

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

UNIVERSITE SAAD DAHLAB BLIDA



Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologie

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme de master

Spécialité : Biotechnologie

Option : Biotechnologie Microbienne

**Optimisation du procédé de lyophilisation pour une
conservation efficace des *Pseudomonas* spp. fluorescents agents
de lutte biologique**

Présenté par :

Fahssi Amel Kaouther

Larbi Samia

Date de soutenance :

Le 15 Juillet 2021

Devant le jury composé de :

- **M^{me} BENCHABANE TOUA D.** **MAA** **Présidente**
- **M^{me} BEN OUSSAID N.** **MCB** **Promotrice**
- **M^{me} BENSAID F.** **MAA** **Examinatrice**

Année universitaire : 2020/2021

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

DEDICACES

Résumé

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Introduction.....1

CHAPITRE I : Les *Pseudomonas* spp. fluorescents

1. Introduction au genre *Pseudomonas*4

1.1. Historique4

1.2. Diversité des *Pseudomonas*5

1.3. Classification scientifique du genre *Pseudomonas*6

1.4. Caractéristiques des *Pseudomonas*6

1.5. Les données de séquençage des *Pseudomonas*7

2. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents phyto bénéfiques8

2.1. Mode d'action et les traits antagonistes des *Pseudomonas* spp. fluorescents associées aux plantes.....8

2.2. Les métabolites secondaires des *Pseudomonas* spp. fluorescents12

2.3. Biofilms et quorum sensing (QS) chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents16

CHAPITRE II: Biopesticides et formulation des *Pseudomonas*

1. Les *Pseudomonas* en tant que biopesticides20

2. Commercialisation des biopesticides à base de *Pseudomonas* spp fluorescents.....21

3. Limites des biopesticides.....22

4.	Les techniques de conservation des <i>Pseudomonas</i>	24
5.	La lyophilisation des <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents	26
6.	Impact du séchage sur la viabilité des bactéries	27
7.	La cryoprotection.....	30

CHAPITRE III: Optimisation du procédé de lyophilisation

1	L'optimisation du procédé de lyophilisation.....	33
1.1	Influence des cryoprotecteurs (CPA) Sur la viabilité	33
1.2	L'influence des cryoprotecteurs sur la capacité du stockage	36
1.3	Effet de la température sur la viabilité.....	38
1.4	Influence des milieux de culture	41
1.5	Influence d'un choc thermique.....	42
1.6	Influence du pH.....	42
1.7	Influence de la concentration cellulaire initiale	43
1.8	Temps de récolte	43
1.9	Les taux de congélation.....	44
1.10	Influence des méthodes de calcul de viabilité sur la précision des résultats	44
2	L'activité de lutte biologique	47
	CONCLUSION.....	51
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	54

REMERCIEMENTS

Au terme de notre travail, Il est de notre devoir d'énoncer notre gratitude et reconnaissance.

Tout d'abord on remercie le tout puissant qui, par sa grâce nous a permis d'arriver au bout de nos efforts en nous donnant la santé, la force, le courage et en nous faisant entourer des merveilleuses personnes dont on tiens à remercier. On remercie :

Notre promotrice Mme Ben Oussaid N. pour ses multiples conseils et ses orientations pour le développement et l'élaboration de notre travail.

Notre Présidente de mémoire, Mme Benchabane Toua D. qui nous a honorés au sein du jury de soutenance.

L'examinatrice Mme Bensaid F. d'avoir accepté d'évaluer notre travail.

Tout l'ensemble des enseignants, Professeur Krimi Z., Mme Ammad F., Professeur Belkahla H. et en particulier Mr le Professeur Benchabane M. pour la qualité de son enseignement, ses conseils et son intérêt incontestable qu'il porte à tous les étudiants.

DEDICACES

On dedie ce travail à :

Nos parents, qui nous ont toujours encouragés dans la poursuite de nos études, ainsi que pour leur aide, leur compréhension et leur soutien.

Nos frères, sœurs, belles sœurs, et tous les membres de la famille, pour leurs encouragements durant notre parcours.

Enfin, nos amies et connaissances, et tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'accomplissement de ce travail.

Résumé

Titre : Optimisation du procédé de lyophilisation pour une conservation efficace des *Pseudomonas* spp. fluorescents agents de lutte biologique

La lyophilisation est une technique couramment utilisée pour la conservation des microorganismes, en particulier les *Pseudomonas* spp. fluorescents qui sont utilisés comme agents de lutte biologique contre divers agents phytopathogènes. Mais les dommages induits par le processus de lyophilisation ne sont pas sans conséquence pour la viabilité des cellules.

Plusieurs études ont été menées pour optimiser le procédé de lyophilisation, en améliorant divers paramètres, à savoir l'ajout des cryoprotecteurs, l'optimisation de la température de croissance, de séchage et de stockage. Il a été approuvé dans plusieurs études que l'ajout des agents cryoprotecteurs (lait écrémé, saccharose et le lactose) augmente le taux de survie des souches des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Par ailleurs, les températures de croissance (20-30°C), de séchage (20-30°C) et de stockage (inférieur à 8°C) ont un impact important sur la viabilité des cellules après lyophilisation. Dans des essais biologiques contre des germes phytopathogènes (*Botrytis cinerea*, *Alternaria radicina*) les souches des *Pseudomonas* spp. fluorescents lyophilisées ont montré une efficacité similaire aux cellules fraîchement produites. Ces résultats soulignent que la qualité du produit formulé peut être améliorée en manipulant les paramètres d'optimisation de lyophilisation.

Mots clés : *Pseudomonas* spp. fluorescents, lutte biologique, lyophilisation, cryoprotecteur, optimisation.

Abstract

Title : Optimization of the freeze-drying process for efficient conservation of fluorescent *Pseudomonas* spp. biological control agents

The freeze drying technique is commonly used for the preservation of microorganisms, in particular fluorescent *Pseudomonas* spp. which are used as biological control agents against various phytopathogenic agents. But the damage induced by the freeze-drying process is not without consequences for the viability of the cells.

Several studies have been carried out to optimize the freeze drying process, by improving various parameters, namely the addition of cryoprotective agents, the optimization of the temperature of growth, drying and storage. The addition of cryoprotective agents (skimmed milk, sucrose and lactose) has been approved in several studies to increase the survival rate of fluorescent *Pseudomonas* spp. strains. In addition, the temperatures of growth (20-30 ° C), drying (20-30 °C) and storage (below than 8°C) have a significant impact on the viability of cells after freeze drying. In biological tests against phytopathogenic germs (*Botrytis cinerea* and *Alternaria radicina*) lyophilized fluorescent *Pseudomonas* spp. strains showed similar efficiency to freshly produced cells. These results point out that the quality of the formulated product can be improved by manipulating the freeze-drying optimization parameters. These results point out that the quality of the formulated product can be improved by manipulating and optimizing the freeze drying parameters

Keywords : Fluorescent *Pseudomonas* spp, biological bontrol, freeze drying, cryoprotective agents, optimization.

ملخص

العنوان: تحسين عملية التجفيف بالتجميد من أجل الحفظ الفعال *Pseudomonas spp. fluorescents* عوامل مكافحة البيولوجية

تستخدم تقنية التجفيف بالتجميد بشكل شائع للحفاظ على الكائنات الحية الدقيقة، ولا سيما *Pseudomonas spp. fluorescents* التي تستخدم كعوامل تحكم بيولوجية ضد العوامل الممرضة للنبات المختلفة. لكن الضرر الناجم عن عملية التجفيف بالتجميد لا يخلو من العواقب على قابلية الحياة للخلايا.

تم إجراء العديد من الدراسات لتحسين عملية التجفيف بالتجميد، من خلال تحسين المعايير المختلفة، وهي إضافة عوامل الحماية من التجميد وتحسين درجة حرارة النمو والتجفيف والتخزين. تمت الموافقة في العديد من الدراسات على ان إضافة المواد الواقية من التجمد (الحليب منزوع الدسم، السكروز والاكروز) يزيد من معدل البقاء على قيد الحياة لسلاسلات *Pseudomonas spp. fluorescents* بالإضافة إلى ذلك، فإن درجات حرارة النمو (20-30 درجة مئوية) والتجفيف (20-30 درجة مئوية) والتخزين (أقل من 8 درجات مئوية) لها تأثير كبير على حيوية الخلايا بعد التجفيف. في الاختبارات البيولوجية ضد الجراثيم الممرضة للنبات (*Alternaria radicina*، *Botrytis cinerea*) أظهرت سلالات *Pseudomonas spp. fluorescents* المجففة بالتجميد فعالية مماثلة للخلايا المنتجة حديثاً. تشير هذه النتائج إلى أنه يمكن تحسين جودة المنتج المركب من خلال معالجة عوامل التجفيف بالتجميد وتحسينها

الكلمات المفتاحية : التجفيف بالتجميد، تحسين، تحكم بيولوجي، عوامل الحماية، *Pseudomonas spp. fluorescents*

LISTE DES ABREVIATIONS

°C : Degré Celsius
ABA : Acide abscissique
ACC : Aminocyclopropane Carboxylate
ADN : Acide Déoxyribo Nucléique
AIA : l'Acide Indole Acétique
ARN : Acide Ribo Nucléique
ARNr : Acide RiboNucléique ribosomal
AS : l'acide salicylique
ATB : Antibiotique
Aw : water activity

CK : Cytokinin

CLP : Composés peptidiques

COV: Composé organique volatile
CPA : Cryo-protective agent
DAPG : Diacétylphloroglucinol
DO : Densité optique
ET : l'éthylène
GA : Acide gibbérellique
HCN: Cyanure d'Hydrogène
IF: Incrementing factor
ISR: Induced systemic resistance
JA : l'acide jasmonique
Mbp : Mega Base pairs
MSLA : Multi Locus Sequence Analysis
NPP : Nombre le plus probable
O₂ : Oxygène
PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PHZ: Phénazine
PLT : Pyolutéorine
QS : Quorum Sensing
ROS: Reactive oxygen species
SAR: systemic acquired resistance
UFC : Unité formant colonie
µm : micro mètre

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Espèces des <i>Pseudomonas</i> sensu stricto et sensu lato	5
Tableau 2: Quelques caractères permettent de caractériser <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> et <i>P. syringae</i>	7
Tableau 3: Les génomes séquencés de <i>Pseudomonas</i>	7
Tableau 4: Comparaison des principaux avantages et inconvénients des techniques utilisées pour la conservation cellulaire	25
Tableau 5: Quelques caractéristiques et substances utilisées comme cryoprotecteurs intracellulaires (CPI) et extracellulaires (CPE)	31
Tableau 6: Pourcentage de survie de différentes combinaisons de composés protecteurs après lyophilisation.....	34
Tableau 7: Effet de la cryoprotection sur la viabilité après lyophilisation	34
Tableau 8: Influence d'apparition d'un agent cryoprotecteur (CPA) sur la viabilité des souches Pf153 et PCL1391	35
Tableau 9: Comparaison de différents agents protecteurs sur la viabilité de <i>P. fluorescens</i> Pf153 après lyophilisation	35
Tableau 10: Viabilité (%) des souches de <i>Pseudomonas</i> après stockage à 4°C	37
Tableau 11: Viabilité (NPP ml-1) avant et après lyophilisation de <i>P. fluorescens</i> Pf153 cultivé à des températures de croissance différentes	39
Tableau 12: Nombre de cellules viables directement après la récolte et avant et après le processus de lyophilisation de Pf153 fermenté à différentes températures pendant différents temps.....	39
Tableau 13: Influence des températures de séchage sur la viabilité des souches Pf153 et PCL1391	40
Tableau 14: Viabilité (NPP ml-1) avant et après lyophilisation de <i>P. fluorescens</i> Pf153 cultivé dans des milieux de culture différentes	41
Tableau 15: Viabilité (NPP ml-1) avant et après lyophilisation de <i>P. fluorescens</i> Pf153 cultivé par un choc thermique	42
Tableau 16: Viabilité (NPP ml-1) avant et après lyophilisation de <i>P. fluorescens</i> Pf153 cultivé à des différents taux de pH.....	43
Tableau 17: Viabilité [NPP ml -1] avant et après lyophilisation de <i>P. putida</i> MF416 et <i>P. fluorescens</i> Pf153	47
Tableau 18: Efficacité des cellules lyophilisées et non lyophilisées de <i>P. putida</i> MF416 contre <i>A. radicina</i> et <i>A. dauci</i> sur graines de carotte	48
Tableau 19: Influence de différents CPA sur l'efficacité de <i>P. fluorescens</i> Pf153 contre <i>B. cinerea</i> sur feuilles détachées de fèves	48
Tableau 20: Influence de la température de croissance et du traitement de choc thermique léger sur l'efficacité des cellules lyophilisées <i>P. fluorescens</i> Pf153 contre <i>B. cinerea</i> sur des feuilles détachées de <i>V. faba</i>	49

LISTE DES FIGURES

Figure 1: contrôle biologique des phytopathogènes par les <i>Pseudomonas</i>	9
Figure 2: Représentation schématique des métabolites secondaires produits par les <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents dans la rhizosphère impliquées dans la lutte biologique contre les phytopathogènes.....	13
Figure 3: Micrographies électroniques à balayage de biofilms de <i>P. fluorescens</i> EvS4-B1 ...	18
Figure 4: Types de biopesticides utilisés dans le monde	20
Figure 5: Distribution industrielle de biopesticides microbiens. Répartition sectorielle basée sur les données de la Direction de la protection des végétaux, de la quarantaine et du stockage, Département de l'agriculture, de la coopération et du bien-être de l'agriculture, gouvernement indien.	21
Figure 6: Les étapes de production et d'évaluation de différents types de biopesticides.	22
Figure 7: Formulation des <i>Pseudomonas fluorescens</i>	23
Figure 8: Principales étapes de traitement lors de la conservation cellulaire des micro-organismes	24
Figure 9: Différences entre les parois des bactéries Gram- et Gram+	27
Figure 10: Exemples de dommages cellulaires causés par la dessiccation	28
Figure 11: Viabilité des cellules lyophilisées des souches Pf153, CHA0, PCL1391 et I112 formulées en lait écrémé, saccharose, glucose, acide lignosulfonique, lactose et sans aucun CPA à 40°C pendant sept jours maximum	37
Figure 12: Perte de survie des lyophilisés <i>P. fluorescens</i> BTP1 pendant stockage à 4°C sous vide avec et sans CPA	38
Figure 13: Effet de la lyophilisation et de la température du stockage (8°C) sur la survie de <i>P. chlororaphis</i>	40
Figure 14: viabilité (%) avant et après lyophilisation par cytométrie en flux	46
Figure 15: Gravité de la maladie de <i>B. cinerea</i> dans un essai biologique sur des feuilles détachées de <i>V.faba</i> avec des préparations lyophilisées de Pf153 cultivées à différentes combinaisons des paramètres de fermentation température et durée de culture.....	50

INTRODUCTION

L'utilisation constante d'engrais chimiques pour augmenter la productivité et nourrir la population croissante a entraîné de nombreux risques environnementaux (**Kalyanasundaram et al., 2021**). Pour cela, la gestion de la santé des sols est vitale pour le maintien de la biodiversité et la sauvegarde d'une production agricole durable, le maintien et la préservation de la santé des sols sont d'une importance primordiale pour la durabilité des écosystèmes (**Pahalvi et al., 2021**).

Les plantes étant immobiles, elles sont incapables de surmonter les conditions environnementales difficiles, les attaques des prédateurs, de parasites et d'agents pathogènes, pour lutter contre ces agents biotiques et abiotiques, elles ont développé un certain nombre de mécanismes qui sont influencés par différents types d'association entre les plantes et les microorganismes du sol (**Singh et al., 2019**).

Ces microorganismes dite plant growth-promoting rhizobacteria PGPR font partie intégrante du sol vivant, non seulement en transformant les nutriments dans le sol, mais aussi avec de multiples fonctions pour influencer la santé du sol et des plantes. Certains des groupes représentatifs de PGPR comprennent les *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia* et en particulier les *Pseudomonas* spp. fluorescents (**Wani et Gopalakrishnan, 2019**).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents constituent le groupe des rhizobactéries le plus diversifié qui les rendent bien adaptées comme agents de contrôle biologique contre plusieurs phytopathogènes, de promotion de la croissance des plantes et la résistance systémique induite, ces effets sont attribués à la capacité d'utiliser les exsudats de graines et de racines, le potentiel de colonisation et de multiplication dans la rhizosphère, la capacité à produire un large éventail de métabolites bioactifs et l'adaptabilité efficacement aux stress environnementaux (**Subashri et al., 2012 ; Madbouly, 2018**).

Pseudomonas spp. fluorescents ont été étudiés pendant des décennies en tant qu'organismes modèles pour la lutte biologique contre les maladies des plantes (**Stockwell et Stack, 2007**). Cependant, la commercialisation des souches microbiennes nécessite de les conditionner sous une forme durable et stable. En effet, en raison de leur physiologie, les cellules microbiennes ne se conservent pas à l'état natif dans leur milieu de culture (**Coulibaly et al., 2011**).

Une application réussie des agents de lutte biologique microbiens dépend du développement d'une formulation appropriée et économiquement faisable. Les formulations doivent livrer un produit final avec une efficacité optimisée (**Bisutti et al., 2015**). Dans ce sens plusieurs techniques de séchage sont adoptées (cryoconservation, atomisation fluidisation et la lyophilisation) (**Alonso, 2016 ; Jain et al., 2020**).

La lyophilisation est la méthode la plus convenable pour conserver la viabilité des bactéries, c'est une opération de déshydratation, généralement sous vide et à basse température, qui consiste à éliminer progressivement l'eau d'un produit congelé principalement par sublimation, la lyophilisation est une technique incluant les étapes de production, de conditionnement et de stockage des *Pseudomonas* spp. fluorescents (**Mputu Kanyinda et al., 2014 ; Alonso, 2016 ; Greffe et Michiels, 2020**), néanmoins, les *Pseudomonas* sont très sensibles à tous formes de séchage surtout en absence de composés protecteurs (**Mputu Kanyinda et al., 2014**).

La lyophilisation sans condition optimisée endommage les cellules au niveau des membranes, ADN et les structures protéiques, ce qui entraîne une perte de viabilité pendant le traitement ainsi que pendant le stockage (**Palmfeldt et al., 2003 ; Craig et al., 2021**). Un processus d'optimisation est nécessaire pour améliorer les conditions de viabilité, de stabilité lors du stockage et pour faciliter la réhydratation ; en ajustant des paramètres et des conditions opératoires à savoir la température de fermentation, l'ajout des cryoprotecteurs et le pH, (**Mputu Kanyinda et al., 2014 ; Bisutti et al., 2015 ; Stephan et al., 2016 ; Bisutti et Stephan, 2019**).

L'objectif de notre travail consiste à réaliser une étude bibliographique sur les *Pseudomonas* spp. fluorescents et leur importance au tant que agents de lutte biologique, ainsi qu'une étude comparative des études basées sur le principe d'optimiser la lyophilisation et son impact sur les *Pseudomonas* spp. fluorescents, tout en gardant leurs viabilité lors du stockage.

Chapitre I : Les *Pseudomonas* spp. fluorescents

1. Introduction au genre *Pseudomonas*

1.1. Historique

Le genre *Pseudomonas* est l'un des genres bactériens les plus divers et omniprésents dont les espèces ont été isolées dans le monde entier dans toutes sortes d'environnements. De l'Antarctique aux Tropiques, présentes dans les sédiments, les échantillons cliniques, les plantes, eau, sol, rhizosphère végétale, mer, déserts, etc... (**Peix et al., 2009**) (Tableau 01).

Il fut apparaitre la 1^{ère} fois par le botaniste Migula de l'institut de Karlsruhe en Allemagne en 1894, sa description était : « cellules avec organe polaire de mobilité. La formation de spores se produit dans certaines espèces, mais il est rare (exp : *Pseudomonas violacea*). Peu de temps après, il a proposé *Pseudomonas pyocyanea* comme espèce type nommé plus tard *Pseudomonas aeruginosa* (**Palleroni, 2010**). Au fur et à mesure que les techniques de caractérisation se sont améliorées, la classification des *Pseudomonas* a changé.

Au début du 20^{ème} siècle, **Orla-Jensen (1909)** a proposé l'utilisation des caractéristiques physiologiques comme critère de base dans la taxonomie bactérienne.

En 1960, le développement des méthodologies d'extraction d'ADN a rendu possible les 1^{ers} études d'homologie d'ADN et les comparaisons génétique appliquées à la taxonomie bactérienne, ainsi que les études des relations entre les espèces des *Pseudomonas* ont été effectués selon la comparaison des ADN et les hybridations ADN-ADN (**Peix et al., 2009**).

Les années 1970 des expériences d'hybridation d'ARNr- ADN on aboutis que le genre *Pseudomonas* se compose de 5 groupes d'homologie d'ARNr (**Hesse et al., 2018**).

De nos jours le gène ARNr 16s étant donnée la molécule clé sur laquelle la taxonomie bactérienne est basé qui a permis une classification phylogénétique des *Pseudomonas* (**Gomila et al., 2015**), un nombre croissant d'espèces appartenant à ce genre dont 102 espèces en 2006, 109 en 2007, 114 en 2008, 118 en 2009 (**Mulet et al., 2010**), 144 en 2015 (**Gomila et al., 2015**), et 180 en 2018 (**Hesse et al., 2018**).

Même si l'ARNr 16s est la base de classification des bactéries, certes que d'autres gènes sont utiliser dans les études taxonomiques : les analyses des séquences multi locus MLSA en utilisant des gènes domestiques tel que "recA, atpD, carA, gyrB, rpoB, rpoD" (**Peix et al., 2009 ; Mulet et al., 2010 ; Gomila et al., 2015**).

Tableau 1: Espèces des *Pseudomonas* sensu stricto et sensu lato (Behrendt et al., 2003 ; Peix et al., 2009).

Sensu stricto (<i>Pseudomonas</i> groupe 1)		Sensu lato	
Espèces	Sources d'isolement de la souche type	Espèces	Sources d'isolement de la souche type
<i>P. aeruginosa</i>	Echantillon clinique	<i>P. strutzeri</i>	Appareil respiratoire des oiseaux
<i>P. cannabina</i>	<i>Cannabis sativa</i>	<i>P. amygdali</i>	<i>Prunus dulcis</i>
<i>P. mendocina</i>	Sol, eau et échantillons cliniques	<i>P. corrugata</i>	<i>Lycopersicon</i> , sous-genre du genre <i>Solanum</i>
<i>P. putida</i>	Sol et eau	<i>P. ficuserectae</i>	<i>Ficus erecta</i>
<i>P. alcaligenes</i>	Eau de piscine	<i>P. flectens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>P. syringae</i>	Lila (<i>Syringa vulgaris</i> , famille Oleaceae)	<i>P. reinekei</i>	Sédiments aérobies de la rivière pollués de l'Elbe en Allemagne.

1.2. Diversité des *Pseudomonas*

Depuis sa découverte, le genre *Pseudomonas* a subi de nombreux changements taxonomiques non seulement en ce qui concerne le nombre d'espèces incluses mais aussi en ce qui concerne les critères utilisés pour leur définition et leur délimitation (Peix et al., 2009). Mis à part les critères morphologiques et les caractéristiques nutritionnelles et métaboliques, la diversité des *Pseudomonas* est basée sur deux facteurs majeurs : Facteur écologique et Facteur génétique (Spiers et al., 2000).

- **Facteur écologique :** l'opportunité écologique est en effet un facteur essentiel et une cause première de diversité, et il est clair que les bactéries ont une capacité remarquable à exploiter les opportunités les plus subtiles. Darwin a été parmi les 1^{ers} à considérer les principales causes de diversité et à proposer deux candidats : l'opportunité écologique (espace de niche libre) et la concurrence entre les espèces qu'il considérait comme moteur de divergence à mesure que la densité bactérienne limite les ressources d'O₂ et des nutriments, ainsi l'effet de productivité et de perturbation et les phages (Spiers et al., 2000).
- **Facteur génétique :** Les facteurs génétiques sont tout aussi importants (bien que les forces écologiques soient les déterminants ultimes des modèles de diversité). Sans variation, il ne peut y avoir ni évolution ni divergence. La variation survient par

mutation et recombinaison, et les deux processus opèrent dans les populations bactériennes (Spiers et al., 2000) :

- ❖ **Mutation** : en scannant les séquences du génome de *P. aeruginosa* PAO₁, il semblait que les *Pseudomonas* n'ont pas de mécanisme mutationnel spécifique qui renforcent la divergence évolutive (Spiers et al., 2000).
- ❖ **Recombinaison** : l'analyse des séquences du génome entier est la mesure dans laquelle les génomes bactériens sont des chimères. L'acquisition de gène et d'élément génétique accessoire (plasmide, transposant, intégrons et phage) et l'analyse des séquences du génome entier révéleront une mosaïque génomique des *Pseudomonas* par conséquent la recombinaison intra-génomique semble être un facteur important dans la diversité des *Pseudomonas* (Spiers et al., 2000).

1.3. Classification scientifique du genre *Pseudomonas*

La classification du genre *Pseudomonas* a été tracé par Migula (1894) dans le Manuel de Bergey 1923 (Das et al, 2020) :

Domaine:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Classe:	Gammaproteobacteria
Ordre :	Pseudomonadales
Famille:	Pseudomonadaceae
Genre :	<i>Pseudomonas</i>

1.4. Caractéristiques des *Pseudomonas*

Ce sont des bacilles à Gram négatif, droits et fins, aux extrémités arrondies ; d'une taille moyenne de 2 sur 5 µm (Palleroni, 1984). Ces bactéries sont mobiles grâce à une ciliature polaire monotriche, lophotriche ou multitriche. Elles se cultivent sur des milieux usuels non enrichis et sont capable d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés comme sources de carbone et d'énergie. Elles présentent un type respiratoire aérobie strict et un type métabolique chimio-organotrophe oxydatif (Meliani, 2012).

L'espèce-type du genre *P. aeruginosa*, est mésophile (entre 20 et 40°C) tandis que la majorité des espèces sont psychrotrophes (Rossignol, 2007) (Tableau 02).

Tableau 2: Quelques caractères permettent de caractériser *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. syringae* (Lelliot et al., 1966 ; Hildebrand et Schroth, 1972).

Caractère	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. syringae</i>
Oxydase	+	+	+	-
Croissance à 0° C	-	+	V	V
Croissance à 41° C	+	-	-	-
Pyocyanine	+	-	-	+
Pyoverdine	+	+	+	+
Arginine d'hydrolase	+	+	+	-

(+) : présence ; (-) : absence ; (V) : Variable

1.5. Les données de séquençage des *Pseudomonas*

Plusieurs génomes de *Pseudomonas* ont été séquencés (Tableau 03), comme exemple, les génomes de *P. putida* mesurent plus de 6 Mbp, dont KT2440 est la meilleure souche caractérisée. C'est une bactérie modèle pour le développement d'applications biotechnologiques et présente un rôle remarquable dans la biorestauration des sols contaminés (Silby et al., 2011).

Tableau 3: Les génomes séquencés de *Pseudomonas* (Silby et al., 2011).

Species/strain	Size*	% G+C*	Genes†	% coding	tRNA†	rRNA†	Released	GenBank	Reference
<i>P. aeruginosa</i>									
PAO1	6 264 404	66.6	5671	89.8	63	13	13/09/2000	AE004091.2	Stover et al. (2000)
PA7	6 588 339	66.4	6396	90.1	65	12	05/07/2007	CP000744.1	Roy et al. (2010)
UCBPP-PA14	6 537 648	66.3	5994	89.8	63	13	06/10/2006	CP000438.1	Lee et al. (2006)
LES858	6 601 757	66.3	6026	88.9	67	13	24/12/2008	FM209186.1	Winstanley et al. (2009)
C3719	6 222 097	66.5	5696	86.6	40	6	04/01/2006	NZ_AAKV00000000†	Mathee et al. (2008)
PA2192	6 905 121	66.2	6203	85.5	44	2	04/01/2006	NZ_AAKW00000000‡	Mathee et al. (2008)
<i>P. entomophila</i>									
L48	5 888 780	64.2	5293	89.8	78	22	10/05/2006	CT573326.1	Vodovar et al. (2006)
<i>P. fluorescens</i>									
Pf0-1	6 438 405	60.6	5741	90.0	73	19	07/10/2005	CP000094.2	Silby et al. (2009)
Pf-5	7 074 893	63.3	6144	88.7	71	16	30/06/2005	CP000076.1	Paulsen et al. (2005)
SBW25	6 722 539	60.5	6009	88.3	66	16	09/01/2008	AM181176.4	Silby et al. (2009)
<i>P. mendocina</i>									
ymp	5 072 807	64.7	4730	90.7	67	12	20/04/2007	CP000680.1	Unpublished
<i>P. putida</i>									
F1	5 959 964	61.9	5423	89.9	76	20	31/05/2007	CP000712.1	Unpublished
GB-1	6 078 430	61.9	5515	90.2	74	22	05/02/2008	CP000926.1	Unpublished
KT2440	6 181 863	61.5	5481	87.5	74	22	22/01/2003	AE015451.1	Nelson et al. (2002)
W619	5 774 330	61.4	5292	89.8	75	22	11/03/2008	CP000949.1	Unpublished
<i>P. stutzeri</i>									
A1501	4 567 418	63.9	4237	90.3	61	13	20/04/2007	CP000304.1	Yan et al. (2008)
<i>P. syringae</i>									
pv. phaseolicola 1448A	5 928 787	57.9	5436§	86.8§	64	16	01/08/2005	CP000058.1	Joardar et al. (2005a, b)
pv. syringae B728a	6 093 698	59.2	5245	88.7	64	16	12/05/2005	CP000075.1	Feil et al. (2005)
pv. tomato DC3000	6 397 126	58.3	5721§	85.6§	64	16	21/08/2003	AE016853.1	Buell et al. (2003)

*Taille, % G + C de <http://www.Pseudomonas.com>, à l'exception de PA2192 et C3719 de Mathee et al. (2008).

†Gènes, % de codage et teneur en ARNr et en ARNt de l'IMG, à l'exception de *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, SBW-25 et Pf-5 (Silby et al., 2009).

‡ Les génomes de ces souches n'ont pas été correctement déposés dans GenBank.

§ Séquences de codage des plasmides inclus dans le comptage des gènes et calcul du % de codage.

2. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents phytobénéfiques

De nombreuses souches fluorescentes de *Pseudomonas* ont été signalées comme des rhizobactéries bénéfiques améliorant la croissance des plantes dites PGPR "Plant Growth Promoting Rhizobacteria" (Kloepper et al., 1980). Ils sont largement étudiés en agriculture pour leur rôle dans l'amélioration des cultures (Kalita et Ram, 2019). La capacité de *Pseudomonas* spp. pour améliorer la croissance des plantes a été attribué à divers mécanismes tels que la production de phytohormones, la solubilisation des nutriments, le HCN, les sidérophores, antibiotiques et l'activité de lutte biologique (Praveen Kumar et al., 2012).

Les meilleurs agents de biocontrôle et les espèces les plus caractérisées sont *P. fluorescens* et *P. putida* (Lalan Sharma et al., 2021). *P. putida* a été largement utilisé dans la stimulation de la croissance de plusieurs plantes telles que le blé, Arabidopsis et le maïs, dans le contrôle biologique de phytopathogènes tels que *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* et dans la bioremédiation des polluants environnementaux (Kandaswamy et al., 2019). Il a été démontré aussi que *P. putida* KT2440 réduit les dommages induits par le stress salin chez les agrumes en diminuant les niveaux de proline et d'ABA (Vives-Peris et al. 2018 ; Aydinoglu et al., 2020). D'autres part, *P. fluorescens* a montré une activité suppressive significative contre une gamme de genres fongiques phytopathogènes, à savoir *Alternaria*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phoma*, *Phytophthora*, *Oospora* et *Erwinia* (Aslan et al., 2004 ; Kalita et Ram, 2019).

2.1. Mode d'action et les traits antagonistes des *Pseudomonas* spp. fluorescents associées aux plantes

Les plantes sont constamment exposées à divers stress biotique et abiotique (minéraux, eau, les animaux, micro-organisme...) qui altèrent la biosynthèse et le développement du végétale, l'association des plantes avec les micro-organismes dans le sol rend la plante plus tolérante aux condition de stress (da Silva Folli-Pereira et al., 2013).

La rhizosphère désigne la zone d'activité microbiologique intense qui s'étend à plusieurs millimètres du système racinaire, elle représente un point chaud d'interaction microbienne, les exudats libérés par les racines des plantes sont la principale source de nutriment pour les rhizobactéries se qui augmente leur densité et leur activité (Maheshwari et al., 2019). L'action de ces rhizobactéries se manifeste en deux manières : direct et indirect (Basit et al., 2021) (figure 01).

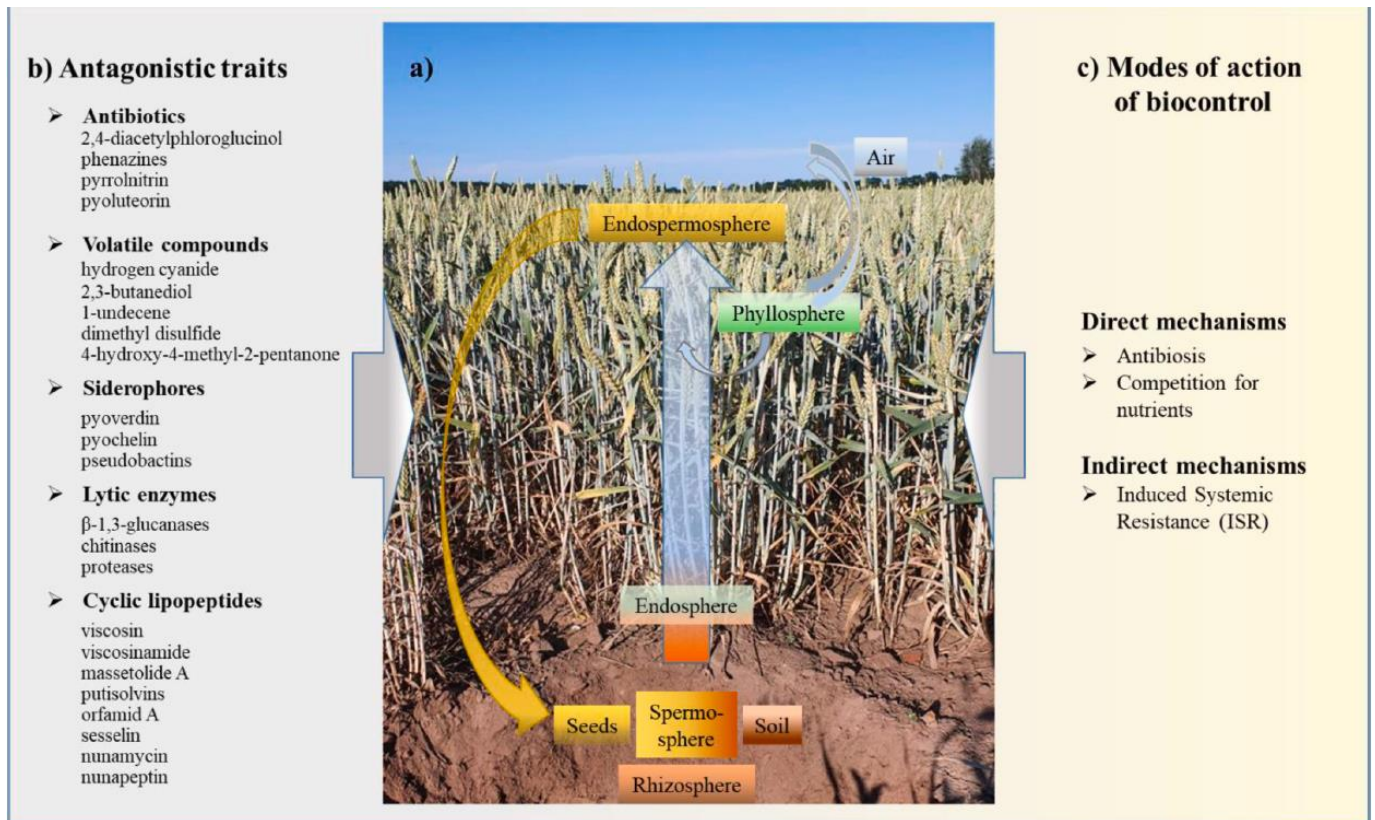


Figure 1: contrôle biologique des phytopathogènes par les *Pseudomonas* (Müller et Behrendt, 2021) :a) cycle de vie des *Pseudomonas* associé aux plantes qui peuvent vivre comme endophyte et épiphyte. b) les *Pseudomonas* présentent un spectre diversifié de traits antagonistes.c) les traits permettent de supprimer les phytopathogène par des mécanismes direct et/ou déclenché des réactions de défense chez les plantes

❖ Action directe

Les PGPR directes améliorent la croissance des plantes en l'absence d'agents pathogènes. Conformément à Vessey (2003), les espèces bactériennes du sol dans la rhizosphère végétale qui poussent dans, sur ou autour des tissus végétaux stimulent la croissance des plantes par une multitude de mécanismes. En plus de fournir le support mécanique et de faciliter l'absorption d'eau et de nutriments, l'activité microbienne dans la rhizosphère affecte les schémas d'enracinement et l'apport de nutriments disponibles aux plantes (Paray et al., 2016 ; Etesami et Adl, 2020).

❖ Action indirecte

Les effets indirects des PGPR incluent des mécanismes qui protège la plante contre les infections (stress biologique) ou aide la plante à se développer sainement sous stress abiotique (Etesami et Adl, 2020) par l'induction de la résistance systémique ISR et la compétition nutritionnelle (Müller et Behrendt, 2021).

Les modes d'action des *Pseudomonas* spp. fluorescents sont déterminés par des caractéristiques antagonistes spécifiques comprenant divers métabolites, qui permet de supprimer les phytopathogènes et, ou bien déclenché des réactions de défense chez les plantes (Müller et Behrendt, 2021).

❖ Production de sidérophores

Le fer présent dans la nature sous forme ferrique Fe_3 est l'un des principaux minéraux présents à la surface de la terre, mais il n'est pas disponible dans le sol pour les plantes.

Les sidérophores chélatent le fer ferrique de l'environnement. Dans des conditions de limitation en fer les sidérophores microbiens fournissent aux plantes du Fe, améliorant ainsi leur croissance, la longueur des racines et le nombre de feuille. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents ont été signalés comme étant impliqués dans le cycle du fer dans la rhizosphère végétale par la production de diverses classes des sidérophores (pyoverdine, pyocheline et pseudomonine) (Ben Oussaid, 2019 ; Das, 2020 ; Yasmeen et al., 2021).

❖ Solubilisation du phosphate et de Potassium

Le phosphore est un macronutriment essentiel et le plus limitant pour la croissance des plantes. Dans la nature, le phosphore se présente sous forme de roches, mais en raison des formes insolubles de phosphate, les plantes ne peuvent pas l'utiliser, il a été révélé que *Pseudomonas* spp. fluorescents solubilisent le phosphate inorganique par la production d'acides organiques de faible poids moléculaire comme l'acide citrique et l'acide gluconique. *Pseudomonas* spp. fluorescents minéralise les phosphates organiques insolubles, tels que les phytates, les phosphomono- di/tri esters et les organophosphonates via les actions de diverses enzymes, phosphatase, phytase et phosphonatase (Parray et al., 2016 ; Das, 2020 ; Etesami et Adl, 2020).

Le potassium est un autre macronutriment essentiel requis pour une bonne croissance des plantes. Il joue un rôle important dans de nombreuses fonctions végétales telles que l'absorption des nutriments, la respiration, la transpiration et l'activité enzymatique. Les concentrations de potassium soluble dans le sol sont généralement très faibles et plus de 90 % du potassium dans le sol existe sous forme de roches insolubles et de minéraux silicatés, les espèces de *Pseudomonas* spp. fluorescents tel que *P. chlororaphis* ont été étudiées pour leur capacité de solubilisation du potassium pour qu'il soit sous une forme disponible pour les plantes (Das, 2020).

❖ Production des composés organiques volatiles (COV's)

Au cours des dernières années, certaines études ont rapporté des effets physiologiques et cellulaires sur les plantules végétales en réponse à une exposition aux composés organiques volatiles microbiens. Des études ont montré que les COVs tel que les HCN produit par les *P. fluorescens*, peuvent induire la croissance principalement par quatre mécanismes : la modulation des nutriments essentiels, l'équilibre hormonal, le métabolisme et les concentrations de sucre (Fincheira et Quiroz, 2018 ; Walia et al., 2021).

❖ Sécrétion de phytohormones

Sous un stress abiotique tel que la sécheresse, l'engorgement, les températures extrêmes, la salinité et le stress oxydatif, la production d'une variété de phytohormone et des régulateurs de croissances comme ABA, GA, CK et AIA par les *Pseudomonas* spp. fluorescents peut altérer l'architecture des racines et favorise le développement des plantes. Il a été rapporté que les phytohormones telles que les auxines, AIA, les cytokinines, les gibbérellines rhizosphérique jouent un rôle important dans l'augmentation de la surface racinaire, prolifération des racines, stimule la germination des graines et des tubercules et la division cellulaire, qui à leur tour augmentent l'absorption de nutriments et d'eau par la plante (Parray et al., 2016; Etesami et Adl, 2020).

❖ L'ACC désaminase

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents possédant l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase facilitent la croissance et le développement des plantes en diminuant les niveaux d'éthylène qui a un effet très nocif, en induisant la tolérance au sel et en réduisant le stress hydrique chez les plantes (Parray et al., 2016 ; Das, 2020).

❖ Compétition pour les nutriments

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents inhibent les agents phytopathogènes en imposant une compétition pour les nutriments et l'espace dans la rhizosphère. La réduction de la concentration d'éléments essentiels comme le carbone, l'azote, le phosphore et d'autres micro-éléments conduit souvent à diminuer la germination des spores et à une croissance plus lente du tube germinatif (Walia et al., 2021). Dans des conditions limitées en fer, les *Pseudomonas* spp. fluorescents produit des siderophores pour acquérir de manière compétitive des ions ferriques ce qui prive les champignons pathogènes de cet élément essentiel car les sidérophores fongiques ont une affinité plus faible (Parray et al., 2016).

❖ **La résistance systémique induite (ISR)**

La résistance systémique induite ISR est phénotypiquement similaire à la résistance systémique acquise SAR. Les ISR sont un mode d'action des rhizobactéries stimulant la croissance des plantes PGPR, en particulier *Pseudomonas* spp. fluorescentes, dans la suppression des maladies (Bakker et al., 2007). Dans les stress biotique l'immunité des plantes est produite par trois voies de signalisation principales : l'acide salicylique SA, l'acide jasmonique JA et l'éthylène ET (Frag et al., 2013 ; Fincheira et Quiroz, 2018).

Les ISR peuvent soit induire un changement soutenu des plantes qui augmente la capacité de tolérance à l'infection par les agents pathogènes, soit induire les défenses locales et/ou systémiques de l'hôte de la plante entière contre un large spectre d'agents ce mécanisme est principalement médiée par l'JA et/ou l'éthylène (Walia et al., 2021). Des éliciteurs déclenchent l'état de ISR contre de multiples phytopathogènes sont les lipopolysaccharides, les sidérophores (pseudobactines et pyocheline), les flagelles, les antibiotiques (pyocyanine, 2,4-diacétylphloroglucinol) ... (Müller et Behrendt, 2021).

❖ **L'antibiose**

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents protègent la plante contre les agents phytopathogènes en les contrôlent ou les inhibent par la production des antibiotiques (ATB). Les antibiotiques produits par *Pseudomonas* spp. fluorescent appartiennent à six classes, les phloroglucinols, les phénazines, la pyloutéorine, la pyrrolnitrine, les lipopeptides cycliques (tous diffusibles) et le cyanure d'hydrogène volatile (Narayanasamy, 2013). Des ATB, tel que les PHZ qui ont un effet contre *Gaeumannomyces graminis*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* et *Verticillium longisporum*. La production des DAPG contre *Fusarium oxysporum*, *Aphanomyces cochlioides*, *Xanthomonas oryzae*, *Rhizoctonia solani* et *sclerotium rolfsii*. Ces ATB affectent l'activité métabolique des organismes pathogènes (Narayanasamy, 2013 ; Kumar et al., 2015 ; Walia et al., 2021).

2.2. Les métabolites secondaires des *Pseudomonas* spp. fluorescents

Différents types des métabolites ont été distingués chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents d'où ils occupent une place importante au niveau de la rhizosphère (figure 02), en synthétisant une large gamme de métabolites secondaires (antibiotiques, sidérophores, phytohormones...).

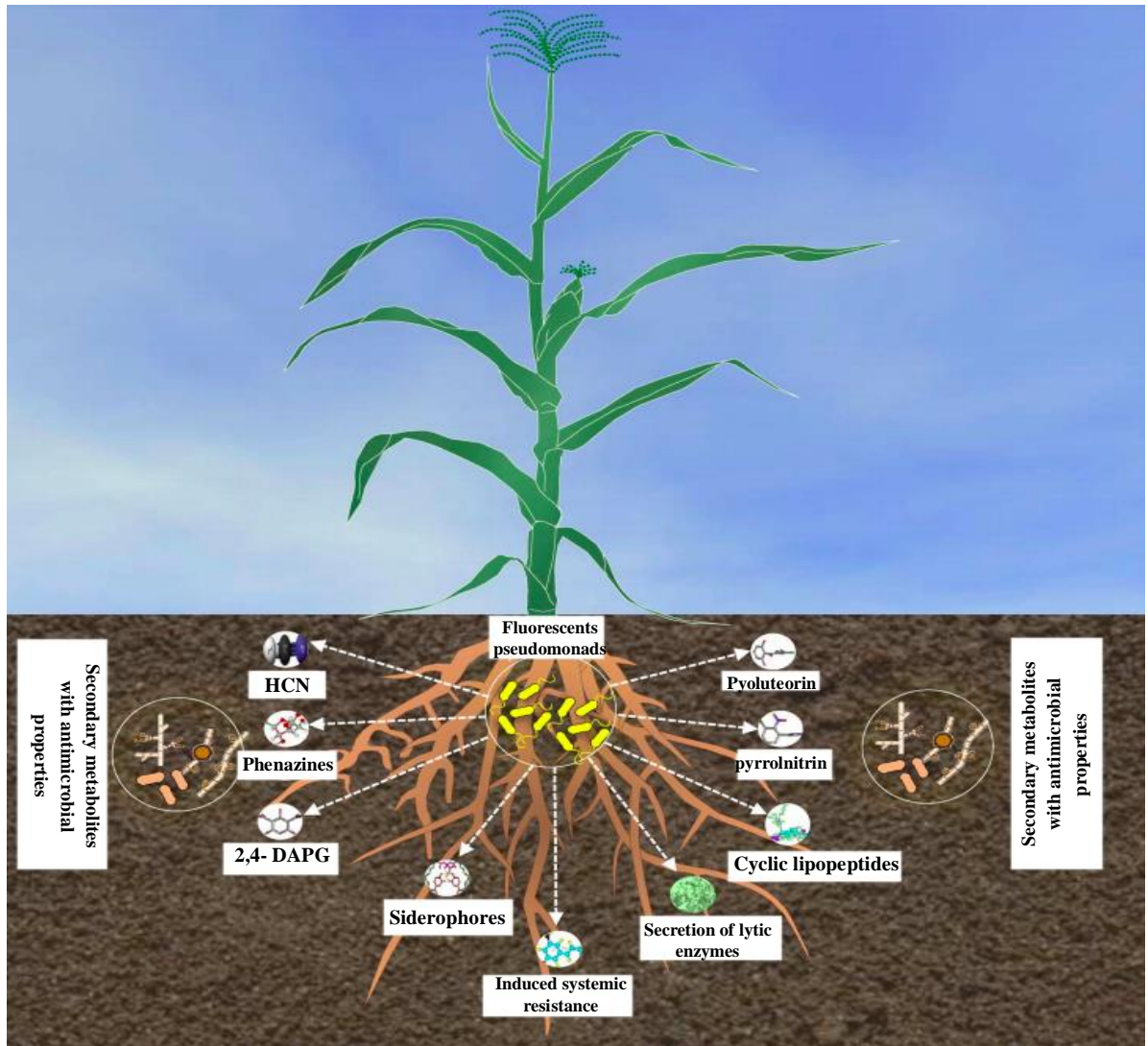


Figure 2: Représentation schématique des métabolites secondaires produits par les *Pseudomonas* spp. fluorescents dans la rhizosphère impliquées dans la lutte biologique contre les phytopathogènes (Mishra et Arora, 2017).

❖ Sidérophores

Les sidérophores du grec « porteurs de fer » sont définis comme des agents chélatants spécifiques des ions ferriques de poids moléculaire relativement bas, élaborés par des bactéries et des champignons poussant sous un faible stress en fer (Neilands, 1995). Ils ont la capacité de séquestrer les ions ferriques et d'acquérir de manière compétitive le fer des micro-environnements limitant le fer, empêchant ainsi la croissance d'autres micro-organismes (Das et al., 2007). Les *Pseudomonas* spp. produisent un mélange de Fe-pyoverdine qui joue un rôle clé dans l'absorption du fer par *Arabidopsis thaliana* (Afzal et Asad, 2019). Une plante modèle, *A. thaliana* qui a accumulé un niveau accru de Fe synthétisé par *Pseudomonas fluorescens* à partir du complexe Fe-pyoverdine, ce qui a considérablement amélioré la croissance des plantes par rapport aux plantes témoins (Parray et al., 2016).

❖ 2,4-Diacétylphloroglucinol (DAPG)

Le DAPG est un antibiotique produit par plusieurs *Pseudomonas* sp., dont 2P24, CHA0, Pf-5 et YGJ3, et il joue un rôle clé dans l'inhibition de la croissance des micro-organismes pathogènes entourant la rhizosphère végétale. Il a été rapporté que le DAPG produit par *P. fluorescens* a inhibé la croissance de la brûlure bactérienne du riz *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, une bactérie pathogène dévastatrice. Lors de tests de laboratoire, et qu'il a supprimé la maladie bactérienne de 59 % à 64 % lors de tests sur le terrain et en serres (Velusamy et al., 2006). En tant que métabolite secondaire phénolique, le DAPG de certaines bactéries a montré sa capacité à contrôler divers agents pathogènes des plantes. Par exemple : *P. fluorescens* CHA0 protège les plantes contre la pourriture noire des racines du tabac (Zhao et al., 2020).

❖ Phénazines (PHZ)

Les PHZ sont des molécules hétérocycliques contenant de l'azote actif redox présentant une activité antibiotique à large spectre contre de nombreux pathogènes végétaux d'origine fongiques, bactériens et oomycètes, y compris *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Streptomyces scabies*, *Pythium* spp et *Phytophthora infestans* (Biessy et Filion, 2018). Une nouvelle souche de *Pseudomonas fluorescens*, LBUM636, isolée d'un champ à Bouctouche, Canada et produisant l'antibiotique PHZ, montre une forte activité antagoniste contre le *phytophthora infestans* et un bon potentiel de biocontrôle contre le mildiou de la pomme de terre (Morrison et al., 2017). La production de PHZ joue également un rôle dans plusieurs processus physiologiques, notamment la formation de biofilm et la réduction du fer (Biessy et Filion, 2018).

❖ Pyolutéorine (PLT)

La PLT est un antibiotique produit par différents *Pseudomonas*, possède également un pouvoir fongitoxique efficace contre les oomycètes, notamment *Pythium ultimum*. Cette molécule, isolée pour la première fois chez *P. aeruginosa*, est composée d'un anneau résocriinol synthétisé par la voie de polycétide, relié à une partie pyrrolle bichlorée (Allaire, 2005). La PLT est produite par plusieurs espèces de *Pseudomonas* mais son rôle dans la suppression d'agents phytopathogènes a été étudié surtout chez les souches de *P. fluorescens* CHA0 et Pf-5 (Vinay et al., 2016).

❖ **Cyanure d'hydrogène (HCN)**

La production de HCN semble confinée aux Protéobactéries et elle a été mise en évidence chez plusieurs souches de *P. fluorescens*. La production de HCN par les *Pseudomonas* est impliquée dans la suppression d'agents pathogènes comme *Thielavopsis basicola*, *Septoria tritici* et *Puccinia recondita*. Le composé agit directement sur les cellules de l'agent pathogène en bloquant la cytochrome oxydase dans la chaîne respiratoire (Meliani, 2012). Il a été rapporté que le HCN est impliqué dans la chélation des métaux et augmente ainsi la disponibilité du phosphate pour la plante (Rijavec et Lapanje, 2016).

❖ **Composés peptidique (CLP)**

Les CLPs sont des biosurfactants produits par *Pseudomonas* spp., qui constituent une classe diversifiée de composés naturels bioactifs polyvalents (viscosin, viscosinamide, massetolide A, putisolvins, orfamid A, ...) (Müller et Behrendt, 2021). Leur intérêt est la lutte contre les agents pathogènes multirésistants en milieu clinique et ils sont utilisés comme agents de lutte biologique. Ils présentent aussi des activités antagonistes claires contre les bactéries Gram positives, tel que les *Staphylococcus aureus*, y compris les souches sensibles et résistantes à la méthicilline (Geudens et Martins, 2018).

Le mode d'action des CLP est attribué à leur capacité à pénétrer la membrane plasmique et à modifier l'intégrité membranaire des microbes cibles, des cellules et/ou des tissus, entraînant une fuite hyphale et une ramification étendue (Omoboye et al., 2019). Un exemple des bananamides qui sont nommés ainsi parce qu'ils ne sont produits que par *P. fluorescens* collecté sur le rhizoplane du bananier dans les zones humides de Galagedara, au Sri Lanka. La souche COW3 a efficacement supprimé la pourriture des racines du taro causé par *Pythium myriotylum* (Oni et al., 2019). Des études récentes ont montré la capacité de la souche COW3 à induire une résistance systémique contre *Pyricularia oryzae* (Omoboye et al., 2019).

❖ **Enzymes Lytiques**

L'amélioration de la croissance par l'activité enzymatique est un autre mécanisme, utilisé par les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes. Ces dernières, peuvent produire certaines enzymes : telles que les chinases, les déshydrogénases, les lipases et les protéases, qui présentent une activité hyperparasitaire, attaquant les agents pathogènes (Ben Oussaid, 2019). Une étude a rapporté que la souche *P. fluorescens* PF-5 agit comme un bio-agent en produisant des enzymes hydrolytiques pour inhiber *Fusarium*

oxysporum f. sp. *cumini* (Foc) agent causal de flétrissure du cumin, et favorise la croissance des plantes du cumin (Rathore et al., 2020).

❖ **Acide indole-3-acétique (AIA)**

L'AIA est une phytohormone (auxine naturelle) importante ayant la capacité de contrôler le développement des plantes de manière à la fois bénéfique et délétère. L'AIA bactérienne stimule la formation des poils racinaires tout en augmentant le nombre et la longueur des racines latérales (Duca et al., 2014). Il a été démontré dans une étude *in vitro* que la souche *P. putida* UB1 et son AIA purifié, ont un effet stimulateur sur les plants de moutarde *Brassica nigra* (Bharucha et al., 2013).

2.3. Biofilms et quorum sensing (QS) chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents

Les bactéries sont capables de réguler leur densité de population grâce à la libération et à la détection des molécules de signal, c'est à dire 'quorum sensing' (Fuqua et al., 1994 ; Bassler, 2002). La détection du QS implique la régulation des gènes qui contrôlent la motilité, la synthèse d'antibiotiques et la formation de biofilm (Scales et al., 2014). Les gènes impliqués dans la formation de biofilm et la détection de QS se trouvent dans le génome central du complexe d'espèces *P. fluorescens* (Loper et al., 2012). Le QS et les biofilms font partie intégrante des nombreuses niches environnementales occupées par *P. fluorescens* et lui permettent de coloniser des surfaces telles que l'équipement hospitalier et les surfaces en acier inoxydable de qualité alimentaire (Daneshvar et Truelstrup, 2013), ainsi que les surfaces des plantes (Feazel et al., 2009).

P. fluorescens forme facilement des biofilms avec des structures tridimensionnelles (3-D) très complexes (Figure 03) (Baum et al., 2009) et les souches qui forment des biofilms associés aux plantes sont souvent d'importants agents de lutte biologique qui protègent les plantes contre les champignons pathogènes (Bloemberg et Lugtenberg, 2001). Deux types de systèmes de QS ont été décrits pour *P. fluorescens* : les systèmes AHL/ *lux* et *hdtS*.

Chez les bactéries à Gram négatif, les molécules AHL sont produites par des protéines de type *LuxI* et interagissent avec des protéines de type *LuxR* pour former des complexes AHL-*LuxR* doubles. Ce complexe AHL-*LuxR* lie ensuite les boîtes *lux* de gènes régulés par le quorum sensing afin d'activer/augmenter ou désactiver/diminuer leur expression (Whitehead et al., 2001).

Un système de type *luxI-luxR* chez *P. fluorescens* a été découvert pour la première fois dans la souche NCIMB 10586 et a été appelé système *mpuI-mpuR* en raison de sa régulation de la voie de biosynthèse de la mupirocine antimicrobienne (El-Sayed et al., 2001).

Un autre système de détection, le système *hdtS*, a été découvert plus tard dans la souche F113 de *P. fluorescens* (Laue et al., 2000). Le gène *hdtS* code pour une nouvelle AHL synthase qui produit des molécules de signalisation distinctes : une *N*-(3-hydroxy-7-*cis*-tétradécénoyl) homosérine lactone (3-OH-C_{14:1}-AHL), une *N*-décanoylhomosérine lactone (C₁₀-AHL), et un C₆-AHL. Bien que les molécules de signalisation et la synthase aient été élucidées, les gènes régulés par le système *hdtS* sont encore inconnus, et aucun phénotype détectable dans F113 n'a encore été lié aux molécules de signalisation (Laue et al., 2000).

Le deuxième messager, di-GMP cyclique (c-di-GMP) qui est essentiel pour la régulation des étapes impliquées dans la formation de biofilm, y compris la production de LapA, une protéine adhésive nécessaire à la fixation de *P. fluorescens* aux surfaces (Navarro et al., 2011). LapA est régulée négativement par la protéase périplasmique LapG et positivement régulée par la protéine de la membrane interne LapD (Newell et al., 2011a). LapG clive généralement LapA de la surface bactérienne, mais lorsque LapD est lié par c-di-GMP, LapD subit un changement de conformation qui lui permet de se lier à LapG, inhibant le clivage de LapA. Les diguanylate cyclases catalysent l'activité de la c-di-GMP synthase, et dans *P. fluorescens* Pf0-1, il existe un total de 43 diguanylate cyclases potentielles codées dans le génome, chacune potentiellement liée à un aspect différent de la formation de biofilm (Newell et al., 2011b).

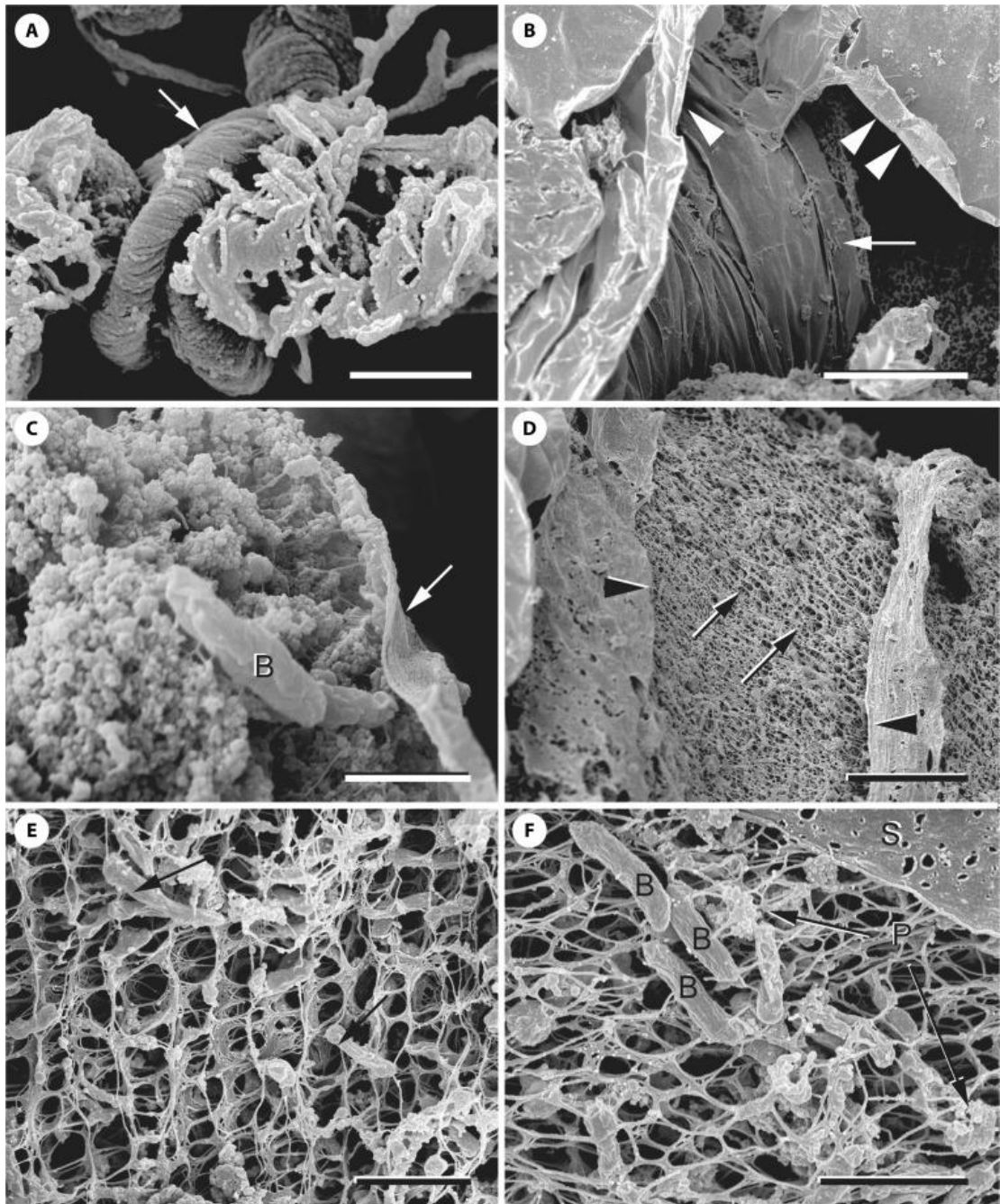


Figure 3: Micrographies électroniques à balayage de biofilms de *P. fluorescens* EvS4-B1 (Baum et al., 2009).

A) Structures fibrillaires constituées de fibres torsadées (flèche). Barre = 1 μm . (B) Feuilles plates de matériau (pointes de flèches), avec certaines des feuilles enroulées autour d'autres structures (flèche). Barre = 20 μm . (C) Le noyau intérieur des structures « enveloppées », composé de bactéries (B) intégrées dans une matrice extracellulaire de particules et d'une fine feuille de matériau (flèche). Barre = 1 μm . (D) La feuille externe (pointes de flèches), qui enveloppe un noyau interne constitué de fibres formant des structures irrégulières en forme de réseau (flèches). Barre = 10 μm . (E) Réseau constitué de fibres disposées selon un motif périodique, avec des bactéries (flèches) dispersées dans tout le réseau. Barre = 2 μm . (F) Une feuille de matériau (S), constituée de matériau extracellulaire et de cellules mortes, recouvrant et se fixant au réseau de fibres et comprenant des bactéries associées (B) et des particules (P). Barre = 2 μm

Chapitre II :
Biopesticides et formulation des
***Pseudomonas* spp. fluorescents**

1. Les *Pseudomonas* en tant que biopesticides

Les pesticides microbiens ont été utilisés comme agent de lutte biologique pour contrôler un certain nombre de maladies microbiennes en appliquant sur les graines et les racines. Ils offrent les avantages d'une plus grande sélectivité et d'une toxicité moindre ou nulle par rapport aux pesticides chimiques conventionnels (Mishra et al., 2014).

Pseudomonas fluorescens est le principal agent biologique vital appliqué contre diverses maladies des plantes et possède également des propriétés de biocontrôle et peut donc être utilisé pour lutter contre les insectes nuisibles (Wahengbam et al., 2020).

A l'échelle mondiale, les biopesticides bactériens revendiquent environ 60% du marché mondial des biopesticides (Figure 04). Ils ne représentent que 5% du marché total de la protection des cultures dans le monde avec une valeur de 3 milliards de dollars. En raison des processus d'enregistrement très longs et compliqués dans l'Union européenne, un très petit nombre de biopesticides ont été enregistrés par rapport au Brésil, aux États-Unis, en Chine et en Inde (Thakur et al., 2020).

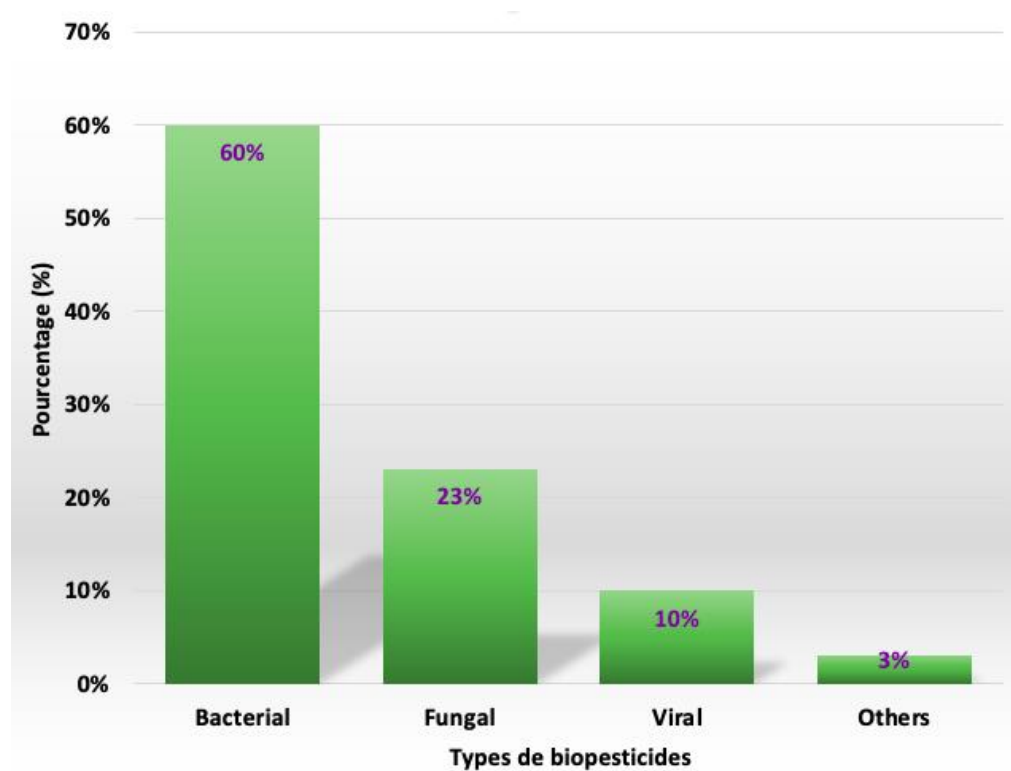


Figure 4: Types de biopesticides utilisés dans le monde (Kabaluk, 2010).

Pour l'Inde, 20% des biopesticides bactériens sont d'origine *Pseudomonas fluorescens*

(Figure 05) (Keswani et al., 2019).

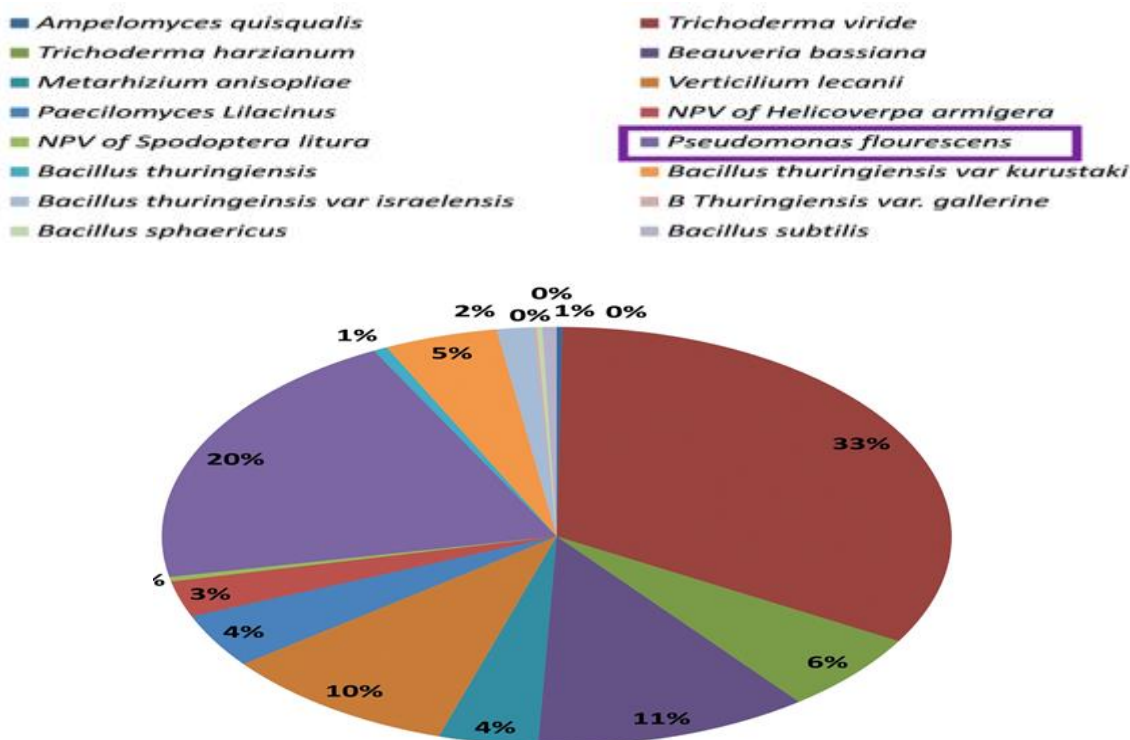


Figure 5: Distribution industrielle des biopesticides microbiens. Répartition sectorielle basée sur les données de la Direction de la protection des végétaux, de la quarantaine et du stockage, Département de l'agriculture, de la coopération et du bien-être de l'agriculture, gouvernement indien (Keswani et al., 2019).

2. Commercialisation des biopesticides à base de *Pseudomonas* spp fluorescents

Production de pesticides microbiens tels que les *Pseudomonas* spp. fluorescents suit une procédure dont les micro-organismes antagonistes sont collectés à partir de sources telles que l'étable, les champs de foin, la rhizosphère, le compost et le fumier. Ils sont isolés en cultures pures en laboratoire et maintenus dans des géloses inclinées. Des essais d'efficacité *in vitro* sont menés selon des méthodes telles que la double culture, la diffusion sur disques d'agar et la diffusion dans des puits d'agar. Les micro-organismes actifs sont multipliés sur un substrat approprié en laboratoire et mélangés avec des supports, des activateurs et des stabilisants pour une application sur le terrain (Lengai et Muthomi, 2018). Des essais d'efficacité répétés en laboratoires et sur le terrain sont menés jusqu'au début du processus d'enregistrement (Figure 06).

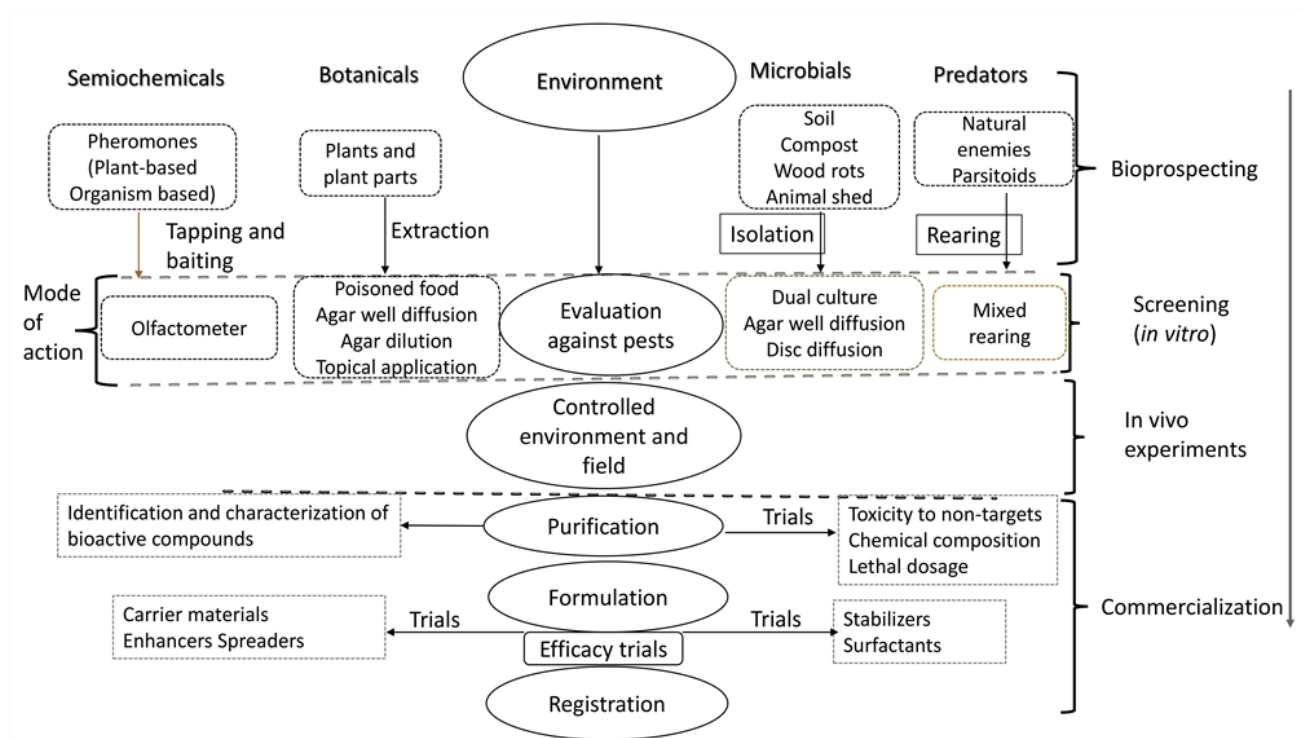


Figure 6: Les étapes de production et d'évaluation de différents types de biopesticides (Lengai et Muthomi, 2018).

3. Limites des biopesticides

Biopesticides offrent bien qu'une approche prometteuse dans la gestion intégrée des ravageurs pour une agriculture durable, mais leur adoption n'est toujours pas à la hauteur en raison de diverses contraintes. Tels que : La vente généralisée de produits de qualité inférieure (faible nombre d'UFC) faux biopesticides (pas de produits à numération d'UFC) et mal étiquetés (contenant des pesticides bioproducts-pseudo-biopesticides) (Keswani et al., 2019). Certaines contraintes importantes associées aux biopesticides à base de *Pseudomonas* spp. fluorescents sont les suivantes (Lengai et Muthomi, 2018 ; Sharma et Gaur, 2021) :

- La mauvaise qualité et la durée de conservation des souches (risque de contamination).
- Le cout de production et d'enregistrement (imposition de la taxe) est très élevé.
- La Concurrence avec les pesticides chimiques.
- La sensibilisation aux biopesticides est insuffisante.

Pour produire industriellement des biopesticides et les conserver à long terme, des techniques de conservation tel que la lyophilisation, peut être une solution convenable pour résoudre le problème de la commercialisation (Sharma et Gaur, 2021).

Les formulations à durée de conservation prolongée comprennent les granulés, les pastilles et les biopesticides à base de poudre sèche (figure 07). Les granulés qui sont adaptés pour les *Pseudomonas* spp. fluorescents peuvent protéger l'agent actif de la dessiccation et également fournir une nourriture de base pour l'agent. La formulation en poudre est facile à appliquer en la suspendant dans l'eau avec une large zone d'application (Amin, 2013 ; Sharma et Gaur, 2021).



Figure 7: Formulation des *Pseudomonas fluorescens* (a : format liquide ; b : format poudre et c : capsules en gélatine) (source : indiamart : <https://www.indiamart.com/>)

4. Les techniques de conservation des *Pseudomonas*

Les souches *Pseudomonas* spp. fluorescents nécessitent un conditionnement stable durant une longue période en vue de leur commercialisation. C'est pour cela qu'il est nécessaire de stabiliser les populations microbiennes par le séchage qui semble être une méthode de conservation très efficace (Mputu Kanyinda *et al.*, 2014). La figure 8 représente les étapes de traitement lors de la conservation cellulaire des micro-organismes (Alonso, 2016).

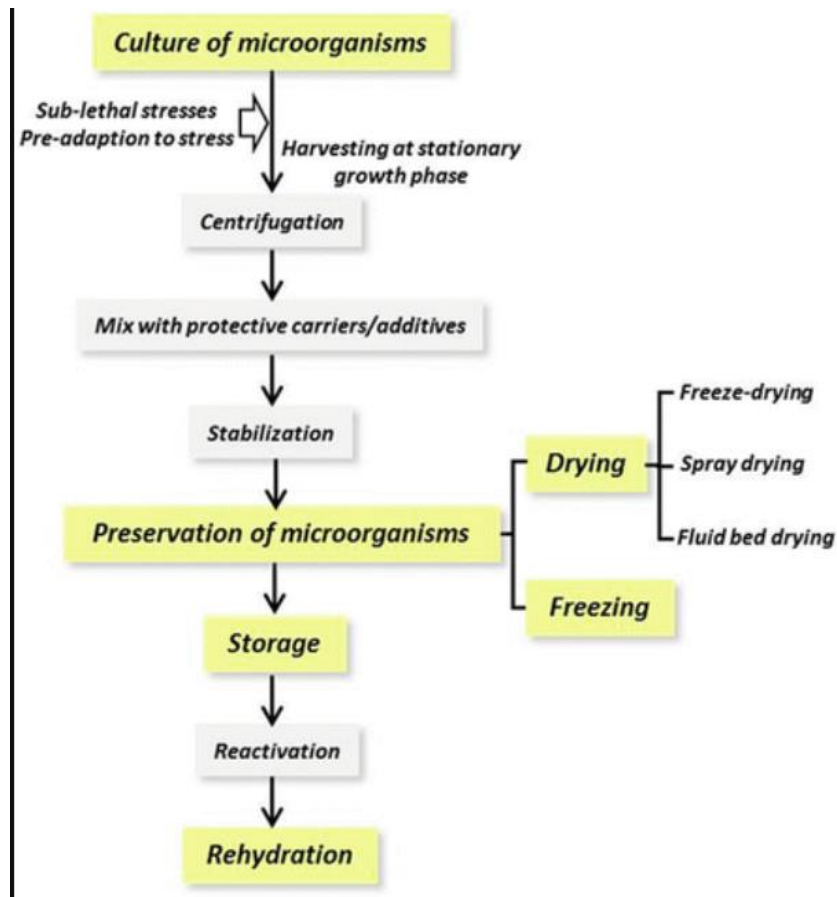


Figure 8: Principales étapes de traitement lors de la conservation cellulaire des micro-organismes (Alonso, 2016).

Les principales techniques de séchage sont les suivants (Alonso, 2016 ; Jain *et al.*, 2020) :

- ❖ **Cryoconservation** : est la conservation des cultures dans l'azote liquide à ultra-basse température (-196 °C). Le stockage à cette température suspend le métabolisme des cellules qui est donc considéré comme le meilleur en termes de viabilité et de stabilité génétique.
- ❖ **Atomisation** : implique l'évaporation de l'eau par pulvérisation d'une solution homogène dans une chambre de séchage. L'application de températures élevées est nécessaire pour faciliter l'évaporation de l'eau tout au long du processus.

- ❖ **Fluidisation** : le séchage a lit fluidisé implique l'évaporation de l'eau de la poudre ou des particules humides à l'aide d'air chaud.
- ❖ **Lyophilisation** : est basée sur le principe de la sublimation, cette dernière se produit lorsqu'un liquide congelé passe directement à l'état gazeux sans entrer dans une phase liquide.

La cryoconservation est la technique la plus privilégiée pour sauvegarder les cultures microbiennes dans les centres de ressources biologiques (**Peiren et al., 2015**). Cependant, d'autres techniques (Tableau 04) comme la lyophilisation qui est une méthode moins dommageable mais coûteuse, tandis que le séchage par atomisation est le plus dommageable en raison de la grande perte d'eau et les contraintes thermiques, ce qui crée une condition stressante pour les cellules, mais reste une méthode rentable (**Alonso, 2016**).

Tableau 4: Comparaison des principaux avantages et inconvénients des techniques utilisées pour la conservation cellulaire (**Alonso, 2016**).

Technique	Avantage	inconvénient
Cryoconservation	Protocole à faible cout Taux de réussite élevé Haute densité cellulaire	Consommation d'énergie élevée En fonction de la température de stockage Cryoprotecteurs requis
Atomisation	Fonctionnement évolutif Production continue Rentable	Dépendant de la souche Contraintes thermiques Dépendant de la réhydratation
Fluidisation	Moins de contraintes thermiques Chauffage rapide Fonctionnement évolutif	Applicabilité de contrainte limitée Dépendant de la réhydratation
Lyophilisation	Manipulation facile Transport facile Stockage longue durée	Coûts d'exploitation élevés Procédure complexe Cryoprotecteurs requis

De nos jours les microorganismes sont utiliser dans une large gamme d'application en agriculture pour cela une conservation approprier est nécessaire pour garder leur viabilité et leur effet bénéfique, les *Pseudomonas* spp. fluorescents étant données des microorganismes

utiliser dans la lutte biologique la méthode de conservation la plus fiable et satisfaisante est la lyophilisation (Mputu Kanyinda *et al.*, 2014).

5. La lyophilisation des *Pseudomonas* spp. fluorescents

La lyophilisation a été effectuée pour la première fois en 1890. A l'échelle industrielle, la lyophilisation a commencé avec la production de plasma sanguin et de penicillium conservés (Stephan *et al.*, 2016). Aujourd'hui, elle est une méthode établie pour préserver et stocker les micro-organismes à long terme sans qu'ils perdent leur potentiels métaboliques (Jain *et al.*, 2020). La dessiccation des *Pseudomonas* spp. fluorescents commence par l'étape de congélation suivie d'une sublimation et en dernière une désorption de l'eau contenue dans le produit (Stephan *et al.*, 2016).

Dans un premier temps, une culture cellulaire est congelée, provoquant le passage des molécules d'eau extra- et intracellulaires à leur état solide. L'eau extracellulaire gèle en premier. L'eau intracellulaire gèle en dessous de -5 °C ou s'écoule à l'extérieur de la cellule en raison des changements d'osmolarité et de pression de vapeur et gèle à l'extérieur (El-kest et Marth, 1992). L'étape de congélation est de préférence effectuée rapidement de telle sorte que la quantité de gros cristaux de glace qui perforeront potentiellement la membrane cellulaire soit limitée (Morgan *et al.*, 2006) et que la morphologie cellulaire soit maintenue (El-kest et Marth, 1992).

Dans la phase de séchage primaire, la culture congelée est exposée à une pression extrêmement basse, ce qui provoque la sublimation de la glace et son retrait de l'échantillon. Cela se produit à basse température pour empêcher l'effondrement de la glace par fonte (Morgan *et al.*, 2006).

La phase de séchage secondaire est effectuée pour éliminer l'eau liée et se produit à des températures plus élevées (Trelea *et al.*, 2016). Parce que l'échantillon est congelé, le stress de dessiccation pendant le processus de séchage est très limité. Cependant, lorsqu'elles sont stockées, les macromolécules peuvent subir des dommages mortels probablement à cause des réactions de Maillard et du stress oxydatif causé par le contact direct avec l'air (Achour *et al.*, 2001 ; Carvalho *et al.*, 2008 ; Stephan *et al.*, 2016).

Lorsque les cultures séchées sont réhydratées, les molécules d'eau retournent dans la cellule, ce qui permet aux molécules de retrouver leur mobilité et l'activité cellulaire peut être initiée (Grefte et Michiels, 2020).

6. Impact du séchage sur la viabilité des bactéries

Selon **Berninger et al. (2017)** le séchage des bactéries est généralement le processus le plus crucial pour déterminer la viabilité. Cependant, les techniques de séchage peuvent entraîner des dommages à la membrane cellulaire, en raison de la constitution de la paroi cellulaires des bactéries Gram⁻ qui est fine et élastique, et qu'elle est couverte d'une membrane externe contenant les lipides liés de manière covalente à des polysaccharides, tandis que celle des bactéries Gram⁺ est épaisse et rigide (**Coulibaly et al., 2008 ; Volodymyr, 2011**). Les bactéries Gram⁻ 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⁺ (Figure 09) (**Beveridge, 1999 ; Tripathi et al., 2012**). Les parois cellulaires des bactéries Gram⁻, avec une couche plus mince de peptidoglycane que celle des bactéries Gram⁺, ont tendance à se rompre plus facilement pendant les processus de dessiccation et de réhydratation (**Pembrey et al., 1999**). L'absence d'acide teichoïque chez les bactéries Gram⁻ réduit encore leur résistance au séchage par rapport aux bactéries Gram⁺. Enfin, la plupart des bactéries Gram⁻ ont des lipopolysaccharides sur leur surface, ces lipopolysaccharides peuvent piéger des molécules d'eau, entraînant une baisse des taux de survie au cours du stockage à long terme (**Miyamoto-Shinohara et al., 2008 ; Mputu Kanyinda et al., 2014**).

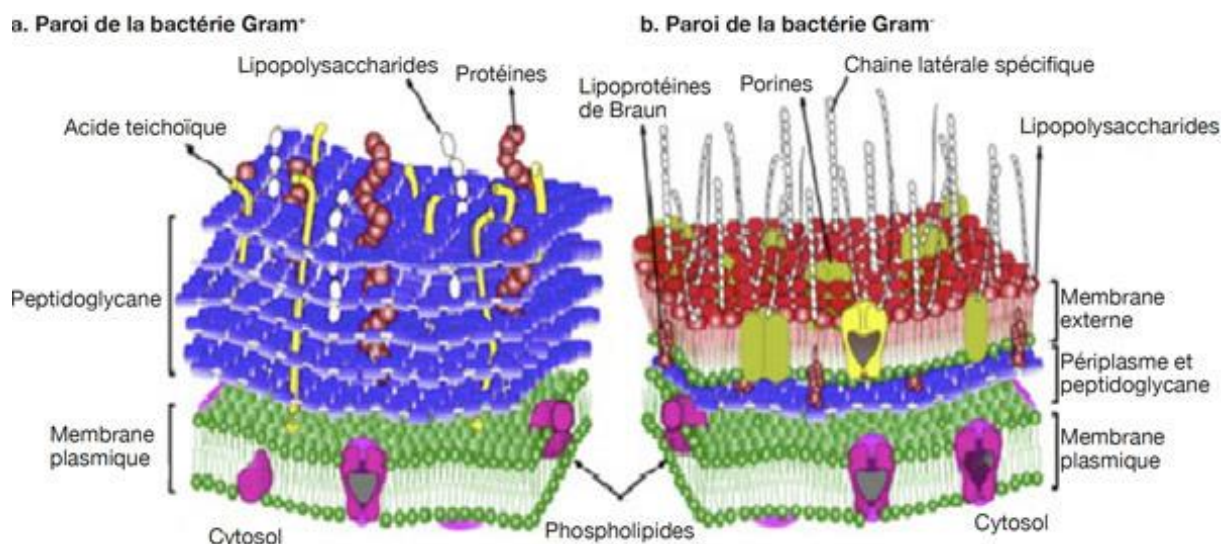


Figure 9: Différences entre les parois des bactéries Gram⁻ et Gram⁺ (**Tripathi et al., 2012**).

Des dommages comme une peroxydation lipidique, une dénaturation des protéines et de l'ADN conduisant à une perte de viabilité (Figure 10) (Zhao *et al.*, 2005). Les bactéries séchées sont exposées aux différentes réactions d'oxydation au cours de leur conservation. Les composants cellulaires les plus exposés pendant le séchage et la conservation de *P. fluorescens* sont : la membrane plasmique, les acides gras polyinsaturés, les protéines et le glutathion (Mputu Kanyinda *et al.*, 2012a ; Mputu Kanyinda *et al.*, 2012b).

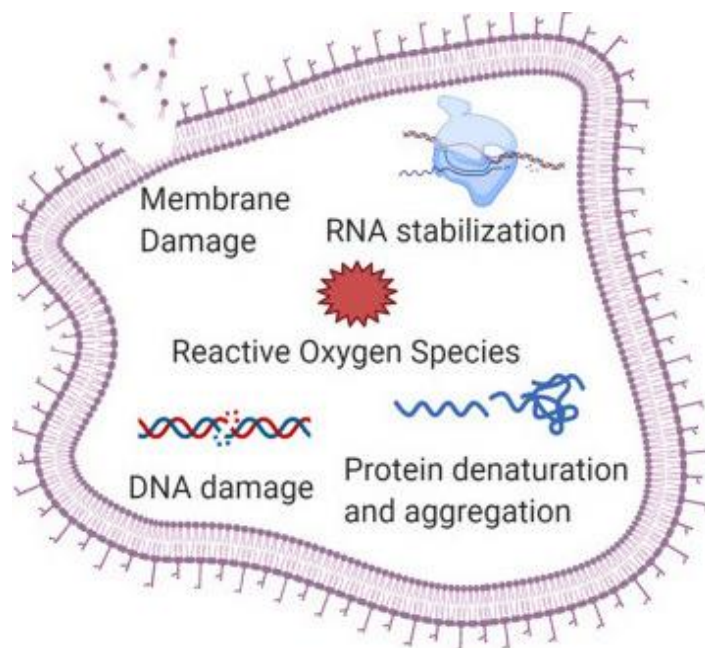


Figure 10: Exemples de dommages cellulaires causés par la dessiccation (Craig *et al.*, 2021)

❖ Modification de la structure membranaire

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

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 et par la modification de la composition lipidique de la membrane au cours du stockage (Coulibaly *et al.*, 2011). Cette

situation de stress pousse les cellules à utiliser leurs propriétés d'auto-défense contre ces phénomènes d'oxydation (productions du glutathion et de la superoxyde dismutate, etc.) (Leslie et al., 1995 ; Luqman et al., 2006).

Le glutathion est un tripeptide utilisé comme marqueur du niveau 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 de l'ADN, tandis que la superoxyde dismutase détruit les radicaux toxiques aux systèmes biologiques (Leslie et al., 1995 ; Luqman et al., 2006). 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 Kanyinda et al., 2012a ; Mputu Kanyinda et al., 2012b).

❖ **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, dont, les pyrimidines peuvent être dégradées en anneaux d'hydantoïne, qui ne peuvent plus être répliqués par les ADN polymérases (Potts et al., 2005). Car les mécanismes de protection et de réparation de l'ADN sont ralentis, les dommages à l'ADN s'accumulent, provoquant la mort cellulaire (Lebre et al., 2017).

❖ **Dommages des protéines**

L'activité des protéines dépend fortement de leur structure native qui dépend partiellement de l'eau. Ces protéines forment avec l'eau des liaisons qui sont rompues lors de la lyophilisation, conduisant ainsi à leur dénaturation (Mputu Kanyinda et al., 2014). Les protéines endommagées qui perdent leur état natif peuvent perdre leur fonctionnalité, provoquant un stress métabolique (Grefte et Michiels, 2020). L'exposition de régions hydrophobes sujettes à l'agrégation qui se produisent normalement dans le noyau de la protéine peut également provoquer une agrégation de la protéine. Il a également été démontré que les agrégats de protéines induisent la formation de ROS, favorisent l'encombrement moléculaire, induisent la peroxydation des lipides, provoquent des fuites et réarrangent la membrane cellulaire (Bednarska et al., 2013). De plus, le stress oxydatif conduit à l'oxydation des

protéines et il est proposé comme étant le principal déterminant de la sensibilité à la dessiccation chez les bactéries (**Fredrickson et al., 2008 ; García, 2011**). La plupart des groupes carbonyle irréversibles sont produits sur les chaînes latérales des protéines et conduisent à un mauvais repliement et potentiellement à une agrégation (**Tyedmers et al., 2010**).

7. La cryoprotection

L'addition d'agents cryoprotecteurs (CPA) sont essentiels pour réduire les dommages cellulaires causés par le processus de lyophilisation (**Morgan et al., 2006 ; Kawahara, 2008 ; Alonso, 2016**). Les cryoportecteurs, également connus sous le nom de lyoprotecteurs dans les procédés de lyophilisation, sont des additifs mélangés aux suspensions microbiennes avant la congélation pour minimiser l'influence délétère de la formation de cristaux de glace et pour abaisser le point de congélation pendant les procédés de congélation (**Alonso, 2016**). Ces composés protecteurs doivent être peu volatils, solubles dans l'eau et n'avoir aucun caractère toxique au niveau cellulaire (**Mputu Kanyinda et al., 2014**). Ils ont des origines diverses : polyols, sucre, protéines laitières, acides aminés, antioxydants ou macromolécules (**Béal et al., 2008**).

Le glycérol agit comme un perméant membranaire et facilite le processus de vitrification en remplaçant l'eau dans les cellules et en créant des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau pour exercer un effet protecteur (**Martin-Dejardin et al., 2013**). La plupart des protocoles de conservation des cellules par lyophilisation incluent le lait écrémé comme milieu de séchage car il stabilise les constituants de la membrane cellulaire en créant un revêtement protecteur sur les cellules (**Carvalho et al., 2004**). Entre autres, le disaccharide non réducteur tréhalose est l'un des protecteurs de lyophilisation le plus étudié (**Berninger et al., 2017**). Il a été démontré que le tréhalose protège les souches de *Pseudomonas* contre les solvants organiques toxiques, la dessiccation, le stress salin et d'autres facteurs de stress environnementaux (**Mikkat et al., 2000 ; Park et al., 2007 ; Freeman et al., 2010 ; Craig et al., 2021**). Différentes souches de *Pseudomonas* étaient mieux stabilisées en ajoutant 20 g par litre de tréhalose ou fructose (**Schisler et al., 2016**) ou de lactose (**Cabrefiga et al., 2011**), car il maintient la fluidité de la membrane et forme des liaisons d'hydrogène avec les protéines en l'absence d'eau, empêchant ainsi la dénaturation des protéines lors du séchage (**Berninger et al., 2017**). Le tableau 05 démontre les différentes classes des composés protecteurs (**Mputu Kanyinda et al., 2014**).

Tableau 5: Quelques caractéristiques et substances utilisées comme cryoprotecteurs intracellulaires (CPI) et extracellulaires (CPE) (**Coulibaly et al., 2011 ; Mputu Kanyinda et al., 2014**).

Caractéristiques	Intracellulaires (CPI)	Extracellulaires (CPE)
Poids moléculaires (g.mol⁻¹)	< 400	> 10000
Activité à une concentration de l'ordre de	la mole (M)	la millimole (mM)
Exemples de molécules utilisées	glycérol, dyméthylsulfoxyde, méthanol, éthanol, polyéthylène oxyde (PEO-400)	Lactose, saccharose, tréhalose, polyvinyl pyrrolidone, amidon, dextrane, maltodextrine

Chapitre III :
Optimisation du procédé de
lyophilisation

1 L'optimisation du procédé de lyophilisation

La lyophilisation est la technique de séchage préférée pour la conservation des micro-organismes (**Morgan et al., 2006**). Elle est adaptée pour obtenir une formulation de poudre stable. C'est la technique la plus courante pour le séchage et le stockage des bactéries et particulièrement pour *P. fluorescens* (**Mputu Kanyinda et al., 2014 ; Stephan et al., 2016**). Cependant, la lyophilisation non optimisée entraîne des effets secondaires indésirables, tels que des modifications de l'état physique des lipides membranaires et des protéines altérées, entraînant la perte de la viabilité cellulaire au cours du processus ainsi que lors du stockage ultérieur (**Mputu Kanyinda et Thonart, 2013**).

Pour obtenir une conservation optimale, compatible avec la préservation d'une viabilité maximale, la procédure d'optimisation s'est avérée être un outil important pour améliorer les performances du processus de la lyophilisation. En modifiant les paramètres et les conditions opératoires à savoir la fermentation, les taux de congélation, les températures de séchage et les agents cryoprotecteurs (CPA) (**Mputu Kanyinda et al., 2014 ; Bisutti et al., 2015 ; Stephan et al., 2016 ; Bisutti et Stephan, 2019**).

En réalisant une étude comparative des études antérieures, les paramètres majeurs les plus étudiés pour optimiser le procédé de lyophilisation, sont les suivants :

1.1 Influence des cryoprotecteurs (CPA) Sur la viabilité

Le choix des cryoprotecteurs (CPA) est très important pour la viabilité des cellules lyophilisées et ils peuvent avoir une influence sur la capacité de stockage.

Mputu Kanyinda et Thonart, (2013) lors d'une étude réalisée sur l'optimisation en utilisant des cryoprotecteurs (1% glycérol et 10% maltodextrine) pendant la lyophilisation des souche *Pseudomonas fluorescens* BTP1 ont obtenue, un taux de survie 26 %, comparativement aux poudres sans CPA, le taux de survie était de 2% dans le deuxième bioreacteur, alors que la viabilité était de 18.90% et de 1.00 % obtenue respectivement avec et sans CPA dans le premier bioreacteur (Tableau 6).

Par ailleurs, une étude récente de **Ben Oussaid (2019)** sur la conservation des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent en utilisant des cryoprotecteurs (1% de glycérol et 5% de maltodextrine) (Tableau 7) a montré que les taux de viabilité variaient entre 1.10% à 6.51% en présence de CPA. Cependant ces memes souches présentent des taux de viabilité plus faibles, variant entre 00.39% à 01.09% en l'absence des CPA.

Tableau 6: Pourcentage de survie de différent combinaisons de composés protecteurs après lyophilisation (Mputu Kanyinda et Thonart, 2013).

Bioréacteur 1		Bioréacteur 2	
Rendement 75%		Rendement 88%	
Echantillon	Survie	Echantillon	Survie
P1 (avec CPA)	18.90%	S1 (avec CPA)	26%
P2 (avec CPA)	8.50%	S2 (sans CPA)	2%
P3 (sans CPA)	1.00 %	-	-

Tableau 7: Effet de la cryoprotection sur la viabilité après lyophilisation (Ben Oussaid, 2019).

Souches	la viabilité après lyophilisation (cfu/g)	
	Avec CPA	Sans CPA
BB9	01.10%	00.39%
BB10	06.51%	01.09%
F21	01.31%	00.73%

D'autre part et comparé à une autre étude, la viabilité après la congélation des deux souches *P. fluorescens* Pf153 et *P. chlororaphis* PCL1391 éta significativement réduite avec des taux de survie inférieurs à 5% lorsque les cellules étaient congelées sans CPA. Mais lorsque le lait écrémé était ajouté, les taux de survie étaient augmentés à au moins 80% (Tableau 08). Cependant, en utilisant la souche Pf153, un total de 20 CPA différents ont été comparés. La viabilité de la souche Pf153 lors de l'ajout du saccharose était 2.9 fois supérieure par rapport aux cellules auxquelles du lait écrémé était ajouté (Tableau 09) (Stephan et al., 2016). Des résultats comparable d'un effet protecteur du lactose ont été trouvés par Cabrefiga et al., (2014).

Chapitre III : Optimisation du procédé de lyophilisation

Tableau 8: Influence d'apparition d'un agent cryoprotecteur (CPA) sur la viabilité des souches Pf153 et PCL1391 (Stephan *et al.*, 2016).

Souche	Taux de congélation (°C min ⁻¹)	CPA	Viabilité (NPP ml ⁻¹ ±SD)	Survie (%)
Pf153	Avant congélation		3,62 (±1,24) × 10 ⁸	
	1,3–1,9		4,45 (±7,70) × 10 ⁶	1
	Avant congélation	Lait écrémé	1,35 (±0,38) × 10 ⁸	
	1,3–1,9	Lait écrémé	1,79 (±1,59) × 10 ⁸	133
PCL1391	Avant congélation		1,31 (±1,26) × 10 ⁹	
	1,3–1,9		5,92 (± 8,09) × 10 ⁷	5
	Avant congélation	Lait écrémé	7,75 (±2,06) × 10 ⁸	
	1,3–1,9	Lait écrémé	6,21 (±4,14) × 10 ⁸	80

NPP : Nombre le plus probable

Tableau 9: Comparaison de différents agents protecteurs sur la viabilité de *P. fluorescens* Pf153 après lyophilisation (Stephan *et al.*, 2016).

Agent cryoprotecteur	Viabilité (NPP ml ⁻¹ ±SD) après lyophilisation	IF
Saccharose	1,02 (±0,44) × 10 ⁹	439,7
Lactose	9,11 (±7,70) × 10 ⁸	392,7
Acide ligninosulfonique	8,63 (±5,84) × 10 ⁸	372,0
d (+)-Glucose-monohydrate	7,05 (±3,50) × 10 ⁸	303,9
Lait écrémé 1% de matière grasse	3,31 (±0,89) × 10 ⁸	142,7
Amidon soluble	1,74 (±0,39) × 10 ⁸	75,0
Na-sel de carboxyméthylcellulose	1,61 (±0,55) × 10 ⁸	69,4
Bouillon nutritif	1,27 (±0,35) × 10 ⁸	54,7
Blanc d'oeuf – Albumen	2,40 (±1,89) × 10 ⁷	10,3
Jaune d'oeuf	2,39 (± 1,36) × 10 ⁷	10,3
Lécithine	3,05 (±4,86) × 10 ⁷	13,1
Jaune d'oeuf	2,82 (±3,43) × 10 ⁷	12,2
SPAN™ 80/gomme xanthane	2,37 (±2,91) × 10 ⁷	10,2
Na-alginate	1,18 (±0,65) × 10 ⁷	5,1
SPAN™ 60/gomme xanthane	1,10 (±0,71) × 10 ⁷	4,7
Blanc d'oeuf – Albumen	9,74 (±11,9) × 10 ⁶	4,2
gomme xanthane	4,27 (± 5,31) × 10 ⁶	1,8
Na-glutamate	4,19 (±4,03) × 10 ⁶	1,8
Contrôle (sans CPA)	2,32 (±1,12) × 10 ⁶	1,0
Glycérol	2,66 (±2,01) × 10 ⁴	0,011
Bentonite	1,84 (±2,64) × 10 ⁴	0,008
Charbon actif	1,29 (±0,30) × 10 ²	0,000
Lignine alcaline	5,60 (±4,70) × 10 ¹	0,000

IF : Incrementing factor

Par conséquent, l'utilisation de composés protecteurs, ajoutés avant la lyophilisation, a permis de maintenir une viabilité considérable, en comparaison avec les memes souches sans CPA. Les résultats confirment aussi que le lait écrémé et les sucres sont des CPA adaptés aux *Pseudomonas* (**Stephan et al., 2016**), car :

- Le lait écrémé stabilise les constituants de la membrane cellulaire en créant un revêtement protecteur sur les cellules (**Carvalho et al., 2004**) ;
- Les sucres ont la capacité à remplacer l'eau pendant la déshydratation tout en maintenant les structures biologiques en état hydratés (**Hubalek, 2003 ; Carvalho et al., 2004**). Ils sont capables aussi de former des structures vitreuses qui ralentissent les interactions moléculaires dans le cytoplasme (**Hubalek, 2003**) et ils offrent également une bonne protection aux cellules microbiennes en remplaçant l'eau dans la membrane après déshydratation et en empêchant l'agrégation des protéines par liaisons hydrogène avec les groupes polaires (**Champagne et al., 1991 ; Alonso, 2016**).

1.2 L'influence des cryoprotecteurs sur la capacité du stockage

Les CPA peuvent influencer la stabilité des préparations microbiennes séchées lors du stockage. Selon **Stephan (2016)**, des CPA (lait écrémé, saccharose, glucose, acide lignosulfonique et lactose) ont été comparés pour quatre souches différentes en raison de leur bonne capacité cryoprotectrice (Figure 11). La survie de toutes les souches a été améliorée en présence des CPA comparant à la lyophilisation sans CPA. Le lactose suivi du lait écrémé étaient pour toutes les souches les meilleurs CPA. Le saccharose a protégé les cellules microbiennes pendant 4 jours, mais la viabilité a considérablement diminué pendant le stockage. Après 7 jours, le saccharose a donné des résultats comparables à ceux du lait écrémé.

Cependant, dans l'étude de **Ben Oussaid (2019)**, la viabilité des souches de *Pseudomonas* a légèrement diminué après stockage. Le taux de survie après 5 ans de stockage varie entre 2.84% à 20.05% avec CPA, Cependant, les souches lyophilisées sans CPA leur taux de survie varie entre 4.27% à 22.09% (Tableau 10). Il n'y avait pas d'effets remarquable des CPA lors de la lyophilisation. Cependant, les CPA peuvent influencer, relativement, la stabilité des préparations microbiennes séchées lors du stockage.

Par Ailleurs, Les cultures lyophilisées avec et sans CPA de **Mputu Kanyinda et Thonart (2013)**, ont été stocké pendant 90 jours à 4°C, la viabilité été nettement significative, dont le taux de survie de S1 avec CPA été meilleur que S2 sans CPA (Figure 12).

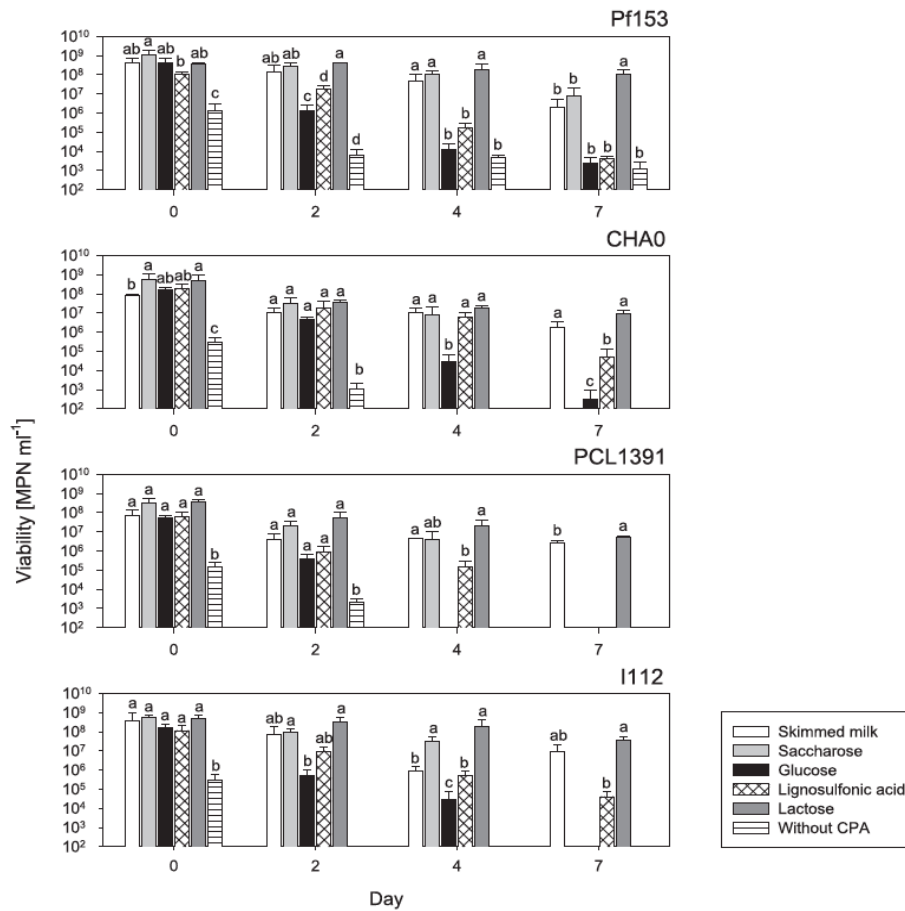


Figure 11: Viabilité des cellules lyophilisées des souches Pf153, CHA0, PCL1391 et I112 formulées en lait écrémé, saccharose, glucose, acide lignosulfonique, lactose et sans aucun CPA à 40°C pendant sept jours maximum (Stephan et al.,2016).

Tableau 10: Viabilité (%) des souches de *Pseudomonas* après stockage à 4°C (Ben Oussaid, 2019).

Souche	Après 3 ans de stockage		Après 5 ans de stockage	
	Avec CPA	Sans CPA	Avec CPA	Sans CPA
BB9	22.50%	05.15%	20.5%	4.47%
BB10	24.47%	13.28%	2.84%	12.3%
F21	12.27%	25.21%	12%	22.09%

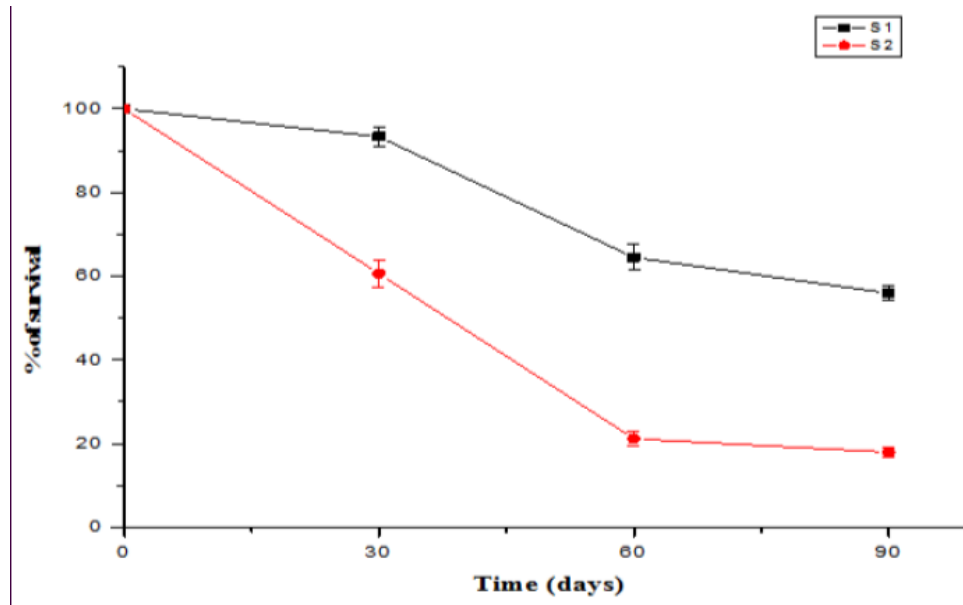


Figure 12: Perte de survie des lyophilisés *P. fluorescens* BTP1 pendant stockage à 4°C sous vide avec et sans CPA (Mputu kanyinda et Thonart, 2013).

1.3 Effet de la température sur la viabilité

La température a montré une influence significative sur la viabilité des cellules, que ce soit lors de croissance, de séchage ou de stockage.

❖ La température de croissance pendant la fermentation

La souche *P. fluorescens* Pf153 cultivé à différentes températures a montré des différences dans les taux de survie après lyophilisation. La viabilité des cellules cultivées à 25 ou 30°C n'était pas réduite après lyophilisation mais lorsqu'elles étaient cultivées à 20 ou 37°C, le nombre de cellules viables était significativement plus faible (Tableau 11) (Bisutti et al., 2015). Par ailleurs, une autre étude en utilisant la même souche Pf153, lorsque les cellules ont été cultivées dans le fermenteur, le rendement cellulaire était le plus élevé pour les cellules fermentées pendant 28 h à 20°C suivies de celles fermentées pendant 16 h à 28°C. La lyophilisation des cellules a provoqué une réduction du nombre de cellules viables (tableau 12) (Bisutti et Stephan, 2019).

Tableau 11: Viabilité (NPP ml-1) avant et après lyophilisation de *P. fluorescens* Pf153 cultivé à des températures de croissance différentes (**Bisutti et al., 2015**).

T° de croissance	Cellules fraîches	Cellules lyophilisées	Taux de survie (%)
20	$19,5 \pm 8,9 \times 10^8$	$7,8 \pm 1,1 \times 10^8$	49 ± 27
25	$7,8 \pm 2,0 \times 10^8$	$7,7 \pm 2,8 \times 10^8$	106 ± 58
30	$6,4 \pm 3,9 \times 10^8$	$5,4 \pm 1,2 \times 10^8$	115 ± 75
37	$8,1 \pm 5,2 \times 10^8$	$2,3 \pm 0,6 \times 10^8$	34 ± 14

Tableau 12: Nombre de cellules viables directement après la récolte et avant et après le processus de lyophilisation de Pf153 fermenté à différentes températures pendant différents temps (**Bisutti et Stephan, 2019**).

Paramètres de fermentation	Rendement	Avant lyophilisation	Après lyophilisation
28°C/8h	$4 \cdot 11 (\pm 1,51) \times 10^9$	$9,62 (\pm 4,68) \times 10^8$	$5,22 (\pm 2,38) \times 10^8$
20°C/16h	$5,03 (\pm 0,62) \times 10^9$	$2,34 (\pm 1,40) \times 10^9$	$1,05 (\pm 0,70) \times 10^9$
28°C/16h	$8 \cdot 33 (\pm 2 \cdot 16) \times 10^9$	$1,57 (\pm 0,79) \times 10^9$	$4 \cdot 29 (\pm 1 \cdot 80) \times 10^8$
20°C/28h	$1 \cdot 37 (\pm 0 \cdot 76) \times 10^{10}$	$1 \cdot 13 (\pm 0,34) \times 10^9$	$5,64 (\pm 4,84) \times 10^8$

❖ La température de séchage

Selon **Gehrke (1991)**, les cellules survivent à la sublimation ou à la phase de séchage sans dommage cellulaire. Tant que l'eau liée est sublimée, les cellules ne sont pas endommagées.

Les résultats de **Stephan et (2016)** démontrent que pendant la sublimation, la viabilité a été influencée par la température de séchage. Les différentes températures de séchage ont été obtenues par la variation de la température du plateau (5, 20 et 30°C) dans le lyophilisateur. La viabilité des cellules lyophilisées était significativement réduite. Le taux de survie variait entre 3% et 27%. La température de séchage été optimum à des températures ambiantes (20°C et 30°C) pour les souches *P. fluorescens* Pf153 et *P. chlororaphis* PCL1391 (Tableau 13). Ce qui a abouti à une viabilité plus élevée après lyophilisation.

Tableau 13: Influence des températures de séchage sur la viabilité des souches Pf153 et PCL1391 (Stephan *et al.*, 2016).

Souche	Taux de congélation (°C min ⁻¹)	T° de séchage (°C)	Viabilité (NPP ml ⁻¹ ±SD)	Taux de survie (%)
Pf153	Avant séchage		1,35 (±0,38) × 10 ⁸	
	1,3–1,9	5	1,25 (±0,42) × 10 ⁷	9
	1,3–1,9	20	6,45 (±6,53) × 10 ⁷	48
	1,3–1,9	30	6,04 (±2,99) × 10 ⁷	45
PCL1391	Avant séchage		7,75 (±2,06) × 10 ⁸	
	1,3–1,9	5	2,63 (±1,06) × 10 ⁷	3
	1,3–1,9	20	8,01 (±5,65) × 10 ⁷	10
	1,3–1,9	30	2,10 (±1,98) × 10 ⁸	27

❖ **La température de stockage**

Pour les tests de conservation, le stockage été effectué à 8°C et pendant 200 jrs, la viabilité à diminuer de 24% à 2% (Figure 13) (Palmfeldt *et al.*, 2003). Cependant, l'étude de Ben Oussaid (2019) et celle de Mputu Kanyinda et Thonart (2013) ont montré que lorsque les lyophilisats été stockés à 4°C, les taux de survie été meilleurs à 4°C (Figure 12). Cependant, certains *Pseudomonas* n'ont pas survécu au stockage, d'autres ont vécu 3 à 5 ans (Tableau 10) (Ben Oussaid, 2019). Ces différents comportements de survie sont attribués à la température de stockage. Les *Pseudomonas* survivent mieux lorsqu'ils sont stockés à des températures inférieures à 8°C sous forme de cellules lyophilisées (Miyamoto-Shinohara *et al.*, 2006). Ce meilleur stockage à température de réfrigération standard a également été rapporté pour d'autres bactéries Gram-négatives comme *X. campestris* (Jackson *et al.*, 1998).

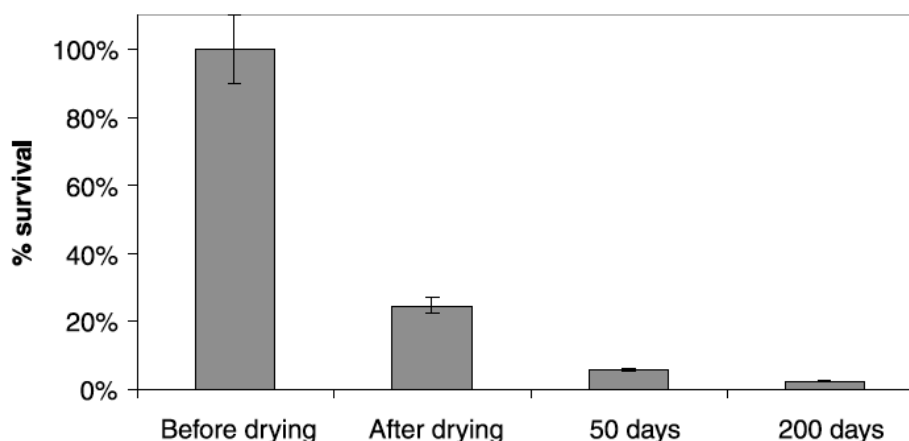


Figure 13: Effet de la lyophilisation et de la température du stockage (8°C) sur la survie de *P. chlororaphis* (Palmfeldt *et al.*, 2003).

Un autre paramètre important affectant la stabilité du produit est la valeur de l'activité de l'eau (a_w) (Coulibaly et al., 2011). Cette valeur dépend des paramètres du processus de séchage et peut être ajustée dans une certaine mesure après la lyophilisation. A haute valeur d' a_w , la cellule sèche peut être détruite car les solutés peuvent diffuser dans l'eau et donc endommager la cellule par effet osmotique (Béal et al., 2001).

1.4 Influence des milieux de culture

Les milieux de fermentation peuvent également influencer la survie après lyophilisation grâce à l'accumulation de solutés compatibles et en altérant la membrane cellulaire (Carvalho et al., 2004). Dans l'étude menée en utilisant la souche *P. fluorescens* Pf153, le taux de survie le plus élevé a été obtenu par des cellules cultivées dans le King B 84% par rapport au bouillon tryptone soja (TSB ½) et DF 63% (Tableau 14) (Bisutti et al., 2015). Il peut être exclu que les différents taux de survie aient été causés par un âge cellulaire différent. Le milieu KB contient du glycérol qui améliore la viabilité cellulaire pendant la lyophilisation (Heckly, 1985). Cependant, d'autres expériences doivent être menées pour identifier le composant moyen responsable des taux de survie plus élevés après la lyophilisation (Bisutti et al., 2015).

Tableau 14: Viabilité (NPP ml-1) avant et après lyophilisation de *P. fluorescens* Pf153 cultivé dans des milieu de culture différentes (Bisutti et al., 2015).

Milieu de culture	Cellules fraîches	Cellules lyophilisées	Taux de survie (%)
TSB ½	$6,3 \pm 3,6 \times 10^8$	$3,3 \pm 1,6 \times 10^8$	$63 \pm 39 \times 10^8$
DF	$6,5 \pm 4,0 \times 10^8$	$4,0 \pm 3,0 \times 10^8$	$63 \pm 26 \times 10^8$
KB	$4,7 \pm 2,1 \times 10^8$	$3,4 \pm 1,3 \times 10^8$	$84 \pm 48 \times 10^8$

DF: un milieu minéral contenant une source organique de carbone (1,5 g d'acide citrique monohydraté (Roth), 1,5 g de D(+)-glucose monohydraté (Merck), 10 µg H₃BO₃ (Roth), 7,5 g Na₂HPO₃ × 2H₂O (Merck), 1 mg FeSO₄ × 7H₂O (Merck), 2 g (NH₄)₂DONC₄ (Merck), 4 g de KH₂ et 0,2 g de MgSO₄ × 7H₂O (Merck) dans 1000 ml d'eau désionisée)

1.5 Influence d'un choc thermique

Les stress sublétaux peuvent induire une tolérance à un stress plus extrême et peuvent se protéger contre d'autres types de stress (**Teixidó et al., 2005**). Dans les expériences de **Bisutti et al. (2015)**, l'augmentation de la température de 7°C pendant environ une heure a augmenté la survie après le processus de lyophilisation de près de 80 %. La viabilité était encore améliorée à des températures plus élevées (40 et 45°C) mais moins qu'à 35°C (Tableau 15). Une résistance accrue à la lyophilisation due au choc thermique est également rapportée pour d'autres *Pseudomonas*. **Palmfeldt (2003)** pourrait doubler la survie de *P. chlororaphis* MA 100, lorsque les cellules ont été exposées à un traitement thermique pendant 15 min à 34,5°.

Tableau 15: Viabilité (NPP ml-1) avant et après lyophilisation de *P. fluorescens* Pf153 cultivé par un choc thermique (**Bisutti et al., 2015**).

Choc thermique léger (°C)	Cellules fraîches	Cellules lyophilisées	Taux de survie (%)
28	$6,7 \pm 2,9 \times 10^8$	$3,0 \pm 1,5 \times 10^8$	45 ± 15
35	$3,8 \pm 1,4 \times 10^8$	$3,9 \pm 2,3 \times 10^8$	124 ± 87
40	$4,9 \pm 1,8 \times 10^8$	$3,3 \pm 1,1 \times 10^8$	66 ± 15
45	$4,4 \pm 4,3 \times 10^8$	$2,7 \pm 0,7 \times 10^8$	83 ± 58

1.6 Influence du pH

Le changement de pH a réduit les taux de survie à moins de 40 % pendant la lyophilisation uniquement à des valeurs de pH extrêmes de 4 et 10. Les cellules adaptées à un pH faible semblaient avoir des sensibilités différentes à un stress supplémentaire. Donc le pH optimale est entre $7,06 \pm 0,15$ et $8,04 \pm 0,12$ (Tableau 16) (**Bisutti et al., 2015**).

Tableau 16: Viabilité (NPP ml-1) avant et après lyophilisation de *P. fluorescens* Pf153 cultivé a des différents taux de pH (Bisutti et al., 2015)

pH	Cellules fraîches	Cellules lyophilisées	Taux de survie (%)
4	$6.3 \pm 5.8 \times 10^4$	$2.4 \pm 1.9 \times 10^4$	39 ± 26
5	$4,0 \pm 1,3 \times 10^8$	$2,4 \pm 1,3 \times 10^8$	66 ± 38
6	$4,6 \pm 3,0 \times 10^8$	$3,3 \pm 1,5 \times 10^8$	90 ± 67
7	$4,4 \pm 1,7 \times 10^8$	$6,3 \pm 3,9 \times 10^8$	145 ± 80
8	$3,9 \pm 1,4 \times 10^8$	$6,3 \pm 3,1 \times 10^8$	159 ± 38
9	$7,7 \pm 3,3 \times 10^8$	$7,1 \pm 2,5 \times 10^8$	110 ± 77
10	$2.1 \pm 2.4 \times 10^6$	$0.7 \pm 0.4 \times 10^6$	31 ± 11

1.7 Influence de la concentration cellulaire initiale

Il a déjà été observé qu'une faible concentration cellulaire initiale est préjudiciable à la survie à la lyophilisation (Bozoğlu et al., 1987 ; Costa et al., 2000). L'étude de Palmfeldt (2003) confirme que c'est également le cas pour *P. chlororaphis*. La concentration cellulaire initiale optimale était comprise entre 1×10^9 et 1×10^{10} CFU/ml lorsque le saccharose était utilisé comme soluté protecteur. Ce qui à donner un taux de survie de 26% après lyophilisation. Cependant, la concentration initiale de la souche *P. putida* I112 été de $1.87(\pm 1.03) \times 10^8$ et de $8.35 (\pm 3.21) \times 10^7$ pour la souche *P. protegens* CHA0, Ce qui à donner un taux de survie 10% pour les deux souches (Stephan et al., 2016).

1.8 Temps de récolte

Les travaux réalisés par Mputu Kanyinda et Thonart (2013) ont montré que le rendement de *P. fluorescens* BTP1 dans le premier bioréacteur (contre pression 0.1bar) été de 75%. La phase stationnaire s'est produite seulement après 12h. Cependant dans le deuxième bioréacteur (contre pression 0.3bar), le rendement été de 88%, dont la phase avait commencé après 18h de culture (Mputu Kanyinda et Thonart, 2013). Cependant, les cellules de *P. fluorescens* Pf153 récoltées lors de la phase initiale de croissance avaient une viabilité significativement plus faible que celles récoltées en fin de phase stationnaire. Pf153 récoltée après 24 h (environ 8h en phase stationnaire) avait un taux de survie plus faible que les cellules récoltées à 16 h (fin de la phase exponentielle) (Bisutti et al., 2015). En revanche, le taux de

survie après lyophilisation des *P. putida* KT2440 était plus élevé pour les cellules en phase stationnaire que pour les cellules en phase exponentielle, ce qui signifie que le temps de récolte optimal dépend largement de l'organisme (Muñoz-Rojas et al. 2006). Heckly (1985) a postulé que les cellules en phase tardive ou stationnaire sont moins sensibles au processus de lyophilisation que les cellules jeunes, car la phase stationnaire déclenche une réponse générale au stress, qui implique l'induction d'un large éventail de protéines de stress (Hecker et Volker, 2001).

1.9 Les taux de congélation

Dans l'étude de Stephan (2016), quatre taux de congélation différentes ont été comparés, dont il a appliqué un choc de congélation avec de l'azote liquide pendant 2.5 min ou la température du produit a atteint -150°C, trois autres vitesses de congélation de (5 à -40°C) ont été atteintes en 40, 50 min ou 16.7 h. La viabilité n'a pas été significativement influencée par le processus de congélation, quel que soit le taux de congélation et même en ajoutant les CPA. D'autre part, Palmfeldt (2003) a congelé le produit à -80 °C, avec une vitesse de refroidissement moyenne de 4 °C/min. Cependant, l'étape de congélation n'a eu que peu d'effet sur la viabilité.

1.10 Influence des méthodes de calcul de viabilité sur la précision des résultats

La viabilité des souches bactériennes est déterminée avant et après chaque test d'optimisation de lyophilisation et après stockage. Deux méthodes sont adaptées au calcul de la viabilité, le nombre le plus probable (NPP) et la Cytométrie en flux.

❖ Nombre le plus probable (NPP)

Le NPP est une méthode permettant d'obtenir des estimations quantitatives des bactéries dans des échantillons d'aliments ou d'eau. En microbiologie, cela est généralement réalisé en effectuant des dilutions en série d'une culture bactérienne, en divisant l'échantillon en aliquotes ou en réplicats, suivi d'une incubation et d'un examen visuel ultérieur de chaque échantillon pour la croissance. Cependant, la méthode n'est capable que de dénombrer les organismes viables (Chandrapati et Williams, 2014).

Le taux de survie est exprimé en unités formant colonies (UFC) avant lyophilisation (nombre cellulaire initial) (N0) et après lyophilisation (nombre cellulaire final) (Nf) par la formule:

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

❖ Cytométrie en flux

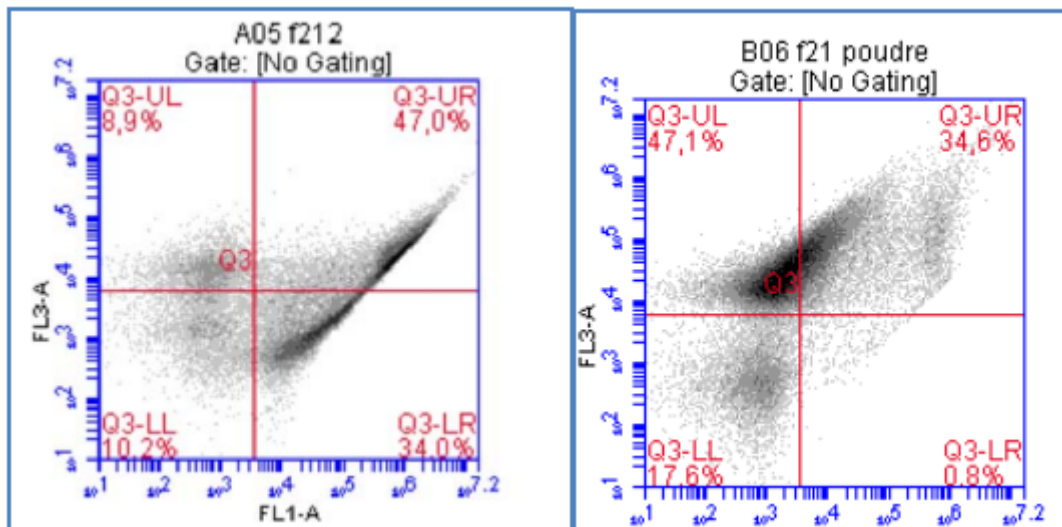
La cytométrie en flux (CMF) est une méthode d'analyse qui permet, à grande vitesse (plusieurs milliers d'événements par seconde), de caractériser et compter des cellules (ou des particules) en suspension dans un flux liquidien (**Zafrani et Monneret, 2017**).

Dans l'étude de **Ben Oussaid (2019)**, le Carboxy fluorescein diacétate (CFDA) a été utilisé pour évaluer la viabilité des bactéries, tandis que l'iodure de propidium (PI) permet de quantifier les cellules endommagées et/ou mortes.

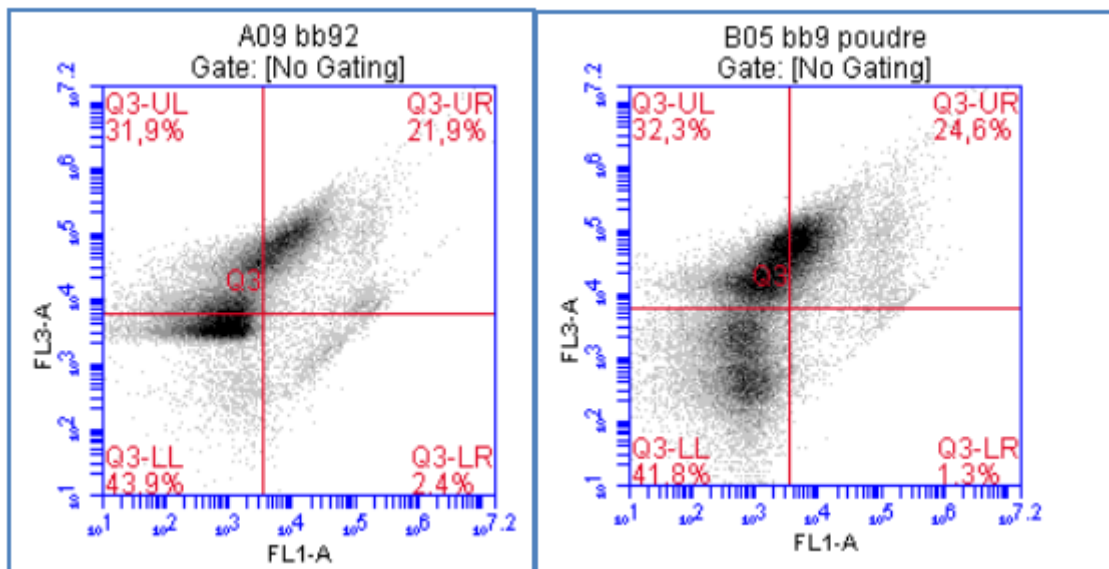
La viabilité des trois souches bactériennes lyophilisées a été comparée aux résultats de la cytométrie en flux qui permet la détermination de l'état physiologique cellulaire (cellules viables, cellules mortes et cellules viables mais non cultivables) après une double coloration par PI et CFDA. Il est apparu que la souche F21 est la plus sensible à la lyophilisation (Tableau 07). Cette sensibilité s'est traduite par une importante diminution de la concentration des cellules viables (de 34 % à 0,8%). Les résultats montrent également que la lyophilisation entraîne une quantité importante en nombre de cellules intermédiaires, que l'on peut récupérer sur un milieu adéquat, pour les souches BB9 et F21 (24,6% et 34,6%) (**Ben Oussaid, 2019**) (figure 14).

En conséquence, La cytométrie en flux est la méthode la plus approprié et convenable en raison de la précision et l'exactitude de calcul.

F21



BB9



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

Figure 14: viabilité (%) avant et après lyophilisation par cytométrie en flux (Ben Oussaid, 2019).

2 L'activité de lutte biologique

Une application réussie des agents de biocontrôle microbiens dépend du développement d'une formulation appropriée et économiquement faisable. Les formulations doivent livrer un produit final avec une efficacité optimisée (Bora et al., 2004), une méthode d'application conviviale et avec une longue stabilité de stockage (Costa et al., 2002 ; Selvaraj et al., 2014). En effet, le processus de formulation est très important au cours du développement des agents de biocontrôle, lorsqu'ils sont transformés de produits testés en laboratoire en produits appliqués sur le terrain (Liu et al., 2014). Les *Pseudomonas* spp. fluorescents et en particulier *P. fluorescens*, sont les antagonistes bactériens considérés comme l'un des meilleurs candidats pour le biocontrôle (Mathivanan et al., 2005).

Dans l'étude de Stephan (2016), ou il a mené deux essais, pour le premier essai, la souche *P. putida* Mf416 a été testé contre *Alternaria Radicina* et *A. dauci*. L'efficacité des cellules lyophilisées était presque identique à celle des cellules fraîches même si la viabilité a diminué après la lyophilisation (Tableau 17), Néanmoins, l'efficacité était nettement inférieure au produit chimique (Thiram) (Tableau 18). Pour le deuxième essai, l'efficacité de *P. fluorescens* Pf153 contre *Botrytis cinerea* n'a été pas bonne par rapport au contrôle chimique (Euparen), quel que soit le CPA choisi, la viabilité du pathogène n'a pas été réduite et le contrôle de la maladie n'a été pas significatif (Tableau 19).

Tableau 17: Viabilité [NPP ml⁻¹] avant et après lyophilisation de *P. putida* MF416 et *P. fluorescens* Pf153 (Stephan et al., 2016).

Souche	CPA	Avant la lyophilisation	Après lyophilisation
MF416	Lactose	7,35 (±1,26) × 10 ⁸	2,86 (±1,49) × 10 ⁸
Pf153	Lactose	1,15 (±0,28) × 10 ⁹	2,52 (±2,72) × 10 ⁹
Pf153	Saccharose	1,87 (±0,40) × 10 ⁹	1,55 (±1,62) × 10 ⁹
Pf153	Lait écrémé	1,87 (±0,40) × 10 ⁹	1,75 (±1,20) × 10 ⁹

Tableau 18: Efficacité des cellules lyophilisées et non lyophilisées de *P. putida* MF416 contre *A. radicina* et *A. dauci* sur graines de carotte (Stephan et al., 2016).

Traitement	Nombre de plantes saines (%)
Contrôle de l'eau	16,3 ± 5,5
Cellules fraîches	35,1 ± 2,2
Cellules lyophilisées	35,3 ± 2,9
Lutte chimique (Thiram)	72,2 ± 8,3

Tableau 19: Influence de différents CPA sur l'efficacité de *P. fluorescens* Pf153 contre *B. cinerea* sur feuilles détachées de fèves (Stephan et al., 2016)

Traitement	AUDC avant lyophilisation	AUDC après lyophilisation
Contrôle de l'eau	249 ± 69	234 ± 70
Lactose	174 ± 50	184 ± 20
Saccharose	253 ± 28	295 ± 22
Lait écrémé	146 ± 51	169 ± 37
Lutte chimique (Euparen)	56 ± 29	66 ± 30

(AUDC : Area under disease progress curve : zone sous la courbe de la progression de la maladie)

Une étude de **Bisutti (2015)** réalisée sur l'effet antagoniste de *P. fluorescens* Pf153 contre *B. cinerea* testée en tant que produits frais et lyophilisés a montré que l'efficacité de la souche de *Pseudomonas* était influencée par la température de croissance (Tableau 20). D'après les résultats mentionnés dans le tableau 20, l'efficacité du Pf153 cultivé à 20°C était significativement plus élevée par rapport aux autres températures de croissance (25, 30 et 37°C), passant de 52,9% de la température (25°C) comparé à 31,7% de la température (20°C). Cependant, un léger choc thermique n'a pas amélioré l'efficacité de l'antagoniste bactérien. Aucune différence significative n'a été observée (Tableau 20).

Tableau 20: Influence de la température de croissance et du traitement de choc thermique léger sur l'efficacité des cellules lyophilisées *P. fluorescens* Pf153 contre *B. cinerea* sur des feuilles détachées de *V. faba* (Bisutti et al., 2015).

Température de fermentation	Traitement	Sévérité moyenne (%)
	L'eau	75,9 ± 7,6
	20°C	35,6 ± 5,8
	25°C	52,3 ± 14,0
	30°C	55,6 ± 5,0
	37°C	56,0 ± 12,9
	Euparen	14,4 ± 1,6
Choc thermique léger	L'eau	77,8 ± 12,0
	28°C	38,0 ± 8,5
	35°C	41,7 ± 7,3
	40°C	38,9 ± 7,7
	45°C	40,7 ± 2,9
	Euparen	18,1 ± 2,8

La gravité a été évaluée cinq jours après l'inoculation

Un autre essai été tenté par **Bisutti et Stephan (2019)** en utilisant la souche *P. fluorescens* Pf153 pour lutter contre *B. cinerea*, Tous les traitements ont réduit la gravité de la maladie de manière significative par rapport au témoin (l'eau) mais pas aussi efficacement que le produit chimique Euparen (réduction respective au contrôle de l'eau de 82,6 %). La réduction la plus élevée de la maladie a été causée par les cellules récoltées au milieu de la phase logarithmique (56,5% pour 28°C et 48,5% pour une température de croissance de 20°C). Les cellules du début de la phase stationnaire ont réduit la maladie d'au moins 37,9 % (28 °C/16 h) (Figure 15).

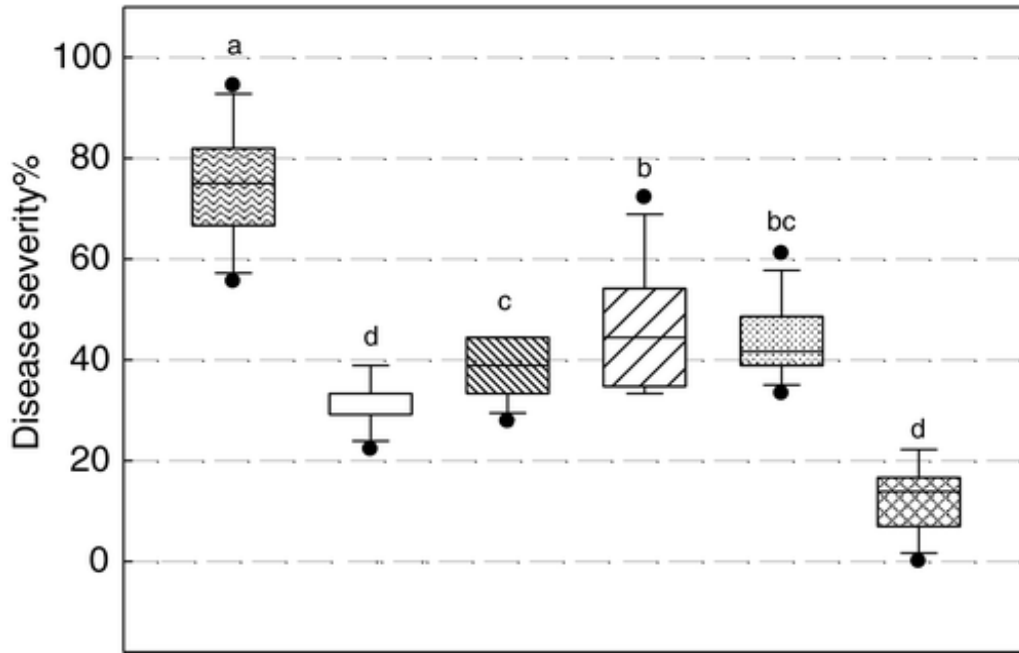


Figure 15: Gravité de la maladie de *B. cinerea* dans un essai biologique sur des feuilles détachées de *V.faba* avec des préparations lyophilisées de Pf153 cultivées à différentes combinaisons des paramètres de fermentation température et durée de culture (**Bisutti et Stephan, 2019**). Les boîtes à moustaches représentent les valeurs minimales, 25 à 75 %, maximales et médianes de la gravité de la maladie. Les paramètres de fermentation (■) eau, (□) 28°C/8 h, (▨) 20°C/16 h, (▩) 28°C/16 h, (▧) 20°C/28 h, (⊞) Euparen).

En effet, une possibilité est que les CPA puissent être utilisées par l'antagoniste ou par le pathogène (**Stephan et al., 2016**). D'autre part, l'agent de biocontrôle peut être influencé par la souche pathogène et son niveau d'agressivité (**Bardin et al., 2013**). **Elmer et Reglinski (2006)**, résume que la suppression biologique de *B. cinerea* résulte de la compétition des nutriments et de l'espace, de la production des métabolites inhibiteurs ou du parasitisme et peut stimuler les mécanismes de défense.

CONCLUSION

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont largement étudiée du fait de leur potentiel biotechnologique en agriculture. En raison de leur commercialisation comme étant des biopesticides, les *Pseudomonas* nécessitent un conditionnement stable durant une longue période.

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 contrairement à d'autres techniques. Cependant, l'impact du séchage lors du processus de la lyophilisation peut causer des dommages Intracellulaires (Dommages d'ADN, protéines, membrane cellulaire). Ce qui nécessite une optimisation de divers paramètres.

A travers notre étude comparative entre des études antérieures, qui ont pour but d'optimiser le processus de lyophilisation et son impact sur la viabilité, la capacité de stockage et la lutte biologique des agents de biocontrôle *Pseudomonas* spp. fluorescents. Il ressort que les paramètres décrits précédemment dans le chapitre III sont liés et que certains paramètres peuvent avoir une influence sur d'autres paramètres. Ainsi, on résulte que :

- Meme si les souches *Pseudomonas* spp. fluorescents se diffèrent, le degré de sensibilisation aux conditions de la lyophilisation est approximatif.
- Le choix d'un bon CPA tels que les sucres et le lait écrémé, est essentiel pour améliorer l'efficacité et la viabilité des *Pseudomonas*, par ailleurs, il influence de divers paramètres tel que le la capacité de stockage.
- Le procédé de fermentation est un paramètre impliqué dans l'optimisation, dont le milieu de croissance, le pH et le temps de récolte peuvent être optimale.
- La température joue un role majeur pour optimiser un meilleur résultat, que ce soit la température lors de croissance, de séchage ou bien le stockage.
- La concentration cellulaire initiale est avantageuse, à force d'avoir une biomasse assez importante, le taux de viabilité pourrai être élevé.
- L'activité de l'eau est un facteur important dans la conservation des poudres lyophilisées, Le brevet européen n° EP 1234019 B1 publié le 28 Aout 2002 rapporte que l'activité de l'eau reflète le degré de liberté de l'eau dans le produit concerné et a un fort impact sur la stabilité et la conservation lors du stockage du produit.

- Un choc thermique léger en augmentant la température lors de la fermentation peut aboutir à une résistante au stress lors de la lyophilisation.
- La lyophilisation n'a pas d'impact négatif sur l'efficacité des agents de bio contrôle, et des tests biologiques peuvent être menés sans crainte.
- Une optimisation des protocoles de production et de formulation est inévitable, les paramètres de sélection de la viabilité, de température de séchage et stockage et le choix des CPA peuvent être améliorés.
- Les conditions de croissance pendant la fermentation doivent être soigneusement prises en compte.
- La procédure de production et la manipulation doit être prise en compte en permanence pour permettre aux bioproduits de passer du laboratoire au terrain.
- Concernant l'impact du séchage, la connaissance de certains paramètres responsables de la perte de viabilité de *P. fluorescens* est importante. Parmi elles, l'étude des modifications subies par les structures cellulaires au cours des traitements de séchage et de conservation (l'oxydation de l'ADN) ainsi que l'utilisation d'un emballage adéquat (Imperméable à la lumière et à l'oxygène).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achour M., Mtimet N., Cornelius C., Zgouli S., Mahjoub A., Thonart P. et Hamdi M., 2001-** Application of the accelerated shelf life testing method (ASLT) to study the survival rates of freeze-dried *Lactococcus* starter cultures. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 76, pp. 624-628
- Afzal A. et Asad S. A., 2019-** *Microbial Applications for Sustainable Agriculture*, pp. 43-77 In Farooq M. et Pisante M. *Innovations in Sustainable Agriculture*.
- Allaire M., 2005** - Diversité fonctionnelle des *pseudomonas* producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel. Thèse de Microbiologie agricole. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, université Laval, Québec, 90p.
- Alonso S., 2016** - *Novel Preservation Techniques for Microbial Cultures*, pp. 7-33 In : Ojha K. S. et Tiwari K. B., *Novel Food Fermentation Technologies*.
- Amin N., 2013-** Teaching of Biopesticide Development as a Technopreneurship Opportunity in Plant Protection. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, vol. 6(6), pp. 88-91.
- Aslan E. M., Galkina N. N., Dobritsa A. P., Kolumbet L. V., Koretsk N. G. et Kochetkov V. V., 2004-** Strain of bacterium *Pseudomonas fluorescens* p469 for preparing preparation against plant diseases caused by phytopathogenic fungi and microorganisms. Russian Patent, RU2235771C.
- Aydinoglu F., Iltas O. et Akkaya O., 2020-** Inoculation of maize seeds with *Pseudomonas putida* leads to enhanced seedling growth in combination with modified regulation of miRNAs and antioxidant enzymes. *Symbiosis*, vol.81, pp.271-285
- Bakker P. A. H. M., Pieterse C.M.J., et Van Loon L.C., 2007-** Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, vol. 97 (2), pp. 239-243.
- Bardin M., Comby M., Troulet C. et Nicot P.C., 2013-** Relationship between the aggressiveness of *Botrytis cinerea* on tomato and the efficacy of biocontrol. *IOBC-WPRS Bull*, vol. 86, pp. 163– 168.
- Basit A., Tanveer Shah S., Tul Muntha S. et Mohamed H.I., 2021-** *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Biocontrol Agents for Viral Protection*, pp. 187-225 in Mohamed H.I., El-Beltagi H.S. et Abd-Elsalam K.A. *Plant Growth-Promoting Microbes for Sustainable Biotic and Abiotic Stress Management*
- Bassler B. L., 2002-** Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell*, vol. 109, pp.421-424.

Baum M. M., Kainovic A., O'Keeffe T., Pandita R., McDonald K., Wu S. et Webster P., 2009- Characterization of structures in biofilms formed by a *Pseudomonas fluorescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*, vol. 9:103.

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

Béal C., Mihoub F., Marin M. et Corrieu C., 2001- INRA (Ed.), European Office Patent, France.

Bednarska N. G., Schymkowitz J., Rousseau F., Van Eldere J., 2013- Protein aggregation in bacteria: the thin boundary between functionality and toxicity. *Microbiology* 159:1795-1806

Behrendt U., Ulrich A. et Schumann P., 2003- Fluorescent pseudomonads associated with the phyllosphere of grasses; *Pseudomonas trivialis* sp. nov., *Pseudomonas poae* sp. nov. and *Pseudomonas congelans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 53, pp. 1461-1469.

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

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

Beveridge T. J., 1999- Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.*, vol.181, pp. 4725-4733.

Bharucha U., Patel K. et Trivedi U. B., 2013- Optimization of Indole Acetic Acid Production by *Pseudomonas putida* UB1 and its Effect as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). *Agricultural Research*, vol. 2(3), pp. 215-221.

Biessy A. et Fillion M., 2018- Phenazines in plant-beneficial *Pseudomonas* spp.: biosynthesis, regulation, function and genomics. *Environmental microbiology*, vol. 20(11).

Bisutti I. L. et Stephan D., 2019- Influence of fermentation temperature and duration on survival and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* Pf153 freeze-dried cells. *Journal Of Applied Microbiology*, vol.128(1), pp 232-241.

Bisutti I. L., Hirt K. et Stephan D., 2015- Influence of different growth conditions on the survival and the efficacy of freeze-dried *Pseudomonas fluorescens* strain Pf153. *Biocontrol Science and Technology*, vol. 25(11), pp. 1269-1284

Bloemberg G. V. et Lugtenberg B. J., 2001- Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 4(4), pp. 343-350.

Bora T., Ozaktan H., Gore E. et Aslan E., 2004- Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis by wettable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*. *Journal of Phytopathology*, vol. 152, pp. 471–475

Bozoğlu T. F., Özilgen M. et Bakir U., 1987- Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 9(9), pp. 531–537.

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

Cabrefiga J., Francés J., Montesinos E. et Bonaterra A., 2014-Improvement of a dry formulation of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e for fire blight disease biocontrol by combination of culture osmoadaptation with a freeze-drying lyoprotectant. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 117(4), pp. 1122–1131.

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

Carvalho A. S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F. X. et Gibbs P., 2008- Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Biotechnology Progress*, vol. 20, pp. 248-254

Chandrapati S. et Williams M. G., 2014- TOTAL VIABLE COUNTS | Most Probable Number (MPN). *Encyclopedia of Food Microbiology*, vol. 3, pp. 621–624

Costa E., Usall J., Teixido N., Garcia N. et Vinas I., 2000- Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 89(5), 793–800

Costa E., Usall J., Teixido N., Torres R. et Vinas I., 2002- Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 92, pp. 873–878

Coulibaly I., Dauphin D. R., Destain J. et Thonart P., 2008-Characterization of lactic acid bacteria isolated from poultry farms in Senegal. *African Journal of Biotechnology*, vol. 7(12)

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

Craig K., Johnson B. R. et Grunden A., 2021- Leveraging *Pseudomonas* Stress Response Mechanisms for Industrial Applications. *Frontiers in Microbiology*. Vol.12.

Da Silva Folli-Pereira M., Sant'Anna Meira-Haddad L., de Vilhena da Cruz Houghton C. M. N. S. et Megumi Kasuya M. C., 2013- *Plant-Microorganism Interactions: Effects on the Tolerance of Plants to Biotic and Abiotic Stresses*, pp. 209-238. In Hakeem K.R., Ozturk M. et Ahmad P. *Crop Improvement*.

Daneshvar A. et Truelstrup H., 2013- Kinetics of biofilm formation and desiccation survival of *Listeria monocytogenes* in single and dual species biofilms with *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia proteamaculans* or *Shewanella baltica* on food-grade stainless steel surfaces. *Biofouling*, vol. 29:1253–1268

Das A., Prasad R., Srivastava A., Giang P. H., Bhatnagar K. et Varma A., 2007- *Fungal siderophores: structure, functions and regulations*, pp 1-42 In: Varma A., Chincholkar S. B., *Microbial siderophores*.

Das K., Abrol S., Verma R., Annapragada H., Katiyar N. et M S., 2020- *Pseudomonas*. pp. 133-148 In: Amaresan N., Annapurna K., Sankaranarayanan A., Kumar S. M. et Kumar K., *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*.

Duca D., Lorv J., Patten C. L., Rose D. et Glick B. R., 2014- Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*. Vol. 106(1), pp. 85-125.

El-kest S. E. et Marth E. H., 1992- Freezing of *Listeria monocytogenes* and other microorganisms: a review. *J. Food Prot.*, vol. 55, pp. 639–648

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

Elmer P. A. G. et Reglinski T., 2006- Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, vol. 55(2), pp.155-177.

Etesami H. et Adl S., 2020- *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Their Action Mechanisms in Availability of Nutrients to Plants*, pp. 147-203. In Kumar M., Kumar V. et Prasad R. *Phyto-Microbiome in Stress Regulation*.

Farag M.A., Zhang H. et Ryu C.M., 2007- Dynamic Chemical Communication between Plants and Bacteria through Airborne Signals: Induced Resistance by Bacterial Volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, vol. 39, pp. 1007–1018.

Feazel L. M., Baumgartner L. K., Peterson K. L., Frank D. N., Harris J. K. et Pace N. R., 2009- Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106(38), 16393–16399.

Fincheira P. et Quiroz A., 2018- Microbial volatiles as plant growth inducers. *Microbiological Research*, vol.208, pp.63-75.

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

Freeman B. C., Chen C. et Beattie G. A., 2010- Identification of the trehalose biosynthetic loci of *Pseudomonas syringae* and their contribution to fitness in the phyllosphere. *Environ. Microbiology*, vol.12, pp. 1486–1497

Fuchs J., 2000- The laboratory medium used to grow biocontrol *Pseudomonas* sp. Pf153 influences its subsequent ability to protect cucumber from black root rot. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 32(3), pp. 421-424.

Fuqua W. C., Winans S. C. et Greenberg E. P., 1994- Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, vol. 176, pp. 269-275

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

Gehrke H.-H., 1991- Untersuchung zur Gefriertrocknung von Mikroorganismen. Düsseldorf. VDI-Verlag.

Geudens N., et Martins J. C., 2018- Cyclic Lipodepsipeptides From *Pseudomonas* spp. Biological Swiss-Army Knives. *Frontiers in Microbiology*, vol. 9.

Gomila M., Peña A., Mulet M., Lalucat J. et García-Valdés E., 2015- Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front Microbiol*, vol.6, pp. 214.

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

Hecker M., et Völker U., 2001- General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, vol. 44, pp. 35–91

Heckly R. J., 1985- Principles of preserving bacteria by freeze-drying. *Developments in Industrial Microbiology*, vol. 26, pp. 379–396.

Hesse C., Schulz F., Bull C. T., Shaffer B.T., Yand Q., Shapiro N., Hassan K.A., Varghese N., Elbourne L.D.H., Paulsen I.T., Kyrpides N., Woyke T. et Loper J.E., 2018- Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. *Environmental Microbiology*, vol.20 (6), pp. 2142-2159

Hildebrand D. C. et Schroth M. N., 1972 - Identification of the fluorescent Pseudomonads, pp 281-287 In : Maas Geesteranus H. P. -*Proceedings of the Third international Conference on plant pathogenic Bacteria*.

Jackson M., Frymier J., Wilkinson B., Zorner P. et Evans S., 1998- Growth requirements for production of stable cells of the bioherbicidal bacterium *Xanthomonas campestris*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 21, pp. 237– 241

Jain A., Jain R. et Jain S., 2020 - *Preservation of Microorganisms: Stabs, Slants, Lyophilization and Cryopreservation*, pp. 105-110. *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology*.

Kabaluk J. T., Svircev A. M., Goette M. S. et Woo S. G., 2010 - The use and regulation of microbial pesticides in representative jurisdictions worldwide.

Kalita P. J. et Ram R. M., 2019 - *Industrial Applications of Pseudomonas fluorescens: A Patent Survey*, pp. 383-402 In : Singh H. B., Keswani C. et Singh S. P. *Intellectual Property Issues in Microbiology*.

Kalyanasundaram G. T., Syed N. et Subburamu K., 2021- *Recent developments in plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture*, pp. 181–192 In: Buddolla Viswanath. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*.

Kandaswamy R., Ramasamy M. K., Palanivel R., et Balasundaram, U., 2019- Impact of *Pseudomonas putida* RRF3 on the root transcriptome of rice plants: Insights into defense response, secondary metabolism and root exudation. *Journal of Biosciences*, vol. 44(4).

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

Keswani C., Dilnashin H., Birla H. et Singh S., P., 2019- Regulatory barriers to Agricultural Research commercialization: A case study of biopesticides in India, *Rhizosphere*, vol 11.

Kloepper J. W., Schroth M. N. et Miller T. D., 1980. Effects of rhizosphere colonization by Plant Growth Promoting Rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, vol.70, pp. 1078-1082

Kumar A., Guleria S., Mehta P., Walia A., Chauhan A. et Shirkot C.K. , 2015- Plant growth promoting traits of phosphate solubilizing rhizobacteria isolated from seabuckthorn growing in cold desert region of trans-Himalayas and evaluating their potential on growth of tomato seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, vol.37 (3), pp. 1-12

Lalan Sharma, Shukla S. K., Jaiswal V. P., Gaur A., Pathak A D., Sharma K. K. et Singh S. K., 2021- *Importance of PGPR in the rhizosphere*, pp. 141-161 In: Nath M., Deepesh Bhatt, Bhargava P. et Choudhary D. K., *Microbial Metatranscriptomics Belowground*.

Laue B. E., Jiang Y., Chhabra S. R., Jacob S., Stewart G. S., Hardman A., Downie J. A., O'Gara F. et Williams P., 2000- The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the Rhizobium small bacteriocin, *N*-(3-hydroxy-7-*cis*-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel *N*-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology*, vol. 146:2469–2480

Lebre P.H., De Maayer P. et Cowan D. A., 2017- Xerotolerant bacteria: surviving through a dry spell. *Nature Reviews Microbiology*, vol.15, pp. 285-296.

Leisinger T. et Margraff R., 1979 - Secondary Metabolites of the Fluorescent Pseudomonads. *Microbiological Reviews*. Vol. 43(3), pp. 422-442.

Lelliot R. T., Billing E. et Hayward A. C., 1966 - A Determinative Scheme for the Fluorescent Plant Pathogenic Pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 29 (3), pp. 470–489.

Lengai G. M. W. et Muthomi J. W., 2018 - Plant Growth Promoting Rhizobacteria Formulations and its Scope in Commercialization for the Management of Pests and Diseases. *Journal of Biosciences and Medicines*, vol. 6 (6), pp. 7-41.

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

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

Liu X., Hou C., Zhang J., Zeng X. et Qiao S., 2014- Fermentation conditions influence the fatty acid composition of the membranes of *Lactobacillus reuteri* I5007 and its survival following freeze-drying. *Lett Appl Microbiol*, vol. 59, pp. 398– 403

Loper J.E., Hassan K.A., Mavrodi D.V., Davis E. W., Lim C.K., Shaffer B.T., Elbourne L.D., Stockwell V.O., Hartney S.L., Breakwell K., Henkels M.D., Tetu S.G., Rangel L.I., Kidarsa T.A., Wilson N.L., van de Mortel J.E., Song C., Blumhagen R., Radune D., Hostetler J.B, Brinkac L.M, Durkin A.S, Kluepfel D.A, Wechter W.P, Anderson A.J, Kim YC, Pierson LS, 3rd, Pierson EA, Lindow SE, Kobayashi DY, Raaijmakers JM, Weller DM, Thomashow LS, Allen AE et Paulsen IT., 2012- Comparative genomics of plant-

associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genetics*, vol. 8(7), e1002784.

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

Madbouly A. K., 2018- Efficacy of Pseudomonads as biocontrol agents of phytopathogens. *Novel Research in Microbiology Journal*, vol. 2(3), pp. 48-52

Maheshwari D.K., Saraf M. et Dheeman S., 2019- *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Protagonists of Ever-Sustained Agriculture: An Introduction*, pp. 01-10 in Maheshwari D.K.et Dheeman S. *Field Crops: Sustainable Management by PGPR*.

Martin-Dejardin F., Ebel B., Lemetais G., Minh H. N. T., Gervais P., Cachon R., et al., 2013- A way to follow the viability of encapsulated *Bifidobacterium bifidum* subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: Interest of flow cytometry. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 49, pp. 166-174.

Mathivanan N., Prabavathy V. R. et Vijayanandraj V. R., 2005- Application of talc formulations of *Pseudomonas fluorescens* migula and *Trichoderma viride* pers. Ex SF Gray decrease the sheath blight disease and enhance the plant growth and yield in rice. *Journal of Phytopathology*, vol. 153, pp. 697–701

Meliani A., 2012 - Contribution à l'étude de la diversité écologique et fonctionnelle des *Pseudomonas fluorescens*. Thèse de Biologie. Univ. d'Oran. 272 p.

Mikkat S., Galinski E. A., Berg G., Minkwitz A. et Schoor A., 2000-Salt adaptation in pseudomonads: Characterization of glucosylglycerol-synthesizing isolates from brackish coastal waters and the rhizosphere. *Syst. Appl. Microbiol.* Vol. 23, pp. 31-40.

Mishra J. et Arora N. V., 2017 - Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture. *Applied soil ecology*. Vol.125, pp. 35-45.

Mishra J., Tewari S., Singh S. et Arora N. K., 2014 - *Biopesticides: Where We Stand?*, pp. 37-75 In : Arora N. K., *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*.

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

Miyamoto-Shinohara Y., Sukenobe J., Imaizumi T. et Nakahara T., 2006- Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. *Cryobiology*, vol. 52, pp. 27– 32

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

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

Mputu Kanyinda J.-N. et Thonart P., 2013- Optimisation of production, freeze-drying and storage of *Pseudomonas fluorescens* BTP1. *International Journal Of Microbiology Research*. Vol. 5(1), pp. 370-373.

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

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

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

Mulet M., Lalucat J. et García-Valdés E., 2010- DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*, vol.12(12), pp. 1513–1530

Müller T. et Behrendt U., 2021- Exploiting the biocontrol potential of plant-associated pseudomonads – A step towards pesticide-free agriculture? . *Biological Control*, vol.155.

Muñoz-Rojas J., Bernal P., Duque E., Godoy P., Segura A. et Ramos J. L., 2006- Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, pp. 472–477

Narayanasamy P., 2013 - *Mechanisms of Action of Bacterial Biological Control Agents*, pp. 295-429. *Biological Management of Diseases of Crops*.

Navarro M. V., Newell P. D., Krasteva P. V., Chatterjee D., Madden D. R., O'Toole G. A. et Sondermann H., 2011- Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis. *PLoS Biology*, vol.9(2) :e1000588.

Neilands J. B., 1995- Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270.

Newell P. D., Boyd C. D., Sondermann H. et O'Toole GA., 2011a- A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage. *PLoS Biology*, vol. 9:e1000587.

Newell P. D., Yoshioka S., Hvorecny K. L., Monds R. D. et O'Toole GA., 2011b- Systematic analysis of diguanylate cyclases that promote biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Journal of Bacteriology*, vol. 193:4685–4698.

Omoboye O. O., Geudens N., Duban M., Chevalier M., Flahaut C., Martins J. C., Leclère V., Oni F. E. et Höfte M., 2019- *Pseudomonas* sp. COW3 Produces New Bananamide-Type Cyclic Lipopeptides with Antimicrobial Activity against *Pythium myriotylum* and *Pyricularia oryzae*. *Molecules*, vol.24(22), 4170.

Oni F. E., Geudens N., Omoboye O. O., Bertier L., Hua H. G. K., Adiobo A., Sinnaeve D., Martins J. C. et Höfte M., 2019- Fluorescent *Pseudomonas* and cyclic lipopeptide diversity in the rhizosphere of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*). *Environmental Microbiology*, vol. 3(21), 1019-1034.

Orla-Jensen S., 1909- Die Hauptlinien der natürlichen Bakteriensystems. *Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. II.*, vol. 22, pp. 305-346.

Pahalvi H. N., Rafiyya L., Rashid S., Nisar B. et Kamili A. N., 2021- *Chemical Fertilizers and Their Impact on Soil Health*, pp. 1-20 In Dar G. H., Bhat R. A., Mehmood M. A. et Hakeem K. R., *Microbiota and Biofertilizers, Vol 2*

Palleroni N. J., 1984- *Genus Pseudomonas*. In: Krieg N. R. et Holt J. G., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.1, pp. 141-199.

Palleroni N.J., 2010- The *Pseudomonas* Story. *Environmental Microbiology*, vol.12 (6), pp. 1377-1383.

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

Park H. C., Bae Y. U., Cho S. D., Kim S. A., Moon J. Y., Ha K. C., Kim D. W., Lee K., Jeong Y. K., Kwack D. O., Heo J. S. et Joo W. H., 2007- Toluene-induced accumulation of trehalose by *Pseudomonas* sp. BCNU 106 through the expression of otsA and otsB homologues. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 44, pp. 50-55.

Parray J. A., Jan S., Kamili A. N., Qadri R. A., Egamberdieva D., Ahmad P., 2016- Current perspectives on plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. 35, pp.877-902

- Peiren J., Buyse J., De Vos P., Lang E., Clermont D., Hamon S. et al., 2015-** Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 99(8), 3559–3571
- Peix A, Ramirez-Bahena M.H. et Velázquez E., 2009-** Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*, *Infection. Genetics and Evolution*, vol. 9, 1132–1147pp
- Pembrey R. S., Marshall K. C. et Schneider R.P., 1999-**Cell surface analysis techniques: what do cell preparation protocols do to cell surface properties?. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol.65, pp. 2877-2894.
- Potts M., Slaughter S. M., Hunneke F-U., Garst J. F. et Helm R. F., 2005-** Desiccation tolerance of prokaryotes: application of principles to human cells. *Integrative and Comparative Biology*, vol. 45(5), pp. 800-809.
- Praveen Kumar G., Kishore N., Leo Daniel Amalraj E., Mir Hassan Ahmed S. K., Rasul A. et Desai S., 2012-** Evaluation of fluorescent *Pseudomonas* spp. with single and multiple PGPR traits for plant growth promotion of sorghum in combination with AM fungi. *Plant Growth Regulation*, vol. 67(2), pp 133-140.
- Rathore R., Vakharia D. N. et Rathore D. S., 2020-** In vitro screening of different *Pseudomonas fluorescens* isolates to study lytic enzyme production and growth inhibition during antagonism of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*, wilt causing pathogen of cumin. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, vol. 30(1).
- Rijavec T. et Lapanje A., 2016-**Hydrogen Cyanide in the Rhizosphere: Not Suppressing Plant Pathogens, but Rather Regulating Availability of Phosphate. *Frontiers in Microbiology*, vol. 7.
- Rossignol G., 2007-** Contribution à l'étude de facteurs de virulence d'une souche hospitalière de *Pseudomonas fluorescens* :activité hémolytique et variation phénotypique. Thèse de microbiologie, Biologie, Université de Rouen, pp. 266.
- Santivarangkna C., Wenning M., Foerst P. et Kulozik U., 2007-**Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *J. Appl. Microbiol.*, vol. 102, pp. 748-756.
- Scales B. S., Dickson R. P., LiPuma J. J. et Huffnagle G. B., 2014-** Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 27(4), pp. 927–948
- Schisler D. A., Slininger P. J. et Olsen N. L., 2016-** Appraisal of selected osmoprotectants and carriers for formulating Gram-negative biocontrol agents active against *Fusarium* dry rot on potatoes in storage. *Biological Control*, vol.98, pp. 1-10.

- Selvaraj S., Ganeshamoorthi P., Anand T., Raguchander T., Seenivasan N. et Samiyappan R., 2014-** Evaluation of a liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense and *Helicotylenchus multicinctus* in banana plantation. *Biocontrol*, vol. 59, pp. 345–355
- Sharma P. et Gaur N., 2021-** *Microbial Biopesticides Use in Insect-Pest Management: An Overview*, pp. 123-145 In : Kaushal M. et Prasad R., *Microbial Biotechnology in Crop Protection*.
- Silby M. W., Winstanley C., Godfrey S. A. C., Levy S. B. et Jackson R. W., 2011-** *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 35(4), pp.652–680.
- Singh P. P., Kujur A., Yadav A., Kumar A., Singh S. K. et Prakash B., 2019-** *Mechanisms of Plant-Microbe Interactions and its Significance for Sustainable Agriculture*, pp. 17–39 In Singh A. K., Kumar A. et Singh P. K., *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture*.
- Stanier R.Y., Palleroni N.J. et Doudoroff M., 1966 -** The Aerobic Pseudomonads: a Taxonomic Study. *The Journal of General Microbiology*, vol. 43, pp. 159-271
- Stephan D., Da Silva A.-P. M. et Bisutti I. L., 2016-** Optimization of a freeze-drying process for the biocontrol agent *Pseudomonas* spp. and its influence on viability, storability and efficacy. *Biological Control*. Vol. 94, pp. 74-81.
- Stockwell V. O. et Stack J. P., 2007-** Using *Pseudomonas* spp. for Integrated Biological Control. *Phytopathology*, vol. 97(2), pp. 244–249.
- Stoodley P., Sauer K., Davies D. G. et Costerton J. W., 2002-** BIOFILMS AS COMPLEX DIFFERENTIATED COMMUNITIES. *Annual Review of Microbiology*. Vol.56, pp. 187-209.
- Subashri R., Raman G. et Sakthive N., 2012-***Biological Control of Pathogens and Plant Growth Promotion Potential of Fluorescent Pseudomonads*, pp. 77-110 In Maheshwari K. D., *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*.
- Sunkad G., Shruthi T. H. et Raja, 2019-** Evaluation of Indigenous Fluorescent Pseudomonads for the Management of Newly Emerging Wilt of Pomegranate Caused by *Ceratocystis fimbriata*, pp. 269-285 In: Sayyed R. Z., Reddy M. S. et Sarjiya Antonius. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for Sustainable Agriculture*.
- Teixidó N., Cañamás T. P., Usall J., Torres R., Magan N. et Viñas I., 2005-** Accumulation of the compatible solutes, glycine-betaine and ectoine, in osmotic stress adaptation and heat shock cross-protection in the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 41, pp. 248–252

Thakur N., Kaur S., Tomar P., Thakur S. et Yadav A. N., 2020- *Microbial biopesticides: Current status and advancement for sustainable agriculture and environment*, pp. 243-282 In : Rastegari A. A., Yadav A. N. et Yadav N., *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*.

Trelea I. C., Fonseca F. et Passot S., 2016- Dynamic modeling of the secondary drying stage of freeze drying reveals distinct desorption kinetics for bound water. *Dry Technol.*, vol. 34, pp. 335–345

Tripathi P., Beaussart A., Andre G., Rolain T., Lebeer S., Vanderleyden J., Hols P. et Dufrière Y. F., 2012- Towards a nanoscale view of lactic acid bacteria. *Micron*, vol. 43(12), pp. 1323-1330.

Tyedmers J., Mogk A. et Bukau B., 2010- Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 11, pp.777-788.

Velusamy P., Immanuel J. E., Gnanamanickam S. S. et Thomashow L., 2006- Biological control of rice bacterial blight by plant-associated bacteria producing 2,4-diacetylphloroglucinol. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 52(1), pp. 56-65.

Vessey J. K., 2003- Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, vol. 255, pp. 571-586

Vinay J. U., Naik M. K., Rangeshwaran R., Chennappa G., Shaikh S. S. et Sayyed R. Z., 2016- Detection of antimicrobial traits in fluorescent pseudomonads and molecular characterization of an antibiotic pyoluteorin. *3 Biotech*, vol. 6(2).

Vives-Peris V., Gómez-Cadenas A. et Pérez-Clemente R. M., 2018- Salt stress alleviation in citrus plants by plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas putida* and *Novosphingobium sp.* *Plant Cell Reports*, vol. 37, pp.1557-1569.

Volodymyr I., 2011- Bioagents of environmental and engineering bioprocesses. In: *Environmental microbiology for engineers*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, pp. 89-98.

Wahengbam J., Bhushan L. S., Patil J. B. et Pathma J., 2020- *Insecticides Derived from Natural Products: Diversity and Potential Applications*, pp. 403-437 In Yadav A. N., Singh J., Singh C. et Yadav N., *Current Trends in Microbial Biotechnology for Sustainable Agriculture*.

Walia A., Putatunda C., Sharma R., Sharma S., et Thakur A., 2021- *Biocontrol: A Sustainable Agricultural Solution for Management of Plant Diseases*, pp. 1-54 In Kaushal M. et Prasad R. *Microbial Biotechnology in Crop Protection*.

Wani S. P. et Gopalakrishnan S., 2019-*Plant Growth-Promoting Microbes for Sustainable Agriculture*, pp.19-45 In Sayyed R. Z., Reddy M. S. et Antonius S., *Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for Sustainable Agriculture*

Whitehead N. A., Barnard A. M., Slater H., Simpson N. J. et Salmond G. P., 2001- Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiololgy Reviews*, vol. 25(4), pp. 365-404.

Yasmeen T., Aziz A., Arif M.S., Riaz M., Ali S. et Rizwan M., 2021- *Pseudomonas as Plant Growth-Promoting Bacteria and Its Role in Alleviation of Abiotic Stress*, pp. 157-185 In Mohamed H.I., El-Beltagi H.S. et Abd-Elsalam K.A. *Plant Growth-Promoting Microbes for Sustainable Biotic and Abiotic Stress Management*.

Zafrani L. et Monneret G., 2017- Understanding Flow Cytometry. *Méd. Intensive Réa*, vol. 26, pp. 517-522

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

Zhao M.-M., Lyu N., Wang D., Wu X.-G., Zhao Y.-Z., Zhang L.-Q. et Zhou H.-Y., 2020 - PhlG mediates the conversion of DAPG to MAPG in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Scientific Reports*, vol.10(1).