

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Université de BLIDA -1-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie



Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention du Diplôme de Master 2 en Biotechnologie
Option : Biotechnologie Microbienne

Métabolites secondaires des *Pseudomonas* spp. fluorescents
dans le contrôle biologique des phytopathogènes pour une
agriculture durable

Réalisé par :

M^{lle} TEBBOUCHE Khaoula

M^{lle} SIAKHENE Asmaa

Soutenu le : 27 / 09 /2020

Devant le jury composé de :

Présidente :	Dr AMMAD F.	MCA	USBD1
Examinatrice :	M^{me} BENSAID F.	MAA	USBD1
Promotrice :	Dr BENOUSSAID N.	MCB	USBD1

Année Universitaire : 2019 / 2020

Remerciements

Nos remerciements vont à *ALLAH*, le tout puissant, le miséricordieux, qui nous a donné la force, la santé, la volonté et la patience pour mener à terme ce travail.

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

Nous tenons à remercier *Dr BENOUSSAID Nacera*, maître de conférences B à l'université de BLIDA -1-, qui a accepté de nous encadrer et de diriger ce travail de recherche, ça ne sera pas suffisant pour lui à exprimer toute nos grandes reconnaissances pour la confiance, l'optimisme, la sympathie et le grand soutien qu'elle nous a accordé pour faire aboutir ce travail.

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

Nos remerciements sont aussi adressés au membre de jury *M^{me} BENSAID Fatíha*, maître assistante A à l'université de BLIDA -1-, qui nous a fait l'honneur en acceptant d'examiner ce travail et qu'elle accepte ici nos sentiments de gratitude.

Un immense merci à *Pr KRIMI Zoulikha* et l'ingénieure de laboratoire *M^{me} Samía*, pour leurs accueils au niveau du laboratoire de phytopathologie de l'université de BLID -1- bien que nous n'ayons pas pu terminer notre stage.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude,

A l'âme de *mes grands-pères*, que dieu vous garde dans son vaste paradis.

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et ma source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde toujours à côté de moi, à toi *mon père*.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; *maman* que j'adore.

A la personne que j'aime beaucoup et qui m'a soutenu tout au long de ce travail, à *mon fiancé Imad Eddine*.

Aux personnes dont j'aurais bien aimé leurs présences dans ce jour, à *mes grandes-mères*, à *mon frère Abdallah*, *mes sœurs Zahra* et *Maroua* et *son époux Ayoub*, à *ma nièce Tassnime*, et à chaque personne de la famille *TEBBOUCHE*, *TOUNANI* et *CHENOUI*, particulièrement *ma tante Houria*, *ma belle-mère Karima* et *mon oncle Rachid*, je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides et encouragements.

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis, collègues d'étude, et sœurs de cœur, *ma moitié Asmaa*, *Chaïma*, *Fatima* et à *ma super promotion de Master « Biotechnologie microbienne »*.

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

Juste ... MERCI à vous

Dédicace

Je dédie ce mémoire,

À *ma très chère mère*, quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différences obstacles

À *mon père*, à mon héros et à ceux qui je porte son nom avec fierté et dignité, tu as toujours été à ma côté pour me soutenir et m'encourager.

Sachez que je vous aime profondément et que je vous suis reconnaissante. Que Dieu vous donne une longue vie.

À *mes frères et leurs épouses Amine et Anissa, Mohammed et Ferial, Sidali et Sihem, Karim*, et *mes sœurs Faiza, Amina* et ma jolie *Meriem*. Qui sont toujours à côtés de moi et me soutenir et me donner la force pour terminer mes études.

À mes chers *neveux et nièces*. Et à toute ma famille *Siakhene et Baouni*.

À l'âme de *ma grande-mère*, mes tantes *Zhour et Malika* رَحْمَهُمُ اللهُ.

À mes chères copines : *Amel, Khadidja D, Fella, Amina, Khadidja, Fatima, Lilya, Amina, Rim, Meriem, Hanane, Meriem, Ferial, Youssra*.

Et à ma partenaire dans le mémoire et *ma chère amie, Khaoula*, pour tout son soutien et son encouragement tout au long du travail malgré les conditions difficiles.

À tous mes amis et mes proches qui m'ont toujours me soutenir et m'encourager dans ma vie, merci à vous infiniment.

Résumé

Les organismes phytopathogènes constituent les principaux facteurs affectant la productivité et la santé des plantes. L'agriculture durable a orienté de nombreuses approches et techniques comme alternative potentielle pour réduire les méfaits des produits chimiques. L'une de ces stratégies est l'utilisation du microorganisme du sol pour le contrôle des maladies des plantes. L'objectif de la présente étude est de mettre en évidence certains métabolites secondaires impliqués dans le contrôle biologique des phytopathogènes par l'usage des *Pseudomonas* spp. fluorescents étant l'un des principaux groupes microbien concernés et le plus abondants dans la rhizosphère. Dans ce mémoire, nous avons signalé le potentiel biotechnologique de biopesticides microbiens, les mécanismes de lutte biologique de *Pseudomonas* spp. fluorescents qui interviennent dans la protection des plantes contre les phytopathogènes y compris la résistance systémique induite (ISR), la compétition ainsi que l'antagonisme microbien liés à la production de métabolites secondaires ayant des propriétés antibiotiques parmi eux les phénazines, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine, le 2,4-diacetylphloroglucinol et les peptides cycliques. Nous avons également analysé des travaux expérimentaux dont leur contexte porte sur la recherche, l'optimisation et la production des antibiotiques de nature phénazinique *in vitro*. Les principaux résultats acquis confirment le rôle de la phénazine dans la lutte biologique. Nous avons souligné aussi les problèmes de formulation, d'enregistrement et de l'application des biopesticides à grand échelle. L'objective de notre travail expérimental porte sur la production des composés à effet antibiotiques de nature phénaziniques, nous avons testé l'activité antimicrobienne de 20 souches de *Pseudomonas* spp fluorescents issues de sol rhizosphérique de la tomate. Le test d'antagonisme réalisé *in vitro* sur milieu King B a montré que les souches *Pseudomonas* Ps 1, Ps 2, Ps 3, Ps 13 et Ps 15 ont un effet antibactérien avec des diamètres de zone d'inhibition allant jusqu'à 11.3mm enregistrée par les souches Ps3 et Ps13 *vis-à-vis* l'isolat E3.

Mots clés : Métabolites secondaires, *Pseudomonas* spp. fluorescents, biocontrôle, phytopathogènes, phenazine.

Abstract

Secondary metabolites of fluorescents *Pseudomonads* in the biological control of phytopathogens for sustainable agriculture

Phytopathogenic organisms are the main factors affecting the productivity and health of plants. Sustainable agriculture has guided many approaches and techniques as a potential alternative to reduce the harms of chemicals. One of these strategies is the use of the soil microorganism for the control of plant diseases. The objective of the present study is to highlight certain secondary metabolites involved in the biological control of phytopathogens by the use of fluorescents *Pseudomonads*, one of the most abundant microorganisms in the rhizosphere. In this thesis, we reported on the biotechnological potential of microbial biopesticides, the biological control mechanisms of fluorescents *Pseudomonads* agents which are involved in the protection of plants against phytopathogens including induced systemic resistance (ISR), competition and microbial antagonism which linked to the production of secondary metabolites with antibiotic properties among them phenazines, pyoluteorin, pyrrolnitrin, 2,4-diacetylphloroglucinol and cyclic peptides. We also analyzed experimental works whose context relates to the research, optimization and production of phenazine antibiotics *in vitro*. The main results obtained confirm the role of phenazine in biological control. Furthermore, we emphasized on formulation, registration and field application problems of biopesticides. The objective of our experimental work focuses on the production of phenazine antibiotic compounds, we tested the antimicrobial activity of 20 strains of fluorescents *Pseudomonads* from rhizospheric tomato soil. The antagonism test carried out *in vitro* on King B medium showed that the strains *Pseudomonas* Ps 1, Ps 2, Ps 3, Ps 13 and Ps 15 have an antibacterial effect with inhibition zone diameters up to 11.3mm recorded by the strains Ps3 and Ps13 against the isolate E3.

Key words: secondary metabolites, fluorescents *Pseudomonads*, biocontrol, phytopathogenic, phenazine.

ملخص

المركبات الثانوية الناتجة من *Pseudomonas spp. fluorescents* في مكافحة البيولوجية لمسببات الأمراض النباتية من أجل الزراعة المستدامة

الكائنات المسببة للأمراض النباتية هي العوامل الرئيسية التي تؤثر على إنتاجية وصحة النباتات. لقد وجهت الزراعة المستدامة العديد من الأساليب والتقنيات كبديل محتمل للحد من أضرار المواد الكيميائية. إحدى هذه الاستراتيجيات هي استخدام الكائنات الحية الدقيقة المتواجدة في التربة للسيطرة على أمراض النبات. الهدف من هذه الدراسة هو تسليط الضوء على بعض المركبات الثانوية المشاركة في مكافحة البيولوجية لمسببات الأمراض النباتية باستخدام *Pseudomonas spp. fluorescents* أحد أكثر الكائنات الحية الدقيقة تواجدا في منطقة الجذور. في هذه المذكرة، قمنا بالإشارة إلى الإمكانيات التكنولوجية الحيوية لمبيدات الآفات الحيوية الميكروبية، وآليات مكافحة البيولوجية باستعمال *Pseudomonas fluorescents* التي تشارك في حماية النباتات ضد مسببات الأمراض النباتية بما في ذلك المقاومة الجهازية المستحدثة (ISR)، المنافسة وكذلك التضاد الميكروبي الذي يرتبط بإنتاج المركبات الثانوية بخصائص المضادات الحيوية من بينها الفينازينات، البيولوتورين، البيرونترين، 2،4-ثنائي أسيتيل فلوروجلوسينول والبيبتيدات الحلقية. قمنا أيضًا بتحليل أعمال تجريبية يتضمن محتواها على البحث عن المضادات الحيوية ذات الطبيعة الفينازينية وتحسينها وإنتاجها في المختبر. تؤكد النتائج الرئيسية التي تم الحصول عليها دور الفينازين في مكافحة البيولوجية. كذلك تطرقنا إلى المشاكل المتعلقة بصياغة، تسجيل وتطبيق المبيدات الحيوية على الميدان. يتعلق عملنا التجريبي بإنتاج مركبات ذات تأثير مضاد حيوي من الطبيعة الفينازينية، وذلك باختبار نشاط مضادات الميكروبات لعشرون سلالة من *Pseudomonas* مشتقة من تربة جذور الطماطم. أظهر اختبار التضاد الذي تم إجراؤه في المختبر على وسط King B أن سلالات *Pseudomonas* التالية: Ps1، Ps2، Ps3، Ps13 و Ps15 لها تأثير مضاد للبكتيريا بأقطار تصل إلى 11.3 مم التي تم تسجيلها بواسطة سلالات Ps3 و Ps13 مقابل السلالة E3.

الكلمات المفتاحية: المركبات الثانوية، *Pseudomonas spp. fluorescent*، مكافحة البيولوجية، الكائنات المسببة للأمراض النباتية، الفينازين.

Liste des abréviations

2-OH-PCA :	Hydroxy-Phenazine-1-Carboxylic Acid
AHL:	Homoserine Lactone Acylée
BCA :	Biocontrol Agent
Bt:	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CCM:	Chromatographie sur Couche Mince
CE:	Conformité Européenne
CLP :	Lipopeptide Cyclique
DAPG :	Diacetylphloroglucinol
DO :	Densité Optique
DRB:	Deleterious Rhizobacteria
EPA :	Environment Protection Agency
GC-MS :	Gas Chromatography- Masse Spectrométrie
HCN :	Cyanure d'hydrogène
HP:	Hydroxy-Phenazine
IA :	Ingrédient Actif
IMP:	Integrated Pest Management
ISR :	Résistance Systématique Induite
MSM:	Minimal Salts Medium
PCA :	Acide Phenazine-1-Carboxylique
PCN :	Phenazine-1-Carboxamide
PGPR :	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
Phz :	Phenazine

PIP :	Protecteurs Incorporés aux Plantes
PLT :	Pyoluteorine
PPMD :	Pigment Production Medium
PRN :	Pyrrolnitrine
PYO:	Pyocianine
SAR :	Résistance Acquisée Systématique
TCAC :	Taux de Croissance Annuelle Composé
TSB :	Bouillon Tryptone de Soja
TY:	Trypticase Yeast
UV-VIS:	UltraViolet – Visible

Liste des figures

Figure 1. Le marché mondial des biopesticides microbiens en 2006.	4
Figure 2. Les opportunités attractives sur le marché des biopesticides	5
Figure 3. Aperçu des interactions plante-microbe qui se produisent dans la rhizosphère et les sols en vrac sous une plante.....	8
Figure 4. Diagramme schématisé illustre les mécanisme directs et indirects des PGPR sur la croissance des plantes.	9
Figure 5. Relations phylogénétiques des protéobactéries, contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux <i>Pseudomonas</i>	12
Figure 6. Un aperçu des mécanismes de lutte biologique contre les agents phytopathogènes qui ont été mis en évidence dans des micro-organismes bénéfiques interagissant avec des plantes.	15
Figure 7. Représentation schématique des métabolites secondaires produits par les <i>Pseudomonas</i> fluorescents dans la rhizosphère impliquées dans le contrôle biologique des phytopathogènes	19
Figure 8. Suppression des phytopathogènes par les <i>Pseudomonas</i> à travers la privation de fer médiée par les sidérophores	20
Figure 9. Exemples représentatifs de différents sidérophores et de leurs producteurs naturels.	21
Figure 10. Représentation graphique des métabolites de lutte biologique rapportés des <i>Pseudomonas</i> fluorescents avec leur mode d'action.	23
Figure 11. Action cumulative des phénazines sur les cellules phytopathogènes entraînant un contrôle biologique	25
Figure 12. Activité antimicrobienne de l'extrait de benzène séché dans divers solvants. (A) <i>B. Subtilis</i> (B) <i>B. Megaterium</i> (C) <i>Streptomyces</i> sp. (D) <i>N. Tenerifensis</i> ; C = control, EA = éthyle acétate, Bz = benzène, Met = méthanol, But = butanol	30

Figure 13. Activité de lutte biologique de *P. chlororaphis* GBSO7 contre *Aletrmania alternata* (A) *Fusarium oxysporum* (B) *Phytophthora sp* (C) et, *Fusarium solant* (D) 31

Figure 14. Activité antifongique de la souche KNU17Pc1 de *Pseudomonas chlororaphis* contre différents phytopathogènes à partir du test de double culture (métabolites diffusibles) : (A) *A. Alternate*, (B) *C. dematium*, (C) *C. gloeosporioides*, (D) *F. graminearum*, (E) *F. oxysporum f.sp. melonis*, (F), *F. subglutinans*, (G), *P. capsici*, (H) *R. solani AG-1 (IA)*, (I) *S. lycopersici* 31

Figure 15. (a) OD362 de surnageant de culture dans trois milieux différents jusqu'à 5 jours d'incubation (b) Production de métabolite à trois températures différentes dans du milieu MSM 34

Figure 16. (a) Plaque CCM montrant un seul point d'extrait séché du métabolite (A) dissous dans de l'acétate d'éthyle, (B) extrait de benzène brut, (b) spectre UV-vis de l'extrait de benzène séché dans l'acétate d'éthyle. Le spectre UV-vis de la phénazine standard (i) et de la fraction éluée d'acétate d'éthyle de la colonne (ii) est indiqué dans l'encart 34

Figure 17. Spectre de masse GC-EI du composé antimicrobien de *P. cholororaphis* GBPI 507..... 34

Figure 18. Production de (A) PCA et (B) 2-OH-PCA de la souche KNU17Pc1 cultivées dans sept milieux liquides différents..... 34

Figure 19. Résultats de confrontation des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent vis-à-vis la souche bactérienne E3 : (A) Ps1-E3, (B) Ps2-E3, (C) Ps3-E3, (D) Ps13-E3, (E) Ps15-E3 41

Liste des tableaux

Tableau 1. Rôle biotechnologique des PGPR et leurs activités fonctionnelles.....	10
Tableau 2. Métabolites secondaires des <i>Pseudomonas</i> fluorescents étudiés dans le contrôle biologique des phytopathogènes.....	19
Tableau 3. Activité antifongique de <i>Pseudomonas chlororaphis</i> KNU17Pc1.....	32
Tableau 4. Liste des produits des souches de <i>Pseudomonas chlororaphis</i> commercialisés comme biopesticides.....	39
Tableau 5. Activité antibactérienne des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents	41

Table des matières

Introduction	1
Synthèse bibliographique	
Chapitre I. Biopesticides microbiens et l'agriculture durable	3
I. 1 Biopesticides microbiens.....	3
I. 2 Marché des biopesticides.....	4
I. 3 Avantages et limites des biopesticides	5
Chapitre II. Les rhizobactéries	7
II. 1 Notion de rhizosphère	7
II. 2 Généralité sur les PGPR.....	8
II. 3 L'intérêt biotechnologique des PGPR dans le domaine agricole	10
Chapitre III. <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents	12
III. 1 Généralité sur le genre <i>Pseudomonas</i>	12
III. 2 Evolution taxonomique sur le genre <i>Pseudomonas</i>	13
III. 3 <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents	14
III. 4 Mécanisme de biocontrôle des <i>Pseudomonas</i> spp. Fluorescents phytobénéfique...	15
III.4.1 Compétition.....	16
III.4.2 Antibiose	16
III.4.3 Induction de la résistance systémique.....	16
Chapitre IV. Métabolites impliqués dans la lutte biologique	18
IV.1 Sidérophores	20

IV.2 Enzymes dégrade les parois cellulaires (CWDE).....	22
IV.3 Antibiotiques	22
IV.3.1 Acide cyanhydrique (HCN)	23
IV.3.2 Phénazines.....	24
IV.3.3 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)	25
IV.3.4 Pyrrolnitrine (PRN)	26
IV.3.5 Pyolutéorine (PLT)	27
IV.3.6 Composés Lipopeptidiques (CLP).....	27
IV. 4 Quorum sensing	28
Chapitre V. Cas de recherche et production des antibiotiques de nature phénazinique	29
V.1 Choix de souche.....	29
V.2 Activité antimicrobienne	29
V.3 Production, extraction et identification de phénazine	32
Chapitre VI. Formulation et commercialisation.....	36
Partie expérimentale	
I. Objectif.....	40
II. Matériel.....	40
II.1 Matériel biologique.....	40
II.1.1 Les souches de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents.....	40
II.1.2 Les bactéries phytopathogènes.....	40
II.2 Matériel non biologique.....	40

III. Méthode et résultats	40
Conclusion et perspectives.....	42
Références bibliographique	

Introduction

Les microorganismes phytopathogènes affectant la santé et la productivité des plantes constituent un obstacle majeur et sérieux à la production alimentaire dans le monde (Chaudhari et al.,2017).

L'utilisation des produits chimiques sous forme des fertilisants et des pesticides ou les plantes résistantes, sont à la base de l'amélioration des rendements des diverses cultures, mais dans l'autre côté ces intrants chimiques ont provoqué des sérieux problèmes sur la biodiversité, la santé humaine, et le développement de la résistance chez les agents pathogènes (insectes, nématodes, champignons, bactéries) (Bhardwaj et al.,2014). La lutte biologique est donc considérée comme un substitut ou un moyen complémentaire de diminuer l'utilisation des pesticides chimiques dans l'agriculture (Singh et al.,2011), par l'utilisation des microorganismes bénéfiques (Vessey,2003).

La rhizosphère ; la zone d'interface entre la plante et le sol ; abrite plusieurs microorganismes qui interagissent avec la plante et influencent sa croissance. Certains ont des effets délétères, d'autres sont bénéfiques. Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes « PGPR » établissent une symbiose associative avec les plantes en stimulant leur croissance et en induisant une résistance contre divers microorganismes phytopathogènes (Panpatte et al.,2016; Dorjey et al.,2017).

Parmi ces bactéries présentant un intérêt agricole, *Pseudomonas* spp. fluorescents font l'objet d'une attention particulière. Leur utilisation en agriculture comme biofertilisants ou biopesticides offre un bon rendement et pourrait réduire l'apport d'engrais ou de pesticides chimiques (Bhattacharyya et Jha,2012).

La grande diversité des mécanismes d'action de ces *Pseudomonas* est principalement liée à leur grande capacité à produire une large gamme de métabolites secondaires et à induire l'ISR chez les plantes (Weller et al.,2007). En effet, Chez les *Pseudomonas* fluorescents, l'antagonisme envers les phytopathogènes est induit par des métabolites secondaires tels que HCN, PHZ, phloroglucinol, PLT, PRN et CLPs (Haas et Défago,2005; Mishra et Arora,2018). Ces bactéries sont également capables de synthétiser des sidérophores appelés pyoverdines ou pseudobactines. Ces molécules sont impliquées dans l'amélioration de la croissance et de la santé des végétaux (Lemanceau et al.,2009) et contribuent à l'acquisition du fer par les plantes (Vansuyt et al.,2003).

Ces métabolites produits par les *Pseudomonas* spp. sont régulés par des molécules de signalisation de quorum sensing (QS) (**Shahid et al.,2018**).

Plusieurs travaux ont montré le potentiel extraordinaire des phénazines qu'est dû à leurs propriétés physicochimiques (**Pierson et Pierson,2010**). Ces propriétés ont été utilisées pour des applications biotechnologiques principalement le contrôle biologique (**Rane et al.,2007**).

Les *Pseudomonas* fluorescents sont un bon exemple d'utilisation durable des microbes, mais la formulation et la commercialisation de produits agricoles à base de ces bactéries n'est pas si répandue, en raison de certains inconvénients que leur application est toujours présente et qu'il faut surmonter (**O'Callaghan,2016; Yanes et Bajsa,2016**).

L'objectif de ce travail est d'apporter un plus dans la lutte biologique par l'étude de bactéries bénéfiques pour les plantes (*Pseudomonas* spp fluorescents), en déterminant les principaux métabolites secondaires synthétisés par ces microorganismes dans le cadre de l'agriculture durable et en signalons également les enjeux d'application des biopesticides au stade pratique.

Synthèse bibliographique

Chapitre I :
Biopesticides microbiens et
l'agriculture durable

Depuis le milieu du XIXe siècle jusqu'à nos jours, les pesticides synthétiques ont été un agent de lutte contre les ravageurs (**Dhakal et Singh,2019**). Leur utilisation en agriculture affecte l'environnement du sol, sa fertilité et l'émergence d'une résistance aux fongicides chez les agents pathogènes (**David et al.,2018**). Par conséquent, il est urgent de mettre au point des biopesticides pour lutter efficacement contre les ravageurs agricoles sans nuire gravement à la chaîne écologique ni aggraver la pollution de l'environnement (**Mnif et Ghribi,2015**). La lutte biologique est donc considérée comme un substitut ou un moyen complémentaire pour diminuer l'utilisation de pesticides chimiques dans l'agriculture (**Singh et al.,2011**).

Les biopesticides sont certains types de pesticides dérivés de matières naturelles telles que les animaux, les plantes, les bactéries et certains minéraux (**Copping et Menn,2000; Thakore,2006; Dhakal et Singh,2019**). L'Environment Protection Agency (EPA) reconnaît trois catégories de biopesticides: les pesticides microbiens, les protecteurs incorporés aux plantes (PIP) et les pesticides biochimiques (**Dhakal et Singh,2019**).

Actuellement, il y a environ 299 ingrédients actifs (IA) de biopesticides enregistrés et plus de 1400 enregistrements de produits de biopesticides actifs dans le monde (**Burges,2012**). Parmi ceux-ci, il y a 125 principes actifs à base d'espèces/de souches de microorganismes ou de leurs métabolites pesticides, dont 57 étiquetés pour une utilisation contre des invertébrés (**Arthurs et al.,2018**).

I. 1 Biopesticides microbiens

En 1835, Agostino Bassi a découvert que les microbes provoquent des maladies, ce qui a conduit à l'idée d'utiliser des microbes pour contrôler les insectes ravageurs et les maladies (**Chaufaux,1995; Nollet et Rathore,2015**). Parmi les biopesticides, les agents microbiens sont soit des bactéries, des champignons, des levures et même des virus. Ils sont employés dans le monde entier dans des cultures en champ et en serres pour réduire de multiples maladies sur diverses céréales, légumineuses, fruits, fleurs et plantes d'ornement (**Fravel,2005; Montesinos et Bonaterra,2017**). En 1938, un biopesticide disponible dans le commerce a été vendu sur la base de la bactérie insecticide *Bacillus thuringiensis* (Bt) en France (**Chaufaux,1995**).

Pour tous les types de cultures, les biopesticides bactériens occupent environ 74% du marché mondiale des biopesticides microbiens (**Thakore,2006**) (**Figure 1**).

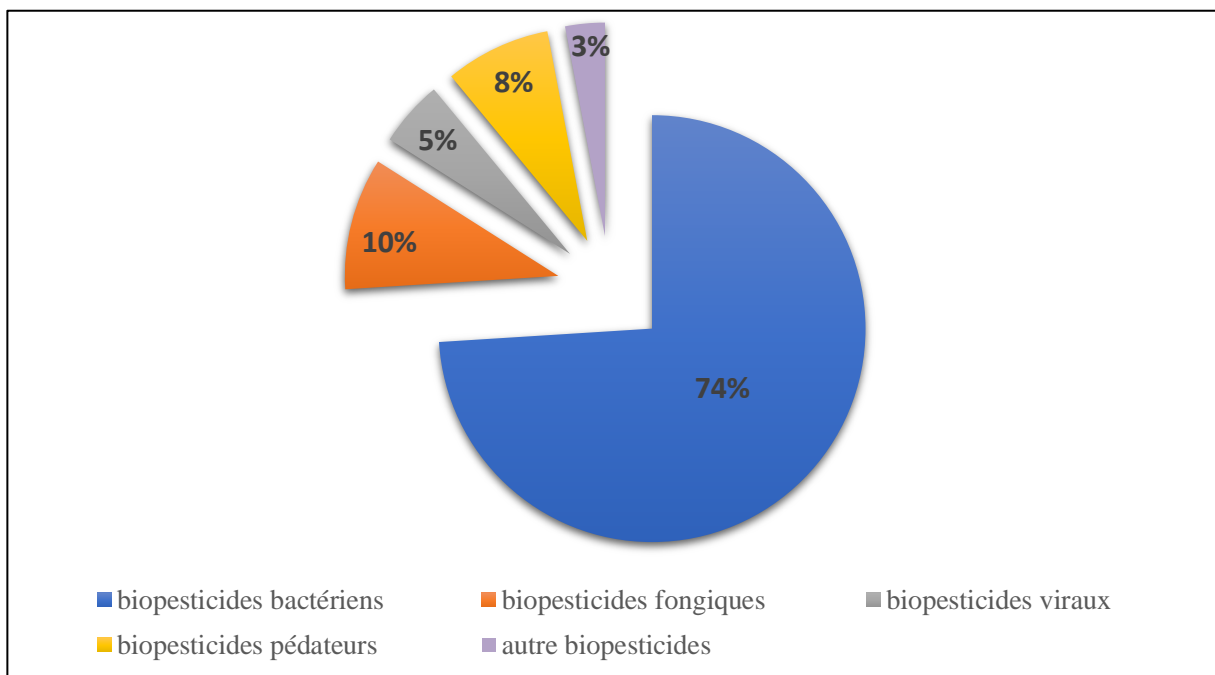


Figure 1. Le marché mondial des biopesticides microbiens en 2006 (Thakore,2006).

La rhizosphère est l'habitat de plusieurs rhizobactéries bénéfiques également appelées PGPR (Kloepper et al.,1980; Kloepper et al.,1989) . Ces bactéries colonisent agressivement les racines des plantes et ont un rôle énorme dans la promotion de la croissance des plantes (PGP) et ont été utilisés comme agents de lutte biologique (BCA), en particulier comme formulations à base de cellules depuis plusieurs décennies (Mishra et Arora,2018).

I. 2 Marché des biopesticides

Ces dernières années, les biopesticides sont largement utilisés à travers le monde pour lutter contre les insectes nuisibles et les maladies. Ils présentent un des secteurs, en pleine croissance sur le marché international, qui devrait accroître sa demande prochainement (Ghodake et al.,2018).

En 1991, les biopesticides représentaient 1 % du marché mondial des pesticides, soit environ 100 millions de dollars (Chaufaux,1995). Après plusieurs décennies de croissance relativement stagnante, le marché américain des biopesticides (y compris les bioinsecticides, acaricides, fongicides, herbicides, bactéricides, algues et stimulants) est évalué à 1,1 milliard de dollars en 2016, et devrait croître à 17 % du TCAC entre 2016 et 2022. Ce taux de croissance dépasse de loin le TCAC de 3 % prévu pour les pesticides classiques (Markets et Markets, 2016) (Figure 2).

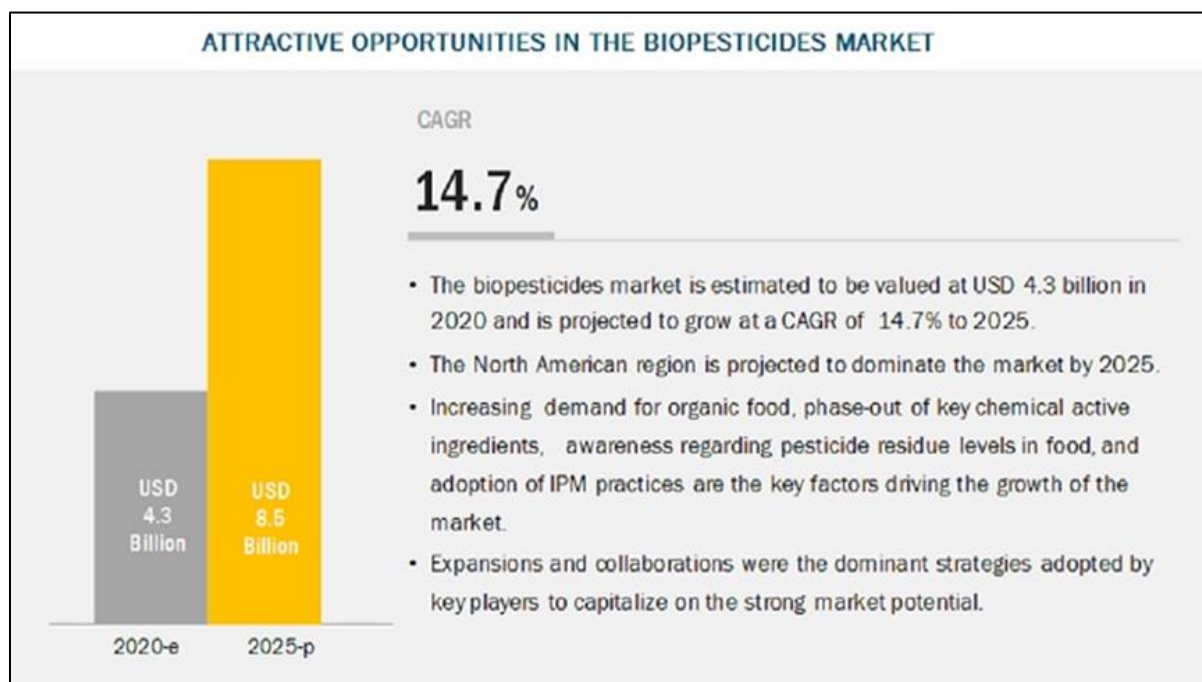


Figure 2. Les opportunités attractives sur le marché des biopesticides (Markets et Markets, 2016).

Le marché européen est estimé à près de 200 millions de dollars et devrait être le marché à la croissance la plus rapide en raison de la réglementation stricte en matière de pesticides et de la demande croissante des producteurs biologiques. Le marché asiatique a une grande opportunité de croissance pour les biopesticides car la Chine et l'Inde adoptent plus de biopesticides dans les champs que les pesticides chimiques synthétiques (Ghodake et al.,2018; Mishra et al.,2020).

Le développement de mécanismes de réglementation stricts est également important pour maintenir la qualité et la disponibilité des biopesticides à un coût abordable dans les pays en développement (Ghodake et al.,2018).

I. 3 Avantages et limites des biopesticides

Les biopesticides gagnent un intérêt dans le monde entier en raison des avantages liés à leur sécurité environnementale, à la spécificité des cibles, à l'efficacité, à la biodégradabilité, à la pertinence des programmes de lutte intégrée et compte tenu de la demande croissante d'aliments biologiques (Kumar et Singh,2015).

Certains avantages spécifiques des biopesticides par rapport aux pesticides chimiques conventionnels sont énumérés ci-dessous (Ghodake et al.,2018) :

- Les biopesticides sont généralement intrinsèquement moins toxiques que les pesticides chimiques conventionnels.

- Les biopesticides n'affectent généralement que l'organisme nuisible cible et les organismes étroitement apparentés, contrairement aux pesticides conventionnels à large spectre qui peuvent affecter les organismes non-cibles, y compris les humains.
- Les biopesticides sont souvent efficaces en très petites quantités et se décomposent rapidement, ce qui réduit les expositions et évite principalement les problèmes de pollution causés par les pesticides conventionnels.
- Lorsqu'ils sont utilisés dans le cadre de programmes de lutte intégrée (IMP), les biopesticides peuvent réduire considérablement l'utilisation de pesticides conventionnels, tout en maintenant des rendements élevés (**Evans et Furlong,2003**).

Bien que la faible persistance des biopesticides puisse être bénéfique là où les résidus environnementaux sont un problème, elle peut avoir un effet négatif également lorsqu'il y a peu de persistance après l'application. Les autres limites des biopesticides comprennent plus de dépenses, une faible efficacité, une action lente, une durée de conservation limitée et une variabilité des performances. Ces facteurs sont parfois plus apparents que réels car ces limitations ne s'appliquent pas à tous les biopesticides. Plusieurs fois, le coût d'enregistrement des biopesticides devient beaucoup plus élevé car ils ne ciblent que des marchés limités en raison de la spécificité de l'agent bioactif et limitent ainsi ses possibilités de commercialisation (**Chapple et al.,1996; Singh,2014; Nollet et Rathore,2015**).

Chapitre II :

Les rhizobactéries

Le sol est un habitat biologique, une réserve génétique avec une large variété d'organismes présents aussi bien à l'intérieur qu'au-dessus des sols (**Lahmar et Ribaut,2001**). La microflore du sol, par sa diversité et son activité, est sans doute le maillon central de l'écosystème sol (**Cleyet-Marel et Hinsinger,2000**). Les microorganismes du sol peuvent être bénéfiques en affectant positivement la qualité du sol et la croissance des plantes, ou pathogènes et responsables de maladies à effets dévastateurs (**Bonkowski et al.,2009**).

II. 1 Notion de rhizosphère

Hiltner (1904) a d'abord introduit le terme rhizosphère, dérivé du mot grec « rhiza », à la racine du sens, et « sphère », qui signifie le champ d'influence. Il a défini la rhizosphère comme la zone de sol immédiatement adjacente aux racines de légumineuse qui soutient des niveaux élevés d'activité bactérienne (**Morgan et al.,2005; Hartmann et al.,2008; Bakker et al.,2013**). La rhizosphère peut contenir plus de 10^{10} cellules microbiennes par gramme de racine (**Egamberdieva et al.,2008**) et maintenir plus de 30 000 espèces de bactéries (**Mendes et al.,2011**).

L'étendue de « effet rhizosphère » dans le sol dépendra de la diffusion loin de la racine des nombreux composés libérés, de leurs caractéristiques de diffusion et de l'état de l'eau du sol (**Bowen et Rovira,1999**). Les produits chimiques sécrétés dans le sol par les racines sont généralement appelés exsudats racinaires. Grâce à l'exsudation d'une grande variété de composés, les racines peuvent réguler la communauté microbienne du sol dans leur voisinage immédiat, encourager les symbioses bénéfiques, changer les propriétés chimiques et physiques du sol, et inhibent la croissance d'espèces végétales concurrentes (**Nardi et al.,2000**).

Le microenvironnement de la rhizosphère comprend le microbiome de la rhizosphère (3 à 5 mm de la racine), le microbiome de la rhizoplane (à l'interface racine-sol) et le microbiome de la racine intérieure. Les interactions symbiotiques courantes dans la zone racinaire comprennent les champignons mycorhiziens, les endophytes bactériens et les nodules symbiotiques (**Coats et Rumpho,2014**) (**Figure 3**).

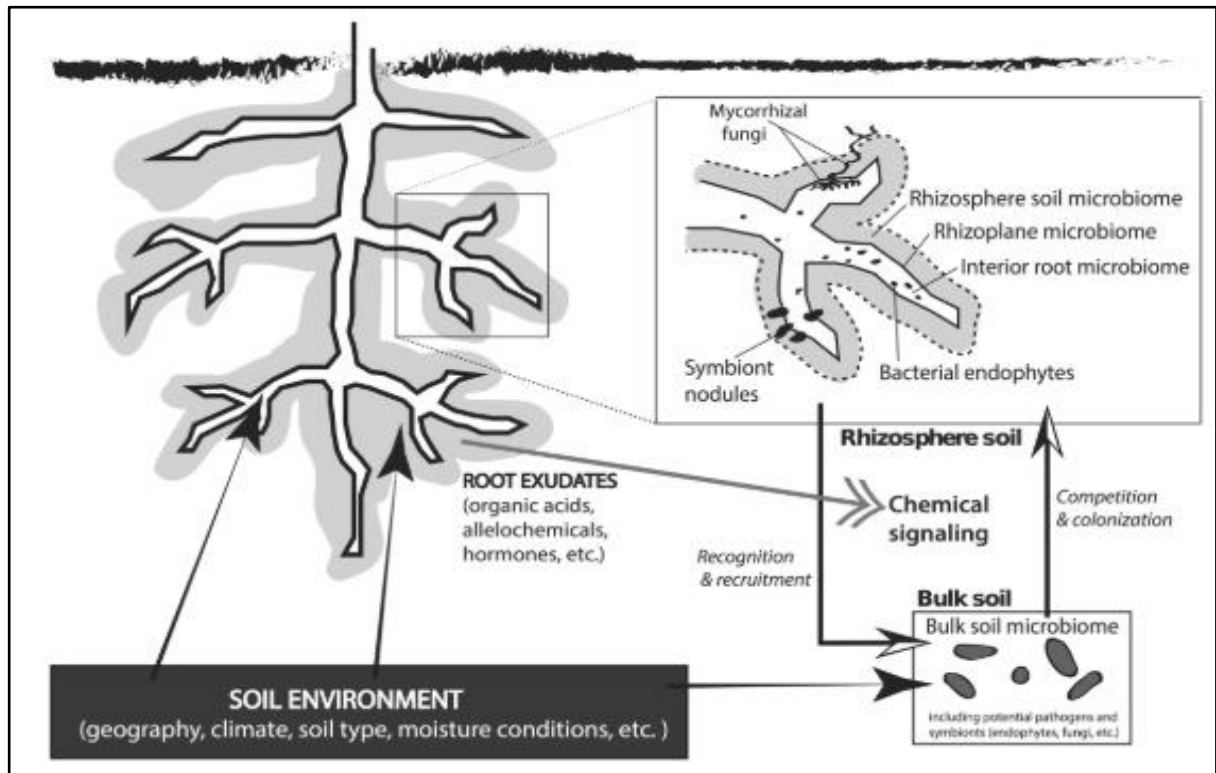


Figure 3. Aperçu des interactions plante-microbe qui se produisent dans la rhizosphère et les sols en vrac sous une plante (Coats et Rumpho,2014).

II. 2 Généralité sur les PGPR

La rhizosphère des plantes est généralement occupée par les rhizobactéries délétères (DRB) qui peuvent inhiber la croissance des plantes, et les PGPR (plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Harish et al.,2009).

Les rhizobactéries sont les membres de la totalité des bactéries de la rhizosphère qui sont capables de coloniser les racines. La colonisation des racines est définie comme la capacité bactérienne à se multiplier et à suivre le rythme de la croissance des racines dans le sol des champs. L'impact des rhizobactéries sur la croissance et la santé des plantes peut être neutre, délétère ou bénéfique. Les effets bénéfiques du PGPR sur les cultures entrent dans l'une des deux catégories suivantes : stimulation de la croissance ou suppression des maladies des plantes (Kloepper et al.,1989; Paungfoo Lonhienne et al.,2014; Bernabeu et al.,2015) .

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ont d'abord été définies par Kloepper et Schroth (1978), comme les bactéries du sol qui colonisent les racines des plantes (Dorje et al.,2017). Les PGPR sont des bactéries libres de vie qui ont des effets bénéfiques sur les plantes car elles améliorent l'émergence, colonisent les racines et stimulent la croissance. Le PGPR bien connu comprend des organismes appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Bacillus*,

Azotobacter, *Azospirillum*, *Azoarcus*, *Klebsiella*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Serratia* et *Rhizobium* (Jogaiah et al.,2010).

Les associations de bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) varient selon le degré de proximité bactérienne avec la racine et l'intimité de l'association. En général, ceux-ci peuvent être séparés en PGPR extracellulaire (ePGPR), existant dans la rhizosphère, sur le rhizoplane ou dans les espaces entre les cellules du cortex radiculaire, et PGPR intracellulaire (iPGPR), qui existent à l'intérieur des cellules radiculaires, généralement dans les structures nodulaires spécialisées (Gray et Smith,2005; Khan,2005).

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) sont un groupe hétérogène de bactéries qui peuvent se développer dans, sur ou autour des tissus racinaires des plantes, stimulant la croissance des plantes directement et / ou indirectement par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes (Hayat et al.,2010; Kang et al.,2013) (Figure 4).

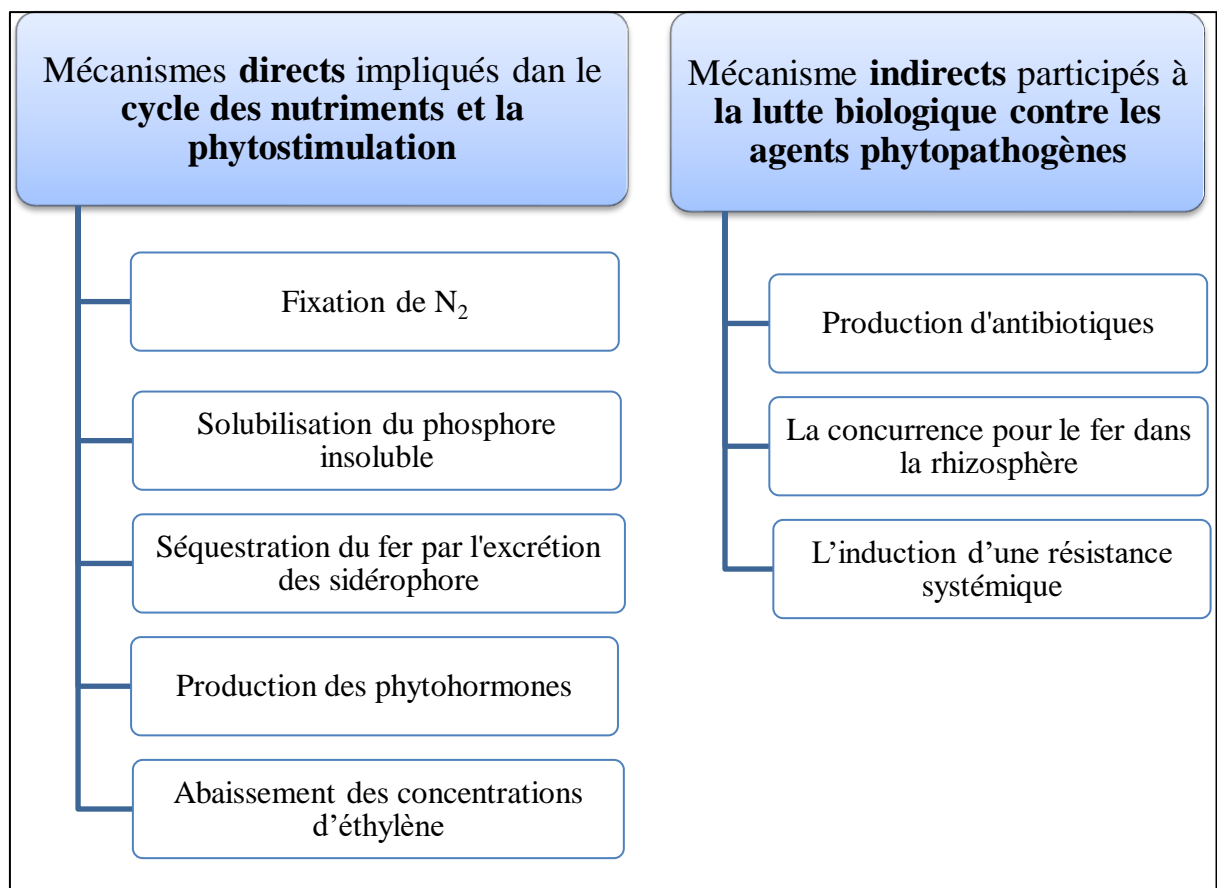


Figure 4. Diagramme schématisé illustre les mécanismes directs et indirects des PGPR sur la croissance des plantes (Kang et al.,2013).

II. 3 L'intérêt biotechnologique des PGPR dans le domaine agricole

Les bactéries bénéfiques, appelées rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR), sont largement étudiées par les microbiologistes et les agronomes en raison de leur potentiel dans la production végétale (Somers et al.,2004). PGPR offre un moyen attrayant de remplacer les engrais chimiques, les pesticides et les suppléments. Les cultures agricoles et horticoles inoculées avec certaines souches de PGPR peuvent avoir des effets multiples, allant de l'amélioration de la germination des semis à la croissance végétative du rendement (Dorjey et al.,2017).

Les applications de PGPR efficaces pourraient contribuer à des pratiques de gestion agricole respectueuses de l'environnement durables qui peuvent réduire l'application de produits chimiques actuellement utilisés pour contrer l'impact nocif des agents phytopathogènes fongiques et pour améliorer ou restaurer le développement des plantes dans des environnements normaux ou salins, respectivement (Nabti et al.,2014). Les PGPR sont classé selon leurs activités fonctionnelles dans la rhizosphère (Somers et al.,2004) (Tableau 1).

Tableau 1. Rôle biotechnologique des PGPR et leurs activités fonctionnelles (Somers et al.,2004).

	Rôle biotechnologique	Activités fonctionnelles
Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)	Biofertilisants	Augmentation de la disponibilité des éléments nutritifs aux plantes
	Biopesticides	Lutte contre les maladies, par la production de métabolites antibiotiques et antifongiques
	Phytestimulateurs	Amélioration de la croissance des plantes, par la production de phytohormones

Les bactéries antagonistes sont considérées comme agents de lutte biologique idéales (**Mishra et Arora,2012**). Nombreuses PGPR ont été identifiés comme agents de lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes, *Pseudomonas* spp., étant l'un des principaux groupes concernés (**Salman,2010; De Bruijn,2013**).

Chapitre III :

Pseudomonas spp. fluorescents

III. 1 Généralité sur le genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* a été décrit en 1894 (Peix et al.,2009). C'est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe γ des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Palleroni et Moore,2004) (Figure 5).

Ce genre contient 294 espèces valablement décrites sur le site <https://lpsn.dsmz.de/genus/pseudomonas>. C'est l'un des genres bactériens les plus omniprésents au monde (Höfte et Altier,2010) , se trouvent en grand nombre dans tous les principaux environnements naturels (terrestres, d'eau douce et marins) et forment également des associations intimes avec les plantes et les animaux. Cette distribution universelle suggère un degré remarquable d'adaptabilité physiologique et génétique (Spiers et al.,2000).

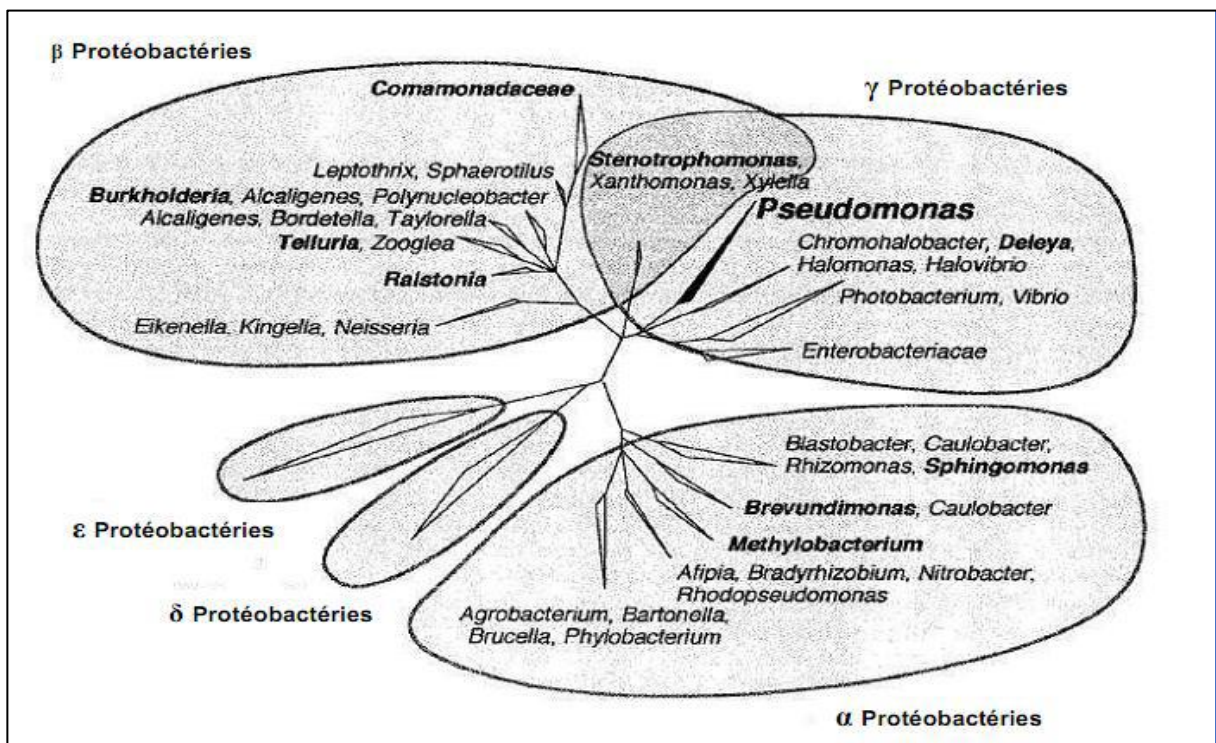


Figure 5. Relations phylogénétiques des protéobactéries, contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (Bossis et al.,2000).

III. 2 Evolution taxonomique sur le genre *Pseudomonas*

La description taxonomique de ce genre ne cesse de voir des réarrangements et des changements de statuts (espèces, sous espèces et nouvelles espèces), depuis ses premières descriptions (**Palleroni,1984; Garrido-Sanz et al.,2016**).

Par définition, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes. Mais cette définition ne permet pas de les différencier des autres bactéries à Gram négatifs, et doit être complétée par d'autres caractéristiques phénotypiques (**Bergey et al.,1997; Palleroni,2008**).

La découverte du caractère de renaturation de l'ADN par Marmur, a permis de confirmer la classification phénotypique des *Pseudomonas*, par les essais d'hybridation ADN/ADN (**Colwell et Mandel,1964; Johnson et Ordal,1968**), et la composition en bases (G + C) (**Doudoroff et Palleroni,1974**). Le plus grand succès de la classification des *Pseudomonas*, selon les caractères génotypiques fût atteint par Palleroni et ses collaborateurs, qui ont classifiés ce groupe bactérien en cinq sous-groupes d'ARNr, sur la base d'homologies ARN/ADN (**Palleroni et al.,1973; Palleroni,1984**). Toutefois ces sous classes d'ARNr sont phylogénétiquement trop éloignés, et finalement seules les bactéries appartenant au groupe ARNr I sont retenues dans le genre *Pseudomonas* (**Peix et al.,2009**).

Les principaux changements dans la taxonomie viennent de Woese, qui proposa de les classier et de les identifier en fonction de leurs ARN ribosomaux 16S, plaçant le genre *Pseudomonas* dans les gamma protéobactéries (**Woese et al.,1984; Botelho et Mendonça-Hagler,2006**).

Depuis 1990, le séquençage du gène codant ARNr 16S a débuté, et est appliqué pour toutes les bactéries connus. Partiel au début, mais plus tard des génomes entiers ont été séquencés et déposés dans les banques de données. Le séquençage du gène codant l'ARNr 16S et le développement des modèles mathématiques des arbres représentant les similitudes des séquences ont permis une classification phylogénétique des procaryotes (**Peix et al.,2009**).

L'édition actuelle du Bergey compte de nombreuses méthodes utilisées dans la classification des *Pseudomonas*. Ces méthodes révèlent les efforts fournis pour la caractérisation des espèces de *Pseudomonas*, incluant la sensibilité à certains composés, les

caractéristiques génétiques et écologiques, le pouvoir pathogène et la structure antigénique (Peix et al.,2009).

Dans le cas du genre *Pseudomonas*, plus de 70 nouvelles espèces ont été décrites depuis 2009, avec une moyenne annuelle de 10 nouvelles espèces au cours des trois dernières années. Etant donné que la plupart des environnements dans lesquels des souches de *Pseudomonas* peuvent être présentes restent inexplorés, il est prévisible que le nombre d'espèces de *Pseudomonas* augmentera considérablement au cours des prochaines années (Peix et al.,2018).

III. 3 *Pseudomonas* spp. fluorescents

Le genre *Pseudomonas* contient principalement des *Pseudomonas* spp. fluorescents , ainsi que quelques espèces non fluorescentes (Bossis et al.,2000):

- *Pseudomonas* fluorescents phytopathogènes à cytochrome c oxydase positif tels que *P. cichorii*, *P. marginalis* et *P. tolaasii* et des souches non-phytopathogènes, non nécrogéniques telles que *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* et l'espèce type *P. aeruginosa* (Bossis et al.,2000).
- *Pseudomonas* spp. fluorescents phytopathogènes nécrogènes à cytochrome c oxydase négatif : *P. syringae* et *P. viridiflava* (Bossis et al.,2000).
- *Pseudomonas* spp. non fluorescents : *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes* et *P. pseudoalcaligenes* (Bossis et al.,2000).

Au sein du groupe *Pseudomonas sensu stricto*, les *Pseudomonas* fluorescents comprennent toutes les espèces ayant la capacité de produire de la pyoverdine fluorescente, particulièrement : *Pseudomonas aeruginosa*, *P. syringae*, *P. putida* et *P. fluorescens* (Latour et Lemanceau,1997; Palleroni,2010) . Ce sont des bactéries qui se caractérisent par un rapport de bases azotées (C+G) allant de 58 à 70 % (Palleroni,1984). Elles partagent des caractéristiques telles que la morphologie en forme de bâtonnet, le comportement de coloration à Gram négatif, un ou plusieurs flagelles polaires assurant la motilité, étant non sporulantes et présentant des tests positifs pour la catalase et l'oxydase (Yang et al.,2013).

Les *Pseudomonas* fluorescents sont classés au sein des espèces *fluorescens* et *putida*, et des deux groupes intermédiaires définis selon Palleroni (1984). Ce classement est basé sur la mise en évidence de deux aptitudes métaboliques (la protéolyse et l'utilisation du tréhalose). Les deux sont présentes chez *P. fluorescens* et absentes chez *P. putida*, alors que l'une ou l'autre seulement s'exprime dans les groupes intermédiaires (Mamoun et Olivier,1989).

III. 4 Mécanisme de biocontrôle des *Pseudomonas spp. fluorescentes* phytobénéfrique

Durant les trois dernières décennies, les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* ont été identifiées comme agents potentiels de biocontrôle, à l'encontre des phytopathogènes (Mezaache,2018), et comme souches de biocontrôle des champignons phytopathogènes (García de Salamone et al.,2001) . Les *Pseudomonas spp. fluorescentes* saprophytes sont des habitants typiques des sols agricoles, en s'impliquant dans de nombreuses interactions avec les plantes, notamment au niveau des rhizosphères (Lemanceau,1992). Ces bactéries sont considérées comme des composés biologiques du sol agricole, douées de potentialités suppressives et inhibitrices de diverses maladies des plantes. De nombreuses études ont mis en évidence les aptitudes de souches de *Pseudomonas spp. fluorescentes* dans l'amélioration de la croissance et la protection sanitaire des plantes (Hussein et Joo,2017; Mishra et Arora,2018).

Les principaux mécanismes par lesquels *Pseudomonas* exerce son effet de lutte biologique sont : la compétition pour l'acquisition de niche et de nutriments, la production d'antibiotiques, la résistance systémique induite (Panpatte et al.,2016) (Figure 6).

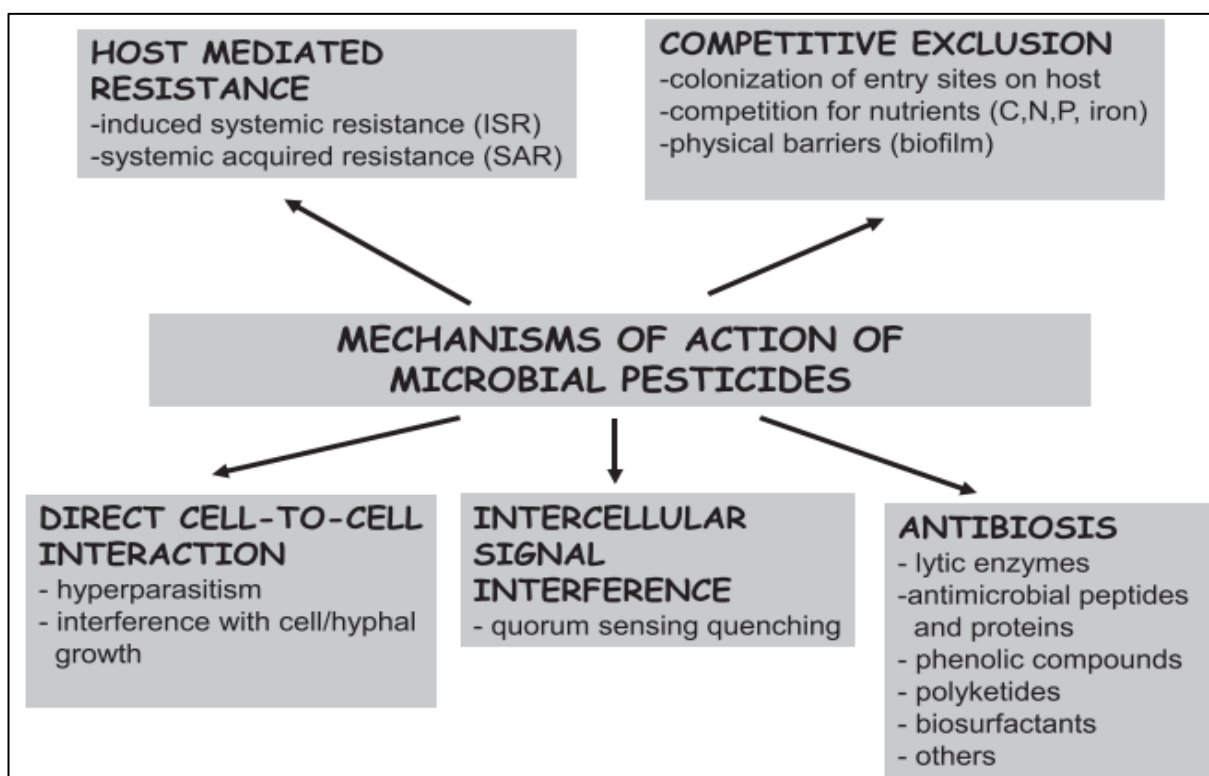


Figure 6. Un aperçu des mécanismes de lutte biologique contre les agents phytopathogènes qui ont été mis en évidence dans des micro-organismes bénéfiques interagissant avec des plantes (Montesinos et Bonaterra,2017).

III.4.1 Compétition

Les interactions microbiennes sont conditionnées par la nature et l'intensité de la compétition entre les microorganismes (**Wicklow et Carroll,1981**). Cette compétition peut s'instaurer pour l'espace et pour les nutriments. Les *Pseudomonas* fluorescents antagonistes participent à ces 2 types de compétition (**Lemanceau,1992**).

La compétition pour les nutriments se fait généralement par la disponibilité en fer dans le milieu. Pour acquérir cet élément indispensable mais peu soluble, les microorganismes ont développé une stratégie d'acquisition du fer qui repose sur la synthèse de sidérophores et de protéines membranaires réceptrices (**Leong,1986**). Par la production de sidérophores, les *P. fluorescens* piègent le fer présent dans le milieu en privant les autres microorganismes et en inhibant leurs pouvoirs de pathogénicité (**Meliani,2012**).

III.4.2 Antibiose

L'importance de l'antibiose dans les interactions microbiennes responsables de la protection biologique contre les maladies a fait l'objet d'une récente synthèse bibliographique, Il peut conférer aux micro-organismes un avantage sélectif dans la compétition pour les nutriments et l'espace dans leurs niches écologiques (**Fravel,1988**).

Plusieurs souches de *Pseudomonas* fluorescents sont capables de produire une gamme d'antibiotiques tels que le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), le cyanure d'hydrogène (HCN), les rhamnolipides, l'oomycine A, la phenazine, la pyocyanine, la pyrrolnitrine, ou des lipopeptides cycliques (**Dwivedi et Johri,2003**).

III.4.3 Induction de la résistance systémique

Toutes les plantes possèdent des mécanismes de défense actifs contre les attaques de pathogènes. Ces mécanismes échouent lorsque la plante est infectée par un pathogène virulent car le pathogène évite de déclencher ou supprime des réactions de résistance, ou élude les effets des défenses activées (**Van Loon et al.,1998**). L'expression de mécanismes de défense systémiques chez les plantes peut être initiée suite à l'interaction avec certaines rhizobactéries non pathogènes (**Meliani,2012**).

La résistance systémique induite (ISR) est un mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR), en particulier les *Pseudomonas* fluorescents, dans la suppression des maladies (**Van Peer et al.,1991**).

Il n'est pas facile de distinguer l'ISR de la résistance acquise systémique (SAR), car les deux utilisent des composés similaires pour supprimer les agents pathogènes. Des progrès

considérables ont été réalisés pour révéler les mécanismes impliqués dans les interactions plante-PGPR-pathogène. Cependant, il existe une absence d'élucidation globale de la signalisation ISR par les bactéries. Il a été rapporté que certains composants structuraux de bactéries, tels que les flagelles, les Lipopolysaccharides (LPS) et la production de sidérophores et d'antibiotiques sont les déterminants des ISR (**Pieterse et al.,2014**).

Chapitre IV :
Métabolites impliqués dans la
lutte biologique

Les études écologiques sur ce groupe bactérien ont révélé leur forte adaptation aux conditions rhizosphériques en association avec plusieurs espèces végétales, ces aptitudes permettent de les classer parmi les rhizobactéries colonisatrices. En plus de leur compétence rhizosphérique, ces bactéries présentent des profils métaboliques leur conférant une compétitivité par rapport aux autres microorganismes telluriques (Latour et Lemanceau,1997).

Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique (Mezaache,2018). Les *Pseudomonas* fluorescents agissent comme un antagoniste contre une variété de phytopathogènes principalement en produisant des métabolites secondaires antimicrobiens (Chaudhari et al.,2017). Les métabolites responsables d'activités spécifiques intéressantes sont variés : sidérophores, antibiotiques, substances de croissance, Lipopolysaccharides, etc (Lemanceau,1992) (Figure 7) (Tableau 2).

Tableau 2. Métabolites secondaires des *Pseudomonas* fluorescents étudiés dans le contrôle biologique des phytopathogènes (Mishra et Arora,2018).

Métabolites secondaires	<i>Pseudomonas</i>	Phytopathogènes	Effet	Références
HCN	<i>Pseudomonas</i> sp. P76 and P124	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Diverses plantes	(Priyanka et al.,2017)
PRN	<i>P. chlororaphis</i> O6	<i>F. graminearum</i> et <i>R. solani</i>	Tomate	(Park et al.,2011)
PCA	<i>P. fluorescens</i>	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> .	Blé	(Thomashow et Weller,1988)
2,4-DAPG	<i>P. aeruginosa</i>	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. cubense</i>	Bananier	(Ayyadurai et al.,2006)
CLPs	<i>P. fluorescens</i>	<i>R. solani</i> and <i>P. ultimum</i>	Canne à sucre	(Nielsen et al.,2002)

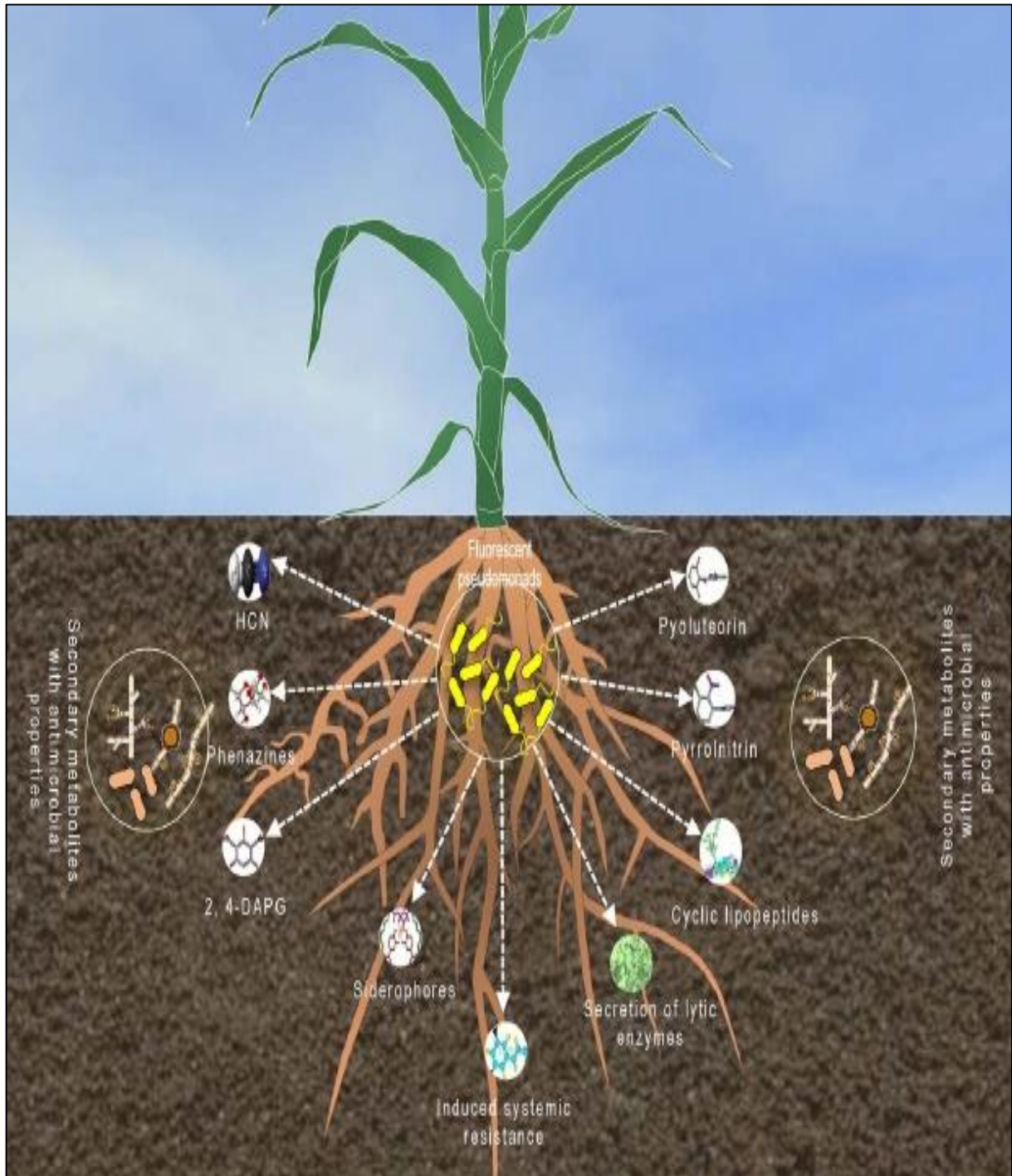


Figure 7. Représentation schématique des métabolites secondaires produits par les *Pseudomonas fluorescens* dans la rhizosphère impliqués dans le contrôle biologique des phytopathogènes (Mishra et Arora, 2018).

IV.1 Sidérophores

Les sidérophores (du grec : « porteurs de fer ») sont définis comme des agents chélatants spécifiques aux ions ferriques, élaborés par des bactéries et des champignons qui poussent sous une faible tension de fer (Neilands,1995; Ansari et al.,2017), Il s'agit de composés de faible poids moléculaire (400 à 1000 kDa) (Skaar,2010), il est en grande partie sous une forme insoluble et n'est donc pas disponible pour l'assimilation directe par les microbes (Saha et al.,2013). La caractéristique majeure des sidérophores est leur très haute affinité pour les ions ferriques (Hay et al.,2001).

Les *Pseudomonas* fluorescents produisent deux sidérophores uniques comme la pyoverdine (Jimenez et al.,2010), contiennent un groupe chromophore qui est responsable de la couleur fluorescente de la molécule (Meyer et al.,2002) et les pyochelines (Braud et al.,2009).

Les sidérophores produits par les *Pseudomonas* pour la lutte biologique arrêtent le Fe dans la zone environnante des racines et inhibent par conséquent la croissance des phytopathogènes en limitant la quantité de fer nécessaire à la croissance de ces pathogènes (Sahu et Sindhu,2011) (Figure 8).

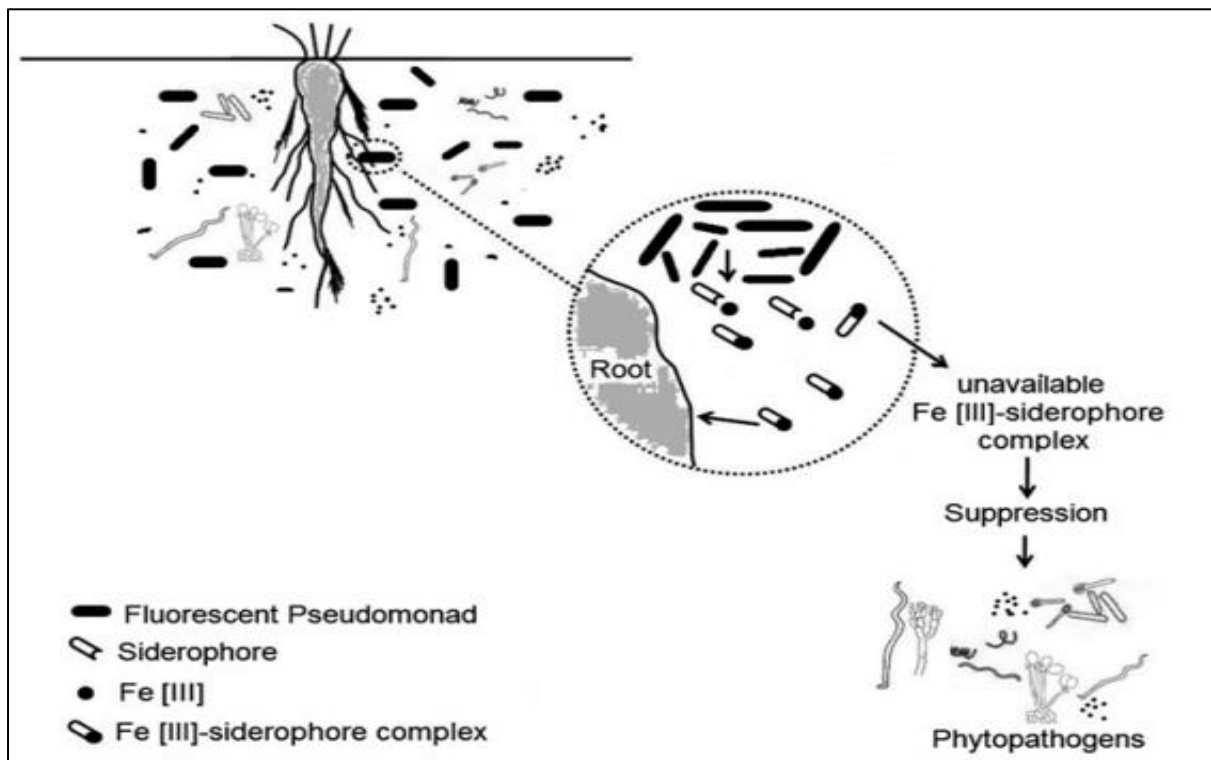


Figure 8. Suppression des phytopathogènes par les *Pseudomonas* à travers la privation de fer médiée par les sidérophores (Chaudhari et al.,2017).

Globalement, et sur la base de la fraction qui donne le ligand d'oxygène pour la coordination de Fe (III), les sidérophores peuvent être classés en cinq catégories : (1) catécholates, (2) phénolates, (3) hydroxymates, (4) carboxylates et 5) types mixtes (Miethke et Marahiel,2007) (Figure 9).

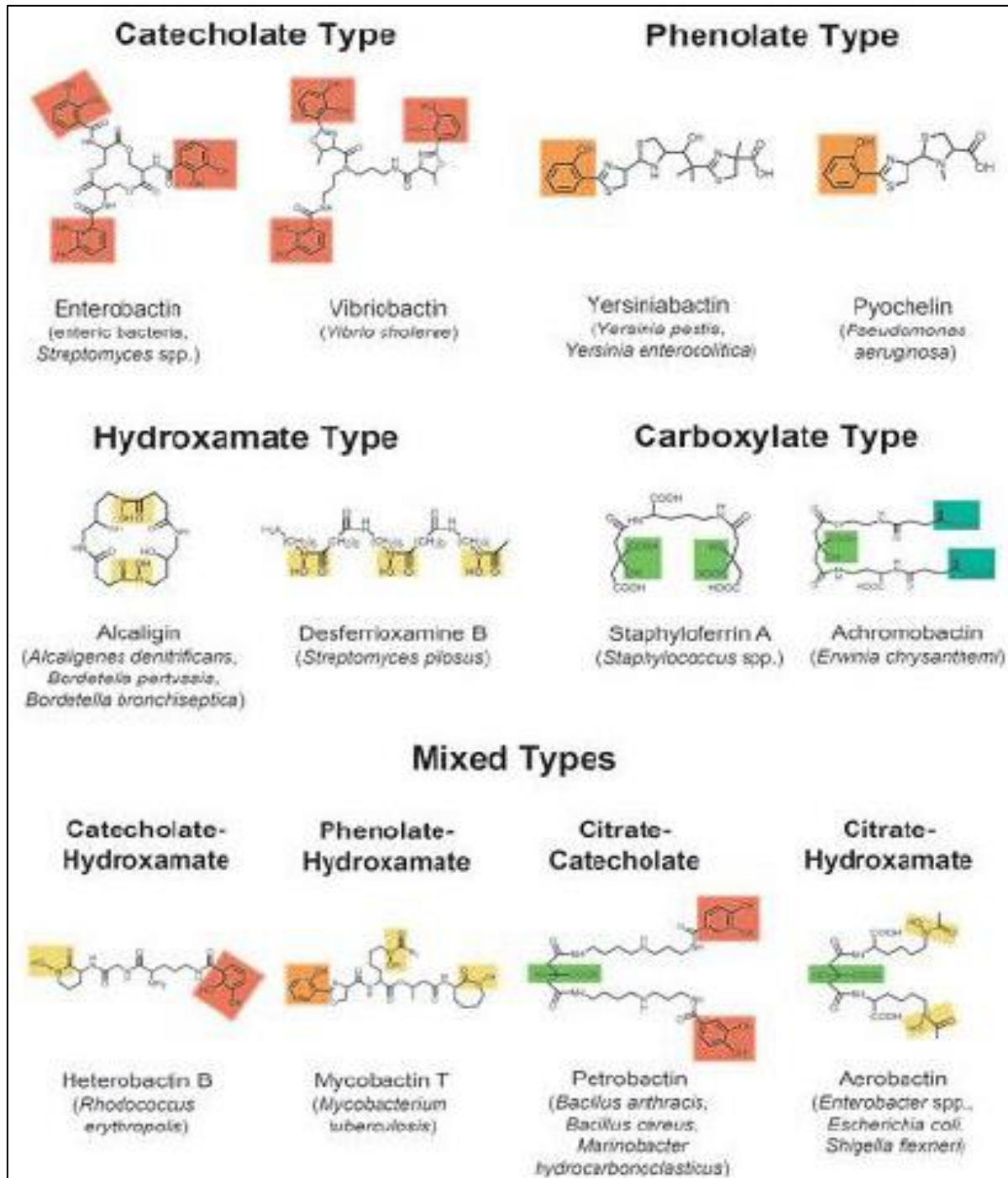


Figure 9. Exemples représentatifs de différents sidérophores et de leurs producteurs naturels (Miethke et Marahiel,2007).

IV.2 Enzymes dégradent les parois cellulaires (CWDE)

Certaines souches antagonistes produisent des enzymes lytiques qui peuvent lyser une partie des parois cellulaires de certains champignons phytopathogènes (Compant et al.,2005; Zarei et al.,2011) . La Chitinase, la β -1,3 glucanase et la cellulase sont d'importantes enzymes spécialement dans le contrôle fongique, par leurs activités dégradatives des composés des parois cellulaires tels que : la chitine, le β 1-6 glucane et les ponts glucosidiques (Lorito et al.,1996).

Le biocontrôle par les *Pseudomonas* présentent une action hyperparasitaire en raison de l'hydrolyse de leur paroi cellulaire par des enzymes compromettant l'intégrité de la paroi cellulaire et de la membrane cellulaire conduisant à la mort des phytopathogènes (Chernin et Chet,2002). De plus, ces enzymes sont connues pour détruire les oospores de ces phytopathogènes fongiques qui affectent la germination des spores et l'allongement du tube germinatif (Sneh et al.,1984).

Les chitinases sont des enzymes qui dégradent la chétine, l'un des composants fongiques des parois cellulaires, composé d'un certain nombre d'unités de liaisons glycosidiques β -1,4 (N-acétylglucosamine) (Inaoka et al.,2003; Krolicka et al.,2018). Diverses souches bactériennes comme *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus* et *Burkholderia* produisent des chitinases (Bhattacharya et al.,2007).

IV.3 Antibiotiques

les agents bioactifs microbiens tels que les antibiotiques sont non seulement bénéfiques pour les hôtes contre divers concurrents microbiens, mais aussi contre d'autres organismes, notamment les insectes, les parasites et les plantes (Maplestone et al.,1992).

La variété du métabolisme des *Pseudomonas* fluorescents est basée sur la production des métabolites antibactériens et antifongiques comme l'acide phenazine carboxilique (PCA), le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine (PRN) et la pyolutéorine (PLT) (Meliani,2012). Ces métabolites secondaires sont actifs vis à vis d'une large gamme de bactéries et de champignons (Dubuis et al.,2007) (Figure 10).

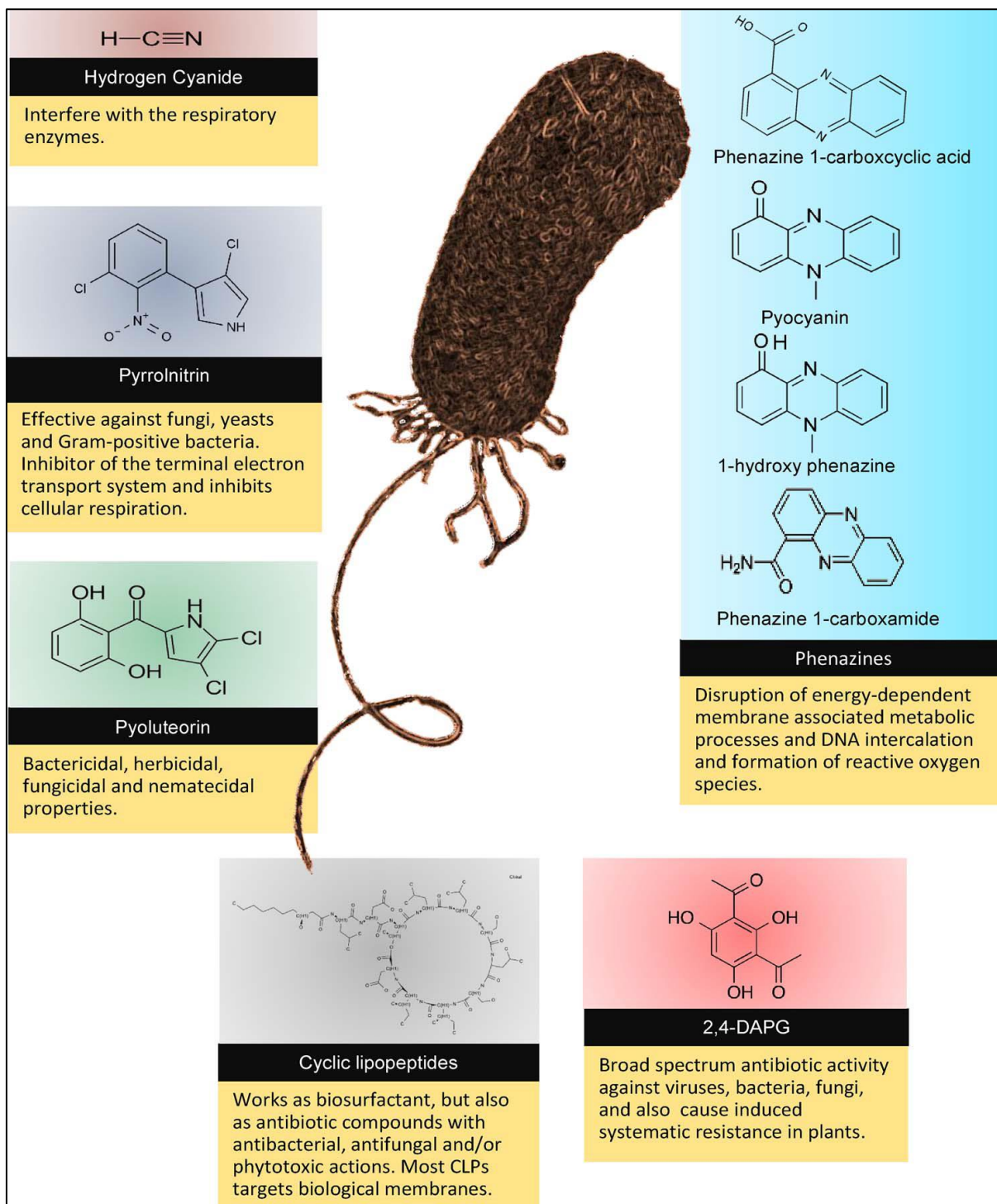


Figure 10. Représentation graphique des métabolites de lutte biologique rapportés des *Pseudomonas fluorescens* avec leur mode d'action (Mishra et Arora,2018).

IV.3.1 Acide cyanhydrique (HCN)

La cyanogenèse chez les bactéries représente en partie la capacité de lutte biologique des souches qui suppriment les maladies fongiques de certaines plantes. Le cyanure d'hydrogène (HCN) est un métabolite secondaire volatil produit par de nombreux genres bactériens différents, dont les *Pseudomonas* (Siddiqui et al.,2006; Ahemad et Kibret,2014).

Selon les facteurs environnementaux, les *Pseudomonas* fluorescents produisent une quantité variable de HCN dans la rhizosphère (**Schippers et al.,1990; Ahemad et Kibret,2014**).

La HCN synthase des protéobactéries (en particulier les *Pseudomonas* fluorescents) est une flavo-enzyme liée à la membrane qui oxyde la glycine, produisant du HCN et du CO₂ (**Blumer et Haas,2000; Nandi et al.,2017**). Le HCN produit par les *Pseudomonas* fluorescents a montré une toxicité contre les phytopathogènes en inhibant le cytochrome c-oxydase (**Devi et Kothamasi,2009**) et de plusieurs autres métallosynthases (**Blumer et Haas,2000**).

IV.3.2 Phénazines

L'un des traits de biocontrôle les plus étudiés des *Pseudomonas* est l'antibiotique de nature phénazinique. Plus de 100 différents dérivés structuraux de la phénazine ont été reconnus dans des conditions naturelles et 6000 composés ont été synthétisés comme un mouvement clé (**Mavrodi et al., 2013**).

Les phénazines sont des composés hétérocycliques de faible poids moléculaire contenant de l'azote, de couleur vive et ayant une activité antimicrobienne à large spectre (**Patil et al.,2016**), ce sont des navettes électroniques qui présentent des propriétés redox uniques (**Mavrodi et al.,2006**), identifiés chez les phyla *Actinobacteria*, *Proteobacteria* et le phylum *Euréarcheota* (**Mavrodi et al.,2001**).

Ils sont connus pour être synthétisés exclusivement par des bactéries en particulier celles appartenant au genre *Pseudomonas* (**Thomashow et al.,1990**). Les exemples les plus étudiés de producteurs bénéfiques de phénazine sont *P. fluorescens* et *P. chlororaphis* qui sont responsables de la suppression des maladies fongiques chez les plantes (**Pierson et Pierson,1996**).

Les dérivés de phénazine les plus courants produits par les *Pseudomonas* sont la pyocyanine (PYC), l'acide phénazine-1-carboxylique (PCA), la phénazine-1-carboxamide (PCN) et plusieurs hydroxy-phénazines (**Patil et al.,2016**). Les hydroxy-phénazines (HP) ont un mode d'action complètement différent de celui du PYC, du PCA et du PCN où il agit comme chélateur du fer, ce qui le rend indisponible pour les champignons affectant négativement sa croissance dans un environnement limitant le fer (**Briard et al.,2015**).

L'action cumulative de ces phénazines produisant un stress oxydant est plus importante dans les cellules fongiques pathogènes et les dommages mitochondriaux. (Chaudhari et al.,2017) (Figure 11).

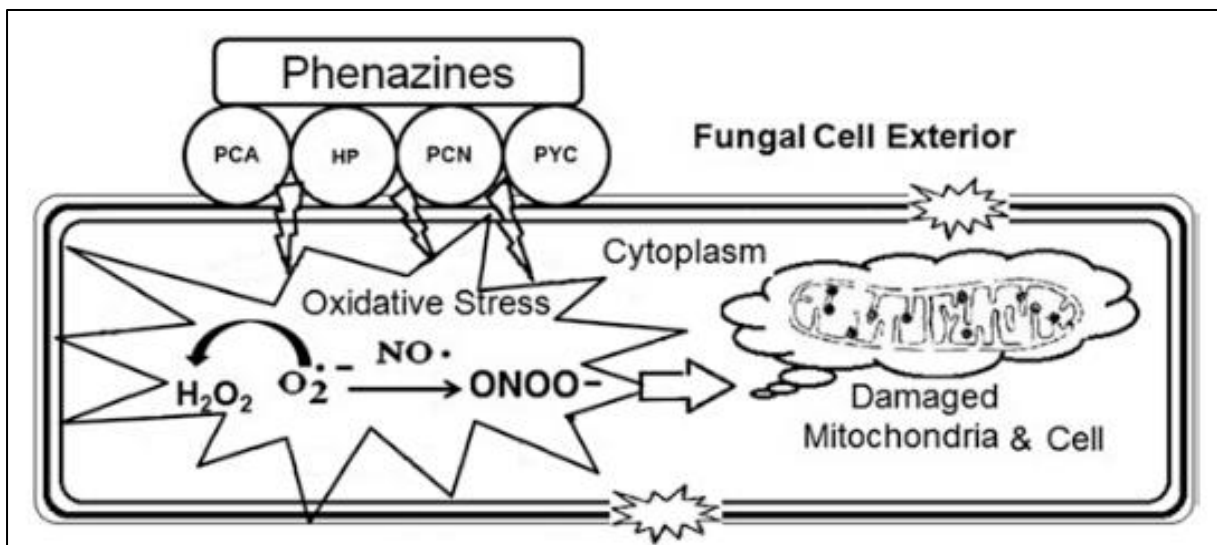


Figure 11. Action cumulative des phénazines sur les cellules phytopathogènes entraînant un contrôle biologique (Chaudhari et al.,2017).

les phénazines traversent la membrane cellulaire du pathogène et agissent comme un agent réducteur, interférant avec la chaîne de transport d'électrons et générant plusieurs espèces toxiques d'oxygène réactif (radicaux superoxyde et peroxyde d'hydrogène) (Chin-A-Woeng et al.,2003).

Le rôle des phénazines dans l'antagonisme vis-à-vis des phytopathogènes fongiques a été remarqué au cours du dernier quart du XXe siècle en raison de la préoccupation croissante concernant les pesticides chimiques et de la sensibilisation à l'agriculture durable et de l'intérêt accru de la recherche pour les phénazines (Chaudhari et al.,2017). Les rôles des phénazines peuvent donc être multiples - agissant comme un antibiotique contre les agents pathogènes, étant impliqués dans la physiologie et même agissant comme un signal moléculaire (Arseneault et Filion,2016; Guttenberger et al.,2017).

IV.3.3 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)

Le phloroglucinol est un composé benzénétriol naturel présent dans certaines espèces végétales et est également produit par différents micro-organismes (Premachandra et al.,2016). En particulier, le 2, 4-diacétylphloroglucinol (DAPG) est un phloroglucinol largement étudié produit par des *Pseudomonas* (Weller et al.,2007; Troppens et al.,2013), tandis que l'activité de lutte biologique de nombreux isolats de *P. fluorescens* a été liée à la production du DAPG (Brazelton et al.,2008).

La production de DAPG est déterminée par six facteurs structurels : *phlA*, *phlC*, *phlB*, *phlD*, *phlE* et *phlI* et trois gènes régulateurs : *phlF*, *phlG* et *phlH* (**Mandryk-Litvinkovich et al.,2017; Mishra et Arora,2018**). Bien que le groupe de gènes biosynthétiques DAPG ait été conservé parmi la plupart des *Pseudomonas* fluorescents, mais de nombreuses souches ont maintenant perdu cette capacité en raison de l'évolution (**Moynihan et al.,2009**).

Plusieurs études expérimentales affirment que le DAPG est un métabolite antimicrobien majeur impliqué dans le contrôle biologique des phytopathogènes (**Sonnleitner et Haas,2011**). Le DAPG exerce une action antimicrobienne via les dommages à la membrane plasmique et inhibe la motilité des zoospores chez les oomycètes (**de Souza et al.,2003**). Le DAPG induit aussi la résistance systémique chez les plantes, et joue donc le rôle d'un éliciteur des phyto-aléxines (**Dwivedi et Johri,2003**).

IV.3.4 Pyrrolnitrine (PRN)

Pyrrolnitrine, est un antibiotique chloré phénylpyrrole, initialement purifié à partir de *Burkholderia pyrrocinia* et, par la suite, de *Pseudomonas*, *Myxococcus fulvus*, *Enterobacter agglomerans* et *Serratia* sp. (**Weller et al.,2016; Parray et Shameem,2019**).

L'opéron biosynthétique de PRN est relativement petit (5,5 kb) (**Hammer et al.,1997**). *Pseudomonas fluorescens* se compose de quatre séquences de codage de l'opéron biosynthétique pyrrolnitrine (*prnABCD*), pour le tryptophane halogénase (*prnA*), la décarboxylase (*prnB*), l'halogénase (*prnC*) et pour la monodichloro-aminopyrrolnitrine et l'oxydase (*prnD*) (**Parray et Shameem,2019**).

Des dérivés chimiques du PRN connus sous le nom de phénylpyrroles sont produits au niveau commercial et utilisés avec succès pour le traitement des semences et du feuillage pour se protéger contre les phytopathogènes fongiques. Le fludioxonil, un analogue du phénylpyrrole, est efficace et utilisé contre plusieurs phytopathogènes fongiques (**Kilani et Fillinger,2016**).

Le mécanisme d'action de la pyrrolnitrine implique une attaque initiale sur la membrane cellulaire, en interagissant avec les phospholipides qui altère la perméabilité de la membrane cellulaire, puis elle inhibe la synthèse des protéines et des acides nucléiques dans la cellule, entraînant ainsi la mort des microbes (**Chaudhari et al.,2017**). Le PRN est également signalé comme un inhibiteur moins puissant de la chaîne de transport d'électrons chez les phytopathogènes (**Wong et Airall,1970**).

IV.3.5 Pyolutéorine (PLT)

La pyolutéorine (PLT) est un métabolite secondaire de polycétide aromatique composé d'un cycle résorcinol lié à un groupement pyrrole bichloré (**Bender et al.,1999**), a été tout d'abord isolé de *P. aeruginosa* et ensuite d'autres *Pseudomonas* fluorescents (**Nowak-Thompson et al.,1997**), ceux qui suppriment les maladies des plantes causées par des champignons phytopathogènes (**Maurhofer et al.,1994**). Le groupe de gènes Plt ABCDEFG est requis pour la biosynthèse des PLT (**Nowak-Thompson et al.,1999**).

Le rôle différentiel de PLT dans le contrôle biologique est dû à la population bactérienne différentielle et aux modèles temporels d'expression et de production du gène Plt dans la rhizosphère et la spermosphère de différents hôtes végétaux (**Kraus et Loper,1995**), elle fonctionne également comme un auto-inducteur et signal intercellulaire entre des populations distinctes de cellules bactériennes cohabitant dans la rhizosphère (**Brodhagen et al.,2004**).

IV.3.6 Composés Lipopeptidiques (CLP)

Une large gamme de biosurfactants structurellement différents a été identifiée à ce jour, y compris les glycolipides, les lipopeptides, les polysaccharides, les protéines et les lipoprotéines, ou leurs mélanges (**Muthusamy et al.,2008**).

Les *Pseudomonas* ayant un potentiel de lutte biologique sont connues pour produire des biosurfactants lipopeptidiques (LP) qui sont composés de queues lipidiques liées à un oligopeptide linéaire ou cyclique court. Parmi les LP, les lipopeptides cycliques (CLP) sont composés d'une queue d'acide gras reliée à un oligopeptide court, qui est cyclisé pour former un cycle lactone entre deux acides aminés dans la chaîne peptidique (**Raaijmakers et al.,2006; Raju et al.,2016**).

CLPs sont produits par nombreuses *Pseudomonas* spp. Associées aux plantes, telles que *P. fluorescens* et *P. putida* (**Nybroe et Sørensen,2004**). Ce sont biosynthétisées par les peptides synthétases non ribosomiques (NRPS) (**Baltz,2014**). Sur la base des différences structurelles, les CLP produits par les *Pseudomonas* sont la viscosine, l'amphisine, la tolaasine, la syringomycine, l'arthrofactine, les putisolvines I et II, l'orfamide, les pseudodesmines A et B, etc (**Kruijt et al.,2009**).

Les CLP ont reçu une attention considérable pour leurs propriétés antimicrobiennes, cytotoxiques et tensioactives. Les CLP produits par les *Pseudomonas* jouent un rôle important dans l'activité antimicrobienne, la motilité et la formation de biofilm (Nielsen et al.,2002), peuvent agir comme des antibiotiques à large spectre, causant des dommages aux membranes entraînant la mort de bactéries, champignons, oomycètes et virus phytopathogènes (Tapadar et Jha,2013).

IV. 4 Quorum sensing

Quorum sensing est le système de régulation de la réponse de l'expression des gènes en fonction de la variation de la densité de la population cellulaire (Fuqua et al.,1994; Kim et Yeon,2018). C'est un processus de communication chimique bactérienne de cellule à cellule qui repose sur la production, la détection et la réponse à des molécules de signalisation extracellulaires appelées auto-inducteurs (Mion et al.,2018; Mukherjee et Bassler,2019). Ces molécules, dites molécules signal, sont des composés organiques de faible poids moléculaire qui présentent une diversité fonctionnelle et chimique (Visick et Fuqua,2005).

Les bactéries Gram-positives et Gram-négatives utilisent des circuits de communication à quorum sensing pour réguler un large éventail d'activités physiologiques. Ces processus comprennent la symbiose, la virulence, la compétence, la conjugaison, la production d'antibiotiques, la motilité, la sporulation et la formation de biofilm. En général, les bactéries à Gram négatif utilisent des homosérines lactones acylées comme auto-inducteurs, et les bactéries à Gram positif utilisent des oligopeptides transformés pour communiquer (Miller et Bassler,2001; Romero et al.,2011).

Les AHL sont synthétisés dans des bactéries par un membre de la famille des protéines LuxI et diffusés à l'extérieur et à l'intérieur des bactéries. Lorsque la concentration d'AHL augmente et atteint un seuil en raison de l'accumulation d'AHL dérivée de chaque cellule bactérienne, les protéines récepteur AHL appartenant à la famille des protéines LuxR se lient à l'AHL et régulent l'expression de nombreux gènes (Miller et Bassler,2001). Plusieurs espèces de *Pseudomonas* produisent des homosérines lactones acylées qui contrôlent des fonctions importantes, notamment la pathogénicité et la promotion de la croissance des plantes (Venturi,2006)

Chapitre V :
Cas de recherche et production
des antibiotique de nature
phénazinique

Une large gamme de bioactivité et d'applicabilité a laissé un impact sur le chercheur pour augmenter la productivité de la phénazine du laboratoire à la production à l'échelle de fermentation en utilisant un producteur potentiel de phénazine (**Chincholkar et Thomashow,2013**). Les phénazines sont des antibiotiques hétérocycliques azotés sécrétés par *Pseudomonas* spp., Possédant une activité à large spectre (**Kumar et al.,2005**). Leurs rôle est dans le contrôle biologique d'un certain nombre de phytopathogènes (**Park et al.,2011**), cette propriété a été démontré dans plusieurs études notamment **Jain et Pandey(2016)** et **Tagele et al.(2019)** .

V. 1 Choix de souche

Dans le but d'obtenir des isolats de *Pseudomonas*, **Jain et Pandey(2016)**, ont isolés la bactérie *Pseudomonas chlororaphis* GBPI 507 du sol de la rhizosphère de blé du village de Lata dans le Dist. Chamoli, Uttarakhand, Inde. Cette souche est poly-extrémophile qui possède divers caractères importants pour la considérer comme un agent potentiel pour les applications sur le terrain, en particulier dans les écosystèmes de montagne, pour une production agricole durable et respectueuse de l'environnement.

Dans les travaux de **Tagele et al.(2019)**, la souche *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* KNU17Pc1 a été isolée du sol de la rhizosphère de maïs comme décrit par **Egamberdieva et al.(2015)** en 2017 dans la province de Gangwon (37 ° .86'98.83''N, 127 ° .75'07.82''E), Corée du Sud. Cette souche a été choisie grâce à leur puissante activité *in vitro* contre *Rhizoctonia solani* AG-1 (IA).

V. 2 Activité antimicrobienne

Afin de sélectionner des isolats de *Pseudomonas* à pouvoir antagoniste vis-à-vis différentes souches phytopathogènes choisies. **Jain et Pandey(2016)**, ont effectué le test de confrontation *in vitro* après l'extraction de métabolite secondaire désiré. Une activité antimicrobienne maximale contre toutes les bactéries de test sauf *Escherichia coli*, où l'inhibition maximale a été enregistrée pour l'extrait dissous au butanol. En cas d'actinomycètes, une inhibition maximale de 3,7 mm et 2,8 mm pour *Nocardia tenerifensis* et *Streptomyces* sp, respectivement, a été enregistrée par un extrait dissous dans du méthanol (**Figure 12**).

Dans les études de lutte biologique, *Alternaria alternata* a été inhibé au maximum par le GBPI 507 (62,25%) suivi par *Phytophthora sp.* (56,00%) (**Figure 13**). Cependant , **Tagele et al.(2019)** ont testé le potentiel antifongique de la souche KNU17Pc1 qui montre une inhibition de la croissance de *Rhizoctonia solani* AG-1(IA) avec une forte activité antifongique contre toutes les souches testées dont l'inhibition maximal de la croissance est vis-à-vis *Alternaria alternata* (KACC43921) et *Colletotrichum dematium* (KACC40013) (**Figure 14**) (**Tableau 3**).

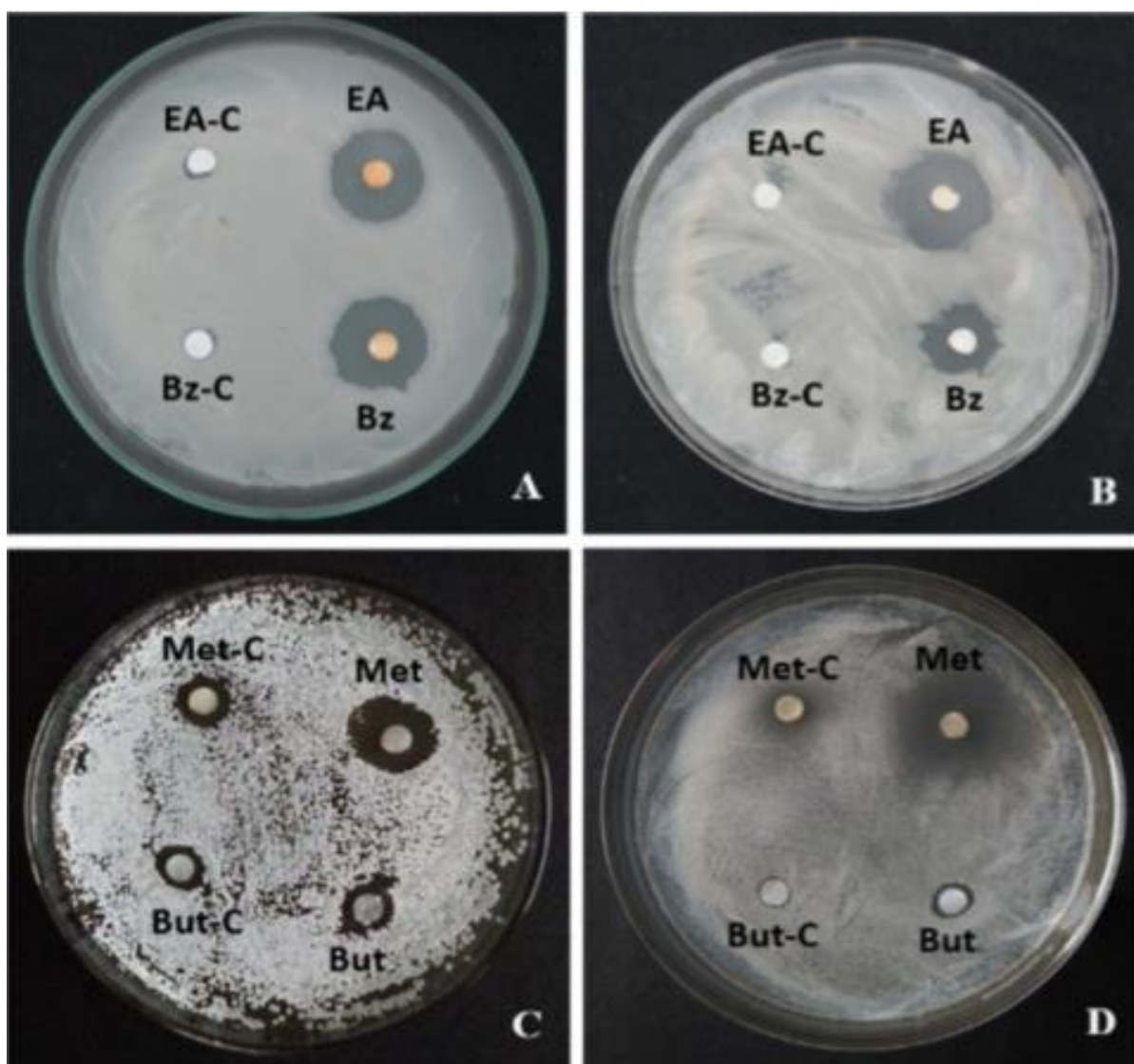


Figure 12. Activité antimicrobienne de l'extrait de benzène séché dans divers solvants. (A) *B. Subtilis* (B) *B. Megaterium* (C) *Streptomyces sp.* (D) *N. Tenerifensis* ; C = control, EA = éthyle acétate, Bz = benzène, Met = méthanol, But = butanol (**Jain et Pandey,2016**).

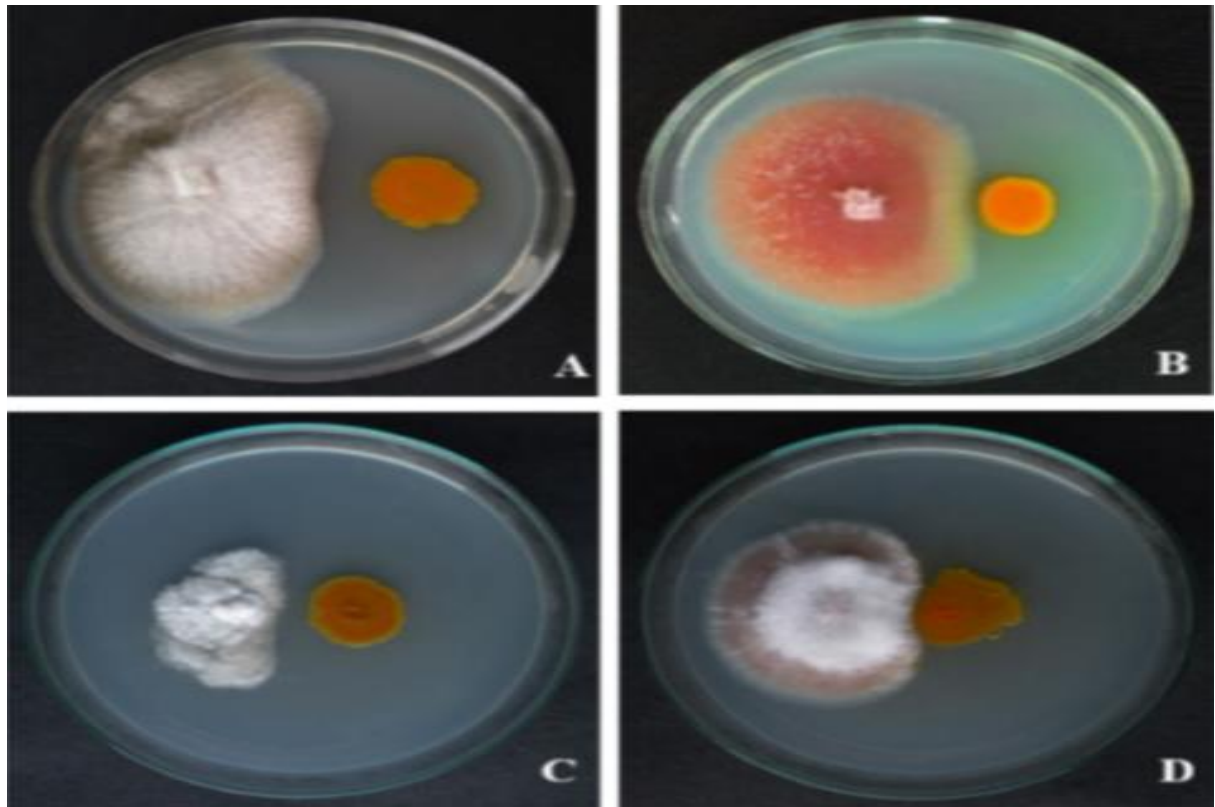


Figure 13. Activité de lutte biologique de *P. chlororaphis* GBSO7 contre *Alettrmania alternata* (A) *Fusarium oxysporum* (B) *Phytophthora* sp (C) et, *Fusarium solant* (D) (Jain et Pandey,2016).

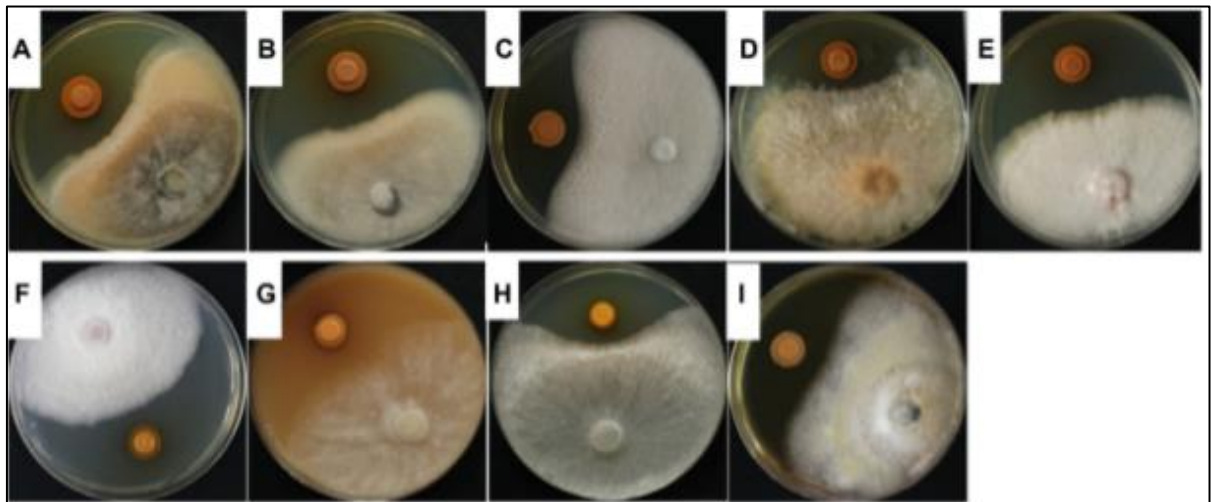


Figure 14. Activité antifongique de la souche KNU17Pc1 de *Pseudomonas chlororaphis* contre différents phytopathogènes à partir du test de double culture (métabolites diffusibles) : (A) *A. Alternate*, (B) *C. dematium*, (C) *C. gloeosporioides*, (D) *F. graminearum*, (E) *F. oxysporum* f.sp. *melonis*, (F) *F. subglutinans*, (G) *P. capsici*, (H) *R. solani* AG-1 (IA), (I) *S. lycopersici* (Tagele et al.,2019).

Tableau 3. Activité antifongique de *Pseudomonas chlororaphis* KNU17Pc1 (Tagele et al.,2019).

Pathogène cible	Pourcentage de zone d'inhibition (mm) ^a (signifier ± SE)	
	Diffusible	Volatile
<i>Aletrnania alternata</i>	45.4 ± 2.4 ^a	48.7 ± 1.2 ^{cd}
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1(IA)	35.9 ± 0.9 ^{cd}	89.2 ± 4.2 ^a
<i>Fusarium subglutinans</i>	35.5 ± 1.2 ^{cd}	33.9 ± 0.9 ^e
<i>Fusarium graminearum</i>	35.1 ± 0.7 ^d	29.6 ± 0.7 ^e
<i>Phytophthora capsici</i>	41.0 ± 0.8 ^{abc}	46.8 ± 2.1 ^{cd}
<i>Colletotrichum dematium</i>	45.4 ± 1.3 ^a	45.8 ± 1.6 ^d
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	43.9 ± 1.0 ^{ab}	19.1 ± 0.9 ^f
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	37.8 ± 1.3 ^{cd}	51.9 ± 0.8 ^c
<i>Stemphylium lycopersici</i>	39.1 ± 2.2 ^{bcd}	76.2 ± 3 ^b

– ^a Les valeurs sont des moyennes de trois réplifications.

– ^b L'activité antifongique déterminée à l'aide d'un test en double culture.

– ^c L'activité antifongique déterminée à l'aide de dosages de métabolites volatils (dosages sur boîtes de Pétri divisées).

– Les moyennes suivies de la (des) même (s) lettre (s) dans une colonne ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$), DMRT.

V. 3 Production, extraction et identification de phénazine

Afin d'optimiser les facteurs qui influencent la productivité de phénazine, **Jain et Pandey(2016)**, ont testé 3 différents milieux de culture pour la production de métabolite secondaire y compris le bouillon TY (1% de glycérine), le milieu King B et le milieu de sel minéral (MSM). Ils ont détecté un pigment orange produit par la bactérie dans le milieu qui était indicateur de la production de métabolites. La production maximale de ce métabolite a été réalisée sur le milieu MSM (avec une DO maximale = 3,52 au 4e jour d'incubation). La production a été également observée à trois températures différentes dans le bouillon MSM dont la production de métabolite a été trouvée plus élevée à 25 ° C ainsi qu'à 20 ° C par rapport à 14 ° C (**Figure 15**).

L'extraction de métabolites a été réalisée selon le protocole de **Mezaache-Aichour et al (2012)**, par l'utilisation de HCL et le benzène. L'extrait brut sec était remis en suspension dans de l'acétate d'éthyle pour l'étude de la caractérisation. Ce dernier a été chromatographié sur des plaques de CCM (gel de silice 60 F₂₅₄, Merck, Allemagne) en utilisant de l'acétate d'éthyle / hexane (3 : 2) comme phase mobile. Les plaques CCM ont été développées et visualisées sous lumière UV (254 nm). Les emplacements correspondant aux taches qui absorbaient la lumière à 254 nm ont été rayés de la plaque CCM de gel de silice et élués dans du méthanol. Une purification supplémentaire de l'extrait brut a été réalisée par Chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant de l'acétate d'éthyle et du méthanol comme phase mobile. Les fractions éluées par CCM et les fractions de gel de silice ont été analysées par balayage en utilisant le spectrophomètre Ultrospec 2100 pro UV / Vis pour une absorbance maximale. Un spectre Ultraviolet-visible de phénazine standard (Sigma, US) dissoute dans de l'acétate d'éthyle a été utilisé comme référence pour l'identification préliminaire du métabolite secondaire. Pour une identification plus approfondie, l'extrait de benzène séché dissous dans du chloroforme a été soumis à une analyse GC-MS sur GCMS-QP2010 ultra (Shimadzu) avec de l'hélium comme gaz porteur et le spectre de masse d'impact électronique (EI) des ions parents a été enregistré. Le spectre du composé a été comparé aux spectres de masse standard de la bibliothèque NIST et Willey.

L'extrait de benzène séché de couleur orange après dissolution dans l'acétate d'éthyle a montré une absorbance caractéristique à 260 nm et 362 nm. Les plaques de CCM du composé extrait au benzène et de l'extrait séché dissous dans l'acétate d'éthyle présentaient une seule tache avec une valeur R_f de 0,59 sous lumière UV. Une absorbance similaire du composé purifié dans des fractions éluées après chromatographie sur gel de silice a été enregistrée.

Le métabolite extrait a été identifié comme un dérivé de la phénazine en comparant le spectre UV-vis du métabolite purifié avec la phénazine standard (**Figure 16**). Enfin, le dérivé de la phénazine a été confirmé par analyse GC-MS qui a montré un pic de base à 180 m / z 1 et une série de pics de fragments moins abondants dans son spectre de masse. La GC-MS suivie de la recherche dans les bibliothèques du NIST et de Willey a proposé le composé antagoniste comme un dérivé d'acide carboxylique de la phénazine avec un poids moléculaire de 224 Da (**Figure 17**).

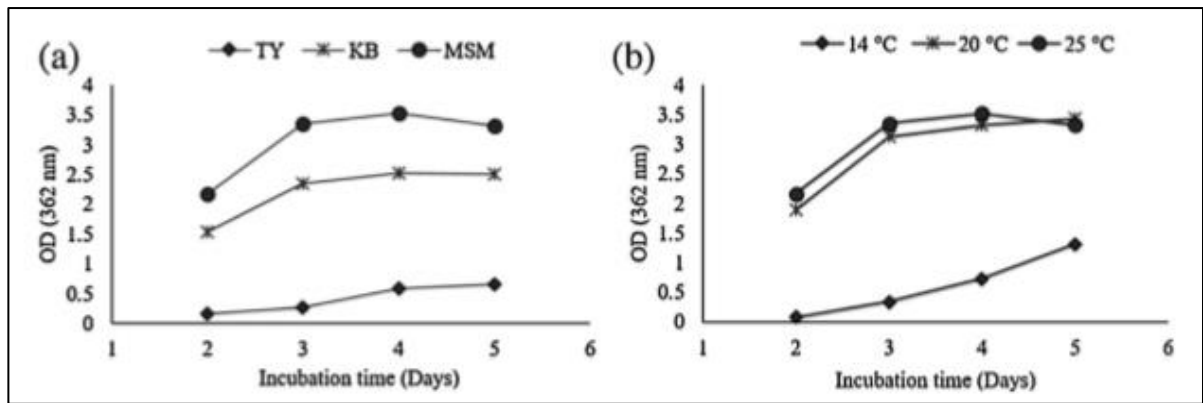


Figure 15. (a) OD362 de surnageant de culture dans trois milieux différents jusqu'à 5 jours d'incubation (b) Production de métabolite à trois températures différentes dans du milieu MSM (Jain et Pandey,2016).

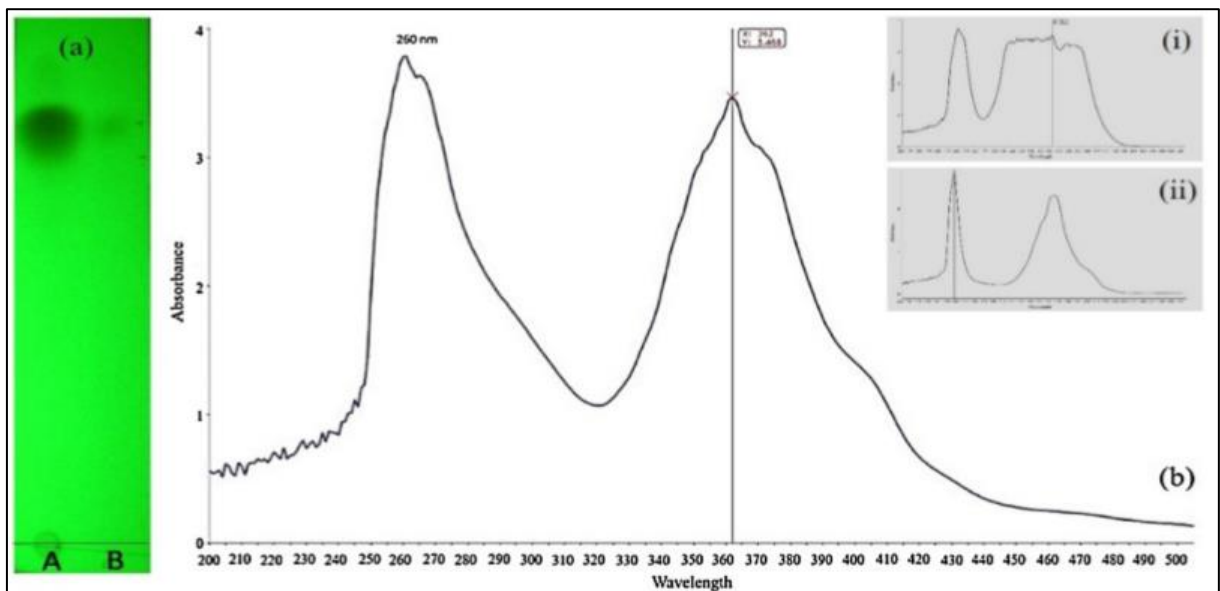


Figure 16. (a) Plaque CCM montrant un seul point d'extrait séché du métabolite (A) dissous dans de l'acétate d'éthyle, (B) extrait de benzène brut, (b) spectre UV-vis de l'extrait de benzène séché dans l'acétate d'éthyle. Le spectre UV-vis de la phénazine standard (i) et de la fraction éluée d'acétate d'éthyle de la colonne (ii) est indiqué dans l'encart (Jain et Pandey,2016).

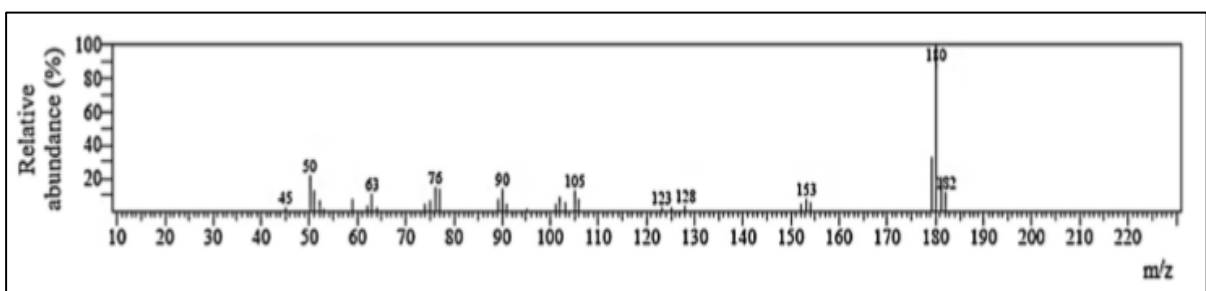


Figure 17. Spectre de masse GC-EI du composé antimicrobien de *P. cholororaphis* GBPI 507 (Jain et Pandey,2016).

Alors que **Tagele et al.(2019)** ont examiné l'extraction de 2 types de phénazine y compris phenazine-1-carboxylic acid (PCA) and 2- hydroxy-phenazine-1-carboxylic acid (2-OH-PCA) à partir de la souche KNU17Pc1 cultivée dans sept milieux différents dont la production maximal est sur le bouillon DPPP suivi du bouillon TSB par contre le minimal production a été signalé dans le milieu king B. La production de PCA et de 2-OH-PCA par KNU17Pc1 a été testée lorsque la culture bactérienne de chaque milieu testé a atteint la même D.O. La quantité maximale de PCA et de 2-OH-PCA a été enregistrée dans le bouillon PPMD (101,8 $\mu\text{g} / \text{ml}^{-1}$ et 9,5 $\mu\text{g} / \text{ml}^{-1}$ respectivement) suivi du bouillon TSB (87,4 $\mu\text{g} / \text{ml}^{-1}$ et 5,6 $\mu\text{g} / \text{ml}^{-1}$ respectivement). En revanche, une quantité plus faible de PCA et de 2 OH-PCA a été enregistrée dans le milieu King B (5,8 $\mu\text{g} / \text{ml}^{-1}$ et 0,5 $\mu\text{g} / \text{ml}^{-1}$, respectivement) (**Figure 18**).

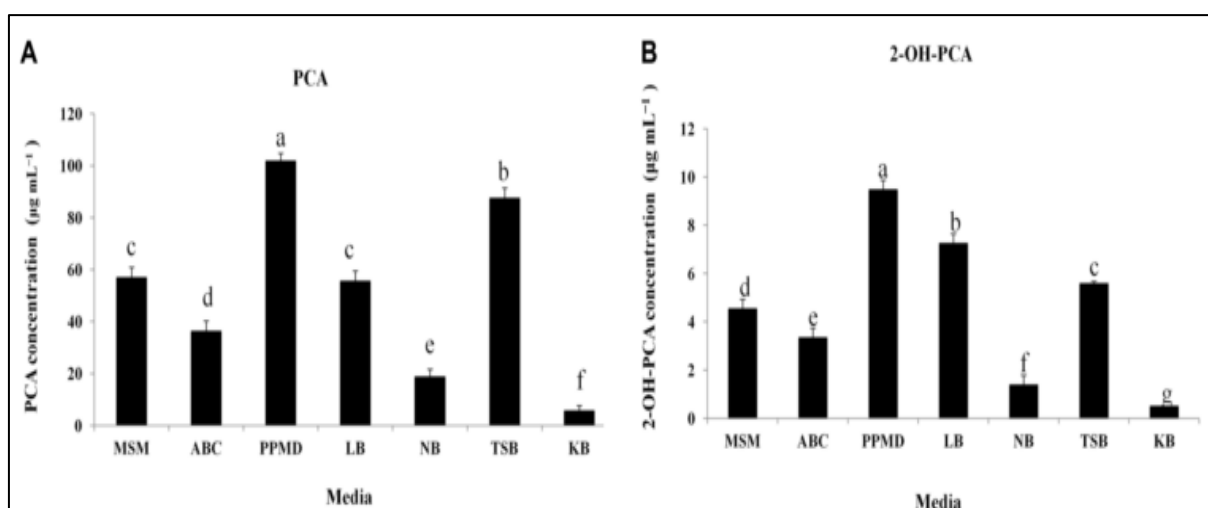


Figure 18. Production de (A) PCA et (B) 2-OH-PCA de la souche KNU17Pc1 cultivées dans sept milieux liquides différents (**Tagele et al.,2019**).

La formulation d'un inoculant est un processus crucial en plusieurs étapes qui devrait entraîner une ou plusieurs souches de micro-organismes incluses dans un porteur approprié, fournissant un environnement sûr pour les protéger contre des conditions souvent difficiles pendant le stockage et la conservation, assurant la survie et l'établissement après l'introduction dans les sols (**Herrmann et Lesueur,2013**). Cette étape peut déterminer le succès ou l'échec d'un agent biologique (**Arora et al.,2010**).

Chapitre VI :

Formulation et commercialisation

L'ingrédient actif dans les biopesticides est d'origine biologique, il devient donc très difficile de la maintenir en vie tout au long du traitement et du stockage. Une fois que l'IA devient non viable, la formulation ne montre pas l'activité pesticide prévue. Ces limitations associées aux biopesticides peuvent être surmontées en utilisant de nouvelles formulations basées sur la nanotechnologie, telles que les nanoparticules polymères (NP), les nano-émulsions, les NP à base de lipides, etc., qui devraient réduire leur concentration dans le sol et, en fin de compte, aider à minimiser la toxicité des pesticides pour l'homme et l'environnement **(Kaushik,2004; Glare et al.,2012)**.

Les bioformulations sont des matériaux biologiquement actifs contenant un ou plusieurs microbes bénéfiques ou leurs métabolites, immergés dans des matériaux de support rentables, qui sont appliqués pour stimuler le développement et la fertilité des plantes, et pour surmonter les phytopathogènes **(Catherine,2014; Ijaz et al.,2019)**. Une définition opérationnelle d'une bio-formulation doit inclure un composant actif, une substance porteuse et un additif. Le composant actif est généralement un organisme viable ; il peut s'agir d'un microbe fonctionnel ou d'une spore, et sa subsistance pendant la période de conservation est indispensable pour un développement efficace de la formulation **(Hynes et Boyetchko,2006)**.

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

La lyophilisation des *Pseudomonas* spp. fluorescents sous forme de poudre rend plus économique sa conservation, son transport et sa commercialisation **(Jean-Noel et al.,2015)**, La lyophilisation comporte généralement trois étapes : la congélation, la sublimation et la dessiccation secondaire **(Coulibaly et al.,2011)**. La technique consiste à ôter l'eau d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide de l'action combinée du froid et du vide. Le principe de base est que lorsqu'on réchauffe de l'eau à l'état solide à très basse pression, l'eau se sublime, c'est-à-dire qu'elle passe directement de l'état solide à l'état gazeux **(De Beer et al.,2006)** . La vapeur d'eau (ou de tout autre solvant) quitte le produit et on la capture par

congélation à l'aide d'un condensateur ou piège. Cette technique permet de conserver à la fois le volume et l'aspect du produit traité. Elle peut avoir lieu naturellement (séchage en montagne), ou, plus rapidement, dans un lyophilisateur (**Chouvenc et al.,2004**). L'utilisation de cryoprotecteurs au cours de la lyophilisation et d'antioxydants pendant le stockage augmente sensiblement le taux de viabilité de ces cellules (**Coulibaly et al.,2010**).

Les résultats de **Benoussaid et al.(2018)** ont démontré que l'utilisation des souches de *Pseudomonas* fluorescents lyophilisées avec ou sans cryoprotection dans le biocontrôle de la fusariose vasculaire de la tomate a donné presque les mêmes résultats qu'avec les souches fraîchement cultivées. Ils ont considéré que la lyophilisation est une technique préconisée dans le cas des *Pseudomonas* fluorescents vu que c'est une conception appropriée pour la production de cultures bactériennes concentrées, établie pour préserver les microorganismes en gardant leurs viabilités et efficacités avec l'avantage de stabilisation de l'état du matériel biologique séché, pour des éventualités de conservation et de stockage aux températures ambiantes, pour de longues périodes, ajoutant les facilités de transport et de manipulation. Pour que la lyophilisation soit prioritaire et recommandée aux souches de *Pseudomonas* fluorescents, par rapport aux autres traitements physiques préexistants, il est suggéré d'assurer une cryoprotection adéquate avant le processus de lyophilisation.

l'encapsulation également est une méthode de formulation de cellules microbiennes, dont les cellules sont mélangées à un matériau matriciel tel que des polysaccharides gélatinisés ou émulsionnés dans un matériau lipidique qui est finalement dilué et séché par atomisation pour obtenir les particules désirées. Au niveau industriel et afin d'obtenir un produit à faible coût, la méthode préférée est le séchage par atomisation ou en lit fluidiser (**Montesinos et Bonaterra,2017**).

Les biopesticides eux-mêmes peuvent être produits commercialement pour une application agricole en tant qu'antibiotiques. Un exemple est l'utilisation commerciale de l'acide phénazine-1-carboxylique, étiqueté « Shenqinmycin » en Chine, avec la Wuhan Agri-Soul Chemical Ltd comme fabricant, en raison de sa capacité à inhiber la croissance des champignons pathogènes des plantes (**Liu et al.,2016**).

Pseudomonas fluorescents a toujours joué un rôle important dans le développement des biopesticides et des biofertilisants depuis l'existence de systèmes de production agricoles plus durables. Cependant, par rapport au volume de recherche qui a été effectué avec ces bactéries, peu de souches ont été développées avec succès en produits commerciaux pour le biocontrôle

et la biostimulation des plantes (**Yanes et Bajsa,2016**). Le manque de cohérence dans les performances sur le terrain des bioproduits à base de *Pseudomonas*, dans différentes cultures et conditions, est une limitation pour son application commerciale (**Figueiredo et al.,2010; Panpatte et al.,2016**) . Dans certains cas, il existe un écart entre les résultats obtenus dans des conditions de laboratoire contrôlées et ceux obtenus sur le terrain (**Khalid et al.,2004**).

L'échec des formulations de protection à base de micro-organismes dans des conditions de terrain a été expliqué par leur faible stabilité, avec une persistance et une résistance limitées, mais pas par un manque d'efficacité (**Dorn et al.,2007**). Ce phénomène peut parfois s'expliquer par la régulation complexe de certaines activités liées au biocontrôle comme la colonisation, la production de métabolites actifs, qui dépendent fortement des conditions environnementales. Dans certains cas, la nécessité de l'inoculation avec une population élevée de l'agent de lutte biologique, afin de parvenir à un contrôle efficace de l'agent pathogène, est également un facteur limitant (**Yanes et Bajsa,2016**).

Pour le succès de la lutte biologique, il faut assurer non seulement la qualité de l'agent de lutte biologique appliqué, mais aussi son établissement dans l'écosystème naturel pour prospérer et bien rivaliser avec les agents phytopathogènes (**Panpatte et al.,2016**).

L'approbation des pesticides microbiens pour la commercialisation nécessite des dossiers détaillés contenant des données scientifiques sur l'identité des micro-organismes, les propriétés biologiques, l'efficacité, les méthodes analytiques spécifiques, les résidus, la traçabilité et les effets néfastes potentiels sur la santé humaine et les organismes non ciblés. Dans l'Union européenne, l'enregistrement et l'autorisation des pesticides microbiens en tant que produits phytopharmaceutiques dépendent de la direction de la santé et de la sécurité alimentaire et sont régis par la directive 2009/128 / CE et le règlement 1107/2009 / CE. Aux États-Unis, l'autorisation est réglementée par l'Environmental Protection Agency. En outre, des exigences spécifiques peuvent changer lorsqu'une demande d'autorisation considère le micro-organisme comme un biocide ou un exhausteur de plantes. Par conséquent, la disponibilité des biopesticides commerciaux dépend des réglementations spécifiques de chaque pays (**Montesinos et Bonaterra,2017**).

Anderson et Kim(2018), ont numérisés des exemples des biopesticides commercialisés issus de *Pseudomonas chlororaphis* (Tableau 4).

Tableau 4. Liste des produits des souches de *Pseudomonas chlororaphis* commercialisés comme biopesticides (Anderson et Kim,2018).

Nom commercial	Nom de souche	Ravageurs ciblés / effet	Société d'enregistrement
AtEze	63-28	La tige et la racine pourrissent dans les légumes	EcoSoil Systems, Inc., CA, USA
BioJect	Tx-1	Tâche du dollar, anthracnose, pythium, moisissure rose des neiges dans le gazon	EcoSoil Systems, Inc., CA, USA
Cedomon	MA342	Agents pathogènes transmis par les semences dans l'orge et l'avoine	BioAgri AB, Sweden
Cerall	MA342	Agents pathogènes transmis par les semences dans le blé, le seigle et le triticale	BioAgri AB, Sweden
Cedress	O6	Pois Ascochyta et <i>Acrothecium carotae</i> transmis par graines sur les carottes.	BioAgri AB, Sweden
NematoKill	O6	Nématodes à galles	HyunNong Inc., South Korea
ItaEpi	O6	Pucerons	HyunNong Inc., South Korea
Bastapa	O6	Engrais microbien favorisant la croissance des plantes pour les légumes	HyunNong Inc., South Korea
Helper Plus	O6 mixé avec la souche de <i>Bacillus sp.</i>	Engrais microbien / inducteur de résistance aux maladies Engrais microbien pour légumes	HyunNong Inc., South Korea

Partie expérimentale

I. Objectif

Notre travail consiste à la recherche de la production de métabolites secondaires à effet antibiotiques de nature phénaziniques de quelques souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents, a été réalisé dans laboratoire de phytopathologie à l'université de Blida 1.

Durant une période allant du mois Février jusqu'à mi-mars 2020.

II. Matériel

II.1 Matériels biologique

II.1.1 Les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents

Des travaux antérieurs ont permis d'isoler 20 souches bactériennes issues de sol rhizosphérique de la tomate présentant les caractéristiques morphologiques et biochimiques des *Pseudomonas* spp. fluorescents.

II.1.2 Les bactéries phytopathogènes

Deux souches bactériens provenant de laboratoire de phytopathologie de l'université de BLIDA1 appartenant au genre *Erwinia* (E3 et E2x).

II.2 Matériels non biologique

Nous avons utilisé comme matériels non biologiques : le milieu de culture King B, les verreries et les appariellages.

III. Méthode et résultats

La pureté des souches bactériennes de *Pseudomonas* a été vérifiée sur le milieu King B en réalisant plusieurs repiquages successifs. L'activité antimicrobienne de ces souches a été testée vis-à-vis des bactéries provenant du laboratoire de phytopathologie de l'université de BLIDA 1. Il s'agit de deux souches appartenant au genre *Erwinia* (E3 et E2x). Des disques de papier wathman imprégnés dans la crème bactérienne de *Pseudomonas* âgée de 24 h ont été déposés à la surface d'un milieu de culture King B préalablementensemencés par les bactéries phytopathogènes puis incubés à 25 °C. Cette technique a été réalisée en trois répétitions.

Les résultats de test de l'activité antagoniste *in vitro*, réalisé par les 20 souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents vis-à-vis les 2 isolats bactériens montrent que 5 souches sur un total de 20 ont manifesté des activités antagonistes vis-à-vis

uniquement de d'isolat E3 avec des taux variables. La meilleure zone d'inhibition était de 11,3 mm enregistrée par les souches Ps3 et Ps13. Aucune activité antagoniste n'a été enregistrée vis-à-vis de l'isolat E2x (Tableau 5) (Figure 19).

Tableau 5. Activité antibactérienne des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents (Original, 2020).

<i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents	Moyenne de trois répétitions de zone d'inhibition (mm)	
	E3	E2x
Ps1	9,3	0
Ps2	10	0
Ps3	11,3	0
Ps13	11,3	0
Ps15	9,6	0

+

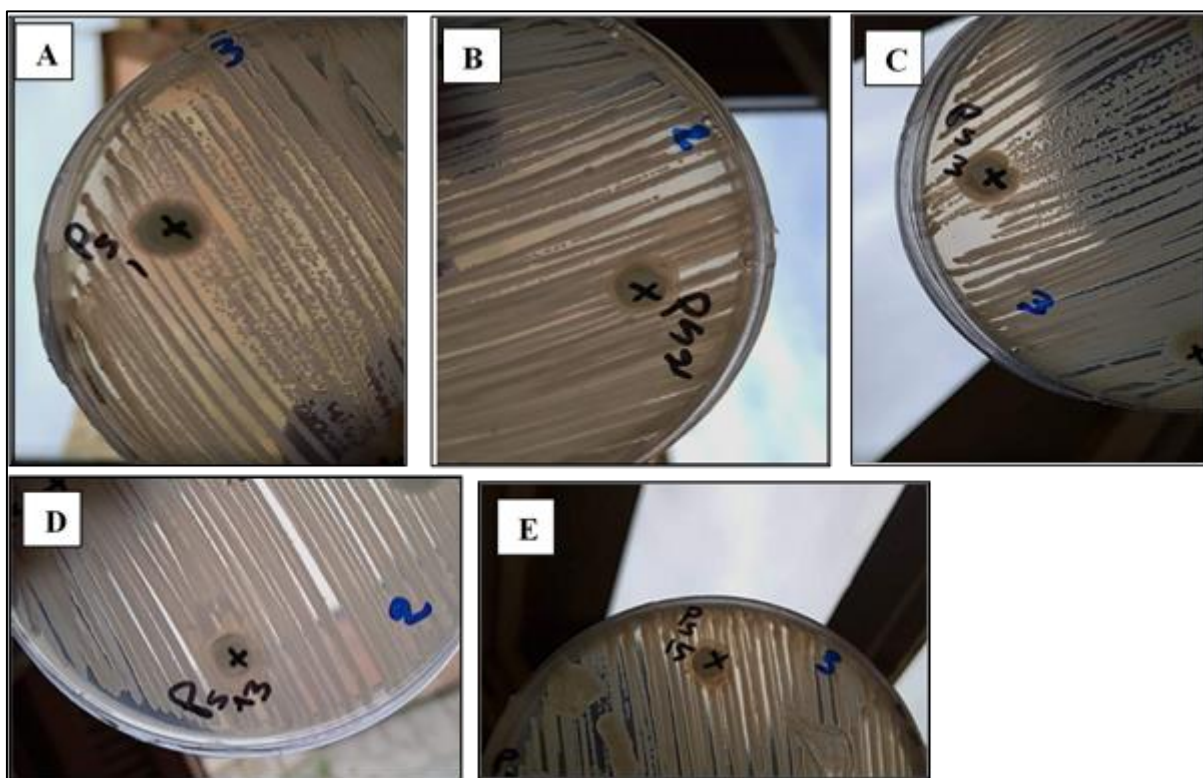


Figure 19. Résultats de confrontation des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescent vis-à-vis la souche bactérienne E3: (A) Ps1-E3, (B) Ps2-E3, (C) Ps3-E3, (D) Ps13-E3, (E) Ps15-E3 (Original, 2020).

Conclusion et perspectives

En conclusion, notre travail a permis d'étudier des métabolites secondaires de *Pseudomonas* spp. fluorescents pour leurs propriétés de biocontrôle des maladies des plantes. Ces bactéries ont fait l'objet d'explorations suppressives de nombreuses maladies causées par les phytopathogènes notamment les champignons et les bactéries.

Les Plant Growth Promoting Rhizobacteria (dans notre étude les *Pseudomonas* spp. fluorescents) ont été appliqués avec succès pour contrôler les agents pathogènes végétaux sur différents pathosystèmes en raison de leur capacité à produire des métabolites secondaires tels que les antibiotiques, l'induction de la résistance systémique dans la plante hôte, et / ou la compétition pour les niches et les nutriments. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont très appropriés pour développer les inoculants de marché, car ils sont abondants dans le sol et les racines, peuvent employer une variété de sources de carbone, ont un taux de croissance élevé, peuvent être introduits dans la rhizosphère par la bactériation des graines, et sont propices à la manipulation génétique.

Plusieurs études ont été décrites que les souches de *Pseudomonas* spp fluorescents qui ont manifesté un pouvoir antagoniste *in vitro*, vis-à-vis de bactéries et de phytopathogènes fongiques, ce sont en effet révélés producteurs de métabolites secondaires à effet antimicrobienne tels que les antibiotiques de nature phénazinique et d'autres composés antimicrobiens. Leur production dépend non seulement des souches mais aussi de facteurs physico-chimiques et de protocole d'extraction et d'identification de ces molécules.

Les perspectives qui résultent de ce travail sont nombreuses. D'un point de vue d'application agricole, Il est nécessaire de confirmer les résultats des recherches *in vitro* par l'étude de la production de métabolites ciblés sous serre et en plein champ et de voir leur potentiel pour une utilisation comme un biopesticide afin d'éviter les pesticides de synthèse. Les difficultés de formulation et d'application, ainsi que des problèmes relatifs à la manutention et principalement le coût de ces microorganismes sont parmi les obstacles ayant retardé leur vulgarisation.

Il serait aussi souhaitable de sélectionner et d'identifier d'autres métabolites secondaires produits par des *Pseudomonas* plus performante et de poursuivre les études sur les propriétés biologiques de ces composés et comprendre leurs mécanismes d'action pour éviter le problème de la résistance aux antibiotiques.

Il serait plus intéressant de poursuivre l'activité antimicrobienne des *Pseudomonas* spp. fluorescents vis-à-vis une large gamme des bactéries phytopathogènes.

Références bibliographiques

- ❖ **Ahemad M. et Kibret M., 2014.** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science*, 26(1): 1-20.
- ❖ **Anderson A. J. et Kim Y. C., 2018.** Biopesticides produced by plant-probiotic *Pseudomonas chlororaphis* isolates. *Crop Protection*, 105: 62-69.
- ❖ **Ansari R. A., Mahmood I., Rizvi R. et Sumbul A., 2017.** Siderophores: Augmentation of soil health and crop productivity. Probiotics in agroecosystem, *Springer*: 291-312.
- ❖ **Arora N. K., Khare E. et Maheshwari D. K., 2010.** Plant growth promoting rhizobacteria: constraints in bioformulation, commercialization, and future strategies. Plant growth and health promoting bacteria, *Springer*: 97-116.
- ❖ **Arseneault T. et Filion M., 2016.** Phenazine-producing *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents of plant pathogens. Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity, *Springer*: 53-68.
- ❖ **Arthurs S., Dara S. K. et Solter L., 2018.** Preface: Regional status of microbial control programs. *Journal of invertebrate pathology*.
- ❖ **Ayyadurai N., Ravindra Naik P., Sreehari Rao M., Sunish Kumar R., Samrat S., Manohar M. et Sakthivel N., 2006.** Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. *Journal of Applied Microbiology*, 100(5): 926-937.
- ❖ **Bakker P. A., Berendsen R. L., Doornbos R. F., Wntermans P. C. et Pieterse C. M., 2013.** The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Frontiers in plant science*, 4: 165.
- ❖ **Baltz R. H., 2014.** Combinatorial biosynthesis of cyclic lipopeptide antibiotics: a model for synthetic biology to accelerate the evolution of secondary metabolite biosynthetic pathways. *ACS synthetic biology*, 3(10): 748-758.
- ❖ **Bender C., Rangaswamy V. et Loper J., 1999.** Polyketide production by plant-associated *pseudomonads*. *Annual review of phytopathology*, 37(1): 175-196.

- ❖ **Benoussaid N., Benchabane M. et Thonart P., 2018.** Identification of *fluorescent Pseudomonas* strains and application of their freeze-dried in biocontrol of tomato *Fusarium vascular* wilt. *AgroBiologia*, 8(1): 753-764.
- ❖ **Bergey G. K., Morris H., Rosenfeld W., Blume W., Penovich P., Morrell M., Leiderman D., Crockatt J., LaMoreaux L. et Garofalo E., 1997.** Gabapentin monotherapy: I. An 8-day, double-blind, dose controlled, multicenter study in hospitalized patients with refractory complex partial or secondarily generalized seizures. *Neurology*, 49(3): 739-745.
- ❖ **Bernabeu P. R., Pistorio M., Torres-Tejerizo G., Estrada-De los Santos P., Galar M. L., Boiardi J. L. et Luna M. F., 2015.** Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica*. *Scientia Horticulturae*, 191: 113-120.
- ❖ **Bhardwaj D., Ansari M. W., Sahoo R. K. et Tuteja N., 2014.** Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial cell factories*, 13(1): 1-10.
- ❖ **Bhattacharya D., Nagpure A. et Gupta R. K., 2007.** Bacterial chitinases: properties and potential. *Critical reviews in biotechnology*, 27(1): 21-28.
- ❖ **Bhattacharyya P. N. et Jha D. K., 2012.** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4): 1327-1350.
- ❖ **Blumer C. et Haas D., 2000.** Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives of Microbiology*, 173(3): 170-177.
- ❖ **Bonkowski M., Villenave C. et Griffiths B., 2009.** Rhizosphere fauna: the functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots. *Plant and Soil*, 321(1-2): 213-233.
- ❖ **Bossis E., Lemanceau P., Latour X. et Gardan L., 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision.
- ❖ **Botelho G. R. et Mendonça-Hagler L. C., 2006.** Fluorescent *Pseudomonads* associated with the rhizosphere of crops: an overview. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4): 401-416.

- ❖ **Bowen G. et Rovira A., 1999.** The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in agronomy, Elsevier*, 66: 1-102.
- ❖ **Braud A., Hannauer M., Mislin G. L. et Schalk I. J., 2009.** The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *Journal of bacteriology*, 191(11): 3517-3525.
- ❖ **Brazelton J. N., Pfeufer E. E., Sweat T. A., Gardener B. B. M. et Coenen C., 2008.** 2, 4-Diacetylphloroglucinol alters plant root development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(10): 1349-1358.
- ❖ **Briard B., Bomme P., Lechner B. E., Mislin G. L., Lair V., Prévost M. C., Latgé G. P., Haas H. et Beauvais A., 2015.** *Pseudomonas aeruginosa* manipulates redox and iron homeostasis of its microbiota partner *Aspergillus fumigatus* via phenazines. *Scientific reports*, 5: 8220.
- ❖ **Brodhagen M., Henkels M. D. et Loper J. E., 2004.** Positive autoregulation and signaling properties of pyoluteorin, an antibiotic produced by the biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3): 1758-1766.
- ❖ **Burges H. D., 2012.** Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments, *Springer Science & Business Media*.
- ❖ **Catherine R. R., 2014.** Produits de Protection des Plantes: Innovation et sécurité pour une agriculture durable. *Lavoisier*.
- ❖ **Chapple A., Downer R., Wolf T., Taylor R. et Hall F., 1996.** The application of biological pesticides: limitations and a practical solution. *Entomophaga*, 41(3-4): 465-474.
- ❖ **Chaudhari B. L., Patil S. N., Paradeshi J. S., Chaudhari M. A. et Chaudhari C. S., 2017.** Premier Biocontrol Traits of *Pseudomonads*: Siderophores, Phenazines or What Else? *Microorganisms for Green Revolution, Springer*: 351-390.
- ❖ **Chaufaux J., 1995.** Utilisation de biopesticides contre les ravageurs des cultures: le point sur *Bacillus thuringiensis*. *Insectes (OPIE)*, 97: 2-6.

- ❖ **Chernin L. et Chet I., 2002.** Microbial enzymes in the biocontrol of plant pathogens and pests. *Enzymes in the Environment, CRC Press*: 179-234.
- ❖ **Chin A, Woeng T. F., Bloemberg G. V. et Lugtenberg B. J., 2003 .** Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New phytologist*, 157(3): 503-523.
- ❖ **Chincholkar S. et Thomashow L., 2013.** Microbial phenazines: biosynthesis, agriculture and health, *Springer*.
- ❖ **Chouvenc P., Vessot S., Andrieu J. et Vacus P., 2004.** Optimization of the freeze-drying cycle: a new model for pressure rise analysis. *Drying Technology*, 22(7): 1577-1601.
- ❖ **Cleyet-Marel J. C. et Hinsinger P., 2000.** Le sol milieu vivant, un territoire qui reste à découvrir et à valoriser. Oléagineux, *Corps gras, Lipides*, 7(6): 490-493.
- ❖ **Coats V. C. et Rumpho M. E. , 2014.** The rhizosphere microbiota of plant invaders: an overview of recent advances in the microbiomics of invasive plants. *Frontiers in Microbiology*, 5: 368.
- ❖ **Colwell R. et Mandel M., 1964.** Adansonian analysis and deoxyribonucleic acid base composition of some gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 87(6): 1412-1422.
- ❖ **Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C. et Barka E. A., 2005.** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*, 71(9): 4951-4959.
- ❖ **Copping L. G. et Menn J. J., 2000.** Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 56(8): 651-676.
- ❖ **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. *BASE*.
- ❖ **Coulibaly I., Dubois-Dauphin R., Destain J., Fauconnier M. L., Lognay G. et Thonart P., 2010.** The resistance to freeze-drying and to storage was determined as

the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity. *International Journal of Microbiology*, 2010.

- ❖ **David B. V., Chandrasehar G. et Selvam P. N., 2018.** *Pseudomonas fluorescens*: a plant-growth-promoting rhizobacterium (PGPR) with potential role in biocontrol of pests of crops. Crop improvement through microbial biotechnology, *Elsevier*: 221-243.
- ❖ **De Beer D., Sauter E., Niemann H., Kaul N., Foucher J. P., Witte U., Schlüter M. et Boetius A., 2006.** In situ fluxes and zonation of microbial activity in surface sediments of the Håkon Mosby Mud Volcano. *Limnology and Oceanography*, 51(3): 1315-1331.
- ❖ **De Bruijn F. J., 2013.** Molecular microbial ecology of the rhizosphere, Wiley-Blackwell.
- ❖ **De Souza J. T., Arnould C., Deulvot C., Lemanceau P., Gianinazzi-Pearson V. et Raaijmakers J. M., 2003.** Effect of 2, 4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Phytopathology*, 93(8): 966-975.
- ❖ **Devi K. K. et Kothamasi D., 2009.** *Pseudomonas fluorescens* CHA0 can kill subterranean termite *Odontotermes obesus* by inhibiting cytochrome c oxidase of the termite respiratory chain. *FEMS microbiology letters*, 300(2): 195-200.
- ❖ **Dhakar R. et Singh D. N., 2019.** Biopesticides: A Key to Sustainable Agriculture. *Int. J. Pure App. Biosci.*, 7(3): 391-396.
- ❖ **Dorjey S., Dolkar D. et Sharma R., 2017.** Plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas*: a review. *Int. J. Curr. Microbiol App. Sci.*, 6(7): 1335-1344.
- ❖ **Dorn B., Musa T., Krebs H., Fried P. M. et Forrer H. R., 2007.** Control of late blight in organic potato production: evaluation of copper-free preparations under field, growth chamber and laboratory conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 119(2): 217-240.
- ❖ **Doudoroff M. et Palleroni N., 1974.** Genus *Migula* 1894, 237; Nom. cons. Opin. 5, Jud. Comm. 1952, 121. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Eighth Edition, The Williams and Wilkins Co., Baltimore: 217-243.

- ❖ **Dubuis C., Keel C. et Haas D., 2007.** Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. *European Journal of Plant Pathology*, 119(3): 311-328.
- ❖ **Dwivedi D. et Johri B., 2003.** Antifungals from fluorescent *pseudomonads*: biosynthesis and regulation. *Current Science*: 1693-1703.
- ❖ **Egamberdieva D., Jabborova D. et Hashem A., 2015.** *Pseudomonas* induces salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*) and resistance to *Fusarium* root rot through the modulation of indole-3-acetic acid. *Saudi journal of biological sciences*, 22(6): 773-779.
- ❖ **Egamberdieva D., Kamilova F., Validov S., Gafurova L., Kucharova Z. et Lugtenberg B., 2008.** High incidence of plant growth, stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environmental microbiology*, 10(1): 1-9.
- ❖ **Evans G. et Furlong J., 2003.** Environmental Biotechnology: Theory and Application (IK International Pvt Ltd).
- ❖ **Figueiredo M. d. V. B., Seldin L., De Araujo F. F. et Mariano R. D. L. R., 2010.** Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. Plant growth and health promoting bacteria, *Springer*: 21-43.
- ❖ **Fravel D., 2005.** Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43: 337-359.
- ❖ **Fravel D. R., 1988.** Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual review of phytopathology*, 26(1): 75-91.
- ❖ **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*, 176(2): 269.
- ❖ **García de Salamone I. E., Hynes R. K. et Nelson L. M., 2001.** Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of microbiology*, 47(5): 404-411.

- ❖ **Garrido-Sanz D., Meier-Kolthoff J. P., Göker M., Martin M., Rivilla R. et Redondo-Nieto M., 2016.** Genomic and genetic diversity within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *PloS one*, 11(2): 150-183.
- ❖ **Geller D. E., Weers J. et Heuerding S., 2011.** Development of an inhaled dry-powder formulation of tobramycin using PulmoSphere™ technology. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*, 24(4): 175-182.
- ❖ **Ghodake V. N., Naik S. V., Bhukhanwala K. N., Kande K. V., Bhor N. J. et Patravale V. B., 2018.** Nanoengineered Systems for Biopesticides. Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications, *Elsevier*: 243-259.
- ❖ **Glare T., Caradus J., Gelernter W., Jackson T., Keyhani N., Köhl J., Marrone P., Morin L. et Stewart A., 2012.** Have biopesticides come of age?. *Trends in biotechnology*, 30(5): 250-258.
- ❖ **Gray E. et Smith D., 2005.** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil biology and biochemistry*, 37(3): 395-412.
- ❖ **Guttenberger N., Blankenfeldt W. et Breinbauer R. 2017.** Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(22): 6149-6166.
- ❖ **Haas D. et Défago G., 2005.** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonads*. *Nature reviews microbiology*, 3(4): 307-319.
- ❖ **Hammer P. E., Hill D. S., Lam S. T., Van Pée K. H. et Ligon J. M., 1997.** Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6): 2147-2154.
- ❖ **Harish S., Kavino M., Kumar N., Balasubramanian P. et Samiyappan R., 2009.** Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting endophytic bacteria against Banana bunchy top virus. *Biological Control*, 51(1): 16-25.
- ❖ **Hartmann A., Rothballer M. et Schmid M., 2008.** Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*, 312(1-2): 7-14.

- ❖ **Hay A. G., Dees P. M. et Sayler G. S., 2001.** Growth of a bacterial consortium on triclosan. *FEMS Microbiology Ecology*, 36(2-3): 105-112.
- ❖ **Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R. et Ahmed I., 2010.** Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of microbiology*, 60(4): 579-598.
- ❖ **Herrmann L. et Lesueur D., 2013.** Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(20): 8859-8873.
- ❖ **Höfte M. et Altier N. 2010.** Fluorescent *pseudomonads* as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Research in Microbiology*, 161(6): 464-471.
- ❖ **Hussein K. A. et Joo J. H., 2017.** Stimulation, purification, and chemical characterization of siderophores produced by the rhizospheric bacterial strain *Pseudomonas putida*. *Rhizosphere*, 4: 16-21.
- ❖ **Hynes R. K. et Boyetchko S. M., 2006.** Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(4): 845-849.
- ❖ **Ijaz M., Ali Q., Ashraf S., Kamran M. et Rehman A., 2019.** Development of Future Bioformulations for Sustainable Agriculture. *Microbiome in Plant Health and Disease, Springer*: 421-446.
- ❖ **Inaoka T., Takahashi K., Ohnishi-Kameyama M., Yoshida M. et Ochi K., 2003.** Guanine nucleotides guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate and GTP co-operatively regulate the production of an antibiotic bacilysin in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(4): 2169-2176.
- ❖ **Jackson T., 2017.** Entomopathogenic Bacteria: Mass Production, Formulation, and Quality Control. *Microbial Control of Insect and Mite Pests, Elsevier*: 125-139.
- ❖ **Jain R. et Pandey A., 2016.** A phenazine-1-carboxylic acid producing polyextremophilic *Pseudomonas chlororaphis* (MCC2693) strain, isolated from mountain ecosystem, possesses biocontrol and plant growth promotion abilities. *Microbiological research*, 190: 63-71.

- ❖ **Jean-Noel M. K., Tshimenga K. et Philippe N., 2015.** Accelerated Oxidation Test of freeze-dried *Pseudomonas fluorescens* BTP1, BB2 and PI9 strains. *The Asia Journal of Applied Microbiology*, 2(2): 18-26.
- ❖ **Jimenez P. N., Koch G., Papaioannou E., Wahjudi M., Krzeslak J., Coenye T., Cool R. H. et Quax W. J., 2010.** Role of PvdQ in *Pseudomonas aeruginosa* virulence under iron-limiting conditions. *Microbiology*, 156(1): 49-59.
- ❖ **Jogaiah S., Shivanna R. K., Gnanaprakash P. H. et Hunthrike S. S., 2010.** Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for their efficiency to promote growth and induce systemic resistance in pearl millet against downy mildew disease. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(4): 368-378.
- ❖ **Johnson J. L. et Ordal E. J., 1968.** Deoxyribonucleic acid homology in bacterial taxonomy: effect of incubation temperature on reaction specificity. *Journal of Bacteriology*, 95(3): 893-900.
- ❖ **Kang Y., Shen M., Wang H. et Zhao Q., 2013.** A possible mechanism of action of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) strain *Bacillus pumilus* WP8 via regulation of soil bacterial community structure. *The Journal of general and applied microbiology*, 59(4): 267-277.
- ❖ **Kaushik N., 2004 .** Biopesticides for Sustainable Agriculture: prospects and constraints, The Energy and Resources Institute (TERI).
- ❖ **Khalid A., Arshad M. et Zahir Z., 2004.** Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3): 473-480.
- ❖ **Khan A. G., 2005.** Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 18(4): 355-364.
- ❖ **Kilani J. et Fillinger S., 2016.** Phenylpyrroles: 30 years, two molecules and (nearly) no resistance. *Frontiers in microbiology*, 7: 2014.
- ❖ **Kim S.R. et Yeon K. M., 2018.** Quorum sensing as language of chemical signals. *Comprehensive Analytical Chemistry, Elsevier*. 81: 57-94.

- ❖ **Kloepper J., Schroth M. et Miller T., 1980.** Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, 70(11): 1078-1082.
- ❖ **Kloepper J. W., Lifshitz R. et Zablotowicz R. M., 1989.** Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in biotechnology*, 7(2): 39-44.
- ❖ **Kraus J. et Loper J. E., 1995.** Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3): 849-854.
- ❖ **Krolicka M., Hinz S. W., Koetsier M. J., Joosten R., Eggink G., Van den Broek L. A. et Boeriu C. G., 2018.** Chitinase Chi1 from *Myceliophthora thermophila* C1, a thermostable enzyme for chitin and chitosan depolymerization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(7): 1658-1669.
- ❖ **Kruijt M., Tran H. et Raaijmakers J. M., 2009.** Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth promoting *Pseudomonas putida* 267. *Journal of applied microbiology*, 107(2): 546-556.
- ❖ **Kumar R. S., Ayyadurai N., Pandiaraja P., Reddy A., Venkateswarlu Y., Prakash O. et Sakthivel N., 2005.** Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *Journal of applied Microbiology*, 98(1): 145-154.
- ❖ **Kumar S. et Singh A., 2015.** Biopesticides: present status and the future prospects. *J. Fertil. Pestic.*, 6(2): 100-129.
- ❖ **Lahmar R. et Ribaut J. P., 2001.** Sols et sociétés, regards pluriculturels, ECLM.
- ❖ **Latour X. et Lemanceau P., 1997.** Métabolisme carboné et énergétique des *Pseudomonas* spp fluorescents saprophytes à oxydase positive.
- ❖ **Lemanceau P., 1992.** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents.
- ❖ **Lemanceau P., Expert D., Gaymard F., Bakker P. et Briat J. F., 2009.** Role of iron in plant–microbe interactions. *Advances in botanical research*, 51: 491-549.

- ❖ **Leong J., 1986.** Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annual review of Phytopathology*, 24(1): 187-209.
- ❖ **Liu K., Hu H., Wang W. et Zhang W., 2016.** Genetic engineering of *Pseudomonas chlororaphis* GP72 for the enhanced production of 2-hydroxyphenazine. *Microbial cell factories*, 15(1): 131.
- ❖ **Lorito M., Farkas V., Rebuffat S., Bodo B. et Kubicek C. P., 1996.** Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology*, 178(21): 6382-6385.
- ❖ **Mamoun M. et Olivier J., 1989.** Dynamique des populations fongiques et bactériennes de la rhizosphère des noisetiers truffiers. II. Chélation du fer et répartition taxonomique chez les *Pseudomonas* fluorescents.
- ❖ **Mandryk-Litvinkovich M., Muratova A., Nosonova T., Evdokimova O., Valentovich L., Titok M. et Kolomiets E., 2017.** Molecular genetic analysis of determinants defining synthesis of 2, 4-diacetylphloroglucinol by *Pseudomonas brassicacearum* BIM B-446 bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 53(1): 31-39.
- ❖ **Maplestone R. A., Stone M. J. et Williams D. H., 1992.** The evolutionary role of secondary metabolites: a review. *Gene.*, 115(1-2): 151-157.
- ❖ **Markets et Markets, 2016.** Biopesticides Market by Type (Bioinsecticides, Biofungicides, Bionematicides, and Bioherbicides), Source (Microbials, Biochemicals, and Beneficial Insects), Mode of Application, Formulation, Crop Application, and Region - Global Forecast to 2025. Retrieved 12/07/2020, from <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biopesticides-267.html>.
- ❖ **Maurhofer M., Keel C. et Haas D. et Défago G., 1994.** Pyoluteorin production by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 is involved in the suppression of *Pythium* damping-off of cress but not of cucumber. *European journal of plant pathology*, 100(3-4): 221-232.
- ❖ **Mavrodi D. V., Blankenfeldt W. et Thomashow L. S., 2006.** Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44: 417-445.

- ❖ **Mavrodi D. V., Bonsall R. F., Delaney S. M., Soule M. J., Phillips G. et Thomashow L. S., 2001.** Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology*, 183(21): 6454-6465.
- ❖ **Meliani A., 2012.** Contribution à l'étude de la diversité écologique et fonctionnelle des *Pseudomonas fluorescens*, PhD thesis, université d'Oran, Algérie.
- ❖ **Mendes R., Kruijt M., De Bruijn I., Dekkers E., Van der Voort M., Schneider J. H., Piceno Y. M., DeSantis T. Z., Andersen G. L. et Bakker P. A., 2011.** Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science* 332(60-33): 1097-1100.
- ❖ **Meyer J.M., Geoffroy V. A., Baida N., Gardan L., Izard D., Lemanceau P., Achouak W. et Palleroni N. G., 2002.** Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent *pseudomonads*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6): 2745-2753.
- ❖ **Mezaache S., 2018.** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme.
- ❖ **Miethke M. et Marahiel M. A., 2007.** Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(3): 413-451.
- ❖ **Miller M. B. et Bassler B. L., 2001.** Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1): 165-199.
- ❖ **Mion S., Rémy B., Plener L., Chabrière E. et Daudé D., 2018.** Empêcher les bactéries de communiquer: diviser pour mieux soigner. *Annales Pharmaceutiques Françaises, Elsevier*.
- ❖ **Mishra J. et Arora N. K., 2018.** Secondary metabolites of fluorescent *pseudomonads* in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*, 125: 35-45.
- ❖ **Mishra J., Dutta V. et Arora N. K., 2020.** Biopesticides in India: technology and sustainability linkages. *3 Biotech.*, 10: 1-12.

- ❖ **Mishra S. et Arora N. K., 2012.** Management of black rot in cabbage by rhizospheric *Pseudomonas* species and analysis of 2, 4-diacetylphloroglucinol by qRT-PCR. *Biological Control*, 61(1): 32-39.
- ❖ **Mnif I. et Ghribi D., 2015.** Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. *Crop Protection*, 77: 52-64.
- ❖ **Montesinos E. et Bonaterra A., 2017.** Pesticides, microbial In Reference module in life sciences, Amsterdam, the Netherlands: *Elsevier*.
- ❖ **Morgan J., Bending G. et White P., 2005.** Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 56(417): 1729-1739.
- ❖ **Moynihan J. A., Morrissey J. P., Coppoolse E. R., Stiekema W. J., O'Gara F. et Boyd E. F., 2009.** Evolutionary history of the phl gene cluster in the plant-associated bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and environmental microbiology*, 75(7): 2122-2131.
- ❖ **Mukherjee S. et Bassler B. L., 2019.** Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology*, 17(6): 371-382.
- ❖ **Muthusamy K., Gopalakrishnan S., Ravi T. K. et Sivachidambaram P., 2008.** Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Current science*: 736-747.
- ❖ **Nabti E., Bensidhoum L., Tabli N., Dahel D., Weiss A., Rothballer M., Schmid M. et Hartmann A., 2014.** Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by a *Cellulosimicrobium* sp. strain isolated from salt-affected rhizosphere soil in northwestern Algeria. *European Journal of Soil Biology*, 61: 20-26.
- ❖ **Nandi M., Selin C., Brawerman G., Fernando W. D. et De Kievit T., 2017.** Hydrogen cyanide, which contributes to *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 biocontrol, is upregulated in the presence of glycine. *Biological Control*, 108: 47-54.
- ❖ **Nardi S., Concheri G., Pizzeghello D., Sturaro A., Rella R. et Parvoli G., 2000.** Soil organic matter mobilization by root exudates. *Chemosphere*, 41(5): 653-658.

- ❖ **Neilands J., 1995.** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45): 26723-26726.
- ❖ **Nielsen T., Sørensen D., Tobiasen C., Andersen J. B., Christophersen C., Givskov M. et Sørensen J., 2002.** Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar beet rhizosphere. *Applied and environmental microbiology*, 68(7): 3416-3423.
- ❖ **Nollet L. M. et Rathore H. S., 2015.** Biopesticides handbook, CRC Press.
- ❖ **Nowak-Thompson B., Chaney N., Wing J. S., Gould S. J. et Loper J. E., 1999.** Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Journal of bacteriology*, 181(7): 2166-2174.
- ❖ **Nowak-Thompson B., Gould S. J. et Loper J. E., 1997.** Identification and sequence analysis of the genes encoding a polyketide synthase required for pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Gene.*, 204(1-2): 17-24.
- ❖ **Nybroe O. et Sørensen J., 2004.** Production of cyclic lipopeptides by fluorescent *pseudomonads*. *Pseudomonas, Springer*: 147-172.
- ❖ **O'Callaghan M., 2016.** Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(13): 5729-5746.
- ❖ **Palleroni N., 1984.** Family I. *Pseudomonadaceae* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith, 1917, 555. *Bergey's manual of systematic bacteriology*: 141-213.
- ❖ **Palleroni N., Kunisawa R., Contopoulou R. et Doudoroff M., 1973.** Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 23(4): 333-339.
- ❖ **Palleroni N. J., 2008.** The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*: 1-18.
- ❖ **Palleroni N. J., 2010.** The *pseudomonas* story. *Environmental microbiology*, 12(6): 1377-1383.

- ❖ **Palleroni N. J. et Moore E. R., 2004.** Taxonomy of *pseudomonads*: experimental approaches. *Pseudomonas, Springer*: 3-44.
- ❖ **Panpatte D. G., Jhala Y. K., Shelat H. N. et Vyas R. V., 2016.** *Pseudomonas fluorescens*: A Promising Biocontrol Agent and PGPR for Sustainable Agriculture. Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 1: Research Perspectives. D. P. Singh, H. B. Singh and R. Prabha. New Delhi, *Springer India*: 257-270.
- ❖ **Park J., Oh S., Anderson A., Neiswender J., Kim J. C. et Kim Y., 2011.** Production of the antifungal compounds phenazine and pyrrolnitrin from *Pseudomonas chlororaphis* O6 is differentially regulated by glucose. *Letters in applied microbiology*, 52(5): 532-537.
- ❖ **Parray J. A. et Shameem N., 2019.** Sustainable Agriculture: Advances in Plant Metabolome and Microbiome, Academic Press.
- ❖ **Patil S., Paradeshi J. et Chaudhari B., 2016.** Suppression of charcoal rot in soybean by moderately halotolerant *Pseudomonas aeruginosa* GS33 under saline conditions. *Journal of basic microbiology*, 56(8): 889-899.
- ❖ **Paungfoo Lonhienne C., Lonhienne T. G., Yeoh Y. K., Webb R. I., Lakshmanan P., Chan C. X., Lim P. E., Ragan M. A., Schmidt S. et Hugenholtz P., 2014.** A new species of *Burkholderia* isolated from sugarcane roots promotes plant growth. *Microbial Biotechnology*, 7(2): 142-154.
- ❖ **Peix A., Ramírez-Bahena M. H. et Velázquez E., 2009.** Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6): 1132-1147.
- ❖ **Peix A., Ramírez-Bahena M. H. et Velázquez E., 2018.** The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: an update. *Infection, Genetics and Evolution*, 57: 106-116.
- ❖ **Pierson L. S. et Pierson E. A., 1996.** Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. *FEMS microbiology letters*, 136(2): 101-108.

- ❖ **Pierson L. S. et Pierson E. A., 2010.** Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(6): 1659-1670.
- ❖ **Pieterse C. M., Zamioudis C., Berendsen R. L., Weller D. M., Van Wees S. C. et Bakker P. A., 2014.** Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology*, 52.
- ❖ **Premachandra D., Hudek L. et Brau L., 2016.** Bacterial modes of action for enhancing of plant growth. *Journal of biotechnology & and biomaterials*, 6(3): 1-8.
- ❖ **Priyanka T. A., Kotasthane A. S., Kosharia A., Kushwah R., Zaidi N. W. et Singh U., 2017.** Crop specific plant growth promoting effects of ACCd enzyme and siderophore producing and cynogenic fluorescent *Pseudomonas*. *3 Biotech*, 7(1).
- ❖ **Raaijmakers J. M., De Bruijn I. et De Kock M. J., 2006.** Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7): 699-710.
- ❖ **Raju R., Kandhasamy S., Nalliappan G. K., Natarajan K. V., Gandhi K. B. et Chandrasekaran B., 2016.** Cyclic depsipeptide producing fluorescent *pseudomonads* exerts antifungal activity against fungal pathogens of maize (*Zea mays*). *African Journal of Microbiology Research*, 10(42): 1767-1774.
- ❖ **Rane M. R., Sarode P. D., Chaudhari B. L. et Chincholkar S. B., 2007.** Detection, isolation and identification of phenazine-1-carboxylic acid produced by biocontrol strains of *Pseudomonas aeruginosa*.
- ❖ **Romero M., Martin-Cuadrado A. B., Roca-Rivada A., Cabello A. M. et Otero A., 2011.** Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities. *FEMS microbiology ecology*, 75(2): 205-217.
- ❖ **Saha R., Saha N., Donofrio R. S. et Bestervelt L. L., 2013.** Microbial siderophores: a mini review. *Journal of basic microbiology*, 53(4): 303-317.
- ❖ **Sahu G. et Sindhu S., 2011.** Disease control and plant growth promotion of green gram by siderophore producing *Pseudomonas* sp. *Research Journal of Microbiology*, 6(10): 735.

- ❖ **Salman M., 2010.** Determination of antibiotic activity on plasmids from fluorescent *pseudomonads* isolates CW2, WB15 and WB52 against pre-emergence damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* in cucumber. *Biological Control*, 53(2): 161-167.
- ❖ **Schippers B., Bakker A., Bakker P. et Van Peer R., 1990.** Beneficial and deleterious effects of HCN-producing *pseudomonads* on rhizosphere interactions. *Plant and Soil*, 129(1): 75-83.
- ❖ **Shahid I., Malik K. A. et Mehnaz S., 2018.** A decade of understanding secondary metabolism in *Pseudomonas* spp. for sustainable agriculture and pharmaceutical applications. *Environmental Sustainability*, 1(1): 3-17.
- ❖ **Siddiqui I. A., Shaukat S. S., Sheikh I. H. et Khan A., 2006.** Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(6): 641-650.
- ❖ **Singh D., 2014.** Advances in plant biopesticides, *Springer*.
- ❖ **Singh J. S., Pandey V. C. et Singh D., 2011.** Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, ecosystems & environment*, 140(3-4): 339-353.
- ❖ **Skaar E. P., 2010.** The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog*, 6(8): e1000949.
- ❖ **Sneh B., Dupler M., Elad Y. et Baker R., 1984.** Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from a *Fusarium*-suppressive soil. *Phytopathology*, 74(9): 1115-1124.
- ❖ **Somers E., Vanderleyden J. et Srinivasan M., 2004.** Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical reviews in microbiology*, 30(4): 205-240.
- ❖ **Sonnleitner E. et Haas D., 2011.** Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(1): 63-79.

- ❖ **Spiers A. J., Buckling A. et Rainey P. B., 2000.** The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*, 146(10): 2345-2350.
- ❖ **Tagele S. B., Lee H. G., Kim S. W. et Lee Y. S., 2019.** Phenazine and 1-undecene producing *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strain KNU17Pc1 for growth promotion and disease suppression in Korean maize cultivars. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 29(1): 66-78.
- ❖ **Tapadar S. A. et Jha D. K., 2013.** Disease management in staple crops: a bacteriological approach. *Bacteria in Agrobiolology: Disease Management, Springer:* 111-152.
- ❖ **Thakore Y., 2006.** The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*, 2(3): 194-208.
- ❖ **Thomashow L. S. et Weller D. M., 1988.** Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of bacteriology*, 170(8): 3499-3508.
- ❖ **Thomashow L. S., Weller D. M., Bonsall R. F. et Pierson L. S., 1990.** Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(4): 908-912.
- ❖ **Troppens D. M., Moynihan J. A., Barret M., O'Gara F. et Morrissey J. P., 2013.** Genetics and Evolution of 2, 4-Diacetylphloroglucinol Synthesis in *Pseudomonas Fluorescens*. *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*, 1: 593-605.
- ❖ **Van Loon L., Bakker P. et Pieterse C., 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual review of phytopathology*, 36(1): 453-483.
- ❖ **Van Peer R., Niemann G. et Schippers B., 1991.** Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS 417 r. *Phytopathology*, 81(7): 728-734.
- ❖ **Vansuyt G., Souche G., Straczek A., Briat J. F. et Jaillard B., 2003.** Flux of protons released by wild type and ferritin over-expressor tobacco plants: effect of phosphorus and iron nutrition. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(1): 27-33.

- ❖ **Venturi V., 2006.** Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS microbiology reviews*, 30(2): 274-291.
- ❖ **Vessey J. K., 2003.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2): 571-586.
- ❖ **Visick K. L. et Fuqua C., 2005.** Decoding microbial chatter: cell-cell communication in bacteria, *Am. Soc. Microbiol.*
- ❖ **Weller D. M., Landa B., Mavrodi O., Schroeder K., De La Fuente L., Bankhead S. B., Molar R. A., Bonsall R., Mavrodi D. et Thomashow L., 2007.** Role of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant biology*, 9(01): 4-20.
- ❖ **Weller D. M., Landa B., Mavrodi O., Schroeder K., De La Fuente L., Blouin Bankhead S., Allende Molar R., Bonsall R., Mavrodi D. et Thomashow L., 2007.** Role of 2, 4-diacetylphloroglucinol producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant biology*, 9(1): 4-20.
- ❖ **Weller D. M., Thomashow L. S., Mavrodi D. V., Yang M. et Zhang J., 2016.** *Pseudomonas fluorescens*2-79 with genes for biosynthesis of pyrrolnitrin improves biocontrol activity, *Google Patents*.
- ❖ **Wicklow D. T. et Carroll G., 1981.** The fungal community. Its organization and role in the ecosystem.
- ❖ **Woese C., Stackebrandt E., Weisburg W., Paster B., Madigan M., Fowler V., Hahn C., Blanz P., Gupta R. et Neilson K., 1984.** The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Systematic and Applied Microbiology*, 5(3): 315-326.
- ❖ **Wong D. T. et Airall J. M., 1970.** The mode of action of antifungal agents: effect of pyrrolnitrin on mitochondrial electron transport. *The Journal of antibiotics*, 23(2): 55-62.
- ❖ **Yanes M. L. et Bajsa N., 2016.** Fluorescent *Pseudomonas*: a natural resource from soil to enhance crop growth and health. *Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability*, *Springer*: 323-349.

- ❖ **Yang G., Han L., Wen J. et Zhou S., 2013.** *Pseudomonas guangdongensis* sp. nov., isolated from an electroactive biofilm, and emended description of the genus *Pseudomonas* Migula 1894. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(12): 4599-4605.

- ❖ **Zarei M., Aminzadeh S., Zolgharnein H., Safahieh A., Daliri M., Noghabi K. A., Ghoroghi A. et Motallebi A., 2011.** Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native *Serratia marcescens* B4A." *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3): 1017-1029.