



République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'étude

Présenté par :

Larbi Nassima

-

Hamadi Hanine Marwa

Pour l'obtention du diplôme

Master en biologie

Spécialité: Microbiologie Appliquée

**Recherche de quelques métabolites chez des
Pseudomonas de l'eau de mer.**

Les membres de jury

Président : Dr. HAMOUM Hakim UMAB

Encadreur : Pr. DJIBAOUI Rachid UMAB

Examineur : Dr. ARABI Abed UMAB

Année universitaire 2021-2022

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A moi et ma binôme « Marwa »

*A mes chers parents, ma sœur, mes
frères et mes amis.*

A la mémoire de mon cher grand père.

*Et à toutes la famille « Boukhorsa » et
« Larbi ».*

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :
A moi et ma binôme « Nassima »
A la mémoire de mon cher père et ma
chère grand-mère
A ma mère, mes sœurs, mes amis et à
toute la famille « Mekibes » et
« Hamadi ».

TABLE DES MATIERES

- Remerciement
- Dédicace.
- Liste des figures.
- Liste des tableaux.
- Liste des abréviations.
- Résumé.
- Introduction.....1

Synthèse bibliographique :

Chapitre I : Généralité sur les *Pseudomonas*.

1. Introduction.....	2
2. Généralité sur le milieu marin.....	2
3. Groupe des <i>Pseudomonas</i>	2
4. Caractéristique général des <i>Pseudomonas</i>	2
4.1. Taxonomie et classification.....	2
4.2. Habitat.....	4
4.3. Caractéristique morphologique.....	4
4.4. Caractéristique métabolique.....	4
4.5. Caractéristique biochimique.....	5
4.6. Caractéristique génomique	6
5. Caractéristiques et rôle de quelques <i>Pseudomonas</i>	8
5.1. <i>P.aeruginosa</i>	8
5.2. <i>P.fluorescens</i>	8
5.3. <i>P.putida</i>	8
6. L'effet de salinité sur les <i>Pseudomonas</i>	9

Chapitre II : Les métabolites des *Pseudomonas* fluresencentes.

Introduction.....	10
1. Les antibiotiques :.....	10
1.1. Le 2,4 diacetylphloroglucinol (DAPG)	11
1.2. Pyolutéorine (PLT).....	11
1.3. Pyrolnitrine (PRN).....	12

1.4. Les phénazines (PLT).....	12
1.4.1. Pyocyanine.....	12
1.5. Cyanure d'hydrogène (HCN).....	13
1.6. Mupirocine.....	13
2. Les sidérophores.....	14
2.1. Pyoverdine (pseudobactine).....	14
3. Les enzymes.....	15
3.1. Enzyme protéolytique (Protéase).....	15
3.2. Enzyme amylolytique (Amylase).....	16
3.3. Enzyme lipolytique (Lipase).....	18

Partie expérimentale

Chapitre III : Matériel et méthode.

1. Objectif.....	21
2. Échantillonnage.....	21
3. Préparation des milieux.....	21
4. Isolement des <i>Pseudomonas</i>	21
5. Purification et conservation des souches de <i>Pseudomonas</i>	21
6. Identification des <i>Pseudomonas</i>	22
6.1. Etude macroscopique.....	22
6.2. Etude microscopique.....	22
6.3. Production de la pyoverdine.....	22
6.4. Test de salinité.....	22
7. Purification des souches tests.....	22
8. Test d'antagonisme <i>in vitro</i>	23
8.1. Sur milieu Mueller-Hinton.....	23
8.2. Sur milieu King B.....	23
9. Etude enzymatique.....	23
9.1. Recherche des protéases.....	23
9.2. Recherche d'amylase.....	24
9.3. Recherche des lipases.....	24
10. Identification biochimique des <i>Pseudomonas</i>	24
10.1. Test sur King A.....	24
10.2. Test du TSI (Triple Sugar Iron).....	24
10.3. Recherche de Nitrate réductase.....	25
10.4. Test VP-RM.....	26
❖ Test de Voges Proskauer (VP).....	26

❖ Test de rouge de méthyle.....	26
10.5. Recherche de gélatinase.....	27
10.6. Croissance à des différentes températures.....	27

Chapitre IV : Résultats et discussion.

1. Isolement des <i>Pseudomonas</i>	28
2. Purification des souches de <i>Pseudomonas</i>	29
3. Etude macroscopique.....	29
4. Etude microscopique.....	29
5. Résultats des tests de salinité.....	30
6. Observation microscopique des souches tests.....	31
7. Test d'antagonisme <i>in vitro</i>	32
7.1. Sur milieu Mueller-Hinton.....	32
8. Mise en évidence des activités enzymatiques :.....	35
8.1. Mise en évidence de l'activité lipolytique.....	35
8.2. Mise en évidence de l'activité amylolytique.....	36
8.3. Mise en évidence de l'activité protéolytique.....	37
9. Identification biochimique des <i>Pseudomonas</i>	38
9.2. Test du TSI (Triple Sugar Iron).....	38
9.3. Recherche de Nitrate réductase.....	38
9.4 . Recherche de gélatinase	38
9.5. Test VP-RM.....	38
❖ Test de Voges Proskauer (VP).....	38
❖ Test de rouge de méthyle.....	38
10. Mise en évidence des pigments sur milieu King A.....	38
11. Croissance à des différentes températures.....	39

- **Conclusion :**
- **Références bibliographique.**
- **Annexe.**

Liste des abréviations :

- ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- APC** : Acide phénazine-1-carboxylique.
- ARN** : Acide ribonucléique ribosomique.
- ATP** : Adenosine triphosphate.
- CaCl₂** : Chlorure de calcium.
- CO₂** : Dioxyde de carbone.
- DAGs** : Diacylglycérols.
- DAPG** : Diacetylphlorogluciol.
- GYRB** : DNA gyrase (subunit B)
- HCl** : Acide chlorhydrique.
- HCN** : Cyanure d'hydrogène.
- K₊** : Ions de Potassium.
- KOH** : Hydroxyde de potassium.
- MgCl₂** : Chlorure de magnésium.
- MnCl₂** : Chlorure de manganèse.
- MRSA** : Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*.
- N₂** : Diazote.
- NaCl** : Chlorure de sodium (sel).
- NAD / NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide.
- NaOH** : Hydroxyde de sodium.
- NH₃** : Ammoniac.
- Nm** : nanomètre.
- NO₃** : Nitrate.
- NO₂** : Nitrite

NR1 : Acide Sulfanilique.

NR₂ : Naphtylamine en milieu acétique.

P: *Pseudomonas*

Pb : Paire de base.

PCN : 1-hydroxyphénazine et la phénazine-1- carboxamide.

pH : Potentiel hydrogène.

PHB : Poly-β-hydroxybutyrate.

PLT : Pyolutéorine.

PRN : Pyrolo-nitrine.

PYO : Pyocyanine.

RM : Rouge de méthyle.

TAGs : Triacylglycérols.

TSA : Tryptone soy agar.

TSI : Three Sugar Iron.

UV : Ultraviolet.

V.P : Vogues- Proskauer.

ZnCl₂ : Chlorure de zinc.

Liste des tableaux

Tableau (01) : Taxonomie du genre <i>Pseudomonas</i>	04
Tableau (02): Les tests biochimiques des <i>Pseudomonas</i>	06
Tableau (03) : Principaux antibiotiques secrétées par les <i>Pseudomonas</i> fluorescents.....	10
Tableau (04): Quelques micro-organismes producteurs d' α -amylase.....	18
Tableau (05) : Quelque exemple sur l'origine de lipase.....	19
Tableau (06) : Résultats de l'effet de salinité sur la croissance des <i>Pseudomonas</i>	30
Tableau (07) : Distances de zones d'inhibition (en cm) entre les isolats de <i>Pseudomonas</i> et les souches test.....	33
Tableau (08) : Résultats des tests biochimiques	38
Tableau(09) : Résultats du test de pigmentation sur milieu King A.....	38
Tableau (10) : Résultats de la croissance à 4°C et 42°C.....	39

Liste des figures :

Figure 01 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vue au microscope électronique.....	04
Figure 02 : Représentation circulaire du génome de <i>P.aeruginosa</i>	07
Figure 03 : Voie de la synthèse biochimique de la DAPG	11
Figure 04 : Une molécule de pyocyanine.....	12
Figure 05 : Composition de la mupirocine en acide pseudomonique A, B, C et le Thiomarinol	13
Figure 06 : structure de la pyoverdine.....	14
Figure 07 : Les liaisons peptidiques (entre un azote en bleu et un carbone en vert) sont hydrolysées par les protéases.....	15
Figure 08 : Mécanisme d'action des protéases.....	16
Figure 09 : Structure chimique des chaînes d'amylpectine et d'amyllose et sites d'hydrolyse par les différents types d'amylases	17
Figure 10 : Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par lipases...19	
Figure 11 : Réaction enzymatique d'un lipase catalysant l'hydrolyse complète.....19	
Figure 12 : Présentation de la structure secondaire du repliement α/β des hydrolases.....20	
Figure 13 : Illustration des colonies obtenues sur milieu King B après 48 d'incubation à 30°C.....28	
Figure 14 : Illustration des colonies à fluorescence faible sur milieu King B après 48h d'incubation à 30°C.....28	
Figure 15 : Aspect d'un isolat fluorescent de <i>Pseudomonas</i> après purification après coloration.....29	
Figure 16 : Observation microscopique des <i>Pseudomonas</i> (Isolat N°6 et 9) après coloration de gram (x1000).....30	
Figure 17 : Observation microscopique des souches tests après coloration de Gram x1000.....31	
Figure 18 : <i>Candida albicans</i> à l'état frais.....32	
Figure 19 : Activité antagoniste de <i>Pseudomonas</i> vis-à-vis <i>P.aeruginosa</i> , <i>E.coli</i> , <i>S.aueus</i> , <i>C.albicans</i>32	
Figure 20 : Activité antagoniste de <i>Pseudomonas</i> (Souche 7.10) vis-à-vis <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C.albicans</i>33	

Figure 21 : Activité antagoniste de <i>Pseudomonas</i> (Souche 1,3) vis-à-vis <i>P.aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>	33
Figure 22 : Histogramme des résultats du test d'antagonisme.....	34
Figure 23 : Activité enzymatique lipolytique de <i>Pseudomonas</i> Souche 9.....	36
Figure 24 : Activité enzymatique amylolytique de <i>Pseudomonas</i> Souche 3.....	36
Figure 25 : Activité enzymatique protéolytique de <i>Pseudomonas</i> Souche 10.....	37
Figure 26 : Mise en évidence des pigments sur milieu King A.....	38

Résumé :

Les *Pseudomonas* sont des microorganismes amplement répandus dans divers environnements, ce sont des bactéries ubiquitaires. Ils produisent de nombreux métabolites secondaires à effets antimicrobiens contre différents pathogènes, responsables de différentes infections. Ils produisent aussi des enzymes utilisables dans plusieurs industries telles que l'industrie laitière, industries des sucres, textile, papier, produit pharmaceutiques, production des huiles et corps gras, et les produits alimentaires.

Dans le présent travail nous avons essayé de rechercher quelques métabolites et enzymes produit par les *Pseudomonas* de l'eau de mer. Huit isolats ont été rapprochés à *Pseudomonas fluorescens* et utilisé dans un test d'antagonisme vis-à-vis *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa* et *C.albicans* sur milieu Mueller-Hinton et King B. Ces isolats ont été cultivés dans des concentrations d'NaCl de 0,5 % , 2,5%, 7% et 9% et utilisé en suite dans la mise en évidence de lipases, d'amylase et de protéase.

Les résultats de cette étude montrent que les 8 *Pseudomonas* ont inhibé faiblement les souches tests. Les zones d'inhibition varient de 0 à 2 cm de diamètre parmi les quels un isolat (3) qui a montré un effet sur toutes les souches cibles avec une inhibition relativement remarquable de 2cm de diamètre vis-à-vis *Candida albicans*.

les résultats de la tolérance au sel indiquent une forte croissance des isolats dans les concentration 0,5 % et 2,5% de NaCl et une baisse progressive de la croissance à 5% jusqu'à devenir difficilement constatable à 7% et 9%. L'étude de l'activité enzymatique a révélé une production de lipase par l'isolat (9), une production d'amylase par l'isolat (3) et une production de protéase par l'isolat (10).

Mots clés : *Pseudomonas* – Métabolites secondaires – Antagonisme –Effet antimicrobien – activité enzymatique.

Abstract:

Pseudomonas are microorganisms widely distributed in various environments, they are ubiquitous bacteria. They produce many secondary metabolites with antimicrobial effects against different pathogens, which are responsible for different infections. They also produce enzymes that can be used in several industries such as dairy, sugar, textile, paper, pharmaceutical, food products, oil and fat production. In this work we have tried to look for some metabolites and enzymes produced by *Pseudomonas* in seawater. Eight isolates were belonged to *Pseudomonas fluorescens* and used in an antagonism test against *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa* and *C.albicans* on Mueller-Hinton and King B medium. These isolates were cultured in NaCl concentrations of 0.5%, 2.5%, 7% and 9% and subsequently used in showing its production of lipases, amylase and proteus .

The results of this study show that the 8 *Pseudomonas* weakly inhibited the test strains. The zones of inhibition vary from 0 to 2 cm in diameter, including one isolate (3) which showed an effect on all the target strains with a relatively remarkable inhibition of 2 cm in diameter against *Candida albicans*.

Salt tolerance results indicate a strong growth of isolates in 0.5% and 2.5% NaCl concentrations and a gradual decline in growth to 5% until it becomes difficult to observe at 7% and 9%. The study of enzyme activity revealed lipase production by isolate (9), amylase production by isolate (3) and protease production by isolate (10).

Keyword: *Pseudomonas* – Secondary metabolites – Antagonism – Antimicrobial effect – enzymatic activity.

المخلص

تعتبر البكتريا *Pseudomonas* من الأحياء الدقيقة الموزعة في بيئات مختلفة وعلى نطاق واسع . تنتج العديد من مواد الاستقلاب الثانوي ذات التأثير المضاد لمسببات العدوى و الأمراض المختلفة. كما تنتج الإنزيمات التي يمكن استخدامها في العديد من الصناعات مثل منتجات الألبان والسكر والمنسوجات والورق والأدوية و النفط وإنتاج الدهون والمنتجات الغذائية. في هذا العمل حاولنا البحث عن بعض مواد الاستقلاب الثانوي والإنزيمات التي تنتجها *Pseudomonas* المعزولة من مياه البحر. تم تصنيف ثمانية عزلات منها إلى النوع *Pseudomonas fluorescens* والتي استخدمت في اختبار التضاد مع *E.coli* و *S.aureus* و *P.aeruginosa* و *C.albicans* على وسط Mueller-Hinton و B King . تمت زراعة هذه العزلات في تراكيز كلوريد الصوديوم بنسبة 0.5 % و 2.5 % و 7 % و 9 % واستخدمت في وقت لاحق في اضرار انتاج هذه العزلات لانزيمات الليباز والأميلاز والبروتياز.

نظهر نتائج هذه الدراسة أن العزلات الثمانية ل *Pseudomonas* تثبط بشكل ضعيف سلالات الاختبار حيث يتراوح قطر مناطق التثبيط من 0 إلى 2 سم ، بما في ذلك عزلة واحدة (3) والتي أظهرت تأثيراً على جميع السلالات المستهدفة مع تثبيط ملحوظ نسبياً بقطر 2 سم ضد *C.albicans*.

. تشير نتائج تحمل الملوحة إلى نمو قوي للعزلات في تراكيز كلوريد الصوديوم بنسبة 0.5% و 2.5% وانخفاض تدريجي في النمو إلى 5% حتى يصبح من الصعب ملاحظته عند 7% و 9%. كشفت دراسة الفعالية الإنزيمية عن إنتاج الليباز بواسطة العزلة (9) ، وإنتاج الأميلاز بالعزلة (3) والبروتياز بالعزلة (10).

الكلمة الرئيسية: *Pseudomonas* – مواد الاستقلاب الثانوي – التضاد – التأثير المضاد للميكروبات – النشاط الإنزيمي.

Introduction :

Introduction

Les infections nosocomiales sont causées par des germes opportunistes divers. Les plus connues sont *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* et la levure *Candida albicans*. Ces germes fréquemment trouvés lors de ces infections sont souvent résistants aux antibiotiques et persistants sur les surfaces (Martineau, 2009 ; Prescott, 1995; Dancer, 1999). Cette flore ainsi formée évolue en acquérant des mutations et du matériel génétique à partir des organismes de leur environnement ce qui les rend difficile à éradiquer.

Les choix de traitement de ces infections s'élargissent aux antibactériens naturels et à des composés obtenus à partir d'autres microorganismes.

L'environnement marin est exceptionnellement complexe, il englobe une grande diversité biologique inexplorée. Ceci a poussé les chercheurs à s'intéresser aux microorganismes marins. Au long des 5 dernières décennies, plus de 16.000 produits d'origine marine ont été extraits à partir de bactéries marines, ces métabolites possèdent une activité biologique antimicrobienne ainsi que d'autres propriétés pharmacologiques efficaces. (Bakkl *et al.*, 2012).

Le genre *Pseudomonas* comprend des bactéries à Gram-négatif, aérobie en forme de bâtonnets, avec plus de 60 espèces présentant des modes de vie variés dans un large éventail d'environnements, y compris le sol, l'eau, les surfaces des plantes et les animaux et beaucoup d'autres environnements. Les membres du genre *Pseudomonas* vivent dans une grande variété d'environnements, ce qui leur donne une capacité d'utiliser une variété remarquable de composés organiques comme sources d'énergie et la production d'une gamme remarquable de métabolites secondaires (Gross et Loeper, 2009). Ses métabolites sont d'un grand intérêt en raison de leur importance dans l'industrie, dans les applications biotechnologiques et en médecine (Silby *et al.*, 2009).

Les métabolites les plus caractéristiques des *Pseudomonas* sont les pyoverdines, les phénazines, la pyocyanine, la phloroglucinols, la pyrrolnitrine, les lipopeptides, et le cyanure d'hydrogène. Ces derniers sont actifs contre un large groupe de bactéries Gram positif et Gram négatif en plus des champignons et des levures. (Vacheron *et al.*, 2016)

Dans ce travail Nous avons fixé comme objectif, l'isolement de bactéries marines à partir du sable de l'eau de mer de la côte de la wilaya de Mostaganem (Sidi Mejdoub). ensuite vérifier l'halotolérance et ces bactéries avant de les utiliser dans l'inhibition de 3 bactéries (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *staphylococcus*) et 1 levure (*Candida albicans*) en fin tester leur capacité de synthèse des lipase, protéases et amylase .

Le manuscrit est structuré en deux parties, la première concerne la recherche bibliographique qui présente en premier lieu des généralités sur les *Pseudomonas* et en second lieu la production des métabolites secondaire et les enzymes.

La deuxième partie concerne le côté pratique dans lequel le matériel et les méthodes suivis dans ce travail sont expliqués, puis ; les résultats sont présentés, discutés, pour tirer à la fin une conclusion.

Chapitre I : Généralité sur les Pseudomonas

1. Introduction :

Le milieu marin est le plus riche en bactérie, caractérisé par son taux de salinité et ses divers conditions de vie aux quelles les bactéries aquatiques peuvent survivre et croître. Parmi ces bactéries on trouve le genre des *Pseudomonas* qui est considéré comme le groupe le plus trouvé dans l'environnement grâce à sa capacité de colonisation de tout type d'habitat, il est aussi le plus étudié pour ses application dans le domaine biotechnologique et pour son pouvoir de polyvalence (production des métabolites à partir de molécule organiques simples). (Martin, C.,2007).

2. Généralité sur le milieu marin :

L'environnement marin englobe une vaste flore complexe qui contient des millions de minuscules êtres vivants qu'on ne peut pas observé à l'œil nu, cette diversité contribue à la formation de biofilms. Ce monde marin est très riches au point ou une goutte d'eau peut contenir des milliers des microorganismes bénéfique ou (non bénéfique) pour la nature ou l'homme et cela a fait l'objet de nombreuses études tant en milieu naturel qu'en laboratoire avec notamment des études à partir de souches pures. (Martin, C.,2007).

La richesse microbiologiques marine et du à la variété des familles et genres microbiens qui participent aussi dans plein de fonctions grâce aux métabolites primaire et secondaires qui contribuent dans divers domaines pharmaceutiques et médicinales. tel que dans la production des substances antimicrobiens produites par divers bactéries dont les *Pseudomonas* qui forment un grand groupe de colonisateurs d'eau de mer.

3. Le groupe des *Pseudomonas* :

Ce genre à été découvert par le botaniste Allemand Emil Walter Migula en 1894 et a été considéré comme un groupe important qui appartient à la sous-classe Gama(γ) des protéobactéries. Certains *Pseudomonas* possèdent un pouvoir de production d'enzymes et des métabolites antagonistes qui inhibent la croissance des microorganismes en dégradant leurs parois cellulaires ou par d'autres modes d'action.

4. Caractéristique généraux des *Pseudomonas* :

4.1. Taxonomie et classification :

Le genre *Pseudomonas* est un taxon exceptionnellement hétérogène composé de beaucoup d'espèces et selon la 8ème édition de Bergey Manual de la bactériologie (1974),

Chapitre I : Généralité sur les Pseudomonas

82 espèces sont décrites dans trois sections et actuellement 213 espèces de *Pseudomonas* sont citées dans la liste des noms des procaryotes selon la nomenclature de **Parte (2014)**, mais seulement 147 espèces sont acceptées dans la taxonomie réelle. Le *Pseudomonas* est le genre le plus important dans l'ordre des Pseudomonadales il appartient au phylum des Proteobacteria, classe des Gammaproteobacteria, et à la famille des *Pseudomonaceae*. (Selon la deuxième édition du "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology")

Parmi les nombreuses espèces de *Pseudomonas* analysé, les spécialistes ont subdivisés ces espèces en 7 groupes d'homologie d'ARNr :

- Le groupe des *P. aeruginosa*.
- Le groupe des *P. syringae*.
- Le groupe des *P. chlororaphis*
- Le groupe des *P. fluorescens*
- Le groupe des *P. putida*.
- Le groupe des *P. stutzeri*.
- Le groupe des *P. pertucinogena*.

Les espèces les plus connues du genre *Pseudomonas* sont :

P.aeruginosa, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. protegens*, *P. syringae*, *P. canabina*, *P. entomophila*, *P. mendocina* et *P. stutzeri*, *P.simiae*..

Tableau (01) : Taxonomie du genre *Pseudomonas* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.Vol 2,2005)

Règne	Bacteria
Embranchement	Prokaryota
Division	Protéobacteria
Classe :	Gamma-proteobacteria
Ordre :	Pseudomonales
Sous-Ordre :	Pseudomonadinaea
Famille :	Pseudomonadaceae
Genre :	<i>Pseudomonas</i>

4.2.Habitat :

Les *Pseudomonas* occupent généralement plusieurs environnement naturels à la fois « ubiquitaires », elles peuvent être des envahisseurs de sol, d'eau, de l'air à travers la poussières et aussi des végétaux et de tout endroit humide ,et cela grâce à leur grande capacité d'adaptation physiologique et génétique et à leur variété nutritionnelle.

Les souches appartenant au genre *Pseudomonas* représentent plus de 60% de la microflore bactérienne totale du sol, elles sont abondantes dans la rhizosphère, elles sont aussi très fréquentes dans les milieux hospitaliers car elles causent des maladies nosocomiales. . (L.M Prescott,J.P,Harley,D.A Klein.Microbiologie.4^{ème} édition,2013).

4.3.Caractéristiques morphologiques :

Ce sont des bacilles droits et fins aux extrémités arrondies, à Gram négatif, asporulés, d'une taille de 0,5 à 1,0 µm de diamètre sur 1,5 à 5,0 µm de longueur, elles sont mobile grâce à un ou plusieurs flagelles polaire (monotriche ou multitriche) (Garrity, 2005). elles se cultivent facilement dans des milieux contenant des simples sources de carbone à une température de 30° C. (Avril *et al.*, 2000).

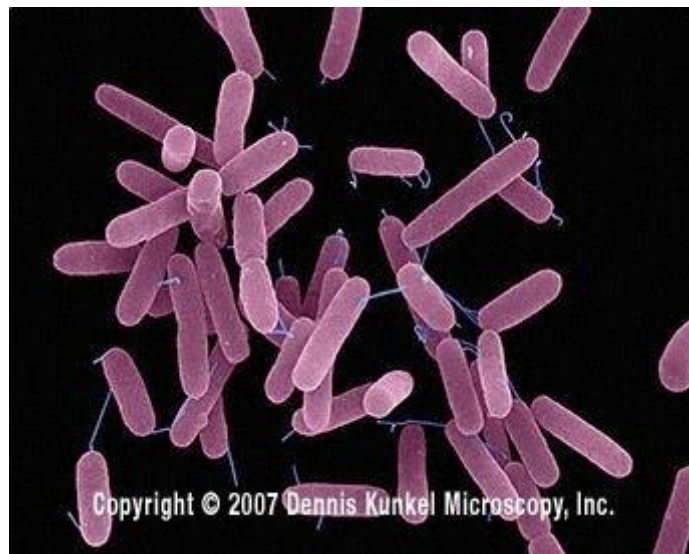


Figure 01 : *Pseudomonas aeruginosa* vue au microscope électronique (Kunkel,2007)

4.4.Caractéristiques métaboliques :

Les *Pseudomonas* sont des Chimiohétérotrophes pratiquent habituellement la respiration aérobie. Ils utilisent parfois le nitrate comme accepteur d'électrons dans une respiration anaérobie. Toutes les *Pseudomonas* ont un cycle des acides tricarboxyliques fonctionnel et

peuvent complètement oxyder leurs substrats en CO₂. La pluparts des hexoses sont dégradés par la voie d'Entner-Doudroff plutôt que celle d'Embden-Meyerhof. Ils participent à la dégradation microbienne des matériaux organiques en substances inorganiques dans la nature et le traitement des eaux usées. Ils sont aussi responsable sur plusieurs maladies chez l'homme souvent les gens hospitalisés (*P.aeruginosa*) ainsi que les végétaux (*P.syringae*) et avarient souvent la nourriture réfrigérée ou congelé (*P.fluorescens*) . (L.M Prescott,J.P,Harley,D.A Klein.Microbiologie .4^{ème} édition,2013)

Comme est mentionné auparavant il existe 7 groupes subdivisés et les trois groupes les mieux caractérisés sont subdivisés selon des propriétés comme la présence de poly Béta hydroxybutyrate (PHB), la production d'un pigment fluorescent, la pathogénicité, la présence d'arginine dihydrolase et l'utilisation du glucose. Ex : Le sous-groupe fluorescent n'accumule pas de PHB, mais produit un pigment vert jaune diffusible, soluble dans l'eau fluorescent sous radiation UV . Ce genre est aussi généralement caractérisé par sa résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques.

4.5. Caractéristiques Biochimiques :

Les *Pseudomonas* se développent dans un environnement à pH neutre. Leurs températures optimales de croissance est à 30°C, néanmoins elles peuvent se développer à des températures extrêmement basses (jusqu'à 4°C). Elles se multiplient généralement dans des milieux humides (Field, 2008).

Les souches de ce groupe sont majoritairement des aérobies strictes "Chimio-organotrophes", "Chimio-hétérotrophe" qui nécessitent l'oxygène et le carbone organique au même temps pour leurs croissance. Certaines souches tolèrent la salinité mais à un faible taux.

Les *Pseudomonas* à type aérobie strictes produisent des enzymes « Catalase » et « Oxydase » afin d'éliminer les déchets cytotoxiques produits par l'oxygène. (Kapal et al.,2016),Quelques *Pseudomonas* tels que *P.aeruginosa* et *P.flurescens* ont la capacité d'utiliser le citrate comme source de carbone ainsi que la production des Sidérophores qui ont pour but de capter le fer dans leurs milieux. Leur métabolisme est de type oxydatif, elles sont capables de dégrader les composés complexes comme les polysaccharides, l'amidon ou la cellulose. Leur membrane est résistante (EX : contre les UV), et leur perméabilité membranaire est basse, ce qui renforce leur résistance aux stress externes.(Bisen et Verma, 1998).

Les caractères biochimiques du genre *Pseudomonas* sont représentés dans le Tableau (02) ci-dessous :

Tableau (02) : Les tests biochimiques des *Pseudomonas* .

Tests biochimiques	Résultat
Hydrolase de l'amidon	<i>Négatif (-)</i>
Liquéfaction de la gélatine	<i>Positif (+)</i>
Pigment fluorescent	<i>Positif (+)</i>
Catalase	<i>Positif (+)</i>
Oxydase	<i>Positif (+)</i>
Citrate	<i>Positif (+)</i>
Indole	<i>Négatif (-)</i>
Rouge de Méthyle	<i>Négatif (-)</i>
Vogues-Proskauer	<i>Négatif (-)</i>
Production des Sidérophores	<i>Positif (+)</i>
Production de Cyanure d'hydrogène	<i>Positif (+)</i>
Production d'Indole Acétique Acide	<i>Positif (+)</i>
Nitrate réductase	<i>Positif (+)</i>
Fermentation du Glucose	<i>Négatif (-)</i>
Fermentation du Lactose	<i>Négatif (-)</i>

4.6. Caractéristiques génomiques :

Le genre des *Pseudomonas* est formé de plus de 200 espèces qui vivent dans des diverses niches écologique et cela participe dans la diversité génomique des *Pseudomonas*. Ils sont généralement représentés par un ADN compacté dans un seul chromosome haploïde circulaire comme ils peuvent avoir un ADN extra-chromosomique sous une forme de plasmide ou transposon.

Les espèces de ce genre ont une grande taille de génome comparativement à *E.coli* et aux espèces apparentées. Le génome de la souche *Pseudomonas fluorescens* Pf5, classé actuellement *Pseudomonas protegens*, est considéré comme le plus grand génome mesurant 7074893 pb avant le séquençage de la souche *Pseudomonas bauzanensis* W13Z2 qui contient un génome de 8,6 Mb avec un rapport en GC de 61.8 % (Wang *et al.*, 2012).

L'ADNr 16S est utilisé comme un marqueur universel pour tracer le statut phylogénétique des espèces dans le genre de *Pseudomonas* qui permet aussi la description des espèces ainsi comme un outil de comparaison entre les bactéries très divergentes (Santos et Ochman, 2004).

Les gènes *gyrB* et *rpoD* ont été proposés pour la différenciation entre les espèces de ce genre par Yamamoto *et al.*(2000), ils ont été aussi exploités au début dans la caractérisation phylogénétique de *Pseudomonas putida* avant d'être utilisés dans l'identification de 31 espèces du genre *Pseudomonas*.

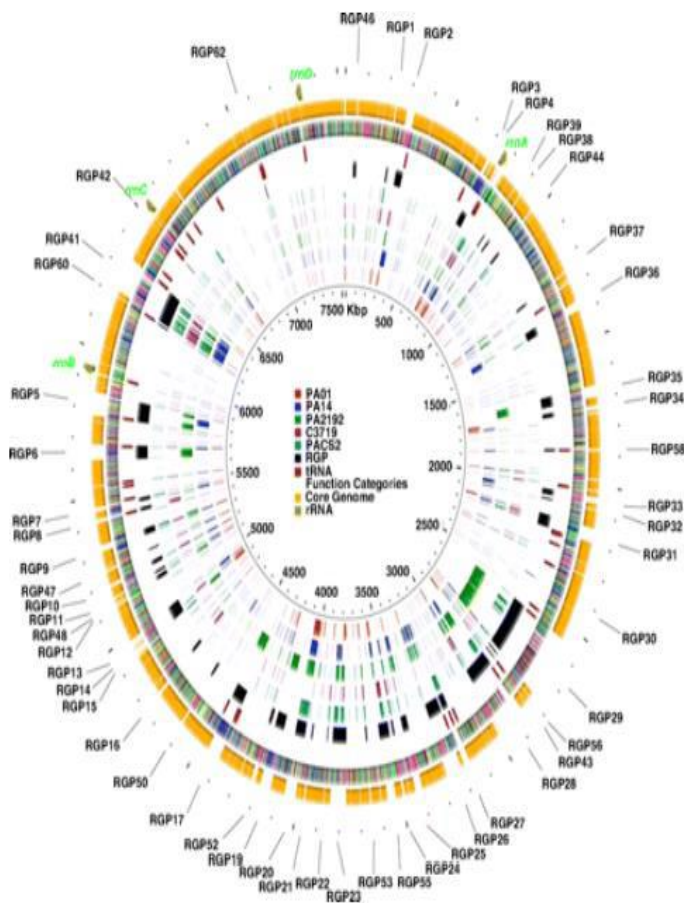


Figure 02 : Représentation circulaire du génome de *P.aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000)

5. Caractéristiques et rôles de quelques différentes *Pseudomonas* :

5.1/ *P. aeruginosa* :

- Trouvée dans les eaux douces et marines, le sol, les végétaux, les solutions antiseptiques et sur des surfaces inorganiques.
- Capacité de respirer en aérobiose et en anaérobiose.
- Bactérie opportuniste.
- Bactérie mobile.
- Responsable sur les infections nosocomiales.
- Possède un effet antimicrobien.

5.2/*P.fluorescens* :

- Trouvée aussi dans les eaux de mer et les océans.
- Bactérie commensale.
- Exerce une activité antagoniste efficace.
- Possède plusieurs pathovars (I,II,III,V,IV)
- Utilisé dans le bio-contrôle de la croissance des plantes.
- Utilisé aussi dans la lutte contre quelques maladies à travers la Pyoverdine ou la Polyketides 2.4, pyoluteorin et la rhizoxin; les dérivés chlorés de tryptophane, pyrrolnitrine et le cyanure d'hydrogène formé par oxydation de glycine (Howell et Stipanovic,1980; Nowak-Thompson *et al.*,1994; Weller, 2007).

5.3/ *P.putida* :

- Se trouve dans des différentes niches écologiques (sol,mer..) et surtout dans les milieux contaminés par les hydrocarbures .
- Utilisé dans le recyclage des déchets.
- Utilisé dans la production des pesticides.
- La souche *Pseudomonas putida* KT2440 a été exploitée pour le développement des applications commerciales et la conception des nouvelles voies cataboliques, production des intermédiaires de biosynthèses et la production des biopesticides (Galan *et al.*, 2000; Espinosa-Urgel *et al.*, 2002).

7) L'effet de la salinité sur les *Pseudomonas* :

La salinisation est le processus d'accumulation des sels minéraux solubles dans les milieux, et sa concentration diffère d'un type à un autre (faible, modérée et élevée). L'accumulation du sel dans l'environnement terrestre peut être le résultat d'une salinisation primaire naturelle ou à une salinisation secondaire anthropique (**Ghassemi *et al.*, 1995**).

- **Salinisation primaire** : Peut être due à l'altération de certaines roches sédimentaires, volcaniques et hydrothermales (**Loyer, 1991**), Ou par l'intrusion d'eaux marines dans les zones côtières qui constitue une source d'apport importante de sels qui seront transportés par des eaux souterraines. Ils sont accumulés à la surface des zones basses où le taux d'évaporation est élevé (**Pitmani et Lauchli, 2004**).
- **Salinisation secondaire** : est induite par les activités humaines comme la création de barrages, l'épandage d'effluents agricoles ou urbains et les implantations de serre détruisant le biote du sol et réduisant sa valeur nutritive (**Abolfazl *et al.*, 2009**).

L'effet des sels sur les bactéries varie selon leur pouvoir d'adaptation et de tolérance aux sels. Et si les bactéries n'arrivent pas à s'adapter à la force ionique élevée des sels, ils ne peuvent survivre à cause de l'incapacité à adsorber et absorber les nutriments du sol, de répliquer leur ADN et de bio-synthétiser les macromolécules (**Le Rudulier *et al.*, 2002**).

L'osmo-adaptation à des teneurs élevés en sels du milieu externe de la cellule bactérienne se fait par le maintien d'une osmolarité interne supérieure à celle de l'environnement extracellulaire (**Pocard *et al.*, 1994**). La stratégie d'osmo-adaptation chez les *Pseudomonas* passe par une réponse primaire via une accumulation des ions K^+ et de glutamate (**Sleator et Hill, 2001 ; Le Rudulier *et al.*, 2002**) puis par une réponse secondaire à travers des molécules organiques, non chargées, de faible poids moléculaire si le choc persiste ou augmente (**Bartlett et Roberts, 2004**).

Chapitre I I :
Les métabolites des
Pseudomonas fluorescents

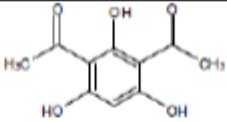
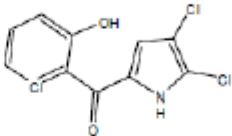
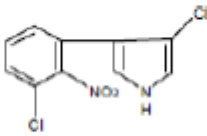
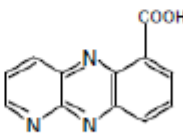
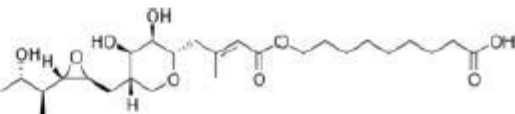
Introduction :

Les *Pseudomonas* désignent un groupe de bactéries exceptionnellement plurivalentes, c'est le groupe le plus étudié pour ses diverses applications biotechnologiques. Les *Pseudomonas* spp fluorescentes produisent une gamme importante de métabolites secondaires, en plus des enzymes dégradant les parois cellulaires. Les plus caractérisées de ces métabolites secondaires sont les: phénazines, pyolutéorine, pyrrolnitrine, et le cyanure d'hydrogène. Ces métabolites secondaires sont actifs vis à vis une large gamme de bactéries et de champignons. (Dubuis *et al.*, 2007).

1. Les antibiotiques

Plusieurs antibiotiques ont été identifiés chez le genre *Pseudomonas*, tels que le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), la phénazine, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine. (Keel *et al.*, 1992 ; Raaijmakers *et al.*, 2002 ; Magnin-Robert, 2007).

Tableau 03 : Principaux antibiotiques sécrétés par les *Pseudomonas* fluorescentes (modifié de Dwivedi *et al.*, 2003).

Nom	Structure moléculaire
2,4-Diacétylphloroglucinol	
Pyolutéorine	
Pyrrolnitrine	
Phénazines	
Mupirocine	

1.1. Le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG)

Le 2,4-diacétylphloroglucinol ou Phl est un phénol naturel présent dans plusieurs Souches spécifiques de *Pseudomonas fluorescens*, ce composé est responsable des propriétés antiphytopathogènes il peut causer la rupture du cytosquelette d'actine des *Aphanomyces*, l'inhibition des activités mitochondrial chez *Saccharomyces cerevisiae* et peut provoquer la perte de la mobilité chez les zoospores et les amibes ainsi que leur lyse (Islam et Fukushi, 2010). Il a été démontré que l'opéron *phlABCD* est à l'origine de la biosynthèse du 2,4 DAPG, en plus des gènes *phlE* qui codent pour la perméase, *phlF* qui est le répresseur de la transcription, *phlG*, *phlH*, et *phlI*. (Achkar et al.,2005).

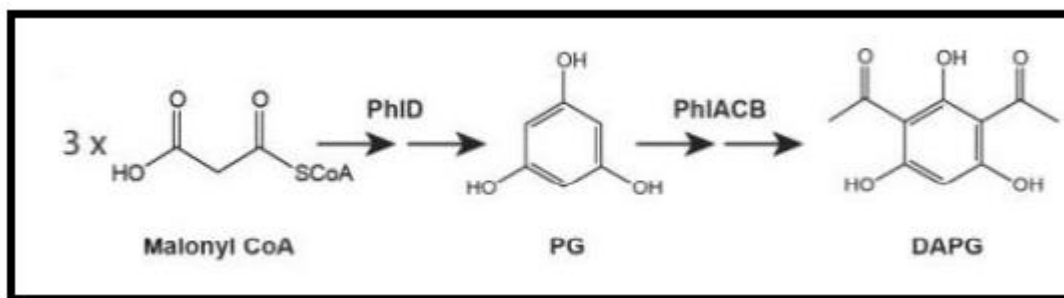


Figure 03: Voie de la synthèse biochimique de la DAPG proposée par (Troppens et al., 2013)

1.2. Pyolutéorine (PLT)

La Pyolutéorine, un autre antibiotique produit par différents *Pseudomonas*. Les souches produisant la PLT sont à l'origine de la suppression de nombreuses maladies telluriques (Howell et Stipanovic 1980; Défago et al., 1990; Maurhofer et al., 1994). Cette molécule, isolée pour la première fois chez *P. aeruginosa*, est composée d'un anneau résocrinol synthétisé par la voie de polycétide, relié à une partie pyrrole bichlorée (Nowak-Thompson et al., 1997,1999), possédant un pouvoir fongitoxique efficace contre les oomycètes, notamment *Pythium ultimum* (Maurhofer et al., 1992).

Le rôle de la pyolutéorine ne se réduit pas qu'à une action antibiotique, la molécule sert aussi de signalisation inter et intra espèce dans la rhizosphère en plus d'être un auto-inducteur de sa propre biosynthèse. (Brodhagen et al., 2005).

1.3 Pyrolnitrine (PRN)

La pyrolnitrine (PRN) (3-chloro-4-(2'-nitro-3'-chlorophenyl) un composé pyrrole, est produite par les *Pseudomonas* spp. fluorescents comme *P. fluorescens* (Kirner et al., 1998) et *P. chlororaphis* (Elander et al., 1968). La pyrolnitrine a trouvé son application comme composé à usage clinique pour le traitement des mycoses cutanées plutôt que fongicide agricole (Hammer et al. 1997, Gardener et Fravel, 2002). La production de ce composé par *P. fluorescens* est impliquée dans le contrôle de certains agents pathogènes racinaires comme *R. solani*, *Verticillium dahliae*, *G. graminis* et *Fusarium oxysporum* (Howell et Stipanovic,1979 ; Homma et al., 1989).

Les quatre gènes intervenant dans la synthèse de la PRN sont *prnABCD*. (**Hammer et al., 1997**). Le précurseur de la biosynthèse de la PRN est le tryptophane, et plus exactement le L-tryptophane qui est chloré, décarboxylé, chloré une seconde fois puis oxydé respectivement par les enzymes PrnA PrnB PrnC et PrnD (**Kirner et al., 1998**).

1.4 Les phénazines

Plusieurs espèces de *Pseudomonas* ont la capacité de produire des phénazines. Ces métabolites ont de différentes fonctions biologiques notamment dans la virulence de la bactérie (**Mahajan-Miklos et al., 1999; Mazzola et al., 1992; Wang et al., 2011**). Plusieurs phénazines tel que : la pyocyanine (1-hydroxy-5-méthyl-phénazine), l'acide phénazine-1-carboxylique (APC), le 1-hydroxyphénazine et la phénazine-1-carboxamide (PCN) sont produites par *P.aeruginosa* (**Budzikiewicz, 1993**).

Actuellement, plus de 50 phénazines différentes ont été identifiées, ayant toutes le même noyau hétérocyclique. Certaines espèces de *Pseudomonas* peuvent produire une large gamme de phénazines différentes, certaines jusqu'à 10 variétés différentes, à l'exception de *P. fluorescens* qui synthétise une seule sorte de phénazines sous la forme de Phénazine-1-Carboxylique Acide (PCA). (**Chin-A-Woeng et al., 2003**).

La PCA a été décrite comme étant un biopesticide très efficace, elle a été isolée et purifiée en **1990 par Thomashow et al.**, à partir des racines appartenant à la rhizosphère d'une plante colonisée par *P. fluorescens* 2-79, ce qui illustre la capacité de la souche à sécréter cet antibiotique. (**Thomashow et al., 1990**). La PCA a un effet bactériostatique sur les souches de *S. aureus* ainsi que la faculté d'inhiber la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* et de *Bacillus anthracis*. En plus d'agir sur certaines bactéries pathogènes, la PCA exerce également une action antifongique contre les espèces *Cercospora musae*, *Diplodia zaeae*, *Claviceps purpurea* et *Pythium debraryanum* et *Stemphylium sarcinaeforme* a des concentrations variables. (**Haynes et al., 1956**).

1.4.1 Pyocyanine

Le principal pigment phénazinique produit par *Pseudomonas aeruginosa* est la pyocyanine. Ce métabolite secondaire est retrouvé en large quantité : jusqu'à 27,3 µg/ml (~ 130 µM) dans les mucus de patients atteints de mucoviscidose présentant une infection chronique à P.a (Wilson et al., 1988). Chimiquement, la PYO est la N-méthyl-1-hydroxyphénazine, elle est peu soluble dans l'eau, mais soluble dans le chloroforme et dans les solvants organiques (**Méthanol, Ethanol...**). En solution aqueuse, la PYO présente la propriété de changer de couleur en fonction du pH et de son état d'oxydation: la PYO oxydée est rouge en milieu acide (pH < 4,9) et bleue en milieu neutre et alcalin.

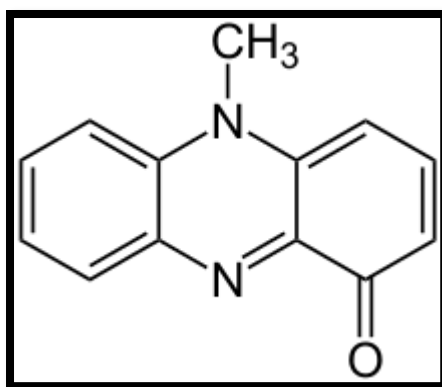


Figure 04 : Une molécule de pyocyanine

1.5 Cyanure d'hydrogène (HCN)

L'acide cyanhydrique (HCN) qui est produit par plusieurs *Pseudomonas* sp est un métabolite secondaire responsable de l'activité biologique contre divers champignons (**Haas et Keel, 2003**). Ce composé volatil est un facteur de virulence qui peut s'avérer toxique. Selon Voisard *et al.* (1989), la production d'acide cyanhydrique (HCN) par la souche *Pseudomonas fluorescens* CHA5 est nécessaire à la protection de la plante vis-à-vis de l'agent de pourritures noir du tabac. Ce mécanisme est de moindre importance pour la souche CHA77 (**Haas et al., 1991**). L'HCN produit dans la rhizosphère activerait des réactions de défense de la plante ce qui correspond à un mécanisme direct de protection avec la souche *Pseudomonas fluorescens* W163 qui révèle une agression notable de la maladie (**Haas et Keel., 2003**).

1.6 Mupirocine

Plus connu comme l'acide pseudomonique, est un antibiotique polycétide naturellement présent chez les *Pseudomonas* spp. Fluorescents. La mupirocine produite par *P. fluorescens* NCIMB 10586, est d'une activité élevée contre *Staphylococcus aureus* et d'autres bactéries à Gram positif (**El-sayed et al., 2001**). C'est un antibiotique largement utilisé dans le traitement des maladies tropicales (**Carcanague, 1997**). La mupirocine est un mélange de quatre acides pseudomoniques, la structure de base de la mupirocine comprend un acide monique (un heptakétide) contenant un cycle pyrannique attaché à l'acide 9-hydroxynonanoïque par une liaison ester (**Chain et Mellows, 1977**).

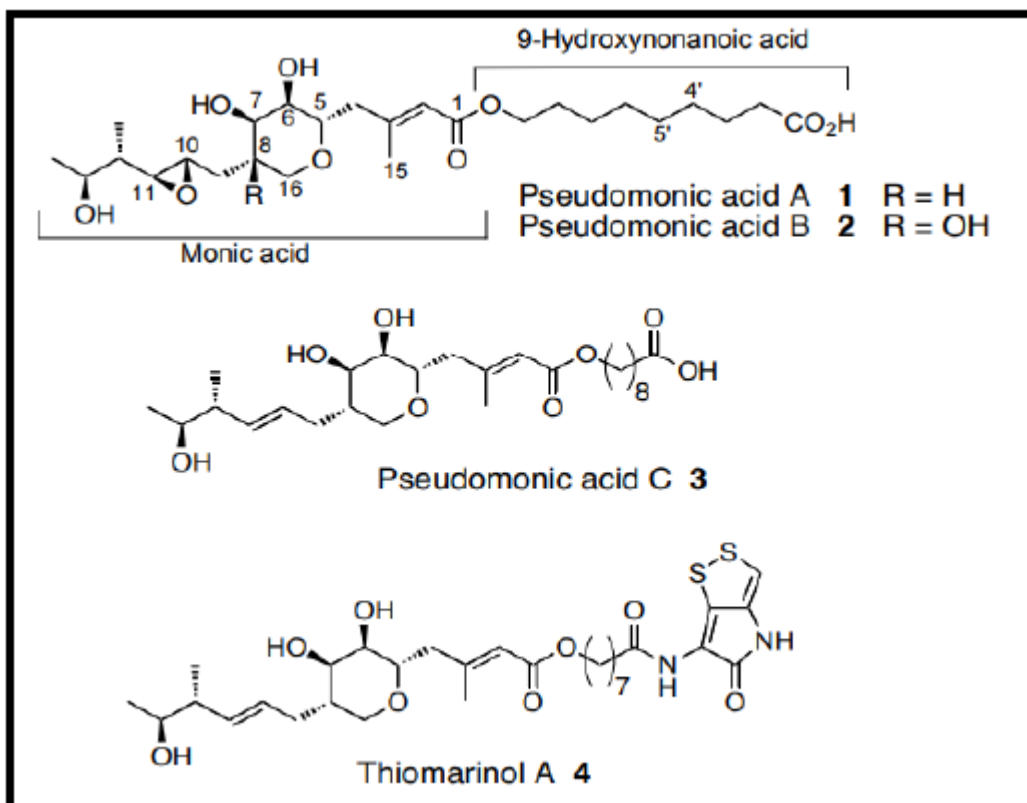


Figure 05: Composition de la mupirocine en acide pseudomonique A, B, C et le Thiomarinol A. (Gao *et al.*, 2014)

2. Siderophores

La majorité des *Pseudomonas fluorescens* synthétisent des sidérophores peptidiques complexes appelés pyoverdines ou pseudobactines. C'est un pigment soluble dans l'eau qui se diffuse dans l'agar autour des colonies. Les sidérophores sont des capteurs de fer très efficace et très utile à l'environnement par l'amélioration de la croissance des plantes et la fixation du fer, en le rendant aussi indisponible pour d'autres composantes de la microflore du sol.

2.1. Pyoverdine

La pyoverdine c'est un sidérophore primordial produit par les *Pseudomonas* et se caractérise par une très forte affinité pour le fer (Abdallah et Pattus, 2000) la pyoverdine de *P. fluorescens* est un pigment vert/jaune fluorescent sous la lumière UV qui est directement impliqué dans un transport de haute affinité du fer vers la cellule (Budzikiewicz, 1993). La découverte de plus d'une cinquantaine de dérivés de la pyoverdine a contribué à augmenter l'intérêt pour l'utilisation de sidérophores comme fongicide et biopesticides, en plus d'ouvrir une nouvelle avenue pour la classification des *Pseudomonas* sp. (Meyer, 2000 ; Wilson, 1997). Leur structure est composée de trois parties caractéristiques :

- Le chromophore : C'est un dérivé de la quinoline (2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline)

conservé chez toutes les pyoverdines, responsables de la fluorescence typique des pyoverdines (Meyer, 2000).

➤ La chaîne latérale acyle : constituée dans la plupart des cas d'un acide dicarboxylique (acide succinique ou acide maléique) ou d'un dérivé amide de cet acide, liée au groupe amine du chromophore en position C3.

➤ La chaîne peptidique : variable ou linéaire, cyclique ou partiellement cyclique. Elle est liée par un groupe amine à la fonction carboxyle C1 (rarement C3) du chromophore. Sa longueur est généralement de 6 à 12 acides aminés, spécifiques à chaque souche de *Pseudomonas*. Elle peut être linéaire, cyclique ou partiellement cyclique (Meksem, 2010).

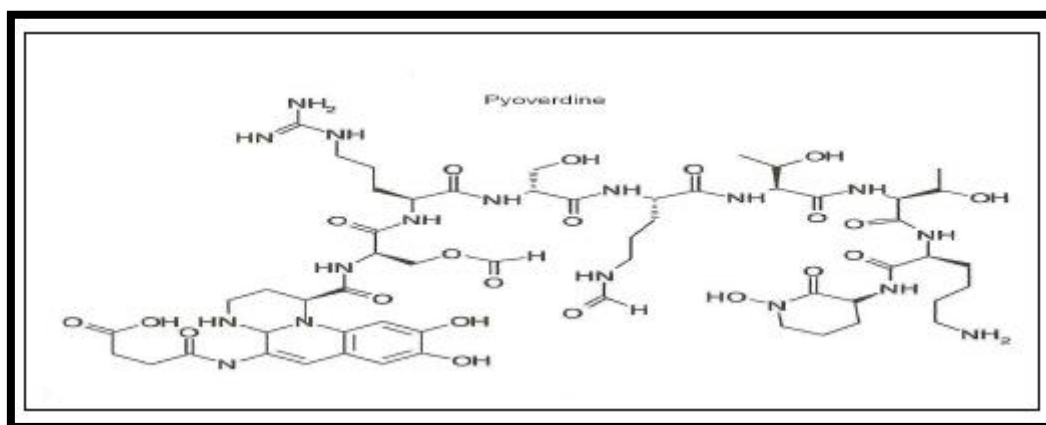


Figure 06: structure de la pyoverdine.

3. Les Enzymes :

3.1. Enzyme protéolytique

Les protéases sont un groupe d'enzymes très complexe, elles appartiennent à la classe d'hydrolases (EC 3.4.21-24.x), formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques (Kumar *et al.*, 2008). Les protéases catalysent le clivage des liaisons peptidiques de toute molécule protéique, elles scindent les protéines en fragments polypeptidiques, qui seront par la suite transformés sous l'influence des peptidases en leurs sous-unités constitutives, les acides aminés offrant une multitude de structures (Frazier, 1967 ;Scriban, 1999). La formation des enzymes protéolytiques est parfois réprimée par l'adjonction au milieu d'un hydrolysât de protéines ou d'un mélange d'acides aminés.

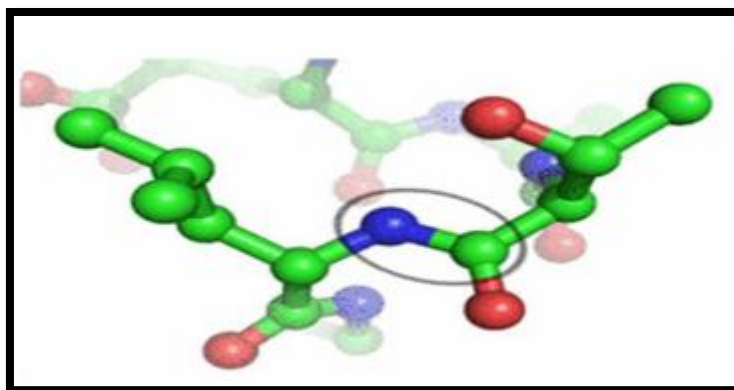


Figure 07: Les liaisons peptidiques (entre un azote en bleu et un carbone en vert) sont hydrolysées par les protéases.

Les protéases sont ubiquistes elles se retrouvent aussi bien chez les microorganismes que chez les animaux et les plantes. Cependant, grâce à leur diversité biochimique extensive, les microorganismes représentent une source exceptionnelle de protéases. En effet, quarante pourcent des enzymes sont produites par les microorganismes parmi les quels, des souches fongiques ((**Botton et al ; 1999 ; García-Gómez et al., 2009**).

Les bactéries psychrotrophes du lait et en particulier, *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* produisent des métalloprotéases thermorésistantes utilisées en particulier pour la coagulation du lait et pour l'affinage des fromages. Ces bactéries sont détruites par la pasteurisation mais les protéases extracellulaires qu'elles produisent ne sont que partiellement inactivées (**Cousin et al.,1982**).

Les *P.fluorescens* CY091 produisent une protéase extracellulaire dont la masse moléculaire est estimée à 50 kDa. La production de cette enzyme (appelée AprX) a été observée dans des milieux contenant du CaCl_2 ou du SrCl_2 , mais pas dans des milieux contenant du ZnCl_2 , du MgCl_2 ou du MnCl_2 .

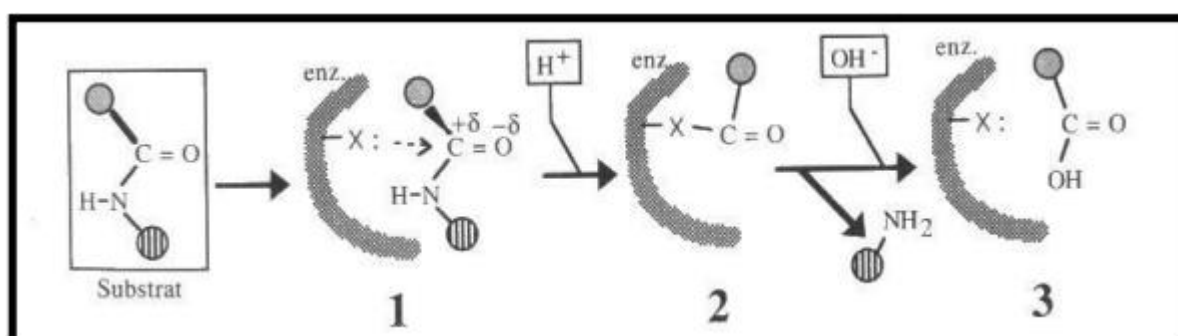


Figure 08: Mécanisme d'action des protéases (**Pelmont, 1995**).

3. 2 Enzymes amylolytiques

Les enzymes amylolytiques sont un groupe de protéines qui dégradant de l'amidon en unités constitutionnelles biochimiquement par ces enzymes telles que l' α et β -amylases ainsi

que les amyloglucosidases, amylopullulanase (**Dakhmouche-Djekrif, 2016 ; Gaenssle *et al.*, 2020**).

L'amidon est un polymère de glucose, se compose généralement d'un mélange de molécule d'amylose et d'amylopectine. L'amylose est une molécule principalement linéaire composé d'unités de glucose liées par des liaisons glycosidiques α -1,4 et présente généralement 20 à 30% du polysaccharides, tandis que l'amylopectine est hautement ramifiée constituée de nombreuses chaîne courte de α -(1,4)-D-glucanes interconnectés par une liaison α -1,6, correspondant typiquement à 70-80% de la structure de l'amidon (**Ferreira *et al.*, 2021**). Il est métabolisé par photorespiration, ce qui nécessite des amylases pour le décomposer en fragment de glucose.

Les amylases sont des glycosides hydrolases (EC 3.2.1) qui hydrolysant les composés O-glycosyles de l'amidon par fragmentation rapide en clivant les liaisons α (1 \rightarrow 4) (**Nadirman *et al.*, 2006**) (figure 4), et se retrouvent chez les animaux, les plantes et les microbes. sont classées en deux catégories, endoamylases et exoamylases. Les endoamylases catalysent l'hydrolyse à l'intérieur de la molécule d'amidon d'une manière aléatoire. Cette action provoque la formation d'oligosaccharides linéaires et ramifiés de diverses longueurs de chaîne. Les exoamylases hydrolysent l'extrémité non réductrice, pour donner successivement des produits finaux plus courts (**Gupta *et al.*, 2003**).

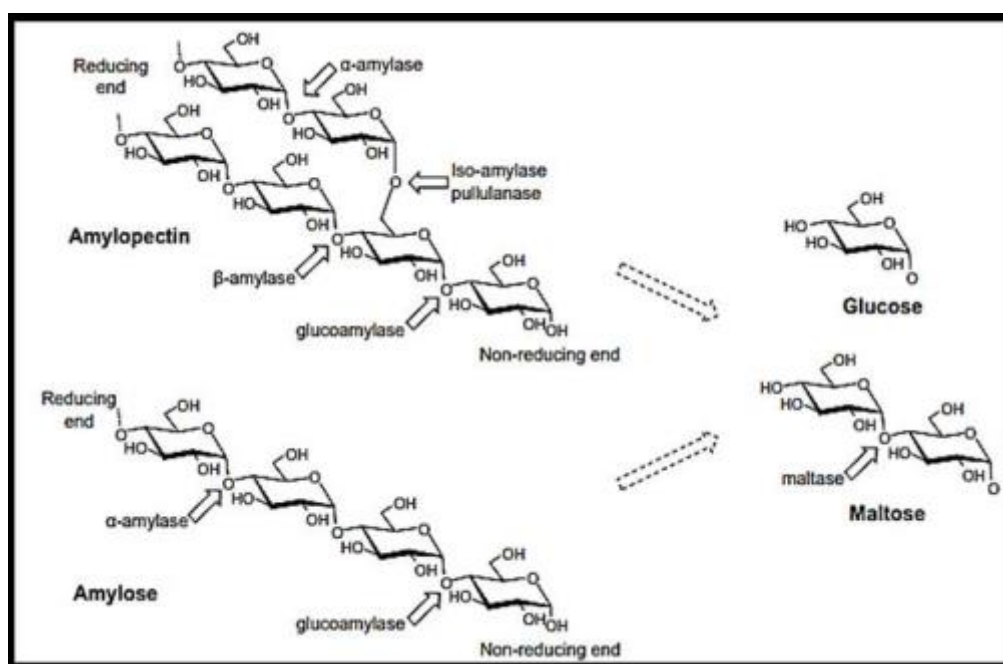


Figure 09: Structure chimique des chaînes d'amylopectine et d'amylose et sites d'hydrolyse par les différents types d'amylases (**Cripwell ., 2020**)

Industriellement, les α -amylases sont isolée principalement à partir de sources bactériennes et fongiques (**Ferreira *et al.*, 2021**), car les microorganismes produisent des α amylases en quantités abondantes (**Wang *et al.*, 2020**).

Tableau 04: Quelques micro-organismes producteurs d' α -amylase.

Micro-organisme	Espèces	Références
Levures	<i>Pichia pastoris.</i>	Wang <i>et al.</i>, 2019.
	<i>Saccharomyces cerevisiae.</i>	Martínez <i>et al.</i>, 2016.
	<i>Aureobasidium pullulans.</i>	Ademakinwa <i>et al.</i>, 2019.
	<i>Cryptococcus flavus.</i>	Barros <i>et al.</i>, 2009.
	<i>Clavispora lusitaniae.</i>	Dakhmouche-Djekrif, 2016.
Bactéries	<i>Bacillus subtilis.</i>	Zheng <i>et al.</i>, 2021.
	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	Sanchez <i>et al.</i>, 2019.
	<i>Pseudomonas.</i>	Kizhakedathil & C, 2021.
	<i>Bacillus licheniformis.</i>	Fincan <i>et al.</i>, 2021.
	<i>Bacillus megaterium.</i>	Shofiyah <i>et al.</i>, 2020.
Moississures	<i>Trichoderma harizianum.</i>	Kalia <i>et al.</i>, 2021.
	<i>Phohiota microspora.</i>	Janičková & Janeček, 2020.
	<i>Serendipita indica.</i>	Janičková & Janeček, 2020.
	<i>Aspergillus niger.</i>	Avwioroko <i>et al.</i>, 2018.
	<i>Aspergillus oryzae.</i>	Melnichuk <i>et al.</i>, 2020.

3.3 Enzyme lipolytique

Les lipases (EC 3.1.1.3) font partie de la sous-classe des hydrolases spécifiques des esters carboxyliques (EC 3.1.1) et sont définies comme étant des triacylglycérol lipases, donc des enzymes capable d'hydrolyser spécifiquement les liaisons ester carboxyliques des TAGs, qui lient les acides gras au squelette carboné du glycérol (Figure 8). D'un point de vue biochimique, une lipase est obligatoirement une estérase, mais l'inverse n'est pas vrai puisqu'il existe de nombreuses estérases non lipolytiques (**Zallot, 2011**).

Les lipases sont capables d'hydrolyser les triacylglycérols TAGS et les diacylglycérols (DAGs) mais généralement pas les monoacylglycérols (MAGs). (**Zallot, 2011**).

Les lipases sont des enzymes très variables par leurs origines et leurs spécificités de substrats. Les lipases de faible poids moléculaires ont des tailles de 20-25 KDa tandis que celles de grands tailles ont des masses moléculaires de 60-65 KDa.

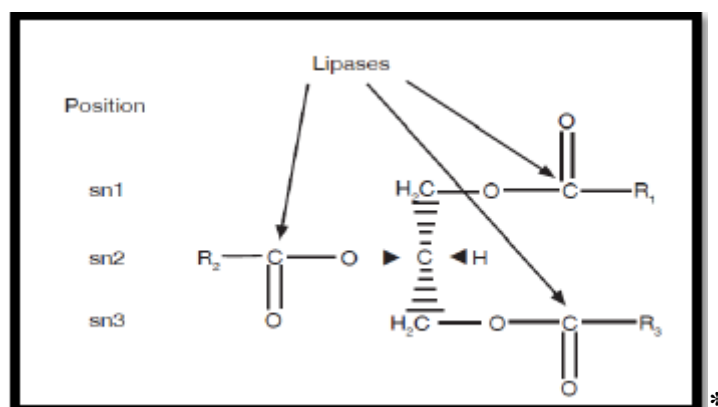


Figure 10 : Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par lipases (Fickers *et al.*, 2008).

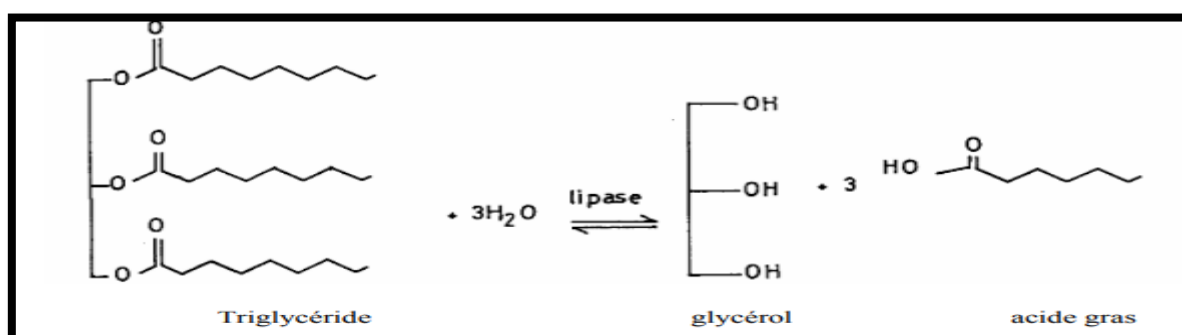


Figure 11 : Réaction enzymatique d'un lipase catalysant l'hydrolyse complète (tiré de Jaeger *et al.* (1994)

La plupart des lipases microbiennes sont extracellulaires, ces lipases présentent de grands avantages par rapport aux autres, elles sont plus abondantes (Tableau 15). Les microorganismes producteurs de ces enzymes peuvent être facilement modifiés génétiquement et présentent une grande diversité de caractéristiques et de spécificités (Filho *et al.*, 2019).

Tableau 05 : Quelques exemples sur l'origine de lipase.

origine	Exemples	références
Bactéries	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> tolérante aux solvants produit une lipase extracellulaire <i>Geobacillus</i> sp Tw1 thermophile capable de produire une lipase extracellulaire	Ruchi <i>et al.</i>, 2007

La structure des lipases a été déterminée par la cristallogénèse et diffraction des rayons x (**Najjar, 2010**) selon leur structure tridimensionnelle ces enzymes appartiennent à la super-famille structurale de α/β -hydrolases (**Bataiche, 2014**). Ces enzymes ont en commun un domaine structural central typique formé par 8 brins β connectés par 6 hélices α formant un repliement dit : α/β (**Figure 12**).

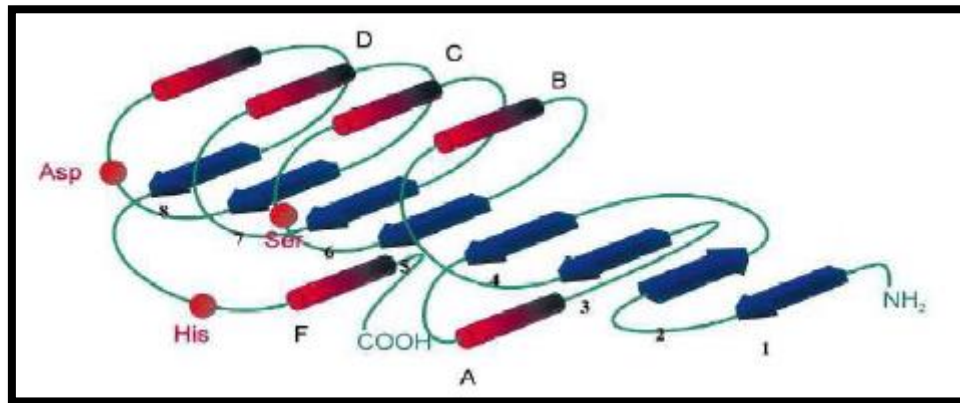


Figure 12: Présentation de la structure secondaire du repliement α/β des hydrolases (**Lotti et Alberghina, 2002 ; Fickers *et al.*, 2008**).

Chapitre III :

Matériel et méthodes

II/ Matériel et méthodes :

1. Objectif :

Le travail présent ci-dessous est réalisé afin de valoriser quelques métabolites des *Pseudomonas fluorescents*, issus d'un milieu marin (salin). Pour réaliser cette étude les objectifs suivants ont été fixés et suivi :

- L'isolement des *Pseudomonas* à partir d'un milieu marin.
- La purification des souches isolées de *P. fluorescents*.
- La sélection des souches test pour l'identification.
- L'identification à travers l'étude macroscopique et microscopique des souches.
- Le test de résistance à la salinité sur les *P. fluorescents* étudiées.
- Sélection des isolats antagonistes par des tests de confrontation avec les souches tests.
- Recherche de quelques enzymes chez les *P. fluorescents* étudiées.
- Identification des isolats de *P. fluorescents* par des tests phénotypiques.

2. Echantillonnage :

Une quantité de sable sous marin à été prélever de la plage de Sidi El Majdoub-Mostaganem le 17/04/2022 à 10h dans un récipient propre et stérile pour être analysé le jour même.

3. Préparation des milieux de culture :

Le milieu de King B permet la détection de la synthèse de pyoverdine, pigment élaboré par quelques espèces de *Pseudomonas*, La présence de sulfate de magnésium fournit les cations nécessaires à l'activation de la pyoverdine qui se manifeste en colorant le milieu de culture en vert-jaune fluorescent. Une synthèse de pyoverdine se traduit par une coloration verte fluorescente. Le milieu de King A permet la détection de la synthèse de pyocyanine, pigment élaboré spécifiquement par *P. aeruginosa* (bacille pyocyanique). Utilisé en parallèle avec le milieu de King B, il permet d'orienter l'identification de *P. aeruginosa*. (**King et al., 1954**)

4. Isolement des *Pseudomonas* :

L'isolement a été effectué par la préparation d'une suspension de 10g de sable dans 90 ml d'eau physiologique stérile. A partir de cette solution mère une série de dilutions de 10^{-1} à 10^{-5} a été effectuée. À partir de chaque dilution, un volume de 0.1 ml a étéensemencé en surface dans une boîtes pétri contenant 18 ml de gélose King B (**King et al., 1954**). Chaque dilution a étéensemencée en double et incubés à 30°C durant 24h.

5. Purification et conservation des souches de *Pseudomonas* :

Les colonies fluorescentes coloré en « vert fluorescent » sont choisies et purifier sur le milieu King B selon la méthode de stries simple puis incubé à 30°C durant 24h.

6. Identification des *Pseudomonas* :

6.1. Etude microscopique :

l'étude microscopique par l'intermédiaire de la coloration de Gram, nous permettra d'examiner la forme, le mode d'association et le résultat de coloration de Gram des bactéries. Pour cette étape d'étude un frotti est préparé suivi d'une coloration de Gram qui a été réalisée selon la méthode classique décrite par (Hildebrand *et al.*, 1988), par l'utilisation de la Fushine. Et cela pour classer les bactéries en Gram positif ou négatif ainsi que leur morphologie.

6.2. Production de pyoverdine :

La pyoverdine est le principal pigment produit par les *P. fluorescents*, il peut être mis en évidence sur la gélose King B. La gélose King B permet ou bien favorise la synthèse de la pyoverdine et qui se manifeste par une couleur verte ou jaune verdâtre (Mezaache, 1997).

6.3. Test de salinité :

Afin de pouvoir déterminer l'effet de la salinité sur la croissance des *P. fluorescents* et leur résistance, une série de tests est réalisée sur 14 souches choisies numérotés de 1 à 14. Ces isolats ont été ensemencés dans des boîtes Pétri sur un milieu de culture King B contenant des différentes concentrations de NaCl (0.5% ; 2.5% ; 5% ; 7.5% ; 9%) et incubé à 30°C pendant 48h.

7. Purification des souches tests :

Afin de tester l'activité antagoniste des souches isolées, des souches cibles ont été utilisées. Ces souches cibles proviennent du C.H.U d'Oran et de l'université d'Abd El Hamid Ibn Badis-Mostaganem et ont été donc purifiées comme suit :

Candida albicans : A été ensemencée sur milieu Sabouroud + chloramphenicol et sur bouillon coeur-cerveau et incubée à 25°C durant 72h. (Université-Mostaganem)

E.coli : A été ensemencée sur gélose nutritive et incubé à 37°C pendant 48h. (C.H.U d'Oran)

Staphylococcus aureus : Ensemencement effectué sur gélose nutritive puis incubé à 30°C pendant 24h. (C.H.U d'Oran)

P.aeruginosa : Ensemencement effectué sur gélose nutritive et milieu King B puis incubé à 30°C pendant 24h. (C.H.U d'Oran)

8. Test d'antagonisme *in vitro* :

Ce test permet d'évaluer les propriétés antagonistes des souches isolées auparavant. Elle consiste à révéler la capacité des souches à reproduire des comparants antimicrobiens. (Lepoivre, 2003)

8.1. Sur milieu Mueller-Hinton :

L'expérience est réalisée par à déposition des isolats de *Pseudomonas* sous forme des lignes sur la gélose de Mueller-Hinton coulé auparavant dans des boîtes Pétri puis les incubent à 30°C pendant 48h. Après cette période d'incubation les souches cibles « *Candida albicans*, *E.coli*, *Staphelococcus* et *P.aeruginosa* » sontensemencées par une ligne perpendiculaire par rapport à la souche d'intérêt « *P.fluorescent* », ensuite ; les boîtes sont incubées à 37° C pendant 24 heures. Les zones d'inhibitions entre les *Pseudomonas* et les souches cibles ont été mesurées (Balouiri et al., 2016).

8.2. Sur milieu King B :

La même expérience est répétée sauf que le milieu à été remplacer par le milieu King B et ré-incuber à 37°C pendant 24 h. En cas d'observation de zones d'inhibitions ils seront aussi mesurés et prise en considération.

9. Etude enzymatique :

A pour but de savoir si les bactéries ont capacité de produire quelques enzymes extracellulaires.

9.1. Recherche des protéases : (Test de caséine)

La caséine est une grande protéine du lait incapable de pénétrer la membrane plasmique des bactéries. Par conséquent, avant que la caséine puisse être utilisée par certaines bactéries comme source de carbone et énergie, elle doit être dégradée en acides aminés. Les bactéries sécrètent une enzyme protéolytique (la caséinase) qui catalyser l'hydrolyse de la caséine pour produire des acides aminés qui sont ensuite transportés dans la cellule et catabolisé.

Lorsque le lait est mélangé avec de la gélose, la casein dans le lait rend la gélose trouble, et il existe 2 cas :

① Réaction positive : la gélose qui entour la colonie devient clair (production «ou libération d'enzyme de caséinase)

② Réaction négative, il n'y a pas D'activité de la protéase, et le milieu entourant le la colonie bactérienne reste opaque.

→**Méthode** : Devant un Bec Bunsen 2ml de lait écrémé stérile et chaud (48° à 50°C) sont déposés sur chaque boîte Pétri à l'aide d'une pipette et puis recouverts de la gélose nutritive fondue et homogénéisés par des mouvements circulaires tout doucement, après la solidification de la gélose, on a ensemencé les *Pseudomonas* aseptiquement en touche et incubé à 30°C pendant 24h.

9.2. Recherche d'amylase :

L'amylase est une enzyme qui permet de digérer l'amidon.

En cas d'une réaction positive, le contour de la colonie sera clair après addition de lugol ce qui indique que la bactérie a libéré l'amylase.

→**Méthode** : Dans cette étape l'ensemencement des *Pseudomonas* a été effectué dans des boîtes Pétri contenant du gélose nutritif + 2g d'amidon avec la méthode des stries simple à l'aide d'une anse de platine puis incubé pendant 24h à 30°C. Après l'incubation quelques gouttes de Lugol sont ajoutées pour recouvrir la surface des boîtes et cela pour faciliter la lecture de la zone d'inhibition à l'œil nu.

9.3. Recherche de lipase :

Les lipases sont des enzymes hydrosolubles capables d'effectuer l'hydrolyse de fonctions esters et sont spécialisées dans la transformation de glycéride en glycérol et en acides gras (lipolyse).

→ En cas d'une réaction positive : observation d'une zone trouble (un précipité) qui entoure la colonie, c'est-à-dire la réaction d'hydrolyse a été effectuée.

→ **Méthode** : Pour réaliser cette recherche un ensemencement des *Pseudomonas* a été effectué sur un milieu contenant de la gélose nutritive + 10 ml/L de Tween 20 et 0.1g/L de CaCl₂ et incubé à 30°C pendant 24h.

10. Identification biochimique des *Pseudomonas* :

10.1. Test sur King A :

Ce test a été réalisé pour différencier les *P. aeruginosa* des *P. fluorescens*, la méthode consiste à couler le milieu King A gélosé dans des boîtes Pétri, laisser solidifier et puis les ensemencer avec les bactéries suspectes en stries simples et les incubées à 30°C durant 24h.

10.2. Test de TSI (Triple Sugar Iron) :

La gélose TSI est utilisée pour l'identification présomptive des entérobactéries basées sur la fermentation du glucose, du lactose, du saccharose, la production de gaz et d'H₂S. Lorsque l'un des glucides est fermenté, la baisse du pH fera passer le milieu de l'orange rougeâtre (la couleur originale) au jaune. Une couleur rouge foncée indique une alcalinisation des peptones. Le thiosulfate de sodium dans le milieu est réduit par certaines bactéries en sulfure d'hydrogène (H₂S), ce dernier réagit avec les ions ferriques dans le milieu pour produire du sulfure de fer, un précipité insoluble noir. (**Harley-Prescott-Laboratory Exercises in microbiology. 5^{ème} édition. 2002**)

→ **Si** la bactérie n'utilise que le glucose : le culot devient jaune et la pente rouge : La bactérie métabolise rapidement le glucose, donnant initialement une pente acide et un culot acide (acide sur acide A/A) avec production du pyruvate, Après une incubation plus poussée (18 heures), le glucose sera consommé, en sachant que les bactéries ne peuvent pas utiliser le lactose et le saccharose, les peptones (acides aminés) seront utilisées comme source d'énergie aérobie (la pente) ce qui provoque la libération d'ammoniac (NH₃) et l'augmentation du pH, faisant virer l'indicateur de pH, le phénol rouge, du jaune au rouge (alcalin sur acide K/A).

→ **Si** la bactérie utilise le glucose, saccharose et /ou lactose : le culot et la pente deviendront jaunes : après consommation du glucose, la bactérie poursuit la consommation du saccharose et /ou du lactose donnant une pente jaune et un culot jaune (acide sur acide (A/A)).

NB : Si on incube le milieu plus longtemps, plus de 48 heures, le lactose et le saccharose seront épuisés, on obtiendra un pH alcalin en raison du métabolisme des peptones.

→ **Si** la bactérie n'utilise aucun des sucres: Dans ce cas la bactérie consommera les peptones : avec 2 cas de figure : Si la bactérie peut métaboliser les peptones à la fois en aérobiose et en anaérobiose, la pente et le culot seront rouges (alcaline sur alcalin ; K/K). Si les peptones ne peuvent être métabolisées qu'en aérobiose, la pente sera rouge et le culot ne présentera aucun changement (K/NC).

10.3. Recherche de Nitrate réductase :

La réduction des nitrates par bactéries est médiée par la nitrate réductase et indique que la bactérie peut utiliser les nitrates (NO₃⁻) comme accepteur d'électron pendant la respiration anaérobie. Pour la recherche de cette enzyme une suspension bactérienne est inoculée dans des tubes de Bouillon nitraté selon la méthode de **Roussel Delif *et al.* (2005)** puis les incubés pendant 24h à 28°C.

La technique de Khan permet la mise en évidence des nitrites dans le milieu et qui utilise les réactifs de Geless Ilosway suivant :

→ **Réactif NR1** (Acide sulfanilique en milieu acétique).

Chapitre III : Matériel et méthodes

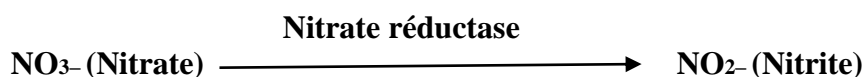
→ **Réactif NR2** (Naphtylamine en milieu acétique).

La méthode consiste à ajouter à la surface de milieu 3 gouttes du réactif **NR1** puis 3 gouttes du réactif **NR2** et homogénéiser le mélange.

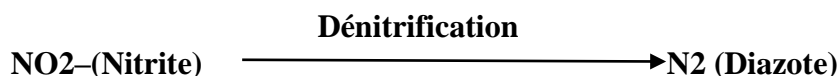
→ Si le nitrite est présent il y aura une apparition d'une couleur rose, donc la bactérie possède une nitrate réductase qui effectue la réaction.

→ Si la coloration ne change pas cela signifie l'absence de nitrite; alors on ajoute de la poudre de Zinc qui réduit les nitrates en nitrites:

- coloration rose: le Zinc réduit les nitrates en nitrite c'est à dire que la bactérie ne possède pas la nitrate réductase selon la réaction suivante:



- Pas de coloration: les nitrites ont été transformés par la bactérie puis la dénitrification a permis l'obtention de diazote. La réaction est positive donc la bactérie possède la nitrate réductase.



10.4. Test VP-RM :

La méthode consiste à ensemercer 8 tubes contenant le milieu Clark et Lubs avec une suspension des souches bactériennes, puis les tubes ont été incubés à une température de 30°C pendant 24 h.

❖ Test Voges Proskauer (VP) :

Il permet de détecter la production d'acétoïne, de dyacétyl et de butane-diol à partir de la fermentation du glucose. Le réactif ajouté (l'alpha naphtol et KOH) permet dans le cas d'un milieu basique et en présence de dioxygène, d'obtenir une coloration rosée ou rouge d'acétoïne dyacétyl + KOH + alpha naphtol + O² coloration rosé ou rouge butane-diol.

❖ Test du Rouge de Méthyle (RM) :

Il permet de détecter la production d'acides plus ou moins forts et plus ou moins volatiles au cours de la fermentation. Quelques gouttes d'un indicateur coloré de pH sont ajoutées au milieu: le rouge de méthyle (rouge en milieu acide et jaune en milieu basique).

Chapitre III : Matériel et méthodes

→ Si les bactéries produisent des acides forts au cours de la fermentation, le milieu reste acide et donc en rouge.

→ Si les bactéries produisent des acides faibles le milieu s'est acidifié puis ré-alcalinisé, Le milieu est donc jaune.

→ **La méthode** consiste à prélevé une colonie à l'aide d'une anse de platine ou pipette de pasteur sur la paroi du tube, pour obtenir une suspension homogène, les tubes ont été incubés à 30°C pendant 24h.

→ **La lecture** : 3 gouttes de RM ont été ajouté puis lus immédiatement.

10.5. Recherche de la gélatinase :

La gélatinase est l'enzyme qui hydrolyse la gélatine en acides aminés ou en peptides. Ce test est effectuer afin de pouvoir différencier entre les *P.putida* et les *P.fluorescents* . Les souches (8 souches) ont étéensemencées par touches sur gélose nutritive contenant 0.4%de gélatine, puis incubé durant 48h à 28°C. Après incubation, verser 1 à 2ml de réactif de Frazier ou sulfate de cuivre sur le milieux gélosée. Le milieu est tout opaque sauf aux endroits où la gélatine a été hydrolysée

10.6. Croissance à de différentes températures :

Ce test a pour but de différencier les *P.aeruginosa* des autres *P.fluorescents* par la croissance à 42°C et à 4°C . Les 8 souches choisies (1.3.5.6.7.9.10.14) ont étéensemencées fans des boîtes contenant de la gélose King A puis incubées à 42°C pendant 48h et à 4°C pendant 5jours.

Chapitre IV :

Résultats et discussion

IV/Résultats et discussion

1. Isolement des souches de *Pseudomonas* :

L'isolement des *Pseudomonas* à partir des sables de mer nous a permis d'obtenir 14 isolats de *Pseudomonas fluorescents*. . Après une période d'incubation de 48h, nous avons pu constater la présence de colonies pigmentées en jaune-verdâtre sur le milieu King B. Cette pigmentation est faible chez les isolats 5 et 6 (figure 13 et 14).

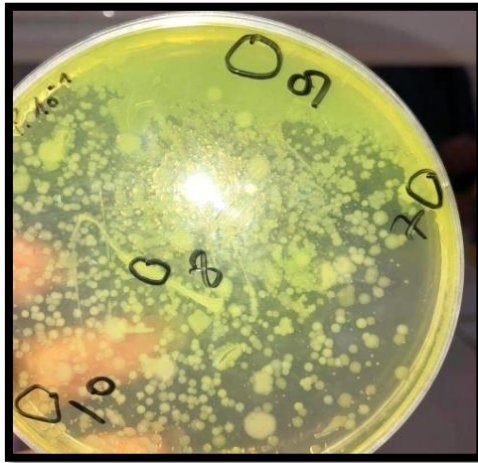


Figure 13: Illustration des colonies fluorescentes obtenues sur milieu King B après 48 d'incubation à 30°C.

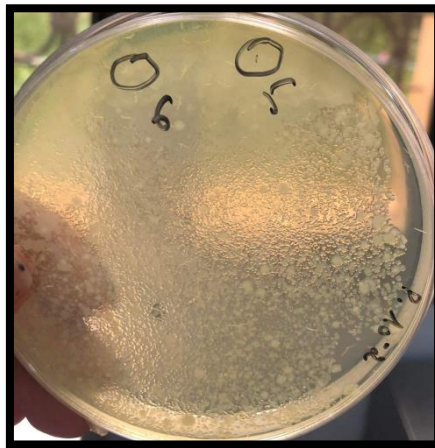


Figure 14 : Illustration des colonies à fluorescence faible sur milieu King B après 48h d'incubation à 30°C.

2. Purification des isolats de *Pseudomonas* :

A partir des cultures obtenues , 14 isolats fluorescents d'aspect morphologique différent ont été choisies, numérotées et purifiées. La majorité de ces colonies-purifiées sur gélose King B ont produit une pigmentation fluorescente, diffusant dans toute la boîte Pétri (Eyquem et Montagnier, 2000).

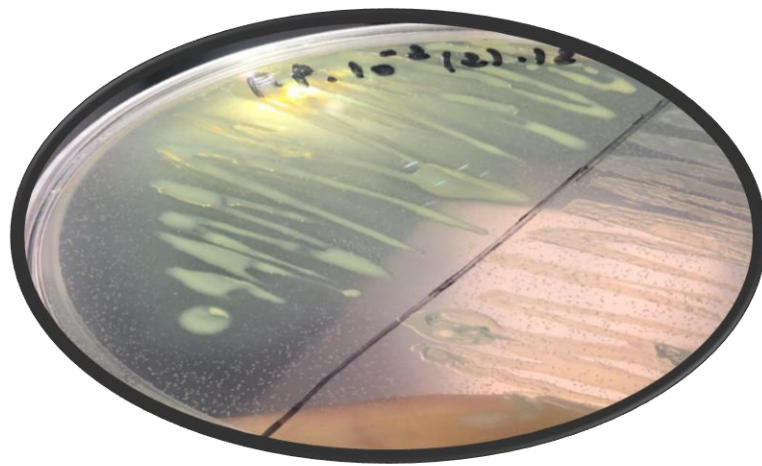


Figure 15 : Aspect d'un isolat fluorescent de *Pseudomonas* après purification

3. Etude macroscopique :

L'observation macroscopique des isolats de *Pseudomonas* cultivé sur milieu King B (annexe) a montré que toutes les colonies ronde blanchâtres à jaunâtre, sont de petite taille à moyenne , opaque, muqueuse légèrement bombées avec un bord circulaire sauf les souches (5,6,9,14) sont des colonies formant une nappe recouvrant la boîte .Elles sont capables d'élaborer un pigment jaune-vert fluorescent diffusible dans le milieu.

4. Etude microscopique :

L'observation microscopique a révélé des bacilles à Gram négatif droits ou légèrement incurvés . Les cellules se présentent isolées ou groupées par deux elles sont asporulées de couleur rose qui indique une coloration de Gram négative (figure 16).

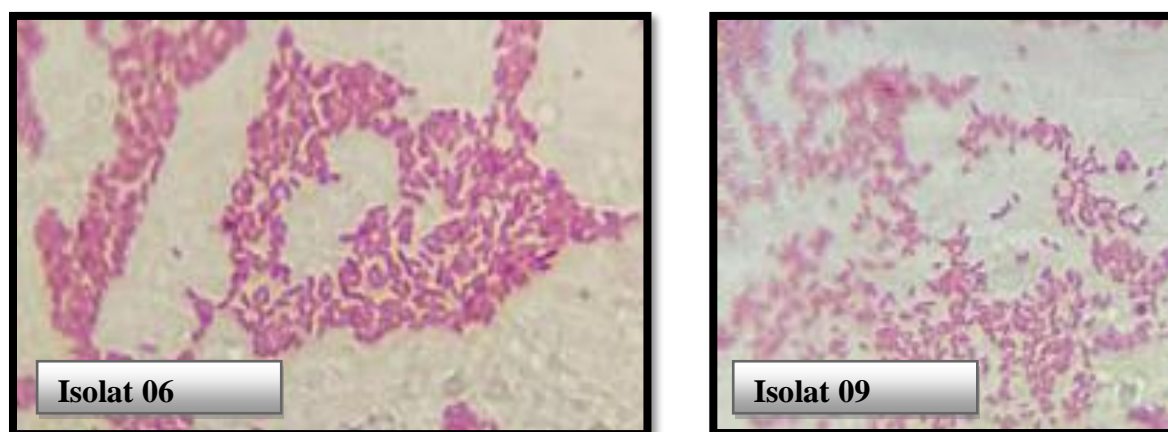


Figure 16 : Observation microscopique des *Pseudomonas* (Isolats n° 6 et 9) après coloration de Gram(x1000)

5. Tests biochimiques :

Les résultats de la série de tests biochimiques effectuée pour les huit isolats bactériens (1,3, 5, 6, 9, 10, 13, 14) sont montrés dans le tableau (06).

Ces résultats révèlent les données suivantes :

Le test TSI était négatif avec l'ensemble des isolats où aucun sucre n'a été fermenté .

Tous les isolats possèdent l'enzyme nitrate réductase où ils ont réduit le nitrate au stade N_2 .

Huit isolats ont présenté des réactions négatives via le test de Voges Proskauer VP (-) et 3 seulement étaient négatifs au test de Rouge de Méthyle

La gélatine n'a pas été hydrolysée par tous les isolats ceci révèle l'absence de gélatinase chez ces derniers.

Tableau (06) : Résultats des tests biochimiques

TEST	Souche 1	Souche 3	Souche 5	Souche 6	Souche 9	Souche 10	Souche 13	Souche 14
VP/ RM	(-) (+)	(-) (+)	(-) (-)	(-) (-)	(-) (+)	(-) (+)	(-) (+)	(-) (-)
TSI	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Nitrate réductase	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Gélatinase	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(+) : Test positif.

(-) : Test négatif.

6. Mise en évidence des pigments sur milieu King A :

La production d'un pigment bleu vert a été nettement observée sur le milieu King A chez l'isolat 10. Le pigment bleu était absent chez les autres isolats (tableau 07 et figure 17).

Tableau (07) : Résultats du test de pigmentation sur milieu king A.

Isolat	Intensité de la pigmentation
1	(-)
3	(-)
5	(-)
6	(-)
9	(-)
10	(+++)
13	(-)
14	(-)

(+++): Présence de pigment.

(-): Pas de pigmentation.

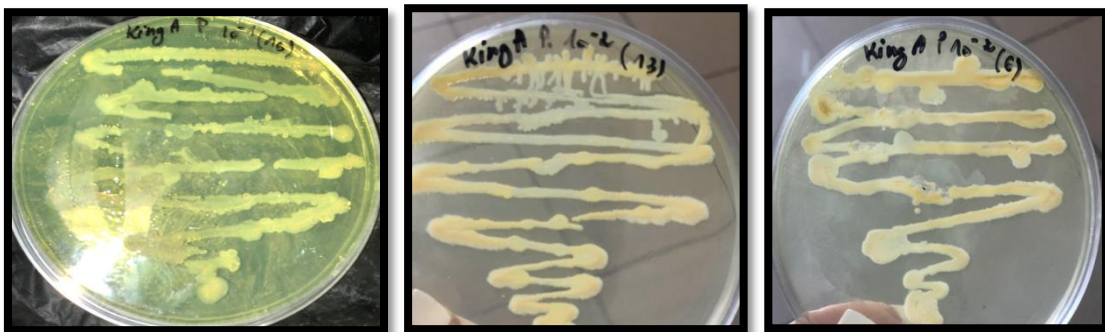


Figure 17 : Mise en évidence des pigments sur milieu King A.

7. Croissance à 4°C et 42°C :

Les résultats de la croissance à 4°C et 42°C indiquent que les souches de *Pseudomonas* présentent une forte croissance à 42°C (1,3,9,10,13,14) et une faible croissance à 4°C (5,6). Cela indique que les six isolats font partie du groupe des *P.aeruginosa* selon le schéma décrit par (Digat et Gardan, 1987).

Chapitre IV : Résultats et discussion

Tableau (08): Résultats de la croissance à 4°C et 42°C

	Température	
	42°C	4°C
1	(+++)	(-)
3	(++)	(-)
5	(-)	(++)
6	(-)	(++)
9	(++)	(-)
10	(++)	(-)
13	(+++)	(-)
14	(++)	(-)

(+++) :Forte croissance

(++) :Moyenne croissance

(-) :Absence de croissance

8. Observation microscopique des souches test :

La coloration de Gram a montrée les cellules de *Staphylococcus* en cocci à Gram positif, isolés, regroupés en diplocoques, en court chaînette et en amas. Les cellules d'*E.coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* apparaissent en forme de bâtonnets à Gram négatif tandis que Les cellules de *Candida albicans* apparaissent à l'état frais en forme unicellulaire, bourgeonnantes avec des noyaux.

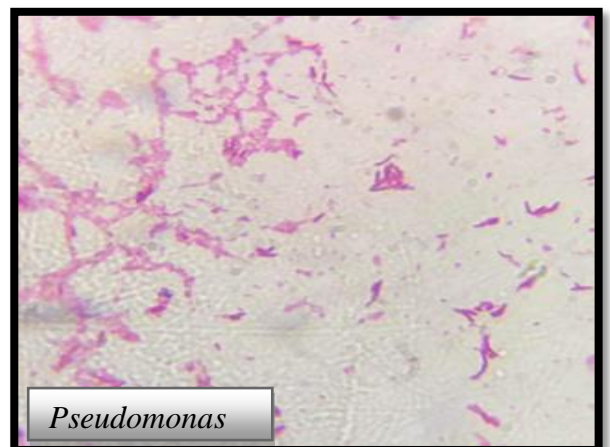
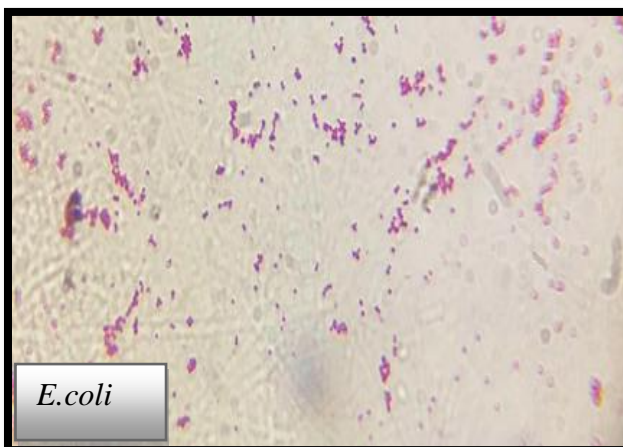
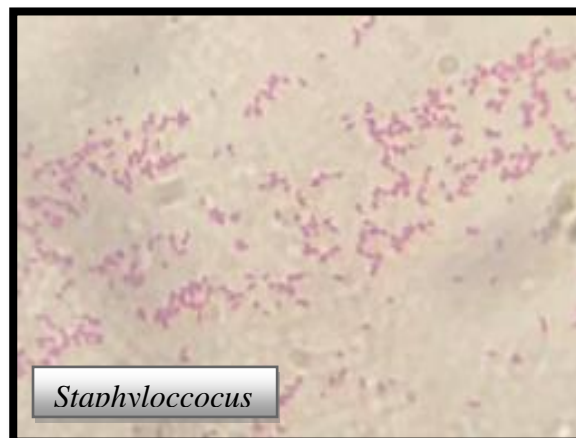


Figure 18 : Observation microscopique des souches test après coloration de Gram des souches tests x 1000.

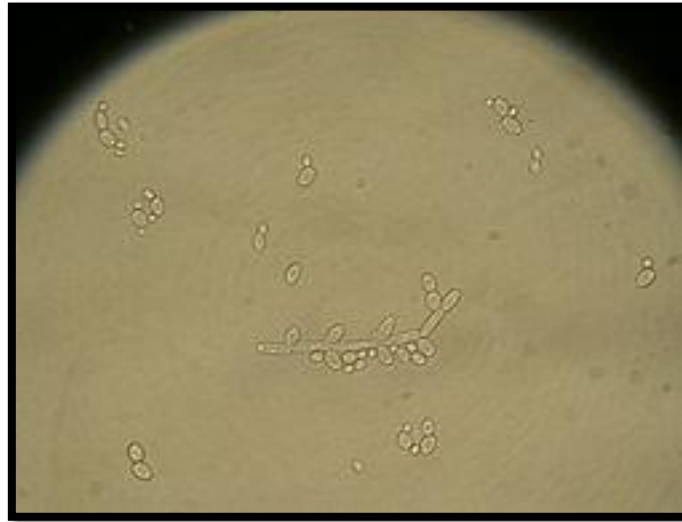


Figure 19: Candida albicans à l'état frais x1000.

9. Résultat du test de l'effet de la salinité :

Les résultats du test de salinité montrent que la concentration de sel a eu un effet sur la croissance des souches. Les valeurs de croissance les plus importantes ont été obtenues à une concentration de 0,5% et 2,5 % chez l'ensemble des *Pseudomonas*. Pour la concentration de 5%, une légère baisse de croissance a été enregistrée. Les concentrations de 7% et 9% ont complètement inhibé la croissance des *Pseudomonas* étudiés tableau 09.

Tableau (09) : Résultats de l'effet de la salinité sur la la croissance des *Pseudomonas*

Isolat	0,5%	2,5%	5%	7,5%	9%
1	(+++)	(+++)	(+)	(-)	(-)
3	(+++)	(+++)	(+)	(-)	(-)
5	(+++)	(+++)	(+)	(-)	(-)
6	(+++)	(+++)	(+)	(-)	(-)
9	(+++)	(+++)	(+++)	(-)	(-)
10	(+++)	(+++)	(+++)	(-)	(-)
13	(+++)	(+++)	(-)	(-)	(-)
14	(+++)	(+++)	(+++)	(-)	(-)

(+++) :forte croissance (+) :faible croissance (-) :absence de croissance

Chapitre IV : Résultats et discussion

Nous avons testé l'effet de la salinité à une température d'incubation de 30°C. Les résultats obtenus (tableau 09) montrent que les plus fortes croissances ont été observées dans les milieux contenant une concentration de (0.5% - 2.5%) d'NaCl puis une diminution progressive de croissance a été remarquée dans le milieu de (5%) d'NaCl par contre dans le milieu à (7.5% - 9%) de concentration d'NaCl il y a eu une absence totale de croissance ce qui confirme l'hypothèse du pourcentage de sel de mer qui est à 3% et que les *Pseudomonas* de cette étude s'adaptent bien à l'eau de mer. Ces résultats sont en accord avec les résultats de (Haouat et Maraf., 2021). Selon leur étude les valeurs de croissance les plus importantes étaient obtenues à une concentration de 1% par la souche E pour une densité optique (D.O = 1,931). Pour une concentration de 2%, une légère baisse de croissance était constatée chez l'ensemble des souches. Alors qu'à une concentration de 3%, une hausse de la croissance était constatée pour les souches F (D.O = 1,105) et K (D.O = 1,113), ce qui représente l'optimum de croissance de ces deux souches. A partir d'une concentration de 5% de NaCl, une baisse progressive de la croissance a été enregistrée jusqu'à devenir difficilement constatable à 7%.

10. Résultat du test d'antagonisme *in vitro* :

La recherche de l'activité antagoniste *in vitro* a été testée vis-à-vis 4 souches pathogènes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*. Les résultats obtenus (tableau 10 et les figures 20, 21 et 22) montrent que l'activité antagoniste se diffère d'une souche à une autre. Des zones d'inhibition moyennes à faibles ont été observées. Ces zones varient de 0 à 7 mm. Le tableau révèle que les souches bactériennes sont des isolats ayant un pouvoir inhibiteur de croissance faible, 4 sur 4 souches ont été inhibées. Par ailleurs, la fréquence d'effet antimicrobien des isolats de *Pseudomonas* indique que 4 isolats de *Pseudomonas* (1,3,5,10) ont montré un effet faible sur *E. coli* le reste des *Pseudomonas* n'ont montré aucun effet inhibiteur sur cette bactérie. Les souches *Staphylococcus* et *Pseudomonas* sp ont été inhibées uniquement par 3 isolats de *Pseudomonas* (3,14,5) et un seul isolat (3) respectivement. La levure *Candida albicans* a été inhibée seulement par les isolats 7,3 et 5.

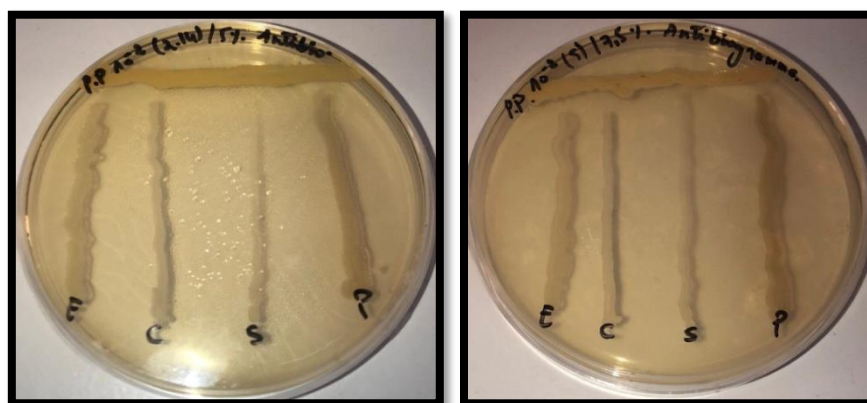


Figure 20 : Activité antagoniste de *Pseudomonas* (Isolat n° 14,5) vis-à-vis *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*

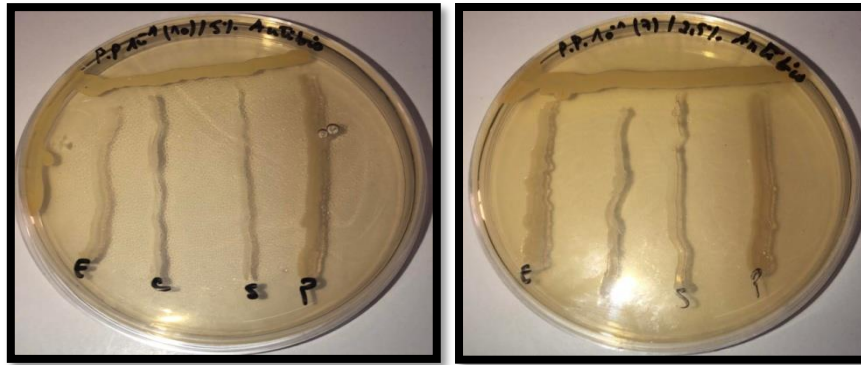


Figure 21: Activité antagoniste de *Pseudomonas* (Isolat 10,7) vis-à-vis *P.aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*

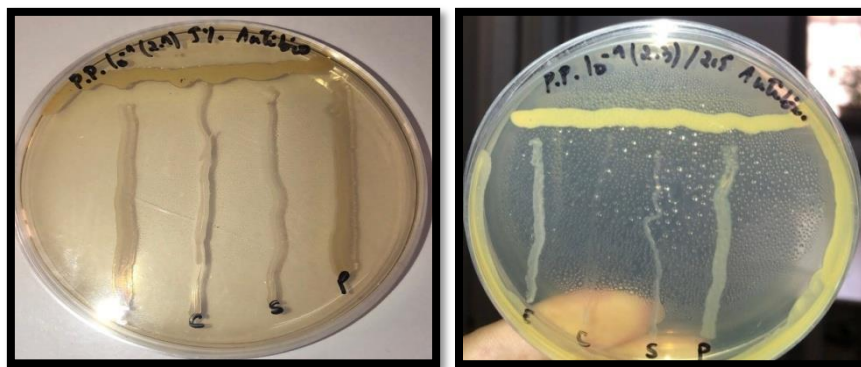


Figure 22 : Activité antagoniste de *Pseudomonas* (Isolat 1,3) vis-à-vis *P.aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*

Tableau (10) : Distances de zones d'inhibition (en cm) entre les isolats de *Pseudomonas* et les souches test.

Boites	Candida albicans	E.coli	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus aureus
1	-	0,4	-	-
7	0,6	-	-	-
3	2	0,2	0,3	0,5
14	-	-	-	0,6
10	-	0,5	-	0,7
5	0,6	0,4	-	-

(-) : pas d'inhibition.

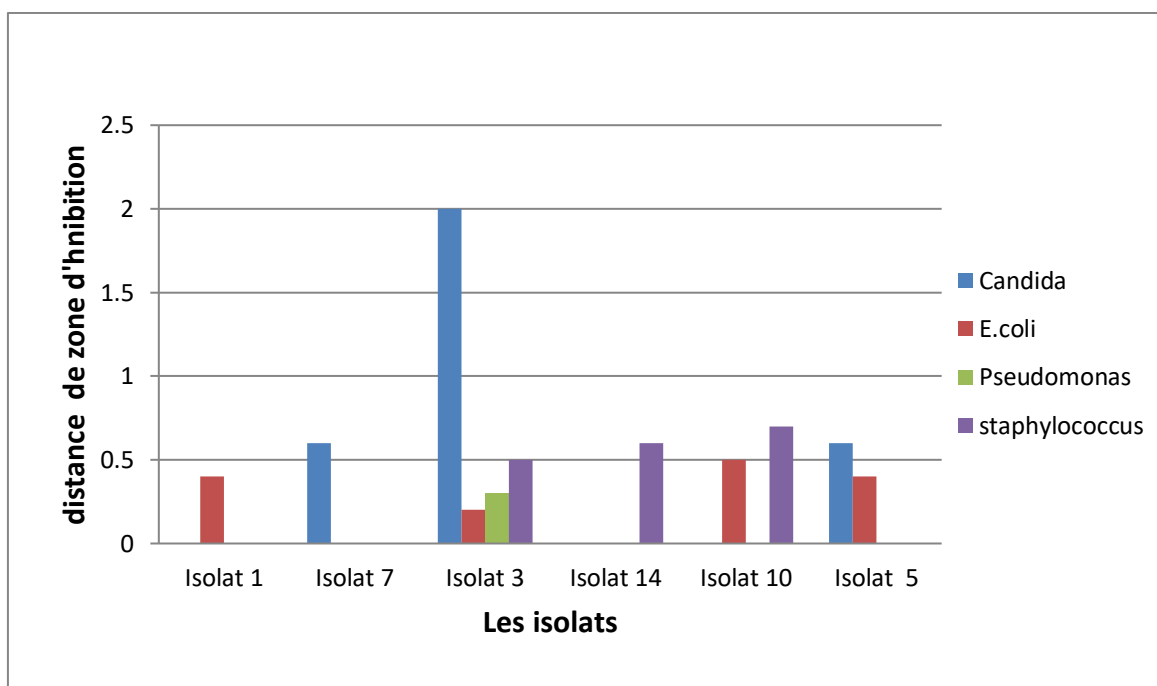


Figure 23 : Histogramme des résultats du test d'antagonisme.

On remarque que l'isolat 3 avait un effet inhibiteur faible sur toutes les souches microbiennes testées, où ces dernières démontrent un pouvoir inhibiteur remarquable vis-à-vis *Candida albicans* qui est présentée par une zone d'inhibition de 2 cm (20 mm) de diamètre. Cette activité antifongique exercée par les isolats étudiés est peut-être due aux métabolites qu'ils produisent. Ces résultats sont en accord avec une étude menée par (Attoura *et al.*, 2019). Qui démontrent que parmi les 8 souches cliniques de *P.aeruginosa*, 5 souches (S1, S2, S5, S7, Sr) ont montré un pouvoir inhibiteur vis-à-vis les souches pathogènes avec une variation dans le degré d'inhibition. *Candida albicans* est la plus inhibée par les trois souches S2, S7, Sr avec des zones d'inhibition de 35 mm, 22 mm et 30 mm respectivement.

Il a été démontré qu'un acide gras insaturé, l'acide cis-2-décénoïque, produit par *P.aeruginosa* est responsable de la réponse à la dispersion des cellules dans les biofilms formés par une gamme de bactéries à Gram négatif, et par des bactéries à Gram positif. De plus, cet acide est également capable d'induire une dispersion dans les biofilms de *Candida albicans*, ce qui indique que cette molécule a une activité fonctionnelle croisée (Davies et Marques, 2009). Et dans le cas de l'incapacité des autres *Pseudomonas* à inhiber la croissance des souches testées, cela peut s'expliquer par le fait que ces isolats manquent de gènes responsables de la production des substances antimicrobiennes.

Une faible action antibactérienne a été constatée plus particulièrement contre les souches *S. aureus* d'un diamètre de 0,2 à 0,7 cm. Ces résultats sont en accord avec les études de (Houat et Maraf, 2021) sauf que l'action antimicrobienne de leur souche était plus forte que celles des nôtres et cela peut être le résultat de la performance de la souche isolée ou de la résistance antimicrobienne des souches tests. Leur résultats démontrent globalement que les cinq isolats de *P. aeruginosa* testés, ont révélé un pouvoir inhibiteur de croissance des souches tests, 4 sur 5 souches ont été inhibées. Une importante action antibactérienne a été constatée plus particulièrement contre les souches *S. aureus* et *E. coli*. Des zones claires et le diamètre de ces zones varient de 0 à 2.3 cm.

Chapitre IV : Résultats et discussion

Pour le cas de *S. aureus*, tout d'abord cela peut être dû aux métabolites produits par *P. aeruginosa* (Zhang *et al.*, 2017), comme la phénazine-1- carboxamide qui est reconnue comme particulièrement efficace contre les *S. aureus* y compris MRSA. Les modes d'action des phénazines peuvent inclure des interactions avec l'ADN (intercalation ou liaison de rainure), des topoisomérases, des anti-oxydants ou des molécules à transfert de charge (Cardozo *et al.*, 2013).. L'action antibactérienne de *P. aeruginosa* sur *E. coli* a également été démontrée par (Onbasli et Asli, 2008).

11. Mise en évidence des activités enzymatiques :

11.1 Mise en évidence de l'activité lipolytique :

Après l'incubation pendant 96 h les résultats ont révélés une absence d'hydrolyse par les 8 *Pseudomonas* sauf avec l'isolat N°9 (Figure24) qui était positive et qui est définie par la formation d'une zone trouble de 1cm de diamètre autour de la colonie et donc une activité lipolytique a été effectuée qui veut dire qu'une réaction d'hydrolyse du triacylglycérol en acide gras et glycérol. (Zallot, 2011)

Dans les méthodes d'observation directe montrées dans la littérature, la formation de zone claire ou opaque autour du puits voire ou la production de cristaux sur la surface de la gélose indique la présence d'une activité lipolytique (Shelley *et al.*, 1987). Selon l'étude de Benattouche *et al.* (2011) Six isolats de genre *Pseudomonas* (Ps1, Ps2, Ps3, Ps4, Ps5 et Ps6) des eaux uséesensemencés sur un milieu sélectif gélosé contenant du tween 80 ou de l'huile d'olive comme seule source de carbone. Le résultat a montré que toutes pouvaient produire l'enzyme lipase et que l'isolat Ps5 a montré une activité lipolytique la plus élevée qui a ensuite été identifié comme *Pseudomonas aeruginosa*.

Dans autre étude de Boumhandi *et al.* (2018) 84 souches bactérienne entre gram + et négative (-) étaient étudié L'activité lipolytique des isolats a été détectée par la révélation de zones d'hydrolyse autour des colonies poussant sur du TSA additionné de 1 % de Tween 80 (w/v) les résultats pour les *Pseudomonas*. (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. luteola* étaient positive).

Le screening primaire a permis de constater différents genres bactériens responsable de la production d'enzyme lipase dont les principaux sont les suivant : *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* (Godfrey *et al.*, 1996 ; Burgess *et al.*, 2010).

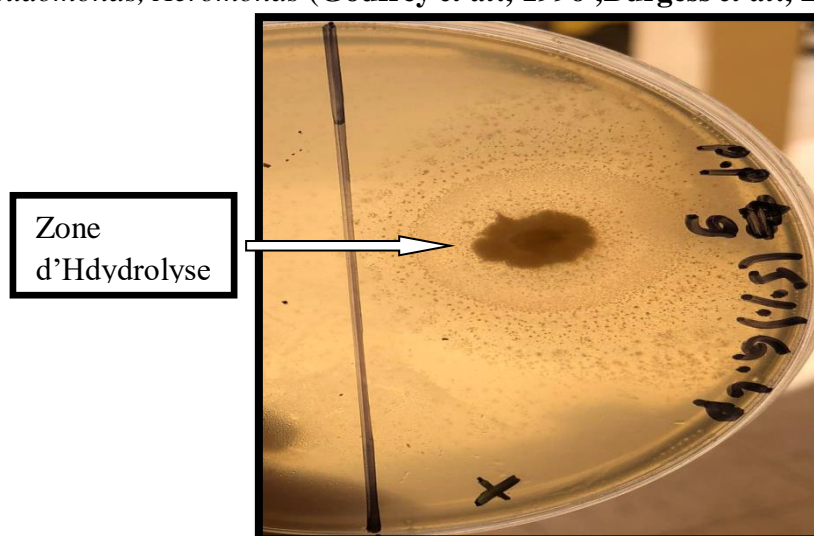


Figure24 : Activité enzymatique lipolytique de *Pseudomonas* (isolat9)

11.2 Mise en évidence de l'activité amylolytique :

L'étude a montré que l'isolat 3 a produit une zone de lyse de 0,5 cm (5mm) de diamètre autour de la colonie, par contre les autres souche (1,5,6,9,10,13,14) n'ont montré aucun effet .

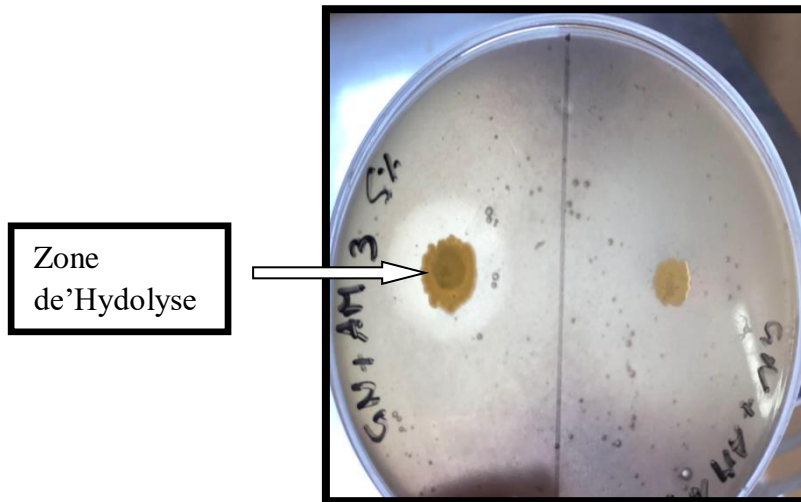


Figure 25 : Activité enzymatique amylolytique de *Pseudomonas* (Isolat 3)

La formation d'une zone claire autour de la colonie montre la capacité de la souche 3 à produire l'enzyme amylase, car ils peuvent hydrolyser l'amidon en un composé plus simple.

L'hydrolyse de l'amidon par l'amylase, entrainera l'amidon hydrolysé qui ne formera pas de couleur bleu autour de la colonie et formera une zone claire, l'absence de zone claire autour des colonies indique une réaction entre les réactifs iodés et les amidons non hydrolysés (**Risandi et al., 2019**).

On accord avec l'étude de Boumhandi1 *et al* (2018) 84souches bactérienne entre gram + et négative (-) étaient étudiée . la présence de l'activité amylolytique sur boite a été déterminée par inondation des cultures sur TSA contenant 0,5 % (w/v) d'amidon soluble et 5 % de NaCl, avec une solution de lugol . Les résultats de cette étude ont indiqué que les *Pseudomonas* de cette étude (*P.aeruginosa* ,*P.fluorescens*,) ne dégradait pas l'amidon .

11.3 Mise en évidence de l'activité protéolytique :

En utilisant un milieu au lait gélosé, Les résultats obtenus après l'incubation donne une zone d'hydrolyse de 1cm de diamètre permettant la mise en évidence de l'activité protéolytique chez un seul isolat seulement (Isolat 10) sur l'ensemble des 8 isolats utilisés dans cette expérience.

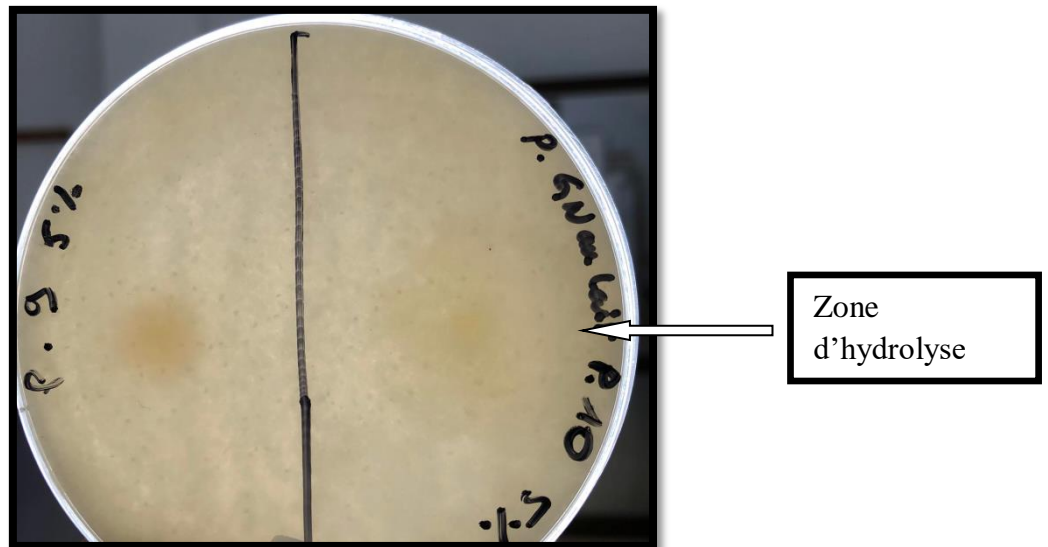


Figure 26 : Activité protéolytique de *Pseudomonas* (Souche 10)

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Boumhandi1 *et al* (2018) où l'activité protéolytique des isolats a été révélée dans un milieu TSA (Difco, Détroit, USA) salé contenant 50% de lait écrémé et 5% de NaCl (w/v). Les résultats indiquaient un effet négatif des *Pseudomonas* étudiés sauf une souche qui a montré une activité protéolytique.

Conclusion :

Conclusion

Le travail présenté ci-dessus a pour but d'isoler des *Pseudomonas* fluorescents provenant d'un milieu marin qui ont le pouvoir de produire certains métabolites secondaires ou quelques substances antimicrobiennes qui peuvent être antagoniste, antibactérien et antifongique et cela à travers des différents tests *in vitro*.

Notre étude expérimentale a commencé par un isolement des *Pseudomonas* à partir d'un échantillon de sable marin de la plage de « Sidi El-Majdoub-Mostaganem » sur un milieu King qui favorise la production d'un pigment jaune verdâtre fluorescent.

D'un autre côté nous avons obtenu des souches tests « *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa* » du laboratoire médical du C.H.U Oran» et une levure « *C.albicans* » du laboratoire de microbiologie de l'université de Mostaganem « *C.albicans* ».

Dans cette étude nous avons aussi procédé à l'identification des *Pseudomonas* isolées, commençant par la coloration de Gram qui nous a permis de s'assurer que ces bactéries sont Gram négatif de forme bacillaire. Les 8 isolats sélectionnés de *Pseudomonas* ont été rapprochés à *P.fluorescens* par des tests phénotypiques. Nous avons ensuite constaté que la concentration en NaCl a un effet notable sur la croissance et la production de métabolites des *Pseudomonas*. Sur les milieux contenant 1.5% et 2.5% d'NaCl la croissance était optimale par contre sur les milieux contenant 7.5% et 9% il n'y a pas eu de croissance et en conséquence pas de production de métabolite secondaire.

Le test de confrontation entre les *Pseudomonas* et les souches test sur Mueller-Hinton et sur king B a permis d'obtenir des zones d'inhibition relativement faibles variant d'un isolats à un autre,

Une autre étape avait pour objectif de mettre en évidence les activités enzymatiques des *P.fluorescens* isolés. Quelques isolats ont montré une activité soit lipolytique, amylolytique ou protéasique. Ceci indique la variabilité génétique entre les isolats obtenus et par conséquent leur comportement métabolique qui diffère d'une souche bactérienne à une autre.

Les résultats présentés dans ce travail démontrent que le monde marin peut être une source de substances bénéfiques et que le stress salin peut induire chez les bactéries la production de métabolites secondaires tels que la pyoverdine chez les *P.fluorescens*, les antibiotiques et les enzymes.

Ce travail à aspect descriptif mérite d'être approfondi par plus de moyens et plus de temps pour pouvoir dévoiler les richesses de ce monde de bactéries marines et montrer son intérêt biotechnologique pour des applications dans les divers domaines.

- Abdallah M.A., et Pattus F. (2000).** Siderophores and Iron-transport in Microorganims. J.Chin Chem Soc, 47 : 1-20.
- Abolfazl, A., R.H. Zabihi, S. Movafegh et A.A.M Hossein (2009).** The efficiency of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of two varieties of wheat in salinity condition. Am. Eurasian J. Sustain. Agric., 3(4): 824–828
- Achkar J., Xian M., Zhao H et Frost J. W. (2005).** Biosynthesis of phloroglucinol. J. Am.Chem. Soc. 127, 5332–5333.
- Attoura Fatma.,(2019)** Contribution à l'étude de la pyocyanine pour un usage thérapeutique contre quelques microorganismes pathogènes
- Avril J. M., Dabernat H et Monteil D. H. (2000).** Bactériologie clinique. 3éme Ed. EdEllepses. Paris. 602 P.
- BakkalSuphan., Sandra M ., Margaret A. (2012)** :Bacteriocins of AquacticMicroorganismes and their potential application in the seafoodIndustry.carvalho.edmir .in tech.978-953.
- Bataiche I. (2014).** Recherche de nouvelles potentialités de *Yarrowia lipolytica*, isolé de différents milieux naturels pour des applications biologiques. Thèse de doctorat en Microbiologie, Université Frères Mentouri Constantine1.
- Budzikiewicz, H., 1993.** Secondary metabolites from *fluorescent pseudomonads*. *FEMS Microbiol. Rev.* 104: 209–228.
- Bartlett, D.H., M. Roberts (2004)** Osmotic stress, p. 754-766. In M. Schaechter (ed.), *The desk encyclopedia of microbiology*, Elsevier. Academic Press. Canada.
- Bisen P. S. and K. Verma. (1998).** “Hand Book of Microbiology”. New Delhi: 1 st Ed., CBS Publishers and Distributors, 16-28.
- Balouiri M, Sadiki M et Ibnsouda SK, (2016).** Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity : A review. *Journal Of Pharmaceutical Analysis.* Vol : 6 : 71-79
- Bornscheuer, U.T. (2002).**Microbial carboxyl esterases :classification,properties and application in biocatalysis.FEMS Microbial Rev.26 :73-81
- Chin-A-Woeng T.F., Bloemberg G.V., et Lugtenberg B.J., (2003).** Phenazines and their role in biocontrol by Pseudomonas bacteria. *New. Phyto,* 157 :503-523.
- Carcanague, D.R., 1997.** Novel derivatives of pseudomonic acid. *Bioorganic Medicinal Chem.Lett.* 7(21): 2805-2808.

Chain E.B et Mellows G. (1977) Pseudomonic acid, part 1, The structure of pseudomonic acid A, a novel antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *J Chem Soc Perkin Trans I*:294e309.

Cardozo V.F., Oliveira A.G., Nishio E.K., Perugini M.R., Andrade C.G., Silveira WD, Durán N., Andrade G., Kobayashi RK and Nakazato G. (2013) Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. Vol: 12 (12):1-8.

Cripwell, R. A., van Zyl, W. H., & Viljoen-Bloom, M. (2020). Fungal Biotechnology : Fungal Amylases and Their Applications. In *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21082-0>

Cousin D., Matagne A., Laemmli U. K. & Stewart D. J. (1982). The purification of neutral bacterial proteases *Pseudomonas fluorescens*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34. 1157-1166.

Dancer, S. J. (2009). "Measuring the effect of enhanced cleaning in a UK hospital: a prospective cross-over study". *BMC Medicine* 7:28

Dakhmouche-Djekrif, S. (2016). *Production et caractérisation de l'amylopullulanase de la levure Clavispora lusitaniae ABS7 isolée de blé cultivé et stocké en zones arides* [Thèse doctorat]. Université de Technologie de Compiègne.

Davies DG and Marques CNH, (2009). A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms. *Journal of Bacteriology*. Vol: 191(5): 1393-1403.

Défago, G., Berling, C.H. and Burger, U., 1990. Suppression of Black Root Rot of Tobacco and Other Root Diseases by Strains of *Pseudomonas fluorescens*: Potential Applications and Mechanisms. In: *Biological Control of Soilborne Plant Pathogens*. Hornby D, (ed). Oxon, UK: CAB International, Wellingford, pp. 93–108.

Denis F., Poly M., Martin C., Bingen E., Quentin R. (2011) *Bactériologie Médicale : Techniques Usuelles*. Elsevier Masson, France.

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

Dubuis, C. and Haas, D., 2007. Cross-species GacA-controlled induction of antibiosis in pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 650-654.

Dwivedi, D. and Johri, B.N., 2003. Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation. *Curr. Sci.* 85(12): 1693-1673.

Dwivedi, D., and B. N. Johri. 2003. Antifungals from fluorescent pseudomonads: Biosynthesis and regulation. *Current Science* 85:1693-1703.

Elander, R.P., Mabe, J.A., Hamili, R.H. and Gorman, M., 1968. Metabolism of tryptophane by *Pseudomonas aureofaciens*. VI. Production of pyrrolnitrin by selected *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol.* 16:753-758.

El-Sayed, A.K., Hothersall, J. and Thomas, C.M., 2001. Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB10586. *Microbiol.* 147: 2127-2139.

Espinosa-Urgel M, Kolter R, Ramos JL (2002) Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiology* 148:341–343.

Eyquem A., Montgnier L. (2000) *Traité de microbiologie clinique : deuxièmes mises à jour et compléments.* PICCIN, Itali, 238p.

Ferreira, A., Cahú, T., Xu, J., Blenow, A., & Bezerra, R. (2021). A highly stable raw starch digesting α -amylase from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) viscera. *Food Chemistry*, 354, 129513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129513>

Frazier W. C. (1967). *Food microbiology.* Academic presse. London. P: 3-429.

Fickers P, Destain J, Thonart P. (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 119-130.

Gaenssle, A. L. O., van der Maarel, M. J. E. C., & Jurak, E. (2020). Reliability factor for identification of amylolytic enzyme activity in the optimized starch-iodine assay. *Analytical Biochemistry*, 597, 113696. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113696>

Galan B, Diaz E, Garcia JL (2000). Enhancing desulphurization by engineering a Flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts. *Environ Microbiol* 2:607–694.

Gao S.S., Hothersall J., Wu J., Murphy A. C., Song Z., Stephens E. R., Thomas C. M., Crump M.P., Cox R.J., Simpson T. J., et Willis C. L. (2014). Biosynthesis of Mupirocin by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586 Involves Parallel Pathways. *Journal of the American Chemical Society*, 136(14), 5501-5507.

Garrity G.M. (2005). The Proteobacteria - Part B: The Gammaproteobacteria. In 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'. (Springer: New York).

Gonçalves Filho D, Gonçalves S, Zanella Guidini C. (2019). Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103:7399–7423.

Gupta R., Gigras P., Mohapatran H., Goswami K.V., Chauhan B. (2003). Microbial

α - amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem* 38: 1599-1616.

Haas, D., and C. Keel. 2003. Regulation of antibiotic production in rootcolonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathology* 41:117-153.

Hammer, P.E., Hill, D.S., Lam, S.T., Van Pee, K.H. and Ligon, J.M., 1997. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2147-2154.

Houat et Maraf .,2021 Estimation de l'effet du stress sur la production de quelques composés pharmaceutiques chez les *Pseudomonas* fluorescents.

Haynes W.C., Stodola F.H., Locke J.M., Pridham T.G., Conway H.F., Sohns V.E et Jackson R.W. (1956). *Pseudomonas aureofaciens* Kluver and phenazine alpha-carboxylic acid, its characteristic pigment. *Journal of Bacteriology* 72:412-417.

Hildebrand D.C., Schorth M.N Et Sand D.C.(1988) *Pseudomonas* spp 60-77. In Shaad, N.W.E.D. Laboratory guide for identification of plant pathogène bacteria .2nd .ST. Pael. Minnosota. PPS.industriel des cadres.14p.

Homma, Y., Kato, Z., Hirayama, F., Konno, K., Shirahama, H. and Suzui, T., 1989. Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biol. Biochem.* 21:723-728.

Howell, C.R. and Stipanovic, R.D., 1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping off of cotton seedling by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, Pyoluteorin. *Phytopathol.* 70: 712-715

Islam M.T., et Fukushi Y. (2010). Growth inhibition and excessive branching in *Aphanomyces cochlioides* induced by 2,4- diacetylphloroglucinol is linked to disruption of filamentous actin cytoskeleton in the hyphae. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:1163–1170.

Jaeger K. E., Ransac S., Dijkstra B. W., Colson C., Heuvel M. V & Misset O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiology reviews.* 15:29-63.

Kapali S., Gade R. M., Shitole A. V And Aswathi S. (2016) Isolation and Characterization of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and their in vitro Evaluation, *Advances in Life Sciences* 5(16), 5857.

Keel C ., Shnider U., Maurhofer M ., Voisard C ., Laville J ., Burger U ., Wirthner P ., Haas D ., et Défago G ., 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0- importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 5 :4-13 .

Kimura Y., Kawasaki S., Yoshimoto H., Takegawa K (2010) Glycine betaine biosynthesized from glycine provides an osmolyte for cell growth and spore germination during osmotic stress in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol*, 192, 1467–1470.

King E.O., Ward M. Et Raney D.E.J. (1954) *J. Lab. Clin. Méd*, 44, p. 301.

Kirner S., Hammer P.E., Hill D.S., Altmann A., Fischer I., Weislo L.J., Lanahan M., van Pée K.H et Ligon J.M.. (1998) Functions encoded by Pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology* 180(7):1939-1943.

Kumar A.G., Nagesh N., Prabhakar T.G., Sekaran G. (2008a). Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresour. Technol.*, 99; 2364–2372

Larsen J.B. et Nielsen J. (2004). *Chem. Rev.* 104, 1663–1685

Lepoivre P. (2003) *Phytopathologie : De Boeck*.Ed. 482p.

LOPER J.E., BUYER J.S.,1991.Siderophores in microbial interaction on plant surfaces.*Mol.Plant –Microbe.Interact.*4 :5-13

Loyer, J.Y (1991) Classification des sols salés : les sols salic. *Cah. Orston. sér. Pédol.* 26: 51 61

Le Rudulier, D., K. Mandon., L. Dupont., et J.C. Trinchant (2002). Salinity effects on physiology of soil microorganisms, p. 2774-2789. In G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology*. Wiley-Interscience Publication. Canada.

Mahajan-Miklos, S., Tan, M. W., Rahme, L. G. & Ausubel, F. M. (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa-Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96, 47–56.

Martin, C. (2007). Bacilles à Gram négatif non fermentaires. *In* : Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R. *Bactériologie médicale: Techniques usuelles*. Ed Elsevier Masson Paris. P : 330-343.

Martineau Annie (2009) Isolement et caractérisation de bactériophages comme moyen de lutte naturel contre les infections nosocomiales Mémoire en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.) en Microbiologie et Immunologie. Faculté Des Etudes Supérieures.

Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Metraux, J.P. and Défago, G., 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathol.*84: 139–146.

Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C., Haas, D. and Défago, G., 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. *Phytopathol.* 82(2): 190–195.

- Mazzola, M., Cook, R. J., Thomashow, L. S., Weller, D. M. & Pierson, L. S. 3rd. (1992).** Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent *pseudomonads* in soil habitats. *Appl Environ Microbiol* 58, 2616-2624.
- Meksem A. (2010).** Etudes structurales et fonctionnelles des récepteurs TonB-dépendant de bactéries à Gram-négatif. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Strasbourg, Discipline : Science du vivant Spécialité : Aspects Cellulaires et Moléculaires de la Biologie. Pp : 14-79.
- Meyer J.M. (2000).** Pyoverdines: Pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch.Microbiol*, 174 : 135- 142.
- Najjar A. (2010).** Etude quantitative de la sécrétion de lipase, de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence de huile de olive. Thèse. Microbiologie et Biotechnologies.
- Naïma BOUM'HANDI ., Fayssal ELFILALI ., Brahim BOUALOUCH ., Said HANOUNE ., Mouna MIRI ., Abdessamad EL BARKAOUI (2018)** Biodiversity of moderate halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes
- Nowak-Thompson, B., Gould, S.J. and Loper, J.E. (1997).** Identification and sequence analysis of the genes encoding a polyketide synthase required for pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Gene*, 204:17–24.
- Onbasli D and Aslim B. (2008)** Determination of antimicrobial activity and production of some metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* B1 and B2 in sugar beet molasses. *African Journal of Biotechnology*.Vol: 7 (24):4614-4619.
- Parte AC (2014)** LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res* 42:D613–D616.
- Pelmont J. (1995).** Enzymes catalyseurs du monde vivant. Presses Universitaire de Grenoble. Sciences Technologie Médecine, Grenoble. Paris. P. 619-655.
- Pitmani, M. G., et A. Lauchli (2004)** Global impact of salinity and agricultural ecosystems,p.3-20. In A. Läuchli, et U. Lüttig (ed.), *Salinity :Environment-plants-molecules*. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
- Pocard J.A., L.T. Smith, G.M. Smith, et D. Le Rudulier (1994)** A prominent role for glucosylglycerol in the adaptation of *Pseudomonas. mendocina* SKB70 to osmotic stress. *J. Bacteriol.* 176: 6877–6884.

Prabhakaran P, Puthumana J, Neil SC, Balachandran (2014). Antagonistic effect of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from various ecological niches on *Vibrio* species pathogenic to crustaceans. *J. Coast Life Med* 2(1), 76-84.

Prescott, L., J.P. Harley, D.A. Klein (1995) "Microbiologie." De Boeck Université, Bruxelles, 711-712.

Prescott L.M., Woolverton C., Willey J., Klein D.A., Harley J.P., Sherwood .L.(2010) Microbiologie 3ème Édition, Ed De Boeck Supérieur, pp. 132-142.

Raaijmakers J.M Magnin-Robert M.,2007.Protection de la vigne contre botrytis cinerea et stimulation des mécanismes de défense à l'aide de bactéries issues du vignoble champenois .Thèse Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne Discipline :Biologie des organismes.Pp :32

Roussel-Delif L., Tarnawski S., Hamelin J., Philippot L., Aragno M Et Fromin N. (2005) Frequency and diversity of nitrate reductase genes among nitrate dissimilating *Pseudomonas* in the rhizosphere of perennial grasses grown in field conditions. *Microb. Ecol.* 49, 63-72.

Ruchi G, Anshu Gupta, Khare SK. (2007). Lipase de la souche *Pseudomonas aeruginosa* tolérante aux solvants : optimisation de la production par la méthodologie et l'application de la surface de réponse. *Bioresour Technol*, 99: 4796–4802.

Santos SR, Ochman H (2004) Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. *Environ Microbiol* 6:754–759.

Scriban. R. 1999. Biotechnologie. 5eme édition technique et documentation. Lavoisier. Paris. P. 149-159.

Sleator, R.D., C. Hill (2001). Bacterial osmoadaptation : the role of osmolytes bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 49-71.

Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrenner P., Hickey M.J., Brinkman F.S., Hufnagle W.O., Kowalik D.J., Lagrou M., Garber R.L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L.L., Coulter S.N., Folger K.R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G.K., Wu Z., Paulsen I.T., Reizer J., Saier M.H., Hancock R.E., Lory S., Olson M.V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*;406 (6799)959-64.

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* 56:908-912.

Troppens D.M., Jennifer A., Barret M.M., Fergal O., Morrissey J. P. (2013). Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere, Volume 2, First Edition. Edited by Frans J. de Bruijn. Inc. Published 2013 by John Wiley & Sons, Chapter 56, p 595.

Vacheron J., Moenne-Loccoz Y., Dubost A., Gonc Calves Martins M., Muller D., and Prigent-Combaret C. (2016) Fluorescent *Pseudomonas* Strains with only few plantbeneficial properties are favored in the maize rhizosphere. *Front Plant Sci* 7: 1–13.

Wang, Y., Wilks, J. C., Danhorn, T., Ramos, I., Croal, L. & Newman, D. K. (2011). Phenazine- 1- carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition. *J Bacteriol* 193, 3606-3617.

Wang R., Mast Y., Wang J. (2012) Identification of twocomponent system AfsQ1/Q2 regulon and its cross-regulation with GlnR in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 87:30–48. doi:10.1111/mmi.12080.

Wang, Y., Hu, H., Ma, J., Yan, Q., Liu, H., & Jiang, Z. (2020). A novel high maltose-forming α -amylase from *Rhizomucor miehei* and its application in the food industry. *Food Chemistry*, 305, 125447. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125447>

Weller, D.M., Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Schroeder, K.L., de la Fuente, L., Blouin-Bankhead, S.B., Allende-Molar, R., Bonsall, R.F., Mavrodi, D.V. et Thomashow L.S. (2007).Role of 2,4- diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant Biology*, 9: 4-20.

Wilson, R., Sykes, D. A., Watson, D., Rutman, A., Taylor, G. W. & Cole, P. J. (1988). Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium. *Infect Immun* 56, 2515-7.

Wilson, M. 1997. Biocontrol of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: Current approaches and future prospects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19:188-191.

Yamamoto S, Kasai H, Arnold DL, Jackson RW, Vivian A, Harayama S (2000) Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* 146:2385–2394.

Zallot R. (2011). Identification et caractérisation d'une lipase exprimée pendant l'hydrolyse des réserves chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse de doctorat en Biologie Végétale, L'université bordeaux 2. n° 1840.

Zhang L., Tian X., Kuang S.H., Liu G., Zhang C.H and Sun C.H. (2017). Antagonistic Activity and Mode of Action of Phenazine-1-Carboxylic Acid, Produced by Marine Bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA31x, Against *Vibrio anguillarum* In vitro and in a Zebrafish In vivo Model. *Frontiers in Microbiology*. Vol: 8 (289) :1-9.

Ziri Mohammed Abderrahmane.,(2013) Etude éco-bactériologique et enzymatique de quelques zones humides classées en convention internationale de Ramsar de la région biogéographique d'Oran (Lac Télamine et Lagune du Macta) et de Bechar (Barrage de Djorf torba).

Zouaoui B, Bouziane A (2011) Isolation, Optimisation and Purification of Lipase Production by *Pseudomonas Aeruginosa*. *J Biotechnol Biomaterial* 1:120. doi:10.4172/2155-952X.1000120.

Annexe

Gélose nutritive	Bouillon nutritif
Peptone.....10g Extrait de levure.....3g Extrait de viande.....3g Le chlorure de sodium.....5g Agar.....15 g pH = 7.4	Peptone.....10g Extrait de levure.....3g Extrait de viande.....3g Le chlorure de sodium.....5g pH = 7
Milieu King A solide	Milieu King B solide
Peptone.....10g Glucose5g Sulfate de potassium5g Chlorure de magnésium.....0,79g pH = 7,4	Peptone de caséine20 g Sulfate de magnésium1,5 g Phosphate bi-potassique.....1,5 g Glycérol10 ml Agar20 g pH =7,2
Milieu Muller-Hinton solide (g/l)	
Extrait de viande:3g Peptone de caséine:..... 17,5 g Amidon:1,5 g Agar:16 g pH = 7,4	