

Université Abdelhamid Ibn  
Badis-Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**ABDELOUAHED ISMAIL**

Pour l'obtention du diplôme de

**Master en biologie**

**Spécialité : Biotechnologie des microorganismes**

### THÈME

**Etude de l'effet de la température et du pH sur  
l'activité antimicrobienne des métabolites secondaire  
sécrété par Pseudomonas aeruginosa isolé des sols  
salins.**

Soutenu publiquement le        /        / 2016

Devant le Jury

Président	<b>MEKHALDIAEK</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. Mostaganem</b>
Examineurs	<b>NEMMICHE.S</b>	<b>M.C.A</b>	<b>U. Mostaganem</b>
Encadreur	<b>DJIBAOUI .R</b>	<b>M.C.A</b>	<b>U. Mostaganem</b>
Co- encadreur	<b>DAHAH.H</b>	<b>DOCTORANT</b>	<b>U. Mostaganem</b>

*Thème réalisé au Laboratoire de microbiologie, université de Mostaganem*

# *Remerciement*

*Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant et  
Miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience  
D'accomplir ce modeste travail.*

*En seconde lieu, nous tenons à remercier notre chère encadreur Monsieur Djibaoui  
Rachid pour ses précieux conseils sa confiance et son aide durant toute la période du  
travail*

*Un remerciement très particulier à monsieur Dahah Hicham qui ma Co-encadré et  
m'a beaucoup aidé pour réaliser ma partie pratique je vous remercie .*

*Notre vif remerciement pour les membres du jury à commencer  
Par Mekhaldi Abdelkader qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury.*

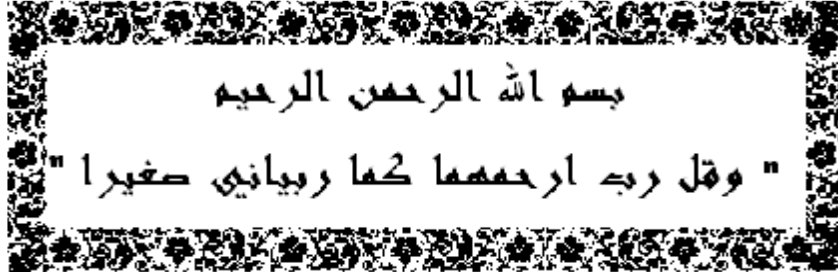
*A monsieur Nemmiche Saïd d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.  
Je les remercie profondément.*

Ces remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant  
contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

## DEDICACES

Je dédie ce travail à :

A mes chers parents, nous n'oublions jamais vos sacrifices j'espère qu'ils seront fier de  
moi



A mes grands parents

A mon frères Larbi et son épouse

A mon frère Hicham

A ma chère sœur Amina

A tous mes enseignants

A tout la famille Abdelouahed

A mes chères amies Bachir, Abdallah, Mohamed et tous mes amis, pour tous les

Moments qui nous avons partagé.

## الملخص:

تعتبر *Pseudomonas aeruginosa* نوع من البكتيريا سالبة الجرام، والتي تعيش في التربة والنباتات والسطوح المائية. والهدف من دراستنا هو استخلاص اثنين من المركبات الايضية الثانوية (pyoverdine و pyocyanine) التي تفرزها *Pseudomonas aeruginosa* ودراسة تأثير مضادات الميكروبات من pyocyanine ضد الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض. يتم استخراج هذه المادة مع اثنين من الوسط السائل King A و B مع الكلوروفورم والميثانول. تم اخضاع pyocyanine إلى نشاط مضاد الميكروبات ضد البكتيريا المسببة للأمراض مثل *S. aureus*، *C. albicans*، *E. coli*، و *B. cereus* و *Salmonella sp* باستخدام طريقة الاقراص. ووجدت الدراسة أن pyocyanine أظهرت وجود نشاط مضاد للميكروبات كبير ضد البكتيريا المسببة للأمراض.

كشفت دراسة تنوع الوسط المغذي ودرجات الحرارة الى علاقة مثالية بين زيادة درجة الحرارة وتركيز حموضة الوسط. تم الكشف عن أفضل إنتاج pyocyanine في وسط King A دو حموضة 7 بمعدل 45,51µg/ml في درجة حرارة 28 درجة مئوية. وتم الكشف عن أفضل إنتاج pyoverdine في وسط King B دو حموضة 7 بمعدل 60µg/ml في درجة حرارة 37 درجة مئوية.

الكلمات المفتاحية: *Pseudomonas aeruginosa*، pyoverdine، pyocyanine، حموضة، مضادات الميكروبات.

## Résumé :

*Pseudomonas aeruginosa*, est une bactérie gram négatif, qui vive aux sols, aux plantes et aux surfaces aqueuses. Le but de notre étude est d'extraire de deux métabolites secondaires (le pyocyanine et le pyoverdine) secrété par *Pseudomonas aeruginosa* et d'étudier l'effet antimicrobien du pyocyanine contre des microorganismes pathogènes. On extrait ces deux substance par milieu liquide King A et B avec du chloroforme et méthanol. Le pigment pyocyanine purifié a été soumis à une activité antibactérienne vers des pathogènes tels tests que *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *B. cereus* et *Salmonella sp* en utilisant la méthode de diffusion sur disque. L'étude a révélé que pyocyanine a montré une activité antimicrobienne significative contre les agents pathogènes de test.

L'étude de variation de composition des milieux de culture et les déférentes températures ont révélé une relation idéale entre l'augmentation de température et la concentration de Ph de milieu. La meilleure production de pyocyanine a été détectée sur le milieu King A de Ph 7 à raison de 45,51µm/ml à une température de 28°C. Et meilleure production de pyoverdine a été détectée sur le milieu King B de Ph 7 à raison de 60µm/ml à une température de 37°C.

**Mots clés :** *Pseudomonas aeruginosa*, pyocyanine, pyoverdine, pH, Activité antimicrobienne.

**Summary:**

*Pseudomonas aeruginosa* is a gram-negative bacterium that live in soil, plants and water surfaces. The aim of our study is to extract from two secondary metabolites (pyocyanine and pyoverdine) secreted by *Pseudomonas aeruginosa* and to study the antimicrobial effect of pyocyanin against pathogenic microorganisms. Liquid medium King A and B extract these two substances with chloroform and methanol. The purified pyocyanin pigment has been subjected to antibacterial activity to pathogens such as *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *B. cereus* and *Salmonella* sp using the disk diffusion method. The study found that pyocyanin showed significant antimicrobial activity against test pathogens.

The study of the compositional variation of the culture media and the deferent temperatures revealed an ideal relationship between the temperature increase and the pH concentration of the medium. The best production of pyocyanin was detected on the King A medium of pH 7 at 45.51µg/ml at a temperature of 28°C. And better production of pyoverdine was detected on the King B medium of pH 7 at a rate of 60 µg/ml at a temperature of 37°C.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, pyocyanin, pyoverdine, pH, Antimicrobial activity.

## **Listes des figures**

Figure 1 : Arbre phylogénique des *Pseudomonas* spp

Figure 2 : Biosynthèse des phénazines

Figure 3 : Phénazines produites par les différentes espèces de *Pseudomonas*

Figure 4 : Ensembles des gènes impliqués dans la biosynthèse des phénazines chez *Pa*

Figure 5 : L'effet de l'extrait brut (pyocyanine) sur les souches testées.

Figure 6 : L'effet de l'extrait brut (pyocyanine) sur les souches testées.

Figure 7 : L'effet du pH sur la production de pyocyanine à température 28 °C

Figure 8 : L'effet du pH sur la production de pyocyanine à température 30 °C

Figure 9 : L'effet du pH sur la production de pyocyanine à température 37 °C

Figure 10 : L'effet du pH sur la production de pyoverdine à température 28 °C

Figure 11 : L'effet du pH sur la production de pyoverdine à température 30 °C

Figure 12 : L'effet du pH sur la production de pyoverdine à température 37 °C

## **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Les espèces appartenant actuellement au genre *Pseudomonas*

Tableau 2 : L'effet inhibiteur de pyocyanine sur les souches pathogènes testées.

Tableau 3 : L'effet du pH sur la production de pyocyanine à température 28°C

Tableau 4 : L'effet du pH sur la production de la pyocyanine à 30°C

Tableau 5 : L'effet du pH sur la production de la pyocyanine à 37°C

Tableau 6 : L'effet du pH sur la production de la pyoverdine à 28°C

Tableau 7 : L'effet du pH sur la production de la pyoverdine à 30°C

Tableau 8 : L'effet du pH sur la production de la pyoverdine à 37°C.

## Liste des abréviations

ADN acide désoxyribonucléique

ADH : Arginine-déshydrogénase

ARN acide ribonucléique

APC : l'acide phénazine-1-carboxylique

Fe<sup>3+</sup> : Ion fer iii

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène

HCl : Acide chlorhydrique

ISR : Système de Résistance Induit

LDC : Lysine-décarboxylase

MEVAG : Milieu pour l'étude de la voie d'attaque des Glucides

ODC : Ornithine-décarboxylase

OHPHZ : 1-hydroxyphénazine

OHPCA : 2-hydroxyphénazine

OLED :organic light emission dispositif

ONPG : orthonitrophényl-galactose

P.a : *Pseudomonas aeruginosa*

PCN : phénazine-1-carboxamide

PGPB : Plant Growth Promoting Bacteria

Phz : phénazine

PYO : pyocyanine

SOD : superoxyde dismutase

SCV : Variantes petites colonies

TDA : tryptophane-désaminase

nm : nanomètre

µm : micromètr

# Sommaire

Remerciements	
Dédicace	
Liste des figures et des tableaux	
Liste des abréviations	
Résumé	
Introduction	

## Partie I : Synthèse bibliographique

### *Chapitre I : généralité sur les Pseudomonas*

1. caractéristiques de genre <i>Pseudomonas</i> .....	1
2. Taxonomie.....	2
3. Classification de genre <i>Pseudomonas</i> .....	3
3.1 Classification de genre <i>Pseudomonas</i> .....	4
3.1.1 Classification actuelle .....	4
3.1.2 Classification classique de PRIVORT .....	4
3.2.1. Étapes de la classification.....	4
3.2.2. Classification contemporaine.....	7
4. caractéristiques de genre <i>Pseudomonas</i> .....	8
4.1. Caractéristiques morphologique .....	8
4.2. Caractéristiques biochimiques.....	8
4.3. Caractéristiques phénotypiques .....	9
5. Écologie .....	9
6- L'importance du genre <i>Pseudomonas</i> .....	10
7. quelques souche de <i>Pseudomonas</i> .....	12
7.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	12
7.2. <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	13

## ***Chapitre II : Les Métabolites secondaires de Pseudomonas***

1-Définition .....	14
2-Métabolites secondaires chez les Pseudomonas spp.....	14
2-1-Les phénazines .....	14
2-1Généralités.....	14
2-1-2- Biosynthèse.....	15
2-1-3- Rôle chez les bactéries productrices.....	17
3- Pyocyanine .....	18
3-1 Généralités.....	18
3-2- Biosynthèse.....	18
4- Activité antimicrobienne .....	19
4-1-Activité antimicrobienne de pyocyanine vis-à-Vis les bactéries et les champignons.....	19
5- Pseudomonas aeruginosa .....	21
5-1-Effet de température et de pH sur la production de pyocyanine .....	21

## **Partie II : Etude expérimentale**

### ***Matériels et méthode***

1. L'obtention des souches.....	23
1.1. L'obtention des souches de références (souches tests).....	23
1.2. Obtention des souches antagonistes.....	23
1.3. Purification et conservation des souches.....	23
2. Production et extraction de substances antimicrobiennes.....	23
2.1. Production de la pyocyanine par l'utilisation du milieu King A.....	24
3. Activité antimicrobienne de la pyocyanine sur les souches pathogènes testées.....	24
3.1. Préparation de suspension bactérienne.....	24
3.2. Préparation de la solution d'antibiotique.....	24
3.3. Préparation des disques.....	25
3.4. L'application de la méthode de diffusion.....	25
4. Effet de température et de pH sur la production de pyocyanine.....	25

4.1. Dosage de la pyocyanine.....	26
5. Effet de température et de pH sur la production de pyoverdine .....	26
5.1. La quantification de la pyoverdine.....	26

***Résultat et discussion***

1. L'extraction de la pyocyanine.....	27
1.1.L'activité antimicrobienne et antifongique de l'extrait de la pyocyanine.....	27
2. Effet de la température et de pH sur la production de la pyocyanine.....	29
3. Effet de température et de PH sur la production de la pyoverdine.....	32

Conclusion

Référence bibliographique

Annexe

## Introduction

Le genre *Pseudomonas* est une bactérie 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 des animaux (Gross et Loeper, 2009) et beaucoup d'autres environnements. Les membres du genre *Pseudomonas* vivent dans une grande variété d'environnements, ce qui se reflète dans leur capacité métabolique polyvalente et large potentiel d'adaptation aux fluctuations des conditions environnementales. Ces 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 *Pseudomonas* sont bien connus par leur omniprésence dans le monde naturel, leur 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).

Parmi les métabolites secondaires produits par les *Pseudomonas* on trouve la pyocyanine qui est un pigment vert bleu soluble dans l'eau et le chloroforme à divers effets pharmacologiques (Ohfujii et al., 2004). Près de 90-95% des isolats de *P. aeruginosa* produit la pyocyanine. Il est produit dans le milieu King A ou il est stimulé par le sulfate de magnésium et le sulfate de potassium.

La Pyocyanine est un phénazine hétérocyclique contenant de l'azote. Il est considéré pour de nombreuses applications. Elle possède une caractéristique d'inhibition de la colonisation bactérienne et fongique à la fois in vivo et in vitro. L'antagonisme de *Pseudomonas* contre les vibrions pathogènes dans l'aquaculture a été identifié en raison de la production de la pyocyanine (pai et al., 2010). Elle est produite dans la rhizosphère des plantes ou elle contribue dans l'activité biologique de *P. aeruginosa* contre *Fusarium* (flétrissement du pois chiche) et *Pythium* (fonte des haricots) (Sudhakar et al., 2013).

En outre, le bioprocédé et le traitement en aval de pyocyanine ont été étudiés pour les applications de l'aquaculture (Priyaja et al., 2014). La Pyocyanine peut être également utilisée comme navette dans la pile à combustible microbienne (MFC) en permettant un transfert d'électrons vers l'anode bactérienne cellulaire (Pham et al., 2008). Elle pourrait être conjuguée

à des composés organiques et la formation de nouveaux complexes utilisés dans les dispositifs d'émission de lumière organiques (OLED) (Chen et Xiao-Chang ,2004).

Malgré les diverses applications, la pyocyanine synthétisé reste un composé coûteux sur le marché. Le présent travail tente d'optimiser les conditions de production de la pyocyanine pour un rendement maximale. Et aussi étudier son activité contre des germes pathogènes (Gram -, Gram + et champignons) par rapport à certains antibiotiques commerciaux utilisés dans des applications thérapeutiques.

## 1- caractéristiques de genre *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* sont des bactéries Gram négatif, aérobie stricte (À l'exception de certaines souches capables d'utiliser les nitrates comme accepteurs d'électrons) et non sporulantes. Elles sont mésophiles, chimioorganotrophes et possèdent un ou plusieurs flagelles polaires. Le terme *Pseudomonas* signifie « fausse unité » et provient du grec pseudo (Grec : ἰ|/εοὸ « faux ») et monas (Grec : μονὰς/μονὸς « unité »). À l'origine ce groupe comprenait tous les germes que l'on ne savait pas classer. Aujourd'hui, grâce aux avancées en phylogénie, on différencie les *Pseudomonas* sensu stricto (Gamma-protéobactéries) des genres *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Acidovorax* et *Comamonas* (Initialement appelés *Pseudomonas* mais faisant partie des bêta-protéobactéries) (Haas et Defago, 2005). Les *Pseudomonas* sensu stricto constitue un groupe très hétérogène et comprend notamment *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens* et *P. syringae* (Haas et Defago, 2005). Les *P. fluorescens* et *P. putida* se retrouvent naturellement dans le sol. Plusieurs souches sont utilisées comme biopesticides en raison de leurs actions antagonistes envers plusieurs phytopathogènes.

Le genre *Pseudomonas* fait partie de la famille des Pseudomonadaceae qui contient des membres ubiquitaires. Ceux-ci sont reconnus pour leur diversité métabolique ainsi que leur caractère bioactif et leur capacité à coloniser agressivement un milieu (Aberoumand et al., 2010). Les espèces du genre jouent le rôle de phytopathogènes, pathogènes des animaux, agents de biocontrôle, agents de biorestauration et comme pourrisseurs alimentaires. Les pathogènes humains les plus communs sont *P. aeruginosa* ainsi que d'autres espèces capables d'hémolyse, ce qui est problématique dans le domaine clinique (Cappe et al., 1994). En ce qui concerne les phytopathogènes, ils font le plus souvent partie du sous-groupe *P. syringae*. Pour les agents de biocontrôle, *P. fluorescens* CHA0 et Pf-5, maintenant *Pseudomonas protegens*, constituent les espèces les plus étudiées contre les micromycètes parasitiques, notamment *Fusarium* sp. Ou *Pythium* sp. Et certains nématodes (Chin-A-Woeng et al., 1998). Chez les espèces présentant un potentiel en biorestauration, on retrouve *P. putida* capable d'utiliser le toluène (Cruden et al., 1992) et *Pseudomonas alcaligenes* qui dégrade les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Dagher et al., 1997). Finalement, en ce qui a trait aux pourrisseurs, *Pseudomonas fragi* et *Pseudomonas ludensis* causent une multitude de problèmes dans l'industrie alimentaire (Parker et Elliker, 1953).

Les bactéries de ce genre se retrouvent fréquemment dans plusieurs niches écologiques variées. Les pathogènes opportunistes sont souvent isolés à partir de cathéters médicaux et causent des problèmes de bactériémie chez de patients immunodéprimée (Marrie et Costerton,

1983). Le reste des membres du genre sont présents dans l'environnement, particulièrement dans la rhizosphère et dans le sol. Une autre niche colonisée par ces bactéries est l'environnement marin, plus précisément le matériel aquifère, les plantes marines et les sédiments au fond d'un point d'eau (Pipke et *al.*, 1992 et Thiem et *al.*, 1994).

## 2- Taxonomie

De par leur occurrence ubiquitaire dans la nature et leur croissance rapide en conditions de laboratoire, les *Pseudomonas* ont été remarqués et observés très tôt dans l'histoire de la microbiologie. Le terme *Pseudomonas*, créé uniquement pour ces nouveaux organismes, présentait les caractéristiques plutôt vagues que voici : « À Gram négatif, à respiration aérobie, mobiles par un flagelle polaire, ne produisent pas de spores et en forme de bacille » (Migula, 1894). La définition à plus tard fait l'objet d'une clarification grâce à l'ajout d'autres caractéristiques morphologiques, notamment la taille et certaines capacités métaboliques comme l'utilisation du nitrate (Palleroni, 1978).

Peu après l'invention du nouveau taxon, un grand nombre d'espèces lui fut ajouté. Au début du 20e siècle, un problème émergera quand le nombre de membres s'est approché de 1000 espèces différentes. La liste incluait malheureusement beaucoup d'espèces avec une description incomplète ou uniquement le nom de la plante arborant la souche (Choi et *al.*, 2008). Les premières tentatives de clarification du genre proviennent d'une thèse doctorale suggérant l'utilisation d'un spectre nutritionnel varié pour classifier les espèces (den Dooren, 1926). Il s'ensuivit le manuel de bactériologie systématique de Bergey utilisant les caractères biochimiques et morphologiques (Bergey et *al.*, 1923).

Du point de vue phénotypique, on peut diviser les espèces de *Pseudomonas* en deux groupes. Le premier contient les espèces capables de produire des pigments fluorescents à 260 nm tandis que les membres du deuxième groupe en sont incapables. Concernant la pathogénicité, une autre classification différencie les espèces pathogènes des non pathogènes. Le premier groupe contient donc les phytopathogènes tandis que le second recense les espèces saprophytes. Cette classification n'est pas très utilisée puisque plusieurs espèces du deuxième groupe sont des pathogènes opportunistes.

La taxonomie du genre s'améliora avec l'avènement des manipulations ADN-ADN pour détecter des similarités dans la séquence de deux organismes. Un peu plus tard, les résultats peuvent être confirmés par la procédure de cartographie S1-nucléase (Johnson et Palleroni, 1989). Ces deux techniques ont contribué à compliquer la classification, puisque plusieurs résultats n'étaient pas en accord avec les groupes phénotypiques préalablement établis. La grande hétérogénéité du génome des groupes suggérait un besoin urgent d'une révision exhaustive des groupements.

La classification actuelle dépend d'études d'hybridation d'ADN-ARN ribosomal, qui sépare maintenant le genre en cinq groupes distincts (Palleroni et al., 1973). Le nom *Pseudomonas* est maintenant réservé au groupe ARNr 1 qui inclut l'espèce type *Pseudomonas aeruginosa*. Les membres de ce groupe sont également classés selon des comparaisons des séquences des gènes *gyrB* et *rpoD*, ce qui a permis la création de deux regroupements nommés IGC I et IGC II (Yamamoto et al., 2000). Le premier ensemble, soit IGC I, regroupe des *Pseudomonas fluorescents* et non fluorescents incluant *P. aeruginosa*. Le second regroupement, IGC II, contient uniquement des *Pseudomonas fluorescents* incluant *P. fluorescens*. Cette dernière espèce est encore sous-divisée en trois complexes, soit *P. putida*, *P. syringae* et *P. fluorescens*. Le complexe *P. fluorescens* est ensuite séparé en quatre biotypes (A, B, C et G), qui sont assez distincts du type *Pseudomonas chlororaphis* (Bergey et al., 1923 et Stanier et al., 1966).

### **3 – Classification de genre *Pseudomonas***

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

#### **3.1 Classification de genre *Pseudomonas***

##### **3.1.1 Classification actuelle**

Domaine : Bactérie

Phylum : Proteobacteria

Classe : Gammaproteobacteria

Ordre : Pseudomonadales

Famille : Pseudomonadaceae

Genre : *Pseudomonas*

### **3.1.2 Classification classique de PRIVORT**

Règne : Bactérie

Division : Proteobacteria

Classe : Gammaproteobacteria

Ordre : Pseudomonadales

Famille : Pseudomonadaceae

Genre : *Pseudomonas*

#### **3.2.1. Étapes de la classification**

En 1960 Stanier et al. Dans une approche de clarification de la taxonomie du genre, ont publié un travail reportant les caractéristiques nutritionnelles de 267 isolats du genre ; basé sur l'utilisation de 146 composés organiques, en plus d'autres tests considérés comme déterminants dans la classification du genre. Dans la même décennie, la découverte du caractère de renaturation de l'ADN par Marmur, a permis de confirmer la classification phénotypique des *Pseudomonas*, par les essais d'hybridation ADN/ADN (Colwell et Mandel, 1964; Colwell et *al.*, 1965; Johnson et Ordal, 1968).

Le plus grand succès de la classification des *Pseudomonas*, selon les caractères génotypiques fût atteint par Palleroni et ses collaborateurs. Qui ont classifiés ce groupe bactérien en cinq sous-groupes d'ARNr, sur la base d'homologies ARN/ADN (Palleroni et al, 1973). Toutefois ces sous classes d'ARNr sont phylogénétiquement trop éloignés, et finalement

seules les bactéries appartenant au groupe ARNr I sont retenues dans le genre *Pseudomonas* (Peix et al., 2009).

Pourtant dans l'édition de 1974 du Bergey's Manual, ces bactéries sont incluses dans la famille des Pseudomonadaceae. Leur classification repose sur des caractéristiques phénotypiques, seules la composition en G+C fussent rajoutées comme caractéristique génétique. Dans la première édition du Bergey's Manual, la classification basée sur les septomologies ARN/ADN fût incluse, mais le nombre d'espèces et les caractéristiques phénotypiques ont été maintenu (Palleroni, 1984).

Les principaux changements dans la taxonomie viennent de Woese, qui proposa de les classer et de les identifier en fonction de leurs ARN ribosomaux (Woese et al., 1984). Toutefois ce nouveau schéma d'identification n'a pas été pris en considération dans l'édition 1994 du Bergey's Manual. Pourtant, c'est la classification phylogénétique basée sur les gènes codant l'ARNr 16S, établie par Woese et al. (1984), qui a permis plus tard la subdivision par Kersters et al. (1996) des protéobactéries en 15 genres appartenant aux classes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  proposé par Stackebrandt et al. (1987).

En même temps, *Pseudomonas acidovorans* et *P. testosteroni* inclus dans le groupe ARNr III sont reclassifiés en 1987 dans le genre *Comamonas* (Tamaoka et al., 1987), alors que les espèces *P. flava*, *P. palleroni*, *P. taeniospiralis*, *P. pseudoflava* et *P. carboxydoflava* seront reclassifiés deux ans plus tard dans le genre *Hydrogenophaga* (Willems et al., 1989).

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

Les espèces du groupe ARNr III comme *P. facilis*, *P. delafieldii* et d'autres isolats cliniques sont désormais reclassifiés dans le genre *Acidovorax* (Willems et al., 1990), des espèces phytopathogènes comme *P. avenae* et *P. catleyae* ont aussi été reclassifiés dans ce genre (Willems et al., 1992). En effet, ces nouveaux genres sont inclus dans la classe des bêta-Protéobacteria, au même titre que *Burkholderia* (Yabuuchi et al., 1992) et *Ralstonia* (Yabuuchi

et al., 1995). Ces deux derniers genres proviennent de la reclassification des espèces du groupe ARNrII comme *P. cepacia* (désignée comme espèce type du genre *Burkholderia*) *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. caryophylli*, *P. gladioli*, *P. pickettii* et *P. solanacearum* (Yabuuchi et al., 1992, 1995).

Le groupe ARNr V, est phylogénétiquement le plus proche des vrais *Pseudomonas* (ARNr groupe I), *Xanthomonas maltophilia* réclassifié dans le genre *Stenotrophomonas* en 1993, mais appartenant à la classe des gamma-Protéobacteria (Palleroni et Bradbury, 1993).

Dans la première décennie du nouveau millénaire, la révision taxonomique la plus détaillée du genre *Pseudomonas* basée sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S, fût entreprise par Anzai et al. (2000). En analysant les séquences de 128 espèces de *Pseudomonas* (certaines sont des souches de références), ils ont conclu que 57 seulement appartenaient aux groupe des *Pseudomonas* sensu stricto ; la comparaison de 1073 nucléotides les a subdivisées en 7 classes :

-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. aeruginosa*.

Et le groupe des *P. pertucinogena*.

Depuis l'an 2000, la reclassification continue toujours (Tableau I). Plusieurs espèces étant mal classées comme *P. aureofaciens* et *P. aurantiaca* qui sont désormais des sous espèces du groupe *P. chlororaphis* (Johnson et Palleroni, 1989 ; Peix et al., 2007), qui compte actuellement trois sous espèces: *P. chlororaphis* subsp. *Chlororaphis* subsp. Nov. *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov. comb. Nov. et *P. chlororaphis* subsp. *Aureofaciens* subsp. nov, comb. nov. (Peix et al., 2007).

### **3.2.2. Classification contemporaine**

L'édition actuelle du Bergey's (Palleroni, 2005) compte de nombreuses méthodes utilisées dans la classification des *Pseudomonas*. Ces méthodes révèlent les efforts fournis pour la caractérisation des espèces de *Pseudomonas*, incluant la sensibilité à certains composés, les caractéristiques génétiques et écologiques, le pouvoir pathogène et la structure antigénique (Peix et al., 2009).

**Tableau 1** : Les espèces appartenant actuellement au genre *Pseudomonas* (d'après Euzéby, 2008 in Peix et al., 2009).

<i>P. abietaniphila</i> <sup>a</sup>	<i>P. cuatrocieneegasensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. mandelii</i> <sup>a</sup>	<i>P. pseudoalcaligenes</i> <sup>a</sup>
<i>P. aeruginosa</i> <sup>a</sup>	<i>P. delhiensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. marginalis</i> <sup>a</sup>	<i>P. psychrophila</i> <sup>b</sup>
<i>P. agarici</i> <sup>a</sup>	<i>P. duriflava</i> <sup>b</sup>	<i>P. marincola</i> <sup>b</sup>	<i>P. psychrotolerans</i> <sup>b</sup>
<i>P. alcaligenes</i> <sup>a</sup>	<i>P. extremorientalis</i> <sup>b</sup>	<i>P. mediterranea</i> <sup>c</sup>	<i>P. putida</i> <sup>a</sup>
<i>P. alcaliphila</i> <sup>b</sup>	<i>P. ficuserectae</i> <sup>a</sup>	<i>P. meliae</i> <sup>a</sup>	<i>P. reinekei</i> <sup>b</sup>
<i>P. amygdali</i> <sup>a</sup>	<i>P. flavescens</i> <sup>a</sup>	<i>P. mendocina</i> <sup>a</sup>	<i>P. resinovorans</i> <sup>a</sup>
<i>P. anguilliseptica</i> <sup>a</sup>	<i>P. flectens</i> <sup>a</sup>	<i>P. meridiana</i> <sup>c</sup>	<i>P. rhizosphaerae</i> <sup>b</sup>
<i>P. antarctica</i> <sup>b</sup>	<i>P. fluorescens</i> <sup>a</sup>	<i>P. migulae</i> <sup>a</sup>	<i>P. rhodesiae</i> <sup>a</sup>
<i>P. argentinensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. fragi</i> <sup>a</sup>	<i>P. mohnii</i> <sup>b</sup>	<i>P. sabulitngri</i> <sup>b</sup>
<i>P. asplenii</i> <sup>a</sup>	<i>P. frederiksbergensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. montelii</i> <sup>a</sup>	<i>P. salomonii</i> <sup>b</sup>
<i>P. avellanae</i> <sup>a</sup>	<i>P. fulva</i> <sup>a</sup>	<i>P. moorei</i> <sup>b</sup>	<i>P. savastanoi</i> <sup>a</sup>
<i>P. azotifigens</i> <sup>b</sup>	<i>P. fuscovaginae</i> <sup>a</sup>	<i>P. moraviensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. segetis</i> <sup>b</sup>
<i>P. azotoformans</i> <sup>a</sup>	<i>P. gelidicola</i> <sup>c</sup>	<i>P. mosselii</i> <sup>b</sup>	<i>P. simiae</i> <sup>b</sup>
<i>P. balearica</i> <sup>a</sup>	<i>P. geniculata</i> <sup>c</sup>	<i>P. mucidolens</i> <sup>a</sup>	<i>P. straminea</i> <sup>a</sup>
<i>P. beteli</i> <sup>c</sup>	<i>P. gessardii</i> <sup>a</sup>	<i>P. multiresinivorans</i> <sup>a</sup>	<i>P. stutzeri</i> <sup>a</sup>
<i>P. borbori</i> <sup>b</sup>	<i>P. graminis</i> <sup>a</sup>	<i>P. nitroreducens</i> <sup>a</sup>	<i>P. synxantha</i> <sup>a</sup>
<i>P. boreopolis</i> <sup>b</sup>	<i>P. grimontii</i> <sup>b</sup>	<i>P. oleovorans</i> <sup>a</sup>	<i>P. syringae</i> <sup>a</sup>
<i>P. brassicacearum</i> <sup>b</sup>	<i>P. guineae</i> <sup>b</sup>	<i>P. orientalis</i> <sup>a</sup>	<i>P. taetrolens</i> <sup>a</sup>
<i>P. brenneri</i> <sup>b</sup>	<i>P. halophila</i> <sup>a</sup>	<i>P. oryzihabitans</i> <sup>a</sup>	<i>P. thermotolerans</i> <sup>b</sup>
<i>P. caeni</i> <sup>b</sup>	<i>P. indica</i> <sup>b</sup>	<i>P. otitidis</i> <sup>b</sup>	<i>P. thivervalensis</i> <sup>b</sup>
<i>P. cannabina</i> <sup>a</sup>	<i>P. japonica</i> <sup>b</sup>	<i>P. pachastrellae</i> <sup>b</sup>	<i>P. tolaasii</i> <sup>a</sup>
<i>P. caricapayae</i> <sup>a</sup>	<i>P. jessenii</i> <sup>a</sup>	<i>P. palleroniana</i> <sup>b</sup>	<i>P. tremae</i> <sup>a</sup>
<i>P. cedrella</i> <sup>a</sup>	<i>P. jinjuensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. panacis</i> <sup>b</sup>	<i>P. trivialis</i> <sup>b</sup>
<i>P. chloritidismutans</i> <sup>b</sup>	<i>P. kilonensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. panipatensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. tuomuerensis</i> <sup>b</sup>
<i>P. chlororaphis</i> <sup>a</sup>	<i>P. knackmussii</i> <sup>b</sup>	<i>P. parafulva</i> <sup>b</sup>	<i>P. umsongensis</i> <sup>b</sup>
<i>P. cichorii</i> <sup>a</sup>	<i>P. koreensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. peli</i> <sup>b</sup>	<i>P. vancouverensis</i> <sup>a</sup>
<i>P. cissicola</i> <sup>b</sup>	<i>P. libanensis</i> <sup>a</sup>	<i>P. pertucinogena</i> <sup>a</sup>	<i>P. veronii</i> <sup>a</sup>
<i>P. citronellolis</i> <sup>a</sup>	<i>P. lini</i> <sup>b</sup>	<i>P. pictorum</i> <sup>c</sup>	<i>P. viridiflava</i> <sup>a</sup>
<i>P. congelans</i> <sup>b</sup>	<i>P. lundensis</i> <sup>a</sup>	<i>P. plecoglossicida</i> <sup>b</sup>	<i>P. vranovensis</i> <sup>b</sup>
<i>P. corrugata</i> <sup>a</sup>	<i>P. lurida</i> <sup>b</sup>	<i>P. poae</i> <sup>b</sup>	<i>P. xanthomarina</i> <sup>b</sup>
<i>P. costantinii</i> <sup>b</sup>	<i>P. lutea</i> <sup>b</sup>	<i>P. pohangensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. xiamenensis</i> <sup>b</sup>
<i>P. cremoricolorata</i> <sup>b</sup>	<i>P. luteola</i> <sup>a</sup>	<i>P. proteolytica</i> <sup>b</sup>	<i>P. xinjiangensis</i> <sup>b</sup>

a : espèces incluses dans le Bergey's Manual (Palleroni, 2005) ; b : espèces décrites après la publication du Bergey's Manual (2005) ; c : espèces décrites avant la publication du Bergey's Manual (2005) qui n'ont pas été incluses dans cette édition mais dont les noms sont validés (d'après Euzéby, 2008 in Peix et al., 2009).

## 4- caractéristiques de genre *Pseudomonas*

### 4.1. Caractéristiques morphologique

Le groupe des *Pseudomonas* renferme des bacilles à Gram négatif, droits ou légèrement incurvés, de 0,5 à 1,0 µm de diamètre sur 1,5 à 5,0 µm (ou plus) de longueur, non sporulés,

le plus souvent dépourvus de granules de poly-bêta-hydroxybutyrate (quelques souches de *P. pseudoalcaligenes* et *P. corrugata* accumulent de l'acide poly-bêta-hydroxybutyrique comme matériel de réserve en fin de croissance exponentielle). Ces bactéries sont très généralement mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires même si certaines espèces telles que *P. mendocina* ou *P. stutzeri* présentent également des flagelles latéraux dans certaines conditions de culture.

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe  $\gamma$  des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Bossis et al., 2000 ; Palleroni et Moore, 2004). Cependant, depuis la découverte du genre *Pseudomonas* (Migula, 1894), beaucoup de noms d'espèces lui ont été assignés. Le nombre d'espèces a subi de nombreuses variations principalement dues à la description de nouvelles espèces et à divers changements de la définition du genre.

## 4.2. Caractéristiques biochimique

*Pseudomonas* n'est pas capable de fermenter les sucres mais peut les attaquer (le glucose en particulier) par voie oxydative, entraînant une acidification du milieu. Les milieux MEVAG (Milieu pour l'étude de la voie d'attaque des Glucides) ou de Hugh et Leifson sont spécialement destinés à mettre cette propriété en évidence.

La plupart des *Pseudomonas* possède une oxydase.

D'autres caractères sont utiles pour le diagnostic d'espèce :

Indole -, urée -, TDA - (tryptophane-désaminase), H<sub>2</sub>S -, gélatine +

ONPG - (orthonitrophényl-galactose)

Nitrate-réductase +

LDC - (Lysine-décarboxylase), ODC - (Ornithine-décarboxylase), ADH + (Arginine-déshydrogénase).

Le *Pseudomonas* est capable d'utiliser de nombreux substrats carbonés comme seule source de carbone et d'énergie : glucose, acide lactique, acide acétique, arginine, mannitol, citrate, malonate ... La réalisation d'un test d'assimilation des substrats carbonés ou auxanogramme est utile pour reconnaître l'espèce et différencier les biotypes.

### 4.3. Caractéristiques phénotypiques

Comprennent les tests tels que : la forme cellulaire, le type de flagelle, l'utilisation des sources de carbones tel que : les acides organiques, les polyols, les acides aminés, la capacité de croissance dans des conditions de culture variables, la synthèse d'exo-enzymes et la production d'antibiotiques (Palleroni, 2005).

## 5. Écologie

*Pseudomonas fluorescens* est une espèce commensale chez les plantes, leur permettant d'atteindre les éléments nutritifs indispensables à sa croissance.

Cette espèce est connue pour son aptitude à réduire l'incidence des maladies racinaires des plantes, ainsi qu'à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes (Gao et al., 2012). Les modes d'action de *P. fluorescens* dans la suppression des maladies des plantes incluent la production de sidérophores (molécules de faibles poids moléculaires ayant une très forte affinité pour l'ion  $Fe^{3+}$ ) pour la compétition du fer disponible, l'antibiose, la production d'enzymes lytiques et le Système de Résistance Induit (ISR) (Ongena et al., 2005). Dans la plupart des cas d'inhibition, le facteur déterminant est la production d'antibiotiques agissant directement sur l'agent pathogène (Charde et al., 2010). Elle est aussi utilisée en lutte biologique et comme stimulateur de croissance des plantes PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) (Ongena et al. 2005 ; Anita et al., 2012 ; Gao et al., 2012). *Pseudomonas fluorescens* est également utilisée comme catalyseur dans la réaction de transestérification de l'huile de *Jatropha* pour la production de biodiesel (Devanesan et al., 2007). *Pseudomonas fluorescens* joue aussi un rôle dans la protection de l'environnement par la dégradation des hydrocarbures et d'autres types de polluants (Moneke et al., 2010). Elle est actuellement étudiée en médecine car elle produit un antibiotique particulier (mupirocine) qui a prouvé son efficacité dans le traitement de certaines maladies de la peau, des troubles oculaires et auditifs (Mazereeuw-Hautier, 2006).

## 6- L'importance du genre *Pseudomonas*

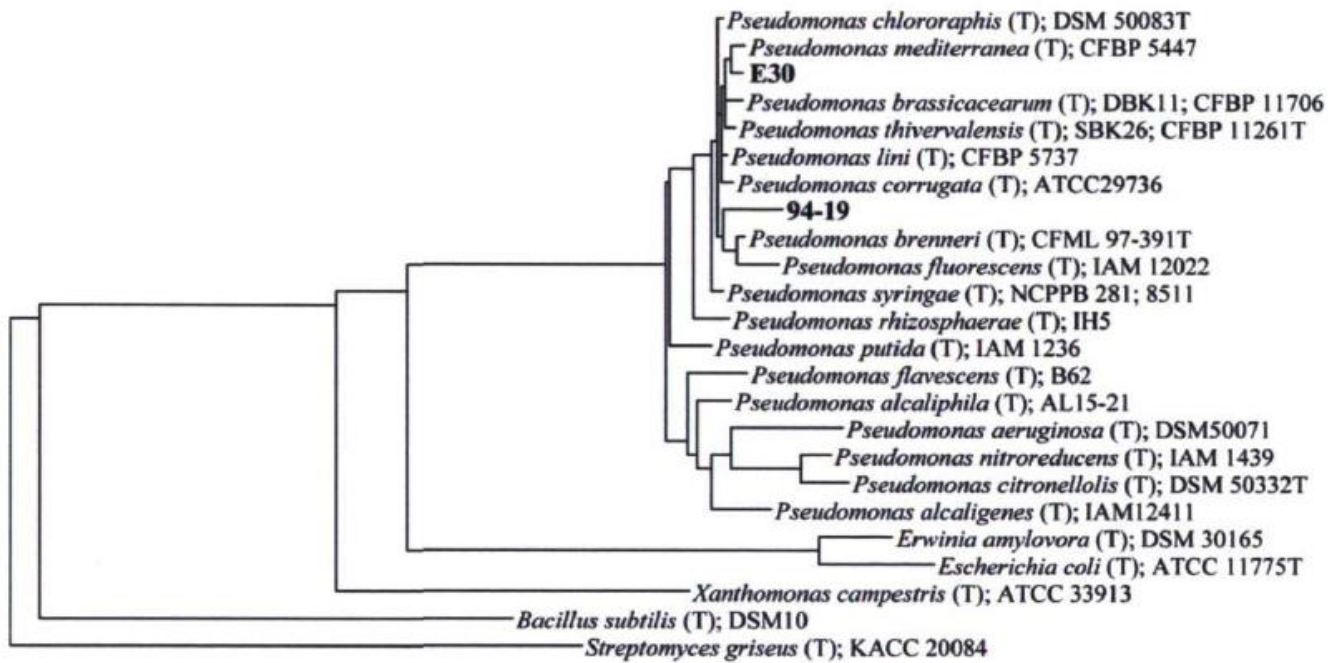
Les bactéries du genre *Pseudomonas* occupent la plupart des environnements naturels. Elles sont isolées de l'eau, du sol et des végétaux. Elles présentent un fort potentiel d'adaptation physiologique et génétique et sont capables d'utiliser une grande variété de nutriments. D'un point de vue écologique, les *Pseudomonas* regroupent des espèces bénéfiques pour l'environnement et des espèces pathogènes (Talon *et al.*, 2006).

Au niveau de la rhizosphère les *Pseudomonas* peuvent avoir un effet bénéfique en mobilisant certains nutriments nécessaires à la croissance de la plante. Elles peuvent aussi la protéger contre des micro-organismes pathogènes en stimulant les mécanismes de résistance intrinsèques de la plante par la sécrétion des composés antibactériens et antifongiques et/ou par la compétition vis-à-vis de certains nutriments. C'est notamment le cas de souches de *P. fluorescens*, décrites comme des bactéries phytoprotéctrices jouant un rôle prépondérant dans le biocontrôle de la rhizosphère (Walsh *et al.*, 2001).

D'autres espèces sont des pathogènes pour les plantes, comme l'espèce *P. syringae* qui compte au moins 37 pathovars capables d'infecter de nombreuses espèces de végétaux (Sawada *et al.*, 2002).

Les *Pseudomonas spp.* Sont capables de dégrader de nombreux composés organiques, tels des composés halogénés, des hydrocarbures aromatiques et des herbicides (Ramos, 2004). elles peuvent ainsi être utilisées dans les processus de décontamination des sols « bioremédiation » (Stallwood *et al.*, 2005).

Les *Pseudomonas spp.* Peuvent également se comporter comme des agents opportunistes et être à l'origine d'infections iatrogènes et/ou nosocomiales. En raison de la richesse de leurs voies métaboliques, souvent capables de résister à de nombreux antiseptiques ou antibiotiques. Ceci explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier, où elles peuvent être isolées de l'environnement humide, des denrées alimentaires, des réactifs biologiques, des solutés injectables, du sang ou des dérivés sanguins conservés au froid (Feuilloley *et al.*, 2007).



**Figure 1** : Arbre phylogénique des *Pseudomonas* spp

## 7. quelques souche de *Pseudomonas*

### 7.1. *Pseudomonas aeruginosa*

La bactérie Gram négatif *P. aeruginosa* est omniprésente dans l'environnement, notamment dans les sols, les milieux humides et dans l'eau (Kerr & Snelling, 2009). Une quantité importante est ingérée chaque jour par l'humain dû à sa présence sur les plantes et les légumes (Hardalo & Edberg, 1997). Bien que les conditions environnementales soient peu clémentes à cette bactérie dans la tuyauterie des établissements de santé, celle-ci s'y loge en faible quantité, dans l'eau ou dans le biofilm. Cela est dû à ses capacités étonnantes de survie et sa facilité à intégrer le biofilm (Kerr & Snelling, 2009). Même si *P. aeruginosa* se retrouve principalement dans le biofilm, elle est très mobile et tend à coloniser des sites plus riches en nutriments. Par conséquent, elle se détache du biofilm et se retrouve libre dans l'eau. Elle peut se reproduire autant dans de l'eau stagnante que sur une surface humide. Elle se distingue des autres types de *Pseudomonas* par sa production de pyocyanine (pigment vert bleu) et de pyoverdine (pigment jaune vert fluorescent) (Hardalo & Edberg, 1997).

Les concentrations de *P. aeruginosa* sont en général trop faibles dans l'environnement pour présenter un risque chez les individus en bonne santé. Des conditions environnementales

spécifiques doivent être réunies pour qu'une prolifération se produise, constitue une exposition significative et mène à une infection. Entre autres, la concentration de *P. aeruginosa* doit être élevée, la bactérie doit être virulente, et l'hôte doit être susceptible comme par exemple, un patient immuno-déficient ayant des tissus ou organes préalablement endommagés (Hardalo & Edberg, 1997).

La bactérie est responsable de plusieurs types d'infection. Celles-ci touchent principalement aux voies respiratoires ou pulmonaires, au système urinaire, aux brûlures, aux plaies ouvertes ou aux septicémies (infection du sang) (Mena & Gerba, 2009).

Il y a trois modes de transmission possible : 1) par contact direct avec de l'eau (par ingestion, lavage ou éclaboussures provenant du robinet); 2) par des aérosols (respirateur, douche, ventilateur); 3) par contact indirect (équipement lavé avec de l'eau contaminée ou mains du personnel soignant) (Department of Health et al., 2013).

La plage de température idéale permettant la croissance de *P. aeruginosa* se situe entre 10°C et 42°C (Brown, 1957). En dessous et au-dessus de ces températures, la bactérie survit, mais cesse de croître. Toutefois, l'efficacité de l'inactivation thermique baisse rapidement au-dessous de 55°C (Spinks et al., 2006). *P. aeruginosa* a développé une résistance à certains antibiotiques et désinfectants et est plus difficilement éradiquée lorsqu'elle est établie dans le biofilm (Kerr & Snelling, 2009; Mena & Gerba, 2009). De plus, la présence de chlore résiduel et la concentration de cuivre dans l'eau sont des facteurs environnementaux influençant la cultivabilité de *P. aeruginosa* (Bédard et al., 2014; Dwidjosiswojo et al., 2011).

## **7.2. *Pseudomonas fluorescens***

Les *P. fluorescens* sont difficilement discernables des *P. putida* malgré les méthodes moléculaires utilisées en phylogénie. Elles peuvent présenter les mêmes caractéristiques notamment au niveau des mécanismes par lesquels elles exercent une activité antagoniste.

## **Les Métabolites secondaires**

### **1-Définition**

Les métabolites secondaires sont des composés non essentiels au métabolisme basique des microorganismes. Ces composés sont généralement produits au cours de l'idiophase et peuvent être très diversifiés au niveau de leur structure chimique. Quelques métabolites sont spécifiques à une ou deux espèces alors que d'autres peuvent être produits par différents genres. Les métabolites secondaires sont synthétisés à partir de précurseurs originaires du métabolisme primaire (acétyl-CoA, acides aminés...). Les enzymes responsables de la synthèse des métabolites secondaires sont très diversifiées suite à l'évolution de gènes impliqués, à l'origine, dans les fonctions métaboliques fondamentales (Steyn, 1980 ; Gaitatzis *et al.* 2002).

### **2-Métabolites secondaires chez les *Pseudomonas* spp**

Plusieurs espèces de *Pseudomonas* ont la capacité de produire des phénazines. Ces métabolites ont différentes fonctions biologiques notamment dans la virulence de la bactérie (Mahajan Mikloset *al.*, 1999; Mazzola *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2011). Plusieurs phénazines telles 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). Ces composés ont une activité d'oxydo-réduction. Les deux loci *phzA1B1C1D1E1F1G1* et *phzA2B2C2D2E2F2G2* sont à l'origine de la production de l'APC. Ce dernier est transformé en pyocyanine et PCN grâce aux trois gènes *phzM*, *phzS*, et *phzH* (Mavrodi *et al.*, 2001).

#### **2-1-Les phénazines**

##### **2-1-1 Généralités**

Les phénazines représentent une vaste famille de molécules hétérocycliques azotées fortement pigmentées, capables d'une action antibiotique à large spectre et également toxiques pour les cellules eucaryotes. L'aptitude à les produire est limitée aux bactéries (*Pseudomonas*, *Bulkholderia*, *Streptomyces*, *Sorangium*, *Nocardia* et *Brevibacterium*).

Plus de 100 phénazines naturelles sont actuellement connues, toutes ayant le même noyau hétérocyclique. Certaines souches bactériennes peuvent produire jusqu'à 10 dérivés

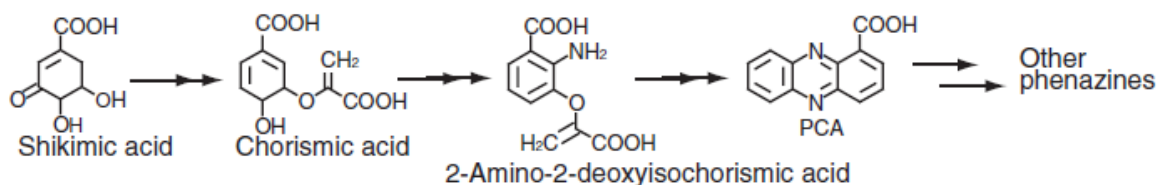
phénaziniques différents en même temps (Mavrodi et *al.*, 1998 ; Delaney et *al.*, 2001 ; Chin-A-Woeng et *al.*, 2003).

Plusieurs espèces de *Pseudomonas* ont la capacité de produire des phénazines. Ces métabolites ont différentes fonctions biologiques et participent notamment à la virulence de la bactérie (Mazzola et *al.*, 1992 ; Mahajan-Miklos et *al.*, 1999 ; Wang et *al.*, 2010).

*Pa* produit 4 phénazines différentes : la pyocyanine (1-hydroxy-5-méthylphénazine), le phénazine-1-carboxylique acide (PCA), la 1-hydroxyphénazine (1-OHPHZ) et la phénazine-1-carboxamide (PCN).

### 2-1-2- Biosynthèse

La biosynthèse des phénazines débute avec l'acide shikimique, à partir duquel est synthétisé le chorismate, qui sera transformé en acide 2-amino-2-deoxyisochorismique. Ce dernier pourra alors se dimériser pour former le premier composé de la famille, soit la phénazine-1-carboxylique acide (PCA). Les autres molécules comme la PYO, la phénazinetel-1 carboxamide (PCN) et l'1-hydroxyphénazines (1-OHPHZ) dérivent du PCA (Price-Whelan et *al.*, 2006) (**Figure 3**).



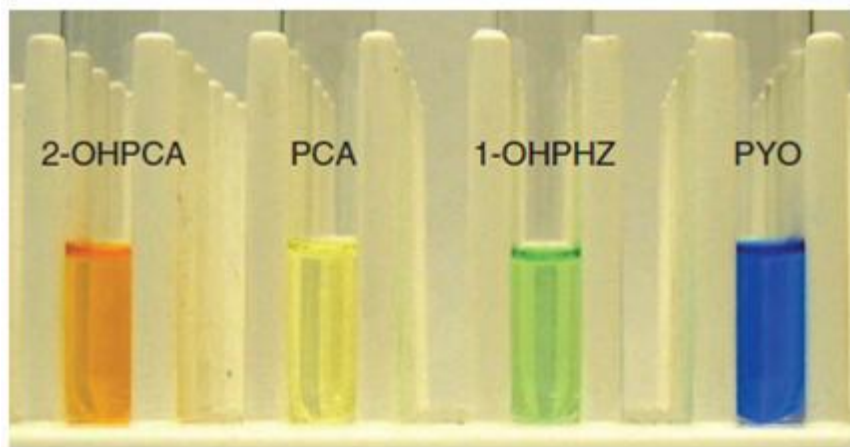
**Figure 2** : Biosynthèse des phénazines (Price-Whelan et *al.*, 2006).

Les gènes impliqués dans la synthèse des phénazines sont regroupés sur un même opéron et sont bien conservés entre *P. fluorescens* 2-79, *P. chlororaphis* PCL1391, *P. aeruginosa* PAO1-PA14 et *P. aureofaciens* 30-84. Dans chacun des cas, on trouve un opéron de sept gènes : *Phz A, B, C, D, E, F, G* dont la séquence de nucléotides montre une homologie de l'ordre de 70 à 95 % d'identité entre ces différentes espèces (Mavrodi et *al.*, 1998; Delaney et *al.*, 2001; Chin-A-Woeng, et *al.*, 2003).

De plus, chez *Pa*, le génome contient 2 opérons : *phzA1, B1, C1, D1, E1, F1, G1* et *phzA2, B2, C2, D2, E2, F2, G2* distants de 2,6 Mb et dont la séquence est identique à 98,3%. Chacun de ces deux opérons est suffisant pour la production de PCA (Mavrodi et *al.*, 1998). Les différentes

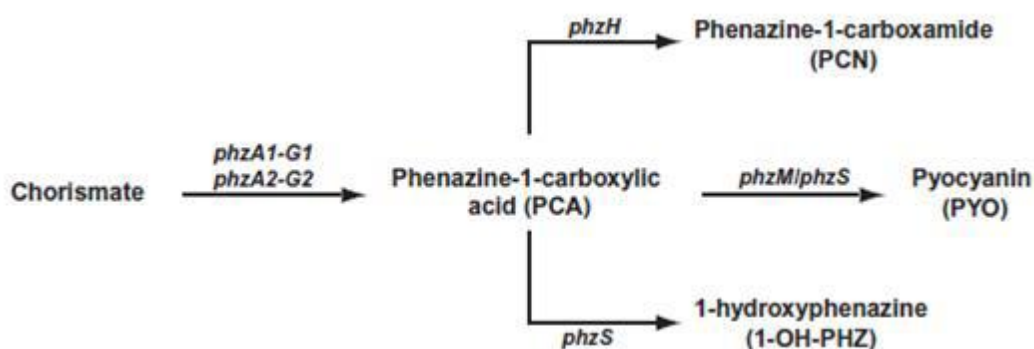
espèces de *Pseudomonas* partagent donc des gènes de production de phénazines assez semblables mais elles se démarquent par l'éventail des phénazines qu'elles produisent .

En effet, chez certaines espèces, d'autres enzymes peuvent intervenir pour former différents dérivés à partir du PCA. C'est le cas de *P. chlororaphis* PCL1391 où le gène *phzO* catalyse la conversion du PCA en acide 2-hydroxyphénazine (2-OH-PCA) (Delaney et al., 2001).



**Figure 3** : Phénazines produites par les différentes espèces de *Pseudomonas*. Avec 2-OHPCA : 2-hydroxyphénazine ; PCA : phénazine-1-carboxylique acide ; 1-OHPHZ : 1-hydroxyphénazine ; PYO : pyocyanine (Price-Whelan et al., 2006).

Chez *Pa*, deux gènes *phzM*, *phzS* sont impliqués dans la production de PYO à partir de PCA (Mavrodi et al., 2001). *phzS* est également impliqué dans la production de 1 hydroxyphénazine, et le gène *phzH* dans la production de phénazine-1-carboxamide (PCN) (**Figure 4**).



**Figure 4** : Ensembles des gènes impliqués dans la biosynthèse des phénazines chez *Pa* (Dietrich et al., 2006).

### 2-1-3- Rôle chez les bactéries productrices

Les premières études sur le rôle des phénazines produites par les bactéries suggéraient une implication dans la survie des microorganismes dans le sol. Cependant, certains auteurs se questionnaient sur la synthèse de ces composés au niveau du sol, étant donné la faible quantité de nutriments, spécialement de composés carbonés, présents dans cet environnement.

Le doute a été dissipé suite à l'extraction de PCA directement à partir de racines de blé colonisées par *P. fluorescens* 2-79 ou *P. aureofaciens* 30-84 (Mazzola et al., 1992).

L'avantage de la production des phénazines pour la colonisation et la survie dans la rhizosphère a également été démontré en comparant le comportement des souches parentales et des souches mutantes dans des sols naturels et des sols stérilisés. Dans le sol stérilisé, où la compétition pour l'espace et les nutriments est nulle, les mutants phz - pouvaient coloniser la rhizosphère du blé aussi bien que les souches phz +. Par contre, dans le sol naturel à forte compétition microbienne, les souches phz - étaient largement déclassées par leurs homologues parentaux.

### **3- Pyocyanine**

#### **3-1 Généralités**

*Pseudomonas aeruginosa* est couramment désignée sous son nom vernaculaire de bacille pyocyanique (du nom d'un pigment produit par cette espèce, la pyocyanine, qui donne une couleur bleue au pus).

La pyocyanine est un pigment phénazinique, soluble dans le chloroforme et spécifique à *Pseudomonas aeruginosa*. En solution aqueuse, la pyocyanine est généralement de couleur bleue. Ce pigment est un accepteur d'électrons permettant à *Pseudomonas aeruginosa* de croître en anaérobiose. Elle possède une activité bactériostatique, notamment vis-à-vis des bactéries à Gram positif. Aussi, la présence d'un pus bleu dans les plaies (notamment après amputation) était considérée comme un signe encourageant puisqu'il éloignait le spectre de la gangrène.

Pyocyanine est une phénazine biologiquement active produite par le pathogène humain *Pseudomonas aeruginosa*. On pense à doter *P. aeruginosa* avec un avantage de croissance compétitive dans le tissu colonisé et est également considéré comme un facteur de virulence dans des maladies telles que la fibrose kystique et le sida où les patients sont souvent infectés par *Pseudomonas* pathogènes en raison de leur état d'immunodépression.

### 3-2- Biosynthèse

La Pyocyanine est également un composé chimique intéressant en raison de son activité inhabituelle d'oxydo-réduction. Phénazine-1-carboxylique, le précurseur des phénazines bioactifs est synthétisé à partir de l'acide chorismique par des enzymes codées dans un cistron sept gènes dans *P. aeruginosa* et *Pseudomonas* dans les autres. Acide Phénazine-1-carboxylique est supposée être convertie en pyocyanine par les actions successives de la N-méthyltransférase putative PhzM S-adénosylméthionine-dépendante et putative PhzS hydroxylase flavine-dépendante. Nous rapportons ici la structure cristalline de 1,8 Å de PhzM déterminée par simple dispersion anormale. Contrairement à de nombreux méthyltransférases, PhzM est un dimère en solution. Le polypeptide de 36 kDa PhzM se replie en trois domaines. Le domaine C-terminal présente l' $\alpha / \beta$ -hydrolase fold typique des petites molécules méthyltransférases. Deux domaines plus petits N-terminaux forment une grande partie de l'interface du dimère. Alignements structurels avec méthyltransférases connus montrent que PhzM est la plus semblable à la plante O-méthyltransférases qui sont caractérisés par une interface entrelacées inhabituelle de dimère. La structure de PhzM ne contient pas de ligands, et le site actif est ouverte et exposée au solvant par rapport aux structures des enzymes similaires. Des expériences in vitro en utilisant PhzM purifié seul démontrent qu'il a peu ou pas de capacité à méthyler l'acide phénazine-1-carboxylique. Toutefois, lorsque les PhzS hydroxylase putatives sont inclus, la pyocyanine est facilement produite. Cette observation suggère qu'un mécanisme a évolué dans *P. aeruginosa* qui assure une production efficace de pyocyanine via la prévention de la formation et la libération d'un intermédiaire instable et potentiellement délétère.

#### 4- Activité antimicrobienne

##### 4-1- Activité antimicrobienne de pyocyanine vis-à-vis les bactéries et les champignons

La Pyocyanine (N-méthyl-1-hydroxyphénazine) est un pigment bleu-vert soluble dans l'eau et le chloroforme est produit en grandes quantités par des cultures actives de *Pseudomonas aeruginosa*. Elle a une activité antibiotique contre une grande variété de micro-organismes (Anas et al., 2010).

L'activité antimicrobienne de la pyocyanine pourrait ainsi être expliquée par sa capacité à induire un stress oxydatif. Hassan et Fridovich (1980) ont observé qu'*Escherichia coli* est sensible à la pyocyanine lorsqu'elle est cultivée en milieu minimum, et qu'elle l'est nettement moins lorsque le milieu est enrichi en extrait de levures. Ils ont constaté que l'ajout de PYO dans le milieu enrichi induit l'expression des enzymes antioxydants, la catalase et dans une

moindre mesure le superoxyde dismutase (SOD), et que l'ajout de SOD et de catalase exogène protège les cellules de la toxicité de pyocyanine.

Ces auteurs ont donc suggéré que la pyocyanine génère de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et par dismutation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) à l'extérieur de la cellule, puis qu'une partie d' $H_2O_2$  traverse la membrane cellulaire et induit l'expression de catalase. Voggu *et al.* (2006) ont observés que la culture de *Staphylococcus aureus* en présence de *Pa* induit l'apparition de souches de *Staphylococcus aureus* communément appelées "Small-colony variants SCVs" Variantes petites colonies, ce phénomène est due à la sécrétion de la pyocyanine par *P. aeruginosa*.

La pyocyanine joue aussi un rôle primordiale dans l'inhibition de *Candida albicans*, en effet, plusieurs études cliniques ont mentionné la limitation de croissance de *C. albicans* par *Pa*. De plus, un traitement antibiotique ciblant *P. aeruginosa* a pour conséquence une prolifération de *C. albicans* (Kerr, 1994).

Des études préliminaires ont permis de mettre en évidence in vitro l'effet négatif exercé par certains métabolites tels que la PYO et l'hydroxyphénazine sur la croissance de *C. albicans* (Kerr, 1994 ; Kerr, et al., 1999). La première étude (Hogan et Kolter, 2002) a clarifié les conditions dans lesquelles *Pa* et *C. Albicans* interagissent : l'interaction de *Pa* avec *C. albicans* se déroule lorsque les bactéries sont en phase stationnaire de croissance et que les champignons sont sous forme filamenteuse. Elle aboutit au terme de 72 h de culture à l'agglutination d'un conglomérat bactérien autour de filament puis à la formation d'un biofilm autour des colonies bactériennes entraînant la mort du champignon.

L'utilisation des souches mutées sur les gènes de synthèse des phénazines et de la PYO s'est traduit par une réduction marquée de l'activité fongicide de *Pa* (Mahajan-Miklos et al.1999).

La pyocyanine se réduit et réduit de manière univoque l'oxygène au radical superoxyde toxique. La résistance des bactéries à diverses pyocyanine serait donc dépendant des niveaux de super oxyde dismutase et de la catalase possédées par l'organisme et en présence d'oxygène (Sudhakar et al., 2013).

## **5- *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* fait partie de la famille bactérienne Pseudomonadaceae qui est répandu dans l'environnement ; dans le sol, l'eau douce, de l'environnement marin, etc. (Franzetti et Scarpellini, 2007). Il a reçu une attention intense en raison de son importance médicale, ainsi que sa polyvalence catabolique (Ananthakrishnan et al., 2012).

De même, un pyocyanine isolé à partir d'une population microbienne marine a été identifiée comme production de synergie entre deux espèces bactériennes distinctes (Angell et al., 2006). L'Application de la pyocyanine en tant qu'agent antimicrobien et colorant alimentaire a été réalisée (Saha et al., 2008). L'Analyse du composé pyocyanine et son activité antagoniste contre les phytopathogènes ont été étudiés par (Sudhakar et al., 2013) Récemment, (El-Fouly et al., 2007).ont réalisé la biosynthèse d'une pyocyanine bioactive par *P. aeruginosa*. Le Composé pyocyanine a été produit et extrait. Une nuance de couleur bleu-vert de la solution a été obtenue, extraction est faite en ajoutant du chloroforme qui sépare un composé de couleur bleue. Il a ensuite été confirmé par addition d'HCl 0,2 N et un composé de couleur rouge rosé a été obtenue qui indique la présence d'un pigment pyocyanine (Ra'oof et Latif, 2010).

### **5-1-Effet de température et du pH sur la production de pyocyanine**

De nombreuses études caractérisant la dépendance conditionnelle de la production de pyocyanine ont révélé des signaux environnementaux qui affectent la régulation de ce processus et, certains cas, des mécanismes liant la condition à la réponse. Ces études ont évalué les effets des paramètres environnementaux tels que la température, le pH, salinité, et la disponibilité de l'oxygène. Ils ont également examiné comment la production de pyocyanine est influencée par la disponibilité des sources de carbone et d'azote, de phosphate, de sulfate, de fer et du magnésium.

Ces variations environnementales peuvent affecter la production de pyocyanine en modifiant directement ou indirectement l'expression des protéines (pour par exemple, par leurs effets sur la production de signaux (van Rij et al., 2004;. Farrow et Pesci , 2007), ou ils peuvent

modifier la disponibilité des substrats et donc, le flux à travers les voies métaboliques de la biosynthèse des pyocyanine .

L'effet de la température sur la production de pyocyanine a été étudiée chez *P. fluorescens*, et *P. aeruginosa*. Ils produisent le dérivé de pyocyanine à des niveaux comparables lorsqu'ils sont cultivés à des températures allant de 28 à 37°C, mais la production est presque indétectable quand ils sont cultivés à 16° C (van Rij et al., 2004). Chez *P. fluorescens* 2-79, la production de pyocyanine a été trouvée en corrélation inverse avec la température dans une enquête sur des températures allant de 25 à 37°C (Slininger et Shea-Wilbur ,1995). Chez *P. aeruginosa* M18, la transcription de *phz1* et *phz2* est élevée à 28 ° C par rapport à 37 ° C, ce qui est en corrélation avec une grande augmentation de la production de pyocyanine (Huang et al., 2009). Chez *P. aeruginosa* PA14, la production pyocyanine augmente légèrement lorsque cette souche est cultivée à 37 ° C par rapport à 28°C.

Les effets du pH sur la production de pyocyanine ont été testés sur des souches de biocontrôle, où l'optimisation des conditions de sol pourrait faciliter l'application de ces souches pour la promotion de la croissance des cultures. *P. chlororaphis* PCL1391 produit le PCA (l'acide phénazine-1-carboxylique) et a été maximisée à pH 7, partiellement diminué, mais encore substantielle à pH 6, et abolie à pH 8 (Slininger et Karité Wilbur, 1995).

## **1. L'obtention des souches**

### **1.1. L'obtention des souches de références (souches testes)**

Les souches de références utilisées dans notre travail sont : *Bacillus cereus* ATCC10876, *Escherichia coli* ATCC25922, et *Candida albicans* ATCC 10231. Nous ont été fournies par le laboratoire de recherche de microbiologie et biologie végétale (Université de Mostaganem).

Les deux souches de *Staphylococcus aureus* et *Salmonella* nous ont été fournies par le laboratoire pédagogique de microbiologie (Université de Mostaganem).

La croissance des souches a été réalisée à 37°C sur différentes milieux solide : milieu Chapman, la gélose nutritive et le milieu OGA.

### **1.2. Obtention des souches antagonistes**

Les souches de *Pseudomonas* utilisées dans notre travail ont été fournies par le laboratoire de microbiologie et biologie végétal (Université de Mostaganem). L'isolement de ces souches a été effectué à partir des sols salés de la plaine de Mina (Relizane).

### **1.3. Purification et conservation des souches**

La purification des souches a été effectuée selon la méthode de stries simples sur les milieux citez auparavant et incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures.

La culture des souches obtenues sont conservées à 4 °C dans des tubes contenant la gélose inclinée.

## **2. Production et extraction de substances antimicrobiennes**

La recherche des métabolites à effets antimicrobiens a été effectuée chez les souches ayant manifestées un pouvoir antagoniste vis-à-vis des souches pathogènes bactériennes testées.

Dans ce contexte nous avons réalisés plusieurs protocoles afin d'obtenir un extrait sec soluble dans l'eau ou dans le méthanol.

## **2.1. Production de la pyocyanine par l'utilisation du milieu King A**

On ensemence la souche performante de *Pseudomonas aeruginosa* dans une boîte de Pétri contenant le milieu King A solide suivie d'une incubation à 30°C pendant 24 h. La production de pyocyanine *in vitro* a été recherchée dans le milieu King A liquide. Les isolats bactériens sont mis en incubation pendant 72 h à 28°C, sous agitation permanente (180 rpm).

Les cultures de production sont centrifugées, puis le surnageant est extrait avec le chloroforme. La phase organique contenant la pyocyanine, est d'abord filtrée, ensuite évaporée sous vide. L'extrait sec est remis en suspension dans du méthanol.

## **3. Activité antimicrobienne de la pyocyanine sur les souches pathogènes testées**

L'activité antibactérienne de la pyocyanine a été confirmée par l'utilisation de la méthode de diffusion sur milieu Mueller Hinton solide (Annexe).

### **3.1. Préparation de suspension bactérienne**

On prélève une colonie à partir des souches pathogènes à tester, on l'introduit ensuite dans 5 ml de bouillon nutritif, et on incube à 37°C pendant 18 heures.

### **3.2. Préparation de la solution de l'agent antimicrobien**

On solubilise 0.01g d'extrait sec de la pyocyanine dans 8 ml d'éthanol afin d'obtenir une solution de concentration équivalente à 1.25mg /ml.

### **3.3. Préparation des disques**

Des disques cellulose stériles (Annexe) de 6 mm de diamètre et d'une épaisseur de 0.25mm sont imprégnés pendant une heure dans les solutions préparées avant l'application du test.

### **3.4. L'application de la méthode de diffusion**

On a appliqué cette méthode sur le milieu MH gélosé, un volume de 20 ml de MH est coulés en boîte de Pétri. Le 1 ml d'inoculum déposé sur le milieu est étalé à l'aide d'un étaloir. Après 5 minutes, l'excédent d'inoculum est éliminé par aspiration. Les disques submergés par la solution de pyocyanine sont déposés à l'aide d'une pince flambée ; sur la surfaces du milieu ensemencé. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures. La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres de la zone d'inhibition autour des disques.

### **4. Effet de la température et du pH sur la production de pyocyanine**

La souche de *P. aeruginosa* a été inoculé dans des flacons remplis de 50 ml de milieu King A liquide. Chaque volume est ajusté avec du NaOH ou d'HCl aux valeurs du pH suivantes : 4, 5, 6, 7, 8 et 9. L'incubation est réalisée à 28°C, 30°C et 37°C sur un agitateur rotatif à 30rpm pendant 24 heures. Un changement de couleur du milieu a été vérifié.

Le bouillon de culture est centrifugé à 4000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant de culture est transféré dans de nouveaux tubes à essai. L'extraction avec le chloroforme (1 :2v/v) et la phase aqueuse est récupéré. On ajoute à le HCl 0,2 M et le changement de couleur observé.

Après le changement de couleur en prélevant un aliquote de 2 ml du pigment en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (UV - 1800 T).

#### **4.1. Dosage de la pyocyanine**

La Mesure de la quantité de la pyocyanine a été évaluée selon la méthode de Kurachi 1958. En bref, on ajout 3 ml de chloroforme au 5 ml de surnageant des cultures préparés. Après extraction, on transfère la couche de chloroforme dans un nouveau tube et on le mélange avec 1 ml de HCl 0,2M. Après centrifugation, on enlève la couche supérieure (HCl 0,2 M) pour être mesuré dans un spectrophotomètre à 520nm. Les valeurs sont exprimées en µg/ml de surnageant après la multiplication de l'absorbance au constante qui est égale à 17,072 (Kurachi, 1958).

## **5. Effet de température et du pH sur la production de pyoverdine**

On ensemence la souche performante de *Pseudomonas fluorescens* dans des tubes contenant 3ml de bouillon nutritif et on incube pendant 24h. Chaque tube est versé dans un flacon de 250ml contenant 80ml de King B liquide, les flacons sont incubés dans incubateur agitateur à 28°C, 30°C et 37 °C pendant 48h avec une agitation de 250t/min.

### **5.1. La quantification de la pyoverdine**

La quantification de la pyoverdine a été faite par la loi de Beer-Lambert ( $A = \epsilon \cdot l \cdot C$ ) où A est l'absorbance,  $\epsilon$  le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon_{400} = \epsilon = 20.000 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  soit  $C = A_{400} / 20.000$  (Meyer & Abdellah, 1978).

## 1. L'extraction de la pyocyanine

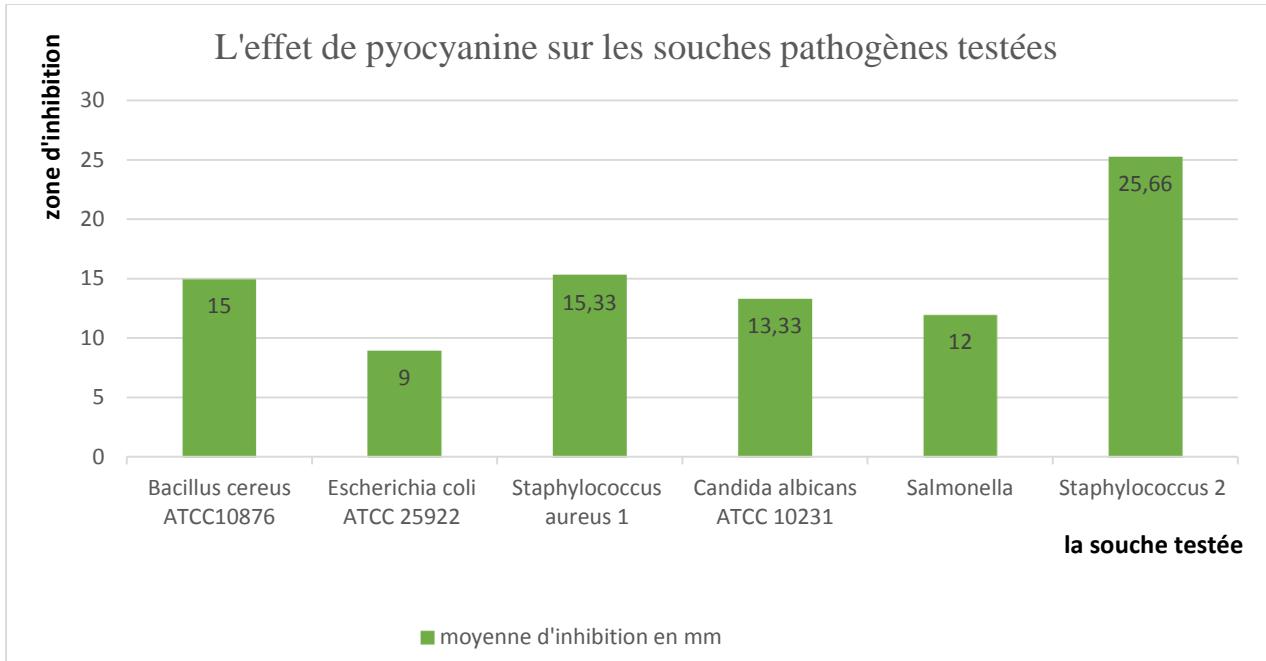
L'extraction par le chloroforme à partir du surnageant de la culture de *Pseudomonas aeruginosa* nous à donner une phase organique de couleur bleue spécifique à notre métabolite. La phase organique contenant la pyocyanine, est d'abord filtrée, ensuite évaporée sous vide. L'extrait sec de couleur bleu est remis en suspension dans le méthanol.

### 1.1. L'activité antimicrobienne et antifongique de l'extrait de la pyocyanine

L'activité de l'extrait (pyocyanine) de *Pseudomonas* a été évaluée par la méthode de diffusion par disque. Les résultats sont présentés dans le tableau 2 et la figure 5 qui représente la moyenne et l'écart type de la zone d'inhibition générée par notre extrait vis-à-vis les souches pathogènes testées.

**Tableau 2** : l'effet inhibiteur de pyocyanine sur les souches pathogènes testées.

L'extrait dilué de pyocyanine	Moyenne de zone d'inhibition
Souche testes	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	15±0,03
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9±0,10
<i>Staphylococcus aureus</i> 1	15,33±0,05
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	13,33±0,05
<i>Salmonella</i> sp	12±0,01
<i>Staphylococcus aureus</i> 2	25.66±0,11

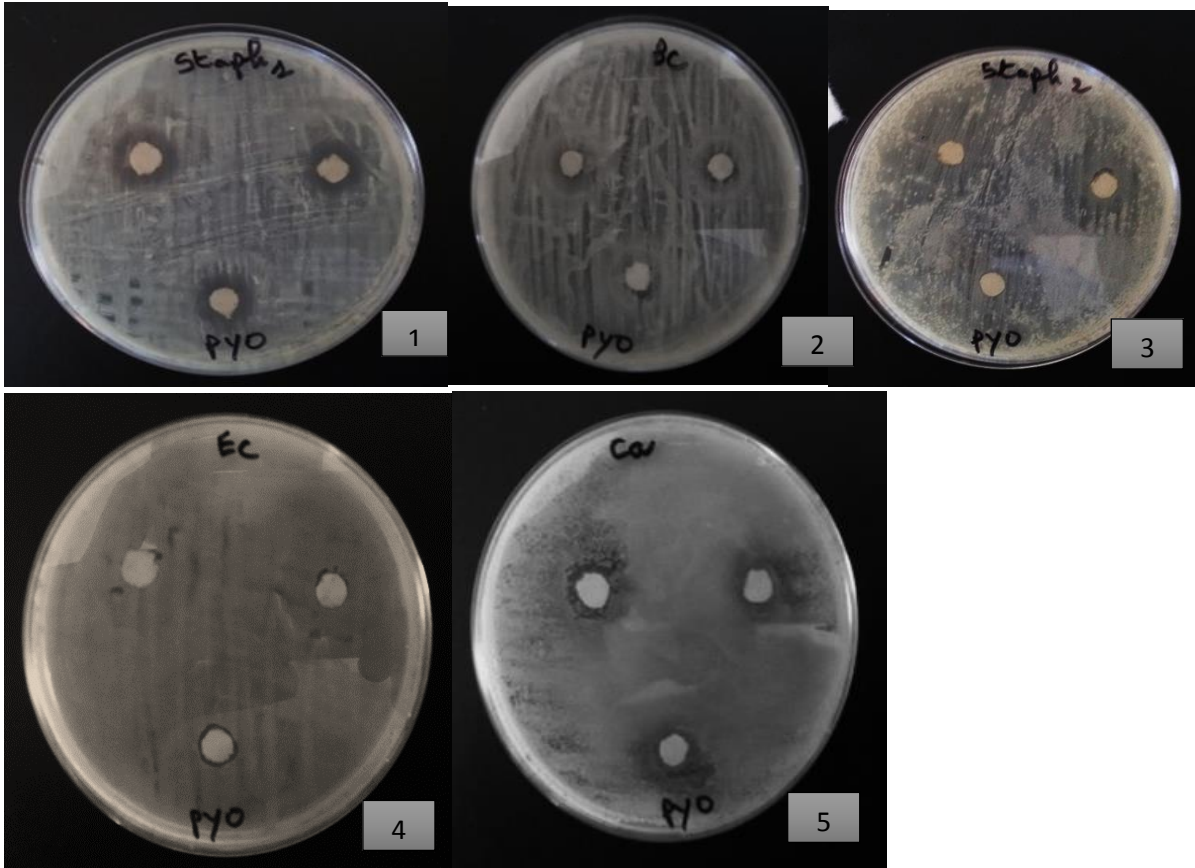


**Figure 5 :** L'effet de l'extrait brut (pyocyanine) sur les souches testées.

L'extrait pyocyanique brut de *Pseudomonas aeruginosa* a montré un important effet inhibiteur contre les microorganismes étudiés. Toutes les souches microbiennes ont été inhibées avec une moyenne d'inhibition qui varie d'une souche à une autre. Les microorganismes les plus sensibles étaient *Staphylococcus aureus 1* et *Staphylococcus aureus 2* : et leurs moyennes des zones d'inhibitions étaient 15,33mm et 25,66mm respectivement.

L'extrait à exercer une activité assez remarquable contre *Bacillus cereus* ATCC10876, *Salmonella* sp et *Candida albicans* ATCC 10231 avec une moyenne d'inhibition qui varie de 12 à 15 mm, l'effet inhibiteur le plus faible a été remarqué chez *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ces résultats sont en accord avec les investigations de plusieurs auteurs qui ont montré que la pyocyanine à une forte activité antimicrobienne (Arunkumar et al., 1997. Preetha et al., 2010 et Barakat.,2012).



**Figure 6** : l'effet de l'extrait brut (pyocyanine) sur les souches testées.

1 : *Staphylococcus aureus* 1

2 : *Bacillus cereus* ATCC10876

3 : *Staphylococcus aureus* 2

4 : *Escherichia coli* ATCC 25922

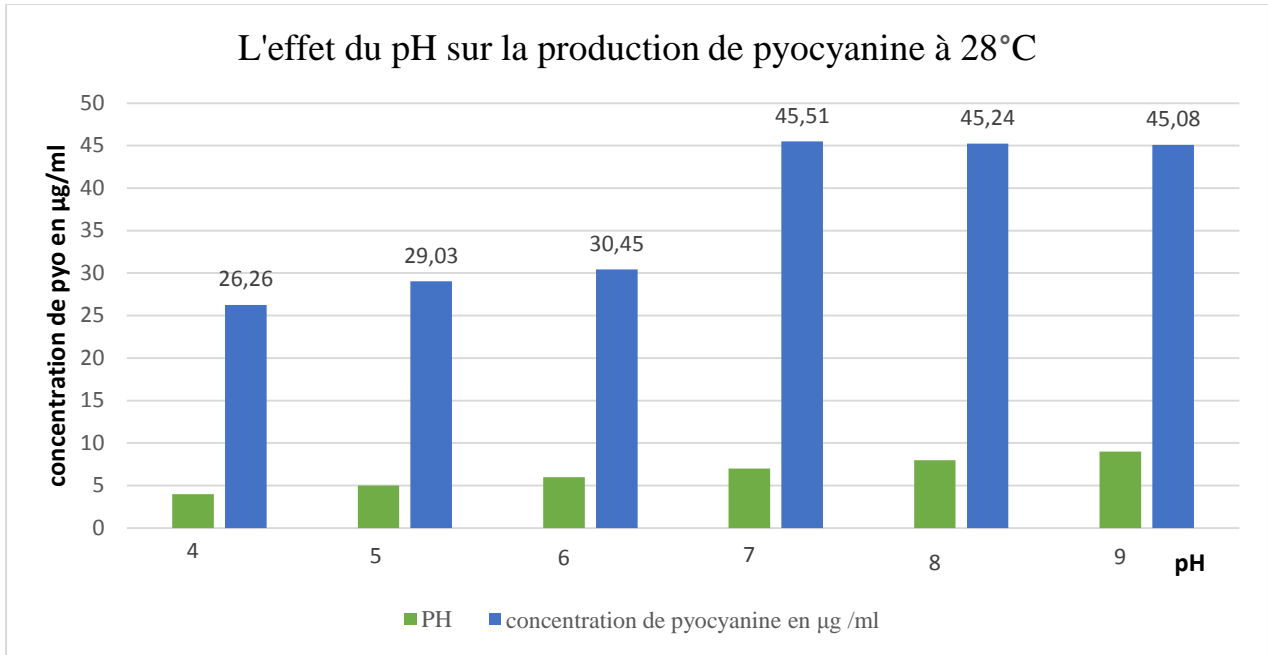
5 : *Candida albicans* ATCC 10231

## 2. Effet de la température et du pH sur la production de la pyocyanine

**Tableau 3** : L'effet du pH sur la production de pyocyanine à température 28°C

pH	Concentration de pyocyanine
4	26,26±0,005
5	29,03± 0,025
6	30,47±0,020
7	45,51±0,011
8	45,24±0,005
9	45,08±0,005

Longueur d'onde = 520 nm ; Température = 28°C°



**Figure 7 :** L'effet du pH sur la production de pyocyanine à température de 28 °C.

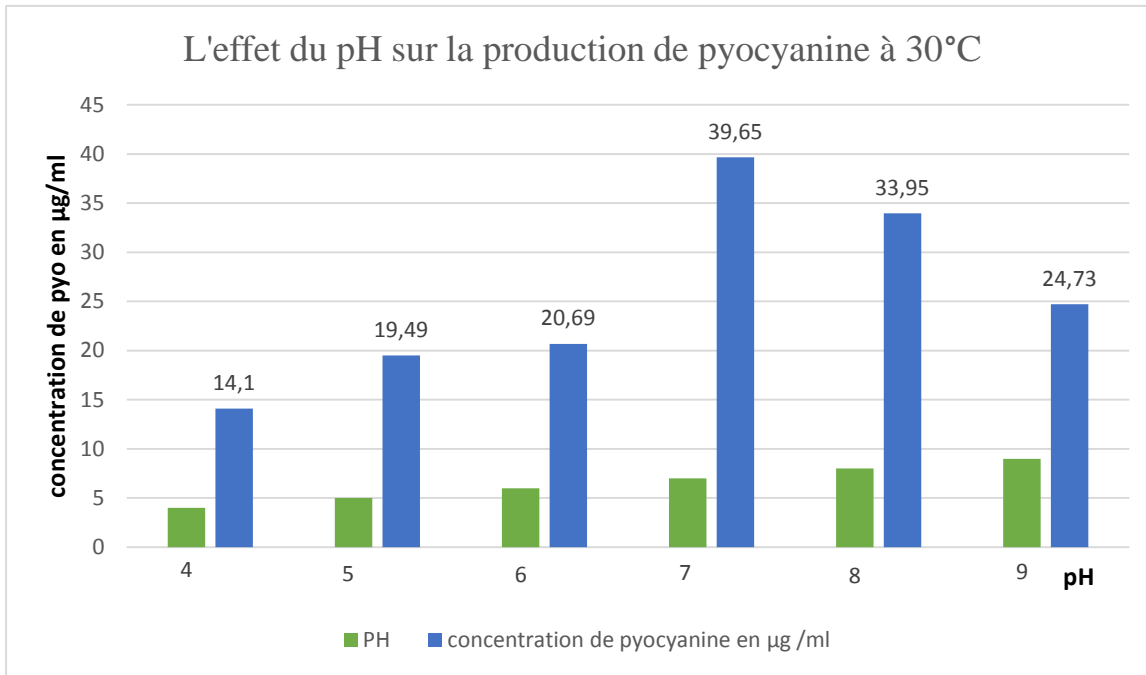
D'après les résultats mentionnés dans l'histogramme, on remarque que la production de la pyocyanine dépend aux valeurs du pH dans le milieu.

La meilleure production a été observée dans un milieu étalonné à pH 7 avec une quantité de pyocyanine produite de 45,51µg/ml. La variation de la quantité de la pyocyanine produite augmente d'une façon significative lorsque le pH de milieu varié de l'acidité vers le pH neutre et alcalin.

**Tableau 4 :** L'effet du pH sur la production de la pyocyanine à 30°C

pH	Concentration de pyocyanine
4	14,10±0,055
5	19,49±0,015
6	20,69±0,046
7	39,65±0,177
8	33,95±0,747
9	24,73±0,080

Longueur d'onde = 520 nm ; Température= 30C°.



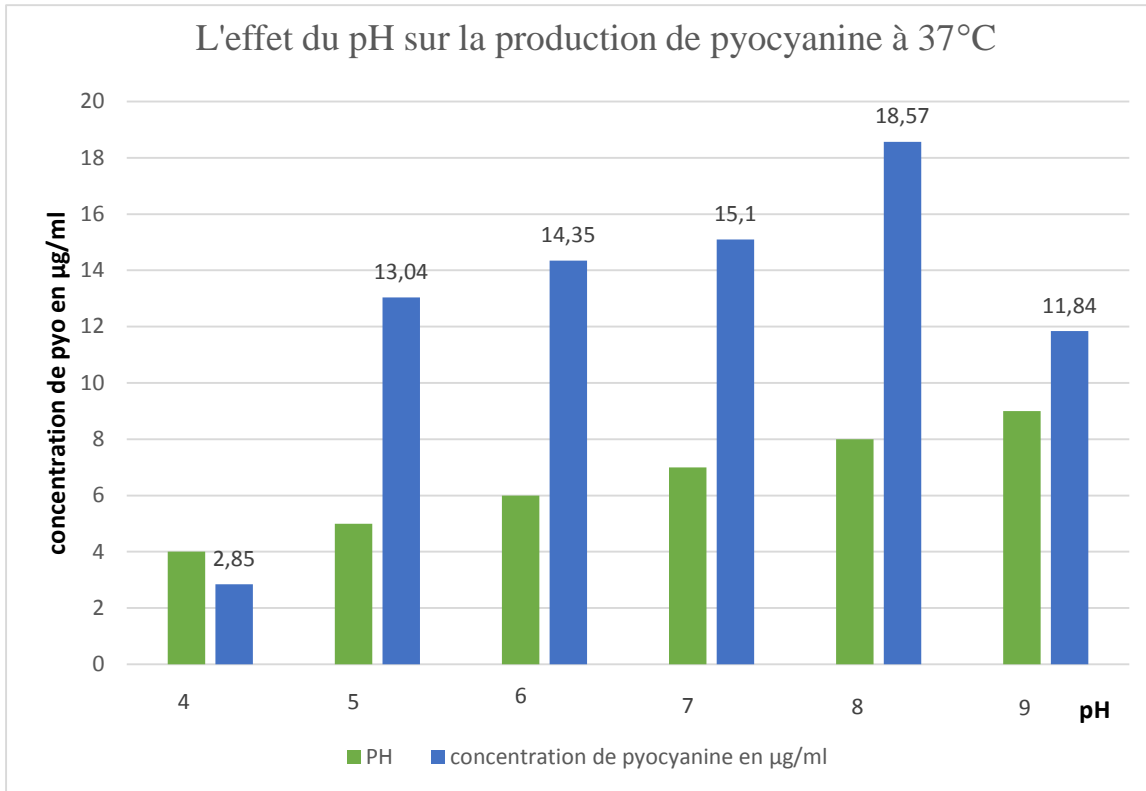
**Figure 8** : L'effet du pH sur la production de pyocyanine à température de 30°C.

En étudiant les résultats d'histogramme, on constate que la production du pyocyanine est inversement proportionnelle au pH des milieux acides. Elle atteint son maximum à pH égal à 7 avec une production de 39.65 µg/ ml .Tandis que le changement des conditions de fermentation (pH) du neutre vers le alcalin provoque une diminution graduelle de la production, qui atteint 24.73µg/ ml pour un pH égal à 9.

**Tableau 5** : L'effet du pH sur la production de la pyocyanine à 37°C

pH	Moyenne de concentration de pyocyanine
4	2,85±0,013
5	13,04±0,023
6	14,35±0,044
7	15,10±0,127
8	18,57±0,019
9	11,84±0,041

Longueur d'onde = 520nm ; Température = 37C°



**Figure 9 :** L'effet du pH sur la production de pyocyanine à température de 37 °C.

Les résultats mentionnés dans le l'histogramme explique que la production de métabolite est affectée par le pH du milieu. On remarque un accroissement proportionnel de la production en fonction du pH, dans l'intervalle de 4 à 8. La meilleure concentration de pyocyanine produite est de 18,57 µg/ ml, elle est observée au pH égal à 8. Après ce seuil, la sécrétion de pyocyanine chute d'une façon remarquable.

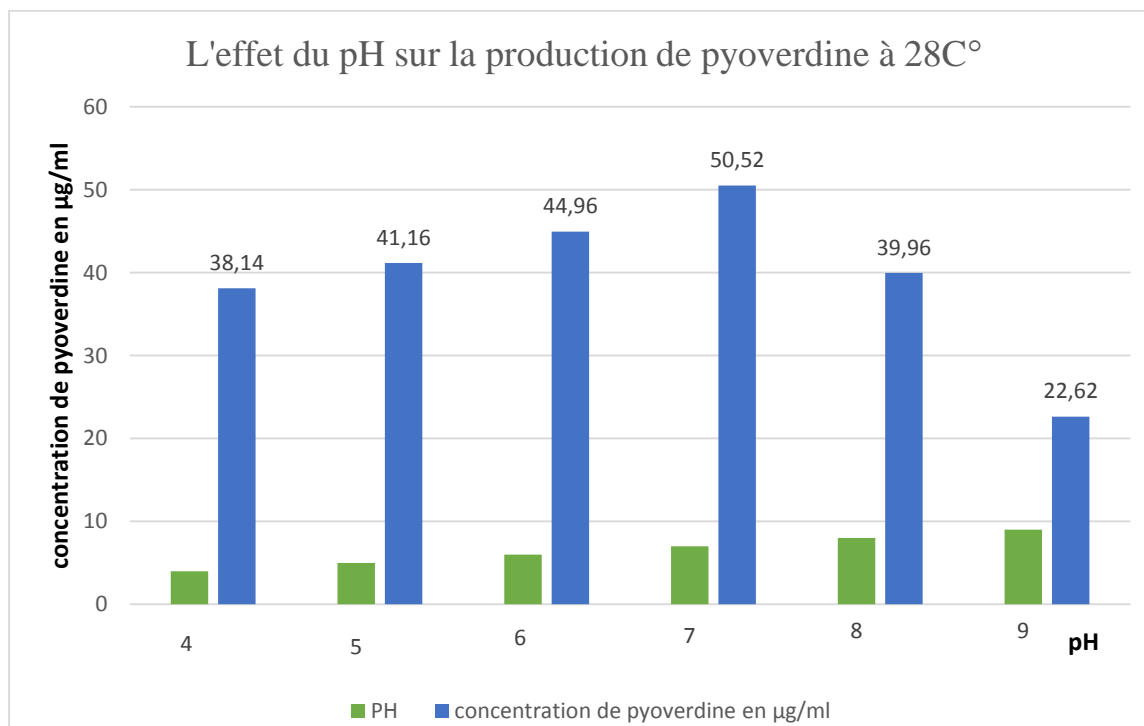
D'après les résultats obtenus en remarque que la production de pyocyanine par la souche de *Pseudomonas* atteint son maximum dans un milieu à pH7 pour les températures de 28 et 30°C. Ces résultats sont en concordances avec les travaux de Liang et al ., (2011).

### 3. Effet de la température et du pH sur la production de la pyoverdine

**Tableau 6** : L'effet du pH sur la production de la pyoverdine à 28°C

pH	Concentration de pyoverdine
4	38,14±0,034
5	41,16±0,070
6	44,96±0,098
7	50,52±0,346
8	39,96±0,04
9	22,62±0,023

Longueur d'onde = 400nm ; Température = 28C°



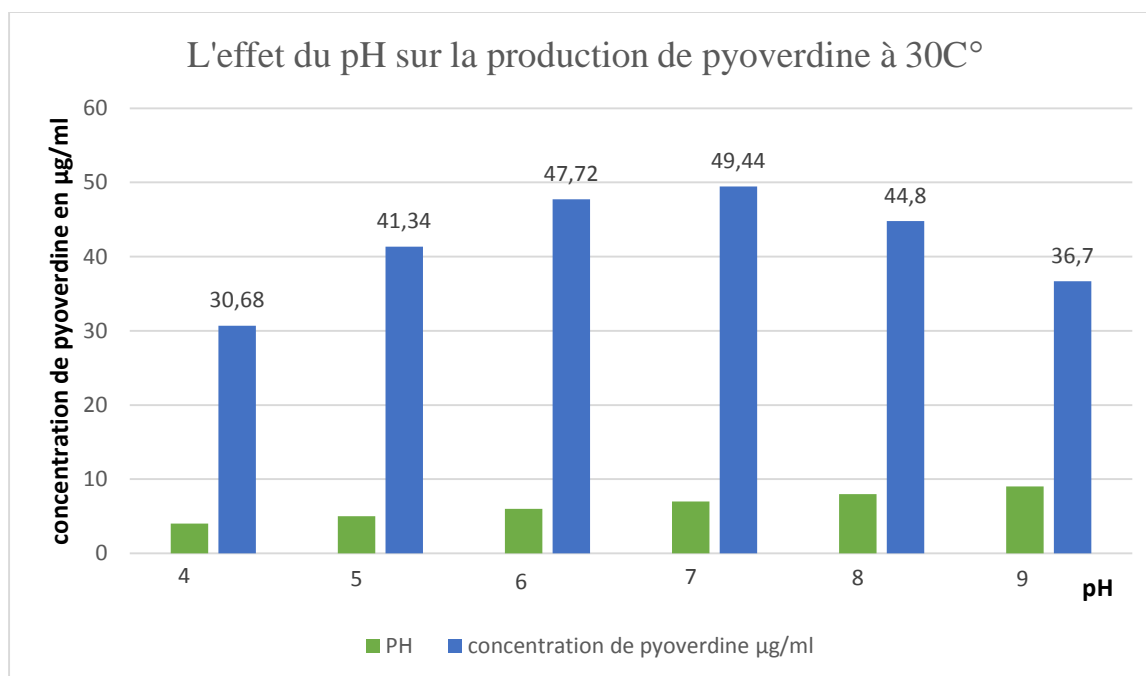
**Figure 10** : L'effet du pH sur la production de pyoverdine à température 28 °C.

Notre étude a montré que la production de pyoverdine est influencé par le changement de pH, l'augmentation des valeurs de pH dans le milieu provoque une augmentation de la production de pyoverdine qui atteinte 50,52 µg/ ml pour un milieu neutre. L'alcalinisation du milieu de fermentation réduit la production par corrélation inversement proportionnelle.

**Tableau 7** : L'effet du pH sur la production de la pyoverdine à 30°C

pH	Concentration de pyoverdine
4	30,68±0,011
5	41,34±0,011
6	47,72±0,034
7	49,44±0,041
8	44,80±0,064
9	36,70±0,046

Longueur d'onde = 400nm ; Température = 30C°



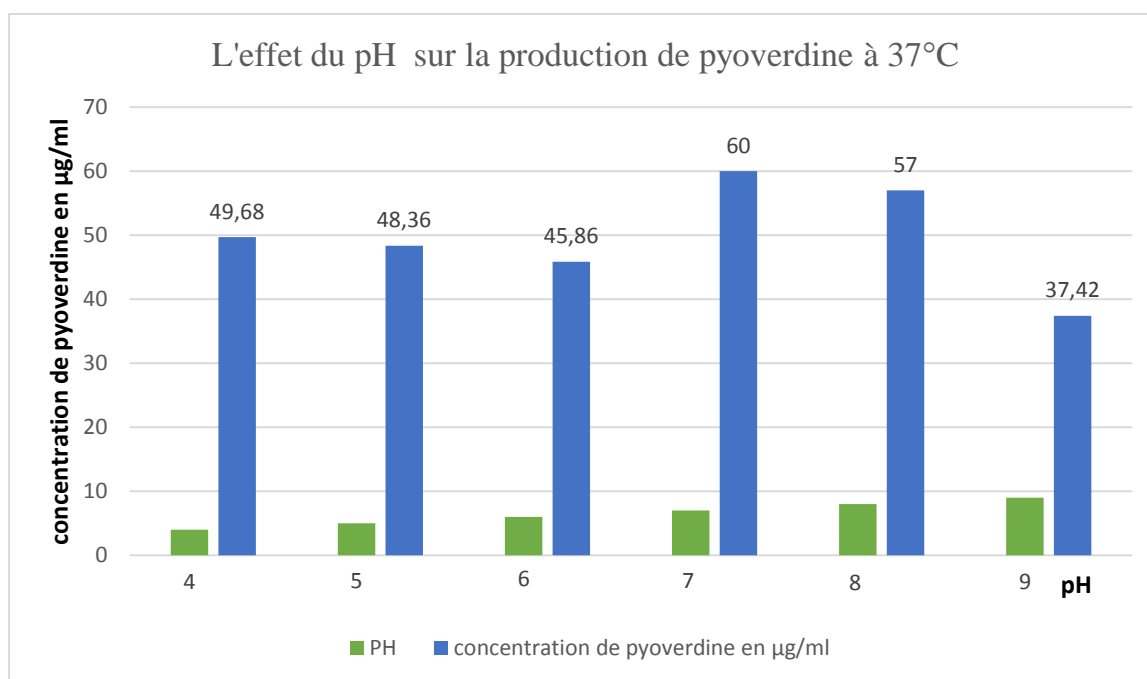
**Figure 11** : L'effet du pH sur la production de pyoverdine à température de 30 °C

Nous avons remarqué que la production de la pyoverdine dans des milieux ajustés à différents valeurs du pH à 30 °C augmente proportionnellement avec la diminution de l'acidité, pour une gamme de concentration qui varie de pH 4 jusqu'à pH 7. La meilleure production est remarquée dans un milieu du pH égal à 7 pour une quantité de pyoverdine sécrété 49,44 µg/ml. Le changement des conditions de fermentation de la neutralisation vers l'alcalinisation provoque une diminution de la production qui atteint 36.70 µg/l pour un milieu à pH 9.

**Tableau 8** : L'effet du pH sur la production de la pyoverdine à 37°C.

PH	Concentration de pyoverdine
4	49,68±0,050
5	48,36±
6	45,86±0,064
7	60±0,034
8	57±0
9	37,42±0,064

Longueur d'onde = 400nm ; Température = 37C°



**Figure 12** : L'effet du pH sur la production de pyoverdine à température de 37 °C.

En observant l'histogramme, on constate que la production de pyoverdine est maximale dans un milieu ayant un pH qui varie de 7 à 8. Tandis que cette dernière chute d'une manière brutale en dehors de l'intervalle cité si dessus.

(Hussien et al., 2011) ont cités que la production de la pyoverdine dépend aux valeurs de pH dans le milieu de fermentation. Ces auteurs ont décrit que la valeur maximale de pyoverdine produite a été obtenu à pH7 avec une quantité libéré dans le milieu approximative au 34µg/ml.

## **Conclusion :**

À la lumière de ce modeste travail nous avons montré les potentialités de production des métabolites secondaires chez *Pseudomonas aeruginosa*. On conclut que la production de ces substances à une activité antibiotique procure un atout majeur dans l'antagonisme microbien pour la souche productrice.

L'extraction des deux métabolites pyocyanine et pyoverdine en utilisant le milieu King A et King B liquideensemencé par *Pseudomonas aeruginosa* est faite en utilisant le chloroforme et le méthanol qui sont considéré comme des solvants efficace. D'après nos résultats, nous avons montré que les deux extraits obtenus (pyocyanine et pyoverdine) présentent un effet inhibiteur sur toute la gamme des souches pathogènes testées, Le meilleur résultat a été remarqué contre *Staphylococcus 1*, *Staphylococcus 2* et *Bacillus cereus* ATCC10876 pour un extrait pyocyanique.

L'étude de la production de la pyocyanine et la pyoverdine dans des milieux de King A et King B ajusté par différentes valeurs de pH nous a permis de conclure que la production de ces deux métabolites secondaires par la souche de *Pseudomonas aeruginosa* objet d'étude dans ce travail est influencée par la nature de milieu de culture et la variation de température. La performance de la souche dans la sécrétion de la pyocyanine et de la pyoverdine augment d'une façon significative par l'augmentation du pH. L'accroissement de la concentration de ces métabolites a été distingué à une température de 28°C et de 37°C. La plus haute concentration de pyocyanine libérée dans le surnageant a été détectée dans une culture de King A liquide de pH 7 à raison de 45,51 µg/ml pour une température d'incubation de 28°C. La meilleure production de pyoverdine a été repérée pour un milieu de King B liquide de pH 7 à raison de 60 µg/ml pour une température d'incubation de 37°C.

- Aberoumand, A. 2010. A review on pseudomonas in marine fish. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 2(4) :291-296.
- Anas A, Pai SS , Jayaprakash NS, Priyaja P, Sreelakshmi B, Preetha R, Philip R, Mohandas A, Singh. *Aquac Res* 2010 ; 41: 847-860.
- Anita B. & Samiyappan R., 2012. Induction of systemic resistance in rice by *Pseudomonas fluorescens* against rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*. *J. Biopesticides*, 5, 53-59.
- Ananthkrishnan M, Kumarasamy K, Raja P, Malini. *Pharmac Glob* 2012; 11: 1–3.
- Angell S, Bench BJ, Williams H, Watanabe CM. *Chem Biol* 2006;13(12):1349-1359.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J-Y., Wakabayashi, H. and Oyaizu, H., 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1563–1589.
- Arunkumar G., Rao S.G. & Shivananda P.G (1997). Anti-Staphylococcal activity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Science* 72, 580-582.
- Baron, S.S. and J.J. Rowe, 1981. Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 20: 814-820.
- Bergey, D. H. Et American Society for Microbiology. 1923. *Bergey's manual of systematic bacteriology* 1st edition. John G. Holt et al (editors), Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA.
- Berche P, Gaillard JL, Simonet M, 1991. *Les bactéries des infections humaines*. Éditeur : Flammarion, Médecine & Sciences, 660 p.
- Bédard, E., Charron, D., Lalancette, C., Déziel, E., & Prévost, M. (2014). Recovery of *Pseudomonas aeruginosa* culturability following copper- and chlorine-induced stress. *FEMS Microbiology Letters*, 9. doi: 10.1111/1574-6968.12494.
- Bossis, Lemanceau, P., Latour, X., Gardan, L., 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, 20, 51-63
- Brown, A. D. (1957). Some general properties of a Psychrophilic Pseudomonad: the effects of temperature on some of these properties and the utilization of glucose by this organism and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology*, 17(3), 640-648.
- Cappe, P., A. Mourey, Et G. Kilbertus. 1994. Variation of lipolytic activity in the genus *Acinetobacter* sp. *Journal of General and Applied Microbiology* 4:113-114.
- Charde A. & Dawande A.Y., 2010. Purification and characterization of proteinaceous compound from *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 948). *Asiatic J. Biotechnol. Resour.*, 1, 20-22.

- Chen J, and Xiao-Chang C. 2004, Organic light-emitting device having phenanthroline-fused phenazine. US patent 6713781.
- Chin-A-Woeng, T. F. C., G. V. Bloemberg, A. J. van der Bij, K. M. G. F. van der Drift, J. Schripsema, et al. 1998. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:1069-1077.
- Choi, K. H., L. A. Trunck, A. Kumar, T. Mima, R. R. Karkhoff-Schweizer, et H. P. Schweizer. 2008. Genetic tools for *Pseudomonas*, p. 65-86. In P. Cornelis (Ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Calister Academic Press, Norfolk, UK.
- Colwell, R.R. and Mandel, M., 1964. Adansonian analysis and deoxyribonucleic acid base composition of some Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 87: 1412–1422.
- Colwell, R.R., Citarella, R.V. and Ryman, I., 1965. Deoxyribonucleic acid base composition and Adansonian analysis of heterotrophic aerobic pseudomonads. *J. Bacteriol.* 90: 1148–1149.
- Cruden, D. L., J. H. Wolfram, R. D. Rogers, et D. T. Gibson. 1992. Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with p-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. *Applied and Environmental Microbiology* 58:2723–2729.
- Dagher, F., E. Déziel, P. Lirette, G. Paquette, J. C. Bisailon, et R. Villemur. 1997. Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. *Canadian Journal of Microbiology* 43:368-377.
- Den Dooren de Jong, L. E. 1926. *Bijdrage tot de kennis van het mineralisatieproces*. Nijgh & Van Ditmar, Rotterdam. 200 pages.
- Delaney, S. M., Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F. et Thomashow, L. S. (2001). *phzO*, a Gene for Biosynthesis of 2-Hydroxylated Phenazine Compounds in *Pseudomonas Aureofaciens* 30-84. *J Bacteriol* 183, 318-327.
- Department of Health (DH), Estates & Facilities, & Government of Great Britain. (2013). *Water systems : HTM 04-01 : Addendum. Pseudomonas aeruginosa - advice for augmented care units.* 37.
- Devanesan M.G., Viruthagiri T. & Sugumar N., 2007. Transesterification of *Jatropha* oil using immobilized *Pseudomonas fluorescens*. *Afr. J. Biotechnol.*, 6, 2497-2501.
- Dietrich, L. E., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M. et Newman, D. K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 61, 1308-1321.
- Dwidjosiswojo, Z., Richard, J., Moritz, M. M., Dopp, E., Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2011). Influence of copper ions on the viability and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* under conditions relevant to drinking water environments. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 485-492.

- El-Fouly MZ, Sharaf AM, Shahin AAM, El-Bialy HA, Omara. J Rad Res Appl Sci 2015;8(1):1-13.
- Euzeby, J.P., 2008. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. URL <http://www.bacterio.cict.fr/>.
- Farrow JM 3rd, Pesci EC (2007) Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the Pseudomonas quinolone signal. J Bacteriol 189(9):3425–3433.
- Feuilloley M.G.J., Chapalain A., Rossignol G., Lesouhaitier O., Merieau A., Geoffroy V., Guerillon J., Meyer J.M., Orange N. (2007). Comparative study of seven fluorescent Pseudomonad clinical isolates. Revue canadienne de microbiologie 54 : 19- 27.
- Franzetti L and Scarpellini. Annals Microbiol 2007; 57: 39–47.
- Gao G. et al., 2012. Effect of biocontrol agent Pseudomonas fluorescens 2P24 on soil fungal community in cucumber rhizosphere using T-RFLP and DGGE. PlosOne, 7, e31806, doi:10.1371/journal.pone.0031806.
- Gaitatzis, N.; Silakowski, B.; Kunze, B.; Nordsiek, G.; Blocker, H.; Hofle, G. and Muller, R. (2002). The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel Type of Modular polyketide synthase. J Biol Chem 277, 13082-13090.
- Gross, H., Loper, J.E. 2009. Genomics of secondary metabolite production by Pseudomonas spp. Nat. Prod. Rep. 26:1408-1446.
- Hardalo, C., & Edberg, S. C. (1997). Pseudomonas aeruginosa: Assessment of risk from drinking water. Critical Reviews in Microbiology, 23(1), 47-75.
- Haas, D. et Defago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews Microbiology 3: 307-319.
- Hassan, H. M. & Fridovich, I. (1980). Mechanism of the antibiotic action pyocyanine. J Bacteriol 141, 156-163.
- Huang J, Xu Y, Zhang H, Li Y, Huang X, Ren B, Zhang X (2009) Temperature-dependent expression of phzM and its regulatory genes lasI and ptsP in rhizosphere isolate Pseudomonas sp. strain M18. Appl Environ Microbiol 75(20):6568–6580.
- Johnson, J. L. et N. J. Palleroni. 1989. Deoxyribonucleic acid similarities among Pseudomonas species, International Journal of Systematic Bacteriology 39:230-235.
- Johnson, J.L. and Ordal, E.J., 1968. Desoxyribonucleic acid homology in bacterial taxonomy: effect of incubation temperature on reaction specificity. J. Bacteriol. 95: 893–900.
- Joffin J. N. et Leyral G., (2006). Microbiologie technique, Tome1 : Dictionnaire technique, 4ème édition CRDP d’aquitaire. P368.
- Kerr, J. R. (1994). Suppression of fungal growth exhibited by pseudomonas aeruginosa. J Clin Microbiol 32,525-527.

- Kerr, J. R., Taylor, G. W., Rutman, A., Hoiby, N., Cole, P. J et Wilson, R. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* Hogan, D.A. et Kolter, R. (2002). *Pseudomonas-Candida interactions : An Ecological Role for Virulence Factors. Science* 296,2229-2232. pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *J Clin Pathol* 52,385-387.
- Kerr, K. G., & Snelling, A. M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa : A formidable and ever present adversary. Journal of Hospital Infection*, 73(4), 338-344.
- Liang, H., L. Li, Z. Dong, M.G. Surette and K. Duan, 2008. The yebc family protein pa0964 negatively regulates the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal system and pyocyanin production. *J. Bacteriol.*, 190: 6217-6227.
- Marrie, T. J., et J. W. Costerton. 1983. Scanning electron microscopic study of uropathogen adherence to a plastic surface. *Applied and Environmental Microbiology* 45 :1018-1024.
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M. W., Rahme, L. G. et Ausubel, F. M. (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96, 47-56.
- Marchal N. et Bourdon j. L., (1982). *Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bacteries* .Ed. Doin, Paris.
- Mavrodi, D. V., Ksenzenko, V. N., Bonsall, R. F., Cook, R. J., Boronin, A. M. et Thomashow, L. S. (1998). A Seven-Gene Locus for Synthesis of Phenazine-1-Carboxylic Acid by *Pseudomonas Fluorescens* 2-79. *J Bacteriol* 180, 2541-2548.
- Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G. et Thomashow, L. S. (2001). Functional Analysis of Genes for Biosynthesis of Pyocyanin and Phenazine-1-Carboxamide from *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 183, 6454-6465.
- Mazereeuw-Hautier J., 2006. Formation médicale continue : impétigo. *Ann. Dermatologie Vénérologie*, 133, 194-207.
- Mazzola, M., Cook, R. J., Thomashow, L. S., Weller, D. M. et Pierson, L. S. (1992). Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Appl Environ Microbiol* 58, 2616-2624.
- Mena, K. D., & Gerba, C. P. (2009). Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. In D. M. Whitacre (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 201, pp. 71-115) : Springer US.
- Moneke A.N., Okpala G.N. & Anyanwu C.U., 2010. Biodegradation of glyphosate herbicide in vitro using bacterial isolates from four rice fields. *Afr. J. Biotechnol.*, 9, 4067-4074.
- Ohfuji K, Sato N, Hamada-Sato N, Kobayashi T, Imada C, Okuma H. *Biosens Bioelec* 2004 ; 19 : 1237–1244.

- Ongena M. et al., 2005. Isolation of an N-alkylated benzylamine derivative from *Pseudomonas putida* BTP1 as elicitor of induced systemic resistance in bean. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 18, 562-569.
- Oussou KR, C Kanko, N Guessend, S Yolou, G Koukoua, M Dosso, YTN'guessan, G. Figueredo, Jean-Claude Chalchat, 2004. Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes de Côte d'Ivoire. *C.R. Chimie* 7 : 1081-1086.
- Parker, R.B., et P. R. Elliker. 1953. Effect of spoilage bacteria on biacetyl content and flavor of cottage cheese. *Journal of Dairy Science* 36(8):843-849.
- Pai SS, Anas A, Jayaprakash NS, Priyaja P, Sreelakshmi B, Preetha R, Philip R, Mohandas A, Singh. *Aquac Res* 2010; 41: 847-860.
- Palleroni, N.J., R. Kunisawa, R. Contopoulou, et M. Doudoroff. 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 23:333-339.
- Palleroni, N.J. 1978. *The Pseudomonas Group*. Meadowfield Press Ltd., Shildon. 80 pages.
- Palleroni, N.J., 2008. The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In: Cornelis, P.(Ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Belgium, pp. 1–18.
- Pipke, R., I. Wagner-Döbler, K. N. Timmis, et D. F. Dwyer. 1992. Survival and function of a genetically engineered *Pseudomonad* in aquatic sediment microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 58:1259–1265.
- Palleroni, N.J., 1984. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp. 141–171.
- Palleroni, N.J. and Bradbury, J.F., 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 : 606–609.
- Palleroni, N.J., moore, E.R.B., 2004. Taxonomy of *Pseudomonas*: experimental approaches In: J.-L. Ramos (Ed.), *Pseudomons Vol. 1*, plenum publishers, New York, pp. 3-47.
- Palleroni, N.J., 2005. Genus I. *Pseudomonas*. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Part B: The Proteobacteria*. Springer, New York, pp. 323–379.
- Palleroni, N.J., 2005. Genus I. *Pseudomonas*. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Part B: The Proteobacteria*. Springer, New York, pp. 323–379.
- Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J.M., Ramirez-Bahena, M.H., Mateos, P.F., Santa-Regina, I., Rodriguez-Barrueco, C., Martinez-Molina, E. and Velazquez, E., 2007. Reclassification of *Pseudomonas aurantiaca* into *Pseudomonas chlororaphis* and proposal of three subspecies, *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp.nov., *P. chlororaphis* subsp.

aureofaciens subsp. nov. and *Pseudomonas chlororaphis* subsp. aurantiaca subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1286–1290.

- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H. and Velázquez, E., 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evolution*, 9: 1132–1147.
- Pham TH, Boon N, De Maeyer K, Hofte M, Rabaey K, Verstraete. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008 ;80: 985–993.
- Preetha R., Jose S., Prathapan S., Vijayan K.K., Jayaprakash N.S., Philip R. & Bright Singh I.S. (2010) An inhibitory compound produced by *Pseudomonas* with effectiveness on *Vibrio harveyi*. *Aquaculture Research* 41, 1452-1461.
- Price-Whelan, A., Dietrich, L. E. et Newman, D. K. (2006). Rethinking “secondary” metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat chem biol* 2, 71-78.
- Priyaja P, Jayesh P, Correya N, Sreelakshmi B, Sudheer N, Philip. *J Coast Life Med* 2014;2: 76–84.
- Ra’oof WM and Latif. *European J Scient Res* 2010; 47(3):405–421.
- Sawada H., Kanaya S., Tsuda M., Suzuki F., Azegami K., Saitou N. (2002). A phylogenomic study of the OCTase genes in *Pseudomonas syringae* pathovars : the horizontal transfer of the argK-tox cluster and the evolutionary history of OCTase genes on their genomes. *J Mol Evol* 54: 437-457.
- Saha S, Thavasi R, Jayalakshmi. *Res J Microbiol* 2008;3 (3): 122-128.
- Silby, M., Cerdano-Tarraga, A., Vernikos, G., Giddens, S., Jackson, R., Preston, G., Zhang, X., Moon, C., Gehrig, S., Godfrey, S., et al. 2009. Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biol.* 10:R51.
- Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, et M. Doudoroff. 1966. The aerobic pseudomonads : A taxonomic study. *Journal of General Microbiology* 43:159-271.
- Stackebrandt, E., Ludwig, W., Weizenegger, M., Dorn, S., McGill, T.J., Fox, G.E., Woese, C.R. and Schubert, W., Schleifer, K.H., 1987. Comparative 16S rRNA Oligonucleotide Analyses and Murein Types of Round Spore Forming Bacilli and Non Spore Forming Relatives. *J. Gen. Microbiol.* 133: 2523-2529.
- Stallwood B., Shears J., Williams P.A., Hughes K.A. (2005). Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with a *Pseudomonas* sp. from maritime Antarctica. *J Appl Microbiol* 99: 794-802.
- Spinks, A. T., Dunstan, R. H., Harrison, T., Coombes, P., & Kuczera, G. (2006). Thermal inactivation of water-borne pathogenic and indicator bacteria at sub-boiling temperatures. *Water Research*, 40(6), 1326-1332.
- Steyn, P. S. (1980). The biosynthesis of mycotoxins. Academic Press, New York, pp. 1-4.

- Sudhakar T, Karpagam S, Shiyama. Inter J Chem Tech Res 2013 ;5: 1101–1106.
- Slininger PJ, Shea-Wilbur MA (1995) Liquid-culture pH, temperature, and carbon (not nitrogen) source regulate phenazine productivity of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Appl Microbiol Biotechnol 43(5):794–800 .
- Singleton P.,(1999), Bactériologie, Edition Duonod 4<sup>ème</sup> édition paris 415p.
- Tamaoka, J., Ha, D.-M. and Komagata, K., 1987. Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosterone* comb. nov., with an emended description of the genus *Comamonas*. Int. J. Syst.Bacteriol. 37: 52–59.
- Talon D., Thouverez M., Bertrand X. (2006). Role des *Pseudomonas* et apparentés dans les infections nosocomiales. XVIIe Congrès national de la SFHH. 22-24.
- Thiem, S. M., M. L. Krumme, R. L. Smith, et J. M. Tiedje. 1994. Use of molecular techniques to evaluate the survival of a microorganism injected into an aquifer. Applied and Environmental Microbiology 60:1059–1067.
- Tortora G .j.,Funke et CASE C.L.,(2003).introduction à la microbiologie.Ed.de Renouveau pédagogique Inc. pp : 157-355 .
- van Rij ET, Wesselink M, Chin-A-Woeng TFC et al (2004) Influence of environmental conditions on the production of phenazine-1-carboxamide by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. Mol Plant Microbe Interact 17(5) :557–566.
- Voguu, L., Schlag, S., Biswas, R., Rosenstein, R., Rausch, C. ET Gotz, F. (2006).Microevolution of Cytochrome bd Oxidase in Staphylococci and Its Implication in Resistance to Respiratory Toxins Released by *pseudomonas*. *J Bacteriol* 188, 8079-8086.
- Walsh U.F., Morrissey J.P., and O'Gara F. (2001). *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens : from functional genomics to commercial exploitation. Curr Opin Biotechnol 12: 289-295.
- Wang, Y., Wilks, J. C., Danhorn, T., Ramos, I., Croal, L. et Newman, D. K. (2011). Phenazine-1-Carboxylic Acid Promotes Bacterial Biofilm Development via Ferrous Iron Acquisition. *J Bacteriol* 193, 3606-3617.
- Willems, A., Busse, J., Goor, M., Pot, B., Falsen, E., Jantzen, E., Hose, B., Gillis, M., Kersters, K., Auling, G. and De Ley, J., 1989. *Hydrogenophaga*, a new genus of hydrogen-oxidizing bacteria that includes *Hydrogenophaga flava* comb. nov.(formerly *Pseudomonas flava*), *Hydrogenophaga palleronii* (formerly *Pseudomonas palleronii*), *Hydrogenophaga pseudoflava* (formerly *Pseudomonas pseudoflava* and “*Pseudomonas carboxydoflava*”), and *Hydrogenophaga taeniospiralis* (formerly *Pseudomonas taeniospiralis*). Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 319–333.

- Willems, A., Falsen, E., Pot, B., Jantzen, E., Hoste, B., Vandamme, P., Gillis, M., Kersters, K. and De Ley, J., 1990. *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E. Falsen (EF) group 13, EF group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 384–398.
- Willems, A., Goor, M., Thielemans, S., Gillis, M., Kersters, K. and de Ley, J., 1992. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 107–119.
- Woese, C.R., Stackebrandt, E., Weisburg, W.G., Paster, B.J., Madigan, M.T., Fowler, V.J., Hahn, C.M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K.H. and Fox, G.E., 1984. The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.* 5: 315–326.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. and Arakawa, M., 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immun.* 36: 1251–1275.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H. and Nishiuchi, Y., 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov., Proposal of *Ralstonia pickettii* (*Ralston*, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol. Immun.* 39: 897–904.
- Yabuuchi et al., 1992, 1995 .
- Yamamoto, S., H. Kasai, D. L. Arnold, R. W. Jackson, A. Vivian, et S. Harayama. 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* 146:2385-2394 .

**King B solide :**

Peptone de caséine (Tryptone).....	20 g
Sulfate de magnésium .....	1.5 g
Phosphate bipotassique .....	1.5 g
Glycérol .....	10 ml
Agar .....	20 g
Eau distillé .....	1000 ml
PH .....	7.2

**King A solide :**

Peptone de caséine (Tryptone).....	20 g
Sulfate de potassium .....	10 g
Chlorure de magnésium .....	1.4 g
Glycérol .....	10 ml
Agar .....	20 g
Eau distillé .....	1000 ml
PH .....	7.2

**King B liquide :**

Peptone de caséine (Tryptone).....	20 g
Sulfate de magnésium .....	1.5 g
Phosphate bipotassique .....	1.5 g
Glycérol .....	10 ml
Eau distillé .....	1000 ml
PH .....	7.2

**King A liquide :**

Peptone de caséine (Tryptone).....	20 g
------------------------------------	------

Sulfate de potassium .....	10 g
Chlorure de magnésium .....	1.4 g
Glycérol .....	10 ml
Eau distillé .....	1000 ml
PH .....	7.2

### **Disque cellulosesiques :**

Les disques cellulosesiques (doublé) ont été préparés à partir de papier filtre

Fabriquant : Schleicher et Schuell

Diamètre ø: 6 mm

Epaisseur : 0.25 mm

### **Mueller Hinton solide**

Peptone de caséine (Tryptone) .....	17,5 g
Extrait de viande .....	2g
Amidon .....	1, 5g
Agar .....	18g
Eau distillé .....	1000 ml
PH .....	7,3

### **Mueller Hinton liquide**

Tryptone .....	17,5 g
Extrait de viande .....	2g
Amidon .....	1, 5g
Eau distillé .....	1000 ml
PH .....	7,3

### **Bouillon nutritif**

Peptone .....	6 g
Extrait de viande .....	1g
Extrait de levure.....	2g

NaCl.....5g  
Eau distillé .....1000 ml  
pH .....7,2