

République Algérienne Démocratique et Populaire

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'ÉTUDE**

Présenté par

**Attoura Fatma**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité: Microbiologie appliquée**

THÈME

**Contribution à l'étude de la pyocyanine  
pour un usage thérapeutique contre  
quelques microorganismes pathogènes**

Soutenue publiquement le 10/07/2019

DEVANT LE JURY

Président :	Mr MEKHALDI Abdelkader	Professeur	U.Mostaganem
Examineur :	Mr CHIBANI Abdelwaheb	Professeur	U.Mostaganem
Examinatrice :	Mlle BECHELAGHEM Nadia	Docteur	U.Mostaganem
Encadreur :	Mr DJIBAOUI Rachid	Professeur	U.Mostaganem
Co-encadreur :	Mr DAHAH Hicham	Docteur	

*Thème réalisé au laboratoire de microbiologie de l'université de Mostaganem*

Année universitaire 2018-2019

## Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier « **Allah** » de m'avoir donné le courage, la patience et la foi pour réaliser ce modeste travail et de me reconnaître à nouveau à travers cette expérience.

Je remercie mon encadreur le professeur « **Djibaoui Rachid** » pour sa disponibilité, son aide, son encouragement et ses conseils surtout.

J'adresse mes sincères remerciements également à mon co-encadreur **Mr « Dahah Hicham »** pour le temps qu'il m'a consacré, ses aides, sa patience, l'inspiration qu'il m'a donné. Merci  
Beaucoup.

Mes remerciements vont aussi aux membres du jury de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail :  
**Monsieur MEKHALDI Abdelkader, Monsieur CHIBANI Abdelwaheb et Mlle BECHLAGHEM Nadia.** Qu'ils acceptent l'expression de ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

Je tiens à remercier Mlle «**Bechlaghem Nadia** » et « **Mazari Hibat Errahmen**» pour leurs aides, leurs encouragements et leur disponibilité.

Je n'oublie pas de remercier **Mr Zerhouni Moustapha, Mr Arabi Abed, Mr Saouane Abdelkader, Mr Mohamed, Mme Hafida, Mr Djilali, Mme Amina et Mme Djahira.**

J'adresse mes sincères remerciements à ma famille et ma tante qui grâce à leur prière j'ai pu dépasser tous les obstacles. Merci d'avoir été là pendant les moments difficiles et de découragement.

Merci à **Halima Medjadji, Somia Zaoui et Nassima Amara.**

Merci à toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail :*

*À la mémoire de mon cher père.*

*À ma mère, mes sœurs et mes frères*

*À ma tante.*

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b>	Représentation schématique du SST3 situé dans l'enveloppe de <i>P. aeruginosa</i>	8
<b>Figure 2 :</b>	Les facteurs de virulence chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
<b>Figure 3 :</b>	Quelques phénazines d'origine bactérienne	18
<b>Figure 4 :</b>	Biosynthèse des phénazines	19
<b>Figure 5 :</b>	Formule développée de la pyocyanine en milieu acide et en milieu basique	20
<b>Figure 6 :</b>	Schéma de la production de phénazine (pyocyanine) par <i>P. aeruginosa</i>	21
<b>Figure 7 :</b>	Mécanisme du stress oxydatif induit par les PCN	24
<b>Figure 8 :</b>	La graminée récoltée (orge des rats = <i>Hordeum murinum</i> ).	26
<b>Figure 9 :</b>	Test d'antagonisme par la méthode des stries.	30
<b>Figure 10 :</b>	Observation microscopique des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> après coloration de Gram (x1000).	33
<b>Figure 11 :</b>	Test de catalase (a) et d'oxydase (b) pour un isolat de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	34
<b>Figure 12 :</b>	Aspect macroscopique de la souche S2 de <i>P. aeruginosa</i> sur gélose King A (1) et gélose King B (2)	34
<b>Figure 13 :</b>	Aspect macroscopique de l'isolat I14 sur gélose King B	35
<b>Figure 14 :</b>	Observation microscopique après coloration de Gram (x1000) de (A) <i>S.aureus</i> ATCC 33862, (B) <i>B.cereus</i> ATCC 10867, (C) <i>P. mirabilis</i> ATCC 35659.	36
<b>Figure 15 :</b>	Aspect macroscopique de <i>S.aureus</i> ATCC 33862 sur milieu Chapman	36
<b>Figure 16 :</b>	Aspect macroscopique de <i>Candida albicans</i> ATCC 33862 sur milieu Sabouraud	36
<b>Figure 17 :</b>	Activité antagoniste des isolats vis-à-vis les souches cibles	37
<b>Figure 18 :</b>	pyocyanine extraite dans l'HCl 0.2 N.	39
<b>Figure 19 :</b>	Spectre d'absorption de la pyocyanine dissoute dans l' HCl 0,2 N.	40
<b>Figure 20 :</b>	Effet antimicrobien de la pyocyanine extraite sur les bactéries à Gram négatif et la levure cibles.	42
<b>Figure 21 :</b>	Effet antimicrobien de la pyocyanine extraite sur les bactéries à Gram positif cibles	42

- Figure 22** histogramme représentant l'effet de la période d'incubation sur la 44  
production de la pyocyanine à 37°C.
- Figure 23** histogramme représentant l'effet de la période d'incubation sur la 45  
production de la pyocyanine à 30°C.
- Figure 24** orientation vers l'identification de la souche S2 sur galerie API 20 E ; 47  
(A) avant l'incubation, (B) après l'incubation.

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b>	Résultats de quelques tests biochimiques pour <i>P.aeruginosa</i>	35
<b>Tableau 2 :</b>	Les zones d'inhibition (en mm) de l'activité antagoniste <i>in vitro</i> des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vis-à-vis les souches pathogènes	38
<b>Tableau 3 :</b>	Quantification de la pyocyanine produite	40
<b>Tableau 4 :</b>	Activité antimicrobienne de la pyocyanine sécrétée par la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (S2).	43
<b>Tableau 5 :</b>	Résultats des différents tests biochimiques de la galerie API 20 E	46

## Liste des abréviations

1-OHPHZ : 1-hydroxyphénazine.  
ABC : ATP Binding Protein.  
ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique .  
ADP : adénosine diphosphate  
AP : protéase alcaline.  
ARNr : Acide Ribo-Nucléique ribosomique.  
ATCC : American Type Culture Collection .  
ATP : Adénosine Tri-Phosphate.  
*B: Bacillus.*  
CAT : catalase.  
CFTR : Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator.  
CIO : oxydase insensible au cyanure.  
DO : densité optique.  
Exo : exotoxine.  
FK : fibrose kystique.  
GTPase : Guanosine triphosphatase.  
KDa : kilodalton.  
Las : élastase.  
Lec : lectine.  
LPS : lipopolysaccharide.  
Mb : Mégabase.  
MFP : Protéine de Fusion Membranaire  
ml : millilitre.  
mm : millimètre.  
MRSA : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.  
MDRPA : Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*.  
N : normalité.  
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide  
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide phosphate.  
NR : nitrate réductase.  
OMP : Protéine de la membrane externe  
*P. : Pseudomonas*  
PCA : phénazine-1-carboxylique acide.  
PCN : phénazine-1- carboxamide.  
PVD : pyoverdine.

PYO : pyocyanine.

PCH :Pyochiline.

PZ : phénazines.

QS : quorum sensing.

RM : Rouge de Méthyl.

RMt : Ribosomal methyl transferase.

ROS : espèce réactive de l'oxygène.

SCP : *Staphylococcus* à coagulase positive.

SCV : Small Colony Variant.

SOD : superoxyde dismutase.

SST : Système de Sécrétion de Type.

TNF : Facteur de nécrose tumorale.

TSI : Triple Sugar Iron.

UFC : unité formant colonie.

UV : Ultra-violet.

VP : Vogues-Proskauer.

µg: microgramme.

µm: micrometer.

µm: micromètre.

## Sommaire

Résumé, ملخص	
Abstract	
Liste des abréviations	
Sommaire	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction .....	1
<b>Analyse bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Généralités sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	
1. Historique.....	3
2. Définition .....	3
3. Habitat .....	4
4. Génome de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	4
5. Versatilité métabolique.....	5
6. Pouvoir pathogène et facteurs de virulence.....	6
6.1. Pouvoir pathogène .....	6
6.2. Facteurs de virulence.....	6
6.2.1. Les systèmes de sécrétion.....	6
6.2.1.1. Système de sécrétion de type I (SST1).....	7
6.2.1.2. Système de sécrétion de type II (SST2).....	7
6.2.1.3. Système de sécrétion de type III (SST3).....	7
6.2.1.4. Système de sécrétion de type V (SST5).....	8
6.2.1.5. Système de sécrétion de type VI (SST6).....	8
6.2.2. Facteurs de virulence associés à la bactérie.....	9
6.2.2.1. Pili.....	9
6.2.2.2. Flagellum .....	9
6.2.2.3. LPS.....	9
6.2.2.4. Alginate .....	9
6.2.3. Facteurs de virulence sécrétés.....	10
6.2.3.1. Les protéases.....	10
6.2.3.1.1. L'élastase.....	10
6.2.3.1.1.1. L'élastase B.....	10
6.2.3.1.1.2. L'élastase A .....	10
6.2.3.1.2. La protéase alcaline.....	11
6.2.3.2. La leucocidine.....	11
6.2.3.3. Les sidérophores.....	11
6.2.3.3.1. La pyoverdine.....	11
6.2.3.3.2. La pyochéline.....	12
6.2.3.4. Les rhamnolipides .....	12
6.2.3.5. Les lectines .....	12
6.2.3.5.1. La lectine PA-IL .....	13
6.2.3.5.2. La lectine PA-III .....	13
6.2.3.6. Exotoxines S, T, U et Y .....	13
6.2.3.7. La pyocyanine.....	14
7. Multirésistance chez <i>P.aeruginosa</i> .....	14
8. La formation de biofilm.....	16
<b>Chapitre II : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> producteur des phénazines</b>	
1. Définition des phénazines.....	18
2. Biosynthèse des phénazines.....	19
3. Les phénazines de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	19
3.1. La pyocyanine.....	20
3.1.1. Biosynthèse .....	20
3.2. La PCA.....	21
3.3. La PCN.....	21

4. Spèctre d'activité antibiotique et pouvoir inhibiteur des phénazines.....	21
5. Utilisation des phénazines dans le domaine thérapeutique : cas de la pyocyanine	22

### Partie pratique

#### Matériel et Méthodes

1. Echantillonnage .....	26
2. Isolement de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	26
3. Choix et purification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	26
4. Provenance des isolats cliniques de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	26
5. Conservations des isolats .....	27
6. Provenance des souches pathogènes.....	27
7. Identification des <i>Pseudomonas</i> .....	27
7.1. Etude macroscopique.....	27
7.2. Etude microscopique.....	27
7.3. Etude biochimique.....	27
7.3.1. Recherche de la catalase.....	27
7.3.2. Recherche du cytochrome oxydase.....	28
7.3.3. Production de pigments.....	28
7.3.4. Croissance à 42 et à 4 ° C.....	28
7.3.5. Protéolyse de la gélatine.....	28
7.3.6. Réduction des nitrates.....	28
7.3.7. Tests VP-RM.....	29
7.3.8. Test TSI.....	29
8. Etude phénotypique des souches pathogènes cibles .....	29
9. Test d'antagonisme <i>in vitro</i> .....	30
10. Dosage de la pyocyanine.....	31
10.1. Production de la pyocyanine.....	31
10.2. Quantification de la pyocyanine produite.....	31
11. Caractérisation et identification du métabolite extrait.....	31
11.1. Etude par spectrophotometrie UV-visible.....	31
12. Effet antimicrobien de la pyocyanine.....	31
13. Effet de la température et de la période d'incubation sur la production de la pyocyanine	32
14. Identification par galerie API 20 E.....	32
14.1. Préparation, inoculation et incubation de la galerie.....	32
14.2. Lecture et interprétation.....	32

#### Résultats et discussion

1. Isolement et obtention de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	33
2. Identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	33
2.1. Etude macroscopique.....	33
2.2. Etude microscopique.....	33
2.3. Résultats des tests biochimiques.....	34
2.3.1. Recherche de la catalase et du cytochrome oxydase.....	34
2.3.2. Production de pigments.....	34
2.3.3. Résultats des tests biochimiques.....	35
3. Observation des souches pathogènes cibles.....	35
4. Résultat du test d'antagonisme <i>in vitro</i> .....	36
5. Dosage de la pyocyanine.....	39
5.1. Calcul de la quantité de la pyocyanine.....	40
6. Caractérisation du métabolite produit.....	40
7. Effet antimicrobien de la pyocyanine.....	41
8. Effet de la température et de la période d'incubation sur la production de la pyocyanine	43
9. Identification par galerie API 20E .....	46
Conclusion et Perspectives.....	48

Références bibliographiques.....	
Annexes.....	

## الملخص

أدى الاستخدام المكثف للمضادات الحيوية إلى ظهور سلالات ممرضة شديدة المقاومة ، يصعب علاج الالتهابات الناجمة عنها حيث لا يمكن علاجها بشكل فعال إلا بعدد محدود من العوامل المضادة للميكروبات. لهذا، أصبح البحث عن مضادات حيوية جديدة غير تقليدية أمر شديد الأهمية. تنتج *Pseudomonas aeruginosa* العديد من مواد الاستقلاب الثانوي التي لها تأثير بيولوجي كبير ضد العديد من الميكروبات.

حاولنا في هذا العمل تقييم النشاط المضاد للميكروبات للبيوسيانين ل9 عزلات من *P.aeruginosa* ومصدرها كلها مستشفيات باستثناء واحدة تم الحصول عليها من جذور نبات تابع للنجيليات (شعير الفأر = *Hordeum murinum*). أظهرت نتائج التصاد لهذه العزلات ضد خمائر و بكتيريا موجبة وسالبة الجرام مناطق تثبيط هامة من بينها تلك التي أظهرتها العزلة S2 التي كان لها تأثير على جميع السلالات المستهدفة. كما بين تقدير كمية البيوسيانين المنتجة عند 4 عزلات *P.aeruginosa* بواسطة جهاز الطيف الضوئي أن أفضل إنتاج كان عند العزلة S2. و قد تم اختبار البيوسيانين المنتج بواسطة هذه السلالة ضد الميكروبات المسببة للأمراض. استخلص هذا الأخير بواسطة الكلوروفورم وتم تقييم تأثيره بواسطة طريقة الانتشار للأقراص على وسط Mueller- Hinton و كشفت النتائج التي تم الحصول عليها أن حساسية الخمائر والبكتيريا الموجبة الجرام كانت أكبر من البكتيريا سالبة الجرام مع مناطق تثبيط قدرت ب 15 مم لكل من *Staphylococcus aureus* ATCC 3386 و *Candida albicans* أعطت دراسة تأثير درجة الحرارة وفترة التحضين على إنتاج البيوسيانين لأفضل 4 عزلات أن أكبر إنتاج و المقدر ب 15.9 µg/ml لوحظ أثناء التحضين عند 37 درجة مئوية لمدة 48 ساعة ومع العزلة S2. أظهر قياس طيف الامتصاص للبيوسيانين في المنطقة فوق البنفسجية و المرئية طيفاً يحتوي على 3 قمم ، اثنان في منطقة الأشعة فوق البنفسجية (عند 300 و 380 نانومتر) وواحد في المنطقة المرئية (عند 520 نانومتر). و قد تم تسجيل أقصى امتصاص عند 380 نانومتر.

**الكلمات المفتاحية:** *Pseudomonas aeruginosa* ، البيوسيانين ، النشاط المضاد للميكروبات ، السلالات الممرضة.

## Résumé

L'utilisation intense des antibiotiques a entraîné l'apparition de souches pathogènes extrêmement résistantes, ce qui est difficile de soigner leurs infections qui ne peuvent être traités efficacement qu'avec un groupe restreint d'agents antimicrobiens. Pour cela, il est devenu très important de rechercher de nouveaux antibiotiques non conventionnels.

*Pseudomonas aeruginosa* produit de nombreux métabolites secondaires à effet biologique significatif contre différents pathogènes, responsables de ces différentes infections.

Dans le présent travail nous avons essayé d'évaluer l'activité antimicrobienne de la pyocyanine de 9 isolats de *Pseudomonas aeruginosa*. Tout les isolats sont d'origine clinique sauf un qui est obtenu à partir des racines d'une plante graminée sauvage (l'orge du rat = *Hordeum murinum*). Les résultats de l'antagonisme de ces isolats vis-à-vis des bactéries à Gram positif et négatif et des levures ont montré des zones d'inhibition importante parmi lesquels un isolat S2 qui a montré un effet sur toutes les souches cibles.

Le dosage de la pyocyanine produite chez 4 isolats par spectrophotométrie a montré que la meilleure production de métabolite est trouvée chez la souche S2. Cette dernière est sélectionnée par la suite pour tester l'activité antimicrobienne de sa pyocyanine contre des germes pathogènes. Ce phénazine est extrait par Chloroforme et son effet est évalué par la méthode de diffusion des disques sur milieu Mueller-Hinton. Les résultats obtenus révèlent une sensibilité des bactéries à Gram positif et les levures plus grande que celle des Gram négatifs avec des zones d'inhibition de 15 mm pour *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 et *Candida albicans* d'origine génital.

L'effet de la température et du temps d'incubation sur la production de la pyocyanine a été réalisé pour les 4 isolats les plus performants. La meilleure production (15.9µg/mL) est atteinte lors d'une incubation à 37°C pendant 48 heures par l'isolat S2.

Une caractérisation de la pyocyanine par spectrophotométrie UV-visible a montré un spectre contenant 3 pics, deux dans l'UV (à 300 et 380nm) et un dans le visible (à 520nm). Un maximum d'absorption à été enregistré à 380nm.

**Mots clés :** *Pseudomonas aeruginosa*, pyocyanine, activité antimicrobienne, souches pathogènes.

## Abstract

The intense use of antibiotics has resulted in the emergence of extremely resistant pathogenic strains, which is difficult to treat their infections that can only be effectively treated with a small group of antimicrobial agents. For this reason, it has become very important to look for new unconventional antibiotics.

*Pseudomonas aeruginosa* produces numerous secondary metabolites with a significant biological effect against different pathogens responsible for these different infections.

In this work we have tried to evaluate the antimicrobial activity of the pyocyanin of 9 isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. All isolates are of clinical origin except one that is obtained from the roots of a wild grass plant (Rat barley = *Hordeum murinum*). The results of antagonism of these isolates against Gram-positive, Gram-negative bacteria and yeast showed significant areas of inhibition among which an isolate S2 had an effect on all target strains.

Determination of pyocyanin produced in 4 isolates by spectrophotometry showed that the best production is found in strain S2. This isolate is subsequently selected to test the antimicrobial activity of its pyocyanin against pathogenic germs. Pyocyanin is extracted by Chloroform and its effect is evaluated by disk diffusion method on Mueller-Hinton medium. The results obtained revealed a greater susceptibility of Gram-positive bacteria and yeasts than Gram-negative ones with 15 mm inhibition zones for *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 and *Candida albicans* of genital origin.

The effect of temperature and incubation time on pyocyanin production was performed for the 4 best performing isolates. The best production (15.9 µg / ml) is reached during incubation at 37 ° C for 48 hours by the isolate S2.

A characterization of the pyocyanin by UV-visible spectrophotometry showed a spectrum containing 3 peaks, two in the UV (at 300 and 380nm) and one in the visible (at 520nm). A maximum of absorption was recorded at 380nm.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, pyocyanin, antimicrobial activity, pathogenic strains.

# Introduction

## Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à Gram négatif présente dans presque toutes les niches écologiques, y compris le sol, l'eau et les plantes (Onbasli et Aslim, 2008) et présent même en milieu hospitalier (Abdulrazaq Abdul-Lateef *et al.*, 2017). Il est fréquemment isolé de sites contaminés et est capable de produire des métabolites qui améliorent sa compétitivité et sa survie (Onbasli et Aslim, 2008) tel que les phénazines et principalement la pyocyanine (Liang *et al.*, 2011). Cette substance qui est un trait caractéristique important et significatif de *Pseudomonas aeruginosa* est un pigment bleu-vert soluble dans l'eau (Abdulrazaq Abdul-Lateef *et al.*, 2017), elle a des effets antimicrobiens sur un grand nombre de groupes différents de microorganismes (Özyürek *et al.*, 2016).

La pyocyanine est un antichlamydia efficace elle inhibe l'infectiosité du corps élémentaire de *Chlamydia* et également la croissance de chlamydia dans l'inclusion au cours des étapes ultérieures du cycle de développement (Li *et al.*, 2018). En dépit de la toxicité de la pyocyanine, son utilisation contre les infections microbiennes humaines avec des concentrations tolérées par les cellules humaines peut devenir une solution de dernier recours devant les infections par des germes résistants à tous les moyens thérapeutiques conventionnels (Li et Webster, 2018). En plus, plusieurs travaux ont signalé la possibilité d'utiliser la pyocyanine comme moyen thérapeutique contre les infections de *Chlamydia* (Li *et al.*, 2018) et les maladies dermatologiques causées par des champignons tel que *Trichophyton rubrum*, qui pourrait être un agent causal majeur de la teigne corporelle (El-Zawawy et Ali, 2016).

En raison du potentiel d'oxydo-réduction du pigment, il a été suggéré que le mécanisme moléculaire de son action passe par la génération du radical superoxyde (Al-Saadi *et al.*, 2012). Ainsi, plusieurs études s'intéressent à son activité anticancéreuse (Zhao *et al.*, 2014 ; Alka *et al.*, 2018).

La découverte et l'utilisation de plus en plus répandue d'antibiotiques ont conduit à l'apparition rapide de souches résistantes aux antibiotiques aujourd'hui; de plus en plus d'infections sont causées par des microorganismes qui ne répondent pas aux traitements conventionnels (Li et Webster, 2018).

Le but de ce travail est d'utiliser un métabolite secondaire secrété par des souches de *P.aeruginosa* qui est la pyocyanine contre des microorganismes pathogènes.

Pour achever ce but, les objectifs suivants sont fixés :

- Isolement et caractérisation phénotypique de *Pseudomonas aeruginosa*.

- L'effet antagoniste de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis des souches pathogènes.
- Production et extraction de la pyocyanine.
- Evaluation de l'activité antimicrobienne de la pyocyanine contre quelques souches pathogènes (bactéries et levures).
- Etude de l'effet de la température et du temps d'incubation sur la production de la pyocyanine.
- Caractérisation de la pyocyanine produite par spectrophotométrie UV-visible.

Le manuscrit est structuré en deux parties, la première partie concerne la recherche bibliographique composée de deux chapitres : le premier présente des généralités sur *P.aeruginosa* et le deuxième chapitre sur la production des phénazines par cette bactérie.

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

## 1. Historique :

Le pathogène bactérien opportuniste actuellement connu sous le nom de *Pseudomonas aeruginosa* a reçu plusieurs noms tout au long de son histoire en raison de la coloration bleu-vert caractéristique produite lors de sa culture. Sédillot a été le premier à constater en 1850 que la coloration des pansements chirurgicaux était associée à un agent transmissible (**Lister et al., 2009**). C'est en 1869 que Fordos a souligné que la coloration était due à un pigment bleu cristallin appelé pyocyanine (**Sefraoui, 2015**). *Pseudomonas aeruginosa* a été découvert pour la première fois en 1872 par Schroter, qui a décrit une bactérie capable de produire un pigment bleu hydrosoluble dans le pus et sur des pommes de terre bouillies, et l'a appelé *Bacterium aeruginosum*. L'isolement bactérien sera fait dix ans plus tard par Gessard, qui le nomme *Bacillus pyocyaneus*, ce nom sera conservé jusqu'aux années soixante du 20<sup>ème</sup> siècle (**Méar, 2014**).

Aujourd'hui, *B. pyocyaneus* est connu sous le nom de *Pseudomonas aeruginosa*, et son nom reflète encore sa capacité à produire un pigment : *aerugo* est le mot latin de *verdigris*, le revêtement bleu-vert sur cuivre (**Blankenfeldt et Parsons, 2014**).

## 2. Définition :

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille à Gram négatif, non sporulant de forme droite ou légèrement courbée, il mesure de 1 à 5 µm de long et de 0,5 à 1 µm de large. C'est une bactérie mobile grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire, mésophile, aérobie stricte, qui possède néanmoins tous les systèmes nécessaires à la respiration anaérobie. Sa morphologie de même que pour tout le genre *Pseudomonas*, est facilement distinctive grâce à la production de la pyocyanine (**Elmeskini, 2011 ; Salacha, 2010**). Il appartient à la division des protéobactéries, qui sont toutes des Gram négatifs, classe des  $\gamma$ -protéobactéries, dans laquelle se trouvent la plupart des bacilles Gram négatifs pathogènes pour l'homme (**Méar, 2014**). *P. aeruginosa* appartient à la famille des *Pseudomonadaceae* (**Barakat, 2012**). Le genre *Pseudomonas* contient actuellement 144 espèces, ce qui en fait le genre de bactérie Gram négatif qui contient le plus grand nombre d'espèces (**Gomila et al., 2015**) citant : *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. pertucinogena*, *P. putida*, *P. stutzeri* et *P. syringae*. *P. aeruginosa* est le principal représentant du genre *Pseudomonas*. Cette bactérie mésophile est capable de se multiplier à l'intérieur d'un large spectre de température allant de 15 à 42°C. La température optimale de croissance est 37°C (**Barakat, 2012**).

### 3. Habitat :

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie largement récupérée de l'environnement, capable de coloniser un certain nombre de sites humides dans les plantes et les sols et dans une grande variété d'environnements aquatiques (**Bédard *et al.*, 2016**).

Considérant les environnements terrestres, son isolement des plantes ou des légumes ainsi que sa détection dans les sols agricoles été rapportés, cependant ; il est encore difficile de savoir si ces environnements constituent un réservoir ou un destinataire transitoire de *P. aeruginosa* (**Deredjian *et al.*, 2014**). Il vit comme saprophyte dans l'eau douce, on le retrouve fréquemment à l'état commensal dans l'appareil digestif de l'animal ou de l'homme sain et plus rarement au niveau cutané ou au niveau des muqueuses (**Salacha, 2010**).

Le rapport le plus ancien sur sa présence dans les sols provient de (**Ringen et Drake, 1952**). Plus tard, (**Green *et al.*, 1974**) l'ont trouvé dans les sols californiens et ont conclu que le sol agricole était un habitat naturel pour la bactérie, car les sols échantillonnés n'avaient pas de source d'engrais organique connu ni de pâturage animal et que l'eau d'irrigation était exempte de bactérie de l'homme ou de l'animal. D'autres études ont montré que *P. aeruginosa* est souvent présent dans les sols pollués de diverses régions géographiques et participe à la dégradation des hydrocarbures (**Deredjian *et al.*, 2014**).

*P. aeruginosa* est bien connu pour sa capacité à établir une résidence permanente dans les voies respiratoires des patients atteints de fibrose kystique (FK), ce qui entraîne la récurrence d'infections pulmonaires chroniques, un déclin progressif de la fonction pulmonaire et une augmentation des taux de mortalité (**Streeter et Katouli, 2016**).

Les réservoirs environnementaux de *P. aeruginosa* dans les hôpitaux sont nombreux et comprennent des aérosols, de l'eau potable, des robinets, des drains d'évier et de douche, des appareils respiratoires, des humidificateurs, et des bassins d'hydrothérapie, ainsi que des bassins de baignade (**Bédard *et al.*, 2016**).

### 4. Génome de *Pseudomonas aeruginosa* :

La capacité de *P. aeruginosa* à s'épanouir dans un répertoire d'hôtes et d'environnements a souvent été associée à son génome relativement volumineux (6 à 7 Mb) (**Freschi *et al.*, 2018**). Le premier génome de *P. aeruginosa* à être séquencé était celui de la souche PAO1, une souche largement utilisée dans les études de recherche et isolée à l'origine d'une plaie (**Kung *et al.*, 2010**). La séquence du génome de cette souche a révélé qu'elle possède un grand nombre de gènes impliqués dans la régulation, le catabolisme, le transport et l'efflux de composés organiques, ainsi que plusieurs systèmes de chimiotactisme présumés

(Lee *et al.*, 2006). *P. aeruginosa* présente la proportion la plus élevée de gènes régulateurs prévus dans les génomes bactériens séquencés. Une analyse montre 468 gènes contenant des motifs caractéristiques des régulateurs de la transcription ou des capteurs environnementaux (Stover *et al.*, 2000).

Les génomes de *P. aeruginosa* partagent une similitude significative, bien qu'ils aient été isolés de différentes niches ou d'origine clinique. Par conséquent, ces génomes similaires peuvent former un pool génomique connu sous le nom de pan-génome et fournir ainsi des informations sur la virulence, la résistance aux médicaments et la formation de biofilms liés à la pathogénicité de *P. aeruginosa* (Li *et al.*, 2016).

### 5. Versatilité métabolique :

L'omniprésence de *P. aeruginosa* est en partie attribuée à sa capacité à utiliser diverses sources de carbone et à générer de l'énergie par de multiples voies (Arai *et al.*, 2014), il possède une chaîne respiratoire ramifiée terminée par des oxydes d'oxygène et d'azote qui lui permet de se développer par respiration aérobie en présence d'oxygène (Kawakami *et al.*, 2010). *Pseudomonas aeruginosa* possède cinq oxydases terminales pour la respiration aérobie, dont une cytochrome c oxydase de type A (caa3) et deux cytochromes de type C (cbb3-1 et cbb3-2), ainsi qu'une quinol oxydase de type A (bo3) et l'oxydase insensible au cyanure (CIO), qui est une quinol oxydase non-hémique-cuivre (Osamura *et al.*, 2017).

Les cytochromes c oxydases de type cbb3 sont les principales oxydases terminales dans des conditions de forte et de faible teneur en oxygène (Hirai *et al.*, 2016). Bo3 et caa3 (ce qui ressemble le plus à l'oxydase terminale mitochondriale) ont de faibles affinités pour l'oxygène, par contre la CIO et les enzymes cbb3 ont de fortes affinités pour l'oxygène (Jo *et al.*, 2014).

*P. aeruginosa* a un métabolisme flexible qui peut utiliser les oxydes nitriques comme accepteurs alternatifs d'électrons pour produire de l'énergie lorsque l'oxygène est épuisé (Toyofuku *et al.*, 2012). En absence d'oxygène et en présence de nitrate ou de nitrite, cette bactérie peut se développer par dénitrification (Trunk *et al.*, 2010), les souches de *P. aeruginosa* sont généralement des dénitrifiants actifs (Chen *et al.*, 2003).

De plus, il effectue une fermentation de l'arginine pour produire de l'énergie dans des conditions anaérobies en l'absence d'autres accepteurs d'électrons appropriés (Trunk *et al.*, 2010) en absence de nitrate ou de nitrite, l'arginine sert de substrat énergétique pour la croissance anaérobie ; *P. aeruginosa* dégrade l'arginine en ornithine, liée à la génération d'ATP (Eschbach, *et al.*, 2004).

La fermentation du pyruvate pourrait également jouer un rôle important en tant que métabolisme de survie endogène général en réponse à une privation d'énergie (**Schreiber et al., 2006**).

## **6. Pouvoir pathogène et facteurs de virulence :**

### **6.1. Pouvoir pathogène :**

Les pathogènes opportunistes, dont *P.aeruginosa* est un modèle qui utilise l'opportunité que représente la baisse des défenses immunitaires de l'organisme pour provoquer des dommages chez l'hôte. Cela ne signifie pas qu'il ne peut se développer que chez l'immunodéficient ; il peut aussi créer des pathologies chez un individu sain mais ses atteintes seront plus fréquentes et plus sévères chez les immunodéficients (**Leclerc, 2002**).

*P.aeruginosa* est à l'origine de plusieurs types d'infections ; des infections pulmonaires, urinaires ; ostéo-articulaires ; des surinfections de lésions cutanées, en particulier chez les grands brûlés, des septicémies et des endocardites (**Claire, 2014**).

L'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* est à l'origine de la majeure partie de la morbidité chez les patients atteints de mucoviscidose. L'infection chronique est considérée comme une croissance de *P. aeruginosa* dans les tissus respiratoires sur une période de 6 mois. Environ 80% des adultes atteints de FK ont une infection chronique à *P. aeruginosa* (**Rikalovic et al, 2017**).

Les études sur les sources et les véhicules par lesquels l'organisme est transféré aux patients étaient auparavant limitées à l'environnement immédiat des patients à l'intérieur de l'hôpital. Ces sources impliquées comprennent les éviers, les solutions et les crèmes, les mains du personnel et le matériel d'inhalation et de réanimation (**Green et al., 1974**).

L'eau du robinet provenant de robinets contaminés par *P. aeruginosa* joue un rôle important dans la propagation de ce pathogène chez les patients. Il a été démontré qu'un grand nombre de transmissions s'effectue du robinet au patient et du patient au robinet (**Reuter et al., 2002**).

### **6.2. Facteurs de virulence :**

#### **6.2.1. Les systèmes de sécrétions :**

La plupart des facteurs de virulence sécrétés doivent traverser la membrane des cellules de l'hôte afin d'être délivrés directement dans le cytoplasme de ces cellules, pour se faire, la bactérie possède des complexes macromoléculaires, plus ou moins sophistiqués, appelés des systèmes de sécrétion (**Chaker, 2012**).

**6.2.1.1. Système de sécrétion de type I (SST1) :**

Le SST1 est composé d'un ABC transporteur (ATP Binding Cassette) localisé dans la membrane interne, d'une protéine spécifique de la membrane externe appelée OMP (Outer Membrane Protein) et d'une protéine dite de « fusion membranaire » (MFP), ancrée dans la membrane interne qui relie l'ABC transporteur à l'OMP (Thibault ,2010).

Deux SST1 ont été bien décrits chez *P. aeruginosa* (Reboud, 2017) : le système Apr permet la sécrétion de la protéase alcaline AprA et de la lipase LipA, et le système HasDEF qui secrète la protéine HasA qui a la capacité d'acquérir des ions des hèmes des hémoglobulines (Gebus, 2008). D'autres SST1 sont présents chez *P. aeruginosa*, mais aucun substrat spécifique n'a été mis en évidence (Reboud, 2017).

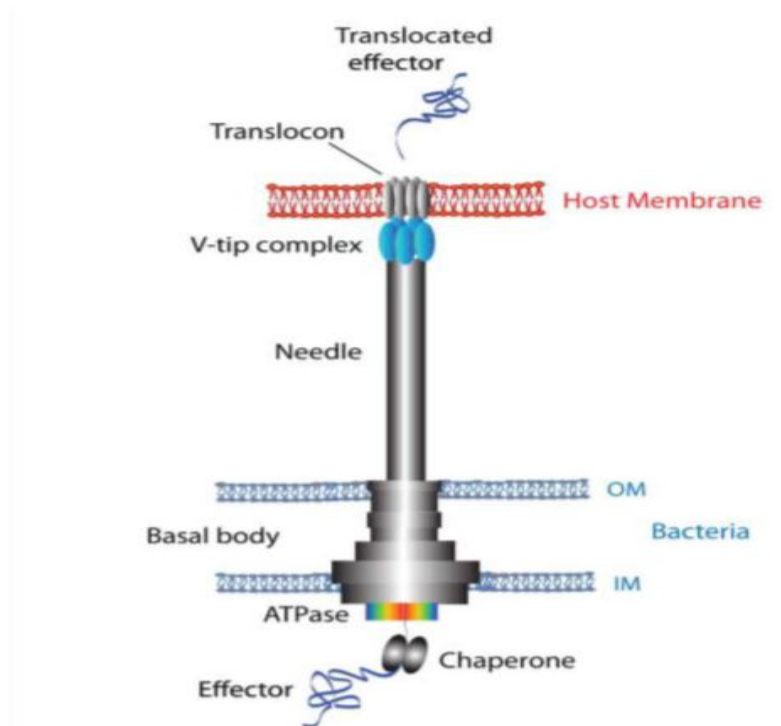
**6.2.1.2. Système de sécrétion de type II (SST2) :**

Chez *P. aeruginosa*, trois systèmes de sécrétion de type 2 ont été identifiés. Le système Xcp est de loin le système le mieux caractérisé et secrète plusieurs facteurs de virulence jouant un rôle important au cours de l'infection (Golovkine, 2015). Ce système est nécessaire pour la sécrétion d'exotoxine A, de lipases, des phospholipases C, de la phosphatase alcaline ou d'élastase (LasB) (Durand *et al.*, 2003).

Le deuxième SST2 on ne lui connaît qu'un seul substrat: la phosphatase alcaline LapA. Un troisième SST2, a été identifié récemment dans la souche clinique PA7 et lui est spécifique (Sall, 2013).

**6.2.1.3. Système de sécrétion de type III (SST3) :**

Présent chez de nombreuses bactéries, le système de sécrétion de Type III (SST3) permet la translocation d'exotoxines directement dans le cytoplasme de la cellule eucaryote cible. Il est un facteur majeur de virulence de *P. aeruginosa*, très actif lors des infections aiguës, lorsque la bactérie se développe sous forme planctonique, mais également actif dans une moindre mesure lors des infections chroniques (Perdu ,2013).



**Figure 1:** Représentation schématique du SST3 de *P. aeruginosa* (Sato et Frank, 2011)

Dans le cas de *P. aeruginosa*, le SST3 bloque les processus phagocytaires, induit la mort cellulaire et permet la dissémination des bactéries dans l'organisme (**Verove, 2011**).

Seulement quatre effecteurs ont été identifiés à ce jour chez *P. aeruginosa*, les exotoxines ExoS, ExoT, ExoU et ExoY, il produit moins de toxines que les autres bactéries à Gram négatif (*Yersinia* 6 toxines, *Shigella* 25 toxines, *Salmonella* 23 toxines) (**Pernet, 2014**).

#### 6.1.2.1.4. Système de sécrétion de type V (SST5) :

Le système de sécrétion de type V (SSTV) représente la voie de sécrétion la plus simple ; la protéine substrat traverse la membrane interne via le système Sec, ensuite ; des feuillettes  $\beta$  de cette protéine forment un canal dans la membrane externe qui servira pour le passage de la protéine à sécréter (**Chaker, 2012**).

Chez *P. aeruginosa*, le SST5 permet la sécrétion de la protéase LepA et de l'estérase EstA, impliquée dans la production des rhamnolipides (**Golovkine, 2015**).

#### 6.1.2.1.5. Système de sécrétion de type VI (SST6) :

Le système de sécrétion cible les bactéries et sécrète des effecteurs qui inhibent la croissance des cellules voisines, en utilisant un système de libération par contact (**Corbitt et al., 2018**).

Les protéines sécrétées par le T6SS appartiennent essentiellement à deux familles, à savoir

Hcp et VgrG. La fonction de Hcp consiste à former des nanotubes sur la surface bactérienne et que ces tubes pourraient permettre le transport d'autres protéines effectrices dépendantes du T6SS (Hachani *et al.*, 2011). La protéine VgrG forme un trimère et est censée servir de capuchon pour le tube Hcp qui fonctionne comme un dispositif de perforation en forme de pointe de queue (Spencer, 2015) permettant le passage de protéines ou de complexes macromoléculaires (Hachani *et al.*, 2011).

### 6.2.2. Facteurs de virulence associés à la bactérie :

#### 6.2.2.1. Pili :

*P. aeruginosa* possède de multiples pili de surface cellulaire (type IV) qui sont responsables de l'adhérence aux membranes cellulaires et à d'autres surfaces, de la motricité par contraction, de la formation de biofilms et responsable aussi des réactions avec le système immunitaire et avec les antibiotiques (Al-Wrafiy *et al.*, 2017).

#### 6.2.2.2. Flagellum :

Le flagellum polaire de *Pseudomonas aeruginosa* est un polymère composé de flagelline, nécessaire à l'adhésion des cellules, à la motilité de nage et à la formation de biofilms. De plus, la flagelline monomère est reconnue par le système immunitaire inné (Bucior *et al.*, 2012). Il peut également déclencher une réponse inflammatoire (Gellatly et Hancock, 2013).

#### 6.2.2.3. LPS :

Le lipopolysaccharide (LPS) de *P. aeruginosa* est un facteur important dans la médiation de la virulence bactérienne et des réponses de l'hôte (Pier, 2007). Il joue un rôle dans l'adhésion des bactéries avec les cellules épithéliales via les récepteurs CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) et asialoGM1 (Reboud, 2017).

Sur le plan structurel, il est composé de trois domaines, à savoir le lipide A, l'oligosaccharide central et l'antigène distal O (O-Ag) (Lam *et al.*, 2011) ; le lipide A, aussi appelé endotoxine, est responsable d'une stimulation excessive du système immunitaire pouvant provoquer un choc septique et conduire à la mort (Ben Haj Khalifa, 2011).

L'antigène-O est porteur de déterminants antigéniques (épitopes), qui sont spécifiquement reconnus par les anticorps induits par la bactérie chez l'hôte et constituent des cibles puissantes pour les anticorps protecteurs (Bystrova *et al.*, 2006).

#### 6.2.2.4. Alginate :

L'alginate est un facteur de virulence dans l'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* dans la fibrose kystique (Pedersen *et al.*, 1992). Il joue un rôle dans l'adhésion de la bactérie aux surfaces des cellules épithéliales (Marty *et al.*, 1998) et permet également d'atténuer la réponse immunitaire en inhibant l'activation du complément, en réduisant le

chimiotactisme des polymorphonucléaires et en diminuant la phagocytose (**Chaker, 2012**).

### 6.2.3. Facteurs de virulence secrétés :

#### 6.2.3.1. Les protéases :

Les protéases de *Pseudomonas aeruginosa* sont considérées comme des facteurs de virulence importants qui endommagent les tissus hôtes et interfèrent avec les mécanismes de défense antibactériens de l'hôte (**Oldak et Trafny, 2005**), elles comprennent l'élastase A (LasA), l'élastase B (LasB), la protéase alcaline 23 (AP), la protéase IV (PIV), la petite protéase de *Pseudomonas* (PASP), la grande protéase A 24 (LepA), MucD, et l'aminopeptidase de *P. aeruginosa* (PAAP) (**Galdino et al., 2017**).

##### 6.2.3.1.1. L'élastase :

L'élastase appartient à la famille des protéinases de sérine caractérisée par la réactivité d'un résidu sérine dans le site actif de l'enzyme. Cette enzyme hydrolyse l'élastine, la protéine spécifique des fibres élastiques, et digère d'autres protéines telles que l'hémoglobine, la caséine et la fibrine (**Raftari et al., 2013**). Elle clive également une grande variété de protéines hôtes, telles que le collagène, les IgG et les protéines du complément (**Laarman et al., 2012**). La sensibilité des protéines IgA humaines à l'élastase suggère un mécanisme par lequel *P. aeruginosa* pourrait échapper à la fonction protectrice des IgA en produisant cette enzyme (**Heck et al., 1990**).

##### 6.2.3.1.1.1. L'élastase B :

LasB, un substrat de système de sécrétion de type II, a fait l'objet de beaucoup d'attention en raison de son expression hautement régulée lors de la colonisation tissulaire et de l'infection, en particulier dans les poumons (**Leduc et al., 2007**). C'est une métalloprotéinase au zinc élastolytique qui endommage les tissus hôtes par l'hydrolyse des composants de la matrice extracellulaire et en franchissant les barrières endothéliales et épithéliales en attaquant les jonctions serrées intercellulaires (**Kuang et al., 2011**) et participe également à l'inactivation protéolytique de nombreux composants extracellulaires des systèmes immunitaires innés et adaptatifs, notamment les opsonines, les cytokines, les chimiokines, les peptides antibactériens et les inhibiteurs de protéinase (**Leduc et al., 2007**).

##### 6.2.3.1.1.2. L'élastase A :

LasA est une protéase extracellulaire qui renforce l'activité élastolytique de l'élastase de *Pseudomonas* et d'autres protéases en clivant de l'élastine sur des sites inconnus (**Kessler et al., 1997**). Elle a également une activité anti-staphylolytique élevée (**Kessler et al., 1998**) résultant de clivages au sein des liaisons croisées de la pentaglycine dans le peptidoglycane des cellules de *S. aureus* (**Barequet et al., 2004**). Son action sur les protéines, y compris

l'élastine, est limitée et vise principalement les séquences Gly3 et Gly2-Ala, peu communes dans la plupart des protéines (Kessler *et al.*, 1998).

#### 6.2.3.1.2. La protéase alcaline :

La protéase alcaline (AprA) est une métalloprotéase au zinc de 50 kDa et est sécrétée via son propre système de sécrétion de type I, qui dégrade plusieurs composants du système immunitaire de l'hôte tels que les compléments C1q et C3 (12) (Laarman *et al.*, 2012), la laminine, l'interféron- $\gamma$  humain (IFN- $\gamma$ ), le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine-6 (IL-6), leurs dégradation peut entraîner une réponse immunitaire altérée (Liyama *et al.*, 2017). *P. aeruginosa* code pour un inhibiteur extrêmement puissant de la protéase alcaline (AprI) qui est uniquement situé dans le périplasme, où il est censé à protéger les protéines périplasmiques contre la AprA sécrétée (Bardoel *et al.*, 2012).

Les capacités immunomodulatrices d'AprA incluent également la possibilité de dégrader la flagelline, un activateur connu des réponses pro-inflammatoires via la reconnaissance du récepteur à péage 5 (TLR5) (Casilag *et al.*, 2016). De plus, AprA peut inhiber les fonctions des neutrophiles, en interférant avec leur chimiotactisme, permettant ainsi à la bactérie de s'échapper des phagocytes du système de défense de l'hôte (Iiyama *et al.*, 2017).

#### 6.2.3.2. La leucocidine :

La leucocidine est une substance cytotoxique produite par plusieurs souches de *Pseudomonas aeruginosa*. La toxine endommage les leucocytes de diverses espèces animales et de nombreuses cultures tissulaires, mais est inefficace contre les érythrocytes et les thrombocytes (Scharmann, 1976).

#### 6.2.3.3. Les sidérophores :

Ce sont des molécules de faible poids moléculaire (200 à 2 000 Da), sécrétées par les bactéries dans leur environnement et capables de chélater avec une très haute affinité le fer ferrique (Vaulont et Schalk, 2015).

Afin d'acquérir le fer, *P. aeruginosa* produit deux sidérophores majeurs, la pyoverdine (PVD), souvent considérée comme sidérophore principal, et la pyochéline (PCH) (Cunrath, 2015).

##### 6.2.3.3.1. La pyoverdine :

La pyoverdine est un groupe de composés fluorescents jaune-verdâtre qui représente le principal système d'acquisition du fer chez *P. aeruginosa* (Newman *et al.*, 2017). Elle lie le fer ferrique avec une affinité exceptionnellement élevée, suffisante pour extraire le métal des protéines séquestrantes du fer chez les mammifères, telles que la transferrine. En fournissant du fer à l'agent pathogène, la pyoverdine peut également contribuer à la formation de biofilms

(Kang *et al.*, 2018). Elle est essentielle à la virulence dans de nombreux modèles d'infection, y compris l'infection pulmonaire et les modèles de brûlures (Newman *et al.*, 2017).

La pyoverdine peut également agir comme molécule de signalisation des facteurs de virulence ; le régulateur de pyoverdine PvdS contrôle (complètement ou partiellement) l'expression de deux autres facteurs de virulence, à savoir la protéase IV et l'exotoxine A (Weigert aus Straubing, 2017).

#### 6.2.3.3.2. La pyochéline :

La pyochéline lie le fer (III) avec une affinité plus faible ( $pFe(III) = 16$ ) que la pyoverdine mais présente une affinité élevée pour les métaux biologiques divalents (Paulen, 2017).

La production de PCH peut jouer un rôle dans la réponse inflammatoire prolongée d'infections chroniques, connue pour causer des lésions tissulaires ( Carballido Lopez, 2018) elle augmente la létalité de *P. aeruginosa* au cours d'une infection intrapéritonéale (Minandri *et al.*, 2016).

#### 6.2.3.4. Les rhamnolipides :

Les rhamnolipides sont des glycolipides extracellulaires thermostables de faible poids moléculaire, ce sont des composés cytotoxiques qui perturbent la mobilité des cils vibratiles tapissant l'épithélium respiratoire (Claire, 2014), sont multifonctionnelles aux propriétés surfactives sécrétés par le pathogène bactérien *Pseudomonas aeruginosa*. Ces biosurfactants sont synthétisés par les enzymes RhlA et RhlB à partir des deux précurseurs rhamnose et 3-hydroxyalkanoate (Mohammad *et al.*, 2013).

Ils possèdent un pouvoir détergent sur les phospholipides du surfactant pulmonaire. Ils sont impliqués dans la mobilité de type « swarming », dans la formation du biofilm et perturbent le transport mucociliaire et les mouvements ciliaires de l'épithélium respiratoire humain et inhibent la phagocytose (Ben Hadj Khalifa, 2011).

Les souches de *P. aeruginosa* qui sécrètent efficacement les rhamnolipides s'infiltrent dans l'épithélium respiratoire, contrairement à celles exprimant tous les autres facteurs régulés par le QS. Les rhamnolipides purifiés, appliqués sur les surfaces des épithéliums, suffisent à perturber fonctionnellement l'épithélium et à favoriser l'invasion paracellulaire de *P. aeruginosa* déficient en rhamnolipides (Zulianello *et al.*, 2006).

#### 6.2.3.5. Les lectines :

Parmi les facteurs de virulence sécrétés par la bactérie, deux lectines solubles ont été découvertes : la première, PA-IL (ou LecA), d'une taille de 12.7 kDa, montre une spécificité pour le galactose, la deuxième ; lectine PA-IIL (ou LecB) d'une taille de 11.7 kDa montre une

très forte affinité pour le fucose (Charles, 2006).

#### 6.2.3.5.1. La lectine PA-IL :

PA-IL est directement cytotoxique pour les cellules épithéliales respiratoires et inhibe leur croissance (Charles, 2006). LecA ralentit considérablement la croissance des cellules épithéliales des polypes nasaux et réduit le nombre de cellules ciliées. De plus, elle provoque la formation de grandes vacuoles dans les cellules (Grishin *et al.*, 2015).

La molécule galactophile LecA a un effet cytotoxique sur les cellules épithéliales respiratoires en diminuant leur vitesse de croissance, contribuant ainsi à la lésion de l'épithélium respiratoire et elle induit une perméabilité de l'épithélium intestinal, entraînant une absorption accrue de l'exotoxine A (Chemani *et al.*, 2009).

#### 6.2.3.5.2. La lectine PA-III :

LecB est impliqué dans l'assemblage des pili à la surface des cellules et dans la production de protéase IV (Funken *et al.*, 2012). De plus, LecB diminue *in vitro* la fréquence de battement ciliaire de l'épithélium des voies respiratoires, inhibant ainsi un mécanisme de défense important du poumon humain (Tielker *et al.*, 2005).

#### 6.2.3.6. Exotoxine S, T, U & Y :

Les exotoxines S, T, U et Y ont en commun d'être sécrétées à travers le SST3. Exo S et exo T sont deux enzymes ayant une parenté de structure. Elles portent 2 activités : une activité GTPase et une activité ribosyl transférase. Elles sont responsables d'une perturbation du cytosquelette d'actine (Méar, 2014). ExoS, une ADP-ribosyltransférase, nécessaire à la destruction des tissus au site de l'inflammation et à la dissémination bactérienne, elle peut aussi contribuer à l'inflammation pulmonaire en stimulant la prolifération lymphocytaire (Khalilzadeh, 2009). ExoT est une toxine bifonctionnelle à activité RhoGAP et ADPRT; elle entrave la production d'espèces réactives de l'oxygène éclatant dans les neutrophiles et favorise l'apoptose des cellules hôtes en transformant la protéine hôte Crk par ribosylation d'ADP en une cytotoxine et en activant la voie apoptotique intrinsèque des mitochondries (Klockgether et Tümmler, 2017).

ExoU est une phospholipase, on estime qu'elle est 100 fois plus puissante que l'ExoS et capable de provoquer la mort rapide des cellules eucaryotes de l'hôte en raison d'une perte d'intégrité de la membrane plasmique compatible avec une nécrose (Gellatly *et al.*, 2012).

L'exotoxine Y cause une augmentation de l'AMPc cytosolique conduisant à l'augmentation de la perméabilité pulmonaire (Pecastings, 2010).



RND (Resistance-Nodulation-Division) (Sugawara *et al.*, 2012).

Ces pompes fonctionnent comme un complexe tripartite composé de la protéine RND (le composant de la membrane interne), de la protéine de fusion membranaire (MFP: le composant périplasmique) et de la protéine de la membrane externe (OMP: la protéine de la membrane externe) (Dinesh et Ayush, 2013). Cet assemblage permet d'expulser le substrat de la membrane interne directement vers le support extracellulaire reproduit (Avrain *et al.*, 2013).

La résistance de *P. aeruginosa* aux bêta-lactamines est due à l'existence de métallo-bêta-lactamases et de bêta-lactamases à spectre étendu, conférant une résistance à la majorité des bêta-lactamines (Auajjar *et al.*, 2006).

La bêta-lactamase AmpC chez *P. aeruginosa* est induite par la présence de certains bêta-lactames et d'inhibiteurs de bêta-lactamines, conférant une résistance naturelle aux pénicillines et aux céphalosporines (Garcia *et al.*, 2018) et aux céphamycines et résistent à l'inhibition par le clavulanate, le sulbactame et le tazobactame (Tankhiwale, 2016). Comme toutes les  $\beta$  lactamases de cette classe, elle hydrolyse ses substrats en plusieurs étapes. Après une association non-covalente et réversible avec l'antibiotique, l'hydroxyle libre de la sérine catalytique attaque le cycle  $\beta$  -lactame du substrat en créant un ester acyle covalent. L'hydrolyse finale de l'ester libère l'enzyme et l'antibiotique rendu inactif par clivage de son cycle  $\beta$  -lactame (Charlotte, 2014).

*P. aeruginosa* peut exprimer une résistance aux antibiotiques autres que les bêta-lactames par une modification de la cible de l'antibiotique. Les deux classes d'antibiotiques les plus en vue susceptibles à ce mécanisme de résistance sont les fluoroquinolones et les aminosides (Garcia *et al.*, 2018). La résistance aux aminosides est liée le plus souvent à l'acquisition d'enzymes inactivatrices. Plus rares sont les résistances dues à l'acquisition de méthylases (*ribosomal methyl transferase* ou Rmt) de l'ARNr 16S, cible de cette classe d'antibiotiques. (Barbier et Wolff, 2010) et parfois d'une surexpression de pompes d'efflux (Mérens *et al.*, 2011).

L'inactivation du système de réparation oxydative de l'ADN augmente la fréquence des mutations chez *P. aeruginosa*, ce qui entraîne une production accrue de  $\beta$ -lactamase et une surexpression de la pompe d'efflux MexCD-OprJ (Pang *et al.*, 2018).

Les mutations des topoisomérases II et IV confèrent une résistance à la fluoroquinolone plus facilement chez *P. aeruginosa* que chez les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*, parce que *P. aeruginosa* a une sensibilité inhérente plus faible (Livermore, 2002).

L'acquisition de gènes de résistance (par exemple ceux codant pour les  $\beta$ -lactamases et les enzymes modifiant les aminoglycosides) par transfert de gène horizontal entraîne effectivement un développement de résistances antimicrobiennes multidrogues chez *P. aeruginosa* (Poole, 2011).

Outre le transfert horizontal des gènes de résistance, la résistance acquise se manifeste également par des mutations dans les gènes chromosomiques (Henrichfreise *et al.*, 2007). L'exposition de *Pseudomonas aeruginosa* aux aminosides sélectionne fréquemment des sous-populations résistantes montrant une résistance instable, dite « adaptative », à ces antibiotiques (Hocquet *et al.*, 2003)

La résistance aux fluoroquinolones est principalement due aux mutations ponctuelles dans les gènes de l'ADN gyrase (*gyrA* et *gyrB*) et de la topoisomérase IV (*parC* et *parE*), la présence d'une résistance transférable à quinolone induite par les plasmides (PMQR), des mutations dans les gènes régulant l'expression des pompes à efflux et une diminution de l'expression des porines de la membrane externe (Yang *et al.*, 2015).

### 8. Formation de biofilm :

*Pseudomonas aeruginosa* peut former des biofilms dans de nombreux environnements et provoquer une grande variété d'infections chroniques (Chen *et al.*, 2018). Le biofilm représente un facteur de virulence important pour ces bactéries, et protège *P. aeruginosa* des mécanismes de défense immunitaire (Al-Wrafiy *et al.*, 2017).

La formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* peut avoir lieu sur un certain nombre de surfaces, y compris les tissus du poumon pour la fibrose kystique et sur des surfaces abiotiques telles que les lentilles de contact et les cathéters (O'Toole et Kolter, 1998). La pertinence clinique et la facilité relative de croissance des biofilms ont fait de cette bactérie un organisme modèle pour la recherche sur la formation des biofilms (Chen *et al.*, 2018).

L'analyse microscopique des expectorations et du tissu pulmonaire de patients atteints de Fibrose Kystique révèle la présence de *P. aeruginosa* dans des agrégats enfermés dans une matrice extracellulaire (Landry *et al.*, 2006). Dans la nature, *P. aeruginosa* existe rarement sous forme planctonique, libre, mais plutôt sous la forme de biofilm (Méar, 2014).

La structure et la stabilité du biofilm de cette bactérie sont déterminées par au moins trois polysaccharides différents, à savoir alginate, Psl et Pel (Pericolini *et al.*, 2018). L'alginate, qui est un polymère acétylé d'acide bêta-d-mannuronique et d'acide alpha-l-gulonique (Mittal *et al.*, 2009), protège les cellules du biofilm de *P. aeruginosa* de la phagocytose par les leucocytes piège l'hypochlorite, réduit le chimiotactisme polymorphonucléaire, inhibe l'activation du complément et diminue la phagocytose des bactéries mucoïdes planctoniques

par les neutrophiles et les macrophages (**Leid et al., 2005**).

Dans certaines circonstances, *P. aeruginosa* produit une enzyme alginate lyase qui divise le polymère en oligosaccharides courts, cela annule les propriétés d'ancrage de l'alginate et entraîne un détachement accru des bactéries loin de la surface, leur permettant ainsi de se propager et de coloniser de nouveaux sites (**Boyd et Chakrabarty, 1995**).

Certains rapports suggèrent que les biofilms mucoïdes de *P. aeruginosa* sont plus résistants aux antibiotiques que les biofilms non mucoïdes (**Hentzer et al., 2001**). Récemment, la structure de Psl a été identifiée en tant que motifs répétitifs d'un pentasaccharide ramifié neutre composé de monosaccharides D-glucose, D-mannose et L-rhamnose (**Colvin et al., 2012**). C'est le composant principal de la matrice extracellulaire du biofilm de *P. aeruginosa* (**Ma et al., 2006**) favorisant à la fois les interactions cellule-cellule et l'attachement à la surface et joue également un rôle unique en tant que molécule de signalisation intercellulaire (**Irie, 2017**). Le psl est nécessaire pour le maintien de la structure du biofilm après la fixation, il fonctionne comme un échafaudage, réunissant des cellules de biofilm dans la matrice et joue un rôle dans la différenciation des biofilms (**Ryder et al., 2007**).

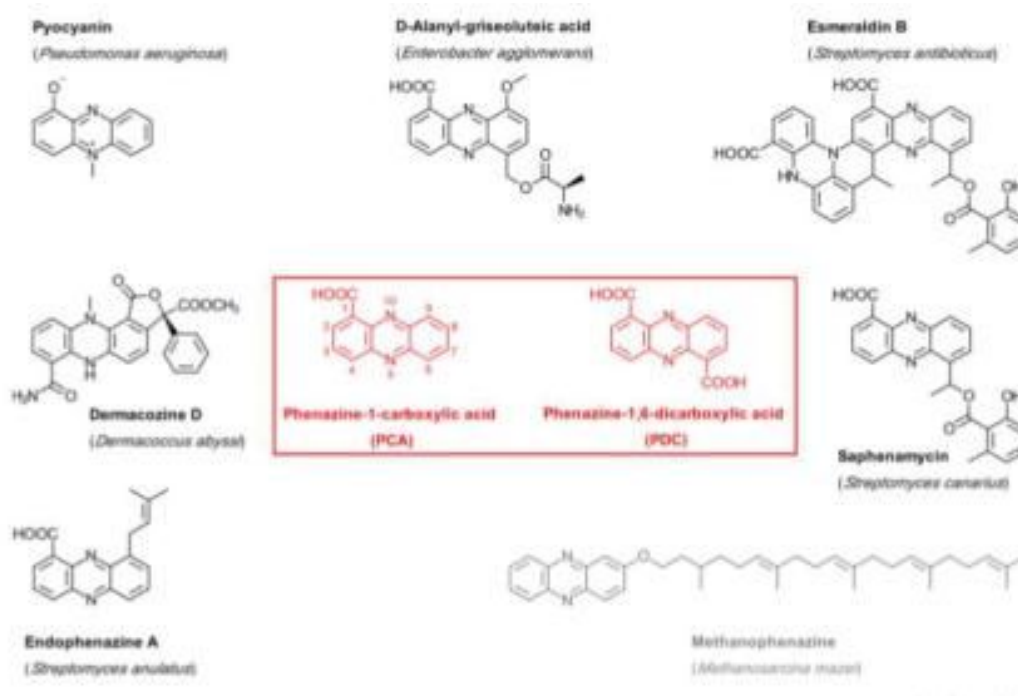
Le polysaccharide Psl pourrait avoir une contribution importante à la persistance du biofilm chez les patients atteints de mucoviscidose et pourrait être utile pour la conception de traitements pour l'infection à *P. aeruginosa* (**Ma et al., 2012**).

Pel est proposé d'être un polysaccharide riche en glucose, distinct de la cellulose (**Franklin et al., 2011**), essentiel pour la formation d'une pellicule à l'interface air-liquide (**Ghafoor et al., 2011**). Il est important pour initier et maintenir les interactions cellule-cellule dans les biofilms où il peut dans certaines circonstances jouer un rôle dans l'adhérence des cellules à une surface. Il offre une protection des biofilms contre certains antibiotiques aminosides (**Jennings et al., 2015**).

## Chapitre II : *Pseudomonas aeruginosa* producteur des phénazines

### 1. Définition des phénazines:

Les phénazines (PZ) sont des métabolites secondaires hétérocycliques bien connus, produits par diverses bactéries, dont *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Sorangium*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Methanosarcina* et *Erwinia*, les bactéries sont leur seule source connue (Mezaache-Aichour *et al.*, 2013). Leur production dans la rhizosphère peut contribuer à la compétence écologique des bactéries productrices et à la compétition (Mazzola *et al.*, 1992).



**Figure3** : Une collection de dérivés de phénazine naturels et de leurs origines.

(Blankenfeldt et Parsons, 2014).

Les PZ diffèrent par leurs structures en fonction des divers substituants (tels que -COOH, -OH, -CH<sub>3</sub>) ajoutés à différentes positions du noyau hétérocyclique basique et peuvent donc différer par leur activité antibiotique (Mezaache-Aichour *et al.*, 2013).

Bien que l'activité redox ait surtout attiré l'attention sur leur rôle dans la création d'espèces réactives d'oxygène dans le contexte de l'infection, dès 1931, Friedheim a émis l'hypothèse que la réduction de la phénazine pourrait être bénéfique aux cellules productrices comme système respiratoire alternatif (Wang *et al.*, 2010). Elles continuent d'être utilisées dans de nombreuses applications, notamment comme accepteurs et donneurs d'électrons, composants de piles à combustible, capteurs environnementaux et biocapteurs, en tant que composants centraux de composés antitumoraux, et agents de contrôle biologique, et ayant des activités

## Chapitre II : *Pseudomonas aeruginosa* producteur des phénazines

antipaludiques et antiparasitaires (Mezaache-Aichour *et al.*, 2013).

En plus de leurs effets sur d'autres organismes, des études récentes ont indiqué que ces composés activent directement certains facteurs de transcription et agissent comme des signaux intercellulaires chez *P. aeruginosa*. En raison de leurs propriétés rédox, les phénazines peuvent également jouer un rôle dans la physiologie des souches qui les produisent en facilitant la réoxydation du NADH dans des conditions limitant l'oxygène, telles que celles trouvées dans les biofilms matures (Mavrodi *et al.*, 2010).

### 2. Biosynthèse des phénazines :

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 pyocyanine, la phénazine-1- carboxamide (PCN) et l'1-hydroxyphénazines (1-OHPHZ) dérivent du PCA (Baraket, 2012). Les gènes codant pour les enzymes biosynthétiques de la phénazine sont disposés dans un opéron principal *phzABCDEFG*, dans la plupart des pseudomonads produisant de la phénazine. Un tel opéron existe en double dans le génome de *P. aeruginosa*. (Price-Whelan *et al.*, 2006).

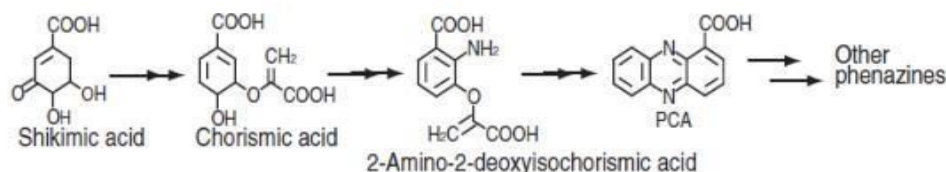


Figure 4 : Biosynthèse des phénazines (Dahah, 2017).

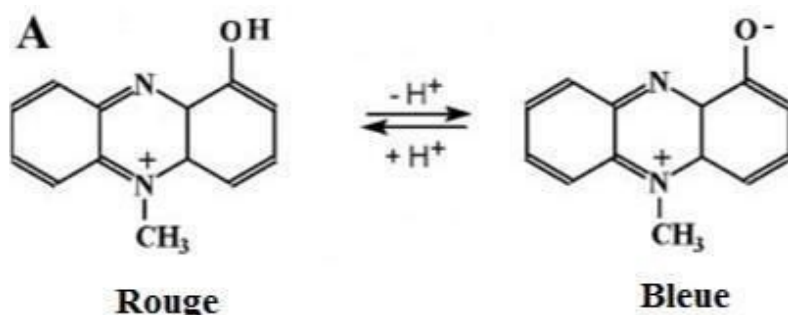
### 3. Les phénazines de *P.aeruginosa* :

Chez *Pseudomonas aeruginosa*, les phénazines favorisent sa croissance et sa survie dans des conditions limitant le fer chez les patients atteints de mucoviscidose (Zhao et Yu, 2018). Les composés phénaziniques sécrétés par cette bactérie se trouvent en grande partie sous forme d'acide phénazine-1-carboxylique (PCA), de pyocyanine, de 1-hydroxyphénazine (1-HP) et de phénazine-1-carboxamide (PCN) (Nansathit *et al.*, 2009), les couleurs vont du bleu de la pyocyanine (PYO) au jaune citron de l'acide phénazine-1-carboxylique (PCA), de la teinte orange de la 1-hydroxyphénazine (1-OH-PHZ) à la teinte verte de la phénazine- 1-carboxamide (Recinos, 2012).

## Chapitre II : *Pseudomonas aeruginosa* producteur des phénazines

### 3.1. La pyocyanine :

La pyocyanine, caractérisant *P. aeruginosa* qui est la seule espèce à le produire ( **Özcan et Kahraman, 2015**) est un pigment bleu soluble dans l'eau élaboré en tant que métabolite secondaire qui agit comme un antibiotique bactéricide. Chimiquement, la pyocyanine est la 5-méthyl-1-hydroxyphénazine qui peut subir une série complexe de réactions d'oxydo-réduction ( **Al-Saadi et al., 2012**), elle est peu soluble dans l'eau, mais soluble dans le chloroforme et dans les solvants organiques (Méthanol, Ethanol...). En solution aqueuse, elle présente la propriété de changer de couleur en fonction du pH et de son état d'oxydation: la PYO oxydée est rouge en milieu acide (pH < 4,9) et bleue en milieu neutre et alcalin. La PYO réduite ou leucopyocyanine est incolore ( **Baraket, 2012**).



**Figure 5:** Formule développée de la pyocyanine en milieu acide et en milieu basique (Baraket, 2012)

La synthèse de cette substance est influencée par les sources de carbone et d'azote présentes dans les milieux de croissance, sa production peut conférer à *P. aeruginosa* un avantage sélectif dans certaines situations de croissance ( **Onbasli et Aslim, 2008**).

La pyocyanine est également reconnue pour sa capacité à réduire les ions ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ) à l'état ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), une forme soluble pouvant être facilement absorbée par *P. aeruginosa* pour des besoins nutritionnels ( **Muller et Merrett, 2014**).

#### 3.1.1. Biosynthèse :

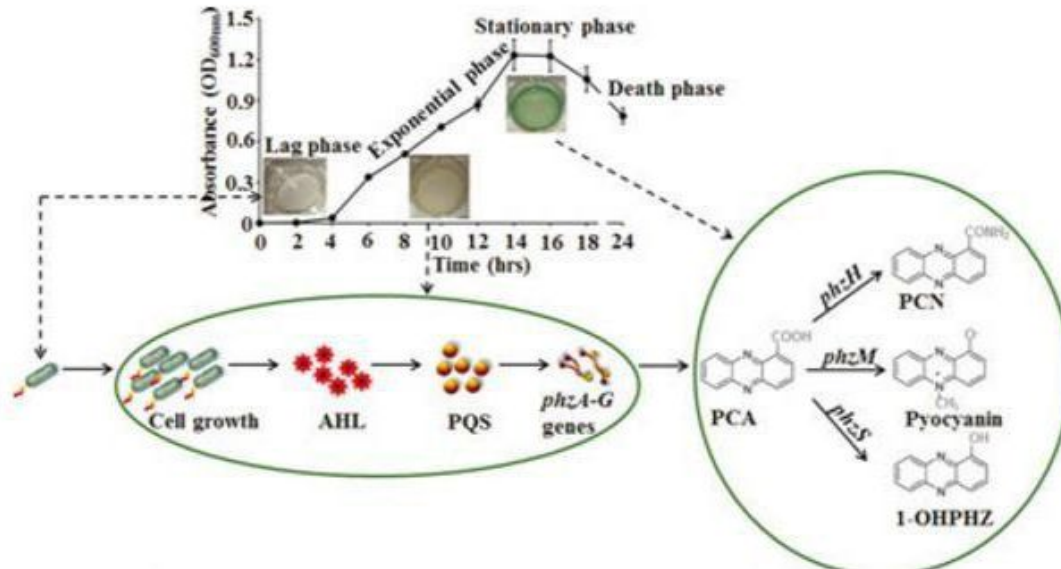
Chez *Pseudomonas aeruginosa*, le produit final de la voie shikimate, le chorismate, sert de dernier précurseur commun pour la biosynthèse des deux métabolites aromatiques primaires, y compris la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane, et des métabolites aromatiques secondaires, y compris la phénazine-1-acide carboxylique (PCA) et la pyocyanine (PYO) ( **Sterritt et al., 2018**). La pyocyanine est produite à partir d'acide chorismique par la voie de la phénazine. L'acide phénazine-1-carboxylique, la phénazine initiale formée, est converti en pyocyanine en deux étapes catalysées par les enzymes PhzM et PhzS ( **Greenhagen et al., 2008**). La première enzyme est dépendante de la S- adénosylméthionine alors que la deuxième

## Chapitre II : *Pseudomonas aeruginosa* producteur des phénazines

est dépendante de la flavine (Parsons *et al.*, 2007).

L'action de PhzM consiste à convertir le PCA en bêtaïne de l'acide 5-méthylphénazine-1-carboxylique, qui peut ensuite être converti en PYO par PhzS. La PCA est converti davantage en phénazine-1-carboxamide par l'action de PhzH et en 1-hydroxyphénazine par PhzS

(Higgins *et al.*, 2018).



**Figure 6** : Schéma de la production de phénazine (pyocyanine) par *P. aeruginosa* (Das *et al.*, 2016). La production de pyocyanine est déclenchée au début de la phase stationnaire par le biais de molécules QS (AHL et PQS), de gènes produisant de la phénazine (phzA-G) et enfin du gène phzM.

### 3.2. La PCA :

L'efficacité de la PCA a été démontrée contre un nombre de champignons phytopathogènes comme *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium* sp., *Polyporus* sp., *Rhizoctonia solani*, et les bactéries pathogènes comme *Actinomyces viscosus*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia amylovora* (Mezaache, 2012).

### 3.3. La PCN :

La PCN diffère du PCA par la présence du groupement carboxamide (CONH) au lieu du groupement hydroxyle sur le carbone 1 du noyau phénazine. Cette molécule est plus stable que la PCA, et exprime ses activités antifongiques même à pH alcalin (Mezaache, 2012).

## 4. Spectre d'activité antibiotique et pouvoir inhibiteur des phénazines :

Ces substances présentent un fort potentiel antifongique contre de nombreuses espèces telles que *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Gibberella avenacea*, *Alternaria* spp et *Drechslera graminea*

## Chapitre II : *Pseudomonas aeruginosa* producteur des phénazines

---

(Simionato *et al.*, 2017). Physiologiquement, la phénazine inhibe et contrôle la synthèse des acides nucléiques et des protéines; par conséquent, ses modes d'action peuvent inclure des interactions avec l'ADN (intercalation ou liaison de rainure), des topoisomérases, des antioxydants et des molécules à transfert de charge (Kumar *et al.*, 2014). La pyocyanine produite par *P. aeruginosa* LEC1 est responsable de l'inhibition de l'espèce *Septoria tritici* qui cause une maladie de blé (Dahah, 2017).

Les composés phénaziniques ont une activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*) et certaines bactéries phytopathogènes telles que *Erwinia carotovora* et *Ralstonia solanacearum*. Ces substances sécrétées affectent également *Mycobacterium tuberculosis* (Dahah *et al.*, 2016). Il a été démontré aussi que certaines phénazines ont des activités insecticides, antitumorales, anticancéreuses, antiplasmodiques, antipaludiques et antiparasitaires (Guttenberger *et al.*, 2017).

La pyocyanine a une activité antibiotique contre d'autres bactéries et champignons. Cette activité pourrait conférer à *P. aeruginosa* un avantage sur les bactéries concurrentes occupant la même niche (Winstanley et Fothergill, 2008). Ce pigment est capable de perturber la chaîne de transport d'électrons des champignons, ce qui révèle l'effet antifongique (Özyürek *et al.*, 2016). Elle est connue aussi pour entraver la croissance de *S. aureus* en inhibant sa respiration, ce qui aboutit à un phénotype non respirant du SCP censé être résistant aux actions de la pyocyanine (Noto *et al.*, 2017).

### 5. Utilisation des phénazines dans le domaine thérapeutique : cas de la pyocyanine :

Les activités anticancéreuses des phénazines ont récemment été résumées et évaluées de manière critique par Cimmino *et al.* Il a été constaté que la mise en œuvre de phénazines en tant qu'agents anticancéreux était problématique en raison de l'intercalation non sélective de l'ADN conduisant à une toxicité générale (Guttenberger *et al.*, 2017).

Le traitement de la lignée cellulaire du cancer de la prostate (DU145) avec de l'acide phénazine-1-carboxylique stimule l'inhibition de la prolifération cellulaire de manière dépendante de la concentration et du temps par production d'espèces réactives de l'oxygène et voie apoptotique (Karuppiah *et al.*, 2016).

La 1-hydroxyphénazine, l'acide phénazine-1-carboxylique et la pyocyanine produit par l'isolat clinique *P.aeruginosa* PA14 sont capables de tuer le nématode *Caenorhabditis elegans* (Cezairliyan *et al.*, 2013).

Diverses applications biotechnologiques potentielles de la PYO ont été découvertes, telles

## Chapitre II : *Pseudomonas aeruginosa* producteur des phénazines

---

que la production de l'antitumoral et la capacité de contrôler les champignons et les bactéries pathogènes. Ce métabolite secondaire a fait l'objet d'études approfondies et a attiré l'attention des chercheurs sur ses propriétés antibiotiques à large spectre contre les champignons (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*) et une activité antibactérienne élevée (*Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) et de nombreux microbes pathogènes infectant le corps humain (Dahah *et al.*, 2016).

La pyocyanine montre des effets antimicrobiens synergiques en présence de nanoparticules d'argent contre des souches microbiennes (Nowroozi *et al.*, 2011). Outre ses applications pharmacologiques et industrielles, cette substance a une activité antibiotique étendue contre divers genres et espèces de protozoaires. Il a également été démontré que les isolats environnementaux de *Pseudomonas* peuvent contrôler les vibrions et améliorer la survie larvaire dans les systèmes d'écloserie de crevettes (Priyaja *et al.*, 2016).

Les phénazines sont associées à des activités antitumorales. Les cellules qui respirent activement, telles que les cellules tumorales, semblent être plus susceptibles à la génération d'espèces oxygénées réactives (ROS) provoquée par la pyocyanine (Hassani *et al.*, 2012), leurs dérivés peuvent interférer avec la fonction des topoisomérases I et II dans les cellules eucaryotes. Les cellules cancéreuses contiennent des taux élevés de topoisomérases, l'activité de ces enzymes et par conséquent la prolifération des cellules tumorales peuvent être affectées par la pyocyanine (Moayedi *et al.*, 2017).

La pyocyanine inhibe de manière significative la prolifération des cellules tumorales HepG2 et déclenche la production de grandes quantités d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), régulant ainsi la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT). La mort cellulaire induite par la PYO implique des lésions de l'ADN et une apoptose (Zhao *et al.*, 2014).

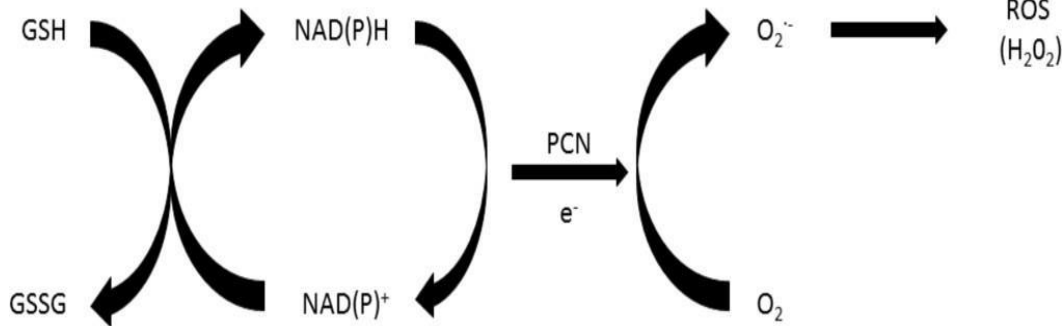
La pyocyanine produite par *P. aeruginosa* CGR-3 a une activité rédox et des effets nocifs sur les cellules cancéreuses des mammifères. Son activité anticancéreuse sur la prolifération de la lignée cellulaire L132 (lignée cellulaire épithéliale de poumon humain) a montré qu'elle inhibe 61% des cellules à une concentration de 0,318 µg / mL (Alka *et al.*, 2018).

La plupart des études associent les propriétés cytotoxiques de la pyocyanine à son aptitude au cycle redox, ce qui dans des conditions aérobies conduit à la production d'espèces oxygénées réactives, telles que le superoxyde ( $O_2^-$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (O'Malley *et al.*, 2003). Elle a un potentiel d'oxydoréduction tel qu'il pourrait concurrencer les électrons à différents niveaux de respiration, réduisant finalement l'oxygène par son réducteur via une oxydase terminale et le contournement du passage d'électrons nécessaire au transport actif et à la phosphorylation oxydative (Baron et Rowe, 1981).

## Chapitre II : *Pseudomonas aeruginosa* producteur des phénazines

Elle mis les cellules sous un stress oxydatif accru en présence des équivalents réducteurs cellulaires (par exemple, NADH ou NADPH) (O'Malley *et al.*, 2003). Ce cyclage redox conduit à la production d'abondantes quantités de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. D'autres part, elle inhibe la respiration cellulaire et inactive la catalase (Cheluvappa *et al.*, 2008).

Les ROS intracellulaires formées après une exposition à un PCN provoquent des lésions radicalaires entraînant des lésions oxydatives des composants du cycle cellulaire, ainsi que des lésions directes de l'ADN, de l'appauvrissement en NAD(P)H et de l'inhibition enzymatique (Hall *et al.*, 2016). Il se forme des espèces d'azote réactif (RNS) très toxiques lorsque le superoxyde réagit avec l'oxyde nitrique. RNS et ROS agissent ensemble pour endommager les protéines, l'ADN et les phospholipides et finalement causer la mort des cellules (Alka *et al.*, 2018).



**Figure 7** : Mécanisme du stress oxydatif induit par les PCN (Hall *et al.*, 2016).

La pyocyanine est active dans des conditions aérobies et dénitrifiantes, mais pas dans des conditions de fermentation. Son action antibactérienne nécessite une respiration active, mais pas nécessairement la présence d'oxygène (Baron et Rowe, 1981).

La pyocyanine a une valeur thérapeutique pour les infections à *Chlamydia* ; elle est considérée comme un antichlamydia efficace. Elle exerce son activité antichlamydiale en désactivant directement l'infektivité des corps élémentaire et en induisant la production de ROS antimicrobiennes (Li *et al.*, 2018).

Le pigment peut être un composé actif contre *Trichophyton rubrum*, qui pourrait être un agent causal majeur du *tinea corporis*. Des traitements topiques avec une pommade à la pyocyanine ont une efficacité pour guérir la teigne corporelle. La pyocyanine peut donc répondre à la demande constante de nouveaux agents naturels antimycotiques contre les infections fongiques gênantes (El-Zawawy et Ali, 2016).

Le traitement topique à la pyocyanine peut protéger efficacement la peau des infections à *S.*

## Chapitre II : *Pseudomonas aeruginosa* producteur des phénazines

---

*aureus*, *K. pneumoniae* et *C. albicans* chez les lapins avec une guérison maximale et une croissance des poils de la zone traitée par la pyocyanine après 14 à 20 jours (**Gharieb *et al.*, 2013**).

### 1. Echantillonnage :

Dans le but d'obtenir des isolats de *Pseudomonas aeruginosa*, deux échantillonnages ont été effectués dans deux régions différentes de la Wilaya de Mostaganem, l'une à Sour et l'autre à Touahria, les échantillons récoltés sont des racines de graminée sauvage (orge des rats = *Hordeum murinum*). Les plantes avec leurs racines sont introduites dans des sachets en plastique étiquetés et transportés rapidement au laboratoire.



**Figure8** : la graminée récoltée (orge des rats = *Hordeum murinum*).

### 2. Isolement de *Pseudomonas aeruginosa* :

1g de chaque échantillon est mis dans un tube contenant 9ml d'eau distillé stérile, puis ; une série de dilution décimale (de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ) est effectuée à partir de chaque échantillon. Dans des boîtes Pétri contenant de la gélose King B, 0.1 ml des dilutions (de  $10^{-3}$  à  $10^{-6}$ ) sontensemencés séparément et étalé avec un étaleur stérile, ensuite ; les boîtes sont incubées à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 48 heures.

### 3. Choix et purification de *Pseudomonas aeruginosa* :

Seules les colonies donnant un pigment jaune-vert fluorescent sur le milieu King B ont été sélectionnées. Les colonies choisies sont purifiés sur le milieu King A puis, une vérification de la pureté a été faite en réalisant une coloration simple par la fushine.

### 4. Provenance des isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* :

En plus de l'échantillonnage effectué, sept souches cliniques sont fournis par Mme

LATTAB Aicha du laboratoire de Microbiologie et de Biologie végétale de Mostaganem. Ces souches proviennent des prélèvements pathologiques des patients au niveau EPH Ain Tedles et Sidi Lakhdar plus une souche de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Les souches ont été réactivées dans un BN puis, ensemencées sur milieu King A.

### **5. Conservations des isolats :**

Les isolats ont été ensemencés sur gélose incliné de King A, incubés à 30°C (pour l'isolat du sol I14) et à 37°C (pour les isolats cliniques) pendant 48 heures puis conservés à 4°C.

### **6. Provenance des souches pathogènes :**

Les souches tests sont fournis par le Laboratoire de Microbiologie et de Biologie végétale de Mostaganem : *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231, plus une souche de *Candida albicans* d'origine vaginale.

### **7. Identification des *Pseudomonas* :**

#### **7.1. Etude macroscopique :**

Cet examen est basé sur l'étude des caractères morphologiques des colonies (l'aspect, la forme et la couleur).

#### **7.2. Etude microscopique :**

Cette étude est réalisée par une observation à l'état frais et après une coloration de Gram permettant de savoir le type de Gram des bactéries ainsi que leur morphologie.

#### **7.3. Etude biochimique :**

Les tests suivants ont été réalisés : détection de cytochrome oxydase et de catalase, production de pigments (sur les milieux King A et King B), croissance à 42 ° C et 4 ° C, protéolyse de la gélatine, réduction des nitrates, réactions de rouge de méthyle et de Voges Proskauer et utilisation des sucres : glucose, lactose et saccharose (**Dahah et al., 2016**).

##### **7.3.1. Recherche de la catalase :**

L'enzyme se trouve dans un large éventail d'organismes aérobies et anaérobies facultatifs. Le mécanisme de base du fonctionnement de cette enzyme implique la décomposition d'espèce réactive d'oxygène, à savoir le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en oxygène et en eau, réduisant ainsi le stress oxydatif provoqué par ce substrat (**Kaushal et al., 2018**).

Pour réaliser ce test, une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes est déposée sur une lame porte objet propre, ensuite ; à l'aide d'une anse de platine une quantité de la colonie suspecte est émulsionnée. La présence de la catalase se traduit par le dégagement immédiat de bulles d'oxygène (**Delarras, 2014**).

### 7.3.2. Recherche du cytochrome oxydase :

La recherche du cytochrome oxydase a été effectuée en frottant un échantillon bactérien sur une bandelette de test (dichlorhydrate de tétraméthyl-p-phénylènediamine ou un disque d'oxydase, p-amino-diméthylaniline). Le réactif du test oxydase rose pâle sert de substrat artificiel. Il donne des électrons au cytochrome oxydase et qui s'oxyde en un composé violet et ensuite violet foncé. La présence de cette coloration pourpre foncé représente un résultat positif. Sans changement de couleur ou une coloration rose pâle indique l'absence d'oxydase et constitue un test négatif (**Prescott, 2002**).

### 7.3.3. Production de pigments :

La pyocyanine et la pyoverdine, ces deux principaux pigments produits par *P.aeruginosa* peuvent être mis en évidence sur les géloses King A et King B. La gélose King A favorise la synthèse de la pyocyanine, pigment qui colore le milieu en bleu ou en vert si les deux pigments (pyocyanine et pyoverdine) sont synthétisés en même temps (**Delarras, 2014**).

La gélose King B permet la production de pyoverdine où un pigment jaune-vert est observé (**Mezaache, 1997**).

Des boîtes contenant le milieu King A et King B sontensemencées par l'isolat étudié et incubées à 30°C (I14) et à 37°C (souches cliniques) pendant 24 heures.

### 7.3.4. Croissance à 42 et à 4 ° C :

Historiquement, la croissance à 42 ° C a été considérée comme un test différentiel clé pour la séparation de *P. aeruginosa* des autres espèces de *Pseudomonas* fluorescents (**Oberhofer, 1979**). L'incubation à 42 et à 4° C a été effectuée après ensemencement sur gélose de King B pour une durée de 24 heures (**King et Philip, 1978**).

### 7.3.5. Protéolyse de la gélatine :

La liquéfaction de la gélatine (la formation d'un liquide) peut être testée en tubes profonds de gélatine nutritive avec la bactérie appropriée en piquant le milieu jusqu'au fond du tube, puis, les tubes sont incubés à 30°C (I14) et à 37°C (souches cliniques). Après l'incubation, les cultures sont placées dans un réfrigérateur de 4°C. Si la gélatine c'est hydrolysée, le milieu restera liquide après réfrigération. Si la gélatine n'a pas été hydrolysée, le milieu se resolidifiera (**Prescott, 2002**).

### 7.3.6. Réduction des nitrates :

La réduction des nitrates par les bactéries est médiée par la nitrate réductase et indique que la bactérie peut utiliser les nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) comme accepteur d'électrons pendant la respiration anaérobie. Pour la recherche de cette enzyme, un bouillon nitraté estensemencé avec et incubé à 30°C (I14) et à 37°C (souches cliniques) pendant 24 heures. L'ajout des réactif NR1

et NR2 est nécessaire pour la détection des nitrites, si le  $\text{NO}_3^-$  a été réduit en  $\text{NO}_2^-$ , une couleur rouge apparaît généralement, ce qui indique la présence de  $\text{NO}_2^-$ , si aucun changement de couleur n'est observé, soit la bactérie était incapable de réduire le  $\text{NO}_3^-$ , ou elle était capable de réduire le  $\text{NO}_3^-$  directement en azote atmosphérique. La poudre de zinc est ajoutée au tube, si le bouillon reste incolore après l'ajout de zinc, la bactérie a également réduit le produit intermédiaire  $\text{NO}_2^-$  en produit gazeux  $\text{N}_2$  ou en un autre produit azoté. Par contre, l'apparition d'une couleur rouge après l'ajout de la poudre de zinc indique une réaction négative, c'est-à-dire que le  $\text{NO}_3^-$  n'a pas été réduit (**Buxton, 2011**).

### 7.3.7. Tests VP-RM :

Le test Voges – Proskauer ou VP est utilisé pour détecter l'acétoïne dans le milieu Clark et Lubs. La lecture est effectuée en ajoutant de l'alpha-naphtol et de l'hydroxyde de potassium. Une couleur rouge cerise indique un résultat positif, tandis qu'une couleur jaune-brun indique un résultat négatif (**Hemraj et al., 2013**).

Dans le test rouge de méthyl les bactéries qui effectuent une fermentation mixte produisent suffisamment d'acide pour éliminer le pouvoir tampon du bouillon. Il en résulte une diminution du pH. Après incubation, l'indicateur de pH rouge de méthyl est ajouté au bouillon. Cet indicateur est rouge à un pH inférieur à 4,4 (résultat positif) et jaune à un pH supérieur à 6,0. Une couleur orange indique un pH intermédiaire (**Hemraj et al., 2013**).

### 7.3.8. Test TSI :

Ce test est réalisé en utilisant le milieu TSI qui permet de mettre en évidence en 24 heures l'attaque du glucose, du lactose et/ou saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfuré et de gaz. A partir d'une culture pure sur gélose nutritive et à l'aide d'une anse de platine, un ensemencement de la pente par des stries et du culot par une pique est effectué. Les tubes sont incubés à 30°C (I14) et à 37°C (souches cliniques) pendant 24 heures. Un virage de couleur du culot vers le jaune traduit la fermentation du glucose, un noircissement intense traduit le dégagement d' $\text{H}_2\text{S}$ . Au niveau de la pente, la fermentation du lactose et/ou du saccharose présents en forte concentration dans le milieu entraîne une acidification et un virage au jaune (**Delarras, 2014**).

## 8. Etude phénotypique des souches pathogènes cible :

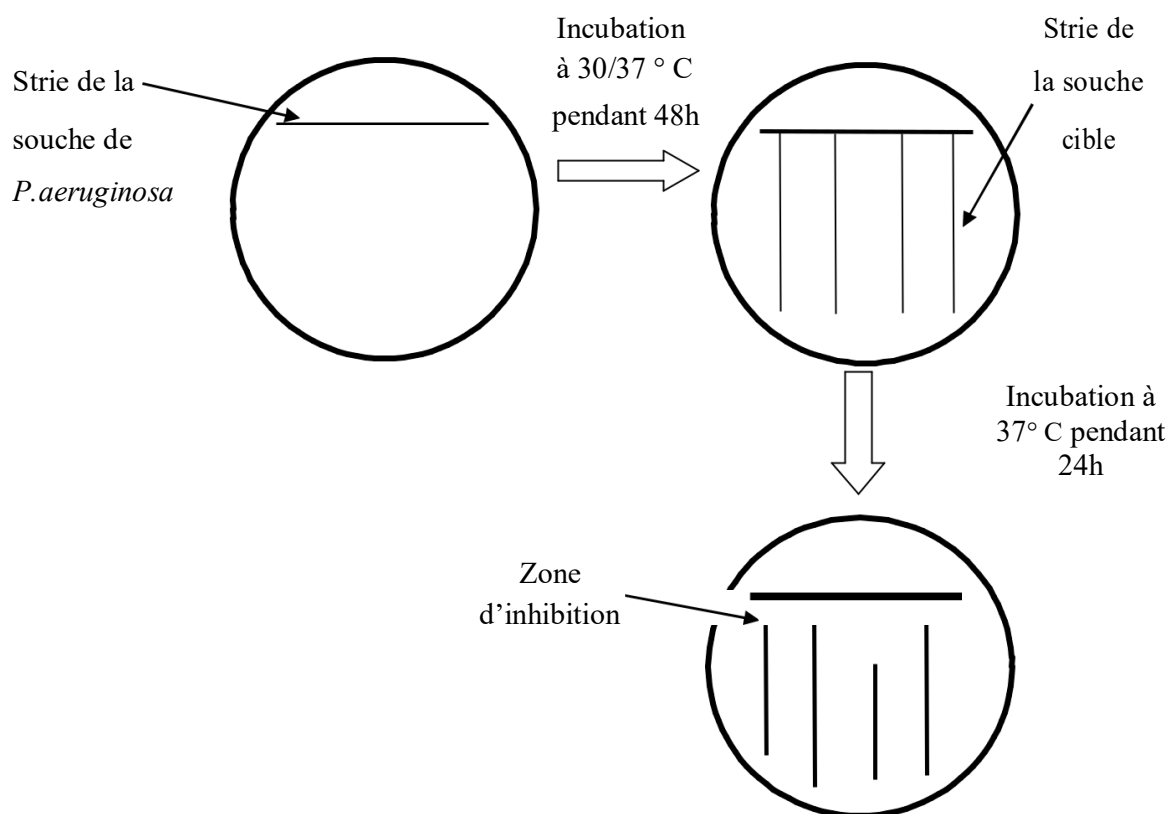
Une coloration de Gram, recherche de la catalase et d'oxydase sont effectuées pour toutes les souches.

Un ensemencement de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *E. coli* sur les milieux sélectifs Chapman, Sabouraud et MacConkey ont été effectués respectivement.

### 9. Test d'antagonisme *in vitro* :

L'objectif de ce test est de sélectionner les isolats les plus compétitifs afin d'obtenir uniquement ceux présentant des caractéristiques d'antagonisme.

Cet essai consiste à déposer en ligne les isolats de *Pseudomonas aeruginosa* sur des géloses Mueller-Hinton et les incuber à 37 ° C (pour les souches cliniques) et à 30 ° C (pour l'isolat du sol) pendant 48 heures. Après cette période d'incubation les souches cibles sont ensemencées par une ligne perpendiculaire à celle de la souche d'intérêt, ensuite ; les boîtes sont incubées à 37° C pendant 24 heures. Les zones d'inhibition entre le *Pseudomonas aeruginosa* et la souche cibles ont été mesurées (Balouiri *et al.*, 2016).



**Figure9** : Test d'antagonisme effectué par la méthode des stries.

### **10. Dosage de la pyocyanine :**

#### **10.1. Production de la pyocyanine :**

La production de la pyocyanine a été faite sur milieu solide. Un ensemencement en stries des antagonistes (S2, S5, S7, Sr) est effectué sur des boîtes Pétri contenant environ 15 ml de gélose nutritive et incubées à 37° C pendant 72 heures. Après cette période d'incubation ; la bactérie a été raclée à l'aide des écouvillons stériles (**Sudhakar *et al.*, 2013**). Ensuite, la gélose est découpée par un couteur en petits morceaux sous formes de carrée, mise dans un becher, puis un volume équivalent de chloroforme est ajouté (15ml), le mélange séjourne pendant 30 minutes jusqu'à ce que le solvant devient bleu et filtré puis récupéré dans un tube à essai stérile.

#### **10.2. Quantification de la pyocyanine produite :**

La mesure de la quantité de la pyocyanine produite a été évaluée selon la méthode de (**Kurachi, 1958**) et (**Grosso-Becerra *et al.*, 2014**) . En bref, 1 ml d' HCl 0,2N est ajouté à 3 ml de chloroforme contenant la pyocyanine extraite. La pyocyanine est récupérée pour être mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 520 nm.

Les valeurs sont exprimées en  $\mu\text{g/ml}$  de pyocyanine après multiplication de l'absorbance à une constante qui est égale à 17,072.

### **11. Caractérisation et identification du métabolite extrait :**

#### **11.1. Etude par spectrophotométrie UV-visible :**

Un balayage a été utilisé pour obtenir le spectre UV-visible de la pyocyanine extraite contenant des pics d'absorptions maximales dans un intervalle de longueur d'onde allant de 200 à 800 nm (**Dahah, 2017**).

### **12. Effet antimicrobien de la pyocyanine :**

L'effet antimicrobien de la pyocyanine extraite a été déterminé par le test de diffusion sur disque selon (**Dahah *et al.*, 2016**) et (**Alka *et al.*, 2018**). Des suspensions bactériennes des souches cibles ont été préparées et leur turbidité a été ajustée à 0.5 McFarland ( $\text{DO} = 0.08 - 0.1 \approx 10^8$  UFC / ml). 100  $\mu\text{l}$  de chaque suspension a été étalée par écouvillonnage sur des boîtes Pétri contenant le milieu Mueller-Hinton, puis ; des disques stériles ont été imprégnés de la solution de la pyocyanine extraite (environ 20  $\mu\text{l}$ ) d'une concentration de 14.86  $\mu\text{g/ml}$  préalablement filtré par un filtre millipore de 0.22 $\mu\text{m}$ , placés à l'aide d'une pince stérile sur le milieu et incubés pendant 24 h à 37 ° C. L'activité antibactérienne a été déterminée par mesure du diamètre des zones d'inhibition (mm) autour des disques.

### **13. Effet de la température et de la période d'incubation sur la production de la pyocyanine :**

L'estimation de la production de la pyocyanine en fonction de deux températures et trois périodes d'incubation a été étudiée. Les cultures de *Pseudomonas aeruginosa* sont incubées à 30 et 37 °C pendant 24, 48 et 72 heures. Le dosage de la pyocyanine a été effectué par la méthode de Kurachi, 1958.

### **14. Identification par galerie API 20E :**

API 20 E est un système pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autre bacille à Gram négatif non fastidieux. Utilisant 23 tests biochimiques standardisés et miniaturisés (Guy Leyral et Joffin, 1998).

#### **14.1. Préparation, inoculation et incubation de la galerie :**

Le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation sont réunis, ensuite environ 5 ml d'eau distillée stérile sont répartis dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Puis, à partir d'une culture de 18 à 24h, une suspension bactérienne de la souche S2 ajustée à 0.5 de McFarland a été préparée. Pour les tests CIT, VP, GEL on a remplis les tubes et les cupules. Pour les tests restants, seulement les tubes sont remplis. Les cupules des tests soulignés ADH, LDC, ODC, URE et H<sub>2</sub>S sont remplis de l'huile de paraffine.

#### **14.2. Lecture et interprétation :**

Après incubation, la lecture de la galerie est faite en se référant au tableau de lecture.

- **Test VP** : ajout d'une goutte de VP1 et VP2, attendre minimum 10 minutes, une couleur rose franche ou rouge indique une réaction positive.
- **Test TDA** : ajout d'une goutte de réactif TDA une couleur marron foncée indique une réaction positive.
- **Test IND** : ajout d'une goutte de réactif JAMES une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.
- **Test NO<sub>2</sub>** : ajout d'une goutte de NR1 et NR2 dans la cupule GLI, attendre 2 à 3 minutes, une couleur rouge indique une réaction positive. Une réaction négative (coloration jaune) peut être due à une transformation en N<sub>2</sub>, l'ajout de 2 à 3 mg de poudre de zinc est nécessaire. Après 5 minutes, si le tube reste jaune, la réaction est positive. Si la cupule est rose-rouge, la réaction est négative.

### 1. Isolement et obtention de *Pseudomonas aeruginosa* :

L'isolement de *Pseudomonas* à partir des racines de la graminée *Hordeum murinum* (Horge du rat) nous a permis d'obtenir 18 isolats de *Pseudomonas* fluorescents sur milieu King B. un seul isolat seulement a donné un pigment bleu sur milieu King A ce qui nous a permis de le considérer comme *Pseudomonas aeruginosa*. 8 souches d'origine clinique de la même espèce ont été fournies par Dr. Lattab Aicha du Laboratoire de Microbiologie et de Biologie végétale.

### 2. Identification de *Pseudomonas aeruginosa* :

#### 2.1. Etude macroscopique :

L'observation macroscopique sur milieu King A a montré que toutes les colonies des isolats sont de petite taille, opaque, muqueuse légèrement bombées avec un bord circulaire régulier sauf l'isolat rhizosphérique présente des bordures irrégulières (Avril *et al.*, 1992).

#### 2.2. Etude microscopique :

Deux types d'observations ont été réalisés : une observation à l'état frais et une observation après coloration de Gram.

L'observation microscopique à l'état frais a montré des bâtonnets mobiles. La coloration de Gram a révélé des bactéries à Gram négatif (fig 10), de forme bâtonnet droite et fine, dépourvue de spores (Gahlout *et al.*, 2017).

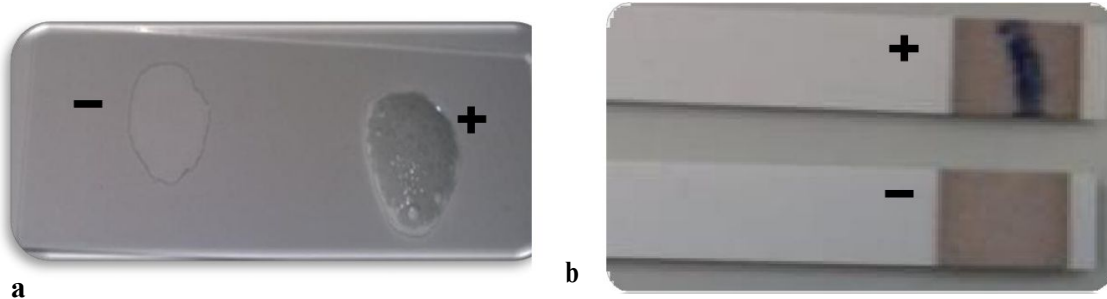


**Figure 10** : Observation microscopique des *Pseudomonas aeruginosa* après coloration de Gram (Obj x100).

### 2.3. Résultats des tests biochimiques :

#### 2.3.1. Recherche de la catalase et du cytochrome oxydase :

Les isolats sont des catalase positif en dégageant des bulles d'air lors du contact avec l'eau oxygénée (fig 11 a) (Dellaras, 2014). Toutes les souches possèdent un cytochrome oxydase et ont montré une couleur violette sur la bandelette après frottement de leurs colonies sur cette dernière) (fig 11 b) (Prescott, 2002).

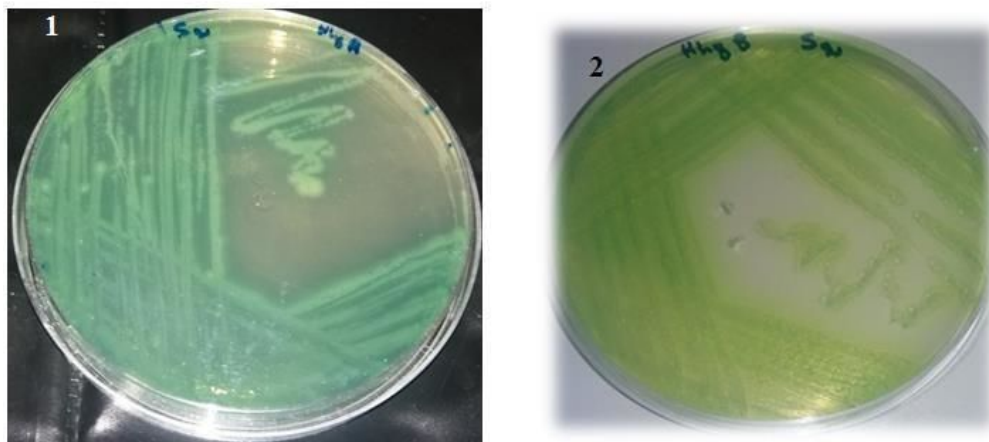


**Figure 11** : Test de catalase (a) et d'oxydase (b) pour un isolat de *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 2.3.2. Production de pigments :

Les souches sont caractérisées par la production de deux pigments (fig 12) : la pyocyanine qui diffuse sur milieu King A en donnant une couleur bleu-verte (Barbhaiya et Rao, 1985 ; Osawa *et al.*, 1963) et la pyoverdine qui pigmente le milieu King B par une couleur jaune verdâtre (Meyer et Abdallah, 1978 ; Streeter et katouli, 2015).

L'isolat du sol montre une couleur verte foncée sur King A (fig 13) et une couleur jaune sur milieu King B.



**Figure 12** : Aspect macroscopique de la souche S2 de *P aeruginosa* sur gélose King A (1) et gélose King B (2)

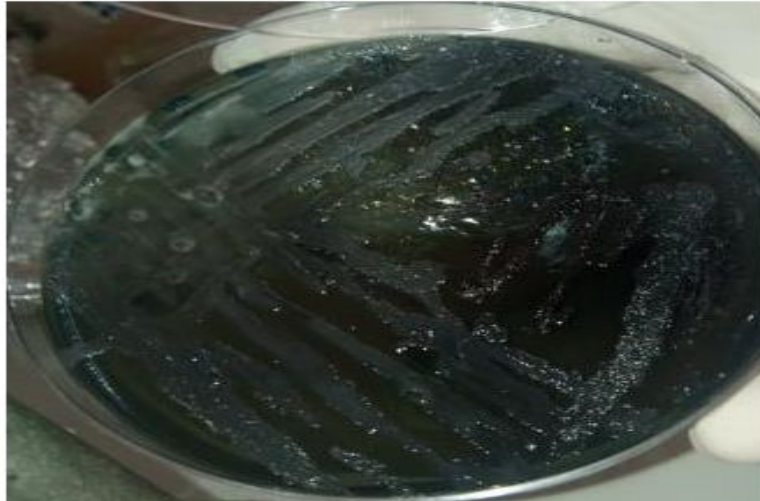


Figure 13: Aspect macroscopique de l'isolat I14 sur gélose King B.

### 2.3.3. Résultats des tests biochimiques :

Tableau 1: Résultats de quelques tests biochimiques de *P.aeruginosa*

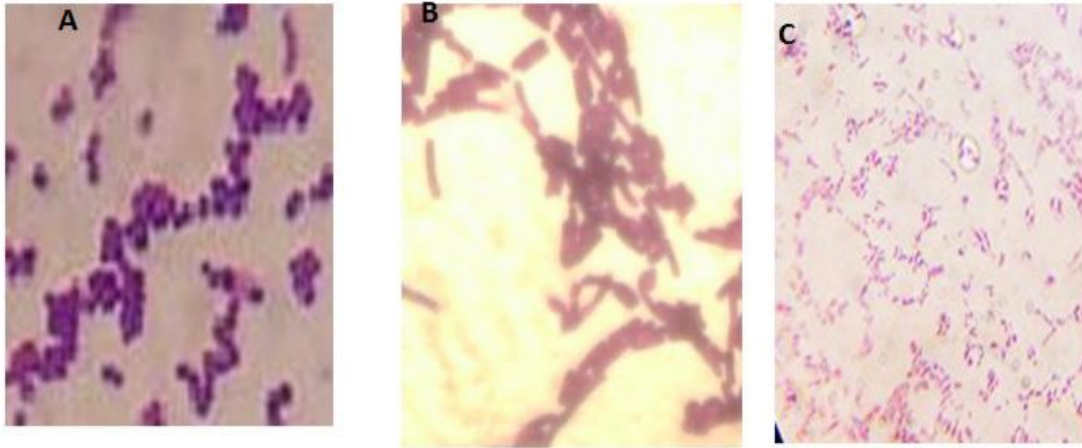
Souche / Test	I14	S1	S2	S2	S4	S5	S6	S7	Sr
42°C	-	+	+	+	+	+	+	+	+
4°C	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Gélatine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate réductase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) : résultat positif. (-) : résultat négatif.

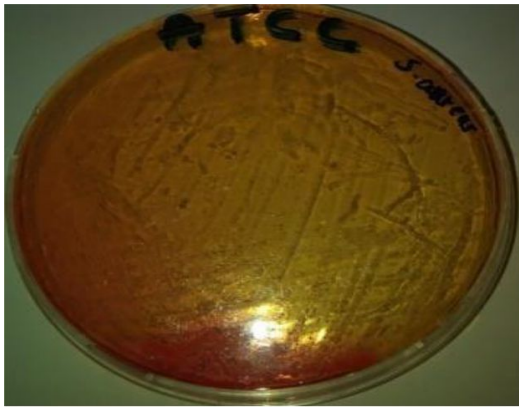
### 3. Observation des souches pathogènes cibles :

Sur milieu Chapman la souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 a montré des colonies de petite taille avec un virage de couleur vers le jaune traduisant la fermentation du mannitol (fig 14). La coloration de Gram a montré des cocci à Gram positif regroupés en amas (Ayeni et Odumosu, 2016) (fig 15).

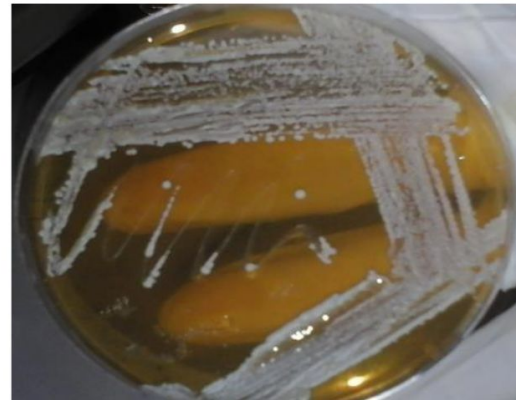
*Candida albicans* d'origine vaginale et *Candida albicans* ATCC 10231 forment de petites colonies blanchâtres (fig 16) sur milieu Sabouraud (Bechelaghem et al., 2015).



**Figure 14 :** Observation microscopique après coloration de Gram (x1000) de (A) *S.aureus* ATCC 33862, (B) *B.cereus* ATCC 10867, (C) *P. mirabilis* ATCC 35659.



**Figure 15:** Aspect macroscopique de *S.aureus* ATCC 33862 sur milieu Chapman.



**Figure 16:** Aspect macroscopique de *Candida albicans* sur milieu Sabouraud.

#### 4. Résultat du test d'antagonisme *in vitro* :

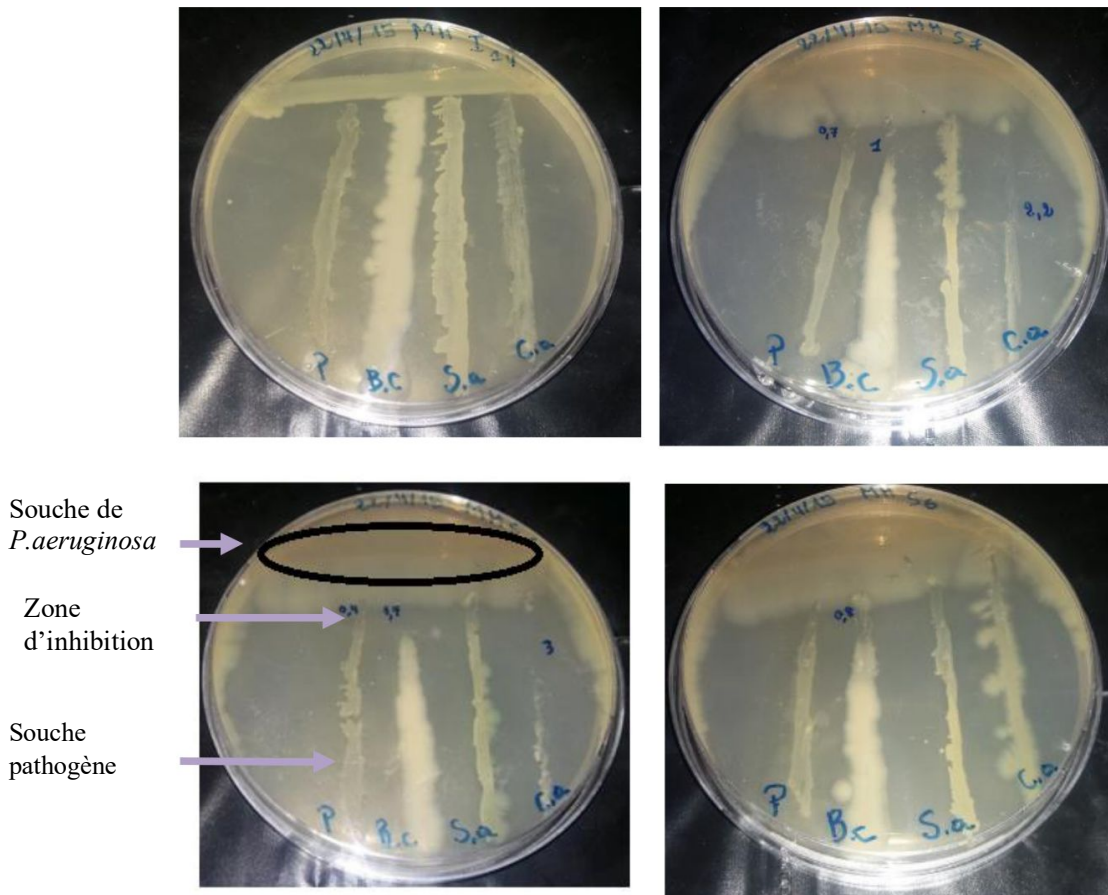
La recherche de l'activité antagoniste *in vitro* a été testée vis-à-vis 4 souches pathogènes : *Bacillus cereus* 10876, *Staphylococcus aureus* 33862, *Proteus mirabilis* 35659 et *Candida albicans*. Les résultats obtenus (tableau 2) montrent que l'activité antagoniste se diffère d'une souche à une autre concernant les souches clinique. Par contre, l'isolat rhizosphérique (I14) n'a montré aucune activité (fig 17).

Parmi les 8 souches cliniques de *P.aeruginosa*, 5 souches (S1, S2, S5, S7, Sr) seulement ont montré un pouvoir inhibiteur vis-vis les souches pathogènes avec une variation dans le degré d'inhibition. Ces zones qui sont de 7 à 35 mm dépendent de la souche de *P.aeruginosa* et du pathogène testé. *Candida albicans* ATCC est la plus inhibée par les trois souches S2,

## Résultats et discussions

S7, Sr avec des zones d'inhibition de 35 mm, 22 mm et 30 mm respectivement. La souche S2 a montré une activité antagoniste à l'encontre de tous les pathogènes et les zones d'inhibition sont comprises entre 11 et 35 mm.

Les deux souches S1, S5 et présentent une activité antimicrobienne vis-à-vis les pathogènes à Gram positif seulement. Tandis que les souches S6, S7 et Sr ont une activité antagoniste envers les pathogènes à Gram positif et négatif.



**Figure 17:** Activité antagoniste des isolats vis-à-vis les souches cibles.

P : *Proteus mirabilis* ATCC 35659.

B.c : *Bacillus cereus* ATCC 10867.

S.a : *Staphylococcus aureus* ATCC 33862.

C.a : *Candida albicans*.

**Tableau 2:** Les zones d'inhibition (en mm) de l'activité antagoniste *in vitro* des souches de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis les souches pathogènes

Les souches pathogènes	<i>B.cereus</i> ATCC 10876	<i>S.aureus</i> ATCC 33862	<i>P.mirabilis</i> ATCC 35659	<i>C.albicans</i> ATCC 10231
<b>Les souches antagonistes</b>				
S1	25	10	0	0
S2	21	11	16	35
S3	0	0	0	0
S4	0	0	0	0
S5	23	17	0	0
S6	8	5	5	0
S7	10	0	7	22
Sr	7	0	4	30
I14	0	0	0	0

Cette activité antifongique et antibactérienne exercées par *P.aeruginosa* à large spectre est peut être due aux métabolites qu'il produit (Zhang *et al.*, 2017), comme la phénazine-1-carboxamide qui est efficace contre *S. aureus*, y compris MRSA. Les modes d'action des phénazines peuvent inclure des interactions avec l'ADN (intercalation ou liaison de rainure), des topoisomérases, des anti-oxydants ou des molécules à transfert de charge (Cardozo *et al.*, 2013).

Selon Mashburn *et al.*, 2005, La présence de *S. aureus* a entraîné une diminution de la transcription des gènes régulés par le fer de *P. aeruginosa* au cours de la co-culture *in vivo*, ce qui indique que la présence de *S. aureus* augmente la teneur en fer utilisable de *P. aeruginosa* dans cet environnement. *P. aeruginosa* lyse *S. aureus* et utilise le fer libéré pour sa croissance dans des environnements à faible teneur en fer.

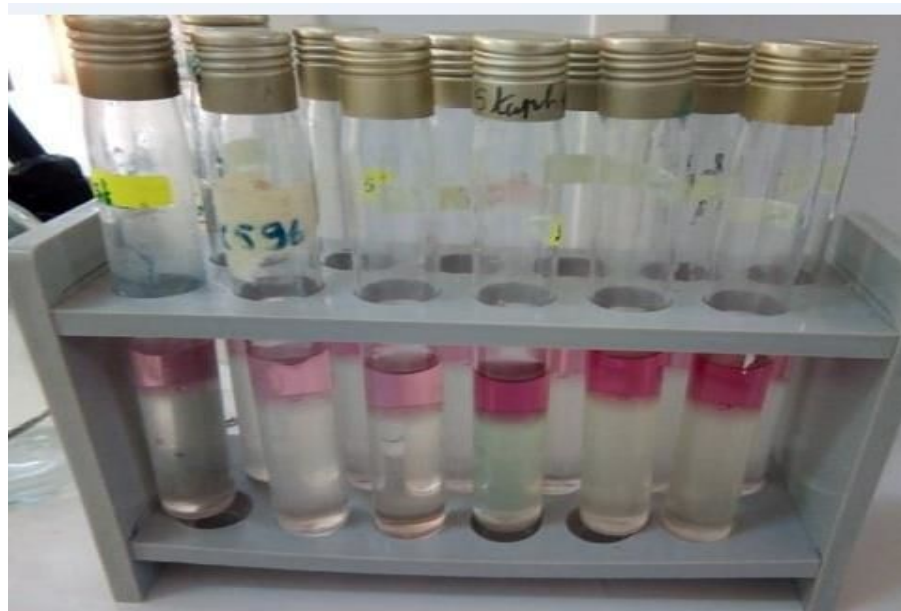
Il a été démontré qu'un acide gras insaturé, l'acide cis-2-décénoïque, produit par *P. aeruginosa* est responsable de la réponse à la dispersion des cellules dans les biofilms formés par une gamme de bactéries à Gram négatif, et par des bactéries à Gram positif. De plus, cet acide est également capable d'induire une dispersion dans les biofilms de *Candida albicans*,

ce qui indique que cette molécule a une activité fonctionnelle croisée (Davies et Marques, 2009).

*P. aeruginosa* sécrète une endopeptidase staphylolytique appelée protéase LasA ou staphylolysine, qui dégrade la pentaglycine dans la paroi cellulaire de *S. aureus*, provoquant la lyse cellulaire (Hotterbeekx *et al.*, 2017). En plus, l'exoproduit 4-hydroxy-2-heptylquinoléine-N-oxyde (HQNO) de *P. aeruginosa* inhibe la croissance de *S. aureus* et provoque l'émergence de variants de petites colonies (SCV) (Mitchell *et al.*, 2010). Il produit également une mixture de rhamnolipides qui présente Le produit d'excellentes propriétés antimicrobiennes contre *staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* (Haba *et al.*, 2003). L'effet bactéricide de la staphylolysine (egalement appelée LasA) produite par *P.aeruginosa* contre MRSA a été démontré par Barequet *et al.*, 2009.

### 5. Dosage de la pyocyanine :

Les résultats présentés dans le tableau (3) montrent que la production de la pyocyanine par les souches de *P.aeruginosa* varie entre 3.86 et 8.82  $\mu\text{g/ml}$  où la quantité la plus élevée est enregistrée chez la souche S2.



**Figure18** : pyocyanine extraite par HCl 0.2 N.

**5.1. Calcul de la quantité de la pyocyanine :**

Quantité de la pyocyanine ( $\mu\text{g/ml}$ ) =  $\text{O.D}_{520} \times 17.072$

Exemple :  $0.516 \times 17.072 = 8.82 \mu\text{g/ml}$

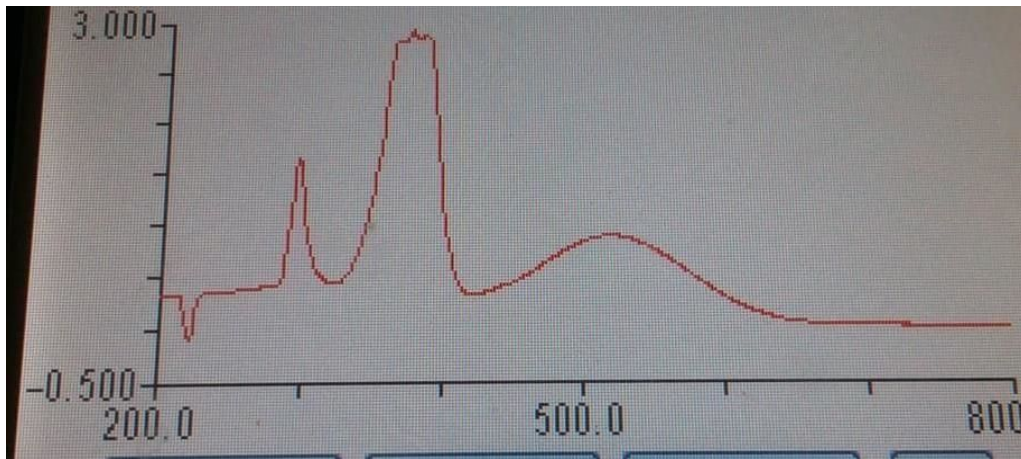
**Tableau 3:** quantification de la pyocyanine produite

Souche	DO	Pyocyanine ( $\mu\text{g/ml}$ )
S2	0.516	8.82
S5	0.226	3.86
S7	0.265	4.52
Sr	0.256	4.37

Ces résultats sont en accord avec une étude menée par (Özyürek *et al.*, 2016) où 10 souches cliniques de *P. aeruginosa* ont été testées pour la production de la pyocyanine, toutes les souches ont été en mesure de produire différentes quantités de ce pigment. En outre, la plus forte production de pyocyanine est de  $10.42 \mu\text{g/ml}$  d'une souche isolée à partir d'un échantillon d'urine, tandis que la plus faible production est de  $0.97 \mu\text{g/ml}$  d'une souche isolée de l'abdomen.

**6. Caractérisation du métabolite produit :**

Le spectre d'absorbance de la pyocyanine a été déterminé de 200 à 800 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible. Le spectre de la pyocyanine dissoute dans 0,2 N d'HCl a montré deux pics dans l'UV (à 300 et 380nm) et un pic dans le visible (à 520nm). Un maximum d'absorption a été enregistré à 380nm (3.0).



**Figure 19 :** Spectre d'absorption de la pyocyanine dissoute dans l' HCl 0,2 N.

Nos résultats sont en accord avec ceux des études menées par **(El-Fouly *et al.*, 2015)** et **(Devnath *et al.*, 2017)** où les pics obtenus à 380 et 520 nm sont caractéristiques de la pyocyanine.

### 7. Effet antimicrobien de la pyocyanine :

La pyocyanine produite par la souche S2 de *P.aeruginosa* a montré un effet antimicrobien variable vis-à-vis des microorganismes cibles (tableau 4). En effet, cette molécule révèle une activité importante contre les levures et les bactéries à Gram positif, alors que son effet sur les bactéries à Gram négatif est moins important.

*Candida albicans* d'origine clinique semble être la plus sensible à la pyocyanine avec un diamètre d'inhibition de 15 mm (fig 20). Tout comme la levure *Candida albicans*, les bactéries à Gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 montrent une sensibilité remarquable vis-à-vis de la pyocyanine avec des zones d'inhibition de 15 mm et 12 mm respectivement (fig 21), tandis que l'effet exercé sur *Bacillus cereus* ATCC 10876 est moins important par rapport aux deux bactéries précédentes où la zone d'inhibition est de 8 mm.

La sensibilité des bactéries à Gram négatif *Proteus mirabilis* ATCC 35659 et *Escherichia coli* ATCC 25922 vient en deuxième lieu avec des zones d'inhibition de 8 mm.

Ces résultats sont en accord avec plusieurs études qui ont montré l'activité antimicrobienne et antifongique de la pyocyanine **(Al-Saadi *et al.*, 2012 ; Sudhakar *et al.*, 2015 ; Özyürek *et al.*, 2016)**.

Selon une étude menée par **(Devnath *et al.*, 2017)**, *S.aureus* est la plus sensible à la pyocyanine parmi les bactéries à Gram positif testées, elle a été inhibée à 5 µg/mL de pyocyanine présentant 17,5 mm de zone d'inhibition.

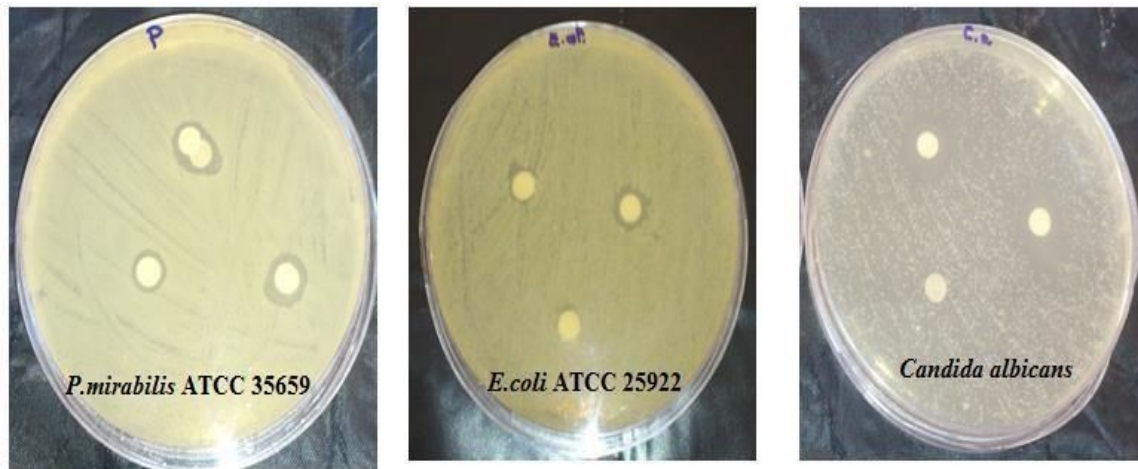
Cependant, l'activité de la pyocyanine contre d'autres bactéries pathogènes a été démontrée tel que : *S. saprophyticus*, *K. pneumoniae* **(Ahmed Mohammed *et al.*, 2017)** ainsi que *Salmonella typhi* A, *Salmonella typhi* B, *Salmonella paratyphi*, *Klebsiella* sp, *Alternaria* sp **(Agrawal et Chauhan, 2016 ; Alka *et al.*, 2018)**.

Les souches de *P.aeruginosa* produisant de la pyocyanine et de rhamnolipides ont une activité antimicrobienne plus élevée. Des relations linéaires positives existaient entre l'activité antimicrobienne contre *E. coli* et *B. subtilis* et la production de rhamnolipides **(Onbasli et Asli, 2008)**. En plus, selon **(Markraphael *et al.*, 2017)** ; l'effet antimicrobien de la pyocyanine et des bactériocines (produites par *Lactococcus lactis*) peut être renforcé par leur application combinée, de manière à rendre leur efficacité synergique.

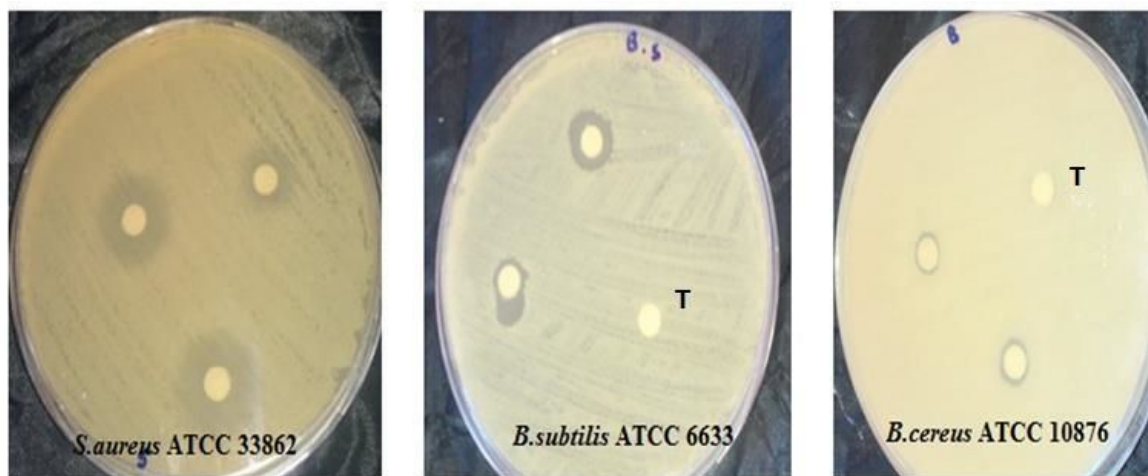
La variation de la teneur en lipides de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif et négatif peut être responsable de la variation de la sensibilité de la pyocyanine **(Agrawal et**

**Chauhan, 2016).** Une autre étude a révélé que la résistance ou la sensibilité à la pyocyanine est liée au niveau d'enzymes catalase et superoxyde dismutase (**Norman *et al.*, 2004**).

L'effet inhibiteur de la pyocyanine est provoqué par la modification du transport normal des électrons dans la chaîne respiratoire et la formation des radicaux libres d'oxygène (**Özyürek *et al.*, 2016**).



**Figure 20 :** Effet antimicrobien de la pyocyanine extraite sur les bactéries à Gram négatif et la levure cibles.



**Figure 21 :** Effet antimicrobien de la pyocyanine extraite sur les bactéries à Gram positif cibles.

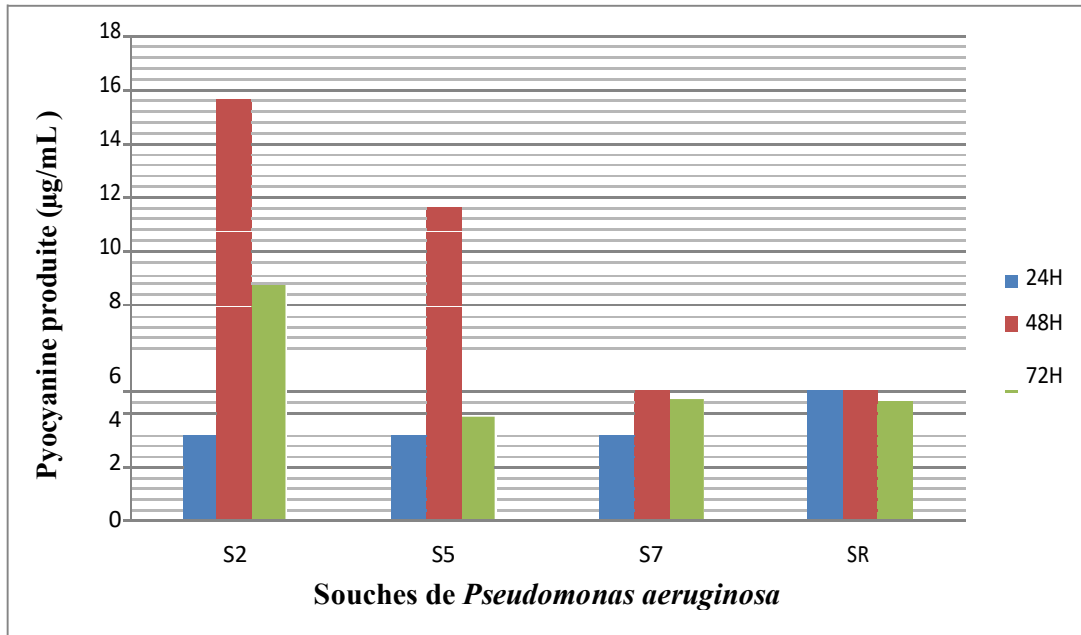
**Tableau 4:** Activité antimicrobienne de la pyocyanine sécrétée par la souche *Pseudomonas aeruginosa* (S2)

Souche pathogène testée	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	08
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	15
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	08
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	08
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	10
<i>Candida albicans</i>	15

### 8. Effet de la température et de la période d'incubation sur la production de la pyocyanine :

Les résultats de la production de la pyocyanine à 37°C pendant différentes périodes d'incubation (fig 22) montrent que la quantité de la pyocyanine produite diffère d'une souche à une autre et que les meilleures productions sont atteintes après 48 heures d'incubations pour les 4 souches avec un maximum de production de 15.9 µg/mL observée chez la souche S2. La quantité de la pyocyanine produite après 72 heures vient en deuxième lieu où le maximum est de 8.8 µg/mL chez la souche S2. Les quantités de la pyocyanine produite après 24 heures sont les plus faibles chez toutes les souches avec un minimum de 3.4 µg/mL obtenue chez la souche S2 qui semble être la plus influencée par le temps d'incubation. Cependant la souche Sr et au contraire des autres souches, a montré un rendement après 24 heures d'incubation plus élevé par rapport à celui obtenu après 72 heures d'incubation.

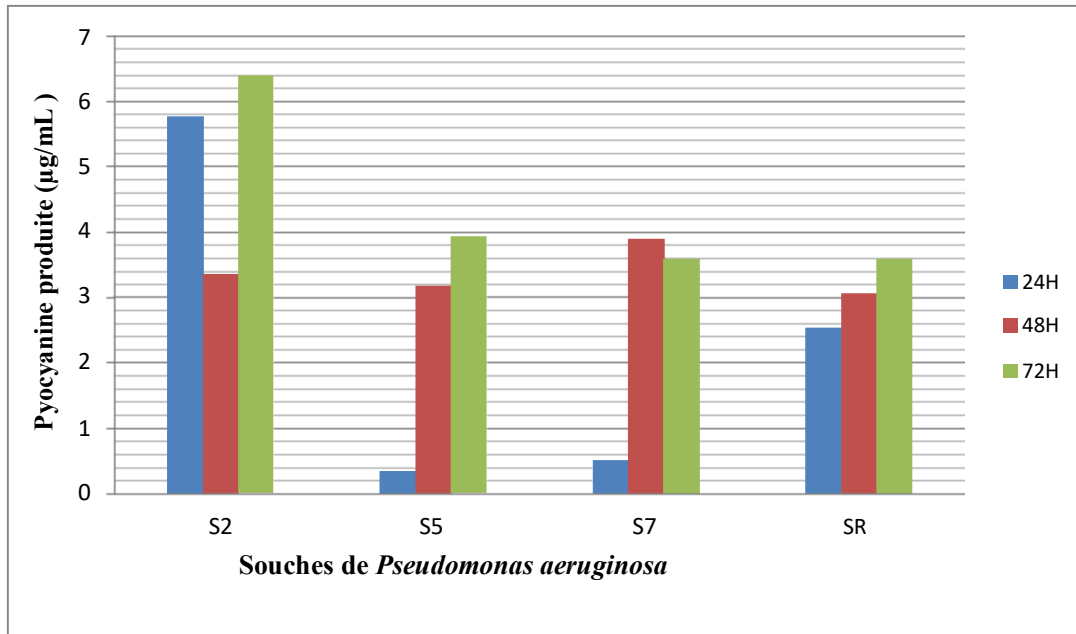
La différence de pyocyanine produite après 24 et 72 heures d'incubation n'est pas grande chez les souches S5 et S7.



**Figure 22** : histogramme représentant l'effet de la période d'incubation sur la production de la pyocyanine à 37°C.

A une température de 30 °C, les souches présentent une meilleure production après 72 heures d'incubation (fig 23) avec un maximum de 6.4 µg/mL observé chez la souche S2, sauf chez la souche S7 où son meilleur rendement est atteint après 2 jours (48h) d'incubation et qui est de 3.89 µg/mL.

L'influence de la durée d'incubation est clairement remarquable chez les deux souches S5 et S7, leur production dans les 24 heures n'a pas dépassé 0.34 µg/mL et 0.51 µg/mL respectivement et qui sont des quantités très faibles au regard de celle obtenues après 48 et 72 heures d'incubation. Par contre, la souche Sr n'a pas montré une grande différence de production dans les trois périodes d'incubation. Toute comme la souche Sr, la souche S2 n'a pas présenté une différence assez importante dans la quantité de la pyocyanine produite après 24 et 72 heures d'incubation (5.77 µg/mL et 6.4 µg/mL respectivement) tandis que sa production après 48 heures d'incubation est relativement faible.



**Figure 23** : histogramme représentant l'effet de la période d'incubation sur la production de la pyocyanine à 30°C.

En comparant les résultats obtenus lors de l'incubation des souches à 30 °C et 37 °C pendant 24, 48 et 72 heures, nous remarquons que :

- La production de la pyocyanine est influencée par la température d'incubation, les quantités maximales sont obtenues lors de l'incubation à 37 °C avec une production importante chez la souche S2 (15.9 µg/mL).
- La durée d'incubation mène à une production différente. Elle est maximale après 48 heures lors de l'incubation à 37 °C tandis qu'à 30°C le maximum est atteint après 72 heures sauf chez la souche S7.

Nos résultats sont en accord avec une étude menée par **(Onbasli et Aslim, 2008)** où la production la plus faible de la pyocyanine lors de l'incubation à 37 °C est remarquée après 24 heures d'incubation.

Une autre étude a rapporté que la production maximale de pyocyanine a été obtenue après 72 heures d'incubation à une température de 30 °C à partir des isolats de *P.aeruginosa* issus de l'environnement **(Agrawal et Chauhan, 2016)**. Ainsi que dans une étude menée par **(Gahlout et al., 2017)** mais à une température de 35° C.

**9. Identification par galerie API 20E :**

Nous avons mené à une orientation vers l'identification de la souche S2 par galerie API 20 E (fig 24). Après incubation, la lecture de la galerie a été faite en se référant au tableau de lecture (Tableau 05). Ces résultats nous ont permis de rapprocher la souche S2 à *P.*

*aeruginosa*. **Tableau 5 :** Résultats des différents tests biochimiques de la galerie API 20 E

Tests	Réactions/ enzymes	Résultats
<b>ONPG</b>	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside - $\beta$ -galactosidase	-
<b>ADH</b>	Arginine dihydrolase	+
<b>LDC</b>	Lysine Décarboxylase	-
<b>ODC</b>	Ornithine Décarboxylase	+
<b>CIT</b>	Assimilation	+
<b>H2S</b>	Thiosulfate réductase	-
<b>URE</b>	Uréase	-
<b>TDA</b>	Tryptophane désaminase	-
<b>IND</b>	Tryptophanase	-
<b>VP</b>	Assimilation	-
<b>GEL</b>	Gélatinase	+
<b>GLU</b>	Assimilation	-
<b>MAN</b>	Assimilation	-
<b>INO</b>	Assimilation	-
<b>SOR</b>	Assimilation	-
<b>RHA</b>	Assimilation	-
<b>SAC</b>	Assimilation	-
<b>MEL</b>	Assimilation	-
<b>AMY</b>	Assimilation	-
<b>ARA</b>	Assimilation	-



**Figure 24:** orientation vers l'identification de la souche S2 sur galerie API 20 E ; (A) avant l'incubation, (B) après l'incubation.

## Conclusion et perspectives

Le présent travail a pour objectif d'utiliser la pyocyanine produite par le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* dans la lutte contre quelques microorganismes pathogènes.

Pour ce faire, un isolement a été effectué à partir des échantillons des racines d'une plante de graminée *Hordeum murinum*. 18 *Pseudomonas* fluorescents ont été obtenus. Un seul seulement produit un pigment bleu-vert sur King A. En plus, 8 souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* ont été rajoutées dans cette étude. Plusieurs tests d'identification préliminaires ont été réalisés pour caractériser cette espèce.

L'activité antagoniste de l'ensemble des isolats a été réalisée sur milieu Mueller-Hinton par la technique de stries vis-à-vis des bactéries pathogènes et des levures afin de sélectionner les *P. aeruginosa* les plus antagonistes, 4 isolats de cette espèce ont montré une activité antagoniste à l'encontre des souches cibles et sont toutes d'origine clinique. Le degré de cette activité varie selon l'isolat de *P.aeruginosa* et la souche testée. Une activité remarquable envers les bactéries à Gram négatif, positif et les levures par la souche S2 où des zones d'inhibition allant de 11 à 35 mm sont obtenues. Cette souche a été sélectionnée pour la production de la pyocyanine, et pour étudier l'activité antimicrobienne de cette molécule sur les germes pathogènes. Une étude sur l'effet de la température et du temps d'incubation sur la production de la pyocyanine est effectuée.

L'effet de la pyocyanine extraite sur les souches cibles a révélé que cette substance possède une activité antimicrobienne importante et de large spectre envers les pathogènes. Les zones d'inhibition obtenues varient de 8 à 15 mm, où *S.aureus* ATCC 33862 et *C.albicans* semblent être les plus sensibles à cette molécule.

L'analyse de la pyocyanine extraite par spectrophotométrie UV-Visible a montré deux pics dans l'UV (à 300 et 380nm) et un pic dans le visible (à 520nm) avec un maximum d'absorption à 380nm

Selon les résultats obtenus, la production de la pyocyanine est influencée par la température et le temps d'incubation, où une meilleure production est obtenue à une température de 37°C après 48 heures d'incubation et qui est de 15.9µg/mL.

Les perspectives qui résultent de ce travail sont nombreuses et multiples :

- D'un point de vue taxonomique, il serait nécessaire d'effectuer une étude moléculaire des souches de *P.aeruginosa*.
- Il serait nécessaire aussi d'étudier les facteurs influençant la production de la pyocyanine et déterminer ceux qui sont optimaux.

- Caractérisation de cette molécule par les méthodes d'identification HPLC, CPG-SM.
- D'un point de vue application médical, il serait intéressant de poursuivre des études *in vivo* pour vérifier l'efficacité antimicrobienne de la pyocyanine ainsi que son activité anticancéreuse et de déterminer les doses tolérées par la cellule animale

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

---

- Abdul-Hussein ZR and Atia SS, (2016). Antimicrobial Effect of Pyocyanin Extracted from *Pseudomonas aeruginosa*. European Journal of Experimental Biology. Vol : 6(6) :1-4.
- Abdullahi R, Lihan S, Carlos BS, Bilung ML, Mikal MK and Collick F, (2013). Detection of *oprL* gene and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from aquaculture environment. European Journal of Experimental Biology. Vol : 3(6):148-152.
- Abdul-Lateef LA, Al-Shukri MS et Chabuck ZAG, (2017). Effect of Different Purified *Pseudomonas* exopigments on Vero-Cell Line and Some Pathogenic Bacterial Isolates. Medical Journal of Babylon. Vol: 14(3): 525 – 531.
- Abou Raji El Feghali P and Nawas T, (2018). Pyocyanin: A Powerful Inhibitor Of bacterial Growth and Biofilm Formation. Journal of Case Reports and Studies. Vol : 3 :101-107.
- Agrawal AH and Chauhan PB, (2016). Effect of cultivation media components on pyocyanin production and its application in antimicrobial property. International Journal of Current Advanced Research. Vol: 5(4): 829-833.
- Ahmed Mohammed T and Almahde MAM, (2017). Antimicrobial Activity of Pyocyanin for Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Urinary Tract Pathogens. Asian Journal of Medicine and Health. Vol: 4(4): 1-9.
- Alhazmi A, (2014). *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. International Journal of Biology. Vol 7 : 44-67.
- Alka R, Shikha C, Wamik A, (2018). Production and Antimicrobial, Antioxidant and Anticancer Applications of Pyocyanin from Isolated *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Fermentation and Microbial Technology. Vol: 1(2).
- Aloush V, Venezia SN, Igra YS, Cabili S and Carmeli Y, (2006). Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors and Clinical Impact. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol: 50(1): 43–48.
- Al-Saadi AAH, Flayyih MT et Al-Shibib AS, (2012). Properties of pyocyanin produced by carbencillin resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Egypt. J. Exp. Biol. Vol : 8(1): 103 – 106.
- Alvarez-Ortega CA and Harwood CS, (2007). Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung are by aerobic respiration. Mol Microbiol. Vol:65(1): 153–165.



- Al-Wrafiy F, Brzozowska E, Górska S et Gamian A, (2016). Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* –the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postepy Hig Med Dosw.* Vol : 70 : 78-91.
- Arai H, (2011). Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology.* Vol: 2 (103): 1-3.
- Arai H, Kawakami T, Osamura T, Hirai T, Sakai Y et Ishii M, (2014). Enzymatic Characterization and In Vivo Function of Five Terminal Oxidases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology.* Vol : 196 : 4206–4215.
- Arat S, Bullerjahn GS et Laubenbacher R, (2015). A Network Biology Approach to Denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE.* Vol: 10(2).
- Auajjar N, Attarassi B, Elhaloui NE et Badoc A, (2006). Multirésistance aux antibiotiques *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* et *Staphylococcus aureus* et survie sur divers tissus hospitaliers. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* Vol : 145: 61-76. 2 17
- Avrain L, Mertens P and Bambeke FV, (2013). RND efflux pumps in *P. aeruginosa*: an underestimated resistance mechanism. *Antibiotic susceptibility.* 26-28.
- Avril JL, Dabernat H, Deni F et Monteil H, (1992). *Bactériologie clinique.* 2ème Ed. Ellipses, Paris.
- Ayeni FA and Odumosu BT, (2016). False identification of other microorganisms as *Staphylococcus aureus* in Southern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* Vol : 15 (9): 1941-1945.
- Balouiri M, Sadiki M et Ibsouda SK, (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity : A review. *Journal Of Pharmaceutical Analysis.* Vol : 6 : 71-79.
- Barakat R, (2012). Etude des propriétés biologiques et antimicrobiennes de la pyocyanine, pigment redox-actif produit par *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat. Université de La Rochelle, France.
- Barbhaiya HB and Rao KK, (1985). Production of pyoverdine, the fluorescent pigment of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *FEMS Microbiology Letters.* Vol 27: 233-235.
- Barbier F and Wolff M, (2010). Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* Vers l'impasse thérapeutique. *Medecine/Sciences.* vol : 26 (11) :1-9.
- BardoelKok BW, van Kessel PM, van Strijp JAG et Fin JM, (2012). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence: Characterization of the AprA–AprI Interface and Species Selectivity. *Journal of Molecular Biology.* Vol : 415 (3) :573-583.
- Barequet IS, Ben Simon GJ, Safrin M, Ohman DE, and Kessler E, (2004). *Pseudomonas aeruginosa* LasA Protease in Treatment of Experimental Staphylococcal Keratitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* Vol : 48 (5) : 1681–1687.

- Barker AP, Vasil AI, Filloux A, Ball G, Wilderman PJ and Vasil ML, (2004). A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Molecular Microbiology*. Vol 5 : (4) : 1089–1098.
- Baron SS And Rowe JJ, (1981) Antibiotic Action Of Pyocyanin. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. Vol: 20(6): 814-820.
- Bechlaghem N, (2017). Etude des *Lactobacillus* vaginaux : Identification, effets protecteurs, facteurs de déséquilibre et moyens de régénérescence .Thèse De Doctorat. Université de Abd Alhamid Ibn Badis Mostaganem. Algérie.
- Bechlaghem N, Djibaoui R, Etalhi M et Arabi A, (2015). Diagnosis of a chronic vaginitis: Characterization of *Candida albicans* and in vitro antagonistic activities of vaginal *Lactobacillus*. *South Asian J Exp Biol*. Vol : 5 (4): 143-150.
- Bédard E, Prévost M et Déziel E, (2016). *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. *Microbiology Open*. Vol 5: 937–956.
- Ben Haj Khalifa A, Moissenet D, Thien VH et Khedher M, (2011). Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations. *Annales De Biologie Clinique*. Vol : 69 (4) : 393-403.
- Benie CKD, Nathalie G, Adjéhi D, Solange A, Fernique konan K, Desire K, Bourahima B, Marcellin DK and Mireille D, (2017). Prevalence and Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Bovine Meat, Fresh Fish and Smoked Fish. *Archives Of Clinical Microbiology*. Vol : 8 (3).
- Berger A, Dohnt K, Tielen P, Jahn D, Becker J et Wittmann Ch, (2014). Robustness and Plasticity of Metabolic Pathway Flux among Uropathogenic Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS One*. Vol : 9.
- Blankenfeldt W and Parsons JF, (2014). The structural biology of phenazine biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol*. 26–33
- Boyd A and Chakrabarty AM, (1995). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *Journal of Industrial Microbiology*. Vol: 15: 162-168.
- Baraket R, (2012). Etude des propriétés biologiques et antimicrobiennes de la pyocyanine, pigment redox-actif produit par *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat. Université de La Rochelle, France.
- Braun P, Bitter W and Tommassen J, (2000). Activation of *Pseudomonas aeruginosa* elastase in *Pseudomonas putida* by triggering dissociation of the propeptide–enzyme complex. *Microbiology*. Vol 145 : 2565–2572.
- Breidenstein LBM, de la Fuente-Núñez C et Hancock REW, (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trend in Microbiology*. Vol: 19(8): 419-426.

- Briard B, Bomme P, Lechner BE, Mislin GLA, Lair V, Prévost MCh, Latgé JP, Haas H and Beauvais A, (2014). *Pseudomonas aeruginosa* manipulates redox and iron homeostasis of its microbiota partner *Aspergillus fumigatus* via phenazines. Scientific reports. Vol : 5 :1-13.
- Bucior I, Pielage JF et Engel JN, (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Pili and Flagella Mediate Distinct Binding and Signaling Events at the Apical and Basolateral Surface of Airway Epithelium. PLoS Pathogens. Vol : 8.
- Buxton R, (2011). Nitrate and Nitrite Reduction Test Protocols. American Society for Microbiology.
- Bystrova OV, Knirel YA, Lindner B, Kocharova BA, Kondakova AN, Zähringer U and Pier GB, (2006). Structures of the core oligosaccharide and O-units in the R- and SR-type lipopolysaccharides of reference strains of *Pseudomonas aeruginosa* O-serogroups. FEMS Immunology and Medical Microbiology. Vol : 46:85-99.
- Carballido Lopez AY, (2018). Rôle des voies d'import du fer impliquant des sidérophores dans l'homéostasie de métaux biologiques autres que le fer chez *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg, France.
- Cardozo VF, Oliveira AG, Nishio EK, Perugini MR, Andrade CG, Silveira WD, Durán N, Andrade G, Kobayashi RK and Nakazato G, (2013). Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. Vol: 12 (12):1-8.
- Casilag F, Lorenz A, Krueger J, Klawonn F, Weiss S et Häussler S, (2016). The LasB Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* Acts in Concert with Alkaline Protease AprA To Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition. Infect Immun 84:162–171.
- Cezairliyan B, Vinayavekhin N, Lee DG, Yuen GJ, Saghatelian A et Ausubel FM, (2013). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Phenazines that Kill *Caenorhabditis elegans*. PLOS Pathogens. Vol: 9(1):1-9.
- Chaker H, (2012). Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte: implication des métabolites du tryptophane. Thèse de Doctorat. Université de Grenoble, France.
- Charles S, (2006). La lectine PA-III de *Pseudomonas aeruginosa*: Structure, affinité et spécificité pour des ligands naturels et glycomimétiques. Thèse de Doctorat. Université de Grenoble I Joseph Fourier, France.
- Charlotte G, (2014). Dialogue inter-règles entre *Pseudomonas aeruginosa* et les cellules de l'immunité innée – Rôle de la production de L-kynurénine par les bactéries. Thèse de Doctorat. Université de Grenoble, France.

- Cheluvappa R, Shimmon R, Dawson M, Hilmer SN And David G. Le Couteur, (2008). Reactions of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin with reduced glutathione. *Acta Biochim Polon.* Vol: 53 (3): 663-677.
- Chemani C, Imberty A, Bentzmann S, Pierre M, Wimmerová M, Guery BP, and Faure K, (2009). Role of LecA and LecB Lectins in *Pseudomonas aeruginosa* Induced Lung Injury and Effect of Carbohydrate Ligands. *Infection And Immunity.* Vol : 77(5) : 2065-2075.
- Chen F, Xia Q and Ju LK, (2003). Aerobic Denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* Monitored by Online NAD(P)H Fluorescence. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol : 69(11): 6715–6722.
- Chen H, Wubbolts RW, Haagsman HP et Veldhuizen EJA, (2018). Inhibition and Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by Host Defence Peptide. *Scientific Reports.* Vol :8:1-10.
- Chen H, Wubbolts RW, Henk HP and EJA Veldhuizen, (2018). Inhibition and Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by Host Defence Peptides. *Scientifique Reports.* Vol : 8.
- Claire B, (2014). *Pseudomonas aeruginosa* dans le cadre de la mucoviscidose. Thèse de Doctorat. Université de Lyon1, France.
- Colvin K M, Irie Y, Tart CS, Urbano R, Whitney JC, Ryder C, Howell PL , Wozniak DJ and Parsek MR, (2012). The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol.* vol : 14(8).
- Cooper M, Tavankar GR and Williams HD, (2003). Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology .*Vol : 149 (Pt5): 1275–1284.
- Corbitt J, Yeo JS, Davis CI, LeRoux M et Wiggins PA, (2018). Type VI Secretion System Dynamics Reveals a Novel Secretion Mechanism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology.* Vol : 200.
- Cunrath O, (2015). Métallome et homéostasie du fer chez *Pseudomonas aeruginosa*: rôle des sidérophores pyochéline et pyoverdine. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg, France.
- Daddaoua A, Molina-Santiago C, de la Torre J, Krell T and Ramos JL, (2014). GtrS and GltR form a two-component system: the central role of 2-ketogluconate in the expression of exotoxin A and glucose catabolic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Research.* Vol 42 : (12) : 7654–7665.
- Dahah H, (2017). Etude de l'effet antimicrobien et antioxydant des métabolites secondaires sécrétés par des *Pseudomonas* originaires des conditions extrêmes. Thèse de Doctorat. Université de Mostaganem, Algérie.

- Dahah, H, Djibaoui R et Nemmiche S, (2016). Antimicrobial effect of phenazines produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from saline soil of Mina River, Algeria. South Asian Journal of Experimental Biology. Vol : 5 : 187-193.
- Dahah, H, Djibaoui R et Nemmiche S, (2016). Antimicrobial, antioxidant and hemolytic effects of Pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from saline soil of Mina river, Algeria. International Journal of Biosciences. Vol : 9(5) :134-143.
- Das T, Ibugo AI, Klare W and Manefield M, (2016). Role of Pyocyanine and Extracellular DNA in Facilitating *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. Microbial Biofilms - Importance and Applications. Chapter 2 : 24-42.
- Davies DG and Marques CNH, (2009). A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms. Journal of Bacteriology. Vol: 191(5): 1393-1403.
- Delarras C, (2014). Pratiques en microbiologie de laboratoire. Lavoisier, France.
- Denning GM, Iyer ShS, Reszka KJ, O'Malley Y, Rasmussen GT and Britigan BE, (2003). Phenazine-1-carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. Vol: 285: L584–L592.
- Deredjian A, Colinon C, Hien E, Brothier E, Youenou B, Cournoyer B, Dequiedt S, Hartmann A, Jolivet C, Houot S, Ranjard L, Saby NPA and Nazaret S, (2014). Low occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in agriculture soils with and without organic amendment. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Vol : 4 (53) : 1-12.
- Devnath P, Uddin MK, Ahamed F, Hossain MT and Abul Manchur M, (2017). Extraction, purification and characterization of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* and evaluation for its antimicrobial activity. International Research Journal of Biological Sciences. Vol: 6(5): 1-9.
- Dinesh MF and Ayush K, (2013). Resistance-Nodulation-Division Multidrug Efflux Pumps in Gram-Negative Bacteria: Role in Virulence. Antibiotics. Vol :2:163-181.
- Durand E, Bernadac A, Ball G, Lazdunski A, Sturgis JN, and Filloux A, (2003). Type II Protein Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the Pseudopilus Is a Multifibrillar and Adhesive Structure. Journal of Bacteriology. Vol : 185 (9) : 2749-2758.
- El-Fouly MZ, Sharaf AM, Shahin AAM et El-Bial HA , (2015). Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Rad. Res. Appl. Sci. Vol : 8 : 36-48.
- Elmeskini MK, (2011). Etude épidémiologique des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat. Université de Mohammed V, Maroc.
- El-Zawawy NA and Ali SS, (2016). Pyocyanin as anti-tyrosinase and anti tinea corporis : A novel treatment study. Microb Pathog. Vol :100 :213-220.

- Eschbach M, Schreiber K, Trunk K, Buer J, Jahn D and Schobert M, (2004). Long Term Anaerobic Survival of the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via Pyruvate Fermentation. *Journal of Bacteriology*. Vol : 186: 4596–4604.
- Franklin MJ, Nivens DE, Weadge J and Howell PL, (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel and Psl. *Frontiers in Microbiology*. Vol: 2(167).
- Freschi L, Vincent AT, Jeukens J, Emond-Rheault J-G, Kukavica-Ibrulj I, Dupont M-J, Charrette SJ, Boyle B and Levesque RC, (2018). The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity. *Genome Biol. Evol.* Vol :11 : (1):109–120.
- Funken H, Bartels K-M, Wilhelm S, Brocker M, Bott M, Bains M, Hancock REW, Rosenau F et Jaeger K-E, (2012). Specific Association of Lectin LecB with the Surface of *Pseudomonas aeruginosa*: Role of Outer Membrane Protein OprF. *PLoS One*. Vol : 7.
- G. Vedel, (2005). Simple method to determine b-lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. vol 56 : 657–664.
- Gahlout M, Prajapati H, Chauhan P, Patel N and Solanki D, (2017). Isolation and screening of pyocyanin producing *Pseudomonas* spp. from soil. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. Vol: 4 (4): 147-152.
- Galdino ACM, Branquinha MH, Santos ALS and Viganor L, (2017). *Pseudomonas aeruginosa* and Its Arsenal of Proteases: Weapons to Battle the Host. Chapter No: 16.
- Garcia J, Gruenberg K, Nguyen L and Macdougall C, (2018). Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections: Hard to Treat, But Hope on the Horizon? *Current Infectious Diseases Reports*. Vol :20(2):23.
- Gebus CIA, (2008). Interactome des antigènes protecteurs V de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Yersinia pestis*: Mécanisme d’assemblage et interaction avec l’aiguille de sécrétion de type III. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier - Grenoble I, France.
- Geerlings PM, (2017). Effects of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and Exotoxin A on subcutaneous tissue following dermal trauma. *Medical Research Archives*. Vol 5 : 1-14.
- Gellatly SL et Hancock REW, (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*. Vol : 67 : 159-173.
- Ghafoor A, Hay ID and Rehm BHA, (2011). Role of Exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Architecture. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol : 77: 5238–5246.
- Gharieb MM, El-Sheekh MM, El-Sabbagh SM et Hamza WT, (2013). Efficacy of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* as a topical treatment of infected skin of rabbits. *Biotechnology an Indian Journal*. Vol : 7(5):184-193.

- Golovkine G, (2015). Franchissement des barrières épithéliales et endothéliales par le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat. Université Grenoble Alpes, France.
- Gomila M, Peña A, Mulet M, Lalucat J and García-Valdés E, (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*. Vol : 6 (214) :1-13.
- Green SK, Schroth MN, Cho JJ, Kominos SD, and Vitanza-Jack VB. Agricultural Plants and Soil as a Reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology*. Vol : 28(6) :967-991.
- Greenhagen BT, Shi K, Robinson H, Gamage S, Bera AK, Lander JE and Parsons JF, (2008). Crystal Structure of Pyocyanin Biosynthetic Protein PhS. *Biochemistry*. Vol : 47(19) : 5281-5289.
- Grishin AV, Krivozubov MS , Kassryagina AS et Gintsburg AL, (2015). *Pseudomonas aeruginosa* Lectins As Targets for Novel Antibacterials. *FEMS Microbiology Letters*. Vol : 364(15) : 1-11.
- Grosso-Becerra MV , Santos-Medellín C, González-Valdez A , Méndez JL, Delgado G , Morales-Espinosa R, Servín-González L , Alcaraz LD and Soberón-Chávez G, (2014). *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics*. Vol : 15(318) :1-14.
- Guttenberger N, Blankenfeldt W et Breinbauer R, (2017). Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Vol: 25: 6149–6166.
- Haba E, Pinazo A, Jauregui O, Espuny MJ, Infante MR, Manresa A,(2003). Physicochemical Characterization and Antimicrobial Properties of Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol: 81(3): 317-322.
- Hachani A, Allsopp LP, Oduko Y and Filloux A, (2014). The VgrG Proteins Are “à la Carte ” Delivery Systems for Bacterial Type VI Effectors. *The journal of biological chemistry*. Vol : 289 (25) : 17872-17884.
- Hachani A, Lossi NS, Hamilton A, Jones C, Bleves S, Albesa-Jové D and Filloux A, (2011).Type VI Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa* Secretion and multimerization of VgrG proteins. *The journal of biological chemistry*. Vol : 286 (14) :12317-12327.
- Hall S, McDermott C, Dukie SA, McFarland AJ, Forbes A, V. Perkins A, Davey AK, Williams RC, Kiefel MJ, Arora D and Grant GD, (2016). Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*. Vol: 8 (236):1-14.
- Hancock REW and Speert DP, (2000). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resistance Updates*. Vol: 3(4): 247–255.

- Hassani HH, Hasan HM, Al-Saadi A, Ali AM et Muhammad MH, (2012). A comparative study on cytotoxicity and apoptotic activity of pyocyanin produced by wild type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. European Journal of Experimental Biology. Vol : 2 (5):1389-1394.
- Heck LW, Alarcon PG, Kulhavy RM, Morihara K, Russell MW and Mestecky JF, (1990). Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. The Journal of Immunology. Vol : 144 (6) : 2253-2257.
- Hemraj V, Diksha S et Avneet G, (2013). A Review On Commonly Used Biochemical Test For Bacteria. Nnovare Journal Of Life Science. Vol : 1: 1-7.
- Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W and Wiedemann B, (2007). Resistance Mechanisms of Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Germany and Correlation with Hypermutation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol : 51 (11) : 4062–4070.
- Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydoran A, Molin S, Givskov M and Parsek MR, (2001). Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function. Journal of Bacteriology. Vol : 183(18): 5395–5401
- Higgins S, Heeb S, Rampioni G, Fletcher MP, Williams P and Cámara M,(2018). Differential Regulation of the Phenazine Biosynthetic Operons by Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-N. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.vol 8 (252):1-13.
- Hill D, Rose B, Pajkos A, Robinson M, Bye P, Bell S, Elkins M, Thompson B, MacLeod C, Aaron SD and Harbour C, (2005). Antibiotic Susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Derived from Patients with Cystic Fibrosis under Aerobic, Anaerobic, and Biofilm Conditions. Journal of Clinical Microbiology. Vol : 43 (10):5085–5090.33
- Hirai T, Osamura T, Ishii M and Arai H, (2016). Expression of multiple cbb3 cytochrome c oxidase isoforms by combinations of multiple isosubunits in *Pseudomonas aeruginosa* .PNAS. Vol: 113: 12815–12819.
- Hirsch EB and Tam VH, (2010). Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes.Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res. Vol: 10(4): 441–451.
- Hocquet D, El Garch F,Vogne C et Plisiat P, (2003). Mécanisme de la résistance adaptative de *Pseudomonas aeruginosa* aux aminosides Mechanism of adaptive resistance to aminoglycosides of *Pseudomonas aeruginosa*. Pathologie Biologie. Vol : 51 : 443-448.
- Hotterbeekx A, Singh SK, Goossens H and Kumar SM, (2017). *In vivo* and *In vitro* Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. Frontiers in Cellular and Infection.Vol: 7 (106):1-13.
- Huang J, Sonnleitner E, Ren B, Xu Y and Haas D, (2012). Catabolite Repression Control of Pyocyanin Biosynthesis at an Intersection of Primary and Secondary Metabolism in

*Pseudomonas Aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology. Vol 78 (14): 5016–5020.

- Hwang W and Yoon SS, (2019). Virulence Characteristics and an Action Mode of Antibiotic Resistance in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Scientific Reports. Vol: 9(487).
- Iiyama K, Takahashi E, Lee JM, Mon H, Morishita M, Kusakabe T and Yasunaga-Aoki C, (2017). Alkaline protease contributes to pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiology Letters. Vol: 364(7):1-7.
- Inès NA, (2016). *Pseudomonas aeruginosa* : Epidemiologie et état actuel des résistances à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V. Thèse de Doctorat .Université Mohammed V, Maroc.
- Irie Y, Roberts AEL, Kragh KN, Gordon VD, Hutchison J, Allen RJ, Melaugh G, Bjarnsholt T, West SA, Diggle SP, (2017). The *Pseudomonas aeruginosa* PSL Polysaccharide Is a Social but Noncheatable Trait in Biofilms. Mbio. Vol: 8.
- Jennings L K, Storek K M, Ledvina HE, Coulon Ch, Marmont LS, Sadovskaya I, Secor PR, Tseng BS, Scian M, Filloux A, Wozniak DJ, Howell PL and MR Parsek, (2015). Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. Proc Natl Acad Sci U S A. Vol :112 (36) : 11353–11358.
- Jo J, Whelan AP et Dietrich LEP, (2014). An Aerobic Exercise: Defining the Roles of *Pseudomonas aeruginosa* Terminal Oxidases. Journal of Bacteriology. Vol : 196: 4203–4205.
- Kang D, Kirienko DR, Webster P, Fisher AL and Kirienko NV, (2018). Pyoverdine, a siderophore from *Pseudomonas aeruginosa*, translocates into *C. elegans*, removes iron, and activates a distinct host response. Research Paper. Vol : 9(1) : 804–817.
- Karupiah V, Alagappan K, Sivakumar K et Kannan L, (2016). Phenazine-1-carboxylic acid-induced programmed cell death in human prostate cancer cells is mediated by reactive oxygen species generation and mitochondrial-related apoptotic pathway. Journal of Applied Biomedicine. Vol : 14 (3) : 199-209.
- Kaushal J, Mehandia S, Singh G, Raina A et Arya SK, (2018). Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. Vol : 16 : 192-199.
- Kawakami T, Kuroki M, Ishii M, Igarashi Y and Arai H, (2010). Differential expression of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. Environmental Microbiology. Vol : 12(6) : 1399–1412.
- Kessler E, Safrin M, Gustin JK, Abrams WR, Rosenbloom J and Ohma DE, (1997). Inhibitors and Specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. The journal of Biological Chemistry. Vol : 272(15) : 9884–9889.

- Kessler E, Safrin M, Gustin JK, and Ohma DE, (1998). Elastase and the LasA Protease of *Pseudomonas aeruginosa* Are Secreted with Their Propeptides. The Journal of Biological Chemistry. Vol : 273 (46) : 30225–30231.
- Khalilzadeh P, (2009). Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse de Doctorat. Université Toulouse, France.
- Kida Y, Higashimoto Y, Inoue H, Shimizu T and Kuwan K, (2008). A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF- $\kappa$ B through protease-activated receptors. Cellular Microbiology. Vol : 10 (7) :1491–1504.
- King A And Philip I, (1978). The identification of Pseudomonads and related bacteria in a clinical laboratory. J. MED. MICROBIOL. Vol :11 :165-176.
- Klockgether J et Tümmler B, (2017). Recent advances in understanding as *Pseudomonas aeruginosa* a pathogen [version 1; referees: 3 approved]. F1000Research. Vol : 6 (1261) :1-10.
- Kounnas MZ, Morris RE, Thompson RM, FitzGeraldj DJ, Strickland DK, and B. Saelinger CB, (1992). The  $\alpha_2$ -Macroglobulin Receptor/ Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Binds and Internalizes *Pseudomonas* Exotoxin A. The Journal Of Biological Chemistry. Vol 267 : (18) : 12420-12423.
- Kuang Z, Hao Y, Walling BE, Jeffries JL, Ohman DE et Lau GW, (2011). *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Provides an Escape from Phagocytosis by Degrading the Pulmonary Surfactant Protein-A. PLoS One. Vol : 6(11) : 1-14.
- Kumar SN, Nisha GV, Sudaresan A, Venugopal VV, Kumar MMS, Lankalapalli RS and Kumar BSD, (2014). Synergistic activity of phenazines isolated from *Pseudomonas aeruginosa* in combination with azoles against *Candida* species. Medical Mycology. Vol : 52 : 480–488.
- Kung VL, Egon A O EA and Alan RH, (2010). The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa* Vanderlene. Microbiology and Molecular Biology Review. Vol 47 : (4) : 621-641.
- Kurachi M, (1958). Studies on the Biosynthesis of Pyocyanine. (II) Isolation and Determination of Pyocyanine. Bulletin of the Institute for Chemical Research, Kyoto University. 36(6): 163-173
- Laarman AJ, Bardoel BW, Ruyken M, Fernie J, Milder FJ, van Strijp JAG, and Rooijackers SHM, (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways. The Journal of Immunology. Vol : 188: 386–393.

- Lam JS, Taylor VL, Islam ST, Hao Y and Kocíncová D, (2011). Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Frontiers in Microbiology*. Vol 2 : 1-25.
- Landry RM, An D, Hupp JT, Singh PK and Parsek MR, (2006). Mucin– *Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Molecular Microbiology*. Vol : 59(1) :142-151.
- Leclerc H, (2002). Bactériologie de *Pseudomonas aeruginosa*. La Presse thermique et climatique. Vol : 139 : 9-13.
- Leduc D, Beaufort N, Bentzmann S, Rousselle JC, Namane A, Chignard M and Pidard D, (2007). The *Pseudomonas aeruginosa* LasB Metalloproteinase Regulates the Human Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor through Domain-Specific Endoproteolysis. *Infection and Immunity*. Vol : 75(8) : 3848–3858.
- Leid JG, Willson CJ, Shirliff ME, Hassett DJ, Parsek MR and Jeffers AK, (2005). The Exopolysaccharide Alginate Protects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN- $\gamma$ -Mediated Macrophage Killing. *The Journal of Immunology*. Vol : 175:7512-7518.
- Leyral G et Joffin JN, (1998). *Microbiologie Technique*. Documentation technique sous la direction de Jean Figarella et Guy Leyral. 2<sup>ème</sup> édition. Bordeaux : CRDP d'Aquitaine. 304 p. (Biologie technique).
- Li B and Webster TJ, (2018). Bacteria Antibiotic Resistance: New Challenges and Opportunities for Implant-Associated Orthopaedic Infections. *Journal of orthopaedic research*. Vol 36 : (1) : 22-32.
- Li G, Shen M, Le S, Tan Y, Li M, Zhao X, Shen W, Yang Y, Wang J, Zhu H, Li S, Rao X, Hu F and Lu S, (2016). Genomic analyses of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* PA1 resequenced by single-molecule real-time sequencing. *Bioscience Reports*. Vol : 38.
- Li JL, Yang N, Huang L, Chen D, Zhao Y, Tang MM, Fan H et Bao X, (2018). Pyocyanin Inhibits *Chlamydia* Infection by Disabling Infectivity of the Elementary Body and Disrupting Intracellular Growth. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. Vol : 62 : 1-14.
- Liang H, Duan J, Sibley CD, Surette MG and Duan K, (2011). Identification of mutants with altered phenazine production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*. Vol : 60 (1) : 22–34.
- Lister PD, Wolter DJ, et Hanson ND, (2009). Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol 22 :(4) :582–610.

- Livermore DM, (2002). Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare. *Clinical Infectious Diseases*. Vol : 34 : 634–640.
- Ma L, Jackson KD, Landry RM, Parsek MR, and Wozniak DJ, (2006). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Conditional Psl Variants Reveals Roles for the Psl Polysaccharide in Adhesion and Maintaining Biofilm Structure Postattachment. *Journal of Bacteriology*. Vol: 188 (23): 8213-8221.
- Ma L, Wang S, Wang D, Parsek MR et Wozniak DJ, (2012). The roles of biofilm matrix polysaccharide Psl in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol*. Vol: 65: 377–380.
- Mao W, Warren MS, Black DS, Satou T, Murata T, Nishino T, Gotoh N and Lomovskaya O,(2002). On the mechanism of substrate specificity by resistance nodulation division (RND)-type multidrug resistance pumps: the large periplasmic loops of MexD from *Pseudomonas aeruginosa* are involved in substrate recognition. *Molecular Microbiology*. Vol: 46 (3) : 889 901.
- Markraphael AO, Uyi EJ, Omuwa AJ, Sale PM et Inuwa JM, (2017). Synergistic Antimicrobial Activities of Bacteriocin from *Lactococcus lactis* and Pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* Against Selected Microorganisms. *Journal of Bioscience*. Vol: 3(3): 16-23.
- Marty N, Pasquier C, Dournes J-L, Chemin K, Chavagnatt F, Guinandt M, Chabanon G, Pipyi B and Montrozier H, (1998). Effects of characterised *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharides on adherence to human tracheal cells. *Journal of medical microbiology*. Vol : 47 (2) :129-134.
- Mashburn LM, Jett AM, Akins DR, and Whiteley M, (2005). *Staphylococcus aureus* Serves as an Iron Source for *Pseudomonas aeruginosa* during In Vivo Coculture. *Journal of Bacteriology*. Vol : 187(2) :554–566.
- Mavrodi DV, Peever TL, Mavrodi OV, Parejko JA, Raaijmakers JM, Lemanceau P, Mazurier S, Heide L, Blankenfeldt W , Weller DM and Thomashow LS, (2010). Diversity and Evolution of the Phenazine Biosynthesis Pathway. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol : 76(3): 866–879.
- Mazzola M, Cook RJ, Thomashow S, Weller DM and Pierson S, (1992). Contribution of Phenazine Antibiotic Biosynthesis to the Ecological Competence of Fluorescent *Pseudomonads* in Soil Habitats. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol: 58(8): 2616-2624.
- Méar J B, (2014). Etude de la modulation de la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* par *Candida albicans* dans un modèle de pneumonie. Thèse de Doctorat. Université de Lille II, France.

- Mérens A, Delacour H, Plésiat P, Cavallo JD et Jeannot K, (2011). *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques *Pseudomonas aeruginosa* and antibiotic resistance. Revue Francophone des Laboratoires. Vol : 2011: 49-62.
- Meyer JM and Abdallah MA, (1978). The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens* Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. Journal of General Microbiology. Vol 107: 319-328.
- Mezaache-Aichour S, Guechi A, Zerroug MM, Nicklin J and Strange RN, (2013). Antimicrobial activity of *Pseudomonas* secondary metabolites. Pharmacognosy Communications. Vol: 3:39-44.
- Mezzache S, (1997). Etude des Propriétés suppressives d'une souche de *Pseudomonas* isolée de la rhizosphère de la pomme de terre sur la croissance de deux bactéries et de deux champignons phytopathogènes. Thèse de magistère. Université de Tlemcen, Algérie.
- Mezzache S, (2012). Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif. Algérie.
- Michalska M and Wolf P, (2015). *Pseudomonas* Exotoxin A : optimized by evolution for effective killing. Frontiers in Microbiology. Vol 6 :1-7.
- Minandri F, Imperi F, Frangipani E, Bonchi C, Visaggio D, Facchini M, Pasquali P, Bragonzi A et Visca P, (2016). Role of Iron Uptake Systems in *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Airway Infection. American Society For Microbiology Infection and Immunity. Vol : 84 (8) : 2324-2335.
- Mitchell G, Séguin DL, Asselin AE, Déziel E, Cantin AM, Frost EH, Michaud S, Malouin F, (2010). *Staphylococcus aureus* sigma B dependent emergence of small colony variants and biofilms production following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. BMC Microbiology. Vol: 10(33):1-15.
- Mittal R, Aggrawal S, Sharma S, Chhibber S et Harjai K, (2009). Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview. Journal of Infection and Public Health. Vol : 2 : 101-111.
- Moayedi A, Nowroozi J et Sepahy AA, (2017). Effect of fetal and adult bovine serum on pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and soil samples. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. Vol : 20 (12) : 1331-1338.
- Mohamad SM, Rostami S, Zamanzad B, Gholipour A et Drees F, (2018). Detection of Exotoxins and Antimicrobial Susceptibility Pattern in Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection. Vol : 5 (2) : 36-40.
- Mohammad AA et Éric D, (2013). La production des rhamnolipides chez *Pseudomonas aeruginosa* est en corrélation avec le type d'activité nette intracellulaire enoyl-CoA

hydratase In: 8ème édition Congrès Armand-Frappier, 14-16 Novembre 2013, Orford, Canada.

- Morlon-Guyot J, Méré J, Bonhoure A, and Beaumell B, (2009). Processing of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A Is Dispensable for Cell Intoxication. *Infection And Immunity*. Vol 77 : (7) :3090-3099.
- Muller M, Merrett ND, (2014). Pyocyanin Production by *Pseudomonas aeruginosa* Confers Resistance to Ionic Silver. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol:58 (9) : 5492-5499.
- Muller PK, Krohn K and Muhlradt PF, (1989). Effects of Pyocyanine, a Phenazine Dye from *Pseudomonas aeruginosa*, on Oxidative Burst and Bacterial Killing in Human Neutrophils. *Infection and Immunity*. Vol: 57(9): 2591-2596.
- Nansathit A, Apipattarakul S, Phaosiri C, Pongdontri PP, Chanthai S and Ruangviriyachai C, (2009). Synthesis, Isolation of Phenazine Derivatives and Their Antimicrobial Activities. *Walailak J Sci & Tech*. Vol: 6(1): 79-91.
- Newman JW, Folyd RV and Fotheril JL, (2017). The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. *FEMS Microbiology Letters*. Vol: 364(15):1-11.
- Norman RS, Moeller P, McDonald TJ and Morris PJ, (2004). Effect of Pyocyanin on a Crude-Oil-Degrading Microbial Community. *Applied And Environmental Microbiology*. Vol: 70(7): 4004–4011.
- Noto MJ, Burns WJ, Beavers W N et Skaar EP, (2017) Mechanisms of Pyocyanin Toxicity and Genetic Determinants of Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. Vol: 199 (17):1-13.
- Nowroozi J, Sepahi AA et Rashnonejad A, (2011). Pyocyanin Biosynthetic Genes in Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and detection of Pyocyanin's Antimicrobial Effects with or without Colloidal Silver Nanoparticles. *Cell Journal*. Vol: 14(1):7-18.
- O'Malley YQ, Reszka KJ, Rasmussen GT, Abdalla MY, Denning GM and Britigan BE, (2003). The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* .vol 285: L1077–L1086.
- O'Toole GA and Roberto Kolter R, (1998). *Molecular Microbiology*. Vol : 30 :(2) : 295–304.
- Oberhofer TR, (1979). Growth of Nonfermentative Bacteria at 42°C. *Journal Of Clinical Microbiology*. Vol : 10(6):800-804.
- Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, et Jung R, (2005). Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy*. Vol : 25(10):1353-1364.

- Okamoto K, Gotoh N and Nishino T, (2001) *Pseudomonas aeruginosa* Reveals High Intrinsic Resistance to Penem Antibiotics: Penem Resistance Mechanisms and Their Interplay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol: 45(7): 1964–1971.
- Oldak E and Trafny EA, (2005). Secretion of Proteases by *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Exposed to Ciprofloxacin. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. Vol : 49 (8) : 3281–3288.
- Oleiwi SR, (2015). Study the Effect of Pyocyanin Extracted from *Pseudomonas aeruginosa* on DNA Fragmentation of Human Lymphocytes Cells, *Iraqi Journal of Science*. Vol : 56 (2B): 1366-1371.
- Onbasli D and Aslim B, (2008). Determination of antimicrobial activity and production of some metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* B1 and B2 in sugar beet molasses. *African Journal of Biotechnology*. Vol: 7 (24):4614-4619.
- Osamura T, Kawakami T, Kido R, Ishii M et Arai H, (2017). Specific expression and function of the A-type cytochrome c oxidase under starvation conditions in *Pseudomonas aeruginosa*. . *PLoS ONE*. Vol: 12(5).
- Osawa S, Yabuuchi E, Narano Y, Nakata M, Kosono Y, Takachina K and Tanab T, (1963). Pigment production by *Pseudomonas aeruginosa* on glutamic acid medium and gel filtration of the culture fluid filtrate. *Japan. J. Microbiol*. Vol: 7 (3):87-95.
- Özyürek SB, Gür SD et Bilkay IS, (2016). Investigation of Antimicrobial Activity of Pyocyanin Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Different Clinical Specimens. *Hacettepe J. Bio. And Chem*. Vol: 44(1):1-6.
- Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ et Cheng Z, (2018). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*. Vol : 37 :177–192.
- Parsons JF, Greenhagen BT, Shi K, Calabrese K, Robinson H and Lnader JE, (2007). Structural and Functional Analysis Biochemistry. Vol : (7) :1821-1828.
- Paulen A, (2017). Utilisation de la stratégie du cheval de Troie pour lutter contre *Pseudomonas aeruginosa*: synthèses et propriétés biologiques de conjugués sidérophores-antibiotiques. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg, France.
- Pecastings S, (2010). Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d’eaux minérales naturelles. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse, France.
- Pedersen SS, Høiby N, Espersen F et Koch C, (1992). Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax*. Vol : 47 (1) :6-13.
- Perdu C, (2013). Etude de deux protéines impliquées dans l’injection de toxines par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat. Université Grenoble, France.

- Pericolini E, Colombari B, Ferretti G, Iseppi R, Ardizzoni A, Girardis M, Sala A, Peppoloni S and Blasi E, (2018). Real-time monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on endotracheal tubes in vitro. *BMC Microbiology*. Vol 18: (84) : 1-10.
- Pernet E, (2014). Etude du rôle de la phospholipase A2 sécrétée de type IIA dans la mucoviscidose: modulation de son expression par *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie, France.
- Pier GB, (2007). *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *International Journal of Medical Microbiology*. Vol : 297 (5) : 277-295.
- Poole K, (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Cellular and Infection Microbiology*. Vol: 2 (65):1-13.
- Prescott H, (2002). *Laboratory exercises in Microbiology*. 5<sup>ème</sup> édition.
- Price-Whelan A, Dietrich LEP et Newma DK, (2006). Rethinking ‘secondary’ metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chemical Biology*. Vol : 2(2): 71-78.
- Priyaja P, P. Jayesh P et Philip R, (2016). Pyocyanin induced in vitro oxidative damage and its toxicity level in human, fish and insect cell lines for its selective biological applications. *Cytotechnology*. Vol: 68:143–155.
- Raftari M, Ghafourian S, Sadeghifard N and Abu Bakar F, (2013). Cloning and overexpression of extracellular elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. *European journal of inflammation*. Vol : 11 (1) : 55-60.
- Rane MR, PD Sarode, BL Chaudhari et Chincholkar SB, (2007). Detection, isolation and identification of phenazine-1-carboxylic acid produced by biocontrol strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Jornal of Scientific and Industrial Research*. Vol: 66:627-631.
- Reboud E, (2017). Comportement et toxicité de nouvelles souches hyper-virulentes de *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat. Université de Grenoble Alpes, France.
- Recinos DA, (2012). The Roles and Regulation of the Redundant Phenazine Biosynthetic Operons in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. These de Doctorat. Columbia University, USA.
- Reuter S, Sigge A, Wiedeck H et Trautmann M, (2002). Analysis of transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* between patients and tap water outlets. *Critical Care Medicine*. Vol 30(10):2222-2228.
- Rikalovic MG, Avramovic NS and Karadzic IM, (2017). Structure-Function Relationships of Rhamnolipid and Exopolysaccharide Biosurfactants of *Pseudomonas aeruginosa* as Therapeutic Targets in Cystic Fibrosis Lung Infections. *Progress in Understanding Cystic Fibrosis*. Chapter6 : pp128-158.

- Ryder C, Byrd M, and Wozniak DJ, (2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol*. Vol: 10(6): 644–648.
- Salacha R, (2010). Les patatines de *Pseudomonas aeruginosa* ; Secrétées ou non Secrétées ? Telle est la question. Thèse de Doctorat. Université de La Méditerranée, France.
- Sall K, (2013). Etude de la régulation du système de sécrétion de type 3 et du système de sécrétion de type 6 chez *Pseudomonas aeruginosa* : Approches de chimogénomique, mutagenèse aléatoire et étude d'isolats clinique. Thèse de Doctorat. Université Grenoble, France.
- Sato H and Frank DW, (2011). Multi-Functional Characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Needle-Tip Protein, PcrV; Comparison to Orthologs in other Gram-negative Bacteria. *Frontiers in Microbiology*. Vol :2(142) : 1-12
- Scharmann W, (1976). Cytotoxic Effects of Leukocidin from *Pseudomonas aeruginosa* on Polymorphonuclear Leukocytes from Cattle. *Infection And Immunity*. Vol : 13(3) : 836-843.
- Schreiber K, Boes N, Eschbach M, Jaensch L, Wehland J, Bjarnsholt T, Givskov M, Hentzer M and Schobert M, (2006). Anaerobic Survival of *Pseudomonas aeruginosa* by Pyruvate Fermentation Requires an Usp-Type Stress Protein. *Journal of Bacteriology*. Vol: 188: 659–668.
- Sefraoui I, (2015). Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen, Algérie.
- Sherif Elleboudy N, Mabrouk Aboulwafa M et Abdel-Haleem Hassouna N, (2014). Phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*; characterization of catalytic activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. Vol : 2014 : 860-866.
- Simionato AS, Navarro , Maria L. A. de Jesus, Barazetti AR, da Silva CS, Simões GC, Balbi-Peña MI, João C. P. de Mello, Panagio L A, de Almeida RSC, Andrade G and AG. de Oliveira, (2017). The Effect of Phenazine-1-Carboxylic Acid on Mycelial Growth of *Botrytis cinerea* Produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV Strain. *Frontiers in Microbiology*. Vol: 8 :1-9.
- Spencer C, (2015). Biochemical characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase D. thèse de Doctorat. Université de Vanderbilt, États-Unis.
- Sterritt OW, Lang EJM, Kessans SA, Ryan TM, Demeler B, Jameson GB and Parker EJ, (2018). Structural and functional characterisation of the entry point to pyocyanin biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* defines a new 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase subclass. *Bioscience Reports*. Vol : 38 :1-20

- Stonehouse MJ, Cota-Gomez A, Parker SK, Martin WE, Hankin JA, Murphy RC, Chen W, Lim KB, Hackett M, Vasil AI and Vasil ML, (2002). A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Molecular Microbiology*. Vol 46 :661-676.
- Strateva T and Yordanov D, (2009). *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*. Vol: 58 : 1133–1148.
- Streeter K and Katouli M, (2016). *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. *Infect Epidemiol Med*. Vol: 2(1): 25-32.
- Strover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warren P, Hickey MJ, Brinkman FSL, Hunfnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GKS, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock EW, Lory S and Olso MV, (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. Vol : 406 :959-964.
- Sudhakar T, Karpagam S and Jayavarthan R, (2013). Pyocyanin and its Bacteriostatic Effect toward Common Clinical Pathogens. *International Journal of PharmTech Research*. Vol : 5(4) : 1487-1492.
- Sudhakar T, Karpagam S and Premkumar J, (2015). Biosynthesis, antibacterial activity of pyocyanin pigment produced by *Pseudomonas aeruginosa* SU1. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. Vol: 7(3):921-924.
- Sugawara E, Nagano K and Nikaido H, (2012). Alternative Folding Pathways of the Major Porin OprF of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS J*. Vol: 279(6): 910–918.
- Tankhiwale S, (2016). Beta-lactamases in *P. aeruginosa*: A threat to clinical therapeutics. *Curr Pediatr Res*. Vol : 20 (1 & 2) : 253-257.
- Taylor PW, Stapleton PD et Paul Luzio J, (2002). New ways to treat bacterial infections. *Drug Discovery Today*. Vol : 7 : 1086-1091.
- Thibaut J, (2010). Caractérisation fonctionnelle et mécanisme de l'inhibition d'ExsA, régulateur clef du Système de Sécrétion de Type III de *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat. Université Grenoble, France.
- Tielker D, Hacker S, Loris R, Strathmann M, Wingender J, Wilhelm S, Rosenau F and Jaeger K, (2005). *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology*. Vol : 151 : 1313-1323.
- Toyofuku M, Uchiyama H and Nomura N, ( 2012). Social Behaviours under Anaerobic Conditions in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Microbiology*. Vol: 2012:1-8.
- Trunk K, B Benkert, Quäck N, Münch R, Scheer M,2 J Garbe , Jänsch L, Trost M, Wehland J, Buer J, Jahn M,1 Schobert M and Jahn D,( 2010). Anaerobic adaptation in

*Pseudomonas aeruginosa*:definition of the Anr and Dnr regulons. Environmental Microbiology .Vol:12(6): 1719–1733.

- Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A, and Filloux A, (2001). The chaperoneusher pathways of *Pseudomonas aeruginosa* : Identification of fimbrial gene clusters ( cup ) and their involvement in biofilm formation. PNAS. Vol 98 : (12) : 6911–6916.
- Van der Plas MJA, Bhongir RKV,w, Kjellstrom S, Siller H, Kasetty G, Morgelin M and Schmidtchen A, (2016). *Pseudomonas aeruginosa* elastase cleaves a C-terminal peptide from human thrombin that inhibits host inflammatory responses. Nature communications. Vol 7:11567 :1-13.
- Vaulont S et Schalk I, (2015) : Rôles des sidérophores bactériens et de mammifères dans les interactions hôtes-pathogènes. Medecine / sciences. Vol : 31 : 756-763.
- Verove J, (2011). Etude de la susceptibilité des cellules eucaryotes à l'injection de toxines par le système de sécrétion de type 3 de *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat. Université de Grenoble, France.
- Wang Y, Kern SE and Newman DK, (2010). Endogenous Phenazine Antibiotics Promote Anaerobic Survival of *Pseudomonas aeruginosa* via Extracellular Electron Transfer. Journal of Bacteriology. Vol: 192 (1): 365–369.
- Weigert aus Straubing M, (2017). Pyoverdine production in the pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: a study on cooperative interactions among individuals and its role for virulence. Thèse de Dctorat. Université Ludwig Maximilian, Munich, Allemagne.
- Wen L, You-ping X, Munyampundu JP, Xin X, Xian-fei Q, Yuan G, Xin-zhong C, (2016). Functional identification of phenazine biosynthesis genes in plant pathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. Journal of Integrative Agriculture. Vol : 15(4): 812–821.
- Winstanley C and Fothergill JL, (2008). The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. Federation of European Microbiological Societies. Vol: 290:1-9.
- Wretlind B et Pavlovskis, (1983). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and its role in pseudomonas infections. Review of infectious diseases. Vol : 5 : 998-1004.
- Xu LQ, Zeng JW, Jiang ChH, Wang H, Li YZ, Wen WH, Li JH, Wang F, Ting WJ, Sun ZY et Huang CY,(2017). Isolation and determination of four potential antimicrobial components from *Pseudomonas aeruginosa* extracts. International Journal of Medical Sciences.vol 14(13): 1368-1374
- Yang X, Xing B, Liang C, Ye Z, Zhang Y, (2015). Prevalence and fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital of South China . Int J Clin Exp Med. Vol: 8(1):1386-1390.

- Yayan J, Ghebremedhin B, Rasche K, (2015). Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in Pneumonia at a Single University Hospital Center in Germany over a 10-Year Period. PLoS One. Vol : 10 (10).
- Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, Ochsner UA, Parvatiyar K, Kamani MC, Allen HL, DeKievit T R, Gardner PR, Schwab U, Rowe J J, Iglewski BH, McDermott TR, Mason RP, Wozniak DJ, Hancock REW, Parsek MR, Noah TL, Boucher RC and Hassett DJ, (2002). *Pseudomonas aeruginosa* Anaerobic Respiration in Biofilms: Relationships to Cystic Fibrosis Pathogenesis. Developmental Cell. Vol : 3 :593–603.
- Zhang L, Tian X, Kuang S, Liu G, Zhang C and Sun C, (2017). Antagonistic Activity and Mode of Action of Phenazine-1-Carboxylic Acid, Produced by Marine Bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA31x, Against *Vibrio anguillarum* *in vitro* and in a Zebrafish *in vivo* Model. Frontiers in Microbiology. Vol: 8 (289):1-11.
- Zhang L, Tian X, Kuang Sh, Liu G, Zhang Ch and Sun Ch, (2017). Antagonistic Activity and Mode of Action of Phenazine-1-Carboxylic Acid, Produced by Marine Bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA31x, Against *Vibrio anguillarum* *In vitro* and in a Zebrafish *In vivo* Model. Frontiers in Microbiology. Vol: 8 (289) :1-9
- Zhao J and Yu W, (2018). Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis. Peer J. Vol: 6.
- Zhao J, Wu Y, Alfred AT, Wei P and Yang S, (2014). Anticancer effects of pyocyanin on HepG2 human hepatoma cells. Letters in Applied Microbiology. Vol : 58 :541-548.
- Zulianello L, Canard C, Khöler T, Caille D, Lacroix JS, and Meda P, (2006). Rhamnolipids Are Virulence Factors That Promote Early Infiltration of Primary Human Airway Epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. Infection And Immunity. Vol : 74 (6) :3134-3147.

# Annexe

Annexes :

Principaux Milieux de culture (Composants g/ litre)

<p>Gélose Chapman</p> <p>Peptone..... 10 g</p> <p>Extrait de viande.....0,1 g</p> <p>Chlorure de sodium.....75 g</p> <p>Mannitol.....10 g</p> <p>Agar.....15 g</p> <p>Rouge de phénol .....0.025 g</p> <p>pH = 7.4</p>	<p>Gélose nutritive</p> <p>Peptone .....10g</p> <p>Extrait de levure.....3g</p> <p>Extrait de viande.....3g</p> <p>Le chlorure de sodium.....5g</p> <p>Agar.....15 g</p> <p>pH = 7.4</p>
<p>King B solide</p> <p>Peptone de caséine.....20 g</p> <p>Sulfate de magnésium .....1,5 g</p> <p>Phosphate bi-potassique.....1,5 g</p> <p>Glycérol .....10 ml</p> <p>Agar .....20 g</p> <p>pH =7,2</p>	<p>King A solide</p> <p>Peptone de caséine .....20g</p> <p>Sulfate de potassium... .....10 g</p> <p>Chlorure de magnésium.....1,5g</p> <p>Glycérol .....10 ml</p> <p>Agar .....20 g</p> <p>pH :..... 7,2</p>
<p>Muller Hinton solide</p> <p>Extrait de viande: .....3g</p> <p>Peptone de caséine:..... 17,5 g</p> <p>Amidon: .....1,5 g</p> <p>Agar: .....16 g</p> <p>pH = 7,4</p>	

# Japi 20 € (V32)

	DNF6	AEH	LDG	QDS	QTI	BSL	URE	TDA	IND	VPI	SEL	ULU	MAN	INS	SDR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OK	BO2	N1	MOS	NOC	DFD	DFP
<i>Serratia ficaria</i>	100	0	0	0	100	0	0	0	0	50	81	100	100	50	85	92	100	75	96	96	0	92	0	100	100	100	100
<i>Serratia fonticola</i>	100	0	85	99	60	0	0	0	0	0	0	100	100	88	100	96	18	99	100	95	0	99	0	91	100	100	100
<i>Serratia liquefaciens</i>	96	0	81	99	77	0	6	0	0	52	60	100	99	75	98	10	99	70	97	97	0	100	0	95	100	100	100
<i>Serratia marcescens</i>	94	0	95	95	96	0	28	0	1	60	85	100	99	71	91	1	98	68	97	19	0	95	0	97	100	100	100
<i>Serratia odorifera 1</i>	95	0	97	84	87	0	0	0	99	40	90	100	99	99	99	99	100	99	99	95	0	99	0	100	100	100	100
<i>Serratia odorifera 2</i>	95	0	96	2	87	0	0	0	99	65	90	100	99	99	99	99	0	99	99	95	0	99	0	100	100	100	100
<i>Serratia plymuthica</i>	99	0	0	0	65	0	0	0	0	65	50	100	90	55	58	3	100	85	95	98	0	99	0	50	100	100	100
<i>Serratia rubidaea</i>	99	0	73	0	63	0	4	0	0	69	76	98	98	58	1	3	84	62	94	99	0	100	0	85	100	100	100
<i>Shigella spp</i>	7	0	0	4	0	0	0	0	39	0	0	96	63	0	15	7	7	22	0	52	0	100	0	0	100	100	100
<i>Shigella sonnei</i>	96	0	0	97	0	0	0	0	0	0	0	100	99	0	1	75	2	1	0	97	0	100	0	0	100	100	100
<i>Tatumella ptyseus</i>	0	0	0	0	10	0	0	72	0	5	0	99	0	0	0	0	80	27	9	1	0	90	0	0	100	100	100
<i>Yersinia aldovae</i>	25	0	25	50	0	0	100	0	0	0	0	95	100	90	100	0	6	0	5	50	0	100	0	0	100	100	100
<i>Yersinia enterocolitica</i>	81	0	0	90	0	0	93	0	65	8	0	99	99	25	98	2	100	4	88	69	0	98	0	2	100	100	100
<i>Yersinia fredericxsenii</i>	95	0	0	99	0	0	98	0	99	1	0	100	99	11	95	100	100	0	97	57	0	98	0	5	100	100	100
<i>Yersinia intermedia</i>	95	0	0	100	0	0	97	0	97	2	0	100	99	63	95	99	99	97	98	52	0	98	0	5	100	100	100
<i>Yersinia kristensenii</i>	87	0	0	87	0	0	100	0	99	0	0	99	99	62	99	0	0	0	99	87	0	98	0	5	100	100	100
<i>Yersinia pestis</i>	68	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	99	97	0	71	0	0	0	18	23	0	47	0	0	99	100	100
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	77	0	0	0	13	0	96	0	0	0	0	98	97	0	0	77	0	70	22	29	0	95	0	0	100	100	100
<i>Acinetobacter spp</i>	0	0	0	0	48	0	1	1	0	10	10	60	0	0	0	2	1	60	2	56	0	3	0	0	90	98	0
<i>Moraxella spp</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	9	0	0	35	0	0
<i>Pasteurella aerogenes</i>	70	0	0	95	0	0	95	0	0	0	0	99	0	90	0	10	99	0	0	80	85	100	0	0	100	100	100
<i>Pasteurella multocida</i>	4	0	0	25	0	0	0	0	88	0	0	29	74	0	68	0	77	0	0	0	79	52	0	0	2	23	23
<i>Pasteurella spp</i>	60	0	1	10	0	0	25	0	15	7	3	35	10	10	10	1	35	1	2	1	80	59	0	0	9	33	33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	87	0	0	92	0	35	0	0	2	74	67	0	0	0	0	1	11	0	18	97	12	56	97	100	98	0
<i>Pseudomonas cepecia</i>	58	0	32	16	72	0	1	0	0	4	46	65	3	1	1	0	14	0	24	18	90	40	0	99	88	97	0
<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	0	74	0	0	68	0	1	0	0	22	27	41	0	0	0	3	0	25	1	20	97	26	0	100	96	93	0
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	0	72	0	0	18	0	0	0	0	1	91	95	79	75	79	0	72	0	64	18	100	0	92	100	100	100	0
<i>Pseudomonas spp</i>	3	10	0	0	54	0	3	0	0	25	10	10	0	0	0	2	1	6	1	9	93	43	35	99	85	49	0
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	60	0	48	0	76	0	0	0	0	0	89	2	0	0	0	0	0	0	0	0	4	25	1	100	91	49	0