



Faculté des sciences de la Nature et de la vie  
Domaine : S.N.V  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Microbiologie appliquée  
Option: Interactions Microorganismes, Hôtes et Environnement

## THÈSE

PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
DOCTORAT 3<sup>ème</sup> cycle LMD

Par  
Hicham DAHAH

### Thème

**Etude de l'effet antimicrobien et antioxydant des métabolites  
secondaires sécrétés par des *Pseudomonas* originaires des  
conditions extrêmes**

Soutenu publiquement le : 03/12/2017

#### Membres de Jury

Chadli Rabah	Professeur	Université de Mostaganem	Président
Djibaoui Rachid	Professeur	Université de Mostaganem	Directeur de thèse
Nemliche Said	Professeur	Université de Mostaganem	Co-directeur de thèse
Mekhaldi Abdelkader	Professeur	Université de Mostaganem	Examineur
Bekada Ahmed	Professeur	Centre Universitaire de Tissemsilt	Examineur

# Dédicace

Je dédie affectueusement cette thèse

A la mémoire de mon Père

A ma Mère

*A ma femme.*

*A mes deux anges filles nourhane et sirine*

*A mes frères et soeurs.*

A tous mes amis et proches

Et à tous qui m'ont aidé dans ce travail

# *Remerciements*

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le professeur Djibaoui Rachid pour sa disponibilité, sa patience et ces encouragements pendant les durs moments de doute et de découragement.

Je remercie également mon co-directeur, le professeur Nemmiche Saïd pour le temps qu'il m'a consacré et toutes les opportunités qu'il m'a offert au cours de cette thèse.

Un grand merci aux membres du jury, Professeur Chadli Rabah, Professeur Mekhalidi Abdelkader et Professeur Bekada Ahmed de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Qu'ils acceptent l'expression de ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

Mes remerciements vont aussi au Dr Moulay Mohamed et le Chef de Département de biologie Mr Mjahed Moustapha pour leurs aides et ces encouragements.

Je n'oublie pas de remercier Mr Kerkoud Mohamed, gérant du laboratoire DIAG GENE, pour son aide en matière de caractérisation moléculaire.

Je n'oublie pas aussi d'exprimer mes remerciements à tous mes amis, collègues et à toute personne ayant participé de près ou de loin pour le bon achèvement de ce travail.

## المخلص

إنَّ الأمراض المتكررة في العالم و خاصة في الجزائر هي الأمراض المعدية التي يعود ظهورها إلى سلالات ميكروبية مقاومة للمضادات الحيوية. من أجل المساهمة في حل هذه المشكلة عن طريق البحث عن مركبات مضادة للميكروبات، حاولنا دراسة الخصائص البيولوجية لبعض مواد الأيض الثانوية التي تفرزها سلالات مترممة ل *Pseudomonas sp* التي يعود مصدرها إلى التربة المالحة. تم جمع 75 عزلة *Pseudomonas* من ثلاث عينات من تربة سهل مينا (غليزان - الجزائر)، أختيرت هذه العزلات لمعرفة خصائص التضاد لديها . إن تحديد عشرين عزلة ذات قدرة عالية على التضاد باستخدام النمط المظهري، الجزيئي و باستخدام MALDI-TOF سمح بتجميع العزلات إلى أربعة أنواع مختلفة، هي *P. aeruginosa* ، *P. fluorescens* ، *P. putida* و *P. fragi*. تم استخلاص مركبات الفينازين والبيوسيانين والبيوفيردين من هذه العزلات بمذيبات مختلفة و تم تحديد خصائصها بالطرق التحليلية المختلفة وهي كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، الطيف، HPLC كروماتوغرافيا السائل ذو الأداء العالي و FTIR. النتائج التي تم الحصول عليها تكشف عن التطابق مع المواد المطلوبة بدرجة نقاوة تختلف من مادة إلى أخرى. يبين تقييم النشاط المضاد للميكروبات في الزجاج أن مركبات الفينازين و البيوسيانين تثبط نمو غالبية السلالات الممرضة المدروسة، على عكس مستخلص البيوفيردين الذي أظهر تأثيرا ضئيلا. في موازاة ذلك، فإن دراسة النشاط المضاد للأكسدة وتحلل الدم بمركبات الفينازين والبيوسيانين تبين أن هاتين المادتين تملكان نشاطا ملحوظا مضادا للأكسدة مقارنة بحمض الاسكوريك المستخدم في حين لم يتم الكشف عن أي تحلل للدم في التراكيز الأقل من 10 ملغ / مل من كلا المادتين. أظهرت نتائج تأثير الملوحة ودرجة الحرارة و الأس الهيدروجيني pH على إنتاج البيوسيانين والبيوفيردين أن العزلة المختبرة تفرز الحد الأقصى من البيوسيانين (51.21µg/ml) في وسط يحتوي على 12.5 غ / ل من كلوريد الصوديوم عند درجة حرارة التحضين 30 م° و pH 7. وتشير النتائج أيضا إلى أن أقصى قدر من البيوفيردين يتم إنتاجه عند درجة حرارة 28 درجة مئوية وعند pH 7 وينخفض هذا الإنتاج مع زيادة تراكيز كلوريد الصوديوم. إن الكشف عن الجينات المتعلقة بـ كبروكسيل الفينازين والمضادات الحيوية الأخرى (بيولوتورين، بيرولنيترين، 2,4-دياستيلفلوروغلوسينول) في عزلات *Pseudomonas* المنتخبة أظهرت وجود الجينات المسؤولة عن إنتاجها باستثناء الجين المشفر للبيولوتورين، الذي لم يظهر في جينوم العزلات المدروسة .

**الكلمات المفتاحية:** *Pseudomonas*؛ نشاط مضادات الميكروبات؛ مضادات الأكسدة؛ الكشف عن الجينات؛ تحديد الخصائص ؛ المكروبات الممرضة .

## Résumé

Les maladies récurrentes dans le monde et particulièrement en Algérie sont des maladies infectieuses qui sont dues à des souches microbiennes résistantes aux antibiotiques. Afin de contribuer dans la résolution de ce problème via la recherche des substances antimicrobiennes, nous avons essayé d'examiner les propriétés biologiques de quelques métabolites secondaires, sécrétées par des souches saprophytes de *Pseudomonas sp* originaire des sols salins. Au total, 75 isolats de *Pseudomonas* collectés à partir de 3 échantillons de sols issus de la plaine de Mina (Relizane-Algérie) ont fait l'objet d'une évaluation de leurs propriétés antagonistes. L'identification de vingt isolats à pouvoir antagoniste élevé, par une approche polyphasique : phénotypiques, moléculaires et par MALDI-TOF a permis de rassembler les isolats en quatre espèces différentes à savoir *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. fragi*. Les phénazines, la pyocyanine et la pyoverdine ont été extrait à partir des isolats antagonistes par différents solvants ensuite caractérisés par les différentes méthodes analytiques à savoir : CCM, spectrophotométrie, HPLC et FTIR. Les résultats obtenus révèlent une similitude avec les substances recherchées avec un degré de pureté qui diffère d'une substance à une autre. L'évaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro* montre que les phénazines et la pyocyanine inhibent la croissance de la majorité des souches pathogènes testées, contrairement à l'extrait de la pyoverdine qui présente un effet négligeable. En parallèle l'étude de l'activité antioxydante et hémolytique des phénazines et la pyocyanine montrent que ces deux substances présentent une activité antioxydante remarquable par rapport à l'acide ascorbique utilisé, par contre aucune hémolyse n'a été détectée à des concentrations inférieures au 10 mg/ml des deux substances. Les résultats de l'effet de la salinité, de la température et du pH sur la production de la pyocyanine et de la pyoverdine montrent que l'isolat testé a sécrété un maximum de pyocyanine (51.21 µg/ml) dans un milieu contenant 12.5 g/l de NaCl à une température d'incubation de 30 °C et à pH 7. Les résultats indiquent aussi que la quantité maximale de pyoverdine est produite à une température de 28 °C et à pH 7 et diminue avec l'augmentation des concentrations du NaCl. La détection des gènes relatifs à la phénazine carboxylate et aux autres antibiotiques (la pyoluteorine, la pyrrolnitrin, la 2,4-Diacetylphloroglucinol) chez les isolats de *Pseudomonas* sélectionnés ; révèle la présence des gènes responsables à leurs production à l'exception du gène codant pour la pyoluteorine qui est absent dans le génome des isolats testés.

**Mots clés :** *Pseudomonas* ; activité antimicrobienne ; activité antioxydante ; détection des gènes ; caractérisation ; souches pathogènes.

## **Abstract**

The recurrent diseases in the world and particularly in Algeria are infectious diseases that are due to antibiotic-resistant microbial strains. In order to contribute to the resolution of this problem in the search for antimicrobial substance, we tried to examine the biological properties of some secondary metabolites secreted by saprophytic strains of *Pseudomonas* originating from saline soils. A total of 75 *Pseudomonas* isolates obtained from three soil samples from the Mina Plain (Relizane -Algeria) were evaluated for their antagonistic properties. The identification of twenty isolates with high antagonist power, using a polyphasic approach: phenotypic, molecular and by MALDI-TOF, allowed the isolates to be grouped into four different species, namely *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* and *P. fragi*. The phenazines, Pyocyanin and pyoverdine were extracted from the antagonist isolates by different solvents then characterized by the various analytical methods, namely TLC, spectrophotometry, HPLC and FTIR. The obtained results reveal a similarity with the desired substances with a degree of purity which differs from one substance to another. The evaluation of the antimicrobial activity *in vitro* shows that the phenazines and pyocyanine inhibit the growth of the majority of the pathogenic strains tested, unlike the pyoverdine extract which has a negligible effect. In parallel, the study of the antioxidant and hemolytic activity of phenazines and pyocyanin show that these two substances exhibit a remarkable antioxidant activity compared to the ascorbic acid used, whereas no haemolysis was detected at concentrations lower than 10 mg / ml of both substances. The results of the effect of salinity, temperature and pH on the production of pyocyanin and pyoverdin show that the isolate tested secreted a maximum of pyocyanin (51.21 µg / ml) in a medium containing 12.5 g / L of NaCl at an incubation temperature of 30 °C and pH 7. The results also indicate that the maximum amount of pyoverdin is produced at a temperature of 28 °C and at pH 7 and decreases with increasing concentrations of NaCl. The detection of genes related to phenazine carboxylate and other antibiotics (pyoluteorin, pyrrolnitrin, 2,4-Diacetylphloroglucinol) in selected *Pseudomonas* isolates; reveal the presence of the genes responsible for their production with the exception of the gene encoding pyoluteorin which is absent in the genome of the isolates tested.

**Key words:** *Pseudomonas*; antimicrobial activity; antioxidant activity; detection of genes; characterization; pathogens.

# Sommaire

## Liste des tableaux

## Liste des figures

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Partie théorique</b>	
<b>Chapitre I : Généralités sur les <i>Pseudomonas</i></b>	
1. Introduction.....	3
2. La salinité et son effet sur les bactéries.....	3
3. Classification de <i>Pseudomonas</i> .....	4
3.1 Approche polyphasique.....	5
3.1.1 La classification phénotypique.....	5
3.1.2 La classification chémo-taxonomique.....	6
3.1.3 La classification génétique.....	7
4. Gènes de ménage utilisés dans la phylogénie moléculaire.....	8
5. Les principales caractéristiques des groupes phylogénétiques des <i>Pseudomonas</i> .....	9
6. Les caractéristiques métaboliques des <i>Pseudomonas</i> .....	10
7. Exemples d'espèces de <i>Pseudomonas</i> .....	14
7.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	14
7.2 <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	15
7.3 <i>Pseudomonas putida</i> .....	16
7.4 <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	17
<b>Chapitre II : Les Phénazines</b> .....	19
1. Introduction.....	19
2. Rôle des phénazines dans l'inhibition des microorganismes pathogènes.....	20
3. Biosynthèse des phénazines.....	22
4. Les mécanismes de la régulation de la biosynthèse des phénazines.....	24
4.1 Le système de deux composants.....	25
4.2 Le système de détection du quorum sensing.....	25
4.3 La régulation post-transcriptionnelle.....	26
5. Les signaux et les conditions environnementaux affectant la production.....	26
6. Structure, biosynthèse et activité de la pyocyanine.....	27
7. La dégradation et la détoxification de la pyocyanine dans l'environnement.....	28
8. Diacéthylephloroglucinol (DAPG).....	29
9. Pyrrolnitrine (PRN).....	30
10. Pyolutéorine (PLT).....	30
11. Les rhamnolipides.....	31
12. Autres antibiotiques.....	31
<b>Chapitre III : Les pyoverdines</b> .....	32
1. Généralités.....	32
2. Biosynthèse et sécrétion de la pyoverdine.....	34
3. Les récepteurs et l'assimilation du fer.....	37
4. Régulation du système pyoverdine.....	37

## Partie Expérimentale :

### Chapitre I : Matériel et Méthodes:

1. Objectifs .....	39
2. Prélèvement des échantillons .....	39
3. Mesure du pH et de la conductivité électrique (CE).....	39
4. Méthode d'isolement des <i>Pseudomonas</i> .....	40
5. Production des métabolites secondaires.....	47
6. Caractérisation des métabolites secondaires.....	49
7. Etude de l'activité antimicrobienne des métabolites secondaires.....	51
8. Optimisation d'un milieu de culture pour une meilleure production de la pyocyanine.....	53
9. Effet de la salinité, température et du pH sur la production de la pyocyanine et de la pyoverdine.....	54
10. L'activité hémolytique de la pyocyanine et l'extrait de la phénazine.....	55
11. Potentiel antioxydant de la pyocyanine et de l'extrait de phénazine (test DPPH).....	56
12. Effet de l'antioxydant L-ascorbate sur l'activité antimicrobienne de la pyocyanine.....	57
13. La recherche des gènes codant pour les antibiotiques chez les isolats de <i>Pseudomonas</i> .....	58

### Chapitre II : Résultats et discussions

1. Analyse des sols .....	60
2. Sélection des <i>Pseudomonas</i> des sols salins à pouvoir antagoniste .....	61
3. L'identification phénotypique des isolats .....	63
4. L'identification par le MALDI TOF MS.....	66
5. L'identification moléculaire des isolats.....	69
6. Effet antimicrobien des phénazines .....	72
7. Caractérisation de l'extrait phénazinique par CCM, FTIR et HPLC.....	75
8. Effet antimicrobien de la pyocyanine.....	78
9. Caractérisation de la pyocyanine par UV-Visible, CCM, FTIR et HPLC.....	81
10. Optimisation d'un milieu de culture pour une meilleure production de la pyocyanine.....	85
11. Effet de l'antioxydant sur l'activité antimicrobienne de la pyocyanine.....	87
12. Caractérisation de la pyoverdine par UV-Visible et FTIR.....	89
13. Effet de la salinité et de la température sur la production de la pyocyanine.....	91
14. Effet du pH et de la température sur la production de la pyocyanine.....	95
15. Effets de la salinité et de la température sur la production de la pyoverdine.....	97
16. Effet du pH et de la température sur la production de la pyoverdine .....	100
17. Évaluation de l'activité hémolytique de l'extrait de la phénazine et la pyocyanine vis-à-vis des globules rouges humains.....	102
18. Mesure du pouvoir anti-radicalaire de la pyocyanine.....	104
19. Mesure du pouvoir anti-radicalaire de l'extrait de phénazine.....	105
20. Recherche des antibiotiques chez les isolats de <i>Pseudomonas</i> par PCR.....	106

<b>Conclusion Générale et Perspectives</b> .....	112
--	-----

<b>Références bibliographiques</b> .....	115
--	-----

### Annexes

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1:</b> Les souches cibles et condition de culture utilisées.	41
<b>Tableau 2:</b> Les différentes concentrations et volume utilisé dans la mixture PCR.	42
<b>Tableau 3:</b> Composition du milieu de culture pour les seize expériences.	53
<b>Tableau 4:</b> Les séquences d'amorces utilisées dans la détection génotypique des antibiotiques.	58
<b>Tableau 5:</b> Les valeurs de pH et de la Conductivité $C_E$ (mS/cm) des sols des trois zones étudiées.	60
<b>Tableau 6 :</b> Les zones d'inhibition de l'activité d'antagoniste des isolats de <i>Pseudomonas</i> vis-à-vis les souches cibles <i>in vitro</i> (en mm).	61
<b>Tableau 7:</b> Résultats de quelques tests biochimiques au sein des isolats de <i>Pseudomonas</i> .	64
<b>Tableau 8:</b> Résultats de l'identification des <i>Pseudomonas</i> par MALDI-TOF.	66
<b>Tableau 9:</b> Identification comparative des <i>Pseudomonas</i> par API 20NE et MALDI-TOF.	67
<b>Tableau 10:</b> Activité antimicrobienne d'extrait brute de phenazine sécrété par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P8).	71
<b>Tableau 11:</b> Détermination de la CMI de l'extrait de phénazine sur les souches cibles.	72
<b>Tableau 12:</b> Activité antimicrobienne de la pyocyanine sécrété par la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P8).	77
<b>Tableau 13:</b> Détermination de la CMI de la pyocyanine sur les souches cibles.	78
<b>Tableau 14 :</b> Optimisation de la composition des milieux de culture.	84
<b>Tableau 15:</b> Effet antimicrobien de la pyocyanine (PYO) seul (A) et en présence d'antioxydant (L-ascorbate 5 (B), 10 (C) et 15 (D) mM) sur les souches pathogènes cibles	86
<b>Tableau 16:</b> Effet de la salinité sur la production de la pyocyanine à 37 °C.	90
<b>Tableau 17:</b> Effet de la salinité sur la production de la pyocyanine à 30 °C.	91
<b>Tableau 18:</b> Effet de la salinité sur la production de la pyocyanine à 28 °C.	91
<b>Tableau 19:</b> Effet du pH sur la production de la pyocyanine à 28 °C.	93
<b>Tableau 20:</b> Effet du pH sur la production de la pyocyanine à 30 °C.	93
<b>Tableau 21:</b> effet du pH sur la production de la pyocyanine à 37 °C.	94
<b>Tableau 22:</b> Effet de la salinité sur la production de la pyoverdine à 28 °C.	95
<b>Tableau 23:</b> Effet de la salinité sur la production de la pyoverdine à 30 °C.	96
<b>Tableau 24:</b> Effet de la salinité sur la production de la pyoverdine à 37 °C.	96
<b>Tableau 25:</b> Effet du pH sur la production de la pyoverdine à 28 °C.	98
<b>Tableau 26:</b> Effet du pH sur la production de la pyoverdine à 30 °C.	98
<b>Tableau 27:</b> Effet du pH sur la production de la pyoverdine à 37 °C.	99

## *Liste des figures*

<b>Figure 1:</b> Rangs fonctionnels et environnementaux de <i>Pseudomonas</i> .	3
<b>Figure 2:</b> Les principaux changements dans les méthodes utilisées et le nombre d'espèces dans la taxonomie des <i>Pseudomonas</i> .	5
<b>Figure 3:</b> Equations de tendance obtenus à partir des distances phylogénétiques de 107 souches de <i>Pseudomonas</i> .	9
<b>Figure 4:</b> Les voies cataboliques de l'arginine.	12
<b>Figure 5:</b> Voies métaboliques centrales de <i>P. putida</i> .	17
<b>Figure 6:</b> Quelques phenazines d'origine bactérienne.	19
<b>Figure 7:</b> Biosynthèse des phénazines.	22
<b>Figure 8 :</b> La collection des gènes et opérons de biosynthèses des phénazines chez les bactéries productrices.	24
<b>Figure 9:</b> Les systèmes de régulation de la production des phenazines (quorum sensing et les petits ARN régulateurs) chez <i>P. aeruginosa</i> et <i>P. chlororaphis</i> .	25
<b>Figure 10:</b> La voie de la biosynthèse de la pyocyanine.	28
<b>Figure 11:</b> Structure de la pyoverdine de <i>P. aeruginosa</i> .	33
<b>Figure 12:</b> Caractéristiques spectrales de la pyoverdine.	33
<b>Figure 13:</b> Schéma de la voie de biosynthèse de la pyoverdine chez <i>P. aeruginosa</i> .	35
<b>Figure 14 :</b> Synthèse de la pyoverdine I de <i>P. aeruginosa</i> .	36
<b>Figure 15 :</b> La voie pyoverdine chez <i>P. aeruginosa</i> .	38
<b>Figure 16:</b> Schéma général de caractérisation du groupe <i>Pseudomonas fluorescens-putida</i> .	42
<b>Figure 17 :</b> Méthode de détermination de la CMI de l'extrait de phénazine en milieu liquide.	52
<b>Figure 18 :</b> Structure du DPPH avec sa forme libre et réduite.	56
<b>Figure 19:</b> Activité antagoniste de la souche P <sub>8</sub> vis-à-vis les souches cibles.	63
<b>Figure 20:</b> Aspect macroscopiques des isolats de <i>Pseudomonas</i> sur gélose King B sous la lampe UV.	64
<b>Figure 21:</b> Amplification de l'ADNr 16S des isolats de <i>Pseudomonas</i> .	69
<b>Figure 22 :</b> Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S, et montrant la relation des isolats P1 à P20 avec trois espèces type du genre <i>Pseudomonas</i> . La barre 0.2 indique le nombre de substitution par position de nucléotide.	71
<b>Figure 23:</b> Effet antimicrobien de l'extrait brut de phenazine sur les souches cibles.	72
<b>Figure 24:</b> Identification des composés de l'extrait phénazinique par CCM.	75
<b>Figure 25:</b> Identification de l'extrait de phénazine par FTIR.	76

<b>Figure 26 :</b> Identification de phénazine par HPLC.	77
<b>Figure 27:</b> Effet antimicrobien de la pyocyanine sur les souches cibles.	78
<b>Figure 28:</b> Spectre d'absorption de l'extrait de la pyocyanine.	81
<b>Figure 29:</b> Identification de la pyocyanine par CCM.	82
<b>Figure 30 :</b> Identification de la pyocyanine par FTIR.	83
<b>Figure 31:</b> Identification de la pyocyanine par HPLC.	84
<b>Figure 32:</b> Effet antimicrobien de la pyocyanine (PYO) seul (A) et en présence d'antioxydant (L-ascorbate 5 (B), 10 (C) et 15 (D) mM) sur les souches pathogènes cibles.	87
<b>Figure 33:</b> Effet antimicrobien de la pyoverdine sur les souches cibles.	89
<b>Figure 34:</b> Témoin de méthanol (A) et l'extrait de la pyoverdine (B)	90
<b>Figure 35 :</b> Spectre d'absorption de l'extrait de la pyoverdine.	90
<b>Figure 36 :</b> Spectre de l'identification de la pyoverdine par FTIR.	91
<b>Figure 37:</b> Activité hémolytique de la pyocyanine.	103
<b>Figure 38:</b> Activité hémolytique de l'extrait de phénazine.	103
<b>Figure 39:</b> Le pouvoir anti-radicalaire de la pyocyanine par le test DPPH.	104
<b>Figure 40:</b> Le pouvoir anti-radicalaire de l'extrait de phénazine par le test DPPH.	106
<b>Figure 41:</b> Amplification du gène codant pour la pyoluteorine chez les isolats de <i>Pseudomonas</i> .	107
<b>Figure 42:</b> Amplification du gène codant pour la pyrrolnitrin chez les isolats de <i>Pseudomonas</i> .	108
<b>Figure 43:</b> Amplification du gène codant pour la 2,4-Diacetylphloroglucinol chez les isolats de <i>Pseudomonas</i> .	109
<b>Figure 44:</b> Amplification du gène codant pour la phénazine carboxylate (PCA) chez les isolats de <i>Pseudomonas</i> .	110

# *Introduction*

---

## Introduction

Les *Pseudomonas* représentent un groupe métaboliquement polyvalent et diversifié de Gamma-proteobacteria qui occupe une variété de niches écologique, et ils sont très considérés dans le domaine des sciences médicales, de l'environnement, de l'agriculture et en biotechnologie.

Leurs diversités génétiques et caractéristiques métaboliques confèrent aux *Pseudomonas* une capacité d'adaptation à différents biotopes et degré de stress environnementaux. Ainsi, la capacité d'induction de gènes variés et d'exprimer un ensemble d'enzymes en présence d'un ensemble des substrats particuliers aident les *Pseudomonas* à mieux s'adapter à divers niches.

L'utilisation des métabolites secondaires bioactifs d'origine bactérienne produits naturellement sont toujours recherché pour des applications diverses. La nature constitue une source des substances actives pharmaceutiques qui couvrent l'ensemble des activités biologiques tel que antimicrobienne, antioxydant, antitumorale, antiparasitique et immunosuppresseurs

Depuis leur découverte au début du XXème siècle, les antibiotiques ont permis de grandes avancées en thérapeutique et ont contribué à l'essor de la médecine moderne. L'introduction et l'utilisation en clinique des premières classes d'antibiotiques ont considérablement réduit la mortalité imputable à des maladies autrefois incurables. L'efficacité de l'antibiothérapie dans le contrôle et la limitation de la dissémination des agents pathogènes a ainsi fait naître l'espoir de pouvoir éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses.

L'apparition de la résistance des microorganismes pathogènes ont incité les chercheurs à trouver continuellement de nouveaux antibiotiques par l'étude des métabolites secondaires produites par les microorganismes entre autre ceux du sol.

Les *Pseudomonas* produisent de nombreux métabolites antimicrobiens et des sidérophores (pyoverdines ou pseudobactines) qui peuvent être valorisés.

En effet, la plupart des *Pseudomonas* produisent des antibiotiques naturels tels que des phénazines, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et le DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) qui sont les antibiotiques les plus fréquemment détectés.

Cette classe de métabolites présente un grand potentiel pour la découverte de nouveaux agents anti-infectieux et antioxydants.

Le genre *Pseudomonas* produit environ 800 substances bioactives qui inclut 600 antibiotiques et le reste avec des propriétés bioactives plus que les antibiotiques (Kahlon, 2016). Ces molécules peuvent endommager différentes fonctions cellulaires chez les germes pathogènes comme le transport d'électrons ou encore l'intégrité des membranes.

*P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste responsable de 10 à 20 % des infections nosocomiales, et qui provoque des infections létales chez les patients atteints de mucoviscidose et les patients immunodéprimés comme les grands brûlés ou les patients atteints de cancer.

Le génome de *P. aeruginosa* est l'un des plus grand génome bactérien avec 6,3 millions de paires de bases, contre 4,6 millions pour *E. coli* (Blattner *et al.*, 1997). Le séquençage du génome de la souche *P. aeruginosa* PAO1 en 2000 (Stover *et al.*, 2000) a permis de mettre en évidence la grande capacité métabolique de cette souche et un grand nombre de gènes impliqués dans différents systèmes de régulation et de transport de nutriments.

Le présent travail contribue à la valorisation des métabolites des *Pseudomonas*, issus d'un biotope salin, pour leur utilisation comme agents antimicrobiens et antioxydants. Afin de réaliser cette étude, les objectifs suivants ont été fixés :

- Isolement et caractérisation phénotypique et moléculaire des *Pseudomonas*.
- Production et extraction des métabolites secondaires
- Caractérisation des métabolites par les techniques analytiques (CCM, spectrophotométrie, HPLC, FTIR)
- Evaluation des activités biologiques des métabolites secondaires (activité antimicrobienne et pouvoir antioxydant).
- Détection génique des métabolites secondaires à pouvoir antibiotiques.

Le manuscrit est structuré en deux parties, une théorique et une seconde pratique. La première partie comporte une analyse bibliographique suivie par le chapitre matériel et méthodes et résultats et discussion.

*Analyse*  
*Bibliographique*

---

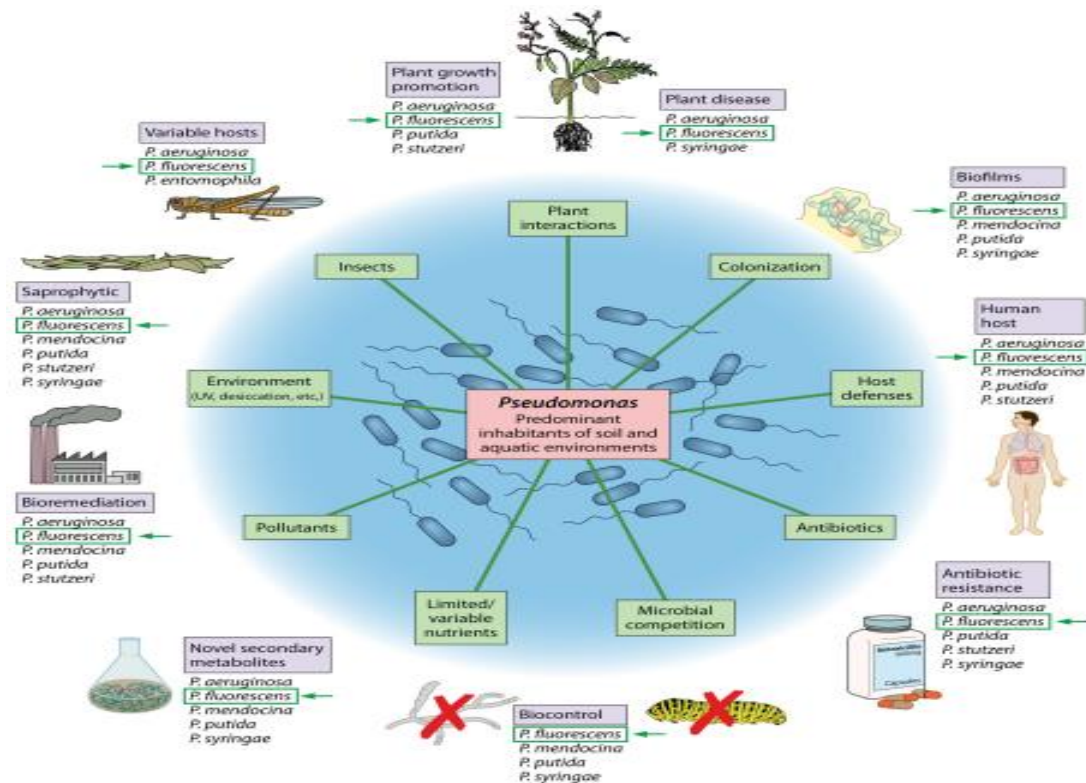
*Chapitre I :*  
*Généralités sur les*  
*Pseudomonas*

---

## 1. Introduction

Le genre *Pseudomonas* est un large groupe qui appartient à la sous-classe des Gamma-protéobactéries et englobe plus de 60 espèces colonisant le sol, les plantes, les eaux douces et marines (Gross and Loeper, 2009).

Cette adaptation à diverse niches écologiques reflète la capacité de ce genre à produire de nombreux métabolites, qui sont connus par leurs importances pour les plantes, les maladies humaines et potentiellement dans le domaine de la biotechnologie (Silby *et al.*, 2011) (Figure 1).



**Figure 1:** Rangs fonctionnels et environnementaux de *Pseudomonas*

(Silby *et al.*, 2011).

## 2. La salinité et son effet sur les bactéries

La salinisation est le processus d'accumulation des sels minéraux solubles dans le sol. Un sol est considéré salin si sa conductivité électrique (CE) est supérieure à 4 mmhos/cm (Richard, 1954) qui correspond à 40 mM de NaCl (2,4 g/l). L'origine de la salinisation peut être due à une **salinisation primaire** naturelle ou à une **salinisation secondaire** anthropique (Ghassemi *et al.*, 1995). La première source de

salinisation est le résultat d'altération de certaines roches sédimentaires, volcaniques et hydrothermales (Loyer, 1991). Aussi, l'intrusion d'eaux marines dans les zones côtières constitue une source d'apport importante de sels qui seront transportés par des eaux souterraines. Ils sont accumulés à la surface des zones basses où le taux d'évaporation est élevé (Pitmani et Lauchli, 2004). Alors que la salinisation secondaire est induite par les activités humaines. L'utilisation des engrais, la création de barrages, l'épandage d'effluents agricoles ou urbains et les implantations de serre détruisant le biote du sol et réduisant sa valeur nutritive (Abolfazl *et al.*, 2009). En général, la salinité des terres arides a été classée en trois types : faible salinité (CE 2 – 4 dS/m), la salinité modérée (CE = 4 – 8 dS/m) et une salinité élevée (CE > 8 dS / m) (Rogers *et al.*, 2005).

L'effet de la teneur des sels sur les bactéries est variable en fonction de leur pouvoir d'adaptation et de tolérance aux sels. Ainsi, si les bactéries ne peuvent s'adapter à la force ionique élevée des sels dans le sol, ils ne peuvent survivre à cause de l'incapacité à adsorber et absorber les nutriments du sol, de répliquer leur ADN et de bio-synthétiser les macromolécules (Le Rudulier *et al.*, 2002).

L'osmo-adaptation à des teneurs élevées en sels du milieu externe de la cellule bactérienne se fait par le maintien d'une osmolarité interne supérieure à celle de l'environnement extracellulaire (Pocard *et al.*, 1994).

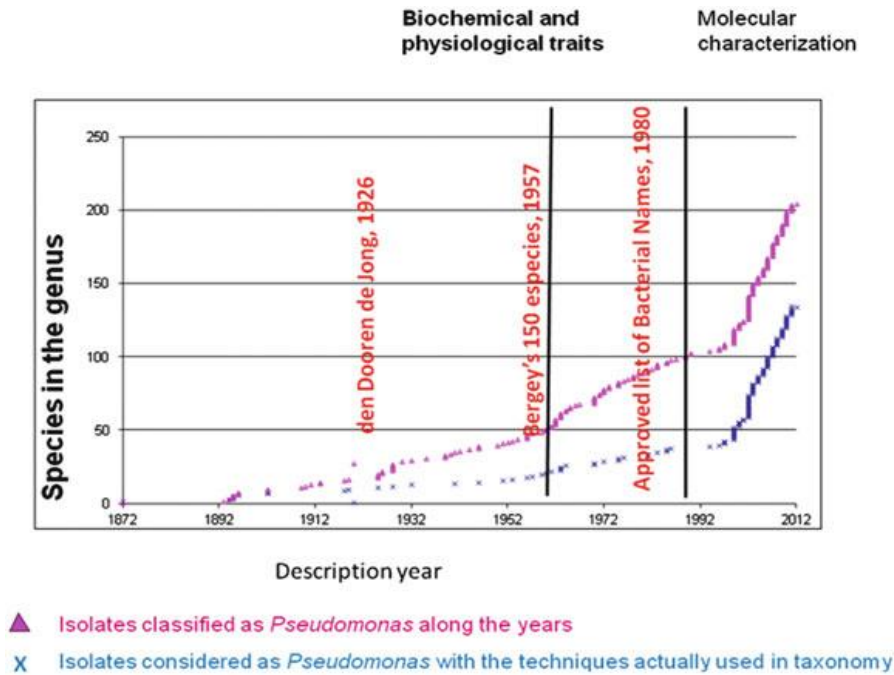
La stratégie d'osmo-adaptation chez les *Pseudomonas* passe par une réponse primaire via une accumulation des ions  $K^+$  et de glutamate (Sleator et Hill, 2001 ; Le Rudulier *et al.*, 2002) puis par une réponse secondaire à travers des molécules organiques, non chargées, de faible poids moléculaire si le choc persiste ou augmente (Bartlett et Roberts, 2004).

### **3. Classification de *Pseudomonas***

Plusieurs espèces liées à ce genre ont subi de nombreux changements principalement dues à la description de nouvelles espèces. Le nombre des espèces inclus dans ce genre a été changé selon les outils taxonomiques disponibles.

Dans la 7<sup>ème</sup> édition du Bergey Manual de la bactériologie déterminative (1957), 149 espèces ont été décrites, 235 espèces dans la 8<sup>ème</sup> édition (1974), 82 espèces sont décrites dans trois sections suivant le manuel de systématique de Bergey;

et actuellement 213 espèces de *Pseudomonas* sont citées dans la liste des noms des procaryotes selon la nomenclature de Parte (2014), mais seulement 147 espèces sont acceptées dans la taxonomie réelle. La figure 2 représente la réorganisation du nombre des espèces depuis la première description.



**Figure 2:** Les principaux changements dans les méthodes utilisées et le nombre d'espèces dans la taxonomie des *Pseudomonas* (Gracia-Valde and Lalucat, 2016) (2212 espèces bactériennes ont été réorganisées dans la liste homologuée des noms bactériennes (1980); 96 d'entre elles sont des espèces de *Pseudomonas*)

### 3.1 Approche polyphasique

En général, l'approche polyphasique est la meilleure manière de classer les bactéries (Vandamme *et al.*, 1996). Cette approche vise l'intégration des informations phénotypiques, génotypiques et phylogénétique pour la classification et l'identification des bactéries.

#### 3.1.1 La classification phénotypique

Elle concerne l'étude des bactéries à différents niveaux :

- Morphologique tels que la forme cellulaire, le type de flagelle, aspect et couleur des colonies ;

- Physiologique et biochimique tels que les sources de carbones (les acides organiques, les polyols, les acides aminés), température de croissance, la capacité de croissance dans des conditions de culture variables, l'activité enzymatique et la production d'antibiotiques (Palleroni, 2005 ;Vande-Castele, 2008).

Ces tests jouent un rôle important pour la description des taxons, des espèces et sous-espèces, genre et famille ; ce qui rend la caractérisation phénotypique nécessaire pour une classification utile qui peut influencer la profondeur de la ligne hiérarchique (Vandamme *et al.*, 1996).

### 3.1.2 La classification chémo-taxonomique

Les études chémo-taxonomiques ont été utilisées pour accomplir les analyses phénotypiques des *Pseudomonas* ainsi que dans la reclassification des espèces (Peix *et al.*, 2009).

La caractérisation chémo-taxonomique a été étudiée par Palleroni *et al.* (2008) qui ont montré que les groupes du genre *Pseudomonas* ont été facilement discriminés par cette classification. L'étude de la composition des acides gras chez les espèces de *Pseudomonas* a révélé que les acides gras saturés (C16 :0) et les acides gras insaturés C16 :1 et C18 :1 sont les plus abondants chez les espèces de ce genre (Ikemoto *et al.*, 1978).

La composition en polyamine et quinone permet une identification rapide par l'outil chémo-taxonomique. Auling *et al.* (1991) ont contribué à différencier les espèces de ce groupe en étudiant la composition en polyamine chez les *Proteobacteria*.

Un autre critère taxonomique a été utilisé par Meyer *et al.* (2002, 2007) pour identifier les *Pseudomonas* spp. Fluorescents, par la caractérisation iso-électrophorétique des sidérophores et pyoverdines, et la détermination de la spécificité de ces dernières pour les souches productrices.

La classification et reclassification des espèces de *Pseudomonas* par la mise en évidence des pyoverdines a été utilisée par Ramette *et al.* (2011). L'amélioration de cette technique taxonomique par la détermination de la masse moléculaire des

pyoverdines par spectroscopie de masse, a permis d'augmenter la résolution et l'exactitude de cette nouvelle technique (Meyer *et al.*, 2008).

Actuellement, la discrimination entre les espèces des *Pseudomonas* par les analyses chémo-taxonomiques est réalisée par l'analyse des biomolécules et la spectroscopie à fluorescence. Malgré la pertinence de l'approche chémo-taxonomique, le séquençage des gènes constitue un rôle déterminant dans la taxonomie récente des *Pseudomonas*.

### 3.1.3 La classification génétique

Comme tous les procaryotes, les *Pseudomonas* sont représentés par un ADN compacté dans un seul chromosome haploïde circulaire. Ils peuvent avoir de l'ADN extra-chromosomique sous la forme des plasmides ou transposons. Ce genre comprenant plus de 200 espèces présent dans les diverses niches écologiques.

Le génome de plus de soixante-dix souches importantes telles que *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. protegens*, *P. syringae*, *P. canabina*, *P. entomophila*, *P. mendocina* et *P. stutzeri* ont été séquencées et comparées (Stover *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2002; Paulsen *et al.*, 2005; Kung *et al.*, 2010; Klockgether *et al.*, 2011; Silby *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011; Ozer *et al.*, 2014).

Les espèces de ce genre ont une grande taille de génome comparativement à *E. coli* et aux espèces apparentées. Le génome de la souche *Pseudomonas fluorescens* Pf5, classé actuellement *Pseudomonas protegens*, est considéré comme le plus grand génome mesurant 7074893 pb avant le séquençage de la souche *Pseudomonas bauzanensis* W13Z2 qui contient un génome de 8,6 Mb avec un rapport en GC de 61.8 % (Wang *et al.*, 2014).

Le génome de toutes les souches séquencées à ce jour est composé d'un chromosome circulaire. Le séquençage de multiples génomes au sein de l'espèce est important pour une meilleure compréhension de la diversité des espèces.

La synthèse des protéines a été toujours remplie par des gènes ribosomaux, cette fonction vitale est présente dans tous les organismes. Ces caractéristiques ont attirés l'attention des chercheurs pour l'utilisation des ribosomes dans les études taxonomiques. En effet ces molécules possèdent un niveau de variabilité et de

conservation suffisant pour assurer une distinction stable et fiable à des catégories taxonomiques correspondant aux genres et aux espèces.

#### **4. Gènes de ménage utilisés dans la phylogénie moléculaire des *Pseudomonas*.**

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

En outre d'autres gènes de ménages ; *gyrB* (sous unité  $\beta$  de l'ADN gyrase) et de *rpoD* (facteur  $\sigma 70$  de l'ARN polymérase) ont été proposés par Yamamoto *et al.* (2000) pour la différenciation entre les espèces de ce genre.

Ces deux gènes sont exploités au début dans la caractérisation phylogénétique de *Pseudomonas putida* avant d'être utilisés dans l'identification de 31 espèces du genre *Pseudomonas*.

Un autre gène le *rpoB* (sous unité  $\beta$  de l'ARN polymérase) a démontré leur importance dans la discrimination entre des espèces très proches de *Pseudomonas* (Tayeb *et al.*, 2008). Ce gène est considéré comme un bon marqueur pour l'identification et l'analyse phylogénétiques des bactéries dans la microbiologie clinique (Adekambi *et al.*, 2009).

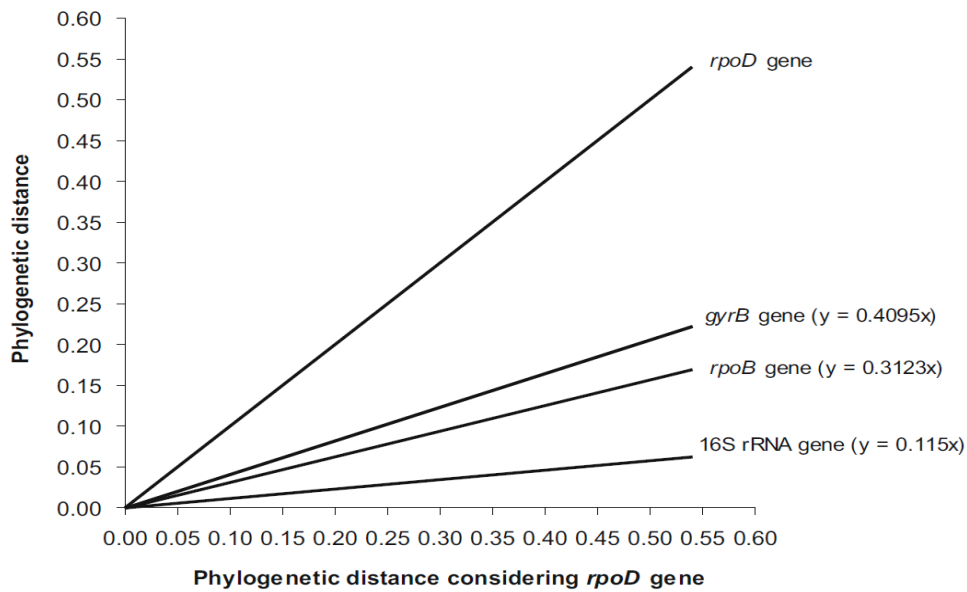
Le séquençage des gènes représente une importante voie discriminatoire puissante relative à l'étude phylogénétique, ce qui rend la possibilité d'utiliser différentes gènes dans le cas d'une corrélation de similitudes des souches.

Le comité ad hoc pour la réévaluation de la définition de l'espèce en bactériologie (Stackebrandt *et al.*, 2002) a recommandé l'utilisation de plusieurs gènes de ménages pour la reconstruction phylogénétique dans la taxonomie bactérienne.

Quatre gènes de ménages ; ARNr 16S, *gyrB*, *rpoB* et *rpoD* ; ont été sélectionnés par Mulet *et al.* (2010) pour l'analyse phylogénique de 107 espèces de genre *Pseudomonas*. Ces derniers ont été comparés afin de choisir le gène le plus discriminant. Une matrice de distance phylogénique de 107 souches a été construite et les distances ont été tracées pour chaque gène étudié.

L'étude multigénique des gènes sélectionnés a montré que le gène le plus discriminant était le *rpoD* suivie par *gyrB*, *rpoB* et ARNr 16S respectivement (Figure 3).

Une autre étude de la diversité génétique a été menée par Matthijs *et al.* (2013), elle été basée sur la comparaison de deux séquences; *oprI*, *oprL* ; avec *rpoD*. Le résultat a montré que le *rpoD* a une puissance discriminatoire trois fois plus forte que le gène *oprI* et deux fois de plus que le gène *oprL*.



**Figure 3:** Equations de tendance obtenus à partir des distances phylogénétiques de 107 souches de *Pseudomonas* (Mulet *et al.*, 2010)

### 5. Les principales caractéristiques des groupes phylogénétiques des *Pseudomonas*

Dans la phylogénie des *Pseudomonas*, deux lignées sont clairement distincts. La première lignée de *P. fluorescens*, divisé en six groupes, *P. fluorescens* (56 espèces), *P. syringae* (12 espèces), *P. lutea* (3 espèces), *P. putida* (12 espèces), *P. anguilliseptica* (8 espèces), et *P. straminea* (4 espèces). Le groupe de *P. fluorescens* était le plus complexe et comprenait neuf sous-groupes (SG) qui étaient représentés par les espèces *P. fluorescens*, *P. gessardi*, *P. fragi*, *P. mandelii*, *P. jesseni*, *P. korensis*, *P. corrugata*, *P. chlororaphis* et *P. asplenii*.

La deuxième lignée de *P. aeruginosa*, est divisée en quatre groupes principaux, représentée par les espèces *P. aeruginosa* (15 espèces), *P. oleovorans* (6 espèces), *P. stutzeri* (4 espèces) et *P. oryzihabitans* (2 espèces).

La plupart des espèces sont incluses dans des groupes phylogénétiques qui coïncident avec les groupes phénotypiques classiques de *P. fluorescens*, *P. syringae*, *P. putida*, *P. stutzeri* et *P. aeruginosa*, et les caractéristiques de chacun d'entre eux peuvent être étendues probablement à l'ensemble du groupe.

## 6. Les caractéristiques métaboliques des *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* sont des bactéries de Gram négatives, non sporulées, droites et fines, aux extrémités arrondies et d'une taille moyenne de 2 sur 5 µm (Palleroni, 1984). Elles sont caractérisées par un métabolisme oxydatif et utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons à l'exception de certaines souches pouvant utiliser le NO<sub>3</sub> comme accepteur d'électrons en anaérobiose.

Ce sont des bactéries mobiles grâce à une ciliature polaire monotriche, lophotriche ou multitriche, mésophiles et chimio-organotrophes utilisant une seule source de carbone présent dans un milieu minéral. Tandis que certaines particularités peuvent exister pour quelques souches chimio-organotrophes facultatifs, qui n'ont pas besoin de facteurs de croissance et peuvent utiliser l'hydrogène comme source d'énergie.

La majorité des espèces sont saprophytes (Ramalho *et al.*, 2002) et certains sont pathogènes soit pour les plantes telle que *P. syringea* (Stanier *et al.*, 1966), soit pour l'homme telle que *P. aeruginosa*. Cette dernière est connue comme pathogène opportuniste et causant des infections pulmonaires mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique (Mavrodi *et al.*, 2001).

Ces bactéries peuvent se multiplier dans un intervalle de température qui varie de 4 à 42 °C, la limite supérieure de ce dernier est spécifique à l'espèce *P. aeruginosa*, tandis que les saprophytes ont un optimum de croissance situé entre 28 et 30 °C.

La plupart des *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* et les espèces saprophytes) possédant une chaîne cytochromique complète comprenant une cytochrome C

oxydase ,contrairement au espèces phytopathogènes dépourvues de cette enzyme (Stanier *et al.*, 1966; Lelliot *et al.*, 1966 ; Sands *et al.*, 1967).

Ces espèces ont la capacité de dégrader des xénobiotiques et certaines composés tel que les protéines et les polysaccharides complexes comme l'amidon et la cellulose dues à la variété fonctionnelle de ces enzymes dégradatives (Latour et lemanceau, 1997 ; Bossis *et al.*, 2000).

De nombreux souches de *P. fluorescens* et *P. putida* isolés des sols contaminés ont été cités en exemple comme des isolats capables de dégrader les molécules aromatiques plus ou moins complexes contrairement au celles de la rhizosphère (Campbell *et al.*, 1995 ; Latour *et al.*, 1996).

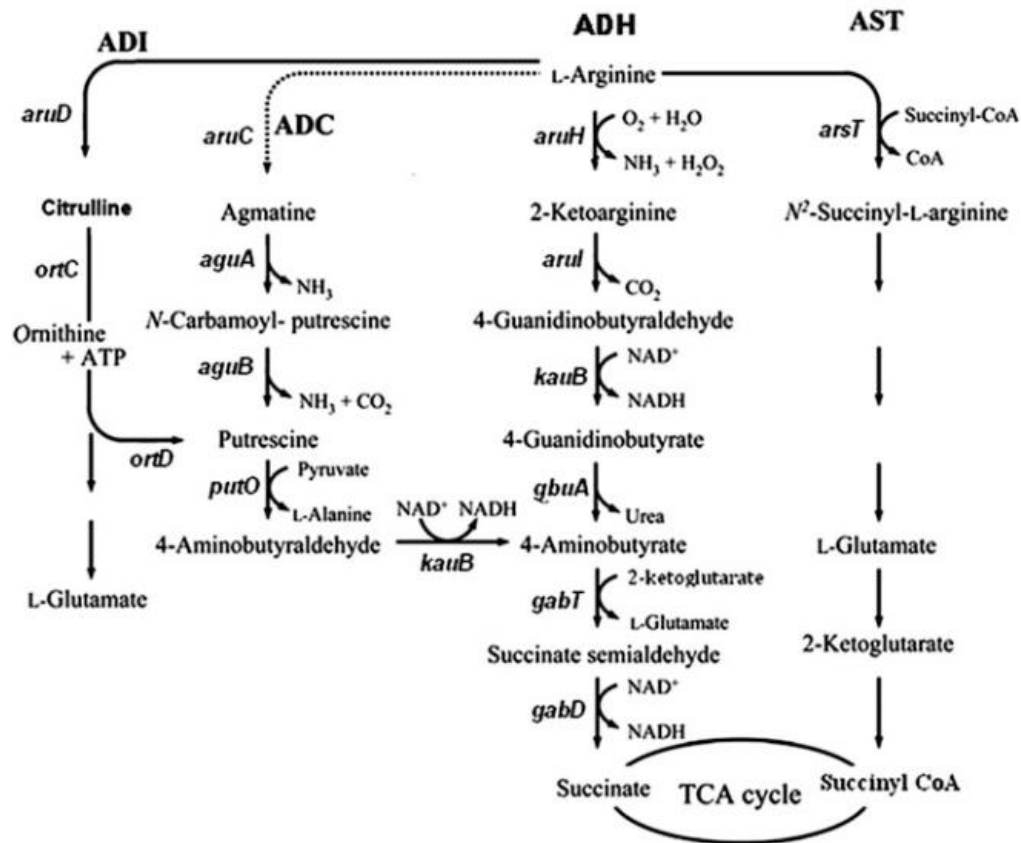
La production des exo-poly saccharides par les espèces du genre *Pseudomonas* permet la formation d'une couche entourant leurs cellules donnant une propriété protectrice, en cas de la phagocytose par les macrophages chez les mammifères. Cette couche joue ainsi un autre rôle important, qui réside dans le collage aux surfaces d'une manière difficile de les déloger en cas de la formation de biofilms (Visca *et al.*, 2007).

Les *Pseudomonas* sont dépourvues des enzymes de la glycolyse (voie d'Embden-Meyerhof). Le glucose en aérobiose est catabolisé par la voie d'Entner-Doudoroff. Les voies de catabolisme des acides aminés et organiques sont assurées par les cycles de Krebs et du glyoxylate qui jouent un rôle important dans leurs métabolismes.

Ces bactéries peuvent aussi tirer leurs énergies en anaérobiose par hydrolyse de l'arginine. Ce dernier est un acide aminé polaire chargé positivement, requit pour la constitution de la polyamine (induisant la résistance au peptide cationique, l'aminoglycoside, et les antibiotiques de quinolone) et produisent de l'ATP dans des conditions déplétions en énergie.

L'utilisation d'arginine comme source de carbone est limitée à quelque espèces des *Pseudomonas* telles que : *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. stutzeri*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. syringae*, *P. cepacia*, *P. testosteroni*, *P. acidovorans*, and *P. maltophilia* (Palleroni *et al.*, 1974).

Les microorganismes utilisent l'arginine par différentes voies telles que (1) l'arginine déiminase (ADI), (2) la voie de l'arginine décarboxylase (ADC), (3) l'arginine déshydrogénase (ADH), et (4) la voie de l'arginine succinyl-transférase (AST) (Figure 4). L'arginine est métabolisé via la voie AST en aérobiose et par la voie ADI en anaérobiose (Haas *et al.*, 1990).



**Figure 4:** Les voies cataboliques de l'arginine: ADI, voie de l'arginine déiminase; ADC, arginine décarboxylase; ADH, voie de l'arginine déshydrogénase; AST, l'arginine succinyl-transférase ; TCA, acide tricarboxylique. (Yang et Dar Lu, 2007).

Les enzymes impliqués sont l'arginine désaminase (aruD), l'ornithinecarbamoyltransférase catabolique (ortC), l'ornithine décarboxylase (ortD), l'arginine décarboxylase (aruC), l'agmatine désaminase (aguA), la N carbamoylputrescine hydrolase (aguB), la putrescine oxydase (putO), 4-guanidinobutyraldéhyde / 4-aminobutyraldéhyde déshydrogénase (kauB), Arginine déshydrogénase (aruH), la 2-cétoarginine décarboxylase (aruI), la 4-guanidinobutyrase (GbuA), 4-aminobutyraldéhyde déshydrogénase (gabD), 4-aminobutyrate transaminase (gabT), et arginine succinyl transférase (arsT).

Les souches de *P. putida* ont la capacité d'utiliser plus de 80 substrats organiques comme sources de carbone et d'énergie, alors que d'autres sont capables d'utiliser un nombre plus élevé.

La voie Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pour l'utilisation des hydrates de carbone chez les *Pseudomonas* est inactive à cause de l'absence de l'enzyme clé, la 6-phosphofructokinase (pfk) et un certain nombre de mécanismes de régulation tels que HexR de cette voie (del Castillo *et al.*, 2008).

Le glucose en aérobiose est catabolisé par la voie d'Entner-Doudoroff (ED) mais n'est pas un substrat préféré par rapport aux acides organiques. Le métabolisme du glucose qui est transporté par ABC (ATP-binding cassette) est pénétré dans l'espace périplasmique où il est oxydé en gluconate et 2-cétogluconate par le glucose déshydrogénase (gcd).

Les trois voies du métabolisme du glucose fonctionnent simultanément et les trois composés sont transportés à travers la membrane cytoplasmique par le système d'absorption ABC et Phosphorylé en glucose-6-phosphate, gluconate-6-phosphate et 2-cétogluconate-6-phosphate par des kinases spécifiques (del Castillo *et al.*, 2007).

Le gluconate-6-phosphate est la clé intermédiaire de la voie ED, il alimente aussi la voie du pentose phosphate pour la biosynthèse. Le glucose-6-phosphate et le 2-cétogluconate-6-phosphate sont converties en gluconate-6-phosphate.

La voie ED donne deux composés 3C, le glycéraldéhyde-3-phosphate et le pyruvate par molécule de glucose. La voie des pentoses phosphates fournit des précurseurs pour la biosynthèse. Le pyruvate donne soit l'acétyl-CoA ou le pyruvate pour alimenter l'oxaloacétate qui est la voie préférable que l'oxydation directe de Malate par la malate déshydrogénase avant d'entrer dans le cycle TCA.

En plus des sucres, les *Pseudomonas* métabolise également un certain nombre de substrats tels que les acides gras, des polyols (tels que le glycérol), des acides aminés et une gamme de composés aromatiques qui mènent aux voies métaboliques centrales.

L'identification des espèces de ce genre peut être réalisée sur la base du catabolisme des glucides (André, 2000). Trois grandes voies du catabolisme des glucides sont utilisées pour la croissance aérobie des *Pseudomonas* : la voie d'Entner-Doudoroff (ED), la voie de Pentose phosphate (PPP) et le cycle d'acide tricarboxylique (TCA).

Les gènes responsables du catabolisme du glucose chez les *Pseudomonas* sont organisés sur une série de chromosomes. Le gène *glk* qui code pour la glucokinase, est situé dans un opéron avec le gène *edd* qui code pour la 6-phosphogluconate déshydrogénase.

De même, le gène *zwfI* codant pour le glucose 6-phosphate déshydrogénase est formé sur le même opéron *Eda* qui code pour le 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate. Par conséquent, les gènes de la voie de la glucokinase et la voie Entner-Doudoroff sont physiquement liées (del Castillo *et al.*, 2008).

Les *Pseudomonas* dégradent les acides aminés disponibles dans leur environnement par différentes voies périphériques qui permettent de les convertir en pyruvate, acétyl-CoA, oxaloacétate, fumarate, succinyl-CoA et oxoglutarate.

Ces systèmes enzymatiques complexes de *Pseudomonas* permettent l'utilisation d'acides aminés pour la synthèse de l'acide tricarboxylique, les acides gras, le NADH et l'ATP, nécessaires à leur survie dans les diverses conditions environnementales.

*Pseudomonas aeruginosa* peut passer d'une forme non pathogène non mucoïde à une forme mucoïde pathogène par la synthèse d'alginate, par le processus de gluconéogenèse qui convertit l'oxaloacétate en fructose 6-phosphate, précurseur de la production d'alginate qui en fait un pathogène opportuniste chez les patients atteints de fibrose kystique. Ainsi, cette bactérie peut croître sous une forme planctonique et former un biofilm associée à l'alginate.

Le grand génome et la capacité d'exprimer un ensemble d'enzymes en présence d'un ensemble des substrats particuliers aident les *Pseudomonas* de s'adapter à divers niches ce qui reflète les grandes capacités physiologiques et métaboliques des espèces de ce genre.

## **7. Exemples d'espèces de *Pseudomonas***

### **7.1 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* est largement répandu dans l'environnement. C'est une bactérie ubiquitaire qui peut vivre à l'état saprophyte dans les eaux douces et marines, le sol, les végétaux, les solutions antiseptiques et sur des surfaces inorganiques.

La présence de cette bactérie dans les différentes niches écologiques est due à la capacité de respirer en aérobiose et en anaérobiose.

Elle est très fréquente en milieu hospitalier où elle est impliquée dans de nombreuses infections nosocomiales. Elle est capable de sécréter certains produits toxiques vis-à-vis les nématodes, les insectes et quelques bactéries pathogènes (Rahme *et al.*, 2000 ; Miyata *et al.*, 2003 ; Gellatly et Hancock, 2013).

Le développement de *Pseudomonas aeruginosa* en anaérobiose est dû à l'utilisation des nitrates ou des nitrites comme accepteurs finaux d'électrons. La transformation des nitrates en azote est catalysé en quatre étapes par les enzymes suivants : le nitrate réductase membranaire (NAR), le cytochrome cd<sub>1</sub> nitrite réductase (NIR) périplasmique, le cytochrome c oxyde nitrique réductase (NOR), le cytochrome c oxyde nitreux réductase (N<sub>2</sub>OR) périplasmique. Les gènes qui codent pour ces quatre réductases sont aussi exprimés en conditions micro-aérophiles (Alvarez-Ortega et Harwood, 2007).

Les étapes de transformation des nitrates sont schématisées comme suit :

Nitrate (NO<sub>3</sub>) → Nitrite (NO<sub>2</sub>) → Oxyde nitrique (NO) → Oxyde nitreux (N<sub>2</sub>O) → Azote gazeux (N<sub>2</sub>).

Cette bactérie est capable de se déplacer de manière isolée grâce à son flagelle. Elle se trouve souvent sous forme planctonique ou adhérer à une surface dont elle est enrobée dans une matrice d'exo-polysaccharides (EPS) à l'état de biofilm. La formation de ce dernier dépend du quorum sensing et d'autres facteurs environnementaux.

## 7.2 *Pseudomonas fluorescens*

*Pseudomonas fluorescens* est une bactérie commensal, apparait singulière ou sous forme de paires mobiles grâce aux flagelles amphitriches. Cette bactérie est très répandue dans la rhizosphère, la phyllosphère et exerce une activité antagoniste efficace. Cette dernière joue un rôle important dans le biocontrôle et la promotion de la croissance des plantes par la suppression des maladies causés par les bactéries et les champignons phytopathogènes (Mavrodi *et al.*, 2006; Pierson et Pierson, 2010).

Elle produit plusieurs métabolites tels que la pyoverdine, polyketides 2,4 diacetylphloroglucinol, pyoluteorin et la rhizoxin; les dérivés chlorés de tryptophane, pyrrolnitrine et le cyanure d'hydrogène formé par oxydation de glycine (Howell et Stipanovic1980; Nowak-Thompson *et al.*,1994; Weller, 2007).

Les gènes codant pour ces métabolites ont été identifiés chez la souche *Pseudomonas chlororaphis* subsp *aurantiaca* BL915 (Gross et Loper, 2009 ; Chen *et al.*, 2015).

Une étude génomique sur 10 souches de *Pseudomonas fluorescens* a montré la présence des gènes codant pour des bactériocines diverses comprenant les pyocines S1/2/3/AP41, S5, les colicines M-likeet les lectin-likeLlp (Parret et De Mot, 2002; Barreteau *et al.*, 2009).

### **7.3 *Pseudomonas putida***

*Pseudomonas putida* est une autre espèce parmi les espèces importantes des *Pseudomonas*, qui se trouve dans les différentes niches écologiques telles que le sol, l'eau et particulièrement dans les zones contaminées par les polluants chimiques et organiques. Elle a un type trophique varié et joue un rôle important dans le recyclage des déchets organiques en aérobiose et en conditions micro-aérophiles.

Cette bactérie peut utiliser plus de 80 composés organiques comme sources de carbone et d'énergie (Clarke, 1982 ; Timmis, 2002) (Figure 5).

Plusieurs outils génétiques basés sur les mini-transposons ont été développés afin d'analyser et manipuler cette espèce pour des applications biotechnologiques telles que la production du bioplastique (de Lorenzo et Timmis, 1994).

La souche *Pseudomonas putida* KT2440 a été exploitée pour le développement des applications commerciales et la conception des nouvelles voies cataboliques, la production des vaccins, production des intermédiaires de biosynthèses et la production des biopesticides (Galan *et al.*, 2000; Espinosa-Urgel *et al.*, 2002).

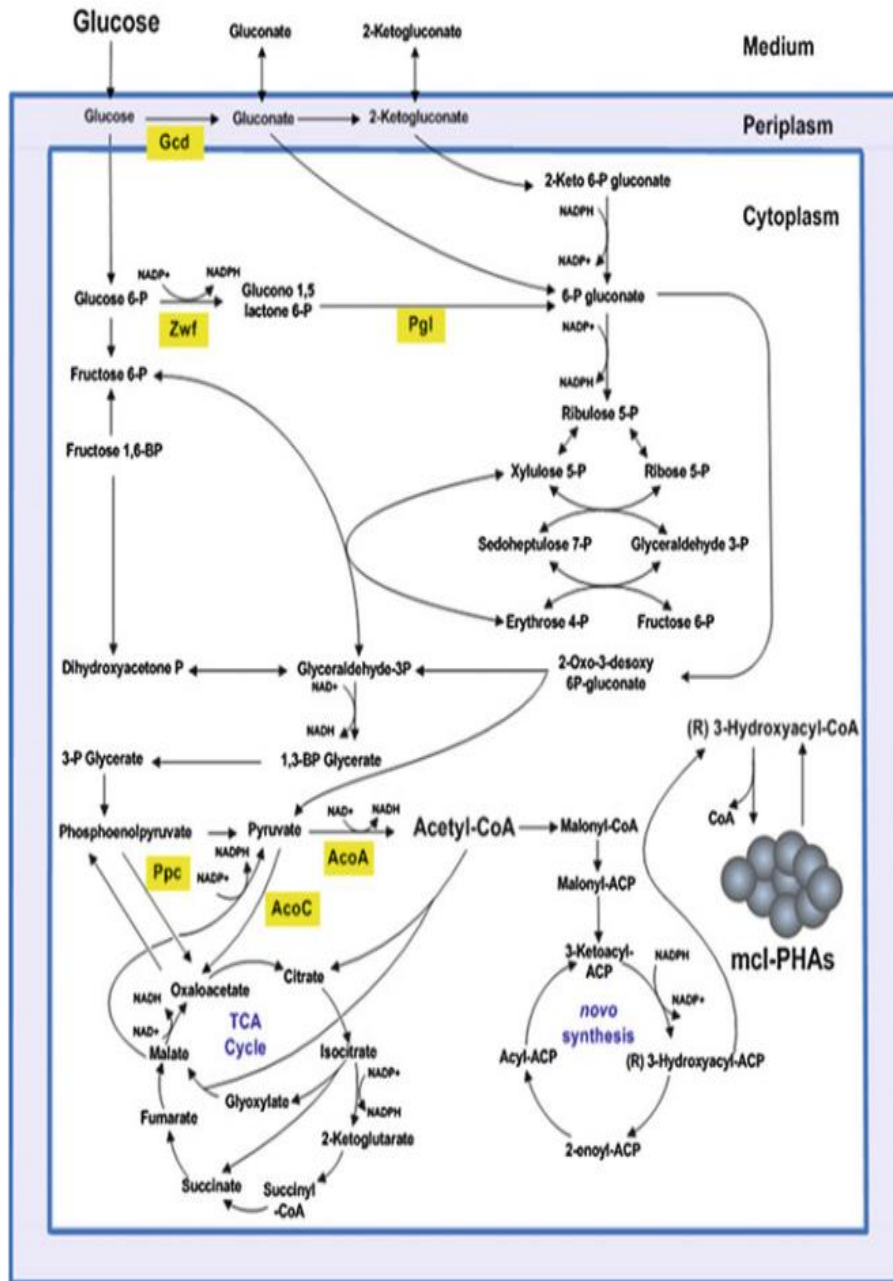


Figure 5: Voies métaboliques centrales chez *P. putida* (Kahlon, 2016)

#### 7.4 *Pseudomonas stutzeri*

*Pseudomonas stutzeri* est définie comme une bactérie de sol avec une importance remarquable dans la biodégradation ainsi qu'en biorémediation.

Cette espèce est saprophyte et non fluorescente à cause de l'absence de production des pigments fluorescents, ce qui permet de différencier cette souche des *Pseudomonas* fluorescents.

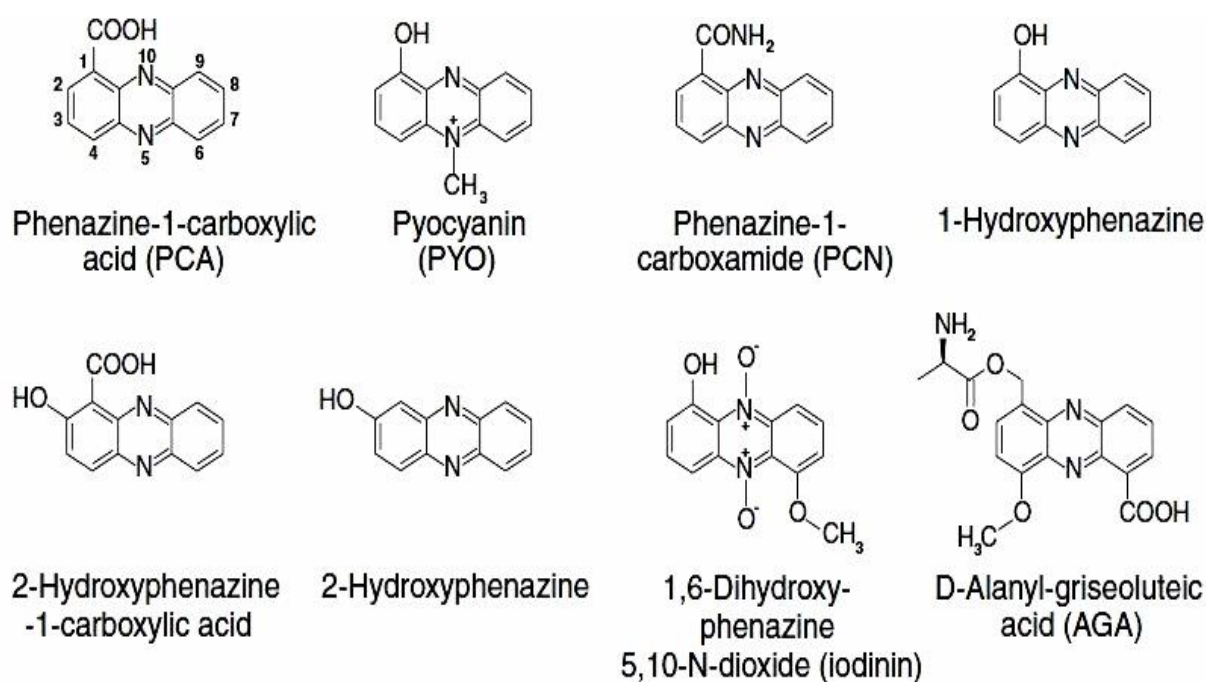
Cette bactérie exhibe des fonctions métaboliques étendues et elle est capable d'utiliser plusieurs sucres et acides aminés, l'acétate et le pyruvate comme sources de carbone et d'énergie. Elle peut coloniser les racines des plantes en raison de la capacité de quelques souches à fixer l'azote (Silby *et al.*, 2011). Beaucoup de souches de cette espèce ont été isolées à partir des cas cliniques (Scotta *et al.*, 2013).

*Chapitre II :*  
*Les phénazines*

---

## 1. Introduction

Les phénazines sont des métabolites secondaires représentant une vaste famille des molécules hétérocycliques azotées intensément colorés. La production de ces molécules est limitée aux bactéries et actinobactéries (*Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bulkholderia*, *Sorangium*, *Nocardia* et *Brevibacterium*). Les phénazines expriment un large spectre d'activité antibiotique sur les bactéries et les champignons ainsi ils jouent un rôle dans la survie, la compétition rhizosphérique et la compétence des bactéries productrices (Smirnov et Kiprianova, 1990 ; Mazzola *et al.*, 1992). Actuellement, plus de 100 phénazines naturelles sont connues et certaines souches bactériennes peuvent sécrétées plusieurs dérivés phénaziniques en même temps (Mavrodi *et al.*, 1998; Delaney *et al.*, 2001; Chin-A-Woeng *et al.*, 2003) (Figure 6).



**Figure 6:** Quelques phénazines d'origine bactérienne (Mavrodi *et al.*, 2006).

Les *Pseudomonas* sont les premiers producteurs de phénazines parmi les bactéries avec presque un tiers de tous les phénazines connus. Ainsi, les *Pseudomonas* fluorescents producteurs de phénazines les plus étudiés sont *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* et *Pseudomonas chlororaphis*. La pyocyanine était la première phénazine d'origine bactérienne remarquée par Fordos en 1850 dans un isolement de *Pseudomonas*.

Le profilage de production de *Pseudomonas aeruginosa* inclut : La phénazine-1-carboxylate (PCA) (Rane *et al.*, 2007a, b ; Mavrodi *et al.*, 2006); la phenazine-1-carboxamide (PCN) (Shanmugaiah *et al.*, 2010), la pyocyanine (PYO) qui a été rapportée uniquement chez *P. aeruginosa* (Ra'oof et Latif, 2010; Kaleli *et al.*, 2006) ; la 1-hydroxyphenazine (1-ohphz) (Kerr *et al.*, 1999), l'aeruginosin A et B (Holliman, 1969; Herbert et Holliman, 1969). Tandis que la phénazine-1-carboxylate (PCA), l'acide 2-Hydroxyphenazine-1-carboxylic de couleur orange et le 2-Hydroxyphenazine de couleur rouge sont rapportés chez *P. chlororaphis*.

La production de plus d'un dérivé phénazinique pour les espèces *P. aeruginosa* et *P. chlororaphis* dépend de la structure génomique et aux conditions environnementales (Mavrodi *et al.*, 2006). *P. fluorescens* est capable de produire seulement la phénazine-1-carboxylate (PCA).

Les phénazines acceptent et cèdent deux électrons, selon les propriétés redox des composés en réaction avec ces molécules qui sont solubles dans les milieu aqueux à raison de micro à milli-molaire (Price-Whelan *et al.*, 2006). Ils peuvent accepter des électrons à partir de NADPH ( $E^\circ = -320$  mV) et les céder à des entités ayant un potentiel redox élevé.

Les principaux accepteurs d'électrons pour les phénazines sont l'oxygène ( $E^{0'} = +816$  mV) et le fer ferrique ( $E^{0'} = +770$  mV) pour la conversion en  $Fe^{2+}$ , Bien que cela varie considérablement avec le pH et la nature de ligands organiques liés (Hernandez *et al.*, 2004). Certaines de ces réactions redox peuvent se produire spontanément *in vitro*.

L'oxydation de la phénazine par dénitrification de *P. aeruginosa* a également été observée uniquement chez les cellules vivantes, ce qui suggère que cette réaction particulière peut être à médiation cellulaire (Price-Whelan, 2009). En outre, des propriétés redox spécifiques varient selon la structure des phénazines.

Ainsi, le 1-hydroxy-5-méthyl-phénazine (pyocyanine) réagit rapidement avec l'oxygène et lentement avec le fer ferrique, tandis que le phénazine-1-carboxylate (PCA) montre une tendance inverse (Wang et Newman, 2008).

L'un des aspects intéressant et important de la physiologie de la phénazine est que ces réactions redox peuvent se produire à la fois dans le milieu intra- et extracellulaire.

## 2. Rôle des phénazines dans l'inhibition des microorganismes pathogènes.

Les Phénazines sont des composés diffusibles, pour lesquelles des études ont permis d'observer que ces derniers peuvent être soit attachés ou absorbés par des champignons pathogènes, ou plus récemment liés à l'ADN extracellulaire (Das *et al.*, 2013).

Les mécanismes de l'activité antifongique des phénazines dépendent du type et de la structure moléculaire; parmi ces mécanismes on peut citer la capacité de générer un stress oxydative, qui résulte suite à une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et/ou une diminution des défenses anti-oxydantes.

La capacité de générer des espèces réactives de l'oxygène est due au noyau aromatique de la molécule de phénazine qui a tendance à échanger des électrons pour former un anion superoxyde  $O_2^-$  et/ou un peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

Les phénazines produites par les bactéries des sols contribuent à l'activité antifongique contre différents champignons pathogènes des plantes (Chin-A-Woeng *et al.*, 2003; Mavrodi *et al.*, 2006; Pierson and Pierson, 2010).

Bien que les agents de bio-contrôle produisent différents types de phénazines en fonction des agents pathogènes cibles et ceci dépend de l'hôte qu'elle colonise et protège. Par exemple *P. fluorescens* 2-79 produit la phénazine-1-carboxylate (PCA) qui est capable d'inhiber le champignon phyto-pathogène *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, responsable de la maladie du blé et certains bactéries pathogènes comme *Actinomyces viscosus* et *Erwinia amylovora* (Gurusiddaiah *et al.*, 1986; Thomashow *et al.*, 1990).

Contrairement au *P. fluorescens* 2-79, le génome de *P. chlororaphis* contient le gène *phzO* placé en aval des gènes essentiels des phénazines qui code pour le mono-oxygénase (Delaney *et al.*, 2001). La présence de ce gène permet de convertir 10-30 % du PCA de couleur jaune en 2OHPCA de couleur orange vif.

*P. aeruginosa* produit trois types de phénazines différents (PCA, 1OHPZ et PYO) capables de tués les nématodes. Les effets de ces phénazines dans des pH variables rend compte de leurs action toxiques vis-à-vis des nématodes (Cezairliyan *et al.*, 2013).

La pyocyanine produite par *P. aeruginosa* LEC1 est responsable de l'inhibition de l'espèce *Septoriatritici* qui cause une maladie de blé et exerce aussi un effet bactéricide contre *Escherichia coli* et *C. albicans*. Le *P. aeruginosa* PAO1 contient deux gènes, le *phzM* qui

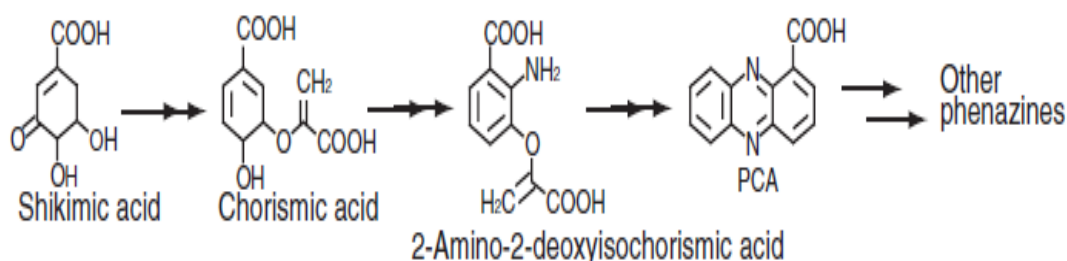
code pour la méthyl-transférase (Parsons *et al.*, 2007) ainsi que le *phzS* codant pour la flavine monooxygénase. Ces deux enzymes sont responsables de la conversion du PCA en PYO (Greenhagen *et al.*, 2008). Tandis que seul le *PhzS* peut faciliter la conversion de PCA en 1-hydroxyphénazine (1OHPZ).

Les conditions environnementales intracellulaires et extracellulaires influent sur la quantité de phénazine produite. En effet, cette quantité produite par *P. fluorescens* et *P. chlororaphis* est liée à la nature du milieu de croissance ainsi que les conditions de sol telle que le pH, la température, la source de carbone, la source d'azote, la concentration d'oxygène, la nature des minéraux et d'autres composés biologiquement actifs (Mavrodi *et al.*, 2006 ; Parc *et al.*, 2011). Cependant, le changement dans la quantité des dérivés de phénazines produites altèrent l'inhibition des pathogènes cibles (Maddula *et al.*, 2006).

### 3. Biosynthèse des phénazines

La biosynthèse des phénazines chez les différentes espèces bactériennes est liée à la souche productrice et aux gènes de la biosynthèse. Les voies biosynthétiques des phénazines débutent avec l'acide shikimique qui donnera le chorismate, transformé en acide 2,3-dihydro-3-oxo anthranillique. Ce dernier sera converti en précurseur commun le phénazine-1-carboxylate (PCA) (Mentel *et al.*, 2009; Seeger *et al.*, 2011).

Une variété des groupes fonctionnels peuvent être ajoutés à la structure du noyau de phénazine afin de produire une gamme avec différentes couleurs et propriétés chimiques diverses telle que la pyocyanine, la phénazine-1-carboxamide (PCN) et l'hydroxyphénazine (OH-PCA) (Mavrodi *et al.*, 2006; Pierson and Pierson, 2010) (Figure 7).



**Figure 7:** Biosynthèse des phénazines (Price-Whelan *et al.*, 2006).

L'opéron impliqué dans la synthèse des phénazines est conservé entre *P. fluorescens* 2-79, *P. chlororaphis* PCL1391, *P. aeruginosa* PA01, *Pseudomonas* sp. CMR12a et *P. aureofaciens* 30-84. Cet opéron contient sept gènes : *phz A, B, C, D, E, F* et *G* avec un pourcentage d'homologie de l'ordre de 70 à 95 % entre ces différentes espèces. La structure d'opéron est très variable chez les autres Proteobacteria et dans l'Actinobacteria (Mavrodi *et al.*, 2010).

De plus, chez *P. aeruginosa* PA01, le génome contient 2 opérons : *phz A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1* et *phz A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2* distants de 2.6 Mb et dont la séquence est identique à 98.3 %. Chacun de ces deux opérons est suffisant pour la production de PCA (Mavrodi *et al.*, 2001) (Figure 8).

Les différentes espèces de *Pseudomonas* partagent donc des gènes de production de phénazine assez semblables mais elle se démarque par l'éventail des phénazines qu'elles produisent.

En effet pour certaines espèces les dérivés du PCA sont obtenus par l'intervention de d'autres enzymes, telle que l'asparagine synthétase responsable de la production de phénazine-1-carboxamide (PCN). Ce dernier est codé par le gène *phz H*, situé en aval de *phz G* chez *P. chlororaphis*. C'est le cas aussi pour *P. aureofaciens* qui contient le gène *phz O* permettant la conversion du PCA en acide 2-hydroxyphénazine (2-OH-PCA) (Delaney *et al.*, 2001).

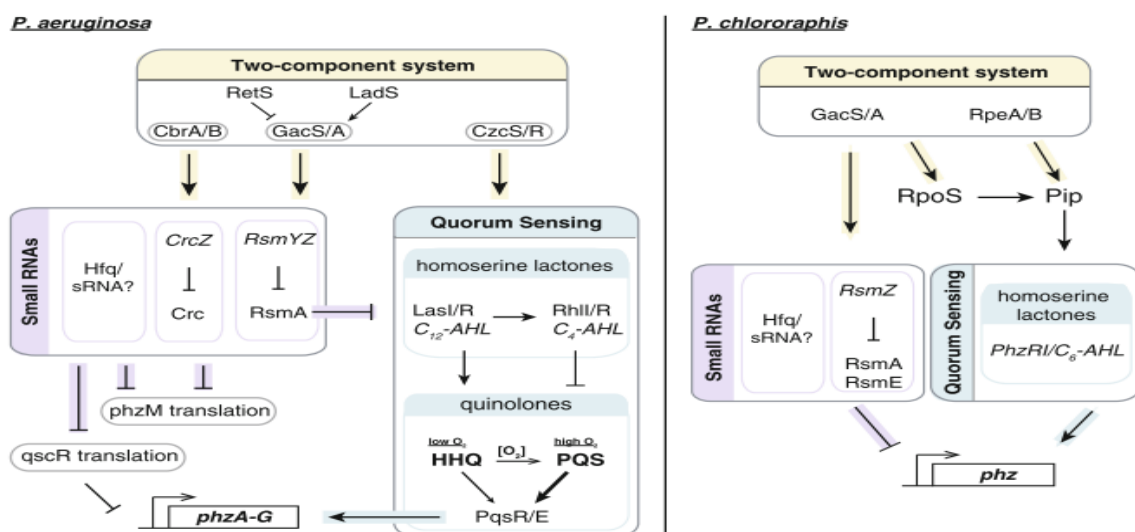
Tandis que pour *P. aeruginosa* PA01 deux autres gènes entrent dans la biosynthèse de la pyocyanin. Le *phz M* qui se trouve en amont de l'opéron *phz A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1* à 695 pb code pour une méthyle-transférase, ce dernier prend en charge la première réaction qui est suivie par une action monooxygénase codé par l'enzyme *PhzS*.



#### 4.1 Le système de deux composants

Le système de deux composants est le premier mécanisme qui joue un rôle critique dans la régulation des phénazines chez les *Pseudomonas* (van den Broek *et al.*, 2003; De Maeyer *et al.*, 2011). Il se situe conceptuellement aux premières hiérarchies de signalisation, car il a le potentiel de détecter directement les signaux environnementaux. Ce système permet de moduler les activités des mécanismes de régulations en aval ou contrôler directement l'expression des gènes (Figure 9).

Le système comporte une protéine capteuse liée à la membrane GacS (sensor kinase) et une protéine cytoplasmique régulatrice. L'activation de la protéine capteuse par des petites molécules ou des signaux environnementaux mène à la phosphorylation, et le groupement phosphate transféré vers la protéine régulatrice stimule la production des petits ARN régulateurs. Ces derniers libèrent les sites de liaisons au ribosome des ARNm responsables de la production des phénazines, et permettent leur traduction (Bourret et Silversmith, 2010).



**Figure 9:** Les systèmes de régulation de la production de phénazines (quorum sensing et les petits ARN régulateurs) chez *P. aeruginosa* et *P. chlororaphis* (Sakhtah, 2013).

#### 4.2 Le système de détection du quorum sensing

Les phénazines dans les cultures discontinues en batch sont produits après la phase exponentielle, ce qui permet l'accumulation des phénazines dans la phase stationnaire. Ce phénomène de production est dû à l'expression du gène de phz par quorum sensing. Dans le cas de ce dernier, les bactéries sécrètent de petites molécules ou des signaux peptidiques dans

l'environnement qui peuvent ensuite affecter l'expression génique de la production des phénazines. Après l'accumulation d'une certaine concentration minimale et diminution du taux de croissance de la culture, l'effet régulateur de ces molécules devient actif.

Diverses structures moléculaires sont impliquées dans la régulation, mais les N-acyl-homosérines lactones (AHL) et les dérivés quinolone sont les plus pertinents dans l'expression du gène de *phz*.

### **4.3 La régulation post-transcriptionnelle**

Plusieurs mécanismes de régulation ont été identifiés, qui contrôlent ou devraient contrôler, la production de phénazines chez les *Pseudomonas*, après la transcription. Ces divers mécanismes comprennent la liaison d'ARNm avec des protéines et/ou l'appariement des bases d'ARNm avec des séquences d'ARN de l'extrémité 5', qui peuvent affecter la traduction (Sonnleitner et Haas, 2011). Des petits RNAs supplémentaires peuvent moduler la liaison des protéines et l'action régulatrice des ARNs en ARNm.

L'expression de ces protéines et les ARN régulateurs est souvent contrôlée par le système de deux composants ou le quorum sensing. Ils peuvent indirectement contrôler l'expression du gène de *phz* en modulant des étapes antérieures dans la cascade régulatrice, ou dans la traduction de l'ARNm du *phz*.

## **5. Les signaux et les conditions environnementaux affectant la production**

Plusieurs études ont été focalisées sur la dépendance de la production des phénazines aux conditions et signaux environnementaux, qui affectent la régulation de ce processus. Les effets des paramètres environnementaux tels que la température, le pH, la salinité et la disponibilité en oxygène ont été évalués.

Ils ont également examiné comment la production des phénazines est influencée par la disponibilité des sources de carbone, d'azote, phosphate, sulfate, fer, et magnésium. Ils ont conclu que les variables environnementales peuvent affecter la production des phénazines en altérant directement ou indirectement l'expression des protéines de *Phz*, ou ils peuvent modifier la disponibilité des substrats et ainsi, le flux à travers les principales voies métaboliques de la biosynthèse (van Rij *et al.*, 2004; Farrow and Pesci, 2007).

Tous les *Pseudomonas* producteurs de phénazines présentant un système de contrôle de la biosynthèse via la détection du quorum. La régulation par ce dernier permet aux cellules de combiner entre les gènes suite à la disponibilité des signaux moléculaires de type N-acyl-homosérines lactones, qui sont influencés par un nombre des signaux iso-géniques et non iso-géniques. Ainsi, la diffusion des signaux et la présence d'autres facteurs peuvent affecter la disponibilité des signaux ou la réponse régulatrice de la cellule.

## 6. Structure, biosynthèse et activité de la pyocyanine

La pyocyanine est un métabolite secondaire toxique, pigmenté, fortement diffusible et responsable de la couleur bleue verdâtre de *Pseudomonas aeruginosa*. Ce métabolite peut exister sous la forme oxydée ou réduite, ce dernier est un radical libre instable qui réagit rapidement avec l'oxygène moléculaire.

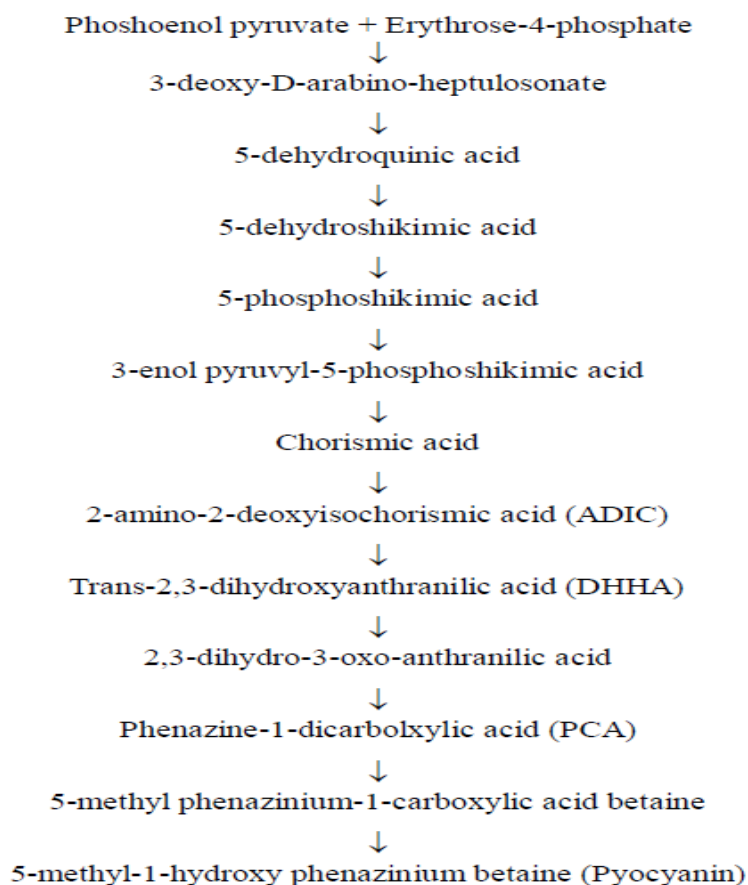
Cette auto-oxydation conduit à la formation de superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou de radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) en présence des catalyseurs métalliques (Denning *et al.*, 2003). Chimiquement, la pyocyanine est la N-méthyl-1-hydroxyphénazine. Elle est fortement soluble dans le chloroforme et dans les solvants organiques mais peu soluble dans l'eau.

Cette molécule présente la propriété de changer de couleur en solution aqueuse selon le pH et l'état d'oxydation. La PYO oxydée est rouge en milieu acide (pH<4,9), bleue en milieu neutre et alcalin mais elle est incolore dans le cas de la forme réduite (Barakat, 2012).

Cette molécule est formée à partir de la phénazine-1-carboxylate par un mécanisme de décarboxylation hydroxylante et la bétaine5-methylphenazine-1- carboxylate est le précurseur dans cette réaction (Figure 10).

La pyocyanine possède une propriété de zwitterion et peut donc facilement pénétrer dans la membrane cytoplasmique de la cellule hôte. Le cycle redox implique la pyocyanine et le NADH de la cellule hôte créant un environnement hautement oxydant. Ceci provoque une augmentation des niveaux de calcium cytosolique, de la respiration cellulaire et de l'expression d'ATPase dans la membrane.

En plus de son rôle dans l'activité antimicrobienne et antifongique, la pyocyanine est un antagoniste de l'oxyde nitrique dans diverses préparations pharmacologiques rapportés sur les cellules eucaryotes et procaryotes (Mashburn-warren *et al.*, 1990; Vukomanovic *et al.*, 1997).



**Figure 10:** La voie de la biosynthèse de la pyocyanine (Parsons *et al.*, 2007)

## 7. La dégradation et la détoxification de la pyocyanine dans l'environnement

La dégradation de la pyocyanine résiduelle dans l'environnement est un facteur important à connaître car le composé est utilisé par plusieurs applications biotechnologiques. La biodégradation de cette molécule est favorisée par la présence des cycles phénoliques qui sont d'excellents substrats pour les peroxydases.

Certains microorganismes du sol consomment la phénazine carboxylate, précurseur de la pyocyanine, comme seule source de carbone et d'azote et permet sa dégradation en 40 heures (Yang *et al.*, 2007).

L'oxydation de la pyocyanine rend la molécule inactive et devient non toxique néanmoins cette réaction est réversible (Reszka *et al.*, 2004). La photosensibilisation de la pyocyanine est une méthode potentiellement utile dans l'inactivation, et éventuellement pour la détoxification. L'efficacité de cette méthode a été montrée par l'étude de l'oxydation photochimique qui permet la libération des produits générateurs des radicaux libres faibles.

### 8. Diacéthylephloroglucinol (DAPG)

C'est un métabolite secondaire phénolique produit par des plantes, algues et bactéries, décrit pour son activité antimicrobienne, antivirale, antihelminthique, phytotoxique, cytotoxique et antioxydante (Bender and Rangaswamy, 1999 ; Dwivedi and Johri, 2003).

Le groupe de gènes responsable de la formation du DAPG a été identifié et caractérisé chez la souche Q2-87 (Bangera *et al.*, 1996, 1999). Chez *P. fluorescens* Q2-87, six gènes désignés *phlA*, *phlB*, *phlC*, *phlD*, *phlE* et *phlF*, faisant partie de la voie métabolique, ont été identifiés sur un fragment génomique de 7.2 kb. L'enzyme *PhlD* est essentielle pour la synthèse du MAPG. En effet, en l'absence de cette enzyme, les cellules étaient capables de convertir le MAPG exogène en DAPG mais ne pouvaient produire d'elles-mêmes aucune des deux molécules (Bangera and Thomashow, 1999).

L'isolement de *Pseudomonas fluorescens* à partir de plusieurs régions géographiques a fourni plusieurs groupes différents de producteurs de DAPG. Premièrement, sur la simple base de la production d'antibiotiques, on remarque deux groupes distincts. D'un côté, ceux produisant le DAPG, le cyanure d'hydrogène (HCN), la pyolutheorine (PLT) et, dans certains cas, la pyrrolnitrine (PYR) ; et de l'autre, ceux ne produisant que le DAPG et le HCN (Mavrodi *et al.*, 2001, Keel *et al.*, 1996).

Cette variabilité a été mise en évidence par l'étude d'une collection de 45 souches DAPG+ isolées des sols suppressifs d'Italie, de Suisse, du Ghana et des États-Unis (Keel *et al.*, 1996). Dans une autre étude utilisant 138 souches isolées des rhizosphères de blé des États-Unis et des Pays-Bas, des résultats similaires furent obtenus (Landa *et al.*, 2002). La diversité génétique des producteurs de DAPG est plus grande dans le sol rhizosphérique qu'à la surface même des racines.

Cette diversité génétique au sein des différentes souches de producteurs de DAPG peut être exploitée afin de trouver des souches ayant un pouvoir de production d'antibiotiques

élevé. Malgré l'abondance de la littérature concernant l'implication du DAPG dans le contrôle des pathogènes telluriques et sur la diversité génétique au sein des producteurs de DAPG, peu d'attention a été portée aux réactions des agents pathogènes face à cet antibiotique.

### 9. Pyrrolnitrine (PRN)

La pyrrolnitrine (3-chloro-4-(2'-nitro-3'-chlorophenyl)-pyrrole) est un autre antibiotique isolé à partir des *Pseudomonas*. Ce métabolite est très actif, utilisé dans le domaine médical pour le traitement des mycoses cutanées. Autre dérivés de la pyrrolnitrine ont été développé comme fongicide agricole (fludoixonil) (Mc Spadden Gardener *et al.*, 2002). L'antibiotique fonctionne comme inhibiteur de la chaîne respiratoire chez les Basidiomycètes, les Deutéromycètes et les Ascomycètes.

Elle est synthétisé via l'action de quatre gènes, *prnA*, *prnB*, *prnC* et *prnD* qui codent pour quatre enzymes responsables des quatre étapes biochimiques menant à la synthèse du composé à partir du tryptophane (Hammer *et al.*, 1999, Kirner *et al.*, 1998). L'étude du gène *prnD* chez *P. fluorescens* a permis de déceler une variabilité dans la séquence de ce gène entre les différentes souches de cette espèce (de Souza *et al.*, 2003).

### 10. Pyolutéorine (PLT)

Cette molécule est avant tout un antibiotique produit par plusieurs souches de *P. fluorescens* et exceptionnellement de *P. aeruginosa*.

Elle est composée d'un anneau résocriinol synthétisé par la voie de polycétide, relié à une partie pyrrole bichlorée (Nowak-Thompson *et al.*, 1997, 1999). Son rôle dans la biocide d'agents phyto-pathogènes a été étudié surtout chez les souches de *P. fluorescens* CHA0 et Pf-5 qui produisent également le DAPG et la pyrrolnitrine.

La diversité génomique retrouvée chez les producteurs de DAPG ne semble pas être présente chez les producteurs de PLT. Une analyse RFLP d'un fragment du gène *pltC* avec 8 endonucléases différentes n'a révélée aucun polymorphisme pour ce gène (de Souza *et al.*, 2003). Cela peut s'expliquer par le fait que la production de PLT semble être limitée à un groupe restreint de *Pseudomonas* qui montrent une très forte similitude génomique (de Souza *et al.*, 2003).

En plus de son rôle antibiotique, la molécule agit comme autoinducteur de sa propre production et est impliquée dans la signalisation inter et intra espèces dans la rhizosphère.

### **11. Les rhamnolipides**

Les rhamnolipides possèdent la caractéristique d'être tensio-actifs, ce qui suscite un intérêt de la part du milieu industriel pour leur pouvoir détergent (Soberon *et al.*, 2005).

*P. fluorescens* produit également des rhamnolipides possédant de nombreux avantages sur les surfactants synthétiques, tels que leur faible toxicité, leur capacité à se biodégrader, leur activité sélective, leur activité modulable en fonction de la température, du pH et de la salinité (Karsa *et al.*, 1999 ; Banat., 2000).

### **12. Autres antibiotiques**

D'autres composés secondaires ainsi que certaines enzymes extracellulaires produits par les *Pseudomonas* peuvent avoir un effet antibiotique. Par exemples, la production de viscosianmide qui est couplée au métabolisme primaire et à la phase de prolifération cellulaire, par contre, l'amphisine est produite lors de la phase stationnaire et le gène de l'amphisine synthétase (*amsY*) serait contrôlé par le système GacA/GacS (Koch *et al.*, 2002).

La mupirocine, un autre antibiotique utilisé de manière topique pour les traitements contre *Staphylococcus aureus*, est constitué d'un mélange de plusieurs acides pseudominiques.

Ces composés sont produits par plusieurs souches de *P. fluorescens*. La biosynthèse de la mupirocine implique une grande région du génome, c'est-à-dire plus de 60 KB, serait régulée par un système de « quorum sensing ». Cette région contient les gènes de synthèse *mupA-X*, *mmpA-F* et *macpA-E*, où *mupM* confère la résistance à l'antibiotique.

*Chapitre III :*  
*Les Pyoverdines*

---

## 1. Généralités :

Les pyoverdines appartiennent à la famille des sidérophores fluorescents, caractérisant les *Pseudomonas* fluorescents, et qui est responsable de la couleur verte de ces bactéries. La structure de cette molécule est composée d'un chromophore responsable de la couleur et la fluorescence typique, une chaîne latérale acyle et une chaîne peptidique variable.

La pyoverdine a une affinité élevée pour les ions fer ferriques, qui représente une exigence fondamentale pour la croissance des *Pseudomonas*, et la production abondante de cette molécule est stimulée dans les milieux carencés en fer (Euzéby, 2005).

La pyoverdine synthétisée par *P. aeruginosa* est constituée du chromophore quinoléique lié à un octa-peptide, partiellement cyclisé [Ser-Arg-Ser-FoOHOrn-c(Lys-FoOHOrn-Thr-Thr)] (Demange *et al.*, 1990) et, en position C3, à une chaîne variable (acide succinique, succinamide ou  $\alpha$ -cétoglutarique).

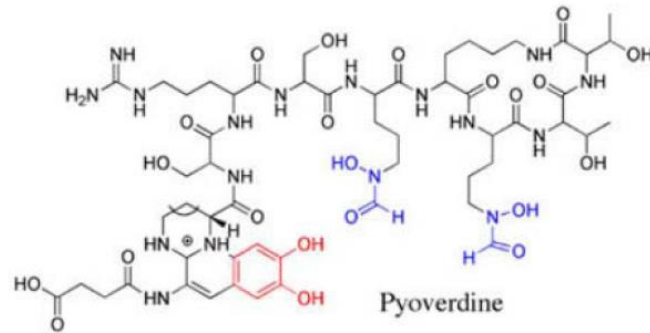
Ainsi, trois isoformes de la pyoverdine peuvent être produites par *P. aeruginosa*. La forme majoritaire, de 1333 Da, comporte une chaîne latérale dérivant de l'acide succinique (Briskot *et al.*, 1989). Les deux groupements hydroxamates des hydroxyornitines et le cathéchol du chromophore sont impliqués dans la chélation du fer ferrique (Figure 11). La chélation du fer se fait ainsi avec une stoechiométrie Pvd:Fe de 1:1 et une constante d'association de  $10^{32} \text{ M}^{-1}$  (Albrecht-Gary *et al.*, 1994).

La structure des pyoverdines (Pvds) chez les *Pseudomonas* (Figure 11) varie d'une espèce à une autre et même entre souches ; telle que *Pseudomonas aeruginosa* qui est capable de produire trois types de Pvds : PvdI, PvdII, Pvd III, ce qui permet d'utiliser la caractérisation iso-électrophorétique des pyoverdines pour la classification des *Pseudomonas*.

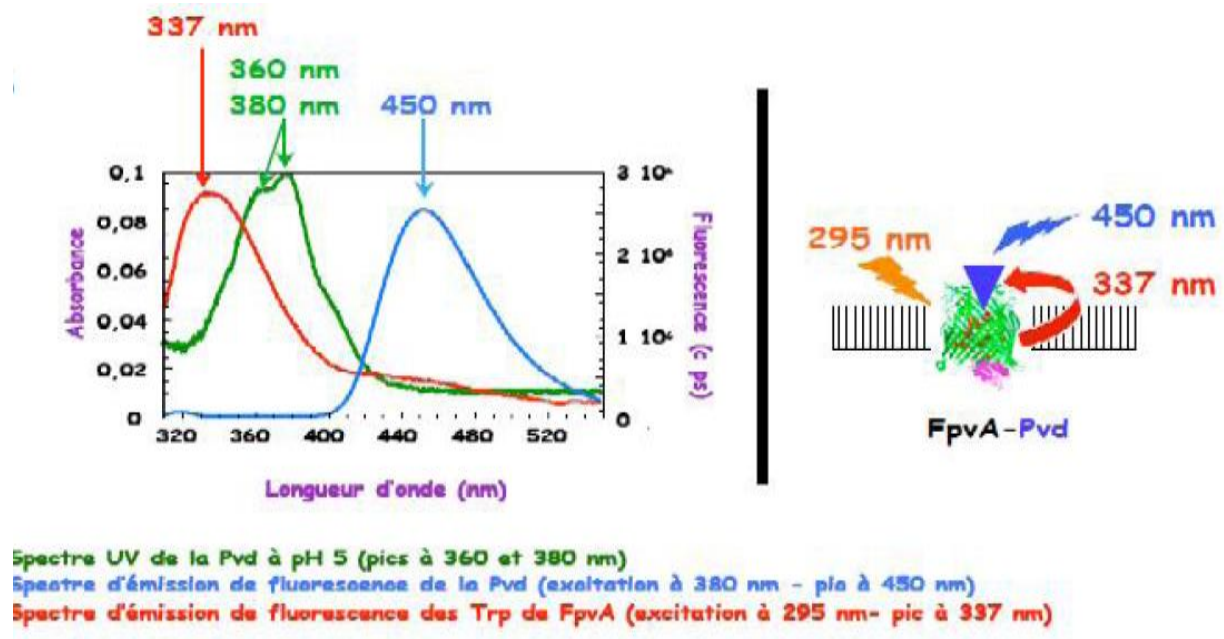
La fluorescence de la pyoverdine dépend de l'absence ou la présence du fer, pour cela deux cas sont envisagés ; une forme vide fluorescente et une forme complexe non fluorescente, cette dernière est le résultat de la chélation du fer par cette molécule. Cette dernière peut également capter d'autres métaux ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ) avec une affinité moins importante, ce qui peut moduler les propriétés spectrales et de fluorescence (Braud *et al.*, 2009).

Les spectres UV et les pics d'absorption de la pyoverdine dépend du pH du milieu. Dans un milieu acide à pH égal à 5, la pyoverdine donne deux pics d'absorption à 360 nm et 380 nm. Par contre dans un milieu alcalin à pH égal à 8, elle montre un pic d'absorption à 400

nm. L'excitation de la Pvd à 380 nm permet d'émettre une fluorescence de longueur d'onde de 450 nm (Figure 12).



**Figure 11:** Structure de la pyoverdine de *P. aeruginosa* (Schalk & Guillon, 2013a)  
Les groupements colorés sont impliqués dans la fixation du fer, en rouge le groupe catécholate et en bleu les groupes de la chaîne peptidique.



**Figure 12:** Caractéristiques spectrales de la pyoverdine (Rehme, 2008).

Aujourd'hui plus de 60 analogues de la Pvd ont été identifiés (Meyer *et al.*, 2008), elles sont toutes constituées de 3 parties :

- un chromophore dérivé de la quinoline (2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline) conservé chez l'ensemble des Pvd, responsable de la couleur et de la fluorescence de la molécule (Meyer, 2000) ;

- une chaîne latérale en position C3 du chromophore, constituée dans la plupart des cas d'un diacide carboxylique ou de son amide correspondante ;
- une chaîne peptidique variable linéaire composée de 8 à 12 acides aminés, en position C1 du chromophore. Cette chaîne peptidique peut être cyclique ou partiellement cyclique (Visca *et al.*, 2007).

Actuellement, dans le cas de *P. aeruginosa*, 4 groupes de pyoverdines ont été identifiés qui diffèrent au niveau de leur chaîne peptidique. A chacune de ces Pvd est associé un TBDT (TonB-Dependent Transporter) spécifique (Cornelis *et al.*, 1989).

## 2. Biosynthèse et sécrétion de la pyoverdine

L'ensemble des gènes impliqués dans la biosynthèse, la sécrétion de la pyoverdine et l'acquisition du fer par la pyoverdine est localisé sur le « locus Pvd ». La Pvd est synthétisée par un système impliquant des peptides synthétases non ribosomiques (NRPS).

Cette biosynthèse débute dans le cytoplasme et se termine dans le périplasma. Elle implique la formation d'un précurseur non fluorescent par les NRPS : PvdL, PvdI, PvdJ et PvdD.

Le premier module de l'enzyme PvdL couple une chaîne des acides gras à un résidu L-Glu du précurseur de la Pvd (Gulick and Drake, 2011 ; Hannauer *et al.*, 2012b ; Schalk and Guillon, 2012b).

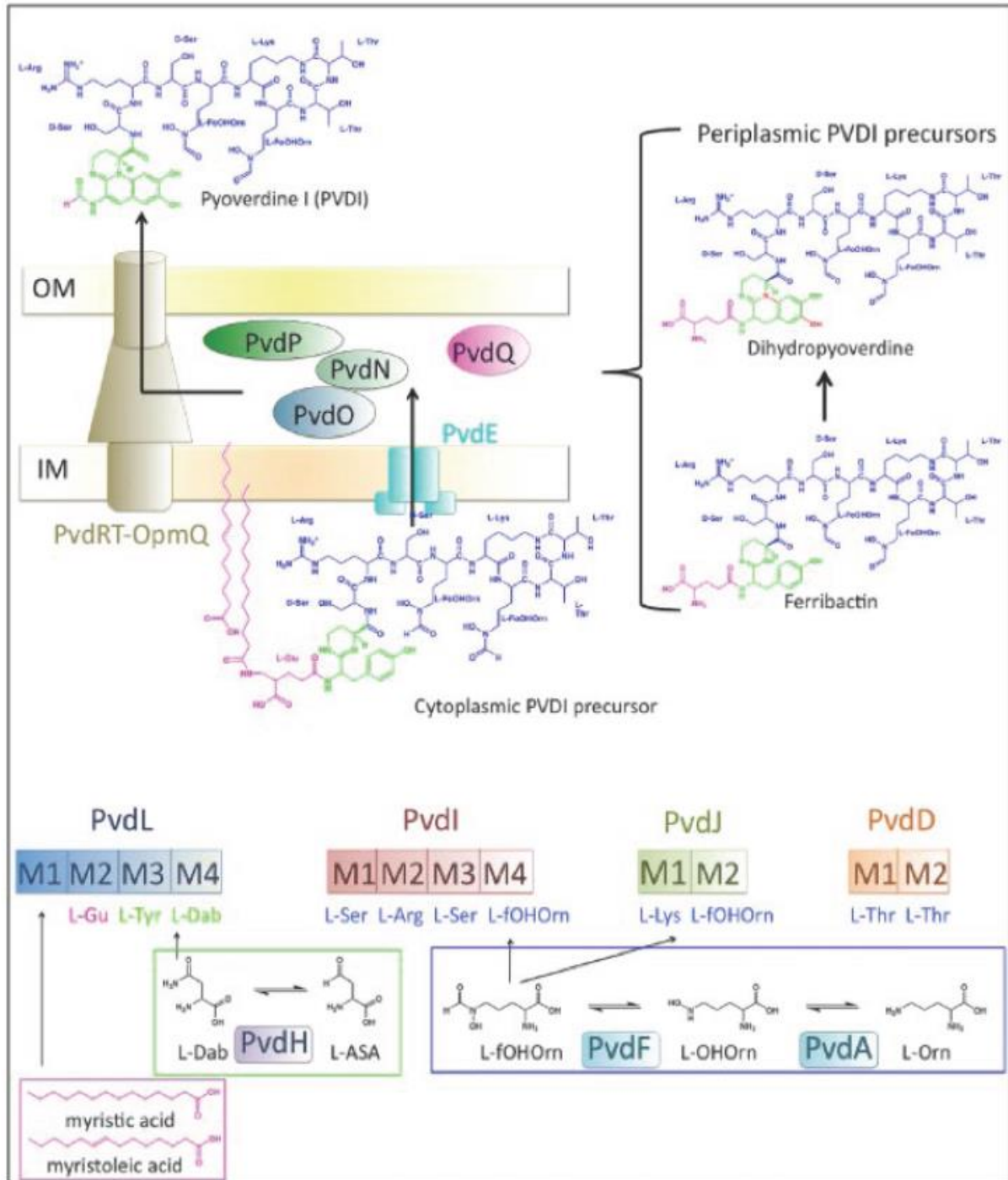
Cette chaîne des acides gras correspond à un acide myristique ou myristoléique qui permet l'ancrage du précurseur au niveau de la membrane cytoplasmique. A ces NRPS s'ajoutent des enzymes auxiliaires qui catalysent des réactions intermédiaires : PvdH, PvdA et PvdF (Figures 13, 14a) (Visca *et al.*, 2007 ; Schalk and Guillon, 2012b).

Le précurseur de la Pvd contenant la chaîne des acides gras passe dans le périplasma via un transporteur ABC, PvdE. La maturation du précurseur a lieu au niveau du périplasma et la formation du chromophore de la Pvd implique les enzymes PvdNOPQ, où PvdQ retire la chaîne des acides gras du précurseur (Figure 14b) (Visca *et al.*, 2007 ; Yeterian *et al.*, 2010, Gulick and Drake, 2011 ; Schalk and Guillon, 2012b).

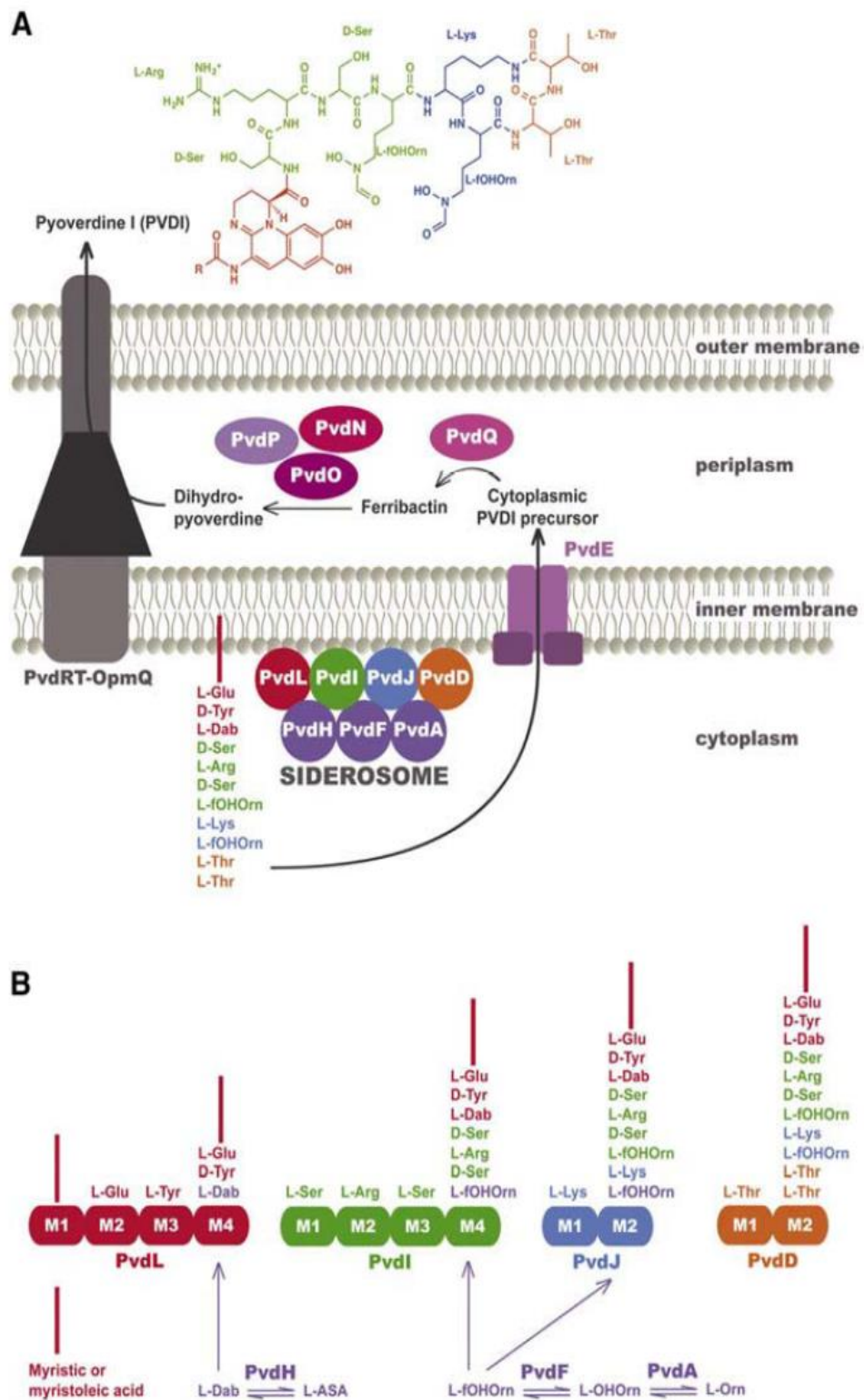
La pyoverdine synthétisée est alors sécrétée dans le milieu extracellulaire grâce à une pompe à efflux PvdRT-OpmQ (Hannauer *et al.*, 2010b).

La figure 13 montre la voie de biosynthèse de la Pvd par les NRPS et les enzymes PvdH, PvdF et PvdA, au niveau du cytoplasme. Chaque NRPS est découpé en plusieurs sous-

domaines M1 à M4 (catalysant des réactions d'adénylation, de ligation, de thiolation ou d'épimérisation). Le précurseur non fluorescent passe dans le compartiment périplasmique grâce au transporteur ABC, PvdE. La maturation du chromophore a lieu au niveau du périplasm, grâce aux enzymes PvdNOPQ. La pyoverdine néosynthétisée est ensuite excrétée dans le milieu extracellulaire via la pompe à efflux PvdRT-OpmQ.



**Figure 13:** Schéma de la voie de biosynthèse de la pyoverdine chez *P. aeruginosa* (Schalk and Guillon, 2012b).



**Figure 14** : Synthèse de la pyoverdine I de *P. aeruginosa* (Schalk and Guillon, 2013 ; Gasser *et al.*, 2015).

### 3. Les récepteurs et l'assimilation du fer

Une fois secrétée dans le milieu extracellulaire, la pyoverdine chélate le fer ferrique présent dans le sol, puis le complexe ferri-pyoverdine est importé dans la bactérie afin d'internaliser le fer.

Le transporteur spécifique de la ferri-pyoverdine I localisé à la membrane externe, FpvAI, est le mieux caractérisé (Cornelis, 2010). Ce transporteur de ferri-pyoverdine de type I est codé par le gène *fpvA*.

Le transporteur FpvAI est composé de trois domaines :

- un tonneau  $\beta$ , composé de 600 résidus amino-acides divisés en 22 feuilletts  $\beta$  avec 11 boucles extracellulaires,
- un domaine N-terminal globulaire, appelé bouchon, localisé à l'intérieur du pore formé par le tonneau  $\beta$ . Ce domaine est composé d'un feuillet de 4 brins  $\beta$  de 150 résidus,
- une boîte TonB correspondant à une séquence de résidus amino-acides situés dans le domaine N-terminal du bouchon, assurant la signalisation via l'interaction entre les récepteurs des sidérophores et la partie périplasmique de la protéine TonB

L'import de la ferri-pyoverdine semble se réaliser via un mécanisme à « deux portes ». La première porte est une boucle extracellulaire qui se referme sur le site de fixation lorsque la ferri-pyoverdine est en place. La seconde est matérialisée par le bouchon N-terminal : celui-ci ferme le canal formé par le tonneau  $\beta$  et empêche l'accès au périplasma en absence de ferri-pyoverdine (Schalk, 2008).

L'ouverture du canal nécessite un apport d'énergie impliquant la protéine périplasmique TonB et les protéines ExbB et ExbD (Schalk, 2008).

### 4. Régulation du système pyoverdine

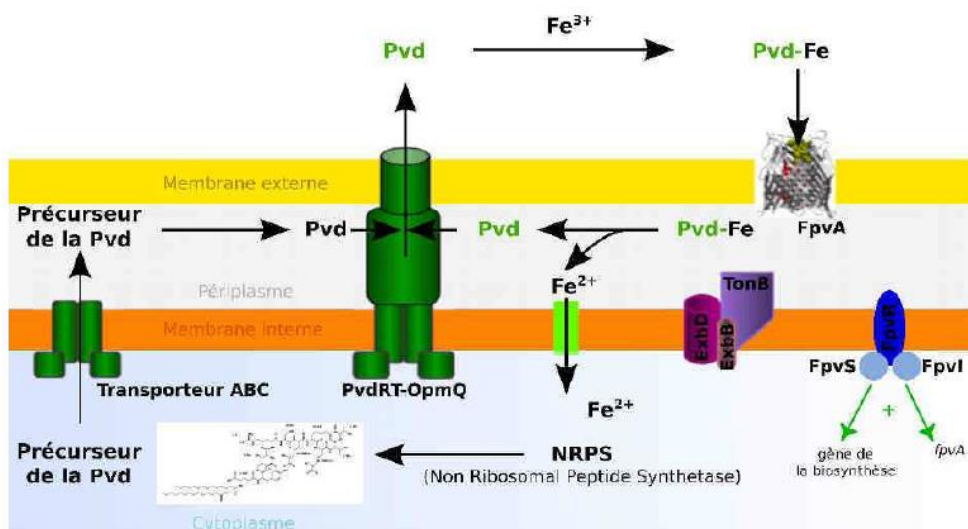
L'expression de l'ensemble des protéines impliquées dans la biosynthèse de la pyoverdine, son export et l'acquisition du fer par ce sidérophore est régulée par un couple de facteurs sigma, anti-sigma (Visca *et al.*, 2002).

Le complexe pyoverdine-fer, présent à faible concentration, joue le rôle d'activateur de cette cascade de signalisation en se liant au transporteur FpvA, à la surface de la membrane

externe. Celle-ci active ensuite le couple de facteurs sigma (FpvI et FpvS) / anti-sigma (FpvR) qui stimule la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse de la pyoverdine et dans l'acquisition du fer par le sidérophore (Figure15).

En présence de fer, l'expression de ce couple de facteurs est, quant à elle, réprimée par la présence d'un régulateur cytoplasmique Fur (Ferric Uptake Repressor). En effet, lorsque le fer ferreux atteint une certaine concentration dans le cytoplasme bactérien, il se lie à Fur qui inhibe alors la transcription des gènes de la voie pyoverdine (Hantke, 2001).

La synthèse de la Pvd est initiée dans le cytoplasme par la synthèse d'un précurseur grâce aux NRPS. Ce précurseur est ensuite sécrété à travers la membrane interne par un transporteur ABC. Il y a maturation du précurseur dans le périplasma, conduisant à la sécrétion de la pyoverdine. Cette dernière est ensuite sécrétée à travers la membrane externe par une pompe à efflux. Libérée dans le milieu extracellulaire, la Pvd chélate le fer ferrique, formant un complexe Pvd-Fe. Ce complexe est alors reconnu par un transporteur de membrane externe spécifique, FpvA. Le passage du complexe à travers ce transporteur vers le périplasma nécessite de l'énergie qui est fournie par le complexe TonB-ExbB-ExbD. Dans le périplasma, le complexe Pvd-Fe est dissocié par réduction du  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$ . Le fer est ensuite transporté vers le cytoplasme, tandis que la Pvd est recyclée dans le milieu extracellulaire par l'intermédiaire de la pompe à efflux PvdRT-OpmQ. Le complexe pyoverdine-fer, présent à faibles concentrations, joue le rôle d'activateur de cette cascade de signalisation en se liant au transporteur FpvA. Celle-ci active ensuite le couple de facteurs sigma (FpvI et FpvS) / anti-sigma (FpvR).



**Figure 15 :** La voie pyoverdine chez *P. aeruginosa* (Hantke, 2001).

# *Matériels et Méthodes*

---

## II- Matériels et Méthodes:

### 1. Objectifs :

Le présent travail contribue à la valorisation des métabolites des *Pseudomonas*, issus d'un biotope salin, pour leur utilisation comme agents antimicrobiens et antioxydants. Afin de réaliser cette étude, les objectifs suivants ont été fixés :

- L'isolement et caractérisation phénotypique et moléculaire des *Pseudomonas*.
- Production et extraction des métabolites secondaires
- Caractérisation des métabolites par les techniques analytiques (CCM, spectrophotométrie, HPLC, FTIR)
- L'évaluation des activités biologiques des métabolites secondaires (activité antimicrobienne et pouvoir antioxydant).
- Détection génique des métabolites secondaires à pouvoir antibiotiques.

### 2. Prélèvement des échantillons

Dans le but d'obtenir des isolats de *Pseudomonas* des sols salins, un échantillonnage a été effectué au niveau de la zone de la plaine de Mina (Wilaya de Relizane). Dans ce contexte les échantillons sont prélevés sur trois sites distinctes, choisis selon la carte de salinité à l'aide d'un GPS (N 35° 55' 24'' E 0° 36' 59'' N 35° 43' 54'' E 0° 29' 17'' et N 35° 57' 09'' E 0° 42' 32'').

Chaque échantillon de sol est recueilli dans un récipient stérile, ensuite transporté au laboratoire en vue de son analyse.

### 3. Mesure du pH et de la conductivité électrique (CE)

Le pH et la conductivité électrique sont des paramètres importants à connaître pour la classification des sols. Ils sont nécessaires pour déterminer les influences sur la communauté microbienne.

#### 3.1 Mesure du pH

Le pH des surnageant des sols est mesuré à l'aide d'un pH-mètre préalablement étalonné. 10 g de sol sont mis dans 25 ml d'eau pure et homogénéisé pendant 15min.

### **3.2 Mesure de la conductivité électrique (CE)**

La mesure de CE est effectuée par homogénéisation de 10g de sol dans 50 ml d'eau pure dans un agitateur pendant 30 min. L'extrait obtenu après repos est mesuré par un refractomètre. Les résultats sont exprimés en mS/cm.

## **4 Méthode d'isolement des *Pseudomonas***

1g de chaque échantillon de sol est mis dans un tube à essai contenant 10 ml d'eau distillée stérile. Une série de suspensions-dilutions allant jusqu'à 1/6<sup>ème</sup> est réalisée à partir de chaque échantillon avant d'étaler 100µl de chaque suspensions-dilutions en boîtes de Pétri contenant 20 ml du milieu B de King *et al*, (1954).

### **4.1 Conservation des isolats**

Les isolats de *Pseudomonas* fluorescents sont purifiées et repiquées dans des tubes contenant un milieu KB additionné de glycérol (25 %), incubées à 28°C et conservés à -20°C pour une période qui ne dépasse pas les 6 mois.

### **4.2 Souches des microorganismes cibles**

Afin de déterminer les activités antagonistes et le spectre d'action des *Pseudomonas*, des microorganismes cibles ont été utilisés (tableau 1).

Les souches utilisées proviennent de l'institut Pasteur, du laboratoire de microbiologie et biologie végétal, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem et le laboratoire de microbiologie de l'Université d'Ibn Kheldoun de Tiaret.

**Tableau 1:** Les souches cibles et les conditions de culture utilisées dans ce travail.

Les microorganismes cibles	Milieu de culture	Température de croissance	Origine
<b>Bactéries Gram positives</b>			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	BHI	37 °C	LMUT
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	BHI	37 °C	LMUT
<i>Staphylococcus aureus</i>	BHI	37 °C	LMUT
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	BHI	30 °C	LMBV
<b>Bactéries Gram négatives</b>			
<i>Shigella sonnie</i> PH 001	BHI	37 °C	LMUT
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	BHI	37 °C	LMBV
<i>Escherichia coli</i>	BHI	37 °C	LMUT
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	BHI	37 °C	LMBV
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	BHI	37 °C	LMBV
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	BHI	37 °C	LMBV
<b>Souches fongiques</b>			
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	BHI	37 °C	LMBV
<i>Candida albicans</i>	BHI	37 °C	LMBV

LMUT : Laboratoire de Microbiologie Université de Tiaret. LMBV : Laboratoire de Microbiologie et de Biologie Végétale.

### 4.3 Sélection des isolats antagonistes

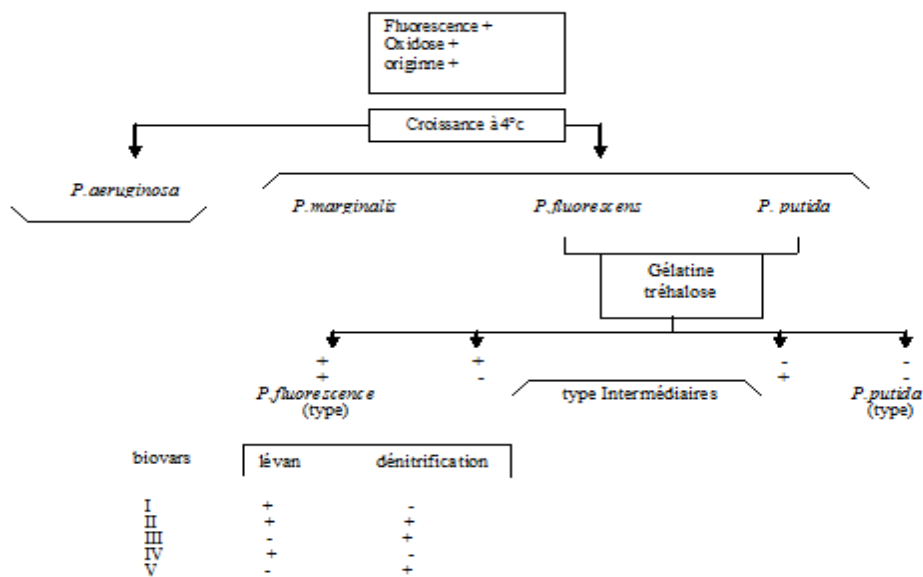
Afin d'obtenir les isolats de *Pseudomonas* à pouvoir antagoniste vis-à-vis de quelques souches pathogènes (cible) choisies dans notre étude, nous avons effectués un test de confrontation *in vitro*. Ce dernier consiste à déposer la souche de *Pseudomonas* en trait sur milieu King B, après incubation pendant 48 h à 30°C on dépose aseptiquement des traits perpendiculaire des souches tests. La lecture des résultats consiste à mesurer la distance des zones d'inhibition entre l'isolat antagoniste et la souche test.

### 4.4 Identification phénotypique des isolats de *Pseudomonas*:

La première étape de cette partie est la mise en évidence des pigments fluorescents. Afin de réaliser ce test les cultures bactériennes ont été examinées sous une lampe UV à une longueur d'onde de 366 nm.

Ce test est suivi par une étude morphologique (macro et microscopique), physiologique et biochimique. Plusieurs tests sont réalisés dans cette étude : recherche de catalase, de l'oxydase, l'arginine dihydrolase, test de mobilité, étude de type respiratoire, hydrolyse de la gélatine, et croissance à 4 et 42°C.

Ces caractéristiques préliminaires sont réalisées selon le schéma proposé (Figure 16) par Digat et Gardan (1987) afin de différencier entre les espèces trouvées de *Pseudomonas*.



**Figure 16:** Schéma général de caractérisation du groupe *Pseudomonas fluorescens-putida* (Digat et Gardan, 1987).

#### 4.5 Identification par la galerie API 20NE

Les isolats caractérisés comme des *Pseudomonas* selon les tests cités auparavant sont identifiés par la galerie **API 20NE**.

Le système API 20NE comporte 20 microtubes combine entre 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne d'eau physiologique. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture des résultats est faite suivant le catalogue API20NE. L'identification est réalisée par le logiciel **API WEB**.

#### **4.6 Identification des *Pseudomonas* par la spectrométrie de masse MALDI-TOF**

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une nouvelle technologie qui est apparue en 2011 dans le domaine de microbiologie en identifiant les germes selon l'analyse direct de leurs protéines. Cette méthode présente des avantages énormes dans la fiabilité et la rapidité des résultats. Ce test est réalisé au niveau du Centre de Recherche des Analyses Physico-chimiques (Tipaza).

La calibration de l'appareil a été effectué à l'aide d'une souche de référence (*Escherichia coli* ATCC 8739), le dépôt de cette dernière est fait dans des puits situés au milieu d'une lame appelée une lame DS. Afin d'éviter l'analyse des échantillons si le MS n'arrive pas à intégrer les pics et à identifier la souche calibrante.

Avant la préparation des échantillons les données (NLAB, bactérie, levure) ont été introduites dans la « Prep Station » constitué d'un ordinateur et d'un scanner optique, cette dernière est traité par un logiciel Myla qui intègre et gère les résultats du Vitek MS et du Vitek 2 avant leur transfert au système informatique du laboratoire.

Dans cette étude les isolats à tester et la souche de référence sont déposer dans les puits de la lame prévu à cet effet, puis déposer 1µl de matrice CHCA (Acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique).

Une fois la préparation de lame est terminée, les données sont transférées de la Prep Station vers le Vitek MS, puis la lame est placée sur le porte-lame et introduite dans le Vitek MS avant de lancer l'analyse.

#### **4.7 Identification génotypique des isolats**

L'extraction de l'ADN est une étape primordiale dans l'identification génétique des microorganismes, dans ce contexte l'extraction d'ADN a été effectuée par un choc thermique.

Cette étape a été réalisé au niveau de laboratoire de génétique du centre de recherche développement Blida .L'extraction consiste à introduire quelques colonies d'une culture pure de 24H dans un tube Eppendorf stérile contenant 500 µl d'eau pure (grade biologie moléculaire).

Le tube est agité puis chauffé à 95°C dans un thermobloc (bain sec) pendant 10mn, ensuite placée dans un cryobloc à -20°C (bain de glace) pendant 5mn ; le choc thermique permet la lyse cellulaire. La suspension est centrifugée à 10000 tr/min à 4°C/10mn. Le tube Eppendorf stérile contenant le surnageant (ADN) récupéré après centrifugation et garder à 4°C pendant une nuit pour permettre l'élimination de l'ARN par lyse avant leur conservation à -20°C pour des analyses ultérieures.

#### **4.7.1 La quantification de l'ADN :**

Afin de déterminer la quantité et vérifier la pureté de l'ADN nous avons utilisés le Nanodrop. L'analyse par ce dernier consiste a déposé 1µl de chaque échantillon dans une cellule de l'appareil construite à cet effet.

Le résultat quantitatif de l'ADN est déterminé en ng/µl. La pureté de l'ADN est déterminée par le rapport 260nm/280nm qui doit être compris entre 1.8 et 2. Si ce rapport est  $\leq 1.8$ , cela signifie une contamination par des protéines. S'il est  $\geq 2.0$  il s'agit d'une contamination par des ARN.

#### **4.7.2 L'amplification de l'ADN ribosomique 16S**

L'ADN ribosomique 16S est amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction) avec un thermocycleur ABI 9700 d'Applied Biosystems, en utilisant les amorces universelles décrites par LANE (1991) synthétisées par Eurofins Genomique, (France) :

27f (forward): 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'

1492R (Reverse): 5'GGTTACCTTGTTACGACTT3'

4 µl d'ADN génomique obtenu sont amplifiés dans un volume de 25µl de mixture réactionnelle contenant tous les réactifs nécessaires pour l'amplification PCR résumés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 2:** Les différentes concentrations et volume utilisé dans la mixture PCR

Réactifs	Concentrations initiales	Concentrations finales	Volume à prélever
Eau ultra pure			10 $\mu$ l
Tampon de TaqPromega	5X	1X	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1,5 mM	1,5 $\mu$ l
dNTP	25mM	0,2mM	0,3 $\mu$ l
Amorce 27F	10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	1,5 $\mu$ l
Amorce 1492R	10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	1,5 $\mu$ l
Taq polymérase Promega	5U	1U	0,2 $\mu$ l
ADN génomique			5 $\mu$ l
Volume final			25 $\mu$ l

- **L'amplification a été effectuée selon les conditions suivantes:**

Dénaturation initiale de la matrice d'ADN à 95°C pendant 5 min, puis 35 cycles de dénaturation à 95°C pendant 30 sec, hybridation à 55°C pendant 30 sec ,extension à 72°C pendant 45 sec. A la fin des cycles, le mélange réactionnel a été maintenu à 72°C pendant 7 min pour l'élongation finale, puis refroidi à 4°C. Dans le but d'obtenir une meilleure amplification trois températures d'hybridation ont été testées (55/ 56/58°C).

- **Electrophorèse sur gel d'agarose**

Les produits de la PCR ont fait l'objet d'une électrophorèse sur gel d'agarose de 1.5 % contenant du bromure d'éthidium (BET). Le gel est visualisé par la suite par un transilluminateur gel Doc XR piloté par un ordinateur.

La préparation du gel est faite par l'ajout de 150mg d'agarose en poudre (DNA grade, Euromedex) à 100 ml de tampon TAE 1X (Tris Acétate-EDTA; Euromedex). Cette solution est homogénéisée par ébullition dans une micro-onde pendant 3min avant d'être coulé dans une plaque d'électrophorèse horizontale. Après

refroidissement, les puits dans lesquels les échantillons seront déposés, sont formés par positionnement d'un peigne qui est retiré après solidification du gel.

Un volume de 5 µl d'amplifiât (produits de PCR) de chaque isolat est alourdi par 1 µL de tampon de charge contenant du bleu de bromothymol est déposé dans un des puits du gel déjà immergé dans le tampon TAE 1X. Le puits de l'extrémité est utilisé pour le dépôt d'un marqueur de taille de 1 Kb DNA ladder.

La migration a été effectuée à 100 volts pendant 20 min afin de visualiser les bandes d'ADN et de vérifier leurs tailles.

- **La purification**

C'est une étape indispensable dans le cas de visualisation de traînées sur les gels, qui sont due à la déplétion du tampon TAE (Ameziane *et al.*, 2005). Ces dernières sont aussi dues à la contamination de l'ADN par des protéines ou des solvants, ce qui nécessite une purification de l'ADN amplifié selon la méthode suivante :

Une électrophorèse des produits PCR avec une quantité d'échantillon déposée égale à 40 µl, et une concentration en agarose du gel égale à 0.8 %. Les bandes du gel obtenues correspondantes à 1500 pb sont incisées et traitées en trois étapes : liaisons, lavage et élution à travers une membrane de silice, selon la technique de chromatographie échangeuse d'ions décrite par Vogelstein et Gillespie (1979); en utilisant un kit d'extraction d'ADN à partir de gels électrophorétique (QIA Quick Gel extraction).

- **La fixation :**

La liaison de l'ADN à la membrane de silice est favorisée par l'ajout à la bande prélevé du gel 3 volume de tampon du kit, suivi d'une incubation à 50 °C afin de dissoudre le gel. L'élimination des contaminants enzymatique est réalisée par l'ajout d'un volume d'isopropanol.

- **Lavage :**

Le tampon PE à 100 % d'éthanol est la solution de lavage idéale pour éliminer les sels l'agarose.

- **Élution :**

Cette étape est effectuée par l'addition du tampon EB (10 mM Tris HCl pH 8,5) qui dissocie l'ADN purifié de la membrane.

### 4.7.3 Séquençage de l'ADN ribosomique 16S

Les amplicans purifiés ont fait l'objet de séquençage automatisé réalisé selon la technique de Sanger (GATC biotech, Germany) par l'utilisation des amorces universelles. Cette étape est réalisée en collaboration avec le laboratoire DIAG-GENE (France).

### 4.7.4 Phylogénétique

Les séquences déterminées sont traitées par le logiciel MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis program, version 6.06) (Tamura et *al.*, 2013) pour extraire la séquence du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S).

Ce logiciel permet de fusionner les deux séquences sens et anti-sens pour avoir une seule séquence d'ADNr 16S. Cette opération est réalisée par l'alignement des deux séquences après inversement du fragment anti-sens.

Les séquences d'ADNr 16S obtenues sont comparées, en utilisant le programme Blast (Altschul *et al.*, 1997 ; Kim *et al.*, 2012).

La construction de l'arbre est faite après l'alignement des séquences de *Pseudomonas* avec les séquences de références, en utilisant les algorithmes du Neighbour-Joining, pour faire des regroupements entre espèces par une matrice des distances.

Ces derniers sont calculées en rapportant le nombre de sites variables par comparaison des séquences. La validation de cette méthode est établie par un test de robustesse, le bootstrap qui soumet le résultat de 1000 analyses en Neighbour-Joining (Felsenstein, 1985).

## 5 Production des métabolites secondaires

### 5.1 Production et extraction des phénazines

Les souches performantes de *Pseudomonas* sont ensemencées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu King B solide puis incubées à 30°C pendant 24 h.

La production des substances phénaziniques *in vitro* a été stimulée dans des Erlenmeyers contenant le milieu NBY (nutrient broth yeast extract) liquide ensemencé par des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* (P8) et mise en incubation à

30°C pendant 72 h, sous agitation permanente de 180 tr/min. L'extraction des composés phénaziniques est faite selon la méthode décrite par Bonsall *et al.* (1997).

Les cultures de production sont centrifugées et le surnageant est acidifié à pH 2 par du HCL concentré afin d'éliminer les protéines, puis extraite avec de l'acétate d'éthyle (1v/1v). La phase organique, contenant les phénazines, est filtrée à travers du sulfate d'ammonium anhydre, ensuite évaporée sous vide. L'extrait sec est remis en suspension dans du méthanol pour des manipulations ultérieures (Delaney *et al.*, 2001).

### 5.2 Production et extraction de pyocyanine :

*Pseudomonas aeruginosa* (P8) est cultivée dans le milieu King A gélosé à 30°C pendant 24 h afin d'obtenir des cultures jeunes. Ces dernières sont utilisés pour inoculés le King A liquide qui a été choisi comme milieu favorable destiné à la production de la substance recherché. L'extraction de la pyocyanine a été faite selon la méthode décrite par Kurachi *et al* (1958), les isolats bactériens sont mis en incubation pendant 72 h à 37°C, sous agitation permanente de 180 tr /min.

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

### 5.3 Production et extraction de la pyoverdine

La production et l'extraction de la pyoverdine ont été effectuées selon la méthode décrite par Meyer et Abdallah (1978). Elle consiste à ensemencé la souche performante (*Pseudomonas fluorescens* P5) sélectionnée pour la production de la pyoverdine dans des tubes contenant 3 ml de milieu King B liquide et incubée à 30°C pendant 24h.

Les tubes de cette pré-culture sont versés dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 125 ml de King B liquide. Ces derniers sont incubés dans une étuve à 30°C pour une durée de 40 h sous agitation permanente de 180 tr/min.

Les cultures sont ensuite centrifugées à 6000 tr/min pendant 15 min à 4°C, les surnageant sont par la suite récupérés et filtrer avant d'être mélanger avec le phénol/chloroforme (2v/1v/1v).

Après agitation, la phase organique est mélangée avec le diethyl-éther (2v/3v), on agite bien puis on le laisse décanter pendant environ 3h. La phase organique contenant la pyoverdine est filtrée (filtre de nitrocellulose 45µm), ensuite le filtrat est concentré à sec par un rotavapor.

## **6 Caractérisation des métabolites secondaires**

### **6.1 Caractérisation de l'extrait de phénazine**

#### **6.1.1 Identification par chromatographie en couche mince (CCM)**

Le fractionnement de l'extrait a été effectué par CCM sur gel de silice. Le volume de dépôt est de 30 µl et la phase mobile est constituée de chloroforme/acétate d'éthyle (1:1). Après migration et évaporation du solvant, les plaques sont visualisées sous UV à 365 nm. Les bandes ont été délimitées et les rapports frontaux sont calculés (*R<sub>f</sub>*).

#### **6.1.2 Identification par UV-Visible**

L'extrait brut est balayé dans la gamme de 200 à 500 nm par un spectrophotomètre UV- Visible afin de déterminer la composition en fonction des maximums d'absorbance des substances phénaziniques (Veselova *et al.*, 2008).

#### **6.1.3 Purification et identification par chromatographie liquide haute performance (HPLC)**

L'extrait brut a été purifié sur Gel de sephadex G25 et filtré (filtre 0.45 µm). L'analyse de l'extrait purifié est faite par le système Jasco Pu séries 1580, équipé d'un détecteur spectrophotométrique UV-visible. Les essais ont été réalisés en phase inverse ; la phase stationnaire de la colonne C18 est constituée de groupements organiques apolaires et la phase mobile (solvant) est polaire. Le débit du solvant est de 1 ml /min et la longueur d'onde de détection est de 375 nm, Les composés phénaziniques sont identifiés par leurs temps de rétention en les comparant avec le standard utilisé (PCA : phenazine carboxylique acide) (Veselova *et al.*, 2008).

### **6.2 Caractérisation de la pyocyanine**

#### **6.2.1 Identification par UV Visible**

Une spectroscopie UV-visible (Spectrophotomètre: Cecil CE3021 UV visible 3000 series) a été menée, où un balayage a été utilisé pour déterminer la composition de notre extrait brut en fonction des pics d'absorptions maximales.

### **6.2.2 Identification par chromatographie en couche mince (CCM)**

La caractérisation de la pyocyanine par chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques en verre recouverte par le gel de silice (0.25 mm d'épaisseur). Le volume de dépôt est de 30  $\mu$ l et la phase mobile est constituée de chloroforme/méthanol (1:1). Après migration et évaporation du solvant, les taches (spots) bleus sont visualisée à l'œil nu.

Ces taches caractéristiques de pyocyanine sont grattées puis mise en suspension dans du méthanol, puis énergiquement agitée afin d'en extraire le composé. La fraction organique collectée est soumise à une concentration par évaporation afin d'être analysé par HPLC (Pierson et Thomashow, 1992).

### **6.2.3 Purification et identification de l'extrait de la pyocyanine par chromatographie liquide haute performance (HPLC)**

L'analyse de l'extrait purifié de notre échantillon et le standard de pyocyanine a été procédé par HPLC équipé d'un détecteur DAD SHIMATZU SPD-M20A. Les analyses ont été réalisés en phase inverse ; la phase stationnaire de la colonne C18 est constituée de groupements organiques apolaires et la phase mobile est constituée de deux solvants polaire A (acide trifluoroacétique-eau (v/v): 100/0,04) et B (acide trifluoroacétique-acétonitrile-eau (v/v/v) : 90/10/0,04). Le débit du solvant est de 1 ml /min et la longueur d'onde de détection est de 280 nm, Les composés sont identifiés par leurs temps de rétention (Femandez et Pizarro, 1997).

## **6.3 Caractérisation de la pyoverdine**

- **Identification par UV Visible**

Le spectre UV-visible est déterminé, pour noter la présence ou non de la pyoverdine dans notre extrait (produits dissous dans du méthanol). Le balayage spectral a été effectué entre 200 et 500 nm par un spectrophotomètre Shimadzu UV 260.

## **6.4 Identification de l'extrait de phenazine, pyocyanine et pyoverdine par FTIR**

L'analyse par infrarouge à transformation de fourrier (FTIR) a été utilisée dans le but de confirmer la structure exacte de nos échantillons.

- **Principe**

La spectroscopie infrarouge est une technique d'analyse spectrale. Son principe est basé sur l'analyse des vibrations des atomes et des molécules lorsqu'ils sont traversés et excités par des rayons IR. Elle permet de caractériser les fonctions chimiques de produits organiques, inorganiques, cristallisés ou amorphes.

Grace à cette technique, il est possible d'identifier une substance inconnue par comparaison avec les spectres d'absorption infrarouge de substances de référence. Dans notre étude, le spectromètre IR utilisé est de type JASCO 4200 FT-IR.

- **Mode opératoire**

Une quantité de 0.1 mg de chaque échantillons a analysé (l'extrait de phénazine, pyocyanine et la pyoverdine) dissoute dans le méthanol est soigneusement mélangée avec 180 mg de bromure de potassium (KBr), puis mise dans l'étuve à 110°C pour éliminer l'humidité avant d'être transformé en pastille de taille très fine, d'un diamètre de 13 mm, à l'aide d'une presse hydraulique uni-axiale ( $P = 0,5$  tonne/cm<sup>2</sup>). Le rapport 0.1/180 du mélange échantillon/KBr est respecté pour obtenir des spectres bien résolus et éviter le chevauchement des pics.

Les spectres d'absorption ont été réalisés dans le domaine du moyen infrarouge, correspondant à des nombres d'ondes ( $\nu = 1/\lambda$ ) compris entre 400 cm<sup>-1</sup> et 4000 cm<sup>-1</sup>.

Nos analyses sont effectuées sur un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier de type JASCO 4200 FT-IR, les spectres obtenus ont été traités par le logiciel JASCO SPECTRA Manager II software.

## **7 Etude de l'activité antimicrobienne des métabolites secondaires.**

### **7.1 Test d'antibiogramme**

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des métabolites obtenus a été réalisée par la méthode des disques de diffusion.

Cette méthode a été appliquée sur le milieu MH gélosé. Un volume de 20 ml de MH est coulé en boîte de Pétri puis 1 ml d'inoculum du germe-cible est déposé et étalé. Les disques de 6 mm de diamètre imbibés de 50 à 80 µL d'extrait à tester sont déposés à l'aide d'une pince flambée sur la surface du milieu ensemencé. Celles-ci sont mises à 4 °C pendant 2 h avant d'être incubées à 37 °C.

La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques après 18 à 24 h.

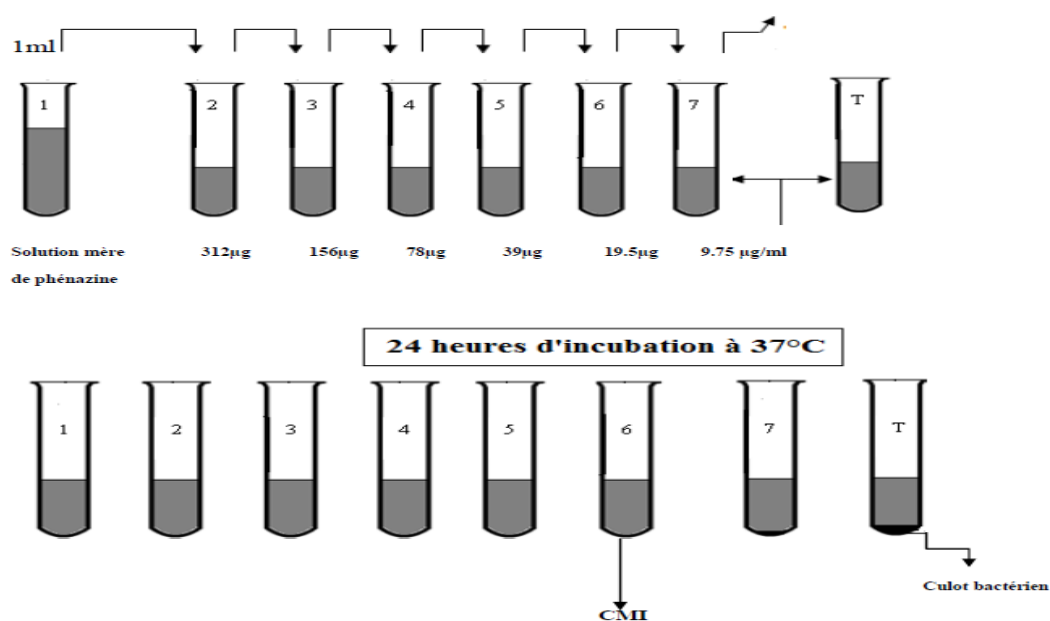
## 7.2 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'extrait phénazinique

Cette technique consiste à ajouter à des tubes contenant 2 ml de MH liquide et 1 ml de l'inoculum bactérienne 0.5 Mac Ferland, une gamme de concentration décroissante en extraits phénaziniques.

Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la concentration minimale inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en phénazine capable d'inhiber la croissance bactérienne.

- **Technique de macro-dilution en milieu liquide**

Une quantité de 0.01 g d'extrait de phénazine est placée dans un tube stérile contenant 8 ml d'éthanol. Cette solution mère est ensuite diluée en cascade dans un milieu MH liquide, de manière à obtenir plusieurs concentrations à savoir : 312, 156, 78, 39, 19.5 et 9.75  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 17).



**Figure 17 :** Méthode de détermination de la CMI de l'extrait de phénazine en milieu liquide

### 7.3 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de la pyocyanine

La méthode utilisée pour la détermination de la CMI de la pyocyanine est similaire à celle utilisée pour l'extrait de la phénazine avec une différence au niveau de la gamme des concentrations qui sont comprises entre 16 et 128 µg/ml.

### 8 Optimisation d'un milieu de culture pour une meilleure production de la pyocyanine

Dans le but d'optimiser la production de la pyocyanine par la souche de *Pseudomonas aeruginosa* (P8), nous avons donc opté pour l'utilisation des quatre composants du milieu King A afin de contrôler l'influence de ces derniers sur la sécrétion.

La démarche suivie consiste à utiliser des fioles agitées et faire varier successivement les deux constituant le tryptone et le glycérol en maintenant les autres constants. Dans cette approche, nous avons réalisé seize expériences afin d'avoir une idée sur la production de la pyocyanine par notre souche dans chaque milieu de culture en fonction de la composition choisi (tableau 3). La quantification de la pyocyanine est effectuée selon la méthode de kurachi *et al.* (1958).

**Tableau 3:** Composition du milieu de culture pour les seize expériences.

Composition des milieux de cultures			
Expérience 01	Expérience 02	Expérience 03	Expérience 04
20g/l tryptone + 0ml glycerol	20g/l tryptone+2.5ml glycerol	20g/l tryptone+5ml glycerol	20g/l tryptone+10ml glycerol
Expérience 05	Expérience 06	Expérience 07	Expérience 08
10g/l tryptone + 0 ml glycerol	10g/l tryptone+2.5ml glycerol	10g/l tryptone+5ml glycerol	10g/l tryptone+10ml glycerol
Expérience 09	Expérience 10	Expérience 11	Expérience 12
5g/l tryptone + 0ml glycerol	5g/l tryptone+10ml glycerol	5g/l tryptone+5ml glycerol	5g/l tryptone+2.5ml glycerol
Expérience 13	Expérience 14	Expérience 15	Expérience 16
2.5g/l tryptone+0ml glycerol	2.5g/l tryptone+10ml glycerol	2.5g/l tryptone+5ml glycerol	2.5g/l tryptone+2.5ml glycerol

## **9 Effet de la salinité, température et du pH sur la production de la pyocyanine et la pyoverdine**

### **9.1 Effet de la salinité sur la production de la pyocyanine**

Afin de déterminer l'effet de la salinité sur la production de la pyocyanine chez *Pseudomonas aeruginosa* (P8), la souche a été inoculée dans le milieu King A liquide additionné de différentes concentrations de NaCl (2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 30, 40, 50, 60 et 70 g/l). Les cultures sont mises en agitation permanente de 180 tr/min à 37 °C pendant 48 h et la quantification de la pyocyanine a été faite par la méthode de Kurachi *et al* (1958) et Essar *et al.* (1990).

Après l'extraction par le chloroforme, 5 ml de la phase organique contenant la pyocyanine est ré-extraite par 1ml d'HCL 0.2N qui donne une couleur rouge. L'absorbance de cette solution est mesurée à 520 nm et la concentration en µg/ml est déterminée par la multiplication de l'absorbance à la constante 17.072.

### **9.2 Effet de la salinité et de la température sur la production de la pyocyanine**

L'estimation de la production de la pyocyanine en fonction de la salinité et de la température a été effectuée par l'ajout des concentrations croissantes de NaCl à des flacons contenant 80 ml de milieu King A liquide à raison de 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 30, 40, 50, 60 et 70 g/l. Ces derniers sontensemencés par 3 ml de pré-culture de *Pseudomonas aeruginosa* (P8). Les cultures sont incubées à différentes températures (28, 30 et 37 °C) pendant 72 h, sous agitation permanente de 180 tr/min. Le dosage de la pyocyanine a été effectué par la méthode de kurachi *et al.* (1958).

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

L'influence de l'effet de la température et du pH sur la production de la pyocyanine a été effectuée par l'inoculation de 3 ml de pré-culture de *Pseudomonas aeruginosa* (P8) à des flacons remplis de 80 ml de milieu King A liquide.

Chaque volume est ajusté avec du NaOH ou d'HCL aux valeurs du pH suivants : 4, 5, 6, 7, 8 et 9. L'incubation a été réalisée à 28, 30 et 37 °C dans un agitateur rotatif à 180 tr/min pendant 72 h. La quantification de la pyocyanine a été effectuée dans les mêmes conditions que précédemment.

#### 9.4 Effet de la salinité et de la température sur la production de la pyoverdine

La production de la pyoverdine sous l'effet de la salinité et de la température a été évaluée sur un milieu liquide. Des flacons de 250 ml contenant 80 ml de milieu King A préparés à différentes concentrations de NaCl (0, 2.5, 5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 25 et 30 g/l) ont étéensemencés par 3 ml de pré-culture de *Pseudomonas fluorescens* (P5). Les cultures sont mises à différentes température d'incubation (28, 30 et 37°C) pendant 72 h, sous agitation permanente à 180 tr/min.

#### 9.5 Effet de la température et du pH sur la production de la pyoverdine

Pour confirmer l'effet de la température et du pH sur la production de la pyoverdine, la souche performante de *Pseudomonas fluorescens* (P5) a étéensemencée dans des tubes contenant 3 ml de King B liquide puis incubé à 30 °C pendant 18 h.

Chaque tube est versé dans un flacon de 250 ml contenant 80 ml du même milieu. Les flacons préparés sont ajustés à différentes valeurs de pH (4, 5, 6, 7, 8 et 9) avant d'être incubés à des températures de 28, 30 et 37 °C pendant 72 h, sous agitation permanente à 180 tr/min.

#### 9.6 La quantification de la pyoverdine

La quantification de la pyoverdine a été effectuée en utilisant la loi de Beer-Lambert par la mesure du couple longueur d'onde ( $\lambda$ ) – absorbance (A). A l'aide de cette loi ( $A = \epsilon \cdot l \cdot C$ ) où A est l'absorbance,  $\epsilon$  le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon_{400} = 20.000 \cdot M^{-1} \text{ cm}^{-1}$  soit  $C = A \cdot 400 / 20.000$ ) (Meyer et Abdellah, 1978).

### 10 L'activité hémolytique de la pyocyanine et l'extrait de la phénazine

Le sang humain est collecté dans des tubes secs de 10 ml contenant 5 % EDTA. La solution de cette dernière a été préparée par la dissolution de 2.7 g EDTA dans 100 ml d'eau bi-distillé. Le sang a été centrifugé à 5000 tr/min pendant 7 min à 4°C. Le surnageant a été rejeté et remplacé par une solution saline de 9 ‰ ; cette opération a été répétée 3 fois afin d'obtenir un culot des globules rouges bien lavés. Un volume de 100  $\mu$ l du culot obtenu est rajouté au 10 ml d'eau pour avoir une concentration de 1 %.

Les essais de l'activité hémolytique ont été réalisés dans une plaque de micro-titration à 96 puits. 100 µl de solution saline ont été déposés dans chaque puits additionnés par 100 µl de la solution du sang de 1 %. Les concentrations de pyocyanine et l'extrait de phénazine ont été préparés par une série de dilutions à partir de la concentration la plus élevée à l'exception de la première colonne qui est considérée comme un témoin négatif.

La plaque est incubée à une température ambiante pour une durée de 3 h. L'apparition d'un point avec un halo régulier indique une réaction négative par contre la réaction positive se manifeste par une solution uniforme de couleur rouge.

### 11 Potentiel antioxydant de la pyocyanine et de l'extrait de phénazine (test DPPH)

Afin d'évaluer l'activité antioxydante, nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par (Liyana and Shahidi, 2005).

Le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables qui donne lieu à une coloration violette foncée de la solution qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH par un agent antioxydant entraîne un changement de la couleur de la solution vers le jaune, dont l'intensité est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Figure 18).



**Figure 18 :** Structure du DPPH avec sa forme libre et réduite (Dangles *et al.*, 2000).

Cinquante microlitres de la solution méthanoïque de la pyocyanine et l'extrait de phénazine à différentes concentrations sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanoïque du DPPH (25 mg/l).

En parallèle, un contrôle négatif est préparé avec du méthanol pur. Les concentrations utilisées sont 0.175, 0.35, 0.7, 1.4, 2.8 µg /ml pour la pyocyanine et 1.25, 2.5, 5, 7.5, 10 µg /ml pour l'extrait de phénazine. Les essais sont réalisés en triplicata.

La lecture de l'absorbance est faite, contre un blanc préparé pour chaque concentration, à 517 nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante (Blois, 1958). Le pourcentage de réduction du radical libre DPPH est exprimé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Ab_{sc} - Ab_{se}) / Ab_{sc}] \times 100$$

**Ab<sub>sc</sub>** : Absorbance du contrôle

**Ab<sub>se</sub>** : Absorbance de l'échantillon testé.

Les résultats ont été exprimés en tenant compte de la moyenne des trois mesures obtenues. Pour chaque métabolite, nous avons déterminé la valeur de l'IC 50 qui est la concentration du substrat qui induit la perte de 50 % de l'activité du DPPH.

## **12 Effet de l'antioxydant L-ascorbate sur l'activité antimicrobienne de la pyocyanine**

Au cours de notre étude, nous avons testé l'activité antimicrobienne de la pyocyanine en présence d'un antioxydant non enzymatique (L-ascorbate) sur un ensemble de microorganismes cités au paravent.

Afin d'étudier la synergie entre la pyocyanine et l'ascorbate. Ce dernier a été préparé à différentes concentrations (5,10 et 15 mM) dans le méthanol et mélangé avec une concentration fixe de pyocyanine (500 µM). L'éventuel effet négatif du solvant utilisé a été testé. L'effet antimicrobien est évalué par la méthode de diffusion sur disque.

### 13 La recherche des gènes codant pour les antibiotiques chez les isolats de *Pseudomonas*

Dans cette partie, les isolats de *Pseudomonas* qui ont exprimé des caractéristiques antimicrobiennes *in vitro*, ont fait l'objet d'une étude moléculaire pour la détection de gènes responsables de la production de quelques antibiotiques tels que la pyoluteorine, la pyrrol-nitrine, la 2,4-diacetylphloroglucinole et la phénazine carboxylate.

La détection des antibiotiques chez la collection des isolats sélectionnés a été réalisée après extraction de l'ADN génomique par la méthode de choc thermique. L'amplification des gènes codant pour les antibiotiques cités auparavant a été effectuée en utilisant les amorces présentés dans le tableau 4, et selon les conditions opératoires suivantes :

Dénaturation initiale de la matrice d'ADN à 95°C pendant 5 min, puis 35 cycles de dénaturation à 94 °C pendant 30 s. La température d'hybridation en fonction de l'amorce de l'antibiotique recherché est de 65, 67, 56 et 58°C pour les gènes cibles : *prnC*, *pltC*, *phlD* et *phzCD* respectivement pendant 30 s, et l'extension à 72°C pendant 2 min. A la fin des cycles, le mélange réactionnel a été maintenu à 72°C pendant 6 min pour l'élongation finale, suivie d'un refroidissement à 4°C.

**Tableau 4:** Les séquences d'amorces utilisées dans la détection génotypique des antibiotiques

Amorces	Séquences	Gènes cibles	Taille d'amplicon	Source
PltCreg1Fe	AGGCAATCACTACCATCCGTGCGC	<i>pltC</i>	438 pb	Zhang et al. (2006)
PltCreg2Re	ATGAGGAGCAGGAGGTGTCGAGCAC			
Pyr1	AAG CGC AAC TTC GGC TTC	<i>prnC</i>	812 pb	Allaire (2005)
Pyr2	GTC GCG CAG CGC CTT GAT			
Phl2ac	GAGGACGTCGAAGACCACCA	<i>phlD</i>	745 pb	Zhang et al. (2006)
Phl2bc	ACCGCAGCATCGTGTATGAG			
PCA2a	TTG CCA AGC CTC GCT CCA AC	<i>phzCD</i>	1150 pb	Raaijmakers. (2001)
PCA3b	CCG CGT TGT TCC TCG TTC AT			

Les produit PCR obtenus ont été détectés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5 %) dans le tampon TBE, puis visualisé sur transluminateur gel Doc XR après trempage dans un bain de bromure d'éthidium ( $10 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ ).

# *Résultats et Discussion*

---

## 1. Analyse des sols

Les trois échantillons nommés Sol1, Sol 2 et Sol 3 prélevés de la zone (plaine de Mina) selon les coordonnées GPS (N 35° 55' 24'' E 0° 36' 59'' N 35° 43' 54'' E 0° 29' 17'' et N 35° 57' 09'' E 0° 42' 32'') respectivement, ont subi des analyses de leur pH et leur conductivité électrique afin de déterminer le type de sol de ces derniers (tableau 5).

Les résultats du pH obtenus ne représentent pas une grande fluctuation au niveau des trois sites de prélèvement étudiés. Elles sont proches au pH alcalin qui est compatible avec celui des milieux naturels salés (Loyer, 1991). La conductivité électrique varie de 6.24 à 13.10 mS/cm, ce qui reflète une variabilité dans les degrés de la salinité des trois sites choisis (salin à très salin).

**Tableau5** : Les valeurs de pH et de la conductivité électrique des sols étudiées.

Zones	pH	Conductivité C <sub>E</sub> mS/cm
Sol 1	7.74	13.10
Sol 2	8.26	6.24
Sol 3	7.88	7.90

L'analyse microbiologique par des tests préliminaires des sols salins étudiés a permis d'isoler une population bactérienne diversifiée et de sélectionner 75 *Pseudomonas* fluorescents. Cette propagation importante dans les conditions de salinité s'explique par le pouvoir d'adaptation des *Pseudomonas* à divers niche écologique (Latour et Lemanceau, 1997; Bossis *et al.*, 2000).

La richesse du patrimoine génétique de ces bactéries par la présence de nombreux îlots développe la capacité d'existence de ces microorganismes dans les zones stressés (Battle *et al.*, 2009).

## 2. Sélection des *Pseudomonas* des sols salins à pouvoir antagoniste :

La recherche de l'activité antagoniste *in vitro* a été testée sur les 75 isolats montrant des critères préliminaires de *Pseudomonas* vis-à-vis de douze microorganismes pathogènes. Les résultats obtenus (Tableau 6) montrent que le degré d'antagonisme varie d'un isolat à un autre. Parmi les 75 isolats testés 20 seulement ont montré un pouvoir antagoniste sur quelque souches pathogènes. L'isolat (P8) a montré une activité antagoniste à l'encontre de tous les pathogènes à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Alors que les autres isolats ont des degrés d'antagonismes de 8.33% pour la majorité des isolats (15/20) et 50 % pour l'isolat P1.

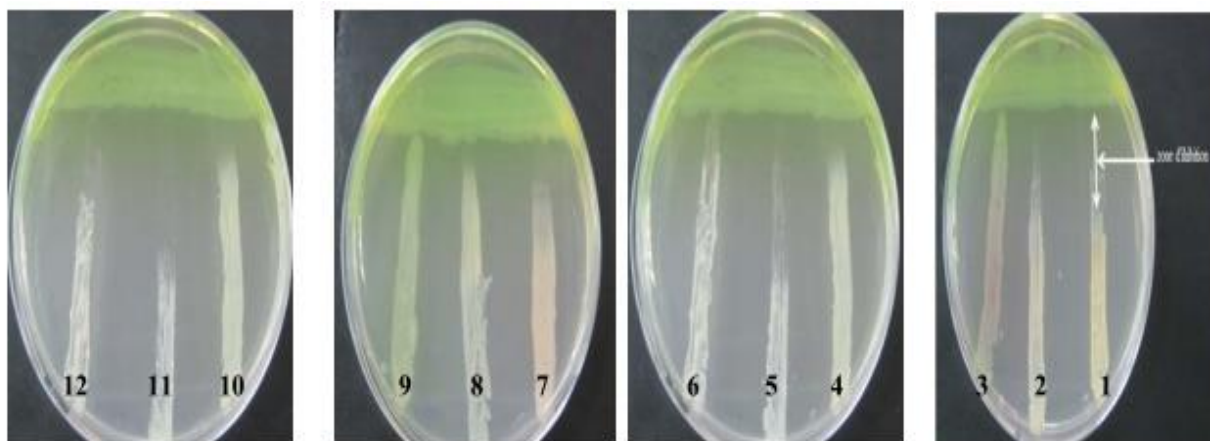
Les effets antibactériens des quatre isolats (P1, P2, P3, P8) ont été observés à l'encontre des Gram négatifs, par contre ceux envers les Gram positifs ont été exercés par les isolats (P1, P4, P8, P11, P12, P13, P14, P15, P17, P18). L'activité antifongique est observable chez les isolats : P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P16, P19 et P20.

L'activité antagoniste chez les *Pseudomonas* est liée à la production de métabolites ayant des propriétés antimicrobiennes, comprenant la production d'antibiotiques et d'antifongiques tels que des phénazines, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et le DAPG (2,4-diacetyl-phloroglucinol) qui représente les métabolites les plus fréquemment détectés (Haas et Defago, 2005 ; Thomashow *et al.*, 1990).

La différence dans l'activité antagoniste exercée par ces bactéries peut être expliquée par la production d'une ou plusieurs substances antimicrobiennes. Cela dépend de l'espèce, de la nature du métabolite ainsi que la quantité libérée dans le milieu utilisé. La plupart des études montrent qu'un nombre réduit des isolats de sol, allant de 1 à 10 %, sont dotés d'un pouvoir antagoniste *in vitro*. Cependant dans l'intervalle indiqué très peu d'entre eux ont la capacité d'inhiber un large spectre d'espèces pathogènes (McSpadden et Fravel, 2002; Kamilova *et al.*, 2005) .

**Tableau 6 :** Les zones d'inhibitions de l'activité antagoniste *in vitro* des isolats de *Pseudomonas* vis-à-vis les souches cibles (en mm).

Les souches antagonistes	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20
<b>Les souches pathogènes</b>																				
<i>Shigella sonnie</i> PH 001	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	8	0	13	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	12	4	14	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	9	6	11	0	0	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	8	0	5	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	0	0	0	0	29	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	9	0	0	9	0	0	0	34	0	0	9	8	11	10	13	0	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	0	10	10	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	13	A	0	15	25	13	0	26	30	15	0	0	0	0	0	0	0	0	12	13



**Figure 19:** Activité antagoniste de la souche P<sub>8</sub> vis-à-vis les souches cibles.

- |  |   |
|--|---|
| 1: <i>Staphylococcus aureus</i>            | 7: <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380        |
| 2: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862 | 8: <i>Escherichia coli</i>                  |
| 3: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922      | 9: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 |
| 4: <i>Shigella sonnei</i> PH 001           | 10: <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659     |
| 5: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 11: <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876       |
| 6: <i>Candida albicans</i>                 | 12: <i>Candida albicans</i> ATCC 10231      |

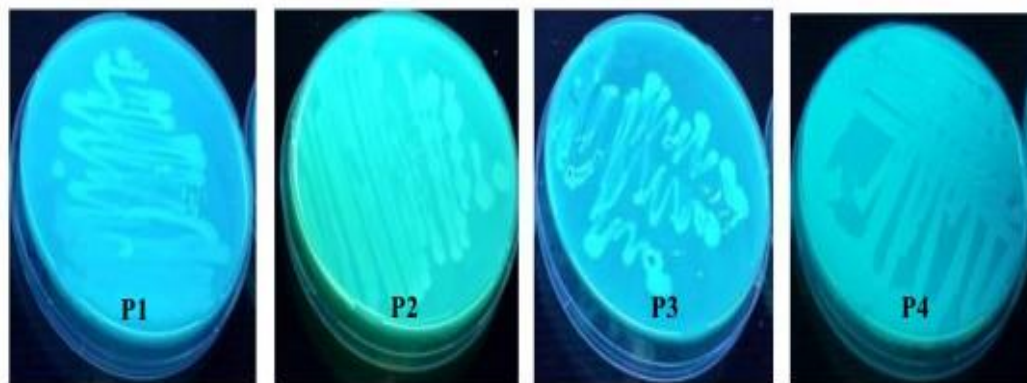
### 3. L'identification phénotypique des isolats

Le test d'antagonisme, la caractérisation macroscopique, microscopique et la production des pigments, ont permis de sélectionner 20 isolats de *Pseudomonas*. Ces derniers ont montrés une couleur jaune verdâtre sur King B. Seulement quatre isolats ont produit un pigment bleu verdâtre sur le milieu King A (Fig. 20).

Les colonies ont des formes bombées et opaques, de diamètre d'environ 2mm, circulaires, régulières, brillantes et muqueuses. L'observation microscopique a montré des bacilles droits ou légèrement incurvés présentant une coloration de Gram négative. Tous ces caractères en plus les tests positifs de l'oxydase et l'arginine dihydrolase ont permis de rapprocher les souches au groupe de *Pseudomonas* fluorescents (Palleroni *et al.*, 1984; Jacques, 1994; Bossis, 1995).

Le tableau 7 résume quelques tests phénotypiques réalisés pour identifier les isolats de *Pseudomonas* à pouvoir antagoniste.

La réaction positive du cytochrome oxydase est un caractère indispensable dans l'identification des espèces de *Pseudomonas*. L'utilisation de l'arginine est une voie caractéristique des *Pseudomonas* spp. Fluorescents. Cette dernière à un rôle physiologique important pour générer des substrats à haut niveau d'énergie sous forme d'ATP en absence d'oxygène. Cette voie est considérée comme la seule voie anaérobie chez les *Pseudomonas* (Latour et Lemanceau, 1997) (tableau 7).



**Figure 20:** Aspect macroscopiques des isolats de *Pseudomonas* sur gélose King B sous la lampe UV.

**Tableau 7:** Résultats de quelques tests biochimiques au sein des isolats de *Pseudomonas*

Isolats	OX	CAT	CIT	MANI	MOB	T/R	GLU	LAC	H <sub>2</sub> S	GAZ	4°C	42°C	GEL	NO <sub>2</sub>	ADH
P1	+	+	+	+	+	AS	+	+	-	-	-	+	+	+	+
P2	+	+	+	-	+	AS	+	+	-	-	-	+	+	+	+
P3	+	+	+	-	+	AS	+	+	-	-	-	+	+	+	+
P4	+	+	+	+	+	AS	+	+	-	-	+	-	-	+	+
P5	+	+	+	+	+	AS	+	+	-	-	+	-	-	+	+
P6	+	+	+	+	+	AS	+	-	-	-	+	-	-	+	+
P7	+	+	+	+	+	AS	+	+	-	-	+	-	-	+	+
P8	+	+	+	+	+	AS	+	-	-	-	-	+	+	+	+
P9	+	+	+	+	+	AS	+	+	-	-	+	-	-	+	+
P10	+	+	+	+	+	AS	+	+	-	-	+	-	-	+	+
P11	+	+	+	+	+	AS	+	+	-	-	+	-	-	+	+
P12	+	+	+	+	+	AS	+	+	-	-	+	-	-	+	+
P13	+	+	+	+	+	AS	+	-	-	-	+	-	-	-	+
P14	+	+	+	+	+	AS	+	-	-	-	+	-	-	-	+
P15	+	+	+	-	+	AS	+	-	-	-	+	-	-	-	+
P16	+	+	+	+	+	AS	+	+	-	-	+	-	-	+	+
P17	+	+	+	+	+	AS	+	+	-	-	+	-	-	+	+
P18	+	+	+	+	+	AS	+	+	-	-	+	-	-	+	+
P19	+	+	+	+	+	AS	+	+	-	-	+	-	-	+	+
P20	+	+	+	+	+	AS	+	+	-	-	+	-	-	+	+

+ : positif, - : négatif, **OX** : oxydase, **CAT** : catalase, **CIT** : citrate, **MANI** : mannitol, **MOB** : mobilité, **T/R** : type respiratoire, **GLU** : glucose,

**LAC** : lactose, **H<sub>2</sub>S** : hydrogène sulfite, **GEL** : hydrolyse de la gélatine, **NO<sub>2</sub>** : nitrate-réductase, **ADH** : arginine dihydrolase

L'application de l'identification selon le schéma proposé par Digat et Gardan (1987) a ressorti deux groupes principaux, le premier est représenté par *Pseudomonas fluorescens/putida* avec un pourcentage de 80 % et le deuxième groupe pouvant croître à 42°C est rapproché à *Pseudomonas aeruginosa* avec un pourcentage de 20 %. Les résultats préliminaires obtenus montrent une diversité phénotypique qui peut clarifier la dominance de *Pseudomonas fluorescens/putida* par rapport à l'autre espèce retrouvée *Pseudomonas aeruginosa*.

L'identification phénotypique par la galerie API 20NE nous a permis de rapprocher 4 souches à *Pseudomonas aeruginosa*, 3 souches à *Pseudomonas putida*, 1 souche à *Pseudomonas luteola* et 12 souches à *Pseudomonas fluorescens* selon le logiciel API web.

La caractérisation phénotypique utilisée dans notre cas nous a permis d'identifier et de classer les isolats selon certains tests, morphologiques, biochimiques et physiologiques. Cependant ces critères n'ont pas permis de réaliser une identification précise; ce qui confirme la faiblesse de ces approches phénotypiques pour la caractérisation des *Pseudomonas*.

Delorme *et al.*, (2002), Botelho and Mendonça-Hagler (2006), Bazhanov and Yatsевич (2011) ont souligné les limites des méthodes phénotypiques dans la classification des *Pseudomonas*. Ces limites ont été clarifiées par Ramette *et al.* (2011), lorsque ils ont étudié la différence entre les *Pseudomonas* producteurs de diacétyl-phloroglucinol et *P. syringae* où ils ont remarqué que la spécificité réside dans les réactions positives pour l'oxydase et l'arginine dihydrolase.

Afin de confirmer l'identification des souches étudiées dans notre travail nous nous sommes orientés vers l'identification génotypiques et à l'utilisation d'une technique récente qui est le MALDI TOF MS.

#### **4. L'identification par le MALDI TOF MS**

Les isolats testés par MALDI-TOF-MS sont bien identifiés au genre et à l'espèce avec un pourcentage de 100 % (tableau 8).

Dieckmann *et al.*, (2005) et Degand *et al.*, (2008) rapportent que cette technique est efficace pour l'identification des *Pseudomonas*, ce qui permet de confirmer ou infirmer les résultats obtenus par les méthodes classiques. Ainsi, elle permet de donner des résultats fiables dans un délai plus court que les méthodes habituelles et de réduire la quantité de l'échantillon à analyser.

Les spectres obtenus en annexe II et le tableau 8 représentent les résultats obtenus de l'identification des isolats par le Vitek MS, où on note l'absence de discordance au genre et espèce relatée aux erreurs du MS dans l'identification du genre et aux erreurs d'identification à l'espèce. Dans le cas positif, ces erreurs peuvent être dues à une mauvaise préparation des échantillons, une quantité insuffisante dans le dépôt des spots et échec de calibration ou absence de l'espèce dans la base de données.

Le comparative entre les deux techniques d'identification utilisées (API 20NE et MALDI-TOF) montrent que la technique MALDI couplé à la spectrométrie de masse est plus précis que l'utilisation de l'API 20NE (Tableau 9).

**Tableau 8:** Résultats de l'identification des *Pseudomonas* par MALDI-TOF

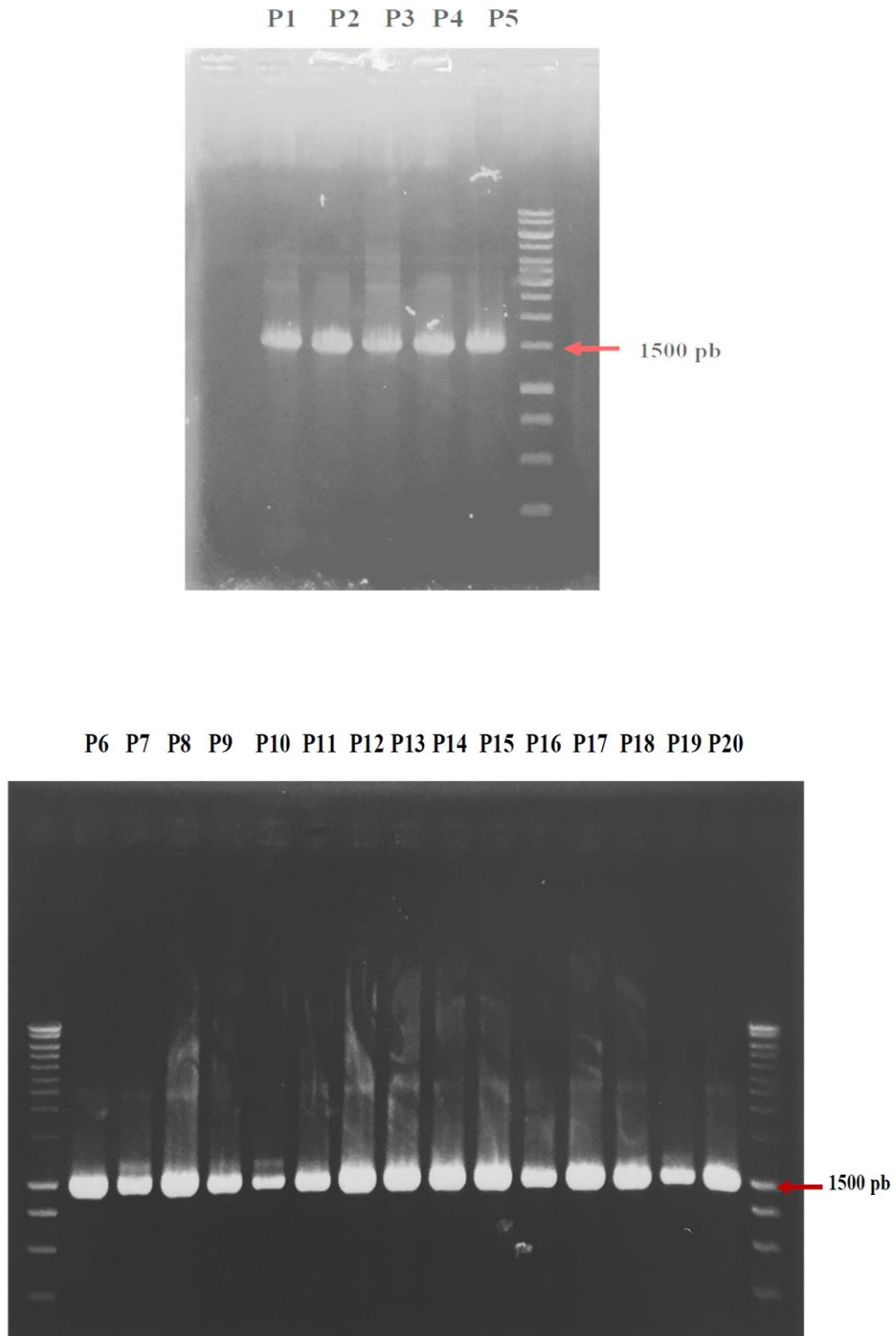
Catégorie	Nombre de souches	Discordance au genre	Discordance à l'espèce	% d'identification correcte au genre et espèce
<i>Pseudomonas</i>	20	0	0	100
<i>P. aeruginosa</i>	4	0	0	100
<i>P. fluorescens</i>	12	0	0	100
<i>P. putida</i>	3	0	0	100
<i>P. fragi</i>	01	0	0	100

**Tableau 9:** Identification comparative des *Pseudomonas* par API 20NE et MALDI-TOF

N°	MALDI-TOF			API 20NE			Identification
	NCBI Identifier	Vitek MS	%	2ème méthode (API 20NE)	Code de la galerie	%	
P1	287	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1354475	99.9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P2	287	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1354575	99.9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P3	287	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1354575	91.9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P4	294	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1347555	99.8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
P5	294	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1747555	99.4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
P6	294	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1347555	99.8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
P7	294	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1347555	99.8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
P8	287	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1356575	91.9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
P9	294	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1347555	99.8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
P10	294	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1347555	99.8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
P11	294	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1347555	99.8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
P12	294	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1347555	99.8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
P13	303	<i>Pseudomonas putida</i>	100	<i>Pseudomonas putida</i>	0147457	80.4	<i>Pseudomonas Putida</i>
P14	303	<i>Pseudomonas putida</i>	100	<i>Pseudomonas putida</i>	0143455	88.7	<i>Pseudomonas Putida</i>
P15	303	<i>Pseudomonas putida</i>	100	<i>Pseudomonas putida</i>	0146457	88.6	<i>Pseudomonas putida</i>
P16	294	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1347555	99.8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
P17	294	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1347555	99.8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
P18	296	<i>Pseudomonas fragi</i>	100	<i>Pseudomonas luteola</i>	1767755	96.4	<i>Pseudomonas fragi</i>
P19	294	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1347555	99.8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
P20	294	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1347555	99.8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

### 5. L'identification moléculaire des isolats

L'amplification de l'ADNr des isolats de *Pseudomonas* a révélé l'apparition des bandes similaires pour l'ensemble des isolats avec une taille approximative de 1500 paires de bases (Fig. 21).



**Figure 21:** Amplification de l'ADNr 16S des isolats de *Pseudomonas*.

Les séquences 16S de l'ADNr des isolats de *Pseudomonas* obtenus ont été alignées et comparées par le programme « BLAST » en utilisant la banque de données NCBI. Les résultats obtenus sont résumés comme suit :

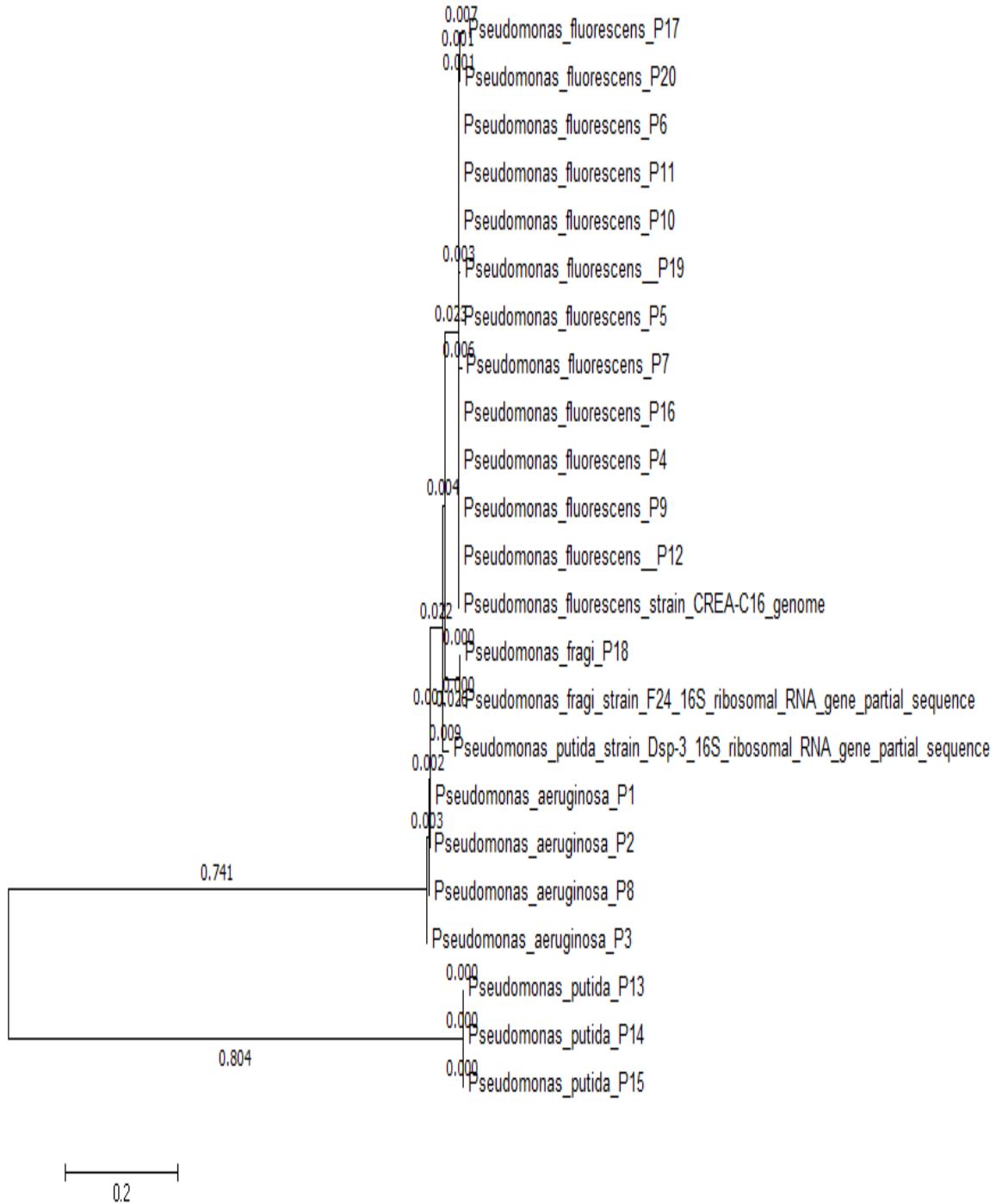
- Les isolats P1, P2 et P8 ont montré une similitude de 100 % avec l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* (strain NHmuc, génome complet). Alors que, la séquence nucléotidique de l'isolat P3 a montré une ressemblance avec l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* (strain SJL-1 16S ribosomal RNA gene) avec une séquence partielle répertoriée dans la banque des données avec un taux de similarité de 99 %.
- Le test de BLAST effectué pour la séquence 16S de l'ADNr de l'isolat P18 a montré une similitude de 100 % avec *Pseudomonas fragi* (strain F24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence).
- Les isolats P14 et P15 montrent une homologie de 99% avec l'espèce *Pseudomonas putida* (strain PP112420, complete genome),
- Tandis que l'espèce la plus proche pour l'isolat P13 est *Pseudomonas putida* (strain Dsp-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence) avec un taux de ressemblance de 99%.
- Les isolats P4, P6, P9 et P17 sont semblables à *Pseudomonas fluorescens* (strain CREA-C16 genome) avec un pourcentage d'homologie de 100%.
- Alors que les isolats P5, P7, P10, P11, P12, P16, P19 et P20 sont rapprochées avec l'espèce *Pseudomonas fluorescens* (strain CREA-C16) avec un taux de ressemblance de 99%.

L'analyse phylogénétique des *Pseudomonas* étudiés permet de positionner chaque isolat et sa corrélation génétique avec les autres souches les plus proches, existant dans la banque des données NCBI (Fig.22).

Cette analyse est basée sur le séquençage de l'ADNr 16S qui a permis de rapprocher les isolats étudiés aux quatre espèces différentes de *Pseudomonas* (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens*). Les résultats obtenus par approche moléculaire confirment les résultats de l'identification par MALDI-TOF MS.

L'analyse de l'ADNr 16S, considéré comme base de la classification actuelle des microorganismes (Peix *et al.*, 2009), ne permet pas à elle seule l'identification exacte des isolats, d'où la nécessité de recourir à d'autres analyses génotypiques tels l'étude de sidérotypage, de l'hybridation ADN/ADN et l'étude des gènes de ménage (*rpoB*, *rpoD* et

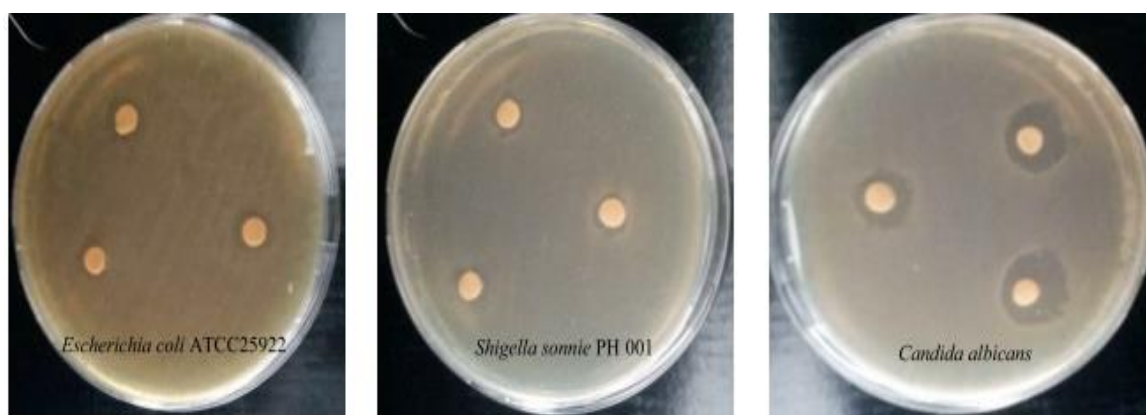
gyr B) afin d'éviter toute ambiguïté dans la position taxonomique de chaque isolat étudié (Ramette *et al.*, 2011).



**Figure 22 :** Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S, et montrant la relation des isolats P1 à P20 avec trois espèces type du genre *Pseudomonas*. La barre 0.2 indique le nombre de substitution par position de nucléotide.

## 6. Effet antimicrobien des phénazines

L'effet antimicrobien des phénazines sécrétés par *Pseudomonas aeruginosa* (P8) a montré une inhibition variable contre les souches microbiennes pathogènes (Fig. 23, Tableau 10). Ces métabolites révèlent une haute activité contre *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Candida albicans* ATCC 10231 et *Candida albicans* d'origine clinique avec des moyennes d'inhibition de l'ordre 19, 20 et 21 mm respectivement; par contre la plus faible valeur a été enregistré chez *Proteus vulgaris* ATCC 6380, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 et *Escherichia coli* ATCC 25922 avec des zones d'inhibition de 9 à 11 mm; ces bactéries à coloration de Gram négative sont les plus difficiles à traiter cliniquement, par contre une activité modérée a été enregistré pour les autres souches cibles.



**Figure 23:** Effet antimicrobien de l'extrait brut de phénazine sur les souches cibles

Ces résultats sont en concordance avec les études de plusieurs auteurs, qui ont montré que les substances phénaziniques ont la capacité d'inhiber la croissance des souches pathogènes telle que *Escherichia coli* (Saosoong *et al.*, 2009), *Staphylococcus aureus* (veselova *et al.*, 2008) et *Candida albicans* (Morales *et al.*, 2013).

Le diamètre de la zone d'inhibition dépend de la souche productrice et à la capacité de l'extrait de diffuser dans le milieu. Le pouvoir inhibiteur de ces métabolites est due à la propriété oxydo-réductrice induisant l'accumulation de super-oxydes et de peroxyde d'hydrogène toxiques ainsi qu'à la production des radicaux hydroxyles qui attaquent les membranes et l'ADN, et pouvant entraîner la mort de la cellule (Hantke et Braun, 2000 ; Mavrodi *et al.*, 2006).

**Tableau 10:** Activité antimicrobienne de l'extrait brute de phénazine sécrété par *Pseudomonas aeruginosa* (P8).

Les souches pathogènes testées	Diamètre des zones d'inhibitions (mm).
<i>Shigella sonnie</i> PH 001	11.5 ± 0.70
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11 ± 0
<i>Escherichia coli</i>	12 ± 0
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	10 ± 0
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	9 ± 0.57
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11 ± 1.41
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	13 ± 0
<i>Staphylococcus aureus</i>	13 ± 0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	21 ± 1.41
<i>Candida albicans</i>	19 ± 0
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	20 ± 0.

- **Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

Les résultats obtenus (Tableau 11) montrent une croissance similaire au témoin dans les concentrations 9.75 et 19.5 µg/ml, et faible dans la concentration de 39 µg/ml. La concentration de 78 µg/ml de l'extrait phénazinique s'est montré comme la plus faible concentration qui a inhibé les trois souches cibles : *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Candida albicans* ATCC 10231 et *Candida albicans* d'origine clinique. Cependant, l'effet de l'extrait reste inactive vis-à-vis les autres souches contrairement à la concentration de 156 µg/ml qui exerce un effet inhibiteur sur la totalité des souches bactériennes et fongiques.

Viviane et al. (2013) ont montré que la concentration minimal inhibitrice des phénazines vis-à-vis *Staphylococcus aureus* est de 125 µg/ml. D'autres chercheurs ont déterminé que les CMI de *Candida albicans* et *Escherichia coli* sont de l'ordre de 17.4 et

34.8 µg /ml. Ceci peut être expliqué par la nature de l'extrait phénazinique étant donné que les *Pseudomonas* spp. synthétisent une mixture de composés phénaziniques qui dépend de l'espèce en plus des conditions environnementales (Delanay *et al.*,2001).

La structure et le pH des phénazines jouent aussi un rôle important dans l'activité antimicrobienne, confirmé par les travaux de Brisbane *et al.* (1986) et Lambert et Stratford (1999). Ces derniers ont montré que les acides peuvent inhiber la croissance des microorganismes, ce qui explique l'effet antimicrobien de l'extrait phénazinique contenant majoritairement la phénazine carboxylate (PCA) qui possède un groupement carboxyle avec un pKa égal à 4.

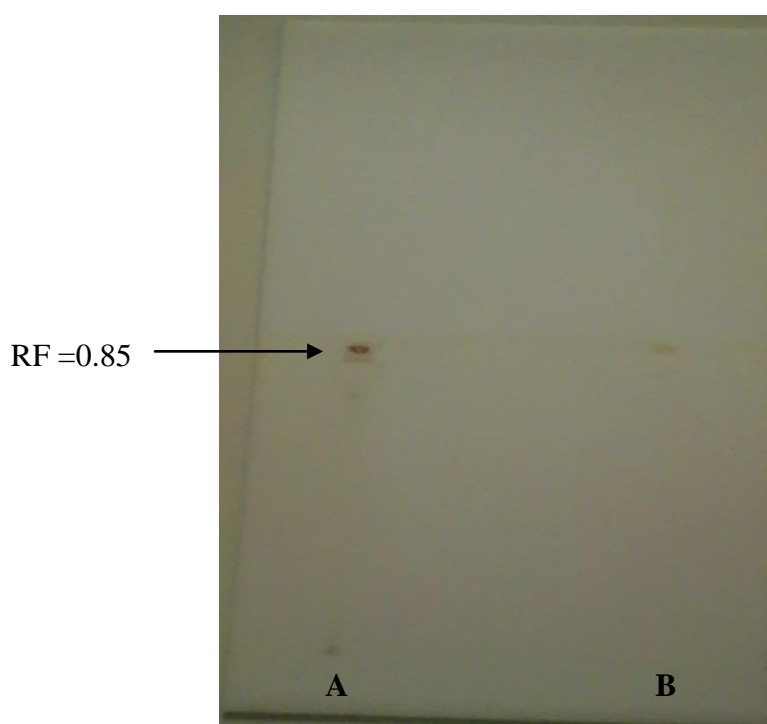
**Tableau 11:** Détermination de la CMI de l'extrait des phénazines sur les souches cibles.

Les souches pathogènes testées	La concentration de l'extrait des phénazines (µg/ml)						CMI (µg/ml)
	9.75	19.5	39	78	156	312	
<i>Shigella sonnie</i> PH 001	+	+	+	+	-	-	156
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	-	-	156
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	-	-	156
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	+	+	+	+	-	-	156
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	+	+	+	+	-	-	156
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+	-	-	156
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	+	+	+	+	-	-	156
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	-	-	156
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	+	+	+	-	-	-	78
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	-	-	-	78
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	+	+	+	-	-	-	78

## 7. Caractérisation de l'extrait phénazinique par CCM, FTIR et HPLC.

### 7.1 Chromatographie sur couche mince (CCM) de l'extrait phénazinique.

L'extrait phénazinique obtenue par l'acétate d'éthyle a donné sur la plaque de CCM une seule tache de couleur jaune avec un rapport frontal (Rf) de 0.85 (Fig. 24) identique à celui du standard PCA. Ce composé a montré une efficacité remarquable vis-à-vis les bactéries et les levures testées. L'extrait phénazinique a été examiné aussi par d'autres méthodes analytiques à savoir FTIR et HPLC, pour vérifier la probabilité de l'existence ou non de d'autres composés avec le même rapport frontal.



**Figure 24:** Identification des composés de l'extrait phénazinique par CCM. (A) extrait de phénazine, (B) standard de phénazine carboxylate.

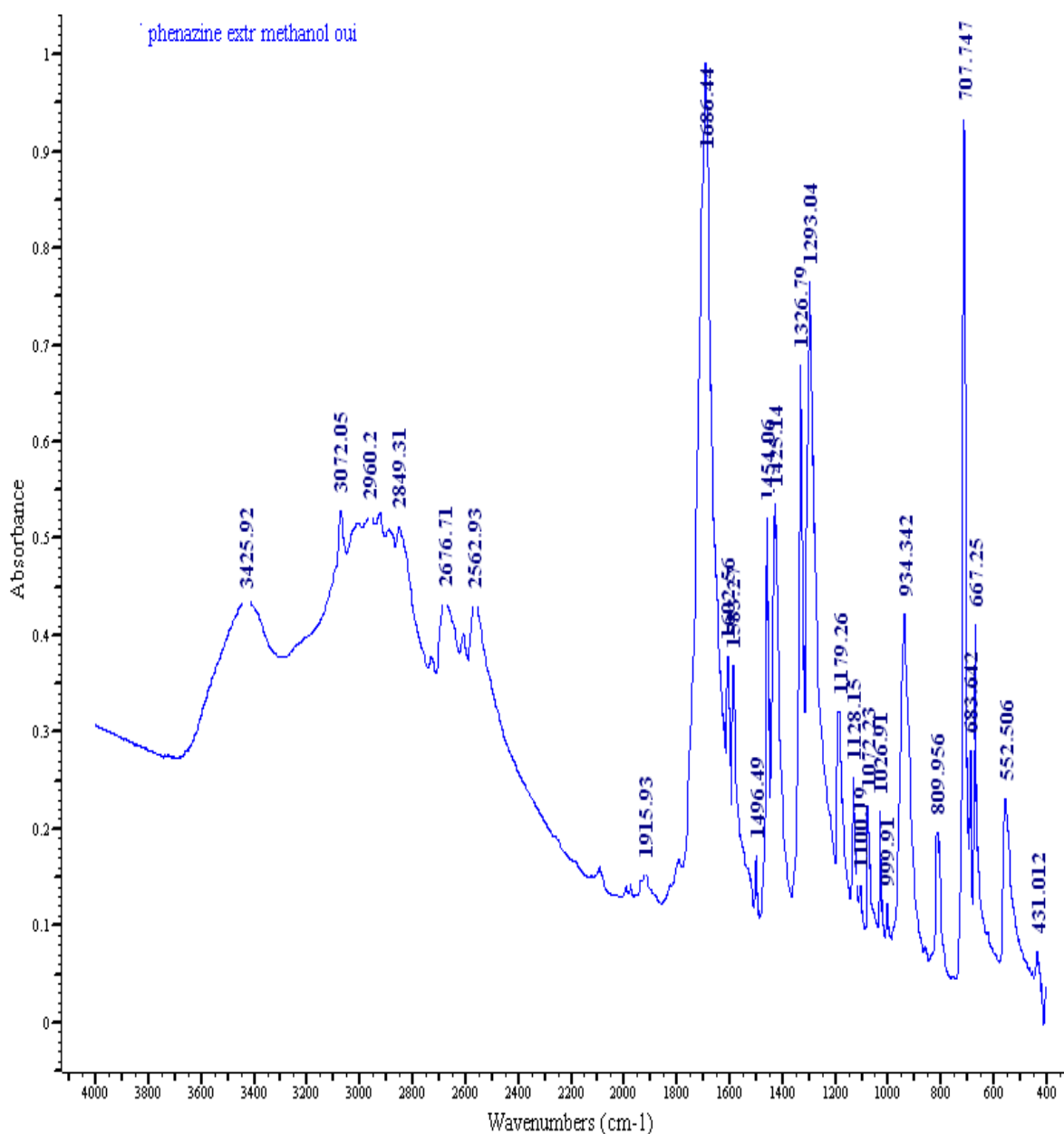
### 7.2 Analyse par FTIR

Les vibrations caractéristiques des différentes liaisons constituant la structure de la phénazine carboxylate (Fig. 25) sont détaillées comme suite :

- Une bande située entre  $2563$  et  $3426\text{ cm}^{-1}$ , correspondant au groupement OH de la fonction acide et qui est due à la formation des liaisons hydrogènes ;

- Une bande intense située à  $1687\text{ cm}^{-1}$ , associée à l'élongation du groupement C=O de la fonction acide ;
- Une bande située à  $1454\text{ cm}^{-1}$ , associée à l'élongation du groupement C=C aromatique ;
- Une bande située à  $1293\text{ cm}^{-1}$ , associée à l'élongation du groupement C-O de la fonction acide.

Les autres bandes détectées représentent les impuretés existant dans l'extrait brut ce qui confirme la présence d'autres composés.

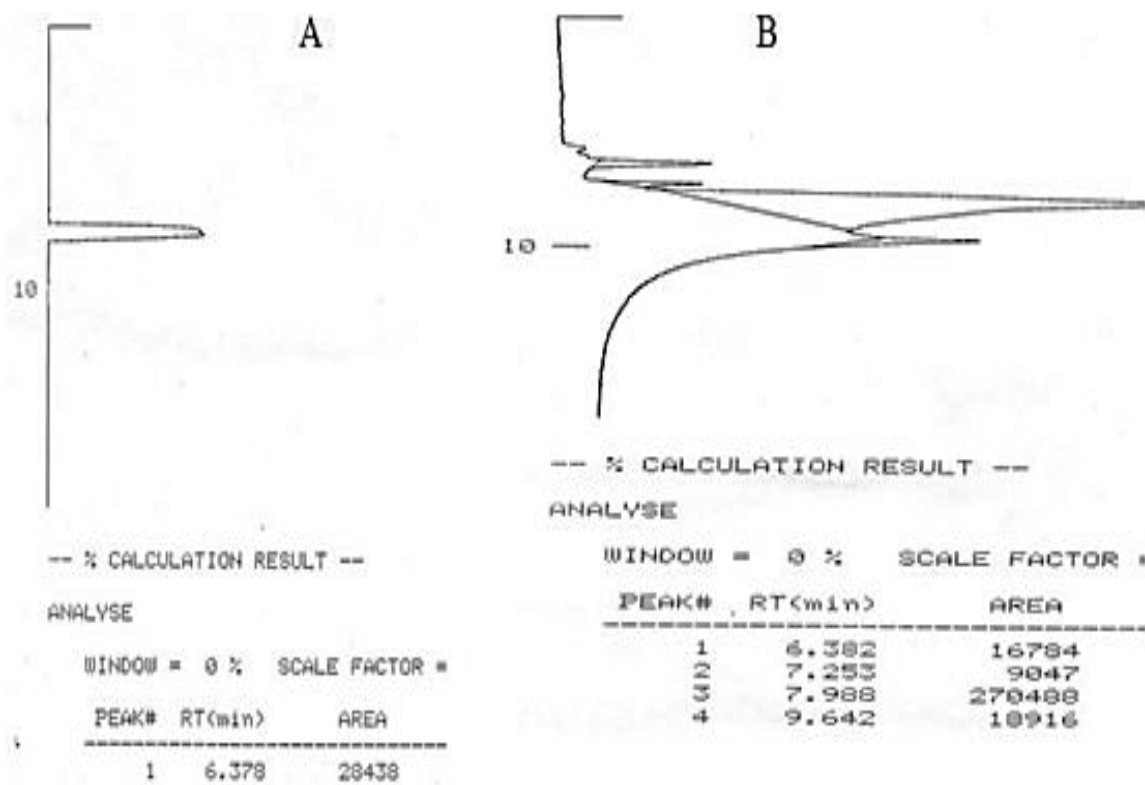


**Figure 25:** Identification de l'extrait phénazinique par FTIR.

### 7.3 Analyse par HPLC

L'analyse de l'extrait phénazinique a été réalisée après une purification partielle par chromatographie sur gel de silice. Ensuite, l'analyse par HPLC à confirmer la nature et le nombre de composés présent dans l'échantillon, en fonction de l'affinité vis-à-vis la colonne chromatographique et les conditions expérimentales.

Les résultats obtenus du standard de phénazine (Fig. 26 A) montrent la présence d'un pic avec un temps de rétention égal à 6.378 min. Alors que l'extrait purifié (Fig. 26 B) a révélé la présence de quatre pics avec différents temps de rétention à savoir 6.382, 7.253, 7.988 et 9.642 min. Ceci démontre la capacité de *Pseudomonas* à produire beaucoup de dérivés phénaziniques. Ces résultats sont en concordance avec les travaux de Budzikiewiez (1993), Chin-A-Woeng *et al.*(2003) et Liu *et al.*(2008).



**Figure 26 :** Identification de l'extrait phénazinique par HPLC. **A :** Standard de phénazine. **B :** Extrait phénazinique

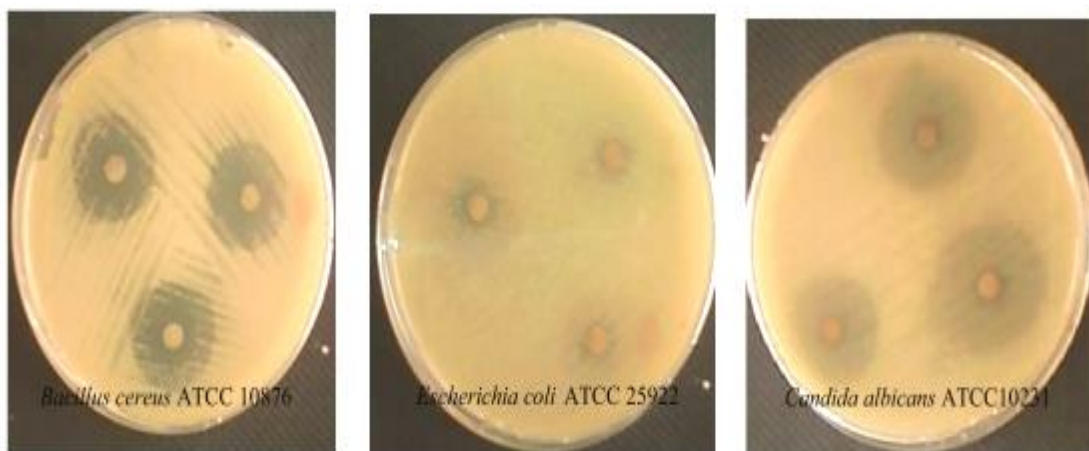
## 8. Effet antimicrobien de la pyocyanine

La pyocyanine produite par *Pseudomonas aeruginosa* (P8) a montré un effet inhibiteur variable vis-à-vis les microorganismes cibles (Tableau 12, Fig. 27). En effet, cette molécule révèle une haute activité contre les levures et les bactéries Gram positives, mais demeure peu actif contre les bactéries à coloration de Gram négative, à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 où l'effet était totalement absent.

Ainsi, on constate que les deux souches fongiques *Candida albicans* ATCC 10231 et *Candida albicans* d'origine clinique sont très sensibles à la pyocyanine avec une moyenne des diamètres d'inhibition de 26 mm et de 25 mm, respectivement. Cependant les souches *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Staphylococcus aureus* d'origine clinique et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ont aussi une sensibilité remarquable vis-à-vis de cette molécule dont les diamètres étaient successivement 14, 13, 13 et 12 mm.

La pyocyanine a exercé une activité antimicrobienne moins importante contre *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* ATCC 6380 et *Proteus mirabilis* ATCC 35659 avec des zones d'inhibition qui varie entre 9 et 11 mm. Ceci n'exclut pas l'efficacité du pouvoir inhibiteur de cette substance car les travaux d'Abdulrudha (2011) ont démontré que les diamètres d'inhibition étaient de 12 à 14 mm.

L'effet de la pyocyanine envers d'autres souches pathogènes a été décrit par plusieurs auteurs qui ont confirmé cet effet vis-à-vis de différentes espèces, telles que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae* (Knight *et al.*, 1979; Baron and Rowe, 1981).



**Figure 27:** Effet antimicrobien de la pyocyanine sur les souches cibles.

La sensibilité des bactéries à coloration de Gram positive à la pyocyanine par rapport aux bactéries à coloration de Gram négatives est due à la différence dans la composition de la paroi qui facilite la pénétration de la pyocyanine.

L'activité antimicrobienne de ce métabolite secondaire est due essentiellement à sa capacité de régénérer un excès d' $O_2^-$  et  $H_2O_2$  inhibant le processus de production d'énergie et le transport actif (Kerr *et al.*, 1999; Preetha *et al.*, 2010; Barakat, 2012; El-Fouly *et al.*, 2015).

La résistance de la souche cible *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est expliquée par la présence d'une grande quantité de super-oxyde dismutase et de catalase sécrétée par cette espèce qui la protège contre la toxicité du pyocyanine (Price-Whelan *et al.*, 2007).

**Tableau 12:** Activité antimicrobienne de la pyocyanine sécrétée par la souche *Pseudomonas aeruginosa* (P8)

Les souches pathogènes testées	Diamètre des zones d'inhibitions (mm)
<i>Shigella sonnie</i> PH 001	11.5 ± 0.70
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	11 ± 0.000
<i>Escherichia coli</i>	10 ± 0.07
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	10 ± 0.057
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	9 ± 0.057
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0 ± 00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12 ± 0.3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	13 ± 0.02
<i>Staphylococcus aureus</i>	13 ± 0.06
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	14 ± 0.057
<i>Candida albicans</i>	25 ± 0.042
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	26 ± 0.057

- **Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 13, les valeurs de la CMI de la pyocyanine sont comprises entre 16 et 64 µg/ml. Les souches cibles les plus sensibles à la pyocyanine sont les souches fongiques, *Candida albicans* d'origine clinique et *Candida albicans* ATCC 10231 avec une CMI de l'ordre de 16 µg/ml.

Cette molécule présente aussi une haute activité contre les bactéries à coloration de Gram positive avec une CMI de 32 µg/ml. En revanche, sur les bactéries à coloration de Gram négative, la CMI générée par cette substance est de 64 µg/ml.

Les travaux d'El-Fouly et *al.*, (2015) ont montré que la pyocyanine exhibé un effet négative sur la croissance de *Staphylococcus aureus* avec une CMI de 20 µg/ml par contre envers *Escherichia coli* a été de l'ordre de 50 µg/ml.

**Tableau 13:** Détermination de la CMI de la pyocyanine sur les souches cibles.

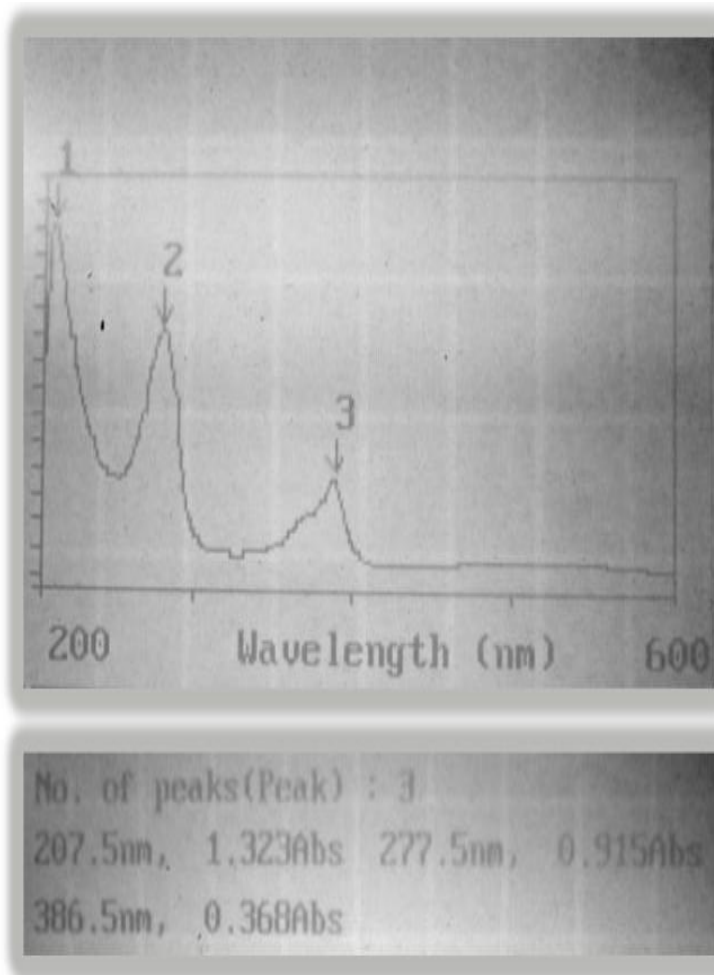
Les souches pathogènes testées	La concentration de la pyocyanine (µg/ml)						CMI (µg/ml)
	08	16	32	64	128	256	
<i>Shigella sonnie</i> PH 001	+	+	+	-	-	-	64
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	+	+	-	-	-	64
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-	64
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	+	+	+	-	-	-	64
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	+	+	+	-	-	-	64
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	+	-	-	-	-	32
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	+	+	-	-	-	-	32
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	-	-	-	-	32
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	+	+	-	-	-	-	32
<i>Candida albicans</i>	+	-	-	-	-	-	16
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	+	-	-	-	-	-	16

## 9. Caractérisation de la pyocyanine par UV-Visible, CCM, FTIR et HPLC

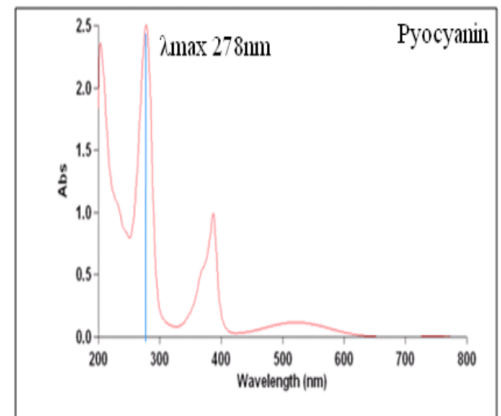
### 9.1 Analyse du Spectre UV-Visible

L'analyse du spectre UV-visible de l'extrait pyocyanique (Fig. 28a) a montré qu'il possède deux pics dans l'UV et un pic dans le visible. Les deux premiers ont des absorbances de 1.323 et 0.995 dans les longueurs d'ondes 207.5 nm et 277.5 nm respectivement, tandis que le pic d'absorption de la partie visible a été détecté à 386.5nm pour une absorbance de 0.368.

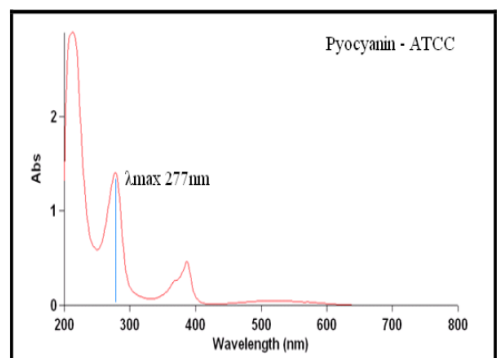
La présence de ces trois pics caractéristiques de la pyocyanine avec une longueur d'onde maximale de 277.5 a été rapportée par les travaux de Kerr *et al.*(1999) et Sundar *et al.*(2013) comme indiquer dans les figures 28b et 28c respectivement.



**Figure 28 a :** Spectre d'absorption de l'extrait de la pyocyanine.



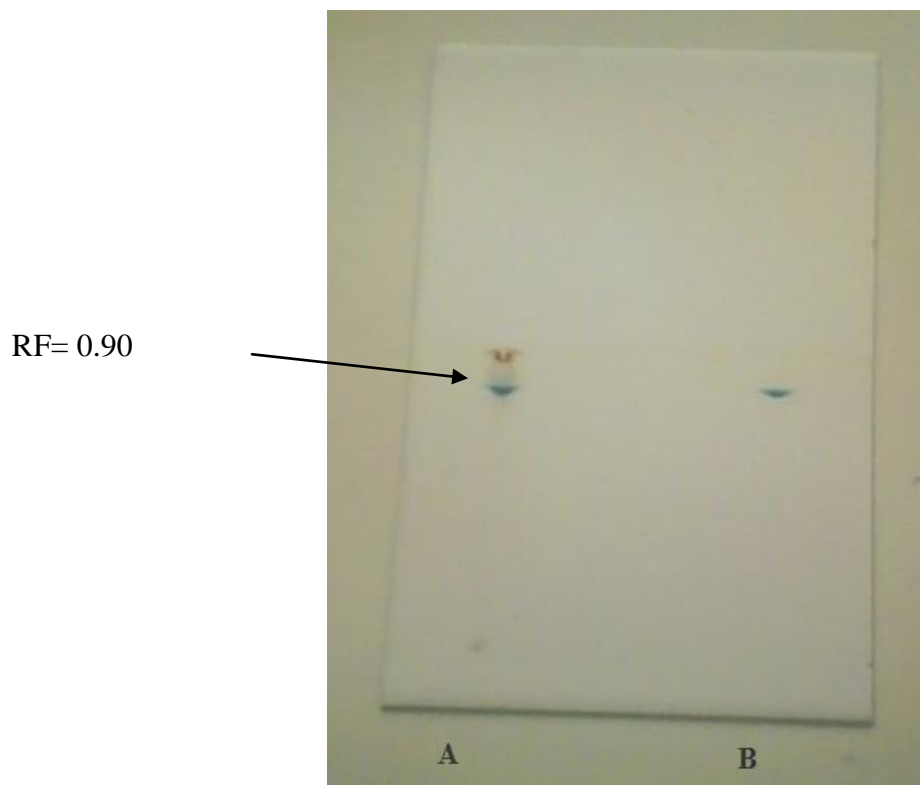
**Figure 28b :** Spectre d'absorption de la pyocyanine (Kerr *et al.*, 1999).



**Figure 28c :** Spectre d'absorption de la pyocyanine (Sundar *et al.*, 2013).

## 9.2 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) de la pyocyanine

L'extrait de la pyocyanine a révélé la présence d'une seule tache de couleur bleu identique avec celle du standard (avec un rapport frontal égale à 0.90) (Fig. 29). Ces résultats sont en concordance avec les travaux de Sudhakar *et al.*(2013) mais avec un rapport frontal différent à cause de la nature de la phase mobile utilisée.



**Figure 29:** Identification de la pyocyanine par CCM.

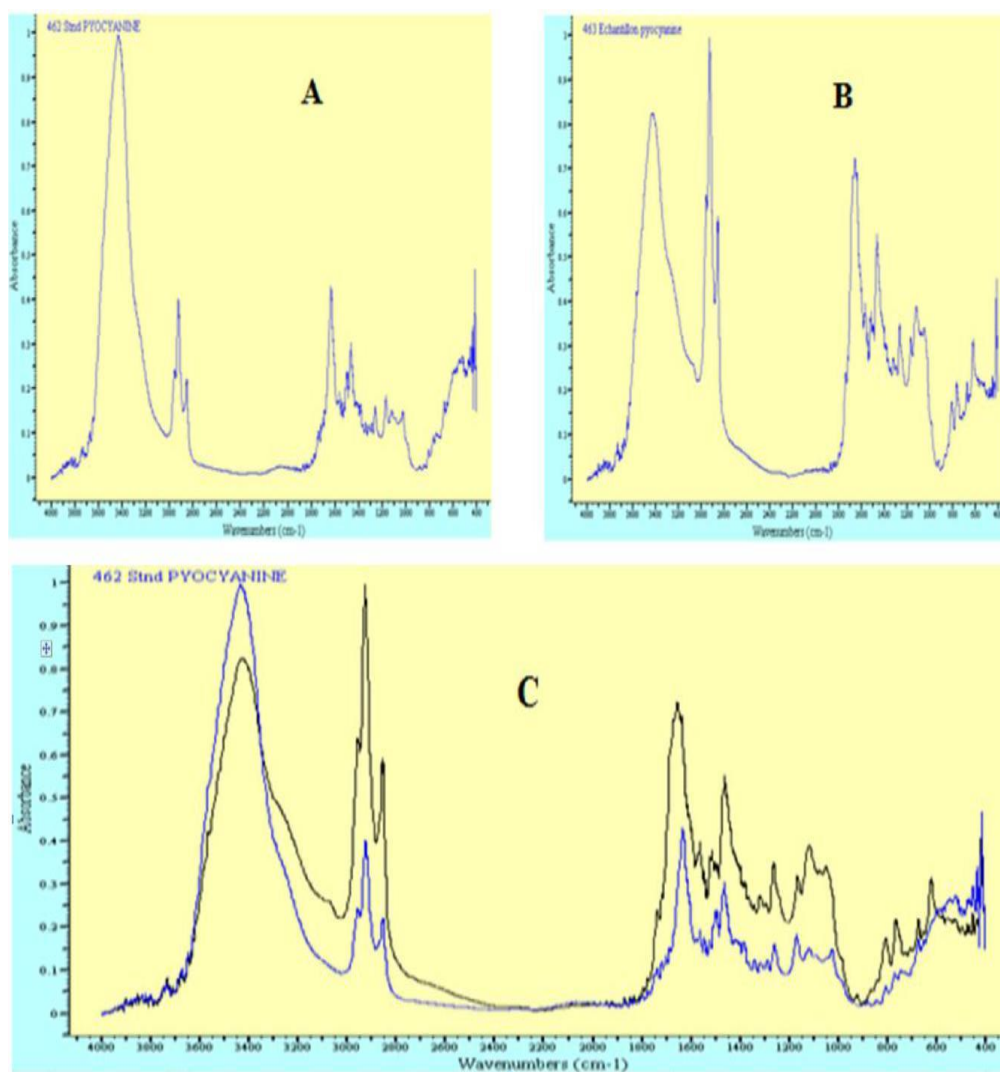
(A) extrait de la pyocyanine, (B) standard de la pyocyanine.

## 9.3 Analyse de la pyocyanine par FTIR

Les spectres IR obtenus représentent les vibrations caractéristiques des différentes liaisons constituant la structure de la molécule étudiée (la pyocyanine) (Fig. 30). La majorité des pics apparaissent dans le domaine 400 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Les bandes d'absorption correspondent à la molécule dont les détails sont les suivants :

- Une bande intense située à 3433  $\text{cm}^{-1}$ , correspondant respectivement à l'élongation asymétrique du groupement O-H de la molécule d'eau ;
- Une bande située entre 2853 et 2922  $\text{cm}^{-1}$ , elle est associée à l'élongation du groupement C-H ;

- Une bande intense située entre  $1634$  et  $1698\text{ cm}^{-1}$ , associée à l'élongation du groupement  $\text{C}=\text{C}$  et  $\text{C}=\text{N}$  respectivement,
- Des bandes situées à  $1458$  et à  $1560\text{ cm}^{-1}$ , associées aux vibrations du cycle Benzoiq̃ue ;
- Une bande située entre  $1286$  et  $1258\text{ cm}^{-1}$ , elle est associée à l'élongation du groupement  $\text{C}-\text{N}$  (Amine primaire) ;
- Une bande située à  $1336\text{ cm}^{-1}$ , elle est associée à l'élongation du groupement  $\text{CO}$  ;
- Une bande située à  $1022\text{ cm}^{-1}$ , elle est associée à l'élongation du groupement  $\text{C}-\text{N}$  (Amine Tertiaire).

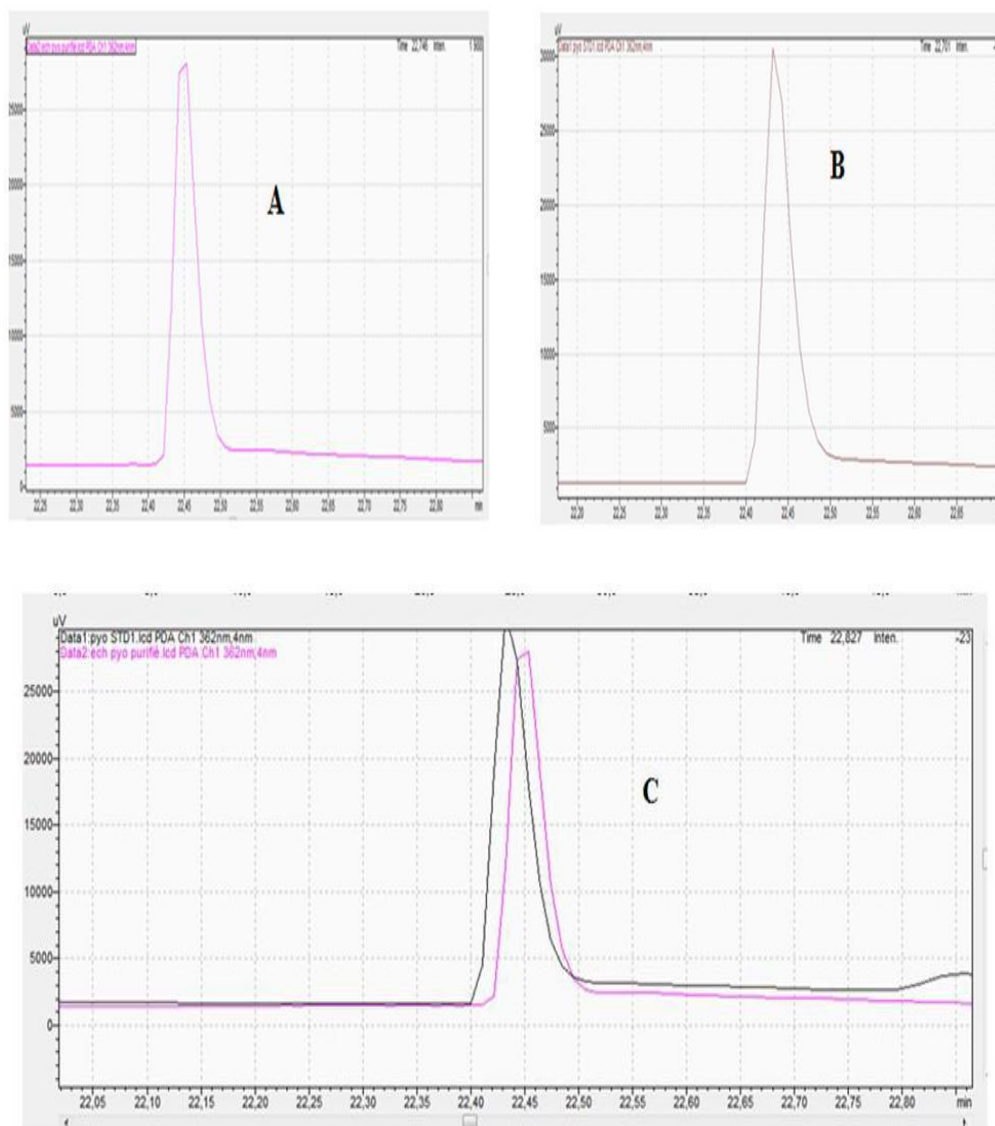


**Figure 30:** Identification de la pyocyanine par FTIR.

(A) standard de la pyocyanine, (B) extrait de la pyocyanine et (C) l'extrapolation des deux graphes A et B.

#### 9.4 Analyse de la pyocyanine par HPLC

L'extrait purifié de la pyocyanine et le standard ont fait l'objet d'une analyse par HPLC. Les injections effectuées ont montré que l'extrait pyocyanique est pur selon le profil obtenu qui ne comporte qu'un seul pic à un temps de rétention de 22.746 min. La superposition du chromatogramme de l'extrait pure avec le standard de la pyocyanine révèle une similitude dans le temps de rétention (Fig. 31).



**Figure 31:** Identification de la pyocyanine par HPLC. (A) extrait de la pyocyanine, (B) standard de la pyocyanine et (C) l'extrapolation des deux graphes A et B.

## 10. Optimisation d'un milieu de culture pour une meilleure production de la pyocyanine

Les résultats de l'effet de variation dans le volume du glycérol et la concentration du Tryptone sur la production de la pyocyanine par l'isolat *Pseudomonas aeruginosa* (P8) sont présentés dans le Tableau 14.

Nous constatons que :

- L'augmentation du volume de glycérol ( $x_1$ ) fait accroître la concentration de la pyocyanine mais ceci varie selon le 2<sup>ème</sup> facteur (concentration de la tryptone). Ainsi, la présence d'un volume important de glycérol et une faible concentration en tryptone permet une meilleure sécrétion de la pyocyanine dans le milieu de culture.
- Une forte concentration en tryptone ( $x_2$ ) est défavorable à l'augmentation de la concentration de la pyocyanine.
- L'interaction  $x_1x_2$  qui correspond à la concentration du tryptone et au volume du glycérol, présente un grand effet sur la sécrétion de la pyocyanine. La meilleure sécrétion est obtenue avec un volume de glycérol de 10 ml et une concentration de tryptone de l'ordre de 2.5g/l.

Les variations de la disponibilité des minéraux et des composées qui fournissent les principaux éléments pour la croissance de la biomasse peuvent avoir des effets affectant la biosynthèse de la pyocyanine.

Dans une étude de l'effet des sources de carbone sur la croissance des *Pseudomonas*, Van Rij *et al.* (2004) ont constaté que l'utilisation du glycérol et l'acide L-pyroglutamique dans les milieux de culture ont donné des niveaux de production élevés de la pyocyanine non corrélées avec le taux de croissance. Ainsi, les sources de carbone les plus stimulantes ne sont pas les mêmes composés organiques abondants dans la rhizosphère, biotope des *Pseudomonas* (Behrends *et al.*, 2009; Rojo, 2010; Valentini and Lapouge, 2012).

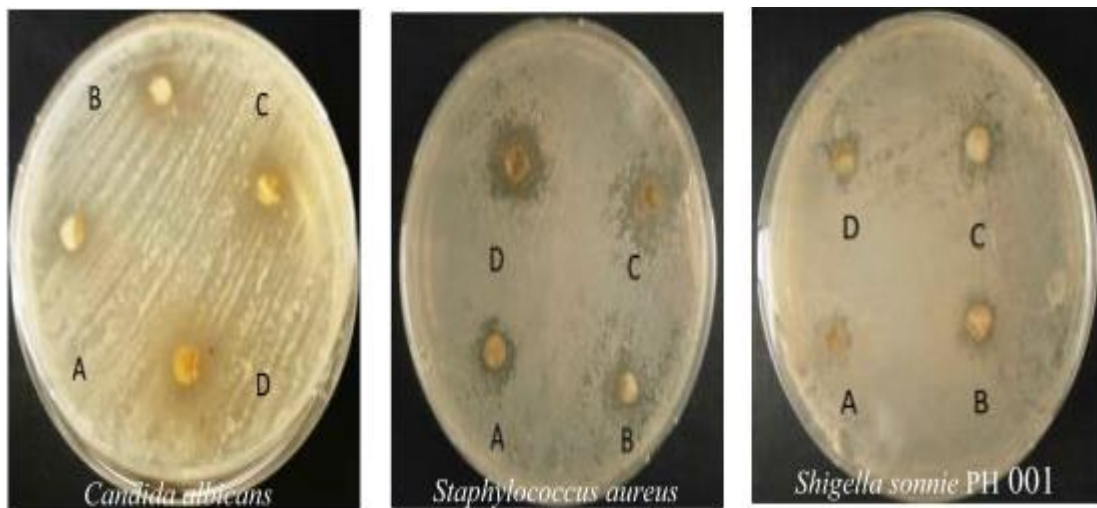
**Tableau 14** : Optimisation de la composition des milieux de culture

<b>Composition des milieux de culture</b>	20g/l tryptone+ 0ml glycerol	20g/l tryptone+ 2.5ml glycerol	20g/l tryptone+ 5ml glycerol	20g/l tryptone+ 10ml glycerol	10g/l tryptone+ 0ml glycerol	10g/l tryptone+ 2.5ml glycerol	10g/l tryptone+ 5ml glycerol	10g/l tryptone+ 10ml glycerol
<b>Absorbance à 520nm</b>	0.860	0.619	0.430	0.455	0.875	0.560	0.543	0.470
<b>Concentration de la pyocyanine (µg/ml)</b>	14.68	10.57	7.34	7.77	14.94	9.56	9.27	8.02
<b>Composition de milieux de culture</b>	5g/l tryptone+ 0ml glycerol	5g/l tryptone+ 10ml glycerol	5g/l tryptone+ 5ml glycerol	5g/l tryptone+ 2.5ml glycerol	2.5g/l tryptone+ 0ml glycerol	2.5g/l tryptone+ 10ml glycerol	2.5g/l tryptone+ 5ml glycerol	2.5g/l tryptone+ 2.5ml glycerol
<b>Absorbance à 520nm</b>	0.740	0.790	0.663	1.115	0.693	1.400	0.770	0.930
<b>Concentration (µg/ml)</b>	12.63	13.49	11.32	19.04	11.83	23.90	13.15	15.88

### 11. Effet antioxydant du L-ascorbate sur l'activité antimicrobienne de la pyocyanine

Afin de déterminer l'effet de l'un des antioxydants hydrosolubles le L-ascorbate ou la vitamine C sur l'effet antimicrobien de la pyocyanine, nous avons testé ce dernier en présence de différentes concentrations de la vitamine C (Fig. 32, tableau 15).

Les résultats obtenus révèlent que l'activité antimicrobienne augmente en fonction de la concentration ajoutée de l'antioxydant. La présence de cette synergie est due à la capacité du L-ascorbate de réagir directement avec les ROS et en particulier  $O_2$ . Les données obtenues sont en concordance avec les travaux de Reszka et al. (2004) qui ont suggéré que le L-ascorbate favorise la production de ROS lorsqu'il réagit avec la pyocyanine.



**Figure 32:** Effet antimicrobien de la pyocyanine (PYO) seul (A) et en présence d'antioxydant L-ascorbate (B) 5 mM, (C) 10 mM et (D) 15mM sur les souches pathogènes cibles.

**Tableau 15:** Effet antimicrobien de la pyocyanine (PYO) seul (A) et en présence d'antioxydant (L-ascorbate 5, 10 et 15 mM) sur les souches pathogènes cibles

Les souches pathogènes cibles	PYO	PYO + 5 mM Vit C	PYO + 10 mM Vit C	PYO + 15 mM Vit C
<i>Shigella sonnie</i> PH 001	9	10	11	12
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	10	11	16	18
<i>Escherichia coli</i>	9	11	15	17
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	12	13	16	18
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	12	13	14	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12	13	13	17
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	11	13	14	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	14	16	18
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	20	21	22	25
<i>Candida albicans</i>	14	16	19	22
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	20	21	22	24

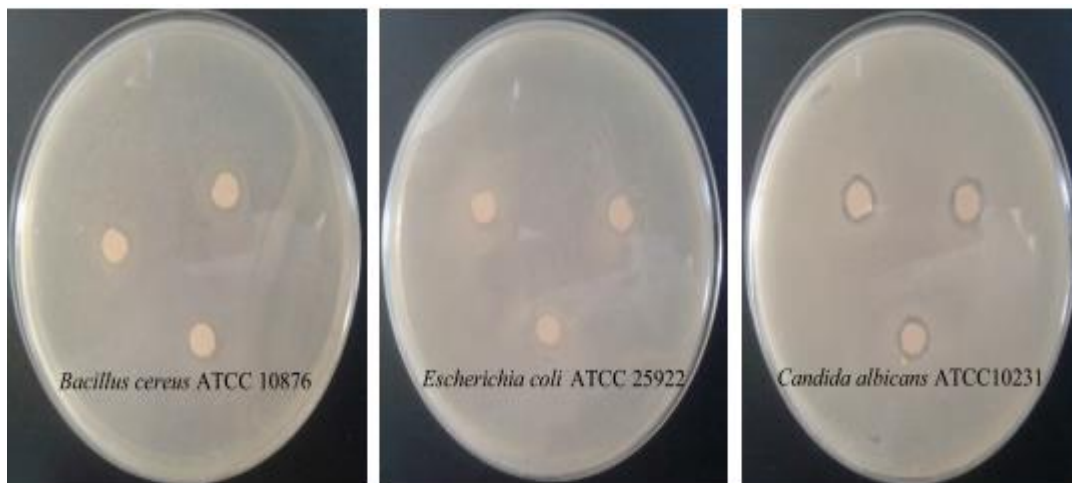
### 11.1 L'activité antimicrobienne de la pyoverdine

Les essais de l'activité antimicrobienne *in vitro* de la pyoverdine produite par la souche de *Pseudomonas fluorescens* (P5) sont illustrés dans les figures ci-dessous. L'absence de la zone d'inhibition autour des disques imbibés de l'extrait de pyoverdine a été remarquée pour l'ensemble des germes cibles à l'exception de la souche fongique *Candida albicans* (sensibilité modérée avec une zone d'inhibition de 9 mm).

L'absence de l'effet inhibiteur de pyoverdine vis-à-vis des bactéries testées est due aux récepteurs spécifiques des sidérophores ferriques dans la membrane externe (Miethke et Marahiel, 2007). En raison de cette spécificité élevée, les bactéries pourraient être capables de reconnaître les sidérophores et par conséquent

une activité inhibitrice ne pourra pas être observée en plus le milieu Muller Hinton est considéré comme un milieu riche en fer.

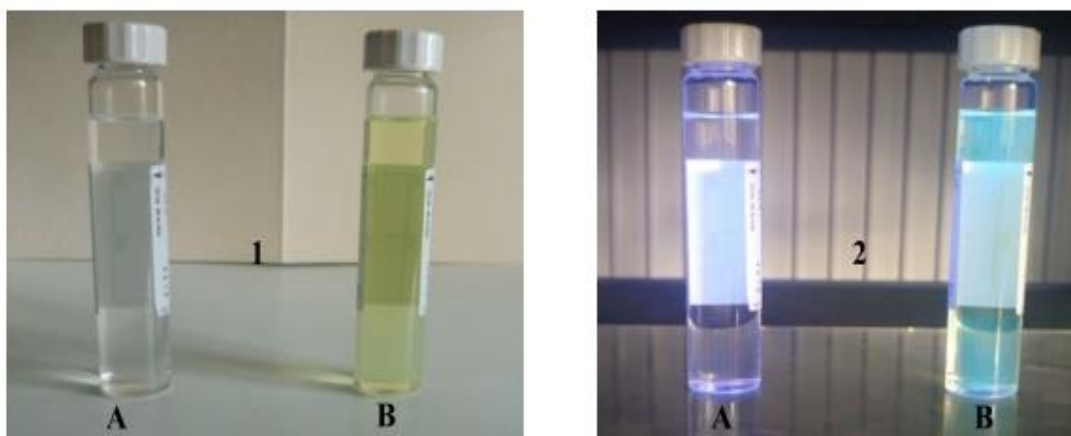
La concentration des sidérophores est un autre facteur qui peut influencer l'activité antimicrobienne. Stintzi *et al.* (2000) ont suggéré que l'augmentation de la concentration des sidérophores sans fer entraîne un taux plus élevé de captivité du fer, ce qui pourrait également contribuer à l'absence d'activités antimicrobiennes.



**Figure 33:** Effet antimicrobien de la pyoverdine sur les souches cibles.

## 12. Caractérisation de la pyoverdine par UV-Visible et FTIR.

La phase organique obtenue après extraction est de couleur jaune verdâtre fluorescente sous la lumière UV (Figure 34). Le résultat obtenu reflète bien la présence de la pyoverdine ainsi selon Meyer (2000) les pyoverdines sont composés de trois parties : un chromophore fluorescent responsable de la couleur jaune verdâtre et de la brillance du pyoverdine, une chaîne latérale contenant un résidu d'acide carboxylique ramifié et une chaîne peptidique.

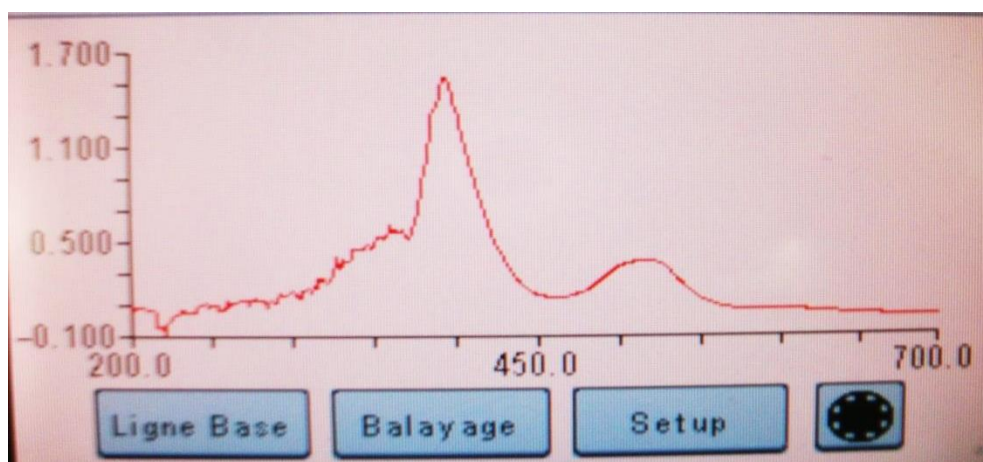


**Figure 34:** Témoin de méthanol (A) et l'extrait de la pyoverdine (B)

(1) à l'œil nu, (2) sous la lampe UV

### 12.1 Analyse de l'extrait de pyoverdine par UV-Visible

L'analyse spectrale UV-Visible (Figure 35) montre que le spectre d'absorption de l'extrait obtenue à un seul pic dans la partie visible (400nm), caractéristique de la couleur jaune verdâtre de la pyoverdine produite par les *Pseudomonas* fluorescents.

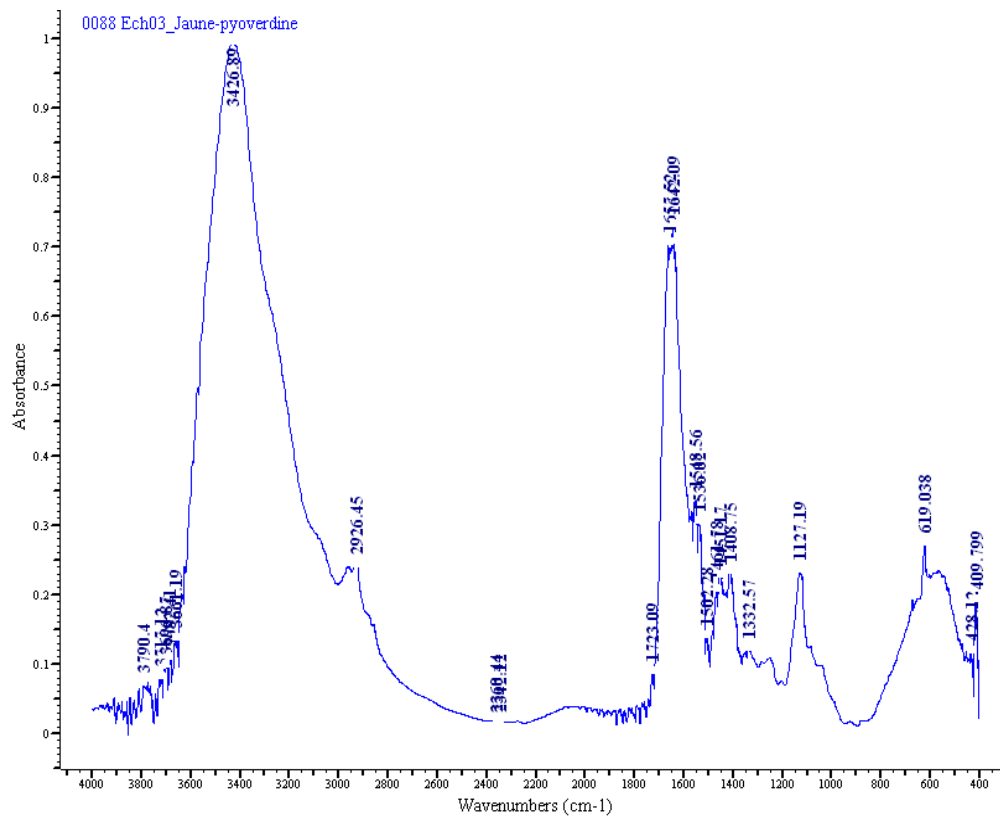


**Figure 35 :** Spectre d'absorption de l'extrait de la pyoverdine.

### 12.2 Identification de la pyoverdine par FTIR

Le spectre IR obtenu représente les vibrations caractéristiques des différentes liaisons constituant la structure de la molécule de la pyoverdine (Fig. 36). La majorité des pics apparaissent dans le domaine 400 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Les bandes d'absorption correspondent à la molécule dont le détail est le suivant :

- Une bande large et intense à  $3400\text{ cm}^{-1}$ , due à la liaison hydrogène O-H et une élongation du groupement N-H pour les amides secondaires ;
- Une bande située à  $1640\text{ cm}^{-1}$ , due à l'élongation du groupement C=O ;
- Une bande détectée à  $1450\text{ cm}^{-1}$  correspond à l'élongation du groupement C=C aromatique ;
- Une bande située à  $1400\text{ cm}^{-1}$  correspond à la déformation du groupement O-H et le groupement =C-O ;
- Une bande située à  $1333\text{ cm}^{-1}$ , due à l'élongation du groupement C=O ;
- Une bande située entre  $1055\text{ cm}^{-1}$  et  $1175\text{ cm}^{-1}$  correspond à l'élongation du groupement C-N.



**Figure 36** : Spectre de l'identification de la pyoverdine par FTIR.

### 13. Effet de la salinité et température sur la production de la pyocyanine chez la souche de *Pseudomonas aeruginosa* (P8)

Les résultats de la production de la pyocyanine à différents taux de NaCl à une température de  $37\text{ °C}$  mentionnés dans le tableau 16 montrent que la croissance et la production de la pyocyanine par la souche *Pseudomonas aeruginosa* (P8) sont

influencées par les différentes concentrations du NaCl. Cette production augmente d'une façon significative dans un intervalle de concentration qui s'étale de 2.5 à 20 g/l.

La meilleure quantité de pyocyanine produite a été détectée à 29.57 µg/ml, pour un milieu contenant une concentration du NaCl de 20 g/l. Une inhibition totale de la production de pyocyanine a été observée dans les milieux où la salinité est supérieure à 20 g/l, contrairement à la capacité de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* (P8) qui est absente dans le milieu avec un taux de chlorure de sodium de 60 g/l.

**Tableau 16:** Effet de la salinité sur la production de la pyocyanine à 37 °C

N°	Concentration du NaCl (g/l) dans le milieu	Concentration de la pyocyanine (µg/ml)	Croissance
01	0	13.37	+++
02	2.5	12.29	+++
03	5	12.5	+++
04	7.5	12.68	+++
05	10	12.74	+++
06	12.5	13.67	+++
07	15	19.01	+++
08	17.5	22.99	+++
09	20	29.57	+++
10	30	0	++
11	40	0	++
12	50	0	+
13	60	0	-
14	70	0	-

+++ : Croissance forte, ++ : croissance moyenne, + : croissance faible, - : absence de croissance.

Par contre, les résultats de la production de la pyocyanine à différents taux de NaCl à une température de 30 °C mentionnées dans le tableau 17 révèlent que la sécrétion de la pyocyanine dans le milieu réactionnel augmente d'une façon significative avec l'ajout croissant du NaCl dans un éventail de concentration de 2.5 jusqu'à 12.5 g/l. L'augmentation de la salinité du milieu au-dessus de 12.5 g/l provoque une diminution graduelle de la production. Cependant, une chute brutale de la production de pyocyanine a été constatée pour un milieu préparé à 30 g/l pour une quantité produite équivalente à 0.99 µg/ml.

**Tableau 17:** Effet de la salinité sur la production de la pyocyanine à 30 °C

N°	Concentration du NaCl (g/l) dans le milieu	Concentration de la pyocyanine (µg/ml)	Croissance
01	0	26.29	+++
02	2.5	27.15	+++
03	5	27.09	+++
04	7.5	36.91	+++
05	10	44.91	+++
06	12.5	51.21	+++
07	15	41.72	+++
08	17.5	37.05	+++
09	20	17.39	+++
10	30	0.99	++
11	40	0	++
12	50	0	+
13	60	0	-
14	70	0	-

+++ : Croissance forte, ++ : croissance moyenne, + : croissance faible, - : absence de croissance.

La production de la pyocyanine étudiée (Tableau 18) à une température d'incubation de 28 °C montre une augmentation proportionnelle avec la salinité du milieu, pour une gamme de concentration qui varie de 2.5 jusqu'à 12.5 g/l. La meilleure production est remarquée dans un milieu contenant 12.5 g/l de NaCl à raison de 45.01µg/ml de métabolite produit. L'augmentation de la salinité pour des concentrations qui s'étalent de 15 à 20 g/l provoque une diminution modérée, contrairement à la concentration de 30 g/l de NaCl qui induit une chute remarquable équivalente à 6.41 µg/ml de pyocyanine.

**Tableau 18:** Effet de la salinité sur la production de la pyocyanine à 28 °C

N°	Concentration du NaCl (g/l) dans le milieu	Concentration de la pyocyanine (µg/ml)	Croissance
01	0	32.16	+++
02	2.5	34.28	+++
03	5	43.05	+++
04	7.5	43.46	+++
05	10	44.89	+++
06	12.5	45.01	+++
07	15	41.99	+++
08	17.5	41.31	+++
09	20	40.11	+++
10	30	27.82	+++
11	40	6.41	++
12	50	0	+
13	60	0	-
14	70	0	-

+++ : Croissance forte, ++ : croissance moyenne, + : croissance faible, - : absence de croissance.

L'ensemble des résultats obtenus montrent que l'isolat testé a sécrété un maximum de pyocyanine (51.21 µg/ml) dans un milieu contenant 12.5 g/l NaCl à une température d'incubation de 30 °C. Ankita et Poonam (2016) ont montré que le maximum de production de pyocyanine (18.98 µg/ml) a été obtenu à une température d'incubation de 30 °C.

Des résultats similaires ont été rapportés par Das *et al.*(2013). L'effet de la salinité sur la production de la pyocyanine a été exhibé par Prabhakaran *et al.*(2014) qui ont confirmé que la meilleure production (25 µg/ml) a été détectée dans des milieux contenant des concentrations de chlorure de sodium de 5 à 10 g/l.

La production des métabolites d'origines microbiennes dépend de plusieurs facteurs environnementaux, mais la fluctuation de la salinité est la plus significative par rapport aux autres facteurs physiques (Pai *et al.*, 2010). La salinité a une influence significative sur le métabolisme, la diversité et les fonctions des communautés microbiennes particulièrement chez les *Pseudomonas* lorsqu'elles occupent plusieurs niches écologiques.

La production de la pyocyanine par *Pseudomonas aeruginosa* est profondément influencée par les facteurs environnementaux. Les travaux de Khan *et al.* (2007) ont montré que *Pseudomonas aeruginosa* a une forte tolérance vis-à-vis le chlorure de sodium et qu'il y avait une légère différence entre les souches isolées des sols, les souches marines et les souches d'origine cliniques dans leurs réponses envers les conditions salines.

La sécrétion de la pyocyanine dans un milieu nutritif préparé sans NaCl est faible par rapport à celle obtenue en présence de cet élément, ce qui peut confirmer que la présence du NaCl ne présente pas une exigence absolue pour la production de la pyocyanine mais elle peut améliorer le niveau de cette production. Tandis que la tolérance vis-à-vis de la salinité dépend de la souche productrice (Priyaja, 2012).

La présence d'une part d'un opéron « *nqr* » codant pour la translocation du sodium par une NADH quinone oxydo-réductase et d'une pompe primaire de sodium d'autre part, peuvent expliquer la survie de *Pseudomonas aeruginosa* dans les milieux hyper-salins (Hase *et al.*, 2001).

#### 14. Effet du pH et de la température sur la production de la pyocyanine chez la souche *Pseudomonas aeruginosa* (P8)

D'après les résultats obtenus (tableau 19), on remarque que la production de la pyocyanine dépend des valeurs du pH du milieu. La meilleure production a été observée dans un milieu étalonné à pH 7 avec une quantité de pyocyanine produite de l'ordre de 32.03 µg/ml. La variation de la quantité de la pyocyanine sécrété dans le milieu réactionnel augmente d'une façon significative avec le pH du milieu acide vers la zone de neutralité, tandis que l'alcalinisation provoque une légère diminution de la production.

**Tableau 19:** Effet du pH sur la production de la pyocyanine à 28 °C

N°	pH	Concentration de la pyocyanine (µg/ml)
01	4	11.39 ± 0.01
02	5	17.34 ± 0.03
03	6	29.22 ± 0.01
04	7	32.03 ± 0.01
05	8	31.54 ± 0.02
06	9	29.96 ± 0.01

L'ensemble des résultats obtenus confirme que la production de pyocyanine est inversement proportionnelle au pH des milieux acides. Elle atteint son maximum à pH égale à 7 avec une production de 29.68 $\mu$ g/ml. Tandis que l'évolution du pH neutre vers l'alcalin provoque une diminution graduelle de la production qui atteint 19.78 $\mu$ g/ml (à pH 9).

**Tableau 20:** Effet du pH sur la production de la pyocyanine à 30°C

N°	pH	Concentration de la pyocyanine( $\mu$ g/ml)
01	4	10.37 $\pm$ 0.01
02	5	18.22 $\pm$ 0.02
03	6	23.51 $\pm$ 0.02
04	7	29.68 $\pm$ 0.03
05	8	24.23 $\pm$ 0.01
06	9	19.78 $\pm$ 0.02

Les résultats mentionnés dans le tableau 20 révèlent que la production de la pyocyanine est affectée par le pH du milieu. On remarque un accroissement proportionnel de la production en fonction du pH dans l'intervalle de 4 à 7. La meilleure concentration de pyocyanine produite est de 14.38  $\mu$ g/ml observée au pH 7. Au-dessus de ce seuil, la sécrétion de la pyocyanine chute d'une façon remarquable.

**Tableau 21:** Effet du pH sur la production de la pyocyanine à 37 °C

N°	pH	Concentration de la pyocyanine( $\mu$ g/ml)
01	4	7.42 $\pm$ 0.02
02	5	9.29 $\pm$ 0.03
03	6	13.04 $\pm$ 0.01
04	7	14.38 $\pm$ 0.01
05	8	12.98 $\pm$ 0.03
06	9	10.68 $\pm$ 0.03

Notre investigation sur l'effet du pH et de la température sur la production de la pyocyanine a permis de suggérer que la souche *Pseudomonas aeruginosa* (P8) sécrète un maximum de ce métabolite dans le milieu King A étalonné à pH7 et soumis à une température d'incubation de 28 °C. Ainsi, nous avons remarqué qu'une légère variation de la température de 28 à 30 °C ne provoque pas une grande différence dans la production. Tandis que la température de 37 °C induit une chute remarquable dans la quantité de pyocyanine produite. La production est plus affectée par les milieux de cultures à pH acides que les milieux à pH basiques.

Nos données sur l'effet de pH et la température confortent les travaux de Liang *et al.*(2011) qui ont constaté que le rendement maximal de production de la pyocyanine par *Pseudomonas aeruginosa* a été obtenu dans un milieu de culture neutre (pH7) sous une température d'incubation de 30 °C. Des résultats similaires ont été reportés par Das *et al.* (2011) avec les mêmes conditions expérimentales. Alors que nos résultats s'opposent en apparence aux travaux d'El-Shouny *et al.* (2011) qui ont suggéré que la production maximale de la pyocyanine a été obtenue à une température de 37 °C.

#### 15. Effets de la salinité et de la température sur la production de la pyoverdine chez la souche *Pseudomonas fluorescens* (P5)

Au cours de notre étude, nous avons testé l'effet des différents taux de chlorure de sodium (NaCl), à une température de 28 °C, sur la production de la pyoverdine. Les résultats dans le tableau 22 montrent que la sécrétion de cette substance par la souche *Pseudomonas fluorescens* (P5) est influencée par l'ajout du NaCl dans le milieu. On remarque que cette production diminue avec l'augmentation de la concentration du NaCl d'une manière inversement proportionnelle.

La meilleure quantité de pyoverdine produite a été remarquée dans un milieu dépourvu de NaCl. Tandis que la plus faible quantité sécrétée a été trouvée dans un milieu contenant 30 g/l du NaCl.

**Tableau 22:** Effet de la salinité sur la production de la pyoverdine à 28 °C

N°	Concentration du NaCl (g/l) dans le milieu	Concentration de la pyoverdine (mM)
01	0	50.43 ± 0.01
02	2.5	47.66 ± 0.03
03	5	36.23 ± 0.02
04	7.5	32.26 ± 0.01
05	10	29.23 ± 0.02
06	12.5	28.47 ± 0.02
07	15	24.11 ± 0.02
08	17.5	20.94 ± 0.04
09	20	19.02 ± 0.11
10	25	16.98 ± 0.01
11	30	14.39 ± 0.03

Nous avons également testé l'effet de la salinité à une température d'incubation à 30 °C. Dans ces conditions, les résultats indiqués dans le tableau confirment l'effet négatif de l'ajout du NaCl sur la production de la pyoverdine. Cette dernière est plus faible dans des milieux contenant des fortes concentrations en NaCl par rapport aux milieux avec une salinité modérée ou exemptée de NaCl.

**Tableau 23:** Effet de la salinité sur la production de la pyoverdine à 30 °C.

N°	Concentration du NaCl (g/l) dans le milieu	Concentration de la pyoverdine (mM)
01	0	49.37 ± 0.03
02	2.5	42.48 ± 0.02
03	5	40.65 ± 0.01
04	7.5	37.66 ± 0.02
05	10	35.98 ± 0.03
06	12.5	33.31 ± 0.01
07	15	29.09 ± 0.02
08	17.5	18.87 ± 0.02
09	20	17.11 ± 0.01
10	25	16.12 ± 0.07
11	30	12.95 ± 0.01

Enfin, nous avons testé l'effet de la salinité à une température d'incubation de 37°C. Les résultats obtenus (Tableau 24) révèlent que l'ajout du NaCl dans le milieu réactionnel provoque une diminution progressive de la production de la pyoverdine dans un intervalle de concentration de 2.5 à 15 g/l de NaCl. Par contre, une chute brutale de la sécrétion a été observée pour des concentrations au-dessous de 15 g/l. La meilleure quantité de pyoverdine produite a été détectée à 44.33 mM, pour un milieu non additionné de NaCl.

**Tableau 24:** Effet de la salinité sur la production de la pyoverdine à 37 °C

N°	Concentration du NaCl (g/l) dans le milieu	Concentration de la pyoverdine (mM)
01	0	44.33 ± 0.02
02	2.5	40.53 ± 0.01
03	5	36.65 ± 0.02
04	7.5	34.62 ± 0.03
05	10	30.96 ± 0.02
06	12.5	29.31 ± 0.02
07	15	26.25 ± 0.01
08	17.5	19.38 ± 0.03
09	20	16.21 ± 0.01
10	25	13.49 ± 0.01
11	30	10.22 ± 0.02

La production de la pyoverdine par la souche de *Pseudomonas fluorescens* (P5) a été effectuée dans le milieu King B, considéré comme un milieu carencé en fer. Meyer et Abdallah (1978) ont rapporté que la production de ce métabolite secondaire a été observée aussi chez d'autres souches de *Pseudomonas* fluorescents telles que : *P. putida*, *P. chlororaphis* et *P. syringae*. La variation dans la température d'incubation ainsi que le taux du NaCl dans le milieu choisi a révélé une fluctuation dans la sécrétion de la pyoverdine.

Les essais effectués suggèrent que la meilleure production de la pyoverdine a été remarquée à une température d'incubation de 28 °C, avec une légère différence dans la sécrétion par rapport à la température de 30 °C. L'augmentation de la température d'incubation du milieu réactionnel à 37 °C provoque une chute remarquable de la production chez la souche testée.

Bhagwat *et al.* (2013) ont rapporté que la meilleure production est obtenue pour une température d'incubation de 25 °C et une diminution de la sécrétion observée à 35 °C. Ils ont rapporté aussi que la température de 15 °C exerce un effet inhibiteur sur la souche productrice.

Les résultats obtenus tout en conservant les températures testées influent sur la fluctuation de la quantité de pyoverdine produite par notre souche qui va diminuer et/ou être complètement inhibés dans les conditions de stress salins.

On remarque que la production de la pyoverdine diminue graduellement avec l'augmentation de la concentration en NaCl. Le surdosage du milieu avec des concentrations qui dépassent 20 g/l provoque une chute brutale de la production de pyoverdine. Malgré la tolérance de la souche *Pseudomonas fluorescens* (P5) au NaCl, les concentrations élevées sont considérées comme totalement inhibitrices de la sécrétion de ce métabolite secondaire. Selon Faddin (1986) des teneurs en NaCl supérieures à 2 % ont des effets délétères sur la production de pigment dans le milieu King B.

### 16. Effet de pH et température sur la production de la pyoverdine chez la souche *Pseudomonas fluorescens* (P5)

Les résultats obtenus (Tableau 25) montrent que la production de la pyoverdine est influencée par le changement de pH. Ainsi, l'augmentation des valeurs de pH dans l'intervalle de 4 à 7 du milieu réactionnel provoque un accroissement de la production qui atteint 50.43 mM à pH neutre. L'alcalinisation du milieu réactionnel réduit la production d'une manière inversement proportionnelle.

**Tableau 25:** Effet de pH sur la production de la pyoverdine à 28 °C

pH	Concentration de la pyoverdine
4	38.14± 0.03
5	41.16± 0.01
6	44.96 ± 0.03
7	50.43± 0.01
8	39.96± 0.02
9	22.62± 0.02

Nous avons donc réexaminé la production de la pyoverdine dans des milieux réactionnels ajustés à différentes valeurs du pH à 30 °C (Tableau 26). Les effets révèlent que la production augmente proportionnellement avec la diminution de l'acidité, pour des valeurs de pH qui varie entre 4 et 7. La meilleure production a été remarquée dans un milieu de pH égal à 7 avec une quantité de pyoverdine de 49.37 mM. Le changement du pH du milieu réactionnel, de la neutralisation vers l'alcalinisation, provoque une diminution de la production qui atteint 36.7 mM pour un milieu de pH 9.

**Tableau 26** : Effet de pH sur la production de la pyoverdine à 30 °C

pH	Concentration de la pyoverdine
4	30.68 ± 0.02
5	41.43 ± 0.03
6	47.72 ± 0.02
7	49.37 ± 0.03
8	44.8 ± 0.08
9	36.7 ± 0.01

Nous avons également testé l'effet de pH sur la production de la pyoverdine à 37 °C (Tableau 27). Les résultats obtenus suggèrent que la production de cette substance est maximale dans un milieu réactionnel à pH neutre. Tandis qu'un environnement légèrement acide ou alcalin provoque un ralentissement dans la sécrétion, alors que le pH du milieu en dehors de l'intervalle de 6 à 8 exerce un effet nettement négatif sur la production.

**Tableau 27** : Effet du pH sur la production de la pyoverdine à 37 °C

pH	Concentration de la pyoverdine
4	30.66 ± 0.01
5	37.17 ± 0.02
6	43.56 ± 0.02
7	44.33 ± 0.01
8	41.26 ± 0.03
9	28.87 ± 0.01

Les pyoverdines produites par les espèces de *Pseudomonas* sont affectées par les facteurs environnementaux. Dans ce contexte, nous avons testé la production de la pyoverdine par la souche *Pseudomonas fluorescens* (P5) dans des milieux réactionnels à différentes valeurs de pH et température. L'ensemble des résultats obtenus suggèrent que le milieu réactionnel à pH neutre sous une température d'incubation de 28 °C représente les conditions optimales de la sécrétion de pyoverdine.

Sayed *et al.* (2004) ont également rapporté que l'optimum de la production de ce métabolite chez *P. fluorescens* a été obtenu dans un milieu à pH neutre.

Cependant, la production chute d'une façon remarquable dans les conditions acides et alcalines. Agate *et al* (1988) ont rapporté que la diminution de la production des pyoverdines sous un milieu à pH acide est due à la solubilisation du fer ayant pour résultat l'inhibition de la sécrétion. Tandis que le niveau réduit de la pyoverdine dans les milieux avec des pH supérieurs à 7 peut être dû à l'instabilité de la structure du sidérophore dans les solutions alcalines (Meyer and Abdallah.,1978; Marek *et al.*,1997).

### **17. Évaluation de l'activité hémolytique de l'extrait de la phénazine et la pyocyanine vis-à-vis des globules rouges humains.**

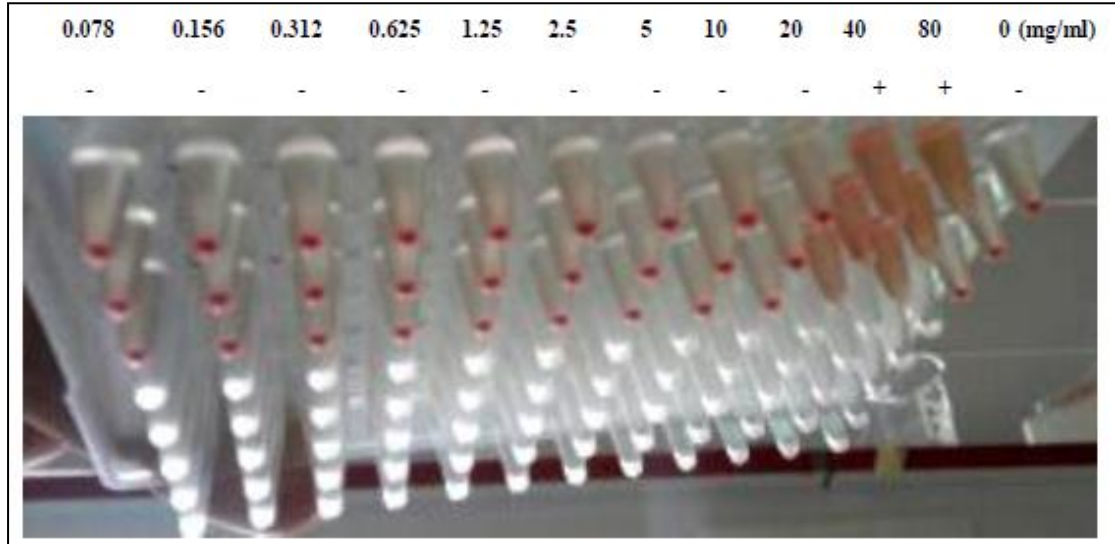
Dans cette partie, nous avons testé les métabolites qui ont montré une activité antimicrobienne importante. La cytotoxicité de l'extrait de la phénazine et la pyocyanine est suivie en observant l'apparition d'une plage de lyse au niveau des cupules de la microplaque, ce qui indique la fuite d'hémoglobine intracellulaire des hématies humaines.

Les résultats relatifs à la lyse des globules rouges en présence d'extrait de la phénazine après une incubation de 90 min à une température de 37 °C sont présentés dans la figure 37. Nous constatons que l'activité hémolytique dépend de la concentration finale du métabolite testé. En effet, la lyse des hématies a été détectée avec une concentration de l'extrait phénazinique qui dépasse 20 mg/ml. En revanche, aucune lyse des globules rouges n'est observée en présence de ce métabolite à des concentrations qui varie de 0.078 jusqu'à 20mg/ml.

En ce qui concerne l'effet de la pyocyanine sur la lyse des hématies humaines, les résultats sont présentés sur la figure 38. À une concentration finale de 10 mg/ml, on remarque une plage de lyse. Aucune lyse n'est observée pour des concentrations qui varient de 0.078 à 5 mg/ml.

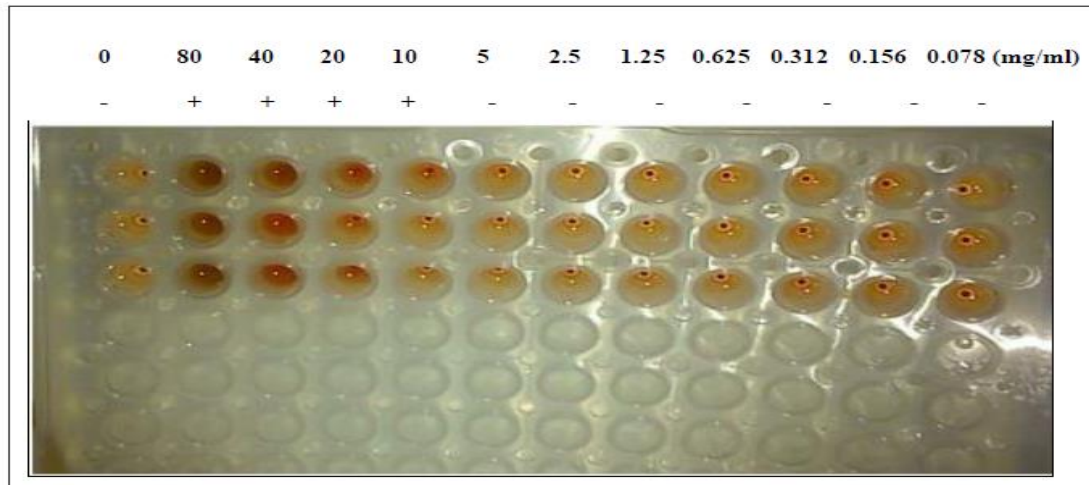
Ce résultat est en accord avec les travaux de Samanta *et al.*, (2008) qui ont également observé que la pyocyanine ne provoque aucune lyse à des concentrations inférieures à 10 mg/ml.

D'après les résultats obtenus, on constate que la pyocyanine est plus toxique que l'extrait phénazinique. Cela est dû à la nature de la composition de ce dernier qui englobe quatre composés avec des fractions différentes selon l'analyse de caractérisation effectuée.



**Figure 37:** Activité hémolytique de l'extrait de phénazine

(+ : présence d'hémolyse, - : absence d'hémolyse)



**Figure 38:** Activité hémolytique de la pyocyanine

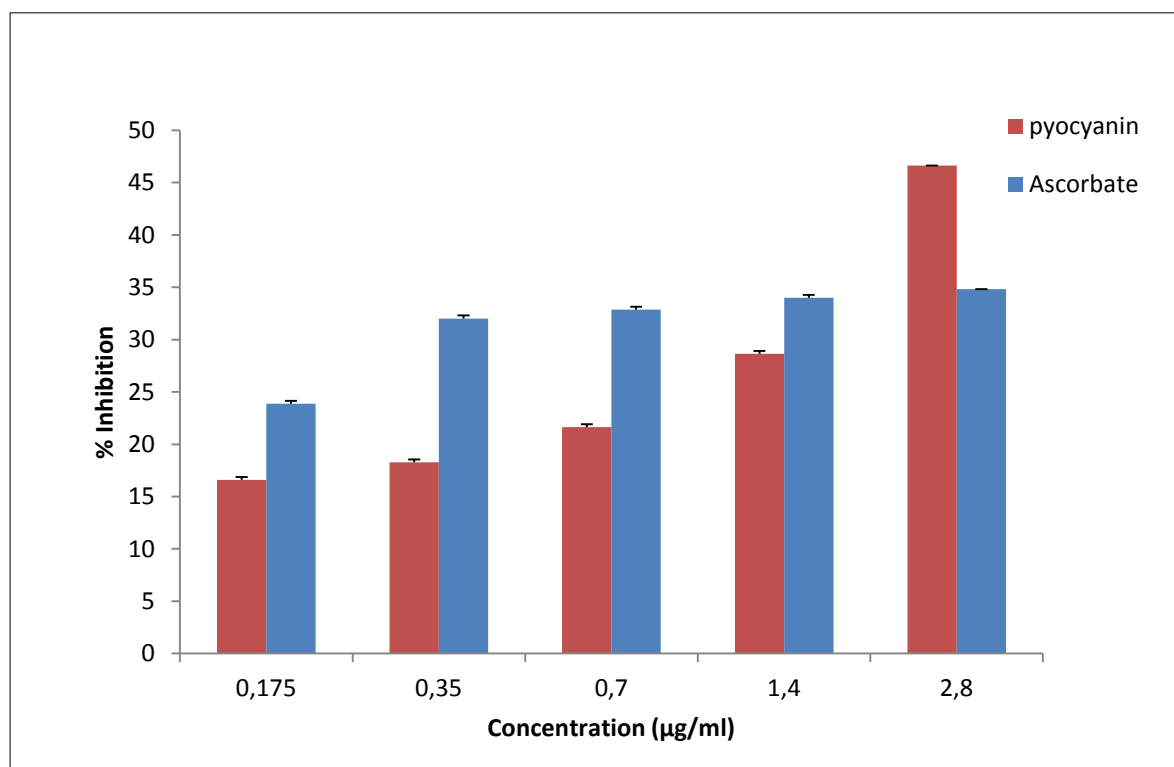
(+ : présence d'hémolyse, - : absence d'hémolyse)

## 18. Mesure du pouvoir anti-radicalaire de la pyocyanine

L'examen de l'activité antioxydante de l'extrait de pyocyanine par la méthode du DPPH présente une activité supérieure à celle de l'acide ascorbique (antioxydant de référence). Le résultat de l'efficacité antioxydante est exprimé en IC50. Rappelant qu'IC50 est la concentration de l'extrait méthanolique exprimé en  $\mu\text{g/ml}$  qui réduit 50 % de la solution DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) à une concentration bien déterminée (oxydant très fort).

L'activité antioxydante de la pyocyanine augmente proportionnellement avec les concentrations d'échantillons (Fig. 39). La valeur IC50 déterminée était de  $3.15 \mu\text{g/ml}$  contre  $7.79 \mu\text{g/ml}$  pour l'acide ascorbique.

Les résultats obtenus de l'activité antioxydante de la pyocyanine sont en concordance avec ceux des travaux de Laxmi and Bhat (2016) avec une différence en IC50 ( $0.2 \mu\text{g/ml}$  vs  $3.15 \mu\text{g/ml}$ ). La différence de l'activité réductrice importante de la pyocyanine par rapport à l'ascorbate peut être due à la qualité de l'extrait et aux conditions expérimentales.



**Figure 39:** Le pouvoir anti-radicalaire de la pyocyanine par le test DPPH.

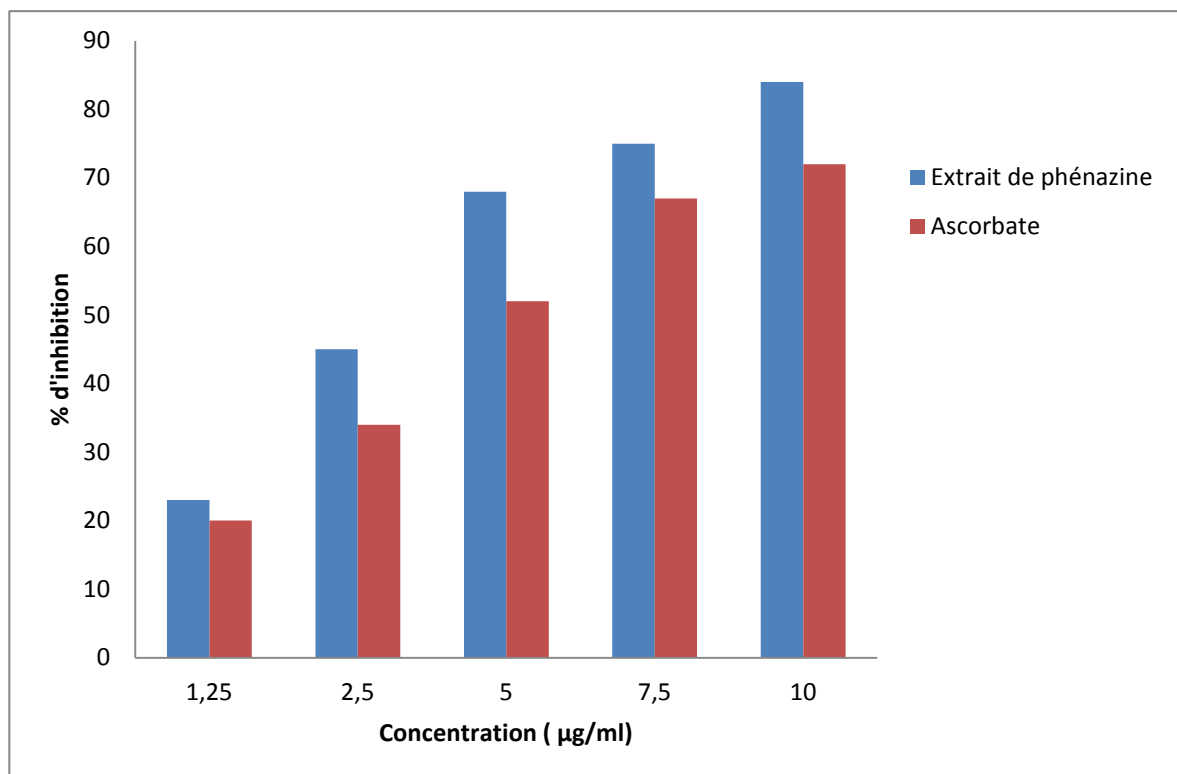
### 19. Mesure du pouvoir anti-radicalaire de l'extrait de phénazine

Le test DPPH effectué pour l'extrait de phénazine a révélé que le potentiel antioxydant devient plus élevé avec l'augmentation de la concentration de l'extrait utilisé. Une réduction de 50 % de l'absorbance qui représente IC50 a été obtenue à 3 µg/ml, alors que celle de l'acide ascorbique (standard) a été déterminée à 5 µg/ml.

Les résultats obtenus (Fig. 40) de l'activité antioxydante de l'extrait de phénazine sont en concordance avec les travaux de Charyulu *et al.* (2012). A la lumière de nos résultats, on remarque une similitude dans les valeurs d'IC50 pour les deux métabolites testés (la pyocyanine et l'extrait de phénazine) ; cela peut être due à la nature de ces deux derniers qui sont de la même famille et contient une structure de trois noyau cyclique communs (Mentel *et al.*, 2009; Seeger *et al.*, 2011).

L'évaluation du pouvoir antioxydant des métabolites obtenus dans cette partie de travail à pour objective principale de réduire le niveau de stress oxydative et d'éliminer les radicaux libres qui peuvent endommager les cellules vivantes, y compris les membranes cellulaires, les lipides, les protéines et les acides nucléiques (Jovanovic *et al.*, 2012).

Le test DPPH est le plus utilisé dans l'évaluation du pouvoir anti-radicalaire par rapport aux autres méthodes ; cela est due au facteur temps qui est plus court en le comparant avec ces dernières ainsi que la réduction de DPPH est indépendante des activités enzymatiques (Lee *et al.*, 1998; Bozin *et al.*, 2008).



**Figure 40:** Le pouvoir anti-radicalaire de l'extrait de phénazine par le test DPPH.

## 20. La recherche des antibiotiques chez les isolats de *Pseudomonas* par PCR

Afin d'identifier les gènes responsables de la production des antibiotiques produites par la collection des quinze isolats de *Pseudomonas* choisies.

Des amorces spécifiques pour les gènes *PltC-F/ PltC-R*, *PRND1/ PRND2*, *Phl2ac/ Phl2bc* et *PCA2a/ PCA3b* codant pour la pyoluteorine, la pyrrolnitrine, la 2,4-Diacetyl-phloroglucinol et la phénazine carboxylate respectivement ont été choisis (tableau 4).

- **La recherche de la pyoluteorine**

L'électrophorèse des produits PCR amplifiés par les amorces PltC-F/ PltC-R n'a révélé aucune bande correspondante au gène responsable de la production de la pyoluteorine (Fig. 41), ce qui suggère que l'activité antagoniste des isolats sélectionnés est due à d'autres substances inhibitrices.



**Figure 41:** Amplification du gène codant pour la pyoluteorine chez les isolats de *Pseudomonas*.

- **La recherche de la pyrrolnitrin**

L'analyse par PCR des gènes codant pour la pyrrolnitrine a montré la présence d'une bande avec une taille approximative de 800 paires de base chez les deux isolats P13 et P14 (Fig. 42). La présence de ce fragment suggère que ces bactéries contiennent le gène responsable de la biosynthèse de cet antibiotique. La détection des bandes avec des tailles qui varient entre 600 à 700 paires de base reflète la présence de la pyrrolnitrine dans le génome des isolats P10, P11, P12, P16 et P19. La différence dans la taille peut être expliquée par une amplification non complète qui est due aux plusieurs facteurs (la nature de l'amorce utilisé, le choix de la température d'hybridation, etc).



**Figure 42:** Amplification du gène codant pour la pyrrolnitrin chez les isolats de *Pseudomonas*.

- **La recherche du 2,4-Diacetylphloroglucinol**

L'analyse électrophorétique des produits de la PCR amplifié par les amorces Phl2ac / Phl2bc montre la présence des bandes de taille approximative de 745paires de base chez quelques isolats étudiés (P8, P11, P17 et P19) (Fig. 43).

L'apparition de ces fragments confirme l'existence de la séquence génique codant pour la 2,4-Diacetylphloroglucinol. La présence des gènes responsable de la production de la pyrrolnitrine et la 2,4-Diacetylphloroglucinol chez les mêmes isolats ne confirme pas l'existence du gène codant pour la pyoluteorine. Cette observation est contradictoire avec les travaux de Souza *et al.* (2003) et Brodhagen *et al.*(2004).



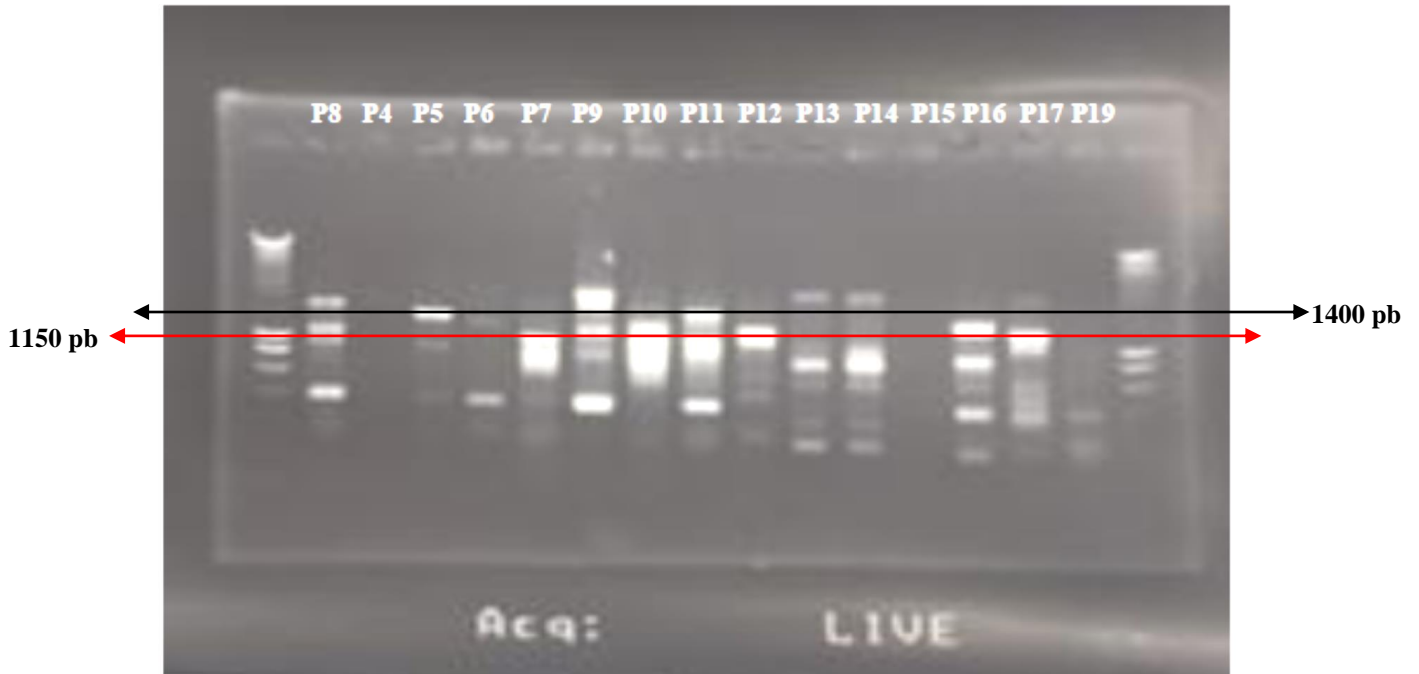
**Figure 43:** Amplification du gène codant pour la 2,4-Diacetylphloroglucinol chez les isolats de *Pseudomonas*.

- **La recherche de la phénazine carboxylate (PCA)**

La phénazine carboxylate est un autre important métabolite secondaire qui joue un rôle d'un antibiotique. L'étude de l'existence du gène responsable de la production de ce dernier chez les isolats sélectionnés a révélé la présence des bandes avec deux tailles différentes 1150 et 1400 paires de base pour les isolats (P8, P9, P10, P12, P17) et (P5 et P11) respectivement (Fig. 44).

Sept gènes sont impliqués dans la synthèse de PCA, et les locus biosynthétiques des phénazines sont bien observés dans les espèces de *Pseudomonas*, ce qui explique que les fragments détectés sont spécifiques pour le gène responsable de la sécrétion de la phénazine carboxylate (Cornea *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2006).

L'absence des bandes chez les autres isolats est peut être due aux conditions d'amplification et à l'amorce utilisée qui est incapable de s'accrocher dans la séquence cible ce qui reflète la diversité génétique des *Pseudomonas* étudiés.



**Figure 44:** Amplification du gène codant pour la phénazine carboxylate (PCA) chez les isolats de *Pseudomonas*.

L'objectif de cette étude est d'évaluer les cibles géniques responsables de la production des antibiotiques chez l'ensemble des *Pseudomonas* sélectionnés. Les résultats obtenus montrent une grande variabilité génique entre les *Pseudomonas* producteurs d'antibiotiques. Ceci est relaté à la nature et le degré de salinité de chaque sol étudié. Des recherches antérieures dévoilent qu'il existe un certain nombre de *Pseudomonas* qui peuvent produire plusieurs antibiotiques.

Plusieurs travaux ont également montré qu'il existe des variations dans les génotypes de *Pseudomonas* qui produisent des antibiotiques selon leur capacité à coloniser la rhizosphère (Bergsma-Vlami *et al.*, 2005).

Le gène *prnC* codant pour la pyrrolnitrine a été détecté chez les deux souches P13 et P14 identifiées comme *Pseudomonas putida* par contre les gènes *phlD* et *phzCD* ont été détectés uniquement chez une souche de *Pseudomonas aeruginosa* P8 et sept souches de *Pseudomonas fluorescens* (P5, P9, P10, P11, P12, P17, P19).

Jong-Shik *et al.* (2013) ont constaté que les gènes *phlD* et *phzCD* sont facilement détectés chez les souches *Pseudomonas* isolées à partir des biotopes de sols différents alors que les gènes *pltC* sont détectés uniquement autour des racines matures.

# *Conclusion générale*

---

## **Conclusion générale et perspectives.**

Ce travail de thèse a eu pour objectif principal de préciser les propriétés biologiques des métabolites secondaires des *Pseudomonas* originaires des sols salins. La lutte contre de nombreuses maladies, dues aux microorganismes pathogènes, par l'utilisation des substances naturelles sécrétées par des microorganismes bénéfiques (le genre *Pseudomonas* dans notre cas) a été proposée comme une alternative envisagée à l'utilisation intensive et répétée des antibiotiques de synthèse chimique.

Les phénazines sont les principaux pigments qui jouent un rôle crucial dans l'antagonisme direct entre ces bactéries et les microorganismes pathogènes d'origines médicales. Bien que la toxicité des phénazines envers les bactéries et les souches fongiques pathogènes testées ait fait l'objet de nombreuses études.

Notre étude a été réalisée à partir de trois échantillons de sols provenant de la zone de la plaine de Mina (Relizane). L'isolement sur milieu King A a permis d'obtenir 75 isolats qui présentent les caractéristiques morphologiques du genre *Pseudomonas*. Les isolats de *Pseudomonas* obtenus ont subi un screening préliminaire sur milieu King B solide afin d'évaluer le pouvoir antagoniste contre les souches pathogènes cibles choisies. Ainsi, 20 isolats ont présenté une activité antagoniste remarquable.

Les vingt isolats sélectionnés ont fait l'objet d'une identification taxonomique par une approche polyphasique (identification phénotypique, génotypique et par la technique MALDI TOF). Cette étude a permis de rassembler les isolats en quatre espèces différentes à savoir *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. fragi*.

Afin de mieux cerner les propriétés biologiques des métabolites secondaires sécrétées par les *Pseudomonas*, nous avons choisi trois métabolites produits par les souches antagonistes performantes (les phénazines, la pyocyanine et la pyoverdine). Ces derniers sont extraits par différents solvants ensuite caractérisés par les différentes méthodes analytiques à savoir : CCM, spectrométrie, HPLC et FTIR.

Les résultats obtenus ont permis d'élucider que l'extrait de phénazine obtenu contient une mixture de métabolites avec une proportion majeure de la phénazine carboxylate, par contre la pyocyanine a montré une pureté remarquable comme produit seul. L'analyse de l'extrait de la pyoverdine nous a permis de définir l'appartenance de cette substance à la famille des pyoverdines.

Une partie importante de notre étude a eu pour but de caractériser l'effet antimicrobien des substances obtenues. Nous avons examiné cette propriété en utilisant un large panel de microorganismes et les résultats obtenus montrent que l'extrait de phénazine et la pyocyanine possèdent une activité antimicrobienne puissante et à large spectre contre les bactéries et les souches fongiques cibles, contrairement à l'extrait de la pyoverdine qui ne représente aucun effet inhibiteur à l'exception de la souche fongique *Candida albicans* (sensibilité modérée).

Pour expliquer l'effet de différents facteurs environnementaux sur la production de la pyocyanine et la pyoverdine, nous avons testé l'effet de la salinité, le pH et la température sur la sécrétion de ces deux métabolites. Les résultats obtenus suggèrent que la meilleure production de pyocyanine a été remarquée dans le milieu King A liquide étalonné à pH 7 et soumis à une température d'incubation de 28 °C et sous une condition de salinité de 12.5 g/l du NaCl. Par contre le maximum de pyoverdine produit a été obtenu dans un milieu King B à pH 7 dépourvu de salinité et sous une température d'incubation de 28 °C.

Afin de mieux cerner les propriétés biologiques de la pyocyanine et l'extrait de phénazine nous avons examiné l'activité antioxydante et l'activité hémolytique de ces deux métabolites. Les tests effectués montrent que ces deux substances présentent une activité antioxydante remarquable par rapport à l'acide ascorbique utilisé par contre aucune hémolyse n'a été détectée à des concentrations inférieures au 10 mg/ml.

La dernière partie de ce travail est consacrée aux détections géniques des antibiotiques (la pyoluteorine, la pyrrolnitrine, la 2,4-Diacetylphloroglucinol et la phénazinecarboxylate) chez la collection des isolats de *Pseudomonas* étudiés. L'électrophorèse des produits PCR amplifiés révèle la présence des gènes responsables de la production de ces antibiotiques à l'exception du gène codant pour la pyoluteorine qui est absent dans le génome des isolats testés.

Les perspectives qui résultent de ce travail sont nombreuses et multiples. D'un point de vue taxonomique, il serait nécessaire d'effectuer une hybridation ADN/ADN et d'étudier les gènes de ménage (rpoB, rpoD et gyr B) afin d'éviter toute ambiguïté dans la position taxonomique de chaque isolat étudié.

Il serait aussi nécessaire d'étudier d'autres métabolites à effet antimicrobien, ainsi que la synergie et le mode d'action sur les souches pathogènes.

D'un point de vue application médical, il serait intéressant de poursuivre des études *in vivo* pour vérifier l'efficacité antimicrobienne, l'activité anticancéreuse ainsi que la toxicité de chaque métabolite.

Enfin, une étude génique des antibiotiques produites par les *Pseudomonas*, serait importante afin d'améliorer la production et de rechercher une méthodologie adaptée pour modifier les gènes codants pour ces antibiotiques.

*Références  
Bibliographiques*

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdulrudha AS (2011). Effect of pyocyanine extracted from *P. aeruginosa* on other pathogenic bacteria in vitro. *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences* Vol 2, N5, p 60-66.
- Abolfazl, A., R.H. Zabihi, S. Movafegh et A.A.M Hossein (2009). The efficiency of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of two varieties of wheat in salinity condition. *Am. Eurasian J. Sustain. Agric.*, 3(4): 824–828.
- Adekambi T, Drancourt M, Raoult D (2009). The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol* 17:37–45.
- Agate AD, Subramanian CV, Vannuci M (1988). *Mangrove Microbiology. Role of Microorganisms in nutrient cycling of mangrove soils and waters.* New Delhi Published by UNDP/UNESCO regional project research and its application to the management of the mangroves of Asia and the Pacific.
- Albrecht-Gary, A.M., Blanc, S., Rochel, N., Ocacktan, A.Z., and Abdallah, M.A. (1994). Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorganic Chemistry* 33: 6391-6402.
- Allaire M.(2005). Diversité fonctionnelle des *Pseudomonas* producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel. Master Dissertation. Laval Université. France.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J.(1997). Gapped Blast and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Alvarez-Ortega, C. et Harwood, C. S. (2007). Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration. *Mol. Microbiol* 65, 153-165.
- Ameziane, N., Bogard, M. and Lamoril. J. (2005). Extraction et purification de l'ADN et de l'ARN. In : *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique.* Dragos Bobu (ed), Elsevier Masson, Trento Italie, pp. 215-226.

- Ankita Agrawal, H and Poonam Chauhan, B (2016). Effect of cultivation media components on pyocyanin production and its application in antimicrobial property. *International Journal of Current Advanced Research Vol 5, Issue 4, pp 829-833.*
- Auling, G., Busse, H.J., Pilz, F., Webb, L., Kneifel, H. Claus, D (1991). Rapid differentiation, by polyamine analysis, of Xanthomonas strains from phytopathogenic pseudomonads and other members of the class Proteobacteria interacting with plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 223–228.
- Banat, I. M (2000). Les biosurfactants, plus que jamais sollicités, *Biofutur* 198:44–47.
- Bangera, M. G. and Thomashow, L. S., 1996. Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:83–90.
- Bangera, M.G., et L. S. Thomashow (1999). Characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2–87. *Journal of Bacteriology* 181:3155–3163.
- Barakat R (2012). Etude des propriétés biologiques et antimicrobiennes de la pyocyanine, pigment redoxactif produit par *Pseudomonas aeruginosa*. Université de La Rochelle 226 p.
- Baron, S. S. et Rowe, J. J. (1981). Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrob Agents Chemother* 20, 814-820.
- Barreteau H, Bouhss A, Fourgeaud M, Mainardi J-L, Touze T et al (2009) Human- and plant-pathogenic *Pseudomonas* species produce bacteriocins exhibiting colicin M-like hydrolase activity towards peptidoglycan precursors. *J Bacteriol* 191:3657–3664.
- Bartlett, D.H., M. Roberts (2004) Osmotic stress, p. 754-766. In M. Schaechter (ed.), *The desk encyclopedia of microbiology*, Elsevier. Academic Press. Canada.
- Battle, S.E., Rello, J. and Hauser, A.R (2009). Genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 290: 70–78.

- Bazhanov, D. P. and Yatsevich, K. K (2011). Taxonomic Heterogeneity of the Collection Strains of Fluorescent Pseudomonads. *Microbiol.* 80 (1): 89–95.
- Behrends V, Ebbels TM, Williams HD (2009) Time-resolved metabolic footprinting for nonlinear modeling of bacterial substrate utilization. *Appl Environ Microbiol* 75(8):2453-2463.
- Bender C.L., and Rangaswamy V., (1999). Polyketide production by plant-associated pseudomonas. *Ann. Rev. Phytopathol.* 37: 175-196.
- Bergsma-Vlami M., Prins ME., Raaijmakers JM (2005). Influence of plant species on population dynamics, genotypic diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiology Ecology*, 52: 59-69.
- Bhagwat P. K., Kasabe P. J., Jhample S. B. and Dandge P. B (2013). Friendly bacteria propping up legumes development in pesticide contaminated soil. *Int J Pharm Bio Sci* 4(3): (B) 356 – 364.
- Blankenfeldt W (2013). The Biosynthesis of Phenazines in Microbial Phenazine: Biosynthesis, Agriculture and Health Sudhir Chincholkar and Linda Thomashow Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp1-17.
- Blois M.S., (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*(181), pp. 1199- 1200.
- Bonsall, R. F., Weller, D. M. and Thomashow, L. S (1997). Quantification of 2,4 diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. in vitro and in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 951-955.
- Bossis E (1995). Les Pseudomonas fluorescents de la rhizosphère : étude taxonomique et effets sur la croissance de la tomate et du maïs, de la germination à la levée, Thèse de doctorat, Université de Nantes, France, 143p.
- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L (2000). The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* 20: 51-63.
- Botelho, G. R. and Mendonça-Hagler, L. C (2006). Fluorescent *Pseudomonads* associated with the rhizosphere of crops - an overview. *Braz. J. Microbiol.* 37: (4):401- 416.
- Bourret RB, Silversmith RE (2010) Two-component signal transduction. *Curr Opin Microbiol* 13(2):113–115.

- Bozin B., Mimica- dukic N., samojlik I ., Goran A and Igc R (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum L., Alliaceae*). Food Chemistry 111:925-9.
- Braud A, Hannauer M, Mislin GLA, Schalk IJ (2009) The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. Journal of Bacteriology 191: 3517-3525.
- Brisbane PG ,Janik LJ, Tate and RFO Warren ME (1986). Revised structure for the phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens*2-79 (NRRL B-15132). *Antimicrob. Agents Chemo.* 31: 1967-71.
- Briskot G, Taraz K, Budzikiewicz H (1989) Bacterial constituents pyoverdin-type siderophores from *Pseudomonas aeruginosa*. *Liebigs Annalen der Chemie* 37: 375-384.
- Brodhagen. M.. M.D. Henkels and J.E. Loper (2004). Positive autoregulation and signaling properties of pyoluteorin. an antibiotic produced by biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl Environ Microbiol.* 70: 1758-1766.
- Budzikiewicz H (1993). Secondary metabolites from fluorescent *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Reviews* 104: 209-228.
- Campbell, J.I.A., Jacobsen, C.S. and Sorensen, J (1995). Species variation and plasmid incidence among fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from agricultural and industrial soils. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 18: 51-62.
- Cezairliyan B, Vinayavekhin N, Grenfell-Lee D et al (2013). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* phenazines that kill *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog* 9(1):e1003101.doi:10.1371/journal.ppat.1003101.
- Charyulu Madhava,E., Japyesan Subramanian, Gnanamani Arumugam (2012). Antioxidant and antimicrobial profile of a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*: ESR and spectrophotometric methods. *Oxid Antioxid Med Sci* 1(2):119-126.
- Chen Y, Shen X, Peng H, Hu H, Wang W, Zhang X (2015). Comparative genomic analysis and phenazine production of *Pseudomonas chlororaphis*, a plant growth-promoting rhizobacterium. *Genomics Data* 4:33–42.

- Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2003) Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist* 157: 503-523.
- Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2003) Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytol* 157:503–523
- Clarke PH (1982). The metabolic versatility of pseudomonads. *Antonie van Leeuwenhoek* 48:105–130.
- Cornea C. P, Matilda C, Cătălina V, Gabriela P, Narcisa B, Aneta P (2007). Molecular detection of the genes involved in the antifungal properties of some *pseudomonas spp.* Strains. *Bulletin USAMV-CN*. 63 - 64/2007.
- Cornelis P (2010) Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86: 1637–1645.
- Cornelis, P., D. Hohnadel and J.M. Meyer (1989). "Evidence for different pyoverdine-mediated iron uptake systems among *Pseudomonas aeruginosa* strains." *Infect Immun* 57(11): 3491-3497.
- Dangles O., Fargeix G., & Dufour C (2000). Antioxidant properties of anthocyanins and tannins: a mechanistic investigation with catechin and the 3,4, 7-trihydroxyflavylium ion. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions (2)*, pp. 1653–1663.
- Das T, Kutty SK, Kumar N et al (2013). Pyocyanin facilitates extracellular DNA binding to *Pseudomonas aeruginosa* influencing cell surface properties and aggregation. *PLoS ONE* 8(3):e58299.
- De Lorenzo V, Timmis KN (1994). Analysis and construction of stable phenotypes in gram negative bacteria with Tn5 and Tn10 derived mini transposon. *Methods Enzymol* 235:386–405.
- De Maeyer K, D'Aes J, Hua GK et al (2011). N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing signalling in antagonistic phenazine-producing *Pseudomonas* isolates from the red cocoyam rhizosphere. *Microbiology* 157(Pt 2):459–472
- De Souza, J.T., and Raaijmakers, J.M (2003). Polymorphisms within the *prnD* and *pltC* genes from pyrrolnitrin and pyoluteorin producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43: 21–34.
- De Souza, J.T., Weller, D.M. and Raaijmakers, J.M. (2003). Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Phytopathol.* 93: 966–975.

- Degand, N., Carbonnelle, E., Dauphin, B., Beretti, J.L., Le Bourgeois, M., Sermet-Gaudelus, I., Segonds, C., Berche, P., Nassif, X. and Ferroni, A (2008). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3361–3367.
- Del Castillo T, Duque E, Ramos JL (2008). A set of activators and repressors control peripheral glucose pathways in *Pseudomonas putida* to yield a common central intermediate. *J Bacteriol* 190:2331–2339.
- Del Castillo T, Ramos JL, Rodriguez-Harva JJ et al (2007). Convergent peripheral pathways catalyze initial glucose catabolism in *Pseudomonas putida*: genomic and flux analysis. *J Bacteriol* 189:5142–5152.
- Delaney SM, Mavrodi DV, Bonsall RF et al (2001). phzO, a gene for biosynthesis of 2-hydrolyated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30–84. *J Bacteriol* 183:318–327.
- Delorme, S., Lemanceau, P., Christen, R., Corberand, T., Meyer, J.M. and Gardan, L (2002). *Pseudomonas linisp.* nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils. *Int. J.Syst. Evol. Microbiol.* 52: 513–523.
- Demange, P., Wendenbaum, S., Linget, C., Mertz, C., Cung, M.T., Dell, A., and Abdallah, M. A. (1990). Bacterial siderophores: structure and NMR assignment of pyoverdins PaA, siderophores of *Pseudomonas aeruginosa* ATCCC 15692. *Biol. Metals* 3, 155-170.
- Denning GM, Iyer SS, Reszka KJ et al (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* 285:584–592.
- Dieckmann, R., Graeber, I., Kaesler, I., Szewzyk, U. and von Dohren, H (2005). Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the sula ridge by intact-cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 539–548.
- Digat, B. and Gardan, L (1987) Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. *Bull OEPP.* 17: 559-568.
- Dwivedi D, Johri BN (2003). Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation. *Curr Sci* 85:1693–1703.

- Ebbels TM, Williams HD et al (2009) Time-resolved metabolic footprinting for non linear modeling of bacterial substrate utilization. *Appl Environ Microbiol* 75(8):2453–2463.
- Elena G.V and Jorge L (2016). *Pseudomonas: Molecular Phylogeny and Current Taxonomy in Pseudomonas: Molecular and Applied Biology*. Springer Nature .Switzerland, pp518.
- El-Fouly MZ, Sharaf AM, Shahin AAM, El-Bial (2015). Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Rad. Res. Appl. Sci* 8, 36-48.
- El-Shouny, W. A., Al-Baidani, A. R and Hamza, W. T. (2011). Antimicrobial activity of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from surgical wound .infections. *International Journal of Pharmacy and Medical Sciences*, 1, 1-7.
- Espinosa-Urgel M, Kolter R, Ramos JL (2002) Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiology* 148:341–343.
- Essar D.W., Eberly L., Hadero A. & Crawford I.P. (1990) Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchange ability of the two anthranilate synthase and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology* 172, 884-900.
- Faddin, M (1986). *Media for medical bacteria*, p. 652-656. Williams and Wilkins, London.
- Farrow JM 3rd, Pesci EC (2007). Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal. *J Bacteriol* 189(9):3425–3433.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39 : 783–791.
- Fernandez, R.O. and Pizarro, R.A (1997). High performance liquid chromatographic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *J. Chromatogr.* 771(A): 99-104.
- Galan B, Diaz E, Garcia JL (2000). Enhancing desulphurization by engineering a Flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts. *Environ Microbiol* 2:607–694.

- Gardener, B.B. and Fravel, D.R (2002). Biological control of plant pathogens: Research, commercialization, and application in the USA. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2002-0510-01-RV.
- Gasser V, Guillon L, Cunrath O & Schalk IJ (2015) Cellular organization of siderophorebiosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for siderosomes. J. Inorg. Biochem. 148: 27–34.
- Gellatly SL, Hancock REW (2013) *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defences. Pathog Dis 67:159–173.
- Ghassemi, F., A.J. Jakeman, et H.A. Nix. (1995) Salinisation of land and water resources: human causes, extent, management and case studies. Center for resource and environmental studies, The Australian National University, Canberra, Australia. 125 pp.
- Greenhagen BT, Shi K, Robinson H et al (2008) Crystal structure of the pyocyanin biosynthetic protein phzS. Biochemistry 47:5281–5289.
- Gross H, Loper JE (2009) Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. Nat Prod Rep 26:1408–1446.
- Gulick AM & Drake EJ (2011) Structural characterization and high-throughput screening of inhibitors of PvdQ, an NTN hydrolase involved in pyoverdine synthesis. ACS Chem. Biol. 6: 1277– 1286.
- Gurusiddaiah S, Weller DM, Sarkar A et al (1986) Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis var. tritici* and *Pythium* spp. Antimicrob Agents Chemother 29(3):488–495.
- Haas D, Defago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonads*. Nat Rev Microbiol 3:307–319.
- Haas D, Galimand M, Gamper M, Zimmermann A (1990) Arginine network of *Pseudomonas aeruginosa*: specific and global control. In: Silver S, Chakrabarty AM, Glewski B, Kaplan S(eds) *Pseudomonas*: biotransformation, pathogenesis, and evolving biotechnology. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 303–316.
- Hammer K.A., Carson C.F., and Riley T.V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Applied Microbiol, 86: 985-990.
- Hannauer M, Braud A, Hoegy F, Ronot P, Boos A, Schalk IJ (2012a) The PvdRT- OmpQ efflux pump controls the metal selectivity of the iron

- uptake pathway mediated by the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* 14: 1696-1708.
- Hannauer, M., E. Yeterian, L. W. Martin, I. L. Lamont and I. J. Schalk (2010b). “An efflux pump is involved in secretion of newly synthesized siderophore by *Pseudomonas aeruginosa*” *FEBS Lett* 584(23): 4751-4755.
  - Hantke, K. and Braun, V (2000). The art of keeping low and high iron concentrations in balance. In: *Bacterial Stress Responses*. Storz G, Hengge-Aronis R(ed). Washington, DC: ASM Press, pp. 275-288.
  - Hantke, K. (2001). Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 4:172–177.
  - Hase C.C., Fedorova N.D., Galperin M.Y. & Dibrova P.A. (2001) Sodium Ion Cycle in Bacterial Pathogens: Evidence from Cross-Genomic Comparisons. *Microbiology & Molecular Biology Reviews* 65: 353-370.
  - Herbert RB, Holliman FG (1969) Pigments of *Pseudomonas* Species. Part II Structure of aeruginosin B. *J Chem Soc C* 19:2517–2520.
  - Hernandez ME, Kappler A, Newman DK (2004) Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Appl Environ Microbiol* 70(2):921–928.
  - Holliman FG (1969) Pigments of *Pseudomonas* Species. Part 1. Structure and synthesis of aeruginosin A. *J Chem Soc C* 19:2514–2516.
  - Howell CR, Stipanovic RD (1980) Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology* 70:712–715.
  - Ikemoto S, Kuraishi H, Komagata K, Ajuma R, Suto T, Murooka H (1978) Cellular fatty acid composition in *Pseudomonas* species. *J Gen Appl Microbiol* 24:199–213.
  - Jacques, M. A (1994) *Écologie quantitative et physiologie de la communauté bactérienne épiphyllle de *Cichorium endivia* var. *latifolia* L.* Thèse de doctorat, université de Paris-XI, Orsay, 123 p.
  - Jong-Shik Kim, Pauline M. Mele and David E. Crowley (2013). Application of PCR primer sets for detection of *Pseudomonas sp.* functional genes in the plant rhizosphere. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, Vol. 2, N° 1, 8-15.

- Jovanovic VS, Jeancloud T, Predrag D, Lalka D, Emiliya C, Denitsa Y, Andrija S (2012). In vitro antioxidant activity of two 6- (propan-2-YD)-4-methyl-morpholine-2,5-Dionies, *Acta Chim Slov* 59(4): 939-943.
- Kahlon RS (2016). *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology*. Springer Nature .Switzerland, pp518.
- Kaleli I, Demir M, Cevahir N et al (2006) Serum neopterin levels in patients with replicative and nonreplicative HBV carriers. *BMC Infect Dis* 6:157.
- Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I. and Lugtenberg, B(2005) Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.* 7: 1809-1817.
- Karsa, D. R., R. M. Bailey, B. Shelmerdine, et S. A. McCann (1999). In: D.R. Karsa (Ed.), *Overview: a decade of change in the surfactant industry, Industrial Applications of Surfactants. Vol IV*, Royal Society of Chemistry pp.1-22.
- Keel, C., Weller, D.M., Natsch, A., Défago, G., Cook, R.J. and Thomashow, L.S., 1996. Conservation of the 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 552-563.
- Kerr JR, Taylor GW, Rutman A et al (1999) *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1 hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *J. Clin. Pathol* 52, 385-387.
- Khan N.H., Ishii Y., Kimata-Kino N., Esaki H., Nishino T., Nishimura M. & Kogure K. (2007) Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from open ocean and comparison with fresh water, clinical and animal isolates. *Microbial Ecology* 53, 173-186.
- Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J (2012a). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:716–721.
- King, E.D., Ward, M.K. and Raney, D.E (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.

- Kirner, S., Hammer, P.E., Hill, D.S., Altmann, A., Fischer, I., Weislo, L.J., Lanahan, M., van Pee, K.H. and Ligon, J.M., 1998. Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 180(7): 1939-1943.
- Klockgether J, Cramer N, Wielmann L, Davenport CF, Tummler B (2011) *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Front Microbiol Cell Infect Microbiol* 2:150.
- Knight M, Hartman PE, Hartman Z, (1979). A new method of preparation of pyocyanin and demonstration of an unusual bacterial sensitivity. *Anal Biochem* 95:19–23.
- Koch B., Nielsen T.H., Sorensen D., Andersen J.B., Christophersen C., Molin S., Givskov M., Sorensen J., and Nybrose O., (2002). Lipopeptide production in *Pseudomonas* sp. strain DSS73 IS regulated by component regulatory system. *Appl Environ Microbio*, 68: 4509-4516.
- Kung VL, Ozer EA, Hauser AR (2010) The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:621–641.
- Kurachi M (1958) Studies on the biosynthesis of pyocyanin, isolation and determination of pyocyanine. *Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ.* 36: 163-173.
- Lambert RJ and Stratford M (1999) Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *J. Appl. Microbiol.*; 86: 157-64.
- Landa BB, deWerd HAE, McSpadden-Gardener BB & Weller DM (2002) Comparison of three methods for monitoring populations of different genotypes of 2,4- diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere. *Phytopathology* 92: 129–137.
- Lane D J (1990). 16s /23s rRNA sequencing. In: Stachebrant E, Goodfellow M, editors. *Nucleic acid techniques in bacterial systematic*. Chichester United Kingdom: John Wiley and Sonds. pp.1515-175.
- Latour, X. and Lemanceau, P (1997). Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp., *Agronomie*, 17:427–443.
- Latour, X., Corberand, T., Laguerre, G., Allard, F. and Lemanceau, P (1996). The composition of fluorescent *Pseudomonad* populations associated with

roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2449-2456.

- Laxmi M, Sarita and Bhat G (2016). Characterization of pyocyanin with radical scavenging and antibiofilm properties isolated from *Pseudomonas aeruginosa* strain BTRY 1.3 Biotech **6**, 27. DOI 10.1007/s13205-015-0350-1.
- Le Rudulier, D., K. Mandon., L. Dupont., et J.C. Trinchant (2002). Salinity effects on physiology of soil microorganisms, p. 2774-2789. In G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology*. Wiley-Interscience Publication. Canada.
- Lee S.K., Mbwambo Z.H, Chung H.S, L, Games E.J.C, Metha R.G. et al (1998). Evaluation of the the antioxidant potential of natural products. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* 1:35-46.
- Lelliott, R.A., Billing, E. and Hayward, A.C (1966) A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *J. Appl. Bacteriol.* 29: 470–489.
- Liang, H., Duan, J., Sibley, C. D., Surette, M. G., and Duan, K. (2011). Identification of mutants with altered phenazine production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 22-34.
- Liu HM, Zhang XH, Huang XQ, Cao CX, Xu YQ(2008). Rapid quantitative analysis of phenazine-1-carboxylic acid and 2-hydroxyphenazine from fermentation culture of *Pseudomonas chlororaphis* GP72 by capillary zone electrophoresis. *Talanta* 76:276–81.
- Liyana PCM, Shahidi F (2005) Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions. *J. Agr. Food Chem* 53, 429-443.
- Loyer, J.Y (1991) Classification des sols salés : les sols salic. *Cah. Orstom. sér. Pédol.* 26: 51 61.
- Maddula VSRK, Zhang Z, Pierson EA et al (2006) Quorum sensing and phenazines are involved in biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis* strain 30-84. *Microb Ecol* 52(2):289–301.
- Marek-Kozaczuk M & Skorupska A (1997). Physiological parameters influencing of production siderophore by PGPR *Pseudomonas* sp. *Acta Microbiol. Pol.* 46 (2): 157-165.

- Matthijs S, Coorevits A, Gebrekidan TT, Tricot C, Wauven CV, Pirnay JP, De Vos P, Cornelis P (2013) Evaluation of oprI and oprL genes as molecular markers for the genus *Pseudomonas* and their use in studying the biodiversity of a small Belgian River. *Res Microbiol* 164:254–261.
- Mavrodi DV, Blakenfeldt W, Thomashow LS (2006) Phenazine compounds in *fluorescent Pseudomonas* spp.: biosynthesis and regulation. *Annu Rev Phytopathol* 44:417–445
- Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM et al (2001) Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 183:6454–6465.
- Mavrodi DV, Ksenzenko VN, Bonsall RF et al (1998) A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *J Bacteriol* 180:2541–2548.
- Mavrodi DV, Peever TL, Mavrodi OV et al (2010) Diversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway. *Appl Environ Microbiol* 76:866–879.
- Mavrodi, O.V., McSpadden Gardener, B.B., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Weller, D.M. and Thomashow, L.S (2001) Genetic diversity of phlD from 2,4 diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species. *Phytopathol.* 91: 35–43.
- Mazzola M, Cook RJ, Thomashow LS et al (1992) Contribution of phenazine antibiotic synthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Appl Environ Microbiol* 58:2616–2624.
- McSpadden Gardener, B.B. and Fravel, D.R.(2002). Biological control of plant pathogens: Research, commercialization, and application in the USA. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2002-0510-01-RV.
- Mentel M, Ahuja EG, Mavrodi DV et al (2009) Of two make one: the biosynthesis of phenazines. *ChemBioChem* 10:2295–2304.
- Meyer JM (2000) Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch. Microbiol.* 174: 135–142.
- Meyer, J.M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schafer, M. and Budzikiewicz, H. (2008). Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Biometals*, 21: 259–271.

- Meyer, J.M. and Abdallah, M.A (1978) The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107: 319-328.
- Meyer, J.M., Geoffroy, V.A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak, W. and Palleroni, N. (2002). Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2745–2753.
- Meyer, J.M., Gruffaz, C., Tulkki, T. and Izard, D (2007). Taxonomic heterogeneity, as shown by siderotyping, of strains primarily identified as *Pseudomonas putida*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2543–2556.
- Miethke, M. and Marahiel, M.A (2007) Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, [online] Available at: <http://mbr.asm.org/content/71/3/413.full>> [Accessed 10 March 2014].
- Miyata S, Casey M, Frank DW, Ausubel FM, Drenkard E (2003) Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun* 71:2404–2413.
- Morales DK, Grahl N, Okegbe C, Dietrich LEP, Jacobs NJ, Hogan DA(2013) Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *mBio* 4(1):e00526-12. doi:10.1128/mBio.00526-12.
- Mulet M, Lalucat J, Garcí'a-Valde's E (2010) DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol* 12:1513–1530.
- Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H et al (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 4:799–808.
- Nowak-Thompson B, Gould SJ, Kraus J, Loper JE (1994) Production of 2,4-diacetylphloroglucinol by the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens*. *Can J Microbiol* 40:1064–1066.
- Nowak-Thompson, B., Chaney, N., Wing, J. S., Gould, S. J. and Loper, J. E., (1999). Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* 181: 2166–2174.

- Nowak-Thompson, B., Gould, S.J. and Loper, J.E. (1997). Identification and sequence analysis of the genes encoding a polyketide synthase required for pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Gene*, 204:17–24.
- Ozer EA, Jonathan P, Allen, Hauser AR (2014) Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools spine and Agent. *BMC Genomics* 15:737-748.
- Pai S.S., Anas A.A., Jayaprakash N.S., Priyaja P., Sreelakshmi B., Philip R., Mohandas A. & Bright Singh I.S. (2010) *Penaeus monodon* larvae can be protected from *Vibrio harveyi* infection by preemptive treatment of rearing system with antagonistic or non antagonistic bacterial probiotics. *Aquaculture Research* 41: 847-860.
- Palleroni J, Kunisawa R, Comopoulou R, Doudoroff M (1974) Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int J Syst Bacteriol* 23:333–339.
- Palleroni NJ, Kunisawa R, Contopoulou R, Doudoroff M (1973) Nucleic acid homologies in genus *Pseudomonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* 23:333–339
- Palleroni, N.J (2005) Genus I. *Pseudomonas*. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Part B: The Proteobacteria*. Springer, New York, pp. 323–379.
- Palleroni, N.J( 2008) The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In: Cornelis, P.(Ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Belgium, pp. 1–18.
- Palleroni, N.J (1984) Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp. 141–171.
- Parret AHA, De Mot R (2002) Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other proteobacteria. *Trends Microbiol* 10:107–112.
- Parsons JF, Greenhagen BT, Shi K et al (2007) Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 46:1821–1828.
- Parte AC (2014) LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res* 42:D613–D616.

- Paulsen IT, Press CM, Ravel J, Kobayashi DY, Myers GSA et al (2005) Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat Biotechnol* 23:873–878.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H. and Velázquez, E (2009) Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evolution*, **9**: 1132–1147.
- Pierson L, Pierson E (2010) Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1659–1670.
- Pierson, L.S.III and Thomashow, L.S (1992) Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Mol. Plant Microbe-Interact.* **5**: 330-339.
- Pitmani, M. G., et A. Lauchli (2004) Global impact of salinity and agricultural ecosystems, p.3-20. In A. Läuchli, et U. Lüttig (ed.), *Salinity :Environment-plants-molecules*. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
- Pocard J.A., L.T. Smith, G.M. Smith, et D. Le Rudulier (1994) A prominent role for glucosylglycerol in the adaptation of *Pseudomonas mendocina* SKB70 to osmotic stress. *J. Bacteriol.* 176: 6877–6884.
- Prabhakaran P, Puthumana J, Neil SC, Balachandran (2014). Antagonistic effect of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from various ecological niches on *Vibrio* species pathogenic to crustaceans. *J. Coast Life Med* 2(1), 76-84.
- Preetha R, Jose S, Prathapan S, Vijayan KK (2010). An inhibitory compound produced by *Pseudomonas* with effectiveness on *Vibrio harveyi*. *Aquac. Res* 41: 1452-1461.
- Price-Whelan A (2009) Physiology and mechanisms of pyocyanin reduction in *Pseudomonas aeruginosa*. Ph.D. Thesis, California Institute of Technology, USA.
- Price-Whelan A, Dietrich LE, Newman DK (2006) Rethinking secondary metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat Chem Biol* 2:71–78.
- Price-Whelan, A., Dietrich, L. E. et Newman, D. K. (2007). Pyocyanin Alters Redox Homeostasis and Carbon Flux Through Central Metabolic Pathways in *Pseudomonas Aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* 189, 6372-6381.

- Priyaja P (2012). Pyocyanin (5-methyl-1-hydroxyphenazine) Produced by *Pseudomonas aeruginosa* as Antagonist to Vibrios in Aquaculture: Overexpression, Downstream Process and Toxicity Thesis submitted to the Cochin University of Science and Technology In partial fulfillment of the requirements for the award of the degree of Doctor of philosophy in marine biotechnology, pp1-159.
- Ra'oof WM, Latif IAR (2010) In vitro study of the swarming phenomena and antimicrobial activity of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different human infections. *Eur J Sci Res* 47:405–421.
- Raaijmakers. J.M..and D.M. Weller (2001) Exploiting genotypic diversity of 2,4- diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp.: characterization of superior root-colonizing *P.fluorescens* strain Q8r1-96. *Appl Environ Microbiol* 67:2545-2554.
- Rahme LG, Ausubel FM, Cao H et al (2000) Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc Natl AcadSci USA* 97:8815–8821.
- Ramalho, R., Cunha, J., Teixeira, P. and Gibbs, P. A (2002) Modified pseudomonas agar: new differential medium for the detection/ enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water. *J. Microbiol. Meth.* 49 : 69–74.
- Ramette, A., Frapolli, M., Fischer-Le Saux, M., Gruffac, C., Meyer, J.M., Défago, G., Sutra, L. and Moëgne-Loccoz, Y(2011) *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl.Microbiol.* 34: 180–188.
- Rane MR, Sarode PD, Chaudhari BL, Chicholkar SB (2007a) Foliar application of *Pseudomonas* metabolite protects *Capsicum annum* (chilli) from fungal phytopathogens. *Bionano Frontier* 1:46–53.
- Rehme Bernd H.A (2008). *Pseudomonas*. Model organism, Pathogen, Cell Factory. Edited by WILEY-VCH Verlag GmbH and Co.KGaA. P: 144.
- Reszka, K. J., O'Malley, Y., McCormick, M. L., Denning, G. M. et Britigan, B. E. (2004). Oxidation of pyocyanin, a cytotoxic product from *Pseudomonas aeruginosa*, by microperoxidase 11 and hydrogen peroxide. *Free Rad Biol Med* 36, 1448-1459.

- Rogers, M.E., A.D. Craig, R. Munns, T.D. Colmer, P.G.H. Nichols, C.V. Malcolm, E.G. Barrett-Lennard, A.J. Brown, W.S. Semple, P.M. Evans, K. Cowley, S.J. Hughes, R. Snowball, S.J. Bennett, G.C. Sweeney, B.S. Dear et M.A. Ewing (2005) .The potential for developing fodder plants for the salt-affected areas of southern and eastern Australia: An overview. *Aust J. Exp. Agr.* 45:301–329.
- Rojo F (2010) Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev* 34(5):658–684.
- Sakhtah. H, Price-Whelan. A. and Dietrich .L. E. P (2013). Regulation of Phenazine Biosynthesis in Microbial Phenazine: Biosynthesis, Agriculture and Health Sudhir Chincholkar and Linda Thomashow Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp19-43.
- Samanta Saha, Thavasi. R and Jyalakshmi. S (2008). Phenazine pigment from *Pseudomonas aeruginosa* and their application as antimicrobial agent and food colourants. *Research Journal of Microbiology* 3(3): 122-128.
- Sands David C, Gleason Frank H, and Hildebrand (1967). Cytochromes of *Pseudomonas syringae*. *Journal of bacteriology* vol.94,N5, p.1785-1786.
- Santos SR, Ochman H (2004) Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. *Environ Microbiol* 6:754–759.
- Saosoong, K., W. Wongphathanakul, C. Poasiri and C. Ruangviriyachai (2009). Isolation and analysis of antibacterial substance produced from *P. aeruginosa* TISTR 781. *KKUS J.*, 37: 163–172.
- Sayyed R Z, Badgujar MD, Sonawane H M, Mhaske M M and Chincholkai B (2004) Production of microbial iron chelator (siderophores) by fluorescent pseudomonads. *Indian journal of Biotechnology* 4, pp 484-490.
- Schalk I.J., 2008. Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: specificities and characteristics of the pyoverdine pathway. *J Inorg Biochem*, 102: 1159-1169.

- Schalk IJ & Guillon L(2013a). Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. *Amino Acids* 44 : 1267–1277.
- Schalk, I. J. and Guillon, L (2012b). “Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis” *Environ Microbiol.*
- Scotta C, Gomila M, Mulet M, Lalucat J, Garcí'a-Valde's E (2013) Whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry and multilocus sequence analysis in the discrimination of *Pseudomonas stutzeri* populations: three novel genome vars. *Microb Ecol* 66:522–532.
- Seeger K, Flinspach K, Haug-Schifferdecker E et al (2011)The biosynthetic genes for prenylated phenazines are located at two different chromosomal loci of *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042. *Microb Biotechnol* 4(2):252–262.
- Shanmugaiah V, Mathivanan N, Varghese B (2010) Purification, crystal structure and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a growth-promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. *J Appl Microbiol* 108:703–711.
- Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC, Levy SB, Jackson RW (2011) *Pseudomonas* genomes:diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* 35:652–680.
- Sleator, R.D., C. Hill (2001). Bacterial osmoadaptation : the role of osmolytes bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 49-71
- Smirnov V, Kiprianova E (1990) Bacteria of *Pseudomonas* genus. *Naukova Dumka, Kiev* Sonnleitner E, Haas D (2011) Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:63–79.
- Soberon-Chavez, G., F. Lépine, et E. Déziel (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68:718-725.

- Sonnleitner E, Haas D (2011) Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol Biotechnol* 91(1):63–79.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kampfer P, Maiden MCJ, Nesme X, Rossell o Mora R, Swings J, Truper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1043–1047.
- Stanier, R.Y, Palleroni, N.J. and Doudoroff, M (1966) The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43: 159-271.
- Stintzi, A., Barnes, C., Xu, J. and Raymond, K.N (2000) Microbial iron transport via a siderophore shuttle: a membrane ion transport paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [e-journal] 97(20), pp. 10691-10696. Available through: Universiti Tunku Abdul Rahman website <http://library.utar.edu.my> [Accessed 27 March 2014].
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P et al (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406:959–964.
- Sudhakar T, Karpagam S, Shiyama S (2013). Analysis of pyocyanin compound and its antagonistic activity against phytopathogens. *Int. J. Chem. Tech. Res* 5, 1101-1106.
- Sundar Amurthy Karpagam, Thukkaram Sudhakar and Muthukrishnan Lakshmipathy (2013). Microbicidal response of pyocyanin produced by *p. aeruginosa* toward clinical isolates of fungi. *Int J Pharm Pharm Sci, Vol 5, Issue 3: 870-873*.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary.
- Tayeb LA, Lefevre M, Passet V, Diancourt L, Brisse S, Grimont PAD (2008) Comparative phylogenies of Burkholderia, Ralstonia, Comamonas, Brevundimonas and related organisms derived from rpoB, gyrB and rrs gene sequences. *Res Microbiol* 159:169–177.

- Thomashow, L.S., Weller, D.M., Bonsall, R.F. and Pierson, L.S (1990) Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microb.* 56: 908-912.
- Timmis KN (2002) *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ Microbiol* 4:779–781.
- Valentini M, Lapouge K (2012) Catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 regulates the uptake of C(4) -dicarboxylates depending on succinate concentration. *Environ Microbiol.* doi:10.1111/1462-2920.12056.
- Van den Broek D, Chin-A-Woeng TFC, Eijkemans K et al (2003) Biocontrol traits of *Pseudomonas* spp. are regulated by phase variation. *Mol Plant Microbe Interact* 16(11):1003–1012.
- Van Rij ET, Wesselink M, Chin-A-Woeng TFC et al (2004) Influence of environmental conditions on the production of phenazine-1-carboxamide by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *Mol Plant Microbe Interact* 17(5):557–566.
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings J (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60:407–438.
- Veselova A, Klein SH, Bass IA, Lipasova VA, Metlitskaya AZ, Ovadis MI, Chernin LS, Khmel IA (2008) Quorum sensing systems of regulation, synthesis of phenazine antibiotics, and antifungal activity in rhizospheric bacterium *Pseudomonas chlororaphis* 449. *Russian Journal of Genetics* 44: 1400-1408.
- Visca, P., Imperi, F. and Lamont, I.L (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* 15: 22–30.
- Visca, P., Leoni, L., Wilson, M.J. and Lamont, I.L. (2002). Iron transport and regulation, cell signaling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* 45: 1177–1190.
- Viviane F Cardozo<sup>1</sup>, Admilton G Oliveira<sup>1</sup>, Erick K Nishio<sup>1</sup>, Marcia RE Perugini, Célia GTJ Andrade, Wanderley D Silveira, Nelson Du-rán, Galdino Andrade, Renata KT Kobayashi and Gerson Nakazato<sup>1</sup>(2013) Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 12:12.
- Vogelstein, B. and Gillespie, D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **76**: 615. W13Z2. *Genome Announc* 2:e01049.
  - Vukomanovic D.V., Zoutman D.E., Stone J.A., Marks G.S., Brien J.F. & Nakatsu K. (1997) Electrospray mass-spectrometric, spectrophotometric and electrochemical methods do not provide evidence for the binding of nitric oxide by pyocyanine at pH 7. *Biochemistry Journal* **322**, 25-29.
  - Wang X, Jin D, Zhou L, Wu L, Qi L, Li C, An W, Chen Y (2014). Draft genome sequence of halotolerant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas bauzanensis* strain W13Z2. *Genome Announc* 2:e 01049.
  - Wang Y, Newman DK (2008) Redox reactions of phenazine antibiotics with ferric (hydroxides) and molecular oxygen. *Environ SciTechnol* 42(7):2380–2386.
  - Warren J.B., Loi R., Rendell N.B. & Taylor G.W. (1990) Nitric oxide is inactivated by the bacterial pigment pyocyanin. *Biochemistry Journal* 266: 921–923.
  - Weller DM (2007) *Pseudomonas* biocontrol agents of soil borne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology* 97:250–256.
  - Wu X, Monchy S, Taghavi S, Zhu W, Ramos J, van der Lelie D (2011) Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Rev* 35:299–323.
  - Yamamoto S, Kasai H, Arnold DL, Jackson RW, Vivian A, Harayama S (2000) Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* 146:2385–2394.
  - Yang Z, Dar Lu C (2007) Functional genomics enables identification of genes of the arginine transaminase pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189:3945–3953.
  - Yang Z-J, Wang W, Jin Y et al (2007) Isolation, identification, and degradation characteristics of phenazine-1-carboxylic acid-degrading strain *Sphingomonas* sp. DP58. *CurrMicrobiol* 55:284–287. doi:10.1007/s00284-006-0522-7.

- Yeterian E, Martin LW, Lamont IL, Schalk IJ (2010) An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology Reports* 2: 412-418.
- Zhang Y., Fernando W.G.D., de Kievit T.R., Berry C., Daayf F., and Paulitz T.C. (2006) Detection of antibiotic-related genes from bacterial biocontrol agents with polymerase chain reaction *Can. J. Microbiol.* 52: 476–481.

# *Annexe*

---

## Annexe I. Principaux Milieux de culture.

<p><b>King B solide</b></p> <p>Peptone de caséine .....20 g            Sulfate de magnésium .....1,5 g            Phosphate bi-potassique.....1,5 g            Glycérol .....10 ml            Agar .....20 g            Eau distillée QSP.....1000 ml            pH :..... 7,2</p>	<p><b>King A solide</b></p> <p>Peptone de caséine .....20 g            Sulfate de potassium... .....10 g            Chlorure de magnésium.....1,5 g            Glycérol .....10 ml            Agar .....20 g            Eau distillée QSP.....1000 ml            pH :..... 7,2</p>
<p><b>King B liquide</b></p> <p>Peptone de caséine .....20 g            Sulfate de magnésium .....1,5 g            Phosphate bi-potassique.....1,5 g            Glycérol .....10 ml            Eau distillée QSP.....1000 ml            pH :..... 7,2</p>	<p><b>King A liquide</b></p> <p>Peptone de caséine .....20 g            Sulfate de potassium... .....10 g            Chlorure de magnésium.....1,5 g            Glycérol .....10 ml            Eau distillée QSP.....1000 ml            pH :..... 7,2</p>
<p><b>Muller Hinton solide</b></p> <p>Protéose-peptone.....10 g            Infusion de cervelle de veau.....12,5 g            Infusion de cœur de bœuf.....5,0 g            Glucose.....2,0 g            Chlorure de sodium.....5,0 g            Hydrogénophosphate de sodium...2,5 g            pH.....7,4</p>	<p><b>NBY à 2% de glucose :</b></p> <p>Bouillon nutritif (Difco)..... 8,0 g            Extrait de levure (Difco).....2,0 g            K<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> 2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .....0.5 g            Glucose .....2,0 g            MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O .....0.25 g            pH.....7,0</p>

## Annexe II: Quelques spectres MALDI-TOF utilisés dans l'identification des *Pseudomonas*

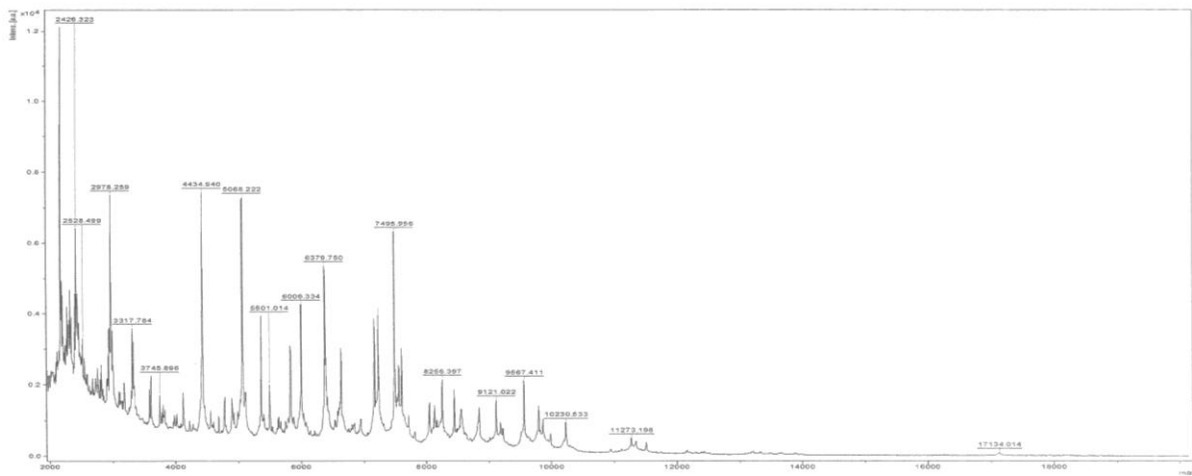


Figure I : Spectre MALDI-TOF de *Pseudomonas fragi*

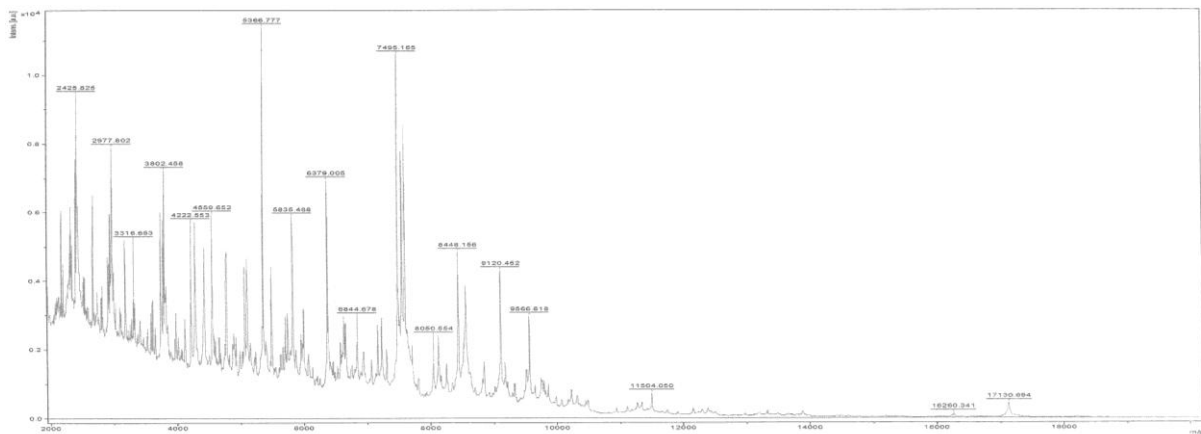


Figure II: Spectre MALDI-TOF de *Pseudomonas fluorescens*

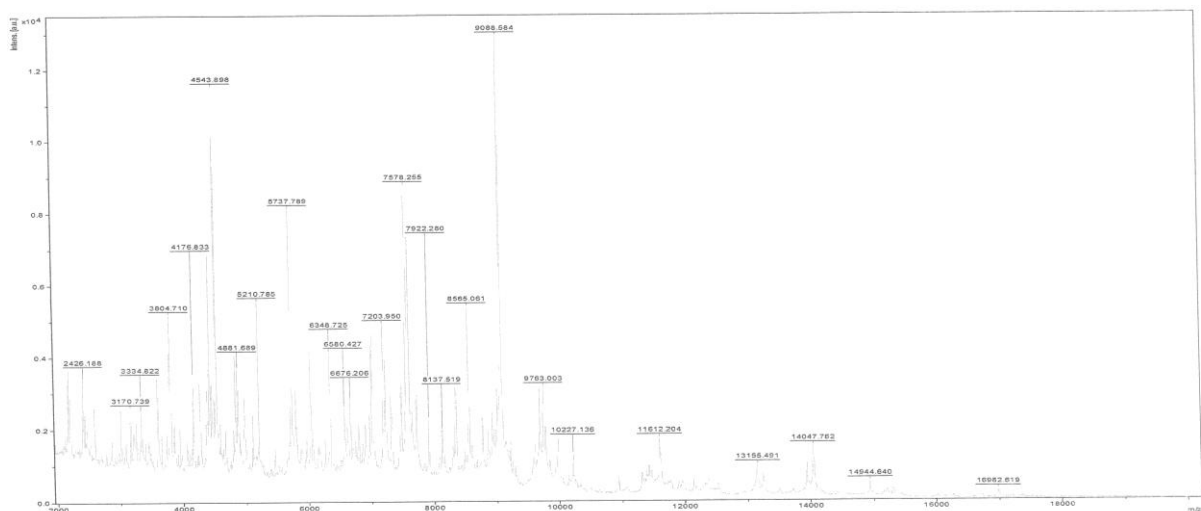


Figure III: Spectre MALDI-TOF de *Pseudomonas aeruginosa*

*Travaux  
Scientifiques*

---

# Travaux scientifiques

## Publications et participation à des séminaires.

### Publications

- **Hicham Dahah**, Rachid Djibaoui, Saïd Nemmiche. Antimicrobial effect of phenazines produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from saline soil of Mina River, Algeria. South Asian J Exp Biol; 5 (5): 187-193; 2015.
- **Hicham Dahah**, Rachid Djibaoui, Saïd Nemmiche. Antimicrobial, antioxidant and hemolytic effects of Pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from saline soil of Mina River, Algeria. Vol. 9, No. 5, p. 134-143, 2016.
- ARABI Abed, Djibaoui Rachid, Malihac Catherine, Sisbane Ismahene, Lattab Aicha, Bechelaghem Nadia, **Dahah Hicham**, Reziga Charef, Ettalhi Mehdi, TALEB Farida, Ouar Korichi Mounira, Dahloum Lahouari. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves and twigs of *Pistacia lentiscus* growing in Mostaganem Province (Algeria). International Journal of Biosciences | IJB |, Vol. 10, No. 5, p. 146-158, 2017.
- Lattab Aicha, Djibaoui Rachid, Arabi Abed, **Dahah Hicham**. Effect of salicylic acid on biofilm formation and on some virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Biosciences, 10 (1): 60-71, 2017.

### Communications Internationales

- Aicha LATTAB, Rachid DJIBAOU, Abed ARABI et **Hicham Dahah**. Action antibactérienne des extraits de henné (*Lawsonia inermis*) sur *Pseudomonas aeruginosa*. International Conference on Integrated Environmental Management For Sustainable Development, Sousse (Tunisia), 27-30 October 2016.

## Communications Nationales

- **DAHAH Hicham**, ARABI Abed, DJIBAOUI Rachid, NEMMICHE Saïd. Etude des métabolites à effet antimicrobien chez *Pseudomonas* : caractérisation et effet sur quelques germes pathogènes. V<sup>èmes</sup> journées scientifiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université de Mostaganem, Algérie), 07 et 08 Mai 2014. (Attestation de participation).
- **DAHAH Hicham**, ARABI Abed, DJIBAOUI Rachid, NEMMICHE Saïd. Etude de l'activité antimicrobienne d'une pyocyanine sécrétée par *Pseudomonas aeruginosa* originaire des sols salins. VI<sup>èmes</sup> journées scientifiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université de Mostaganem, Algérie), 27 et 28 Avril 2016. (Attestation de participation).



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة عبد الحميد ابن باديس مستغانم

UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS DE MOSTAGANEM

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

## Attestation

Le Comité scientifique des 5<sup>èmes</sup> journées scientifiques de la faculté (Mostaganem les 07 et 08 Mai 2014)

Atteste que : DAHAH H. a présenté une communication orale intitulée : **Etude des métabolites à effet antimicrobien chez**

***Pseudomonas*: caractérisation et effet sur quelques germes pathogènes**

Coauteurs : A. ARABI, R. DJIBAOUI, S. NEMMICHE

Fait à Mostaganem le 08 Mai 2014



Le Président du Comité Scientifique

أبو بكر  
السيد: ع. بركاني

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Abdelflamia Ibn Badis - Mostaganem  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

## Attestation de Participation

Le Comité Scientifique des 17<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, les 27 et 28 Avril 2016, Atteste que :

DAHAN H. a présenté une communication Orale intitulée :

« Etude de l'activité antimicrobienne d'une pyocyanine sécrétée par *Pseudomonas aeruginosa* originaire des sols salins »

Co-auteurs : DJIBAOUI R, NEMMICHE S.

Pr. ~~LOTMANA Brahim~~  
Doyen de la Faculté

السيد: المصطفى البراهيم  
عميد كلية علوم الطبيعة والحياة  
بالبليدة

Pr. GHAFFOUR Mohamed  
Président du Comité d'Organisation

مستطام محمد  
رئيس لجنة تنظيم مؤتمرات  
الكلية العلمية والحياة  
بالبليدة

**REGULAR ARTICLE**

## Antimicrobial effect of phenazines produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from saline soil of Mina River, Algeria

Hicham Dahah<sup>a,b\*</sup>, Rachid Djibaoui<sup>a,b</sup>, Saïd Nemmiche<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Microbiology and Vegetal-Biology

<sup>b</sup>Department of Biology, Faculty of SNV, University of Mostaganem, Mostaganem 27000, Algeria

**ARTICLE INFO****Article History:**

Received: 15 Jan 2016

Revised: 27 Jan 2016

Accepted: 28 Jan 2016

**\*Corresponding Author:**

Email: hicham010203@yahoo.com

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; antagonism; phenazines; pathogenic microorganisms; characterization

**ABSTRACT**

Several strains of environmental *Pseudomonas aeruginosa* have been used in biotechnology to produce beneficial metabolites in medicine and agriculture. Many secondary metabolites are secreted throughout their growth where phenazines are one among the most known stronger metabolites. The phenazines are antimicrobial substances inhibiting a wide range of pathogenic bacteria. In order to exploit the antimicrobial effect of *P. aeruginosa* and its phenazines we do isolate the studied bacteria from saline soil collected from Mina river region (Relizane, Algeria). Ten isolates belonged to *Pseudomonas* were selected by an antagonistic test, one of isolates was identified as *P. aeruginosa* and selected for phenazines production. Phenazines were produced using King A broth medium, extracted by ethyl acetate and purified by silica gel chromatography. The antimicrobial activity of crude extract containing phenazines was evaluated by the disc diffusion method against a number of pathogen microorganisms and the minimal inhibitory concentrations (MIC) were determined. The results indicated that the crude phenazines solution was effective against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei* and *Candida albicans*. The characterization of purified phenazines extract by HPLC showed a peak similar to the standard. The results of this study will contribute in the identification of the potential of phenazines naturally-occurring substances as antimicrobial agents.

**1. Introduction**

*Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative ubiquitous bacterium largely widespread in the environment. The capability for quick adaptation is the main reason to its versatility behaviour and its biodiversity in different ecological niches.

The antimicrobial specificity of these species products made a subject of interest for researchers and many studies were conducted. Strains of *P. aeruginosa* produce and secrete a variety of redox ac-

tive phenazine compounds including pyocyanin (PYO), phenazine-1-carboxylic acid (PCA), 1 hydroxyphenazine (1-OH-PHZ) and phenazine-1-carboxamide (PCN) (Chin-A-Woeng et al., 2003). The antibiotics produced by *Pseudomonas* include phenazine derivatives, pyoluteorin, pyrrolnitrin, hydrogen cyanide, 2,4-diacetylphloroglucinol and insect toxin (Gross and Loper, 2009). There are a variety of phenazine derivatives found in different *Pseudomonas* spp., such as *P. fluorescens* (Thomashow and Weller, 1988), *P. aeruginosa* (Mavrodi et al., 2001), and *P. chlororaphis* (Maddula et al., 2006).

The Phenazine compounds are one group of the bacterial natural products. They are characterized by a large family of heterocyclic nitrogen-containing compounds, water soluble, colored and secondary metabolites primarily obtained from soil or marine environment (Laursen and Nielsen, 2004). Producing phenazine by micro-organisms permits to use them as an acceptor of electrons, to maintain their redox balance in the absence of any electron acceptor, such as oxygen (Wang et al., 2010). The phenazine compounds have an antimicrobial activity against the yeast (*Candida albicans*) (Morales et al., 2013), Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) (Veselova et al., 2008), Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*) and some phytopathogenic bacteria such as *Erwinia carotovora* and *Ralstonia solanacearum* (Aunchalle et al., 2009). These secreted substances affect also *Mycobacterium tuberculosis* (Makarand et al., 2007).

Wang et al. (2011) suggested that the PCA produced by *P. aeruginosa* enables it to solubilize iron and consequently to assimilate developing to biofilm, whereas the Pyocyanin would support also the development in biofilm but by another mechanism.

Pyocyanin (1-hydroxy-5-methyl-phenazine) is predominant in *P. aeruginosa* (Demange et al., 1989). It is responsible for the blue-green colour characteristic of *Pseudomonas spp.* and is considered both in virulence and as quorum sensing factor (QS) signalling molecule for *P. aeruginosa* (Lau et al., 2004). Pyocyanin, a water soluble bio-active compound, has the capacity to arrest the electron transport chain of the fungi and exhibits antifungal activity (Wilson et al., 1987).

This study investigated the potential antimicrobial activity of phenazines, produced by *P. aeruginosa* isolated from saline soil, against microorganisms of medical importance, namely, *E. scherichia coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. sonnei* and *C. albicans*.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Isolation and characterization of fluorescent *Pseudomonas* from saline soil

*P. aeruginosa* was selected from fluorescent *Pseudomonas*. The bacteria were isolated by suspending 1g of saline soil in 10 ml of physiological medium. The suspension was spread onto King B agar medium (King et al., 1954) and incubated at 28 °C for 2 days. Yellow green fluorescent colonies under UV light (366 nm) were selected and purified.

### 2.2. *Pseudomonas aeruginosa* selection

The following tests were effectuated to select bacterial isolates showing characteristics belonging to *P. aeruginosa*:

Morphologic study: morphology of colonies and Gram strain.

Physiologic study: cytochrome oxidase and catalase detection, production of pigments (using King A and King B mediums), growth at 42 °C and 4 °C, proteolysis of gelatin, nitrate reduction, galactosidase (degradation of lactose), citrate utilization, methyl red and VogesProskauer reactions and utilization of the carbon sources glucose and lactose (Stanier et al., 1966). Results of these tests were scored as either positive or negative.

### 2.3. *In vitro* antagonism test

The objective of this test was to select the most competitive bacterium in order to obtain only those which have characters of performance. This test consists on depositing in line the bacteria of *Pseudomonas* on King B agar plates and incubating at 28 °C for 48 h. Target microorganisms were cultivated in perpendicular to the *Pseudomonas* culture. The tested microorganisms include Gram positive bacteria (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 25923S, *S. aureus* ATCC 33862, and *B. cereus* ATCC 27853), Gram negative bacteria (*E. coli* ATCC25922, *S. sonnie* PH 001, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *E. coli*) and one potentially pathogenic yeast (*C. albicans*).

The antagonistic action was determined by measuring the distance of the inhibition zone between the fluorescent *Pseudomonas* bacteria and the target microorganisms.

### 2.4. *Pseudomonas aeruginosa* (P8) identification

The conventional tests API20NE identification system (API NE, Biomerieux) was done for only one isolate (P8) showing most antagonistic power and presenting morphological and biochemical characteristics belonged to *P. aeruginosa*.

### 2.5. Production and extraction of phenazines

*P. aeruginosa* (P8) was streaked on King A agar plates (King et al., 1954) and incubated at 28 °C for 24 h. The production of phenazines *in vitro* was effectuated by inoculating King A broth. The culture was incubated in 500 ml shaking flasks containing 200 ml of growth medium using a rotary shaker

(180 rpm at 30°C).

The culture was then centrifuged and the supernatant was acidified by HCl (pH 2), followed by double extraction with equal volume of ethyl acetate. The crude extracts were filtered through anhydride sulphate of ammonia and completely concentrated in a rotary evaporator (James and Gutterson, 1986). The dry extract is dissolved in methanol (Delanay et al., 2001) for further experiments.

### 2.6. Antimicrobial activity of phenazines

The antimicrobial activity of crude phenazines was determined by disc diffusion method. Briefly, a suspension of the tested microorganism (0.5 McFarland:  $10^8$  UFC/ ml) was spread on the solid media plates. All tests were performed in Mueller–Hinton broth and phenazines extracts were dissolved in methanol. The filter paper discs (6 mm in diameter) were impregnated with the solution of phenazines and placed on the inoculated plates. These plates were incubated at 37°C for 24 h. The diameters of the inhibition zones were measured in millimetres. All tests were performed in duplicate.

### 2.7. Determination of the Minimal Inhibiting Concentration (MIC)

*In vitro* antimicrobial activity of phenazines was evaluated by the disc diffusion method. The inoculum suspensions were prepared from 18 h broth cultures and adjusted to obtain a 0.5 McFarland standard turbidity. The phenazine extract and the fractions were sterilized by filtration through Millipore (Bedford, MA, USA) filters (pore size, 0.45  $\mu$ m) and added to Mueller-Hinton broth medium. Serial 10-fold dilutions were made for a concentration range between 9.75 and 312.5  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> for the samples. The MIC was determined as the lowest concentration of phenazine able to inhibit any visible

growth of each microorganism in the broth.

### 2.8. Identification of the phenazinic compounds by high-performance liquid chromatography (HPLC)

The phenazine compounds obtained from the ethyl acetate extract of *P. aeruginosa* were performed on an analytical HPLC (Jasco Pu series 1580, Japan) system equipped with a UV-visible spectrophotometric detector. The HPLC column was an RP-18 reversed phase column (25 cm x 4.6 mm; particle size, 5  $\mu$ m). Elution was carried out with a polar solvent acetonitrile (100 %). The purified extract was kept in a suspension within 0.6 ml of pure methanol then filtered using (0.45  $\mu$ m) filter membrane. The flow rate was 1 ml/min, and the volume injected was 1  $\mu$ L. All chromatographic analysis was performed at ambient temperature.

## 3. Results

### 3.1. Selection of *Pseudomonas* from saline soil

A number of isolates were obtained using King B medium. Ten fluorescent *Pseudomonas* were selected by choosing colonies secreting a yellow-green fluorescent pigment. The all isolates were identified to *Pseudomonas sp* by phenotypic characters (Table 1). The isolate P8 is the only *Pseudomonas* which reacts positively with gelatin, pyocyanin production and growth at 42 °C. The numerical profiles 1 3 5 4 4 7 5 calculated from API 20NE system tests confirm that the isolate (P8) is *P. aeruginosa* with 99.9% similarity according to the API Web software.

### 3.2. Antagonistic action

The spectrum of antagonistic action applicable on the ten isolates (Table 2) indicates that *P. aeruginosa* (P8) inhibited 89 % of pathogens. We observed that P8 exhibited a high effect against *C. albicans*,

Isolates	G	Cat	Ox	Pvd	Gel	Pyo	Nit	CsG	CsL	G(42°C)	G(4°C)	Cit
P1	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
P2	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
P3	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
P4	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
P5	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
P6	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
P7	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
P8	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
P9	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
P10	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+

Table 1. Biochemical and physiologic characteristics of *Pseudomonas* strains.

G-, Gram negative; Cat, catalase; Ox, Cytochrome oxidase; C, carbon sources (sG, glucose, sL, lactose); Pvd, pyoverdine (fluoresced on King B); N, nitrate reduction; G, growth in 42 C° and 4 C°; Cit, citrate utilization.

Isolates Microorganisms	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P9	P10
	Inhibition zone diameter (mm)									
<i>Shigella sonnei</i> PH 001	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923S	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 27853	34	0	10	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 2785	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2. Inhibition zones of *in vitro* antagonistic action.

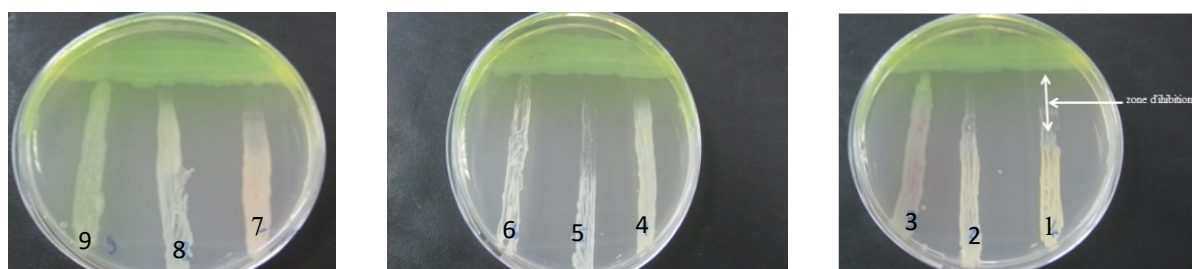


Fig.1: Inhibition zones of *in vitro* antagonistic action.

1: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923S; 2: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; 3: *Escherichia coli* ATCC; 4: *Shigella sonnei* PH 001; 5: *Bacillus cereus* ATCC 27853; 6: *Candida albicans*; 7: *Staphylococcus aureus* ATCC 33862; 8: *Escherichia coli* ATCC 25922; 9: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

the used Gram-positive and Gram-negative bacteria except for *P. aeruginosa* ATCC 27853 which was not affected by the antagonistic action of P8 (Fig.1).

### 3.3. Antimicrobial activity of the crude phenazine

The antimicrobial effect of phenazines against a range of Gram-positive (four strains) and Gram negative (three strains) is shown in Table 3. The phenazine compounds secreted by *P. aeruginosa* (P8) exhibited variable levels of antibacterial activity against all tested bacterial strains and showed an important inhibition zones. The diameter of the zone of inhibition is related to the susceptibility of the isolate and to the rate of diffusion of the phenazine through the agar medium. These inhibition zones of phenazines extract of *P. aeruginosa* which were obtained against all test pathogenic microor-

ganisms were in the range of 11-21 mm.

The highest inhibitory activity was determined against *B. cereus* ATCC 27853 and *C. albicans* with average inhibition zones diameters of 21 mm and 19 mm respectively. On the other hand, the weakest inhibitory activity was determined against *E. coli* ATCC25922 and *S. aureus* ATCC 33862 (11 mm, inhibition zone diameter).

### 3.4. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of crude phenazine

Minimal inhibition concentration values were given in Table 4. The crude extract at 78µg/ml was found to be the effective minimal concentration against *C. albicans* and *B. cereus* ATCC 27853, but remains inactive to the other pathogens microorganisms

Test bacteria	Inhibition zone diameter (mm)
<i>Shigella sonnei</i> PH001	11.5 ± 0.70
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	11 ± 1.41
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13 ± 0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923S	13 ± 0
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	11 ± 1.41
<i>Escherichia coli</i>	12 ± 0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 27853	21 ± 1.41
Test fungi	
<i>Candida albicans</i>	19 ± 0

Table 3. Antimicrobial activity of the crude phenazine extract of *P. aeruginosa*.

Pathogen microorganisms	Concentration of P8 crude extract(µg /ml)						MIC (µg/ml)
	9.75	19.5	39	78	156	312	
<i>Shigella sonnei</i> PH001	+	+	+	+	-	-	156
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+	-	-	156
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	+	+	+	+	-	-	156
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923S	+	+	+	+	-	-	156
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	+	+	+	+	-	-	156
<i>Escherichia coli</i> ATCC	+	+	+	+	-	-	156
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 27853	+	+	+	-	-	-	78
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	-	-	-	78

**Table 4. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of crude phenazines.**  
(+) growth; (-) absence of growth

which were used for our experiment. The MIC of the remaining bacterial strains was found to be 156µg/ml.

### 3.5. HPLC Analysis

HPLC analysis was performed for the purified extract using a phenazine standard. These compounds were identified by comparison of their retention time with the authentic standard. The results illustrated in Fig. 2B show a peak of purified extract of *P. aeruginosa* with a retention time of 6.378 min similar to phenazine carboxylic acid standard (Fig. 2A).

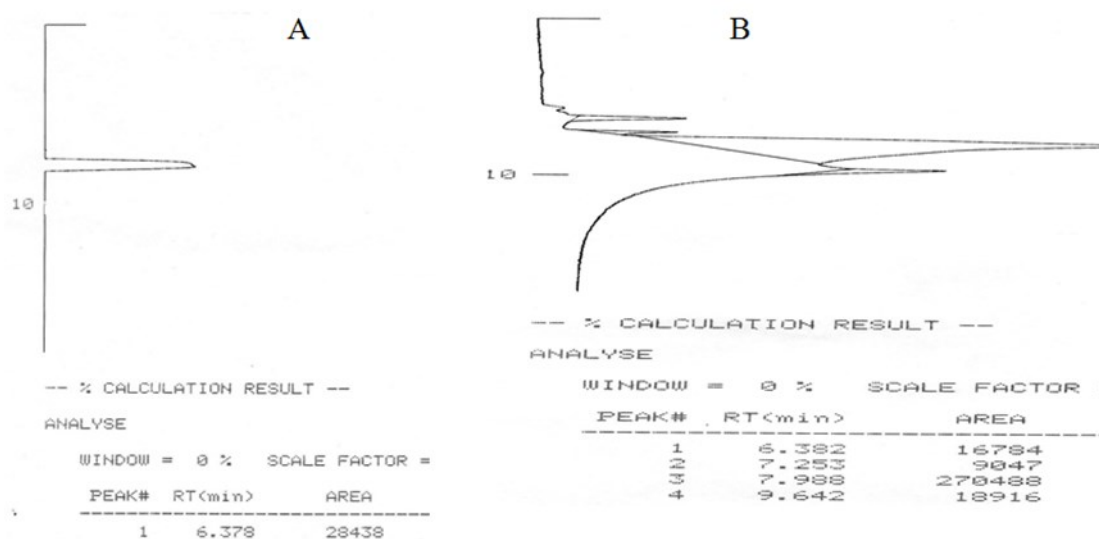
### 4. Discussion

In our study, 10 bacterial strains were isolated from soil samples collected from Mina River region of Algeria. All isolates were identified as fluorescent Pseudomonads by their characteristics on KB medium. On the basis of morphological, cultural, biochemical and physiological characterization, the isolate P8 was identified as *P. aeruginosa* by the API

20NE system tests with 99% of similarity.

*P. aeruginosa* exhibits antagonistic activity against *C. albicans* and the tested pathogenic bacteria including Gram positive bacteria (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 25923S, *S. aureus* ATCC 33862, and *B. cereus* ATCC 27853), Gram negative bacteria (*E. coli* ATCC25922, *S. sonnie* PH 001, and *E. coli*). Our results indicated that *P. aeruginosa* ATCC 27853 resists to the antagonistic activity of the studied isolate. This result can be explained by the production of high levels of superoxide dismutase (SOD) to protect itself (Gusarov et al., 2009).

The studied crude extract of *P. aeruginosa*, was tested for antimicrobial activity against (Gram-positive, Gram- negative bacteria and fungi). The effects were evaluated by measuring the zones of inhibition around the disks. It was found that the crude extract of phenazine exhibits a high activity especially against *B. cereus* ATCC 27853 and *Candida albicans*. This result is in agreement with the investigations of several authors who confirmed



**Fig. 2: Identification of phenazine by HPLC. A- Chromatography profile (at 375 nm) of Standard phenazine carboxylic acid. B- Sample of extract phenazine from Pseudomonas aeruginosa.**

that phenazine inhibits pathogen strains growth, such as *E. coli* (Sansoong et al., 2009), *S. aureus* (Veselova et al., 2008) and *C. albicans* (Morales et al., 2013). The activity of crude extract phenazine to inhibit the growth of the bacteria and fungi can be referred by the oxydo-reduction ability of this compound while the presence of oxygen and reducing agents (including NADH and the NADPH) causing the accumulation of superoxydes and peroxide hydrogen poisons (Mavrodiet al., 2006).

MIC for phenazine was found to be 156 µg/ml against all microorganisms tested except *B. cereus* ATCC 27853 and *C. albicans*. It was equivalent to 78 µg/ml. Viviane et al. (2013) found that the minimal inhibiting concentration of phenazines on *S. aureus* is 125 µg/ml. Other authors showed that the MIC of Phenazine-1-carboxylic acid against *C. albicans* and *E. coli* was equal to 17.4 and 34.8 µg/ml respectively (Aunchalee et al., 2009). These results were explained by the fact that the used bacteria secrete a mixture of phenazines substances which depend on the species and environmental conditions (Delanay et al., 2001).

HPLC analysis was effectuated to identify the nature of Phenazine compound. The result revealed a major peak with retention time of about 6.378 min similar to PCA standard comparably with the other peak detected in this sample. The presence of four peaks in our sample with retention times 6.382, 7.253, 7.988 and 9.642 min shows the capacity of *P. aeruginosa* to produce many phenazines derived, this result is in agreement with Budzikiewicz (1993), Chin-A-Woeng et al (2003) and Liu et al (2008).

## 5. Conclusion and Perspectives

This study aims principally to valorize the interest of *P. aeruginosa* as phenazines producer. These findings suggest that the investigated phenazines substances produced by *Pseudomonas aeruginosa* have strong antibacterial and antifungal activities against human pathogenic bacteria and need exploitation as an alternative source of natural antibacterial agents. The results demonstrate that the produced phenazine has a relatively important effect with low values of MIC. In addition, the estimation of purified extract using HPLC analysis confirmed the presence of many substances of phenazine. One of them was detected as phenazine carboxylic acid with homogeneous retention time 6.382 min.

Additional studies are required to further the advancements and knowledge required to discover and develop effective antimicrobial agents.

## References

- Aunchalee N, Sukanya A, Chankporn P, Paweena P, Saksit C, Chalerm R (2009) Synthetic, isolation of phenazine derivatives and their antimicrobial activities. *Walailak Journal of Science and Technology* 6(1):78-91.
- Budzikiewicz H (1993) Secondary metabolites from fluorescent *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Reviews* 104: 209-228.
- Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2003) Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist* 157: 503-523.
- Delaney SM, Mavrodi DV, Bonsall RF, Thomashow LS (2001) phzO, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compound in *Pseudomonas aureofaciens*. *Journal of Bacteriology* 183:318-327.
- Demange P, Wendenbaum S, Linget C, Bateman A, Macleod J, Dell A, Albrecht AM, Abdallah MA (1989) *Pseudomonas* siderophores: structure and physicochemical properties of pyoverdins and related peptides. In: Second Forum on Peptide, Colloque INSERM. A. Aubry, M. Marraud and B. Vitoux (ed). Montrouge, France, LibbeyEurotext 174:96-98.
- Gross H, Loper JE (2009) Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural Product Reports* 26 (11) 1408-1446.
- Gusarov I, Shatalin K, Starodubtseva M, Nudler E (2009) Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science* 325:1380-1384. doi: 10.1126/science.1175439.
- James D.W. and Gutterson N.I (1986) Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. *Applied and Environmental Microbiology* 52:1183-1198.
- King ED, Ward MK, Raney DE (1954) Two simple media for demonstration of pyocyanine and fluorescein. *Journal Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301-307.
- Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F (2004) The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular medicine* 10:599-606.
- Laursen JB, Nielsen J (2004) Phenazine natural products: biosynthetic analogues, and biological activity. *Chemical Review* 104:1663-1685.
- Liu HM, Zhang XH, Huang XQ, Cao CX, Xu YQ (2008) Rapid quantitative analysis of phenazine-1-carboxylic acid and 2-hydroxyphenazine from fermentation culture of *Pseudomonas chlororaphis* GP72 by capillary zone electrophoresis. *Talanta* 76:276-81.
- Maddula VK, Zhang Z, Pierson EL (2006) Quorum sensing and phenazines are involved in biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis* (aureofaciens) strain 30-84. *Journal of Microbial Ecology* 52 (2) 289-301.
- Makarand R, Prashant DS, Bhushan L, Sudhir B (2007) Detection, isolation and identification of phenazine-1-carboxylic acid pro-

- duced by biocontrol strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Scientific and Industrial Research* 66:627-631.
- Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomashow LS (2001) Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* 183 (21) 6454-6465.
- Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS, Mentel M (2006) Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annual Reviews of Phytopathology* 44: 417-445.
- Morales DK, Grahl N, Okegbe C, Dietrich LEP, Jacobs NJ, Hogan DA (2013) Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *mBio* 4 (1):e00526-12. doi:10.1128/mBio.00526-12.
- Price-Whelan A, Dietrich LE, Newman DK (2006) Rethinking secondary metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chemical Biology* 2: 71-78.
- Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M (1966) The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *Journal of Genetic Microbiology* 43:159-271.
- Thomashow LS, Weller DM (1988) Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of Bacteriology* 170 (8) 3499-3508.
- Veselova A, Klein SH, Bass IA, Lipasova VA, Metlitskaya AZ, Ovadis MI, Chernin LS, Khmel IA (2008) Quorum sensing systems of regulation, synthesis of phenazine antibiotics, and antifungal activity in rhizospheric bacterium *Pseudomonas chlororaphis* 449. *Russian Journal of Genetics* 44: 1400-1408.
- Viviane F Cardozo<sup>1</sup>, Admilton G Oliveira<sup>1</sup>, Erick K Nishio<sup>1</sup>, Marcia RE Perugini, Célia GTJ Andrade, Wanderley D Silveira, Nelson Durán, Galdino Andrade, Renata KT Kobayashi and Gerson Nakazato<sup>1</sup> (2013) Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 12:12
- Wang Y, Kern SE, Newman DK (2010) Endogenous phenazine antibiotics promote anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* via extracellular electron transfer. *Journal of Bacteriology* 192: 365-369.
- Wang Y, Wilks JC, Danhorn T, Ramos I, Croal L, Newman DK (2011) Phenazine-1-carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition. *Journal of Bacteriology* 193: 3606-3617.
- Wilson R, Pitt T, Taylor G, Watson D, Mac Dermot J, Sykes D (1987) Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia in vitro. *Journal of Clinical Investigation* 79, 221-229.
-



## RESEARCH PAPER

## OPEN ACCESS

## Antimicrobial, antioxidant and hemolytic effects of Pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from saline soil of Mina river, Algeria

Hicham Dahah<sup>\*1</sup>, Rachid Djibaoui<sup>1</sup>, Saïd Nemmiche<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Microbiology and Vegetal-Biology, Department of Biology, Faculty of SNV, University of Mostaganem, Mostaganem, Algeria

<sup>2</sup>LSTPA Laboratory, Department of Biology, Faculty of SNV, University of Mostaganem, Mostaganem, Algeria

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, Pyocyanin, Antimicrobial, Antioxidant effect

<http://dx.doi.org/10.12692/ijb/9.5.134-143>

Article published on November 30, 2016

### Abstract

*Pseudomonas aeruginosa* is a common inhabitant of soil, fresh-water and marine environments. Pyocyanin is one of the stronger antimicrobial substance produced by this bacterium inhibiting a wide range of pathogenic microorganisms. In order to exploit the antimicrobial and antioxidant effects of pyocyanin and abrogate some pathogenic microbes responsible for several diseases, three strains (P1, P2 and P3) of *Pseudomonas aeruginosa* were isolated from saline soil of Mina river region (Relizane, Algeria). The higher producer of pyocyanin (P3) was selected for further studies. Pyocyanin was produced in King A broth medium, extracted with chloroform then purified by silica gel chromatography. The characterization of the metabolite by UV spectrum, TLC, IR and HPLC revealed a similarity with the pyocyanin standard. The effect of NaCl on pyocyanin production was determined by using different concentrations and the maximum amount was detected in the medium containing 20g/l. The antimicrobial effect results showed varying degrees of inhibition zones against the microorganisms tested and the remarkable effect were detected against *Candida albicans* ATCC 10231 and *Bacillus cereus* ATCC10876 with zones diameters of 26 mm and 14 mm respectively. Hemolytic activity using human blood was obtained above 5mg/ml and the IC<sub>50</sub> value of the antioxidant activity of pyocyanin with DPPH method was evaluated at 3.15µg/ml.

\* **Corresponding Author:** Hicham Dahah ✉ [hicham.dahah@univ-mosta.dz](mailto:hicham.dahah@univ-mosta.dz).

## Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* is a Gram negative, obligate aerobe, rod shaped bacterium belonging to the family of Pseudomonadaceae. It is largely widespread in the environment by an ability to develop in soil, plants, fresh and marine water. The metabolism of *P. aeruginosa* was significantly controlled in diverse ecological niches by the degree of salinity and other environmental factors. It is also known to produce pyocyanin (5-N-methyl-1-hydroxy phenazine (PCN) which is the major phenazine compound in this species (Rangarajan *et al.*, 2003; Prabhakaran *et al.*, 2014).

Interest is now growing in the use of antimicrobial drugs that directly target the expression of virulence factors. PCN has various pharmacological effects on prokaryotic cells; its biological activity is related to similarity in the chemical structure to isoalloxazine, lipoproteins, flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide compounds (Ohfuji *et al.*, 2004). A variety of potential biotechnological applications of PYO were found, as production of the antitumor (Laursen and Nielsen, 2004; Mavrodi *et al.*, 2006) and the ability to control the pathogenic fungi and bacteria. This secondary metabolite has been studied intensively and has drawn the attention of the researchers for its broad spectrum antibiotic properties against fungi (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*) (Costa and Cusmane, 1975; Kerr *et al.*, 1999) and a high antibacterial activity against (*Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) and many pathogenic microbes infecting human body.

The broad spectrum of pyocyanin is basically due to its ability to regenerate an exceed of  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  during respiration in cells membranes of other microorganisms inhibiting the energy process and active transport of aqueous solution (Baron *et al.*, 1989; Usher *et al.*, 2002). Pyocyanin increases intracellular oxidant stress and exhibits a redox cycle under aerobic condition. However, *Pseudomonas aeruginosa* protect themselves against pyocyanin production with high level of superoxide dismutase and catalase (Price-Whelan *et al.*, 2007). In addition, the major role of pyocyanin in the producing bacterium is its important persistence in absence of other competitors (Price-Whelan *et al.*, 2006; Price-Whelan *et al.*, 2009).

The study was designed to investigate antimicrobial and antioxidant activities of PCN against a number of pathogenic microorganisms, specifically, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Proteus vulgaris* ATCC 6380 and *Candida albicans* ATCC 10231.

## Material and methods

### Isolation of *Pseudomonas aeruginosa*

Fluorescents *Pseudomonas* was isolated from saline soil of Mina river region (Relizane, Algeria). Soil samples were collected from different areas in sterile plastic bags then transported to the laboratory. The bacteria were isolated by suspending 10g of soil in a sterile flask containing 90ml of sterile physiological water. Isolates and standard *Pseudomonas aeruginosa* strain were grown in King B agar medium (King *et al.*, 1954). The plates were incubated for 48 hours at 28°C. Only isolates producing fluorescence on King B agar medium were streaked on King A agar medium to select only those producing bleu pigment.

### *Pseudomonas* strains identification

Fourteen isolates were identified by phenotypic characterization to *Pseudomonas*. Therefore we realized the Gram stain, motility test and oxidase test (growth at 42°C and 4°C). All isolates were identified with API 20 NE identification system (API NE, bio Merieux, France) and kept in freezer at -20°C. The strains identified as *Pseudomonas aeruginosa* by biochemical and physiological characterizations were approved by the genotypic identification.

The genomic DNA of isolates were extracted, purified and amplified with primers 27F (5'AGAGTTTGATC MTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGYTACCTG TTACGACTT-3') and using thermocycler ABI 9700. The PCR products were sequenced. The sequence determined was compared with the reference species of *Pseudomonas* contained in genomic database banks, using the "NCBI Blast".

#### *Extraction of pyocyanin*

To extract the crude pyocyanin, we select one isolate belonging to *P. aeruginosa* and showing high blue pigmentation on King A agar medium. The selected strain was inoculated in the King A broth medium, incubated for 3 days in rotary shaker (180 rpm at 30°C). The culture was centrifuged and the supernatant was extracted with 1v/1v chloroform. The organic phase was concentrated in a rotary evaporator at 50°C.

#### *Antimicrobial activity*

The Antimicrobial effect of purified pyocyanin was determined by the disc diffusion assay (Barry and Thornsberry, 1985). Bacterial turbidity was adjusted to McFarland standard (0.5 McFarland:  $10^8$  UFC/ ml) and suspension was spread on the solid media plates (Mueller–Hinton). The paper discs (Whatman paper Grade AA) were impregnated with the solution of extracted pyocyanin, placed on the plates and incubated for 24 h at 37°C. Antibacterial activity was determined by the diameter of inhibition zones (mm) around the wells. All tests were performed in triplicate.

#### *Determination of the Minimal Inhibiting Concentration (MIC)*

The minimum inhibitory concentration of pyocyanin was evaluated by broth microdilution. All pathogens microorganisms were suspended in broth cultures for 18 hours and adjusted to obtain a 0.5 McFarland standard turbidity. The purified pyocyanin was added in serial concentrations (8 µg/ml to 128 µg/ml) for all inoculum suspensions prepared and incubated at 37°C for 24 hours. The MIC was determined as the lowest concentration of pyocyanin able to inhibit any visible growth of each microorganism in the broth medium.

#### *Effect of salinity on the growth and pyocyanin production*

To verify the influence of salinity on the growth and pyocyanin production of the isolate; the bacterium was inoculated in King A broth supplemented with 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20 and 30g/l of NaCl. Cultures were incubated in a shaker incubator (180 rpm at 30°C) for 48h.

The growth was determined visually and the pyocyanin production was evaluated using the method described by Kurachi (1958). All experiments were done in triplicate.

#### *Hemolytic activity of pyocyanin pigment*

The human blood was added in tube containing EDTA and centrifuged at 5000rpm for 10min at 4°C. The supernatant was discarded and the packed RBC was washed by normal saline. 1ml of the packed RBC was resuspended in normal saline to obtain 1% RBC suspension. The assay was carried in microtiter plate and the pyocyanin compound was assayed at different concentration. 100µl of normal saline and 100µl of 1% RBC were added to each well, and then different concentrations of pyocyanin were added. The microtiter plate was incubated for 3h at room temperature. The negative reaction was indicated by observing a fine button cell with regular margin and the uniform red colored suspension indicated positive of the lysed RBC (Samanta *et al.*, 2008).

#### *Antioxidant activity of pyocyanin*

DPPH radical scavenging activity of purified pyocyanin was measured as described by Liyana and Shahidi (2005). Various concentrations of pyocyanin (2.8, 1.4, 0.7, 0.350 and 0.175µg/ml) were prepared in methanol. 2 mL of 24µg/ml DPPH solution was mixed with 0.5ml of each concentration of pyocyanin and incubated at room temperature for 30min. Ascorbic acid was also used as positive control. The absorbance of all solutions was read at 517nm by using a spectrophotometer.

#### *Analysis of pyocyanin pigment with UV-VIS spectrophotometer*

##### *Extraction and purification of Pyocyanin*

3 ml of chloro form was added to 5ml culture supernatant. After extraction, the chloroform layer was transferred to a fresh tube and mixed with 1ml 0.2 M HCl.

After centrifugation, the red top layer was analyzed in range 200 to 500nm using UV-V is spectrophotometer (JASCO V-530) and the maximum absorbance was detected.

The crude extract was purified by using silica gel column and the obtained bleu fraction was analyzed by thin layer chromatographic method (TLC) to determine the purity of PCN compound. A standard pyocyanin was spotted on the first position and the purified PCN was spotted on the second position. The TL Cplat was developed in chloroform-methanol (1:1 v/v) and after migration of compounds the Rf values were calculated and compared.

#### Identification of the pyocyanin compounds by high-performance liquid chromatography (HPLC/DAD)

The purified pyocyanin was performed at 280nm on analytical HPLC/DAD with C18 column (250 x 4.6 mm) and DAD Shimatzu SPD-M20A detector. The analysis was controlled by Lab Solution LC-PDA software. In the method of elution samples we used two solvents A and B. The first was water-trifluoroacetic acid (100:0.04, v/v) and the second was acetonitrile-water-trifluoroacetic acid (90:10:0.04, v/v/v). The flow rate was 1ml/min, and the injected volume was 1µL. All chromatographic analysis was performed at 30°C (Fernández and Pizarro, 1997).

#### Identification of pyocyanin by FTIR

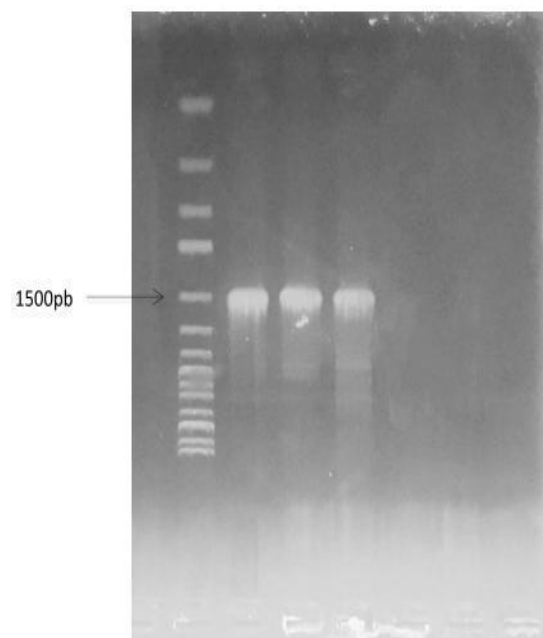
The structure of pyocyanin extract was confirmed with Jasco 4200 FT-IR spectrophotometer by analysis of the functional groups of the substance used. The KBr was heated at 110°C to eliminate humidity and results were treated with Jasco Spectra Manager II software.

## Results

#### *Pseudomonas* identification

The obtained isolates are rode shaped gram-negative, motile and showed positive oxidase reaction. They also grow aerobically and all of them produce yellow green pigment on King B medium. Consequently they are belonged to the group of fluorescent *Pseudomonas* and only the isolates Pa1, Pa2 and Pa3, produced a bleu pigment, showed a positive reaction with gelatinase and grow at 42°C (but not at 4°C). The API 20NE system used confirms by APIWeb software that Pa1, Pa2 and Pa3 have a similarity of 99.9%, 91.9% and 99.9% respectively to *Pseudomonas aeruginosa*.

The numerical profiles were 1354475, 1356575 and 1356457 successively. The amplification of 16S rDNA of P1, P2, and P3 using primers revealed a fragment DNA of 1.5kb (Fig. 1) which was identified by sequencing as *P. aeruginosa* F 9670 with a similarity of 99%. Only the isolate P1 was selected for the further experiments.



**Fig. 1.** Agarose gel electrophoresis of the polymerase chain reaction (PCR) amplified 16S-rRNA gene for P1, P2 and P3.

#### Antimicrobial activity of the pyocyanin

The spectrum of antimicrobial activity againsta Gram-positive bacteria (*Bacillus cereus* ATCC 10876), Gram negative bacteria (*Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Proteus vulgaris* ATCC 6380 and *Escherichia coli* ATCC 25922) and yeast (*Candida albicans* ATCC 10231) is presented in Table 1.

The results indicate that pyocyanin antibiotic showed antimicrobial activity against all pathogenic microorganisms tested. Pyocyanin exhibited a highest activity against *Candida albicans* ATCC 10231 and *Bacillus cereus* ATCC 10876 with average inhibition zones diameters of 26mm and 14mm respectively. We also found that pyocyanin revealed a weak antibacterial activity was against *Escherichia coli* ATCC 25922 (11mm), *Proteus vulgaris* ATCC 6380 (10mm) and *Proteus mirabilis* ATCC 35659 (09mm).

**Table 1.** Antimicrobial activity of purified pyocyanin.

Zones inhibition (mm) of the crude pyocyanin produced by <i>P. aeruginosa</i> on tested pathogenic microorganisms.	
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	26 ± 0.057
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	14 ± 0.057
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	11 ± 0.000
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC35659	09 ± 0.057
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC6380	10 ± 0.057

#### Minimal Inhibitory Concentration (MIC) determinations

Minimal inhibition concentration values were given in Table 2. The MIC of pyocyanin against *Candida albicans* ATCC 10231 and *Bacillus cereus* ATCC

10876 was found at 16µg/ml and 32 µg/ml whereas the MIC of *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 and *Proteus vulgaris* was observed at 64µg/ml.

**Table 2.** Minimal inhibitory concentrations (MIC) of purified pyocyanin.

Pathogen microorganisms	Concentration of Pyocyanin crude extract (µg/ml)				
	8	16	32	64	128
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	+	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	+	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	+	+	+	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC35659	+	+	+	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC6380	+	+	+	-	-

#### Effect of salinity on the growth and pyocyanin production

The isolate Pa was notably influenced by different concentration of salinity. The production of pyocyanin increased proportionally with salinity concentration.

The high amount of pyocyanin (29.57µg/ml) was obtained with 20g/L of NaCl. The result also indicated that salinity above 20g/L have totally affected pyocyanin production but did not affect the bacterium growth which was completely inhibited at 60 g/L of NaCl (Table 3).

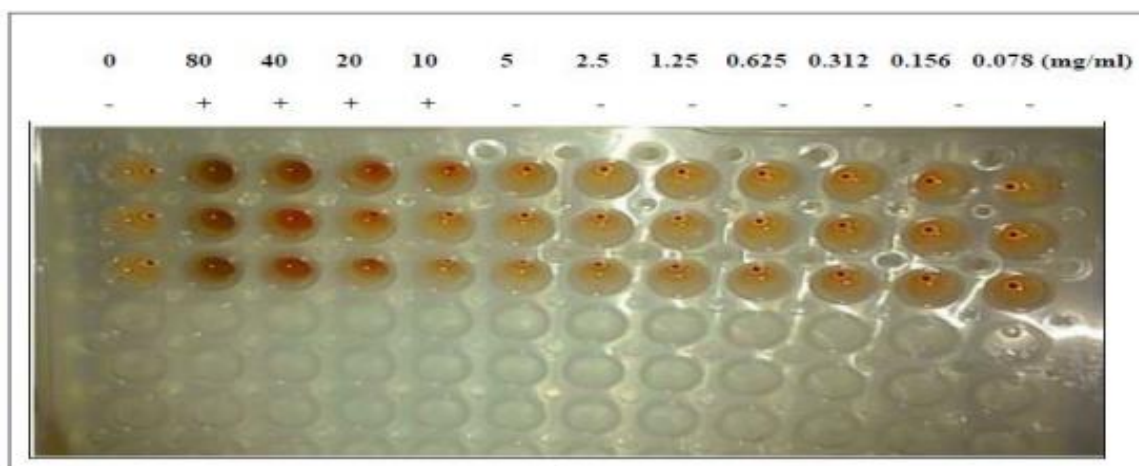
**Table 3.** Effect of salinity on producing pyocyanin by *P. aeruginosa*.

N°	Concentration of NaCl (g/l) in the medium	Concentration of pyocyanin (µg/ml)	Growth
01	0	13.37	+++
02	2.5	12.29	+++
03	5	12.5	+++
04	7.5	12.68	+++
05	10	12.74	+++
06	12.5	13.67	+++
07	15	19.01	+++
08	17.5	22.99	+++
09	20	29.57	+++
10	30	0	++
11	40	0	++
12	50	0	+
13	60	0	-
14	70	0	-

#### Hemolytic assay

The effect of pyocyanin on the lysis of human red cells was tested to check its toxicity and side effects when used as curing agent at concentration ranging

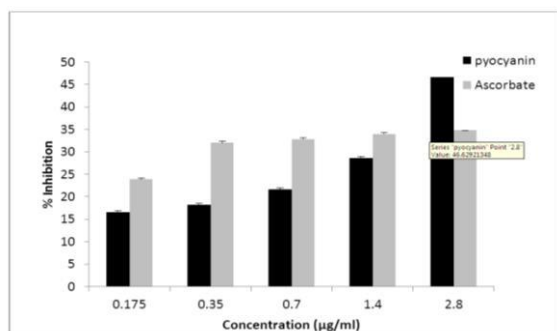
from 0.156 to 5mg/ml. A negative hemolytic activity was observed at this rang and the effect was detected at all concentration exceeding 5mg/ml of pyocyanin (Fig. 2).



**Fig. 2.** Hemolytic activity of pyocyanin (+: hemolysis, -: no hemolysis).

#### *Antioxidant activity of pyocyanin*

The DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of pyocyanin is given in Fig. 3. In the DPPH method, the result of antioxidant efficiency is expressed as EC<sub>50</sub> determined as the concentration of substrate that causes 50% loss in absorbance (DPPH activity). This activity was increased by increasing the concentration of sample substrate. The IC<sub>50</sub> value of the pyocyanin was 3.15 µg/ml, as opposed to that of ascorbic acid (IC<sub>50</sub> 7.79 µg/ml), which is a well-known antioxidant.

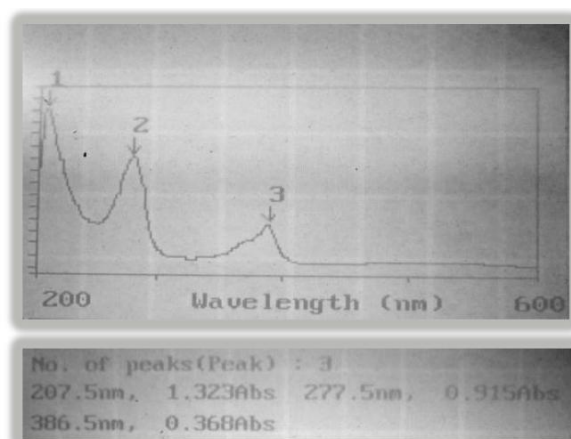


**Fig. 3.** DPPH radical scavenging activity of the pyocyanin. Values are the average of triplicate experiments and represented as mean ± standard deviation.

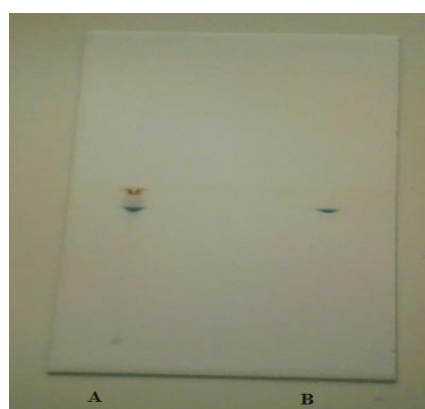
#### *Characterization of pyocyanin by UV spectrum and TLC*

The UV spectrum of partially purified compound showed three peaks, two major of them were found at 205.5 nm and 277.5 nm. However, the minor was observed at 386.5 nm (Fig. 4).

These observations confirm pyocyanin compound characters in the examined solution. The visualization of TLC revealed only one spot after migration and the RF was found to be 0.9 (Fig. 5). The spot showed a similarity between the standard and the used molecule of pyocyanin with the same RF.



**Fig. 4.** UV absorption spectra of pyocyanin showing  $\lambda_{\text{max}}$  277.5.

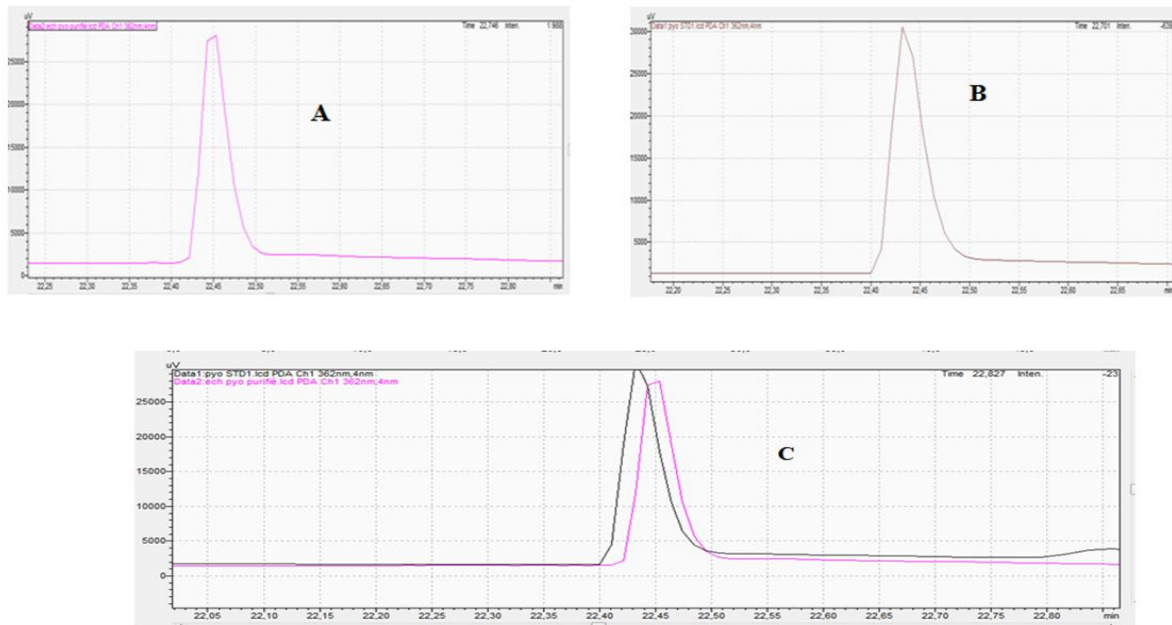


**Fig. 5.** Identification of pyocyanin by TLC (A) sample of pyocyanin and (B) standard of pyocyanin.

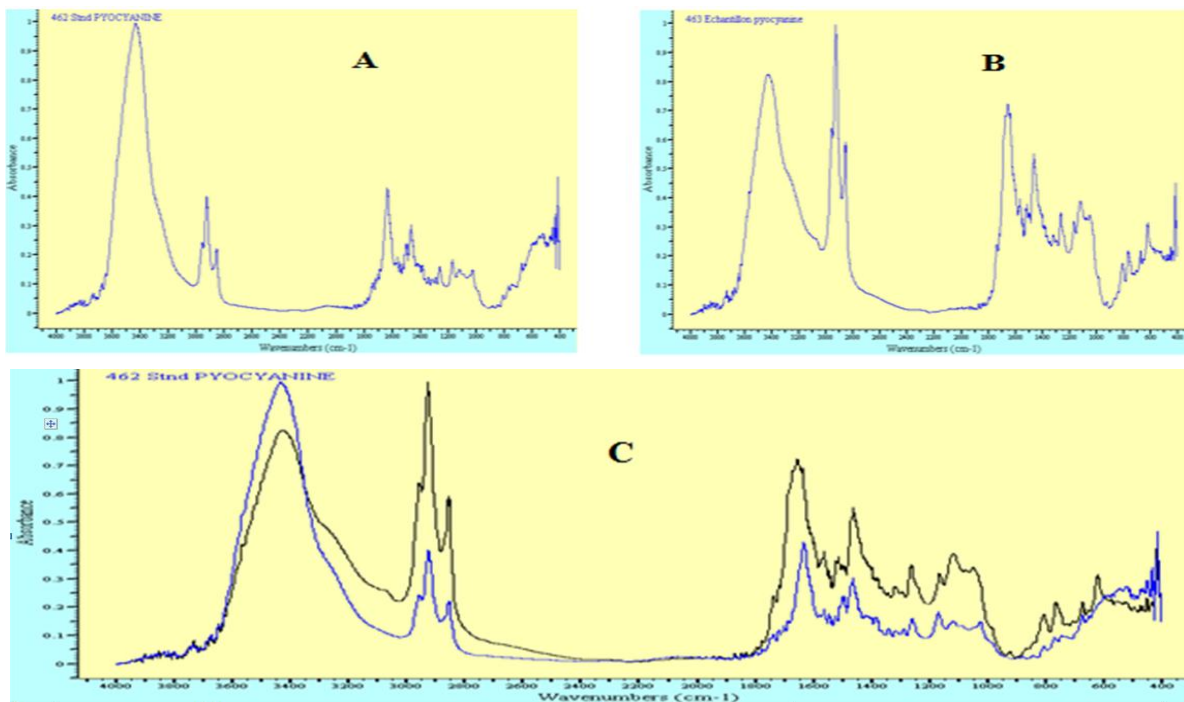
### Characterization of pyocyanin by HPLC and FTIR

The analysis of purified extract and the pyocyanin standard were performed in HPLC. The two compounds were identified by comparison of their retention time. The results represented in Fig. 6, show a peak of purified.

extract of analyzed pyocyanin with a retention time of 22.746 min (Fig. 6A) which was highly identical to that of the pyocyanin standard 22.701min (Fig. 6B). Fig. 7 summarizes the characteristics of the studied pyocyanin using the FTIR technique.



**Fig. 6.** Identification of pyocyanin by HPLC. (A) Sample of extract pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* (B) standard of pyocyanin and (C) extrapolation of two graphs A and B.



**Fig. 7.** FTIR measurements (A) standard of pyocyanin, (B) sample of pyocyanin from *P. aeruginosa* and (C) extrapolation of the two graphs A and B.

## Discussions

The present work is focusing a selection of environmental species of *Pseudomonas aeruginosa* to produce pyocyanin. The antagonistic activity of purified PCN compound was evaluated by measuring the zones of inhibition. It was found active against all tested pathogens microorganisms. The results showed high activity against *Candida albicans* ATCC 10231, *Bacillus cereus* ATCC 10876 and exhibit a moderate activity against gram-negative bacteria tested.

PCN, a blue colored phenazine exotoxin, can easily penetrate biological membranes. Because the difference in lipid content in their cell wall, the Gram-positive are more sensitive to pyocyanin in antibiotic than Gram-negative bacteria. El-Fouly *et al.* (2015) found that the MIC of purified pyocyanin (20 µg/ml) exhibited by *Staphylococcus aureus*; whereas the highest MIC (50 µg/ml) was recorded by *E. coli*. The broad-spectrum antibiotic of pyocyanin obtained in the present study is in agreement with several works (Kerr *et al.*, 1999; Preetha *et al.*, 2010; Barakat, 2012; El-Fouly *et al.*, 2015). The antibiotic effect of PCN is also due to its power in generating toxic effect of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during respiration (Hassan and Fridovich, 1980; Mavrodi *et al.*, 2006), and the capacity to arrest the electron transport chain of the fungi to exhibit antifungal activity (Wilson *et al.*, 1987).

In the present work we found that production of pyocyanin was salinity-dependent when *Pseudomonas aeruginosa* was grown in King A medium supplemented with 2.5 to 20 g/l of NaCl. The highest amount of PCN was obtained at 20 g/l and the growth of *P. aeruginosa* was completely inhibited at 50 g/l of NaCl. However; a recent study shows that maximum of productivity was found in a medium salinity ranging from 5-10 g/l (Prabhakaran *et al.*, 2014).

These findings can be explained by the role of stress salinity in increasing metabolites production and to the capacity of this bacterium to adapt in different environmental conditions (Selezska *et al.*, 2012). In the experience of antioxidant activity of pyocyanin we obtained a very high free radical scavenging at very low concentration as also obtained by Liyana and Shahidi (2005) and Laxmi *et al.* (2016).

In addition, this substance showed no hemolytic activity against human erythrocytes at less than 5 mg/ml. The same results were cited by Park *et al.* (2004). These findings give us the possibility to check the way of using this compound in *in vivo* experiments and further more in a therapeutic treatment.

The pyocyanin in chloroform extract separated as a blue color compound in organic phase showed a red color after addition of 0.2 N HCl indicating its membership to pyocyanin. The UV-spectrophotometric analysis showed that the maximum absorption was found at 277.5 nm which confirm one of pyocyanin characteristics as indicated by Kerr *et al.* (1999) and Sudhakar *et al.* (2013). The purified extract of pyocyanin showed one spot on TLC plate with RF 0.90 identical to the standard used. Our result was in accordance with Sudhakar *et al.* (2013). The obtained RF value was probably correlated to the kind of the solvent used.

The results of HPLC analysis revealed only a major peak with retention time of about 22.746 which was the same as observed with the standard. This finding identifies the extracted pyocyanin and confirms its purity. The obtained FTIR spectre present vibrations characteristic of the various connections constituting the structure of studied pyocyanin. The majority of the peaks appear in the field 400 with 2000 cm<sup>-1</sup> and absorption bands correspond to those of pyocyanin. An intense band located at 3433 cm<sup>-1</sup>, corresponding respectively to the asymmetrical elongation of grouping OH of the water molecule, A band located between 2853 and 2922 cm<sup>-1</sup>, associated the elongation of the CH grouping, An intense band located between 1634 and 1698 cm<sup>-1</sup>, associated the elongation of grouping C=C and C=N respectively,

Bands located at 1458 and at 1560 cm<sup>-1</sup>, associated the vibrations of the Benzene cycle, A band located between 1286 and 1258 cm<sup>-1</sup>, associated the elongation of the grouping C-n (primary Amine), A band located at 1336 cm<sup>-1</sup>, associated the elongation of the grouping CO, A band located at 1022 cm<sup>-1</sup>, associated the elongation of the grouping C-n (Tertiary Amine).

### Conclusion

Despite the striking success of the pharmaceutical industries in creating new antibiotics, finding new broad spectrum antimicrobial agents is still a priority because of resistant bacterial infections. In this study *Pseudomonas aeruginosa* isolated from saline soil was selected to produce a high amount of pyocyanin substance under saline conditions. The evaluation of purified extract using different analytical methods confirmed the similitude of the obtained substance with pyocyanin reference. The obtained pyocyanin was active against human pathogenic microbes and showed an important antioxidant activity. The hemolytic activity was not shown at less than 5mg/ml, opening an issue to use weak concentrations of pyocyanin as therapeutic agent. Finally, we can conclude that the present work needs to be continued with in vivo studies to clarify the clinical and therapeutic effects of pyocyanin.

### Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### References

- Barakat R.** 2012. Etude des propriétés biologiques et antimicrobiennes de la pyocyanine, pigment redoxactif produit par *Pseudomonas aeruginosa*. Université de La Rochelle 226 p.
- Baron SS, Terranova G, Rowe JJ.** 1989. Molecular mechanism of the antimicrobial action of pyocyanin. *Current Microbiol* **18**, 223-230.
- Barry AL, Thornsberry C.** 1985. Susceptibility tests: Diffusion tests procedures. In: Lennette E.H., Ballows A.W. Shadomy J.R.H. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology* pp. 1000-1008. American Society for Microbiology, Washington DC USA.
- Costa AL, Cusmane V.** 1975. Antimycotic activity of pyocyanin *in vitro* and *in vivo* an pathogenic strain of *Candida albicans*. *Gen. Bacteriol. Viro. Immunol* **66**, 297-308.
- El-Fouly MZ, Sharaf AM, Shahin AAM, El-Bial.** 2015. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Rad. Res. Appl. Sci* **8**, 36-48.
- Fernández RO, Pizarro RA,** 1997. High-performance liquid chromatographic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Phenazines. *J. Chromatogr. A* **771**, 99-104.
- Hassan HM, Fridovich I,** 1980. Mechanism of the antibiotic action of pyocyanin. *J. Bacteriol* **141**, 156-163.
- Hassett DJ, Sutton MD, Schurr MJ, Herr AB, et al.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. *Trends Microbiol* **17**, 130-138.
- Kerr JR, Taylor GW, Rutman A, Hoiby.** 1999. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *J. Clin. Pathol* **52**, 385-387.
- King ED, Ward MK, Raney DE.** 1954. Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med* **44**, 301-307.
- Kurachi M.** 1958. Studies on the biosynthesis of pyocyanin, isolation and determination of pyocyanine. *Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ.* **36**, 163-173.
- Laursen JB, Nielsen L.** 2004. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogs, and biological activity. *Chem. Rev* **104**, 1683-1685.
- Laxmi M, Sarita and Bhat G.** 2016. Characterization of pyocyanin with radical scavenging and antibiofilm properties isolated from *Pseudomonas aeruginosa* strain BTRY 1.3 Biotech **6**, 27. DOI 10.1007/s13205-015-0350-1.
- Liyana PCM, Shahidi F.** 2005. Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions. *J. Agr. Food Chem* **53**, 429-443.

- Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS.** 2006. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Phytopathol* **44**, 417-445.
- Ohfuji K, Sato N, Hamada-Sato N, Kobayashi et al.** 2004. Construction of a glucose sensor based on a screen-printed electrode and a novel mediator pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosens. Bioelectron* **19**, 1237-1244.
- Park Y, Park SN, Park SC, Park JY.** 2004. Antibiotic activity and synergistic effect of antimicrobial peptide against pathogens from a patient with gallstones. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **321**, 631-637.
- Prabhakaran P, Puthumana J, Neil SC, Balachandran.** 2014. Antagonistic effect of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from various ecological niches on *Vibrio* species pathogenic to crustaceans. *J. Coast Life Med* **2(1)**, 76-84.
- Preetha R, Jose S, Prathapan S, Vijayan KK.** 2010. An inhibitory compound produced by *Pseudomonas* with effectiveness on *Vibrio harveyi*. *Aquac. Res* **41**, 1452-1461.
- Price-Whelan A, Dietrich LE, Newman DK.** 2006. Rethin king 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chem. Biol* **2**, 71-78.
- Price-Whelan A, Dietrich LE, Newman DK.** 2007. Pyocyanin alters redox homeostasis and carbon flux through central metabolic pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol* **189**, 6372-6381.
- Rangarajan S, Saleena LM, Vasudevan P, Nair S.** 2003. Biological suppression of rice diseases by *Pseudomonas* spp. under saline salt condition. *Plant Soil* **251**, 73-82.
- Samanta SR, Thavasi Jayalakshmi S.** 2008. Phenazine pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and their application as antibacterial agent and food colorants. *Res. J. Microbiol* **3(3)**, 122-128.
- Selezska K, Kazmierczak M, Müsken M, Garbe et al.** 2012. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited under environmental focus: impact of water quality and phage pressure. *Environ. Microbiol* **14**, 1952-1967.
- Sudhakar T, Karpagam S, Shiyama S,** 2013. Analysis of pyocyanin compound and its antagonistic activity against phytopathogens. *Int. J. Chem. Tech. Res* **5**, 1101-1106.
- Usher LR, Lawson RA, Geary I., Taylor.** 2002. Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *J. Immun* **168**, 1861-1868.
- Wilson R, Pitt T, Tayler G, Walson D.** 1987. Pyocyanin and hydroxyphenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia *in vitro*. *J. Investig* **79**, 221-229.