

République Algérienne Démocratique et Populaire

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



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de fin d'études

Présenté par

Houat Souhil Ryane

-

Maraf Nafissa

Pour l'obtention du diplôme de

Master en biologie

Spécialité: Microbiologie appliquée

Thème

**Evaluation de l'effet du stress salin sur la production
des métabolites secondaires chez les *Pseudomonas*
fluorescents**

Jury

Président :	Mr Nemiche Saïd	Professeur	U. Mostaganem
Encadreur :	Mr Djibaoui Rachid	Professeur	U. Mostaganem
Examineur :	Mme Bekenniche Nahla	Docteur	U. Mostaganem

Année universitaire 2020-2021

Dédicaces

Je dédie cet humble travail à mes chers parents, pour leur amour, leur encouragement et leur soutien sans faille, je les remercie de m'avoir accompagné tout au long de mon parcours.

*A ma très chère **Maman***

Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consolider. Que dieu te garde pour moi.

*A mon très cher **Papa***

Je prie dieu le tout puissant de t'accorder la santé, le bonheur et une longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

*A mes très cher frères **Nadir, Abdallah et Kamal** Que dieu vous garde à mes côtés éternellement.*

*A mon très cher **grand- père** :*

*A la mémoire de mon grand-père **Maraf Hadj Abdallah** qui a été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite. Que Dieu l'accueille dans son éternel paradis.*

*A ma très chère **grand- mère maternelle** :*

Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu l'accorde une longue vie inchaallah.

*A mes très chers **cousins et cousines** :*

Maraf Yacine Ilyes Abdallah, Maraf Asma Noria, Kara mostéfa Imane, Benbernou Hadjer. Et ma chère tante : Fatima Benmerzouka.

*A mes très **chères amies** :*

Abadi Torkia, Nourhane Kadi, Belmokadem Bouchra, Shahinez Smaoui, Ilhem Ziane, Ghizlane Benriati, Kheloufi assia and my friend el Abssi.

*A **Mr Houat Souhil Ryane, mon binôme** et à sa famille.*

Nafissa

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents pour leurs sacrifices, leur soutien et leur amour. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous, que ce travail soit l'accomplissement de vos efforts et le fruit de votre soutien infailible.

*A ma très chère **Mère***

Quoi que je dise ou quoi que je fasse je ne saurai te remercier. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de motivation pour affronter les obstacles de la vie.

*A mon très cher **Père***

Grâce à toi j'ai appris à toujours me surpasser et repousser mes limites peu importe la situation, tes conseils et tes enseignements ont toujours su me montrer le bon chemin et m'aider à faire les bons choix.

*A mon cher frère **Sami** à qui je souhaite beaucoup de succès et de réussite.*

*À la mémoire de mes défunts **grands-parents et à ma grand-mère***

Qui m'ont encouragé depuis le plus jeune âge à poursuivre mes études et de travailler dur. Puisse Dieu, le tout-puissant, leur accorde sa sainte miséricorde.

A ma famille

Merci d'être toujours là pour moi.

*A **Melle Maraf Nafissa, mon binôme** avec qui ce travail en collaboration a permis d'aboutir à ce résultat et à sa famille.*

Souhil Ryane

Remerciements

On remercie avant tout, Dieu le tout puissant pour la volonté, la santé, et la patience qu'il dont il nous a gratifié durant toutes ces longues années d'études.

*Nous tenons à remercier en premier lieu notre enseignant **Pr. Djibaoui R** de nous avoir encadré. Nous voulons également lui témoigner toute notre gratitude et notre respect pour sa patience et son aide très précieux afin de mener notre travail à bien, Merci.*

*Nos remerciements vont aux membres du jury **Pr. Nemiche S** et **M^{me} Bekenniche N** d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nos plus sincères remerciements à **M^{me} Amir F**, **M^{me} Lazreug H** et à l'ensemble du personnel des laboratoires de l'Université de Mostaganem pour avoir partagé leur expérience, leur savoir et leur temps avec nous afin de réaliser ce travail.*

*Nous tenons également à remercier **M^{me} Attoura F** et **M^{me} Braikia K** pour leur aide et leur bienveillance.*

Nous tenons à exprimer nos remerciements à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation et ont su cultiver notre passion pour la biologie.

Enfin, merci à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail de près ou de loin.

À tous ces intervenants, nous présentons nos remerciements, nos respects et notre gratitude.

المخلص

Pseudomonas هي كائنات دقيقة منتشرة على نطاق واسع في بيئات مختلفة. تتمتع هذه السلالات بنشاط قوي مضاد للميكروبات والكائنات الدقيقة المسببة للأمراض من خلال إنتاج المركبات الثانوية. في مواجهة زيادة ظاهرة مقاومة المضادات الحيوية، أصبح من الضروري استكشاف جزيئات جديدة وبدائل موجودة في الطبيعة.

من هذا المنظور، الدراسة الحالية تتعلق بإنتاج المركبات الثانوية تحت الضغط الملحي الذي تم إجراؤه على خمسة عينات من *Pseudomonas* المأخوذة من الرمل تحت مياه البحر. قمنا باختبار هذه العزلات بالنسبة إلى تأثير الملوحة بتركيزات من كلوريد الصوديوم تتراوح من 1 إلى 7٪.

تم إنتاج المركبات الثانوية على وسط مولر-هينتون السائل ثم تم استخلاصها باستخدام الكلوروفورم. يبخر المستخلص الناتج في وسط مفرغ. تم اختبار تأثير المستخلص المضاد للميكروبات على أنواع مختلفة من البكتيريا والخمائر.

حدد اختبار النمط الظاهري ان جميع العزلات الخمس على أنها *Pseudomonas aeruginosa*. تم العثور على اثنين من هذه العزلات (B و E) الأكثر إنتاجاً. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها لاختبار الملوحة أنه عند تركيز 1٪ كلوريد الصوديوم، أنتجت السلالة B ما يقارب من 4 ميكروغرام / مل من المركبات. بالنسبة للسلالة E، حصلنا على تركيز حوالي 10 ميكروغرام / مل بتركيز 1.5٪ من كلوريد الصوديوم. بالنسبة لنشاط المضاد، تمكنا من ملاحظة أن عزلات *P. aeruginosa* تمارس نشاطاً مضاداً للميكروبات على جميع البكتيريا المستهدفة. أظهر تقييم النشاط المضاد للميكروبات في المختبر أن المركبات الثانوية المستخلصة تظهر مناطق تثبيط تتراوح بين 0.8 إلى 1.6 سم في القطر ضد بعض السلالات الممرضة المختبرة.

توضح هذه النتائج تأثير إجهاد الملح على إنتاج المركبات الثانوية في عزلات *P. aeruginosa*. من الممكن استخدام المستقلبات التي تنتجها كمادة مضادة للميكروبات على سلالات معينة من مسببات الأمراض. يشتهر في أن أحد المركبات الناتجة هو البيوسيانين.

الكلمات المفتاحية: *Pseudomonas* - إجهاد الملحي - المركبات الثانوية - تنافر - التأثير المضاد للميكروبات.

Résumé

Les *Pseudomonas* sont des microorganismes amplement répandus dans divers environnements. Ces souches sont dotées d'une forte activité antimicrobienne contre les microorganismes pathogènes grâce à la production de métabolites secondaires. Face à l'augmentation du phénomène d'antibiorésistance, il est devenu nécessaire d'explorer de nouvelles molécules et de nouvelles alternatives présentes dans la nature.

La présente étude est dans cette optique, elle porte sur la production des métabolites secondaires sous stress salin réalisée sur cinq *Pseudomonas* d'un sable prélevé sous l'eau de mer. Sur ces isolats on a testé l'effet de la salinité avec des concentrations de NaCl allant de 1 à 7%.

Des métabolites secondaires ont été produits sur milieu Mueller-Hinton liquide et qui ont été ensuite extraits en utilisant du chloroforme. L'extrait obtenu a été évaporé sous vide et mis en solution. L'effet antimicrobien du métabolite a été testé sur différentes bactéries à Gram positive, négative et sur une levure.

Les tests phénotypiques ont permis d'identifier les cinq isolats comme étant des *Pseudomonas aeruginosa*. Deux de ces isolats (notés B et E) se sont révélés être plus performants. Les résultats obtenus pour le test de la salinité montrent qu'à une concentration de 1% de NaCl, la souche B a produit près de 4 µg /ml de métabolites. Pour la souche E, on a pu obtenir une concentration de métabolites qui avoisine les 10 µg /ml et ce à une concentration de 1,5% de NaCl. Pour l'activité antagoniste, nous avons pu observer que les isolats de *P. aeruginosa* ont exercés une activité antimicrobienne sur l'ensemble des bactéries cibles. L'évaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro* montre que les métabolites secondaires extraits présentent des zones d'inhibition qui varient entre 0,8 à 1,6 cm de diamètre vis-à-vis de quelques souches pathogènes testées.

Ces résultats illustrent l'effet du stress salin sur la production de métabolites secondaires chez des isolats *P. aeruginosa*. Il est possible d'utiliser les métabolites produits par *P. aeruginosa* comme substance antimicrobienne sur certaines souches pathogènes. L'un des métabolites obtenus est suspecté d'être de la pyocyanine.

Mots clés : *Pseudomonas* – Stress salin – Métabolites secondaires – Antagonisme – Effet antimicrobien

Abstract

Pseudomonas are widely distributed microorganisms in various environments. These strains have a strong antimicrobial activity against pathogenic microorganisms through the production of secondary metabolites. Facing the increase in the phenomenon of antibiotic resistance, it has become necessary to explore new molecules and alternatives present in nature.

In this perspective, the present study deals with the production of secondary metabolites under salt stress carried out on five *Pseudomonas* collected from sand under sea water. The effect of salinity was tested on these isolates with different NaCl concentrations ranging from 1 to 7%.

Secondary metabolites were produced on liquid Mueller-Hinton medium, which were then extracted using chloroform, the extract was then evaporated under vacuum and put into solution. The antimicrobial effect of the metabolite was tested on various Gram positive, Gram negative bacteria and on a yeast.

The phenotypic tests identified all five isolates as *Pseudomonas aeruginosa*, two of these isolates (noted B and E) were found to be more productive. The results obtained for the salinity test showed that at a concentration of 1% of NaCl, strain B produced nearly 4 µg /ml of metabolites. For strain E, a concentration of metabolites close to 10 µg /ml was obtained at a concentration of 1.5% of NaCl. For the antagonistic activity, we were able to observe that the *P. aeruginosa* isolates exerted an antimicrobial activity on all target bacteria. The evaluation of the antimicrobial activity in vitro shows that the extracted secondary metabolites presented zones of inhibition that vary from 0.8 to 1.6 cm in diameter towards some of the pathogenic strains tested.

These results illustrate the effect of salt stress on the production of secondary metabolites in *P. aeruginosa* isolates. It is possible to use the metabolites produced by *P. aeruginosa* as antimicrobial substances on certain pathogenic strains. One of the metabolites obtained is suspected to be pyocyanin.

Key words : *Pseudomonas* - Salt stress - Secondary metabolites - Antagonism - Antimicrobial effect.

Listes des abréviations :

µg : microgramme.

µl : microlitre.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AHL : N-acylhomoserine lactones.

APC : Acide phénazine-1-carboxylique.

ARN : Acide ribonucléique ribosomique.

ARNm : Acide ribonucléique ribosomique messenger.

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique ribosomique.

ARNt : Acide ribonucléique ribosomique de transfert.

ATP : Adenosine triphosphate.

B: *Bacillus*

BCPL : Bouillon au Bromo-Cresol Pourpre.

C : *Candida*

CaCl₂ : Chlorure de calcium.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

Csp : Les protéines de choc hypothermique.

D.O : Densité optique.

DAPG : Le 2,4-diacétylphloroglucinol.

Dps : DNA-binding protein from starved cells.

DRO : Dérivé réactif de l'oxygène.

E: *Escherichia*

GSH : le glutathion.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

H₂S : Sulfure d'hydrogène.

HCl : Acide chlorhydrique.

HCN : Cyanure d'hydrogène.

HSP : protéine de choc thermique.

KOH : Hydroxyde de potassium.

M : molaire.

MgCl₂ : Chlorure de magnésium.

MH : Mueller-Hinton.

MnCl₂ : Chlorure de manganèse.

N.C : Non-compté.

NAD / NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

NH₃ : Ammoniac.

Nm : nanomètre.

P: *Pseudomonas*

PCA : Phenazine-1-Carboxylique Acide.

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

PRN : La pyrrolnitrine.

QS : Quorum Sensing.

R.M : Rouge de Méthyle.

RBS : Shine-Dalgarno.

RpoD : Facteur sigma (σ^D).

RpoS : Facteur (σ^S).

S : *Staphylococcus*

SAM : S-adénosyl methionine.

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

SOD : superoxyde dismutase.

SrCl₂ : Chlorure de strontium.

Tr/min : tours par minute.

TSI : Three Sugar Iron.

UV : Ultraviolet.

V.P : Vogues- Proskauer.

ZnCl₂ : Chlorure de zinc.

Table des matières :

- Résumé.
- Introduction..... 1

Synthèse bibliographique :

Chapitre I : Facteurs de stress influençant le développement des microorganismes.

Introduction	3
1) Température comme facteur de stress	3
1.1) Stress causé par une hyperthermie	3
1.2) Stress causé par une hypothermie	3
1.3) Mécanisme de résistance contre le stress thermique	4
2) La carence en nutriments	5
2.1) Les éléments nutritifs communément essentiels aux microorganismes	5
a) Le carbone	5
b) L'azote	6
c) Le phosphore	6
d) Autres substrats	6
2.2) Réponse à la carence des nutriments	6
3) Stress oxydatif	7
3.1) Mécanismes de résistance au stress oxydatif	8
4) Le pH comme facteur de stress	8
4.1) Mécanismes de résistances face au stress de la variation du pH	9
5) Stress osmotique (salin)	10
5.1) Mécanismes de résistance au stress osmotique	10
a) Dans un milieu hypotonique	10
b) Dans un milieu hypertonique	10
6) Production des métabolites secondaires par les microorganismes	12
6.1) Définition des métabolites secondaires	12
6.2) Production des métabolites sous l'effet d'un stress	12
6.3) Production des métabolites secondaires sous l'effet d'une carence nutritif	13
6.4) Production des métabolites secondaires sous l'effet d'un stress thermique et alcoolique	13
a) Choc thermique	13
b) Stress alcoolique	14
6.5) Production des métabolites secondaires sous l'effet d'un stress osmotique (milieu marin)	14

Chapitre II : Généralités sur les *Pseudomonas* fluorescents.

Introduction	16
1) Habitat Naturel	16
2) Taxonomie et Classification	16

3) Caractères morphologiques	18
4) Caractères biochimiques	18
5) Caractères génomiques	19
6) Les métabolites produits par les <i>Pseudomonas</i> fluorescentes	22
6.1) Antibiotiques	22
a) Pyolutéorine	22
b) 2,4-Diacétylphloroglucinol	23
c) Phénazines	24
d) Pyrrolnitrine	26
e) Mupirocine	27
6.2) Sidérophores	29
6.3) Enzymes	31
6.4) La pyocyanine	31
6.5) Les Rhamnolipides	32
6.6) Autres substances bioactives	33
7) Système de régulation de la biosynthèse des métabolites secondaires	34
7.1) Système GacA/GacS	34
7.2) Régulation LuxI/R QS	35
7.3) Régulation RpoS (σ^S) et RpoD (σ^D)	35

Partie expérimentale :

Chapitre III : Matériel et méthode.

1) Objectif de l'étude	36
2) Provenance de l'échantillon	36
3) Méthode d'isolement de <i>Pseudomonas</i>	37
4) Les milieux utilisés	37
5) Caractérisation des isolats	38
6) Pré-identification des souches isolées	38
6.1) Etude microscopique	38
6.2) Recherche de Catalase	38
6.3) Test VP/RM	38
6.4) Triple Sugar Iron (TSI)	39
6.5) Mannitol mobilité	40
6.6) Citrate de Simmons	40
6.7) Recherche de nitrate réductase	41
6.8) Bouillon au Bromo-Cresol Pourpre (BCPL) simple concentration	42
6.9) Recherche de la lécithinase	42
6.10) Recherche de la gélatinase	42
6.11) Recherche du cytochrome oxydase	42
7) Croissance à de différentes températures	43
8) Mise en évidence de la production de la Pyocyanine	43
9) Purification des souches tests	43
10) Test d'antagonisme in vitro	45
11) Test de salinité	45
12) Production du métabolite	46
13) Extraction et caractérisation du métabolite	47
14) Etude de l'activité antimicrobienne de l'extrait par la méthode des disques	48

Chapitre IV : Résultats et discussion.

1) Isolement des souches <i>Pseudomonas</i>	50
2) Confirmation de l'identification des souches <i>Pseudomonas</i>	52
2.1) Etude microscopique	53
2.2) Test Catalase	54
2.3) Test Oxydase	54
2.4) Tests biochimiques	55
3) Mise en évidence des pigments sur milieu King A.....	56
4) Croissance à différentes températures (4°C et 42°C)	57
5) Identification des souches tests	58
5.1) Identification des bactéries	58
5.2) Identification du champignons	59
6) Résultat du test d'antagonisme <i>in vitro</i>	60
7) Résultat du test de l'effet de la salinité	64
7.1) Effet de la salinité sur la croissance bactérienne	64
7.2) Effet de la salinité sur la production du métabolite	65
8) Résultats de l'extraction de du métabolite	67
9) Résultat de l'activité antimicrobienne de l'extrait obtenu	68
• Conclusion	70
• Références bibliographiques.	
• Annexes.	

Listes des figures :

Figure 01 : Représentation circulaire du génome de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5.....	20
Figure 02 : Représentation circulaire du génome de <i>P. aeruginosa</i>	22
Figure 03 : Voie de la biosynthèse de la pyolutéorine.....	23
Figure 04 : Voie de la synthèse biochimique de la DAPG.....	24
Figure 05 : Schéma de biosynthèse de la Phenazine-1-Carboxylic Acid in <i>Pseudomonas fluorescens</i>	25
Figure 06 : La voie de biosynthèse de la pyrrolnitrine.....	26
Figure 07 : Composition de la mupirocine en acide pseudomonique A, B, C et le Thiomarinol A.....	27
Figure 08 : Aperçu du cluster responsable de la biosynthèse de la mupirocine.....	28
Figure 09 : Voie de la biosynthèse de la mupirocine.....	29
Figure 10 : Plage Sidi El-Medjdoub (Mostaganem).....	37
Figure 11 : Incubation des échantillons du test de salinité.....	46
Figure 12 : Extraction de la pyocyanine selon la méthode de Kurachi.....	46
Figure 13 : Production de la pyocyanine sur milieu Mueller-Hinton.....	47
Figure 14 : Extraction du surnageant avec du chloroforme.....	47
Figure 15 : Evaporation sous vide à l'aide d'un rota vapeur.....	48
Figure 16 : Illustration des colonies fluorescente (E, F et G) obtenues sur milieu King B après 24h d'incubation à 28°C.....	50
Figure 17 : Illustration des colonies fluorescente (3) et non-fluorescentes (4) obtenues sur milieu King B après 24h d'incubation à 20°C.....	51
Figure 18 : Illustration de la colonie (K) fluorescente obtenue sur milieu King B après 24h d'incubation à 28°C.	51
Figure 19 : Illustration d'une colonie qui présente une zone d'inhibition.....	52
Figure 20 : Aspect macroscopique des colonies suspecte de <i>Pseudomonas</i> sur gélose King B.....	53
Figure 21 : Observation microscopique des <i>Pseudomonas</i> (B et K) après coloration de Gram (x1000).....	53
Figure 22 : Observation microscopique des <i>Pseudomonas</i> (E, G et F) après coloration de Gram (x1000)...	54
Figure 23 : Test catalase positif.	54
Figure 24 : Test oxydase positif de l'isolat B de <i>Pseudomonas</i>	55
Figure 25 : Mise en évidence des pigments fluorescents sur milieu King A.....	57
Figure 26 : Observation microscopique après coloration de Gram des souches tests (<i>Bacillus</i> et <i>Escherichia</i>) x 1000.....	58

Figure 27 : Observation microscopique après coloration de Gram des bactéries cibles (<i>Proteus</i> et <i>Staphylococcus</i>) x 1000.....	59
Figure 28 : Colonies obtenues sur milieu Sabouroud + Chlorophynicol similaire au colonies appartenant au genre <i>Candida</i>	60
Figure 29 : Observation microscopique du genre <i>Candida</i> après coloration de Gram (X 1000).....	60
Figure 30 : Histogramme des résultats du test d'antagonisme.....	61
Figure 31 : Activité antagoniste de <i>Pseudomonas</i> (B) vis-à-vis <i>B.cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i> et <i>Proteus</i>	62
Figure 32 : Activité antagoniste de <i>Pseudomonas</i> (G) vis-à-vis <i>B.cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i> et <i>Proteus</i>	62
Figure 33 : Activité antagoniste de <i>Pseudomonas</i> (E) vis-à-vis <i>B.cereus</i> , <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i>	62
Figure 34 : Activité antagoniste de <i>Pseudomonas</i> (K) vis-à-vis <i>B.cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	63
Figure 35 : Activité antagoniste de <i>Pseudomonas</i> (F) vis-à-vis <i>B.cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i> et <i>Proteus</i>	63
Figure 36 : Histogramme illustrant l'effet de la concentration de Nacl sur la croissance de la souche <i>P. aeruginosa</i>	65
Figure 37 : Courbe représentant l'effet de la salinité sur la production de la pyocyanine chez les isolats E et B.....	66
Figure 38 : Courbe d'absorbance spectral de la pyocyanine extraite a différente longueur d'ondes.....	67
Figure 39 : Effet antimicrobien de l'extrait pyocyanique sur <i>E. coli</i> et <i>Proteus</i>	68
Figure 40 : Absence d'effet antimicrobien de l'extrait pyocyanique sur <i>S. aureus</i> et <i>B.cereus</i>	40

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Taxonomie du genre <i>Pseudomonas</i>	17
Tableau 02 : Caractères biochimiques du genre <i>Pseudomonas</i>	19
Tableau 03 : Les bactéries cibles et les conditions de leurs cultures.....	43
Tableau 04 : Les tests biochimiques appliqués aux bactéries cible.....	44
Tableau 05 : Résultats des tests biochimiques des isolats.	56
Tableau 06 : Intensité de la fluorescence chez les souches <i>Pseudomonas</i>	57
Tableau 07 : Mise en évidence du degrés d'intensité des pigments fluorescents sur milieu King A à 42°C et 4°C.	58
Tableau 08 : Résultats des tests biochimiques des quatre souches tests (<i>B.cereus</i> , <i>Proteus</i> , <i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i>).....	59
Tableau 09 : Les distances de zones d'inhibition entre les isolats de <i>Pseudomonas</i> et bactéries cibles...	61
Tableau 10 : Résultat de la lecture de la densité optique de la croissance des isolats G, F, K, E et B....	65
Tableau 11 : Résultat de la lecture de la densité optique de la production de pyocyanine des isolats E et B.....	66
Tableau 12 : Concentration (en µg/ml) de pyocyanine des souches E et B sous différentes concentrations de NaCl.....	66
Tableau 13 : Résultat de l'absorption spectral de la pyocyanine extraite à différente longueur d'onde....	67
Tableau 14 : Activité antimicrobienne de l'extrait pyocyanique.....	68

Introduction :

Découvert au début du siècle dernier, les antibiotiques ont eu un effet salvateur sur la médecine en réduisant considérablement la mortalité liée aux infections qui étaient considérées comme incurables. Néanmoins l'émergence du phénomène de l'antibiorésistance ces dernières années est devenu récurrent, ainsi la résistance aux antibiotiques et plus largement aux anti-infectieux est devenue une situation préoccupante car pourrait devenir dans un futur proche l'une des causes principales de décès dans le monde. Ce qui a poussé les chercheurs à explorer d'éventuelles nouvelles molécules dans les différents écosystèmes.

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

Les *Pseudomonas* forment un large groupe colonisant l'eau de mer. Ce genre a été décrit et classé pour la première fois en 1894 par Emil Walter Migula, un botaniste allemand né en Pologne. Le groupe des *Pseudomonas* est un groupe particulièrement important qui appartient à la sous-classe γ des protéobactéries qui comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires. Toutefois, depuis la découverte de ce genre, de nombreux noms d'espèces lui ont été assignés. **(Palleroni., 2003 ; Peix *et al.*, 2009)**

Les *Pseudomonas* possèdent une aptitude à entraver les microorganismes pathogènes dans leur croissance et leur développement. Cela peut se faire selon plusieurs mécanismes notamment la production d'une vaste série de métabolites antagoniste secrétés qui dégradent les parois cellulaires des microorganismes et inhibent leur croissance. Les métabolites les plus caractéristiques sont les phénazines, la pyocyanine, phloroglucinols, pyrrolnitrine, lipopeptides, et le cyanure d'hydrogène. Ces derniers sont actifs contre un large groupe de bactéries Gram positif et Gram négatif en plus des champignons et levures. **(Vacheron *et al.*, 2016)**

Ce travail contribue à l'étude de l'effet du stress salin sur la production des métabolites secondaires secrétés par les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas* fluorescentes issues d'un environnement marin, dans le but d'exploiter ces métabolites comme agents antimicrobiens.

Afin de réaliser notre étude, les objectifs suivant ont été définis :

- Isolement et caractérisation phénotypique des *Pseudomonas*.
- Évaluation de l'activité antimicrobienne des isolats *Pseudomonas* obtenus.

- Évaluation de l'effet de la salinité sur la croissance des *Pseudomonas* et sur la production de métabolites secondaire.
- Production et extraction de métabolites secondaires.
- Évaluation de l'effet antimicrobien des métabolites extraits.

Ce manuscrit est structuré en deux parties, nous présentons tout d'abord une synthèse bibliographique en deux chapitres :

- Le premier chapitre introduit des généralités sur les différents stress environnementaux et les différents mécanismes de résistances employés par les bactéries pour y faire face.
- Le deuxième chapitre traite des différentes caractéristiques métaboliques et génétiques des bactéries du genre *Pseudomonas*.

La deuxième partie explique les différentes méthodes et techniques employées pour réaliser les objectifs susmentionnés ainsi que les résultats obtenus.

Chapitre I :
Facteurs de stress influençant
le développement des
microorganismes

Introduction :

La capacité des microorganismes à contrôler leur environnement est limitée, cependant ils doivent impérativement répondre au changement « stress » que leurs milieux leur imposent en effectuant des modifications physiologiques, biochimique ou génotypiques aux seins même de leurs cellules.

Le stress peut être défini comme toute modification des paramètres de l'environnement qui conduisent à une réponse du microorganisme. Les réponses aux stress ont été largement étudiées en raison de leur importance pour déterminer la capacité des microorganismes à réagir et s'adapter aux différentes modifications de l'environnement (**Welch, 1993**).

1) Température comme facteur de stress :

Les microorganismes sont particulièrement sensibles à la température, car leur température intérieure dépend de celle de leurs milieux. L'un des facteurs les plus notables concerne l'effet de la température sur la croissance et la sensibilité thermique des enzymes responsables de leurs métabolismes. Si la température est en dessous de la température optimale, l'activité des enzymes catalytique s'arrête. A contrario plus la température augmente plus l'activité catalytique s'accélère à son tour jusqu'à arriver à un optimum, ce qui activera le métabolisme général et de ceci résultera la croissance et le développement du microorganisme.

1.1) Stress causé par une hyperthermie :

Lorsque les microorganismes sont soumis à des températures au-dessus de leur optimum, leur croissance diminue à fur et à mesure que la température augmente jusqu'à ce que cela provoque une létalité. Cela peut s'expliquer par la dénaturation de leur protéine, leur système de transport et leurs enzymes, donc l'ensemble de leurs fonctions vitales seront détériorées. D'un point de vue structural, la bicouche lipidique risque de fondre et de se détériorée sous l'effet de la chaleur vu sa composition majoritairement lipidique et protéique. Le stress par hyperthermie risque d'affecter (permanemment) de façon irréversible la structure cellulaire ainsi que les fonctions biologiques des microorganismes (**Prescott *et al.*, 2010**).

1.2) Stress causé par une hypothermie :

Lorsque les microorganismes se développent dans un environnement ayant une température inférieure à leur optimum de croissance, la membrane risque de se solidifier sans pour autant détériorer sa composition chimique. Néanmoins cela peut causer des perturbations dans

l'activité des protéines membranaires ainsi que de l'ADN et ARN dans la réplication, transcription et traduction des informations génétiques (**Berry et Foegeding, 1997**).

L'étude du comportement des microorganismes vis-à-vis de ce facteur est importante, car lors de la biosynthèse de certain produit dans le cadre des procédés industriels, la température est déterminante pour optimiser la fermentation et le rendement des produits (**Abdel-Banat et al., 2010**).

1.3) Mécanisme de résistance contre le stress thermique :

En guise de réponse rapide au stress hyperthermique, la grande majorité des microorganismes induisent la synthèse des protéines appelés « protéine de choc thermique » ou « HSP » ayant des fonctions multiples au sein de la cellule comme la stabilisation du cytosquelette, l'application d'une activité de chaperon sur les protéines en les protégeant de la dénaturation, mais aussi en assurant le bon déroulement de leur synthèse, leur transport et la dégradation des éléments endommagés. Parmi ces protéines chaperon on peut citer les *DnaK*, *DnaJ*, *GroEL*, *GroES*, et les *GrpE*. Ces dernières ont surtout été étudiées pour leur fonction de protéolyse des protéines défectueuses et mal formées. Les *Lon* et *Clp* sont des protéases *ATP-dépendantes* chargées du renouvellement des protéines régulatrices et la dégradation des protéines endommagées, en plus de la protéine *HtrA* qui catalyse le renouvellement des protéines aberrantes dans le périplasma (**Gao et al., 2016 ; Nicolaou et al., 2010**).

En présence d'un stress hypothermique, les microorganismes induisent la production de protéines de choc hypothermique, ce sont des petites protéines liées aux acides nucléiques composées de 65 à 75 acide aminés. Présentes chez la majorité des microorganismes, ce sont des molécules très conservées au même titre que les protéines de choc hyperthermique (**Czapski et Trun, 2014**).

Les protéines de choc hypothermique les plus étudiées sont les « *Csp* », elles contiennent un domaine de liaison aux acides nucléiques « *CSD* » composés de deux ribonucléoprotéine qui ont pour rôle de faciliter la liaison avec l'ADN et l'ARN. Ces protéines ont un rôle de chaperon qui protège la structure de l'ADN et l'ARN et de leurs activités de réplication, transcription et traduction (**Lee et al., 2013**).

Bien que ces protéines de chocs thermiques soient présentes chez tous les groupes de microorganismes (les psychrophiles, mésophile et thermophile...), chaque microorganisme a

son seuil de thermo-sensibilité à partir duquel commencera la synthèse de ces protéines (**Phadtare, 2004 ; Jin *et al.*, 2014**).

Chez certaines bactéries marines, la sécrétion d'exopolymères comme les polysaccharides est une forme de résistance au froid, ces polysaccharides agissent comme des agents cryoprotecteur (**Flemming et Wingender, 2001**). Tandis que certains microorganismes ont la capacité d'entrer dans un état de végétation en produisant des spores thermorésistantes (**Loison, 2013**).

2) La carence en nutriments :

Les nutriments représentent les substances utilisées par les microorganismes dans la biosynthèse des composants essentiels à leurs survies, leurs divisions cellulaires et la production d'énergie utile à leurs métabolismes. La croissance microbienne dépend en grande partie de la disponibilité des nutriments dans leur milieu.

Afin de mieux comprendre l'effet des nutriments sur la croissance des microorganismes, **Lieberg** a développé une loi selon laquelle la biomasse d'un organisme sera déterminée par l'élément nutritif plus faible quantité. En d'autres termes, l'organisme croitra jusqu'à ce qu'un élément nutritif sera épuisé dans le milieu, en conséquence sa croissance sera arrêtée indépendamment de la quantité des autres éléments nutritifs présents (**Prescott *et al.*, 2010**).

L'environnement naturel est souvent épuisé d'un ou de plusieurs nutriments en raison de plusieurs facteurs dont l'activité métabolique des populations microbiennes indigènes. De ce fait, la carence en nutriment est la forme de stress la plus commune pour les microorganismes car ils y sont usuellement exposés (**Tempest et Neijse, 1981**).

2.1) Les éléments nutritifs communément essentiels aux microorganismes :

Parmi les éléments nutritifs les plus essentiels pour les microorganismes nous avons :

a) Le carbone :

Le carbone est un substrat vital pour les microorganismes, il est nécessaire à la formation du squelette de toute molécule organique et à la production d'énergie dont la cellule a besoin pour effectuer tous ces besoins métaboliques. Le carbone utilisé par les cellules peut être d'origine organique (microorganisme hétérotrophe) ou bien en réduisant le CO₂ (autotrophes).

b) L'azote :

L'azote constitue un substrat inorganique indispensable aux microorganismes pour la synthèse des acides aminés principalement le glutamate ou glutamine, des bases azotées (purines et pyrimidines), des cofacteurs enzymatiques en plus de certains lipides, des glucides ainsi que d'autres composés. L'azote peut provenir directement des acides aminés catabolisés, par intégration de l'ammoniaque ou bien par fixation de l'azote atmosphérique.

c) Le phosphore :

Tout comme l'azote, le phosphore est un substrat inorganique essentiel à la croissance microbienne. Il entre dans la composition des acides nucléiques, les cofacteurs d'enzymes, les phospholipides, l'ATP ainsi que d'autres composants. La majorité des microorganismes utilisent le phosphore inorganique mais il existe des exceptions comme *E. coli* qui utilise le phosphore organique et inorganique.

d) Autres substrats :

L'oxygène et l'hydrogène sont utilisés principalement par les cellules dans la chaîne de transport des électrons ainsi que les réactions d'oxydo-réduction pour fournir de l'énergie à la cellule. Le besoin de ces deux molécules est principalement comblé par la même source qui fournit le carbone.

Le soufre est utilisé dans la synthèse des composés tels que les acides aminés (méthionine et cystéine), des vitamines (biotine et thiamine) en plus de quelques glucides. Les microorganismes puisent leur besoin en soufre en réduisant le sulfate.

2.2) Réponse à la carence des nutriments :

Pour répondre à la carence des nutriments, les microorganismes peuvent s'adapter morphologiquement pour augmenter la surface d'absorption des nutriments par le passage d'une forme bâtonnet en forme mini ou ultra micro chez les procaryotes en général par allongement des pédoncules chez les microorganismes appendiculés.

La réduction de l'activité métabolique est souvent constatée dans le cas d'un appauvrissement en nutriments dans le milieu, le but étant d'en rationner le peu présent. Cette réduction métabolite ne s'applique pas pour les activités de transcription et d'expression des gènes essentiels à la survie (Prescott *et al.*, 2010).

Les cellules peuvent dégrader l'ARN et les protéines cellulaires pour libérer respectivement des nucléotides essentiels à la synthèse de nouveaux ARN et des acides aminés ou pour la production d'énergie. Certains microorganismes ont la faculté de séquestrer des nutriments critiques limitant afin de le rendre moins disponible pour les organismes compétiteurs, le cas le plus souvent décrit est la séquestration du fer en sécrétant des Sidérophores.

La formation de polymères cellulaires qui contiennent des quantités substantielles de nutriments spécifiques limitant la croissance est fortement réduit, tandis que la formation de ces polymères et des produits qui ne contiennent aucun nutriment limitant la croissance est encouragée **(Dalton, 1979)**.

Quelques microorganismes peuvent passer à un état végétatif inactif métaboliquement, ce passage est caractérisé par le phénomène de la sporulation, et ceci pour minimiser la consommation de l'énergie en entrant dans un état de quiescence ou endormissement en attendant l'amélioration des conditions externes. Ce processus peut être également enclenché par les variations de températures et l'exposition au rayon ultra-violet et les rayons gamma. Dans certains cas, le cannibalisme cellulaire, qui consiste à lyser les cellules qui ne sont pas encore passées à l'état végétatif peut contribuer à la libération des nutriments dans le milieu **(Loison, 2013)**.

3) Stress oxydatif :

Le besoin des microorganismes en oxygène est relatif à leurs types de métabolismes. Les aérobies ont besoin d'oxygène afin de l'utiliser comme accepteur final d'électron de la chaîne respiratoire alors que chez les anaérobies stricts l'oxygène est létal. La variation des relations entre les microorganismes et l'oxygène a plusieurs facteurs dont la sensibilité de certaines protéines et enzymes essentielles aux métabolismes microbiens. En effet et à titre d'exemple une enzyme comme la nitrogénase qui a pour fonction de fixer l'azote est très sensible à la présence de l'oxygène. En plus de perturber le métabolisme, l'oxygène est une molécule facilement réductible à cause de ces électrons non-appariés de ses deux orbitales externes. De cela en résulte des composés toxiques pour la cellule appelés dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), on peut citer les ions super-oxyde, le peroxyde d'hydrogène ainsi que le radical hydroxyle. Ces composés oxydent et détériorent les protéines, les lipides et les acides nucléiques qui composent la cellule et la membrane cellulaire **(Imlay, 2015)**. Il a été démontré que même si les organismes aérobies utilisent l'oxygène moléculaire pour la respiration aérobie et la production d'énergie, les dérivés réactifs de l'oxygène peuvent également causer

l'oxydation de plusieurs éléments et composés de la cellule aérobie (**Cabiscol et al., 2010**). Nous pouvons également définir le stress oxydatif comme un déséquilibre de la balance d'oxydo-réduction des microorganismes.

3.1) Mécanismes de résistance au stress oxydatif :

Afin de remédier aux dommages causés par le stress oxydatif, les microorganismes ont mis-au point différents mécanismes pour réduire la production des DRO et réparer les dommages causés par l'oxydation. La première ligne de défense des microorganismes est l'utilisation de des enzymes catalase et oxydase. Ensuite, ils peuvent utiliser des petites molécules comme le glutathion (GSH), un tripeptide (glu-cys-gly) et la thiorédoxine pour atténuer le stress oxydatif (**Carmel-Harel et Storz 2000**).

La deuxième ligne de défense sollicite l'utilisation d'enzymes dont le superoxyde dismutase (SOD) qui a comme fonction d'éliminer les radicaux superoxydes. La catalase et la peroxydase catalysent quant à eux la destruction du peroxyde d'hydrogène. Ces enzymes sont généralement présents chez les organismes aérobies stricts et anaérobies facultatifs (**Prescott et al., 2010**).

D'autres moyens sont utilisés par les microorganismes dont la désaturation des acides gras. Plus la concentration d'oxygène est élevée, plus l'activité de l'enzyme acide gras désaturase augmente, ce qui a pour conséquence de consommer l'oxygène libre rendant également la membrane moins fluide et moins perméables pour les molécules d'oxygènes (**Pamplona et al., 2002**).

Il a été observé chez certaine bactérie, comme *E. coli*, qui est une bactérie anaérobie facultatif, la présence de protéine *Dps* qui protège l'ADN du peroxyde d'hydrogène lors d'un stress oxydatif (**Foote et al., 1983**).

La NADH oxydase joue également un rôle dans l'élimination de l'oxygène libre. Le NADH est oxydé en NAD⁺ en même temps que la consommation d'oxygène dans *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (**Marty-Teyssset, 2000**).

4) Le pH comme facteur de stress :

Le potentiel d'hydrogène (pH) est la mesure de l'activité des ions d'hydrogène d'une solution ou d'un milieu donné. Ce paramètre affecte de façon directe la croissance des microorganismes. La diversité du monde microbien fait que chaque espèce ou groupe de microorganisme ont un

pH optimum de croissance, par exemple les champignons ont tendance à croître dans des milieux acides tandis que chez les bactéries, il existe des souches qui se développent dans des milieux neutre (neutrophile), alcalin (alcalophile) ou bien acide (acidophile).

En général, les microorganismes peuvent s'adapter à un large spectre de pH et ceux loin de leur optimum de croissance, néanmoins leur seuil de tolérance est limité. Si cette limite est dépassée, cela peut nuire à la fluidité membranaire et causer la destruction de la membrane cytoplasmique, la dénaturation des protéines de transfert membranaire ainsi que l'ionisation des nutriments les rendant indisponible pour la cellule.

Le pH du milieu subit des variations fréquentes à cause notamment des déchets métaboliques produits par divers microorganismes qui peuvent être acide ou basique. Face à cette irrégularité, les microorganismes utilisent des mécanismes divers pour survivre aux variations drastiques ? du pH dans leur milieu ayant comme principe de neutralisé le pH intermembranaire (**Prescott et al., 2010**).

4.1) Mécanismes de résistances face au stress de la variation du pH :

Chez les neutrophiles, qui représentent une grande population de microorganismes, la régulation du pH se fait par échange du potassium contre des protons par système de transport antiport.

Pour les alcalophiles comme la souche *B. alcalophilus*, elle procède à un échange d'ions de sodium interne contre des protons externes.

Dans le cas où le pH du milieu venait à devenir trop acide, certaines bactéries comme *E. coli* peuvent synthétiser de nouvelles protéines, une ATPase capable de soit synthétiser plus d'ATP ou bien simplement de rejeter les protons dans le milieu externe en réponse à la tolérance du stress acide. Si le pH atteint une valeur extrême, les bactéries synthétiseront alors des protéines chaperons comme les protéines du choc acide afin de préserver les molécules protéiques de la dénaturation et faciliter le repliement des protéines dénaturées.

La modification de la composition des acides gras pour préserver la perméabilité membranaire est également observée comme un mécanisme de résistances contre une augmentation de l'acidité (**Wu et al., 2012**).

L'ADN endommagé est restauré grâce au système de réparation. Il a été également démontré chez certaines souches dont *E. coli* que les protéines « *Dps* » protègent activement l'ADN dans

le cadre d'une réponse à un stress extrêmement acide (pH=2) et également très alcalin (pH=12) (Nair et Finkel, 2004).

5) Stress osmotique (salin) :

Les microorganismes possèdent une membrane perméable sélective les rendant vulnérables à la pression osmotique exercée par leurs environnements. Dans le cas où un microorganisme est placé dans un milieu hypertonique (à haute concentration de sel et minéraux) on observera un phénomène de déshydratation de la cellule causant le phénomène de la plasmolyse. À l'inverse, si nous plaçant notre microorganisme dans un milieu hypotonique, il y a pénétration de l'eau causant à fort déséquilibre une entrée massive de l'eau pouvant mener à un éclatement de la cellule (Prescott *et al.*, 2010).

L'eau est un élément crucial dans la biosynthèse microbienne, la présence de NaCl conduit à une réduction de l'eau disponible dans le milieu, causant un phénomène de dessiccation rendant faible la concentration des biomolécules et des ions, ce qui perturbera la croissance et le développement des microorganismes (Hohmann, 2002).

5.1) Mécanismes de résistance au stress osmotique :

Les microorganismes maintiennent généralement la concentration osmotique de leur protoplasme au-dessus de la concentration de leur milieu.

a) Dans un milieu hypotonique :

Dans un milieu hypotonique, la membrane cytoplasmique s'étire sous l'effet de la pression hydrostatique et du gonflement due à la pénétration d'eau. Certains microorganismes ont développé un mécanisme de résistance qui consiste à ouvrir des canaux mécano-sensibles présents sur la membrane, cela vont avoir l'effet d'une valve qui fera sortir le soluté dans le milieu extérieur. Chez certains microorganismes dépourvus de paroi comme les protistes, il existe des vacuoles pulsatrices d'eau ayant également comme objectif d'éviter un éclatement cellulaire.

b) Dans un milieu hypertonique :

La réponse primaire au stress hyper osmotique des cellules microbiennes est le maintien de l'équilibre ionique grâce notamment aux transporteurs à cassette liant l'ATP (ABC transporteur) situé dans la membrane cellulaire. Ils sont impliqués dans l'homéostasie des ions en transportant les ions en excès hors de la cellule (Esmann *et al.*, 2008).

Les microorganismes ont la faculté de synthétiser des solutés dit « compatibles » afin d'assurer la continuité des activités enzymatiques cytoplasmiques et ce en présence d'une faible activité de l'eau dans le milieu. Ces solutés compatibles de pH neutre, ont la caractéristique d'être des éléments très solubles, ils peuvent également être absorbés depuis le milieu extérieur. La transcription des gènes codant pour ces solutés est activée lorsque la cellule détecte la présence de stress salin ou hyper osmotique. Il existe plusieurs composés considérés comme compatibles tels que les cations de potassium (K⁺), les sucres (glycogènes, saccharose ...), les alcools (mannitol, glycérol...), les acides aminés (acide glutamique, proline...) ainsi que d'autres composés comme la choline, betaine et la carnitine qui sont généralement absorbés du milieu extracellulaire (**Kimura et al., 2010**).

En plus de son effet osmoprotecteur, la proline intervient dans la détoxification des formes actives d'oxygène, la stabilisation des protéines, la protection de l'intégrité de la membrane plasmique et pourrait même représenter une source de carbone et d'azote pour la cellule. Certains protistes photosynthétiques et les champignons utilisent les polyols (arabitol, glycérol et mannitol) en plus des acides aminés comme solutés compatibles, car ces composants ne peuvent pas perturber la structure des enzymes (**Prescott et al., 2010**).

La membrane a également un rôle important dans l'osmorégulation, elle permet de réguler et d'équilibrer l'absorption et le flux de solutés compatibles entre les milieux intracellulaires et extracellulaires.

Comme mentionné précédemment, un stress hyperosmotique modifie les lipides membranaires et leur configuration structurale, ce qui cause la destruction membranaire (**Gandhi et Shah, 2016**).

Chez plusieurs microorganismes, la composition des phospholipides de la membrane passe d'anionique à zwitterionique neutre lorsqu'ils sont soumis à un stress salin. Ces changements dans la composition des phospholipides ont été notamment observés en plus de la modification de la composition des acides gras chez les souches *Oceanimonas baumannii*, *Listeria monocytogenes* et *Lactobacillus plantarum* par exemple lorsque la salinité du milieu extérieur augmente (**Brown et al., 2003**).

Chez le *Marinococcus halophilus* qui est une bactérie marine Gram-positif, une augmentation de la salinité ou de la température conduit à une augmentation de la teneur en acides gras saturés (principalement 18 :0) et une diminution de la teneur en acides gras à chaîne ramifiée 15 :0.

6) Production des métabolites secondaires par les microorganismes :

6.1) Définition des métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires sont des molécules de faible masse moléculaire d'origine organique. Ces molécules ne sont pas nécessaires à la croissance des microorganismes, ils sont synthétisés lors de la phase stationnaire néanmoins ils assurent la survie de leur producteur dans l'environnement (Croteau *et al.*, 2000). Il existe divers métabolites secondaires dans l'environnement, l'activité biologique d'une large proportion d'entre eux n'a pas pu être déterminé à ce jour, la catégorie des métabolites la plus notable est celle aillant une activité antimicrobienne (Takano *et al.*, 2005).

Les métabolites secondaires sont synthétisés via des processus enzymatiques qui ont pour intermédiaire des protéines simples de forme libre, complexe ou ayant plusieurs fonctions polypeptidiques. Leurs principales voix biosynthétiques conduit généralement à la formation de composés aromatiques (isoprènes, oligosaccharides, peptides, polykétides, et les anneaux de β -lactame) (Paradkar *et al.*, 2003).

Les gènes codant pour les enzymes des métabolites secondaires sont généralement chromosomiques, par exemple, les 30 gènes « *str/sts* et *blu* » responsables de la biosynthèse de la streptomycine de *Streptomyces griseus* se trouvent tous dans une région chromosomique de 30-40 kb. Il peut néanmoins exister des gènes codants pour la synthèse des métabolites secondaires se situant dans le plasmide comme ceux qui codent pour la synthèse de la méthylénomycine A de *Streptomyces coelicolor* ou pour l'antibiotique AS-48 de *Enterococcus faecalis* S-48 (Martínez-Bueno *et al.*, 1990).

6.2) Production des métabolites sous l'effet d'un stress :

Comme cité précédemment, la production de métabolites secondaires est initiée lors de la phase stationnaire de la croissance, cette production est grandement influencée par les facteurs environnementaux. L'expression des gènes de biosynthèses des métabolites secondaires intervient lors de l'épuisement d'un nutriment, ou l'ajout d'un inducteur et/ou par une diminution de taux de croissance (Bibb, 2005).

6.3) Production des métabolites secondaires sous l'effet d'une carence nutritif :

Il a été démontré que certains métabolites secondaires sont influencés par des métabolites primaires comme le métabolisme de l'azote (**Wang et al., 2012**). La synthèse des antibiotiques est régulée par les nutriments (source d'azote, de phosphore et de carbone), les métaux, le taux de croissance, le contrôle de la rétroaction et l'inactivation des enzymes.

La production des métabolites secondaires chez les souches *Streptomyces* par exemple sont issus de la fermentation, ce qui fait qu'elle dépend des conditions physico-chimiques mais aussi la présence de substrat comme le phosphate en plus d'une source de carbone, d'azote, d'oxygène etc...

Bien que le carbone occupe un rôle central dans la croissance et la multiplication microbienne, il a été prouvé que la production de plus de 30 métabolites différents chez les *Streptomyces* peut être réprimée par la présence d'une source de carbone (glucose, lactose, mannose, saccharose...) Par exemple, le glucose réprime la formation des antibiotiques aminoglycosidiques (streptomycine, kanamycine, istamycine, néomycine, gentamicine), par la répression les enzymes biosynthétiques (**Piepersberg et Distler, 1970**).

Chez la souche *Erwinia carotovora*, le glycérol supprime la biosynthèse de son métabolite secondaire, le carbapénème, en réprimant la transcription du gène responsable de la synthèse de la molécule de détection du quorum qui induit la formation d'antibiotiques (**McGowan et al., 1995**).

La pénicilline issue du champignon *Penicillium chrysogenum* est produite à l'échelle industriel, et ceci en limitant la quantité d'azote dans le milieu et en ajoutant continuellement de petites quantités de glucose (**Prescott et al., 2010**).

6.4) Production des métabolites secondaires sous l'effet d'un stress thermique et alcoolique :

Les stress les plus appliqués pour induire la production de métabolite secondaire sont le choc thermique et le stress alcoolique.

a) Choc thermique :

L'un des exemples les plus récurrents est celui de la souche *Streptomyces venezuelae* productrice de l'antibiotique Jadomycine B qui est un antibiotique de la classe des benzoxazolophenanthridines (**Jakeman et al., 2009**).

Il a été prouvé que lorsque la température de culture est augmentée de 27°C à 42°C la production de la Jadomycine B augmente considérablement comparé à un milieu qui n'a subi aucune augmentation de température (**Doull, 1993**).

b) Stress alcoolique :

En reprenant le même exemple de la souche *S.venezuelae*. Il a également été démontré que l'ajout de 6% d'éthanol dans le milieu de culture augmente la concentration de la Jadomycine B comparé à un milieu qui n'a subi aucune addition. Il a été démontré que les gènes responsables de la biosynthèse des métabolites sont régulés par des facteurs de transcription, un répresseur et un inducteur. Lors d'un choc thermique ou alcoolique, le répresseur de la transcription est inhibé, ce qui provoque une surproduction du métabolite secondaire, or dans le cas cité précédemment : le facteur répresseur de la biosynthèse de la Jadomycine B est inactivé ce qui explique l'augmentation de la production. Néanmoins les mécanismes par lesquels les facteurs environnementaux induisent la production de métabolites secondaires sont très peu répertoriés et sont toujours en investigation (**Yang et al., 2001**).

6.5) Production des métabolites secondaires sous l'effet d'un stress osmotique (milieu marin) :

Les bactéries marines, qui sont sous l'effet d'un stress osmotique important, produisent des composés terpènes et terpénoïdes comme métabolite secondaire. Les terpènes ont un rôle important dans la médiation des interactions antagonistes et bénéfiques entre les organismes et les fonctions physiologiques y compris la stabilisation des membranes, les propriétés antioxydantes, la signalisation et la protection (**Gershenson et Dudareva, 2007**).

(**Schulz et Dickschat, 2007**) ont démontrés la présence d'une variété importante des produits volatiles et hydrocarbures produites par les bactéries comme métabolite secondaire. Il est possible de citer à titre d'exemple : les lactones iso- et anteiso-ramifiés α - et δ produits par *Streptomyces caviscabies* et le 2-phenylethanol produit par *Roseobacter* ssp, *Staphylococcus xylosus* et plusieurs espèces de *Streptomyces*.

La seule bactérie marine a été identifiée à ce jour comme productrice de composés diterpénoïdes est la *Chloroflexus aurantiacus* (**Hefter et al., 1993**).

Le nombre croissant de terpènes signalés dans les bactéries marines suggère qu'un grand nombre de ces composés doivent encore être isolés et caractérisés. Leur rôle dans la physiologie des cellules bactériennes est également inconnu dans la plupart des cas.

En plus des composés terpène et terpénoïdes, il a été démontré que les bactéries marines produisent des Sidérophores pour capturer, solubiliser et transporter le fer (III) à l'intérieur de la cellule (**Rastogi et Sinha, 2009**).

L'eau de mer est un milieu pauvre en fer et la plupart des microorganismes dépendent du fer pour divers processus cellulaires, à savoir la respiration, la photosynthèse ou la production de pigments. Parmi les Sidérophores détectés dans les milieux marins on peut citer : Amphibactins produite par *Vibrio* sp R-10, la Pyoverdine produite par *Pseudomonas aeruginosa* ID 4365 et Loihichelins A–F produite par *Halomonas* sp. LOB-5 (**Homann, et al., 2009**).

Plusieurs autres substances chimiques produites par les bactéries marines comme métabolite secondaire ne sont pas encore identifiées et répertoriées car le domaine est à ce jour encore peu étudié.

Chapitre II :
Généralités sur les
Pseudomonas fluorescents.

Introduction :

Les *Pseudomonas* désignent un groupe de bactéries exceptionnellement plurivalentes, c'est le groupe le plus étudié pour ses diverses applications biotechnologiques. Ce genre se distingue par son omniprésence dans différents habitats, et sa grande capacité de coloniser l'environnement. Il a aussi un pouvoir de polyvalence dans la production des métabolites à partir de molécule organiques simples comme source d'énergie (**Mercado-Blanco, 2015**).

1) Habitat Naturel :

La plupart des espèces de *Pseudomonas* sont ubiquitaires, elles occupent la plupart des environnements naturels, leur isolement est effectué à partir du sol, de l'eau, des poussières en suspension dans l'air et des végétaux. Les bactéries de ce genre peuvent vivre dans des niches écologiques très diverses grâce à leur large versatilité nutritionnelle. Elles présentent un fort potentiel d'adaptation physiologique et génétique et sont capables d'utiliser une grande variété de nutriments. Les souches appartenant au genre *Pseudomonas* représentent plus de 60% de la microflore bactérienne totale du sol, elles sont parmi les plus abondantes dans la rhizosphère. Leur présence est ainsi très fréquente en milieu hospitalier où elles peuvent être isolées dans les environnements humides (siphons, éviers, vases, linges, récipients contenant de l'eau...). (**Talon et al, 2006**)

2) Taxonomie et Classification :

Le genre *Pseudomonas* appartient à la famille des *Pseudomonaceae*, il comprend une soixantaine d'espèces (**Cook et al., 1996**). Selon la deuxième édition du "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", l'ordre des *Pseudomonadales* est défini sur la base des séquences des ARNr 16S et il est constitué de la famille des *Pseudomonadaceae*. La taxonomie du genre *Pseudomonas* a subi de nombreux changements au fil du temps, c'est l'un des genres bactériens le plus diversifié. (**Palleroni, 2005**)

Les *Pseudomonas* sont classées selon la hiérarchie établie par (**Holt et al., 1994**).

Tableau 01 : Taxonomie du genre *Pseudomonas*. (Holt *et al.*, 1994).

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

En analysant les séquences de 128 espèces de *Pseudomonas* (certaines sont des souches de référence), ils ont conclu que 57 seulement appartenaient au groupe des *Pseudomonas* au sens strict ; la comparaison de 1073 nucléotides les a subdivisées en sept groupes :

- Le groupe des *P. syringae*.
- Le groupe des *P. chlororaphis*.
- Le groupe des *P. fluorescens*.
- Le groupe des *P. putida*.
- Le groupe des *P. stutzeri*.
- Le groupe des *P. aeruginosa*. (Anciennement appelée *Bacterium aeruginosum* par Schroeter, 1972)
- Le groupe des *P. pertucinogena*.

3) Caractères morphologiques:

Les *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, droits ou légèrement incurvés, de 0,5 à 1,0 μm de diamètre sur 1,5 à 5,0 μm de longueur, non sporulés. Ce sont des bactéries mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires (Garrity, 2005). Elles sont facilement cultivables sur des milieux minéraux synthétiques avec une source simple de carbone. Les colonies de *P. aeruginosa* ont l'aspect d'un œuf sur plat, ce sont des polymorphes, avec une partie centrale bombée et un contour plus ou moins irrégulier. *P. aeruginosa* se différencie des autres espèces fluorescentes par la présence d'un flagelle polaire. (Avril *et al.*, 2000)

4) Caractères biochimiques :

Les *Pseudomonas* sont des bactéries neutrophiles qui ne peuvent pas se développer dans des conditions acides (pH inférieur à 4.5). Leurs températures optimales de croissance sont comprises entre 25°C et 30°C, néanmoins elles peuvent se développer à des températures extrêmement basses (jusqu'à 4°C). Elles se multiplient généralement dans des milieux humides. (Field, 2008)

La majorité des souches de ce genre sont des chimio-organo-trophes aérobies strictes qui nécessitent à la fois de l'oxygène et du carbone organique (hétérotrophes) pour leur croissance. Les souches *P. fluorescens* ne sont pas des espèces halophiles, elles ne tolèrent qu'une concentration de sel (NaCl) comprise entre 1% et 4%.

Les souches *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*, étant aérobies strictes, elles produisent les enzymes Catalase et Oxydase afin d'éliminer les déchets cytotoxiques produits par l'oxygène. Elles ont la capacité d'utiliser le citrate comme source de carbone en plus de la faculté à produire des Sidérophores afin de capter le fer dans leurs milieux (Kapal *et al.*, 2016). Leur métabolisme est de type oxydatif, elles sont capables d'utiliser le citrate comme source de carbone en plus de la faculté de dégrader les composés complexes comme les polysaccharides comme l'amidon ou la cellulose. Leur membrane est résistante (assez bonne résistance face aux UV solaires par exemple), et leur perméabilité membranaire est basse, ce qui renforce leur résistance aux stress externes. Ces deux souches sont des espèces appartenant au groupe fluorescentes car elles produisent des pigments qui provoquent une fluorescence sous rayonnement UV. (Bisen et Verma, 1998)

Chapitre II : Généralités sur les *Pseudomonas* fluorescents.

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

Tableau 02 : Caractères biochimiques du genre *Pseudomonas*. (Kapal *et al.*, 2016 ; Bisen et Verma, 1998)

Tests Biochimiques	Résultats
Hydrolyse de l'amidon	Négatif (-)
Liquéfaction de la gélatine	Positif (+)
Pigment fluorescent	Positif (+)
Catalase	Positif (+)
Oxydase	Positif (+)
Citrate	Positif (+)
Indole	Négatif (-)
Rouge de Méthyle	Négatif (-)
Vogues- Proskauer	Négatif (-)
Production de Sidérophores	Positif (+)
Production de Cyanure d'hydrogène (HCN)	Positif (+)
Production d'Indole Acétique Acide	Positif (+)
Nitrate réductase	Positif (+)
Fermentation du Glucose	Négatif (-)
Fermentation du Lactose	Négatif (-)

5) Caractères génomiques :

Il existe 494 génomes complets de l'ensemble du genre *Pseudomonas*. Ils ont été analysés lors d'une étude génomique comparative, 25 d'entre eux ont été identifiés comme étant *P. fluorescens* (Garrido *et al.*, 2017). L'analyse phylogénétique des 25 souches a clairement montré que les

P. fluorescens annotées ne forment pas un groupe monophylétique car leurs identités nucléotidiques moyennes ne répondaient pas aux critères d'une espèce, on peut dire donc qu'elles étaient très diverses.

Il a été conclu que *P. fluorescens* n'est pas une espèce au sens strict, mais qu'elle doit être considérée comme un groupe évolutif plus large, ou un complexe d'espèces qui comprend également d'autres espèces. Le groupe évolutif de *P. fluorescens* comprend 96 génomes et présente des niveaux élevés d'hétérogénéités phylogénétiques.

Le groupe de *P. fluorescens* possède un génome dont la taille varie entre 6.4 Mb à 7.07 Mb (**Paulsen et al., 2005**). Une étude a été menée afin de comparer trois bactéries saprophytes de *P. fluorescens* (Pf-5, SBW25 et Pf0-1) entièrement séquencées, les résultats ont révélé un degré de diversité énormément élevé. Ces trois souches de *P. fluorescens* ne partagent que 61,4 % de leur contenu génétique alors que cinq génomes séquencés de *Pseudomonas aeruginosa* partagent entre 80 % et 90 % de leur contenu génétique. (**Silby et al., 2009**)

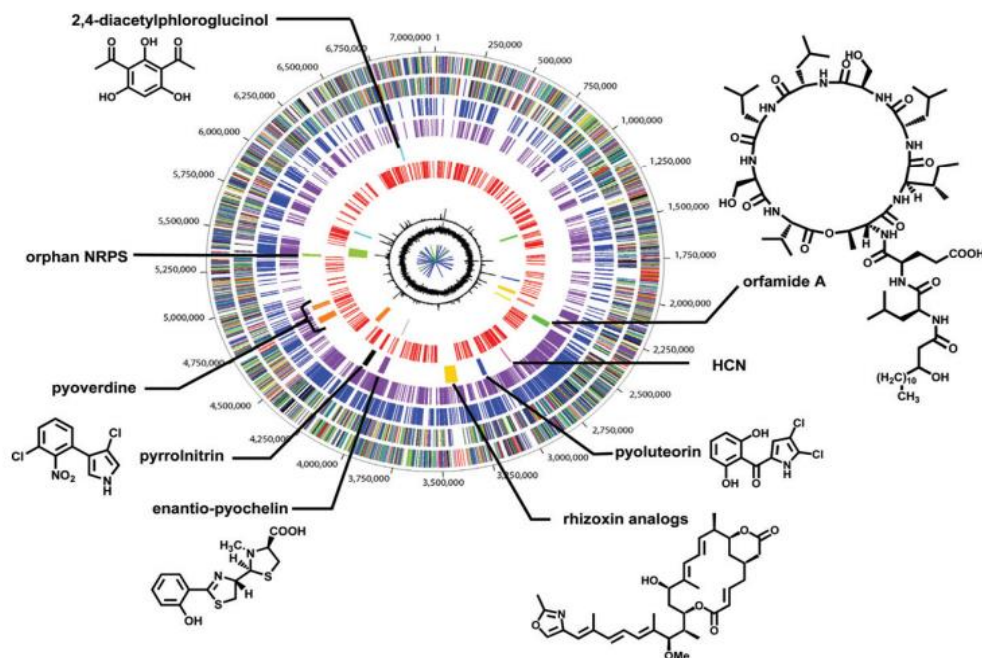


Figure 01: Représentation circulaire du génome de *P. fluorescens* Pf-5.

Selon la figure 01 on peut voir que l'échelle extérieure désigne les coordonnées en paires de bases (bp), avec l'origine de répllication à 1 pb.

- Le premier cercle (cercle ultrapériphérique) indique les régions de codage prévues sur le volet positif.
- Le deuxième cercle indique les régions de codage sur le volet négatif avec un code couleur par catégorie de rôle.
- Le troisième cercle montre l'ensemble des 1489 gènes Pf-5 de *P. fluorescens* qui ne se trouvent pas dans le génome de *P. aeruginosa* PAO1, *P. syringae* et *P. putida* KT2440.
- Le quatrième cercle montre l'ensemble des 1472 gènes qui ne se trouvent pas dans les génomes de *P. fluorescens* SBW25 ou PfO-1.
- Le cinquième cercle montre neuf groupes de gènes de métabolites secondaires.
- Le sixième cercle indique les éléments de répétition REP.
- Le septième cercle montre l'île mobile PFGI-1 dans les régions des phages.
- Le huitième cercle montre le trinuéclotide.
- Le neuvième cercle indique le pourcentage G + C par rapport à la moyenne G + C dans 2000 pb.
- Le dixième cercle montre les gènes de l'ARNr en vert, les gènes ARNt en bleu. (**Loper, 2009**)

Le premier séquençage complet du génome de l'espèce *P. aeruginosa* (**Figure 02**) a été réalisé pour la souche PAO1 par l'équipe de **Stover et al.**, il s'agit de l'un des plus grands génomes bactériens séquencé avec 6,3 millions de paires de bases codant pour 5 570 séquences protéiques prédites. En étudiant ce génome de près, il est possible de distinguer un nombre important de gènes d'adaptation métabolique et nutritionnel en plus de gènes de résistance intrinsèque aux antibiotiques. Soixante-dix à 90% des gènes sont spécifiques de l'espèce, et 10% à 30% sont spécifiques au clone bactérien. La proportion de gènes de régulation est la plus importante de tous les génomes bactériens séquencés connus. Outre le chromosome bactérien *P. aeruginosa*, possède de nombreux plasmides transférables par conjugaison ou par transduction. La taille, la complexité et la variabilité du génome de *P. aeruginosa* démontre une évolution adaptative de l'espèce lui permettant de survivre dans différents environnements. (**Stover et al., 2000**)

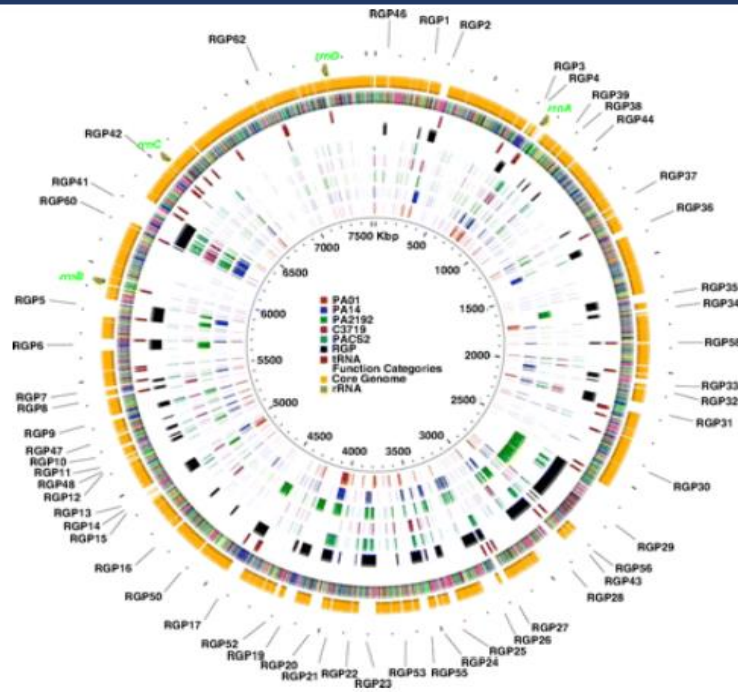


Figure 02 : Représentation circulaire du génome de *P.aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000).

6) Les métabolites produits par les *Pseudomonas* fluorescents :

6.1) Antibiotiques :

a) Pyolutéorine :

La pyolutéorine est un antibiotique produit majoritairement par les *Pseudomonas* fluorescents. Cet antibiotique est retrouvé dans la rhizosphère, plus particulièrement, il est sécrété contre les oomycètes comme le *Pythium ultimum* et certaines bactéries pathogènes. (Bender et Rangaswamy, 1999)

La pyolutéorine est synthétisée par neuf gènes structuraux, *PltA-G*, *PltL-M* en plus de deux gènes codent pour les régulateurs de la transcription. Le gène *PltR* est l'activateur de la transcription des neuf gènes tandis que *PltZ* est le répresseur de la transcription. (Huang *et al.*, 2004)

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

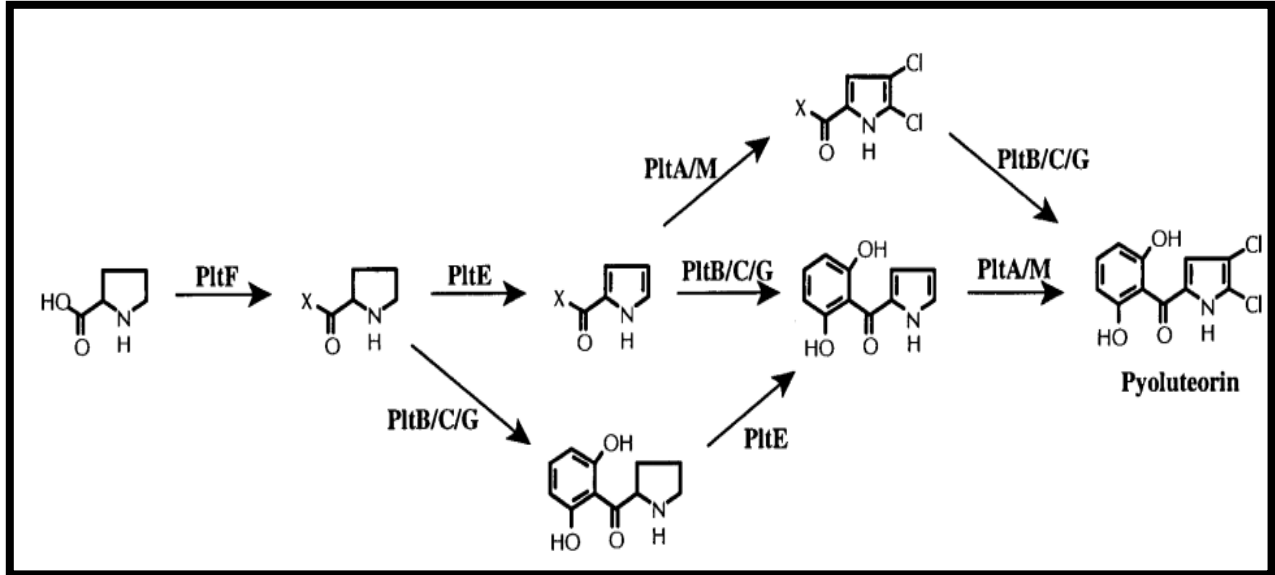


Figure 03 : Voie de la biosynthèse de la pyoluteorine proposé par (Nowak-Thompson *et al.*, 1999).

Dans la voie biosynthétique proposée par Nowak-Thompson *et al.*, de la Figure 03, les flèches représentent les transformations biochimiques prédites, catalysées par les produits encodés par le groupe de gènes de la pyolutiorine. Le désignateur « X » indique la fixation covalente de la proline soit à la CoA, soit à l'adénosine. La *pltD* a été omise dans ce schéma en partant de l'hypothèse que : l'absence d'une région de liaison au NADH la rend non fonctionnelle. (Nowak-Thompson *et al.*, 1999)

b) 2,4-Diacétylphloroglucinol :

Le 2,4-diacétylphloroglucinol (2,4 DAPG) est un antibiotique polykétide. Cet antibiotique affecte plusieurs processus cellulaires chez différents microorganismes : il peut causer la rupture du cytosquelette d'actine des *Aphanomyces*, l'inhibition des activités mitochondrial chez *Saccharomyces cerevisiae* et peut provoquer la perte de la mobilité chez les zoospores et les amibes ainsi que leur lyse (Islam et Fukushi, 2010). Il a été démontré que l'opéron *phlABCD* est à l'origine de la biosynthèse du 2,4 DAPG, en plus des gènes *phlE* qui codent pour la perméase, *phlF* qui est le répresseur de la transcription, *phlG*, *phlH*, et *phlI*. (Achkar *et al.*, 2005)

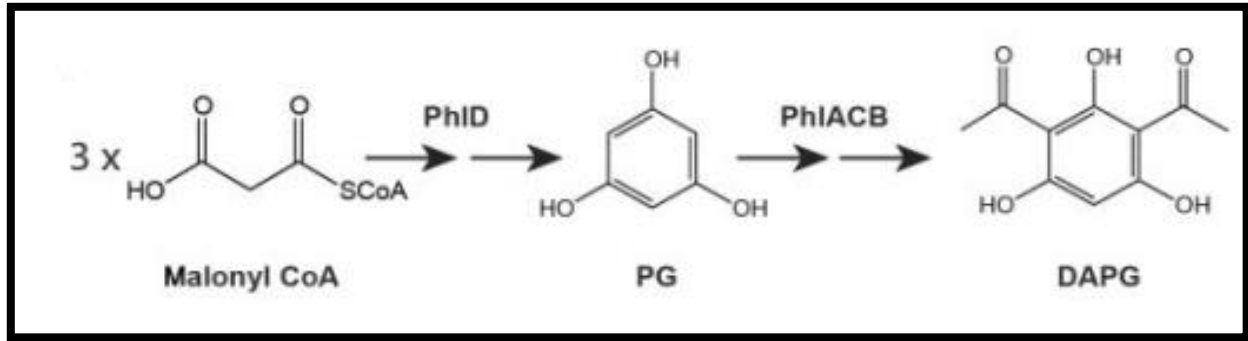


Figure 04: Voie de la synthèse biochimique de la DAPG proposée par (Troppens *et al.*, 2013)

c) Phénazines :

Les premières phénazines ont été décrites dans les années 1890 sous la forme de pyocyanine (la phénazine bleue) synthétisée dans les tissus humains par les souches *P. aeruginosa*. (Lau *et al.*, 2004). Différentes espèces de *Pseudomonas* ont une tendance à produire des phénazines. Ces métabolites ont différentes activités biologiques notamment dans la virulence. (Wang *et al.*, 2011) De nombreuses phénazines telles que : la pyocyanine (1-hydroxy-5-méthyl-phénazine), l'acide phénazine-1-carboxylique (APC), le 1-hydroxyphénazine et la phénazine-1-carboxamide (PCN) sont produites par *P. aeruginosa*. (Budzikiewicz, 1993)

Les phénazines sont des composés aromatiques composés de plus de quatre-vingts molécules hétérocycliques azotées produites par les espèces fluorescentes et d'autres genres de bactéries sous différentes formes chimiques. Les phénazines les plus répandues sont pigmentées ayant un large spectre d'action antimicrobienne contre les bactéries, les champignons et autres parasites. (Laursen et Nielsen, 2004)

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

La PCA a été décrite comme étant un biopesticide très efficace, elle a été isolée et purifiée en 1990 par Thomashow *et al.*, à partir des racines appartenant à la rhizosphère d'une plante colonisée par

P. fluorescens 2-79, ce qui illustre la capacité de la souche à sécréter cet antibiotique (Thomashow *et al.*, 1990). La PCA a un effet bactériostatique sur les souches de *S. aureus* ainsi que la faculté d'inhiber la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* et de *Bacillus anthracis*. En plus d'agir sur certaines bactéries pathogènes, la PCA exerce également une action antifongique contre les espèces *Cercospora musae*, *Diplodia zae*, *Claviceps purpurea* et *Pythium debraryanum* et *Stemphylium sarcinaeforme* a des concentrations variables. (Haynes *et al.*, 1956)

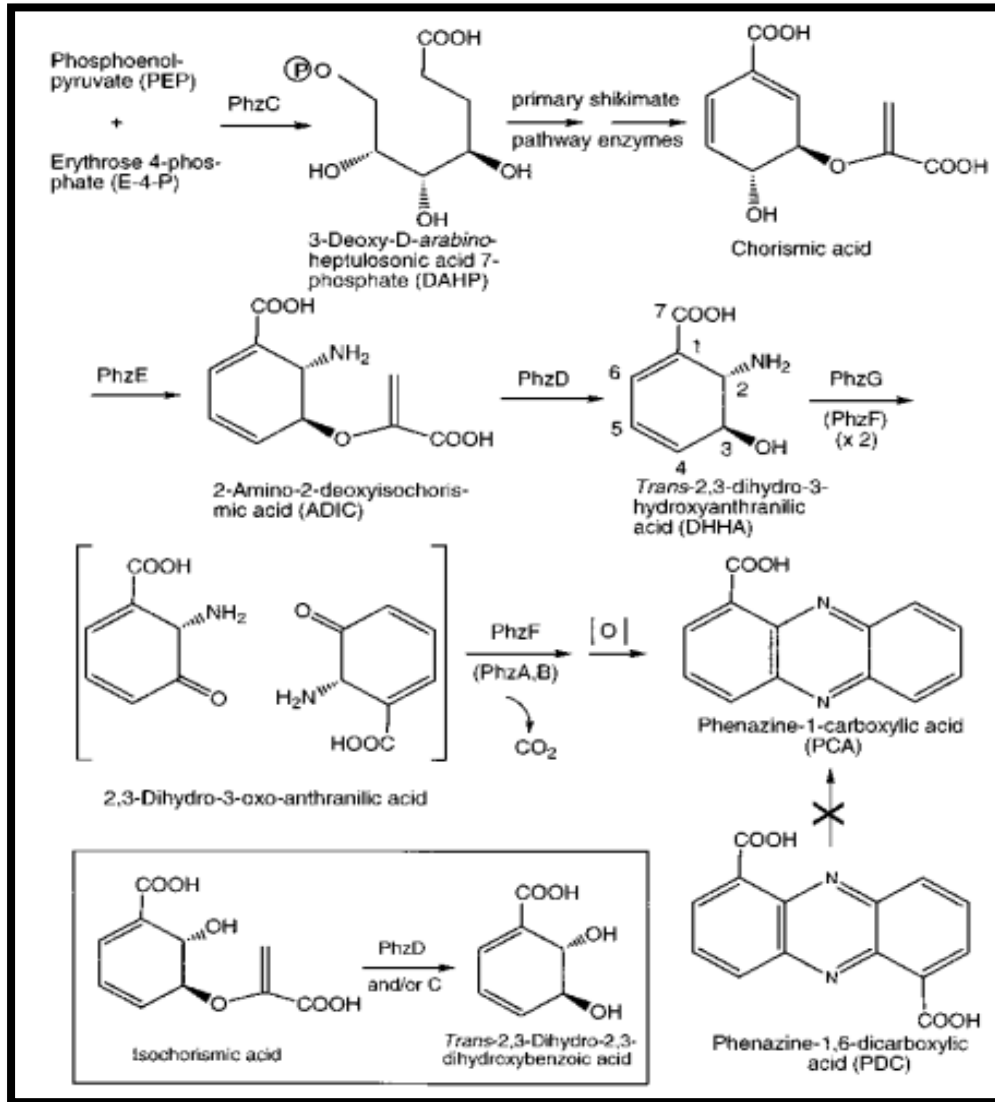


Figure 05 : Schéma de biosynthèse de la Phenazine-1-Carboxylic Acid in *Pseudomonas fluorescens*. (McDonald *et al.*, 2001)

d) Pyrrolnitrine :

La pyrrolnitrine (PRN) est un antifongique à large spectre d'activité produit par plusieurs *Pseudomonas*. C'est une molécule très active utilisée dans le traitement des mycoses cutanées, ainsi que dans l'élaboration d'antifongiques utilisés dans le domaine agricole. (McSpadden-Gardener et Fravel, 2002)

La PRN agit comme un inhibiteur de la chaîne respiratoire chez les Basidiomycètes, les Deutéromycètes et les Ascomycètes. (Tripathi et Gottlieb, 1969)

Les quatre gènes intervenant dans la synthèse de la PRN sont *prnABCD* (Hammer *et al.*, 1997). Le précurseur de la biosynthèse de la PRN est le tryptophane, et plus exactement le L-tryptophane qui est chloré, décarboxylé, chloré une seconde fois puis oxydé respectivement par les enzymes *PrnA PrnB PrnC et PrnD* comme il est représenté dans la figure 09 (Kirner *et al.*, 1998).

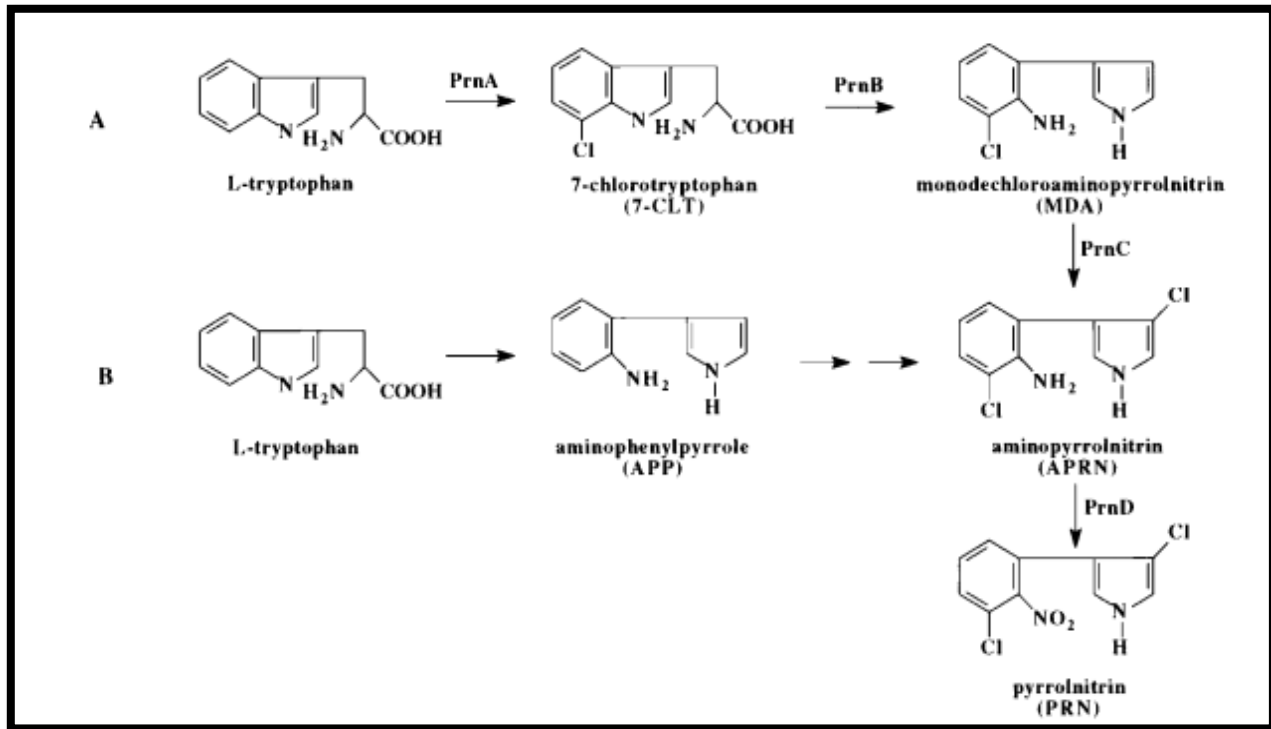


Figure 06 : La voie de biosynthèse de la pyrrolnitrine décrite par Van Pée *et al* (A) et par (Chang *et al.*,1981).

e) Mupirocine :

Étroitement connu comme l'acide pseudomonique, c'est un antibiotique polycétide naturellement présent chez les *Pseudomonas spp* fluorescents. En fait, la mupirocine est un mélange de quatre acides pseudomoniques, la structure de base de la mupirocine comprend un acide monique (un heptaketide) contenant un cycle pyranique attaché à l'acide 9-hydroxynonanoïque par une liaison ester (Voir Figure 07) (Chain et Mellows, 1977). La mupirocine a une activité à large spectre contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, bien que la plupart des bactéries à Gram négatif testées soient moins sensibles que les bactéries à Gram positif. C'est un antibiotique amplement utilisé dans les maladies tropicales. (Carcanague, 1997)

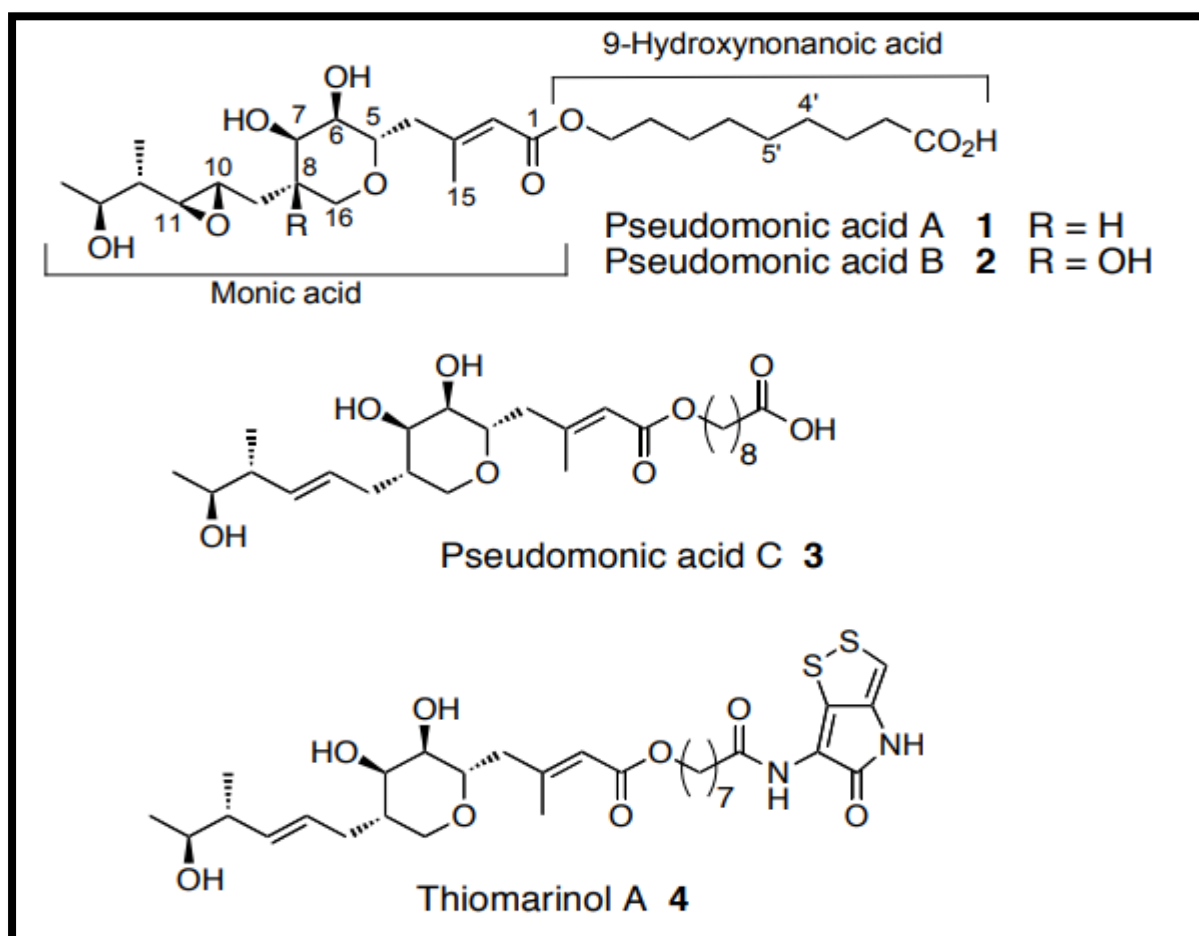


Figure 07 : Composition de la mupirocine en acide pseudomonique A, B, C et le Thiomarinal A. (Gao *et al.*, 2014)

L'antibiotique agit par inhibition de l'isoleucyl-ARNt synthétase bactérienne. La mupirocine est actuellement utilisée de façon topique pour le traitement des infections cutanées et pour la décolonisation des patients porteurs de *Staphylococcus*. (Gurney, 2012)

La biosynthèse de la mupirocine est induite par le cluster *mup*, qui est une région chromosomique d'environ 74 Kb (El-Sayed *et al.*, 2003). La première partie du cluster contient deux grands gènes de polyketides synthases (PKS) du type 1 : (*mmpA* et *mmpD*), une trans-acyltransferases associée (*mmpC*), un acide gras synthétase du type 1 (*mmpB*) en plus de deux cadres de lectures ouvertes ou ORFs (*mupA* et *mupB*). La deuxième partie du cluster contient vingt-sept ORFs uniques (*mupC-X*, *macpA-E*), deux petits gènes de la polyketide synthetases *mmpE* et *mmpF* (Hothersall *et al.*, 2005). La Figure 10 ci-dessous illustre la carte des gènes composants du cluster mentionné :

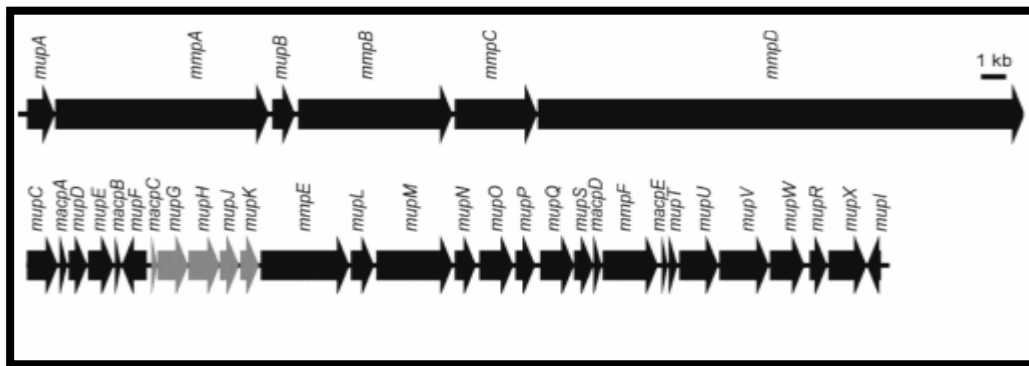


Figure 08 : Aperçu du cluster responsable de la biosynthèse de la mupirocine. (Hothersall *et al.*, 2005)

La voie métabolique de la mupirocine est actuellement étudiée, et sa machinerie biosynthétique est encore peu comprise vu sa complexité. Néanmoins, Connolly *et al.* Qui voulait réaliser l'étude afin de définir l'ensemble complet des gènes *mup* nécessaires à la conversion de PA-B en PA-A, ont pu proposer une potentielle voie métabolique, en se référant à la synthèse du cycle tétrahydropyranique par les *mupW* et le *mupT*. Ceci en plus de la découverte du rôle d'intermédiaire de l'acide pseudomonique B dans cette voie de biosynthèse.

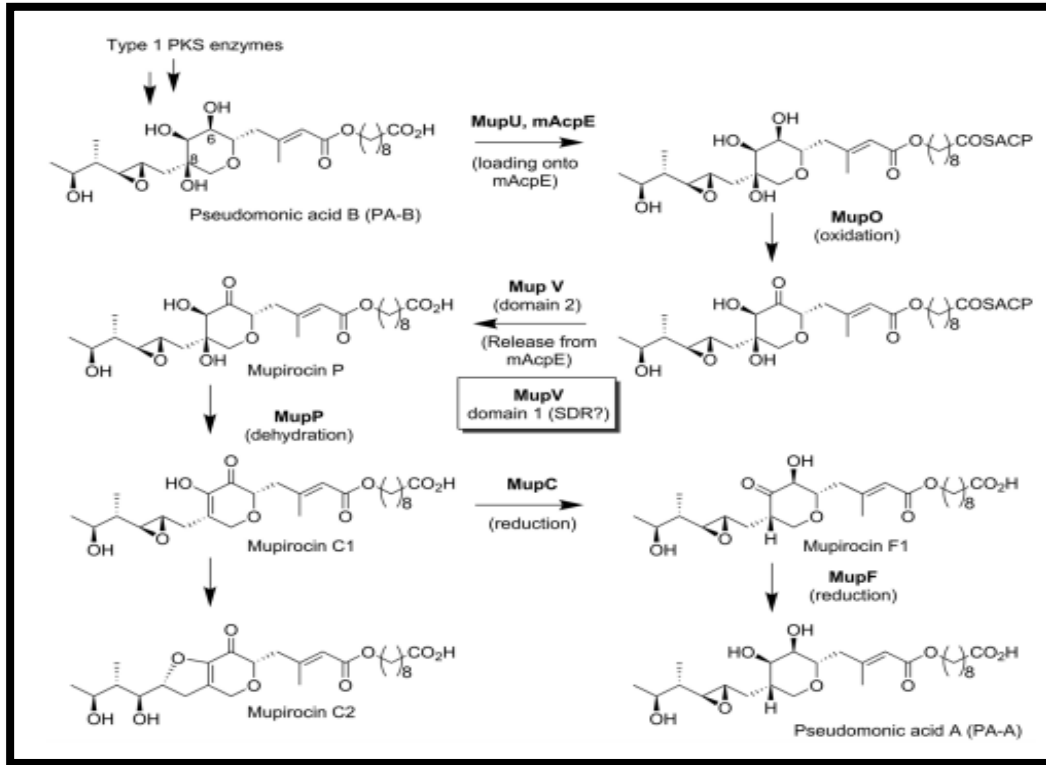


Figure 09 : Voie de la biosynthèse de la mupirocine proposé par (Connolly *et al.*, 2019).

6.2) Sidérophores :

La majorité des *Pseudomonas* fluorescents synthétisent des sidérophores peptidiques complexes appelés pyoverdines ou pseudobactines. C'est un pigment soluble dans l'eau qui se diffuse dans l'agar autour des colonies. Les sidérophores sont des capteurs de fer très efficace et très utile à l'environnement par l'amélioration de la croissance des plantes et la fixation du fer, en le rendant aussi indisponible pour d'autres composantes de la microflore du sol. Afin d'assurer la subvention en besoins de fer, les *Pseudomonas* synthétisent et sécrètent, la pyoverdine, c'est un sidérophore primordial produit pour ce groupe et se caractérise par une très forte affinité pour le fer (Abdallah et Pattus, 2000). Il a été aussi démontré par (King *et al.* 1948) que la production de sidérophores est un processus qui dépend de la composition du milieu.

Meyer *et al.*, (2008), ont identifié plus de 60 pyoverdines provenant de différentes souches de *Pseudomonas*, elles sont composées de trois parties caractéristiques :

- Le chromophore : C'est un dérivé de la quinoline (2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline) conservé chez toutes les pyoverdines, responsables de la fluorescence typique des pyoverdines. (Meyer, 2000)
- La chaîne latérale acyle : constituée dans la plupart des cas d'un acide dicarboxylique (acide succinique ou acide maléique) ou d'un dérivé amide de cet acide, liée au groupe amine du chromophore en position C3.
- La chaîne peptidique : variable ou linéaire, cyclique ou partiellement cyclique. Elle est liée par un groupe amine à la fonction carboxyle C1 (rarement C3) du chromophore. Sa longueur est généralement de 6 à 12 acides aminés, spécifiques à chaque souche de *Pseudomonas*. Elle peut être linéaire, cyclique ou partiellement cyclique. (Meksem, 2010)

Ces composés sont les sidérophores distincts des *Pseudomonas* fluorescents tels que *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*. La pyoverdine est un pigment vert/jaune fluorescent sous la lumière UV qui est aussitôt impliquée dans un transport de haute affinité du fer vers la cellule. (Budzikiewicz, 1993)

Comme les micro-organismes sont en compétition pour les nutriments disponibles, y compris le fer, il n'est pas rare de lier les molécules fixatrices du fer à la virulence microbienne. (Lamont *et al.*, 2002)

La relation entre la virulence et la lutte biologique a été étudiée par Genthner *et al.* (2004). Si la virulence d'un micro-organisme est liée à la capacité de produire les sidérophores, la modification du besoin en fer peut également modifier l'activité générale du micro-organisme en matière de lutte biologique. Le succès de ce type de contrôle dépend, entre autres du degré de pathogénicité du micro-organisme.

Plusieurs microorganismes sécrètent des substances ayant une grande affinité pour le fer. Ces faits expliquent pourquoi le fer n'est pas facilement disponible pour les micro-organismes. Les microorganismes autres que les *Pseudomonas* comme *Legionella pneumophila*, *Halomonas*, *Marinobacter* (Martinez *et al.*, 2000), et *Rhizobium* (Roy *et al.*, 1994), peuvent produire des molécules de récupération du fer.

6.3) Enzymes :

La décomposition de la matière organique complexe est un processus biogéochimique fondamental qui est largement contrôlé par les microbes. La biomasse vivante contient un large éventail de macromolécules polymériques, notamment des protéines, des acides nucléiques et des glucides de structure (Lee *et al.*, 2004). Les microbes produisent des enzymes extracellulaires pour dégrader ces composés en molécules plus petites qui peuvent être absorbées à travers la membrane cellulaire et métabolisées. (Sinsabaugh, 1994)

Ils peuvent ainsi bénéficier de la production d'enzymes en accédant à l'énergie et aux nutriments de composés complexes, mais cette stratégie nécessite également un investissement important en ressources pour la synthèse et l'excrétion des enzymes. La production d'enzymes peut consommer de 1 à 5% de la productivité bactérienne (Christiansen et Nielsen, 2002), et nécessite également de grandes quantités d'azote. (Sternner et Elser, 2002)

Les bactéries psychrotrophes à Gram négatif, telles que les espèces *Pseudomonas*, posent un problème de détérioration important dans les viandes et les produits laitiers réfrigérés en raison de la sécrétion d'enzymes hydrolytiques, en particulier les lipases et les protéases. Certaines souches des *Pseudomonas* fluorescents isolées à partir de lait pasteurisé se sont révélées protéolytiques et lipolytiques sur gélose à la caséine et à la tributyrine, respectivement. (Waite *et al.*, 2002)

Les *P. fluorescens* CY091 produisent une protéase extracellulaire dont la masse moléculaire est estimée à 50 kDa. La production de cette enzyme (appelée AprX) a été observée dans des milieux contenant du CaCl₂ ou du SrCl₂, mais pas dans des milieux contenant du ZnCl₂, du MgCl₂ ou du MnCl₂.

6.4) La pyocyanine :

La pyocyanine provoque beaucoup de dégâts cellulaires, tels que l'inhibition des fonctions respiratoires de la cellule, la croissance des cellules épidermiques, la fonction ciliaire. Elle participe également à la persistance de *P. aeruginosa*, ainsi qu'au dérèglement de l'homéostasie du calcium. La pyocyanine induit de nombreuses conséquences qui peuvent être pathogènes, notamment l'augmentation de l'IL-8, une réponse dépressive de l'hôte ainsi qu'une apoptose chez les neutrophiles. (Agrawal et Chauhan, 2016)

6.5) Les Rhamnolipides :

Les rhamnolipides sont l'une des classes les plus intéressantes de biosurfactants en raison de leurs caractéristiques. Ce sont des composés actifs biologiques, des détergents qui mettent en solution ou en suspension les souillures adhérentes à des surfaces. Ils favorisent l'humidification, la solubilisation et l'émulsion de composés organiques. Ils sont appliqués dans plusieurs industries (**Banat et al., 2000**) et sont multifonctionnels aux propriétés surfactives sécrétées par le pathogène bactérien *P. aeruginosa*. Ces biosurfactants sont synthétisés par les enzymes RhlA et RhlB à partir des deux précurseurs rhamnos et 3- hydroxyalkanoate. (**Mohammad et al., 2013**)

En ce qui concerne la production, plusieurs sources de carbone peuvent être utilisées par les bactéries, notamment des matières premières telles que les huiles usées ou les déchets de l'industrie alimentaire. (**Soberon-Chavez et al., 2005**)

La structure chimique de ce groupe de biosurfactants est composée d'une tête hydrophile contenant une ou deux molécules de rhamnose, appelées respectivement monorhamnolipide ou dirhamnolipide, et d'une queue hydrophobe contenant un ou deux acides gras. La composition de la molécule de rhamnolipide produite dépend de la souche bactérienne. (**Banat et al., 2000**) Aujourd'hui, les progrès récents dans la réduction des coûts de production et la découverte de nouvelles souches productrices laissent entrevoir un avenir prometteur.

Deux types de microorganismes produisant des biosurfactants : *P. fluorescens* P.V:10 et *P. aeruginosa* P.B:2, ont été isolés à partir de sols contaminés par des hydrocarbures dans la région de Mascara (Algérie). La production de rhamnolipides a été réalisée en utilisant un bouillon nutritif supplémenté en huile d'olive comme meilleure source de carbone.

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

6.6) Autres substances bioactives :

L'étude des *Pseudomonas spp* a conduit à la découverte de nouveaux mécanismes de biosynthèse. Ces espèces de *Pseudomonas* fabriquent un énorme éventail de produits représentant des origines métaboliques variées et exposant des activités biologiques de grande envergure. Deux souches ont été identifiées faisant partie de la rhizosphère délétère qui font partie du biovar I (biotype I) de la bactérie *P. fluorescens* ont engendré un facteur d'arrêt qui bloque la germination du pâturin annuel et d'un grand nombre de mauvaises herbes graminées. La germination est inhibée par des filtrats de culture d'une façon propre au développement, en l'arrêtant immédiatement après l'apparition de la coléo-rhize et de la plumule, causant ainsi une chlorose. (**Banowitz et al., 2008**)

Certaines souches de *Pseudomonas* sont capables de produire du HCN dans des conditions in vitro chez des colonies de termites (*Odontotermes obesus*). Ces métabolites secondaires, par exemple, déterminent la capacité de la lutte biologique de *P. fluorescens* chez les termites. (**Devi and Kothamasi, 2009**)

La souche de *P. fluorescens ATCC 55799* a été évaluée en 2012 par l'agence de réglementation de la lutte antiparasitaire afin de l'utiliser en tant que bio-pesticide pour lutter contre la moule zébrée. Elle produit une toxine qui est un métabolite secondaire de type protéinique. Le mode d'action de la souche de *P. fluorescens ATCC 55799* est l'intoxication et non l'infection, la mort des moules semble être directement liée à la destruction sélective du tube digestif par lyse des cellules épithéliales. (**Molloy et al., 2013a ; Molloy et al., 2013b**)

Une exotoxine moustiquocide est produite par la souche *P. fluorescens MSS-1* qui est mortelle en cas d'ingestion par voie orale par les moustiques. (**Pushpanathan et Pandian, 2008**)

De plus, **Johnson et al., (1993)** ont signalé chez les plantes, la souche *P. fluorescens D7* qui peut interférer avec la croissance du brome des toits grâce à l'activité d'une phyto-toxine. Il a été suggéré que la phyto-toxine D7 est active sur la surface de la racine, car l'effet est réversible lorsqu'on retire les plantes.

La *Pseudomonine*, isolée de *P. fluorescens AH2*, est un autre métabolite de *Pseudomonas* qui possède le même fonctionnement que celui des sidérophores. Les gènes de biosynthèse des pseudomonines ont été localisés par Bakker et ses collègues dans la souche de bio-contrôle *P.*

fluorescens WCS37496 et par Walsh et associés dans *P. entomophila*. Les Safracines, possédant une activité anti-tumorale, ont été isolées à partir de *P. fluorescens* A2-2144 et SC 12695145, ces souches présentent un extraordinaire système moléculaire tridimensionnel basé sur un squelette de tétrahydroisoquinoléine. La découverte de la voie de biosynthèse de la safracine a été motivée par la similarité structurelle de la safracine avec le puissant agent anti-tumoral. (Cuevas et Francesch, 2009)

7) Système de régulation de la biosynthèse des métabolites secondaires :

7.1) Système GacA/GacS :

Les deux composés régulateurs GacA et GacS ont comme fonction de détecter et d'apporter une réponse aux différents stimuli de l'environnement. Découvert en premier chez l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* pour son rôle dans le Quorum Sensing, la formation de biofilm et dans la virulence ; le système GacA/S a été par la suite découvert chez de nombreux *Gammaproteobacteria*. Chez les souches appartenant au groupe des *Pseudomonas* fluorescents, ce système a été décrit dans la régulation de la production de différents métabolites secondaires et de facteurs biologiques de control. (Kay *et al.*, 2006)

Lors de la réception d'un stimulus, l'élément GacS, qui est une protéine kinase transmembranaire ayant la fonction de senseur, elle entame son autophosphoryle et transfère ce phosphate via un mécanisme tripartite (semblable à celui de BarA et UvrY chez *E. coli*) jusqu'au GacA, qui est le régulateur transcriptionnel du système.

Une fois activé le GacA, il active à son tour de petites séquences d'ARN non-codants RmsX, RsmY et RsmZ. Ces séquences se lient aux répresseurs traductionnels RsmA et RsmE qui répriment la traduction des gènes cibles au niveau de la séquence Shine-Dalgarno (RBS). Ces gènes cibles sont généralement impliqués dans la fabrication de produits extracellulaires, dans la formation de biofilm, dans le QS et dans la mobilité. (Lapouge *et al.*, 2008)

7.2) Régulation LuxI/R QS :

Chez le gram négatif, le système QS reconnaît la molécule N-acylhomoserine lactones (AHL) comme un signal. Cette molécule est synthétisée par une enzyme synthase de type LuxI en dérivant la fraction lactone de la S-adenosyl méthionine (SAM) et généralement, la chaîne acyle est obtenue

à partir d'intermédiaires de la biosynthèse des acides gras. La AHL est reconnue par un régulateur de la transcription de type LuxR et forme un complexe LuxR-AHL. Le régulateur LuxR contient deux sites de liaisons : un domaine de liaison avec la molécule AHL et un domaine de liaison à l'ADN. Le complexe LuxR-AHL module l'expression de gènes responsables de bioluminescence. La sécrétion des produits exocellulaires, la formation de biofilm et bien d'autres processus biologiques. **(Kai et Bassler, 2016)**

Découvert en premier chez la bactérie *Vibrio fischeri* lors d'études sur sa bioluminescence, ce système de régulation a été ensuite décrit chez plus de 70 espèces de bactéries Gram négatif dont plusieurs *Pseudomonas spp.* **(Schaefer et al., 1996)**

Il été également démontré que le système LuxI/LuxR QS tient un rôle crucial dans la régulation du biofilm et la réponse à des stress divers (oxydatif, salin, traitement au Crystal Violet...). **(Tanga et al., 2019)**

7.3) Régulation RpoS (σ^S) et RpoD (σ^D) :

Le facteur sigma (σ^D) ou RpoD est une sous-unité de l'ARN Polymérase qui est responsable de la reconnaissance des sites promoteurs et le contrôle de la synthèse des gènes responsables de la croissance bactérienne. Le facteur RpoS (σ^S) est un facteur sigma alternatif, comme démontré chez *E. coli*, il est responsable de la transcription de plusieurs gènes exprimés lors de la phase stationnaire ainsi que dans la réponse aux stress divers **(Landini et al., 2014)**. Chez le genre *Pseudomonas spp.*, le facteur RpoS n'est pas uniquement le seul à être responsable de la réponse au stress, mais il a été démontré l'existence d'autres facteurs sigma comme σ^{54} et σ^{22} qui sont impliqués dans la réponse au stress osmotique, carence en nutriments et la dessiccation chez certaines espèces. **(Péchy-Tarr et al., 2005)**

Chapitre III :

Matériel et méthode

1) Objectif de l'étude :

Ce travail contribue à l'étude du stress salin sur la production des métabolites antimicrobiens par des espèces de *Pseudomonas* issue d'un milieu marin.

Afin de réaliser notre étude nous avons procédé selon les étapes suivantes :

- L'isolement de *Pseudomonas* à partir d'un milieu marin.
- La purification des isolats suspectés d'appartenir aux *Pseudomonas*.
- Testes biochimiques et phénotypique des isolats suspectés.
- Identification phénotypique des isolats.
- La purification et la sélection des bactéries cibles.
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne des isolats.
- Test de l'effet de la salinité sur la croissance bactérienne des isolats et la production de la substance antimicrobienne.
- L'extraction et la caractérisation de métabolite antimicrobien produit par *Pseudomonas*.
- Test de l'effet de l'extrait sur des bactéries pathogènes cibles.

2) Provenance de l'échantillon :

Dans le but d'obtenir des isolats de *Pseudomonas* des sols salins, un échantillonnage a été effectué au niveau de la zone arrière plage de la plage Sidi-El Mejdoub. Trois échantillons ont été prélevés selon les coordonnées suivantes :

- **E1** : 35°57'56.1"N 0°05'32.5"E.
- **E2** : 35°57'56.4"N 0°05'32.1"E.
- **E3** : 35°57'56.5"N 0°05'31.4"E



Figure 10 : Plage Sidi El-Majdoub (Mostaganem)

Les échantillons de sable sous l'eau de mer ont été recueilli le 01.05.2021 à 18h dans un récipient stérile, conservé ensuite au réfrigérateur à une température avoisinante les 4°C en vue de leur analyse le lendemain.

3) Méthode d'Isolement de *Pseudomonas* :

Une solution mère a été préparée avec 10g de sable et 90 ml d'eau distillée stérile. 1 ml de la solution mère est mise dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillée stérile. Une série de suspensions-dilutions allant jusqu'à 10^{-5} est réalisée à partir de chaque échantillon. Un volume de chaque suspensions- dilutions (0.1 ml) a étéensemencé dans une boites pétri contenant 18 ml du milieu King B (**King et al.,1954**). Chaque suspension-dilution a étéensemencée en double : la première boîte a été incubée à 20°C et la deuxième à 28°C durant 24h.

4) Les milieux utilisés :

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

Dix-huit colonies typique représentant une légère fluorescence ont été repiqué (en stries) à partir des boîtes précédentes dans de la gélose King B et incubé à 30 °C pendant 24h. La composition des milieux est répertoriée dans (**Annexe**).

5) Caractérisation des isolats :

Au cours de la première étape de l'isolement des bactéries, les colonies ont été repiquées (c'est - à-dire, en moyenne 2 à 3 colonies ont été prise par boîte de Pétri). Il est possible qu'une même souche puisse éventuellement être prise plusieurs fois, ce qui entraîne la présence d'isolats identiques ou biotypes. Pour vérifier une telle incidence nous avons voulu préciser la caractérisation des isolats et confirmer leur identité en les soumettant à différents tests biochimiques. Cette étude permettra de détecter d'éventuelles différences entre les isolats et de préciser leur identification.

6) Pré-identification des isolats :

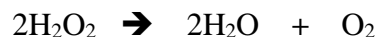
Les colonies typiques fluorescentes ont subi différents tests afin de les pré-identifier :

6.1) Etude microscopique :

La coloration de Gram a été réalisée selon la méthode classique décrite par (**Hildebrand *et al.*, 1988**). Cette technique est la plus utilisée dans l'étude et la classification des bactéries en Gram positif et à Gram négatif.

6.2) Recherche de Catalase :

La technique de catalase est définie par (**Stead *et al.*, 1987**) qui consiste à déposer des gouttes d'eau oxygénée (2 à 3 gouttes) à 10 volumes sur une crème bactérienne jeune réalisée à partir d'une culture de 24 heures sur une lame propre et sèche. Une importante dégradation gazeuse traduit la présence d'une catalase selon la réaction suivante :



6.3) Test VP/RM :

Les caractères Rouge de Méthyle (RM) et Voges Proskauer (VP) sont effectués dans le milieu Clark et Lubs. La méthode consiste àensemencer deux tubes contenant un milieu Clark et Lubs avec une suspension des isolats bactériens, puis les tubes ont été incubés à une température de 30°C pendant 24 h.

➤ **Test de Voges Proskauer (VP)** : Il permet de détecter la production d'acétoïne, de diacétyl et de butane-diol à partir de la fermentation du glucose. Le réactif ajouté (l'alpha naphthol) permet dans

le cas d'un milieu basique et en présence de dioxygène, d'obtenir une coloration rosée ou rouge d'acétoïne dyacétyl + KOH + alpha naphthol + O₂ coloration rosé ou rouge butane-diol.

- **Test du Rouge de Méthyle (RM) :** Il permet de détecter la production d'acides plus ou moins forts et plus ou moins volatiles au cours de la fermentation. Quelques gouttes d'un indicateur coloré de pH sont ajoutées au milieu: le rouge de méthyle (rouge en milieu acide et jaune en milieu basique). Si les bactéries produisent des acides forts au cours de la fermentation, le milieu reste acide et donc en rouge. Si les bactéries produisent des acides faibles le milieu s'est acidifié, puis ré-alcalinisé, Le milieu est donc jaune.
- **Ensemencement :** la colonie prélevée à l'aide d'une anse de platine ou pipette de pasteur sur la paroi du tube, pour obtenir une suspension homogène, les tubes ont été incubés à 30°C pendant 24h.
- **Lecture :** 3 gouttes de KOH ou NaOH + 5 gouttes de VP ont été ajoutés et la lecture a été effectuée au bout de 10 minutes. Dans l'autre tube 2-3 gouttes de RM ont été ajoutés, la lecture est immédiate.

6.4) Triple Sugar Iron (TSI) :

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

- **Interprétation :**

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

- Si la bactérie utilise le glucose, saccharose et /ou lactose : le culot et la pente deviendront jaunes : après consommation du glucose, la bactérie poursuit la consommation du saccharose et /ou du lactose donnant une pente jaune et un culot jaune (acide sur acide (A/A)). NB : Si on incube le milieu plus longtemps, plus de 48 heures, le lactose et le saccharose seront épuisés, on obtiendra un pH alcalin en raison du métabolisme des peptones.
- La bactérie n'utilise aucun des sucres: Dans ce cas la bactérie consommera les peptones : avec 2 cas de figure : Si la bactérie peut métaboliser les peptones à la fois en aérobiose et en anaérobiose, la pente et le culot seront rouges (alcaline sur alcalin ; K/K). Si les peptones ne peuvent être métabolisées qu'en aérobiose, la pente sera rouge et le culot ne présentera aucun changement (K/NC).
- Production de gaz : La production de gaz (CO_2) est détectée par la division (décollement) de la gélose.
- Production H_2S : Le précipité noir indique que les bactéries ont été capables de produire du sulfure d'hydrogène (H_2S) à partir du thiosulfate de sodium. Comme le H_2S est incolore, le citrate d'ammonium ferrique est utilisé comme indicateur de formation de sulfure ferreux insoluble. La formation d' H_2S nécessite un environnement acide, ceci veut dire que même si la couleur du culot ne peut pas être vue à cause du noircissement du milieu, la bactérie est glucose (+) car s'il n'y a pas consommation de glucose et acidification du milieu la formation de l' H_2S ne pourrait pas avoir lieu. (Sulkin *et al.*, 1940).

6.5) Mannitol mobilité :

Ce milieu permet la lecture de deux caractères : l'utilisation du mannitol (glucide), la mise en évidence de la mobilité. La mise en évidence de ces deux caractères peut être utile pour l'identification bactérienne. La présence d'une faible teneur d'agar rend possible le déplacement des bactéries mobiles autour de la piqûre centrale. La lecture de l'utilisation du mannitol est possible grâce à la présence d'un indicateur de pH, le rouge de phénol. L'utilisation du mannitol acidifie le milieu qui peut ainsi être révélé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune). Ensemencer par piqûre centrale à l'aide du fil droit chargé de suspension de la culture à étudier. Incuber 24 heures à 37°C.

6.6) Citrate de Simmons :

La gélose Simmons citrate (milieu minéral minimum au citrate de sodium) est utilisé pour la différenciation des bacilles Gram négatifs. Il permet la recherche du citrate de sodium comme seule

source de carbone et d'énergie pour les bactéries. L'utilisation du milieu citrate de Simmons a pour but de déterminer la capacité des isolats bactériens à utiliser le citrate comme une seule source de carbone. Cette technique consiste à ensemencer en stries longitudinales le milieu (qui se présente en pente) à partir de la suspension bactérienne âgée de 24 h. L'incubation se fait à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures. Les bactéries citrate positive (Citrate +) donnent une culture abondante qui se traduit par le virage de l'indicateur du vert au bleu (Larpent, 1975).

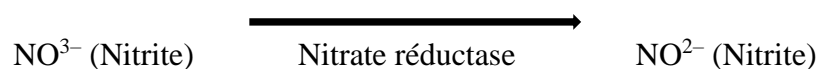
6.7) Recherche de nitrate réductase :

La réduction des nitrates a été testée selon la méthode décrite par Roussel (Delif *et al.*, 2005). La technique consiste à inoculer une suspension bactérienne de 24 h dans des tubes de Bouillon nitraté (Ann I), puis les incubés pendant 24 h à une température de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$. La mise en évidence des nitrites dans le milieu se fait grâce à la technique de Khan qui utilise les réactifs de Griess:

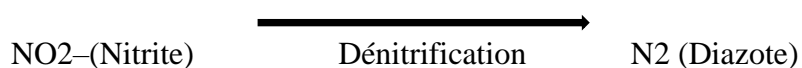
- Réactif A: Acide sulfanilique en milieu acétique.
- Réactif B: Alpha Naphtylamine en milieu acétique.

Cette méthode consiste à ajouter à la surface de milieu 3 gouttes du réactif A puis 3 gouttes du réactif B et homogénéiser le mélange. En cas de présence de nitrite il y aura apparition d'une couleur rose, donc la bactérie possède une nitrate réductase qui effectue la réaction. Si la coloration ne change pas cela signifie l'absence de nitrite ; alors on ajoute de la poudre de Zinc qui réduit les nitrates en nitrites :

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



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



6.8) Bouillon au Bromo-Cresol Pourpre (BCPL) simple concentration :

Le Bouillon au B.C.P. est un milieu utilisé pour l'étude de la fermentation du lactose (**Ewing, 1986 ; ISO 21567, 2005**). Ensemencer le milieu avec quelques gouttes de suspension bactérienne, incubé 24h à 37 °C. La fermentation du lactose se caractérise par un virage au jaune de l'indicateur, et la production de gaz par la formation d'une bulle de gaz dans la cloche de Durham.

6.9) Recherche de la lécithinase :

La gélose au jaune d'œuf est un milieu enrichi et différentiel utilisé pour l'isolement et la différenciation présumée de différentes espèces sur la base de leur activité de la lécithinase. Certaines d'entre elles possèdent de la lécithinase, également appelée phospholipase C, c'est une enzyme qui sépare la lécithine phospholipidique. Une telle activité de lécithinase est utilisée afin de caractériser plusieurs bactéries à Gram négatif telle que *P. aerogenosa*. Les isolats *Pseudomonas* ont été ensemencés puis incubés à 37°C pendant 48h. Le test positif est caractérisé par l'apparition d'une zone blanche, opaque et diffuse qui s'étend dans le milieu entourant les colonies.

6.10) Recherche de la gélatinase :

La gélatinase est une enzyme qui hydrolyse le collagène (gélatine) en acides aminés ou en peptides. La liquéfaction du milieu à base de gélatine indique la présence de bactéries qui synthétisent la gélatinase. Ce test est effectué afin de distinguer *P. putida* de *P. aeruginosa*. Le milieu est ensemencé par pique centrale, incubé à 37°C. Après 24h d'incubation, les tubes sont mis à 4°C pendant 30 min avant d'effectuer la lecture (**Palleroni, 2005 ; Stanier et coll, 1966**).

6.11) Recherche du cytochrome oxydase :

Ce test est effectué afin d'identifier les bacilles à Gram négatif. A l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, une colonie de l'isolat B a été mise en contact avec un disque d'oxydase afin de confirmer la présence d'un cytochrome oxydase. La réaction est considérée comme étant positive par l'apparition d'une couleur violette après 30 à 60 secondes. (**Denis et al., 2011**)

7) Croissance à de différentes températures :

L'objectif du test de croissance à 42°C est de différencier *P. aeruginosa* des autres *Pseudomonas* fluorescents. Les isolats sélectionnés ont été ensemencés sur 2 boîtes contenant une gélose King A, puis elles ont été incubées à 4°C pendant 5 jours, et à 42°C pendant 48h selon le schéma décrit par (Digat et Gardan, 1987).

8) Mise en évidence de la production de la Pyocyanine-:

Une crème bactérienne des cinq isolats sélectionnés est ensemencée sur le milieu King A. Après 72 h d'incubation à une température 30±2°C, l'apparition de la couleur bleue indique la production de pyocyanine.

9) Purification des bactéries cibles :

Afin de tester l'activité antagoniste des bactéries cibles, des souches cibles ont été utilisés. Ces souches cibles proviennent de l'université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem et ont été donc purifiés comme suit (Voir Tableau 03) :

Bactéries cibles	Milieux utilisés	Température d'incubation	Durée d'incubation
<i>Candida spp</i>	Ensemencement sur milieu Sabouroud + chloramphenicol et sur bouillon cœur-cerveau.	25°C	72h.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ensemencement sur milieu Chapman.	37°C	24h.
<i>Bacillus cereus</i>	Ensemencement sur Gélose Nutritif	37°C	24h.
<i>Proteus spp</i>	Ensemencement sur Gélose Nutritif.	37°C	24h.
<i>Escherichia coli</i>	Ensemencement sur milieu Désoxycolate	37°C	24h.

Après l'obtention de cultures viables après incubation, une observation microscopique à l'état frais et une coloration de gram ont été effectuées sur l'ensemble des souches cibles dans le but de confirmer leurs morphologies, de vérifier leurs états et de s'assurer de l'absence de toute contamination. Certaines souches cibles ont subi des tests biochimiques afin de confirmer leur détermination (**Voir Tableau 04**).

Tableau 04 : Les tests biochimiques appliqués aux bactéries cible.	
Bactéries cibles	Tests biochimiques
<i>Bacillus cereus</i>	-Utilisation du Citrate. - Voges-Proskauer (V.P). - Rouge de Méthyle (R.M).
<i>Proteus spp</i>	-Production d'H ₂ S sur Kligler Iron Agar. -Fermentation du lactose (BCPL). -Utilisation du Citrate. -Mannitol mobilité. -Bouillon nitraté. - Voges-Proskauer (V.P). - Rouge de Méthyle (R.M).
<i>Escherichia coli</i>	-Fermentation du lactose (BCPL). -Three Sugar Iron (T.S.I). - Voges-Proskauer (V.P). - Rouge de Méthyle (R.M).
<i>Staphylococcus aureus</i>	- Milieu Chapman

10) Test d'antagonisme *in vitro* :

Après l'opération d'isolement des échantillons et leur identification, vient l'évaluation des propriétés antagonistes des isolats, elle repose sur l'antagonisme révélé *in vitro* ou sur la capacité de la souche à produire des composants antimicrobiens. (Lepoivre, 2003)

Nous avons testé l'effet inhibiteur des isolats B, E, K, F, G de *Pseudomonas* sur les 5 isolats tests suivantes : *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Proteus sp* et *C. albicans*. Les inhibitions inter- bactériennes sont mises en évidence par la méthode directe (confrontation bactérie / bactérie) (Fleming *et al.*,1975).

La sélection des bactéries antagonistes a été réalisée en adoptant la méthode de l'antagonisme direct (Co-culture sur milieu solide). Cette méthode consiste àensemencer les isolats antagonistes de *Pseudomonas* en un seul trait à la surface du milieu solide et en bordure de la boîte de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton (MH). Après incubation à 30°C pendant 48h, les bactéries tests sontensemencées perpendiculairement à *Pseudomonas*. La lecture des résultats se fait en mesurant la distance d'inhibition entre les bordures de la souche cible et de la souche de *Pseudomonas* à l'aide d'une règle graduée. Le résultat de l'interaction entre l'isolat antagoniste et les bactéries tests est noté après 24h d'incubation à 37°C (Selvin *et al.*, 2009).

11) Test de salinité :

Dans le but de vérifier l'influence de la salinité sur la production de pyocyanine et afin de déterminer la souche la plus performante, les cinq isolats de *Pseudomonas* (B, E, F, G et K) ont étéensemencés dans des tubes contenant 10 ml de milieux King A liquide à différentes concentrations (1%, 1,5%, 2%, 3%, 5% et 7% de chlorure de sodium (NaCl). Les cultures ont été incubées à 30°C dans un incubateur à agitation (180 tr/min) durant 48h. (Kurachi *et al.*,1958 ; Essar *et al.*,1990). La croissance a été déterminée par spectrophotomètre a une longueur d'onde de 600 nm et la production de pyocyanine a été déterminée par la méthode décrite par (Kurachi, 1958) : 3 ml de chloroforme ont été ajoutés à 5 ml de surnageant. La phase organique a été extraite puis 1 ml d'une solution 0,2M HCl a été ajouté. Après centrifugation à 6000 tr/min à 4°C, le HCl a été ensuite éliminé. Enfin, la quantité de pyocyanine a été évaluée grâce à une lecture à 520 nm au spectrophotomètre.



Figure 11 : Incubation des échantillons du test de salinité.



Figure 12 : Extraction de la pyocyanine selon la méthode de (Kurashi *et al.*, 1958)

12) Production du métabolite :

Pour extraire la pyocyanine, la souche la plus performante a été sélectionnée selon les résultats des tests biochimiques et du test de salinité effectué précédemment. La souche a été ensemencée dans un flacon contenant 125 ml de milieu Mueller-Hinton (MH) liquide. L'incubation a été effectuée à 30°C durant 48h dans un incubateur à agitation (150 tr/min).



Figure 13 : Production de la pyocyanine sur milieu Mueller-Hinton

13) Extraction et caractérisation du métabolite :

Après l'incubation, la culture a été centrifugée à 4000 tr/min durant 15 min, puis le surnageant a été extrait. L'extraction a été effectuée en utilisant du chloroforme comme solvant organique. Après l'extraction, les deux phases ont été séparées en utilisant une ampoule à décompter. La phase organique a été ensuite filtrée puis évaporée sous vide en utilisant un rota vapeur à une température de 35°C. La poudre obtenue a été mise en suspension en utilisant du méthanol.

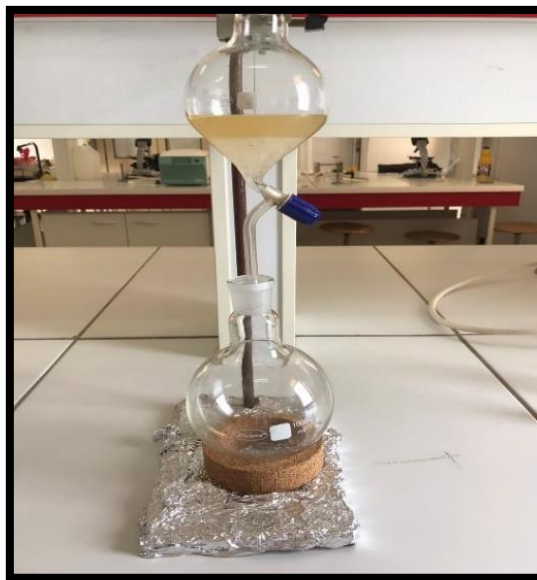


Figure 14 : Extraction du surnageant avec du chloroforme.



Figure 15 : Evaporation sous vide à l'aide d'un rota vapeur

Une fois l'extrait mis en suspension, une lecture au spectrophotomètre à U.V-visible a été réalisée à différentes longueurs d'ondes (un balayage) allant de 500 nm à 640 nm.

14) Etude de l'activité antimicrobienne de l'extrait par la méthode des disques :

Dans le but de déterminer l'activité antibactérienne de l'extrait obtenu, la méthode des disques de diffusion a été effectuée. Une solution de 0.19 g de substrat sec a été préparée dans du méthanol. 1 ml d'inoculum de chacune des bactéries cibles purifiées a été déposé par inondation dans chaque boîte Pétri contenant environ 20 ml de gélose MH. Les disques en papier Whatman stériles (7 mm de diamètre) ont été déposés à l'aide d'une pince flambée et imbibée avec 10 μ l de l'extrait (**Hazalin et al., 2009**). Les boîtes ont été mises à 4°C pendant 2h afin de permettre la diffusion des métabolites ensuite incubées à 37°C pendant 24h. Le diamètre des zones d'inhibitions a été mesuré à l'aide d'une règle (en millimètre).

Chapitre IV : Résultats et discussion

1) Isolement des isolats *Pseudomonas* :

Le milieu marin est un environnement aux conditions physico-chimiques particulières, caractérisées par une présence de concentration élevée d'ions Na^+ . De ce fait les microorganismes qui colonisent les milieux marins sont dotés d'une capacité de tolérance de divers stress, on parle donc d'une concentration élevée de sel avoisinant les 35g/l, de pressions élevées supérieurs à 10^7 Pa, de manque de nutriments et des basses températures pouvant être inférieurs à 4°C (**Delong et Yayanos, 1987 ; Wai et al.,1999**).

Selon (**Bull et Stach, 2007**) les conditions de cultures dans le laboratoire ne peuvent pas représenter les conditions naturelles réelles de l'environnement marin. Il est donc possible d'obtenir uniquement des souches non-exigeantes à croissance rapide.

Dans le but d'évaluer l'effet du milieu marin sur la production des métabolites secondaires, nous avons dans notre étude tentée d'isoler des bactéries marines du genre *Pseudomonas* productrices de ces métabolites et plus précisément des substances antimicrobiennes de la côte Mostaganemoise.

Après une période d'incubation de 24h, nous avons pu constater la présence de colonies fluorescentes sur quelques boites (**voir Figure 16, 17 et 18**). Nous avons remarqué que ces colonies fluorescentes semblent présentes en plus grand nombre sur les boites incubées à une température de 28°C que celles incubées à 20°C.

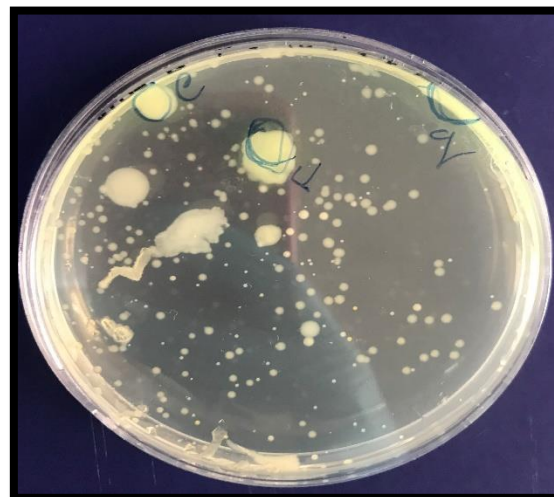


Figure 16 : Illustration des colonies fluorescente (E, F et G) obtenues sur milieu King B après 24h d'incubation à 28°C.



Figure 17 : Illustration des colonies fluorescente (3) et non-fluorescentes (4) obtenues sur milieu King B après 24h d'incubation à 20°C.

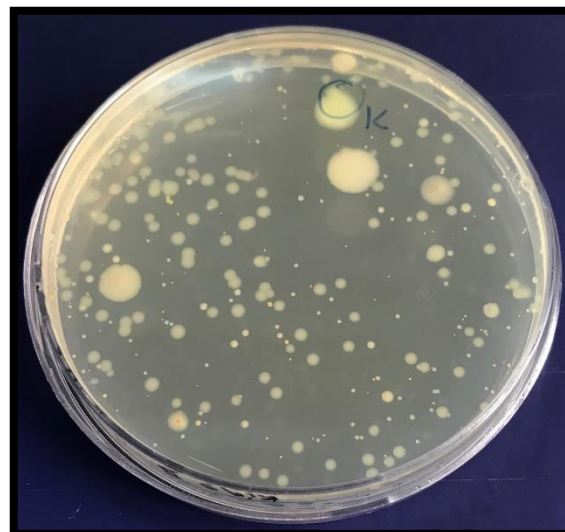


Figure 18 : Illustration de la colonie (K) fluorescente obtenue sur milieu King B après 24h d'incubation à 28°C.

Nous avons constaté la présence de plusieurs colonies morphologiquement distinctes : des colonies de forme rondes blanchâtres et ronde irrégulière jaunâtre, des colonies formant une nappe recouvrant la boîte (**comme illustré dans les Figure 16, 17 et 18**) et des colonies d'aspect filamenteux qui présentent des zones d'inhibition (**voir Figure 19**). Néanmoins, cette dernière n'a pas été retenue dans notre expérimentation.

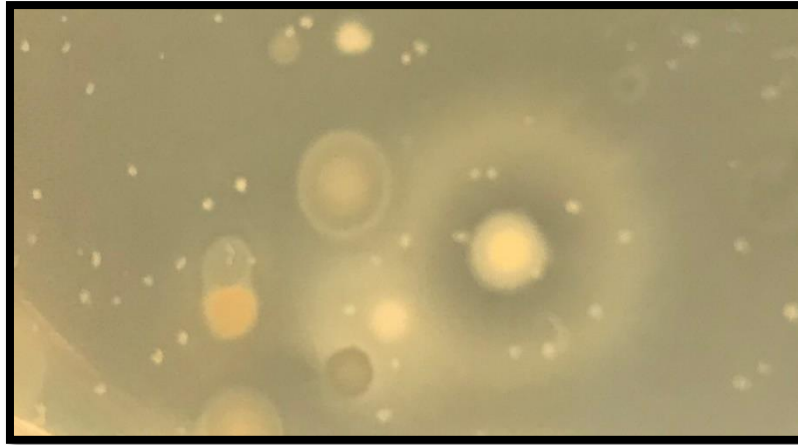


Figure 19 : Illustration d'une colonie qui présente une zone d'inhibition.

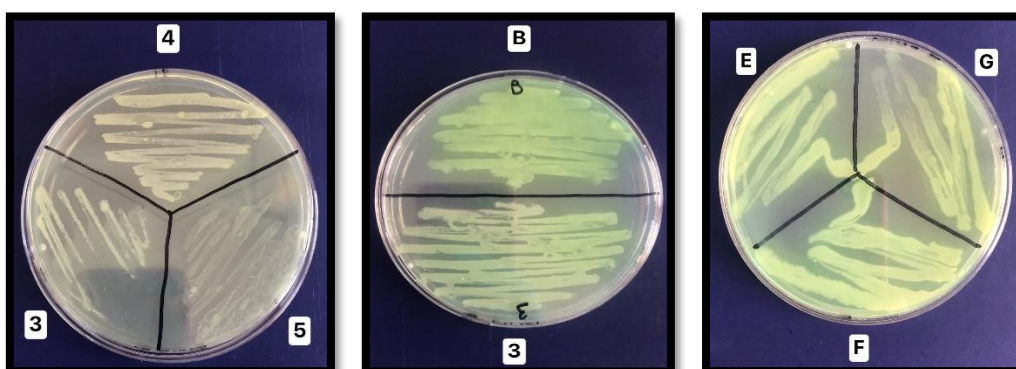
Les isolats retenus pour notre travail sont au nombre de 18 et on était classées comme suit :

- 11 colonies retenues des boites incubées à 28°C et identifiées par les lettres : A, B, C, D, E, F, G, H, I, J et K.
- 7 colonies retenues des boites incubées à 20°C et identifiées par les numéros : 1,2,3,4,5,6 et 7.

Les isolats destinés à la purification ont été sélectionnés sur la base des critères de fluorescence, quelques isolats qui présentent à l'œil nu une légère fluorescence et une croissance importante ont été prises en compte.

2) Confirmation de l'identification des isolats *Pseudomonas* :

A partir des cultures, 18 isolats (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K) d'aspect morphologique similaire ont été isolés et purifiés. La majorité de ces colonies repiquées sur gélose King B ont produit une pigmentation fluorescente, diffusant dans toute la boîte Pétri (**Figure 20**) (**Eyquem et Montagnier, 2000**).



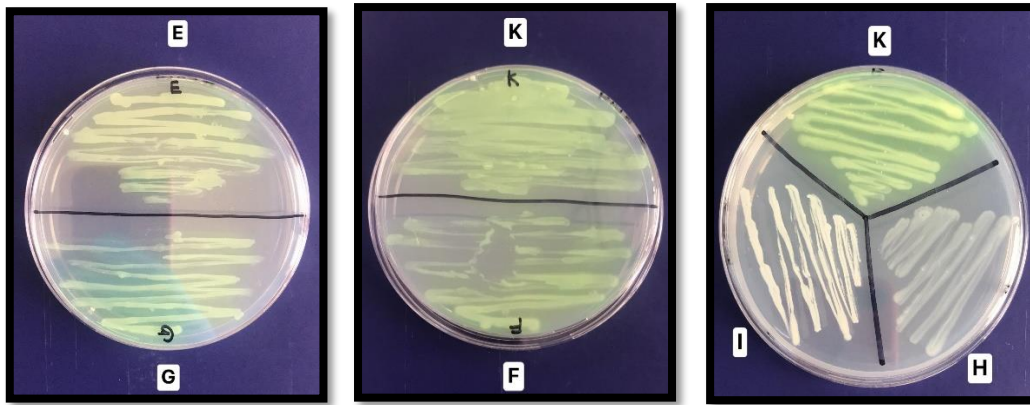


Figure 20 : Aspect macroscopique des colonies suspecte de *Pseudomonas* sur gélose King B.

2.1) Etude microscopique :

Après la coloration de Gram, nous avons observé des bactéries a Gram négatif de forme bacillaires, droites et dépourvus de spores. Elles apparaissent la plupart du temps isolées ou en diplobacilles. Après une observation microscopique à l'état frais, nous avons pu remarquer que ces isolats étaient très mobiles. Selon les travaux de (**Delarras, 2014**), nous pouvons attribuer les bactéries observés au genre *Pseudomonas*.

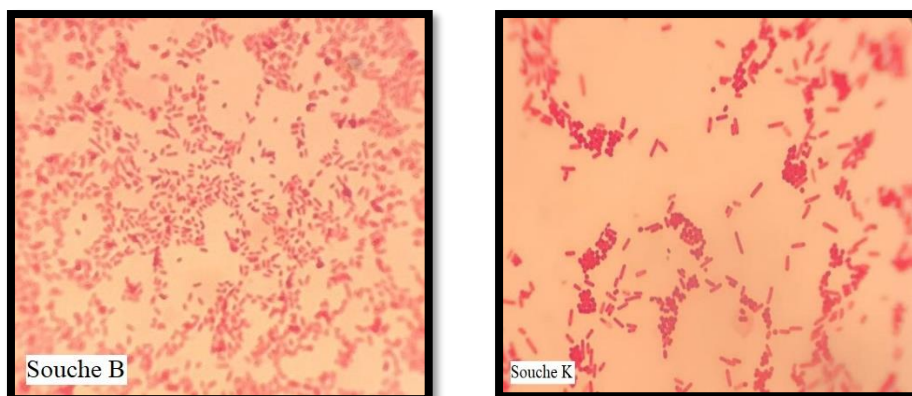


Figure 21 : Observation microscopique des *Pseudomonas* (B et K) après coloration de Gram (x1000).

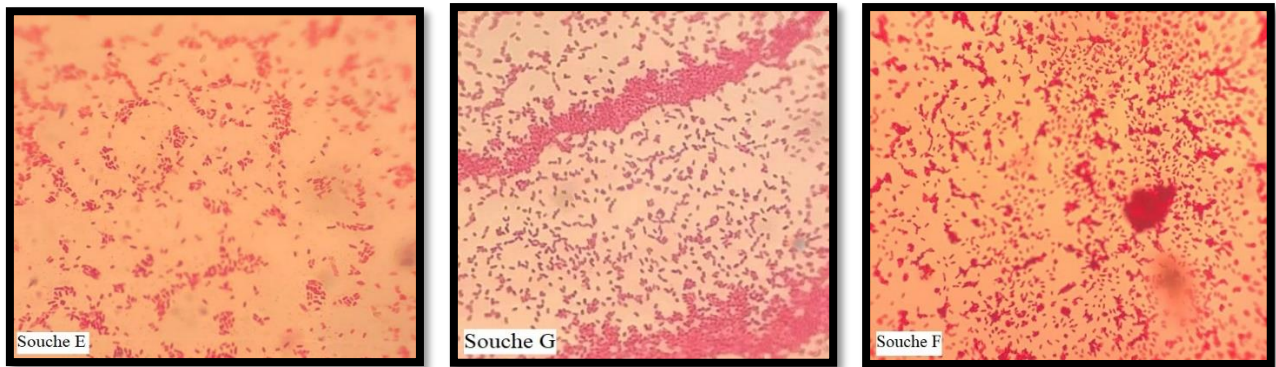


Figure 22 : Observation microscopique des *Pseudomonas* (E, G et F) après coloration de Gram (x1000).

2.2) Test Catalase :

Tous les isolats de *Pseudomonas* testés pour la production d’une catalase, ont décomposé l’eau oxygénée en eau et en oxygène en manifestant une effervescence synonyme de dégagement des bulles de gaz.



Figure 23 : Test catalase positif.

2.3) Test Oxydase :

Ce test est réalisé directement par un dépôt d’une quantité de crème bactérienne de la souche B sur un disque oxydase. La bactérie est oxydase positive qui s’est traduit par l’apparition d’une coloration violette.



Figure 24 : Test oxydase positif de la souche B de *Pseudomonas*.

2.4) Tests biochimiques :

La série de tests biochimiques effectuée pour les huit isolats bactériens (2, 3, 6, E, B, G, F, K) a révélé les résultats suivants (**Tableau 05**). Les huit isolats présentent des réactions négatives via le Voges Proskauer VP (-) et 3 isolats (6, 3, 2) positif au Rouge de Méthyle RM (+).

Pour le test TSI les isolats (B, E, F, G, K) sont négatifs, les sucres n'ont pas été fermentés par ces dernières, contrairement aux isolats (6, 3, 2) qui ont fermenté le glucose, le lactose et/ou le saccharose en plus d'une production de gaz (H_2S +).

Sept sur huit isolats étudiés transférés sur le milieu Citrate de Simmons ont provoqué un virage de l'indicateur au bleu, cela signifie que les bactéries sont des citrates (+), sauf pour la souche (2).

Les isolats E, B, G, F, K ont été testés négatives pour la dégradation du mannitol, contrairement aux isolats 2, 3, 6 dans lesquels il y'a eu un virage du milieu au jaune.

Sept isolats sur huit possèdent l'enzyme nitrate réductase, les isolats (2, 3, G) ont présenté un changement de couleur vers le rouge instantanément ce qui indique la présence de nitrite. Les isolats (6, B, E, F, K) ont transformé les nitrites, la dénitrification a permis l'obtention de diazote.

Les caractères décrits précédemment sont en accord avec la description des *P. aeruginosa* établit par (**Bisen et Verma, 1998**).

Les isolats E, B, G, F, K ont prouvés leur capacité à liquéfier la gélatine et à dégrader le jaune d'œuf. Selon (**Palleroni, 2005 ; Stanier et coll, 1966**) il s'agit des caractères qui confirme l'identité de *P. aeruginosa*.

Tableau 05 : Résultats des tests biochimiques des isolats.

Test	Souche E	Souche B	Souche G	Souche F	Souche K	Souche 6	Souche 3	Souche 2
VP/ RM	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Mannitol Mobilité	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
Citrate de Simmons	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Nitrate réductase	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
TSI	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Glu + Lac + H ₂ S +	Glu + Lac + H ₂ S +	Glu + Lac + H ₂ S +
BCPL	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Lécithinase	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	/	/	/
Arabinose	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	/	/	/
Gélatinase	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	/	/	/
Catalase	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Oxydase	/	(+)	/	/	/	/	/	/

3) Mise en évidence des pigments sur milieu King A :

La production des pigments a été nettement observée sur le milieu King A chez les isolats G, B et F qui se traduit par une couleur Bleu-vert. L'intensité du pigment est variable selon les isolats, elle est notamment visible pour les deux isolats G et B et plus ou moins absente chez les isolats E et K.

Tableau 06 : Intensité de la pigmentation sur King A chez les isolats de *Pseudomonas*.

Isolats	Intensité de la pigmentation
E	(-)
B	(+++)
G	(+++)
F	(+)
K	(-)

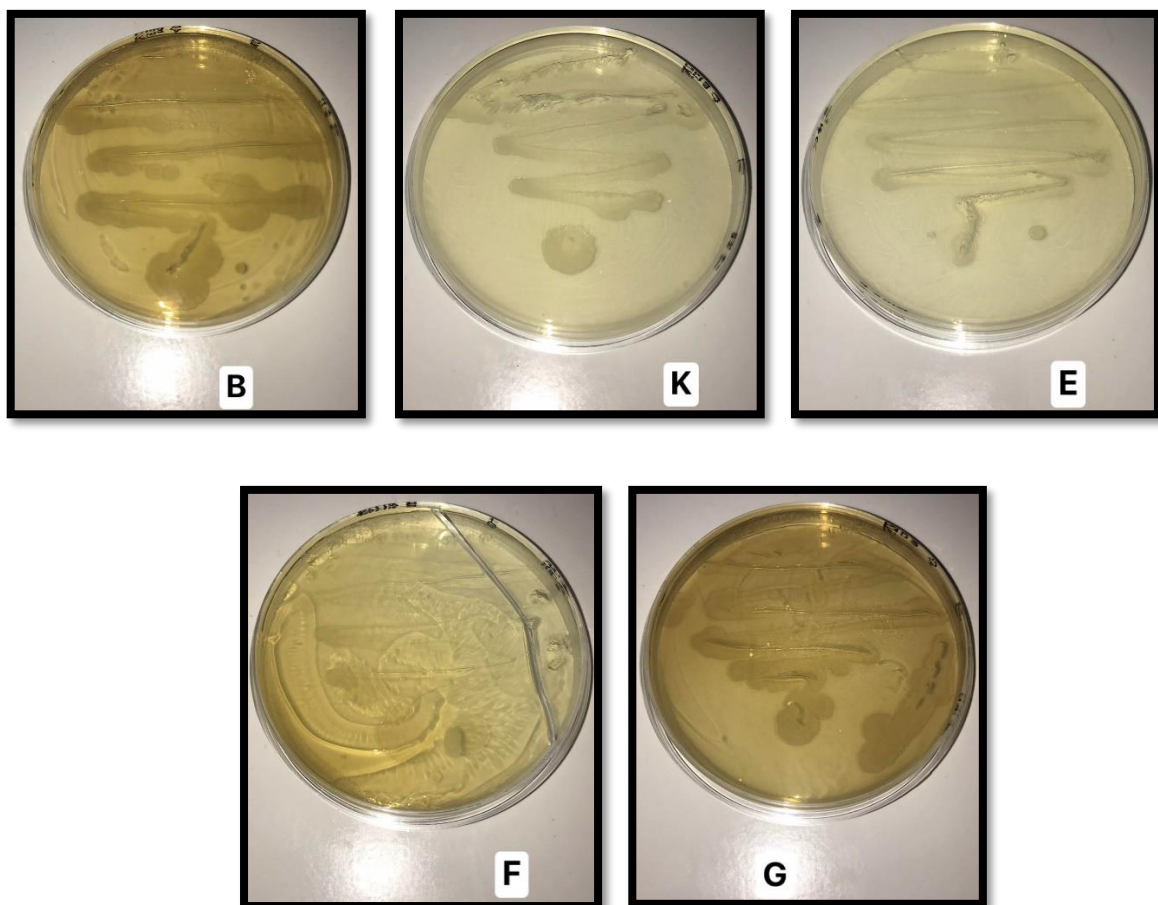


Figure 25 : Mise en évidence des pigments sur milieu King A.

4) Croissance à différentes températures (4°C et 42°C) :

Les résultats de la croissance à 4°C et 42°C indiquent que les isolats de *Pseudomonas* présentent une forte croissance à 42°C notamment les souches B et G et absence de croissance pour toutes les isolats

à 4°C. Cela indique que les cinq isolats font partie du groupe des *P.aeruginosa* selon le schéma décrit par (Digat et Gardan, 1987).

Tableau 07 : Mise en évidence du degrés d'intensité des pigments sur milieu King A à 42°C et 4°C.

Température	42°C	4°C
Isolats		
E	(+)	(-)
B	(+ + +)	(-)
G	(+ + +)	(-)
F	(+ +)	(-)
K	(+ +)	(-)

5) Identification des bactéries cibles :

5.1) Identification des bactéries :

Grâce aux observations au microscope (voir les figures 26 et 27) et aux tests biochimiques (voir **Tableau 04**) effectués il nous est possible d'identifier quatre isolats bactériens cibles : *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Proteus* sp.

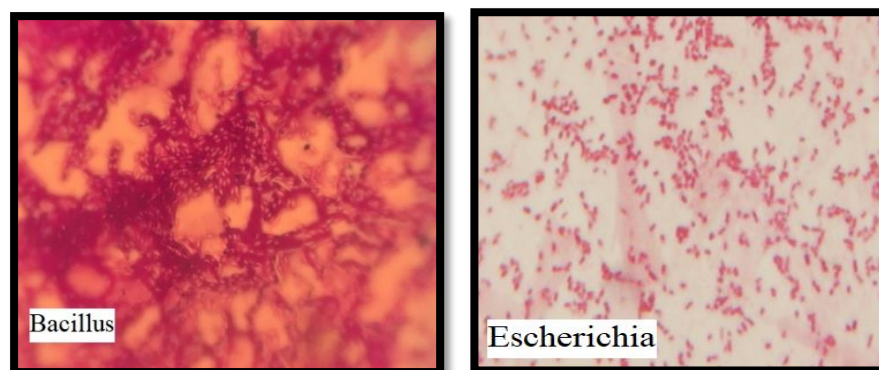


Figure 26 : Observation microscopique après coloration de Gram des bactéries cibles (*Bacillus* et *Escherichia*) x 1000.

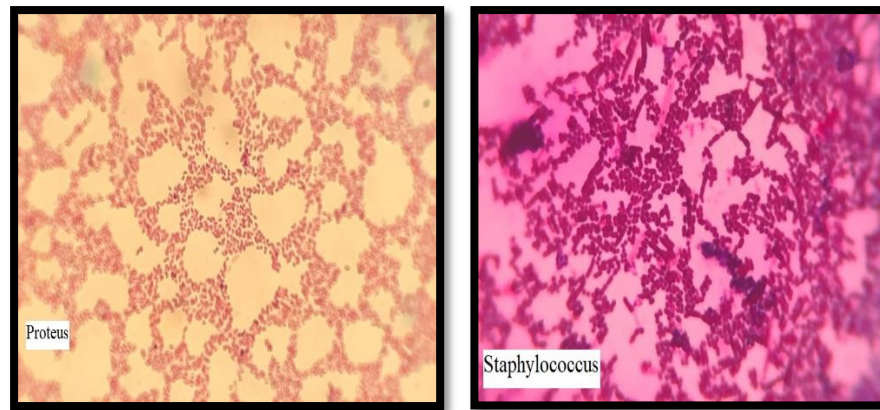


Figure 27 : Observation microscopique après coloration de Gram des bactéries cibles (*Proteus* et *Staphylococcus*) x 1000.

Tableau 08 : Résultats des tests biochimiques des quatre bactéries cibles (*Bacillus*, *Proteus*, *S. aureus* et *E. coli*).

Test bactéries	Gram	Forme	Spore	Citr	Mani	Mob	H ₂ S	Glu	Lac	NitR	V.P	R.M
<i>Staphylococcus</i>	(+)	Cocci	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	Var	(+)
<i>Bacillus</i>	(+)	Bacille	(+)	(+)	/	/	(-)	(+)	(-)	Var	(+)	(-)
<i>Proteus</i>	(-)	Bacille	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
<i>Escherichia</i>	(-)	Bacille	(-)	/	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)

5.2) Identification du champignon :

Nous avons pu purifier dans le milieu Sabouroud + Chlorophynicol une *Candida albicans* fourni par le laboratoire de microbiologie et de biologie végétale de l'université de Mostaganem. Cette levure présentant des colonies similaires morphologiquement au genre *Candida* (Voir Figure 28). L'observation microscopique après une coloration de Gram a et à l'état frais ont montré des cellules levuformes bourgeonnantes pourvues de noyaux.



Figure 28 : Colonies obtenues sur milieu Sabouroud + Chlorophenicol similaire aux colonies appartenant au genre *Candida*.

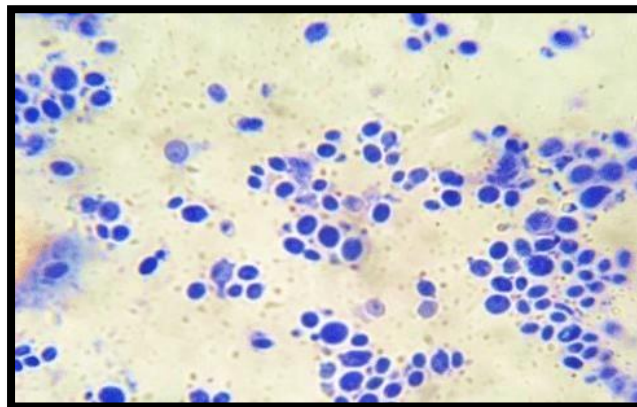


Figure 29 : Observation microscopique du genre *Candida* après coloration de Gram (X 1000).

6) Résultat du test d'antagonisme *in vitro* :

Les résultats du test d'antagonisme *in vitro* par la méthode directe (Co-culture sur milieu solide), ont démontré une inhibition de la croissance des bactéries cibles. Cette inhibition varie selon l'isolat de *Pseudomonas* et la bactérie cible.

Les résultats de ce test ont démontré globalement que les cinq isolats de *P. aeruginosa* testés, ont révélé un pouvoir inhibiteur de croissance des bactéries cibles, 4 sur 5 isolats ont été inhibés. Des zones claires entre les *Pseudomonas* et *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *E. coli* et *Proteus* ont été clairement

observées, le diamètre de ces zones varie de 0 à 2.3 cm (**Tableau 09**). L’histogramme donné dans la (**Figure 30**) présente les différentes distances des zones d’inhibition en centimètre entre les isolats de *Pseudomonas* et les bactéries cibles. La zone la plus grande a été signalée chez l’isolat B contre *E. coli* (2.3 cm), Les résultats obtenus dans l’essai d’antagonisme n’ont montré aucun effet antagoniste sur la souche de *C. albicans*. Ce qui reflète la différence de l’effet du pouvoir antagoniste chez chaque souche de *Pseudomonas* isolée.

Tableau 09 : Les distances de zones d’inhibition entre les isolats de *Pseudomonas* et bactéries cibles.

	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>	<i>E.coli</i>	<i>Proteus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
E	2 cm	Aucune	1.8 cm	aucune	1 cm
G	1.9 cm	Aucune	1.7 cm	0.5 cm	0.7 cm
B	1.8 cm	Aucune	2.3 cm	0.5 cm	1.2 cm
F	1.8 cm	Aucune	2 cm	0.8 cm	1.3 cm
K	2.2 cm	Aucune	2 cm	0.5 cm	1.5 cm

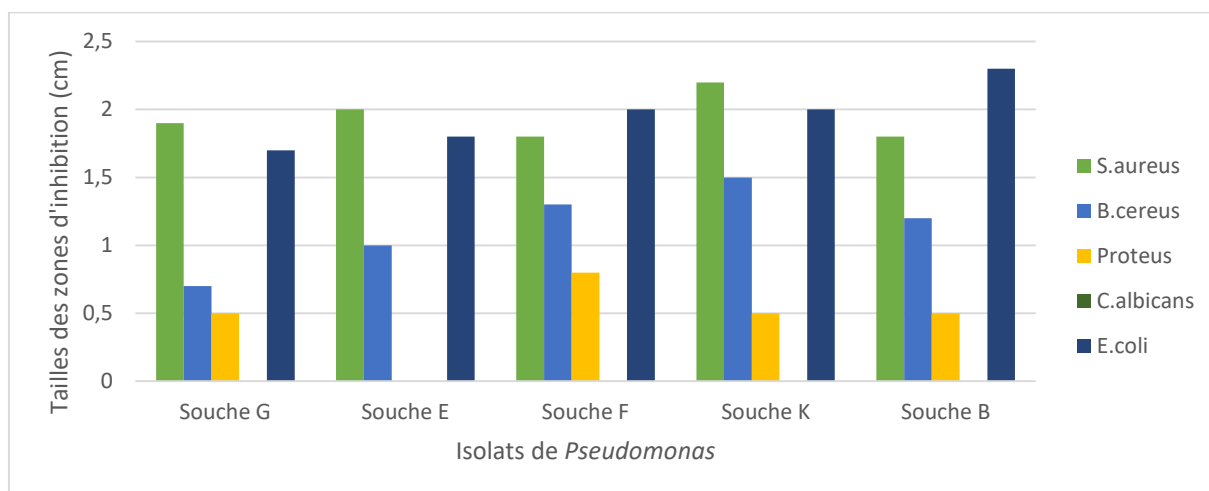


Figure 30 : Histogramme des résultats du test d’antagonisme.

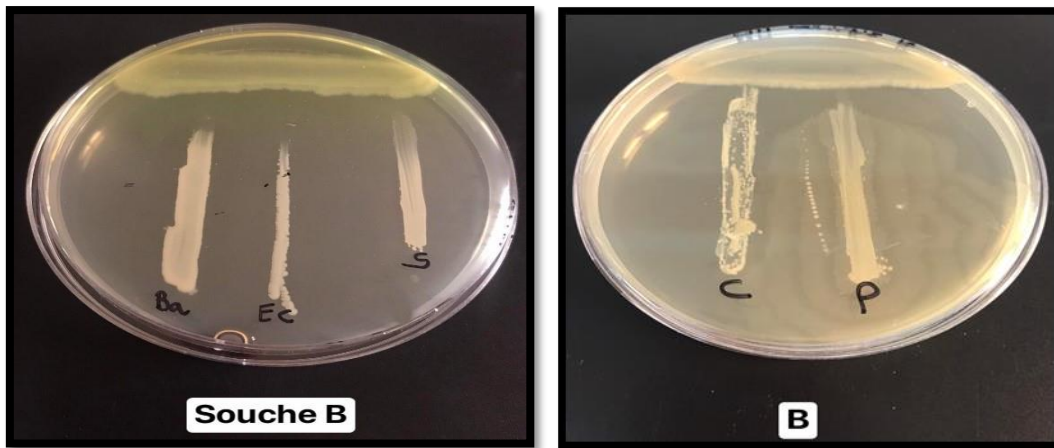


Figure 31 : Activité antagoniste de *Pseudomonas* (B) vis-à-vis *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* et *Proteus*.

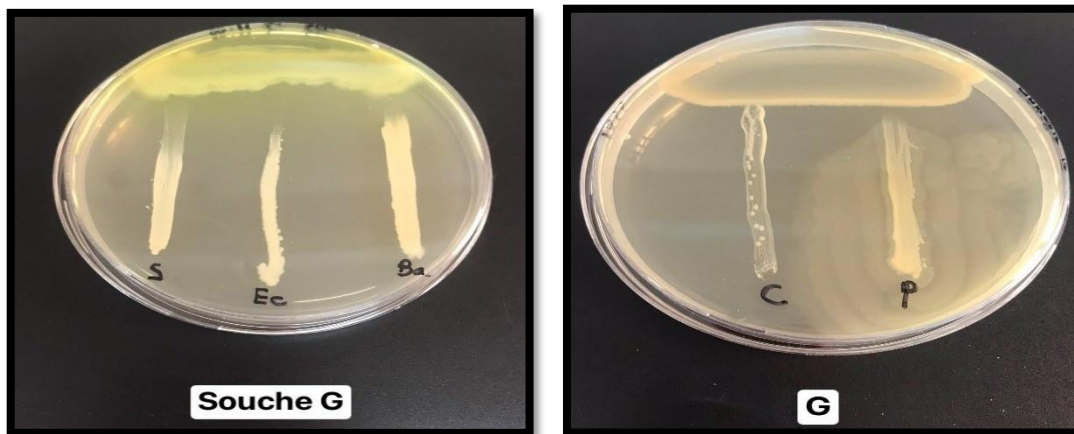


Figure 32 : Activité antagoniste de *Pseudomonas* (G) vis-à-vis *Bacillus cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* et *Proteus*.

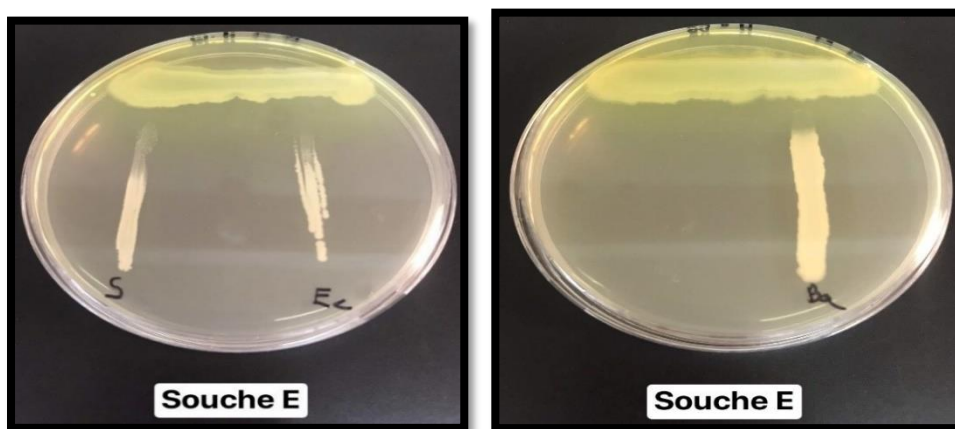


Figure 33 : Activité antagoniste de *Pseudomonas* (E) vis-à-vis *Bacillus cereus*, *E. coli* et *S. aureus*.

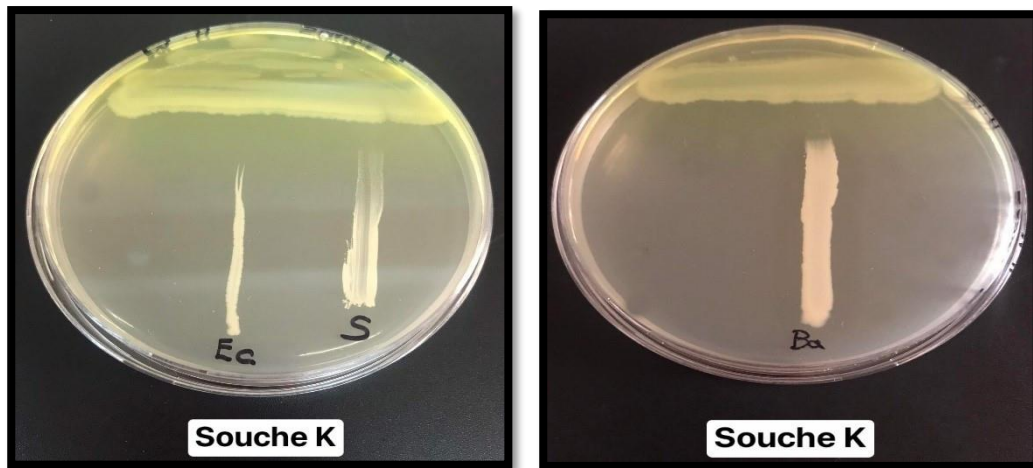


Figure 34 : Activité antagoniste de *Pseudomonas* (K) vis-à-vis *Bacillus cereus*, *E. coli*, *S. aureus*.

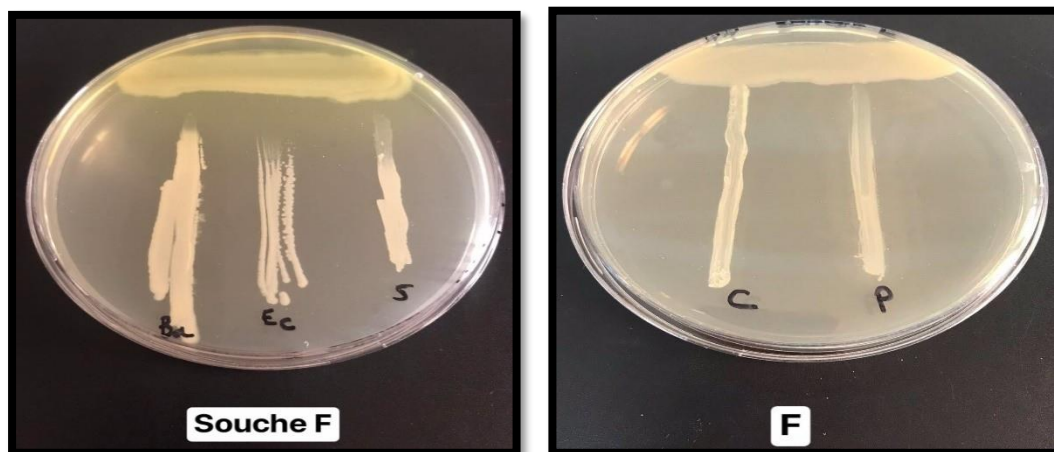


Figure 35 : Activité antagoniste de *Pseudomonas* (F) vis-à-vis *Bacillus cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* et *Proteus*.

Comme constaté précédemment, une importante action antibactérienne a été constatée plus particulièrement contre les souches *S. aureus* et *E. coli*. Pour le cas de *S. aureus*, plusieurs explications peuvent être mises en avant, tout d'abord cela peut être dû aux métabolites produits par *P. aeruginosa* (Zhang *et al.*, 2017), comme la phénazine-1- carboxamide qui est reconnue comme particulièrement efficace contre les *S. aureus*, y compris les souches SARM. Le mode d'action des phénazines peut inclure des interactions avec l'ADN, les topoisomérases, les anti-oxydants ou les molécules de transfert de charge. (Cardozo *et al.*, 2013). Mais il a été aussi démontré que *P. aeruginosa* sécrète une endopeptidase staphylolytique appelée protéase LasA ou staphylolysine, qui dégrade la pentaglycine dans la paroi cellulaire de *S. aureus*, provoquant la lyse cellulaire (Hotterbeekx *et al.*, 2017).

L'action antibactérienne de *P. aeruginosa* sur *E. coli* a également été démontrée par (Onbasli et Asli, 2008). Selon une autre étude menée par (Abdul-Hussein et Atia, 2016), les bactéries les plus affectées par la pyocyanine étaient *E. coli* extraites des voies urinaires, suivies par *Bacillus*. Ces résultats sont en accord avec le résultat précédent qui a rapporté que les antibiotique phénazines ont une activité antimicrobienne contre les souches de *B.subtilis* et *E. coli* (Makrand et al., 2007).

La bactérie *P.aeruginosa* peut produire également une mixture de rhamnolipides ayant une action antimicrobiennes particulièrement efficace contre *B.subtilis* en plus d'autres souches gram positif (Haba et al., 2003).

A un degrés moindre, l'effet antimicrobien de *P. aeruginosa* sur les bactéries a gram négatif tel que *Proteus sp* a déjà été démontré par (Sudhakar et al., 2015 ; Özyürek et al., 2016). Ce qui est en accord avec les résultats obtenus lors de notre étude. Cependant l'absence de toute activité antifongique contre la souche *C. albicans* utilisée vient en contradiction avec les études menées par (Özyürek et al., 2016) sur la souche *C. albicans*. Cette incapacité des souches de *P. aeruginosa* à inhiber la croissance fongique peut s'expliquer par le fait que les souches utilisées contre *C. albicans* manquent de gènes responsable de la production des substances antifongiques ou peut être à la présence de gènes de résistance chez *C. albicans*.

7) Résultat du test de l'effet de la salinité :

7.1) Effet de la salinité sur la croissance bactérienne :

Après la période d'incubation de 48h, nous avons pu constater que la concentration de sel a eu un effet sur la croissance de la souche de *P. aeruginosa*. Les valeurs de croissance les plus importantes ont été obtenues à une concentration de 1% par la souche E pour une densité optique (D.O = 1,931). Pour une concentration de 2%, une légère baisse de croissance a été constatée chez l'ensemble des souches. Alors qu'à une concentration de 3%, une hausse de la croissance a été constatée pour les souches F (D.O = 1,105) et K (D. O =1,113), ce qui représente l'optimum de croissance de ces deux souches. A partir d'une concentration de 5% de NaCl, une baisse progressive de la croissance a été enregistrée jusqu'à devenir difficilement constatable à 7% (indéetectable pour la souche G et D. O = 0,141 pour la souche E). (Voir tableau 10)

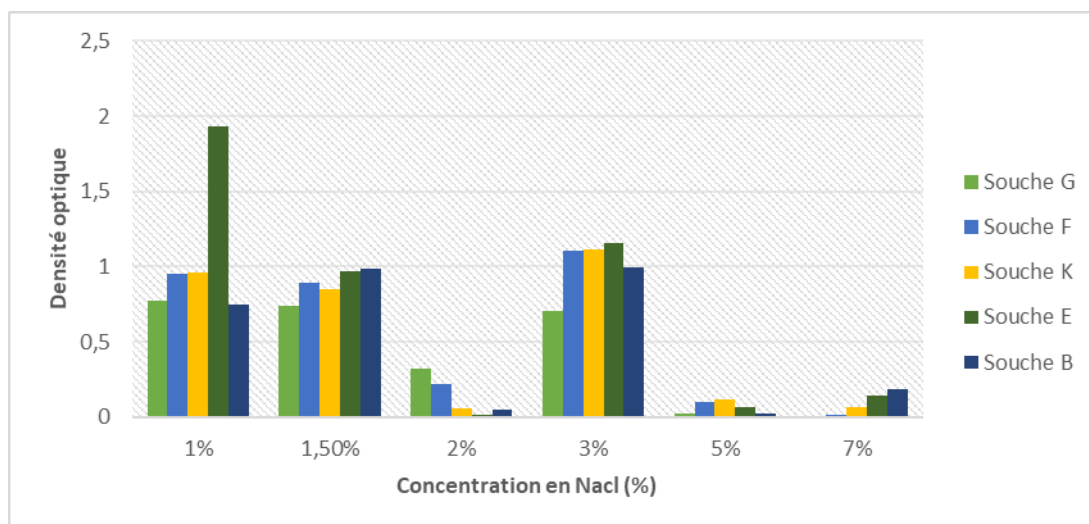


Figure 36 : Histogramme illustrant l'effet de la concentration de NaCl sur la croissance de la souche *P. aeruginosa*.

Tableau 10 : Résultat de la lecture de la densité optique de la croissance des souches G, F, K, E et B.

Souches	D.O à 1%	D.O à 1,5%	D.O à 2%	D.O à 3%	D.O à 5%	D.O à 7%
G	0.778	0.738	0.323	0.707	0.026	
F	0.949	0.89	0.222	1.105	0.104	0.017
K	0.963	0.853	0.056	1.113	0.115	0.068
E	1.931	0.967	0.014	1.155	0.069	0.141
B	0.745	0.988	0.049	0.994	0.024	0.190

7.2) Effet de la salinité sur la production du métabolite :

Avant d'effectuer la quantification, nous avons sélectionné les deux souches les plus performantes sur la base des tests biochimiques et du test de température (la capacité de production de la pyocyanine à 42°C). Les deux souches retenues sont la souche E et la souche B. L'optimum de croissance de la souche B se situe à 3% de NaCl et pour la souche E cette optimum se situe à 1% de NaCl, le rendement maximal de pyocyanine obtenu pour la souche B se situe à 1% de NaCl alors que pour la souche E il se situe à 1,5%. D'après l'étude publié par (**Dahah et al., 2016**), l'optimum de croissance et de production de pyocyanine se situe à 20g/l de NaCl (2%) pour un rendement de 29.57µg/ml. D'une autre part, d'après les travaux de (**Prabhakaran et al.,2014**), le rendement maximal de la production

de ce métabolite secondaire est obtenu à une concentration comprise entre 5 et 10 g/l (0,5 % et 1%) avec une moyenne de production de 25mg/ml. Les résultats obtenus lors de notre étude sont conforme à l'intervalle des résultats décrits dans les travaux cités précédemment (entre 0,5% et 2% de NaCl). Cela confirme l'hypothèse selon laquelle un stress salin modéré contribue à augmenter la production de la pyocyanine chez *P. aeruginosa* issus d'un milieu marin. Néanmoins pour confirmer de manière plus significative, d'autres essais avec une autre palette d'échantillons seraient conseillés.

Les résultats de lecture de la D.O de la production de pyocyanine ont été illustrés dans le (tableau 11). Un seul test seulement a été effectué.

Tableau 11 : Résultat de la lecture de la densité optique de la production de pyocyanine des souches E et B.

	D.O à 1%	D.O à 1,5%	D.O à 2%
Souche E	0.074	0.592	0.197
Souche B	0.247	0.122	0.001

Les résultats de la production de la pyocyanine à 3%, 5% et 7% de NaCl ont été éliminés du fait de leur incohérence et de leur irrégularité.

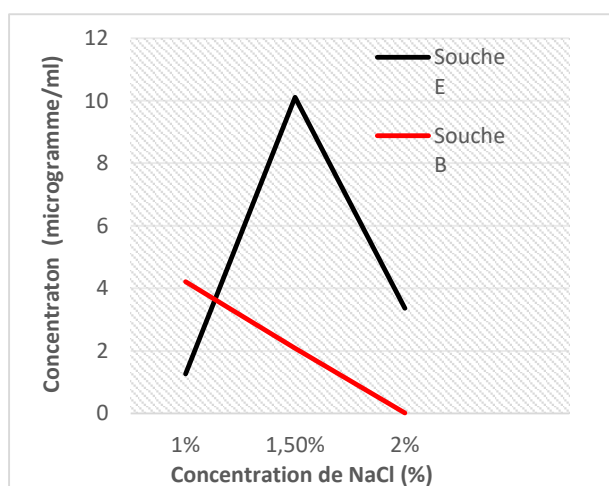


Tableau 12 : concentration (en µg/ml) de pyocyanine des souches E et B sous différentes concentrations de NaCl.

	[C] à 1%	[C] à 1,5%	[C] à 2%
Souche E	1.263	10.106	3.363
Souche B	4.217	2.082	0.017

Figure 37 : Courbe représentant l'effet de la salinité sur la production de la pyocyanine chez les Souche E et B.

8) Résultats de l'extraction du métabolite :

Pour la production de la pyocyanine en vue de l'extraction, nous avons retenu la souche B car elle présente un taux important de production à de faible concentration de NaCl. Après l'extraction et l'évaporation sous vide, nous avons obtenu une quantité de 0,19g de poudre blanche pour 125 ml de culture. Les résultats de la lecture au spectrophotomètre à U.V nous a permis de quantifier la quantité de métabolites obtenue. Les résultats de l'absorbance spectral à différentes longueurs d'ondes sont dans reportés dans le **tableau 13** et illustrés avec la **figure 38** :

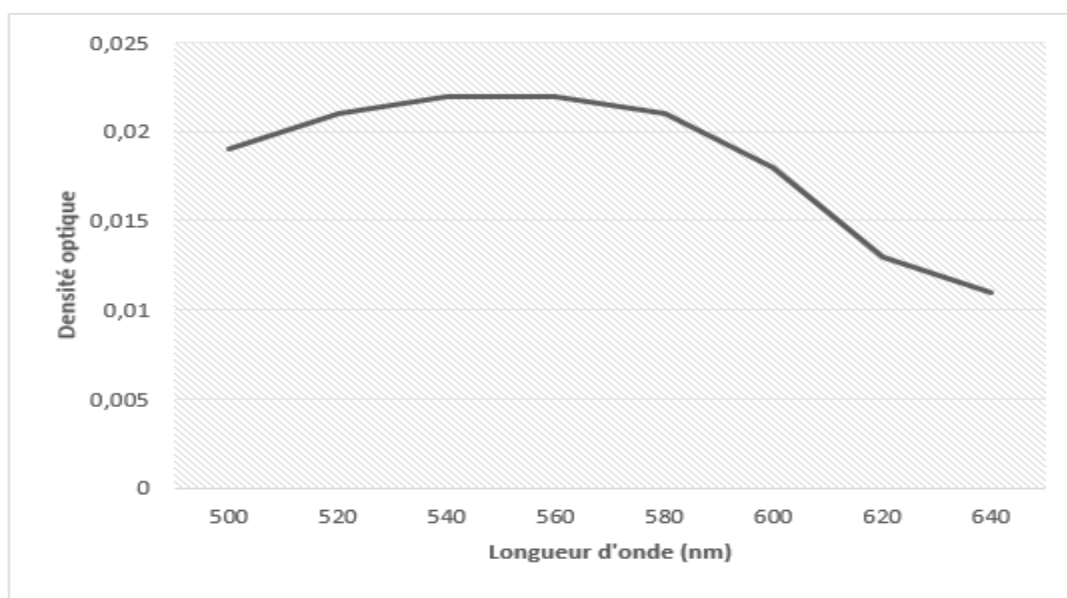


Figure 38 : Courbe d'absorbance spectral de la pyocyanine extraite a différente longueur d'ondes.

Tableau 13 : Résultat de l'absorption spectral de la pyocyanine extraite à différente longueur d'onde.

Longueur d'ondes	500 nm	520nm	540 nm	560 nm	580 nm	600 nm	620 nm	640nm
Densité optique	0,019	0,021	0,022	0,022	0,021	0,018	0,013	0,011

La lecture à une longueur d'onde de 520 nm peut témoigner de la présence d'une quantité de pyocyanine atteignant une concentration de 0,36 µg/ml (**Kurashi et al., 1958**). Néanmoins une caractérisation plus poussé serait judicieuse afin de confirmer qu'il s'agit bien de la pyocyanine.

9) Résultat de l'activité antimicrobienne de l'extrait obtenu :

La production des substances antimicrobiennes suspectées d'être pyocyaniques par l'isolat B a été effectuée sur le milieu MH liquide, l'extraction de ce métabolite a été réalisée en utilisant du chloroforme, L'extrait sec a été mis ensuite en solution avec du méthanol pour tester son effet antimicrobien.

Les résultats obtenus ont démontré que la substance obtenue exerce une activité inhibitrice notamment contre *E. coli* et *Proteus*. Des zones claires autour des disques immergés de l'extrait de métabolites ont été observées. La taille de ces zones varie selon la souche testée, entre 0.8 et 1.6 cm, la plus grande zone a été observée contre *E. coli* (1.6 cm). Tandis que pour les souches *S. aureus* et *B. cereus* les zones d'inhibition sont non déterminées ou nulles respectivement.

Tableau 14 : Activité antimicrobienne de l'extrait pyocyanique.

Isolats <i>Pseudomonas</i>	Bactéries testées	Diamètre des zones d'inhibition (cm)
Souche B	<i>Proteus</i>	0.8 – 1
	<i>S. aureus</i>	Non déterminée
	<i>B. cereus</i>	00
	<i>E. coli</i>	1.3 – 1.6

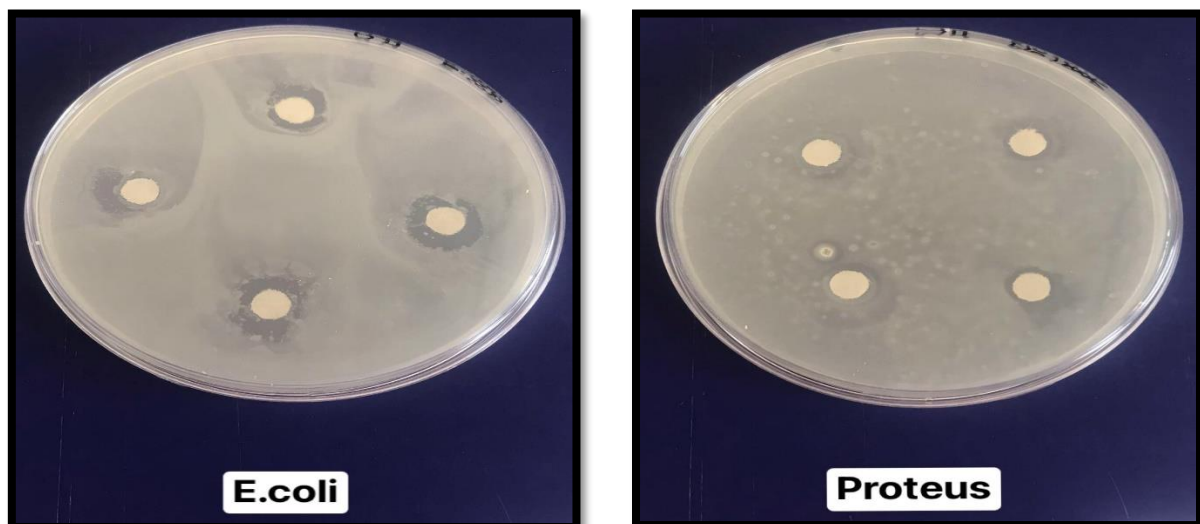


Figure 39 : Effet antimicrobien de l'extrait pyocyanique sur *E. coli* et *Proteus*.

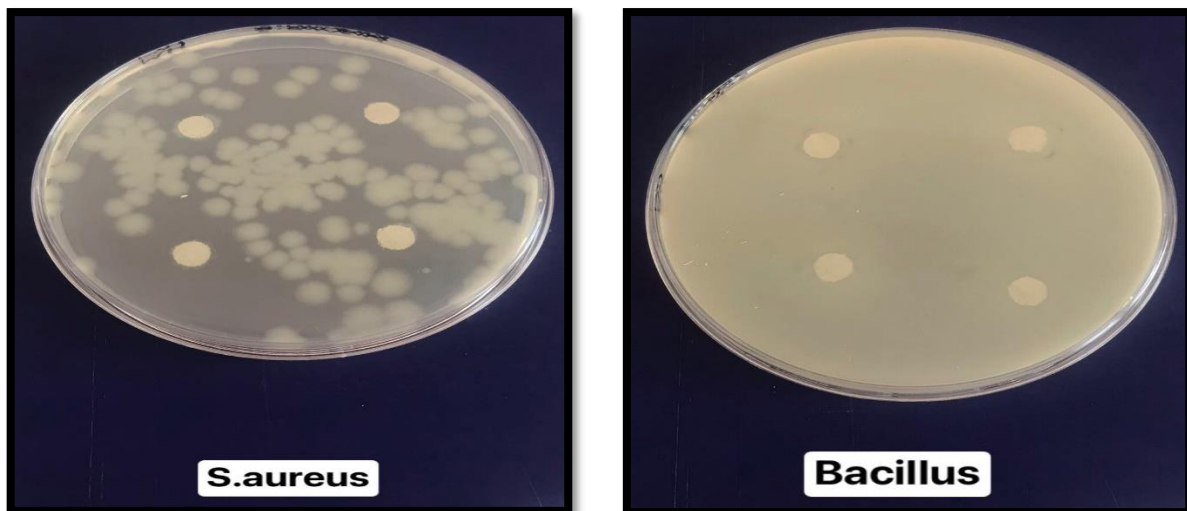


Figure 40 : Absence d'effet antimicrobien de l'extrait pyocyanique sur *S. aureus* et *B.cereus*

Nous avons pu obtenir une quantité notable de pyocyanine après 72h d'incubation à une température de 30°C selon le protocole de (Agrawal et Chauhan, 2016). L'antibiogramme a démontré l'efficacité de l'activité antibactérienne de la pyocyanine appliquée aux souches gram négatif comme *E. coli* et *Proteus sp.* L'action antibactérienne de la pyocyanine a été également démontrée contre d'autres bactéries pathogènes *S. saprophyticus*, *K. pneumoniae* (Ahmed Mohammed *et al.*, 2017) ainsi que *Salmonella typhi A*, *Salmonella typhi B*, *Salmonella paratyphi*, *Klebsiella sp*, *Alternaria sp* (Agrawal et Chauhan, 2016 ; Alka *et al.*, 2018).

L'absence de zones d'inhibition autour de disque de pyocyanine disposé sur la culture de *B.cereus* peut indiquer probablement la résistance de cette bactérie à ce métabolite. Concernant *S. aureus*, malgré les résultats non-déterminés de l'antibiogramme qui peuvent être du à une diffusion de la pyocyanine dans le milieu de culture, plusieurs études attestent de l'efficacité de cette dernière sur les souches de ce genre. En effet, selon une étude menée par (Devnath *et al.*, 2017), l'espèce *S. aureus* représente la souche la plus sensible à la pyocyanine parmi les bactéries à Gram positif.

Conclusion et perspectives :

Le présent travail a pour objectif d'isoler à partir du milieu marin des *Pseudomonas* fluorescents qui ont tendance à produire sous l'effet d'un stress salin des métabolites secondaires ou des substances antimicrobiennes qui peuvent exercer un pouvoir antagoniste, antibactérien et antifongique.

Les bactéries cibles utilisées dans notre étude ont été obtenues depuis les laboratoires de microbiologie de l'université de Mostaganem il s'agit de : *S. aureus*, *B. cereus*, *Proteus*, *E. coli* et *C. albicans*. De nombreux tests d'indentification répétées ont été réalisés afin de confirmer quelques-unes de leurs caractéristiques.

L'isolement des *Pseudomonas* a été réalisé à partir de 3 échantillons de sable de mer au niveau de la plage de Sidi El Medjdoub à Mostaganem. Les 5 isolats sélectionnés de *Pseudomonas* isolées ont été rapprochées à *P. aeruginosa* par des tests phénotypiques. Ces isolats ont subi un test d'antagonisme sur le milieu Mueller-Hinton solide afin de mettre en évidence leurs pouvoirs antibactérien et antifongique contre des bactéries à Gram positif, négatif et *C. albicans*. Ces zones d'inhibition varient entre 0,5 et 2.3 cm. La plus grande zone d'inhibition observée était chez l'isolat B contre la bactérie *E. coli*, toutes les autres bactéries ont été également inhibées par cet isolat. Néanmoins, les 5 isolats de *Pseudomonas* isolées n'ont montré aucune activité antifongique.

L'isolat B a été identifié en tant que *P. aeruginosa* par la galerie API NE. La production des substances antimicrobiennes par ce dernier a été effectuée sur le milieu MH liquide, l'extraction de ce métabolite a été réalisée en utilisant du chloroforme.

Nous avons constaté que la concentration en NaCl a eu un effet notable sur la croissance et la production de métabolites isolats de *Pseudomonas*, pour l'isolat B, l'optimum de production se situe à seulement 1% de l'NaCl pour une concentration de 4.217 µg/ml.

Concernant le test d'antagonisme, nous avons pu obtenir des zones d'inhibition qui varient entre 0,8 à 1,6 cm de diamètre pour les bactéries *E. coli* et *Proteus spp* uniquement.

Les résultats présentés dans ce travail démontrent que l'application d'un stress salin peut influencer sur la production de métabolites secondaires comme la pyocyanine chez *P. aeruginosa* isolée. L'extrait de pyocyanine obtenue à montrer une activité antimicrobienne constatable a une concentration de 0,36 µg/ml du métabolite.

Les perspectives qui résultent de ce travail sont nombreuses :

- ✓ D'un point de vue taxonomique, il serait nécessaire d'effectuer une étude moléculaire des isolats de *P. aeruginosa* par un séquençage de l'ARN 16S.

- ✓ L'échantillon de pyocyanine extrait nécessite une caractérisation chromatographique de type HPLC dans le but de confirmer l'identité du métabolite et l'état de pureté de l'échantillon utilisé.
- ✓ Une étude moléculaire est à préconiser, en effet il est important d'effectuer des PCR par des amorces spécifiques des gènes de la bactérie productrice afin de comprendre la biosynthèse de la pyocyanine dans l'optique d'améliorer la production et de rechercher une méthodologie adaptée pour modifier les gènes codants pour cet antibiotique.
- ✓ Le travail actuel doit être poursuivi avec des études *in vivo* pour clarifier les effets thérapeutiques de la pyocyanine. Enfin, il serait aussi nécessaire d'étudier d'autres métabolites à effet antimicrobien produits dans les mêmes conditions de stress ainsi que sous l'effet d'autres stress.

Références bibliographiques :

- **Abdallah M.A., et Pattus F. (2000).** Siderophores and Iron-transport in Microorganims. J.Chin Chem Soc, 47 : 1-20.
- **Abdel-Banat BM., Hoshida H., Ano A., Nonklang S., Akada R. (2010)** High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast. Appl Microbiol Biotechnol., 85:861– 867.
- **Abdul-Hussein Z.R., Atia S.S. (2016)** Antimicrobial effect of Pyocyanin Extracted from *Pseudomonas aeruginosa*, Department of Biology, College of Science, University of Basra, Iraq.
- **Achkar J., Xian M., Zhao H et Frost J. W. (2005).** Biosynthesis of phloroglucinol. J. Am. Chem. Soc. 127, 5332–5333.
- **Agrawal A.H and Chauhan P.B. (2016)** Effect of cultivation media components on pyocyanin production and its application in antimicrobial property. International Journal of Current Advanced Research. Vol: 5(4): 829-833.
- **Agrawal A.H et Chauhan P.B. (2016).** Effect of cultivation media components on pyocyanin production and its application in antimicrobial property. International Journal of Current Advanced Research. Vol: 5(4): 829-833.
- **Ahmed Mohammed T and Almahde M.A.M. (2017)** Antimicrobial Activity of Pyocyanin for Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Urinary Tract Pathogens. Asian Journal of Medicine and Health. Vol: 4(4): 1-9.
- **Alka R., Shikha C., Wamik A. (2018)** Production and Antimicrobial, Antioxidant and Anticancer Applications of Pyocyanin from Isolated *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Fermentation and Microbial Technology. Vol: 1(2).
- **Avril J. M., Dabernat H et Monteil D. H. (2000).** Bactériologie clinique. 3éme Ed. EdEllepses. Paris. 602 P.
- **BakkalSuphan., Sandra M ., Margaret A. (2012)** :Bacteriocins of AquacticMicroorganismes and their potential application in the seafood Industry.carvalho.edmir .in tech.978-953.
- **Banat IM., Makkar RS., Cameotra SS. (2000)** Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl Microbiol Biotechnol 53: 495-508.
- **Banowetz G.M., Azevedo M.D., Armstrong D.J., Halgren A.B., Mills D.I. (2008).** Germination-Arrest Factor (GAF): Biological properties of a novel, naturally

occurring herbicide produced by selected isolates of rhizosphere bacteria. *Biol. Control* 46:380-390.

- **Barry A.L., Thornsberry C. (1985)** Susceptibility tests: Diffusion tests procedures. In: Lennette E.H., Ballows A.W. Shadomy J.R.H. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC USA, pp. 1000-1008
- **Bender C. L., et Rangaswamy V. (1999)**. Polyketide production by plant associated pseudomonads. *Annual Reviews of Phytopathology* 37:175–196.
- **Berry E.D., Foegeding P.M. (1997)** Cold Temperature adaptation and growth of microorganisms. *J Food Protect.*, 60, 1583-1594.
- **Bibb M.J. (2005)**. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes *Curr Op Microbiol.*, 8, 208–215.
- **Bisen P. S. and K. Verma. (1998)**. “Hand Book of Microbiology”. New Delhi: 1 st Ed., CBS Publishers and Distributors, 16-28.
- Brodhagen M., Paulsen I., et Loper J. E. (2005). Reciprocal Regulation of Pyoluteorin Production with Membrane Transporter Gene Expression in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology* 71(11):6900-6909.
- **Brown G.R., Sutcliffe I.C., Cummings S.P. (2003)** Combined solvent and water activity stresses on turgor regulation and membrane adaptation in *Oceanimonas baumannii* ATCC 700832. *Anton. Leeuw.*, 83, 275–283.
- **Budzikiewicz H. (1993)**. Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol. Rev.* 104: 209–228.
- **Bull A. T. & Stach, J. E. (2007)**. *Trends Microbiol.* 15, 491–499.
- **Cabiscol E., Tamarit J., Ros J. (2010)** Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol*, 3, 3–8.
- **Carcanague D.R. (1997)**. Novel derivatives of pseudomonic acid. *Bioorganic Medicinal Chem. Lett.* 7(21): 2805-2808.
- **Cardozo V.F., Oliveira A.G., Nishio E.K., Perugini M.R., Andrade C.G., Silveira WD, Durán N., Andrade G., Kobayashi RK and Nakazato G. (2013)** Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. Vol: 12 (12):1-8.

- **Chain E.B et Mellows G. (1977)** Pseudomonic acid, part 1, The structure of pseudomonic acid A, a novel antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *J Chem Soc Perkin Trans I*:294e309.
- **Chang C. J., Floss H.G., Hook D. J., Mabe J. A., Manni P. E., Martin L. L., Schrode K. R, et Shieh T. L. (1981).** The biosynthesis of the antibiotic pyrrolnitrin by *Pseudomonas aureofaciens*. *J. Antibiot.* 24:555–566.
- **Chin-A-Woeng T.F., Bloemberg G.V., et Lugtenberg B.J., (2003).** Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New. Phyto*, 157 :503-523.
- **Christiansen T et Nielsen J. (2002).** Production of extracellular protease and glucose uptake in *Bacillus clausii* in steady-state and transient continuous cultures. *J. Biotechnol.* 97, 265–273.
- Connolly J.A., Wilson A., Macioszek M., Song Z., Wang L., Mohammad H.H., Yadav M., di Martino M., Miller C.E., Hothersall J., Haines A.S., Stephens E.R., Crump M.P., Willis C.L., Simpson J.L., Winn P.J., Thomas C.M. (2019). Defning the genes for the fnal steps in biosynthesis of the complex polyketide.
- **Cook R., Bruckart W., Coulson J., Goettel M., Lumsden R., Maddox J., McManus M., Moore L., Meyer S., Quimby P., Stack J et Vaughn J. (1996).** Sécurité des micro-organismes destinés à la lutte antiparasitaire et de lutte contre les maladies des plantes: un cadre pour l'évaluation scientifique. *Biol. Contrôle.* 14-24p.
- **Croteau R., Kutchan TM., Lewis N.G. (2000)** Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, pp 1250–1318.
- **Czapski T. R., and Trun N. (2014)** Expression of *csp* gene in *E. coli* K-12 in defined rich and defined minimal media during normal growth, and after cold-shock, *Gene* 547, 91–97. doi : [10.1016/j.gene.2014.06.033](https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.06.033).
- **Dahah H., Djibaoui R., Nemmiche S. (2016)** Antimicrobial, antioxidant and hemolytic effects of Pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from saline soil of Mina river, Algeria. *International Journal of Biosciences*, Vol. 9, No. 5, p. 134-143.
- **Dalton H. (1979)** *Int. Rev. Biochem*, 21, 229-66.
- **Delarras C. (2014)** *Pratiques en microbiologie de laboratoire*. Lavoisier, France.
- **Delarras C. (2014).** *Pratiques en microbiologie de laboratoire*. Lavoisier, France.

- **Delong, E.F., Yayanos, A.A. (1987)** Properties of the glucose-transport system in some deep-sea bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 527–532.
- **Denis F., Poly M., Martin C., Bingen E., Quentin R. (2011)** *Bactériologie Médicale : Techniques Usuelles*. Elsevier Masson, France.
- **Devi K.K et Kothamasi D. (2009)**. *Pseudomonas fluorescens* CHA0 can kill subterranean termite *Odontotermes obesus* by inhibiting cytochrome c oxidase of the termite respiratory chain. *FEMS Microbiol. Lett.* 300 :195-200.
- **Devnath P., Uddin MK., Ahamed F., Hossain M.T and Abul Manchur M. (2017)**. Extraction, purification and characterization of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* and evaluation for its antimicrobial activity. *International Research Journal of Biological Sciences*. Vol : 6(5) : 1-9.
- **Digat, B., et Gardan, L. (1987)** Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. *Bull OEPP*, 17 : 559-568.
- **Doull J.L., Ayer S.W., Singh A.K., Thibault P. (1993)** Production of a novel polyketide antibiotic, jadomycin B, by *Streptomyces venezuelae* following heat shock. *J Antibiot*, 46, 869.
- **El-Sayed A. K., Hothersall J., Cooper S.M., Stephens E., Simpson T. J., Thomas C.M. (2003)**. *Chem. Biol.*, 10, 419–430.
- **Esmann M., Fedosova N.U., Marsh D. (2008)** Osmotic stress and viscous retardation of the Na, K-ATPase ion pump. *Biophys. J* 94, 2767– 2776.
- **Essar D.W., Eberly L., HaderoA. & 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.
- **Ewing E. (1986)** *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*. 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc. New-York.
- **Eyquem A., Montgnier L. (2000)** *Trité de microbiology clinique : deuxièmes mises à jour et complements*. PICCIN, Itali, 238p.
- **Field D., Garrity G., Gray T., Morrison N., Selengut J., Sterk P., Tatusova T., Thomson N., Allen M.J., Angiuoli S.V., Ashburner M., Axelrod N., Baldauf S., Ballard S., Boore J., Cochrane G., Cole J., Dawyndt P., Vos P.D., dePamphilis C., Edwards R., Faruque N., Feldman R., Gilbert J., Gilna P., Glöckner F.O., Goldstein P., Guralnick**

- R., Haft D et Hancock D. (2008)** The minimum information about a genome sequence (MIGS) specification. *Nat Biotechnol.*; 26:541–7.
- **Fleming H. P., J. L and Costilow R. N. (1975).** Microbiological inhibition of isolate of *Pediococcus* from cucumber brine. *Applied and Environmental Microbiology*, 30 : 1040-1042.
 - **Flemming H.C., Wingender J. (2001)** Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: structural and ecological aspects. *Water Sci. Technol*, 43, 1–8.
 - **Foote C.S., Goyne T.E. and Lehrer R.I. (1983)** Assessment of chlorination by human neutrophils. *Nature* 301, 715–716.
 - **Gandhi A., Shah N.P. (2016)** Effect of salt stress on morphology and membrane composition of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, and *Bifidobacterium bifidum*, and their adhesion to human intestinal epithelial-like Caco-2 cells. *J Dairy Sci*, 99, 2594–2605.
 - **Gao L, Liu Y, Sun H, Li C, Zhao Z, Liu G (2016)** Advances in mechanisms and modifications for rendering yeast thermotolerance. *J Biosci Bioeng* 121 ,599–606.
 - **Gao S.S., Hothersall J., Wu J., Murphy A. C., Song Z., Stephens E. R., Thomas C. M., Crump M.P., Cox R.J., Simpson T. J., et Willis C. L. (2014).** Biosynthesis of Mupirocin by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586 Involves Parallel Pathways. *Journal of the American Chemical Society*, 136(14), 5501-5507.
 - **Garrido-Sanz., Daniel., Arrebola., Eva., Martínez-Granero., Francisco., García-Méndez., Sonia., Muriel., Candela., Blanco-Romero., Esther., Martín., Marta., Rivilla., Rafael., Redondo-Nieto et Miguel. (2017).** "Classification of Isolates from the *Pseudomonas fluorescens* Complex into Phylogenomic Groups Based in Group-Specific Markers". *Frontiers in Microbiology*.
 - **Garrity G.M. (2005).** The Proteobacteria - Part B: The Gammaproteobacteria. In 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'. (Springer: New York).
 - **Genthner F.J., Foss S.S. et Glas P.S. (2004).** Virulence of *Metarhizium anisopliae* to embryos of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*.
 - **Gershenzon J., Dudareva N. (2007)** The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol*, 3, 408–414.

- **Gurney R. (2012)** Biosynthesis of the antibiotic mupirocin by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. PhD thesis. University of Birmingham.
- **Haba E., Pinazo A., Jauregui O., Espuny M.J., Infante M.R., Manresa A. (2003)** Physicochemical Characterization and Antimicrobial Properties of Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIM 40044. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol: 81(3): 317-322.
- **Hammer P.E., Hill D.S., Lam S.T., van Pe' e K.H and Ligon J.M. (1997)**. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2147–2154.
- **Haynes W.C., Stodola F.H., Locke J.M., Pridham T.G., Conway H.F., Sohns V.E et Jackson R.W. (1956)**. *Pseudomonas aureofaciens* Kluyver and phenazine alpha-carboxylic acid, its characteristic pigment. *Journal of Bacteriology* 72:412-417.
- **Hazalin N.A, Ramasamy K., Meng Lim S.S, Abdul Wahab I., Cole A.L.J. and Abdul Majeed A.B. (2009)** Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. Vol : 09(46).
- **Hefter J., Richnow H.H., Fischer U., Trendel, J.M., Michaelis, W. (1993)** Verrucosan-2-beta-ol from the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*—1st report of a verrucosan-type diterpenoid from a prokaryote. *J. Gen. Microbiol*, 139, 2757–2761.
- **Hildebrand D.C., Schorth M.N Et Sand D.C.(1988)** *Pseudomonas* spp 60-77. In Shaad, N.W.E.D. Laboratory guide for identification of plant pathogène bactéria .2nd .ST. Pael. Minnosota. PPS.industriel des cadres.14p.
- **Hohmann S (2002)** Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol*, R 66:300–372.
- **Holt J.G. (1994)**. *Bergey's Manual of Determinate Bacteriology*.
- **Homann, V.V.; Sandy, M.; Tincu, J.A.; Templeton, A.S.; Tebo, B.M.; Butler, A. Loihichelins A F. (2009)** A suite of amphiphilic siderophores produced by the marine bacterium *Halomonas* LOB-5. *J. Nat. Prod*, 72, 884–888.
- **Hothersall J., Rahman A.S., Crosby J., Simpson T.J., Thomas C.M.J. (2005)**. *Biol. Chem.*, 280, 6399–6408.

- **Hotterbeekx A, Singh SK, Goossens H and Kumar SM, (2017)** In vivo and In vitro Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. *Frontiers in Cellular and Infection*.Vol: 7 (106):1-13.
- **Huang X., Zhu D., Ge Y., Hu H., Zhang X., et Xu Y. (2004).** Identification and characterization of *pltZ*, a gene involved in the repression of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 232:197–20.
- **Imlay JA. (2015)** Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. *Curr Opin Microbiol*, 24,124–131.
- **Islam M.T., et Fukushi Y. (2010).** Growth inhibition and excessive branching in *Aphanomyces cochlioides* induced by 2,4- diacetylphloroglucinol is linked to disruption of filamentous actin cytoskeleton in the hyphae. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:1163–1170.
- **ISO 21567 (2005)** Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche de *Shigella* spp.
- **Jacques BEJOT**, « GRAM COLORATION DE », *Encyclopædia Universalis* [en ligne], consulté le 6 juin 2021. URL : <https://www.universalis.fr/encyclopedie/coloration-de-gram/>
- **Jakeman D.L., Bandi S., Graham CL. (2009)** Antimicrobial activities of jadomycin B and structurally related analogues. *Antrimicrob Agents Ch* 53:1245–1247. doi:10.1128/AAC.00801-08.
- **Jin, B., Jeong, K. W., and Kim, Y. (2014)** Structure and flexibility of the thermophilic cold-shock protein of *Thermus aquaticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451, 402–407. doi: [10.1016/j.bbrc.2014.07.127](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.127).
- **Johnson B.N., Kennedy A.C., Ogg A.G. Jr. (1993).** Suppression of downy brome growth by a rhizobacterium in controlled environments. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 57:73-77.
- **Kai P., Bassler B.L. (2016).** Quorum sensing signal-response systems in gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 576–588.
- **Kapali S., Gade R. M., Shitole A. V And Aswathi S. (2016)** Isolation and Characterization of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and their in vitro Evaluation, *Advances in Life Sciences* 5(16), 5857.

- **Kay E., Humair B., Denervaud V., Riedel K., Spahr S., Eberl L., Valverde C et Haas D. (2006).** Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188: 6026–6033.
- **Kimura Y., Kawasaki S., Yoshimoto H., Takegawa K (2010)** Glycine betaine biosynthesized from glycine provides an osmolyte for cell growth and spore germination during osmotic stress in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol*, 192, 1467–1470.
- **King E.O., Ward M. Et Raney D.E.J. (1954)** *J. Lab. Clin. Méd*, 44, p. 301.
- **King J.V., Campbell J.R. et Eagles B.A. (1948)** The mineral requirements for fluorescein production. *Can. J. Res.*, 26, 514-519.
- **Kirner S., Hammer P.E., Hill D.S., Altmann A., Fischer I., Weislo L.J., Lanahan M., van Pée K.H et Ligon J.M.. (1998)** Functions encoded by Pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology* 180(7):1939-1943.
- **Kurachi M. (1958)** Studies on the biosynthesis of pyocyanin, isolation and determination of pyocyanine. *Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ.* 36, 163-173.
- **Lamont I.L., Beare P.A., Ochsner U., Vasil A.I et Vasil M.L. (2002).** Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 7072-7077.
- **Landini P., Egli T., Wolf J et Lacour S., (2014).** sigmaS, a major player in the response to environmental stresses in *Escherichia coli*: role, regulation and mechanisms of promoter recognition. *Environ. Microbiol. Rep.* 6, 1–13.
- **Larpentj.P.(1975)** *Mémento technique de microbiologie*.Ed : Perfectionnemnt.
- **Larsen J.B. et Nielsen J. (2004).** *Chem. Rev.* 104, 1663–1685.
- **Lau G.W., Ran H., Kong F., Hassett D.J. et Mavrodi D. (2004).** *Infect. Immun.* 72, 4275–4278.
- **Lee C., Wakeham S., et Arnosti C. (2004).** Particulate organic matter in the sea: the composition conundrum. *Ambio* 33, 565–575.
- **Lee J., Jeong K. W., Jin B., Ryu K. S., Kim E. H., Ahn, J. H. (2013)** Structural and dynamic features of cold-shock proteins of *Listeria monocytogenes*, psychrophilic bacterium. *Biochemistry*, 52, 2492–2504. [doi: 10.1021/bi301641b](https://doi.org/10.1021/bi301641b)
- **Lepoivre P. (2003)** *Phytopathologie* : De Boeck.Ed. 482p.

- **Loison P. (2013)** Etude de la spore de *Bacillus subtilis* : caractérisation des structures impliquées dans sa résistance : Université de Bourgogne.
- **Loper J.E. (2009).** Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. This journal is The Royal Society of Chemistry. Nat. Prod, 26, 1408–1446 | 1435.
- **Makrand R., Prashant D.S., Bhushan L., Sudhir B. (2007)** Detection, isolation and identification of phenazine -1-carboxylic acid produced by biocontrol strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J.scientific and Industrial Res 66: 627-631. 16.
- **Maksem A. (2010).** Etudes structurales et fonctionnelles des récepteurs TonB-dépendant de bactéries à Gram-négatif. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Strasbourg, Discipline : Science du vivant Spécialité : Aspects Cellulaires et Moléculaires de la Biologie. Pp : 14-79.
- **Martinez J. S., Zhang C.P., Hott, P.D., Jung, H.T., Carrano C.J., Haygood M.G et Butler A. (2000).** Self-assembling amphiphilic siderophores from marine bacteria. Science, 287, 1245-1247.
- **Martínez-Bueno M., Gálvez A., Valdivia E., Maqueda M. (1990)** A transferable plasmid associated with AS-48 production in *Enterococcus faecalis*. J Bacteriol 172, 2817–2818.
- **Marty-Teyssset C., De La Torre F., Garel J.R. (2000)** Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Appl Microbiol Biotechnol bulgaricus* upon aeration: involvement of an NADH oxidase in oxidative stress. *Appl Environ Microbiol* 66:262–267.
- **McDonald M., Mavrodi D.V., Thomashow L.S., et Floss H.G. (2001).** Phenazine Biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: Branchpoint from the Primary Shikimate Biosynthetic Pathway and Role of Phenazine-1,6-dicarboxylic Acid. J. Am. Chem. Soc. 123, 9459-9460.
- **McGowan S, Sebahia M, Jones S, Yu B, Bainton N, Chan PF, Bycroft B, Stewart GS, Williams P, Salmond GP. (1995)** Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator. *Microbiol–SGM*, 141, 541–550.
- **McSpadden Gardener B.B et Fravel D.R. (2002).** Biological control of plant pathogens: Research, commercialization and application in the USA Online. *Plant Health Progress*, 10 : 1994.

- **Mercado-Blanco J. (2015).** Pseudomonas Strains that Exert Biocontrol of Plant Pathogens. Springer, USA.
- **Meyer J.M. (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 et Budzikiewicz H. (2008).** Siderotyping of fluorescent Pseudomonas: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. Biometals, 21 : 259-271.
- **Mohammad AA et Éric D. (2013).** La production des rhamnolipides chez Pseudomonas aeruginosa est en corrélation avec le type d'activité nette intracellulaire enoyl-CoA hydratase In: 8ème édition Congrès Armand-Frappier, 14-16 Novembre 2013, Orford, Canada.
- **Molloy D.P., Mayer D.A., Gaylo L.E., Karatayev A.Y., Presti K.T., Sawyko P.M., Morse J.T et Paul E.A. (2013) a.** Non-target trials with Pseudomonas fluorescens strain CL145A, a lethal control agent of dreissenid mussels (Bivalvia: Dreissenidae). Management of Biological Invasion 4:71-79.
- **Molloy D.P., Mayer D.A., Gaylo M.J., Morse J.T., Presti K.T., Sawyko P.M., Karatayev A.Y., Burlakova L.E., Laruelle F et Nishikawa K.C. (2013) b.** Pseudomonas fluorescens strain CL145A – A biopesticide for the control of zebra and quagga mussels (Bivalvia: Dreissenidae). J. Invertebr. Pathol. 113:104-114.
- **Nair S., and Finkel S.E. (2004)** Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. J Bacteriol 186,4192–4198.
- **Nicolaou S.A., Gaida S.M., Papoutsakis E.T. (2010)** A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: from biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation. Metab Eng ,12, 307–331.
- **Nowak-Thompson B., Gould S.J., et Loper J.E. (1997)** Identification and sequence analysis of the genes encoding a polyketide synthase required for pyoluteorin biosynthesis in Pseudomonas fluorescens Pf-5. Gene 204:17– 24.
- **Onbasli D and Aslim B. (2008)** Determination of antimicrobial activity and production of some metabolites by Pseudomonas aeruginosa B1 and B2 in sugar beet molasses. African Journal of Biotechnology. Vol: 7 (24):4614-4619.

- **Özyürek S.B., Gür S.D et Bilkay IS. (2016)** Investigation of Antimicrobial Activity of Pyocyanin Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Different Clinical Specimens. Hacettepe J. Bio. And Chem. Vol: 44(1):1-6.
- **Palleroni N.J. (2005)** Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, 237AL (Nom. Cons., Opin. 5 of the Jud. Comm. 1952, 121). In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2 The Proteobacteria. The Gammaproteobacteria, Brenner, D.J., Krief, N.R., Staley, J.T. (éd.), New York: Springer, p. 323-373.
- **Palleroni N.J.(1984)** .Genus I. *Pseudomonas*Migula 237 AL (n. m. cons. opin. 51. Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl Microbiol Biotechnol 53: 495-508.
- **Pamplona R., Barja G., Portero-Otin M. (2002)** Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span. Ann N Y Acad Sci 959:475–490.
- **Paradkar A., Trefzer A., Chakraborty R., Stassi D. (2003)** Streptomyces genetics: a genomic perspective. Crit Rev Biotechnol 23, 1–27.
- **Paulsen I.T., Press C.M., Ravel J., Kobayashi D.Y., Myers G.S.A., Mavrodi D.V., DeBoy R.T., Seshadri R., Ren Q et Madupu R. (2005).** Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Nat. Biotechnol. 23:873-878.
- **Péchy-Tarr M., Bottiglieri M., Mathys S., Lejbølle K.B., Schnider Keel U., Maurhofer M., et Keel C. (2005).** RpoN (σ_{54}) controls production of antifungal compounds and biocontrol activity in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Mol. Plant-Microbe Interact. 18:260-272.
- **Phadtare, S. (2004).** Recent developments in bacterial cold-shock response. Curr. Issues Mol. Biol, 6, 125–136.
- **Piepersberg W., Distler J. (1997)** Aminoglycosides and sugar components in other secondary metabolites. In: Rehm HJ, Reed G (Geneds.); Kleinkauf H, von Döhren H. (Vol eds Biotechnology, 2nd edition vol 7 Products of Secondary Metabolism, pp. 397–488.
- **Prabhakaran P., Puthumana J., Correya N.S., Balachandran S., Sudheer N., Philip R., Sarogeni B.S. (2014)** Antagonistic effect of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from various ecological niches on *Vibrio* species pathogenic to crustaceans. Journal of Coastal Life Medicine 2(1): 76-84.

- **Prescott L.M., Woolverton C., Willey J., Klein D.A., Harley J.P., Sherwood .L.(2010)** Microbiologie 3ème Édition, Ed De Boeck Supérieur, pp. 132-142.
- **Pushpanathan M., Pandian R.S. (2008).** Management of dengue and chikungunya vectors *Aedes aegypti* (Linn) and *Aedes albopictus* (Skuse) (*Diptera: Culicidae*) by the exotoxin of *Pseudomonas fluorescens* Migula (*Pseudomonadales: Pseudomonadaceae*). *Current Biotica* 2:74-103.
- **Rastogi, R.P., Sinha, R.P. (2009)** Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnol. Adv*, 27, 521–539.
- **Roussel-Delif L., Tarnawski S., Hamelin J., Philippot L., Aragno M Et Fromin N. (2005)** Frequency and diversity of nitrate reductase genes among nitrate dissimilating *Pseudomonas* in the rhizosphere of perennial grasses grown in field conditions. *Microb. Ecol.* 49, 63-72.
- **Roy N., Bhattacharyya P et Chakrabarty,P. (1994).** Iron acquisition during growth in an iron deficient medium by *Rhizobium* sp. isolated from *Cicer arietium*. *Microbiology*, 140, 2811-2820.
- **Schaefer A.L., Val D.L., Hanzelka, B.L., Cronan Jr et Greenberg E.P. (1996).** Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9505–9509.
- **Schulz S.; Dickschat J.S. (2007)** Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat. Prod. Rep*, 24, 814–842.
- **Selvin J., Shanmughapriya S., Gandhimathi R., Seghal-Kiran G., Rajeetha R.T., Natarajaseenivasan K and Hema T.A., (2009).** Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardioopsis dassonvillei* MAD08. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol: 83, 435-445.
- **Silby M., Cerdano-Tarraga A., Vernikos G., Giddens S., Jackson R., Preston G., Zhang X., Moon C., Gehrig S et Godfrey S. (2009).** Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biol.* 10:R51.
- **Sinsabaugh R. L. (1994).** Enzymic analysis of microbial pattern and process. *Biol. Fertil. Soils* 17, 69–74. doi: 10.1007/BF00418675.

- **Soberon-Chavez G., Lepine F et Deziel E. (2005).** Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol Biotechnol. 9 th Edition. TheWilliams & Wilkins Co., Baltimore68: 718-72.
- **Stanier R.Y., Palleroni N.J. and Doudoroff M. (1966).** The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. J. Gen. Microbiol. 43, 159-271.
- **Sterner R. W et Elser J.J. (2002).** Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- **Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrenner P., Hickey M.J., Brinkman F.S., Hufnagle W.O., Kowalik D.J., Lagrou M., Garber R.L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L.L., Coulter S.N., Folger K.R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G.K., Wu Z., Paulsen I.T., Reizer J., Saier M.H., Hancock R.E., Lory S., Olson M.V. (2000)** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. Nature;406 (6799)959-64
- **Sudhakar T., Karpagam S. and Premkumar J. (2015)** Biosynthesis, antibacterial activity of pyocyanin pigment produced by *Pseudomonas aeruginosa* SU1. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. Vol: 7(3):921-924.
- **Sulkin ., Willet et Hajna. (1940)** URL : Gélose TSI | Principe | Composition | Interpretation (microbiologie-clinique.com)
- **Takano H., Obitsu S., Beppu T., Ueda K. (2005)** Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. J Bacteriol, 187, 1825–1832. [doi:10.1128 /JB.187.5.1825-1832.2005](https://doi.org/10.1128/JB.187.5.1825-1832.2005)
- **Talon D., Thouverez M et Bertrand X. (2006).** Role des *Pseudomonas* et apparentés dans
- **Tanga R., Zhua J., Fenga L., Lib J et Liu X .(2019).** Characterization of LuxI/LuxR and their regulation involved in biofilm formation and stress resistance in fish spoilers *Pseudomonas fluorescens*. International Journal of Food Microbiology. 297 : 60-71.
- **Tempest D. W., Neijse! O. M. (1981)** Basic Life Sciences, ed. A. Hollaender, 18, 335-56. New York: Plenum
- **Thomashow L.S., Weller D. M., Bonsall R.F., et Pierson L.S. (1990).** Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. Applied and Environmental Microbiology 56:908-912.

- **Tripathi R. K et Gottlieb D. (1969).** Mechanism of action of the antifungal antibiotic pyrrolnitrin. *Journal of Bacteriology* 100:310–318.
- **Troppens D.M., Jennifer A., Barret M.M., Fergal O., Morrissey J. P. (2013).** *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere, Volume 2, First Edition.* Edited by Frans J. de Bruijn. Inc. Published 2013 by John Wiley & Sons, Chapter 56, p 595.
- **Vacheron J., Moenne-Loccoz Y., Dubost A., Gonc Calves Martins M., Muller D., and Prigent-Combaret C. (2016)** Fluorescent *Pseudomonas* Strains with only few plantbeneficial properties are favored in the maize rhizosphere. *Front Plant Sci* 7: 1–13.
- **Wai S.N., Mizunoe Y., Yoshida S. (1999)** How *Vibrio cholerae* survive during starvation. *FEMS Microbiol. Lett*, 180, 123–131
- **Waites M.W., Rajmohan S., Dodd E.R. (2002).** *Journal of applied microbiology.* 93(2) :205-13. Source: PubMed.
- **Wang R., Mast Y., Wang J. (2012)** Identification of twocomponent system AfsQ1/Q2 regulon and its cross-regulation with GlnR in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 87:30–48. doi:10.1111/mmi.12080
- **Wang Y., Wilks J.C., Danhorn T., Ramos I., Croal L et Newman D.K. (2011).** Phenazine-1- carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition. *J Bacteriol* 193, 3606-3617.
- **Welch W. (1993)** How cells respond to stress. *Sci. Am*, 268,34–41.
- **Wu C, Zhang J, Wang M, Du G, Chen J (2012)** *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality. *J Ind Microbiol Biot*, 39, 1031–1039.
- **Yang K., Han L., He J. (2001)** A repressor-response regulator gene pair controlling jadomycin B production in *Streptomyces venezuelae* ISP5230. *Gene* 279:165–173
- **Zhang L., Tian X., Kuang S.H., Liu G., Zhang C.H and Sun C.H. (2017).** Antagonistic Activity and Mode of Action of Phenazine-1-Carboxylic Acid, Produced by Marine Bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA31x, Against *Vibrio anguillarum* In vitro and in a Zebrafish In vivo Model. *Frontiers in Microbiology.* Vol: 8 (289) :1-9.
- **Zulianello L., Canard C., Khöler T., Caille D., Lacroix JS et Meda P. (2006).** Rhamnolipids Are Virulence Factors That Promote Early Infiltration of Primary Human Airway Epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection And Immunity.* Vol : 74 (6) :3134-3147.

Annexe :

Composition des milieux utilisés :

Gélose nutritive (g/l)	Milieu King B solide (g/l)
Peptone.....10g Extrait de levure.....3g Extrait de viande.....3g Le chlorure de sodium.....5g Agar.....15 g pH = 7.4	Peptone de caséine20 g Sulfate de magnésium1,5 g Phosphate bi-potassique.....1,5 g Glycérol10 ml Agar20 g pH =7,2
Milieu King A solide (g/l)	Milieu Muller-Hinton solide (g/l)
Peptone.....10g Glucose5g Sulfate de potassium5g Chlorure de magnésium.....0,79g pH = 7,4	Extrait de viande:3g Peptone de caséine:..... 17,5 g Amidon:1,5 g Agar:16 g pH = 7,4
Bouillon Muller Hinton (g/l)	Bouillon nutritif (g/l)
Extrait de viande:3g Peptone de caséine:..... 17,5 g Amidon:1,5 g pH = 7,4	Peptone.....10g Extrait de levure.....3g Extrait de viande.....3g Le chlorure de sodium.....5g pH = 7.4
Milieu Chapman (g/l)	Sabouraud au chloramphénicol solide (g/l)
Composition : Peptone..... 10 g Extrait de viande.....0,1 g Chlorure de sodium.....75 g Mannitol.....10 g Agar.....15 g Rouge de phénol0.025g pH = 7.4	Peptone pepsique de viande.....10,0 Glucose20,0 Chloramphénicol 0,05. Agar5,0. pH à 25°C : 5,7 ± 0,2