

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



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BENMERIEME Saliha

MEHANNECHE Dhehbiya

Pour l'obtention du diplôme de

Master en biologie

Spécialité : BIOTECHNOLOGIE DES MICROORGANISMES

THÈME

**Effet de la salinité sur la production de la pyocyanine
et pyoverdine et recherche de leurs effets sur quelques
germes pathogènes.**

Soutenue publiquement le / / 2016

DEVANT LE JURY

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

Thème réalisé au Laboratoire de microbiologie, université de Mostaganem

Remerciements

Nous exprimons tout d'abord, nos profonds remerciements à DIEU tout puissant, qui nous guide sur le droit chemin et nous donne le courage et la volonté d'achever ce travail de recherche qui est le résultat d'un stage effectué au sein de laboratoire de microbiologie à l'université d'Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements et nos très vives reconnaissances à Mr. DJIBAOUI. R pour la confiance qu'il nous accordé en acceptant de nous encadrer ; pour sa rigueur et pour son enthousiasme.

Nous voudrions aussi témoigner de notre reconnaissance à tous ceux qui ont offert leurs collaborations professionnelles entant que membre de jury :

Mr. MEKHALDLAEK, qui nos ont fait l'honneur de présider ce jury.

Mr. NEMMICHE.S, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous adressons un grand merci à Mr. DAHAH.H pour leur patience leur aide et leur conseils

Nous remercions très respectivement tous les techniciens de laboratoire à l'université de Mostaganem



Dédicace

*Je dédie cet humble travail A
ALLAH le tout puissant à qui je dois tout.*

*Mes très chers parents
Pour leur amour, leurs encouragements et
soutien sans faille Je les remercie de m'avoir
accompagnée tout au long de mon
parcours*

A Mes frères et sœurs, Mes oncles, mes tantes

*A Mon marie pour leur aide et
encouragement*

*A Tous mes camarades de promotion :
Hassiba, Souad, Amina, Amina*

A Mon binôme Mehanneche Dhahbia

A toute personne qui me connais

Saliha



Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents.

A mon mari.

A ma famille :

MEHANNECHE et DJELLALI.

A mon binôme SALIHA.

A toutes mes amies.

Dhahbia

Résumé :

Pseudomonas aeruginosa est largement répandu dans l'environnement. C'est une bactérie ubiquitaire qui peut vivre à l'état saprophyte dans l'eau, le sol, les végétaux, les solutions antiseptiques et sur des surfaces inorganiques. Cette souche est douée d'une forte activité antimicrobienne contre les microorganismes pathogènes. Afin d'exploiter cette propriété, deux métabolites sécrétés par cette souche sont mis en évidence (la pyocyanine et la pyoverdine). Ces substances actives ont été extraites par le milieu King A et B liquide, chloroforme et méthanol. Les substances obtenues ont été testées sur des microorganismes pathogènes. Les résultats obtenus par la méthode des disques montrent une activité antibactérienne et antifongique vis-à-vis de l'ensemble des souches pathogènes testées. L'étude de variation de composition de milieu et de température sur leurs productions a révélé une corrélation proportionnelle entre l'augmentation de la sécrétion et la salinité du milieu. La meilleure production a été détectée dans des cultures de King A et B liquide contenant 12,5 g/l et 15g/l de NaCl à raison de 51.2 mg/ml et 56.16 mg/ml à une température d'incubation de 30°C pour la pyocyanine et la pyoverdine respectivement.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa* ; activité antimicrobienne ; pyocyanine, pyoverdine ; salinité.

Liste des figures

Figure N°1 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vue au microscope électronique.....	02
Figure N°2 : Le génome de de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	05
Figure N°3 : catabolisme des hexoses et des polyols chez les <i>pseudomonas</i> spp fluorescents saprophyte à oxydase positive.....	13
Figure N°4 : catabolisme des acides organiques et des acides aminés chez les <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents saprophyte à oxydase positive.....	15
Figure N°5 : Les principaux antibiotiques produits par les souches de biocontrôle jouent un rôle central entre les éléments impliqués dans les interactions: <i>Pseudomonas</i> de biocontrôle, plantes, pathogènes, prédateurs, coopérateurs et sol.....	21
Figure N°6 : structure de la pyoverdine.....	27
Figure N°7 : zones d'ihnhibition de l'activité antagoniste de la souche PA1.....	33
Figure N°8 : Activité antagoniste de la souche PA1 vis-à-vis les souches tests.....	34
Figure N° 9 : Effet de l'extrait brut (pyocyanine) sur les souches testées.....	35
Figure N°10 : l'effet de l'extrait brut (pyocyanine) sur les souches testées.....	36
Figure N°11 : Effet inhibiteur de l'extrait brut (pyoverdine) sur les souches pathogènes testées.....	37
Figure N° 12 : Effet de l'extrait dilué sur les souches 1,2, 3, 4, 5 et 6.....	38
Figure N°13 : production de la pyocyanine sur milieu king A liquid à 28°C.....	39
Figure N°14 Effet du NaCl sur la production de pyocyanine à température de 28 °C.....	40
Figure N°15 : Effet du NaCl sur la production de pyocyanine à température 30 °C.....	41
Figure N°16 : Effet du NaCl sur la production de pyocyanine à température 37 °C.....	42
Figure N°17 : Effet du NaCl sur la production de pyoverdine à température 28 °C.....	44
Figure N°18 : Effet du NaCl sur la production de pyoverdine à température 30 °C.....	45

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Les espèces appartenant actuellement au genre <i>Pseudomonas</i>	07
Tableau N°2 : caractéristique des principaux <i>pseudomonas</i>	19
Tableau N°3 : Principaux antibiotiques sécrétées par les <i>Pseudomonas</i> fluorescents.....	22
Tableau N°4 : Zone d'ihnhibition de l'avtivité antagoniste in vitro (en mm).....	33
Tableau N°5 : l'effet inhibiteur de l'extrait la pyocyanine sur les pathogènes testées.....	35
Tableau N° 6 : l'effet inhibiteur de l'extrait pur (pyoverdine) sur les souches teste.....	37
Tableau N°7 : L'effet de la salinité sur la production de pyocyanine à 28 °C.....	39
Tableau N°8 : L'effet de la salinité sur la production de pyocyanine à 30 °C.....	41
Tableau N°9 : L'effet de la salinité sur la production de pyocyanine à 37 °C.....	42
Tableau N°10 : L'effet de la salinité sur la production de pyoverdine à 28 °C	43
Tableau N°11 : L'effet de la salinité sur la production de pyoverdine à 30 °C	44

Liste des abréviations

ACC désaminase : 1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate désaminase

ADH : Arginine déshydrogénase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

AIA : Acide Indole-3-acétique

APC : Acide phénazine-1-carboxylique

ARN Acide ribonucléique

ARN r : Acide ribonucléique rébosomique

ATPase : adénosine tri-phosphate.

APC : Acide phénazine-1-carboxylique

°C : Degrés Celsius

C: cytosine

Cl : Chlore

CO₂ : Dioxyde de Carbone

E.P.S : Exopolysacharides

F ADH₂ : **Flavine adénine dinucléotide dihydrogène**

Fe²⁺ : Ion fer II

G : guanine

g : Gramme

HCN : l'acide cyanhydrique

LDC : Lysine décarboxylase.

MH: Gélose Muller Hilton

mM : Milimole

ml : Millilitre

mV : millivolt

mg : milligramme

N₂: diazote

Na : Sodium

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NH₃: Ammonium

NO: Oxyde Nitrique

NO₂⁻: Ion nitrite

NO₃⁻: Ion nitrate

O₂: Dioxyde

P. fluorescens : pseudomonas fluorescens

Pch : pyochéline

PCA : Acide phénazine-1-carboxylique

PCN : phénazine-1-carboxamide

PEP: phosphoenolpyruvate

PGPR : plant growth promoting rhizobactéria

Phz : phénazine

Pi: phosphore organique

PLT : Pyolutéorine

PRN : pyrrolnitrine.

Pvd : pyoverdine

PYO : pyocyanine

μg : Microgramme

SCVs : Small-colony variants

SOD : superoxyde dismutase

μM : micromole

μ : Vitesse de croissance instantanée ou taux de croissance

UV: Ultraviolets

$\mu\text{ m}$: micromètre

Sommaire

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

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Classification de l'espèce des Pseudomonas

1. Caractéristiques des <i>Pseudomonas</i>	1
1.1. Caractéristiques morphologiques et culturaux.....	1
1.2. Caractéristiques biochimiques	1
1.3. Caractéristiques métabolique.....	2
1.4. Caractéristique Taxonomique.....	3
2. Les génomes des <i>Pseudomonas</i>	3
3. Classification des <i>Pseudomonas</i>	5
4. Distribution écologique et rôle biologique de <i>Pseudomonas</i>	7
5. Place taxonomiques de la complexe <i>P. aeruginosa-Fluorescens</i>	8
6. Pouvoir pathogène.....	8

Chapitre II : Métabolisme des Pseudomonas

1. Métabolisme des <i>Pseudomonas</i>	10
2. Voies respiratoires.....	10
2.1. Respiration sur oxygène.....	11
2.2. Respiration sur nitrate et dénitrification dissimulatrice.....	11
3. Catabolisme des composés organiques simples.....	11
3.1. Catabolisme des sucres et composés dérivés.....	11
3.2. Catabolisme du glucose.....	12
3.3. Catabolisme des autres monosaccharides.....	13
3.4. Catabolisme des disaccharides.....	14
4. Catabolisme des acides organiques.....	14
4.1. Catabolisme des acides gras.....	14

4.2. Catabolisme des acides dicarboxyliques.....	15
4.3. Catabolisme des acides aromatiques.....	16
4.4. Catabolisme des acides aminés.....	16
4.4.1. Catabolisme des acides aminés à chaîne latérale apolaire	16
4.4.2. Catabolisme des acides aminés à chaîne latérale aromatique.....	16
4.4.3. Catabolisme des acides aminés à chaîne latérale basique.....	17
5. Oxydation des xénobiotiques	17
6. Hydrolyse de l'arginine.....	18
7. Condition de croissance des <i>Pseudomonas</i>	18
8. Production des exopolysaccharides.....	20
9. Production des pigments	20
10. Milieux favorisant la synthèse de pigments	20

Chapitre III : antagonisme et substances produites par Pseudomonas

1. Mécanismes d'antagonisme.....	21
1.1. Antibiose.....	21
1.1.1. Les phénazines.....	22
1.1.1. La pyocyanine (PYO).....	23
• L'effet antimicrobien de la pyocyanin.....	23
1.1.1. Phloroglucinols.....	24
1.1.2. Pyrolnitrine (PRN).....	24
1.1.3. Pyolutéorine (PLT).....	25
1.1.1. Mupirocine.....	25
1.1.4. Antibiotiques peptidique.....	25
1.1.5. Enzymes dégradant les parois fongiques.....	26
1.2. Les sidérophores de <i>P.aeruginosa</i>	26
• Pyoverdines.....	26
1.4. L'acide cyanhydrique (HCN).....	27
1.5. Effets de la salinité sur les <i>Pseudomonas</i>	27

Partie II : Etude expérimentale

Matériels et méthode

1. L'obtention des souches.....	28
1.1. L'obtention des souches de références (souches tests).....	28
1.2. L'obtention des souches antagonistes	28

1.3. Purification et conservation des souches.....	28
1.4. Test d'antagonisme <i>in vitro</i>	29
2. Production et extraction de substances antimicrobiennes.....	29
2.1. Production de la pyocyanine par l'utilisation du milieu kingA.....	29
3. L'effet antimicrobien de la pyocyanine sur les souches pathogènes testées.....	29
3.1. Préparation de l'inoculum bactérienne	29
3.2. Préparation de la solution d'antibiotique à partir des deux extraits bruts.....	30
3.3. Préparation des disques.....	30
3.4. L'application de la méthode de diffusion.....	30
4. Effet de la salinité et de température sur la production de la pyocyanine.....	30
4.1. Effet de la salinité.....	30
4.2. Effet de la température	30
4.3. Dosage de la pyocyanine.....	31
5. Production, extraction et caractérisation de la pyoverdine.....	31
5.1. L'extraction de la pyoverdine.....	31
6. Effet de la salinité et de température sur la production de la pyoverdine.....	31
6.1. Effet de la salinité.....	31
6.2. Effet de la température.....	32
6.3. La quantification de la pyoverdine.....	32

Résultat et discussion

1. Sélection des <i>Pseudomonas</i> à pouvoir antagoniste	33
2. Activité de souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
3. L'extraction de la pyocyanine	34
3.1. L'activité antimicrobienne et antifongique de l'extrait de la pyocyanine	34
4. L'extraction de pyoverdine	36
4.1. L'activité antimicrobienne et antifongique de l'extrait brut de la pyoverdine	36
5. Effet de la salinité et de température sur la production de la pyocyanine.....	39
6. Effet de la salinité et de température sur la production de la pyoverdine.....	43

Conclusion

Référence bibliographique

Annexe

Introduction

Introduction

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie Gram négatif, aérobie stricte, sous forme de bâtonnet appartenant à la famille des Pseudomonaceae. Elle est largement répandue dans l'environnement par sa capacité de se développer dans le sol, les eaux douces et marines (Palleroni *et al.*, 1973). Le métabolisme de *P. aeruginosa* des diverses niches écologiques est contrôlé par le degré de salinité et des facteurs environnementaux. Son activité antagoniste est due principalement à la sécrétion de deux métabolites majoritaires qui sont la pyocyanine et la pyoverdine. Cette bactérie est également connue par le contrôle des agents phytopathogènes dans les sols salins. (Prabhakaran *et al.*, 2014).

Ces deux métabolites ont fait l'objet de plusieurs études scientifiques pour ses propriétés antifongiques à large spectre contre les champignons (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *phytium* et *Fusariumoxysporum*) et une forte activité antibactérienne contre *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (Costa et Cusmanae 1975; Kerr *et al.*; 1999 ; Gould *et al.* 2008).

L'activité antimicrobienne de la pyocyanine est due essentiellement à sa capacité de régénérer un excès d'O₂⁻ et H₂O₂ inhibant le processus d'énergie et le transport actif des autres microorganismes. Cependant, *Pseudomonas aeruginosa* peut se protéger contre la toxicité de ce métabolite « pyocyanine » par la sécrétion d'une grande quantité de superoxydedismutase et de catalase (Prix-Whelan *et al.*, 2007).

Le contrôle des microorganismes néfastes par les sidérophores s'effectue par le biais de la détention du fer en complexe sidérophore-fer, assimilable uniquement par un organisme possédant les récepteurs spécifiques au complexe. Ceci permet la croissance du *Pseudomonas*, inoffensif pour les plantes avoisinantes, et exclut d'autres organismes dans le milieu.

Dans ce travail Nous avons fixé comme objectif , d'étudier l'effet antagoniste de *Pseudomonas aeruginosa* sur 4 bactéries et 2 levures (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans*, *Bacillus cereus* ATCC10876, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Salmonella*). En second lieu, Nous avons étudié l'effet de la salinité et de température sur la production de la pyocyanine et la pyoverdine ; et nous avons aussi procédé à l'extraction de ces deux métabolites et à la détermination de leurs activité antimicrobienne et antifongique.

PARTIE I

Etude Bibliographique

CHAPITR I

Classification de l'espèce de *Pseudomonas*

1. Caractéristiques des *Pseudomonas*

1.1. Caractéristiques morphologiques et culturaux

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 (ou plus) de longueur, non sporulés. Ces bactéries sont généralement mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires. (Figure 1). (Garrity, 2005). La culture de ces bactérie est facile avec ou sans production de pigments, sur des milieux minéraux synthétiques avec une source simple de carbone : acétate, pyruvate et des milieux sélectifs à base de Cétrimide que l'on peut additionner d'acide nalidixique. Les colonies de *P. aeruginosa* sont polymorphes, soit large avec une partie centrale bombée et un contour irrégulier (oeufs sur le plat), soit des petites colonies mates légèrement bombées avec un bord circulaire régulier, des colonies muqueuses bombées, opaques, visqueuses parfois coulantes. (Avril et *al.*, 2000).

Le genre *Pseudomonas* comprend des espèces fluorescentes produisant des pigments spécifiques. Les deux pigments les plus fréquents et caractéristiques sont la pyocyanine et la pyoverdine qui sont solubles dans les milieux de culture. Les espèces pigmentées sont par exemple : *P. aeruginosa* (*P.a*) produit les deux pigments, mais pouvant être perdus par mutation. *P. fluorescens*, *P.putida*, *P.syringae*, et *P. cichorii* produisent de la pyoverdine et *P. aureofaciens* : produit un pigment jaune orange ou pourpre. Certaines souches sont apigmentées tel que *P. alcaligenes*, *P. stutzeri*. (Martin, 2007).

1.2. Caractéristiques biochimiques

Les espèces de *Pseudomonas* sont des bactéries chimio-organotrophes avec un métabolisme strictement respiratoire, qui utilisent l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons en aérobiose. Elles sont oxydase positive, pour certaines espèces elles réduisent le nitrate en anaérobiose avec synthèse d'une nitrate-réductase. Elles sont aussi caractérisées par la diversité des substrats hydrocarbonés utilisés comme source de carbone et d'énergie (avril et *al.*, 2000). *Pseudomonas aeruginosa* dégage une odeur aromatique caractéristique de seringa due à la production d'ortho-amino-acétophénone, intermédiaire du métabolisme du tryptophane et non liée à la production de pigment, il hydrolyse aussi la gélatine et la lécithine (Avril et *al.*, 2000).

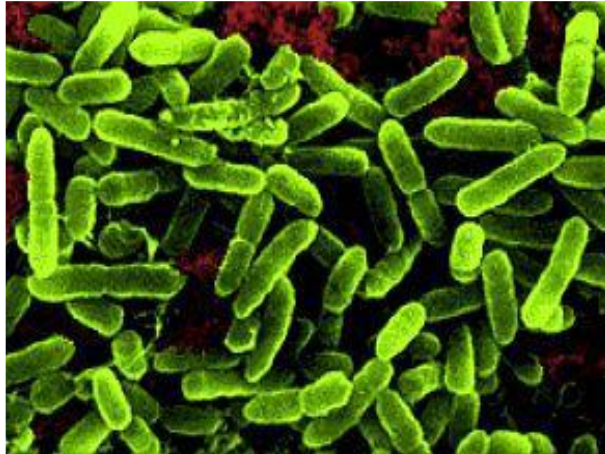


Figure 1 : *Pseudomonas aeruginosa* vue au microscope électronique (Cheryl A. Nickerson http://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/experiments/Microbe.html)

1.3. Caractéristiques métabolique

Le genre *Pseudomonas* est caractérisé par un métabolisme oxydatif et non fermentatif, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons, et même quelques souches utilisent la dénitrification (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons ce qui permet une croissance en anaérobiose).

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents saprophytes possèdent tous une cytochrome oxydase c ayant un maximum d'absorption caractéristique à 552/554 nm, qui peut être mise en évidence par l'oxalate de N, N-diméthyl-paraphénylène-diamine (Lelliot *et al.*, 1966). Elles sont aussi catalase positive, mésophile chimio-organotrophe puisqu'elles peuvent croître dans un milieu minéral ne contenant qu'une seule source de carbone.

Les températures cardinales aux quelles les espèces se multiplient varient de 4° à 42°C, cette dernière est caractéristique de l'espèce *P. aeruginosa*, alors que la température optimale pour la croissance des espèces saprophytes est située entre 28°C et 30°C. Toutes les espèces de ce genre ne peuvent croître à pH inférieur à 4,5, ni métaboliser le lactose sur Mc Conkey, l'examen au rouge de méthyle et celui de Voges Proskauer sont négatifs (Palleroni, 1984).

1.4. Caractéristique Taxonomique

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

La taxonomie du genre s'améliora avec l'avènement des manipulations ADN-ADN pour détecter des similarités dans la séquence de deux organismes. Un peu plus tard, les résultats peuvent être confirmés par la procédure de cartographie S1-nucléase. (Johnson, *et al.*, 1989). Ces deux techniques ont contribué à compliquer la classification, puisque plusieurs résultats n'étaient pas en accord avec les groupes phénotypiques préalablement établis. La grande hétérogénéité du génome des groupes suggérait un besoin urgent d'une révision exhaustive des groupements. La classification actuelle dépend d'études d'hybridation d'ADN-ARN ribosomal, qui sépare maintenant le genre en cinq groupes distincts. (Palleroni, *et al.*, 1973).

Le nom *Pseudomonas* est maintenant réservé au groupe ARNr 1 qui inclut l'espèce type *Pseudomonas aeruginosa*. Les membres de ce groupe sont également classés selon des comparaisons des séquences des gènes *gyrB* et *rpoD*, ce qui a permis la création de deux regroupements nommés IGC I et ICG II. (Yamamoto, *et al.*, 2000).

Le premier ensemble, soit IGC I, regroupe des *Pseudomonas* fluorescents et non fluorescents incluant *P. aeruginosa*. Le second regroupement, IGC II, contient uniquement des *Pseudomonas* fluorescents incluant *P. fluorescens*. Cette dernière espèce est encore sous-divisée en trois complexes, soit *P. putida*, *P. syringae* et *P. fluorescens*. Le complexe *P. fluorescens* est ensuite séparé en quatre biotypes (A, B, C et G), qui sont assez distincts du type *Pseudomonas chlororaphis*. (Bergey, *et al.*, 1923 ; Stanier, *et al.*, 1966).

2. Les génomes des *Pseudomonas*

Les gènes ribosomaux sont présents chez tous les organismes, et possèdent la même fonction vitale : la synthèse protéique. Ces caractéristiques font des ribosomes d'excellents candidats d'études pour les taxonomistes. En effet ces molécules possèdent un niveau

d'évolution assez élevé pour assurer une variabilité entre les différentes espèces ; mais avec un degré de conservation suffisant pour assurer que ces différences correspondent à des catégories taxonomiques stables comme les genres et les espèces. Parmi tout les ARN ribosomiaux seul le gène ARNr16S remplit ces deux caractéristiques (Peix *et al.*, 2009). C'est pour cela que le gène ARNr16S est devenu la molécule clé sur laquelle est basée la classification des procaryotes, incluant celle des *Pseudomonas* (Anzai *et al.*, 2000; Palleroni, 2005).

En effet, la discrimination entre des espèces très proches de *Pseudomonas* est obtenue par l'analyse du gène *rpoB*. L'arbre phylogénétique obtenu avec ce gène donne une résolution 3 fois plus importante que celui obtenu avec le gène ARNr16S (Ait-Tayeb *et al.*, 2005). Et pourtant c'est le gène ARNr16S, qui a permis la différenciation des sous espèces de *P. chlororaphis* (Peix *et al.*, 2007). Cependant, l'analyse des gènes de ménage n'est pas communément utilisée dans la description des espèces de *Pseudomonas*. Et seulement, la description des gènes *rpoD*, *gyrB*, *rpoB* a été incluse dans des descriptions récentes de *Pseudomonas*: chez *P. xiamenensis* (Lai et Shao, 2008), chez 107 espèces de référence de *Pseudomonas* (Mulet *et al.*, 2010), et chez *P. syringae*, *P. fluorescens* et *P. chlororaphis* (Ramette *et al.*, 2011).

Des protocoles spécifiques utilisant des amorces universelles, ont été désigné pour analyser cette séquence chez les *Pseudomonas* environnementaux (Locatelli *et al.*, 2002). Une méthode prometteuse pour l'identification des microorganismes, et qui peut analyser jusqu'à 300 échantillons en une seule fois est le MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry), par l'analyse des protéines ribosomiques (Pineda *et al.*, 2003). En effet, les résultats d'identification des isolats de *Pseudomonas* sont excellents, jusqu'à 100% de résultats corrects (Dieckmann *et al.*, 2005; Degand *et al.*, 2008).

Le génome de la souche de *P. aeruginosa* a été complètement séquencé en 2000. Il est parmi les plus grands génomes bactériens qui comprennent 6,3 millions de paires et 5570 gènes seule de 6,7% de ses gènes ont une fonction bien connue. La plupart sont riche en Guanine et Cytosine (G+C% = 66,6). Le pourcentage de séquences régulatrices est plus important dans le génome de *P.aeruginosa* (8,4%) . (Stover *et al.*, 2000). (Figure 2).

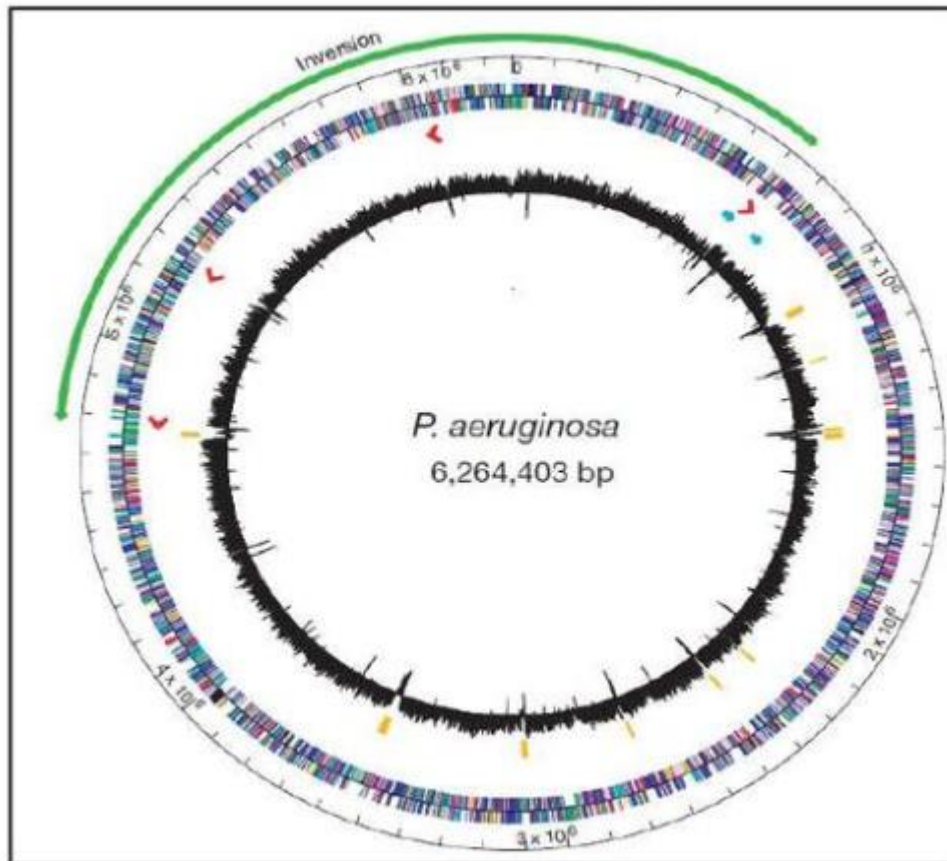


Figure 2 : Le génome de *Pseudomonas aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000)

3. Classification des *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* sont classé selon la hiérarchie suivante :

Règne :	Bacteria
Embranchement :	Prokaryota
Division :	Proteobacteria
Classe :	Gammaproteobacteria
Ordre :	Pseudomonadales
Famille :	Pseudomonadaceae
Genre :	<i>Pseudomonas</i>

Dans l'édition de 1974 du Bergey's Manual, ces bactéries sont incluses dans la famille des *Pseudomonadaceae*. Leur classification repose sur des caractéristiques phénotypiques, seules la composition en G+C fussent rajoutées comme caractéristique génétique.

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

-Le groupe des *P. syringae*.

-Le groupe des *P. chlororaphis*.

-Le groupe des *P. fluorescens*.

-Le groupe des *P. putida*.

-Le groupe des *P. stutzeri*.

-Le groupe des *P. aeruginosa*.

Et le groupe des *P. pertucinogena*.

Depuis l'an 2000, la reclassification continue toujours (**Tableau 1**). Plusieurs espèces étant mal classées comme *P. aureofaciens* et *P. aurantiaca* qui sont désormais des sous espèces du groupe *P. chlororaphis* (**Johnson et Palleroni, 1989; Peix et al., 2007**), qui compte actuellement trois sous espèces: *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp. nov; *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov. comb. nov. et *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov. comb. nov. (**Peix et al., 2007**).

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

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

4. Distribution écologique et rôle biologique de *Pseudomonas*

Les espèces de *Pseudomonas* décrites durant la dernière décennie montrent que c'est l'un des genres bactériens les plus ubiquistes dans le monde, et différents espèces ont été isolées de niches écologiques diverse. En effet, *P. plecoglossicida* est un pathogène de poissons (Nishimori *et al.*, 2000) ; *P. salomonii* et *P. palleroniana* sont des espèces phytopathogènes (Gardan *et al.*, 2002); *P. simiae* a été isolé d'un échantillon clinique de singe (Vela *et al.*, 2006) et *P. costantinii* est un pathogène de champignons comestibles (Munsch *et al.*, 2002).

D'autres sont des bactéries associées aux racines, et ont été isolés de différentes plantes. *P. brassicacearum* et *P. thivervalensis* isolés respectivement de plants d'ail et de riz

(Achouak *et al.*, 2000). *P. rhizosphaerae*, *P. lutea* et *P. argentinensis* isolé de la rhizosphère de l'herbe (Peix *et al.*, 2003, 2004, 2005). Certaines ont été isolés de la phyllosphère des plantes, c'est le cas de *P. lurida* de la phyllosphère de l'herbe (Behrendt *et al.*, 2007).

Quelques espèces ont été isolées d'écosystèmes marins comme c'est le cas de *P. marincola* (Romanenko *et al.*, 2008), ou encore d'écosystèmes désertiques *P. duriflava* (Liu *et al.*, 2008), *P. guineae*, une bactérie psychro-tolérante du sol de l'antarctique (Bozal *et al.*, 2007), *P. thermotolerans*, qui peut croître à 55°C isolée d'échantillons animaux (Manaia *et Moore*, 2002).

Cette distribution semble être due à une adaptabilité physiologique et génétique élevée (Spiers *et al.*, 2000). La clé de cette adaptabilité de souches individuelles à de tels environnements, est la présence chez ce genre bactérien de nombreux îlots génomiques, c'est le cas de la souche *P. aeruginosa* PSE9 (Battle *et al.*, 2009).

5. Place taxonomiques de la complexe *P. aeruginosa-Fluorescens*

Les *Pseudomonas* font partie des Protéobactéries à Gram négatif du groupe gamma à côté de germes comme *Stenotrophomonas maltophilia* et *Burckholderia septia* qui sont aussi des *Pseudomonas* et qui coopèrent aux multi-infections de la mucoviscidose à côté de *P.a.*

Pour bien différencier le bacille pyocyanique des autres *Pseudomonas* à pigment fluorescent, l'identification se fait en recherchant le pigment pyocyanine soluble dans le chloroforme et la capacité du germe à se développer à 42° C.

Quant aux autres très nombreuses espèces comme *P. fluorescens* il est difficile d'en faire l'identification autrement qu'en recourant aux techniques d'hybridation des ADN pour voir si les séquences d'ADN d'une souche sont faciles à hybrider avec des espèces connues. (Presse, 2002).

6. Pouvoir pathogène

Les *Pseudomonas* sont Peu virulent pour l'individu normal, par contre ils sont considérés comme des agents infectieux redoutables lorsque les défenses immunitaires du sujet sont altérées. *P. aeruginosa* est l'exemple type de la bactérie pathogène opportuniste. Les malades particulièrement sensibles sont les nourrissons, les personnes âgées, les sujets atteints d'affections graves, chroniques, métaboliques (diabète) mais surtout hématologiques ou

cancéreuses. Chez les brûlés, cette infection est l'une des causes majeures de mortalité (Avril *et al.*, 2000).

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste capable d'infecter une grande variété d'hôtes : humain, souris, insectes, nématodes, plantes et amibes (D'Argenio *et al.*, 2001; Pukatzki *et al.*, 2002; Rahme *et al.*, 1995). Chez l'homme, elle n'adhère pas à l'épithélium normal intact et ne provoque de maladie que lorsqu'il existe une défaillance du système immunitaire ou une lésion préexistante. *P. aeruginosa* colonise particulièrement les personnes immunodéprimées (patients atteints de leucémie, SIDA, cancer), les grands brûlés, les patients en soins intensifs ou atteints de la mucoviscidose (Bielecki *et al.*, 2008; Branski *et al.*, 2009; Lyczak, 2000). Elle est capable de coloniser une grande diversité de tissus. Elle provoque des bactériémies, des infections intestinales, urinaires, des dermatites, des otites externes, des kératites ulcéreuses chez les porteurs de verres de contact, des infections de la peau chez les grands brûlés, des endocardites chez les patients abusant de drogues intraveineuses, (Bielecki *et al.*, 2008; Bodey *et al.*, 1983; Branski *et al.*, 2009). *P. aeruginosa* est également capable de causer des méningites et des ostéomyélites en infectant le système nerveux central et les structures osseuses (Carek *et al.*, 2001).

CHAPITRE II

Métabolismes des *Pseudomonas*

1. Métabolisme des *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* est caractérisé par un métabolisme oxydatif et non fermentatif, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons ce qui permet une croissance en anaérobiose (respiration nitraté).

Ces bactéries ont la capacité de dégrader des composés complexes, tel que les polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (Palleroni, 1984). De nombreux isolats de *P.fluorescens* et *P. putida* ont été cités en exemple comme souches capables de dégrader des molécules aromatiques plus ou moins complexes. L'assimilation des composés aromatiques semble par contre moins courante chez les isolats provenant des sols non contaminés ou de la rhizosphère (Campbell et al.1995)

Les différents travaux conduits sur ces effets bénéfiques indiquent clairement que les activités intéressantes des *Pseudomonas* fluorescents reposent sur la nature de leur métabolisme carboné et énergétique. Ainsi, la stimulation de croissance des plantes et l'activité antagoniste à l'encontre des agents pathogène exercés par les *Pseudomonas* fluorescents sont liées à la synthèse de métabolites secondaire particuliers (Haas et al., 1991).

2. Voies respiratoires

La dégradation des substrats organiques lors des réactions cataboliques ne fournit directement qu'une seule forme d'énergie : la forme chimique disponible dans l'ATP, le phosphoénolpyruvate et quelques thioesters. Une autre forme essentielle d'énergie est la forme électrochimique, résultant d'une différence de potentiel électrique et de différences de concentrations ioniques entre les deux faces de la membrane plasmique. Ces différences proviennent de la circulation d'électrons dans la chaîne respiratoire et de l'accumulation dans le périplasma de charges positives (protons).

Le gradient électrochimique obtenu permet la synthèse d'ATP via l'ATPase, l'accumulation de métabolites (diffusions facilitées et transports actifs), le mouvement (mise en rotation des flagelles), l'excrétion et la mise en place de protéines et polysaccharides de surface. Chez les *Pseudomonas* spp, les donneurs d'électrons sont principalement synthétisés au cours du cycle de Krebs : il s'agit en particulier du NADH, du NADPH, du F ADH₂ et du succinate. Comme cela a été discuté précédemment, le glycérol et le glucose peuvent également jouer ce rôle. L'accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire des *Pseudomonas* est l'oxygène

atmosphérique. En anaérobiose, le nitrate et certaines de ses formes réduites peuvent intervenir dans cette chaîne.

2.1. Respiration sur oxygène

Les *Pseudomonas spp* sont définis comme étant des microorganismes aérobies utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons (Palleroni, 1984). Cette respiration sur O₂ est celle qui présente le rendement énergétique le plus important suite au potentiel redox élevé de l'oxygène. Elle est caractérisée par des cytochromes oxydases, transporteurs d'électrons terminaux qui réagissent directement avec l'oxygène (ThönyMeyer, 1997). Les *Pseudomonas spp* fluorescents saprophytes possèdent tous un cytochrome oxydase *c* présentant un pic d'absorption caractéristique à 552/554 nm. Cette enzyme est mise en évidence par l'oxalate de N,N-diméthylparaphénylène- diainine (Lelliot et al, 1966 ; Stanier et al, 1966).

2.2. Respiration sur nitrate et dénitrification dissimulatrice

Lorsque l'oxygène n'est plus disponible en quantité suffisante, certaines espèces de *Pseudomonas spp* fluorescents font appel aux oxydes d'azote. La réduction des nitrates (NO₃ + 2 e⁻ + 2H⁺ → NO₂⁻ + H₂O) se fait à l'intérieur de la cellule au niveau de la membrane interne grâce à la nitrate réductase. Elle est généralement inhibée en aérobiose, les électrons de la chaîne respiratoire étant alors préférentiellement orientés vers l'oxygène dont le potentiel redox (E'^o = + 820 mV) est plus élevé que celui du nitrate (E'^o = + 420 mV) (Tiedje, 1988). Les nitrites formés sont ensuite rejetés dans le milieu. Dans certains cas, ils interviennent eux-mêmes comme accepteurs d'électrons et sont réduits en composés gazeux tels que les oxydes nitriques (NO) et nitreux (N₂O) et l'azote (N₂). Il s'agit de la dénitrification dissimulatrice. La réduction de NO₂⁻, NO et NO₂ est sous le contrôle de réductases plus ou moins liées à la membrane plasmique et elle s'exprime du côté périplasmique (Knowles, 1982).

3. Catabolisme des composés organiques simples

3.1. Catabolisme des sucres et composés dérivés

Pseudomonas spp fluorescents sont capables d'assimiler comme seule source de carbone les quatre sucres en C₆ les plus couramment rencontrés dans la nature (D-glucose, D-fructose, D-mannose, galactose) ainsi que trois sucres en C₅ (L-arabinose, ribose, D-xylose). De la même manière, ces souches utilisent le glycérol, le gluconate et le 2-cétogluconate suivant la même

voie d'assimilation que celle du glucose (Wood, 1955 ; Siegel et Phibbs, 1979). Elles utilisent aussi trois polyols (inositol, mannitol et sorbitol) dont la conformation est proche de celle des sucres en C₆ cités plus haut.

À l'opposé, très peu de polymères sont dégradés par ces bactéries. Seuls deux des six disaccharides testés (saccharose et tréhalose) et aucun des trisaccharides ou polysaccharides étudiés sont assimilés. L'assimilation ou non du saccharose, du tréhalose, des pentoses et des polyols par les *Pseudomonas* spp fluorescents saprophytes permet leur discrimination infra spécifique.

3.2. Catabolisme du glucose

Chez les *Pseudomonas* spp fluorescents, les premières étapes permettant l'assimilation du glucose aboutissent à la formation d'un composé clé, le 6-phosphogluconate. Plusieurs voies sont responsables de la synthèse de ce composé. Habituellement, le glucose est oxydé en gluconate et 2-cétogluconate avant son entrée dans la cellule. Les enzymes intervenant dans ces réactions (glucose et gluconate déshydrogénases) sont des enzymes membranaires qui utilisent l'oxygène atmosphérique. Les électrons obtenus lors de l'oxydation du glucose sont transférés, via les cytochromes b et c, à la chaîne respiratoire (Wood, 1955).

L'oxydation du glucose n'est cependant pas une condition obligatoire à son transfert dans la cellule où il peut directement pénétrer grâce à une perméase (Eisenberg et al, 1974). Ce dernier système présente un intérêt particulier puisque c'est le seul qui permet l'utilisation du glucose en anaérobie sous conditions dénitrifiantes (Hunt et Phibbs, 1983). Glucose, gluconate et 2-cétogluconate cytosoliques sont ensuite phosphorylés et convertis en 6-phosphogluconate (Fig 3).

Dans la Fig 3 on remarque, Le glucose consommé par les *Pseudomonas* spp fluorescents est donc transformé en totalité en 6-phosphogluconate (1). Et assimilé selon les voies d'Entner-Doudoroff (2). et du Shunt de l'hexose monophosphate (3). (Wood, 1955). L'énergie extraite de ce catabolisme provient, en grande partie, des cycles de kreps et du glyoxylate alimentés par le pyruvate originaire de la voie d'Entner- Doudoroff (4). (Latour et Lemanceau, 1997).

Phibbs, 1982). Contrairement au fructose, le mannose est un aldose. Mannose et fructose peuvent être inter convertis par un mannose isomérase (Palleroni et Doudoroff, 1956). Cette conversion permet au mannose d'emprunter la voie catabolique du fructose (Fig3).

3.4. Catabolisme des disaccharides

La molécule de saccharose est par ses propriétés physicochimiques un dérivé analogue du glucose, toutefois moins réactif ; sous cette forme, le glucose demeure donc protégé de nombreuses attaques enzymatiques. Alors que l'ensemble des *Pseudomonas* spp fluorescents présente l'aptitude de cataboliser le glucose et le fructose, seules certaines souches sont capables d'assimiler le saccharose. Chez les *Pseudomonas* spp, le saccharose subit une coupure intracellulaire par l'intermédiaire d'une phosphorylase selon la réaction :

Saccharose + Pi \longrightarrow glucose-1-P + fructose. (De Ley, 1960).

L'assimilation du saccharose grâce à cette saccharase phosphorylase présenterait un avantage vis-à-vis de celle mettant en jeu une autre enzyme plus connue, l'invertase (saccharose \longrightarrow glucose + fructose). En effet, non seulement l'énergie contenue dans la liaison glycosidique est préservée, mais les réserves en ATP ne sont pas sollicitées pour activer le sucre en sucre-1-P (Gottschalk, 1979). Contrairement au saccharose, le tréhalose [D-glucose 1 α - 1 α D-glucose] est rarement identifié chez les plantes vasculaires (Müller et al, 1995). En revanche, on le trouve dans les cellules de nombreux microorganismes. C'est un sucre caractéristique de nombreux champignons pour lesquels il représente une forme de stockage du glucose et joue le rôle d'osmorégulateur (Van Laere, 1989).

4. Catabolisme des acides organiques

4.1. Catabolisme des acides gras

Les acides carboxyliques à longue chaîne saturée, appartenant à la série C₆ – C₁₀ (caproate, heptanoate, caprylate, pelargonate, caprate) sont fréquemment assimilés par les *Pseudomonas* spp fluorescents. Les *Pseudomonas* spp, comme de nombreux autres microorganismes aérobies, dégradent ces acides par β oxydation (Gottschalk, 1979) (Fig.4).

Dans la Fig 4 on remarque que les acides organiques sont oxydés selon les réactions des cycles de kreps (1). Et du Glyoxylate (2). L'extraction et le stockage de l'énergie sous forme d'ATP se fait au niveau de la chaîne respiration, dans laquelle les électrons sont fournis lors de la déshydrogénation du NADH et du succinate par les enzymes flaviniques membranaire

(3). En anaérobiose et sous conditions non dénitrifiantes, la fermentation de l'arginine peut également produire de l'ATP (4). (Latour et Lemonceau, 1997)

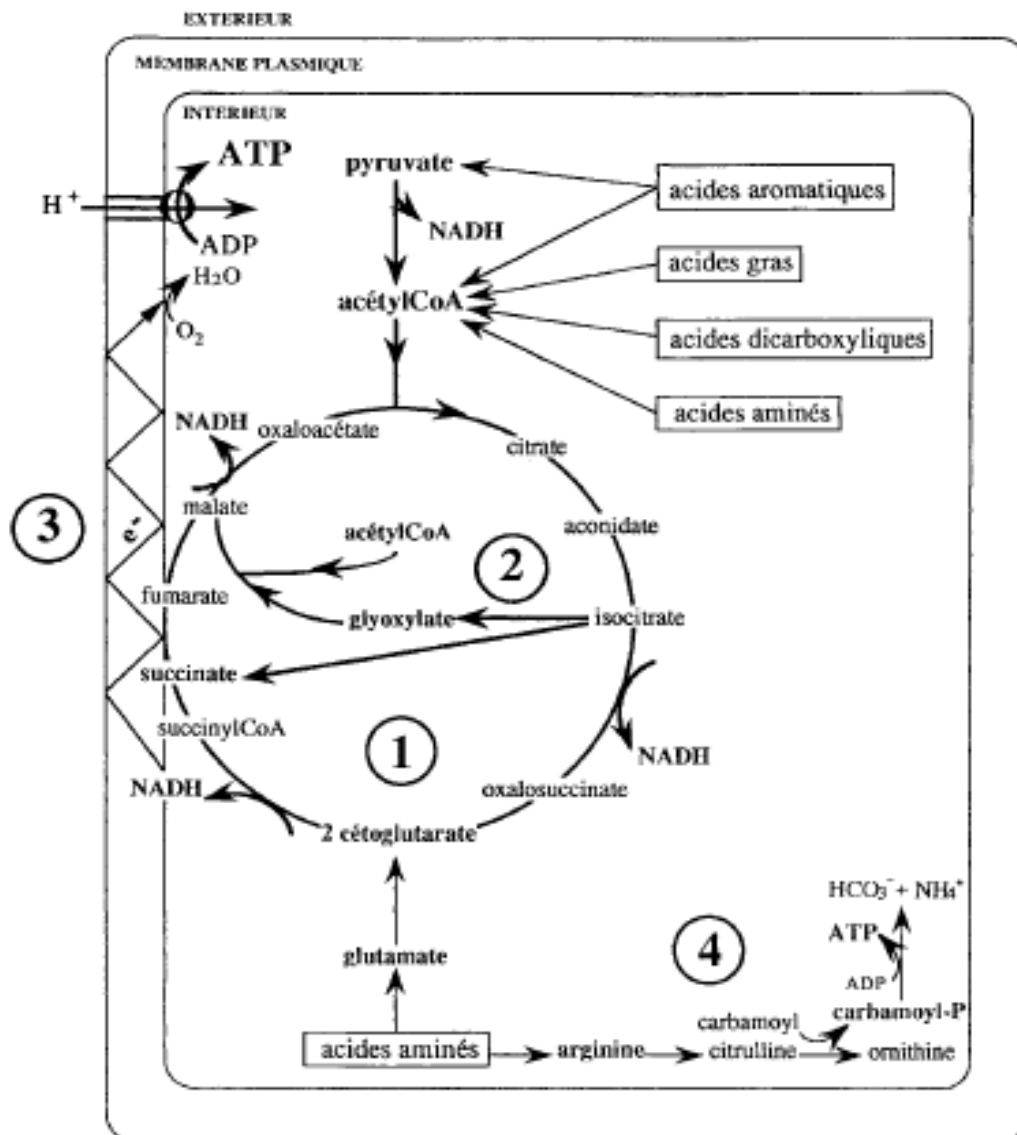


Figure 4 : catabolisme des acides organiques et des acides aminés chez les *pseudomonas* spp fluorescents saprophyte à oxydase positive.

4.2. Catabolisme des acides dicarboxyliques

L'oxydation d'acides dicarboxyliques différents de ceux présents dans le cycle de Krebs a également été décrite chez *P. fluorescens*. C'est le cas du malonate (Wolfe et al, 1954), du glutarate (Numa et al, 1964) et de l'itaconate (Cooper et Kornberg, 1964). L'oxydation de ces acides aboutit à chaque fois à la formation d'acétylCoA et de CO₂. Les acides dicarboxyliques à longue chaîne carbonée (adipate, pimélate, subérate, azélate, sébacate) ne permettent pas, par contre, la croissance des *Pseudomonas* spp fluorescents.

4.3. Catabolisme des acides aromatiques

De nombreux isolats de *P.fluorescens* et *P.putida* ont été cités en exemple comme souches capables de dégrader des molécules aromatiques plus ou moins complexes. Les voies permettant la dégradation de ces composés ne seront pas détaillées ici (Stanier et Ornston, 1973 ; Dagley, 1986). Il faut cependant noter que les souches étudiées ont toujours été isolées de milieux pollués par des xénobiotiques ou des hydrocarbures. L'assimilation de composés aromatiques semble par contre moins courante chez les isolats provenant de sols non contaminés ou de la rhizosphère (Campbell et al, 1995 ; Latour et al, 1996).

4.4. Catabolisme des acides aminés

Les *Pseudomonas* spp fluorescents utilisent de nombreux acides aminés comme sources de carbone, d'azote et d'énergie (Palleroni, 1984). L'assimilation ou non d'un nombre important de ces composés (glycine, L-tryptophane, trigonelline, L-lysine, L-citrulline,...) par les *Pseudomonas* spp fluorescents saprophytes permet leur discrimination infraspécifique. Les voies d'assimilation des acides aminés sont nombreuses et peuvent être illustrées à partir de quelques exemples selon que la chaîne latérale de l'acide est apolaire, aromatique ou basique.

4.4.1. Catabolisme des acides aminés à chaîne latérale apolaire

Les acides aminés apolaires comme la D et L-alanine, leucine, isoleucine et la L-valine sont quasiment toujours utilisés comme substrats carbonés par les *Pseudomonas* spp fluorescents étudiés. Marshall et Sokatch (1972) puis Martin et al (1973) ont élucidé chez *P.putida* le catabolisme des formes L et D de la leucine, de l'isoleucine et de la valine. Ils montrent que ces voies mettent en jeu des enzymes communes. L'assimilation de ces acides aminés aboutit à la production d'acétoacétate, d'acétylCoA et de succinylCoA.

4.4.2. Catabolisme des acides aminés à chaîne latérale aromatique

Chez les *Pseudomonas* spp fluorescents qui peuvent utiliser ce composé, le L-tryptophane est attaqué par une L spécifique tryptophane-2,3-dioxygénase qui provoque la formation de formylLkynurénine, à son tour converti en L-kynurénine et formate. Une kynuréninase hydrolyse alors la chaîne latérale de la kynurénine libérant de l'alanine et un nouvel acide aminé aromatique, l'anthranilate (2-aminobenzoate). Ce dernier composé est transformé en catéchol et rejoint la voie dégradative des acides aromatiques présentée précédemment (Ornston, 1971).

La première étape de dégradation de l'histidine consiste en une désamination de l'acide aminé. L'urocanate est le premier composé intermédiaire formé, mais constitue également l'inducteur physiologique de cette voie (Hug et al, 1968 ; Newell et Lessie, 1970). Comme pour de nombreux autres acides aminés, le catabolisme de l'histidine permet la production de glutamate qui peut entrer dans le cycle de Krebs après une désamination en 2-cétoglutarate.

4.4.3. Catabolisme des acides aminés à chaîne latérale basique

Le catabolisme de la lysine emprunte trois voies distinctes : la voie de l'oxygénase, celle du pipécolate et celle de la cadavérine. L'existence de ces voies dépend de l'espèce et du biovar étudiés. Les *P.fluorescens* posséderaient les trois voies, les *P.putida* du biovar A les deux premières et les *P.putida* du biovar B la seule voie du pipécolate. La L-lysine apparaît être le substrat caractéristique de la voie acyclique de l'oxygénase tandis que la D-lysine est celui de la voie cyclique passant par le pipecolate. Chacune de ces voies est spécifiquement induite par la L ou la D-lysine et leurs intermédiaires respectifs (Chang et Adams, 1971 ; Fothergill et Guest, 1977).

5. Oxydation des xénobiotiques

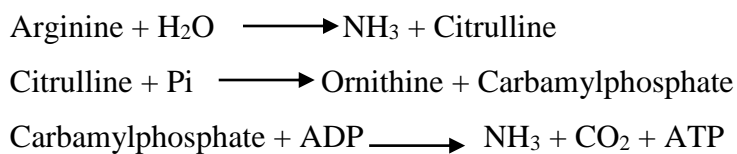
Le catabolisme des xénobiotiques par les *Pseudomonas* spp fluorescents se caractérise en effet par la variété et la plurifonctionnalité des enzymes dégradatives. Il présente de multiples voies périphériques permettant les premières attaques d'une gamme importante de composés (Golovleva *et al.*, 1992). Enfin, certaines populations de *Pseudomonas* spp fluorescents ont la possibilité de dissimiler l'azote (Clays Josserand *et al.*, 1995). Cette dissimilation est plus ou moins complète selon le groupe taxinomique considéré (Matsubara et Zumft, 1982).

Ces bactéries contribuent donc, de façon significative, à la réduction des nitrates et des nitrites qui constituent des polluants des nappes phréatiques (Latour et Lemanceau, 1997). En raison de la richesse de leurs voies métaboliques, elles sont souvent capables de résister à de nombreux antiseptiques ou antibiotiques ce qui explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier où elles peuvent être isolées de l'environnement humide (Euzeby, 2008).

6. Hydrolyse de l'arginine

L'arginine représente une source d'azote intéressante dans les milieux riches en matière organique. Elle constitue une source d'énergie en aérobiose et en anaérobiose. La complexité du catabolisme de l'arginine révèle l'intérêt de ce substrat pour les microorganismes. Il existe quatre voies distinctes d'assimilation de l'arginine chez *P. putida* et au moins trois d'entre elles existent chez les autres espèces de *Pseudomonas* spp fluorescents (Cunin et al, 1986 ; Haas et al, 1990). Ces voies mettent en jeu d'autres acides aminés comme la citrulline, l'ornithine, la proline ou le 4-aminobutyrate. Elles sont largement indépendantes les unes des autres et sont différemment utilisées selon les besoins bactériens. La voie de l'arginine déiminase est une voie caractéristique des *Pseudomonas* spp fluorescents saprophytes (Thornley, 1960). Elle fonctionne seulement en absence d'O₂ et sous conditions non dénitrifiantes, c'est-à-dire lorsque la chaîne respiratoire est totalement bloquée (Shoosmith et Sherris, 1960 ; Mercenier et al, 1980). C'est la seule voie fermentative connue chez ces bactéries.

L'action de ce complexe multi-enzymatique « ADH », dont le bilan peut s'écrire en laissant penser à une simple réaction d'hydrolyse, est en fait une succession de trois réactions enzymatiques englobant une séquence « classique » de phosphorylation au niveau du substrat.



7. Condition de croissance des *Pseudomonas*

Un Nombre important de ces bactéries présentent un caractère psychrotrophe avec une température minimale de croissance voisine de 4°C et une température optimale de l'ordre de 28°C, tout en étant incapables de se multiplier à des températures supérieures à 35°C. (La croissance de certaines souches à des températures voisines de 45 °C a cependant été observée).

Les *Pseudomonas* poussent facilement dans un pH situé entre 7 et 8, elles sont incapables de croître à un pH inférieur ou égale à 6, l'optimum étant 7.2 (Pallerony, 1984). Les caractéristiques métaboliques des principaux *Pseudomonas* sont données dans le tableau 2.

Tableau 2: caractéristique des principaux *Pseudomonas*. (Ligon et al., 2000)

<i>P.aeruginosa</i> <i>P.fluerescens</i> <i>P.putida</i> <i>P.stutzeri</i>				
Oxydase	+++	+		
Respiration de nitrate	+ D-	+		
Nombre de flagelle	1 >1>1	1		
Croissance a 4C°	++ D	-		
Croissance a 42C°	++	-	D	
Pyocyanine	+-	-	-	
Pyoverdine	++	+	-	
Arginine dihydrolase	++	+	-	
ONPGD	-	-		
Hydrolyse de l'esculine	-	-	-	
Lysine décarboxylase	--	-	-	
Phénylalanine désaminase	-	-	-	+
Amylase	-	--	+	
Gélatinase	D+ -	-		
Lécithinase	D+ -	+		
DNase	D- -	-		
Hémolyse	DD -	-		
Acétate*		+++	+	
Glucose*	+++	+		
Trhhalose*	--		-	
Maltose*		---	+	
Inositol*	--	-		
Mannitol	+++	D		
Arginine*	+++	-		
Glucose**		++	+	+
Fructose**		++	+	+
Mannose**		D+	+	+
Lactose**		-DD	-	
Maltose**		-DD+		
Mannitol**		D+DD		

* : Assimilation. ** : Acidification oxydative.

+ : positive. - : négative. D : variable.

8. Production des exopolysaccharides

Les espèces du genre *Pseudomonas* produisent une couche d'exopolysaccharides entourant leurs cellules, la protégeant de la phagocytose par les macrophages chez les mammifères. Cette couche d'exopolysaccharides (E.P.S) leur permet de former des biofilms, grâce aux quels elles peuvent rester collées aux surfaces, de telle manière qu'il est difficile de les déloger (Viscaet *al*, 2007). Ce genre de produits est des polyhydroxyal canoates et d'alginate ainsi que d'autres substances métaboliques. Ce qui les rend d'un grand intérêt biotechnologique (Holloways,1992).

9. Production des pigments

Les *Pseudomonas* spp. Peuvent produire des pigments diffusant dans les milieux de culture. Deux types de pigments peuvent être synthétisés : des pigments fluorescents (pyoverdines), des pigments phénaziniques non fluorescents.

La pyocyanine est un pigment bleu-vert, dérivé de la phénazine. La production de pyocyanine est largement favorisée par l'utilisation d'un milieu très bien aéré contenant peu de sels.*P. aeruginosa* est un des premiers microorganismes dont on a démontré que les pigmentsprésentaient un effet antibiotique (Young *et al.*, 1984). La présence de ces pigmentspeut expliquer la colonisation dominante de *P.aeruginosa* et l'inhibition des autres bactéries qui sontnormalement présentes dans la flore de l'arbre respiratoire. La phénazine vient principalement inhiber la fonction ciliaire et par le fait même altérer la réponse immunitaire chez l'humain (Godfrey *et al.*, 1984).

La pyoverdine, pour sa part, est un pigment vert fluorescent dont la production est favorisée par le mélange de phosphate-sulfate et de glycérol.

10. Milieux favorisant la synthèse de pigments

En raison de l'importance de ces pigments dans le diagnostic, leur recherche doit s'effectuer dans des milieux spéciaux favorisant leur synthèse. Les milieux les plus sensibles et plus utilisés sont les milieux de King.

Le milieu de King A favorise sélectivement la production de pyocyanine et il convient également pour la mise en évidence des autres pigments phénazinique. Le milieu de King B favorise la production des pyoverdines. (Euzéby,2008).

CHAPITRE III

**Antagonisme et substances produites par
*Pseudomonas***

1. Mécanismes d'antagonisme

Les *Pseudomonas* spp. *Fluorescents* produisent une gamme importante de métabolites secondaires, en plus des enzymes dégradant les parois cellulaires. Les plus caractérisées pyolutéorine de ces métabolites secondaires sont les: phénazines, phloroglucinols, , pyrrolnitrine, lipopeptides, et le cyanure d'hydrogène. Ces métabolites secondaires sont actifs vis à vis d'une large gamme de bactéries et de champignons (**Fig.5**).

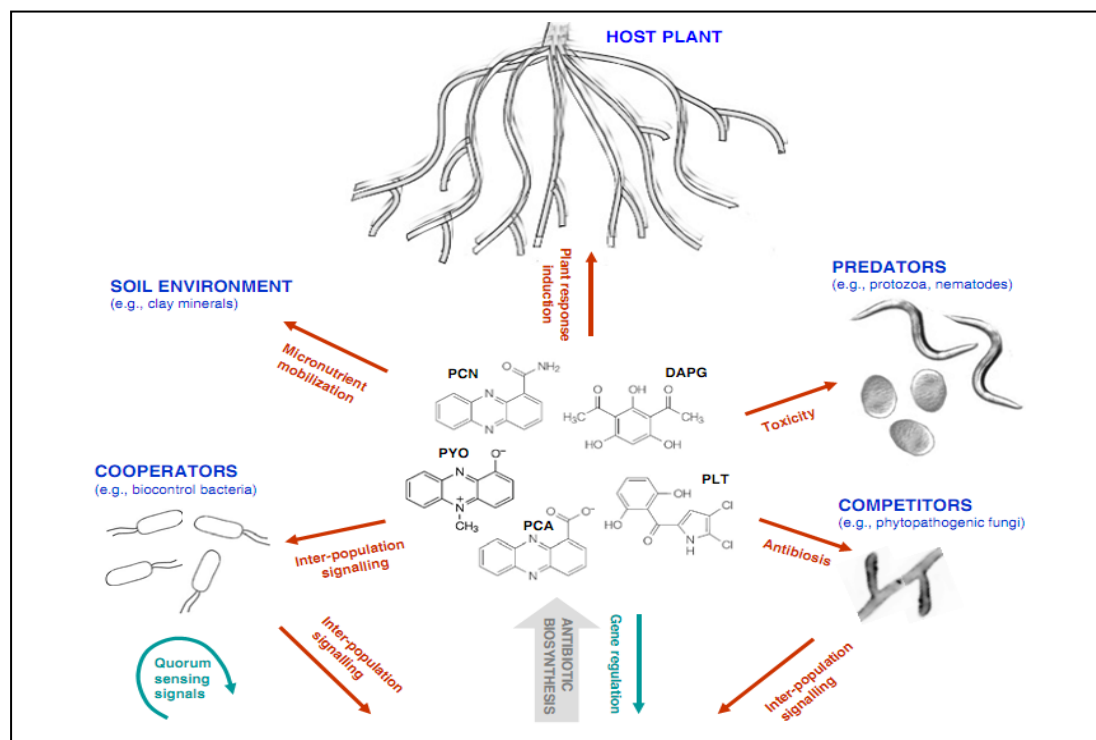


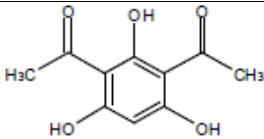
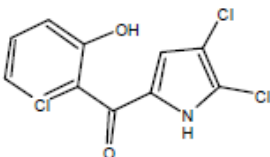
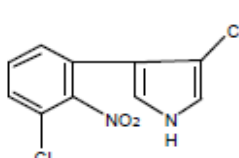
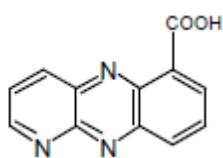
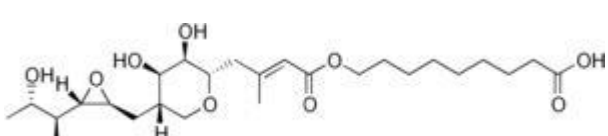
Figure 5 : Les principaux antibiotiques produits par les souches de biocontrôle jouent un rôle central entre les éléments impliqués dans les interactions : *Pseudomonas* de biocontrôle, plantes, pathogènes, prédateurs, coopérateurs et sol (Dubuis *et al.*, 2007).

1.1. Antibiose

L'antibiose consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Les souches de *Pseudomonas* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants impliquées dans le biocontrôle, par exemple l'acide cyanhydrique (HCN), la viscosamide, la pyolutéorine, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine, les phénazines, les butyrolactones, les tensines et les tropolones (Defago, 1993 ; de Souza *et al.*, 2003 ; Haas et Defago 2005). D'autre part l'oligomycine A, la kanosamine, la zwittermicine et la xanthobacine sont produites par *Bacillus* spp. , *Streptomyces* spp et *Stenotrophomonas* spp. (Milner *et al.*, 1996 ; Nakayama *et al.*,

1999). Certaines souches de PGPR ont la capacité de dégrader les parois cellulaires fongiques à travers la production d'enzymes hydrolytiques tels β -1,3-gluconase, exo- et endo-polygalacturonases, pectinolyases, cellulases et chitinases (Whippes, 2001).

Tableau 3 : Principaux antibiotiques secrétées par les *Pseudomonas* fluorescents (modifié de Dwivedi et al., 2003).

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

1.1.1. Les phénazines

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

(APC), le 1-hydroxyphénazine et la phénazine-1-carboxamide (PCN) sont produites par *P. aeruginosa* (Budzikiewicz, 1993). Ces composés ont une activité d'oxydo-réduction. Les deux loci *phzA1B1C1D1E1F1G1* et *phzA2B2C2D2E2F2G2* sont à l'origine de la production de l'APC. Ce dernier est transformé en pyocyanine et PCN grâce aux trois gènes *phzM*, *phzS*, et *phzH* (Mavrodi *et al.*, 2001).

1.1.2. La pyocyanine (PYO)

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

La biosynthèse de ce composé semble débiter avec l'acide shikimique duquel est tiré le chorismate qui sera transformé en acide 2,3-dihydro-3-oxoanthranillique. Ce dernier pourra alors se dimériser pour former le premier composé de la famille, soit l'acide phénazine-1-carboxylique (PCA). C'est à partir du PCA que sera dérivée la pyocyanine.

- **L'effet antimicrobien de la pyocyanin**

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

Ces auteurs ont donc suggéré que la pyocyanine génère de l'anion superoxyde (O₂⁻) et par dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à l'extérieur de la cellule, puis qu'une partie d'H₂O₂ traverse la membrane cellulaire et induit l'expression de catalase. Voggu *et al.* (2006) ont observés que la coculture de *Staphylococcus aureus* en présence de *Pa* induit l'apparition

de souches de *Staphylococcus aureus* communément appelées "Small-colony variants SCVs" Variants petites colonies, ce phénomène est due à la sécrétion de la pyocyanin par *P.a.*

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

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

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

1.1.3. Phloroglucinols

Les phloroglucinols sont des antibiotiques à large spectre, produits par une large variété de souches bactériennes. Le 2,4-diacétyl phloroglucinol (DAPG) est aussi un antibiotique phénolique à large spectre d'action produit par *P. fluorescens* Pf-5 (Howell et Stipanovic, 1979), *P. fluorescens* F113 (Fenton et al., 1992), *P. fluorescens* CHAO (Keel et al., 1992) et *P. fluorescens* Q2-87 (Bangera et Thomashow, 1996). Cet antibiotique possède aussi une activité herbicide, ressemblant à l'acide 2, 4-dichlorophénoxyacétique (2, 4-D) un herbicide de post-émergence, pour le contrôle des mauvaises herbes des céréales, de la canne à sucre et d'autres plantations. Le DAPG induit aussi la résistance systémique chez les plantes, et joue donc le rôle d'un éliciteur des phytoaléxines (Dwivedi et Johri 2003).

1.1.4. Pyrrolnitrine (PRN)

La pyrrolnitrine (PRN) (3-chloro-4-(2'-nitro-3'-chlorophenyl) un composé pyrrole, est produite par les *Pseudomonas* spp. fluorescents comme *P. fluorescens* (Kirner et al., 1998) et *P. chlororaphis* (Elander et al., 1968). La pyrrolnitrine a trouvé son application comme composé à usage clinique pour le traitement des mycoses cutanées plutôt que fongicide agricole

(Hammer et al. 1997, McSpadden Gardener et Fravel, 2002). La production de ce composé par *P. fluorescens* est impliquée dans le contrôle de certains agents pathogènes racinaires comme *R. solani*, *Verticillium dahliae*, *G. graminis* et *Fusarium oxysporum* (Howell et Stipanovic 1979, Homma et al., 1989).

1.1.5. Pyolutéorine (PLT)

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

1.1.6. Mupirocine

Plus connu comme l'acide pseudomonique, est un antibiotique polycétide naturellement présent chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents. La mupirocine produite par *P. fluorescens* NCIMB 10586, est d'une activité élevée contre *Staphylococcus aureus* et d'autres bactéries à Gram positif (El-sayed et al., 2001). C'est un antibiotique largement utilisé dans les maladies tropicales (Carcanague, 1997).

1.1.7. Antibiotiques peptidique

Les antibiotiques peptidiques sont aussi bien produits par les bactéries à Gram positif (Katz et Demain, 1977) que celles à Gram-négatif (Dowling et O'Gara, 1994), par une synthèse multienzymatique non-ribosomique (Kleinkauf et Dohren, 1996). Récemment, il a été démontré que des *Pseudomonas* spp. fluorescents produisent des lipopeptides cycliques (CLPs). La tensine produite par *P. fluorescens* 96.578, a montré un effet potentiel sur le basidiomycète *R. solani* (Nielsen et al., 2000). La Viscosinamide un autre lipopeptide cyclique produit par *P. fluorescens* DR54 (Nielsen et al., 1999), est aussi actif sur *R. solani* par la réduction de la biomasse mycélienne et donc la formation de sclérotés (Thane et al., 2000). L'Oomycin A est un antibiotique produit par *P. fluorescens* HV37a, est à l'origine de la suppression du damping-off du coton causé par *P. ultimum* (Gutterson et al., 1988).

1.1.8. Enzymes dégradant les parois fongiques

L'excrétion d'enzymes qui dégradent les parois cellulaires fongiques est fréquemment impliqué dans les attaques des champignons phytopathogènes (Martin et Loper 1999; Nielsen et Sorensen, 1998; Picard *et al.*, 2000). La lyse des parois cellulaires, par les enzymes dégradatives excrétées par les microorganismes est une fonction bien connue du mycoparasitisme. La Chitinase, la β -1,3 glucanase et la cellulase sont d'importantes enzymes spécialement dans le contrôle fongique, par leurs activités dégradatives des composés des parois cellulaires tels que : la chitine, le β 1-6 glucane et les ponts glucosidiques (Schroth et Hancock, 1981; Chet, 1987; Lorito *et al.*, 1996).

Les microorganismes excrétant la chitinase ont été rapportés comme des agents de biocontrôle efficaces (Ordentlich *et al.*, 1988; Inbar et Chet, 1991). Le contrôle biologique de *Fusarium solani*, se fait essentiellement via les activités des laminarinase et chitinase chez *P. stutzeri* YPL-1 (Lim *et al.*, 1991). *P. cepacia* produisant la β -1,3 glucanase, réduit l'incidence des maladies causées par *R. solani*, *P. ultimum* et *Sclerotium rolfsii* (Fridlender *et al.*, 1993). Nielsen *et al.* (1998) ont rapporté que dans la rhizosphère de la betterave à sucre, les *Pseudomonas* spp. fluorescents inhibaient *R. solani* par production d'endochitinase.

1.2. Les sidérophores de *P.aeruginosa*

Pour subvenir à ses besoins en fer, *P.aeruginosa* synthétise et sécrète deux sidérophores, la pyoverdine (Pvd) et la pyochéline (Pch). La Pvd est le sidérophore majeur produit par cette bactérie et se caractérise par une très forte affinité pour le fer (10^{32} M^{-1}) (Abdallah and Pattus, 2000 ; Albrecht-Gary *et al.*, 1994). La Pch est un sidérophore produit en plus faible quantité et qui présente une plus faible affinité pour le fer (10^{18} M^{-1}).

- **Pyoverdines**

Ces composés sont les sidérophores typiques des *Pseudomonas* fluorescents comme *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*. La pyoverdine de *P. fluorescens* est un pigment vert/jaune fluorescent sous la lumière UV qui est directement impliqué dans un transport de haute affinité du fer vers la cellule (Budzikiewicz, 1993). La découverte de plus d'une cinquantaine de dérivés de la pyoverdine a contribué à augmenter l'intérêt pour l'utilisation de sidérophores comme fongicide et biopesticides, en plus d'ouvrir une nouvelle avenue pour la classification des *Pseudomonas* sp. (Meyer, 2000 ; Wilson, 1997). Leur structure consiste en un chromophore dihydroxyquinoline flanqué d'une chaîne de peptide à 6-12 acides aminés liée au

groupement carboxyle et à un acide dicarboxylique connecté sur le groupement NH₂ du chromophore (Fernandez, et...2003).

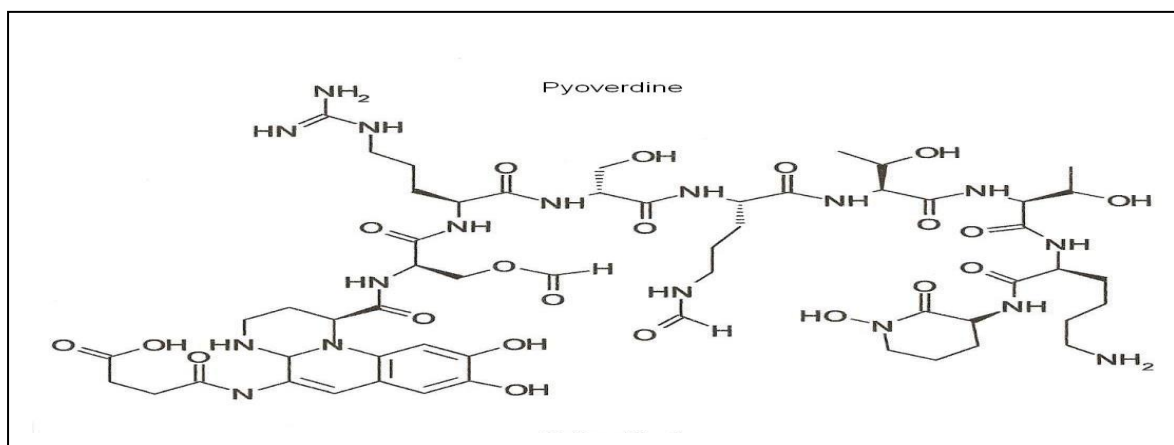


Figure 6 : structure de la pyoverdine.

1.4. L'acide cyanhydrique (HCN)

L'acide cyanhydrique (HCN) qui est produit par plusieurs *Pseudomonas* sp est un métabolite secondaire responsable de l'activité biologique contre divers champignons (Haas, D., and C. Keel. 2003). Ce composé volatil est un facteur de virulence qui peut s'avérer toxique.

2. Effets de la salinité sur les *Pseudomonas*

Le métabolisme des *Pseudomonas* des diverses niches écologiques est contrôlé par le degré de salinité et des facteurs environnementaux. Son activité antagoniste est due principalement à la sécrétion des métabolites. Ces bactéries sont également connues par le contrôle des agents phytopathogènes dans les sols salins (Prabhakaran et al 2014). Dans leur habitat naturel, les *Pseudomonas* sont fréquemment exposés à des variations de pression osmotique du milieu environnant. En effet, la salinité élevée du sol peut interférer avec la croissance et l'activité des *Pseudomonas*.

La membrane cytoplasmique de ces bactéries est perméable à l'eau mais constitue une barrière efficace vis-à-vis des solutés du milieu et des métabolites présents dans le cytoplasme (Csonka, 1989). La circulation des molécules d'eau à travers cette bicouche lipidique est accélérée par la présence de canaux dits aqueux (Kempf et Bremer, 1998).

PARTIE II

Etude Expérimental

Matériel Et Méthode

1. L'obtention des souches

1.1. Souches de références (souches tests).

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

Les deux souches de *Staphylococcus aureus* et *Salmonella* nous ont été fournies par le laboratoire pédagogique de microbiologie (université de Mostaganem). La croissance des souches a été réalisée à 37°C sur différents milieux solide Hectoen, milieu Chapman, la gélose nutritive et le milieu OGA.

1.2. L'obtention des souches antagonistes

La souche de *Pseudomonas* utilisées dans notre travail a été fournie par le laboratoire de microbiologie et biologie végétal (Université de Mostaganem), l'isolement de ces souches a été effectué à partir des sols salés de la plaine de Mina selon la carte de salinité. La souche PA1 appartient à *Pseudomonas aeruginosa*.

1.3. Purification et conservation des souches

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

Les souches obtenues sont conservées à 4 °C dans des tubes contenant la gélose inclinée après 24 heures d'incubation à 37°C pour chaque souche.

1.4. Test d'antagonisme *in vitro*

Le but de ce test est de sélectionner les souches les plus compétitives afin d'obtenir uniquement celles qui possèdent des caractères de performance.

Ce test consiste à déposer la souche de *Pseudomonas* en trait dans des boîtes de pétri contenant le milieu king B, après incubation de 48h à 30°C on ensemence

aseptiquement des traits Perpendiculaire au trait de *Pseudomonas* des microorganismes tests pour détecter le pouvoir antagoniste des *Pseudomonas* étudiés.

La lecture des résultats consiste à mesurer la distance des zones d'inhibition entre la souche antagoniste et la souche testée.

2. Production et extraction de substances antimicrobiennes

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

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

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

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

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

3. L'effet antimicrobien de la pyocyanine sur les souches pathogènes testées:

L'évaluation de l'effet antibactérien et antifongique de la pyocyanine a été établie par l'utilisation de la méthode de diffusion en milieu solide, on a Proposé le milieu Mueller Hinton gélosé (Annexe) comme milieu de culture pour cette étude.

3.1. Préparation de l'inoculum bactérienne

A l'aide d'une anse stérile, on prélève une colonie à partir des souches pathogènes à tester incubées sur gélose nutritif, qu'on introduits ensuite dans 5 ml de bouillon nutritif, et on incube à 37°C pendant 18 heures. Une suspension bactérienne

préparée à partir ces cultures jeunes afin d'ajuster la turbidité (par un spectrophotomètre à 625 nm) à raison de 0.08 à 0.1 (équivalente au standard 0,5 de Mac Farland).

3.2. Préparation de la solution d'antibiotique à partir des deux extraits bruts :

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

3.3. Préparation des disques

Des disques cellulose (Annexe) de 6 mm de diamètre et une épaisseur de 0.25mm, sont d'abord stérilisés par l'autoclavage, puis imprégnés pendant une heure dans les solutions d'antibiotiques avant l'application du test.

3.4. L'application de la méthode de diffusion

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

4. Effet de la salinité et de température sur la production de la pyocyanine

4.1. Effet de la salinité

On ajoute des concentrations croissantes de NaCl à des flacons contenant 80 ml de milieu King A liquide à des raison de (2,5; 5;10; 12.5; 15; 17.5; 20; 25 et 30 g/l de NaCl)ensemencé par 3ml de préculture de *Pseudomonas aeruginosa*. Les cultures sont mises en incubation pendant 72 h à 28°C, sous agitation permanente (180 rpm).

4.2. Effet de la température

Les cultures préparées à des différentes concentrations de NaCl sont incubées à différents température (28°, 30° et 37°C) à raison de trois répétitions.

4.3. Dosage de la pyocyanine.

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

5. Production, extraction et caractérisation de la pyoverdine

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

5.1. L'extraction de la pyoverdine

La culture est centrifugé à 6000t/min pendant 10 min, on ajoute ½ le volume du surnageant du mélange chloroforme/phénol (1V/1V) dans un ballon à décanter, on le laisse décanter puis on prend la phase organique, on ajoute à cette phase 1,5 le volume de diéthyléther on agite bien puis on le laisse se séparé pendant environ 3h dans un ballon à décanter, la phase organique est passé à travers un papier filtre contenant le sulfate de sodium anhydre (Meyer & Abdellah, 1978).

6. Effet de la salinité et de température sur la production de la pyoverdine

Dans cette partie de notre travail nous avons testés l'effet de la salinité et la température sur la production de la pyoverdine.

6.1. Effet de la salinité

On ajoute des concentrations croissantes de NaCl à des flacons contenant 80 ml de milieu King B liquide à des raison de (2,5; 5;10; 12.5; 15; 17.5; 20; 25 et 30 g/l de NaCl) ensemencé par 3ml de préculture de *Pseudomonas fluorescens* . Les cultures sont mises en incubation pendant 72 h à 28°C, sous agitation permanente (180 rpm).

6.2. Effet de la température

Pour tester l'effet de la température nous avons choisi deux températures pour la production de ce métabolite 28 °C et 30 °C à raison de trois répétitions pour chaque température.

6.3. La quantification de la pyoverdine

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

Résultat Et Discussion

1. Sélection des *Pseudomonas* à pouvoir antagoniste

Les résultats obtenus (tableau n°4), dans nos essais d'antagonisme in vitro montrent que l'effet antagoniste exercé n'est pas spécifique, le spectre d'action de la souche de *pseudomonas* est variable. L'activité antagoniste de la souche *PAI* sur le milieu solide montre un large spectre touchant aussi bien les bactéries et les levures.

Tableau N°4 : Zone d'ihnibition de l'activité antagoniste in vitro (en mm)

La souche d'antagoniste	<i>PAI</i>
La souche à tester	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	5
<i>Candida albicans</i>	4
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	4
<i>Salmonelle</i>	6

2. Activité de souche *Pseudomonas aeruginosa*

L'activité de l'isolat *PAI* (tableau n°4)exerce un effet antagoniste important sur 83 % des souches étudiées avec une zone d'inhibition qui varie de 4 à 16 mm sur les souches testés, et aucun effet contre P.a.

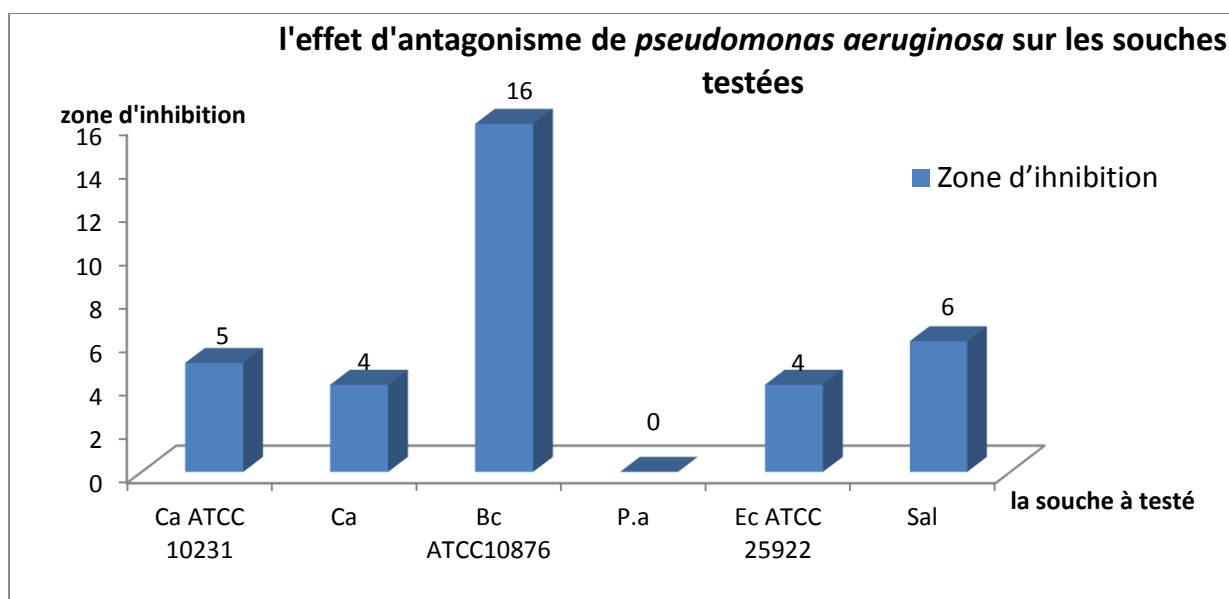


Figure N°7 : l'histogramme représente les zones d'ihnibition de l'activité antagoniste de la souche *PAI*.

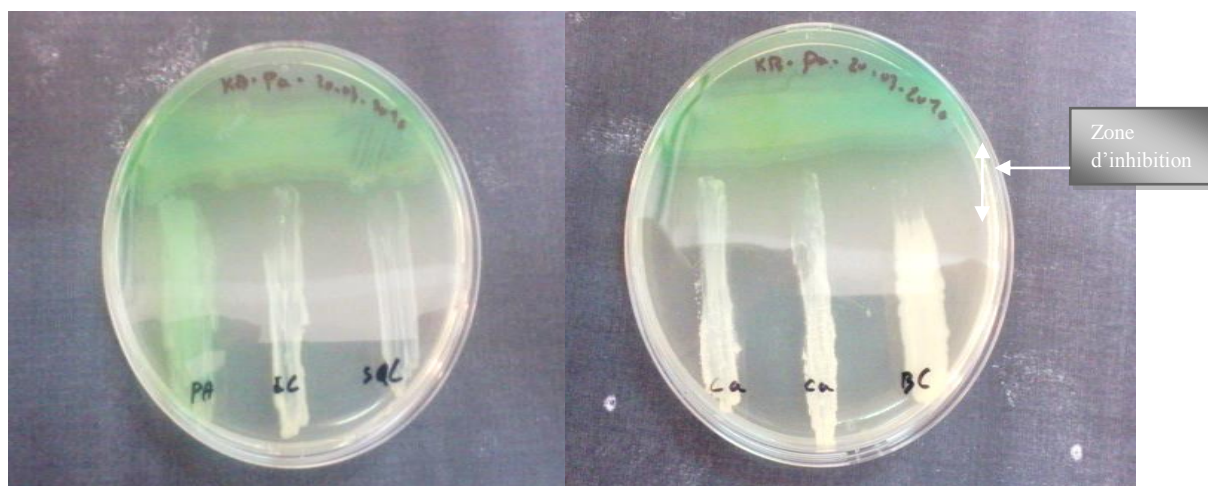


Figure N°8 : Activité antagoniste de la souche PA1 vis-à-vis les souches tests

Ca : *Candida albicans* ATCC 10231

pa : *Pseudomonas aeruginosa*

Ca : *Candida*

Ec : *Escherichia coli* ATCC 25922

Bc : *Bacillus cereus* ATCC10876

Sa : *Salmonelle*

3. L'extraction de la pyocyanine

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

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

L'activité de l'extrait pyocyanique de PA1 a été évaluée par la méthode de diffusion par disque. Les résultats sont présentés dans le tableau n°5 qui représente la moyenne et l'écart type de la zone d'inhibition générée par notre extrait vis- à- vis les souches pathogènes testées.

Tableau N°5 : l'effet inhibiteur de l'extrait la pyocyanine sur les pathogènes testées.

L'extrait dilué de pyocyanine Souche testes	Moyenne de taux d'inhibition	Ecart types
<i>Salmonelle</i>	14	1
<i>Staphylococcus aureus 1</i>	19.33	0.58
<i>Staphylococcus 2</i>	17.66	0.57
<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	10.67	1.15
<i>Candida albicans ATCC 10231</i>	14.66	1.15
<i>Bacillus cereus ATCC10876</i>	12.66	0.57

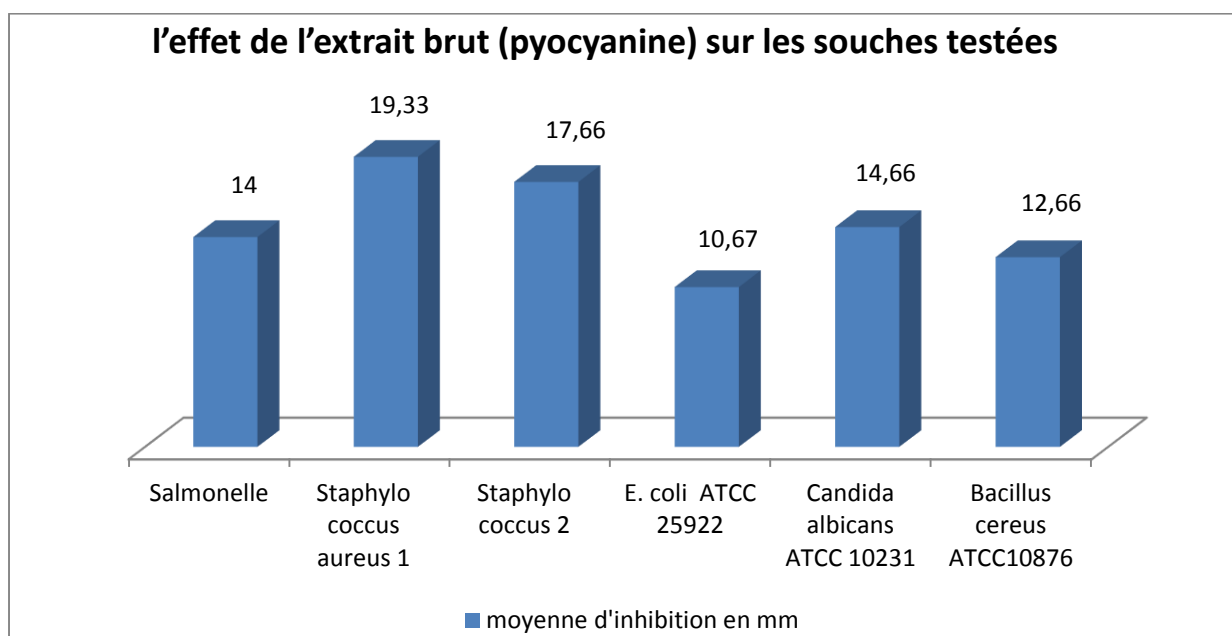


Figure N° 9: L'effet de l'extrait brut (pyocyanine) sur les souches testées.

L'extrait brut de *Pseudomonas aeruginosa* (PAI) a montré un important effet inhibiteur contre les microorganismes étudiés. Toutes les souches microbiennes ont été inhibées avec une moyenne d'inhibition qui varie d'une souche à une autre. Les microorganismes les plus sensibles étaient *Staphylococcus 1* et *Staphylococcus 2* : et leurs moyennes des zones d'inhibitions étaient 19.33mm et 17.66mm respectivement.

L'extrait a exercé une activité assez remarquable contre *Bacillus cereus* ATCC10876, *Salmonelle* et *Candida albicans* ATCC 10231 avec une moyenne d'inhibition qui varie de 12 à 14.66 mm, l'effet inhibiteur le plus faible a été remarqué chez *Escherichia coli* ATCC 25922.

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



Figure N°10 : l'effet de l'extrait brut (pyocyanine) sur les souches testées.

1 : *Bacillus cereus* ATCC10876

2 : *Staphylococcus aureus* 1

3 : *Candida albicans* ATCC 10231

4. L'extraction de pyoverdine

L'extraction de la pyoverdine nous a donné un surnageant de couleur jaune. La phase organique contenant la pyoverdine, est d'abord filtrée, ensuite évaporée sous vide. L'extrait sec de couleur jaune verdâtre est remis en suspension dans le méthanol.

4.1. L'activité antimicrobienne et antifongique de l'extrait brut de la pyoverdine

L'activité de l'extrait brut de pyoverdine de PAI a été évaluée par la méthode de diffusion par disque. Les résultats sont présentés dans le tableau n°6 qui représente la moyenne et l'écart type de la zone d'inhibition générée par l'extrait brut pour chaque souche testée.

Tableau N° 6: l'effet inhibiteur de l'extrait pur (pyoverdine) sur les souches teste

L'extrait pur de pyoverdine	Moyenne de taux d'inhibition	Ecart types
Souche testes		
<i>Salmonelle</i>	10.33	1.53
<i>Staphylococcus aureus 1</i>	9	0
<i>Staphylococcus 2</i>	11.33	2.08
<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	10.33	1.15
<i>Candida albicans ATCC 10231</i>	7.66	0.58
<i>Bacillus cereus ATCC10876</i>	8.66	1.15

Remarque : les valeurs des zones de l'inhibition indiquée dans le tableau en millimètre.

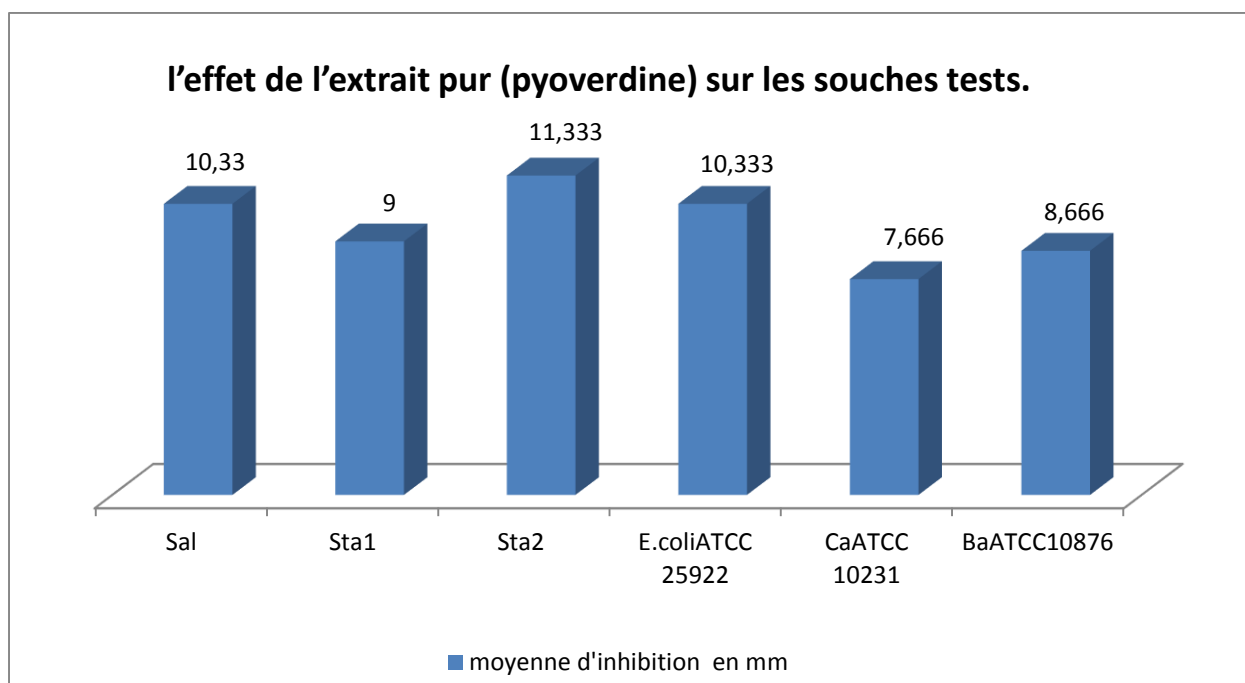


Figure N°11 : l'histogramme représente l'effet inhibiteur de l'extrait brut (pyoverdine) sur les souches pathogènes testées

D'après les résultats regroupés dans le tableau (**tableau n° 6**) nous avons pu évaluer l'activité antimicrobienne en observant le pouvoir inhibiteur de notre échantillon d'extrait brut de la pyoverdine sur les microorganismes pathogènes testés. Nous constatons que les souches *Staphylococcus aureus 2*, *Escherichia coli ATCC 25922* et *Salmonelle* sont très sensibles à ce métabolite avec une moyenne des diamètres d'inhibition de 11.33 mm, 10.33mm et 10.33 mm respectivement.

Cependant les souches *Bacillus cereus* ATCC10876 et *Staphylococcus aureus* 1, ont aussi une sensibilité remarquable vis-à-vis cet extrait dont les diamètres étaient successivement (8.66 mm et 9 mm).

L'extrait brut de la pyoverdine n'exerce aucun effet contre *Candida albicans* ATCC 10231 par rapport aux autres souches citées auparavant. Ceci est en accord avec les travaux de Klopper et al, 1980 qui a montré que les *Pseudomonas* utilisent plusieurs mécanismes pour la suppression des pathogènes parmi lesquels on cite la production des sidérophores. En effet, le rôle des sidérophores est très important pour la survie, la persistance et surtout le contrôle du métabolisme du fer des souches productrices (Dowling et O'Gara, 1994).

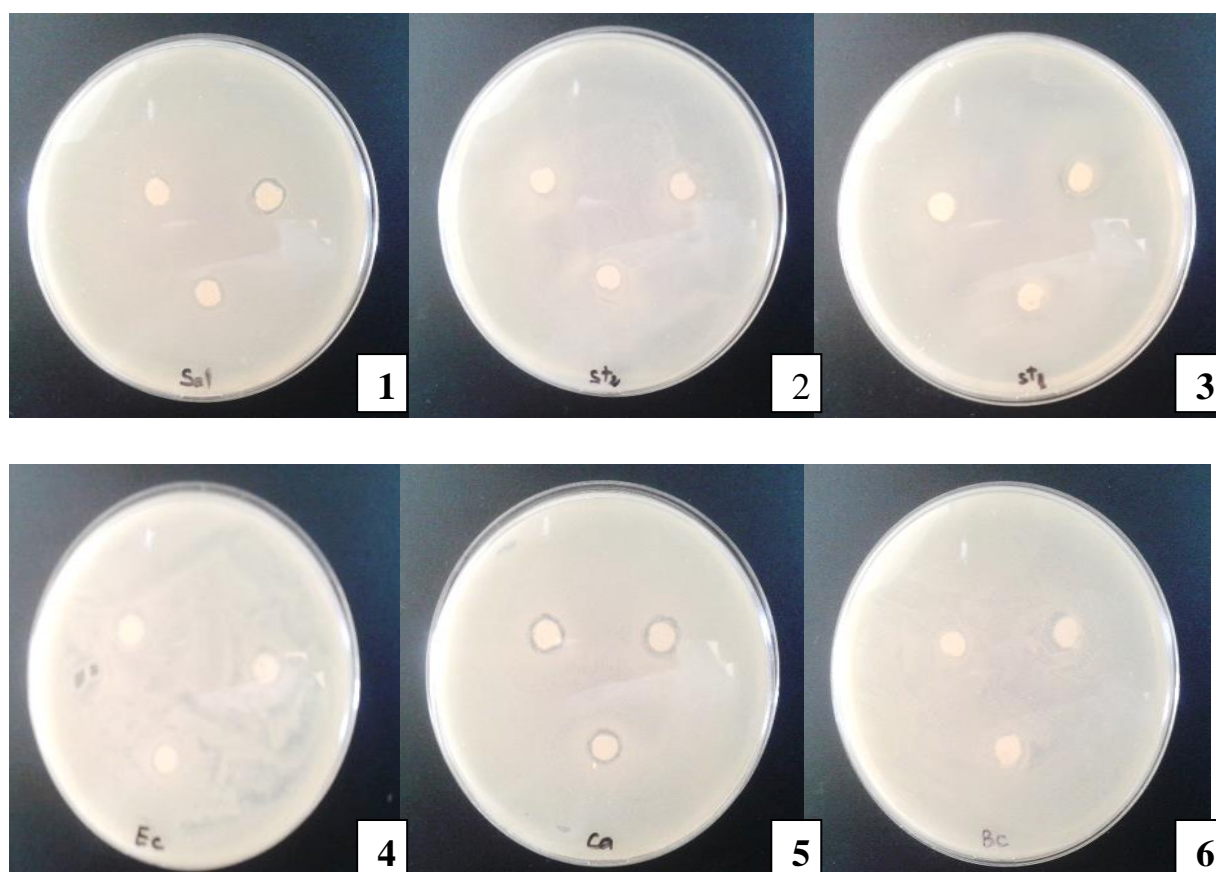


Figure N° 12 : l'effet de l'extrait dilué sur les souches 1,2, 3, 4, 5 et 6

1 : *Salmonelle*

2 : *Staphylococcus aureus* 1

3 : *Staphylococcus* 2

4 : *Escherichia coli* ATCC 25922

5 : *Candida albicans* ATCC 10231

6 : *Bacillus cereus* ATCC1087

5. Effet de la salinité et de température sur la production de la pyocyanine

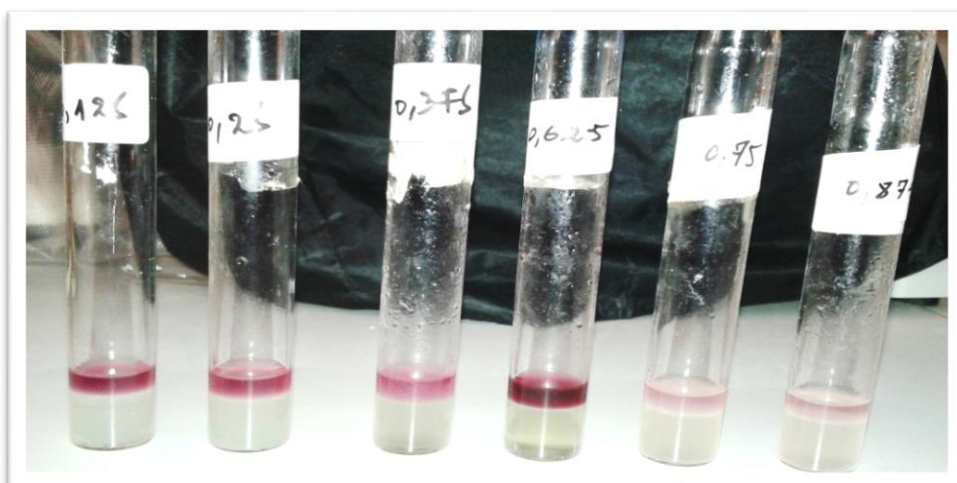


Figure N°13 : production de la pyocyanine sur milieu king A liquide à 28°C

Tableau N°7 : L'effet de la salinité sur la production de pyocyanine à température 28 °C

Concentration de NaCl	Absorbance	Concentration de pyocyanine
2.5	1.935	34.28
5	2.522	43.05
7.5	2.546	43.46
10	2.630	44.89
12.5	2.637	45.01
15	2.460	41.99
17.5	2.420	41.31
20	2.350	40.11
25	1.630	27.82
30	0.376	6.41

Longueur d'onde=520

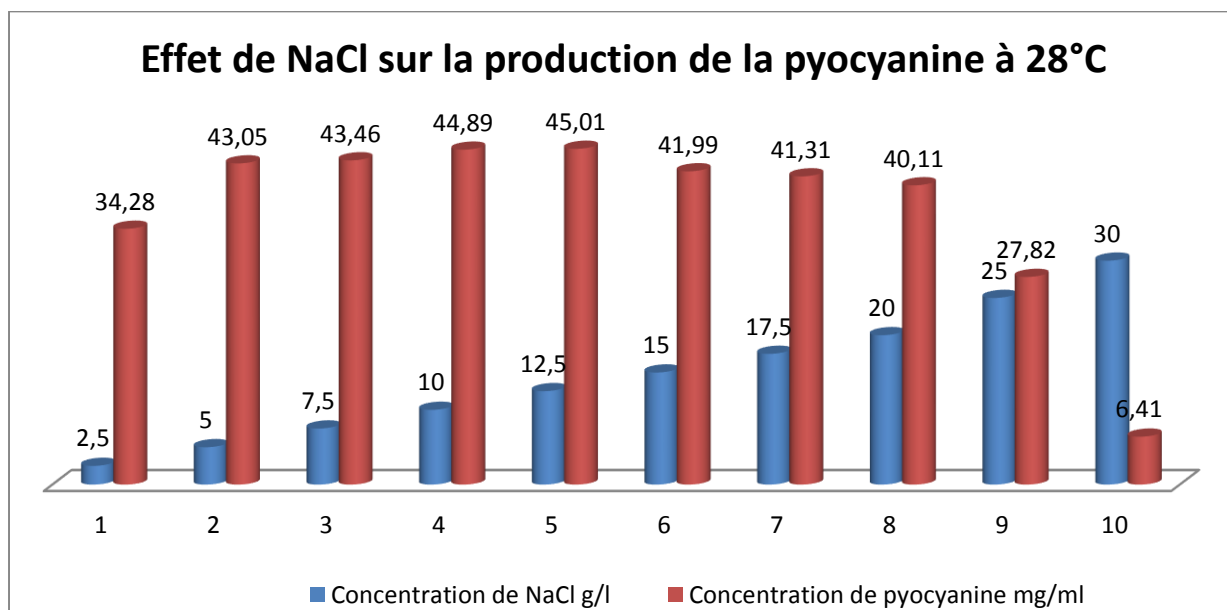


Figure N°14: L'effet de NaCl sur la production de pyocyanine à température 28 °C.

D'après les résultats mentionnés dans les histogrammes on Remarque que la production de la pyocyanine dépend de la concentration du NaCl dans le milieu.

La production de la pyocyanine dans un milieu contenant différents concentration de NaCl à 28 °C augment proportionnellement avec la salinité pour une gamme de concentration qui varie de 2.5 jusqu'à 12, 5 g/l. la meilleure production est remarquée dans un milieu contenant 12,5 g/l de NaCl à raison de 45.01 mg/l de pyocyanine. L'augmentation de la salinité au-dessus de 12.5 g/l provoque une chute de la production qui atteint 6.41 mg/l pour une concentration de NaCl équivalente à 30g/l.

Tableau N°8 : L'effet de la salinité sur la production de la pyocyanine à 30°C

Concentration de NaCl	Moyen de Concentration de pyocyanine	Ecart type
0	5.78	0.085
2.5	27.15	0.011
5	27.09	0.075
7.5	36.91	1.306
10	44.91	0.055
12.5	51.21	0
15	41.72	0.107
17.5	37.05	0.080
20	29.27	0.041
25	17.39	0.32
30	0.99	0.021

Longueur d'onde = 520

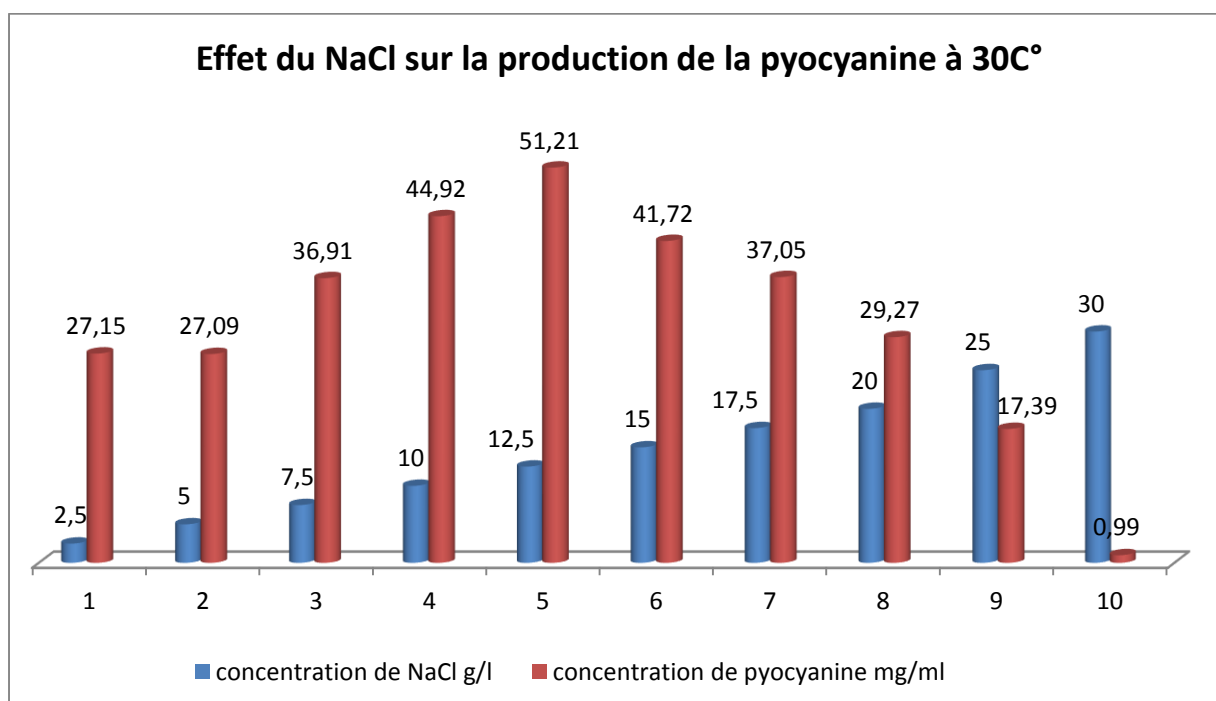


Figure N°15 : L'effet de NaCl sur la production de pyocyanine à température 30 °C.

En culture de King A à différentes concentration de salinité pour une température de fermentation de 30°C la sécrétion de ce métabolite dans le surnageant augmente d'une façon significative avec l'ajout croissant du NaCl dans un éventail de concentration qui varie de 2.5

jusqu'à 12,5 g/l, après cette dernière en remarque une diminution graduelle de la production avec une diminution brusque égale 0.99 mg/ml pour un milieu préparé à 30g/l du NaCl.

Tableau N° 9: L'effet de la salinité sur la production de la pyocyanine à 37°C

Concentration de NaCl	Moyenne de concentration de pyocyanine	Ecart type
2.5	12.59	0.015
5	11,24	0.028
7.5	13.95	0.023
10	21.97	0.005
12.5	9.41	0.023
15	7.91	0.011
17.5	6.31	0.023
20	5.21	0.023
25	2.85	0.025
30	1.59	0.017

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

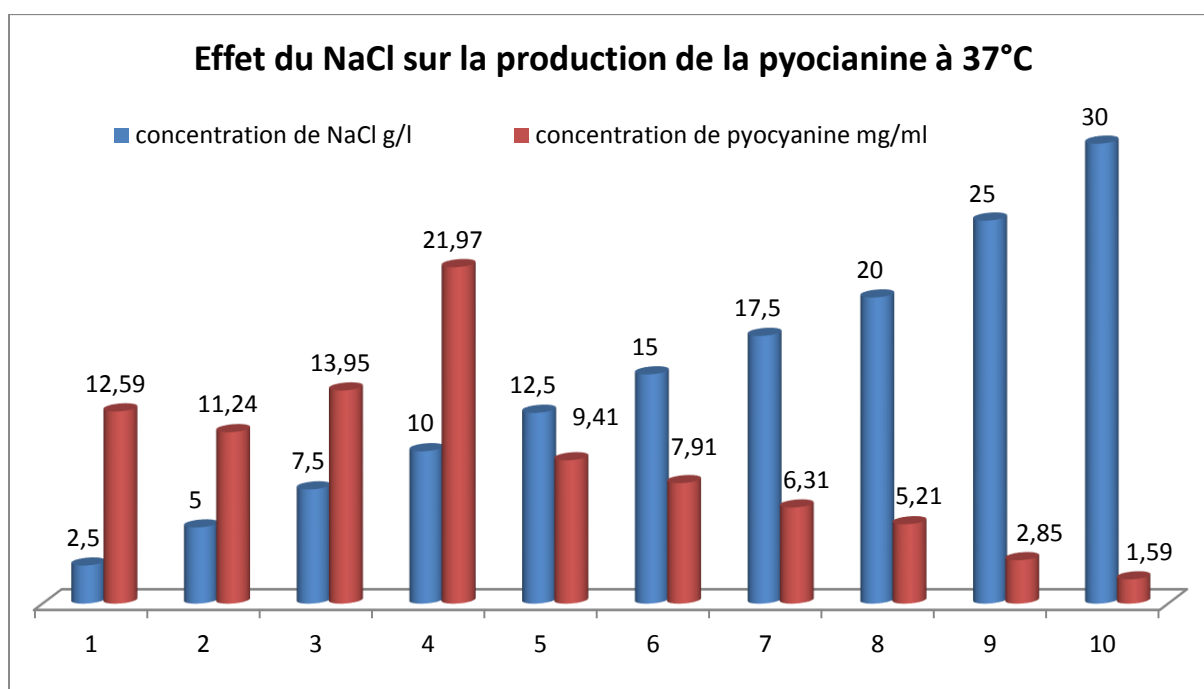


Figure N°16: L'effet de la salinité sur la production de pyocyanine à température 37 °C.

Enfin, nous avons testés la production de la pyocyanine dans la gamme des concentrations précédentes pour une température d'incubation de 37°C. Les résultats mentionnés dans le l'histogramme explique l'effet de la température sur la production de métabolite objet d'étude et on remarque un accroissement de la production pour des

concentrations qui s'étale jusqu'à 10g/l de NaCl, après ce seuil la sécrétion de pyocyanine chute d'une façon remarquable. La meilleure concentration produite par notre souche dans cette condition de température est de 21.97mg/ml.

Les résultats obtenus dans cette étude nous a permis de conclure que notre souche a sécrété un maximum de pyocyanine dans une condition de salinité égale à 12.5g/l et une température de fermentation de 30°C. Prabhakaran *et al*.,2014 on testés l'effet de salinité sur la production de la pyocyanine et on trouver que les meilleurs niveaux de la sécrétion de ce métabolite sont détectés pour une composition des milieux de culture de fermentation à une salinité de 5 à 10g/l de NaCl avec une moyenne de production de 25mg/ml.

6. Effet de la salinité et de température sur la production de la pyoverdine

Tableau N°10 : L'effet de la salinité sur la production de la pyoverdine à 28°

Concentration de NAACL	Moyenne de Concentration de pyoverdine	ecartype
2.5	16.98	0.21
5	19,58	0.23
7.5	29,23	0.02
10	29,66	0.02
12.5	47,66	0.04
15	36,23	0.08
17.5	32,26	0.05
20	31,19	0.07
25	28,47	0.02
30	20,94	0.01

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

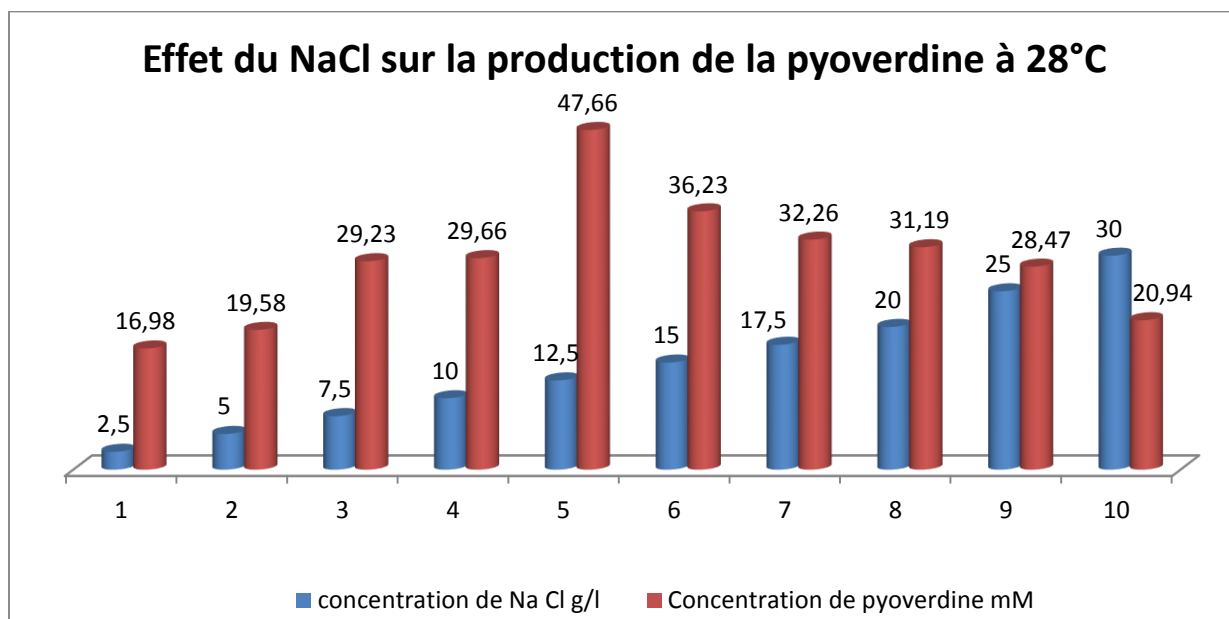


Figure N°17 : L'effet du NaCl sur la production de pyoverdine à température 28 °C.

Notre étude a montré que la production de pyoverdine est influencé par le degré de salinité, puisque l'ajout de NaCl dans le milieu provoque une augmentation de la production qui atteinte 47.66 mM à une concentration de 12.5 g/l de NaCl. Le surdosage avec des concentrations élevées de NaCl réduit la production par une corrélation proportionnelle.

Tableau N°11 :L'effet de la salinité sur la production de la pyoverdine à 30°C

Concentration de NaCl	Moyenne de Concentration de pyoverdine	Ecartype
2.5	33,31	0.011
5	33,72	0.242
7.5	36,72	0.02
10	37,66	0.011
12.5	41,33	0.050
15	56,16	0.111
17.5	40,65	0.050
20	39,89	0.02
25	35,98	5.184
30	33,41	0.011

Longueur d'onde= 400

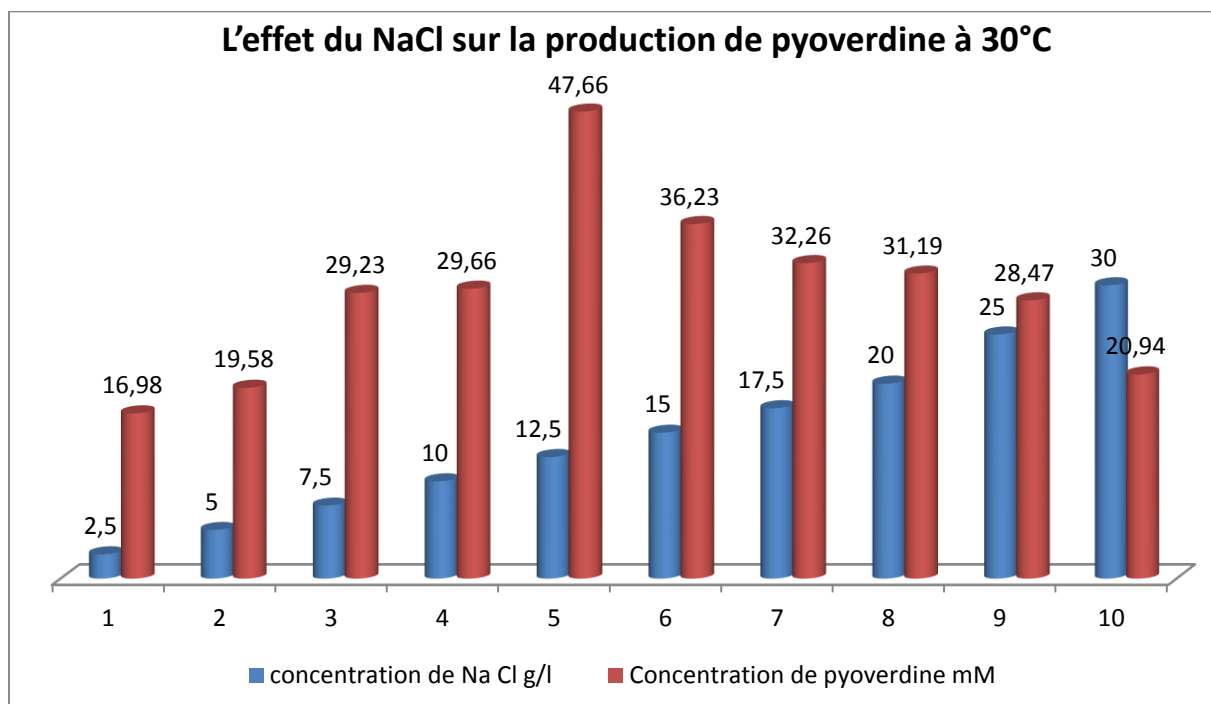


Figure N°18: L'effet du NaCl sur la production de pyoverdine à température 30 °C.

Nous avons donc réexaminé l'effet de salinité pour une température de 30°C, dans cette condition les résultats obtenus confirme l'effet positif du NaCl sur la production de la pyoverdine. La souche testée sécrète un maximum de ce métabolite qui atteint 56.16 mM pour une concentration de NaCl de 15 g/l et on peut conclure que la température idéale de production est de 30°C.

Conclusion

Conclusion

Nous avons montré dans cette étude les potentialités de production des métabolites secondaires chez *Pseudomonas aeruginosa*. La production de ces substances à activité antibiotique procure un atout majeur dans l'antagonisme microbien pour la souche productrice.

L'extraction des deux métabolites pyocyanine et pyoverdine en utilisant le milieu King A et King B liquideensemencé par *Pseudomonas aeruginosa* est faite en utilisant le chloroforme et le méthanol qui sont considéré comme des solvants efficace. D'après nos résultats, nous avons montré que les deux extraits obtenus (pyocyanine et pyoverdine) présentent un effet inhibiteur sur toute la gamme des souches pathogènes testées, Le meilleur résultat a été remarqué contre *Staphylococcus* 1 et *Staphylococcus* 2 pour un extrait pyocyanique par contre la pyoverdine à un effet inhibiteur remarquable vis à vis *Staphylococcus aureus* 2, *Escherichia coli* ATCC 25922.

L'étude de la production de la pyocyanine et la pyoverdine dans des milieux de King A et B additionnés par différentes concentrations de salinité nous a permis de conclure que la production de ces deux métabolites secondaires par la souche de *Pseudomonas aeruginosa* objet d'étude dans ce travail est influencée par la composition de milieu de culture et la variation de température. Laperformance de la souche dans la sécrétion de la pyocyanine et de la pyoverdine augment d'une façon significative par l'augmentation de la salinité. L'accroissement de la concentration de ces métabolites a été distingué à une température de 30°C .La plus haut concentration de pyocyanine libéré dans le surnageant a été détecté dans une culture de King A liquide contenant 12,5 g/l de NaCl à raison de 51.2 mg/ml pour une température incubation de 30°C. La meilleure production de pyoverdine a été repérée pour un milieu de King B liquide contenant 15 g/l de NaCl sous une température d'incubation de 30°C à raison de 56.16 mg/l.

Référence bibliographique

Références bibliographiques

- ✚ Abdallah, M.A. and Pattus, F. (2000) Siderophores and Iron-transport in Microorganisms. *J Chin Chem Soc*, 47, 1-20.
- ✚ Achouak, W., Sutra, L., Heulin, T., Meyer, J.M., Fromin, N., Degraeve, S., Christen R. and Gardan, L., (2000). *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Syst. Evolution. Microbiol.* 50 : 9–18.
- ✚ Ait-Tayeb, L.A., Ageron, E., Grimont, F. and Grimont, P.A.D., (2005). Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Res. Microbiol.* 156: 763–773.
- ✚ Albrecht-Gary, A.M., Blanc, S.R., Ocaktan, A.Z. and Abdallah, M.A. (1994) Bacterial iron transport coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg Chem*, 33, 6391-6402.
- ✚ Anzai, Y., Kim, H., Park, J-Y., Wakabayashi, H. and Oyaizu, H., (2000). Phylogenetic affiliation of the *pseudomonads* based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1563–1589
- ✚ Arunkumar G., Rao S.G. & Shivananda P.G. (1997). Anti-Staphylococcal activity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Science* 72, 580-582.
- ✚ Avril, J. M., Dabernat, H., et Monteil, D. H. (2000). *Bactériologie clinique. 3^{ème} Ed. Ed* Elsevier. Paris. 602 P
- ✚ Bangera, M. G. and Thomashow, L. S., 1996. Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:83–90.
- ✚ Battle, S.E., Rello, J. and Hauser, A.R., (2009). Genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 290: 70–78.
- ✚ Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Meyer, J-M and Spröer, C., (2007). *Pseudomonas lurida* sp. nov., a fluorescent species associated with the phyllosphere of grasses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (5): 979-985.
- ✚ Bergey, D. H. ET American Society for Microbiology. (1923). *Bergey's manual of systematic bacteriology* 1st edition. John G. Holt et al (editors), Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA.
- ✚ Bielecki, P., Glik, J., Kawecki, M. & Martins dos Santos, V. A. (2008). Towards understanding *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections by profiling gene expression. *Biotechnol Lett* 30, 777-790.
- ✚ Blachnitsky, E.O., Wengenmayer, F., Kurtz, G. (1974) D-galactose dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*: purification, properties and structure. *Eur J Biochem* 47, 235-250.

Références bibliographiques

- ✚ Branski, L. K., Al-Mousawi, A., Rivero, H., Jeschke, M. G., Sanford, A. P. & Herndon, D. N. (2009). Emerging Infections in Burns. *Surg Infect (Larchmt)* 10, 389-397.
- ✚ Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V. & Jadeja, L. (1983). Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 5, 279-313.
- ✚ Boos, W., Ehmann, U., Forkl, H., Klein, W., Rimmele, M., Postma, P. (1990) Trehalose transport and metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172, 3450-3461
- ✚ Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L. (2000). The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .20: 51-63.
- ✚ Bozal, N., Montes, M.J. and Mercade, E. (2007). *Pseudomonas guineae* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium from an Antarctic environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2609–2612.
- ✚ Budzikiewicz, H., 1993. Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol. Rev.* 104: 209–228.
- ✚ Campbell, J.I.A., Jacobsen, C.S., Sorensen, J. (1995). Species variation and plasmid incidence among fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from agricultural and industrial soils. *FEMS Microbiol Ecol* 18, 51-62.
- ✚ Campbell, J.J.R., Ramakrishnan, T., Linnes, A.G., Eagles, B.A. (1956). Evaluation of the energy gains by *Pseudomonas aeruginosa* during the oxidation of glucose to 2-ketogluconate. *Can J Microbiol* 2, 304-312
- ✚ Carcanague, D.R., 1997. Novel derivatives of pseudomonic acid. *Bioorganic Medicinal Chem. Lett.* 7(21): 2805-2808.
- ✚ Carek, P. J., Dickerson, L. M. & Sack, J. L. (2001). Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am Fam Physician* 63, 2413-20.
- ✚ Chang, Y.F., Adams, E. (1971). Induction of separate catabolic pathways for L-lysine and D-lysine in *Pseudomonas putida*. *Biochem Biophys Res Comm* 45, 570-577
- ✚ Cheryl, A., Nickerson, Ph.D., Arizona State University. URL http://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/experiments/Microbe.html
- ✚ Chet, I., 1987. Trichoderma - application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: *Innovative Approaches to Plant Disease Control*, I. Chet (ed.), John Wiley & Sons: New York. pp. 137-160.
- ✚ Cornelis (Ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Calister Academic Press, Norfolk, UK.)
- ✚ Clays Jossierand, A., Lemanceau, P., Philippot, L. and Lensi, R. (1995). Influence of two plant species (flax and tomato) on the distribution of nitrogen dissimilative abilities within fluorescent *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1745-1749

Références bibliographiques

- ✚ Cooper, R.A., Kornberg, H.L. (1964). The utilization of itaconate by *Pseudomonas sp.* *Biochem J* 91, 82-91
- ✚ Cunin. R., Glansdorff, N., Piérard, A., Stalon, V. (1986). Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol Rev* 50, 314-352
- ✚ Csonka. L.N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53:121-147
- ✚ D'Argenio, D. A., Gallagher, L. A., Berg, C. A. & Manoil, C. (2001). *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Bacteriol* 183, 1466-1471.
- ✚ Dagley, S. (1986). Biochemistry of aromatic hydrocarbon degradation in *Pseudomonas*. In: *The Bacteria* (JR Sokatch, LN Ornston, eds), Academic Press, 10, 527-555.
- ✚ Defago, G. 1993. 2,4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant Pathol.* 42: 311–312
- ✚ Défago, G., Berling, C.H. and Burger, U., 1990. Suppression of Black Root Rot of Tobacco and Other Root Diseases by Strains of *Pseudomonas fluorescens*: Potential Applications and Mechanisms. In: *Biological Control of Soilborne Plant Pathogens*. Hornby D, (ed). Oxon, UK: CAB International, Wellingford, pp. 93–108.
- ✚ De Ley, J. (1960). Comparative carbohydrate metabolism and localization of enzymes in *Pseudomonas* and related micro-organisms. *J Appl Bacteriol* 23, 400- 441.
- ✚ De Ley, J., Doudoroff, M. (1957). The metabolism of Dgalactose in *Pseudomonas saccharophila*. *J Biol Chem* 213, 745-757.
- ✚ De Souza, J. T., M. De Boer, P. DeWaard, T.A. Van Beek, et J.M. Raaijmakers. 2003. Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7161-7172
- ✚ Dieckmann, R., Graeber, I., Kaesler, I., Szewzyk, U. and von Dohren, H. (2005). Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the sula ridge by intact-cell-MALDI-TOFmass spectrometry (ICM-MS). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 539–548.
- ✚ Dowling, D.N. and O'Gara, F, 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.* 12: 133-140.
- ✚ Dubuis, C. and Haas, D., 2007. Cross-species GacA-controlled induction of antibiosis in pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 650-654.
- ✚ Dwivedi, D. and Johri, B.N., 2003. Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation. *Curr. Sci.* 85(12): 1693-1673.
- ✚ Dwivedi, D., and B. N. Johri. 2003. Antifungals from fluorescent pseudomonads: Biosynthesis and regulation. *Current Science* 85:1693-1703.

Références bibliographiques

- ✚ Eisenberg, R.C., Butters, S.J., Quay, S.C., Friedman, S.B. (1974). Glucose uptake and phosphorylation in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 120, 147- 153
- ✚ Elander, R.P., Mabe, J.A., Hamili, R.H. and Gorman, M., 1968. Metabolism of tryptophane by *Pseudomonas aureofaciens*. VI. Production of pyrrolnitrin by selected *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol.* 16:753-758.
- ✚ El-Sayed, A.K., Hothersall, J. and Thomas, C.M., 2001. Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Microbiol.* 147: 2127-2139.
- ✚ Entner, N., Doudoroff, M. (1952). Glucose and gluconic oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *J Biol Chem* 196, 853-862.
- ✚ Euzeby, J.P. (2008). List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. URL <http://www.bacterio.cict.fr/>.
- ✚ Fenton, A.M., Stephens, P.M., Crowley, J. O'Callaghan, M. and O'Gara, F., 1992. Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3873-3878.
- ✚ Fernandez, D. U., R. Fuchs, M. Schäfer, H. Budzikiewicz et J. M. Meyer. 2003. The pyoverdinin of *Pseudomonas fluorescens* G173, a novel structural type accompanied by unexpected natural derivatives of the corresponding ferrioxalate. *Z. Naturforsch* 58,(1-2):1-10.
- ✚ Fothergill, J.C., Guest, J.R. (1977). Catabolism of L-lysine by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 99, 139-155
- ✚ Fridlender, M., Inbar, J. and Chet. I., 1993. Biological control of soil-borne plant pathogens by a β -1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* 25:1211–1221.
- ✚ Gardan, L., Bella, P., Meyer, J.M., Christen, R., Rott, P., Achouak, W. and Samson, R. (2002). *Pseudomonas salomonii* sp. nov., pathogenic on garlic, and *Pseudomonas palleroniana* sp. nov., isolated from rice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 2065–2074.
- ✚ Garrity, G.M. (2005). The Proteobacteria - Part B: The Gammaproteobacteria. In 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'. (Springer: New York).
- ✚ Godfrey, A.J., Hatlelid, L., Bryan, L.E. (1984). Correlation between lipopolysaccharide structure and permeability resistance in β -lactam resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Agents. Chemother.* 26: 181-186.
- ✚ Golovleva, L.A., Maltseva, O.V. and Solyanikova, I.P. (1992). Metabolism of foreign compounds in *Pseudomonas* spp. In: *Pseudomonas*, Molecular Biology and Biotechnology (Galli, E., Silver, S., Witholt, B., eds), Am. Soc. Microbiol, Washington, DC, pp. 231-238.
- ✚ Gottschalk, G. (1979). Catabolic activities of aerobic heterotrophs. I. Degradation of polymers by exoenzymes. In : *Bacterial Metabolism* (MP Starr, ed), Springer-Verlag, New York, 114-116.

Références bibliographiques

- ✚ Gottschalk, G. (1979). Catabolic activities of aerobic heterotrophs. III. Growth with organic acids. In: *Bacterial Metabolism* (MP Starr, ed), Springer-Verlag, New York, 118-123.
- ✚ Gurtler, V. and Stanisich, V.A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. *Microbiol.* 142: 3–16.
- ✚ Gutterson, N., Ziegler, J.S., Warren, G.J. and Layton, T.L., 1988. Genetic determinants for catabolite induction of antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* HV37a. *J. Bacteriol.* 170: 380-385.
- ✚ Haas, D., Galiman, M., Gamper, M., Zimmermann, A. (1990) .Arginine network of *Pseudomonas aeruginosa*: Specific and global controls. In : *Pseudomonas Biotransformations, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology* (S Silver, AM Chakrabarty, B Iglewski, S Kaplan, eds), Am Soc Microbiol, Washington, DC, 303-313
- ✚ Haas ,D.,Keel,C.,Laville,J.,Maurhofer, M.,Oberhansli, T.,Schanider,U., voisard, C.,Wuthrich, B. and Dévago, G. (1991). Secondary metabolites of *pseudomonas fluorescens* strain CHA0 involved in the suppression of root diseases. In: *Advances Molecular Genetics of Plant-microbe Interaction* (H Hennecke, DPS Verma, eds Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1,450-456.
- ✚ Haas, D., and C. Keel. 2003. Regulation of antibiotic production in rootcolonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathology* 41:117-153.
- ✚ Haas, D., et G. Defago. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *pseudomonads*. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 307-319
- ✚ Hammer, P.E., Hill, D.S., Lam, S.T., Van Pee, K.H. and Ligon, J.M., 1997. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2147-2154.
- ✚ Harwood, C.S., Rivelli, M., Ornston, L.N. (1984). Aromatic acids are chemoattractants for *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 160, 622-628
- ✚ Hassan, H. M. & Fridovich, I. (1980). Mechanism of the antibiotic action pyocyanine. *J Bacteriol* 141, 156-163.
- ✚ Hogan, D.A. et Kolter, R.(2002). *Pseudomonas-Candida* interactions: An Ecological Role for Virulence Factors. *Science* 296,2229-2232.
- ✚ Holloways, B.W. (1992). *Pseudomonas* in the late twentieth century. In: *pseudomonas, Molecular Biology and biotechnology* (E Gali, S Sliver, B Witholt, eds), *Am Soc Microbiol, Washington, DC*, 1-8.
- ✚ Homma, Y., Kato, Z., Hirayama, F., Konno, K., Shirahama, H. and Suzui, T., 1989. Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biol. Biochem.* 21:723-728.

Références bibliographiques

- ✚ Howell, C. R. and Stipanovich, R. D., 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathol.* 69: 480-482.
- ✚ Howell, C.R. and Stipanovic, R.D., 1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedling by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, Pyoluteorin. *Phytopathol.* 70: 712-715.
- ✚ Hug D.H., Roth, D., Hunter, J. (1968). Regulation of histidine catabolism by succinate in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 96, 396-402.
- ✚ Hunt JC, Phibbs JR (1983) Regulation of alternate peripheral pathways of glucose catabolism during aerobic and anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 154, 793-802
- ✚ Inbar, J. and Chet, I., 1991. Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil borne plant pathogens by this bacterium. *Soil Biol. Biochem.* 23: 973-978.
- ✚ Johnson, J. L. et N. J. Palleroni. (1989). Deoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species, *International Journal of Systematic Bacteriology* 39:230-235.
- ✚ Katz, E. and Demain, A. L., 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacteriol. Rev.* 40: 449-474.
- ✚ Kempf, B., et E. Bremer.1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* 170: 319-330.
- ✚ Kerr, J. R. (1994). Suppression of fungal growth exhibited by *pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 32,525-527.
- ✚ Kerr, J. R., Taylor, G. W., Rutman, A., Hoiby, N., Cole, P. J et Wilson, R. (1999).*pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxphenazine inhibit fungal growth. *J Clin Pathol* 52,385-387.
- ✚ Kirner, S., Hammer, P.E., Hill, D.S., Altmann, A., Fischer, I., Weislo, L.J., Lanahan, M., van Pée, K.H. and Ligon, J.M., 1998. Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 180(7): 1939-1943.
- ✚ Kleinkauf, H. and von Dohren, H., 1996. A non ribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 236:335-351.
- ✚ Knowles, R. (1982). Denitrification. *Microbiol Rev* 46, 43-70.
- ✚ Lai, Q. and Shao, Z. (2008). *Pseudomonas xiamenensis* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1911-1915. Mulet, M., Lalucat, J. and García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* 12(6):1513-1530.

Références bibliographiques

- ✚ Latour, X., Corberand, T., Laguerre, G., Allard, F., Lemanceau, P. (1996). The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl Environ Microbiol* 62, 2449-2456.
- ✚ Latour, X. and Lemanceau, P. (1997). Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp., *Agronomie*, 17: 427–443.
- ✚ Lessie, T.G., Phibbs, P.V. J. r (1984). Alternative pathways on carbohydrate utilization in *Pseudomonads*. *Annu Rev Microbiol* 38, 359-387.
- ✚ Lewis, K.F., Blumenthal, H.J., Weinrack, R.S., Weinhouse, S. (1955). An isotope tracer study of glucose catabolism in *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem* 216, 273-278.
- ✚ Lelliott, R.A., Billing, E. and Hayward, A.C., (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *J. Appl. Bacteriol.* 29: 470–489.
- ✚ Lignon, J.M., Hill, D.S., Hammer, P.E., Torkewitz, N.R., Hofmann, D., Kempf, H.J. and van Pee, K.H. (2000). Natural products with antifungal activity from *pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Management Science* 56:688-695.
- ✚ Lim, H.S., Kim, Y.S. and Kim, S.D., 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation and Antifungal Mechanism against *Fusarium solani*, an Agent of Plant Root Rot. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(2): 510-516.
- ✚ Liu, R., Liu, H., Feng, H., Wang, X., Zhang, C.X., Zhang, K.Y. and Lai, R. (2008). *Pseudomonas duriflava* sp. nov., isolated from a desert soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1404–1408.
- ✚ Locatelli, L., Tarnawski, S., Hamelin, J., Rossi, P., Aragno, M. and Fromin, N. (2002). Specific PCR amplification for the genus *Pseudomonas* targeting the 30 half of 16S rDNA and the whole 16S-23S rDNA spacer. *Syst. Appl. Microbiol.* 25: 220–227.
- ✚ Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B. and Kubicek, C.P., 1996. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.* 178: 6382–6385.
- ✚ Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2, 1051-1060.
- ✚ Mahajan-Miklos, S., Tan, M. W., Rahme, L. G. & Ausubel, F. M. (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96, 47–56.
- ✚ Manaia, C.M. and Moore, E.R., (2002). *Pseudomonas thermotolerans* sp. nov., a thermo-tolerant species of the genus *Pseudomonas* sensu stricto. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 2203–2209.

Références bibliographiques

- ✚ Marshall, V.D., Sokatch, J.R. (1972). Regulation of valine catabolism in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 110, 1073-1081.
- ✚ Martin, R.R., Marshall, V.D., Sokatch, J.R., Unger, L. (1973). Common enzymes of branched-chain amino acid catabolism in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 115, 198-204.
- ✚ Martin, C. (2007). Bacilles à Gram négatif non fermentaires. In : Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R. Bactériologie médicale: Techniques usuelles. Ed Elsevier Masson . Paris. P : 330-343.
- ✚ Martin, F. N. and Loper, J. E., 1999. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: Ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18:111-181.
- ✚ Martinez Blanco, H., Reglero, A., Rodriguez Aparicio, L.B., Luengo, J.M. (1990). Purification and biochemical characterization of phenylacetyl-CoA ligase from *Pseudomonas putida*. A specific enzyme for the catabolism of phenylacetic acid. *J Biol Chem* 265, 7084-7090.
- ✚ Matsubara, T. and Zumft, W. G. (1982). Identification of a copper protein as part of the nitrous oxide-reducing system in nitrite-respiring (denitrifying) *pseudomonads*. *Arch Microbiol.* 132: 322-328.
- ✚ Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Mettraux, J.P. and Défago, G., 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathol.* 84: 139–146.
- ✚ Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C., Haas, D. and Défago, G., 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. *Phytopathol.* 82(2): 190–195.
- ✚ Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G. & Thomashow, L. S. (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1 carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 183, 6454-6465.
- ✚ Mazzola, M., Cook, R. J., Thomashow, L. S., Weller, D. M. & Pierson, L. S. 3rd. (1992). Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent *pseudomonads* in soil habitats. *Appl Environ Microbiol* 58, 2616-2624.
- ✚ McSpadden Gardener, B.B. and Fravel, D.R., 2002. Biological control of plant pathogens: Research, commercialization, and application in the USA. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2002-0510-01-RV.
- ✚ Mercenier, A., Simon, J.P., Vander Wauven, C., Haas, D., Stalon, V. (1980). Regulation of enzyme synthesis in the arginine deiminase pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 144, 159-163.

Références bibliographiques

- ✚ Meyer, J. M. 2000. Pyoverdins: pigments siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of Microbiology* 174:135-142.
- ✚ Miller, D.L., Rodwell, V.W. (1971). Metabolism of basic amino acids in *Pseudomonas putida*. *J Biol Chem* 246, 2758-2764.
- ✚ Miller, K.J., Wood, J.M. (1996). Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Microbiol* 50, 101-136.
- ✚ Milner, J.L., L. Silo-Suh, J.C. Lee, H. He, J. Clardy, et J. Handelsman. 1996. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3061-3065
- ✚ Müller, J., Boller, T., Wieken, A. (1995). Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Sci* 112, 1-9.
- ✚ Munsch, P., Alatosava, T., Marttinen, N., Meyer, J.M., Christen, R. and Gardan, L. (2002). *Pseudomonas costantinii* sp. nov., another causal agent of brown blotch disease, isolated from cultivated mushroom sporophores in Finland. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1973–1983.
- ✚ Nakayama, T., Y. Homma, Y. Hashidoko, J. Mizutani, et S. Tahara. 1999. Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4334-4339.
- ✚ Newell CP, Lessie TG (1970) Induction of histidinedegrading enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 104, 596-598
- ✚ Nielsen, M.N., Sørensen, J., Fels, J. and Pedersen, H.C., 1998. Secondary metabolite- and endochitinase-dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3563–3569.
- ✚ Nielsen, T.H., Christophersen, C., Anthoni, U. and Sorensen, J., 1999. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *J. Appl. Microbiol.* 87: 80-90.
- ✚ Nielsen, T.H., Thrane, C., Christophersen, C., Anthoni, U. and Sorensen, J., 2000. Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin - a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *J. Appl. Microbiol.* 89: 992-1001.
- ✚ Nishimori, E., Kita Tsukamoto, K. and Wakabayashi, H. (2000). *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 83–89.
- ✚ Nowak-Thompson, B., Chaney, N., Wing, J. S., Gould, S. J. and Loper, J. E., 1999. Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* 181: 2166–2174.

Références bibliographiques

- ✚ Nowak-Thompson, B., Gould, S.J. and Loper, J.E., 1997. Identification and sequence analysis of the genes encoding a polyketide synthase required for pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Gene*, 204:17–24.
- ✚ Numa, S., Ishimura, Y., Nakazawa, D., Okazaki, T., Hayaishi, O. (1964). Enzymatic studies on the metabolism of glutarate in *Pseudomonas*. *J Biol Chem* 239, 3915-3922A.
- ✚ Ordentlich, A., Elad, Y. and Chet, L., 1988. The Role of Chitinase of *Serratia marcescens* in Biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathol.* 78: 84-88.
- ✚ Ornston, L.N. (1971). Regulation of catabolic pathways in *Pseudomonas*. *Bacteriol Rev* 35, 87-116.
- ✚ Pagés, J.M., Garnotel, E. *Revue Française des Laboratoires*, volume (2003), issue 352, Avil 2003, Pages 57-63.
- ✚ Palleroni, N.J., Doudoroff, M. (1956.) Mannose isomerase of *Pseudomonas saccharophila*. *J Biol Chem* 218, 535-548.
- ✚ Palleroni, N.J., R. Kunisawa, R. Contopoulou, et M. Doudoroff. (1973). Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 23:333-339.
- ✚ Palleroni, N.J. (1984). Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp. 141–171.
- ✚ Parry, M.F., Neu, H.C. (1976). Ticarcillin for treatment of serious infections with gramnegative bacteria. 1. *Infect. Dis.* 134:476-480.
- ✚ Peix, A., Rivas, R., Mateos, P.F., Martinez Molina, E., Rodriguez Barrueco, C. and Velazquez, E. (2003). *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate *in vitro*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 2067–2072.
- ✚ Peix, A., Rivas, R., Santa Regina, I., Mateos, P.F., Martinez Molina, E., Rodriguez Barrueco, C. and Velazquez, E. (2004). *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate solubilizing bacterium isolated from rhizosphere of grasses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 847–850.
- ✚ Peix, A., Berge, O., Rivas, R., Abril, A. and Velazquez, E. (2005). *Pseudomonas argentinensis* sp. nov., a novel yellow pigment-producing bacterial species, isolated from rhizospheric soil in Cordoba (Argentina). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1107–1112.
- ✚ Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J.M., Ramirez Bahena, M.H., Mateos, P.F., Santa Regina, I., Rodriguez Barrueco, C., Martinez Molina, E. and Velazquez, E. (2007). Reclassification of *Pseudomonas aurantiaca* into *Pseudomonas chlororaphis* and proposal of three subspecies, *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp. nov., *P. chlororaphis* subsp.

Références bibliographiques

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

✚ Peix, A., Ramírez Bahena, M.H. and Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evolution*, 9: 1132–1147.

✚ Phillips, A.T., Mulfinger, L.M. (1981). Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate levels in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa* during induction and carbon catabolite repression of histidase synthesis. *J Bacteriol* 145, 1286-1292.

✚ Picard, C., Di Cello, F., Ventura, M., Fani, R. and Guckert, A., 2000. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 948–955.

✚ Pineda, F.J., Antoine, M.D., Demirev, P.A., Feldman, A.B., Jackman, J., Longenecker, M., and Lin, J.S. (2003). Microorganism identification by matrix-assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers. *Ann. Chem.* 75: 3817–3822.

✚ Prabhakaran Priyaja¹, Puthumana Jayesh¹, Neil Scolastin Correya², Balachandran Sreelakshmi¹, Naduthalmuriparambil SSudheer¹, Rosamma Philip², Isaac Sarogeni Bright Singh¹ (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

✚ Preetha R., Jose S., Prathapan S., Vijayan K.K., Jayaprakash N.S., Philip R. & Bright Singh I.S. (2010) An inhibitory compound produced by *Pseudomonas* with effectiveness on *Vibrio harveyi*. *Aquaculture Research* 41, 1452-1461.

✚ Presse therm climat. (2002); 139: 9-13 (© Société française d'hydrologie et de climatologie médicales).

✚ Provonost, M. URL <http://mpronovost.ep.profweb.qc.ca/BIONP1/grammoins.jpg>

✚ Quay, S.C., Friedman, S.B., Eisenberg, R.C. (1972). Gluconate regulation of glucose catabolism in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 112, 291-298

✚ Pukatzki, S., Kessin, R. H. & Mekalanos, J. J. (2002). The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3159-3164.

✚ Ramette, A., Frapolli, M., Fischer-Le Saux, M., Gruffac, C., Meyer, J.M., Défago, G., Sutra, L. and Moëgne-Loccoz, Y. (2011). *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2, 4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl. Microbiol.* 34: 180–188.

✚ Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G. & Ausubel, F. M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268, 899-1902.

Références bibliographiques

- ✚ Rezzonico, F., Zala, M., Keel, C., Duffy, B., Moëgne-Loccoz, Y. and Défago, G. (2007). Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection? *New Phytologist*, 173: 861- 872.
- ✚ Roehl, R.A., Phibbs, P.V. (1982). Characterization and genetic mapping of fructose phosphotransferase mutations in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 149, 897-905.
- ✚ Romanenko, L.A., Uchino, M., Tebo, B.M., Tanaka, N., Frolova, G.M. and Mikhailov, V.V. (2008). *Pseudomonas marincola* sp. nov., isolated from marine environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 706–710.
- ✚ Sawyer, M.H., Baumann, P., Baumann, L., Berman, S.M., Canovas, J.L. (1977). Pathways of D-fructose catabolism in species of *Pseudomonas*. *Arch Microbiol* 112, 49-55.
- ✚ Schleissner, C., Reglero, A., Luengo, J.M. (1997). Catabolism of D-glucose by *Pseudomonas putida* U occurs via extracellular transformation into D-gluconic acid and induction of a specific gluconate transport system. *Microbiology* 143, 1595-1603.
- ✚ Schleissner, C., Olivera, E.R, Fernandez Valverde, M., Luengo, J.M. (1994). Aerobic catabolism of phenylacetic acid in *Pseudomonas putida* U: biochemical characterization of a specific phenylacetic acid transport system and formal demonstration that phenylacetyl-Coenzyme A is a catabolic intermediate. *J Bacteriol* 176, 7667-7676.
- ✚ Schroth, M.N. and Hancock, J.G., 1981. Selected topics in biological control. *Annu. Rev. Microbiol.* 35:453-476.
- ✚ Shoesmith, J.G., Sherris, J.C. (1960). Studies on the mechanism of arginine-activated motility in a *Pseudomonas* strain. *J Gen Microbiol* 22, 10-24
- ✚ Siegel, L.S., Phibbs, P.V. (1979). Glycerol and L-(-glycerol- 3-phosphate uptake by *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Microbiol* 2, 251-256.
- ✚ Stalon, V., Mercenier, A. (1984) L-Arginine utilization by *Pseudomonas* species. *J Gen Microbiol* 130, 69-76.
- ✚ Stalon, V., Ramos, F., Pierard, D., Wiame, J.M. (1972). Regulation of the catabolic ornithine carbamoyltransferase in *Pseudomonas fluorescens*: a comparison with the anabolic transferase and with a mutationally modified catabolic transferase. *Eur J Biochem* 29, 25-35.
- ✚ Stalon, V., Vander Wauven, C., Momin, P., Legrain, C. (1987). Catabolism of arginine, citrulline and ornithine by *Pseudomonas* and related bacteria. *J Gen Microbiol* 133, 2487-2495.
- ✚ Stanier, R.Y., Palleroni, N.J., Doudoroff, M. (1966). The aerobic *pseudomonads*, a taxonomic study. *J Gen Microbiol* 43, 159-271.
- ✚ Stanier, R.Y. and Ornston, L.N.(1973). Aromatic compounds that can be converted to catechol *Adv microbial physiol* 9, 89-151.

Références bibliographiques

- ✚ Styrvold, O.B, Strom, A.R. (1991). Synthesis, accumulation, and excretion of trehalose in osmotically stressed *Escherichia coli* K-12 strains: influence of amber suppressors and function of the periplasmic trehalase. *J Bacteriol* 173, 1187-1192.
- ✚ Spiers, A.J., Buckling, A. and Rainey, P.B. (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiol.* 146: 2345–2350.
- ✚ Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., *et al.* (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406(6799):959-64.
- ✚ Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, et M. Doudoroff. (1966). The aerobic pseudomonads : A taxonomic study. *Journal of General Microbiology* 43:159-271.
- ✚ Thane, C., Nielsen, T. H., Neiendam, M., Sørensen, J. and Olsson, S., 2000. Viscosinamid-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33: 139–146.
- ✚ Thornley, M.J. (1960). The differentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J Appl Bacteriol* 23, 37-52.
- ✚ Thöny Meyer, L. (1997). Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 337-376.
- ✚ Tiedje, J.M. (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory nitrite reduction to ammonium. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms* (AJB Zehnder, ed), Wiley Interscience Publications, New York, 179- 244.
- ✚ Vancura, V. (1988). Plant metabolites in soil. In: *Soil Microbial Association* (V Vancura, V Kunc, eds), Elsevier, Amsterdam, 57-132.
- ✚ Van Laere, A. (1989). Trehalose, reserve and/or stress metabolite? *FEMS Microbiol Rev* 63, 201-210.
- ✚ Vela, A.I., Gutierrez, M.C., Falsen, E., Rollan, E., Simarro, I., Garcia, P., Dominguez, L., Ventosa, A. and Fernandez-Garayzabal, J.F. (2006). *Pseudomonas simiae* sp. nov., isolated from clinical specimens from monkeys (*Callithrix geoffroyi*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2671–2676.
- ✚ Visca, P., Imperi, F. and Lamont, I.L. (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* 15:22-30.
- ✚ Voguu, L., Schlag, S., Biswas, R., Rosenstein, R., Rausch, C. et Gotz, F. (2006). Microevolution of Cytochrome bd Oxidase in Staphylococci and Its Implication in Resistance to Respiratory Toxins Released by *pseudomonas*. *J Bacteriol* 188,8079-8086.

Références bibliographiques

- ✚ Wang, Y., Wilks, J. C., Danhorn, T., Ramos, I., Croal, L. & Newman, D. K. (2011). Phenazine-1- carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition. *J Bacteriol* 193, 3606-3617.
- ✚ Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Mcspadden Gardener, B.B., Thomashow, L.S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 309-348.
- ✚ Weller, D.M., Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Schroeder, K.L., de la Fuente, L., Blouin-Bankhead, S.B., Allende-Molar, R., Bonsall, R.F., Mavrodi, D.V. et Thomashow L.S. (2007). Role of 2,4- diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant Biology*, 9: 4-20.
- ✚ Whipps, J. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp Bot.* 52: 487-511
- ✚ Whiting, P.H., Midgley, M., Dawes, E.A. (1976). The role of glucose limitation in the regulation of the transport of glucose, gluconate and 2-oxogluconate, and of glucose catabolism, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 92, 304-310.
- ✚ Wilson, M. 1997. Biocontrol of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: Current approaches and future prospects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19:188-191.
- ✚ Wilson, R., Sykes, D. A., Watson, D., Rutman, A., Taylor, G. W. & Cole, P. J. (1988). Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium. *Infect Immun* 56, 2515-7.
- ✚ Wolfe, J.B., Ivler, D., Rittenberg, S.C. (1954). Malonate decarboxylation by *Pseudomonas fluorescens*. I. Observations with dry cells and cell-free extracts. *J Biol Chem* 209, 867-874.
- ✚ Wolfe, J.B., Ivler, D., Rittenberg, S.C. (1954). Malonate decarboxylation by *Pseudomonas fluorescens*. II. 2M +g dependency and trapping of active intermediates. *J Biol Chem* 209, 875-884.
- ✚ Wolfe, J.B., Ivler, D., Rittenberg, S.C. (1954). Malonate decarboxylation by *Pseudomonas fluorescens*. III. Role of acetylCoA. *J Biol Chem* 209, 885-895
- ✚ Wood, W.A. (1955). Pathways of carbohydrate degradation in *Pseudomonas fluorescens*. *Bacteriol Rev* 19, 222-233.
- ✚ Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D.L., Jackson, R.W., Vivian, A. and Harayama, S. (2000). Phylogeny of the genus *pseudomonas*: intragenic structure reconstructed from the nucleotide sequences of gryB and rpoD genes. *Microbiol.* 146:2387-2394.

Références bibliographiques

✚ Young, L.S., Wenzel, R.P., Sabath, L.D., Pollack, M., Pennigton, J.E., and platt R. (1984). The outlook for prevention and treatment of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Infect. Dis. 6:769s-774s.

Annexe

Annexe

King B solide :

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

King A solide :

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

King B liquide :

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

Annexe

King A liquide :

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

Disque celluloses :

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

Fabriquant : Schleicher et Schuell

Diamètre ø: 6 mm

Epaisseur : 0.25 mm

Mueller Hinton solide

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

Mueller Hinton liquide

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

Annexe

Bouillon nutritif

Peptone	6 g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure.....	2g
NaCl.....	5g
Eau distillé	1000 ml
pH	7,2