

République Algérienne Démocratique et Populaire

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



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Medjadji Halima – Zaoui Somia

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Microbiologie appliquée

THÈME

**Évaluation de la production et de l'activité antimicrobienne
de la pyoverdine chez des isolats de *Pseudomonas fluorescens*
rhizosphériques**

Soutenu publiquement le 11/07/2019

DEVANT LE JURY

Président :	Mr MEKHALDI Abdelkader	Professeur	U. Mostaganem
Examineur :	Mr BOUZNED Ahcene	MCB	U. Mostaganem
Encadreur :	Mr DJIBAOUI Rachid	Professeur	U. Mostaganem
Co-encadreur :	Mlle MAZARI Hibat Errahmen	Doctorante	U. Mascara

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

Année universitaire 2018-2019

Dédicaces

Nulle œuvre n'est exaltante que celle réalisée avec le soutien moral et financier des personnes qui nous sont proches.

Nous dédions ce modeste travail :

A nos très chers parents nos mères et nos pères qui ont toujours été là pour nous et pour leurs encouragements et soutiens tout au long de notre étude.

A nos chers grands parents

A nos frères et sœurs

A tous nos collègues et nos amis

A nos professeurs de l'Université de Mostaganem qui doivent voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis

Ainsi qu'à tous ceux qui nous sont chers.

Somia & Halima

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

*En second lieu, nous tenons à exprimer nos remerciements les plus vifs à notre encadreur Monsieur **DJIBAOUI Rachid** qui a su nous guider et nous aider dans ce travail avec beaucoup de tact et de gentillesse et qui nous a permis de découvrir un domaine très intéressant. Qu'il trouve ici notre estime et notre profond respect.*

*Nous tenons à remercier sincèrement Melle **Mazari Hibat Errahmen** notre co-encadreur de mémoire, pour son aide précieuse, ses conseils judicieux, ainsi que le temps qu'elle nous a consacré tout au long de cette période.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury Monsieur **MEKHALDI Abdelkader** et Monsieur **BOUZNEB Ahcene** pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

*Nous adressons une pensée spéciale à : **Mme Bechelaghem Nadia, Mr Dahah Hicham, Mr Zerhoni Mustapha, Melle Bennama R, Mr Arabi Abed, Mr Souane Abdelkader, Mr Mohamed, Mme Hafida, Mr Djilali** qui ont accepté de nous faire partager leur expérience pour ce travail.*

*Enfin, Nous tenons également à remercier **ATTOURA Fatima** et toutes les personnes qui ont participé, à titre professionnel ou personnel à la réalisation de ce travail.*

المخلص

البیوفردینات هی سیدروفورات تفرزها مجموعة *Pseudomonas* ذات الفلورة منخفضة الوزن الجزيئي وذات شراهة عالية للحديد وتنتج في شروط معوزة للحديد . أهميتها جعلت من تطبيقاتها تمتد إلى المجالات الزراعية والبيوتكنولوجية والطبية.

نهدف من خلال هذا العمل إلى تقييم إنتاج البیوفردینات بواسطة *Pseudomonas fluorescens* واختبار نشاطها المضاد للميكروبات.

قمنا في هذا العمل بعزل 14 *Pseudomonas* ذات الفلورة من جذور نبات شعير الفأر التابع للنجيليات (*Hordeum murinum*) بالإضافة إلى عزلتين تابعتين للنوع *P. fluorescens* تم تحديدهما سابقًا. سمح لنا تطبيق مجموعة من اختبارات التحديد بأن نصنف أربع عزلات من بين الأنواع الـ 14 إلى النوع *P. fluorescens*. تم استخدام سلالات *P. fluorescens* الستة لتحديد نشاطها المضاد ضد 8 سلالات ممرضة باستخدام طريقة الخطوط المتقاطعة، مرة على وسط King B ومرة أخرى على نفس الوسط بإضافة $FeCl_3$. أظهرت النتائج مناطق تثبيط تتراوح من 5 إلى 34 ملم في الوسط الخال من الحديد مع ظهور صبغة ذات فلورة صفراء مخضرة. قامت العزلة (PK) بالتثبيط في وجود غياب Fe^{3+} مما يستبعد دور البیوفردین في هذه العملية. أظهر تحليل الطيف الضوئي للأشعة فوق البنفسجية / المرئي لطافيات *Pseudomonas* ذات الفلورة الستة المزروعة في وسط السكسينات ، أطيافًا مماثلة لطيف البیوفردین في أربع عزلات واثنين من الأطياف المختلفة في اثنين آخرين. أظهر قياس تراكيز البیوفردین أن العزلة P11 هي الأكثر إنتاجًا وأن الطاف لهذه السلالة له أكبر تثبيط لـ *P. mirabilis* ATCC 35659 و *C. albicans* ATCC10231 بقطر 16 و 15 ملم على التوالي. أعطت سلالة PK المنتجة لمركبات البیوفردین والفينازین منطقة تثبيط تقدر بـ 18 ملم مع *P. mirabilis* ATCC 35659. كما أظهر بیوفردین العزلة P11 المنتج على وسط king B والمستخلص بطريقة الاستخلاص صلب / سائل مناطق تثبيط 15 ملم مع *P. mirabilis* ATCC 35659 و 14 ملم مع *C. albicans* ATCC10231. بين استخدام شريحة من نظام API 20 NE في التعرف على السلالة P11 أنها تنتمي إلى النوع *P. fluorescens*

الكلمات المفتاحية: البیوفردین، *P. fluorescens*، وسط King B، وسط السكسينات، تثبيط، الحديد، سلالات ممرضة.

Résumé

Les pyoverdines sont des sidérophores sécrétés par les *Pseudomonas* fluorescents. Ce sont des chélateurs du fer à haute affinité, à faible poids moléculaire et produits dans des conditions limitées en fer. Leur importance étend leurs applications à l'agriculture, à la biotechnologie et à la médecine.

Dans le présent travail, nous avons pour objectif d'évaluer la production des Pyoverdines par *Pseudomonas fluorescens* et d'examiner leur activité antimicrobienne.

Un total de 14 *Pseudomonas* fluorescents ont été isolés à partir des racines d'une plante graminée sauvage (l'orge du rat = *Hordeum murinum*) en plus de deux isolats de la même espèce préalablement identifiés à *P. fluorescens*. L'application d'un ensemble de tests d'identification nous a permis de rapprocher 4 isolats parmi les 14 à l'espèce *P. fluorescens*. Les six isolats ont été utilisés pour déterminer leur pouvoir antagoniste vis-à-vis 8 souches pathogènes en utilisant la méthode des stries croisés, une fois sur le milieu King B standard et une autre fois sur le même milieu additionné de FeCl_3 . Les résultats ont montré des zones d'inhibition de 5 à 34 mm dans le milieu non additionné de fer avec apparition d'une fluorescence jaune verdâtre. Un isolat (PK) a exercé son inhibition en présence et en absence du Fe^{3+} ce qui fait exclure le rôle de la pyoverdine dans cette action. L'analyse par spectrophotométrie UV/Visible des surnageants des six *P. fluorescens* cultivés dans le milieu succinate a montré des spectres similaires au spectre de la pyoverdine chez quatre isolats et deux spectres différents chez les deux autres. Le dosage de la pyoverdine a déterminé que l'isolat P11 est le plus producteur et c'est le surnageant de cette souche qui a montré l'inhibition la plus importante vis-à-vis *P. mirabilis* ATCC 35659 et *C. albicans* ATCC 10231 avec des zones de 16 et 15 mm de diamètre respectivement. La souche PK productrice de pyoverdine et des composés phénaziniques a donné une zone d'inhibition de 18 mm avec *P. mirabilis* ATCC 35659. La pyoverdine de l'isolat P11 produite sur le milieu King B et extraite par une extraction solide/liquide a montré des zones d'inhibition de 15 mm avec *P. mirabilis* ATCC 35659 et de 14 mm avec *C. albicans* ATCC 10231.

La Galerie API 20 NE utilisée pour identifier l'isolat P11 a donné des résultats correspondant à l'espèce *P. fluorescens*.

Mots-clés : la pyoverdine, *Pseudomonas fluorescens*, milieu King B, milieu succinate, inhibition, le fer, souches pathogènes.

Abstract

Pyoverdins are siderophores secreted by fluorescent *Pseudomonas*. They are low molecular weight and high affinity iron chelators produced under iron restricted conditions. Their importance extends their applications to agriculture, biotechnology and medicine.

In the present work, our goal was to evaluate the production of Pyoverdins by *Pseudomonas fluorescens* and to examine their antimicrobial activity.

A total of 14 fluorescent *Pseudomonas* were isolated from the roots of a wild grass (rat barley = *Hordeum murinum*) in addition to two isolates of the same species previously identified to *P. fluorescens*. The application of a set of identification tests allowed us to belong four isolates among the 14 to *P. fluorescens* species. The six *P. fluorescens* strains were used to determine their antagonistic activity against 8 pathogenic strains using the crossed streaks method, once on the standard King B medium and again on the same medium plus FeCl₃. The results showed inhibition zones of 5 to 34 mm in the non-iron added medium with appearance of a greenish-yellow fluorescence. An isolate (PK) exerted its inhibition in the presence and absence of Fe³⁺ which excludes the role of the pyoverdin in this action. An UV / Visible spectrophotometry analysis of the supernatants of the six *P. fluorescens* grown in the succinate medium, showed spectra similar to the pyoverdin spectrum in four isolates and two different spectra in two others. The pyoverdin dosage determined that the P11 isolate is the most productive and it is the supernatant of this strain that showed the greatest inhibition against *P. mirabilis* ATCC 35659 and *C. albicans* ATCC 10231 with 16 and 15 mm in diameter respectively. The PK strain producing pyoverdin and phenazine compounds gave an 18 mm inhibition zone with *P. mirabilis* ATCC 35659. Pyoverdin of the isolate P11 produced on king B medium and extracted by solid / liquid extraction showed 15 mm inhibition zones with *P. mirabilis* ATCC 35659 and 14 mm with *C. albicans* ATCC 10231.

The API 20 NE Gallery used to identify the P11 isolate yielded results corresponding to *P. fluorescens* species.

Keywords: pyoverdine, *Pseudomonas fluorescens*, King B medium, succinate medium, inhibition, iron, pathogenic strains.

Liste des abréviations

AA : Acide aminé

ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylate

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIA : L'acide indole-3-acétique

ARNr : Acide Ribo-Nucléique ribosomique

ARNt : Acides ribonucléiques de transfert

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adénosine triphosphate

C : Celsius

Cd : Cadmium

CLP : Les lipopeptides cycliques

Cu : Cuivre

Da : Dalton

DAPG : 2,4-diacétylphloroglucinol

DO : Densité optique

D-Tyr : D-tyrosine

HCl : Chlorure d'hydrogène

HCN : Cyanure d'hydrogène

Kb : Kilobase

L-ASA : L-aspartate β -semialdehyde,

L-Dab :L-2,4-diaminobutyrate,

L-fOHOrn : L-N5-formyl-N5-hydroxyornithine

L-Glu: L-glutamic

NRPS : Non-ribosomal peptide synthetase,

Ntn : - N-terminal nucleophile

MALDI-TOF / TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight

P: Pseudomonas

Pb : Plomb

PCA : Phénazine-1-carboxylate

PLT: La Pyolutéorine

PRN: La pyrrolnitrine

PtaA: Periplasmic transaminase A

Pvds: Pyoverdines

QS: Quorum sensing

RMN: Résonance magnétique nucléaire

tr/min : Tour par minute.

UFC : Unité Formant Colonie

UV : Ultra-violet

Zn : Zinc

Table des matières

ملخص

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction1

Analyse bibliographique

Chapitre I : Adaptation de *P. fluorescens*

I. 1. Définition.....	3
I.2. Mécanismes d'adaptation et habitats de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	4
I.2.1. Interactions biotiques et abiotiques	4
I.2.1.1. Adaptation dans la rhizosphère	4
I.2.1.2. Adaptation dans le sol	4
I.2.1.3. Adaptation dans l'eau.....	4
I.2.1.4. Adaptation dans les aliments	5
I.2.1.5. Adaptation des <i>P. fluorescens</i> par l'interaction avec des autres êtres vivants..	6
I.2.1.5.1. Bactéries.....	6
I.2.1.5.2. Phages.....	6
I.2.1.5.3. Plantes.....	7
I.2.1.5.4. Homme.....	7
I.2.2. La résistance de <i>P. fluorescens</i>	8
I.2.2.1. Résistance aux métaux	8
I.2.2.2. Résistance aux hydrocarbures.....	8
I.2.2.3. Résistance aux antibiotiques	9

Chapitre II : La production des métabolites chez *Pseudomonas fluorescens*

II.1. La production des métabolites chez <i>Pseudomonas fluorescens</i>	11
II.1.1. Les antimicrobiens	12
II.1.1.1. La mupirocine (Bactroban).....	12
II.1.1.2. La safracine	12
II.1.1.3. Les analogues de la rhizoxine	12
II.1.1.4. DAPG (2,4-diacétylphloroglucinol)	13
II.1.1.5. La pyrrolnitrine (PRN).....	13
II.1.1.6. La Pyolutéorine (PLT).....	14
II.1.1.7. Les phénazines	14
II.1.1.8. L'aérugine.....	15
II.1.1.9 Les lipopeptides cycliques (CLP).....	15
II.1.1.9.1. Le Massétolide A.....	15
II.1.1.9.2. La Nunamycine et la Nunapeptine	15
II.1.1.9.3. Autres CLP antimicrobiens.....	16
II.1.1.10. Cyanure d'hydrogène (HCN).....	16
II.1.2. Les toxines.....	16

II.1.3. Les enzymes.....	17
II.1.3.1. La peptidase	17
II.1.3.2. La protéase	17
II.1.3.3. La glycérol-phosphodiesterase	17
II.1.3.4. La chitinase, la β -1,3-glucanase et la cellulase	17
II.1.4. Les sidérophores	18
II.1.4.1. La pyochéline.....	18
II.1.4.2. La pseudomonine.....	19
II.1.4.3. La pyoverdine (Pvd).....	19
II.1.5. Les phytohormones.....	20
II.1.5.1. L'acide indole-3-acétique (AIA).....	20
II.1.5.2. Cytokinines	20
II.1.5.3. ACC désaminase.....	20

Chapitre III : Caractérisation structurel et fonctionnel de la pyoverdine

III.1. Généralités.....	22
III.2. Structure générale de la pyoverdine.....	22
III.2.1. La chaîne peptidique.....	24
III.2.2. Le chromophore.....	24
III.2.3. La chaîne latérale du chromophore.....	25
III.3. Biosynthèse et sécrétion de la pyoverdine.....	26
III.4. L'acquisition de fer via la pyoverdine.....	27
III.4.1. Le fer : un nutriment essentiel pour les microorganismes.....	27
III.4.2. Le transport de fer par la pyoverdine.....	28
III.5. Les applications de la pyoverdine.....	29
III.5.1. La pyoverdine en tant que biocapteur en améliorant la bioremédiation des métaux lourds.....	29
III.5.2. La pyoverdine comme inhibiteur de corrosion.....	31
III.5.3. La pyoverdine en tant qu'agent de biocontrôle potentiel.....	31
III.5.4. L'effet antimicrobien de la pyoverdine.....	31
III.5.5. La pyoverdine favorise la croissance des plantes.....	32
III.5.6. La stratégie du cheval de troie.....	32

Partie pratique

Matériels et méthodes

1. Échantillonnage.....	34
2. Isolement des <i>Pseudomonas</i>	34
3. Purification des <i>Pseudomonas</i> fluorescents.....	34
4. Conservation des isolats.....	34
5. Orientation vers l'espèce <i>Pseudomonas fluorescens</i>	35
5.1. L'observation macroscopique.....	35
5.2. L'observation microscopique.....	35
5.3. Croissance à 4°C et 42°C.....	35
5.4. Caractérisation biochimique.....	35
5.4.1. Test d'oxydase.....	35
5.4.2. Test de catalase.....	36
5.4.3. Tests Voges – Proskauer et rouge de méthyle (VP-RM).....	36
5.4.4. Test urée-indole (urée-tryptophane).....	36

5.4.5. Test TSI (Triple Sugar Iron).....	36
5.4.6. Test mannitol-mobilité-nitrate.....	37
5.4.7. Réduction de nitrate.....	37
5.4.8. Hydrolyse de la caséine.....	37
5.4.9. Hydrolyse de la gélatine.....	38
6. Souches des microorganismes cibles.....	38
7. Test d'antagonisme <i>in vitro</i> (Méthode directe)	39
8. Production de la pyoverdine.....	40
9. Dosage de la pyoverdine.....	40
10. Etude de l'effet antibiotique des surnageants.....	40
11. Extraction solide/liquide de la pyoverdine.....	40
12. Identification par galerie API 20NE.....	41
12.1. Inoculation de la galerie.....	41
12.2. Lecture et interprétation.....	41
13. Identification par galerie API 20E.....	42

Résultats et discussions

1. Isolement et purification des isolats.....	43
2. Orientation vers l'espèce <i>Pseudomonas fluorescens</i>	43
2.1. L'examen macroscopique.....	43
2.2. L'examen microscopique.....	44
2.3. Croissance à 4°C et 42°C.....	44
2.4. Test d'oxydase et de catalase.....	44
2.5. Tests VP-RM et urée-indole (urée-tryptophane)	45
2.6. Test TSI (Triple Sugar Iron)	45
2.7. Test mannitol-mobilité-nitrate.....	46
2.8. Réduction de nitrate.....	46
2.9. Hydrolyse de la caséine.....	47
2.10. Hydrolyse de la gélatine.....	48
3. Souches des microorganismes cibles	48
4. Souches de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	50
5. Test d'antagonisme <i>in vitro</i>	50
5.1. Milieu King B non additionné de fer.....	50
5.2. Milieu King B additionné de fer.....	52
6. Production et dosage de la pyoverdine.....	55
7. Etude de l'effet antibiotique des surnageants	57
8. Extraction solide/liquide de la pyoverdine.....	58
9. Résultat de l'identification de l'isolat P11 par la galerie Api 20 NE.....	59
10. Résultat d'identification par la galerie Api 20E.....	61

Conclusion et perspectives.....	62
--	-----------

Références bibliographiques

Annexes

Liste des Figures

Figure 01 : <i>P. fluorescens</i> en microscopie électronique à balayage.....	03
Figure 02 : Représentation circulaire du génome de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5.....	11
Figure 03 : la pyoverdine de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (souche ATCC 13525).....	23
Figure 04 : Représentation schématique du chromophore de pyoverdine avec localisation des atomes de carbones sur lesquels se fixent les chaines peptidiques.....	24
Figure 05 : Structures des différents chromophores de sidérophores.....	25
Figure 06 : La biosynthèse, la sécrétion, l'absorption et le recyclage de pyoverdines chez <i>P. fluorescens</i> A506.....	27
Figure 07 : Acquisition du fer par la voie pyoverdine.....	29
Figure 08 : la perte de la fluorescence après une formation d'un complexe pyoverdine-ion cuivre.....	30
Figure 09 : les conjugués sidérophores / antibiotiques : exploitation de l'absorption de fer pour administrer des médicaments contre les maladies bactériennes.....	33
Figure 10 : un schéma de la méthode d'antagonisme direct <i>in vitro</i>	39
Figure 11 : Un échantillon d'orge de rat du champ de Touahria.....	43
Figure 12 : Aspect macroscopique des isolats de <i>Pseudomonas</i> sur gélose King B.....	43
Figure 13 : Observation microscopique (x1000) des <i>Pseudomonas</i> après une coloration de Gram.....	44
Figure 14 : Test d'oxydase et de catalase pour un isolat de <i>Pseudomonas</i>	45
Figure 15 : Résultat de test urée et test d'indole pour quelques souches.....	45
Figure 16 : Résultat de test TSI pour quelques isolats de <i>Pseudomonas</i>	46
Figure 17 : Résultats du test mannitol-mobilité-nitrate.....	46
Figure 18 : Résultat du test de réduction du nitrate pour quelques isolats de <i>Pseudomonas</i>	47
Figure 19 : Résultat de l'hydrolyse de la caséine.....	47
Figure 20 : Résultat de l'hydrolyse de la gélatine.....	48
Figure 21 : Quelques caractères microscopiques (x1000) et morphologiques des souches cibles.....	49
Figure 22 : Effet antagoniste des <i>P. fluorescens</i> vis-à-vis les souches cibles sur le milieu King B non additionné de fer.....	51
Figure 23 : effet antagoniste de <i>P. fluorescens</i> vis-à-vis les souches cibles sur le milieu King B additionné de fer.....	53
Figure 24 : diamètre des zones des <i>Pseudomonas fluorescens</i> contre les souches cibles.....	55

Figure 25: Spectre d'absorption des surnageants de P11 et PK par spectrophotomètre UV-visible.....	56
Figure 26 : La concentration (en μM) des pyoverdines secrétées.....	56
Figure 27: Effet antimicrobien de surnageant de la pyoverdine sur deux souches cibles.....	57
Figure 28: Tubes contenant l'extrait de la pyoverdine.....	58
Figure 29: Effet antimicrobien de l'extrait de la pyoverdine sur deux souches cibles.....	59
Figure 30 : Résultats de l'identification de l'isolat P11 sur galerie API NE 20.....	60

Liste des tableaux

Tableau 01 : les souches cibles et quelques milieux pour leur confirmation.....	39
Tableau 02 : Résultats des tests d'hydrolyse chez les 14 isolats.....	48
Tableau 03 : Quelques caractères des souches cibles.....	49
Tableau 04 : Caractéristiques des isolats utilisé pour les essais d'antagonisme.....	50
Tableau 05 : Les zones d'inhibitions (en mm) de l'activité antagoniste <i>in vitro</i> des isolats de <i>Pseudomonas fluorescens</i> vis-à-vis les souches cibles.....	54
Tableau 06 : zone d'inhibition par la méthode de disques de diffusion (en mm).....	57
Tableau 07 : Effet de la pyoverdine de <i>P. fluorescens</i> PFAS14 sur la croissance de certains microorganismes pathogènes exprimés en diamètre de la zone d'inhibition (mm)..	58
Tableau 08 : la zone d'inhibition de la pyoverdine (en mm).....	59
Tableau 09 : Résultats des différents tests de la galerie API 20 NE.....	61
Tableau 10 : Résultats de quelques tests biochimique de la galerie API 20.....	61



Introduction

Introduction

Le fer est un élément fondamental pour la croissance et le développement de la majorité des organismes vivants, procaryotes et eucaryotes. Il participe à de nombreux processus cellulaires, dont le transport de l'oxygène, la synthèse d'ATP et d'ADN ainsi qu'à la prolifération cellulaire (**Gineste, 2017**). Pour acquérir le fer de façon efficace, les bactéries ont développé de différentes stratégies de capture de ce métal qui dépendent de sa disponibilité dans l'environnement, de sa nature (ionique, hémique), et de son degré d'oxydation, lorsque le fer est en quantité limitée cette carence induit les bactéries à produire et à sécréter des composés à faible poids moléculaire appelés sidérophores (**Vaulont et Schalk, 2015**).

Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant le milieu avec des commensaux représentés principalement par les genres *Bacillus* et *Streptomyces* (**Mezaache, 2012**). Les *Pseudomonas* spp. fluorescents considérées comme PGPRs (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) non symbiotiques, ont été largement étudiées et expérimentées, surtout par rapport à leurs performances dans la phytostimulation de la croissance de nombreuses plantes, à leur capacité de colonisation racinaire, à la synthèse de phytohormones, à la solubilisation des phosphates, à la production d'enzymes et de métabolites, ainsi qu'au biocontrôle de divers agents phytopathogènes (**Ouserir et al., 2018**). Les sidérophores sont considérés comme un facteur indispensable aux microorganismes pour coloniser les différentes niches et sont aussi un facteur de virulence pour parasiter l'hôte par ces organismes producteurs (**Briana et al., 2016**). Dans le sol les sidérophores qui sont particulièrement efficaces pour chélater le fer, sont en compétition avec des champignons phytopathogènes. En freinant la croissance des champignons, ils limitent la probabilité d'infection au niveau de la racine et améliore de ce fait la santé de la plante (**Lemanceau, 2011**).

Pseudomonas fluorescens comprend un groupe de saprophytes communs, non pathogènes qui colonisent les environnements de surface du sol, de l'eau et des plantes, il sécrète un pigment fluorescent verdâtre soluble appelé pyoverdine qui est un sidérophore qui jouent un rôle important dans la croissance dans des conditions limitant le fer (**Ganeshan et Kumar 2005 ; Michael et al., 2018**). *P. fluorescens* est un producteur d'antibiotiques et possède un large spectre d'activité antimicrobienne contre *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Aeromonas hydrophila* (**Rekha et al., 2010**).

Le présent travail contribue à l'utilisation de la pyoverdine sécrétée par *Pseudomonas fluorescens* rhizosphérique comme agent antimicrobien. Afin de réaliser cette étude, les objectifs suivants ont été fixés :

- L'isolement et la caractérisation phénotypique de *Pseudomonas fluorescens*.
- La production et l'extraction de la pyoverdine.
- La caractérisation spectroscopique de la pyoverdine.
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne de la pyoverdine.

Le manuscrit est structuré en deux parties, la première partie concerne la recherche bibliographique composée de trois chapitres : le premier présente l'adaptation de *P. fluorescens*, le deuxième chapitre sur la production des métabolites par cette bactérie et le troisième chapitre est sur la caractérisation structurels et fonctionnel de la pyoverdine.

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

Chapitre I

Adaptation de *Pseudomonas fluorescens*

I. 1. Définition

Pseudomonas fluorescens est une bactérie qui appartient à la classe des Gammaproteobacteria (Silby *et al.*, 2009), à coloration de Gram négatif, bâtonnet, aérobie stricte (Trivedi *et al.*, 2015). C'est un microorganisme psychrotrophe, incapable de se développer à des températures supérieures à 32 °C (Trivedi *et al.*, 2015), sauf les souches cliniques (Madi *et al.*, 2010). Sa température optimale de croissance est de 25 à 30°C, et elle évolue à un pH neutre (Trivedi *et al.*, 2015). Dans certains cas, une croissance anaérobie est possible si une source de nitrate peut être utilisée comme un accepteur final d'électrons au lieu de l'oxygène (Scales *et al.*, 2014; Wisplinghoff, 2017). Cette bactérie ne forme ni de spores ni d'autres forme de résistance (El Ouakfaoui, 2015).

P. fluorescens ne fermente pas le glucose (Scales *et al.*, 2014). Elle est commensal, apparait singulière ou sous forme de paires mobiles grâce aux flagelles amphitriches (Dahah, 2017) (figure 01). Cette espèce est parmi les Pseudomonades fluorescentes capables de produire des pyoverdines (sidérophores) fluorescents (Couillerot *et al.*, 2009). La taille du génome du groupe *P. fluorescens* varie de 6,4 Mb à 7,07 Mb et trois souches étudiées de *P. fluorescens* ne partagent que 61,4 % de leur contenu génétique alors que cinq génomes séquencés de *P. aeruginosa* partagent de 80 % à 90 % de leur contenu génétique (El Ouakfaoui, 2015).

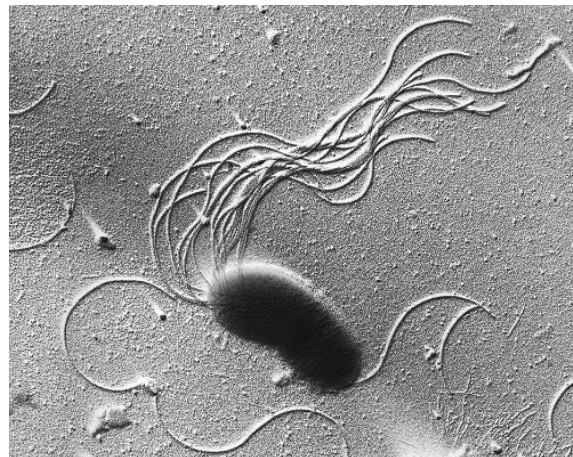


Figure 01 : *P. fluorescens* en microscopie électronique à balayage (Scales *et al.*, 2014)

I.2. Mécanismes d'adaptation et habitats de *Pseudomonas fluorescens*

I.2.1. Interactions biotiques et abiotiques

I.2.1.1. Adaptation dans la rhizosphère

La rhizosphère est le volume du sol situé au voisinage immédiat des racines des plantes et qui se caractérise par la présence d'exsudats racinaires (rhizodépôts) (Nihorimbere *et al.*, 2011). Ces exsudats sont utilisés par la microflore endémique en tant que signaux chimiques en plus d'être un substrat nutritif disponible pour la croissance et le développement de ces microorganismes dans la rhizosphère (Nihorimbere *et al.*, 2011).

Des études effectuées avec des empreintes génétiques d'ARNr 16S ont fourni un nombre croissant de preuves que des facteurs biotiques (par exemple, espèces / génotype de plantes, stade de développement et agents phytopathogènes) et des facteurs abiotiques (par exemple, les conditions météorologiques, la gestion agricole) ont une incidence sur la composition de la communauté bactérienne dans la rhizosphère (Schreiter *et al.*, 2018).

Ainsi que les micronutriments et les macronutriments dans la rhizosphère qui constitue une condition préalable importante (El Ouakfaoui, 2015), donc *P. fluorescens* s'adapte en raison de sa polyvalence nutritionnelle (Lemire *et al.*, 2011).

I.2.1.2. Adaptation dans le sol

P. fluorescens possède un gène *AdnA* qui est un homologue de *FleQ* chez *P. aeruginosa*, qui régule à la fois la motilité et la fixation par le flagellum sur diverses surfaces (Mastropaolo *et al.*, 2012). Les mutants *AdnA* se sont également avérés déficients en colonisation, propagation et persistance in situ, en formation de biofilm et en motilité (Mastropaolo *et al.*, 2012).

La souche R2f de *P. fluorescens* a survécu au-dessus de 10^7 UFC/g dans un sol sec pendant un maximum de 84 jours dans des microcosmes de sable limoneux lorsqu'elle était encapsulée, tandis que les cellules libres sont passées à moins de 10^5 cellules/g de sol sec après 21 jours (El Ouakfaoui, 2015).

I.2.1.3. Adaptation dans l'eau

Les eaux en milieu hospitalier sont souvent contaminées par *P. fluorescens*, espèce qui se trouve également très fréquemment dans les eaux douces naturelles même potables (Avril *et al.*, 1992).

Après inoculation dans des EDP (Eau de distribution publique) préalablement filtrées sur un support de porosité de 0,22 µm et conservées à 25°C, des *Pseudomonas* spp. peuvent survivre plus de 90 jours (Vigneron, 2010).

Les eaux présentant une concentration ionique importante favoriseraient la multiplication des bactéries (Vigneron, 2010). Le calcium et le magnésium joueraient un rôle important dans la stabilisation des parois bactériennes, notons que des souches de *Pseudomonas* sp. sont susceptibles de survivre dans des eaux de mer présentant une force ionique élevée (Vigneron, 2010).

Au sein d'un biofilm, la bactérie est protégée de l'action des désinfectants ajouté au l'eau en raison de la viscosité du milieu (diffusion limitée des désinfectants) et de leur neutralisation par réaction avec les exopolymères constituant la matrice du biofilm (Vigneron, 2010).

Les *P. fluorescens* et *P. aeruginosa* sous forme de biofilm sont plus résistants à l'ozone que sous forme libre (Vigneron, 2010).

P. fluorescens 123 produit une ou plusieurs molécules amphipathiques qui semblent servir d'agents tensioactifs pour disperser les cellules bactériennes dans un environnement aqueux transmis sur des surfaces relativement hydrophobes telles que la cire cuticulaire (Hernandez-Anguiano *et al.*, 2004).

La lumière naturelle aurait également un impact négatif sur la survie de ces bactéries, l'effet inactivant de ce paramètre pourrait s'expliquer par la production de composés toxiques appartenant à des formes réactives de l'oxygène, type peroxyde d'hydrogène ou radicaux hydroxyles (Vigneron, 2010).

Une étude par Troxler *et al.* (1997), a montré que dans des conditions aérobies, le nombre de cellules cultivables de la souche CHA0 de *P. fluorescens* diminuent dans l'eau des effluents, en passant de 10^7 à environ 10^2 , en l'espace de 115 jours et les auteurs ont émis l'hypothèse que la baisse était due à la concurrence ou à l'antagonisme avec les micro-organismes indigènes ou prédation (El Ouakfaoui, 2015).

I.2.1.4. Adaptation dans les aliments

Certaines souches de *P. fluorescens* se trouvent dans les produits alimentaires réfrigérés dus à leurs caractères psychrotrophes (Trivedi *et al.*, 2015).

P. fluorescens induit des changements de structure et de couleur des produits alimentaires, dus à la production de lécithinase (phospholipase C), d'enzymes protéolytiques et de molécules pigmentées, la majorité des souches de *P. fluorescens* isolées de produits

laitiers et d'usines de fabrication de produits laitiers étaient capables de former un biofilm dans des puits de plaques de microtitration (Rossi *et al.*, 2016). Ainsi qu'elles ont été signalées dans la putréfaction de la viande (Lee *et al.*, 2017).

La souche 123, contrairement à de nombreuses souches de *P. fluorescens* non pathogènes isolées de divers environnements, est capable de provoquer des pourritures molles chez le brocoli et le chou-fleur en l'absence de blessure évidente et à des températures de réfrigération telles que 4 ° C (Hernandez-Anguiano *et al.*, 2004).

I.2.1.5. Adaptation des *P. fluorescens* par l'interaction avec des autres êtres vivants

I.2.1.5.1. Bactéries

L'association *Rhizobium fabae*, R1 et R2 avec des souches de *P. fluorescens* (S20, CHAO et P64) a induit plus d'effets phytobénéfiques (Ouserir *et al.*, 2018). Le potentiel phytostimulateur en croissance est meilleur avec la combinaison de PGPRs symbiotiques et non symbiotiques (Ouserir *et al.*, 2018).

La biodisponibilité du fer est réduite dans les environnements aérobies, tels que le sol. *P. fluorescens* BBbc6R8 utilise les ferrioxamines et ferricoelichelin produites par *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 en tant que xénosiderophores et n'active donc plus la production de ses propres sidérophores (Galet *et al.*, 2015). Un criblage d'une banque de mutants de BBbc6R8 de *P. fluorescens* a mis en évidence l'implication du récepteur FoxA dépendant de TonB dans ce processus : l'expression de FoxA et de gènes impliqués dans la régulation de sa biosynthèse a été induite en présence de *S. ambofaciens* (Galet *et al.*, 2015).

I.2.1.5.2. Phages

Les génomes bactériens contiennent des groupes de gènes acquis par transfert horizontal, appelés îlots génomiques (Genomicislands (GIs)), ils sont généralement grandes de 10 à 200 kb de longueur (Langille *et al.*, 2010). Les GIs sont souvent associées à des adaptations microbiennes d'intérêt médical et environnemental, et elles ont eu un impact considérable sur l'évolution de la bactérie (Langille *et al.*, 2010). Dans les souches de *P. fluorescens*, les séquences du génome ont révélé la diversité des éléments intégrés, dans la Pf-5, neuf GIs, certaines codent pour des métabolites secondaires, et six régions ressemblant à des phages ont été identifiées, certaines ressemblant aux phages trouvés dans *Shigella* et *Yersinia* entériques (Silby *et al.*, 2011).

I.2.1.5.3. Plantes

Les *Pseudomonas fluorescens* peuvent améliorer la santé des plantes grâce au cycle des bioéléments (Silby *et al.*, 2009), via la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphore, ou la production de sidérophores, et modifient la physiologie des racines en modifiant le gène de transcription et de biosynthèse de métabolites dans les cellules végétales (Vacheron *et al.*, 2013). De plus grâce à la dégradation des facteurs de virulence produits par des agents pathogènes (El Ouakfaoui, 2015), par des antagonismes, et par l'induction des défenses de la plante (Silby *et al.*, 2009).

Les comparaisons de trois génomes de *P. fluorescens* (SBW25, Pf0-1, Pf-5) ont révélé une divergence considérable : 61% des gènes sont partagés, la majorité situés près de l'origine de répllication (Silby *et al.*, 2009). Un crible fonctionnel de SBW25 a défini 125 gènes induits par la plante, y compris une gamme de fonctions spécifiques à l'environnement de la plante (Silby *et al.*, 2009). Par exemple, le phloroglucinol (PG) de la plante avait de vastes effets sur le transcriptome de *P. fluorescens* Pf-5, modifiant de manière significative la transcription de plus de deux cents gènes (Clifford *et al.*, 2015).

Selon Ouserir *et al* (2018) : « Les niveaux de colonisation racinaire obtenus, avec les plants de blé dur, de tomate ou de fève, expriment une compétence rhizosphérique notable avec les souches de *Pseudomonas fluorescens* (P64, CHAO et S20), bien que leurs origines initiales d'isolement soient autres que ces plantes, qui sont respectivement l'abricotier, le tabac et le palmier dattier ».

I.2.1.5.4. Homme

P. fluorescens est présent en faible nombre dans la lumière intestinale et il a été signalé de jouer un rôle dans la maladie de Crohn (Madi *et al.*, 2010). Certaines de ces souches se trouvent dans le tube digestif humain avec un faible niveau commensal (Trivedi *et al.*, 2015).

Il n'existe aucune preuve dans les publications scientifiques que la bactérie *P. fluorescens* dispose de mécanismes précis pour contourner les barrières physiques, chimiques ou lymphoïdes contre l'infection au niveau des surfaces épithéliales ou des muqueuses, et les cas sont généralement associés à des blessures ou à des interventions médicales (El Ouakfaoui, 2015). La fibronectine est un mécanisme important de la pathogénicité de la bactérie *P. fluorescens*, car elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, y compris la réparation des tissus après une lésion et l'adhérence de cette bactérie aux cellules nerveuses et gliales se fait par l'intermédiaire des lipopolysaccharides et provoque généralement l'apoptose (El Ouakfaoui, 2015).

Les souches PAB de *P. fluorescens* se sont développées et ont produit des pigments dans le sang stocké à 4 ° C, avec une production de pyoverdine de 0,13 mg / ml de sérum après 5 jours d'incubation (**Pájaro et al., 1995**). Lorsque l'effet cytotoxique sur les leucocytes humains a été analysé, la mort et la lyse ont été observées et les doses insuffisantes pour provoquer la lyse ont diminué la phagocytose et la chimiotaxie des leucocytes (**Pájaro et al., 1995**).

Une précipitation plasmatique en solution saline a montré que les fractions de globuline et d'albumine retenaient la pyoverdine à différentes concentrations (**Pájaro et al., 1994**).

Une hémolyse a pu être observée avec certaines souches de *P. fluorescens*, principalement cliniques mais selon les essais effectués par Santé Canada « aucune activité hémolytique n'a été observée lorsque la souche de *P. fluorescens* ATCC 13525 a été étalée sur une gélose au sang de mouton. Ainsi que la même souche n'a pas été associée à la maladie de Crohn, et on ignore si elle porte l'antigène I2 » (**El Ouakfaoui, 2015**).

I.2.2. La résistance de *P. fluorescens*

I.2.2.1. Résistance aux métaux

La bactérie *P. fluorescens* est également bien connue pour sa tolérance aux métaux (**El Ouakfaoui, 2015**). Elle a montré une capacité *in vitro* à tolérer les quantités pertinentes de métaux lourds, de pesticides, d'herbicides et de composés phénoliques (**Petriccione et al., 2013**).

La bioaccumulation intracellulaire des métaux et l'homéostasie dans le cytosol cellulaire impliquent des métallothionéines bactériennes riches en cystéine de poids moléculaire compris entre 3,5 et 14 kDa, ces protéines uniques démontrent également une induction en réponse à des métaux lourds spécifiques tels que Cd, Pb, Zn et Cu (**Naik, 2012**). Les métallothionéines jouent un rôle important dans l'immobilisation des métaux lourds toxiques protégeant ainsi les processus métaboliques bactériens catalysés par des enzymes (**Naik, 2012**).

I.2.2.2. Résistance aux hydrocarbures

P. fluorescens Migula 1895-DSMZ produisait un biosurfactant de type rhamnolipidique et présentait une bonne activité moussante, émulsifiante, et antimicrobienne (**Abouseoud et al., 2008**). Ainsi que la solubilité du naphthalène, ce qui montre son potentiel d'application dans la bioremédiation et dans la contamination par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans l'environnement (**Abouseoud et al., 2010**).

I.2.2.3. Résistance aux antibiotiques

Les bactéries produisant des antibiotiques ont plusieurs stratégies communes pour empêcher leurs propres antibiotiques de les éradiquer (**Yanagisawa et Kawakami, 2003**). L'acide pseudomonique est un antibiotique connu comme un puissant inhibiteur de nombreuses isoleucyl-ARNt synthétases (IleRS) bactériennes, la cible de l'acide pseudomonique, *P. fluorescens* est totalement insensible à l'antibiotique qu'il produit à cause de la présence de ces deux IleRS distincts (IleRS-R1 et IleRS-R2), surtout la deuxième qui a une affinité nettement réduite pour l'antibiotique (**Yanagisawa et Kawakami, 2003**).

L'émergence mondiale de *P. fluorescens* montre un mécanisme de résistance à tous les antimicrobiens existants, en raison de sa forte capacité à acquérir de la résistance (**Trivedi et al., 2015**).

Dans une étude de **Kittinger et al., (2016)**, des espèces de *Pseudomonas* (parmi eux l'espèce *P. Fluorescens*) de type sauvage sont sensibles à tous les 10 antibiotiques testés, à l'exception de SXT (sulfaméthoxazole / triméthoprime) L'état naturel de compétence requis pour assimiler *in situ* le matériel génétique étrangé a été confirmé par *P. fluorescens* (**Luczkiewicz et al., 2015**). De plus, il a été suggéré que les *Pseudomonas* spp. ont été trouvés à développer facilement une résistance aux antimicrobiens par l'acquisition de gènes de résistance à médiation plasmidique (**Luczkiewicz et al., 2015**).

Dans les plans d'eau tels que les effluents d'eaux usées, les lacs et les rivières, des bactéries de différentes sources, par exemple des déchets urbains, industriels et agricoles, probablement sélectionnées en raison d'une utilisation intensive d'antibiotiques, sont collectées et mélangées à des espèces environnementales, cela peut provoquer l'apparition de résistances (**Agnese et al., 2012**).

Certains mécanismes de résistance (pompes à efflux, β -lactamases de l'AmpC chromosomique, par exemple) sont régulés de manière précise dans leur expression et, confèrent une sensibilité naturellement réduite aux médicaments (**Agnese et al., 2012**). Les mutations dans les architectures génomiques entraînent leur surexpression et leur haut niveau de résistance aux antibiotiques, sachant que les gènes AmpC sont largement répandus dans les espèces bactériennes d'origine environnementale tel que *P. fluorescens* (**Agnese et al., 2012**).

Les adaptations phénotypiques et les effets protecteurs physiques ont toujours été considérés comme le principal mécanisme de résistance au glutaraldéhyde, qui est un biocide couramment utilisé dans les hôpitaux, le traitement de l'eau, le pétrole et le gaz, la production alimentaire et d'autres industries (**Vikram et al., 2015**). Des études génétiques récentes

indiquent que les pompes à efflux contribuent à la résistance au glutaraldéhyde dans les biofilms de *P. fluorescens* et de *P. aeruginosa* (Vikram *et al.*, 2015).

Chapitre II

La production des métabolites chez
Pseudomonas fluorescens

II.1. La production des métabolites chez *Pseudomonas fluorescens*

Chez la bactérie de biocontrôle *P. fluorescens* CHA0, le système GacS-GacA contrôle l'expression de produits extracellulaires tels que les antibiotiques, les exo-enzymes et le cyanure d'hydrogène (Blumer *et al.*, 1999) (Figure 02).

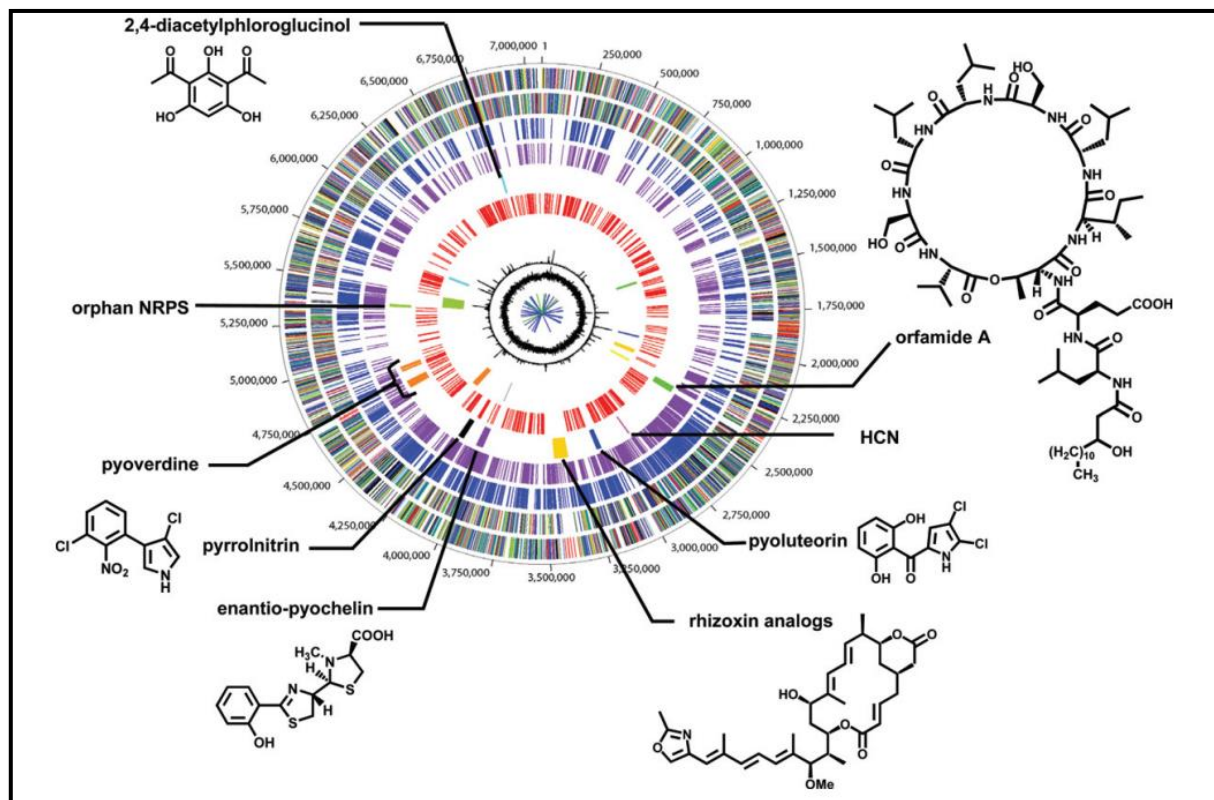


Figure 02 : Représentation circulaire du génome de *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (Gross et Loper, 2009).

L'échelle externe désigne les coordonnées en paires de bases (pb), avec l'origine de répliation à 1 pb. **Le troisième cercle** représente l'ensemble des 1489 gènes *P. fluorescens* Pf-5 qui ne se trouvent pas dans les génomes de *P. aeruginosa* PAO1, *P. syringae* pv. tomato DC3000 et *P. putida* KT2440. **Le quatrième cercle** représente l'ensemble des 1472 gènes qui ne se trouvent pas dans les génomes de *P. fluorescens* SBW25 ou PfO-1. **Le cinquième cercle** représente neuf groupes de gènes de métabolites secondaires. **Le septième cercle** représente l'île mobile PFGI-1 dans l'olivier et les régions de phage.

II.1.1. Les antimicrobiens

II.1.1.1. La mupirocine (Bactroban)

La mupirocine a une structure chimique différente de celle de tout autre agent antimicrobien, contenant une chaîne latérale d'acide gras courte (acide 9-hydroxy-nonanoïque) liée à l'acide monique par une liaison ester (Judith *et al.*, 2015). La mupirocine était autrefois appelée acide pseudomonique car son principal métabolite est dérivé de la fermentation submergée par *P. fluorescens* (Judith *et al.*, 2015).

La mupirocine produite par *P. fluorescens* NCIMB 10586, est d'une activité élevée contre *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* et d'autres bactéries à Gram positif. Cet antibiotique inhibe la synthèse de l'ARN et des protéines bactériennes en se liant à l'isoleucyl-ARNt synthétase (IleRS) afin d'empêcher l'incorporation d'isoleucine dans des protéines bactériennes (Yanagisawa et Kawakami, 2003 ; Gallagher *et al.*, 2012 ; Kumar, 2017) . Le spectre antimicrobien de la mupirocine comprend aussi les *Staphylococcus aureus* résistant et sensibles à la méthicilline (SARM, SASM), les streptocoques, les anaérobies et les entérobactéries (Kumar, 2017).

La mupirocine est principalement utilisé comme crème nasale dans le cadre thérapeutique, elle peut également être appliqué à la trachéotomie, à la gastrostomie et à d'autres sites fréquemment colonisés par le SARM (Fraise, 2010). Elle est principalement utilisée comme application topique pour les infections cutanées, telles que l'impétigo dû à *S. aureus* ou à *S. pyogenes* (Kumar, 2017).

II.1.1.2. La safracine

La safracine est un antibiotique à activité antitumorale produit par *P. fluorescens* A2-2 (Velasco *et al.*, 2005). Structurellement, cette antibiotique appartient à la famille des saframycines (Okumoto *et al.*, 1985). Son ensemble du groupe de gènes synthétiques couvre 17,5 kb. Le groupe de safracine comprend 10 cadres de lecture ouverts codant pour : trois NRPS, trois enzymes de biosynthèse de précurseurs de safracine, deux enzymes de personnalisation de safracine, une protéine de résistance de safracine et une petite protéine hypothétique de fonction inconnue (Velasco *et al.*, 2005).

II.1.1.3. Les analogues de la rhizoxine

Les produits synthétisés à partir d'un groupe de gènes hybrides polykétide synthase / peptide synthétase non-ribosomal dans le génome de *P. fluorescens* Pf-5 ont été identifiés, et cinq analogues de la rhizoxine, ayant des activités antifongiques, phytotoxiques et antitumorales, ont été produits par Pf-5 (Loper *et al.*, 2008). Parmi ces analogues, le composé

prédominant, WF-1360 F, et le composé nouvellement décrit 22 Z -WF-1360 F étaient les plus toxiques contre deux agents phytopathogènes (*Botrytis cinerea* et *Phytophthora ramorum*) et trois espèces végétales (riz, pois et concombre) (Loper *et al.*, 2008).

II.1.1.4. DAPG (2,4-diacétylphloroglucinol)

Ce composé était également impliqué dans l'élicitation des défenses des plantes par la résistance systémique induite, et directement dans la modulation de l'équilibre hormonal des plantes en agissant comme un composé mimétique de l'auxine. La synthèse de DAPG a été jusqu'à présent associée à la présence du groupe de gènes *phl*, comprenant l'opéron *phlACBDE* et d'autres gènes tels que *phlF*, *phlG*, *phlH* et *phlI* (Almario *et al.*, 2017).

Certaines souches de *Pseudomonas* spp. fluorescentes associées aux plantes, produisent le DAPG (Velusamy *et al.*, 2006), il est produit par *P. fluorescens* à la fois *in vitro* et dans la rhizosphère du blé (Marchand *et al.*, 2000).

Il possède des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales et antihelminthiques, et joue un rôle important dans la lutte biologique contre les maladies du tabac, du blé et de la betterave à sucre (Velusamy *et al.*, 2006).

II.1.1.5. La pyrrolnitrine (PRN)

Pyrrolnitrine [3-Chloro-4-(2'-nitro-3'-chlorophenyl) pyrrole] a été isolée en 1964 en tant qu'antibiotique de *Pseudomonas pyrrocinia* présentant une activité contre les champignons, les levures et les bactéries à Gram positif. Plus tard, elle s'est avérée être produite par une grande variété de bactéries différentes, telles que l'espèce de *Pseudomonas*. La biosynthèse de la PRN chez *P. fluorescens* Pf-5 est contrôlée par le facteur sigma en phase stationnaire, RpoS (Park *et al.*, 2011).

L'activité de la pyrrolnitrine est principalement l'inhibition du glycérol kinase entraînant l'accumulation de glycérol et des membranes cellulaires. Les premières tentatives d'isolement du groupe de gènes biosynthétiques de PRN à partir de *P. fluorescens* ont conduit à la détection d'un régulateur global nécessaire à la formation de chitinase, cyanure et pyrrolnitrine par *P. fluorescens* (Pée, 2012).

La PRN est un inhibiteur de la chaîne respiratoire fongique. Elle est utilisée comme antimycose topique chez l'homme, et un dérivé de pyrrolnitrine présentant une plus grande stabilité environnementale qui est utilisé comme fongicide agricole (Gross et Loper, 2009).

II.1.1.6. La Pyolutéorine (PLT)

La pyolutéorine est un polycétide phénolique doté de propriétés bactéricides, herbicides et fongicides. Le Plt peut supprimer la fonte des semis causée par le champignon *Pythium ultimum* dans le coton (Mousa et Raizada, 2015) Mais pas les autres pathogènes comme *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *R.solani*, *T.basicola* et *Verticillium dahliae* (Mukerji, 2004).

Le PLT et les phénazines peuvent agir de manière synergique pour supprimer de telles maladies fongiques transmises du sol, certaines études suggérant que les deux voies de biosynthèse interagissent (Mousa et Raizada, 2015). Ainsi que la production de DAPG et de PLT est équilibrée, chaque composé inhibant la synthèse de l'autre et les mutants déficients en PLT surproduisent le DAPG (Neidig *et al.*, 2011).

La pyolutéorine est produite par plusieurs espèces de *Pseudomonas* (Meliani, 2012), mais son rôle dans la suppression d'agents phytopathogènes a été étudié surtout chez les souches de *P. fluorescens* CHA0 et Pf-5 (Meliani, 2012 ; Brodhagen *et al.*, 2004).

La biosynthèse de Plt implique la condensation de la proline avec trois équivalents en acétate par chloration et oxydation. Chez *P. fluorescens* Pf-5, un segment de 24 kb contient l'opéron biosynthétique du PLT (*pltABCDEFG*) (Mousa et Raizada, 2015).

II.1.1.7. Les phénazines

Les phénazines sont des métabolites secondaires aromatiques colorés contenant de l'azote produits par diverses espèces de bactéries (Hadla et Halabi, 2018). *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Pectobacterium*, *Brevibacterium* et *Streptomyces* (Mavrodi *et al.*, 2010), les excrètent en grande quantité dans l'environnement sous une forme visible à l'œil nu, les chercheurs ont identifié plus de 100 origines naturelles de phénazines, ayant une activité antimicrobienne contre les bactéries et les champignons des plantes (Hadla et Halabi, 2018).

Il a été montré que seuls les *P. fluorescens* sont capables de produire de l'acide phénazine-1-carboxylique (PCA), au lieu de cela, en raison de la présence de différentes enzymes spécifiques, *P. aeruginosa* et *P. chlororaphis* ont la capacité de produire plus de dérivés à base de phénazine tels que la phénazine-1-carboxamide (PCN), la pyocyanine (5-N-méthyl-1-hydroxyphénazine), la 1-hydroxyphénazine (1-OH -PHZ) et l'PCA également (Hadla et Halabi, 2018).

L'opéron *PhzABCDEFG* est principalement conservé chez *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* et *P. aeruginosa* et il a été identifié comme étant l'opéron responsable de la biosynthèse de la PCA à partir de chorismate (Hadla et Halabi, 2018). Les *Pseudomonas* produisent le PCA d'une manière dépendante de la densité bactérienne, dans les phases

exponentielles tardives et stationnaires précoces, ce qui suggère que cette production est régulée par le QS (Hadla et Halabi, 2018).

Les mécanismes d'action comprennent : (1) l'accumulation de molécules toxiques telles que le peroxyde d'hydrogène et le superoxyde en raison du potentiel rédox de la phénazine ; et (2) élicitation de la résistance induite à l'hôte (Mousa et Raizada, 2015).

II.1.1.8. L'aérogine

La souche *P. fluorescens* MM-B16 a montré une forte activité antifongique vis-à-vis de certains agents pathogènes des plantes par production de l'aérogine [4-hydroxyméthyl-2-(2-hydroxyphényl)-2-thiazoline] les champignons *Colletotrichum orbiculare*, *Phytophthora capsici* et *Pythium ultimum* étaient les plus sensibles à cette antibiotique. Cependant, aucune activité n'a été trouvée contre les levures et les bactéries, même à des concentrations supérieures à 100 µg ml⁻¹ (Lee et al., 2003).

II.1.1.9 Les lipopeptides cycliques (CLP)

Les CLP sont synthétisés par des NRPS (Vanvlassenbroeck, 2012), et possèdent de vastes activités spectrales, contre les bactéries, les champignons, les protozoaires et les lignées de cellules tumorales humaines (Ma et al., 2016).

II.1.1.9.1. Le Massétolide A

Le massétolide A est un antibiotique et un tensioactif lipopeptidique cyclique (CLP) produit par diverses souches de *Pseudomonas*, c'est un oligopeptide cyclique de 9 acides aminés lié à l'acide 3-hydroxydécanoïque (Bruijn et al., 2007). Le Massetolide A a été identifié chez *P. fluorescens* SS101, une souche de biocontrôle isolée de la rhizosphère du blé, puis décrite plus tard comme *Pseudomonas* sp. la souche MF-30 (Bruijn et al., 2007). Le massétolide A possède une action antimicrobienne à large spectre : il inhibe la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* et de *Mycobacterium avium* il aussi des effets destructeurs sur les zoospores des agents pathogènes multiples des oomycètes, C'est un déterminant important de l'activité de *P. fluorescens* SS101 contre *Phytophthora infestans* (Bruijn et al., 2007).

II.1.1.9.2. La Nunamycine et la Nunapeptine

La Nunamycine et la Nunapeptine sont deux lipopeptides cycliques antimicrobiens, produits par *P. fluorescens* In5, situées sur deux groupes de gènes appelés régulon non-nup, est régulée par le régulateur de transcription NunF, de type LuxR (Hennessy et al., 2017).

II.1.1.9.3. Autres CLP antimicrobiens

Selon **Nielsen et Sørensen (2003)** les souches DR54, 96.578 et DSS73 de *P. fluorescens* étudiées produisent trois CLP différentes, la viscosinamide, la tensin et la amphisine, toutes montrant des activités antagonistes contre deux champignons phytopathogènes *Pythium ultimum* et *Rhizoctonia solani*.

La production de viscosinamide est couplée au métabolisme primaire et à la prolifération cellulaire chez les bactéries productrices, et donc elle est contrôlée par le substrat de croissance et les conditions nutritionnelles. L'amphisine (groupe A1) et la tensin (groupe d'amphisine A4) est produite lorsque les cellules entrent en phase stationnaire (**Nielsen et Sørensen, 2003**).

Les CLP de type orfamide sont des biosurfactants produits par *Pseudomonas* et impliqués dans la lyse des zoospores des oomycètes, le contrôle biologique de *Rhizoctonia* et l'activité insecticide contre les pucerons. Des orfamides ont été découverts pour la première fois dans une nouvelle approche génomique dans la souche de biocontrôle bien connue *Pseudomonas protegens* Pf-5 (**Ma et al., 2016**).

II.1.1.10. Cyanure d'hydrogène (HCN)

Le cyanure d'hydrogène (HCN) est un métabolite secondaire volatil produit par diverses pseudomonades fluorescentes de la rhizosphère, où il exerce une activité de biocontrôle sur des champignons pathogènes tels que *Thielaviopsis basicola*, l'agent causal de la pourriture noire du tabac (**Mousa et Raizada, 2015**). Mécaniquement, le HCN fonctionne en inhibant des métalloenzymes importantes telles que le cytochrome c oxydase et / ou en complexant des métaux dans le sol (**Mousa et Raizada, 2015**). Le HCN est biosynthétisé à partir de glycine dans une réaction d'oxydation catalysée par l'HCN synthase, un flavoenzyme lié à la membrane et en présence d'un accepteur d'électrons tel que le méthosulfate de phénazine (**Mousa et Raizada, 2015**).

Les souches de *P. fluorescens* sont parmi les productrices de HCN (**Ramette et al., 2003 ; Nagarajkumar et al., 2004**).

II.1.2. Les toxines

Les *Pseudomonas* peuvent également produire des insecticides, notamment la toxine « Fit » de *P. fluorescens* Pf-5 contre le ver de corne du tabac (**Silby et al., 2011**).

Un gène de la toxine 1 d'insectes Hector d'*Androctonus australis* (AaHIT1), l'un des peptides les plus toxiques pour la sélection d'insectes (anti-insecte), a été cloné dans une souche de *P. fluorescens* par le vecteur pSUP106, les essais biologiques ont indiqué que la souche

manipulée était capable de produire de l'AaHIT1 avec une activité insecticide, tout en maintenant l'activité anti-phytopathogène (Lu *et al.*, 2010).

Il a d'abord été signalé qu'une souche de *P. fluorescens* exprimant une neurotoxine scorpion active avait une double activité contre les champignons et les insectes phytopathogènes, intéressante pour les applications agronomiques (Lu *et al.*, 2010).

II.1.3. Les enzymes

II.1.3.1. La peptidase

Les profils de peptidase associés aux cellules de 12 souches de *P. fluorescens* (biotypes ATCC 948 considérée comme référence et 11 apparentés) ont été examinés. En utilisant le système Analytab API ZYM, une activité peptidase forte et générale a été détectée en utilisant les L-lysyl-, L-pyrrolidonyl-, L-arginyl-, L-alanyl et glycyl-glycyl- β -naphthylamides comme substrats. Inversement, les substrats de L-tyrosyle, L-phénylalanyle, L-histidyle, L-prolyl-, γ -L-glutamyl- β -naphthylamides ont été hydrolysés par seulement quelques souches. Les peptidases étaient donc actives sur les substrats responsables du goût amer des produits laitiers (Gobbetti et Rossi, 1992).

II.1.3.2. La protéase

P. fluorescens 07A, une souche protéolytique, produit une protéase extracellulaire responsable de la détérioration du lait, cette enzyme a un poids moléculaire de 49,486 kDa et hydrolyse la gélatine, la caséine et l'azocaseine, l'enzyme a 477 AA et des domaines de liaison hautement conservés avec Ca^{2+} et Zn^{2+} , indiquant que Ca^{2+} , le principal ion du lait, est également un cofacteur (Alves *et al.*, 2016). La production de protéase et de lipase extracellulaires de *P. fluorescens* B52 augmente dans un milieu lacté (Rowe, 1988).

II.1.3.3. La glycérol-phosphodiesterase

La Glycérol-phosphodiesterases GlpQII sécrétées, trouvées chez *P. fluorescens* SBW25, dans ces souches de *Pseudomonas*, le clivage de la glycérolphosphorylcholine et de son produit de dégradation, glycérol-3-phosphateG3P, se produit de manière extracellulaire, permettant à d'autres bactéries de bénéficier de ce métabolisme (Lidbury *et al.*, 2017).

II.1.3.4. La chitinase, la β -1,3-glucanase et la cellulase

La chitinase et la β -1,3-glucanase hydrolysent respectivement la chitine et le β -1,3-glucane, qui sont des composants majeurs de la paroi cellulaire des champignons pathogènes. Des souches de PGPR comme *P. fluorescens* ont été développées commercialement sous forme

de formulation à base de talc et testées contre plusieurs maladies des cultures (**Vivekananthan et al., 2004**).

Une chitinase purifiée à partir de *P. fluorescens* a montré une activité insecticide contre le moustique du thé *Helopeltis theivora*, est un ravageur insidieux qui représente une menace économique importante pour les plantations de thé, le mode d'action de la toxicité de la chitinase est l'hydrolyse enzymatique de la chitine, constituant commun de l'exosquelette et de la muqueuse de la membrane péritrophe de l'insecte (**Suganthi et al., 2017**).

Abdul-kadhim et Jarallahont (2013) ont isolé dix-huit isolats de bactéries cellulytiques à partir des sols d'agriculture et après identification, les résultats ont montré que tous les isolats bactériens font partie de *P. fluorescens*.

II.1.4. Les sidérophores

Les sidérophores, du grec *pherein* et *sideros*, signifiant « porter le fer » (**Vaulont et Schalksont, 2015**) se sont de petites molécules organiques produites par des microorganismes dans des conditions limitant en fer (**Saha et al., 2016**). Dans l'environnement, la forme ferrique du fer est insoluble et inaccessible au pH physiologique (7,35 à 7,40), dans ces conditions, les microorganismes synthétisent des sidérophores qui ont une forte affinité pour le fer ferrique, puis il est réduit en fer ferreux dans le cytosol et devient accessible aux micro-organismes (**Saha et al., 2016**).

Certaines maladies dues à une surcharge en fer, par exemple la drépanocytose, peuvent être traitées à l'aide de sidérophores (**Saha et al., 2016**). Les autres applications médicales des sidérophores comprennent l'activité antipaludique, l'élimination des transuraniens du corps et l'activité anticancéreuse (**Saha et al., 2016**).

II.1.4.1. La pyochéline

L'énantio-pyochéline est dérivé de la thiazolidine [2(2-o-hydroxy- phenyl-2-thiazolin-4yl)-3-methylthiazolidine-4-carboxylic acid], cette molécule résulte de la condensation du salicylate et de deux résidus cystéines (**Hannauer, 2011**).

Les différences entre pyochéline et énantio-pyochéline sont la nature stéréochimique uniquement, tandis que les éléments constitutifs, tels que le salicylate et la cystéine, ne sont pas altérés (**Youard et al., 2007**).

En produisant de l'énantio-pyochéline, les souches Pf-5 et CHA0 ont mis au point un mécanisme permettant de séquestrer le fer sous une forme disponible pour elles-mêmes, mais non pour les bactéries concurrentes (**Gross et Loper, 2009**), même *P. aeruginosa* (**Youard et**

al., 2007). On suppose que cette stratégie confère un avantage concurrentiel à Pf-5 et à CHAO dans des environnements naturels où les concentrations de fer biologiquement disponible sont limitées (Gross et Loper, 2009). L'énantio-pyochéline chez *P. fluorescens* agit aussi comme inducteur de ses propres gènes de biosynthèse, ressemblant ainsi à la pyochéline, qui est à la fois un sidérophore et une molécule de signalisation chez *P. aeruginosa* (Youard *et al.*, 2007).

II.1.4.2. La Pseudomonine

La pseudomonine est un sidérophore d'isoxazolidone qui a été initialement caractérisé chez *P. fluorescens* AH2 (Anthoni *et al.*, 1995). La pseudomonine est similaire à la pyochéline, constituée de l'acide salicylique et de deux fractions d'acides aminés hétérocycliques (Gross et Loper, 2009).

Ces gènes de biosynthèse ont été localisés par Bakker (2001) dans la souche de biocontrôle *P. fluorescens* WCS374 (Gross et Loper, 2009).

Le groupe Pms de 21 kb est divisé en sept gènes codant, pour trois NPRS (PmsG, D, E) et quatre enzymes biosynthétiques précurseurs (PmsA, B, C, F), le point de départ de la biosynthèse de la pseudomonine est la formation d'acide salicylique à partir du chorismate par l'isochorismate synthase PmsC et l'isochorismate-pyruvate lyase PmsB, respectivement, suivie de son activation par le domaine A de PmsE (Gross et Loper, 2009).

II.1.4.3. La Pyoverdine (Pvd)

La pyoverdine (pseudobactine) est un sidérophore fluorescent (Ringel et Brüser, 2018), environ 1500 Da (Ruiz *et al.*, 2015). Un pigment jaune-vert soluble dans l'eau, est un puissant piègeur et transporteur efficace du fer (III), elle représente un marqueur pour la différenciation bactérienne (Meyer, 2000).

La production de pyoverdines par des Pseudomonades fluorescentes permet leur colonisation d'hôtes allant de l'homme à la plante (Ringel et Brüser, 2018). Les pyoverdines sont des peptides d'origine non-ribosomiale produits par les *Pseudomonas* fluorescents, tel que les souches Pf-5, PfO-1 et SBW25 de *P. fluorescens* (Vanvlassenbroeck, 2012). Les Pvd sont constituées de trois parties distinctes : le chromophore, la chaîne latérale du chromophore et la chaîne peptidique (Vanvlassenbroeck, 2012).

II.1.5. Les Phytohormones

II.1.5.1. L'acide indole-3-acétique (AIA)

C'est l'auxine naturelle la plus répandue, est une hormone produite par les plantes, les champignons et les bactéries (Li *et al.*, 2018).

De nombreux chercheurs ont signalé que des bactéries promotrices de la croissance peuvent produire de l'AIA, et appartenant à différents genres comme *Bacillus* et *Pseudomonas* (Ozdal *et al.*, 2017). Où elle agit comme une molécule de signalisation qui a des effets importants sur la communication entre les plantes et les microorganismes et favorise la croissance des plantes (Li *et al.*, 2018). Dix isolats de *P. fluorescens* ont été isolés et étudiés par une équipe indienne, tous les isolats ont manifesté une production de l'AIA et de l'acide Gibbérellique (GA₃) (Shahira *et al.*, 2015) .

Les microorganismes de la rhizosphère qui interagissent avec les plantes perturbent leur développement en raison du déséquilibre d'auxine, donc ils peuvent affecter la plante de manière positive ou négative (Vega-Celedón *et al.*, 2016).

La biosynthèse de l'AIA chez la souche CHAO a été étudiée, deux activités enzymatiques clés se sont avérées impliquées : l'oxydase de la chaîne latérale du tryptophane et la transaminase du tryptophane (Oberhänsli *et al.*, 1991).

II.1.5.2. Cytokinines

P. fluorescens 6-8, un isolat de la rhizosphère qui stimule l'allongement des racines du canola (*Brassica napus* L.), est caractérisé par sa capacité à produire de l'acide indole-3-acétique et des cytokinines en culture pure et dans la rhizosphère du canola en conditions gnotobiotiques (Pallai *et al.*, 2012).

Les cytokinines, régulent le développement et la physiologie des plantes ainsi que leur immunité, leur production par des micro-organismes n'a pas été considérée comme un mécanisme de biocontrôle, mais nous identifions la capacité de *P. fluorescens* G20-18 à contrôler efficacement l'infection à *P. syringae* chez *Arabidopsis*, permettant ainsi de préserver l'intégrité des tissus et, à terme, le rendement en biomasse (Grobkinsky *et al.*, 2016). La production de cytokinines microbiennes a été identifiée comme un déterminant clé de cet effet de biocontrôle sur le pathogène bactérien hémibiotrophique (Grobkinsky *et al.*, 2016).

II.1.5.3. ACC désaminase

Les PGPR possédant une activité ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) désaminase réduit le niveau de stress en éthylène, ce qui confère une résistance et améliore la croissance des plantes dans différentes conditions de stress (Safari *et al.*, 2018).

La bactérie bénéfique pour les plantes *P. fluorescens* F113 abrite un gène *acdS*, qui permet la désamination de l'ACC (**Vacheron *et al.*, 2016**). L'impact des facteurs abiotiques et biotiques sur l'expression de ce gène a été évalué, et différents modèles de colonisation racinaire et d'expression *acdS* ont été observés en fonction du génotype de la plante (maïs) (**Vacheron *et al.*, 2016**).

Chapitre III

Caractérisation structurel et fonctionnel
de la pyoverdine

III.1. Généralités

En 1892, Gessard découvrit des pigments fluorescents jaune-vert d'origine bactérienne qu'il nomma fluorescéines et pseudobactines. Ces pigments, ont été renommés plus tard pyoverdine par Turfreijer (**Ringel et Brüser, 2018**).

Les pyoverdines (Pvds) appartiennent à la famille des sidérophores, caractérisant les *Pseudomonas* fluorescents, elles sont responsables de la couleur verte de ces bactéries (**Dahah, 2017**). Leur implication dans l'acquisition du fer a été établie de manière concluante à la fin des années 1970 grâce aux travaux fondateurs de J-M. Meyer et ses collaborateurs (**Meliani, 2012**). La pyoverdine a une affinité élevée pour les ions fer ferriques, qui représente une exigence fondamentale pour la croissance des *Pseudomonas*, et la production abondante de cette molécule est stimulée dans les milieux carencés en fer (**Dahah, 2017**).

III.2. Structure générale de la pyoverdine

La première structure de la pyoverdine a été établie par cristallographie au début des années 80. Plus de 60 structures sont aujourd'hui connues grâce aux outils d'analyse tels que la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (**Vanvlassenbroeck, 2012**).

Les pyoverdines (Figure 03) sont toutes composés de trois parties caractéristiques : (1) Le chromophore est un dérivé de la quinoline (2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline) conservé chez toutes les Pvds. Il est responsable de la couleur et de la fluorescence typiques des Pvds, (2) une chaîne acyle attachée au groupe NH₂ du Chromophore, et (3) une chaîne peptidique liée par son extrémité N-terminale au groupe carboxyle du chromophore (**Meyer, 2000**).

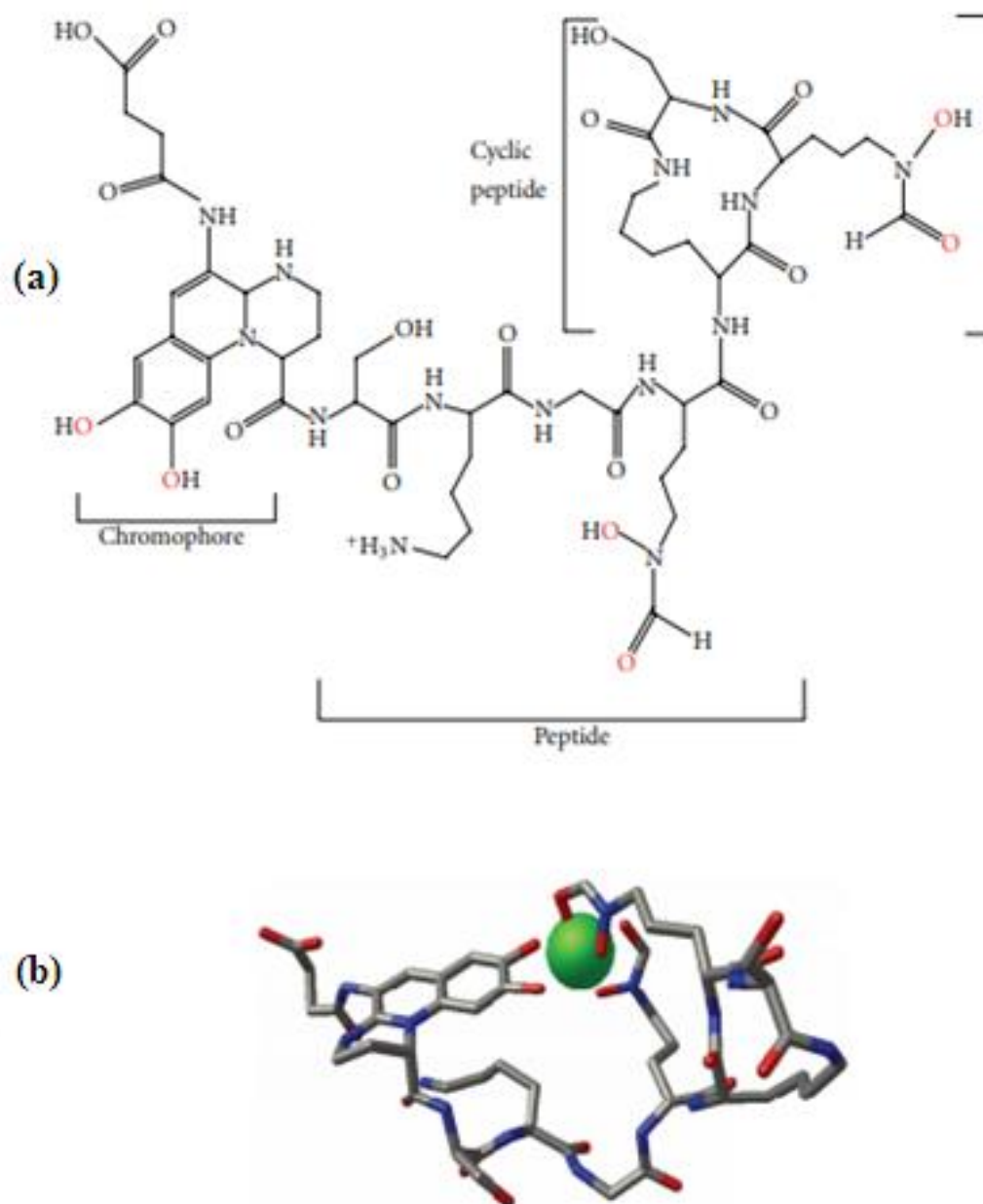


Figure 03 : La pyoverdine de *Pseudomonas fluorescens* (souche ATCC 13525)

(a) Structure chimique d'une pyoverdine illustrant sa structure peptidique dérivée, Les oxygènes en rouge représentent les atomes qui coordonnent le fer dans les structures 3D. (b) Structure de pyoverdine ferrique prise à partir de la structure 3D d'une protéine de transport pyoverdine-Fe. Seuls les atomes de pyoverdine et de fer (vert) sont représentés. Les deux groupes hydroxyle sur le chromophore et les oxygènes de la chaîne latérale FHO forment des interactions avec le fer (Peek *et al.*, 2012).

III.2.1. La chaîne peptidique

La chaîne peptidique de la pyoverdines est constituée de 6 à 14 acides aminés. La molécule de la pyoverdine comporte trois sites destinés à la coordination du fer ferrique (Fe^{3+}) au sein du sidérophore, deux de ces sites se trouvent sur la chaîne peptidique sous la forme de groupements hydroxymate et / ou β -hydroxycarboxylate (Cézard *et al.*, 2015)

La chaîne peptidique est variable peut être linéaire, cyclique ou partiellement cyclique elle est liée par un groupe amide à la fonction carboxyle C1 du chromophore ou C3 dans le cas des isopyoverdines (Figure 4) (Vanvlassenbroeck, 2012).

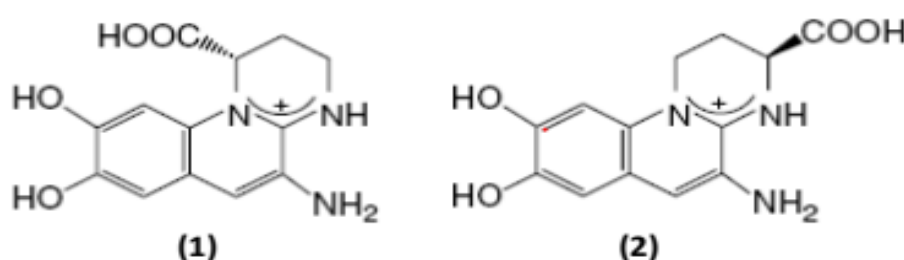


Figure 04 : Représentation schématique du chromophore de pyoverdine avec

localisation des atomes de carbones sur lesquels se fixent les chaînes peptidiques.

Fixation de la chaîne peptidique par le groupement carboxyle porté par le C1 du chromophore pour les pyoverdines (1) et par le groupement carboxyle porté par le C3 du chromophore pour les isopyoverdines (2) (Vanvlassenbroeck, 2012).

III.2.2. Le chromophore

Le chromophore, qui est le (1S) -5-amino-2,3-dihydro-8,9-dihydroxy-1H-pyrimido [1,2-a] quinoléine-1-carboxylique acide, est identique pour tous les pyoverdines analysés jusqu'à présent (Meyer, 2000).

Il chromophore est responsable des propriétés de la fluorescence de la molécule lorsqu'elle n'est pas liée au fer, mais lorsqu'il est complexé à une molécule de fer, il prend une forme cyclique et perd sa fluorescence (Vanvlassenbroeck, 2012).

Le chromophore contient une unité catéchol, qui est l'un des trois sites de liaison pour Fe^{3+} (Cézard *et al.*, 2015).

Les différentes structures de chromophores sont reprises sur la figure 05. Le chromophore le plus commun chez les pyoverdines est le n°1, le n°2 est le chromophore retrouvé chez les isopyoverdines qui ne diffèrent que par la position de l'acide carboxylique ici porté par le C-3 du chromophore.

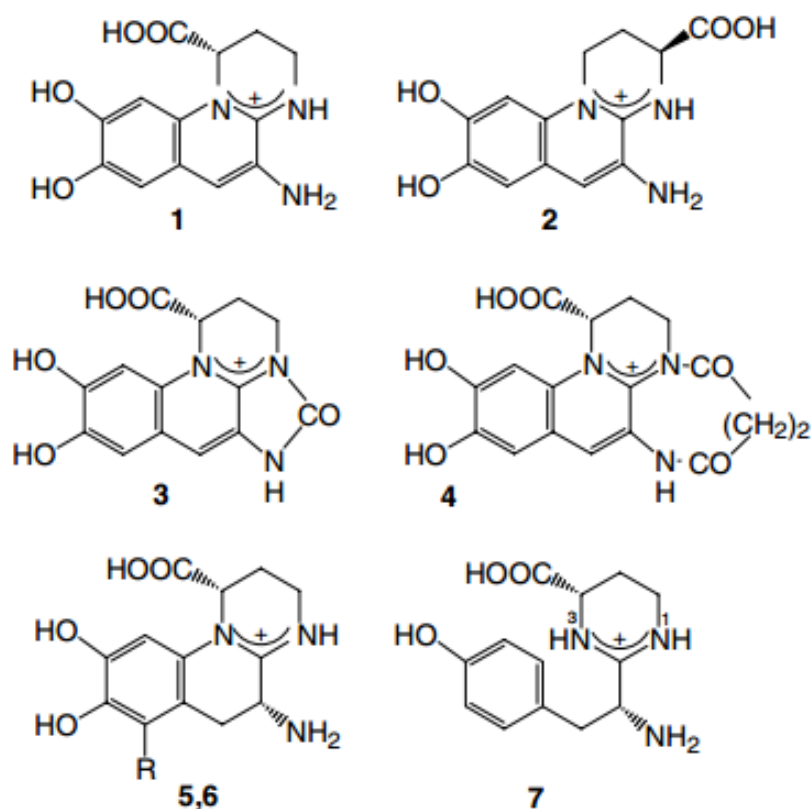


Figure 05 : Structures des différents chromophores de sidérophores.

1. Pyoverdine, 2. Isopyoverdines, 3. Azotobactine, 4. Succinopyoverdine, 5. R=H, dihydropyoverdie, 6. R=SO₃H, dihydropyoverdine-7-sulfonique acide, 7. Ferribactine (Budzikiewicz *et al.*, 2006).

III.2.3. La chaîne latérale du chromophore

La chaîne latérale acyle est constituée dans la plupart des cas d'un acide dicarboxylique (acide succinique ou acide maléique ou acide α -cétoglutarique) ou d'un dérivé amide de cet acide. Elle est liée au groupe amino du chromophore en position C3 (Meksem, 2010).

III.3. Biosynthèse et sécrétion de la pyoverdine

La biosynthèse de la pyoverdine est un processus complexe nécessitant de nombreuses étapes qui impliquent au moins 11 enzymes différentes et faisant intervenir plus de 20 gènes (Trapet, 2015).

L'ensemble des gènes impliqués dans la biosynthèse, la sécrétion de la pyoverdine et l'acquisition du fer par la pyoverdine est localisé sur le « locus Pvd », La Pvd est synthétisée par un système impliquant des peptides synthétases non ribosomiques (NRPS) (Dahah, 2017)

Cette biosynthèse débute dans le cytoplasme, où des peptides synthétases non ribosomiques (NRPS) tels que PvdL, PvdI et PvdD (selon la souche) assemblent une ferribactine initialement acylée, le précurseur du peptide de pyoverdines (Meksem, 2010).

Le précurseur ferribactine acylée est synthétisé dans le cytoplasme par des NRPS et des enzymes auxiliaires organisés en complexes associés à la membrane, appelés «sidérosomes» (Ringel et Brüser, 2018).

Le PvdL synthétise le tripeptide N-terminal conservé avec son acylation, les autres NRPS sont responsables du reste du peptide et varient donc entre les souches ayant des séquences distinctes (Ringel et Brüser, 2018).

La ferribactine acylée est probablement exportée par le PvdE dans le périplasme, où elle est désacylée par l'hydrolase de type Ntn PvdQ, par la suite, le PvdP catalyse la cyclisation par oxydation, ce qui entraîne la dihydropyoverdine (Ringel et Brüser, 2018).

Le PvdO éventuellement en jonction avec d'autres protéines, facilite l'oxydation finale en produisant le chromophore caractéristique de la pyoverdine. Ensuite, les voies de modification des chaînes latérales transforment la chaîne latérale d'origine de l'acide L-glutamique en succinamide catalysée par PvdN ou en α -cétoglutarate catalysée par PtaA (Figure 06) (Ringel et Brüser, 2018).

Les pyoverdines modifiées sont ensuite sécrétées via divers systèmes de transport tels que PvdRT-OmpQ et se lie à l'extérieur du fer ferrique (Meksem, 2010 ; Dahah, 2017).

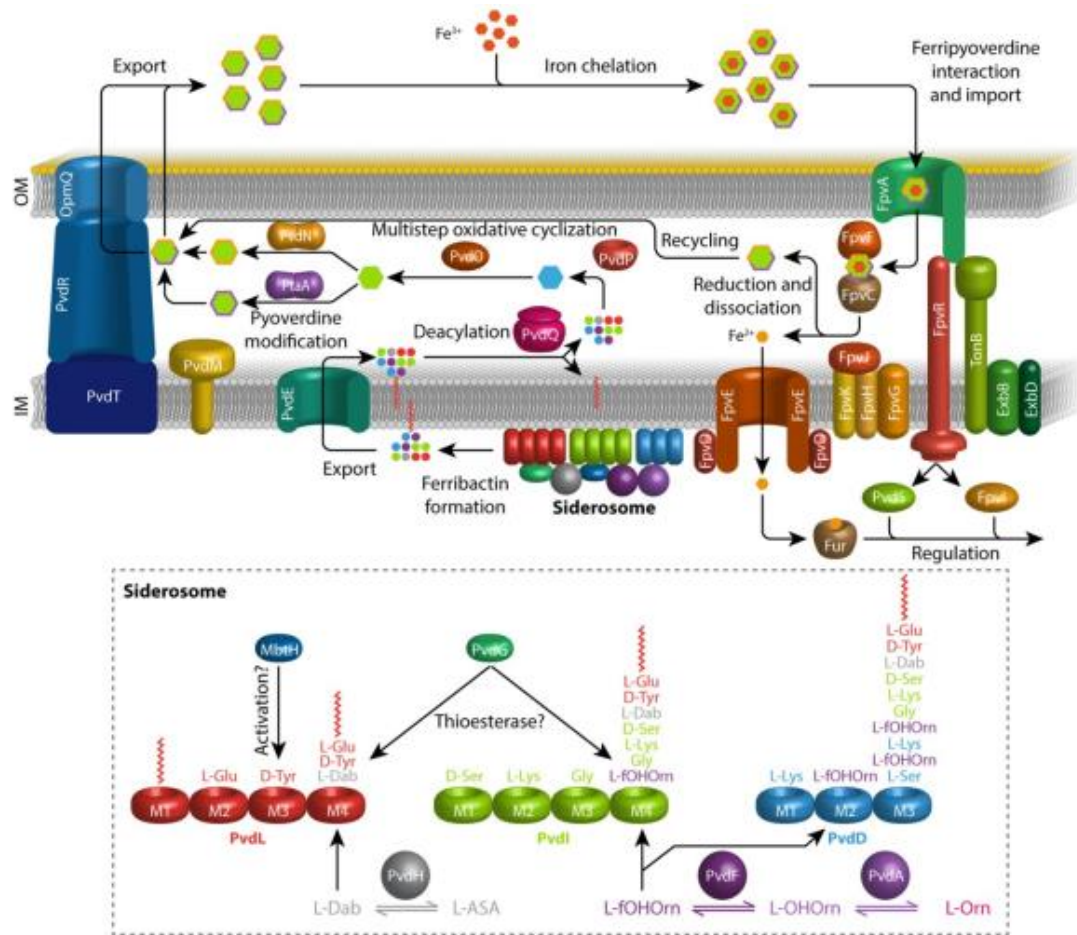


Figure 06 : La biosynthèse, la sécrétion, l'absorption et le recyclage de pyoverdines chez *P. fluorescens* A506 (Ringel et Brüser, 2018).

III.4. l'acquisition de fer via la pyoverdine

III.4.1. Le fer : un nutriment essentiel pour les microorganismes

Le fer est le quatrième élément le plus abondant sur terre et il est largement utilisé par les organismes, car il peut exister sous deux états d'oxydation fer ferreux (Fe^{2+}) et fer ferrique (Fe^{3+}) ce qui explique sa participation à de nombreuses réactions d'oxydo-réduction (Cornelis *et al.*, 2013).

Le Fe^{3+} domine dans les environnements oxygénés, ce qui pose un problème pour les microorganismes ayant un style de vie aérobie en raison de la solubilité extrêmement faible de cette forme de métal (Cornelis *et al.*, 2013).

À l'exception de quelque souches de *Lactobacilli* et des agents de la maladie de Lyme : *Borrelia burgdorferi* (Meliani, 2012) et de la syphilis : *Treponema pallidum* tous les autres microorganismes ont besoin du fer pour se multiplier (Meksem, 2010).

Une concentration de 10^{-6} M est estimée nécessaire pour une croissance bactérienne optimale (Paulen, 2017).

Le fer est impliqué en tant que co-facteur enzymatique dans de nombreux processus métaboliques majeurs comme la synthèse des acides nucléiques, la photosynthèse, la phosphorylation oxydative le transport et le stockage de l'oxygène, la régulation génétique ou le transfert d'électrons (Meksem, 2010).

La différence entre les besoins bactériens à un nutriment essentiel et la biodisponibilité du fer a conduit à faire doter les bactéries des systèmes efficaces d'acquisition du fer (Paulen, 2017).

III.4.2. Le transport de fer par la pyoverdine

Les mécanismes moléculaires impliqués dans le transport des ferrisidérophores ont été intensivement étudiés ces dernières années. Chez les bactéries à Gram-négatif, tous les mécanismes d'acquisition du fer via les sidérophores impliquent pour le passage de la membrane externe un transporteur, hautement spécifique à chaque sidérophore (Yétérián, 2010).

La pyoverdine chélate le fer dans le milieu extracellulaire grâce à la fonction catéchol du chromophore ainsi que deux fonctions hydroxamate portés par les acides aminés de la chaîne peptidique. Le complexe entre le fer et le sidérophore est de stœchiométrie 1 :1 avec une constante d'affinité de 10^{31} M⁻¹ (Paulen, 2017).

Le ferri-pyoverdine est transporté dans le périplasme par les transporteurs de la membrane externe FpvA (le transporteur principal) ou FpvB (transporteur secondaire). Ces deux transporteurs sont activés par la force proton motrice de la membrane interne, via la machinerie protéique TonB. Le fer est ensuite libéré par la pyoverdine dans le cytoplasme par un processus de réduction du Fe⁺³ en Fe⁺² sans dégradation du sidérophore, La pyoverdine est ainsi recyclée par la pompe PvdRT-OpmQ pour être relâchée dans le milieu extracellulaire et participer à un nouveau cycle (Figure 07) (Paulen, 2017).

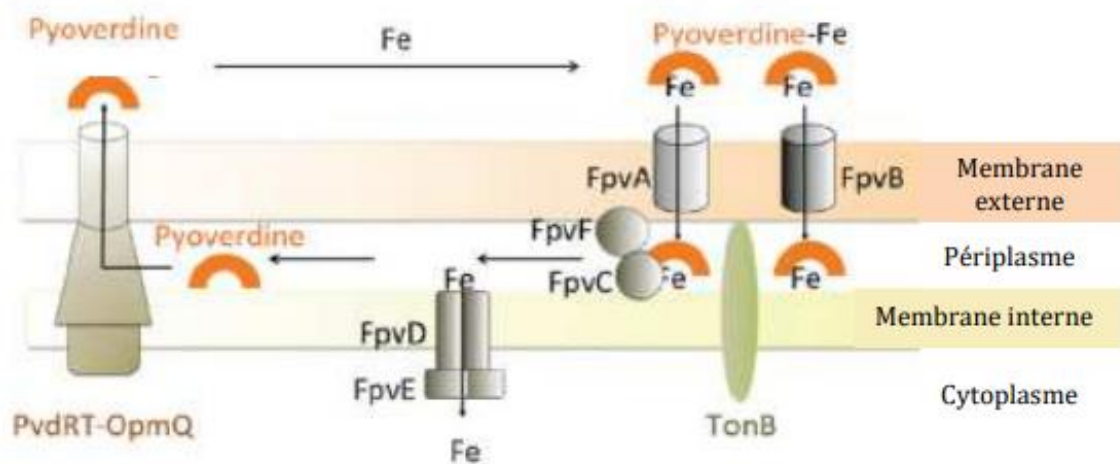


Figure 07 : Acquisition du fer par la voie pyoverdine (Paulen, 2017).

III.5. Les applications de la pyoverdine

Les sidérophores ont de plusieurs applications, ils améliorent la croissance de plusieurs microorganismes non cultivables, ils augmentent l'absorption de Fe par les plantes comme ils sont utilisés contre les phytopathogènes et ont la capacité de remplacer les pesticides dangereux (Saha *et al.*, 2016).

III.5.1. La pyoverdine en tant que biocapteur en améliorant la bioremédiation des métaux lourds

La pyoverdine peut être utilisée comme un outil puissant pour surveiller la pollution par le cuivre dans l'environnement (Kun *et al.*, 2016). Un biocapteur fluorescent basé sur la pyoverdine, élément de reconnaissance biologique, permettant de détecter sélectivement les ions cuivre et dans une matrice compliquée et la fluorescence de la pyoverdine est évidemment stoppée après la liaison avec cuivre (Figure 08) (Kun *et al.*, 2016). Le biocapteur a été utilisé avec succès pour la détection des ions du cuivre dans l'eau potable, l'eau de mer et les échantillons biologiques, et les résultats obtenus concordent bien avec ceux obtenus par spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (Kun *et al.*, 2016).

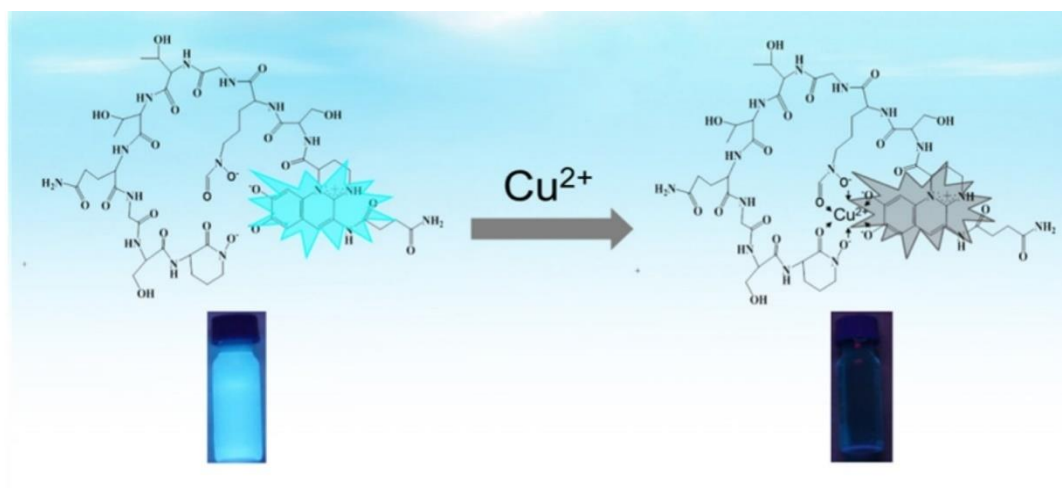


Figure 08 : la perte de la fluorescence après une formation d'un complexe pyoverdine-ion cuivre (Kun *et al.*, 2016).

Il a été signalé que la sécrétion de pyoverdine par des *Pseudomonas* fluorescents isolés d'une station de traitement des eaux usées et de compost peut séquestrer le zinc de façon marquée et constituer ainsi un potentiel d'agent biorémédiant du zinc (Saha *et al.*, 2016).

Edberg *et al.* ont étudié l'influence des pyoverdines de *P. fluorescens* sur l'élimination des métaux de déchets provenant d'une ancienne mine d'uranium, les métaux toxiques tels que Ni et U ont été complexés mais pas en quantité significative par rapport à des métaux non toxiques tels que Fe (Cézard *et al.*, 2015). Néanmoins, le processus doit être envisagé dans les cas où les concentrations de métal toxique sont élevées (Cézard *et al.*, 2015).

Les pyoverdines ont un fort potentiel de dissolution, de liaison et de transport de l'uranium dans l'environnement (Hussien *et al.*, 2013). Dans des conditions optimales, il a été constaté que la pyoverdine de *Pseudomonas fluorescens* SHA 281 était complexée avec environ 90,48% et 86,41% d'U (VI) de monazite et de (Th-U) concentré, respectivement (Hussien *et al.*, 2013).

La concentration de la pyoverdine produite par *P. fluorescens* DSMZ 50090 (ATCC 13525) en présence de métaux Fe, Cu et Zn a été comparée aux concentrations maximales admissibles indiquées dans la réglementation internationale (par exemple 98/83/EC), et une corrélation qui pourrait être utile pour construire un biocapteur colorimétrique a été observée (Chiadò *et al.*, 2013).

III.5.2. La pyoverdine comme inhibiteur de corrosion

P. aeruginosa BUP₂ extraite du rumen d'animal a été utilisé comme inhibiteur de corrosion pour l'acier doux dans du HCl 0,5 M, et son efficacité a été étudiée par méthode gravimétrique, électrochimique spectroscopie d'impédance et techniques de polarisation à des températures de 29,85°C, 34,85°C et 39,85°C, la pyoverdine de *P. aeruginosa* présente une excellente efficacité d'inhibition dans ces températures (Shainy *et al.*, 2016).

L'adsorption de la pyoverdine sur une surface d'acier doux augmente la résistance au transfert de charge et l'énergie d'activation de la corrosion des métaux. Un rendement de protection de 97,55% a été signalé pour un inhibiteur de 10 ppm à 29,85°C, le biofilm bactérien peut protéger le métal même à 34,85°C et 39,85°C et son efficacité réduite à seulement 73 et 68%. La pyoverdine inhibe les réactions anodiques et cathodiques et agit donc comme un inhibiteur de type mixte (Shainy *et al.*, 2016).

III.5.3. La pyoverdine en tant qu'agent de biocontrôle potentiel

Les pyoverdines sont impliqués dans la lutte contre les maladies du flétrissement de la pomme de terre causées par *Fusarium oxysporum*, elles sont également actives contre *Gaeumannomyces graminis*, associé à un déficit de croissance du blé et de l'orge, en plus il a été signalé que les pyoverdines suppriment les agents phytopathogènes dans les cacahuètes et le maïs (Saha *et al.*, 2016).

III.5.4. L'effet antimicrobien de la pyoverdine

La pyoverdine de *Pseudomonas aeruginosa* PA1a montré des effets inhibiteurs sur la croissance, la production de sidérophores et la formation du biofilm de *Vibrio* sp. marine (*Vibrio parahaemolyticus* WzW1 et Wz2121 et *Vibrio cyclitrophicus* HS12) (Weiwei *et al.*, 2016).

Il a été déterminé que cette pyoverdine avait une masse moléculaire de 1333,54 Da, telle que déterminée par MALDI-TOF / TOF, et appartenait à la pyoverdine de type I, telle que déterminée par analyse PCR de son récepteur de ferri-pyoverdine de la membrane externe correspondant (Weiwei *et al.*, 2016).

De plus, les espèces d'animaux marins *Apostichopus japonicus* cultivée dans de l'eau de mer prétraitée à la pyoverdine ont montrées un pourcentage relatif de survie de 89% quand elles ont été mises au défi par *Vibrio splendidus*. Ces résultats ont

démontré que la pyoverdine pourrait être un agent prometteur pouvant potentiellement être appliqué pour traiter la vibriose (Weiwei *et al.*, 2016).

III.5.5. La pyoverdine favorise la croissance des plantes

Depuis plusieurs décennies, on sait que différentes espèces de *Pseudomonas* peuvent améliorer la croissance des plantes en produisant de pyoverdine. Ces types de bactéries sont donc considérés comme des bactéries favorisant la croissance des plantes (Saha *et al.*, 2016).

L'apo-pyoverdine *Pseudomonas fluorescens* était efficacement assimilé par les plantes *Arabidopsis thaliana* et potentiellement transporté des racines aux pousses. La présence de pyoverdine dans le tissu racinaire a été étudiée par ELISA en utilisant des anticorps polyclonaux de lapin anti-pyoverdine, et de manière remarquable, l'apo-pyoverdine a aboli le phénotype de carence en fer et a rétabli la croissance de plantes maintenues dans le milieu pauvre en fer (Trapet *et al.*, 2016).

Une expérience a été menée par Masalha *et al.* 2000, où les plantes ont été cultivées dans des conditions à la fois stériles et non stériles sur un sol de limon loess. Après l'incubation, il a été observé que les plantes cultivées dans des conditions non stériles poussaient bien et présentaient des concentrations de Fe plus élevées dans les racines (Saha *et al.*, 2016).

Masalha *et al.* (2000) ont montré que la production de sidérophores microbiens était totalement supprimée lorsque les plantes étaient cultivées dans des conditions stériles. Ils ont donc conclu que les sidérophores microbiens pourraient être considérés comme une source de fer efficace pour les plantes (Saha *et al.*, 2016).

III.5.6. La stratégie du cheval de Troie

Le sidérophore utilise la "stratégie du cheval de Troie" pour former des complexes avec des antibiotiques et contribue à l'administration sélective d'antibiotiques aux bactéries résistantes aux antibiotiques (Figure 09) (Saha *et al.*, 2016)

La pyoverdine produit par *P. fluorescens* ATCC 13525 a été utilisé pour construire un conjugué (Pv9446SebAmp) efficace contre *P. aeruginosa*, cette pyoverdine contient un résidu alysine avec un groupe ϵ -amino libre dans sa chaîne peptidique et peut être utilisée pour l'absorption du fer par *P. aeruginosa*, Contrairement à l'ampicilline, ce conjugué présentait une activité antibactérienne

élevée contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15692 et ATCC 27853, efficace uniquement contre la souche utilisant la pyoverdine pour l'absorption de fer (Kinzel *et al.*, 1998). Ceci suggère que le conjugué entre dans la cellule bactérienne via le voie d'absorption du ferripyoverdine (Kinzel *et al.*, 1998).

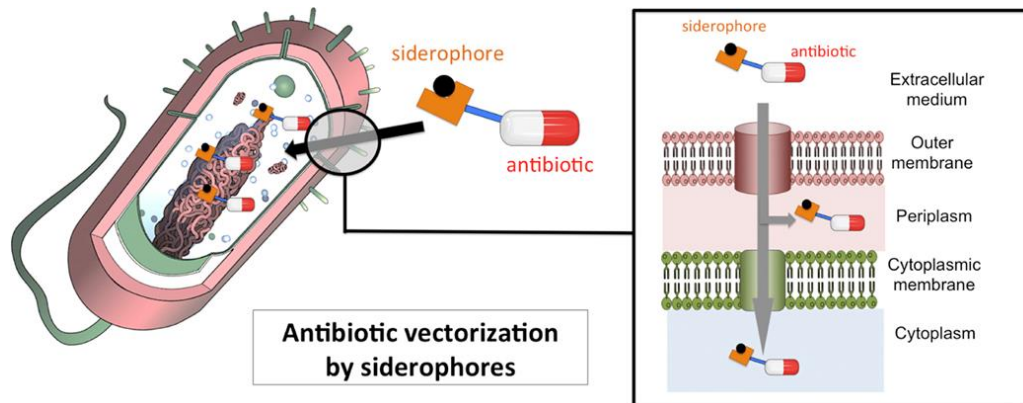


Figure 09 : les conjugués sidérophores / antibiotiques : exploitation de l'absorption de fer pour administrer des médicaments contre les maladies bactériennes (Schalk, 2018).

Matériels et méthodes

1. Échantillonnage

Des échantillons des racines des graminées sauvages (orge des rats : *Hordeum murinum*) ont été collectés avec leur partie aérienne dans des sachets en plastique et transportés au laboratoire. L'échantillonnage a été effectué dans deux régions de la wilaya de Mostaganem, l'un dans un champ de pomme de terre à Touahria au mois de Novembre 2018, et l'autre dans un endroit à Mesra au mois de Mars 2019.

2. Isolement des *Pseudomonas*

Des échantillons de racines ont été secoués vigoureusement pour enlever le sol qui adhère (Vlassak *et al*, 1992). Pour isoler ces bactéries, de manière aseptique 1 g de chaque échantillon a été mis dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile, ensuite les tubes ont été agités par un vortex.

Une série de suspensions-dilutions allant jusqu'à 10^{-5} a été réalisée à partir de chaque échantillon avant d'étaler 0,1 ml de chaque suspensions dilutions en boîtes de Pétri contenant le milieu de King B (Dahah, 2017). Deux boîtes Pétri ont été utilisées pour chaque dilution. Après l'ensemencement, les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 48h.

3. Purification des *Pseudomonas* fluorescents

Toutes les colonies productrices de pigment jaune-vert apparues sur les boîtes du milieu King B ont été prélevées et ensemencés par la méthode des stries sur le milieu King A pour purifier et détecter à la fois la présence de *Pseudomonas aeruginosa*.

L'observation macroscopique et microscopique après une coloration simple par la fuchsine (Besson, 1898) a été utilisée pour confirmer l'obtention d'une culture pure.

4. Conservation des isolats

Les isolats ont été ensemencés en stries sur milieu gélosé inclinée en tubes, ensuite incubés à 30°C pendant 48h en. Les cultures en tubes ont été conservées à 4°C.

5. Orientation vers l'espèce *Pseudomonas fluorescens*

Les souches conservées ont été identifiées selon leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques, comme indiqué dans le Manuel de bactériologie systématique de Bergey (Rekha, 2011), en permettant de sélectionner les souches *P. fluorescens*.

Dans cette étude, on a travaillé aussi avec deux souches de *Pseudomonas fluorescens* (nommées PK et P14) identifiées par la galerie Api 20NE et conservées au glycérol, elles ont été fournies par Mlle MAZARI Hibat Errahmen du laboratoire de Microbiologie de

Mostaganem. Ces souches provenaient de prélèvement rhizosphérique (orge des rats : *Hordeum murinum*) d'un champ de vigne.

5.1. L'observation macroscopique

La morphologie et les pigments des colonies ont été étudiés sur le milieu King B après incubation à 30°C pendant 24h, puisqu'il s'agit d'un milieu sélectif pour les *Pseudomonas* (Mazumdar *et al.*, 2007).

5.2. L'observation microscopique

Une coloration de Gram et un examen en état frais ont été faite selon Denis *et al* (2007) pour savoir le type de Gram, la taille des cellules (Narayanasamy, 2013), le mode de regroupement et la mobilité (Delarras, 2014).

5.3. Croissance à 4°C et 42°C

Certains *Pseudomonas* comme *P. fluorescens* et *P. putida* ont la capacité de se développer à des températures aussi basses que 4°C, *P. aeruginosa* peut être séparé des autres *Pseudomonas* spp. fluorescents (par exemple, *P. fluorescens*, *P. putida*) par sa capacité à se développer à 42 ° C (Wisplinghoff, 2017). A partir de ça, des boîtes de milieu King B ont étéensemencées et incubées à 4°C et 42°C pendant 24h. La lecture s'effectue par la présence ou l'absence de la culture bactérienne pour les deux températures.

5.4. Caractérisation biochimique

Quelques caractères ont été étudiés par des tests biochimiques classiques pour sélectionner progressivement les souches *Pseudomonas fluorescens*.

5.4.1. Test d'oxydase

La zone réactionnelle d'une bandelette réactive contient : du dichlorure de N, N-diméthyl-1,4-phénylènediammonium 0,1 µmol, 1-naphtol 1,0 µmol.

En présence d'oxygène moléculaire, le système cytochrome oxydase / cytochrome c peut réduire un certain nombre de substances organiques, notamment le réactif dit NaDi (1 naphtol + diméthylparaphénylènediamine) pour former la molécule de condensation bleu indophénol.

En utilisant une pipette Pasteur, une seule colonie bien développée a été frottée avec la pipette Pasteur sur la zone de réaction. La Comparaison avec l'échelle de couleur a été faite après environ 20 à 60 secondes. Chez les bactéries positives au cytochrome oxydase, la zone de réaction passe du bleu au bleu-violet.

5.4.2. Test de catalase

La recherche de catalase, qui agit sur le peroxyde d'hydrogène pour produire de l'eau et de l'oxygène. Une petite quantité d'une colonie est placée sur une lame de microscope et une goutte de peroxyde d'hydrogène 3% est ajoutée. Si la colonie est catalase positive, des bulles de gaz sont produites et si il n'y a aucune production de bulles, ceci indique un résultat négatif (Sirois, 2018). Selon Joffin et Leyral (2014), la réaction catalysée est la suivante :



5.4.3. Tests Voges – Proskauer et rouge de méthyle (VP-RM)

Les bactéries oxydatives ne sont pas concernées par ces tests (Joffin et Leyral, 2014), pour cette raison, il a été réalisé pour confirmer que nos souches de *Pseudomonas* ne sont pas fermentatives.

Le milieu de Clark et Lubs permet l'étude des produits de fermentation du glucose : pour la différenciation entre deux types de fermentation « acides mixtes » et « butylène glycolique ».

Deux tubes de bouillon Clark et Lubs ont étéensemencés par la bactérie et incubés à 30 ° C pendant 48 heures. Ensuite quelques gouttes de réactif RM ont été ajoutées, l'absence de changement de couleur montre un milieu légèrement acide ou alcalin, la bactérie est dite RM-, la coloration rouge montre un milieu relativement acide (RM+). Dans le test VP 3 gouttes de VP1 et 3 gouttes de VP2 ont été ajoutées, puis le tube a été agité et incliné pour favoriser l'oxygénation du milieu. La présence d'acétoïne issu de la fermentation butylène glycolique se traduit par une coloration rose, l'absence de changement de couleur indique un résultat négatif.

5.4.4. Test urée-indole (urée-tryptophane)

Ce milieu jaune orangé a étéensemencé par la bactérie et incubé à 30°C pendant 24h. Après incubation, en premier temps la coloration rouge traduit une alcalinisation due à l'hydrolyse d'urée par la bactérie (uréase +), et la coloration orange montre l'absence d'hydrolyse de l'urée (uréase -) (Joffin et Leyral, 2014). Ensuite, l'ajout de réactif de Kovacs permet de mettre en évidence l'indole formé, la couche alcoolique se sépare de la couche aqueuse et se colore alors en rouge (indole +) (Delarras, 2014).

5.4.5. Test TSI (Triple Sugar Iron)

La gélose TSI est un milieu qui différencie les bacilles à Gram négatif en fonction de leur capacité à fermenter les sucres et à libérer l' H₂S. Le milieu contient 0,1 % de glucose pour 1% de lactose et 1% de saccharose. Le rouge de phénol sert d'indicateur pour détecter le changement de pH et le sulfate ferreux détecte la formation d' H₂S (Tang et Stratton, 2018).

Le culot a été ensemencé par piqure centrale et la pente ensemencé en strie. L'incubation à une température de 30°C pendant 24 h.

Le culot jaune indique une acidification et la bactérie est dite glucose positive, et l'absence d'acidification est montrée par une couleur inchangée. La pente rouge indique une absence d'acidification (la bactérie dégrade les acides aminés avec alcalinisation du milieu) et la pente jaune montre une acidification.

Le Noircissement du milieu indique la production d'H₂S. La production de gaz est indiquée par des fissures dans la gélose et le gaz peut également pousser la gélose vers le haut du tube (**Tang et Stratton, 2018**).

5.4.6. Test mannitol-mobilité-nitrate

Ce milieu avec une gélose molle a été ensemencé par piqure centrale et incubé à 30°C pendant 24h. Les bactéries mannitol + acidifient le milieu qui vire de rouge au jaune, sachant que l'acidification produite par les bactéries aérobies strictes est en général insuffisante pour permettre le virage de l'indicateur. Les bactéries mobiles essaient à partir de la strie d'inoculation et troublent le milieu, et ceux qui ne sont pas mobile persistent près de la piqure (**Joffin et Leyral, 2014**).

5.4.7. Réduction de nitrate

La réduction de nitrate peut suivre diverses voies exothermiques : la réduction de nitrate en nitrite (utilisant une nitrate-réductase) et la réduction de nitrate en diazote (utilisant une nitrate-réductase et une nitrite-réductase) (**Joffin et Leyral, 2014**).

Le tube a été ensemencé et étuvé à 30°C pendant 48h, après l'incubation 2 gouttes de chaque réactif nitrites (NR1 et NR2) ont été ajoutées. Une coloration rouge indique la présence (nitrate réductase +). En cas de milieu incolore jaunâtre, le zinc est ajouté si après quelques minutes la couleur reste inchangée ceci indique que le zinc n'a pas réduit le nitrate parce que ce dernier a été réduit en azote par la bactérie (stade diazote). Une coloration rouge montre la présence de nitrites, donc le zinc qui a réduit le nitrate, et la bactérie est nitrate réductase négative.

5.4.8. Hydrolyse de la caséine

La caséine, protéine de lait, peut être hydrolysée par certaines espèces bactériennes, la recherche de l'activité caséolytique est notamment utile dans l'identification des *Bacillus* et parfois des *Pseudomonas* (**Delarras, 2014**). *P. fluorescens* et *P. aeruginosa* hydrolysent la

caséine à 82% et 83% respectivement, tandis que *P. putida* est caséine négative (**Reynolds et al., 1979**).

Pour réaliser ce test la bactérie a été ensemencée en centre d'une gélose au lait en strie. Ensuite les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 48h à 72h. Après incubation, les zones d'éclaircissement du milieu autour des colonies traduisent un résultat positif, l'absence de telles zones exprime une caséinolyse négative (**Delarras, 2014**).

5.4.9. Hydrolyse de la gélatine

La gélatine est utilisée pour identifier les bactéries qui produisent l'enzyme protéolytique, la gélatinase. Les organismes produisant de la gélatinase sont capables d'hydrolyser la gélatine et lui font perdre ses caractéristiques gélifiantes (**Tang et Stratton ,2018**). Le tube de gélatine solidifiée a été ensemencé par piqûre centrale et incubé à 30°C de 48h à 4 jours, puis placé à 4°C pendant 30 min.

D'après **Delarras (2014)** si le milieu liquide reste liquide ceci indique une gélatine hydrolysée (27% de souches *P. fluorescens*), un milieu solidifié désigne une gélatine non hydrolysée.

6. Souches des microorganismes cibles

Afin de déterminer les activités antagonistes et le spectre d'action des *Pseudomonas*, des microorganismes cibles ont été utilisés. Les souches de référence proviennent de l'institut Pasteur et du laboratoire de microbiologie et biologie végétal, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem. La souche *Candida albicans* de la flore vaginale est fournie par Mme BECHELAGHEM Nadia de Laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.

Les souches bactériennes (souches cibles) ont été examinées par une coloration de Gram tandis que les deux souches de *Candida* ont été observées à l'état frais. Toutes les souches cibles ont été ensemencées dans des milieux gélosés sélectifs et dans un milieu GN (tableau 01). Ensuite une recherche de catalase et d'oxydase a été effectuée sur les bactéries cibles.

Les souches cibles ont été aussi ensemencées en strie sur la gélose King B carencé en fer, et incubé à 37°C pendant 24h.

Tableau 01 : les souches cibles et quelques milieux pour leur confirmation.

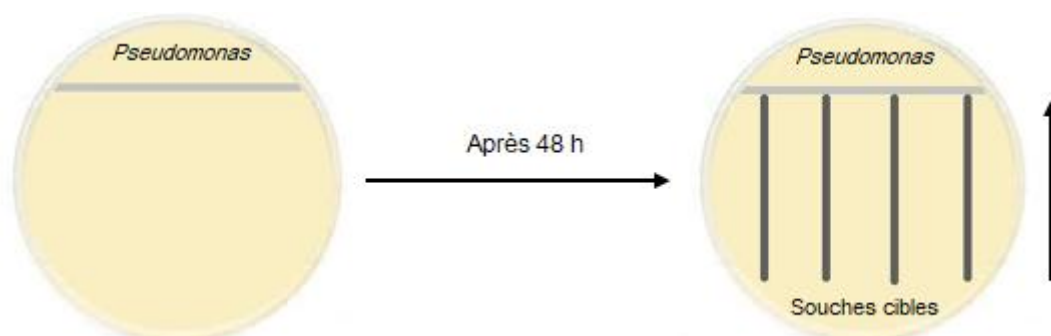
Les microorganismes cibles	Milieu de culture
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	Chapman
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Mac Conkey et TSI
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	Mac Conkey
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	King A
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	GN
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	GN
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Sabouraud
<i>Candidat albicans</i>	Sabouraud

7. Test d'antagonisme *in vitro* (Méthode directe)

Dans ce travail deux milieux ont été utilisés pour l'antagonisme, le milieu King B standard, et le milieu King B additionné de 1 mg de Fe^{3+} L⁻¹ sous forme de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ selon Meyer et Abdallah (1978).

Cette méthode consiste à ensemencer les souches antagonistes de *Pseudomonas fluorescens* (P10, P11, P14, P16, P20, PK) en trait à la surface du milieu solide et en bordure de la boîte de Pétri contenant la gélose. Après incubation pendant 48h à 30°C, les souches testes sont ensemencés perpendiculairement au trait de *Pseudomonas fluorescens* (figure10).

Après 24h d'incubation à 37°C la lecture des résultats a été réalisée par mesure de la zone d'inhibition (absence de croissance des souches pathogènes) entre la bordure de la souche cible et *Pseudomonas* (Selvin *et al.*, 2009).

**Figure 10** : un schéma de la méthode d'antagonisme direct *in vitro*.

8. Production de la pyoverdine

Cette étape est effectuée selon le principe de la méthode décrite par Meyer et Abdallah (1978). 1 ml de chaque souche bactérienne de densité optique égale 0,4 a été ensemencé dans un flacon contenant 30 ml de milieu succinate standard. L'incubation a été faite pendant 48 h à 25 ° C sous agitation de 150 tr/min pour favoriser la sécrétion de la pyoverdine.

9. Dosage de la pyoverdine

Après centrifugation à 6000 tr/min pendant 10 minutes les surnageants ont été récupérés et filtrés (Dahah, 2017) par filtre millipore 0,22 µm, puis analysés par spectrophotomètre pour caractériser le spectre d'absorption UV-Visible de ce pigment.

Un dosage de la pyoverdine par spectrophotométrie est effectué à 400 nm par la suite pour déterminer la concentration de pigment fluorescent dans le milieu succinate (Meyer et Abdallah, 1978).

Les concentrations sont calculées selon la loi de Beer Lambert ($A = \epsilon.l.C$).

10. Etude de l'effet antibiotique des surnageants

Pour réaliser ce test la méthode de diffusion sur disque a été utilisée. Les boîtes de gélose King B ont été ensemencées avec 100 µl de chaque germe test normalisé à l'aide d'un spectrophotomètre à $\lambda=625$ nm à une densité optique de 0,08 à 0,1 valeur équivalente au standard 0,5 MacFarland et à 530 nm pour les levures située entre 0,12 et 0,15. Ensuite, des disques de papier filtre wattman (d'environ 6 mm de diamètre) ont été déposés à l'aide d'une pince flambée et ensuite imprégnés avec 50 µl de surnageant de chaque *P. fluorescens*. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37° C pendant 24 h. L'agent antimicrobien diffuse dans la gélose et inhibe la croissance du microorganisme cible et les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (Balouiri *et al.*, 2016).

11. Extraction solide/liquide de la pyoverdine

Cette méthode a été faite selon El Feghali et Nawas (2018) avec des modifications.

La souche qui a montré la plus forte concentration et un pouvoir antagoniste le plus important a été ensemencé sur 6 boîtes pétries contenant le milieu King B et incubé à 30°C pendant 48h. Ensuite les colonies ont été éliminées par des écouvillons et seulement la gélose pigmentée sur boîte a été gardée.

La gélose a été coupée par la suite en carrés de 1 cm et placée dans un bécher et une quantité de 50 ml de méthanol a été ajoutée. Le mélange a été secoué vigoureusement et le méthanol (coloré en vert) a été récupérer après filtration. Puis, l'extrait a été centrifugé et filtré par un filtre millipore 0,22 µm.

La pyoverdine extraite a été testée pour une estimation de son pouvoir antibiotique vis-à-vis les souches cibles. Ce test est réalisé par l'utilisation des disques de diffusion, et les zones d'inhibition ont été mesurées (**Balouiri *et al.*, 2016**).

12. Identification par galerie API 20NE

Afin d'obtenir une orientation vers le genre et l'espèce de l'isolat performant P11, une identification biochimique par galerie API 20NE a été effectuée. La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries croissent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. Le test d'oxydase constitue le 21^{ème} test d'identification à effectuer hors galerie (**Delarras, 2014**). La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

12.1. Inoculation de la galerie

Pour le bon fonctionnement des tests de la galerie API 20 NE, il est très important d'ajuster la densité de l'inoculum au point 0,5 de McFarland. Le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation sont réunis, ensuite environ 5ml d'eau distillée stérile sont répartis dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

Les microtubes des tests NO₃ à PNPG ont été Remplis (et non les cupules) avec la suspension précédente. Ensuite environ 200 µl de la suspension précédente est transférée dans une ampoule d'API AUX Medium pour remplir les microtubes et les cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) ont été remplies par d'huile de paraffine stérile pour former un ménisque convexe. A la fin la boîte d'incubation a été fermée et incubé à 29°C ± 2°C pendant 24 heures.

12.2. Lecture et interprétation

Après incubation, la lecture de la galerie est faite en se référant au tableau de lecture. Les résultats de toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG) sont notés sur la fiche de résultats.

- **Test NO₃** : Une goutte de chaque réactif (NIT1 et NIT2) est ajoutée dans la cupule NO₃.
Test TRP : Une goutte de réactif kovacs est ajoutée dans la cupule TRP. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.
- **Tests d'assimilation** : La croissance bactérienne est observée, une cupule trouble indique une réaction positive.

13. Identification par galerie API 20E

API 20E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux.

La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

Nous avons complété l'identification des souches (P10, P16, P20, P11) par cette galeries .Il est vrai que la galerie API 20E n'est pas adaptée à l'identification des *P. fluorescens*, mais nous avons juste considéré quelques tests, en se basant sur les critères utilisés dans l'identification de cette espèce.

Résultats et discussion

1. Isolement et purification des isolats

Dans la présente étude nous avons examiné deux échantillons de sol rhizosphérique d'une graminée sauvage (orge des rats = *Hordeum murinum*) (fig. 11). Les 38 colonies bactériennes choisies sur le milieu King B ont toutes montré une fluorescence jaune-verdâtre. Leur purification sur milieu King A et la coloration simple de leurs cellules par la fuchsine, ont permis de retenir 14 isolats de *Pseudomonas* fluorescents non productrice de pyocyanine (5 isolats du site de Touahria et 9 isolats du site de Mesra).



Figure 11 : Un échantillon d'orge de rat du champ de Touahria.

2. Orientation vers l'espèce *Pseudomonas fluorescens*

Des études supplémentaires ont été réalisées pour cribler seulement les souches de *Pseudomonas fluorescens*.

2.1. L'examen macroscopique

Sur le milieu gélosé King B les souches ont présentées des colonies isolées de 0,5 – 1,5 mm de diamètre de forme renflée ou plat, circulaire, muqueuse et homogène, avec une pigmentation jaune-verdâtre fluorescente (fig. 12).

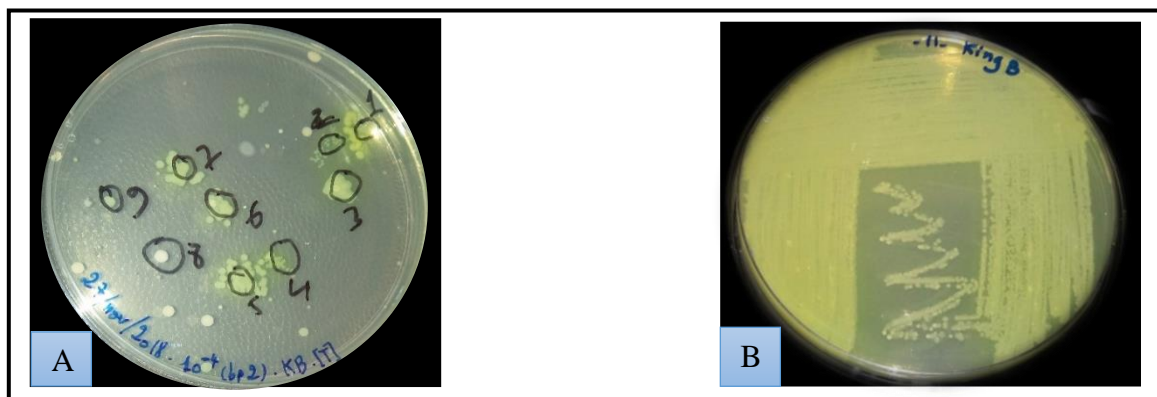


Figure 12 : Aspect macroscopique des isolats de *Pseudomonas* sur gélose King B.

A : Colonies de l'isolement, B : Souche P11.

2.2. L'examen microscopique

La coloration de Gram a montré des cellules de forme bacillaire mince et de couleur rose (Gram négative) (fig. 13). Les bactéries examinées à l'état frais, apparaissent en forme bâtonnets très mobiles.

Les *Pseudomonas* spp. ont une largeur de 0,5-1 µm sur une longueur de 1,5-5 µm (Falkow *et al.*, 2006). Elles sont des bacilles, en forme de bâtonnets, ne formant pas de spores, elles sont mobiles par un seul flagelle comme des *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* et *P. oryzihabitans* ou par plusieurs flagelles polaires comme chez *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. luteola* (Wisplinghoff, 2017).

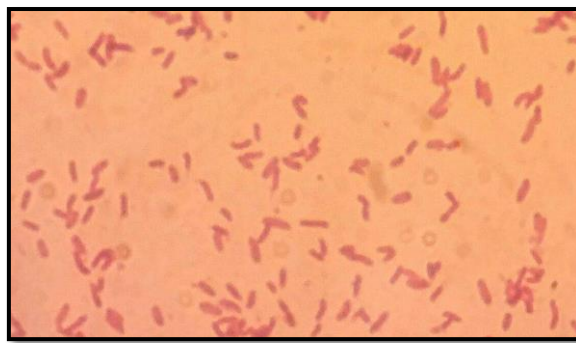


Figure 13 : Observation microscopique (x1000) des *Pseudomonas* après une coloration de Gram.

2.3. Croissance à 4°C et 42°C

Les isolatsensemencés n'ont pas montré une croissance à 42°C par contre ils ont tous poussé à 4°C avec une légère production d'un pigment jaune verdâtre.

2.4. Test d'oxydase et de catalase

Tous les isolats sont catalase positive. Les 14 *Pseudomonas* testés, ont décomposé l'eau oxygénée en eau et en oxygène qui se traduit par le dégagement des bulles de gaz (fig.14). Ces même isolats ont fait virer la couleur du réactif d'oxydase au violet ce qui montre qu'ils sont oxydase positif (fig. 14).

Nos résultats sont en accord avec les études de plusieurs auteurs, qui ont montré que les *Pseudomonas* sont des producteurs de catalase et de cytochrome oxydase (Uğur *et al.*, 2012; Burns, 2018), à l'exception de quelque espèces comme *P. luteola*, *P. syringae* et *P. oryzihabitans* qui sont oxydase négative (Wisplinghoff, 2017).

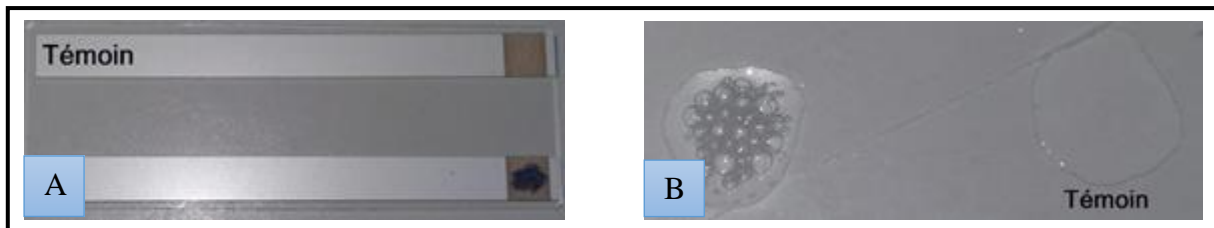


Figure 14 : A. Test d'oxydase pour un isolat de *Pseudomonas*. **B.** Test de catalase pour un isolat de *Pseudomonas*.

2.5. Tests VP-RM et urée-indole (urée-tryptophane)

Une absence de coloration après l'ajout des réactifs VP (α naphthol et KOH) et RM dans chaque tube du milieu Clark et Lubs indique que nos souches sont de VP et RM négatifs.

Dans le test urée-indole une coloration orange a été observée ce qui montre une uréase négative. La production d'indole a montré un résultat négatif par une absence d'un anneau rouge suite à l'addition de réactif Kovacs (fig. 15).

D'après les littératures, toutes les espèces de *Pseudomonas* ne produisent ni l'acétoïne, ni les acide mixtes et ni d'indole (Trivedi *et al.*, 2015).

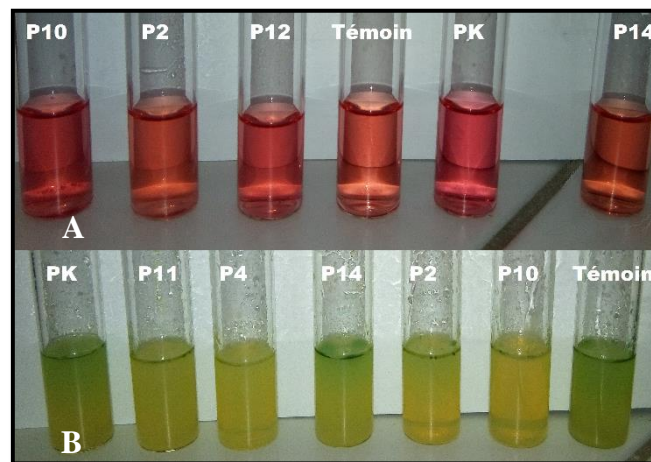


Figure 15 : A. Résultat de test urée pour quelques souches. **B.** Résultat de test d'indole.

2.6. Test TSI (Triple Sugar Iron)

Tous les tubes sont de couleur inchangé avec une pente et un culot rouge avec une absence de gaz et d' H_2S ce qui signifie une absence d'acidification des sucres (fig. 16). Ce qui est cohérent avec les autres travaux qui ont signalé que les *Pseudomonas* sont connues de ne pas fermenter les sucres (Aprameya, 2013).

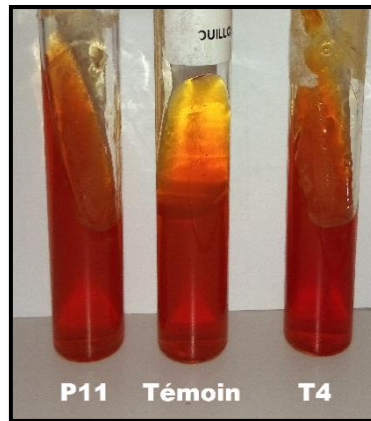


Figure 16 : Résultat de test TSI pour quelques isolats de *Pseudomonas*.

2.7. Test mannitol-mobilité-nitrate

L'absence de dégradation du mannitol révèle que tous les isolats sont mannitol négatif, sauf PK, T10 et 14 qui sont mannitol + / -. Des bulles d'air ont été formées par les souches P4, P11, P2 et P12. Concernant la mobilité, seulement les souches P4, P11 et P14 ont montré une diffusion dans le milieu (fig. 17).

Les bactéries aérobies strictes qui ne poussent pas en profondeur, leur mobilité ne pourra être lue. L'apparition des bulles avec un mannitol non fermenté indique une réduction des nitrates en azote (Joffin et Leyral, 2014).

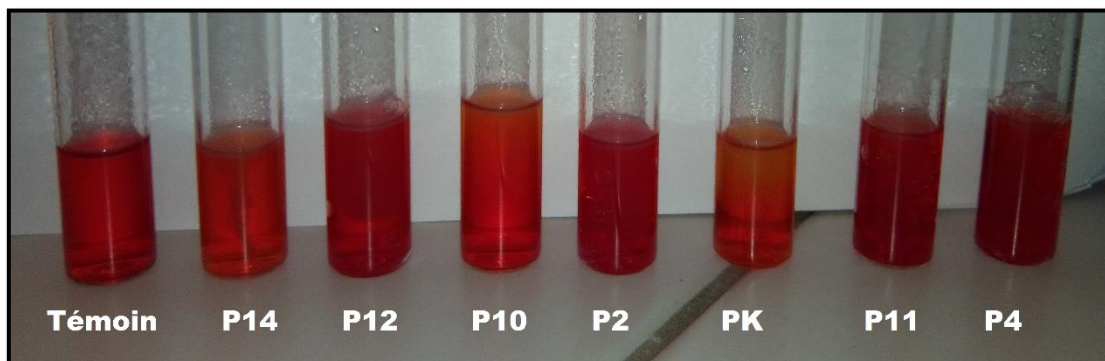


Figure 17 : Résultats du test mannitol-mobilité-nitrate.

2.8. Réduction de nitrate

Les tubes ont montré une coloration rouge après l'ajout de l'acide sulfanilique et α -naphthylamine ce qui indique une nitrate réductase positive. Sauf deux isolats P2 et P12 qui sont restés de couleur jaune, même après addition de zinc ce qui révèle une transformation du nitrate en azote atmosphérique (fig. 18).

Les *P. fluorescens* possèdent un métabolisme de type strictement respiratoire avec de l'oxygène comme accepteur final d'électrons, dans certains cas le nitrate peut être utilisé comme accepteur d'électrons alternatif, permettant ainsi une croissance par respiration anaérobie par un processus de dénitrification (Albrecht, 2013).

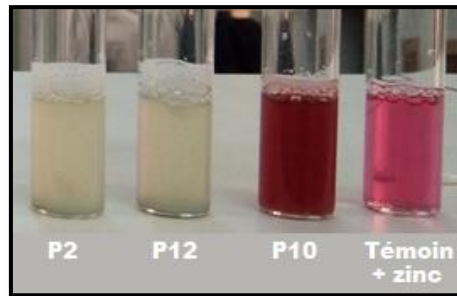


Figure 18 : Résultat du test de réduction du nitrate pour quelques isolats de *Pseudomonas*.

2.9. Hydrolyse de la caséine

Des zones claires ont été observées pour quelques isolats, indiquant qu'ils sont des caséinase positive (fig. 19 et tableau 01). Les *P. fluorescens* sont reconnues par leur production des enzymes thermostables, telles que les protéases (exemple : la métalloprotéase), elles peuvent provoquer de graves problèmes dans l'industrie laitière, tels que l'hydrolyse des protéines du lait (Martins *et al.*, 2015).

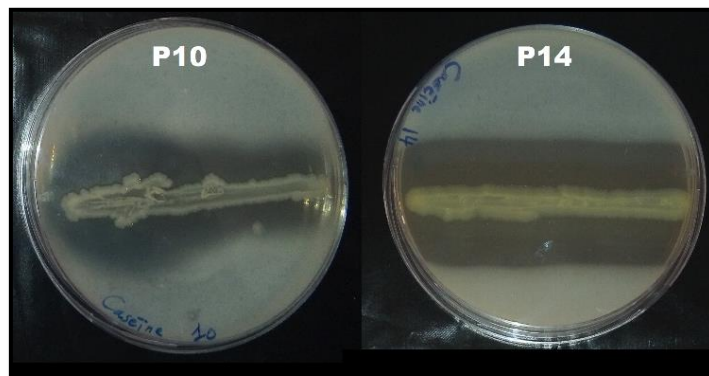


Figure 19 : Résultat de l'hydrolyse de la caséine.

2.10. Hydrolyse de la gélatine

Après réfrigération à 4°C, on a obtenue des souches gélatinase positive montant des tubes de gélatine liquide seulement en surface, et d'autres tubes sont restés gélatine solides indiquant des souches gélatinase négative (fig. 20 et tableau 02). Selon **Suman et al. (2015)**, toutes leurs souches de *P. fluorescens* isolées à partir d'une rhizosphère de ris était gélatine positive. La production de protéases extracellulaires, comme évidence l'hydrolyse de la gélatine, est une propriété universelle de *P. aeruginosa*, présente chez *P. fluorescens* mais absente chez *P. putida* (**Stanier et al., 1966**).

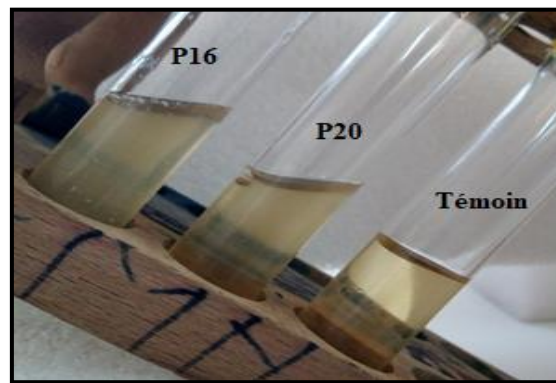


Figure 20 : Résultat de l'hydrolyse de la gélatine.

Tableau 02 : Résultats des tests d'hydrolyse chez les 14 isolats.

	P2	P4	P10	P11	P12	P5	P6	P13	P15	P16	P17	P18	P19	P20	PK	P14
G	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
C	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+

G : Gélatinase, C : Caséinase.

3. Souches des microorganismes cibles

Les bactéries et les levures cibles ont été examinées par une coloration de Gram et en état frais et ensemencées dans des milieux gélosé sélectifs et dans un milieu GN. Ensuite une recherche de catalase et d'oxydase a été effectuée sur ces souches, les résultats sont montrés dans le tableau (03).

Toutes les souches cibles ont montré une croissance normale dans le milieu King B ce qui permet de tester leur confrontèrent avec les *Pseudomonas* sur ce même milieu.

Tableau 03 : Quelques caractères des souches cibles.

	Oxydase	Catalase	Gram	Colonies
<i>E. coli</i>	-	+	-	Mac Conkey : Petites colonies rouges. TSI : Virage de couleur au jaune et production de gaz.
<i>P. mirabilis</i>	-	+	-	Mac Conkey : Petites colonies beige.
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	-	King A : Pigmentation bleu-vert foncé.
<i>S. aureus</i>	-	+	+	Chapman : colonies jaunes.
<i>B. cereus</i>	+	+	+	GN : Colonies blanches envahissantes
<i>B. subtilis</i>	-	+	+	GN : Petites colonies transparentes.
	Colonie sur milieu Sabouraud		Etat frais	
<i>C. albicans</i> ATCC	Petites colonies blanches et régulier.		Des cellules immobiles avec des différentes formes, à peu près sphériques avec un bourgeonnement et un noyau.	
<i>C. albicans</i>	Colonies grandes et autres petites, du couleur blanche à beige.		Des cellules immobiles avec des différentes formes, à peu près sphériques, et avec un noyau.	

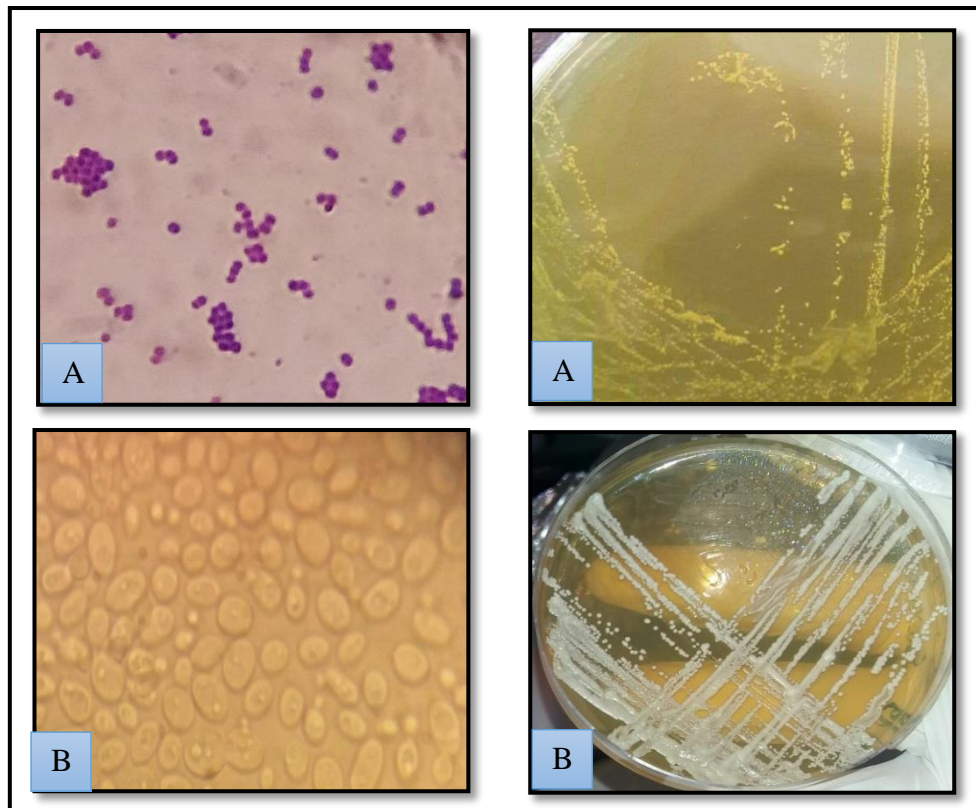


Figure 21 : Quelques caractères microscopiques (x1000) et morphologiques des souches cibles.

A : *S. aureus* ATCC 33862. **B** : *C. albicans* ATCC 10231.

4. Souches de *Pseudomonas fluorescens*

L'étude des caractéristiques biochimiques des isolats bactériens nous a permis de sélectionner les isolats rapprochés à *P. fluorescens* qui sont P10, P11, P16 et P20 en plus des souches PK et P14 fournis de laboratoire de microbiologie de l'université Abdelhamid Ibn Badis (Mostaganem) (tableau 04).

Tableau 04 : Caractéristiques des isolats utilisé pour les essais d'antagonisme.

<i>Isolat</i>	P10	P11	P16	P20	PK	P14
<i>Coloration de Gram</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Forme</i>	Bacillaire					
<i>Mobilité</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Oxydase</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Catalase</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Croissance à 4°C</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Croissance à 42°C</i>	-	-	-	-	-	-
<i>VP</i>	-	-	-	-	-	-
<i>RM</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Nitrate réductase</i>	+	+	+	+	+	+
<i>TSI</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Production d'indole</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Uréase</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Hydrolyse de la caséine</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Hydrolyse de la gélatine</i>	+	-	+	+	+	+

5. Test d'antagonisme *in vitro*

5.1. Milieu King B non additionné de fer

La recherche de l'activité antagoniste *in vitro* a été testée sur les six isolats de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis de huit microorganismes pathogènes. Les souches ont montré une activité antagoniste à l'encontre de tous les pathogènes à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, Les résultats obtenus (Tableau 05 et fig. 24) montrent que le degré d'antagonisme varie d'un isolat à un autre et d'un milieu à un autre.

Dans le milieu King B non additionné de fer, les cinq isolats (P10, P11, P16, P20, PK) ont exercé une inhibition à l'encontre des Gram négatifs, par contre l'inhibition envers les Gram

positifs a été exercés par les isolats (P11, P14, P16, PK). L'activité antagoniste contre les levures a été enregistrée chez tous les isolats sauf P14. Les isolats (P11) et (Pk) a montré une activité antifongique importante (fig. 22).

Sigee en 2005 a réalisé un test d'antagonisme *in vitro* entre *Erwinia amylovora* et *Pseudomonas syringae* en utilisant deux milieux de King B, l'un carencé en fer et l'autre additionnée de fer. Il a trouvé que *E. amylovora* a été inhibé seulement sur le milieu carencé en fer. Sigee a conclu que la production de sidérophores *in vitro* sur un milieu à faible teneur en fer peut être déterminée de plusieurs manières, notamment la production visible de pigment fluorescent et la démonstration d'une activité antagoniste envers d'autres bactéries.

Nos résultats sont accord aussi avec **Khazaal** et ces collaborateurs (2009) qui ont trouvé que la pyoverdine de *P. fluorescens* a une activité d'inhibition contre des champignons pathogènes, des bactéries et contre la levure le *C. albicans*.

Les interactions bactéries - pathogènes ont un intérêt important dans le domaine du biocontrôle. Le genre *Pseudomonas* solubilise activement le phosphate *in vitro* et produit plusieurs antibiotiques hautement spécifiques contre plusieurs micro-organismes tels que *Bacillus subtilis* et *Proteus vulgaris* (**Rekha et al., 2010**).

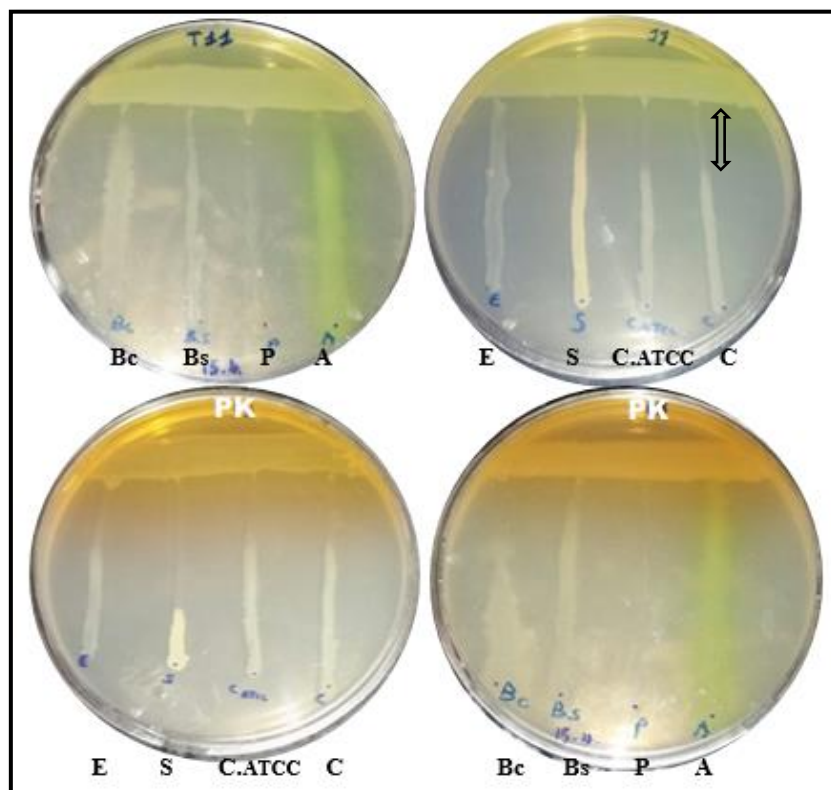


Figure 22 : Effet antagoniste des *P. fluorescens* vis-à-vis les souches cibles sur le milieu King B non additionné de fer.

E : *E.coli* ATCC25922, **S** : *S. aureus* ATCC33862, **C.ATCC** : *C. albicans* ATCC10231, **Bc** : *B. cereus* ATCC10876, **Bs** : *B. subtilus* ATCC6633, **P** : *P. mirabilis* ATCC35659, **A** : *P. aeruginosa* ATCC27853.

5.2. Milieu King B additionné de fer

Dans cette étude nous avons constaté que l'addition de fer dans le milieu King B inhibe l'activité antagoniste *in vitro* pour tous les isolats (sauf PK), en raison de l'absence de sécrétion de pigment jaune-verdâtre qui est la pyoverdine ce qui prouve que l'inhibition des pathogènes par les *Pseudomonas* étudiés et due à l'action de ce chélateur de fer (fig. 23).

Les expériences décrites par **Meyer et Abdallah (1978)** révèlent que la concentration en Fe^{3+} est le seul facteur qui régule la synthèse de la pyoverdine par *P. fluorescens*. De nombreux chercheurs ont montré que l'ajout de Fe^{3+} à des cultures inhibe la synthèse de la pyoverdine par des *Pseudomonas* fluorescentes (**Meyer et Abdallah, 1978**).

L'inhibition de la croissance microbienne par l'isolat Pk observée sur milieu King B sans fer et avec fer suggère qu'elle n'est pas due à l'action de la pyoverdine, mais à un antibiotique du groupe des phénazines comme il a été montré dans une étude ultérieure par **Benkredda et Mazari (2018)**.

Ceci est aussi en accord avec les études de plusieurs auteurs, qui ont montré que les substances phénaziniques sont connues pour leurs activités antimicrobienne (**Shahid et al., 2017**), telle que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* (**Dahah et al., 2015**).

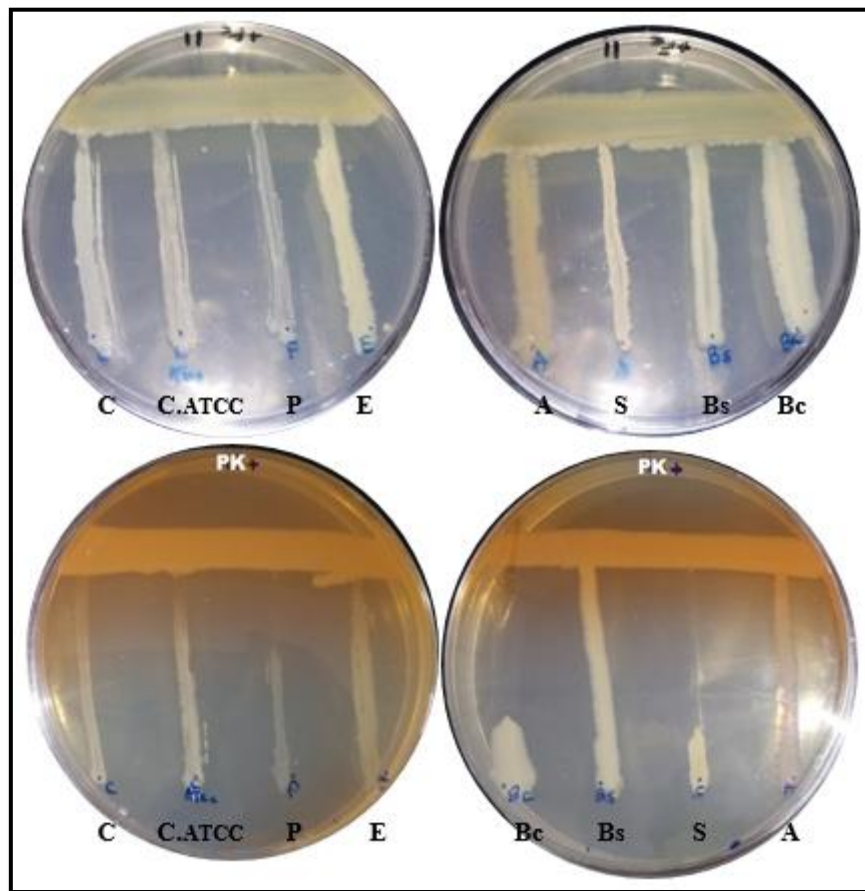


Figure 23 : Effet antagoniste de *P. fluorescens* vis-à-vis les souches cibles sur le milieu King B additionné de fer.

E : *E.coli* ATCC25922, **S** : *S. aureus* ATCC 33862, **C.ATCC** : *C. albicans* ATCC 10231, **Bc** : *B. cereus* ATCC 10876, **Bs** : *B. subtilus* ATCC 6633, **P** : *P. mirabilis* ATCC 35659, **A** : *P. aeruginosa* ATCC 27853.

La différence dans l'activité antagoniste exercée par ces isolats de *Pseudomonas fluorescens*, peut être expliquée par la production d'une ou plusieurs substances antimicrobiennes. Cela dépend de la souche, de la nature du métabolite ainsi que la quantité libérée dans le milieu utilisé.

Selon **Mezaache (2012)** la production de métabolites secondaires, impliqués dans l'antagonisme microbienne et sous l'effet du milieu de culture.

Tableau 05 : Les zones d'inhibitions (en mm) de l'activité antagoniste *in vitro* des isolats de *Pseudomonas fluorescens* vis-à-vis les souches cibles.

Milieu King B	Souches cibles	Souches antagonistes					
		P10	P11	P14	P16	P20	Pk
Non additionné de fer	<i>E. coli</i> ATCC25922	0	0	0	0	0	15
	<i>P. mirabilis</i> ATCC 35659	14	10	0	5	8	24
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i> ATCC 33862	0	5	0	0	0	34
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0	15	0	0	0	0
	<i>B. cereus</i> ATCC 10876	0	0	11	10	0	21
	<i>C. albicans</i>	11	20	0	20	7	18
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	12	20	0	10	22	22
Additionné de fer	<i>E. coli</i> ATCC25922	0	0	0	0	0	0
	<i>P. mirabilis</i> ATCC 35659	0	0	0	0	0	16
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i> ATCC 33862	0	0	0	0	0	36
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0	0	0	0	0	0
	<i>B. cereus</i> ATCC 10876	0	0	0	0	0	32
	<i>C. albicans</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0	0	2	0	0	02

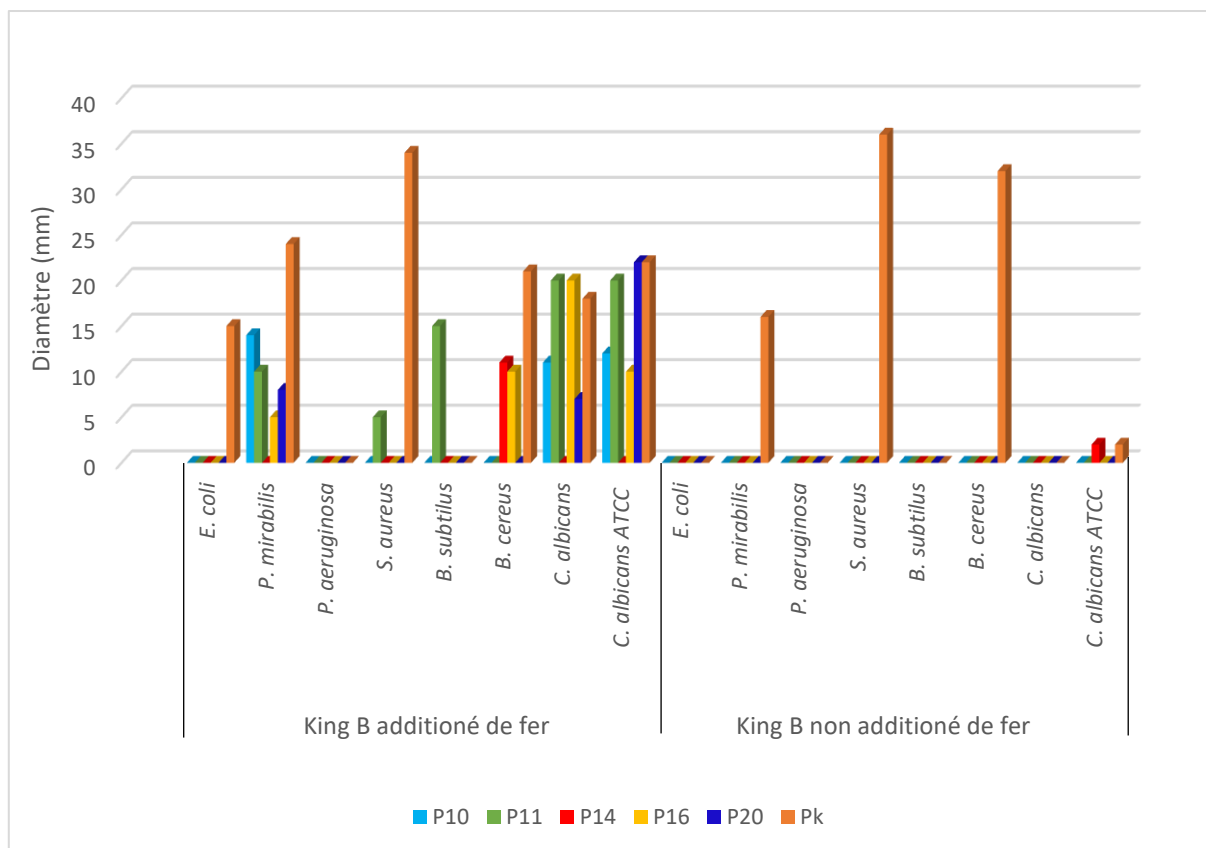


Figure 24 : Diamètre des zones d’inhibition des *Pseudomonas fluorescens* contre les souches cibles.

6. Production et dosage de la pyoverdine

La culture sur le milieu succinate nous a donné une culture de couleur verte avec les isolats P10, P11, P16, et P20, tandis que les cultures des isolats PK et P14 a une couleur marron orangé et beige respectivement.

Après une centrifugation suivie par une filtration, les spectres d’absorption des surnageants dans l’intervalle 200-600 nm ont montré deux pics pour les souches P10, P11, P16, et P20, un pic maximal à 400 nm et l’autre à 260 nm. Les surnageants des isolats PK et P14 ont montrés un seul pic à 300 nm et 260 nm respectivement (fig. 25).

Selon **Cézard, (2015)** le chromophore est la seule partie de la pyoverdine possédant des propriétés spectroscopiques, les spectres UV / Vis présentent des bandes d'absorption à pH = 8,0 à une position de 400 nm.

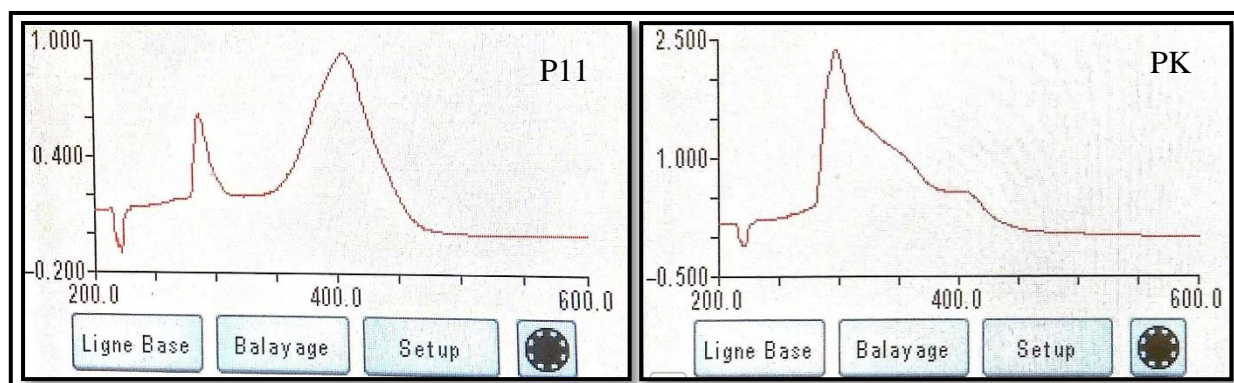


Figure 25 : Spectre d'absorption des surnageants de P11 et PK par spectrophotomètre UV-visible

Un dosage de la pyoverdine par spectrophotométrie est effectué à 400 nm et les concentrations sont calculées selon la loi de Beer Lambert ($A = \epsilon.l.C$), où A est l'absorbance, ϵ le coefficient d'extinction molaire ($\epsilon_{400} = \epsilon = 20.000. M^{-1} cm^{-1}$ soit $C = A_{400} / 20.000$) (fig.26).



Figure 26 : La concentration (en μM) des pyoverdines secrétées.

7. Etude de l'effet antibiotique des surnageants

Les surnageants de quatre *P. fluorescens* produits dans le milieu succinate ont montré un effet inhibiteur observable avec des zones situées entre 9 à 18 mm contre *Proteus mirabilis*, et *Candidat albicans* ATCC 10231 (tableau 06 et fig. 27), alors que les autres souches cibles n'ont été pas inhibées.

Ceci est peut être dû à la faible concentration de la pyoverdine dans les surnageants qui n'a pas pu séquestrer tout le fer disponible pour réprimer les souches cibles, ce qui a permis aux systèmes d'acquisition de fer chez les souches cible de s'approvisionner de cet élément. Des résultats qui se rapprochent de nos résultats sont montrés dans le tableau 07 obtenus par **Khazaal et al. (2009)**.

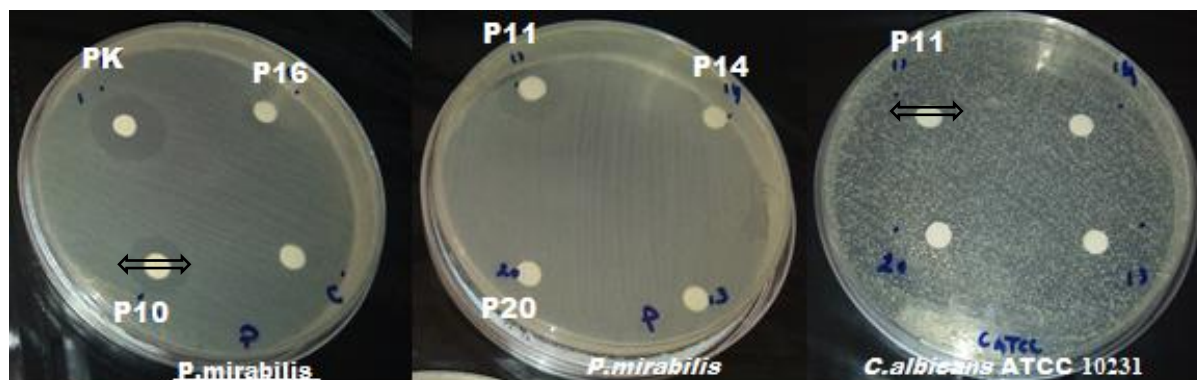


Figure 27 : Effet antimicrobien de surnageant de la pyoverdine sur deux souches cibles.

Tableau 06 : zone d'inhibition par la méthode de disques de diffusion (en mm).

	PK	10	11	16
<i>P. mirabilis</i> ATCC 35659	18	13	16	9
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0	0	15	0

Tableau 07 : Effet de la pyoverdine de *P. fluorescens* PFAS14 sur la croissance de certains microorganismes pathogènes exprimés en diamètre de la zone d'inhibition (mm) (**Khazaal et al., 2009**)

Microorganismes	Le surnageant du PFAS14	La pyoverdine pure
<i>S. aureus</i>	0	13
<i>Bacillus spp.</i>	15	16
<i>P. mirabilis</i>	26	23
<i>E. coli</i>	8	0
<i>Klebseilla</i>	10	0
<i>C. albicans</i>	0	28

8. Extraction solide/liquide de la pyoverdine

La souche la plus productrice de pyoverdine P11 a été utilisée pour d'extraction de ce métabolite, l'extrait obtenu après une extraction solide/liquide par le méthanol a donné un liquide de couleur verte (fig. 28). L'absorbance de cet extrait est de 2,457 à 400 nm (concentration = 122,85 μ M). Le test de pouvoir antibiotique vis-à-vis les souches cibles a montré des zones d'inhibition avec la souche bactérienne *P. mirabilis* ATCC 35659 et la levure *C. albicans* (tableau 08 et fig. 29).



Figure 28 : Tubes contenant l'extrait de la pyoverdine.

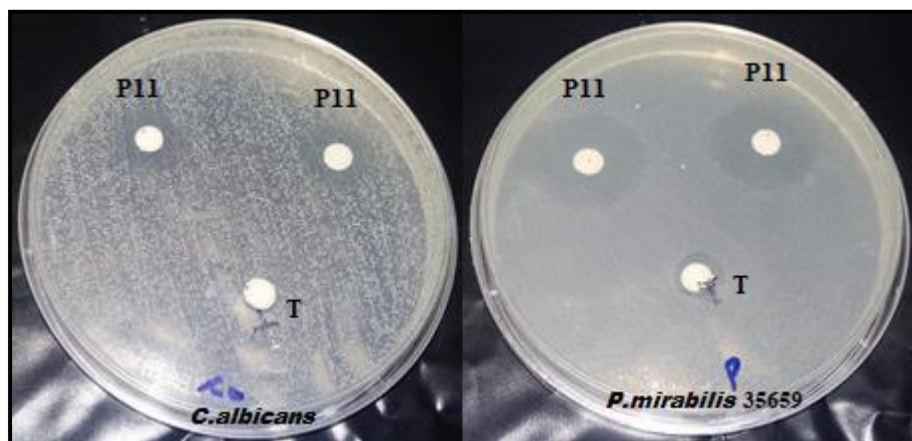


Figure 29 : Effet antimicrobien de l'extrait de la pyoverdine sur deux souches cibles.

Tableau 08 : la zone d'inhibition de la pyoverdine (en mm).

	L'extrait de la pyoverdine	Le témoin (méthanol)
<i>P. mirabilis</i> ATCC 35659	25	10
<i>C. albicans</i>	14	Aucun effet.

9. Résultat de l'identification de l'isolat P11 par la galerie Api 20 NE

L'isolat P11 était parmi les isolats les plus performants, il a inhibé le plus grand nombre des souches cibles testés avec de grandes zones d'inhibition. Une galerie d'identification a été utilisée pour nous orienter vers le genre et l'espèce de cet isolat de *Pseudomonas*. Après incubation, la lecture de la galerie a été faite en se référant au tableau de lecture (Tableau 09). Les résultats de toutes les réactions sont notés sur la fiche de résultats (fig. 30), et ils nous orientent vers l'espèce *Pseudomonas fluorescens*.



Figure 30 : Résultats de l'identification de l'isolat P11 sur galerie API NE 20

Tableau 09 : Résultats des différents tests de la galerie API 20 NE.

Tests	Réactions/Enzymes	Résultat
NO3	réduction des nitrates en nitrites	+
TRP	formation d'indole	-
GLU	Fermentation	-
ADH	Arginine dihydrolase	+
URE	Uréase	-
ESC	Hydrolyse (β -glucosidase)	-
GEL	Hydrolase (protéase)	+
PNPG	β -galactosidase	-
GLU	Assimilation	+
ARA	Assimilation	+
MNE	Assimilation	+
MAN	Assimilation	+
NAG	Assimilation	+
MAL	Assimilation	-
GNT	Assimilation	+
CAP	Assimilation	+
ADI	Assimilation	-
MLT	Assimilation	+
CIT	Assimilation	+
PAC	Assimilation	-
OX	Cytochrome-oxydase	+

10. Résultat d'identification par la galerie Api 20E

Les résultats obtenus avec le système Api 20E ont confirmé l'appartenance des souches étudiées au rang de l'espèce *P. fluorescens*. Le profil d'identification obtenu avec les souches testées est présenté dans le tableau (10).

Tableau 10 : Résultats de quelques tests biochimique de la galerie API 20E

Tests	P10	P16	P20	P11
ADH	+	+	+	+
URE	-	-	-	-
GEL	+	+	+	+
GLU	+	+	+	-
ARA	-	-	-	-
MAN	-	-	-	-
CIT	-	-	-	+

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Le fer est un élément indispensable dans plusieurs processus métaboliques, fonctions physiologiques et signalisations. De ce fait, le fer devient un facteur limitant dans le développement de presque tous les micro-organismes. Ce travail est un protocole expérimental concentré sur la mise en évidence de la production de la pyoverdine chez *Pseudomonas fluorescens* et sur son effet antimicrobien.

Il a été clairement observé que les isolats de *Pseudomonas fluorescens* étudiés ont une capacité de synthétiser la pyoverdine et d'inhiber des microorganismes pathogènes selon un test d'antagonisme *in vitro* (méthode directe). Afin d'expérimenter cet effet de la pyoverdine sur le développement des microorganismes pathogènes, Chaque isolats de *P. fluorescens* a subi deux tests sur milieu King B standard et milieu King B additionné par Fe^{+3} . Toutes les souches ont exercés leur pouvoir inhibiteur dans le milieu King B standard ou une synthèse des pyoverdines jaune-verdâtre a été détectée. L'absence des ions Fe^{+3} dans le milieu stimule la synthèse des sidérophores, alors que leur présence semble par contre la réprimer. Les 6 isolats de *Pseudomonas fluorescens* testés, ont révélé un pouvoir d'inhibition sur 7 souches cibles surtout dans les conditions carencées en fer ce qui fait impliquer les pyoverdines dans leur pouvoir antagoniste. Ces zones d'inhibition varient entre 5 et 34 mm, la zone la plus grande à été constaté chez l'isolat P11. L'étude de l'effet antibiotique des surnageants des *P. fluorescens* cultivés sur milieu King B non additionné de fer par la méthode de diffusion sur disque d'agar a montré un effet inhibiteur observable sur des germes pathogène. Le balayage spectral dans l'intervalle 200-600nm pour les surnageants des souches de *P. fluorescens*, a montré un pic d'absorption caractéristique à la pyoverdine à environ 400nm chez majorité des isolats. Le dosage des pyoverdines produites dans le milieu succinate a permis de déterminer leurs concentrations et de confirmer que la souche P11 est la plus productrice avec une concentration de 25,95 μ M.

La souche PK à effet antagoniste sur milieu le King B sans fer et avec fer suggère qu'elle cette inhibition n'est pas due à l'action de la pyoverdine. Ces composés à effet antibiotique retrouvés chez la souche Pk, peuvent être des dérivés phénaziniques. Le spectre d'absorption retrouvé par analyse du surnageant de cette souche a un pic à environ 300 nm.

La pyoverdine extraite par la méthode solide/liquide à montré un effet antibactérien et antifongique remarquable.

En conclusion nous pouvons déduire que la production de substances à activité antibiotique procure un atout majeur dans l'antagonisme microbien pour la souche productrice. D'après nos résultats, la production de pyoverdine retrouvé chez la majorité de nos souches étudiées était un facteur clé dans le pouvoir antagoniste de ces dernières. Par conséquent Nous pouvons confirmer que les pyoverdines, sont des composés qui peuvent être impliqués activement dans les mécanismes de lutte biologique vis à vis de nombreux agents pathogènes.

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

- du point de vue taxonomique, il serait nécessaire d'effectuer une étude moléculaire des isolats de *Pseudomonas fluorescens*.
- la purification et l'identification des substances inhibitrices responsables de l'activité des *Pseudomonas fluorescens*.
- Mener une étude *in vivo* sur des animaux de laboratoire pour examiner l'effet antibiotique de ces pyoverdines.
- L'application des pyoverdines dans le domaine de la bioremédiation des environnements contaminés.



Références bibliographiques

1. **Abdul-kadhim AR and jarallah EM, (2013)**. Screening of cellulase activity produced from *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Babylon University, Pure and Applied Sciences, Vol 21 (3): 849-854.
2. **Abouseoud M, Yataghene A, Amrane A, Maachi R, (2010)**. Production of a biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens* - Solubilizing and wetting capacity. Chemical Engineering Transactions, AIDIC, Vol: 20: 291-296.
3. **Agnese L, Coyne S and Berendonk TU, (2012)**. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. Frontiers in microbiology, Vol: 3 (18).
4. **Albrecht A, (2013)**. Identification of Two Unknown Species of Bacteria. ESSAI, Vol: 10 (8).
5. **Almario J, Bruto M, Vacheron J, Prigent-Combaret C, Moëgne-Loccoz Y and Muller D, (2017)**. Distribution of 2,4-Diacetylphloroglucinol Biosynthetic Genes among the *Pseudomonas* spp. Reveals Unexpected Polyphyletism. Frontiers in microbiology, Vol 8: 1218.
6. **Alves MP, Salgado RL, Eller MR, Vidigal PM, Carvalho AF, (2016)**. Characterization of a heat-resistant extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* 07A shows that low temperature treatments are more effective in deactivating its proteolytic activity. Journal of Dairy Science, Vol: 99 (10): 7842-7851.
7. **Anthoni U, Christophersen C, Nielsen PH, Gram L and Petersen BO, (1995)**. Pseudomonine, an Isoxazolidone with Siderophoric Activity from *Pseudomonas fluorescens* AH2 Isolated from Lake Victorian Nile Perch. J. Nat.Prod., Vol: 58 (11): 1786-1789.
8. **Aprameya IV, (2013)**. Non-fermenting Gram-negative bacilli (NFGNB) other than *Pseudomonas*. J Acad Clin Microbiol, Vol: 15 (2): 59-61.
9. **Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H, (1992)**. Bactériologie clinique. 2^e édition. Ellipses, Paris, France.
10. **Balouiri M, Sadiki M and Ibsouda S, (2016)**. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, Vol: 6 (2): 71-79.
11. **Benkredda F and Mazari H, (2018)**. Utilisation des métabolites extracellulaires des *Pseudomonas* fluorescents dans la lutte contre les Staphylococcus à coagulase

- négative. Mémoire de Master, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. Algérie.
12. **Besson A, (1898)**. Technique microbiologique et sérothérapique : guide pour les travaux du laboratoire. Librairie J.-B Baillière et fils, Paris.
 13. **Blumer C, Heeb S, Pessi G and Haas D, (1999)**. Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol: 96 (24): 14073-8.
 14. **Brodhagen M, Henkels MD, and Loper JE, (2004)**. Positive autoregulation and signaling properties of pyoluteorin, an antibiotic produced by the biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Applied and environmental microbiology, Vol: 70(3).
 15. **Bruijn I, Kock MJ, Waard P, van Beek TA and Raaijmakers JM, (2007)**. Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. Journal of bacteriology, Vol: 190 (8): 2777–2789.
 16. **Budzikiewicz H, Schafer M, Fernández DU, Matthijs S and Cornelis P, (2006)**. Biotechnol. Agron. Soc. Environ., Vol : 15(2) : 327-337.
 17. **Burns JL, (2018)**. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases *Pseudomonas* Species and Related Organisms (Fifth Edition), Elsevier.
 18. **Cézard C, Farvacques N and Sonnet P, (2015)**. Chemistry and Biology of Pyoverdines, *Pseudomonas* Primary Siderophores. Curr Med Chem, Vol22(2):165-86.
 19. **Chiadò A, Varani L, Bosco F and Marmo L, (2013)**. Opening Study on the Development of a New Biosensor for Metal Toxicity Based on *Pseudomonas fluorescens* Pyoverdine. Biosensors (Basel), Vol: 3(4):385-99.
 20. **Clifford JC, Oliver AB, Kidarsa VT , Chang JH, McPhail KL, Loper JE, (2015)**. Phloroglucinol functions as an intracellular and intercellular chemical messenger influencing gene expression in *Pseudomonas protegens*. Environ Microbiol, Vol: 18 (10):3296-3308.
 21. **Cornelis P and Dingemans J, (2013)**. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron strategies in function of the type of infection. Frontiers in cellular and infection microbiology. Vol: (75):1-7.
 22. **Couillerot O, Prigent-Combaret C, Caballero-Mellado J and Moënne-Loccoz Y, (2009)**. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent

- pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Lett Appl Microbiol.*, Vol: 48(5):505-12.
23. **Dahah H, (2017).** Etude de l'effet antimicrobien et antioxydant des métabolites secondaires secrétés par des *Pseudomonas* originaires des conditions extrêmes. Thèse de Doctorat. Université Abdelhamid Ibn-Badis Mostaganem, Algérie.
 24. **Dahah H, Djibaoui R and Nemmiche S, (2015).** Antimicrobial effect of phenazines produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from saline soil of Mina river, Algeria. *South. Asian. J. Exp. Biol.* Vol:5(5): 187-193.
 25. **Delarras C, (2014).** Pratiques en microbiologie de laboratoire. Lavoisier, France.
 26. **Denis F, Poly M, Martin C, Bingen E, Quentin R, (2007).** Bactériologie Médicale : Techniques Usuelles. Elsevier Masson, France.
 27. **El Ouakfaoui S, (2015).** Évaluation préalable finale pour la souche de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. Environnement et Santé Canada Publication. Canada.
 28. **Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K and Stackebrandt E, (2006).**The Prokaryotes: Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass (3rd edition), Springer.
 29. **Fraise AP, (2010).** Mupirocin. Dans Saunders WB, *Antibiotic and Chemotherapy* (Ninth Edition, pp. 290-291). Editor: Finch RG, Greenwood D, Norrby SR, Whitley RJ.
 30. **Galet J, Deveau A, Hôtel L, Frey-Klett P, Leblond P and Aigle B, (2015).** *Pseudomonas fluorescens* pirates both ferrioxamine and ferricoelichelin siderophores from *Streptomyces ambofaciens*. *Appl Environ Microbiol.* Vol: 81(9):3132-41.
 31. **Gallagher JJ, Branski LK, Williams-Bouyer N, Villarreal C, Herndon DN, (2012).** Treatment of infection in burns. Dans Saunders WB, *Total Burn Care* (Fourth Edition, pp.137-156). Editor: Herndon DN.
 32. **Ganeshan G and Kumar AM, (2005).** *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant disease, *Journal of Plant Interactions*, Vol: 1(3): 12/3-134.
 33. **Gineste A, (2017).** Fer et immunité innée : vers une meilleure compréhension des mécanismes développés par l'hôte pour réduire le fer accessible aux pathogènes. Thèse de Doctorat. Université Paul Sabatier - Toulouse III, France.
 34. **Gobbetti M, Rossi J, (1992).** Peptidase Profiles of *Pseudomonas fluorescens*: Identification and Properties. *Journal of Dairy Science*, Vol: 75 (4): 924-934.

35. **Grobkinsky DK, Tafner R, Moreno MV, Stenglein SA, García de Salamone IE, Nelson LM, Novák O, Strnad M, Van der Graaff E and Roitsch T, (2016).** Cytokinin production by *Pseudomonas fluorescens* G20- 18 determines biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis. Scientific Reports, Vol: 6: 1-11.
36. **Gross H, Loper JE, (2009).** Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. Nat. Prod. Rep., Vol: 26 (1408-1446).
37. **Hadla M and Halabi M, (2018).** Effect of Quorum Sensing. Comprehensive Analytical Chemistry, Vol (81): 95-116.
38. **Hannauer M, (2011).** Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'acquisition du fer par la pyoverdine et le ferrichrome chez *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse, université de Strasbourg, école doctoral des sciences de la vie et de la santé.
39. **Hennessy RC, Phippen CBW, Nielsen KF, Olsson S and Stougaard P, (2017).** Biosynthesis of the antimicrobial cyclic lipopeptides nunamycin and nunapeptin by *Pseudomonas fluorescens* strain In5 is regulated by the LuxR-type transcriptional regulator NunF. MicrobiologyOpen, Vol (6) :516.
40. **Hernandez-Anguiano AM, Suslow TV, Leloup L and Kado C I, (2004).** Biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* and soft-rotting of harvested florets of broccoli and cauliflower. Plant Pathology, Vol: 53: 596-601.
41. **Hussien SS, Desouky OA, Abdel-Haliem MEF and El-Mougith AA, (2013).** Uranium (VI) Complexation with Siderophores pyoverdine Produced by *Pseudomonas Fluorescens* SHA 281. Int. J. Nucl. Energ. Sci. Eng.(IJNESE), Vol 3: 95-102.
42. **Joffin JN and Leyral G, (2014).** Microbiologie technique : Dictionnaire des techniques. Scérén, France.
43. **Judith A, O'Donnell SP and Gelone AS, (2015).** Topical Antibacterials. Dans Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Volume 1,: 452-462.e2.
44. **Khazaal AQ, Shawkat MS, AL-Shalchi SA, (2009).** Extraction and purification of pyoverdine produce by locally isolated *pseudomonas fluorescens* and its ability as a biological control agent. Irac journal of science, Vol: 50 (3): 330-316.
45. **Kinzel O, Tappe R, Gerus I and Budzikiewicz H, (1998).** The Synthesis and Antibacterial Activity of two Pyoverdin-ampicillin Conjugates, Entering

- Pseudomonas aeruginosa* via the Pyoverdinin-mediated Iron Uptake Pathway. The journal of antibiotics, Vol:5 1 (5): 499-507.
46. **Kittinger C, Lipp M, Baumert R, Folli B, Koraimann G, Toplitsch D, Liebmann A, Grisold AJ, Farnleitner AH, Kirschner A and Zarfel G.** Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from the River Danube. Front Microbiol, Vol 7:586.
 47. **Kumar P, (2017).** Pharmacology of Specific Drug Groups: Antibiotic Therapy. Dans Mosby, *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry* (Seventh Edition, pp.457-487). Editor: Dowd FJ, Johnson BS, Mariotti AJ.
 48. **Kun Y, Yixuan W, Shasha W, Lingxin C, (2016).** A sensitive fluorescent biosensor for the detection of copper ion inspired by biological recognition element pyoverdine Sensors and Actuators B: Chemical, Vol: 232: 257-263.
 49. **Langille G I, Hsiao WL and Brinkman S L (2010).** Detecting genomic islands using bioinformatics approaches. Nature Reviews Microbiology, Vol: 8: 373–382.
 50. **Lee HS, Kwon M, Heo S, Kim MG and Kim GB, (2017).** Korean J. Characterization of the Biodiversity of the Spoilage Microbiota in Chicken Meat Using Next Generation Sequencing and Culture Dependent Approach. Food Sci. An, Vol: 37(4): 535-541.
 51. **Lee JY, Moon SS and Hwang BK, (2003).** Isolation and antifungal and antioomycete activities of aerugine produced by *Pseudomonas fluorescens* strain MM-B16. Applied and environmental microbiology, Vol: 69 (4): 2023–2031.
 52. **Lemire J, Auger C, Bignucolo A, Appanna VP and Appanna VD, (2011).** Metabolic strategies deployed by *Pseudomonas fluorescens* to combat metal pollutants: Biotechnological prospects.
 53. **Li J, Xu H, Liu W, Zhang X, Lu Y, (2018).** Ethylene Inhibits Root Elongation during Alkaline Stress through AUXIN1 and Associated Changes in Auxin Accumulation. Plant physiology, Vol: 168 (4): 1777-1791.
 54. **Lidbury M, Andrew RJ, Fraser TD, Bending GD, Jones AME, Moore JD, Goodall A, Tibbett M, Hammond JP, Scanlan DJ, Wellington EMH (2017).** Identification of extracellular glycerophosphodiesterases in *Pseudomonas* and their role in soil organic phosphorus remineralization. Scientific Reports, Vol: 7(1): 2179.

55. **Loper JE, Henkels MD, Shaffer BT, Valeriote FA and Gross H, (2008).** Isolation and identification of rhizoxin analogs from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 by using a genomic mining strategy. *Appl Environ Microbiol*, Vol: 74 (10): 3085-93.
56. **Lu W, Zhang, Bai Y, Fu Y, Chen, J, Geng X, Wang Y and Xiao M, (2010).** A Genetically Engineered *Pseudomonas fluorescens* Strain Possesses Dual Activity Against Phytopathogenic Fungi and Insects. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol: 20 (2): 281- 286.
57. **Luczkiewicz A, Kotlarska E, Artichowicz W, Tarasewicz K and Fudala-Ksiazek S, (2015).** Antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone. *Environ Sci Pollut Res Int.*, Vol : 22(24): 19823-34.
58. **Madi A , Lakhdari O , Blottière HM , Guyard-Nicodème M, Le Roux K, Groboillot A , Svinareff P , Doré J , Orange N , Feuilloy GJ et Connil N, (2010).** The clinical *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 strain exerts a cytotoxic effect on epithelial intestinal cells and induces Interleukin-8 via the AP-1 signaling pathway. *BMC Microbial*, Vol: 10 (215).
59. **Marchand PA, Weller DM, and Bonsall RF, (2000).** Convenient Synthesis of 2,4-Diacetylphloroglucinol, a Natural Antibiotic Involved in the Control of Take-All Disease of Wheat. *J. Agric. Food Chem.*, Vol: 48 (5): 1882–1887.
60. **Martins ML, Pinto UM, Riedel K and Vanetti MC, (2015).** Milk-deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk. *Braz J Microbiol*, Vol: 46(1):207-17.
61. **Mastropaolo MD, Silby MW, Nicoll JS and Levy SB, (2012).** Novel genes involved in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 motility and biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*, Vol: 78(12): 4318-29.
62. **Mavrodi DV, Peever TL, Mavrodi OV, Parejko JA, Raaijmakers JM, Lemanceau P, Mazurier S, Heide L, Blankenfeldt W, Weller DM and Thomashow LS, (2010).** Diversity and Evolution of the Phenazine Biosynthesis Pathway. *American Society for Microbiology Journals*, Vol: 76 (3): 866-879.
63. **Mazumdar T, Goswami C and Talukar NC, (2007).** Characterization and screening of beneficial bacteria obtained on King's B agar from tea rhizosphere. *Indian journal of Biotechnology*, Vol 6: 490-494.

64. **Meksem A, (2010).** Études structurales et fonctionnelles des récepteurs TonB dépendants de bactéries à Gram-négatif. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg, France.
65. **Meliani A, (2012).** Contribution à l'étude de la diversité écologique et fonctionnelle des *Pseudomonas fluorescens*. Thèse de Doctorat. Université d'Oran, Algérie.
66. **Meyer JM and Abdallah MA, (1978).** The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. Journal of General Microbiology, Vol: 107: 319-328.
67. **Meyer JM, (2000).** Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species, Arch Microbiol. Vol: 174:135–142.
68. **Mezaache S, (2012).** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Thèse de Doctorat. Université de Ferhat Abbas Sétif, Algérie.
69. **Mousa WK and Raizada MN, (2015).** Biodiversity of genes encoding anti-microbial traits within plant associated microbes. Frontiers in plant science, Vol: 6 (231).
70. **Mukerji K G, (2004).** Fruit and Vegetable Diseases. Springer. Delhi. India.
71. **Nagarajkumar M, Bhaskaran R, Velazhahan R, (2004).** Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. Microbiological Research, Vol: 159 (1): 73-81.
72. **Naik MM, (2012).** Biological characterization of lead resistant bacteria from terrestrial and estuarine niches of Goa. Ph.D. Thesis. Department of Microbiology university of Goa, Goa, India.
73. **Narayanasamy P, (2013).** Biological management of diseases of crops: volume 1: characteristics of biological control agents. Springer Dordrecht Heidelberg New York London. India.
74. **Nielsen TH, Sørensen J, (2003).** Production of Cyclic Lipopeptides by *Pseudomonas fluorescens* Strains in Bulk Soil and in the Sugar Beet Rhizosphere. Applied and Environmental Microbiology, Vol: 69 (2):861-868.
75. **Nihorimbere V, Ongena M, Smargiassi M, Thonart P, (2011).** Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health.

76. **Oberhansli T, Défago G and Haas D, (1991).** Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *Journal of General Microbiology*, Vol: 137: 2273-2279.
77. **Okumoto T, Kawana M, Nakamura I, Ikeda Y and Isagai K, (1985).** Activity of safracins a and b, heterocyclic quinone antibiotics, on experimental tumors in mice. *The journal of antibiotics*, Vol 38 (6):767-771.
78. **Ouserir S, Chennaoui N and Benchabane M, (2018).** Effets de la bactérisation par *pseudomonas fluorescens* et *rhizobium fabae* sur la stimulation de la nodulation et de la croissance de la fève (*vicia faba* l. var. hystal). Vol : 8(1): 775-785.
79. **Ozidal M, Ozidal OG, Sezen A, Algur OF and Kurbanoglu EB, (2017).** Continuous production of indole-3-acetic acid by immobilized cells of *Arthrobacter agilis*. *Journal 3 Biotech*, Vol: 7 (1): 23.
80. **Pájaro MC, Barberis IL, Albesa I, (1995).** *Pseudomonas fluorescens*: production of pyoverdine in human blood at 4 degrees C and cytotoxic effect of the pigment. *Rev Latinoam Microbiol*. Jan-Mar, Vol: 37(1):1-6.
81. **Pallai R., Hynes RK, Verma B and Nelson LM, (2012).** Phytohormone production and colonization of canola (*Brassica napus* L.) roots by *Pseudomonas fluorescens* 6-8 under gnotobiotic conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, Vol: 58(2):170-178.
82. **Paulen A, (2017).** Utilisation de la stratégie du cheval de Troie pour lutter contre *Pseudomonas aeruginosa* : Synthèses et propriétés biologiques de conjugués sidérophores antibiotiques. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg.
83. **Pée VK, (2012).** Biosynthesis of Halogenated Alkaloids. Dans Academic Press, *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Vol: 71: 167-210. Editor: Knölker H.
84. **Peek ME, Bhatnagar A, McCarty NA and Zughaier SM. (2012),** Pyoverdine the Major Siderophore in *Pseudomonas aeruginosa* Evades NGAL Recognition, *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*.
85. **Petriccione M, Patre D, Ferrante P, Papa RD, Bartoli G, Fioretto A and Scortichini M, (2013).** Effects of *Pseudomonas fluorescens* Seed Bioinoculation on Heavy Metal Accumulation for *Mirabilis jalapa* Phytoextraction in Smelter-Contaminated Soil.

86. **Petriccione M, Patre D, Ferrante P, Papa RD, Bartoli G, Fioretto A and Scortichini M, (2013).** Effects of *Pseudomonas fluorescens* Seed Bioinoculation on Heavy Metal Accumulation for *Mirabilis jalapa* Phytoextraction in Smelter-Contaminated Soil.
87. **Ramette A, Frapolli M, Defago G, and Moenne-Loccoz Y, (2003).** Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Vol: 16: 525- 535.
88. **Rekha V, (2011).** Isolation, purification, characterization and production of pyoverdine pigment from *Pseudomonas fluorescens*. Thesis, Bharathidasan University, India.
89. **Rekha V, Ahmed John S and Shankar T, (2010).** Antibacterial activity of *Pseudomonas fluorescens* isolated from Rhizosphere soil, *International Journal of Biological Technology* .Vol : 1(3):10-14.
90. **Reynolds MT, Falkiner FR, Hardy R and Keane CT, (1979).** Differentiation of fluorescent pseudomonads by their effect on milk agar. *J. YED*, Vol: 12: 379-382.
91. **Ringel MT and Brüser T, (2018).**The biosynthesis of pyoverdines. *Microbial cell*, Vol: 5(10) :424-437.
92. **Rossi C, Chaves-López C, Serio A, Goffredo E, Goga B T and Paparella A, (2016).** Influence of Incubation Conditions on Biofilm Formation by *Pseudomonas Fluorescens* Isolated from Dairy Products and Dairy Manufacturing Plants. *Italian journal of food safety*, Vol: 5(3): 5793.
93. **Rowe MT, (1988).** Effect of carbon dioxide on growth and extracellular enzyme production by *Pseudomonas fluorescens* B52. *International Journal of Food Microbiology*, Vol: 6 (1): 51-56.
94. **Ruiz JA, Bernar EM, Jung K, (2015).** Production of siderophores increases resistance to fusaric acid in *Pseudomonas protegens* Pf-5. *PLoS One*, Vol: 10(1).
95. **Safari D, Jamali F, Nooryazdan H and Bayat F, (2018).** Evaluation of ACC deaminase producing *Pseudomonas fluorescens* strains for their effects on seed germination and early growth of wheat under salt stress. *AJCS* 12(03):413-421 (2018).
96. **Saha M, Sarkar S, Sarkar B, Sharma BK, Bhattacharjee S and Tribedi P, (2015).** Microbial siderophores and their potential applications: a review.

- Environmental Science and Pollution Research. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
97. **Scales BS, Dickson RP, LiPuma JJ and Huffnagle GB, (2014).** Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. Clinical microbiology reviews, Vol: 27 (4): 927-48.
 98. **Schreiter S, Babin D, Smalla K and Grosch R, (2018).** Rhizosphere Competence and Biocontrol Effect of *Pseudomonas* sp. RU47 Independent from Plant Species and Soil Type at the Field Scale. Frontiers in microbiology, Vol: 9 (97).
 99. **Selvin J, Shanmughapriya S, Gandhimathi R, Seghal-Kiran G, Rajeetha RT, Natarajaseenivasan K and Hema TA, (2009).** Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardiopsis dassonvillei* MAD08. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol : 83 : 435-445.
 100. **Shahid I, Rizwan M, Baig DN, Saleem RS, Malik KA, and Mehnaz S, (2017).** Secondary Metabolites Production and Plant Growth Promotion by *Pseudomonas chlororaphis* and *P. aurantiaca* Strains Isolated from Cactus, Cotton, and Para Grass. J. Microbiol. Biotechnol. Vol: 27(3): 480-491.
 101. **Shahira S, Vedha B, Panneerselvam T and Anandaraj K, (2015).** Screening of phytohormones by *Pseudomonas fluorescens* from rhizosphere soil of paddy in and around Tiruvannamalai. Indo Asian Journal of Multidisciplinary Research (IAJMR), Vol: 1(3): 244-251.
 102. **Shainy KM, Rugmini AP, Unni KN et al., (2016).** Surface Interaction and Corrosion Inhibition of Mild Steel in Hydrochloric Acid Using Pyoverdine, an Eco-Friendly Bio-molecule. Journal of Bio- and Tribo-Corrosion, Vol 2 (20).
 103. **Sigee DC, (2005).** Bacterial plant pathology: cell and molecular aspects. Cambridge.
 104. **Silby MW, Cerdeño-Tárraga AM, Vernikos GS, Giddens SR, Jackson RW, Preston GM, Zhang XX, Moon CD, Gehrig SM, Godfrey SA, Knight CG, Malone JG, Robinson Z, Spiers AJ, Harris S, Challis GL, Yaxley AM, Harris D, Seeger K, Murphy L, Rutter S, Squares R, Quail MA, Saunders E, Mavromatis K, Brettin TS, Bentley SD, Hothersall J, Stephens E, Thomas CM, Parkhill J, Levy SB, Rainey PB and Thomson NR, (2009).** Genomic and

- genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. Genome biology, Vol : 10(5), R51.
105. **Silby MW, Winstanley C, Godfrey AC, Levy SB and Jackson RW, (2011).** *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. FEMS Microbiol Rev, Vol: 35:652–680.
 106. **Sirois M, (2018),** Laboratory Procedures for Veterinary Technicians. 8^e edition. ELSEVIER.
 107. **Stanier RY, Palleroni NJ and Doudoroff M, (1966).** The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. J. Gen. Microbiol, Vol: 43: 159-271.
 108. **Suganthi M, Senthilkumar P, Arvinth S, Chandrashekara Kn, (2017).** Chitinase from *Pseudomonas fluorescens* and its insecticidal activity against *Helopeltis theivora*. The Journal of General and Applied Microbiology, Vol: 63.
 109. **Suman B, (2015).** Isolation and characterization of *Pseudomonas fluorescens* from rice fields for the biological control of rhizoctonia solani causing sheath blight in rice. Thesis, Agricultural University, India.
 110. **Tang Y and Stratton CW, (2018).** Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology: Volume 1: Techniques. 3^e edition. Springer.
 111. **Trapet P , Avoscan L, Klinguer A, Pateyron S, Citerne S, Chervin C, Mazurier S, Lemanceau P, Wendehenne D and Besson-Bard A, (2016).** The *Pseudomonas fluorescens* Siderophore Pyoverdine Weakens *Arabidopsis thaliana* Defense in Favor of Growth in Iron-Deficient Conditions. Plant Physiology, Vol: 171: 675–693.
 112. **Trapet P, (2015).** Incidence physiologique et étude du mode d'action de la pyoverdine de *Pseudomonas fluorescens* chez *Arabidopsis thaliana* : liens avec l'homéostasie du fer, la croissance et les défenses .Thèse de Doctorat. Université de Bourgogne, France.
 113. **Trivedi MK, Patil S, Shettigar H, Gangwar M and Jana S, (2015).** Antimicrobial Sensitivity Pattern of *Pseudomonas fluorescens* after Biofield Treatment. Infectious Diseases and Therapy, Vol: 3 (3).
 114. **Uğur A, Ceylan Ö and Aslım B, (2012).** Characterization of *Pseudomonas* spp. from seawater of the southwest coast of Turkey. J. BIOL. ENVIRON. SCI., Vol: 6 (16):15-23.
 115. **Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moëgne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, and Prigent-Combaret C, (2013).**

- Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in plant science*, Vol: 4: 356.
116. **Vacheron J, Moëgne-Loccoz Y, Dubost A, Gonçalves-Martins M, Muller D and Prigent-Combaret C, (2016).** Fluorescent *Pseudomonas* Strains with only Few Plant-Beneficial Properties Are Favored in the Maize Rhizosphere. *Front Plant Sci.*, Vol:7: 1212.
 117. **Vanvlassenbroeck A, (2012).** Etude expérimentale et *in silico* du potentiel de synthèse NRPS chez les *Pseudomonas* fluorescents. Thèse de Doctorat. Université de Lille 1 sciences et technologie, France.
 118. **Vaulont S and Schalk I, (2015).** Rôles des sidérophores bactériens et de mammifères dans les interactions hôtes-pathogènes, médecine/sciences .Vol : 31(8-9): 756–763.
 119. **Vega-Celedón P, Martínez HC, González M and Seeger M, (2016).** Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria (review). *Cultivos Tropicales*, Vol: 37: 33-39.
 120. **Velasco A, Acebo P, Gomez A, Schleissner C, Rodríguez P, Aparicio T, Conde S, Muñoz R, De La Calle F, Garcia JL, Sánchez-Puelles JM, (2005).** Molecular characterization of the safracin biosynthetic pathway from *Pseudomonas fluorescens* A2-2: designing new cytotoxic compounds. *Molecular microbiology*, Vol: 56 (1).
 121. **Velusamy P, Immanuel JE, Gnanamanickam SS and Thomashow L, (2006).** Biological control of rice bacterial blight by plant-associated bacteria producing 2,4-diacetylphloroglucinol. *Canadian Journal of Microbiology*, Vol: 52 (1): 56-65.
 122. **Vigneron J, (2010).** Évaluation des risques sanitaires liés à l'exposition par ingestion de Pseudomonades dans les eaux destinées à la consommation humaine (hors eaux conditionnées). Rapport, Édition scientifique. Anses. Alimentation, environnement, travail.
 123. **Vikram A, Bomberger JM and Bibby KJ, (2015).** Efflux as a glutaraldehyde resistance mechanism in *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, Vol: 59(6): 3433-40.
 124. **Vivekananthan R., Ravi M, Ramanathan A and Samiyappan R, (2004).** Lytic enzymes induced by *Pseudomonas fluorescens* and other biocontrol organisms

- mediate defence against the anthracnose pathogen in mango. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol: 20 (3): 235-244.
125. **Vlassak K, Van Holm L, Duchateau L, Vanderleyden J and De Mot R, (1992)**, Isolation and characterization of fluorescent *Pseudomonas* associated with the roots of rice and banana grown in Sri Lanka. *Plant Soil*, Vol: 145 (1):51–63.
126. **Weiwei Z, Weikang L and Chenghua L, (2016)**. Inhibition of marine *Vibrio* sp. by pyoverdine from *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *Journal of Hazardous Materials*, Vol 302: 217-224.
127. **Wilson BR, Bogdan A. R, Miyazawa M, Hashimoto K and Tsuji Y, (2016)**. Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential, Author Manuscript. Vol : 22(12) : 1077–1090.
128. **Wisplinghoff H, (2017)**. *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and *Miscellaneous* Gram-Negative Bacilli. *Infectious Diseases (Fourth Edition)*. Elsevier, Vol : 2: 1579-1599.
129. **Yanagisawa T and Kawakami M, (2003)**. How Does *Pseudomonas fluorescens* Avoid Suicide from Its Antibiotic Pseudomonic Acid? *Biological Chemistry*, Vol: 278 (28): 25887–25894.
130. **Yétérian E, (2010)**. Bases moléculaire de la maturation et de la sécrétion de la pyoverdine chez *pseudomonas aeruginosa* .Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg, France.
131. **Youard ZA, Mislin LA., Majcherczyk PA., Schalk IJ and Reimann C, (2007)**. *Pseudomonas fluorescens* CHA0 Produces Enantio-pyochelin, the Optical Antipode of the *Pseudomonas aeruginosa* Siderophore Pyochelin. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol: 282: 35546-35553.



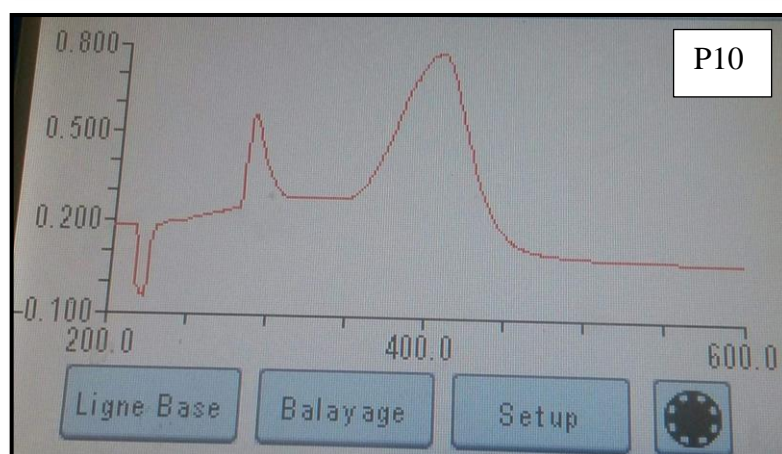
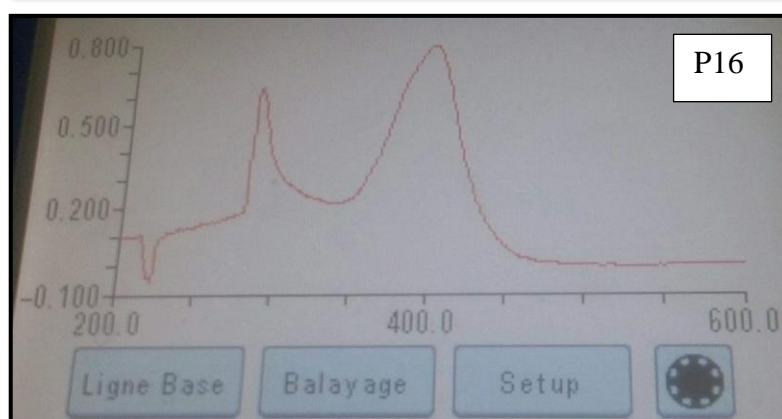
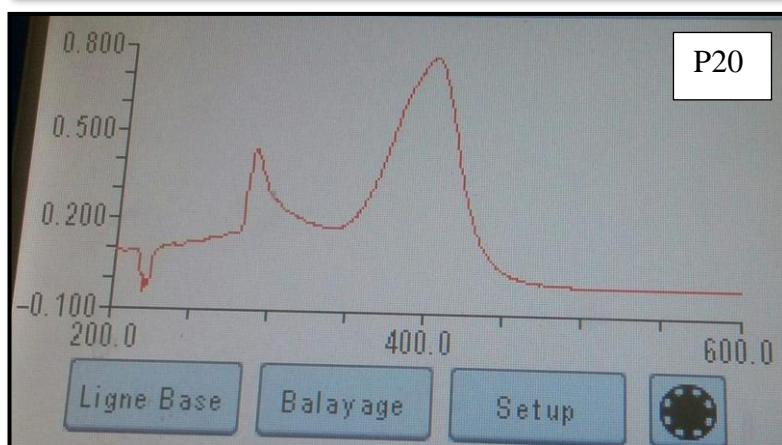
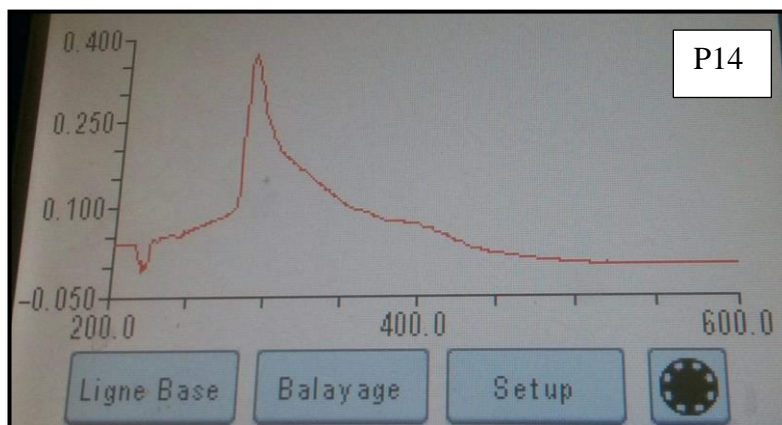
Annexes

Annexes :

Principaux Milieux de culture (Composants g/ litre)

<p>King B solide (et liquide)</p> <p>Peptone de caséine20 g Sulfate de magnésium1,5 g Phosphate bi-potassique.....1,5 g Glycérol10 ml Agar20 g pH 7,2</p>	<p>Gélose nutritive</p> <p>Peptone.....10 g Extrait de levure.....3 g Extrait de viande.....3 g Le chlorure de sodium.....5 g Agar.....18 g pH7,4</p>
<p>King B liquide</p> <p>Peptone de caséine20 g Sulfate de magnésium1,5 g Phosphate bi-potassique.....1,5 g Glycérol10 ml pH 7,2</p>	<p>Mannitol- Mobilité g/l</p> <p>Peptone..... 20 g Nitrate de potassium1 g Mannitol2 g Rouge de phénol0,04 g pH8,1</p>
<p>King A solide</p> <p>Peptone de caséine20 g Sulfate de potassium...10 g Chlorure de magnésium.....1,5 g Glycérol10 ml (1%) Agar20 g pH :..... 7,2</p>	<p>Milieu succinate (g/L)</p> <p>K_2HPO_46g KH_2PO_43g $(NH_4)_2SO_4$1g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.....0,2g acide succinique.....4g pH=7 (le pH est ajusté à 7 par NaOH 6M)</p>
<p>Urée- indole</p> <p>L- tryptophane3g Phosphate de dipotassique.....1g Phosphate monopotassique.....1g Chlorure de sodium5g Urée20g Rouge de phénol.....2,5g pH 6,8</p>	<p>Gélose TSI g/l</p> <p>Extrait de viande de bœuf3 g Extrait de levure3 g Peptone trypsique20 g Chlorure de Sodium5 g Citrate ferrique0,3 g Thiosulfate de sodium0,3 g Lactose10 g Glucose1 g Saccharose10 g Rouge de phénol0,05 g Agar18 g pH7,4</p>
<p>Milieu Clark et lubs g/l</p> <p>Peptone trypsique de viande5 g Glucose6 g Phosphate bipotassique5 g pH07</p>	

Les spectres d'absorption des surnageants de P10, P16, P20 et P14 par spectrophotomètre UVvisible





API 20 NE – SYSTÈME D'IDENTIFICATION DES BACILLES À GRAM NÉGATIF NON ENTÉROBACTÉRIES

d'après bioMérieux sa

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
NO ₃	nitrate de potassium	réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min	
		réduction des nitrates en azote	incolore	rose-rouge
TRP	tryptophane	formation d'indole	Zn / 5 min	
			incolore vert pâle / jaune	rose
GLU	glucose	fermentation	bleu à vert	jaune
ADH	arginine	arginine dihydrolase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	uréase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine	hydrolyse (β-glucosidase)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (à l'encre de chine)	hydrolyse (protéase)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	p-nitrophényl-β-D-galactopyranoside	β-galactosidase	incolore	jaune
[GLU]	glucose	assimilation	transparence	trouble
[ARA]	arabinose	assimilation	transparence	trouble
[MNE]	mannose	assimilation	transparence	trouble
[MAN]	mannitol	assimilation	transparence	trouble
[NAG]	N-acétyl-glucosamine	assimilation	transparence	trouble
[MAL]	maltose	assimilation	transparence	trouble
[GNT]	gluconate	assimilation	transparence	trouble
[CAP]	caprate	assimilation	transparence	trouble
[ADI]	adipate	assimilation	transparence	trouble
[MLT]	malate	assimilation	transparence	trouble
[CIT]	citrate	assimilation	transparence	trouble
[PAC]	phényl-acétate	assimilation	transparence	trouble
OX	tétraméthyl-p-phenylène diamine	cytochrome-oxydase	OX / 1-2 min	
			incolore	violet

**TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE /
TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE**

% de réactions positives après 24-48 h à 30°C / % of positive reactions after 24-48 hrs at 30°C /

% der positiven Reaktionen nach 24-48 Std. bei 30°C /

% de las reacciones positivas después de 24-48 H a 30°C / % di reazioni positive dopo 24-48 ore a 30°C

API 20 NE	V6.0	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUa	ARaA	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	ADLa	MLTa	CITa	PACa	OX
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		96	0	0	80	20	1	92	1	99	1	1	89	84	1	97	98	91	98	99	1	98
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		27	0	0	80	1	1	39	1	99	71	97	89	85	1	99	99	10	99	99	16	99
<i>Pseudomonas mendocina</i>		100	0	0	94	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	99	100	0	100	100	0	100
<i>Pseudomonas putida</i>		3	0	1	88	1	0	0	1	99	56	57	5	2	1	97	99	1	100	99	58	99
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		94	0	0	1	1	0	1	0	98	1	10	67	0	75	87	87	1	99	85	1	100
<i>Burkholderia cepacia</i>		39	0	24	1	1	46	70	72	100	75	99	96	99	8	97	99	93	100	99	99	91
<i>Burkholderia pseudomallei</i>		100	0	0	98	0	5	100	0	100	0	99	100	100	0	100	100	99	100	99	94	100
<i>Brevundimonas diminuta/Oligella urethralis</i>		1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	1	99	33	0	100
<i>Brevundimonas vesicularis</i>		16	0	0	0	0	98	12	34	72	1	1	3	10	72	1	1	1	40	0	0	98
<i>Comamonas acidovorans</i>		96	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	76	0	0	99	71	89	99	28	83	100
<i>Comamonas testosteroni/Ps.alcaligenes</i>		75	0	0	6	4	0	4	1	11	3	3	4	1	2	42	55	38	87	32	3	98
<i>Chryseomonas luteola</i>		78	0	13	71	1	100	30	98	99	99	99	88	12	76	85	62	1	94	94	1	2
<i>Flavimonas oryzae</i>		0	0	0	0	1	0	11	1	100	99	99	100	0	84	99	88	2	99	99	0	1
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>		21	0	0	0	76	0	0	0	21	40	0	0	1	0	7	0	5	75	8	0	99
<i>Ralstonia pickettii</i>		32	0	1	1	3	0	1	0	96	35	1	10	14	0	99	86	62	99	98	16	99
<i>Shewanella putrefaciens</i>		96	0	1	0	1	71	95	0	6	11	0	0	95	10	1	71	1	90	2	0	100
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>		10	0	0	0	1	97	1	90	99	83	75	15	64	95	34	9	3	61	45	1	73
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		37	1	0	0	0	99	99	87	84	3	95	2	98	99	2	1	0	99	98	0	7
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>		2	0	8	0	1	1	1	0	67	70	1	1	1	1	20	98	80	100	99	87	0
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>		1	0	14	0	0	0	96	0	1	0	0	0	0	0	99	2	99	81	1	0	0
<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>		1	0	0	0	1	0	0	0	24	8	2	0	0	0	99	4	95	70	0	0	0
<i>Acinetobacter lwoffii</i>		3	0	0	0	2	0	0	0	11	1	0	1	1	0	0	70	20	46	1	36	0
<i>Acinetobacter radioresistens</i>		2	2	0	2	0	0	0	0	19	2	0	0	2	0	0	97	100	2	2	97	0
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>		99	89	99	78	1	89	97	98	99	80	78	99	99	99	95	84	1	99	37	1	99
<i>Aer.salm.ssp masoucida/achromogenes</i>		100	21	9	0	0	2	33	0	66	0	33	50	2	21	2	0	0	2	0	0	100
<i>Aeromonas salmonicida ssp salmonicida</i>		100	0	57	36	0	100	99	18	84	1	0	96	84	99	99	0	1	99	1	0	100
<i>Aeromonas sobria</i>		100	86	96	86	0	1	99	99	100	12	99	99	99	100	100	93	0	99	81	0	100
<i>Agrobacterium radiobacter</i>		98	0	0	0	65	99	1	99	100	100	100	100	99	99	90	2	0	100	0	1	99
<i>Alcaligenes denitrificans</i>		93	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	86	20	96	99	94	93	100
<i>Alcaligenes faecalis 1</i>		1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3	77	7	100	97	97	98
<i>Alcaligenes faecalis 2</i>		78	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	99	73	91	100	69	73	100
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>		81	0	0	1	0	0	1	0	99	0	30	1	1	1	100	81	94	99	98	96	100
<i>Bergeyella zoohelcum</i>		0	0	0	0	99	0	74	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	99
<i>Bordetella avium</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	99	100	100	100	95
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		76	0	0	0	96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	94	85	91	80	100	100
<i>CDC gr. IV C-2</i>		1	0	0	0	23	0	1	0	1	1	0	1	0	1	89	89	86	99	96	14	98
<i>Chromobacterium violaceum</i>		97	1	99	100	0	0	100	0	100	0	66	10	97	0	100	75	0	100	36	0	97
<i>Chryseobacterium indologenes</i>		20	81	1	0	70	98	99	22	55	12	37	1	0	66	1	0	1	1	12	12	99
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>		0	83	1	0	5	99	95	93	86	1	80	76	70	61	0	0	1	0	25	0	99
<i>Myroides spp</i>		0	1	0	0	94	1	99	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	100
<i>Moraxella lacunata</i>		90	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	99
<i>Moraxella spp</i>		34	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	17	1	0	1	1	99
<i>Ochrobactrum anthropi</i>		80	0	0	0	84	1	0	1	82	75	60	20	75	76	34	34	4	99	47	1	99
<i>Oligella ureolytica</i>		71	0	0	0	99	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	95	95	26	96
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>		60	0	0	0	95	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	100
<i>Sphingobacterium multivorum</i>		0	0	1	0	95	100	1	99	99	91	99	0	99	99	0	0	0	1	0	0	99
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>		0	0	0	0	1	100	0	100	100	1	99	10	100	100	0	0	0	0	0	0	99
<i>Weeksella virosa/Empedobacter brevis</i>		12	5	0	0	0	1	100	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	3	1	0	98
<i>Pasteurella aerogenes</i>		100	0	97	0	100	0	0	100	99	75	97	1	80	99	97	0	0	95	0	0	77
<i>Pasteurella haemolytica</i>		95	0	2	0	0	2	0	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85
<i>Pasteurella multocida</i>		96	96	1	0	0	0	0	10	1	0	2	1	1	2	1	0	1	1	0	0	86
<i>Pasteurella pneumotropica</i>		100	61	26	0	85	0	0	83	6	1	6	0	6	3	6	0	1	6	0	0	84
<i>Pasteurella spp</i>		96	1	2	2	1	1	1	4	19	1	1	1	1	1	1	0	1	13	1	0	87
<i>Photobacterium damsela</i>		99	0	94	99	99	2	0	11	11	0	6	0	1	6	0	0	0	63	0	0	100
<i>Plesiomonas shigelloides</i>		99	99	98	98	0	0	0	86	94	0	12	0	77	98	99	77	0	94	0	0	99
<i>Vibrio alginolyticus</i>		98	93	93	0	0	65	91	10	76	1	18	75	57	74	76	1	0	99	1	0	99
<i>Vibrio cholerae</i>		99	100	99	0	0	1	99	99	88	0	30	78	75	97	98	1	0	99	97	1	100
<i>Vibrio hollisae</i>		100	100	31	0	0	0	0	3	10	67	68	0	24	1	41	0	0	94	0	0	100
<i>Vibrio metschnikovii</i>		0	50	64	0	0	7	100	50	100	0	71	99	99	99	17	0	99	50	0	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		99	99	100	1	6	1	98	97	90	81	82	99	51	98	90	0	1	99	21	1	99
<i>Vibrio vulnificus</i>		100	95	95	0	1	95	99	99	9	0	10	9	1	6	28	0	0	95	91	0	100

المخلص

البیوفورڈینات هي سیدروفورات تفرزها مجموعة *Pseudomonas* ذات الفلورة منخفضة الوزن الجزيئي وذات شراهة عالية للحديد وتنتج في شروط معوزة للحديد. أهميتها جعلت من تطبيقاتها تمتد إلى المجالات الزراعية والبيوتكنولوجية والطبية. نهدف من خلال هذا العمل إلى تقييم إنتاج البيوفورديينات بواسطة *Pseudomonas fluorescens* واختبار نشاطها المضاد للميكروبات. قمنا في هذا العمل بعزل 14 *Pseudomonas* ذات الفلورة من جذور نبات شعير الفأر التابع للنجيليات (*Hordeum murinum*) بالإضافة إلى عزلتين تابعتين للنوع *P. fluorescens* تم تحديدهما سابقاً. سمح لنا تطبيق مجموعة من اختبارات التحديد بأن نصف أربع عزلات من بين الأنواع الـ 14 إلى النوع *P. fluorescens* تم استخدام سلالات *P. fluorescens* الستة لتحديد نشاطها المضاد ضد 8 سلالات ممرضة باستخدام طريقة الخطوط المتقاطعة، مرة على وسط King B ومرة أخرى على نفس الوسط بإضافة $FeCl_3$. أظهرت النتائج مناطق تثبيط تتراوح من 5 إلى 34 ملم في الوسط الخال من الحديد مع ظهور صبغة ذات فلورة صفراء مخضرة. قامت العزلة (PK) بالتثبيط في وجود وغياب Fe^{3+} مما يستبعد دور البيوفوردين في هذه العملية. أظهر تحليل الطيف الضوئي للأشعة فوق البنفسجية / المرئي لطاقيات *Pseudomonas* ذات الفلورة الستة المزروعة في وسط السكسينات، أطباقاً مماثلة لطيف البيوفوردين في أربع عزلات واثنين من الأطياف المختلفة في اثنين آخرين. أظهر قياس تراكيز البيوفوردين أن العزلة P11 هي الأكثر إنتاجاً وأن الطاف لهذه السلالة له أكبر تثبيط لـ *P. mirabilis* ATCC 35659 و *C. albicans* ATCC10231 و *P. mirabilis* ATCC 35659 مع 15 و 16 بقطر على التوالي. أعطت سلالة PK المنتجة لمركبات البيوفوردين والفينازين منطقة تثبيط تقدر بـ 18 ملم مع *P. mirabilis* ATCC 35659. كما أظهر بيوفوردين العزلة P11 المنتج على وسط King B والمستخلص بطريقة الاستخلاص صلب / سائل مناطق تثبيط 15 ملم مع *P. mirabilis* ATCC 35659 و 14 ملم مع *C. albicans* ATCC10231. بين استخدام شريحة من نظام API 20 NE في التعرف على السلالة P11 أنها تنتمي إلى النوع *P. fluorescens*.

الكلمات المفتاحية: البيوفوردين، *P. fluorescens*، وسط King B، وسط السكسينات، تثبيط، الحديد، سلالات ممرضة.

Résumé

Les pyoverdines sont des sidérophores sécrétés par les *Pseudomonas* fluorescents. Ce sont des chélateurs du fer à haute affinité, à faible poids moléculaire et produits dans des conditions limitées en fer. Leur importance étend leurs applications à l'agriculture, à la biotechnologie et à la médecine. Dans le présent travail, nous avons pour objectif d'évaluer la production des Pyoverdines par *Pseudomonas fluorescens* et d'examiner leur activité antimicrobienne. Un total de 14 *Pseudomonas* fluorescents ont été isolés à partir des racines d'une plante graminée sauvage (l'orge du rat = *Hordeum murinum*) en plus de deux isolats de la même espèce préalablement identifiés à *P. fluorescens*. L'application d'un ensemble de tests d'identification nous a permis de rapprocher 4 isolats parmi les 14 à l'espèce *P. fluorescens*. Les six isolats ont été utilisés pour déterminer leur pouvoir antagoniste vis-à-vis 8 souches pathogènes en utilisant la méthode des stries croisées, une fois sur le milieu King B standard et une autre fois sur le même milieu additionné de $FeCl_3$. Les résultats ont montré des zones d'inhibition de 5 à 34 mm dans le milieu non additionné de fer avec apparition d'une fluorescence jaune verdâtre. Un isolat (PK) a exercé son inhibition en présence et en absence de Fe^{3+} ce qui fait exclure le rôle de la pyoverdine dans cette action. L'analyse par spectrophotométrie UV/Visible des surnageants des six *P. fluorescens* cultivés dans le milieu succinate a montré des spectres similaires au spectre de la pyoverdine chez quatre isolats et deux spectres différents chez les deux autres. Le dosage de la pyoverdine a déterminé que l'isolat P11 est le plus producteur et c'est le surnageant de cette souche qui a montré l'inhibition la plus importante vis-à-vis *P. mirabilis* ATCC 35659 et *C. albicans* ATCC 10231 avec des zones de 16 et 15 mm de diamètre respectivement. La souche PK productrice de pyoverdine et des composés phénaziniques a donné une zone d'inhibition de 18 mm avec *P. mirabilis* ATCC 35659. La pyoverdine de l'isolat P11 produite sur le milieu King B et extraite par une extraction solide/liquide a montré des zones d'inhibition de 15 mm avec *P. mirabilis* ATCC 35659 et de 14 mm avec *C. albicans* ATCC 10231. La Galerie API 20 NE utilisée pour identifier l'isolat P11 a donné des résultats correspondant à l'espèce *P. fluorescens*.

Mots-clés : la pyoverdine, *Pseudomonas fluorescens*, milieu King B, milieu succinate, inhibition, le fer, souches pathogènes.

Abstract

Pyoverdins are siderophores secreted by fluorescent *Pseudomonas*. They are low molecular weight and high affinity iron chelators produced under iron restricted conditions. Their importance extends their applications to agriculture, biotechnology and medicine. In the present work, our goal was to evaluate the production of Pyoverdins by *Pseudomonas fluorescens* and to examine their antimicrobial activity. A total of 14 fluorescent *Pseudomonas* were isolated from the roots of a wild grass (rat barley = *Hordeum murinum*) in addition to two isolates of the same species previously identified to *P. fluorescens*. The application of a set of identification tests allowed us to belong four isolates among the 14 to *P. fluorescens* species. The six *P. fluorescens* strains were used to determine their antagonistic activity against 8 pathogenic strains using the crossed streaks method, once on the standard King B medium and again on the same medium plus $FeCl_3$. The results showed inhibition zones of 5 to 34 mm in the non-iron added medium with appearance of a greenish-yellow fluorescence. An isolate (PK) exerted its inhibition in the presence and absence of Fe^{3+} which excludes the role of the pyoverdin in this action. An UV / Visible spectrophotometry analysis of the supernatants of the six *P. fluorescens* grown in the succinate medium, showed spectra similar to the pyoverdin spectrum in four isolates and two different spectra in two others. The pyoverdin dosage determined that the P11 isolate is the most productive and it is the supernatant of this strain that showed the greatest inhibition against *P. mirabilis* ATCC 35659 and *C. albicans* ATCC 10231 with 16 and 15 mm in diameter respectively. The PK strain producing pyoverdin and phenazine compounds gave an 18 mm inhibition zone with *P. mirabilis* ATCC 35659. Pyoverdin of the isolate P11 produced on king B medium and extracted by solid / liquid extraction showed 15 mm inhibition zones with *P. mirabilis* ATCC 35659 and 14 mm with *C. albicans* ATCC 10231.

The API 20 NE Gallery used to identify the P11 isolate yielded results corresponding to *P. fluorescens* species.

Keywords: pyoverdine, *Pseudomonas fluorescens*, King B medium, succinate medium, inhibition, iron, pathogenic strains.