
Soumis le: 30/03/2020

Forme révisée acceptée le: 14/06/2020

Correspondant: benzinafarida@yahoo.fr



Revue
Nature et Technologie

<http://www.univ-chlef.dz/revuenatec>

ISSN: 1112-9778 – E-ISSN: 2437-0312

Détermination et caractérisation des sidérophores synthétisés par quelques souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents phytobénéfiques

Farida BENZINA TIHAR^{a,*}, Hakima OULEBSIR-MOHAND KACI^b, Sonia HAMID^{a,b},
Abd-Ennaceur REGHMIT^a, Fatma SAHIR-HALOUNE^a

^a Laboratoire de Valorisation et Conservation des Ressources Naturelles, Département de Biologie, Université M'hamed Bougara de Boumerdes, Algérie.

^b Université Akli Mohand Ouladjid Bouira, Algérie.

Abstract

Cette étude est consacrée à la détermination de la capacité de 5 souches autochtones de groupe fluorescent des *Pseudomonas* et une souche de référence CHA0 à produire des sidérophores. Les 5 souches testées ont été isolées de la rhizosphère de l'olivier cultivé dans la région de Bouira (localisée au nord algérien). Les tests d'évaluation de la production des sidérophores ont été réalisés dans cinq milieux de culture différents à savoir le succinate (SM), le King B, le milieu PD, le milieu CAA et le milieu TSB. Les résultats obtenus confirment que l'ensemble des souches testées ont la capacité de produire des sidérophores sur le milieu succinate (MS) avec des intensités de production variable d'une souche à une autre. L'influence de certains facteurs tels que l'assimilation du fer ajouté, sous forme de FeCl₃ à différentes concentrations, le pH, et le type de sucre sur la production des sidérophores a été également testée. Nous avons remarqué que l'absence de fer dans le milieu, à des pH neutre (7) en présence de fructose comme source de carbone assure les meilleurs taux de production. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour la détection des sidérophores tels que les tests chimiques et biochimiques par l'électrophorèse SDS-PAGE. Ces méthodes ont permis de conclure que la plupart des sidérophores synthétisés par nos souches sont de type hydroxamate. D'autre part, l'infrarouge (IR) a été utilisée pour la détection du groupement fonctionnel des pigments responsables de la fluorescence (les chromophores) qui sont dans notre cas très riche en groupement OH, NH, cycles benzoïques, acide carboxylique COOH ce qui confirme la synthèse des sidérophores de type hydroxamates et plus précisément la classe des pyoverdines. L'évaluation qualitative de l'activité antifongique des sidérophores produits par les différentes espèces de *Pseudomonas fluorescents* à l'encontre de *Verticillium dahliae* a montré des taux d'inhibition qui varient de 25 à 48%.

Mots-clés : Olivier ; *Pseudomonas* spp. fluorescents ; Sidérophores ; *Verticillium dahliae* ; Pyoverdines.

Bioassay, characterization and estimation of siderophores from some phyto-beneficial fluorescent *Pseudomonas*.

Abstract

We studied the capacity of 5 indigenous strains of fluorescent group of *Pseudomonas* isolated from the rhizosphere of the olive tree cultivated in the region of Bouira (Algeria), and a reference strain CHA0 to produce siderophores in the culture media tested namely succinate (SM), King B, PD, CAA and TSB medium. The results obtained confirm that all of the strains tested have the capacity to produce siderophores on the succinate medium (MS) without added iron, with production intensities varying from one strain to another. The influence of certain factors such as the culture medium, and the assimilation of the added iron, in the form of FeCl₃ at different concentrations, the pH, and the type of sugar added in the culture medium on the production of siderophores has been also tested. We have noticed that the absence of iron in the medium, at neutral pH (7) in the presence of fructose as a carbon source ensures the best production rates. Several methods have been used for the detection of siderophores such as chemical and biochemical tests by SDS-PAGE electrophoresis. These applied identification methods made it possible to conclude that most of the siderophores synthesized by our strains are of the hydroxamate type. While infrared (IR) was used for the detection of the functional group of pigments responsible for fluorescence (chromophores) which in our case are very rich in group OH, NH, benzoic cycles, carboxylic acid COOH which confirms the synthesis of siderophores of the hydroxamate type and more precisely the class of pyoverdines. The qualitative evaluation of the antifungal activity of siderophores produced by the different species of fluorescent *Pseudomonas* against *Verticillium dahliae* has shown inhibition rates which vary from 25 to 48%.

Keywords: Olive trees; Fluorescents *Pseudomonas*; Siderophores; *Verticillium dahliae*; Pyoverdin.



Ceci est un document en libre accès selon les termes de [Creative Commons Attribution License CC-BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), ce qui permet de le partager, copier, reproduire, distribuer, communiquer, réutiliser ou de l'adapter avec l'obligation de créditer son auteur.

1. Introduction

Le fer est un élément important pour presque tous les organismes vivants étant impliqué dans beaucoup de processus métaboliques. Cependant, le fer n'est pas aisément disponible pour la plupart des micro-organismes bien que ce ne soit pas un élément rare, étant le quatrième d'abondance dans la croûte terrestre. Dans le sol et à la valeur du pH 7, il règne sous forme d'hydroxyde ferrique ($\text{Fe}(\text{OH})_3$). La concentration de Fe^{3+} libre est au mieux $10^{-17} \text{ mol.L}^{-1}$ tandis que les microorganismes ont besoin de $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ [1]. Pour les microorganismes le fer est fortement lié aux protéines [2]. Il s'implique dans différentes fonctions de l'organisme comprenant la réduction de l'oxygène pour la synthèse de l'ATP (Adénosine triphosphate), réduction de précurseurs de ribonucléotide d'ADN, ainsi que pour la formation du l'hème et pour d'autres buts essentiels [3]. Les microorganismes ont donc développé des systèmes d'acquisition de fer spécifiques et performants pour assurer leur survie par la sécrétion de sidérophores [4-8].

Les sidérophores, sont des molécules de faible poids moléculaires, produites par les bactéries et les champignons, avec une forte affinité pour chélater le fer ferrique. Ils sont synthétisés et sécrétés par beaucoup de micro-organismes en réponse aux carences de fer [4], ces composés se lient avec le Fe^{3+} , et le transportent dans la cellule microbienne par des récepteurs membranaires spécifiques afin de le solubiliser [3].

Ces derniers sont utilisés pour assurer la nutrition en fer des microorganismes. Ils sont produits par presque tous les microorganismes, procaryotes ou eucaryotes étudiés, à l'exception de *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans* et *Candida albicans*. Parmi les 500 sidérophores identifiés jusqu'en 2016, seules ces trois espèces microbiennes ne produisent pas elles-mêmes des sidérophores, mais elles possèdent la machinerie moléculaire permettant l'utilisation de sidérophores sécrétés par d'autres microorganismes, nommés alors xénosidérophore [9,10].

Parmi les bactéries productrices des sidérophores les *Pseudomonas spp.* fluorescents, qui sont des bactéries

rencontrées dans l'eau et dans le sol particulièrement, au niveau de la rhizosphère. Dans ce dernier milieu, deux espèces de groupe fluorescents des *Pseudomonas* à savoir ; *P. fluorescens* et *P. putida*, sont prédominants et peuvent constituer plus de 60 % de la flore bactérienne [11]. Elles ont développé une stratégie active pour la prise de fer, cette stratégie est basée sur des sidérophores (appelé souvent pyoverdine qui montrent une affinité élevée pour le Fe^{3+} [5].

Des études menées actuellement, notamment sur le groupe fluorescent des *Pseudomonas* qui sont des bactéries à Gram-négatif, permettent d'accroître progressivement nos connaissances sur les mécanismes permettant à ces microorganismes d'assimiler les quantités de fer nécessaires à leur prolifération [8, 12].

L'objectif de la présente étude est basé sur (i) la détection, et l'identification d'un métabolite secondaire, les sidérophores, synthétisés par différentes souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents isolées à partir de sol rhizosphérique de l'olivier, et (ii) leurs capacités d'assimiler le fer dans les conditions de carence en créant dans le milieu une compétition trophique vis-à-vis de cet élément, (iii) la recherche d'une éventuelle activité antifongique contre le *Verticillium dahliae* agent de la verticilliose vasculaire de l'olivier.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Les souches bactériennes

Pour la réalisation des différentes expériences, 5 souches bactériennes du genre *Pseudomonas* (T23, T27, T33, T34 et T49) sont utilisées, ces souches ont été isolées à partir de la rhizosphère de l'olivier cultivé (*Olea europaea pv. europaea*) sur le milieu King B [13]. Une souche de référence CHA0 (Swiss, Pr. Keel) a également été utilisée pour interpréter et comparer les résultats. Le tableau 1 représente les caractéristiques moléculaires effectuée par le séquençage de l'ADN 16S des isolats de *Pseudomonas* utilisés dans la présente étude [14].

Tableau 1

Identification moléculaire des souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents utilisées dans notre étude

Souches bactériennes	Code d'accésion	Identification	Pourcentage de similarité
T23	LN849713	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	99 %
T27	LN849714	<i>Pseudomonas fluorescens</i> bv. III	100 %
T33	LN849715	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	99 %
T34	HG810923	<i>Pseudomonas putida</i>	100 %
T49	LN849712	<i>Pseudomonas fluorescens</i> bv. II	100 %

2.2. Les souches fongiques

Il s'agit d'un champignon phytopathogène, du genre *Verticillium*, isolé des branches et des rameaux d'oliviers (variété Chemlal) dans la région de Bouira¹, commune de M'chedallah (36°21'55" Nord, 4°16'15" Est, Altitude 481 m). Le climat est chaud et sec en été, froid et pluvieux en hiver. La pluviométrie moyenne est de 660 mm.an⁻¹ au nord et de 400 mm.an⁻¹ dans la partie sud. Les températures varient entre 20 °C et 40 °C de mai à septembre et de 2 °C à 12 °C de janvier à mars. Les sujets choisis présentaient les symptômes de la maladie (jaunissement et défoliation). Le champignon isolé a été identifié en utilisant la clé d'identification proposée par Agrios [15], et en utilisant des primers spécifiques de pathotype défoliant et non défoliant pour l'identification moléculaire [14].

2.3. Mise en évidence de la production des sidérophores

La production des sidérophores a été mise en évidence par la technique de Pérez-Miranda *et al.* [16], sur le milieu Succinate-Agar (MS) (K₂HPO₄, 6 g) ; (KH₂PO₄, 3 g) ; (MgSO₄, 0,2 g) ; ((NH₄)₂SO₄, 1 g) ; Acide succinique ((C₄H₆O₆), 4 g) et le milieu B de King ((Peptone 20 g) ; (K₂HPO₄, 1,5 g) ; (MgSO₄, 1,5 g) ; (Glycérol 15 mL). Ces derniers sont préparés sans addition de sulfate de fer. Pour éliminer toute trace de fer, un volume de milieu de culture est mélangé avec un volume équivalent de 8-hydroxyquinoline à 3 % (préparé dans le chloroforme). Le mélange a été agité et conservé à 4 °C pendant une nuit. Ensuite la phase aqueuse a été récupérée après décantation. Pour éliminer les traces de 8-hydroxyquinoline, la phase récupérée a été lavée deux fois avec le chloroforme, le milieu de culture a été ensuite porté à ébullition sous

une hôte chimique pour éliminer les traces de chloroforme, ensuite puis les cultures ont été incubées pendant 18 h à 28 °C. L'observation des pigments jaunes verdâtres fluorescents été bien visible sous lumière ultraviolette ($\lambda=350$ nm) ou à l'œil nu ce qui confirme la production des sidérophores.

2.4. Evaluation quantitative de la production des sidérophores

L'évaluation de la production des sidérophores a été testée sur 5 milieux de culture liquide différents : KB ; PDB ; MS ; CAA et TSB. Chaque milieu a été distribué dans des tubes à essai stériles à raison de 15 mL par tube [17].

1 mL de la suspension bactérienne préparée préalablement à partir d'une culture bactérienne âgée de 18 à 24 h, a été ajouté. Les concentrations ont été ajustées à DO 0,3 à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm, ensuite les cultures liquides ainsi préparées ont été incubées à 28 °C pendant 48h. Trois répétitions ont été retenues. Le témoin négatif était représenté par un milieu sans inoculum, alors que le témoin positif était représenté par la souche de référence *P. fluorescens* CHA0. La lecture a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre.

Les résultats ont été exprimés par la mesure de la concentration à deux longueurs d'onde : $\lambda = 600$ nm dont la lecture permettait l'évaluation de la masse bactérienne et une deuxième lecture avec une longueur d'onde $\lambda = 400$ nm, et ce, après centrifugation à une vitesse de 6000 tr.min⁻¹ pendant 20 minutes pour chaque culture. La production des sidérophores a été calculée selon le rapport de la densité optique (DO) décrit par Meyer et Abdallah [17] : $DO (\lambda = 400 \text{ nm}) / DO (\lambda = 600 \text{ nm})$

¹ Wilaya de Bouira : Circonscription administrative

2.5. Détection et identification des sidérophores

Les cultures bactériennes de 18 h cultivées sur le milieu succinate solide été inoculées dans des tubes à essai contenant le milieu succinate liquide. Après incubation, sous agitation à 120 tr.min⁻¹ pendant 48 h à 28 °C, les cultures obtenues ont été soumises à une centrifugation à 4000 tr.min⁻¹ à 4 °C pendant 15 min. La caractérisation des sidérophores a été effectuée à partir des surnageants concentrés par plusieurs méthodes.

2.5.1. Méthodes chimiques

Les sidérophores ont été divisés en trois groupes chimiques, les hydroxamates, les catécholates et les carboxylates ou une mixture des trois groupements. Des tests spécifiques ont été utilisés pour leurs révélations.

La détection des hydroxamates a été réalisée selon la méthode de Neilands [18]. La production des sidérophores a été quantifiée directement par la mesure de l'absorbance lors de la complexation de chlorure ferrique avec le fer. Ces ferri-sidérophores sont généralement de couleur rouge-orangée. La mesure d'absorbance a été effectuée à 450 nm.

La Détection des Catécholates a été effectuée selon le test d'Arnow [19]. Ce test est basé sur la réaction du groupement catécholate en présence de nitrate de molybdate qui donne une coloration jaune en milieu acide suivie en milieu basique d'un virage au rouge. L'apparition d'une couleur rose indique la présence des catéchols. Le dosage des catéchols s'est effectué par spectrophotométrie à $\lambda = 515$ nm.

Enfin, la détection des carboxylates a été réalisée selon la méthode de Shenker et al. [20] ; 1 mL de CuSO₄ (250 μ M) et 2 mL de tampon acétate (pH 4), sont additionnés à 1 mL de filtrat. Le complexe cuivreux formé présentait un maximum d'absorption entre 190 et 280 nm.

2.5.2. Détection de poids moléculaire des sidérophores

Les protéines sont quantifiées par la méthode de Bradford, et font l'objet d'une électrophorèse selon la méthode de Laemmli [21].

Les culots cellulaires ont été soumis à une sonication (Soniprep 150 MSE) à 10 μ M pendant 30 s (l'opération a été répétée 5 fois). Pour une purification

partielle des protéines solubles, les surnageant ont été récupérés après centrifugation (13 200 rpm/45 mn à 4 °C). La précipitation des protéines était alors effectuée par saturation à 50 % avec du sulfate d'ammonium, et une incubation pendant une nuit à 4 °C. Le précipité protéique a fait l'objet d'une dialyse (Vivaspin Concentrators de Millipore), par solubilisation dans 1 mL de tampon Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8). La détection des bandes protéiques a été est révélée par la méthode conventionnelle au Bleu Brillant de Coomassie R-250 sur SDS-PAGE avec un gel à 5 % de polyacrylamide [22].

2.5.3. Détermination des groupements fonctionnels (La spectrophotométrie Infrarouge)

Les surnageants des cultures de *Pseudomonas* ont subis une évaporation sous vide à l'aide d'un rota-vapeur pour des investigations complémentaires concernant la détection des pigments responsable de la fluorescence des sidérophores par l'infrarouge (IR) [23].

Les spectres IR ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre JASCO FT /IR- 4100, dans la gamme 400 à 4000 cm⁻¹. La lecture des résultats a été effectuée à l'aide d'un ordinateur par affichages graphiques.

2.5.4. Mise en évidence de l'activité antifongique

L'évaluation qualitative de l'activité antifongique des sidérophores a été réalisée selon Backer et Cook [24], sur le milieu PDA. Cette méthode consiste à estimer l'inhibition de la croissance mycélienne d'un isolat de *Verticillium dahliae* (pathotype défoliant) par la méthode de diffusion sur milieu gélosé.

A partir d'une culture jeune et pure du champignon phytopathogène *Verticillium dahliae*, deux à trios fragments de la culture fongique ont été prélevés et placés à la périphérie des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA préalablementensemencé par les surnageants des différentes souches bactériennes. Les boîtes témoins ont été préparées par l'introduction des fragments des cultures de *V. dahliae* dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Les boîtes ont ensuite été placées pendant 4 h au réfrigérateur afin de stimuler la diffusion des sidérophores, puis à l'étuve à 28 °C

pendant 5 à 7 jours. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la méthode de Rappilly [25] :

$$I(\%) = [D_n/D_0] \times 100$$

D_n : Diamètre (cm) de la zone d'inhibition (halo) autour de la colonie fongique.

D_0 : Diamètre de la boîte de pétri en cm.

2.6. Effet de quelques facteurs limitants sur la synthèse des sidérophores

2.6.1. Effet de la concentration de fer :

La biosynthèse et la sécrétion des sidérophores sont fondamentalement régis par plusieurs facteurs dont la concentration en fer est la plus importante. Le fer sous forme de $FeCl_3$ a été additionné au milieu succinate, à différentes concentrations : 0 ; 50 ; 100 et 150 μM . Après inoculation des différentes souches bactériennes, une incubation à 28 °C pendant 48 h à 120 tr.mn⁻¹ a été faite. La lecture des résultats a été faite selon la méthode de Meyer et Abdellah [17].

2.6.2. Influence de pH

L'effet du pH (5, 7, 10) sur la production de sidérophores a été étudié dans le milieu succinate en ajustant le pH avant l'inoculation avec 1 N de HCl ou 1 N de NaOH en maintenant toutes les autres conditions constantes [26]. La lecture des résultats a été faite selon la méthode de Meyer et Abdellah [17].

2.6.3. Influence de type de sucre

Afin d'examiner l'effet de différentes sources de carbone sur la croissance et la production des sidérophores, chaque 100 mL de milieu SSM ont été complétés séparément avec 5 g chacun de glucose, maltose, et fructose. Après cela, nous avons procédé à la lecture des résultats selon la méthode de Meyer et Abdellah [17].

3. Résultats et discussion

3.1. Mises en évidence et évaluation de la production des sidérophores

Sur le milieu SSM et le milieu King B, toutes les souches ont émis un pigment fluorescent soluble dans

l'eau qui diffusait rapidement dans le milieu gélose (Figure 1).



Figure 1. Aspect macroscopique de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescentes cultivées sur le milieu SSM. A observé à l'œil nu, B observé sous lumière UV à 350 nm.

3.2. Evaluation quantitative des sidérophores

Les souches testées ont montré des intensités de production des sidérophores variables. Cela est liée à la nature de milieu de culture et à la diversité structurale du génome des espèces productrices.

D'après les résultats des tests effectués, l'ensemble des souches ont montré une capacité plus au moins importante sur la base de synthèse du pigment fluorescent diffusible (Tableau 2). Nous avons remarqué une croissance bactérienne (évaluée par la mesure de la densité optique) assez élevée dans tous les milieux de culture testés dont la DO dépasse 1, à l'exception de milieu PDL dont la DO était en moyenne de l'ordre de 0,7. Les souches étudiées ont montré des niveaux de synthèse de sidérophores appréciables sur milieu MS, mais leur croissance était relativement faible. Dans le milieu KB nous avons noté une production appréciable de sidérophores, avec une bonne croissance ainsi que pour le milieu CAA. Sur le milieu TSB, où la croissance était relativement importante, la production de sidérophores était pratiquement très faible. En fin, sur le milieu PDL, les deux paramètres étudiés, le taux de croissance et la production des sidérophores étaient faible.

La production maximale des sidérophores a été observée dans le milieu succinate (MS) avec des quantités de production allant de 35 $\mu g.L^{-1}$ enregistrée chez la souche de référence CHA0 et la souche locale T34, jusqu'à 46 $\mu g.L^{-1}$ chez la souche T23. Le milieu King B arrive en deuxième position avec le milieu CAA, le taux de production diffère d'une souche à l'autre selon la nature du milieu ; par exemple sur le

44 Détermination et caractérisation des sidérophores synthétisés par quelques souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents phytobénéfiques

milieu B de King, une production maximale de 35,5 µg.L⁻¹ est observé chez la T34 suivi de la souche T49 et la souche de référence CHA0 avec une production moyenne de 13 µg.L⁻¹. Par contre sur le milieu CAA, la production maximale est observée chez la souche T33 (28,5 µg.L⁻¹) et la souche T23

(23 µg.L⁻¹), les souches T34 et la souche de référence CHA0 avec des productions de l'ordre de 16 et 15 µg.L⁻¹ respectivement. Les résultats sur les milieux PDB et TSB étaient relativement faibles, pour l'ensemble des souches ne dépassent pas 15 µg.mL⁻¹.

Tableau 2

Evaluation quantitative de la production des sidérophores par les différentes souches de *Pseudomonas* dans les trois milieux de culture testés (SSM, KB et PD).

Souches	Production de sidérophores µg.L ⁻¹									
	King B		MS		PDB		TSB		CAA	
	CB	PS	CB	PS	CB	PS	CB	PS	CB	PS
T23	1,445	19	1,134	45,925	1,782	10,37	0,754	11,222	1,126	22,666
T27	1,239	16,74	1,09	42,222	1,435	4,592	0,891	12,481	1,373	12,925
T33	1,248	9,777	1,661	43,888	1,492	7,63	0,821	9,37	1,432	28,481
T34	1,663	35,481	1,477	35,296	0,917	6,62	0,638	4,518	1,185	15,888
T49	1,32	13,37	1,087	36,37	1,78	14,74	0,798	11,925	1,74	14,333
CHA0	1,818	12,851	1,524	34,962	1,677	11,37	0,806	13,148	1,298	15,444

CB : Croissance bactérienne estimée à 540 nm ; PS : Production de sidérophores en µg.L⁻¹

3.3. Détection de la nature chimique des sidérophores produits

A la lumière des résultats obtenus, nous avons constaté que les souches étudiées produisent différents types de sidérophores.

Cinquante pourcent (50%) des souches testées produisent des sidérophores de types hydroxamates (3/6) à savoir la T27, la T49 et la souche de référence CHA0. Deux seulement, la T23 et la T33 produisent les sidérophores de type catécholates (2/6 isolats) alors qu'une seule souche la T34 est productrices de carboxylates (1/6) (Tableau 3).

Tableau 3

Détection de la nature chimique des sidérophores produits par les *Pseudomonas* spp

Isolats bactériens	Hydroxamates				Catécholates		Carboxylates
	Test de FeCl ₃ (à 2 %)		Test Csaky		Test d'Arnow		Test de Shenker
	Couleur	Pic à 420-450 nm	Couleur	Couleur	Pic à 515 nm	Couleur	Pic à 190-280 nm
T23	-	Nd	-	Rose	0.290	Nd	0.190
T23+	-	Nd	-	-	Nd	Nd	Nd
T27	Pourpre	0.493	Rouge	-	0.401	Nd	0.266
T27 ⁺	-	Nd	-	-	Nd	Nd	Nd
T33	-	0.331	-	Rose	0.350	Nd	0.193
T33 ⁺	-	Nd	-	-	-	Nd	Nd
T34	-	Nd	-	-	0.109	Jaune-vert*	0.103
T34 ⁺	-	Nd	-	-	Nd	Nd	Nd
T49	Pourpre	0.525	Rouge	-	0.505	Nd	0.500
T49 ⁺	-	Nd	-	-	Nd	Nd	Nd
CHA0	Pourpre	0.500	Rouge	-	0.493	Nd	0.465
CHA0 ⁺	-	Nd	-	-	Nd	Nd	Nd

+ : Culture en présence de FeCl₃. ; Nd : Non détectable ; - : Absence de coloration ; * : Témoin négatif bleu.

3.4. La détection des poids moléculaires des sidérophores

Lorsque les cellules microbiennes perçoivent une carence en fer, l'expression des gènes codant les enzymes nécessaires à la synthèse et au transport des sidérophores est activée. Le gel de migration a révélé la présence d'une seule bande avec une forte intensité, au même niveau presque que la souche de référence CHA0 qui possède des sidérophores d'un poids moléculaire aux alentours de 10^3 Da⁽²⁾, dans notre cas 950 Da (Figure 2).

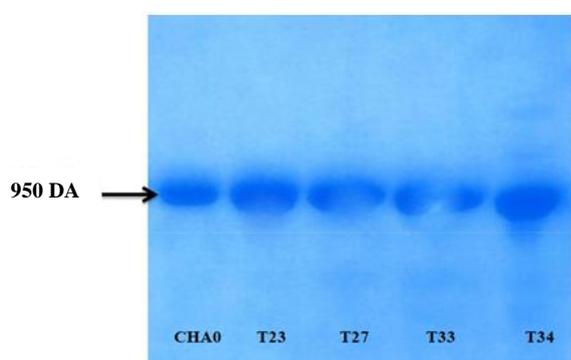


Figure 2. Le profil électrophorétique des sidérophores produits sur gel polyacrylamide par les souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents. (CHA0 ; T23, T27, T33 et T34)

3.5. Détection des groupements fonctionnels (chromophores) des sidérophores

Les résultats obtenus ont été traités avec deux logiciels [Essential FTIR](#)® et [Specamp](#)©. Les figures ci-dessous montrent les différents groupements chromophores détectés chez les souches T23, T33, T27 et T34.

L'étude du spectre de la souche T23, révèle la présence de plusieurs bandes caractéristiques des groupements chromophores spécifiques des sidérophores : une bande fine au-delà de 980 cm^{-1} qui correspond à la liaison N-H ; une deuxième bande forte et fine entre 1046 à 1145 cm^{-1} qui correspond aux liaisons C-O et C=N ; et 3 bandes de forte intensité correspondant à la liaison C=C (cycle benzoïque) entre 1300 à 1480 cm^{-1} . Une bande très forte correspond à la liaison C=O entre 1570 à 1750 cm^{-1} et une autre bande moyenne et large de fonction OH libre entre 2900 et

3200 cm^{-1} . Ces deux bandes correspondent à l'acide carboxylique R-COOH, et la liaison C=O correspondant au groupe carbonyle, car elles sont confondues. Ce dernier donne une bande de vibration très légèrement plus haute en nombre d'onde que celle du groupe carboxylique. Une autre bande très large entre 3200 et 3600 cm^{-1} correspond au groupement OH de l'alcool R-OH.

L'étude du spectre de la souche T33 montre qu'il existe les mêmes bandes caractéristiques que l'extrait de la souche T23, mais on remarque de plus la présence d'une multiple bande très fine de C=C (aromatique) entre 1287 et 1576 cm^{-1} et une harmonique des vibrations du cycle benzoïque entre 1900 et 2300 cm^{-1} , et entre 2300 à 2400 cm^{-1} (Figures 3 et 4).

² Da (Dalton) équivaut 1 g/mol.

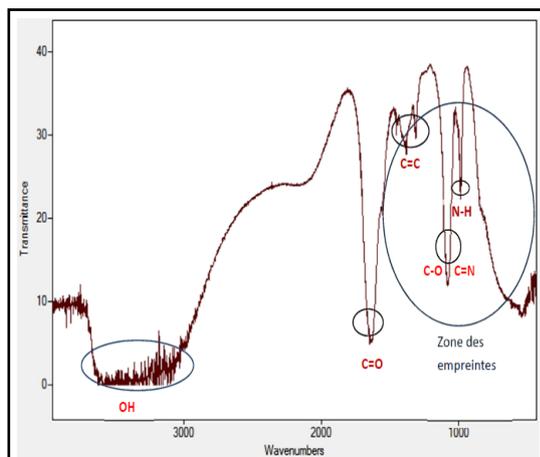


Figure 3. Spectre infrarouge de l'extrait de la souche T23

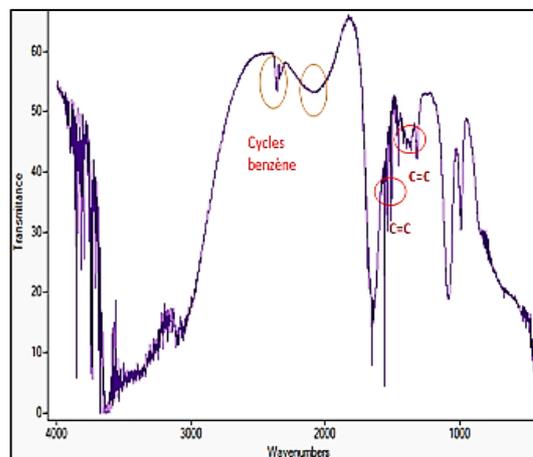


Figure 4. Spectre infrarouge de l'extrait de la souche T33

Le spectre infrarouge de la souche T27 est le même que celui de la souche T33, les mêmes bandes d'absorbance sont affichées avec une intensité qui diffère plus ou moins. Nous avons remarqué la présence d'un cycle benzoïque fonctionnel et caractéristique très large, avec une haute absorbance. Ce cycle se situe à une longueur d'onde entre 1950 et 2300 cm^{-1} . Dans le

spectre de la souche T34, la bande de liaison C=O de groupe carbonyle (cercle rouge) apparaît très claire que celle de groupement carboxyle (cercle vert) se situant entre 1500 et 1586 cm^{-1} . Les autres bandes sont les mêmes que celles des autres graphes, il n'y'a que l'intensité qui est différente (Figures 5 et 6).

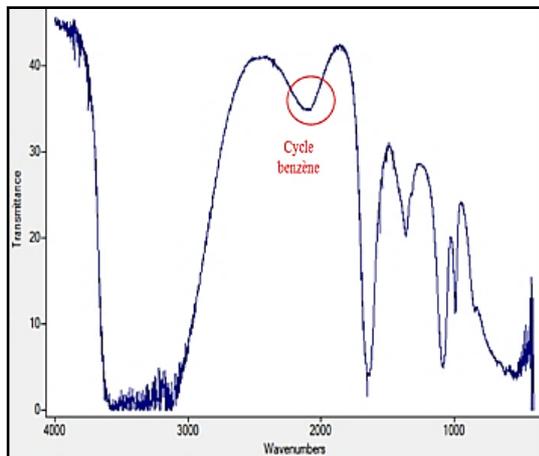


Figure 6. Spectre infrarouge de l'extrait de la souche T34

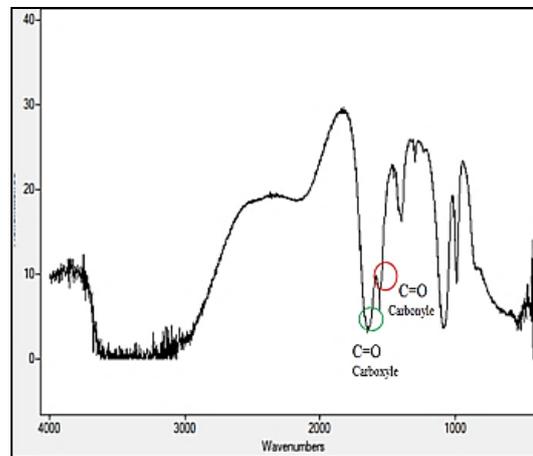


Figure 5. Spectre infrarouge de l'extrait de la souche T27

4. Résultats de l'activité antifongique

Les surnageants des cultures des *Pseudomonas spp.* productrices de sidérophores ont montré des activités

antagonistes variables envers le champignon testé (Figure 7).

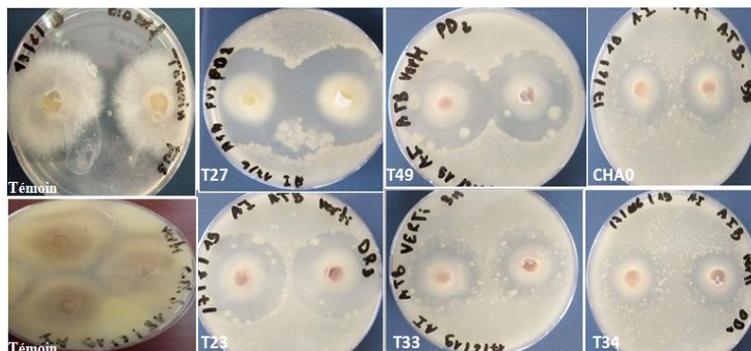


Figure 7. Photos montrant l'activité antagoniste des surnageants des cultures de *Pseudomonas* sur *V. dahliae*

Après 5 jours d'incubation, le sidérophore de la souche T27 a montré un taux d'inhibition important de 47,9 %, suivi de la souche T49 avec un taux de 45,3 %. Les souches T23 et T33 viennent en deuxième position avec des taux d'inhibition de 32,3 et 30,8 % respectivement. La souche T34 a montré le taux d'inhibition le plus faible (25,58 %). La souche de référence CHA0 a montré un taux d'inhibition de 28 %. La zone d'inhibition montre la capacité des *Pseudomonas spp.* fluorescents et ces sidérophores à inhiber le champignon phytopathogène *V. dahliae* (Figure 8).

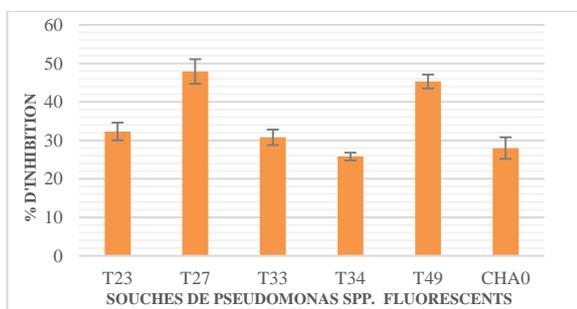


Figure 8. Effet des surnageant de cultures des *Pseudomonas spp* fluorescents sur la croissance mycélienne de *Verticillium dahliae*

5. Effets de différentes conditions de culture sur la production de sidérophores

L'étude des facteurs influençant les conditions de biosynthèse des sidérophores en milieu liquide a été réalisée dans le but d'optimiser leur production. Différents paramètres ont été étudiés tels que le pH (5, 7, 10), la concentration de fer dans le milieu (0, 50, 100, 150 µM), et la source de carbone (de glucose, maltose, fructose).

L'incorporation des ions Fe³⁺, apportés sous forme de FeCl₃, a influencé la production de sidérophores chez les souches étudiées. A croissances relativement égales de souches dans le milieu MS et MS+ FeCl₃, la synthèse des sidérophores a nettement régressé dans ce dernier (Tableau 3), de même que le type de sidérophores (Tableau 4).

Tableau 4
Effet de la concentration de fer sur la production des sidérophores

Souches	Production de sidérophores µg.L ⁻¹			
	[FeCl ₃] = 0 µM	[FeCl ₃] = 50 µM	[FeCl ₃] = 100 µM	[FeCl ₃] = 150 µM
T23	1,240 ^a (45,925) ^b	0,371 (23,629)	0,965 (13,777)	1,359 (13,555)
T27	1,140 (42,222)	0,458 (19,629)	0,946 (16,962)	1,126 (13,074)
T33	1,185 (43,888)	0,321 (23,740)	0,613 (11,888)	1,682 (9,629)
T34	0,874 (35,296)	0,404 (31,407)	0,796 (14,962)	1,522 (8,481)
T49	0,982 (36,370)	0,442 (26,185)	1,241 (16,370)	1,753 (15,703)
CHA0	0,944 (34,962)	0,557 (31,111)	0,922 (20,629)	1,827 (8,555)

a : croissance bactérienne à 540 nm ; b : quantité de sidérophores en µg.L⁻¹

Le pH joue un rôle important dans la solubilité et la disponibilité du fer dans le milieu. Diverses valeurs du pH ont été prises. On a remarqué que les pH acide (4) et alcalin (10) influençaient largement la synthèse des sidérophores. Le rendement maximum en sidérophore a été obtenu à pH 7 avec une production de 46 $\mu\text{g.L}^{-1}$ enregistrée par la souche T23 (Tableau 5).

Les résultats montrent que tout apport en fer dans le milieu de culture diminue la quantité des sidérophores produite, une concentration supérieure ou égale à 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ entraîne presque une absence de sécrétion de sidérophores. En parallèle, une absorbance maximale (1,827) pour la souche CHA0 a été détectée à une longueur d'onde de 540 nm à une concentration de 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ avec une production de sidérophores qui ne dépasse pas 8,55 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Ceci explique le fait que fer soit un facteur limitant de la synthèse des sidérophores mais il n'influence nullement la croissance bactérienne.

Tableau 5
Effet de pH sur la production des sidérophores

Souches	Quantité des sidérophores ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	pH = 5	pH = 7	pH = 10
T23	17,222	45,925	20,407
T27	14,851	42,222	15,370
T33	12,925	43,888	27,888
T34	13,851	35,296	27,777
T49	9,888	36,370	16,222
CHA0	16,185	34,962	16,518

L'effet de sucres utilisés a montré une bonne multiplication sur le milieu MS additionné de fructose, suivi en deuxième position par le glucose ensuite du maltose. Ceci peut être expliqué par l'assimilation rapide de fructose et glucose comme source de carbone (Tableau 6).

Tableau 6
Effet de la nature de sucre sur la quantité de sidérophore produite en ($\mu\text{g.L}^{-1}$)

Souche/Sucre	Quantité des sidérophores ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	Maltose	Fructose	glucose
T23	0,532 ^a (12.592) ^b	0,573 (32,148)	0,320 (17,296)
T27	0,615 (28.625)	0,638 (17,518)	0,689 (14,148)
T33	0,462 (11.518)	0,591 (19,518)	0,751 (10,222)
T34	1,069 (25.222)	1,582 (40,518)	1,004 (17,259)
T49	0,438 (16,250)	0,373 (16,222)	0,573 (20,037)
CHA0	0,522 (9.888)	0,419 (13.925)	0,470 (15,518)

a : croissance bactérienne à 540nm ; b : quantité de sidérophores en $\mu\text{g.L}^{-1}$

6. Discussion

Dans des conditions limitant en fer, les microorganismes ont développé des systèmes d'acquisitions du fer spécifiques et performants pour assurer leur survie et de s'adapter à leur environnement, il s'agit de la sécrétion de sidérophores, qui ont une haute affinité pour le (Fe^{+3}). Puisque la synthèse de sidérophores est réglée par le fer et souvent influencée par d'autres facteurs environnementaux, les conditions de croissance sont importantes pour maximiser leurs productions. La meilleure synthèse de sidérophores a été révélée dans les milieux SM et KB, considérés comme carencés en fer, à travers la production d'un pigment fluorescent diffusible dans le milieu.

La couleur de la fluorescence émise sous l'influence d'une lampe à rayons ultraviolets pouvait varier grandement (bleu, vert, jaune), non seulement en fonction de la souche, mais aussi selon l'âge de la culture. On conçoit donc que la variabilité de la couleur de la fluorescence ne dépend pas seulement de la structure moléculaire des pigments émis, mais aussi de l'environnement dans lequel ils sont produits. Néanmoins, une étude structurale de ces pigments pourrait être très utile en tant que critère taxonomique [11].

La totalité des souches sont sélectionnées sur la base de la synthèse d'un pigment fluorescent diffusible sur le milieu succinate (SM). Dans le but de détecter ce type

de composés, plusieurs techniques basées sur les propriétés chimiques ont été utilisées. Tous les isolats produisent des hydroxamates révélés par le test de FeCl_3 et le test de Csaky, alors que la production de catécholates, de carboxylates n'a été observée que chez les isolats T23, T33 et T34. Il existe d'autres types de sidérophores non fluorescents, qui jouent un rôle dans la survie des bactéries tels que la pyocheline et pseudomanine chez *P. aeruginosa* [3, 27-30].

La synthèse de sidérophores n'a été révélée en forte quantité que dans les milieux MS, KB et CAA, considérés comme carencés en fer, à travers la production d'un pigment fluorescent diffusible dans le milieu. Le succinate est employé par le groupe fluorescent des *Pseudomonas* plus efficacement dans la synthèse de sidérophore que dans la croissance, vraisemblablement due à l'influence du succinate dans la synthèse de ce métabolite. Cette proposition est basée sur la structure de pyoverdine, en laquelle la partie 3-amino du chromophore est substitué avec divers groupes d'acyle dérivés du succinate, malate ou α -cétoglutarate [31, 32].

Le milieu King B est considéré comme sélectif pour les *Pseudomonas spp.* fluorescents [13]. Ce constat a été aussi rapporté par Meyer et Abdallah [17]. Les milieux synthétiques sont mieux conseillés pour la production de sidérophores afin de pouvoir éliminer toute source de fer.

Sur le milieu PDL et TSB la production des sidérophores était faible dû à la nature des milieux qui est semi synthétique contenant des concentrations variables en fer dans leurs composés naturels ; la pomme de terre pour le milieu PD et la peptone de soja pour le milieu TSB. De plus sur le milieu PDL, la croissance bactérienne (mesurée en densité optique) était en moyenne de l'ordre de 0,7 ce qui peut être expliqué par le fait que le milieu PDL contient une quantité limitée en glucose, et que la source majoritaire de carbone qui est l'amidon soit assez complexe et donc la bactérie doit synthétiser de l'amylase pour qu'elle puisse se développer sur ce milieu.

Les souches du groupe *P. fluorescens-putida* utilisaient plus les acides organiques (66 %), un peu moins les acides aminés (44 %) et peu les sucres (seulement 28 % des carbohydrates testés étaient utilisés) [33].

La croissance de *Pseudomonas spp.* fluorescents dans le milieu liquide au succinate (qui n'est pas supplémenté par le fer) a été accompagnée de l'excrétion du sidérophore qui a cessé pendant que la culture entrain dans la phase stationnaire. Aparna et al. [34] ont indiqué que la production de sidérophore par *P. fluorescens* commence après 6 heures de croissance et atteint la productivité maximum (96 %) après 24 h.

L'addition de Fe^{3+} au milieu de culture a presque doublé la croissance bactérienne mais la production de sidérophores est réprimée. Nos résultats sont similaires à ceux de Meyer et Abdallah [17] qui ont testé l'effet du fer sur la production de pyoverdine produite par *P. fluorescens*. Quand Fe^{3+} est inférieur à 200 μM , il y avait un rapport inverse entre la teneur en fer de milieu et la quantité de pigments synthétisés.

Un autre paramètre a été étudié, il s'agit du pH qui joue un rôle primordial dans la synthèse des sidérophores. Nos résultats ont montré que la variation de pH et l'apport ionique peuvent influencer la synthèse *in vitro* des sidérophores chez les souches de *Pseudomonas* testées.

La production de sidérophores est retardée lorsque le milieu est à pH = 5. En effet, l'acidification du milieu rend le fer plus soluble dans l'eau et donc plus facilement assimilable par la bactérie qu'en milieu basique. Ainsi, en milieu acide le stress ferrique auquel a été soumis *Pseudomonas spp.* fluorescents a diminué, sachant que les pH acides sont défavorables à la croissance bactérienne. Par contre, en milieu basique (pH = 10), où le fer ferrique est moins soluble, *Pseudomonas spp.* fluorescents subit un stress ferrique plus important, mais la croissance bactérienne qui préfère le pH neutre diminue ce qui influence le taux de production des sidérophores. L'optimum de pH pour la production de sidérophore s'est avéré égal à 7,0 dans lequel les bactéries se sont développées mieux et le fer se présente en forme insoluble et n'étaient pas donc disponibles aux bactéries [26].

Concernant le choix de la meilleure source de carbone pour favoriser la production des sidérophores, une bonne multiplication est observée sur le milieu MS additionné de fructose, suivi de glucose et en dernière position le maltose.

Nos résultats sont similaires avec celles de Sayyed et al. [35] ; Tailor et Joshi [36] et Pratama et al. [37] qui ont utilisés différents sucres à savoir, le glucose, le

saccharose, le mannitol, le lactose et la xylose pour tester le taux de production des sidérophores. Ils ont trouvé que les sucres utilisés ont un effet négatif sur la stimulation de la production de sidérophores, à l'exemple du glucose.

Habituellement, le glucose est oxydé en gluconate et 2-cétogluconate avant son entrée dans la cellule qui va entraîner une baisse de pH du milieu, et comme conséquence une diminution de la production des sidérophores. Par contre le fructose est assimilé par les *pseudomonas* en le transformant en fructose-6-P puis en fructose-1,6-biP. Alors que le maltose n'est jamais utilisé par les *Pseudomonas*, il n'a aucune influence ni sur la multiplication ni sur la production de sidérophores [5, 38].

L'activité antifongique exercée par les sidérophores produites par les différentes souches de *Pseudomonas* fluorescents à l'encontre de *Verticillium dahliae* a montré des taux d'inhibition qui s'étendent de 25 à 48 %. La variabilité dans les taux d'inhibition observée entre les souches, peut être expliquée par la quantité et la nature des sidérophores produites. Également le génome de la souche bactérienne peut influencer la réponse des souches envers un stress ferrique, les souches T27 et T49 identifiées comme étant *Pseudomonas fluorescens*, ont montré les meilleurs taux d'inhibition de l'ordre de 47,9 et 45,3 % respectivement. Les souches T23 et T33 viennent en deuxième position avec des taux d'inhibition 32,3 et 30,8 % respectivement. L'identification moléculaire de ces souches les a affiliées à l'espèce *Pseudomonas plecoglossicida* (T23) et *Pseudomonas chlororaphis* (T33). La souche T34 a montré le taux d'inhibition le plus faible (25,58 %), affiliée à l'espèce *Pseudomonas putida*. La souche de référence CHA0 a montré un taux d'inhibition de 28 %. Ceci dit qu'à l'exception de la souche T34, l'activité antifongique des souches autochtones de *Pseudomonas* dépassent largement celle de la souche de référence.

Les résultats obtenus sont similaires avec ceux de hernández-León [39], qui ont trouvé que le degré d'inhibition varié selon l'organisme étudié et le milieu utilisé. Ils ont utilisé deux milieux KB et PDA, ainsi que plusieurs microorganismes pathogènes citons *A. flavus* ; *A. niger* ; *A. oryzae* ; *F. oxysporum* et *S. rolfii* et ont trouvé que l'inhibition est plus importante sur milieu KB et ont conclu que ça pouvait être due au

niveau de diffusion de sidérophore/surnageant dans le milieu, mais Sayyed *et al.* [35] ont trouvé que la culture bactérienne est avérée plus efficace pour l'inhibition des champignons pathogènes que le surnageant, ce qui indique le rôle d'autres métabolites secondaires (antibiotiques et/ou toxines) dans l'inhibition comme le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), l'acide phénazine carboxylique (PCA), la pyrrolnitrine (PRN) et la pyolutéorine (PLT) qui sont probablement reliées à cette inhibition. Benjamin *et al.* [40] ont montré le rôle des sidérophores dans l'inhibition de la croissance de champignon phytopathogène *Alternaria alternata*.

Ces résultats sont prometteurs pour le développement de sidérophore ou les pseudomonads fluorescents comme agent de biocontrôle

La sensibilité de l'électrophorèse, nous a permis de confirmer la présence en sidérophores dans les surnageants des cultures bactériennes. La révélation par la solution de Blue de Coomassie, a permis d'obtenir des spots de mobilité relative similaire. L'intensité de cette couleur était variable d'un isolat à un autre.

Lorsque les cellules microbiennes perçoivent une carence en fer, l'expression des gènes codant les enzymes nécessaires à la synthèse et au transport des sidérophores est activée [41]. Sur notre gel on a révélé la présence d'une seule bande avec une forte intensité, au même niveau presque que la souche de référence CHA0 qui possède des sidérophores d'un poids moléculaire aux alentours de 1 kDa, dans notre cas 950 Da, ce qui est en accord avec la littérature qui confirme que les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire, 400 à 1 kDa avec une forte affinité pour le fer Fe^{3+} et permettent la nutrition en fer des microorganismes [41].

Les cinq surnageants des souches utilisées T23, T27, T33, T34 et T49 correspondent respectivement aux espèces *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas fluorescens* bv III, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas putida*, et *Pseudomonas fluorescens* bv II, *Pseudomonas fluorescens* bv I sont des espèces productrices des sidérophores de type pyoverdines (Pseudobactine). La fluorescence remarquable de ces derniers composés résulte d'un chromophore dans lequel est dérivé de 2,3-diamino-6,7-dihydroxy-quinoline, le composé est très riche en groupement OH, NH, cycles benzoïques, acide carboxylique COOH. Nous concluons que les résultats obtenus par

l'infrarouge de ces quatre extraits sont en accord avec la structure de ce composé, ce qui confirme la synthèse de ces souches aux sidérophores type hydroxamates et plus précisément la classe de pyoverdine.

7. Conclusion

Notre étude s'est basée sur la détection et l'identification d'un métabolite secondaire, les sidérophores, synthétisés par des souches de *Pseudomonas spp.* fluorescents isolées à partir de sol rhizosphérique de l'olivier ainsi que leurs capacités d'assimiler le fer dans les conditions de carence.

La meilleure synthèse de sidérophores a été révélée dans les milieux SSM, KB et CAA, considérés comme carencés en fer, à travers la production d'un pigment fluorescent diffusible dans le milieu. La variabilité de la couleur de la fluorescence ne dépend pas seulement de la structure moléculaire des pigments émis, mais aussi de l'environnement dans lequel ils sont produits.

Les pyoverdines produites par les espèces de *Pseudomonas* contiennent trois groupes fonctionnels (Hydroxamate, Catécholates et Carboxylate).

La sensibilité de l'électrophorèse, nous a permis de confirmer la présence des sidérophores dans les surnageants des cultures bactériennes. La révélation par la solution de Blue de Coomassie, a permis d'obtenir des spots de mobilité relativement similaire. L'intensité de cette couleur est variable d'un isolat à un autre, l'intensité la plus élevée a été observée chez les souches T23 et T34 et la souche de référence CHA0.

L'activité antifongique observée chez les souches autochtones de *Pseudomonas* est importante donc ces souches peuvent trouver leurs places dans le domaine de la lutte biologique.

Références

- [1] Chen J.W., Wang B.X., Lu Y.J., Guo Y.Q., Sun J.D., Wei B., Zhang H.W. and Wang h., Quorum sensing inhibitors from marine microorganisms and their synthetic derivatives. *Mar. Drugs* 17 (2) (2019): 80. <https://doi.org/10.3390/md17020080>
- [2] Budzikiewicz H., Siderophores from bacteria and from fungi. In Cornelis P. and Andrews C. 2010 (Eds), Iron uptake and homeostasis in microorganisms. Great Britain. (2010) 1-5.
- [3] Neilands. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *J. Biol. Chem.* vol. 270 (45) (1995): 26723–26726. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26723>
- [4] Renshaw J., Robson G., Trinci A., Wiebe M., Livens F., Collison D. And Taylor R., Fungal Siderophores: Structures, Functions and Applications. *Mycological Research*, 106 (10) (2002) 1123-1142. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006548>
- [5] Lemanceau A., Robin S. and Mazurier G. Vansuyt. Implication of Pyoverdines in the Interactions of Fluorescent *Pseudomonads* with Soil Microflora and Plant in the Rhizosphere. *Soil Biology*. 12 (2007): 166. https://doi.org/10.1007/978-3-540-71160-5_8
- [6] Raines D.J., Olga V.M., Elena V.B., Johan P.T., Keith S.W. and A.K. Duhme-Klair. Bacteria in an intense competition for iron: Key component of the *Campylobacter jejuni* iron uptake system scavenges enterobactin hydrolysis product. *PNAS*. Vol.113 (21) (2016): 5850–5855. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520829113>.
- [7] Patel D., C. Xu, Nagarajan S., Liu Z., Hemphill WO, Shi R.R., Uversky VN., Caldwell GA., Caldwell KA. and Witt SN., Alpha-synuclein inhibits Snx3-retromer-mediated retrograde recycling of iron transporters in *S. cerevisiae* and *C. elegans* models of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 27(9) (2018):1514-1532. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy059>
- [8] Leonard Fresenborg S., Graf J., Schätzle H. and Schleiff E., Iron homeostasis of cyanobacteria: advancements in siderophores and metal transporters. In book: *Advances in Cyanobacterial Biology*. 2020): 85-117. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819311-2.00007-3>
- [9] Vaulont S. and Schalk I., Rôles des sidérophores bactériens et de mammifères dans les interactions hôtes-pathogènes, *Med Sci (Paris)*, 31 (8-9) (2015) : 756–763. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153108014>
- [10] Verma P., Nath Yadav A., Kumar V., Pratap Singh D. and Kumar Saxena A., Beneficial Plant-Microbes Interactions: Biodiversity Microbes from Diverse Extreme Environments and Its Impact for Crop Improvement. *Microbial interactions and Agro-Ecological impacts*. 2 (2017) : 543-578. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6593-4_22
- [11] Digat et Gardan. Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida*. 17 (4) (1987): 559-568. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1987.tb00075.x>
- [12] has H., Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*. *Nat. Prod. Rep.* 31 (2014): 1266–1276. <https://doi.org/10.1039/C4NP00071D>
- [13] King E.O., Wark M.K. and Raney D.E., Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and chemical medicine*, 44 (2) (1954): 301- 307.
- [14] Benzina F., Sahir-Halouane F. and Hamed K., Algerian isolates of fluorescent *Pseudomonas spp.* as potential biological control against wilt pathogen (*Verticillium dahliae*). *Plant Omics journal* 9 (1) (2016) 48 -60. https://www.pomics.com/benzina_9_1_2016_48_60.pdf
- [15] Agrios G N., *Plant Pathology*. 5^{ème} Edition. Elsevier Academic Press. (2005) 903p.
- [16] Pérez-Miranda S., Cabirol N., George-Téllez R., Zamudio-Rivera L. S. and Fernández F.J., O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J. Microbiol. Methods*. 70 (2007): 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.023>
- [17] Meyer J.M. and Abdallah M.A., The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107(1978): 319-328. <https://doi.org/10.1099/00221287-107-2-319>
- [18] Neilands J. B., Iron absorption and transport in microorganisms. *Annu Rev Nutr.* 1(1981): 27 –46. [electronic version]] available on URL : <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.nu.01.070181.000331>
- [19] Arnow L.E., Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine tyrosine mixtures. *J. Biol. Chem.* 118 (1937): 531. Download available on <https://scholar.google.com/>

- [20] Shenker M., Oliver I., Helmann M., Hadar Y. and Chen Y., Utilization tomatoes of iron mediated by siderophore produced by *Rhizopus arrhizus*. *J. Plant Nutr.* 15 (1992): 2173–2182. <https://doi.org/10.1080/01904169209364466>
- [21] Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (1970): 680–683. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- [22] Blum U., Weed S.B. and Dalton B.R., Influence of various soil factors on the effects of ferulic acid on leaf expansion of cucumber seedlings. *Plant Soil.* 98 (1987):111-130. <https://doi.org/10.1007/BF02381732>
- [23] Maier G.P. and Butler A., Siderophores and mussel foot proteins: the role of catechol, cations and metal coordination in surface adhesion. *J. Biol. Inorg. Chem.* 22 (2017) 739–749. <https://doi.org/10.1007/s00775-017-1451-6>.
- [24] Bakker P.A.H.M., Van Peer R. and Schippers B., Specificity of siderophore receptors and biocontrol by *Pseudomonas spp.*. In: *Biological control of soil-borne plant pathogens*, Hornby D. (ed). CAB International, Wallingford. (1990) 131–142.
- [25] Rappily F., Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Inst. National de le Recherche Agronomique-* (1968)101 p.
- [26] Bholay A. D., Jadhav Priyanka U., Borkhataria B. V., Mayuri and Dhalkari V., Fluorescent *Pseudomonads* as Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Their Siderophore genesis, *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences.* 3 (1) (2012) : 27-32. Version électronique disponible sur URL : <http://www.iosrjournals.org/iosr-jpbs/pages/v3i1.html>
- [27] Bultreys A., Gheysen I., Wathélet B., Maraité H. and de Hoffmann E., high-performance liquid chromatography analyses of pyoverdin siderophores differentiate among phytopathogenic fluorescent *Pseudomonas* species. *Applied and Environmental Microbiology.* 69 (2) (2003) : 1143–1153. Version électronique disponible sur URL : <https://aem.asm.org/content/69/2/1143>
- [28] Das S., Sreeram P A. and Raychaudhuri A K., A method to quantitatively evaluate the hamaker constant using the jump-into-contact effect in atomic force microscopy. *Nanotechnology.* 18 (3) (2007): 5501. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/3/035501>
- [29] Mezaache-Aichour S., Haichour N., Guechi A. and Zerroug M., Telluric *Pseudomonads* metabolites involved in the antagonism to phytopathogenic fungi. *Global J Biol Agri Heath Sci.*3(1) (2014) :71-77. Version électronique disponible sur URL : <https://www.longdom.org/archive/gjbaahs-volume-3-issue-1-year-2014.html>
- [30] Hofmann M., Heine T., Schulz V., Hofmann S. and Tischler D., Draft genomes and initial characterization of siderophore producing pseudomonads isolated from mine dump and mine drainage. *Biotechnology reports.* 25 (2020) (e00403). <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00403>
- [31] D. de Villegas P., Villa A. Frías. Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa*. *PSS.* 44 (3-4) (2002) : 112-117. Version électronique disponible sur URL : https://www.medigraphic.com/pdfs/lamico/mi-2002/mi02-3_4b.pdf
- [32] Cézard C., Farvacques N. and Sonnet P., Chemistry and biology of pyoverdines, *Pseudomonas* primary siderophores. *Curr Med Chem.* 22 (2) (2015): 165–186. <https://doi.org/10.2174/0929867321666141011194624>
- [33] Bossis E., Lemanceau P., Latour X. and Gardan L., The taxonomy o *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* 20 (1) (2000): 51-63. <https://doi.org/10.1051/agro:2000112>
- [34] Tailor A.J., Joshi B.H., Bhakta C.G. and Vidyannagar G., Characterization and optimization of siderophore production from *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from sugarcane rhizosphere. *J Environ Res Dev.* 6 (3A) (2012): 688-694.
- [35] Sayyed R.Z., Badgujar M. D., Sonawane H. M., Mhaske M. M. and Chincholkar S. B., Production of microbial iron chelators (siderophores) by fluorescent pseudomonads. *Indian Journal of Biotechnology.* 4 (2005): 484-490. <http://hdl.handle.net/123456789/5776>
- [36] Pratama I., Advinda L. and Fifendy M., The influence of carbon sources on the production of siderophores from the fluorescent pseudomonad bacteria. *Bioscience* 2 (2) (2018): 50-57. <https://doi.org/10.24036/020182210406-0-00>
- [37] Malcom G. P., The Role of Iron and Siderophores in Infection, and the Development of Siderophore Antibiotics. *Clinical Infectious Diseases.* 69 (Suppl. 7) (2019): 529-537. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz825>
- [38] Hernández-León R., Rojas-Solís D., Contreras-Pérez M., M. Orozco-Mosqueda del. C., Macías-Rodríguez L.I. and Reyes-de la Cruz H., Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol Control,* 81(2015): 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.011>
- [39] Voß B., Kirschhöfer F., Brenner-Weiß G. and Fische R. *Alternaria alternata* uses two siderophore systems for iron acquisition. *Scientific Reports.* 10(2019):3587. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60468-7>.
- [40] Saha M., Sarkar S., Sarkar B., Sharma B., Bhattacharjee S. and Tribedi P., Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23(2016) 3984–3999.
- [41] Berdja R., Abderrahmane O., Benchabane M. et Ammad F., Analyse de sensibilité d'un modèle de chélation de fer appliquée à une souche phytobénéfiques de *Pseudomonas fluorescens*. *Agrobiologia.* 8 (1) (2019) : 765-774. Disponible sur URL : <http://agrobiologia.net/online/?s=Berdja>