

Université de Montréal

**Inhibition du pathogène des salmonidés
Saprolegnia parasitica par des bactéries
aquatiques**

par

Vincent Domingue Gauthier

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

Mars, 2013

© Vincent Domingue Gauthier, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Inhibition du pathogène des salmonidés *Saprolegnia parasitica* par des bactéries
aquatiques

Présenté par :
Vincent Domingue Gauthier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. France Daigle, présidente-rapporteuse
Dr. Pierre Belhumeur, directeur de recherche
Dr. Grant Vandenberg, co-directeur
Dr. Éric Déziel, co-directeur
Dr. Marc Drolet, membre du jury

Résumé

Les maladies constituent présentement la cause la plus importante de perte économique en aquaculture moderne. Chez certaines espèces, notamment les salmonidés (*Oncorhynchus* sp. et *Salmo* sp.), on rapporte des pertes annuelles atteignant cinquante pour cent de la production. À l'heure actuelle, les infections fongiques occupent le second rang derrière les maladies bactériennes en fonction de leur importance économique. Ces poissons sont particulièrement vulnérables à une infection fongique causée par *Saprolegnia* sp. qui infecte habituellement les œufs morts. Le saprophyte ubiquitaire se propage ensuite aux œufs sains et aux individus matures. Malheureusement, le traitement efficace de cette infection, souvent primaire et parfois secondaire, est de plus en plus difficile en raison de nouvelles réglementations restrictives entourant le vert de malachite. Jadis, ce colorant constituait le fongicide le plus efficace dans la lutte contre la saprolégniose, mais son potentiel cancérigène en limite maintenant l'utilisation. Jusqu'à présent, aucun traitement disponible n'est aussi efficace que le vert de malachite pour le contrôle de la saprolégniose. Récemment, nous sommes parvenus à isoler trois bactéries capables d'inhiber la croissance de *Saprolegnia* sp. *in vitro*. Ces trois *Pseudomonas fluorescens* proviennent d'une pisciculture dans laquelle survenaient des cas d'infections à *Saprolegnia parasitica*. En poussant la caractérisation de l'activité grâce à des analyses de chromatographie liquide haute performance et de spectrométrie de masse, nous avons réussi à isoler et à identifier la molécule responsable. L'acide phénazine-1-carboxylique (PCA), sécrété par deux de nos trois souches, cause l'inhibition de la croissance de *Saprolegnia*.

Mots-clés : *Saprolegnia*, Saprolégniose, *Pseudomonas fluorescens*, Phénazine, Acide phénazine-1-carboxylique (PCA)

Abstract

Disease is the single largest cause of economic losses in aquaculture, and fungal infections are second only to bacterial diseases in economic importance. Fifty percent per year losses due to fungal infections have been reported in a number of species including salmonids, (*Oncorhynchus* sp., *Salmo* sp.) which are particularly susceptible to *Saprolegnia* sp. The ubiquitous saprophyte commonly infects dead fish eggs and spreads to healthy eggs and fry resulting in a deadly, usually secondary, infection. The ability to effectively treat fungal infections has become increasingly difficult with the accrual of restrictions on the use of the most effective fungicide available, namely malachite green due to concerns regarding its carcinogenicity. Hitherto, no new treatment as effective as malachite green has been available to fish farmers. Recently, we have isolated three *Pseudomonas fluorescens* bacterial strains, from a *Saprolegnia parasitica*-infected fish farm, adept at the inhibition of the growth of this oomycete *in vitro*. The inhibitory activity was found to be present in the culture supernatant of the three strains. Further characterization by high performance liquid chromatography and mass spectrometry has been performed to identify the nature of the inhibition. Phenazine-1-carboxylic acid (PCA), produced by two of the three isolates, was found to be able of inhibiting the growth of *Saprolegnia*. The causal factor producing inhibition for the third isolate remains a mystery.

Keywords : *Saprolegnia*, Saprolegniasis, *Pseudomonas fluorescens*, Phenazine, Phenazine-1-carboxylic acid

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations	xi
Remerciements	xii
Chapitre 1 : Introduction	
1.1 Saprologniose	1
1.1.1 Importance historique et économique	2
1.1.2 Taxonomie	3
1.1.3 Cycle de développement	5
1.1.4 L'infection	6
1.1.5 Évolution de la maladie et défenses du poisson	8
1.1.6 Facteurs prédisposants	8
1.1.7 Vert de malachite	9
1.1.8 Autres traitements	11
1.2 Biocontrôle	14
1.2.1 Mécanismes du biocontrôle	16
1.2.1.1 Sidérophores	16
1.2.1.2 Antibiotiques	17
1.2.1.3 Autres mécanismes	18
1.3 <i>Pseudomonas</i>	19
1.3.1 Taxonomie	20
1.3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22

1.3.3 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	22
1.3.4 « Quorum sensing »	24
1.3.4.1 Plusieurs systèmes de « quorum sensing » chez les <i>Pseudomonas</i>	25
1.3.5 Le système à deux composantes GacA/GacS	25
1.3.6 Les métabolites secondaires et facteurs extracellulaires produits par les <i>Pseudomonas</i>	27
1.3.6.1 La mupirocine	28
1.3.6.2 La pyolutéorine	28
1.3.6.3 La pyrrolnitrine	29
1.3.6.4 Le 2,4-diacétylphloroglucinol	29
1.3.6.5 Les rhamnolipides	30
1.3.6.6 Autres biosurfactants	30
1.3.6.7 Les pyoverdines	31
1.3.6.8 Les phénazines	33
1.3.6.9 L'acide phénazine-1-carboxylique	36
1.4 But et hypothèse	40

Chapitre 2 : Matériel et méthode

2.1 Milieux de culture utilisés	41
2.1.1 Souches et plasmides utilisés	44
2.2 Conservation de <i>Saprolegnia parasitica</i>	45
2.2.1 Sporulation de <i>Saprolegnia parasitica</i>	45
2.3 Amplifications en chaîne par polymérase (ACP), électrophorèse et amorces utilisées	46
2.3.1 Conditions pour la détection de gènes impliqués dans la synthèse du 2,4-diacétylphloroglucinol	47
2.3.2 Conditions pour l'identification de <i>Saprolegnia parasitica</i>	47
2.3.3 Conditions pour l'identification de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	48

2.4 Test pour la détection de l'activité anti- <i>Saprolegnia</i> en gélose (spot test)	48
2.4.1 Test pour la détection de l'activité anti- <i>Saprolegnia</i> en milieu liquide	49
2.5 Tentative d'association de l'activité anti- <i>Saprolegnia</i> à des activités microbiennes connues	50
2.5.1 Production de cyanure d'hydrogène	51
2.5.2 Chromatographie sur couche mince (ccm)	51
2.6 Extraction de l'activité anti- <i>Saprolegnia</i>	52
2.7 Fractionnement et comparaison des extraits de culture bactérienne pour l'identification de l'activité anti- <i>Saprolegnia</i>	53
2.8 Détection et quantification de l'acide phénazine-1-carboxylique par HPLC	54
2.8.1 Spectrométrie de masse pour la confirmation du composé identifié comme étant l'acide phénazine-1-carboxylique	55
2.9 Mutagenèse chimique des bactéries	55
2.9.1 Création d'une banque de l'ADN génomique muté	56
2.9.2 Préparation du vecteur (pRS44)	57
2.9.2.1 Extraction du plasmide par phénol acide	57
2.9.2.2 Digestion par BamHI	59
2.9.2.3 Traitement à la phosphatase alcaline	59
2.9.3 Isolation et purification de l'ADN à être cloné	59
2.9.3.1 Extraction de l'ADN génomique	60
2.9.3.2 Digestion par Sau3AI	61
2.9.3.3 Ligation des fragments d'ADNg dans pRS44	61
2.9.4 Introduction de la banque d'ADNg dans <i>E. coli</i> EPI300	62
2.9.5 Transfert de la banque vers <i>E. coli</i> S17-1	64
2.9.6 Insertion du gène <i>trfA</i> pour le transfert de la banque d'ADNg	65
2.9.7 Conjugation entre le donneur <i>E. coli</i> S17-1 et la souche sauvage <i>Pseudomonas fluorescens</i> C5 (<i>trfA</i> +)	66

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Trois isolats capables d'inhiber la croissance de <i>Saprolegnia parasitica</i>	67
3.2 L'inhibition se retrouve dans le surnageant de culture	68
3.3 Les trois isolats appartiennent au groupe des <i>Pseudomonas fluorescens</i>	70
3.4 Méthode en microplaque 96 puits	72
3.5 Le pH, la carence en fer, le 2,4-DAPG et le HCN ne sont pas responsable de l'activité anti- <i>Saprolegnia</i> exprimée par les souches sélectionnées	73
3.6 Isolement de mutants surproduisant l'activité anti- <i>Saprolegnia</i>	79
3.7 Responsable : l'acide phénazine-1-carboxylique	84
3.8 Quantification de l'activité et de la production de PCA	91

Chapitre 4 : Discussion et perspectives

4.1 Collection des isolats	94
4.2 Variation et optimisation de la production de PCA	95
4.3 Suivi sur la mutagenèse	97
4.4 Le PCA	99
4.5 La souche 2149	100
4.6 Applications possibles	102

Bibliographie	104
----------------------	-----

Annexe I : Interfaces HPLC	xiii
-----------------------------------	------

Annexe II : Protocoles détaillés	xvi
---	-----

Liste des tableaux

Tableau I.	Liste de facteurs prédisposant au développement d'une saprolégniose	9
Tableau II.	Valeurs pour la quantification relative du PCA par intégration présent dans les surnageants de cultures	92

Liste des figures

Figure 1.	Cycle de vie de <i>Saprolegnia</i>	6
Figure 2.	Cycle de développement d'un poisson	7
Figure 3.	Les trois formes du vert de malachite	11
Figure 4.	Structure de certains des principaux facteurs extracellulaires produits par <i>P. fluorescens</i>	32
Figure 5.	Phénazine et composés dérivés	35
Figure 6.	Carte génétique de l'opéron <i>phz</i> chez <i>Pseudomonas fluorescens</i>	36
Figure 7.	Voie de biosynthèse du PCA et de ses intermédiaires chez <i>P. fluorescens</i>	39
Figure 8.	Criblage initial pour l'inhibition de <i>Saprolegnia parasitica</i>	67
Figure 9.	Inhibition de <i>Saprolegnia</i> par trois colonies bactériennes sur gélose	68
Figure 10.	Test du surnageant de trois isolats possiblement inhibiteurs de <i>Saprolegnia</i>	69
Figure 11.	Évaluation de la croissance de <i>Saprolegnia</i> par spectrophotométrie à différentes densités	73
Figure 12.	Effet du pH sur la croissance de <i>Saprolegnia</i>	74
Figure 13.	Effet du fer (FeCl ₃) sur la croissance de <i>Saprolegnia</i> lorsqu'ajouté (A) à la culture bactérienne ou (B) ajouté au surnageant stérile	76

- Figure 14.** Électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'ACP provenant de l'ADN génomique de nos souches *Pseudomonas fluorescens* C5, C8 et 2149 amplifié avec les amorces phl2a et phl2b 78
- Figure 15.** Comparaison entre le surnageant de la souche sauvage et des meilleurs mutants surproducteurs de l'activité anti-*Saprolegnia* 81
- Figure 16.** Morphologie coloniale de la souche C5 et du mutant C5-33 sur gélose GY 82
- Figure 17.** Motilité des souches C5, C5-10 et C5-33 sur gélose GY, Swarm et Swim 82
- Figure 18.** Effet des fractions, récoltées après séparation au HPLC, provenant des isolats C5 (A) et 2149 (B) sur la croissance de *Saprolegnia* mesuré par densité optique 85
- Figure 19.** Fragmentogramme (A) d'un extrait de la souche sauvage C5 (haut) et du mutant C5-33 (bas) montrant la présence du m/z 225. Chromatogramme (B) SIM (Single ion monitoring). Ce chromatogramme est reconstruit uniquement avec le m/z 225. L'aire sous la courbe indique que C5-33 produit plus de 225 que C5 87
- Figure 20.** Maximums d'absorptions du surnageant de la souche sauvage C5 au HPLC 88
- Figure 21.** Spectrophotogramme de l'échantillon récolté au HPLC et de l'acide phénazine-1-carboxylique pur 89
- Figure 22.** Spectrophotogramme montrant les ions fils (206 et 178) d'une fraction d'un échantillon de surnageant récolté au HPLC (A) et de l'acide phénazine-1-carboxylique pur (B) 90

- Figure 23.** Détermination de la concentration minimale inhibitrice du PCA sur *Saprolegnia parasitica* 91
- Figure 24.** Vérification de la quantification du PCA par l'évaluation de la croissance de *Saprolegnia parasitica* 93
- Figure 25.** Interface du système de chromatographie liquide haute performance (Waters 2795 Alliance HT separation) utilisé pour le fractionnement xiii
- Figure 26.** Interface du spectromètre de masse (Quattro Premier XE Micromass R MS Technologies) pour la fragmentation de l'acide phénazine-1-carboxylique xiv
- Figure 27.** Interface du système de chromatographie liquide haute performance (Beckman-Coulter-HPLC Gold system) utilisé pour la détection et la quantification de l'acide phénazine-1-carboxylique xv

Liste des sigles et des abréviations

2,4-DAPG	2,4-diacétylphloroglucinol
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
ACP	Amplification en chaîne par polymérase
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	« American Type Culture Collection »
BSA	Albumine provenant de sérum bovin
CCM	Chromatographie sur couche mince
CTAB	Bromure d'hexadécyltriméthylammonium
DL 50	Dose létale pour 50 % de la population
dNTP	Déoxynucléotide triphosphate
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EMS	Méthanesulfonate d'éthyle
FMN	Flavine mononucléotide
FMNH₂	Flavine mononucléotide, forme réduite
GY	Glucose et extrait de levure
HSL	Homosérine lactone
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
MSM	Milieu de sporulation modifié
PB/KB	Paire de bases / kilobase
PCA	Acide phénazine-1-carboxylique
PGPR	« Plant growth promoting rhizobacteria »
PIA	<i>Pseudomonas</i> isolation agar
RPM	Révolution par minute
Rf	Rapport frontal
TAE	Tris, acide éthylène diamine tétraacétique et acide acétique
TE	Tris et acide éthylène diamine tétraacétique
TEG	Tris, acide éthylène diamine tétraacétique et glucose
UV	Ultraviolet

Remerciements

Je dois avant tout remercier mon directeur de recherche, le Dr Pierre Belhumeur, puisqu'il est l'investigateur principal du projet *Saprolegnia*. Grâce à lui, j'ai pu continuer mon apprentissage de la microbiologie dans un environnement stimulant tout en travaillant avec des bactéries, champignons et levures. Le Dr Belhumeur m'a également permis d'entrer en contact avec le Réseau Aquaculture Québec (RAQ) pour parfaire mes connaissances et participer à certains congrès dans le domaine de l'aquaculture.

Au sein du RAQ, je remercie particulièrement un de mes codirecteurs, le Dr Grant Vandenberg pour le partage de son savoir sur les poissons et l'aquaculture en plus du passage de l'isolat *Saprolegnia* sp. utilisé dans notre laboratoire. De plus, je tiens à remercier mon troisième codirecteur, le Dr Éric Déziel, de m'avoir transmis une fraction de son savoir concernant *Pseudomonas* et les métabolites secondaires. Merci aussi à Marie-Christine Groleau et Valérie Dekimpe pour le partage de leur expertise en spectrométrie de masse, en HPLC et sur les biosurfactants. Je me dois de mentionner la remarquable disponibilité des membres de cette équipe tout au long de mes études.

Pour sa présence constante au laboratoire, ses connaissances de la microbiologie et de la chimie, son aide avec les appareils analytiques de notre département et plusieurs heures de discussions constructives, je remercie Martin Clément. Aussi au laboratoire, je dois remercier Étienne Blais, notre stagiaire, pour son aide indispensable sur plusieurs manipulations.

Ce point final apposé à deux années de travail au sein du département de microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal n'aurait pas été envisageable sans le soutien et l'expérience de mon entourage. Je ne peux passer sous silence la contribution de mes parents, qui m'ont toujours encouragé dans la poursuite de mes études, ainsi que pour toutes les raisons imaginables.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Saprologniose

Les termes moisissures aquatiques ou champignons aquatiques englobent, d'une manière un peu simpliste, les organismes du phylum des oomycètes capables de vivre dans l'eau. Ce phylum provient du règne des Chromista, ce qui rend l'utilisation de l'appellation moisissure trompeuse. Cette dénomination est issue de la ressemblance entre les oomycètes et les mycètes. Le terme sera quand même employé pour différencier les oomycètes aquatiques du reste du phylum. Ces moisissures sont ubiquitaires dans les écosystèmes d'eau douce et se nourrissent, par absorption, de matière organique (224). Une famille d'oomycètes, celle des *saprolegniaceae*, contient plusieurs pathogènes à fort impact pour la vie aquatique (269). Les genres *Saprolegnia*, *Aphanomyces* et *Achlya* sont particulièrement infectieux pour les crustacés, amphibiens, mollusques et poissons (201). Le reste de cet ouvrage concerne le genre *Saprolegnia*, puisqu'il est le plus souvent isolé d'un animal souffrant de saprologniose (269). Chez les poissons, les salmonidés apparaissent comme une famille plus vulnérable à l'infection (260). Des cas d'infections ont aussi été rapportés chez l'achigan (189), le brochet (287), la carpe, la lamproie, l'esturgeon, le mulot, le tilapia, le barramundi, l'orfe (33), le poisson-chat (106) et d'autres (221). La saprologniose affecte également des poissons plus tropicaux comme l'espadon, les guppys, le platyfish et le gourami embrasseur (221 et 289).

Historiquement, les moisissures impliquées dans la saprologniose n'ont pas été considérées comme des pathogènes véritables ou même comme des parasites primaires (180). Le spectre nutritionnel plutôt opportuniste des *Saprolegniaceae*, connus comme saprotrophes vont dans cette direction (33). En même temps, Huxley et Stirling proposent que *Saprolegnia* puisse agir comme pathogène sans l'aide d'une bactérie, *Bacillus salmonis pestis*, pour endommager les tissus du poisson (113 et 248). D'autres travaux démontrent que certains

isolats de *Saprolegnia*, les plus virulents, peuvent établir une infection chez un individu sain (infection primaire) (184 et 280). Le consensus actuel propose que la saprolégniose constitue généralement une infection secondaire (infecte un individu déjà affaibli par une première infection) qui, dans des circonstances propices, peut causer une infection primaire.

1.1.1 Importance historique et économique

La saprolégniose n'est certes pas un phénomène récent puisque, dès 1877, on rapporte un trouble appelé « salmon disease » dans les rivières d'Angleterre, d'Écosse et s'étendant jusqu'au Royaume-Uni. Le saumon sauvage se voyait alors affecté par une infection épizootique particulièrement agressive. Huxley et Stirling attribuèrent l'infection à un oomycète du nom de *Saprolegnia ferax* tandis que Rutherford et Hume impliquèrent plutôt une bactérie. De manière rétrospective, on sait désormais que le « salmon disease » était en fait un cas de nécrose dermique ulcéreuse (UDN) qui a permis l'éclosion d'une épidémie de saprolégniose secondaire (291). Plus récemment, plusieurs cas de véritable saprolégniose ont été rapportés sur des salmonidés sauvages ou en aquaculture (33, 100, 185, 269 et 263).

Au cours du siècle passé, l'alimentation mondiale dépendait en grande partie des pêches océaniques et des élevages bovins. Par contre, il semble que ces deux modes d'exploitation s'avèrent incapables de répondre à la demande mondiale croissante (269). En 2003, l'aquaculture comptait pour plus de 30 % de la production mondiale de poisson destiné à la consommation humaine (58). Il est envisageable de voir l'aquaculture conserver ou augmenter sa place au sein de l'industrie alimentaire. Une production accrue nécessitera vraisemblablement un accroissement de la surface exploitée ou un meilleur rendement de ces surfaces. Une réduction des pertes par mortalité animale constitue donc une solution fort

prometteuse pour l'industrie piscicole. En effet, la plus grande perte pécuniaire en aquaculture demeure la maladie (269). De ces maladies, les oomycètes occupent la seconde position en terme d'impact sur l'industrie derrière les bactéries (172). Aux États-Unis en 1999, on déplorait des pertes allant jusqu'à 40 millions de dollars par an (33) alors qu'au Japon, on rapportait en 1980 des mortalités annuelles atteignant les 50 % chez l'anguille et le saumon de coho, causées exclusivement par *Saprolegnia parasitica* (185).

1.1.2 Taxonomie

La taxonomie, au sens de la construction d'une classification, a toujours été un problème pour la famille des *Saprolegniaceae*. Cette dernière, très importante chez les oomycètes, a commencé à être sérieusement étudiée au cours du 19^e siècle. Anciennement membre du royaume des Fungi, les oomycètes appartiennent à présent au royaume des Chromista. Les *Saprolegniaceae*, famille d'organismes filamenteux et coenocytiques, se retrouvent dans les sols humides ou l'eau fraîche. Ils se nourrissent de matière organique morte (saprophyte) ou en parasite tuant certaines cellules de l'hôte pour en absorber les nutriments (nécrotrophe).

Il va sans dire qu'une bonne connaissance de la morphologie et du cycle vital des *Saprolegniaceae* est capitale afin de comprendre la taxonomie et les problèmes de classification de cette famille dont la reproduction asexuée se fait par des zoospores unicellulaires et biflagellées. Ces spores sont produites par un sporange en position terminale séparé des hyphes par un septum basal. Les zoospores apparaissent habituellement comme diplanétiques et dimorphiques. En effet, il existe deux stades, avec des caractéristiques différentes, durant lesquels les zoospores sont capables de mouvement par natation. Les zoospores primaires ont une forme piriforme avec flagelles apicaux tandis que les secondaires sont

réniformes, avec flagelles latéraux (216). De plus, soit l'un ou soit les deux stades motiles peuvent être réprimés ou atténués chez certains genres de la famille. Les deux types de zoospores s'enkystent, parfois dès la libération ou alors après une période de motilité d'une durée plus ou moins bien déterminée. Les kystes primaires germent et propagent les zoospores secondaires dont certaines possèdent des groupes de longs cheveux/poils avec des crochets tandis que d'autres isolats n'ont que de courts cheveux/poils isolés avec des petits crochets (19).

Historiquement, la classification des *Saprolegniaceae* commence avec les travaux de William Chambers Coker qui constituent désormais une base pour le travail sur les champignons aquatiques (48). La description que Coker fait de *S. parasitica* se lit : « tout parasite du genre *Saprolegnia*, isolé de poisson, qui est asexué ». Cette description pose rapidement problème puisque l'identification se fait habituellement par les caractéristiques sexuelles observables sur les anthéridies, les oogones et les oospores (176). Au début des années 2000, Johnson et al. mettent à jour la taxonomie des *Saprolegniaceae* en énumérant 17 genres et 122 espèces (119). Leurs travaux mentionnent qu'une révision est nécessaire à cause d'un chevauchement dans les espèces. La difficulté d'observer les structures sexuelles en condition de laboratoire contribue au problème de la différenciation entre les espèces (60, 124, 176 et 249). On considère parfois des caractères asexués qui permettent d'aller plus loin dans l'identification, notamment les poils crochus de *S. parasitica* (249).

La biologie moléculaire joue un rôle important dans l'identification des organismes et les champignons aquatiques n'échappent pas cette la règle. Deux régions codant pour de l'ARN ribosomal génèrent un intérêt particulier pour les espèces du genre *Saprolegnia* (124 et 247). Une séquence du gène 18S de l'ARNr et une autre région comprenant l'ITS (internal transcribed spacer) avec le gène 5.8S permettent de faire la distinction entre les espèces.

1.1.3 Cycle de développement

Le cycle vital des moisissures aquatiques comme *Saprolegnia* est complexe puisqu'il comprend la reproduction sexuée et asexuée (Fig. 1). Le côté sexué implique la production d'anthéridies (gamètes mâles) et d'oogones (gamètes femelles) qui s'unissent pour le processus de fécondation. Le stade asexué, plus important pour la colonisation d'un milieu aquatique, produit des spores motiles qui sont relâchées par un sporange à l'extrémité d'un hyphe. Les zoospores primaires sont mobiles durant quelques minutes avant de s'enkyster pour germer et devenir une spore secondaire (235). Bien que ces spores primaires possèdent la capacité de germer en mycélium, leur motilité de courte durée ne favorise pas cet événement. Les zoospores secondaires, motiles pour une période de temps plus longue, sont donc considérées comme la principale phase de dispersion de *Saprolegnia* (20). Ces zoospores secondaires peuvent toujours s'enkyster, même après la première germination, pour tenter de trouver un substrat propice à leur croissance (19). Cette faculté confère une plus grande chance de survie aux zoospores secondaires et se nomme polyplanétisme.

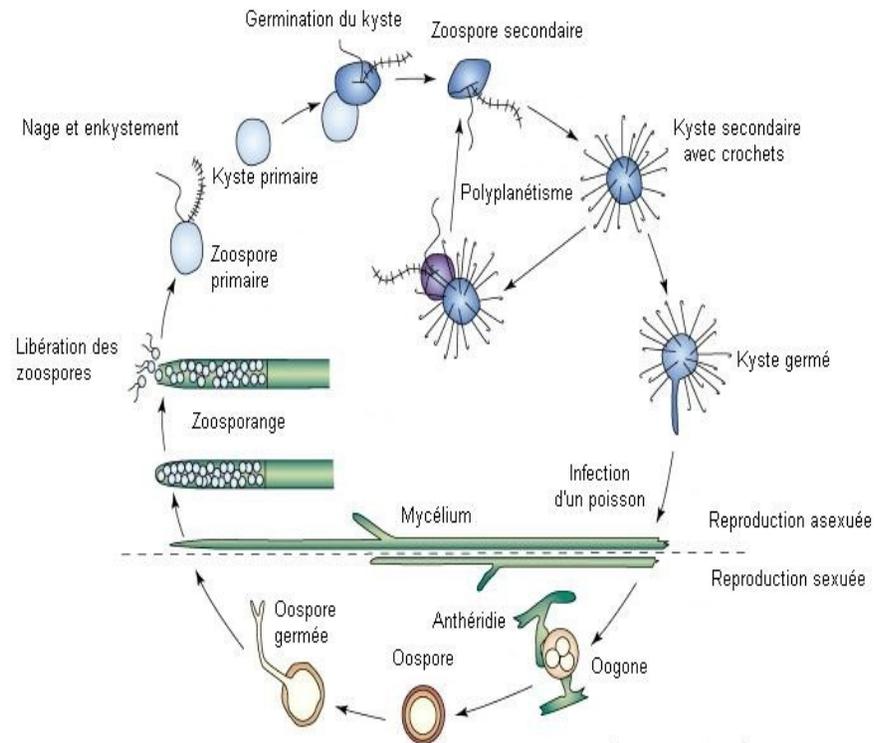


Figure 1 : Cycle de vie de *Saprolegnia* (modifié de Phillips *et al.*, 2008).

1.1.4 L'infection

Le pathogène étant ubiquitaire en milieu aquatique, l'exposition y est donc constante. En effet, il est possible de développer l'infection à tous les stades (Fig. 2) de la vie du poisson (204). Ainsi, le parasite s'accroche facilement aux œufs morts et réussit à s'en nourrir (209). On voit alors apparaître une épaisse couche de mycélium qui pénètre la membrane des œufs et se propage vers les œufs morts ou sains (289). Un phénomène de chimiotaxie positive aiderait la propagation du mycélium vers d'autres œufs. La mort serait causée par suffocation puisque le parasite enrobe les œufs, ce qui diminue leur accès à l'oxygène (33). L'infection est facilement repérable à l'œil à cause du tapis de mycélium recouvrant les œufs.

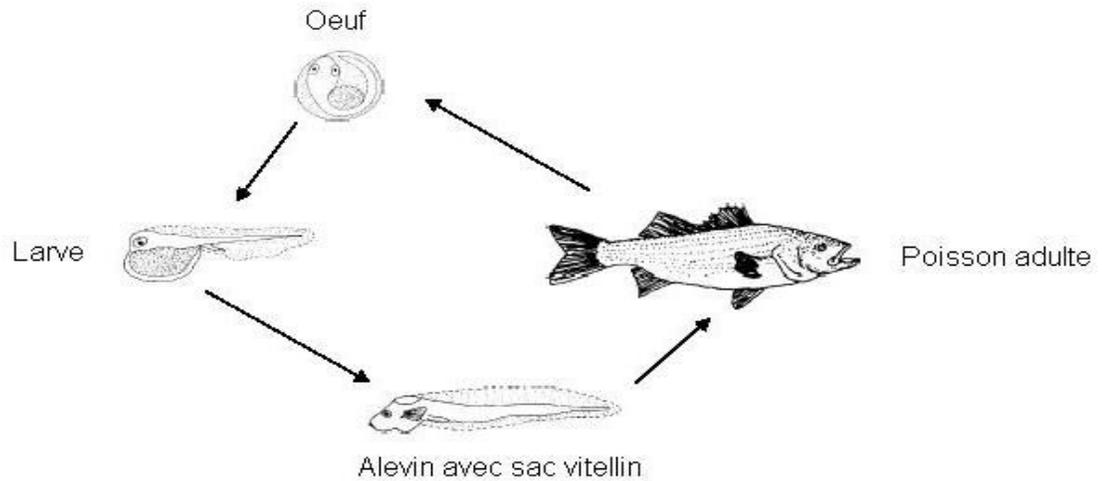


Figure 2 : Cycle de développement d'un poisson (modifié de Pêches et Océans Canada, 2012).

L'infection se présente d'une manière différente chez les alevins. Durant les premières alimentations, les jeunes ont tendance à ne pas différencier la nourriture saine des autres résidus dans l'eau. Ces derniers étant souvent contaminés par des spores, ils propagent l'infection des œufs vers les alevins. Par conséquent, le champignon croît dans le sac vitellin et le système digestif du poisson. La croissance du parasite provoque alors une distension du sac en plus d'un blanchiment important (222). L'infection se propage finalement à l'extérieur du corps et s'en suit la mort de l'alevin qui finira recouvert de mycélium.

Chez les poissons dont le stade de développement est plus avancé, *Saprolegnia* envahit les tissus de l'épiderme, souvent au niveau de la tête ou des nageoires (185). Ce phénomène se caractérise par l'apparition de touffes blanches ou grises à la surface du corps. Le mycélium prend une apparence semblable au coton en se propageant de manière circulaire, en croissant ou en spirale (204). Pickering et Willoughby ont suggéré que certaines différences existeraient entre l'infection d'un poisson sauvage et celle d'un poisson d'élevage (204).

1.1.5 Évolution de la maladie et défenses du poisson

Saprolegnia affecte les tissus recouverts de mycélium et occasionne une perte d'intégrité de l'épithélium (34). Les hyphes pénètrent la membrane basale et provoquent une nécrose cellulaire ainsi que des dommages au derme et à l'épiderme (204). *Saprolegnia* semble incapable de causer une infection systémique ou de produire des toxines (185). Au stade précédant la mort des poissons, la guérison est rare et ils adoptent un comportement léthargique en plus de subir des pertes d'équilibre (34). Ces attaques mènent à la mort par des problèmes de régulation osmotique et d'hémodilution (101).

Dans un environnement sain, la saprolégniose peut être combattue par les défenses naturelles des poissons. En premier lieu, les spores attachées à l'épiderme peuvent être délogées par le renouvellement de la couche de mucus. Ce même mucus contient un morphogène capable d'inhiber la croissance des spores, mais sans les tuer. En dernier recours, une réponse cellulaire visant le mycélium en croissance est activée dans le mucus (288). Des lymphocytes et neutrophiles s'attachent au champignon et le lysent de l'intérieur (292). Le mucus recouvrant l'épiderme agit donc comme barrière physique à l'infection et s'avère essentiel à la bonne santé de l'animal même s'il n'élimine pas 100 % des spores (182). Toutefois, un épiderme intact reste la meilleure défense contre la saprolégniose (101 et 202)

1.1.6 Facteurs prédisposants

L'oomycète étant présent en permanence dans l'eau, des facteurs prédisposants doivent jouer un rôle clé au début de l'infection. Chez les salmonidés, l'état physiologique de l'animal détermine si l'infection fongique pourra s'établir et envahir l'épiderme (184). Les poissons stressés ou ceux dont le

Le système immunitaire est affaibli sont généralement les premiers à développer une saprolégniose (202). Neish postule qu'un changement, voir le tableau I pour certain de ces changements, permet à des organismes normalement non pathogènes, comme *Saprolegnia*, de devenir une réelle menace pour le poisson (185). Il existe plusieurs facteurs répertoriés affectant l'état de santé général du poisson et qui facilitent le développement d'une saprolégniose.

Tableau I : Liste de facteurs prédisposants au développement d'une saprolégniose.

Facteur	Référence
Géniteurs	172
Surpopulation du bassin	20
Intégrité de l'épithélium	101
Manipulation du poisson	101
Erreur humaine	172
Autres pathogènes et parasites	172
Activité physique au bas du bassin	203
Pollution	242
Maturation sexuelle	184
Qualité de l'eau (pH, oxygène, autres)	202
Changement de température	106
Métabolisme hormonal élevé	182
Température trop froide	289

1.1.7 Vert de malachite

Le vert de malachite est un composé pouvant servir de colorant alimentaire, de désinfectant médical, d'agent antiparasite et de colorant dans l'industrie du textile, du papier et de l'acrylique (53). Il est aussi très efficace pour traiter ou prévenir plusieurs maladies, internes ou externes, affectant les poissons et leur

progéniture (104). Au début des années 2000, le vert de malachite a été identifié comme étant le fongicide le plus efficace parmi quarante-neuf composés anti-oomycètes. (40). Le traitement consiste à exposer les poissons à une dose variant entre 0.25 mg/L et 5 mg/L. Il existe plusieurs méthodes d'exposition qui consistent souvent en bains de courte durée ou en ajouts directs de vert de malachite dans le système de circulation d'eau du bassin d'élevage (290). L'exposition au remède produit des effets secondaires chez le poisson, ce qui a engendré un questionnement quant à la toxicité du vert de malachite. Bien que le temps d'exposition, la dose, le pH, la température, le pourcentage d'oxygène dissous dans l'eau ainsi que sa dureté influencent la DL50, il est néanmoins possible de tirer des conclusions (232, 240 et 88). En effet, le vert de malachite cause des mutations dans l'ADN et des fractures sur les chromosomes qui peuvent se répercuter en cancer. Le produit cause aussi des diminutions de la fertilité chez les animaux traités en plus d'être tératogène (173). Des coupes histologiques ont permis de découvrir des effets néfastes sur le foie, les branchies, l'intestin, les gonades et l'hypophyse d'animaux exposés au vert de malachite (85). Tout ceci est particulièrement inquiétant lorsqu'on considère que le vert de malachite s'accumule dans les tissus et que sa forme réduite, soit le vert de leucomalachite (Fig. 3), persiste encore plus longtemps tout en ayant des effets semblables au composé d'origine (208).

En tenant compte de ces nouvelles connaissances sur le vert de malachite, plusieurs pays ont décidé d'en restreindre ou d'en interdire l'utilisation. Depuis 1978, l'utilisation du vert de malachite est interdite sur des poissons destinés à l'alimentation humaine aux États-Unis (5). L'Union Européenne leur a emboîté le pas et a passé une réglementation s'appliquant autant au poisson qu'au oeufs en 2000 (250). Au Canada, on a dû attendre jusqu'en 2002 pour voir le produit disparaître de la production alimentaire. Par contre, l'absence de la substance laisse les piscicultures vulnérables et une recrudescence de la saprolégniose ainsi que d'autres maladies fongiques a été rapidement observée (33).

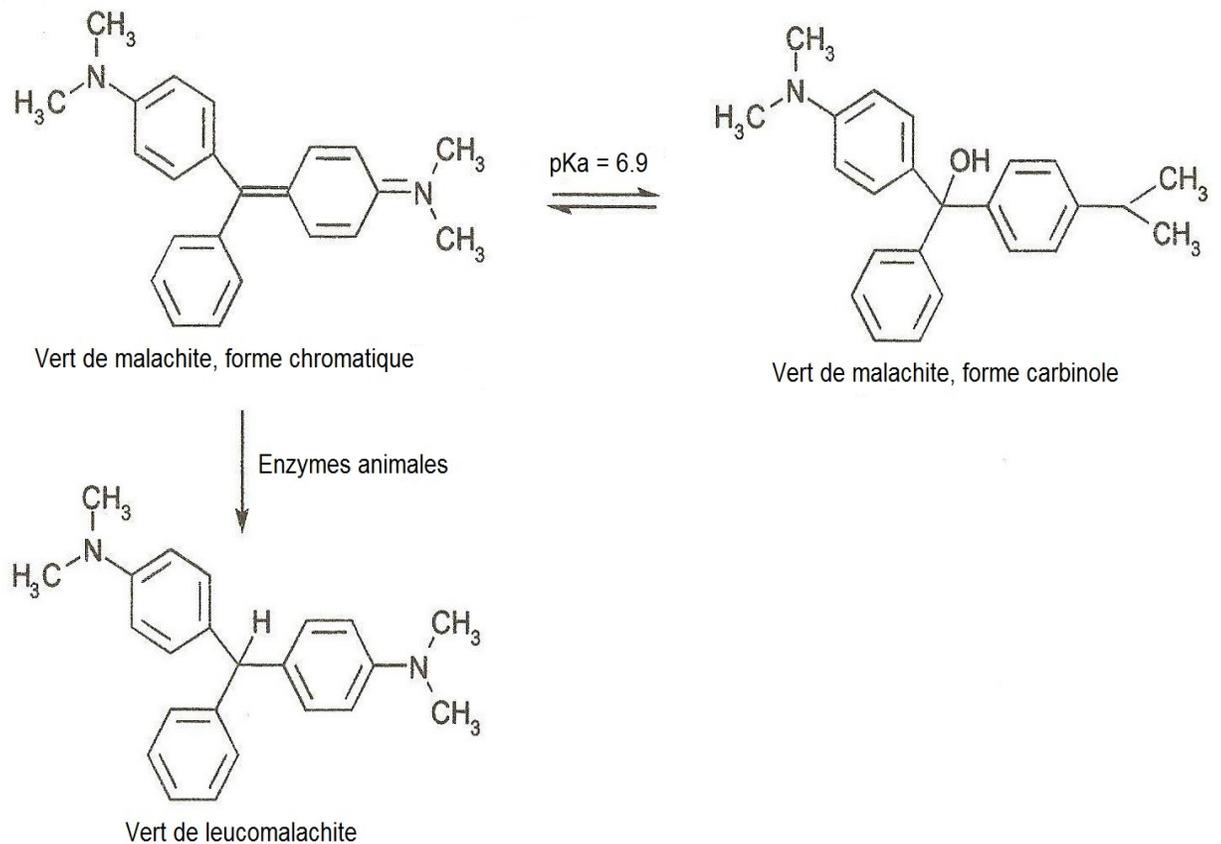


Figure 3 : Les trois formes du vert de malachite (créée avec BKChem).

1.1.8 Autres traitements

L'absence du vert de malachite a laissé un vide dans la lutte aux infections en aquaculture. Plusieurs chercheurs ont donc tenté de trouver un produit capable de remplacer le vert de malachite comme antifongique. S'il existait présentement, l'agent antifongique idéal réunirait les propriétés suivantes :

- Forte activité antifongique
- Aucun effet adverse sur le poisson ou les œufs traités

- Non toxique pour la consommation humaine
- Sécuritaire pour l'environnement
- Facile d'utilisation et d'entreposage
- Peu coûteux
- Exempt de réglementation trop restrictive

De nombreux traitements potentiels ont été découverts, mais à ce jour aucun n'a vraiment remplacé le vert de malachite. Voici certains produits méritant une mention puisqu'ils sont les plus prometteurs parmi ceux qui sont présentement offerts dans la lutte contre la saprolégniose.

La Formalin est le terme utilisé pour décrire une solution aqueuse contenant 10-15 % méthanol et 37 % formaldéhyde. De telles solutions sont disponibles commercialement sous le nom de Parasite-S® et Formalin-S® et sont relativement efficaces pour des traitements contre des parasites externes. Les infections fongiques ou bactériennes restent difficiles à traiter puisque la dose thérapeutique affecte le poisson de manière néfaste. Il reste possible de travailler entre 1000 et 2000 mg/L pour contrôler la saprolégniose sur les œufs en petits bassins (274). Un problème existe lorsqu'on considère les rejets de traitements qui affectent la vie marine en diminuant le niveau d'oxygène disponible dans l'eau (6). Chez l'humain, le formaldéhyde est reconnu comme agent cancérigène. Il faut donc redoubler de prudence et œuvrer dans des conditions sécuritaires lorsqu'en présence de Formalin.

Le bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol) est un agent de conservation dans plusieurs produits destinés à entrer en contact avec l'épiderme humain. L'agent antimicrobien présente un large spectre d'action tout en étant particulièrement efficace contre les bactéries à Gram négatif (35). Un traitement, contre la saprolégniose, à base de bronopol est disponible sur le marché sous le nom de Pyceze®. Il suffit de l'utiliser en bains de 30 minutes à des concentrations

variant entre 15 et 50 mg/ml (209). Le bémol se retrouve au niveau du prix du produit et de la réglementation l'entourant. Pour obtenir du Pyceze®, il faut avant tout se doter d'une autorisation de distribution d'un médicament d'urgence et d'une prescription d'un médecin vétérinaire à chaque application.

Le chlorure de sodium (NaCl) peut servir d'agent anti-*Saprolegnia* lorsqu'il est présent en quantité considérable. Combattre une infection déjà en place requiert des concentrations allant jusqu'à 30000 mg/L. Or, la haute dose létale contre *Saprolegnia* rend difficile l'utilisation du sel comme traitement puisqu'il devient trop coûteux pour de grands bassins. Par contre, la présence d'une faible concentration de sel s'est avérée bénéfique en prophylaxie (159). Le fait que le sel ne présente aucun risque pour l'utilisateur ni pour l'environnement et qu'il suffit de le conserver dans un endroit sec en font un excellent choix pour la prévention (178).

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) joue un rôle inestimable en aquaculture grâce à son large spectre d'activité contre des parasites, bactéries et plusieurs champignons causant des problèmes en aquaculture (213). Le peroxyde d'hydrogène est facile d'utilisation en ce qui concerne le dosage, ce qui permet d'effectuer des traitements curatifs ou préventifs. La molécule est totalement sécuritaire pour l'environnement puisqu'elle se décompose en eau et en oxygène (90). Il n'existe aucun problème en lien avec son accumulation dans les tissus puisque le peroxyde d'hydrogène se décompose au contact de matière organique (156). Bien que son entreposage et sa manipulation s'avèrent plus délicats, le produit reste en utilisation aujourd'hui. Le Perox-Aid^{MC} est homologué pour le traitement des œufs et est disponible sans prescription. Toutefois, il n'est pas homologué pour traiter les poissons (178).

Bien qu'il existe encore plusieurs autres traitements, aucun ne répond vraiment aux critères fixés plus haut. L'hypochlorite de sodium cause une fragilisation de la paroi des œufs, ce qui complique leur transport et n'est pas sans

danger pour l'humain (128). Le permanganate de potassium irrite le poisson, ce qui complique la période post-traitement en le rendant très vulnérable à d'autres infections. De plus, son utilisation demeure trop complexe et son efficacité reste à démontrer en pisciculture (158).

Le développement d'un vaccin capable d'augmenter la réponse immunitaire d'un poisson avant l'infection a également été envisagé. La réponse immunitaire du poisson s'éloigne considérablement de celle générée chez l'humain. En effet, les organismes aquatiques montrent une forte réponse innée, mais une faible réponse acquise. Somme toute, leur réponse immunitaire dépend énormément de l'environnement présent (262). Par exemple, la température, par son influence sur la quantité d'oxygène disponible, joue un rôle crucial dans le maintien de l'immunité. Ces fluctuations dans la réponse immunitaire du poisson amènent de nombreuses difficultés dans le développement d'un vaccin pour les maladies responsables du « Winter kill ». Le poisson se retrouve immunosupprimé durant la période critique et il est donc incapable de combattre une infection malgré une exposition précédente au pathogène (27).

1.2 Biocontrôle

Le biocontrôle par la recherche d'antagoniste à *Saprolegnia* est aussi une avenue pour des traitements potentiels. L'environnement aquatique regorge d'organismes nuisibles à la moisissure qui pourraient être exploités dans la lutte contre le parasite (33). Une espèce bactérienne ressort du lot d'études comme regorgeante de potentiel puisque déjà bien établie comme espèce antagoniste à d'autres champignons (28, 38, 55, 81, 93, 107, 108 et 126). En effet, *P. fluorescens*, ubiquitaire en milieu aquatique, présente la capacité d'inhiber *Saprolegnia* sp. *in vitro* (28). Le groupe de Bly *et al.* a tenté d'isoler le composé actif du surnageant de culture de *P. fluorescens*. L'échec de l'isolement les a contraints à conclure que

l'activité inhibitrice ne se retrouve pas dans le surnageant de culture (28). Depuis, le groupe ne semble pas avoir poursuivi cette piste qu'est l'inhibition par *P. fluorescens*. Il est tout de même pertinent de mentionner que *P. fluorescens* est l'agent responsable de certaines maladies bactériennes ulcératives causant une subite mortalité chez le poisson (266).

À ce jour, l'utilisation de pesticides dommageables pour l'humain et pour l'environnement constitue un problème d'opinion publique. Ce problème est justement à la base du besoin de trouver une méthode plus sécuritaire pour contrôler plusieurs fléaux en l'agriculture. Des bactéries non pathogènes en provenance du sol sont antagonistes de plusieurs pathogènes fongiques et donc capables de prévenir des maladies. De manière générale, les organismes ciblés comme agents de biocontrôle possèdent à la fois une grande diversité catabolique, la capacité de coloniser facilement les racines ou le sol et celle de produire une gamme variée d'antibiotiques (275). Le genre bactérien compte plusieurs espèces pourvues de ces caractéristiques et constitue donc le sujet tout désigné d'études sur le biocontrôle commercial.

On ne peut pas mettre en doute l'existence de certains pathogènes parmi les *Pseudomonas* fluorescents, tel que *Pseudomonas syringae*, capables de relation de type pathogène-hôte avec plusieurs plantes d'importance industrielle. Par contre, il est d'ores et déjà bien établi que la grande majorité des membres du groupe des *Pseudomonas* fluorescents peuvent exercer une influence très bénéfique sur la croissance végétale (251). Au cours des 45 dernières années, des recherches ont illustré le potentiel d'exploiter certaines bactéries pour contrôler plusieurs maladies affectant les racines des plantes. Des bactéries capables de produire des hormones stimulant la croissance végétale ou renforçant leurs défenses ont même été isolées de rhizomes (152). En ce qui a trait aux *Pseudomonas*, l'aspect biocontrôle provient davantage du côté bactérien que végétal puisque ce groupe colonise le sol de manière agressive en réduisant la

présence d'organismes nuisibles dans la zone immédiate (7). Qui plus est, plusieurs de ces bactéries fluorescentes produisent également de nombreux composés avec activité antibiotique jouant un rôle dans la lutte biologique (251). Par exemple, des souches de *P. fluorescens* ont été impliquées dans le contrôle de *Phytophthora* chez le soja, de *Thielaviopsis basicola* chez le tabac, d'*Erwinia carotovora* chez la patate, de *Fusarium* chez plusieurs végétaux et d'autres maladies fongiques chez le citron, l'orange et même certaines plantes ornementales (125, 231, 132, 151, 81, 241, 293 et 297). D'autre part, une étude en serre rapporte une augmentation de 367 % du rendement d'un lot de patates, avec l'utilisation d'un *P. fluorescens* (38). Le même isolat, dans un champ, produit des résultats de la même magnitude (133). Chez la betterave cultivée en serre, des rendements 20 % à 85 % supérieurs sont observables à cause de la diminution de maladies suite au traitement (252).

1.2.1 Mécanismes du biocontrôle

La suppression d'une maladie peut se faire par le biais de plusieurs mécanismes différents. Cette section vise à présenter certains de ces mécanismes, plus spécifiquement ceux utilisés par *P. fluorescens*.

1.2.1.1 Sidérophores

La biodisponibilité du fer dans un environnement comme la rhizosphère constitue souvent un facteur limitant la croissance microbienne. Puisque la plupart des organismes vivants utilisent le fer dans leur métabolisme, il s'en suit une compétition pour l'acquisition du métal présent en quantité limitée (251). Le phénomène de rareté du fer, un élément pourtant fort commun dans la croûte terrestre, s'explique par l'insolubilité du minerai. Dans l'environnement, on retrouve

le fer ferreux (Fe^{2+}) et le fer ferrique (Fe^{3+}) à des taux trop faibles pour supporter la croissance microbienne. Au fil du temps, plusieurs organismes ont développé un système de ligands servant à s'emparer du fer ferrique ainsi le rendant plus soluble et disponible pour leur croissance. Ces sidérophores sont caractérisés par leur faible masse moléculaire, leur forte spécificité au Fe^{3+} , ainsi que leur biosynthèse contrôlée par la disponibilité du fer (183).

Le contrôle des organismes néfastes s'effectue donc par le biais de la séquestration du fer en complexe sidérophore-fer, assimilable uniquement par un organisme possédant les récepteurs spécifiques au complexe. Ceci permet la croissance du *Pseudomonas*, inoffensif pour les plantes avoisinantes, et exclut d'autres organismes du milieu. Certains végétaux peuvent même obtenir leur fer par le détournement de sidérophores bactériens (46 et 47). La carence en fer de l'environnement semble également inhiber la germination de spores comme ceux de *Fusarium oxysporum* (67). Par ailleurs, on note que certains lactobacilles dépourvus de protéine à groupement hème, sont immunisés contre mécanisme puisqu'ils n'utilisent pas le fer dans leur croissance (10).

1.2.1.2 Antibiotiques

La production d'antibiotiques par *Pseudomonas* est désormais reconnue comme un facteur important dans le contrôle de plusieurs maladies. Ce genre bactérien produit une myriade de composés présentant des activités antimicrobiennes, notamment; les phénazines (256), la pyolutéorine (107), la pyrrolnitrine (108), la tropolone (153) et le 2,4-diacetylphloroglucinol (126). Leur spectre d'action varie grandement d'une molécule à l'autre. Certains sont faiblement spécifiques, telle la tropolone, qui pourrait entraver la croissance d'organismes bénéfiques (153).

1.2.1.3 Autres mécanismes

La production de cyanure d'hydrogène (HCN) par *Pseudomonas* influence plusieurs maladies affectant les racines du point de vue végétal et bactérien. Chez le tabac, le HCN stimule la croissance de structures en cheveux sur les racines, ce qui suggère que l'effet biocontrôle pourrait passer par l'induction d'un mécanisme de résistance autrement dormant chez la plante (273).

De plus, la compétition directe vise également à restreindre la croissance d'organismes indésirables dans l'environnement immédiat. La vitesse de croissance rapide couplée à une forte polyvalence métabolique font des *Pseudomonas* d'excellents colonisateurs. De plus, ces bactéries accaparent alors l'ensemble des nutriments disponibles, ce qui empêche l'établissement d'autres organismes potentiellement pathogènes. Ce phénomène suscite un intérêt particulier puisque certains *Pseudomonas* colonisent de préférence la surface des racines, environnement critique pour le bien-être de la plante (277).

Avec l'avènement du génie génétique, il est présentement possible d'exprimer artificiellement certaines fonctions hétérologues dans une souche bactérienne. C'est le cas de l'endotoxine delta de *Bacillus thuringiensis*, qui a été clonée chez une souche *P. fluorescens* alors capable de tuer certains insectes (193). Le gène responsable de la production de chitinase chez *Serratia marcescens* a même été cloné et exprimé chez *P. fluorescens* afin de dégrader la chitine, laquelle fait partie intégrante de la paroi des Fungi et des insectes souvent dommageables pour les plantes (78).

1.3 *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* fait partie de la famille des *Pseudomonadaceae* qui contient des membres plutôt disparates et ubiquitaires. Ceux-ci sont reconnus pour leur diversité métabolique ainsi que leur caractère bioactif et leur capacité à coloniser agressivement un milieu (3). Ce genre est composé de bactéries à Gram négatif, en forme de bacilles avec un flagelle polaire. Les espèces du genre jouent le rôle de phytopathogènes, pathogènes animaux, agents de biocontrôle, agents de biorestauration et comme pourrisseurs alimentaires. Les pathogènes humains les plus communs sont *P. aeruginosa* ainsi que d'autres espèces capables d'hémolyse, ce qui est problématique dans le domaine clinique (41). En ce qui concerne les phytopathogènes, ils font le plus souvent partie du sous-groupe *P. syringae*. Pour les agents de biocontrôle, *P. fluorescens* CHA0 et Pf-5, maintenant *Pseudomonas protegens*, constituent les espèces les plus étudiées contre les micromycètes parasitiques, notamment *Fusarium* sp. ou *Pythium* sp. et certains nématodes (44). Chez les espèces présentant un potentiel en biorestauration, on retrouve *P. putida* capable d'utiliser le toluène (52) et *Pseudomonas alcaligenes* qui dégrade les hydrocarbures aromatiques polycycliques (54). Finalement, en ce qui a trait aux pourrisseurs, *Pseudomonas fragi* et *Pseudomonas ludensis* causent une multitude de problèmes dans l'industrie alimentaire (197).

Les bactéries de ce genre se retrouvent fréquemment dans plusieurs niches écologiques variées. Les pathogènes opportunistes sont souvent isolés à partir de cathéters médicaux et causent des problèmes de bactériémie chez de patients immunosupprimés (160). Le reste des membres du genre sont présents dans l'environnement, particulièrement dans la rhizosphère du sol. Une autre niche colonisée par ces bactéries est l'environnement marin, plus précisément le

matériel aquifère, les plantes marines et les sédiments au fond d'un point d'eau (207 et 258).

1.3.1 Taxonomie

De par leur occurrence ubiquitaire dans la nature et leur croissance rapide en conditions de laboratoire, les *Pseudomonas* ont été remarqués et observés très tôt dans l'histoire de la microbiologie. Le terme *Pseudomonas*, créé uniquement pour ces nouveaux organismes, présentait les caractéristiques plutôt vagues que voici : « À Gram négatif, à respiration aérobie, mobiles par un flagelle polaire, ne produisent pas de spores et en forme de bacille » (175). La définition a plus tard fait l'objet d'une clarification grâce à l'ajout d'autres caractéristiques morphologiques, notamment la taille et certaines capacités métaboliques comme l'utilisation du nitrate (195).

Peu après l'invention du nouveau taxon, un grand nombre d'espèces lui fut ajouté. Au début du 20^e siècle, un problème émergea quand le nombre de membres s'est approché de 1000 espèces différentes. La liste incluait malheureusement beaucoup d'espèces avec une description incomplète ou uniquement le nom de la plante arborant la souche (45). Les premières tentatives de clarification du genre proviennent d'une thèse doctorale suggérant l'utilisation d'un spectre nutritionnel varié pour classifier les espèces (63). Il s'ensuivit le manuel de bactériologie systématique de Bergey utilisant les caractères biochimiques et morphologiques (24).

Du point de vue phénotypique, on peut diviser les espèces de *Pseudomonas* en deux groupes. Le premier contient les espèces capables de produire des pigments fluorescents à 260 nm tandis que les membres du deuxième groupe en sont incapables. Concernant la pathogénicité, une autre classification différencie les espèces pathogènes des non pathogènes. Le premier

groupe contient donc les phytopathogènes tandis que le second recense les espèces saprophytes. Cette classification n'est pas très utilisée puisque plusieurs espèces du deuxième groupe sont des pathogènes opportunistes.

La taxonomie du genre s'améliora avec l'avènement des manipulations ADN-ADN pour détecter des similarités dans la séquence de deux organismes. Un peu plus tard, les résultats peuvent être confirmés par la procédure de cartographie S1-nucléase (118). Ces deux techniques ont contribué à compliquer la classification, puisque plusieurs résultats n'étaient pas en accord avec les groupes phénotypiques préalablement établis. La grande hétérogénéité du génome des groupes suggérait un besoin urgent d'une révision exhaustive des groupements.

La classification actuelle dépend d'études d'hybridation de ADN-ARN ribosomal, qui sépare maintenant le genre en cinq groupes distincts (194). Le nom *Pseudomonas* est maintenant réservé au groupe ARNr 1 qui inclut l'espèce type *Pseudomonas aeruginosa*. Les membres de ce groupe sont également classés selon des comparaisons des séquences des gènes *gyrB* et *rpoD*, ce qui a permis la création de deux regroupements nommés IGC I et IGC II (294). Le premier ensemble, soit IGC I, regroupe des *Pseudomonas* fluorescents et non fluorescents incluant *P. aeruginosa*. Le second regroupement, IGC II, contient uniquement des *Pseudomonas* fluorescents incluant *P. fluorescens*. Cette dernière espèce est encore sous-divisée en trois complexes, soit *P. putida*, *P. syringae* et *P. fluorescens*. Le complexe *P. fluorescens* est ensuite séparé en quatre biotypes (A, B, C et G), qui sont assez distincts du type *Pseudomonas chlororaphis* (24 et 246).

1.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa, espèce type du genre *Pseudomonas*, est souvent décrite comme une bactérie présente dans l'environnement et agissant en tant que pathogène sous certaines conditions. La nature ubiquitaire de la bactérie s'explique entre autres par sa capacité de coloniser plusieurs niches distinctes et par son utilisation de plusieurs composés comme source d'énergie (284).

Chez l'humain, cette bactérie agit comme un pathogène opportuniste lorsque le système immunitaire est affaibli ou lors d'une infection chronique. En effet, les grands brûlés, les sidéens, les cancéreux suivant un traitement de chimiothérapie, les patients atteints de kératose ulcéreuse ainsi que ceux souffrant d'infections chroniques aux poumons causés par une fibrose kystique constituent un milieu propice à la croissance du microorganisme opportuniste (77, 129 et 23).

L'intérêt suscité par cette bactérie ne s'explique pas uniquement par la médecine humaine. À l'instar des autres membres du genre des *Pseudomonas*, elle produit une grande variété de métabolites secondaires aux propriétés diverses (36). Ainsi, un de ces métabolites, le 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ), est tout nouvellement observé comme inhibiteur de *S. Parasitica* (72).

1.3.3 *Pseudomonas fluorescens*

L'attention reçue par cette bactérie provient surtout de son potentiel à réduire les dégâts causés par certaines maladies fongiques s'attaquant à des plantes cultivables destinées à l'alimentation humaine ou animale (196). Justement, les souches capables de coloniser la rhizosphère portent l'appellation PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) et *P. fluorescens* est l'organisme pour lequel le terme a été inventé (170).

L'abilité de production des sidérophores rend cette bactérie particulièrement intéressante pour le contrôle de plusieurs maladies animales ou végétales. Ceci évite l'utilisation abusive d'antibiotiques et le recours à une main-oeuvre pour des campagnes de vaccinations massives (74). D'autre part, les sidérophores, surtout la pyoverdine, jouent un rôle dans la réduction de la charge fongique d'un plan d'eau (91). Même chez l'être humain, le mécanisme bactérien de séquestration du fer est important puisqu'il constitue un candidat potentiel dans la lutte contre l'Alzheimer, le parkinson, certains cancers, la tuberculose, le sida, la malaria et plusieurs infections néonatales (188 et 56).

Tout comme la plupart des autres membres de son genre, cette espèce colonise principalement le sol et certains milieux aquatiques. Les *Pseudomonas* aquatiques sont surtout étudiés pour leur tendance à inhiber la croissance de bactéries ou de champignons pathogènes envers la vie aquatique. Dans des pénécultures de crevettes, une souche de *P. fluorescens* a été isolée grâce à son antagonisme envers *Vibrio harveyi*, *Vibrio. fluvialis* et autres bactéries du même genre s'attaquant aux larves (272). D'autre part, trois isolats de *P. fluorescens* issus d'un bassin commercial de poisson-chats ont été sélectionnés pour leur capacité à inhiber la croissance de *Saprolegnia* sp. Cf1 en gélose (28). Cette aptitude à l'inhibition de pathogènes provient vraisemblablement de la myriade de métabolites secondaires sécrétés par *P. fluorescens*.

Cependant, dans le milieu de l'aquaculture, *P. fluorescens* est également considéré comme un pathogène infectant les carpes et les cardeaux (84 et 253). Les poissons sont vulnérables à l'infection durant toute l'année et particulièrement s'ils sont transportés ou manipulés. Suite à l'établissement de l'infection, ils développent une maladie de la peau très difficile à contrôler. La pathogenèse de cette maladie reste peu comprise, mais semble limitée aux souches sécrétant une métalloprotéase AprX (298).

1.3.4 « Quorum sensing »

Sous sa forme la plus simple, le « quorum sensing » est un mécanisme de régulation globale de l'expression génique d'une bactérie en réponse à la densité d'une population. Ce phénomène est possible grâce à la production et l'accumulation de molécules dans l'environnement immédiat (80). Ces signaux moléculaires, également connus sous le nom d'autoinducteurs, lient un récepteur situé à la surface de la cellule ou à l'intérieur de celle-ci, ce qui entraîne un changement dans l'expression génique si un seuil déterminé est atteint (80). Ce mécanisme, dont le rôle est de coordonner le comportement d'une population de bactéries, n'est pas sans rappeler, d'un point de vue évolutif, la communication cellule à cellule d'organismes multicellulaires.

Jadis considéré comme marginal et peu commun dans le monde bactérien, le « quorum sensing » est maintenant reconnu comme un mécanisme de régulation majeur chez plusieurs microorganismes. Tandis que les bactéries à Gram positif ont développé un système de communication fonctionnant avec des oligopeptides comme signaux, les bactéries à Gram négatif utilisent des molécules de faible poids pour la signalisation (65 et 80). Une famille de ces molécules fait l'objet d'une attention particulière de la part de la communauté scientifique, puisqu'elle est utilisée par un grand nombre de bactéries à Gram négatif. Les acyles-homosérine lactone (acyle-HSL), observées pour la première fois dans le contexte de l'écologie microbienne, sont maintenant connues pour leur importance dans les relations avec les plantes, les animaux et les humains (198). Le « quorum sensing » médié par des acyles-HSL joue un rôle dans plusieurs activités physiologiques notamment les symbioses, la virulence, la compétence, la conjugaison, la production de métabolites secondaires variés, la motilité de type « swarming », la sporulation et la formation de biofilm (198).

1.3.4.1 Plusieurs systèmes de « quorum sensing » chez les *Pseudomonas*

Chez *P. fluorescens* la synthèse de mupirocine dépend d'une région du génome d'une longueur de 60 kp (279). Cette région, un système de « quorum sensing », contient les gènes homologues à *luxR* et *luxI* nommés *mupR* et *mupI* (68). Au cours de la phase stationnaire, MupR/MupI signalent MupA qui active la transcription maximale de l'opéron *mup*. Le signal détecté par MupR serait une 3-oxo-C10 N-acyl homoserine lactone produite par *mupI* en présence de MupR (68).

La mupirocine n'est pas le seul antibiotique dont la synthèse est régulée par un système de « quorum sensing » chez les *P. fluorescens* en produisant. La production de phénazines, métabolites secondaires souvent antimicrobiens, répond à un autre système, PhzI/PhzR, chez *P. fluorescens*, *Pseudomonas aureofaciens*, et *P. chlororaphis* (256, 49 et 44). Le régulateur PhzR, qui fonctionne par la reconnaissance de signaux acyle-HSL, dont le 3-OH-C₆-HSL, le 3-OH-C₈-HSL et le 3-OH-hexanoyl-HSL (127), s'accumulant durant la phase de croissance stationnaire.

1.3.5 Le système à deux composantes GacA/GacS

Ce système se retrouve chez plusieurs Gammaprotéobactéries, dont la plupart sont des *Pseudomonas*. Chez *P. aeruginosa* ce système à deux composantes favorise la production de l'autoinducteur N-butyryl-homoserine lactone, la synthèse de la pyocyanine, du cyanure d'hydrogène, de la lipase, de l'élastase (217) et la production de biofilm (271). Ce système est nécessaire à l'activation de la virulence dans le cadre d'une infection animale, végétale et chez les insectes (214). Dans le cas des *Pseudomonas* phytopathogéniques tel que *P. syringae*, le système Gac est impliqué dans la production de protéases, de

toxines, de l'alginate et de la motilité par « swarming » (161). L'interaction entre GacA et GacS joue un rôle particulièrement important chez *P. fluorescens*, puisqu'elle régule la production de la plupart des métabolites secondaires : le 2,4-diacetylphloroglucinol, le cyanure (2), la pyoluteorine, les phénazines (299), la phytohormone acide indole-3-acétique (121), certains sidérophores (225) et certaines lipopeptides comme l'amphisine (135) constituent tous des exemples de métabolites régulés positivement par le système GacA/GacS. Ceci explique pourquoi des mutations dans le système se traduisent souvent par une perte de la capacité de biocontrôle de cette espèce (144). Le système Gac est aussi connu comme régulateur global et régule négativement certains phénomènes comme la motilité par « swimming » (162).

Au cours de la transition vers la phase stationnaire, un signal d'activation, médié par GacS, est envoyé par GacA pour la production de petits ARNs régulateurs. Une hypothèse est que la kinase réceptrice GacS s'autophosphorylle sur un résidu histidine pour ensuite effectuer un transfert de phosphate par un mécanisme tripartite vers le régulateur GacA (143). Les souches de *P. fluorescens* produisent deux ou trois des ARN non-codants parmi RsmX, RsmY et RsmZ (123 et 268). Il s'en suit alors un phénomène de compétition entre ces ARN non-codants et les protéines liant l'ARN messager RsmA, RsmE et RsmI (300). Le résultat de cette compétition produit donc un titrage des petits ARNs. Lorsque les ARN non-codant deviennent présents en plus grand nombre, ils peuvent lier des séquences régulatrices sur l'ARN afin d'activer ou de désactiver la traduction d'un gène (142 et 233).

1.3.6 Les métabolites secondaires et facteurs extracellulaires produits par les *Pseudomonas*

La découverte du fait que les bactéries du genre *Pseudomonas* produisent des antibiotiques ne date pas d'hier. En effet, dès 1899, Emmerich et Löw ont remarqué qu'un surnageant stérile de culture de *Bacillus pycyanus*, désormais connue sous le nom de *P. aeruginosa*, pouvait inhiber la croissance de plusieurs espèces bactériennes (71). Par la suite, on note la production de la pyocynase, un médicament commercial manufacturé à partir d'un concentré de culture et utilisé pour le traitement de la diphtérie, de l'influenza, de la méningite et du choléra (95 et 147). Malgré des résultats cliniques décevants à cause de la faible efficacité, de la toxicité et de l'instabilité, la pyocynase a été utilisée comme antibiotique topique durant une trentaine d'années, ce qui fait de ce produit le premier antibiotique moderne. Qui plus est, on lui attribue en partie le mérite d'avoir attiré l'attention vers les métabolites secondaires chez les *Pseudomonas*, et ce 40 ans avant la pénicilline (149).

D'autre part, les métabolites secondaires jouent des rôles variés puisqu'ils sont produits en grand nombre et qu'ils possèdent des structures moléculaires diversifiées. Les prochaines sections concernent particulièrement les principales molécules présentant une activité antimicrobienne sécrétées par certains *P. fluorescens*, tels que le 2,4-diacétylphloroglucinol, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine, les rhamnolipides, la mupirocine, le cyanure d'hydrogène, certains sidérophores et les phénazines (66, 145 et 279). La figure 4 illustre justement la structure diverse de plusieurs de ces composés.

1.3.6.1 La mupirocine

Cet antibiotique, utilisé de manière topique pour les traitements contre *Staphylococcus aureus*, est constitué d'un mélange de plusieurs acides pseudominiques, notamment l'acide A (90 %) et l'acide B (8 %) (79 et 42). Ces composés sont produits par plusieurs souches de *P. fluorescens* et des dérivés ont plus tard été découverts chez *Alteromonas* (236). La mixture inhibe, par compétition, les isoleucine-ARNt synthases par l'interaction de la portion méthyle terminale de l'acide monique avec le site de liaison des acides aminés de l'ARNt synthase (111). La biosynthèse de la mupirocine implique une grande région du génome, c'est-à-dire plus de 60 KB, serait régulée par un système de « quorum sensing » (279). Cette région contient les gènes de synthèse *mupA-X*, *mmpA-F* et *macpA-E*, où *mupM* confère la résistance à l'antibiotique (69).

1.3.6.2 La pyolutéorine

Cette molécule est avant tout un antibiotique produit par plusieurs souches de *P. fluorescens* et exceptionnellement de *P. aeruginosa*. On la connaît surtout grâce à *P. fluorescens* Pf-5, une bactérie résidente de la rhizosphère et beaucoup étudiée pour la suppression d'oomycètes, tel *Pythium ultimum*, s'attaquant aux racines des plantes (108). Le pouvoir antibiotique de la souche provient, entre autres, de la pyolutéorine (PLT) qui est active contre plusieurs oomycètes et certaines bactéries (15). La région responsable de la synthèse de la pyolutéorine contient neuf gènes structuraux, *pltA-G* avec *pltL-M* et deux gènes codant pour des régulateurs de la transcription (189 et 191). *PltR* est l'activateur des neuf autres gènes tandis que *PltZ* est le répresseur de la production (110). En plus de son rôle antibiotique, la molécule agit comme autoinducteur de sa propre production et est impliquée dans la signalisation inter et intra espèces dans la rhizosphère (30 et 31).

1.3.6.3 La pyrrolnitrine

La découverte de la pyrrolnitrine, produite par un *Pseudomonas* sp., a eu lieu une soixantaine d'années après celle du premier antibiotique utilisé en clinique ; la pyocyanase (11 et 71). Ce métabolite secondaire, également produit par certains *Burkholderia* sp., et *P. fluorescens* Pf-5, est en fait un antifongique à large spectre qui fut d'abord utilisé pour le traitement de mycoses cutanées (107, 255 et 267). L'antibiotique fonctionne comme inhibiteur de la chaîne respiratoire chez les Basidiomycètes, les Deutéromycètes et les Ascomycètes (264). Un dérivé, le phénylpyrrole, a plus tard été mis au point comme fongicide destiné à l'agriculture (186 et 82). La synthèse de la pyrrolnitrine (PRN), bien caractérisée, débute avec du L-tryptophane, chloré en 7-chloro-L-tryptophane par PrnA, décarboxylé en monodechloroaminopyrrolnitrine par PrnB, chloré en aminopyrrolnitrine par PrnC puis finalement oxydé en pyrrolnitrine par PrnD (130). La production serait en partie régulée par RpoS puisqu'un mutant RpoS⁻ ne produit aucune pyrrolnitrine (227). La régulation de l'opéron *prn* passe aussi par les systèmes à deux composantes GacA/GacS et par le système de « quorum sensing » PhzI/PhzR (234).

1.3.6.4 Le 2,4-diacétylphloroglucinol

Cet antibiotique polyketide s'avère efficace contre plusieurs formes de vie, telles que certains micromycètes ou champignons, protistes, bactéries, oomycètes et nématodes (22, 18, 115, 244, 120 et 114). Son influence sur autant de formes de vies différentes suggère que le 2,4-diacétylphloroglucinol (2,4-DAPG) affecte plusieurs processus cellulaires, notamment la lyse cellulaire par un mécanisme inusité (120), la disruption du cytosquelette d'actine des *Aphanomyces* (114) et l'inhibition des fonctions mitochondriales chez *Saccharomyces cerevisiae* (87). En

plus, d'occasionner des pertes de mobilité chez les zoospores et les amibes, le polyketide est responsable de leur lyse en agissant d'une manière dose-dépendante à des concentrations avoisinantes 5-10 µg/ml (257). Le contrôle de la synthèse de l'antibiotique requiert le système GacS/GacA tout en répondant au facteur sigma RpoD et RpoS (50 et 225). Les gènes directement impliqués dans la biosynthèse sont regroupés dans l'opéron *phlA-D* qui est flanqué par les gènes codant pour la perméase PhIE et le répresseur transcriptionnel PhIF (231).

1.3.6.5 Les rhamnolipides

Cette classe de molécule amphiphile possède une région hydrophobe ainsi qu'une région hydrophile. Ceci leur confère la capacité de s'insérer dans la membrane plasmique et de provoquer la lyse cellulaire par instabilité de la membrane (109). Les rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* ont justement la capacité de lyser les zoospores de *Pythium aphanidermatum*, de *Phytophthora capsici* et de *Plasmopara lactucae-radicis* en utilisant ce processus (245). Les rhamnolipides possèdent la caractéristique d'être tensio-actifs, ce qui suscite un intérêt de la part du milieu industriel pour leur pouvoir détergent (243). *P. fluorescens* produit également des rhamnolipides possédant de nombreux avantages sur les surfactants synthétiques, tels que leur faible toxicité, leur capacité à se biodégrader, leur activité sélective, leur activité modulable en fonction de la température, du pH et de la salinité (17 et 122). Il est à noter que la production de rhamnolipides par *P. fluorescens* n'est pas très répandue, un exemple de souche en produisant est *P. fluorescens* HW (270).

1.3.6.6 Autres biosurfactants

Quoique les rhamnolipides ne soient que rarement sécrétés par *P. fluorescens*, ces bactéries produisent normalement des lipopeptides cycliques

(CLP) présentant une activité tensioactive (21). Les CLPs des *Pseudomonas* spp. sont composés d'une queue d'acide gras liée à un court oligopeptide qui lui est replié pour former un anneau lactone entre deux acides aminés dans la chaîne peptidique. Ces CLPs présentent une grande diversité structurelle et d'activité biologique de par la variation dans la composition de la queue d'acide gras (210). L'orfamide A est le principal lipopeptide cyclique retrouvé chez *P. fluorescens* Pf-5, même s'il produit aussi les orfamides B et C (92). La biosynthèse de l'orfamide A s'effectue par le biais des gènes *ofaA-C* et est sous le contrôle de du système GacA/GacS (154 et 25). Du point de vue biologique, les CLPs, dont les orfamides facilitent le mouvement bactérien, l'adhésion, la formation de biofilm ainsi que la croissance sur plusieurs surfaces (187). Ces métabolites sont capables de détruire les zoospores d'oomycètes dépourvus de paroi cellulaire par le biais d'un mécanisme de disruption de la membrane grâce aux propriétés détergentes ou à la formation de pores transmembranaires (192). D'autres biosurfactants sont produits par *P. fluorescens* et comptent des activités semblables, comme la vicosine (89), le massetolide (32) et l'arthofactine (223).

1.3.6.7 Les pyoverdines

Ces composés sont les sidérophores typiques des *Pseudomonas* fluorescents comme *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*. La pyoverdine de *P. fluorescens* est un pigment vert/jaune fluorescent sous la lumière UV qui est directement impliqué dans le transport haute affinité du fer vers la cellule (36). La découverte de plus d'une cinquantaine de dérivés de la pyoverdine a contribué à augmenter l'intérêt pour l'utilisation de sidérophores comme biopesticides en plus d'ouvrir une nouvelle avenue pour la classification des *Pseudomonas* sp. (174 et 286). Leur structure consiste en un chromophore dihydroxyquinoline flanqué d'une chaîne de peptide à 6-12 acides aminés liée au groupement carboxyle et à un acide dicarboxylique connecté sur le groupement NH₂ du chromophore (73).

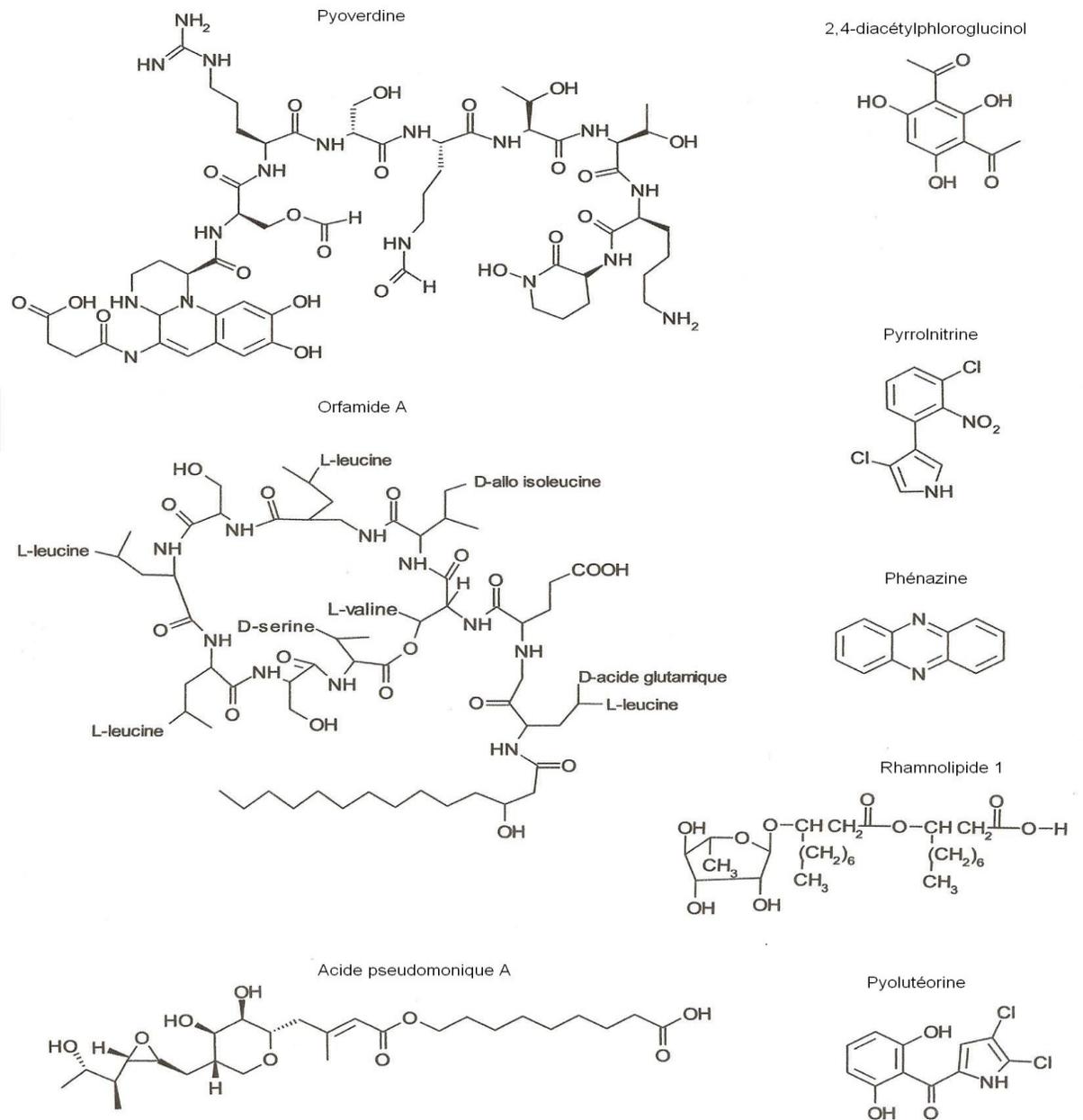


Figure 4 : Structure de certains des principaux facteurs extracellulaires produits par *Pseudomonas fluorescens* (créée avec BKChem).

1.3.6.8 Les phénazines

Cette famille de composés aromatiques comprend plus de 80 molécules naturelles qui possèdent une activité soit antibactérienne, antifongique, antivirale ou antitumorale et sont principalement produites par des espèces des genres *Pseudomonas* et *Streptomyces* (157). L'activité antibiotique provient d'une réaction d'oxydoréduction sur la phénazine, ce qui cause l'accumulation de radicaux superoxydes toxiques pour la cellule (99). Leur capacité de subir l'oxydoréduction confère aux phénazines plusieurs fonctions accessoires, notamment celles d'accepteurs ou donneurs d'électrons, de composantes de piles biologiques, de biosenseurs, et de marqueurs environnementaux (206). Les phénazines sont sécrétées à l'extérieur de la cellule à des concentrations variant du milligramme au gramme par litre en condition de culture *in vitro* (29). Il existe aussi une phénazine intégrée à la membrane qui tient lieu de transporteur d'électron dans la méthanogenèse de *Methanosarcina* (4). Les phénazines sont typiquement pigmentées avec un spectre d'absorption incluant deux maxima dans l'ultraviolet et au moins un dans le visible. L'absorption dans le visible et l'activité biologique dépendent de la nature et de la position des substitutions présentes sur l'anneau hétérocyclique (29).

Historiquement, *P. aeruginosa* est la première souche à avoir été rapportée comme productrice de phénazines à la fin du 19^e siècle (86). Le pigment bleu-vert 5-Nméthyle-1-dydroxyphénazine, caractéristique de cette espèce, constitue fort probablement la première phénazine connue et décrite sous le nom de pyocyanine (76). Il a ultérieurement été mis en évidence que *P. aeruginosa* est responsable de la production de plusieurs phénazines incluant le PCA, le PCN, l'aeruginosine A et l'aeruginosine B (39, 75, 98 et 105).

L'étude des phénazines s'est principalement penchée sur les *Pseudomonas* fluorescents, notamment *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* et *P. aeruginosa* pour examiner leur rôle dans la virulence de ces souches ainsi que dans le but d'évaluer leur utilisation potentielle comme biopesticides (169). Les souches dites phénazines positives synthétisent habituellement plusieurs de ces composés à l'exception de *P. fluorescens* qui produit uniquement l'acide phénazine-1-carboxylique (PCA) (239). Le présent manuscrit, traitant de trois souches de *P. fluorescens*, porte une attention particulière à la biosynthèse, à la régulation et aux effets du PCA.

La grande diversité de cette famille de composés provient de modifications sur l'acide phénazine-1,6-dicarboxylique et le PCA, principaux produits de cette voie de biosynthèse. La Figure 5 présente quelques exemples de cette diversité en plus de la molécule d'origine. Chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents, le PCA peut-être modifié par méthylation, par transamidation, par hydroxylation ou par décarboxylation (166 et 57). Dans certains cas, les gènes requis pour les modifications sont liés à l'opéron : *phzO* chez *P. aureofaciens*, *phzH* chez *P. chlororaphis*, *phzM* et *phzS* chez *P. aeruginosa* (57, 44 et 166). Dans d'autres cas, ces gènes sont présents ailleurs dans le génome comme *phzH* chez *P. aeruginosa* (166). Cette diversité provient aussi des régions analogues à l'opéron *phz* présentes chez *Burkholderia cepacia*, *E. carotovora* et *Brevibacterium linens* codant pour d'autres régions de biosynthèses (83).

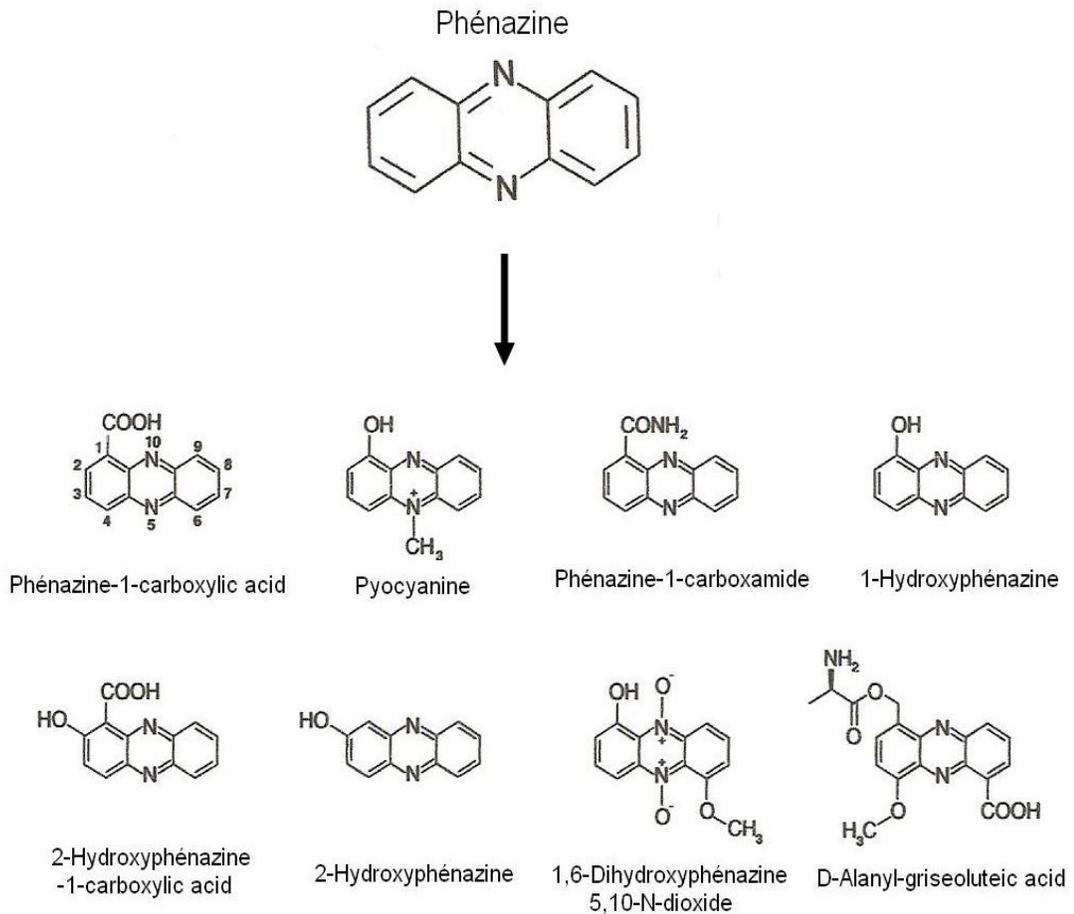


Figure 5 : Phénazine et composés dérivés (modifié de Mavrodi, 2006).

Une comparaison des séquences et de l'organisation des opérons *phz* révèle que les enzymes clés sont toujours organisées en opérons et très conservées chez les *Pseudomonas* et même chez les autres producteurs de phénazine comme *Burkholderia* ou *Actinomycetales*. Les enzymes encodées par *phzB*, *phzD*, *phzE*, *phzF* et *phzG* sont absolument indispensables à la synthèse des trois cycles de la phénazine et sont présentes chez toutes les espèces capables de produire une ou plusieurs phénazines (167). Il existe même certaines souches de *Streptomyces cinnamomensis* et de *P. aeruginosa* possédant deux copies de l'opéron dans leur génome (94 et 166). Uniquement chez les

Pseudomonas, l'opéron *phz* est généralement couplé aux gènes *phzI* et *phzR* qui forment un système de « quorum sensing » régulant la production de phénazine selon la densité de la population bactérienne (169). Il faut cependant mentionner que les gènes à l'extérieur de l'opéron, comme *phzI*, *phzR*, *phzO*, ne sont pas aussi bien conservés dans le monde bactérien (148). La Figure 6 montre l'organisation de l'opéron de biosynthèse et illustre sa taille chez certaines des espèces mentionnées plus haut.

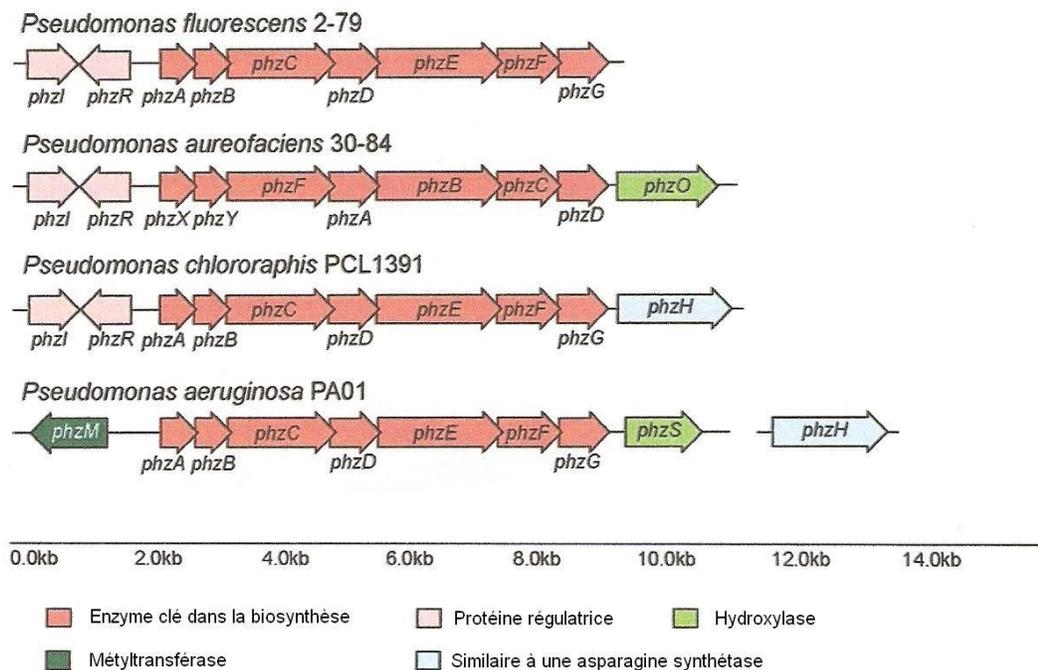


Figure 6 : Carte génétique de l'opéron *phz* chez certains *pseudomonas* fluorescents (modifié de Mavrodi, 2006). Notons ici qu'il y a un 2^e opéron *phz* situé ailleurs sur le génome chez *P. aeruginosa*.

1.3.6.9 L'acide phénazine-1-carboxylique

Cette phénazine, produite par *P. fluorescens*, jouit d'une attention particulière depuis le début des années 1980 grâce à son rôle de biopesticide. En

effet, une colonisation de la rhizosphère exige plus qu'un métabolisme adapté au milieu, puisqu'il convient de posséder un avantage sélectif sur les microorganismes indigènes de cet environnement. En 1990, le groupe de Thomashow et al. a réussi à purifier du PCA à partir de racines et de terre appartenant à la rhizosphère d'une plante colonisée par *P. fluorescens* 2-79, démontrant ainsi que la bactérie est en mesure d'établir une population et produire l'antibiotique (257). Quelques années plus tard, il a été démontré que le PCA joue un rôle indispensable dans la survie à long terme, c'est-à-dire de plus de quarante jours, d'une population bactérienne établie dans la rhizosphère (170). Par contre, la molécule ne semble pas impliquée dans le maintien à court terme (quatorze jours) d'une population ni dans la colonisation initiale de l'environnement (203 et 256).

En plus de sa fonction de transporteur d'électrons facilitant l'accès au fer et au phosphate dans l'écologie bactérienne (103), le PCA constitue également un antibiotique à large spectre (93 et 102). Il a d'abord été synthétisé artificiellement par un groupe allemand en 1930 (136) avant de voir son spectre ultraviolet, ainsi que d'autres structures de résonance, être caractérisés par Rădulescu et Ostrogovic (212). L'activité antibactérienne du PCA a initialement été qualifiée de bactériostatique contre *S. aureus* lorsque présent à 100 mg/L de culture (229). De plus, cinq ans plus tard, on a attribué au PCA la capacité d'inhiber la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* et de *Bacillus anthracis* à des concentrations approximative de 100 mg/L (26). Cette inhibition de *M. tuberculosis* explique justement le nom commun de tubermycine B. En ce qui concerne son activité antifongique, il a fallu attendre encore quelque temps pour rapporter son activité contre *Cercospora musae*, *Diplodia zaeae*, *Claviceps purpurea*, *Pythium debraryanum* et *Stemphylium sarcinaeforme*, à des concentrations variant entre 75 et 200 mg/L (102).

Chez *Pseudomonas*, la biosynthèse du PCA et d'autres phénazines provient d'un embranchement de la voie de l'acide shikimique passant par l'acide chorismique. Cette voie est hautement conservée dans le monde bactérien puisqu'elle mène à la production de métabolites nécessaires à la croissance, incluant trois acides aminés et l'acide para-aminobenzoïque (206). La régulation de la production de phénazines doit par conséquent faire l'objet d'un contrôle rigoureux afin de ne pas priver la cellule de métabolites indispensables. D'ores et déjà, certaines mutations de l'enzyme PhzC entraînent une diminution du « fitness » de la bactérie en augmentant la quantité de phénazines sécrétée (169). Cette enzyme, une 1-3-déoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase (DAHP) augmente la première étape de condensation de l'érythrose-4-phosphate et de l'acide phosphoenolpyruvique, ce qui permet d'avoir un niveau de substrat assez élevé pour la production de phénazines tout en maintenant une bonne quantité de phénylalanine, tyrosine et de tryptophane (206). La Figure 7 montre la voie de biosynthèse en plus des rôles connus et possibles des gènes *phzA-G*.

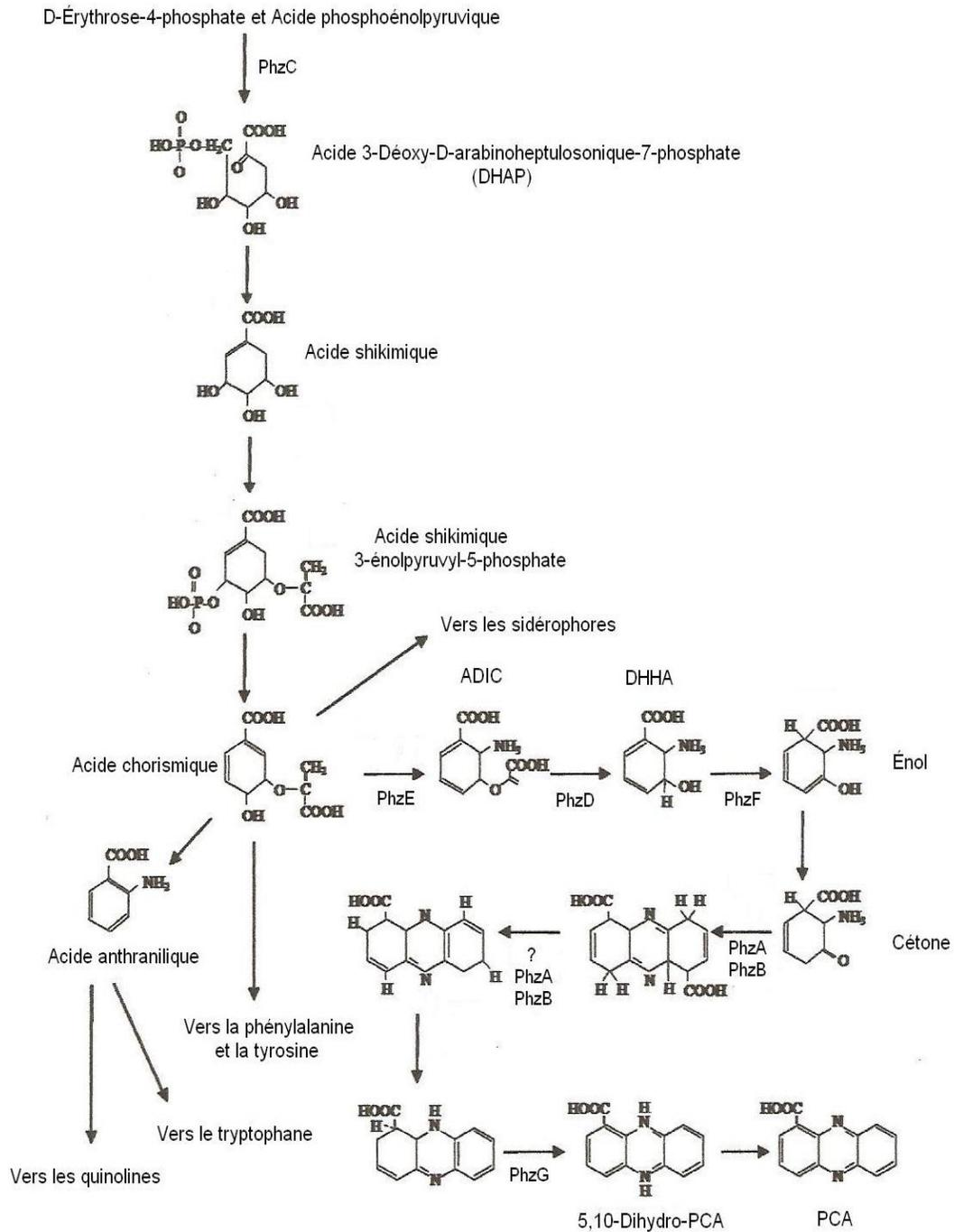


Figure 7 : Voie de biosynthèse du PCA et de ses intermédiaires chez *P. fluorescens* (modifiée de Mentel, 2009).

1.4 But et hypothèse

Depuis 1960, la littérature scientifique regorge d'études portant sur la recherche et la caractérisation d'antibiotiques de tout genre. La quête d'un antifongique efficace contre la saprolégniose, présentement en recrudescence en aquaculture, constitue un exemple actuel.

Le principal objectif de cette étude consistait en l'identification d'un ou plusieurs nouveaux composés d'origine microbienne qui pourraient venir combler le vide laissé par le bannissement de l'emploi du vert de malachite dans la lutte contre la saprolégniose en aquaculture commerciale.

Le mémoire suivant décrit les travaux effectués sur trois souches bactériennes récoltées directement d'une pisciculture active. L'idée d'utiliser des isolats provenant de l'environnement repose sur le fait qu'un milieu naturel doit être équilibré. Par conséquent, si ce milieu contenait du champignon *Saprolegnia* sp. il était présumé qu'il devrait aussi contenir des microorganismes avec une activité antagoniste.

Pour ce faire, de l'eau en provenance d'une pisciculture où des poissons ou œufs semblaient infectés par *Saprolegnia* sp. a été récoltée puis analysée pour la présence de bactéries présentant une activité anti-*Saprolegnia*. Après identification des souches bactériennes positives, la caractérisation de la molécule active responsable de l'activité antifongique a été réalisée.

Toutes les manipulations impliquant la moisissure aquatique ont été réalisées avec un isolat provenant d'un poisson atteint de saprolégniose. L'utilisation de cette souche infectieuse permet de travailler dans des conditions plus près de la réalité puisque cette souche est plus robuste et présente une croissance plus vigoureuse que les souches provenant des collections habituelles telle l'American Type Culture Collection (ATCC).

Milieu MSM (modified sporulation media) (265)

- 5 g $C_8H_{18}N_2O_4S$ hepes
- 0,01 g rouge de phénol
- 0,028 g $CaCl_2$ chlorure de calcium
- 0,019 g KCl chlorure de potassium
- Ajuster à pH 7.4 avec du NaOH
- Stériliser par filtration 0,22 μm

Milieu M9+glucose (226)

- 200ml sel M9

Sels M9 5x

- 64 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ sodium phosphate dibasique heptahydrate
- 15 g KH_2PO_4 potassium phosphate dibasique
- 2,5 g NaCl chlorure de sodium
- 5 g NH_4Cl chlorure d'ammonium
- 0,0011 g $CaCl_2$ chlorure de calcium
- 0,493 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ sulfate de magnésium heptahydrate
- 0,72 g $C_6H_{12}O_6$ glucose

Milieu LB (Luria Bertani broth) (226)

- 10 g tryptone
- 5 g extrait de levure
- 5 g NaCl Chlorure de sodium
- Ajuster à pH 7 avec du NaOH
- Ajouter 1,233 g de $MgSO_4$ et 0,011 g de $CaCl_2$ pour la préparation d'un litre de milieu LBA

Milieu PIA (*Pseudomonas isolation agar*) (13)

-20 g peptone

-1,4 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ chlorure de magnésium 6-hydrate

-10 g $\text{K}_2\text{O}_4\text{S}$ Sulfate de potassium

-25 mg $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_3\text{O}_2$ Irgasan (triclosan)

-Pour les géloses ajouter 13,6 g d'agar à la préparation d'un litre

Milieu 2YT (226)

-16 g tryptone

-10 g extrait de levure

-5 g NaCl

-Ajuster à pH 7 avec du NaOH

Milieu Swim (215)

-10 g tryptone

-5 g NaCl

-Pour les géloses ajouter 3 g agar à la préparation d'un litre

Milieu Swarm (modifié de 215)

-3 g extrait de bœuf

-5 g peptone

-5 g $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ glucose

-Pour les géloses ajouter 5 g agar

-Laisser sécher 12h à température pièce

-Utiliser immédiatement après séchage

Milieu B de King (12)

-20 g peptone

-1,5 g MgSO₄ 7H₂O sulfate de magnésium heptahydrate

-1,5 g K₂HPO₄ potassium phosphate dibasique

-Ajuster à pH 7,2 avec du NaOH

2.1.1 Souches et plasmides utilisés

La souche *P. aeruginosa* PA14 provient du docteur Éric Déziel de l'INRS-Institut Armand-Frappier à Laval (Québec, Canada).

La souche identifiée comme *S. parasitica* a été isolée d'oeufs atteints de saprolégniose à la Pisciculture de la Jacques-Cartier au Cap-Santé (Québec, Canada). Après un certain nombre de passages en laboratoire et pour s'assurer de sa virulence, elle a été utilisée dans un modèle d'infection (truite arc-en-ciel) et repurifiée au laboratoire du docteur Grant Vandenberg à l'Université Laval (Québec, Canada). Le maintien de la souche s'est effectué sur milieu GY tandis que la sporulation a été induite par l'utilisation du milieu MSM (265).

Deux souches, nommées C5 et C8, de *P. fluorescens* proviennent de l'eau utilisée dans différentes piscicultures du Québec tandis qu'une troisième, 2149, a été retrouvée lors de l'isolement de *S. parasitica* au laboratoire.

Les souches d'*Escherichia coli* EPI 300, S17-1 et S17-1 λ pir proviennent du docteur Trine Aakvik de l'Université des sciences et technologies à Trondheim (Norvège). Le même laboratoire nous a fait parvenir les plasmides pRS44 et pRS48 servant à la construction d'une banque d'ADN génomique (1).

Le premier plasmide, pRS44, provient de pCC1FOS commercialement disponible par Epicentre. Il est modifié pour contenir la région parDEoriT et un gène de résistance à la kanamycine. La sélection pour ce plasmide se fait à la

kanamycine (50 µg/ml) ou au chloramphénicol (12,5 µg/ml chez *E. coli* et 100 µg/ml pour *P. fluorescens*). Le vecteur de transposon suicide, pRS48 a été construit en clonant *trfA* et le gène de résistance à la tétracycline dans pKD20 (16). La sélection pour l'intégration du transposon se fait à la tétracycline (25 µg/ml).

La conservation à long terme des souches bactériennes a été effectuée en congelant à -80°C un aliquot de 700 µl provenant d'une culture bactérienne et en y ajoutant 700 µl de glycérol 40 %. L'ampoule n'est jamais complètement décongelée et la souche est récupérée en grattant le liquide gelé avec une anse de platine stérile.

2.2 Conservation de *Saprolegnia parasitica*

Pour la conservation à long terme, c'est-à-dire de plus de cinq jours, l'isolat a dû être maintenu dans de l'eau distillée stérile puisqu'il ne résiste pas à la congélation. Des rectangles d'agar envahis par *Saprolegnia* ont été découpés à l'aide d'un scalpel stérile et ont ensuite été placés dans une éprouvette vissée contenant 7 ml d'eau distillée stérile. L'éprouvette contenant le champignon a été gardée à température pièce sans précaution spéciale. Pour usage rapide, soit moins de cinq jours, une gélose GYensemencée est gardée à 4°C.

2.2.1 Sporulation de *Saprolegnia parasitica*

Certaines expériences de ce mémoire ont nécessité des zoospores de *Saprolegnia*. Ces spores sont produites selon cette méthode et se conservent pour une semaine sans perte de viabilité. Cette courte période de conservation entraîne la nécessité d'utiliser des spores fraîches pour chaque nouvelle expérience. La production de zoospores commence avec une gélose GY fraîchement

ensemencée avec *Saprolegnia*. Lorsque le champignon a envahi la gélose, c'est-à-dire après 56h d'incubation à 25°C, il faut découper trois carrés d'agar et les déposer dans un flacon de type Erlenmeyer de 125 ml contenant 25 ml de bouillon GY. Après une incubation de 72h à 25°C, on doit retirer le mycélium de l'agar et le laver à trois reprises avec du milieu MSM. Le mycélium, dépourvu de milieu GY, doit maintenant être transféré dans un flacon de type Erlenmeyer de 125 ml contenant 20 ml de milieu MSM et incubé pour un minimum de 48h à 18°C. Il convient ensuite de verser le milieu MSM dans une seringue de 10 ml contenant 1 cm³ de mousse à filtre d'aquarium préalablement lavée à l'eau distillée stérile et de filtrer le milieu MSM. Il faut par la suite centrifuger le filtrat à faible vitesse (500 x g.) et réduire son volume en retirant environ 19.8 ml du milieu MSM. Finalement, on doit utiliser un hémacymètre pour le dénombrement des zoospores.

2.3 Amplifications en chaîne par polymérase, électrophorèse et amorces utilisées

Les échantillons produits par ACP avec l'utilisation du kit Expand High Fidelity PCR System de Roche® et d'un thermocycleur T1 de Biometra® sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,6 % pour les fragments s'approchant de 1000 paires de bases (pb). Le pourcentage d'agarose est augmenté à 1.5 % pour les fragments sous 400 pb. Les échantillons contenant des plasmides ont migré sur gel à 0,6 % d'agarose. Toutes les séparations ont été effectuées à 100 volts pour 1h ou à 20 volts pour 12h en utilisant un tampon de migration. La révélation de l'ADN se fait avec l'utilisation de bromure d'éthidium et d'une lampe UV. Les quantités précises pour la confection du tampon de migration, du gel d'agarose et de mix de la réaction d'ACP sont disponibles à l'annexe II. Aussi, la séquence de toutes les amorces en plus des programmes d'ACP peut être consultée à l'annexe II.

2.3.1 Conditions pour la détection de gènes impliqués dans la synthèse du 2,4-diacetylphloroglucinol

Une ACP a été effectuée en utilisant une paire d'amorces, soit Phl2a et Phl2b, détectant le gène *phlD* qui est nécessaire à la production de l'antibiotique 2,4-diacetylphloroglucinol (211). Un produit de 745 bp est attendu pour une réaction positive. L'ADN bactérien est préparé en ajoutant une colonie dans 25 µl de NaOH 0,4 M. Après 30 minutes à température pièce, il convient d'ajouter 25 µl de Tris 1 M et 450 µl d'eau (226). Ce mélange de 500 µl sert ensuite d'ADN cible dans le reste du protocole.

2.3.2 Conditions pour l'identification de *Saprolegnia parasitica*

L'identification de *S. parasitica* s'est faite par ACP en utilisant une version modifiée de la méthode de Hulvey (112). Le matériel génétique, provenant du mycélium, doit être préparé d'une manière différente d'un échantillon bactérien. Le mycélium est gelé à -20°C et est ensuite pulvérisé à l'aide du mortier dans un tube de 50 ml contenant 1 ml d'eau distillée stérile. Un échantillon de 500 µl d'eau est ensuite récolté à l'aide d'une micropipette en évitant le mycélium et sert d'ADN pour la réaction d'ACP. Deux paires d'amorces différentes sont utilisées pour avoir un résultat plus fiable. La paire d'amorces C1-D2 vise une portion hypervariable du gène de l'ARNr 28s tandis que la paire ITS1-ITS4 vise la région ITS (internal transcribed spacer) (112).

2.3.3 Conditions pour l'identification de *Pseudomonas fluorescens*

Après l'utilisation de tests biochimiques et d'une galerie API20E, l'identité de trois isolats bactériens présumés être *P. fluorescens* a été confirmée par ACP. L'ADN a ensuite été préparé selon la méthode dissolvant la colonie dans du NaOH 0,4 M (2.3.1). La méthode utilisée pour l'amplification au thermocycleur est celle de Mulet *et al.* (181). La première paire d'amorces, PsEG30F et PsEG790R amplifiant *rpoD*, provient de l'article décrivant la méthode et la deuxième paire, Ps-for et Ps-rev visant l'ARNr 16s, vient de Widmer *et al.* (283).

2.4 Test pour la détection de l'activité anti-*Saprolegnia* en gélose (Spot Test)

Pour confirmer qu'une souche bactérienne peut inhiber la croissance de *S. parasitica*, une technique simple et rapide s'imposait. Le protocole suivant ne prend que 6 jours et n'implique que très peu de manipulations. On commence par inoculer un bouillon GY avec la souche bactérienne à tester. Dans le cas d'un *Pseudomonas fluorescens*, il faut ensuite incuber le bouillon pendant 12h à 25°C avant d'en déposer 10 µl sur une gélose GY à 2,5 cm du centre. Cette méthode permet donc de tester 4 isolats sur 1 gélose. On poursuit avec l'incubation de la gélose pour une durée de 48h à une température de 25°C, ce qui laisse le temps au développement d'une grosse colonie bactérienne là où la goutte de 10 µl a été déposée. Ensuite, on dépose 10 µl d'une suspension de spores à concentration avoisinant les $1 \cdot 10^5$ dans le centre de la gélose. Il ne reste plus que l'incubation finale de 96h à 18°C en suivant l'évolution de la croissance du champignon à chaque 12h d'incubation. Il est alors possible de remarquer des changements

dans la croissance normalement concentrique de *S. parasitica* lorsqu'en présence d'une bactérie capable de l'inhiber.

2.4.1 Test pour la détection de l'activité anti-*Saprolegnia* en milieu liquide

Il est possible de visualiser l'activité recherchée d'une manière qualitative en utilisant des carrés d'agar en éprouvette. Ce processus indique la présence ou l'absence d'activité, mais ne permet pas de bien quantifier le phénomène puisque l'inoculum initial peut varier. Un bouillon GY de 5ml, inoculé avec une colonie bactérienne, est incubé à 25°C avec agitation pendant plus de 48h. La culture est centrifugée à 7500 x g pour 5 minutes avant de récolter le surnageant destiné à être filtré sur membrane 0,22 µm. Après la filtration, on transfère 2 ml de ce surnageant stérile dans une éprouvette contenant déjà 2 ml de GY 2X et un carré d'agar envahi par *S. parasitica*. Il ne reste qu'à incuber pour une période 48h à 25°C et à observer la croissance ou l'absence de croissance du mycélium.

Une fois l'activité anti-*Saprolegnia* visualisée par le *Spot-Test* et le test en milieu liquide, on a eu recours à une méthode permettant une quantification de l'activité en utilisant un nombre de zoospores bien défini. Cette méthode requiert une suspension à 2000 spores par millilitre dans du milieu GY 2X. On dépose ensuite 100 µl de cette suspension dans chaque puits d'une microplaque 96 puits. Il faut par la suite ajouter 100 µl de surnageant bactérien stérile à tester et bien mélanger avec un embout de micropipette stérile. La microplaque 96 puits est ensuite incubée à 18°C avec faible agitation pendant environ 50h. On finit par mesurer la croissance du champignon par densité optique au lecteur de plaque à 595 nm en retirant le couvercle de la plaque avant la lecture. Il est à noter qu'il est possible de diluer les surnageants dans du GY, mais qu'il faut conserver un

volume final de 200 µl par puits. Il est aussi préférable d'incuber la microplaque moins longtemps et de suivre la croissance du champignon à intervalle régulier.

2.5 Tentative d'association de l'activité anti-*Saprolegnia* à des activités microbiennes connues

Les techniques du « drop collapse test » et de la « oil spreading technique » ont été utilisées pour comparer la production de biosurfactants de nos souches de *P. fluorescens* à *P. aeruginosa*. Les deux méthodes ont été effectuées conformément aux protocoles décrits par Jain et al. (116) et Morikawa et al. (177). On a doncensemencé 4 ml de bouillon GY avec *P. aeruginosa* PA14, *E. coli* S17-1 ou nos différentes souches de *P. fluorescens*. Après incubation jusqu'à la phase de croissance stationnaire pour les différentes espèces, on a filtré les cultures sur membrane 0,22 µm pour obtenir les surnageants stériles.

Pour la « oil spreading technique » il faut transférer 50 ml d'eau distillée et 20 µl d'huile à moteur dans une boîte de Pétri vide. Une fois que l'huile est stable dans l'eau, on y a déposé 10 µl du surnageant à tester et on a noté le retrait de l'huile.

Concernant la technique du « drop collapse test », on doit préalablement déposer 2 µl d'huile minérale dans le couvercle d'une plaque contenant 96 puits et laisser l'huile envahir la surface pendant 1 heure. On peut ensuite déposer 5 µl de surnageant stérile à la surface de l'huile et observer l'apparence de la goutte pendant quelques minutes. Si la goutte s'affaisse sur elle-même, le test est positif.

2.5.1 Production de cyanure d'hydrogène

La méthode de Lorck (155) a été employée pour obtenir une réponse visuelle qualitative pour évaluer la production de cyanure d'hydrogène par les isolats de *P. fluorescens*. L'apparition d'une coloration allant de l'orange jusqu'au brun indique la production de HCN.

La méthode consiste à ensemencer une gélose GY supplémentée de glycine à 4.4 g/L avec le microorganisme à tester. Il faut ensuite préparer la solution de détection et s'en servir pour complètement imbiber un papier filtre durant 20 secondes. Ce papier filtre est ensuite fixé à l'intérieur du couvercle de la gélose qui elle est fermée et sellée avec du parafilm. Le montage est incubé durant 48h à une température de 25°C avant d'observer le changement de couleur du papier filtre.

2.5.2 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince a été utilisée pour comparer des inconnus avec des standards de molécules connues. Ceci est possible lorsque la séparation a lieu dans les mêmes conditions. Chaque migration est différente en raison des conditions de solvants utilisés ; voici celles utilisées et inspirées d'Ayyadurai *et al.* (14). Le solvant est constitué d'un mélange de méthanol/chloroforme (1:9) et la révélation est effectuée avec une lampe UV à 254 nm.

On commence par faire sécher le support et la plaque de silice à 100°C durant 1h. On poursuit avec la préparation des solvants, en l'occurrence méthanol/chloroforme (1:9), et on les verse dans la chambre de migration. La chambre doit ensuite être refermée pour laisser les vapeurs de solvant la remplir.

Pendant ce temps, la plaque de silice refroidit et on dépose 5-10 µl de surnageant ou 1-5 µl d'extrait au bas de la plaque. On fait ensuite sécher les échantillons avec un séchoir à cheveux et on glisse rapidement la plaque dans la chambre de migration. Une fois la chambre refermée, il suffit d'attendre que le solvant atteigne 95 % de la hauteur de la plaque avant de la retirer de la chambre et de marquer le front de migration. On peut ensuite révéler la plaque avec la méthode choisie.

2.6 Extraction de l'activité anti-*Saprolegnia*

Cette étape sert à simplifier la complexité du surnageant et à en diminuer le volume tout en tentant de conserver l'activité antifongique. Il est préférable d'effectuer ce protocole sur le surnageant tout en utilisant le milieu non inoculé comme témoin négatif. Le matériel récolté à la fin de l'extraction est souvent très faible. Par conséquent, afin d'obtenir une mesure de masse raisonnablement précise, il convient d'extraire au moins un litre de culture. Si l'on veut uniquement tester l'activité d'un extrait (évaluation qualitative), vingt millilitres de culture suffisent. La vaisselle utilisée pour l'expérience doit être fraîchement lavée avec une solution de SDS 1 % et ensuite à l'alcool éthylique.

Cette méthode d'extraction s'effectue sur un surnageant bactérien stérilisé par centrifugation et par filtration sur membrane 0,22 µm. On doit d'abord transférer 20 ml du surnageant stérile dans un flacon de type Erlenmeyer de 125 ml et y ajouter 22 ml de solvant, ici de l'acétate d'éthyle. Agiter vigoureusement, laisser les phases se séparer et retirer le solvant avec une pipette graduée en évitant la phase aqueuse. Répéter l'ajout de solvant, l'agitation et la collecte du solvant au moins deux autres fois puis évaporer le solvant. L'évaporation se fait à l'aide d'un évaporateur rotatif et d'un bain-marie à 65°C. Il est préférable d'avoir une lente évaporation sans bouillir le solvant ce qui peut durer plusieurs heures. Une fois ce processus terminé, récupérer le résidu en y

ajoutant un faible volume de solvant et en le transférant dans une petite éprouvette à paroi mince. Utiliser un séchoir à cheveux pour évaporer le solvant contenu dans l'éprouvette et peser la poudre résiduelle. Ce matériel peut ensuite être resuspendu dans un mélange, eau/acétonitrile, permettant d'exposer *S. parasitica* à l'extrait concentré.

2.7 Fractionnement et comparaison des extraits de culture bactérienne pour l'identification de l'activité anti-*Saprolegnia*

Une première tentative d'identification des composés anti-*Saprolegnia* a été réalisée en fractionnant un extrait de la culture de la souche sauvage. Ceci a comme but de réduire la complexité du mélange à tester. Le fractionnement a été effectué avec un appareil pour chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) Waters 2795 Alliance HT Separation Module, avec colonne C-18, couplé à un spectromètre de masse Quattro Premier XE Micromass R MS Technologies en utilisant le temps comme facteur déterminant le début et la fin d'une fraction. Le liquide injecté provient d'un mélange d'eau distillée et d'extrait ayant été ajusté à 25 % d'acétonitrile. Le matériel insoluble a été retiré par l'utilisation de filtre 0,22 µm. Un volume de 1 ml, total de plusieurs injections, a ensuite été injecté dans l'appareil pour produire les fractions. Ces fractions ont ensuite été évaporées pour être suspendues à nouveau dans le même volume d'eau avec 2 % d'acétonitrile. La fractionnement s'est faite par un gradient d'eau et d'acétonitrile en utilisant une période de 10 minutes pour faire passer la concentration d'acétonitrile de 25 à 100 %. Le test pour la détection de l'activité anti-*Saprolegnia* a ensuite été effectué par la méthode en microplaque. Le chromatogramme des fractions actives a alors fait l'objet d'une comparaison avec celui des fractions inactives dans le but de faire ressortir les ions (m/z) présents uniquement dans les fractions actives.

Une autre approche consiste à générer un mutant surproducteur de l'activité, rendant ainsi possible la comparaison du profil sauvage avec le profil mutant pour trouver des ions plus abondants. Un ion surproduit dans la même proportion que l'augmentation de l'activité et présent dans les fractions actives est considéré pour l'analyse subséquente.

2.8 Détection et quantification de l'acide phénazine-1-carboxylique par HPLC

La détection du métabolite bactérien à l'étude s'est faite directement sur les cultures bactériennes ayant incubé 144h à 25°C avec faible agitation. Avant d'être injectés, les surnageants ont été obtenus par centrifugation et filtration. On injecte au minimum 100 µl de liquide en évitant toute bulle d'air. On utilise une boucle contenant 100 µl, ce qui permet d'injecter un volume plus grand et d'utiliser uniquement le 100 µl requis. L'injection contient 15 µl de surnageant stérile, 30 µl d'acétonitrile contenant 0,5 % d'acide trifluoroacétique (TFA) et 105 µl d'eau distillée stérile. Ce mélange est centrifugé et seulement 130 µl sont récoltés dans une seringue en verre pour l'injection.

L'appareil utilisé dans le cadre de cette expérience est un Beckman-Coulter-HPLC Gold system, fonctionnant avec une colonne analytique C18 de Nova-Pak 3,9x150 mm. Le système est équilibré avec 80 % d'eau distillée et 20 % d'acétonitrile, les deux liquides contenant 0,1 % TFA. L'élution consiste en un gradient linéaire grimant jusqu'à 35 % d'acétonitrile sur une période de 15 minutes. La détection se fait par lumière UV sur l'effluent à 208, 254, 371 et 450 nm. Lorsque nécessaire, l'effluent est récolté dans des tubes en verre et évaporé sous un flux d'azote gazeux. Une fois l'évaporation terminée, l'activité antifongique est testée avec la méthode en microplaque.

Des numérisations de l'interface informatique du HPLC sont disponibles à l'annexe I pour le protocole détaillé.

2.8.1 Spectrométrie de masse pour la confirmation du composé identifié comme étant l'acide phénazine-1-carboxylique

Afin de s'assurer que le composé actif est bien le PCA et que le pic au HPLC contient uniquement ce composé, la fraction correspondante au pic a été récoltée et analysée au spectromètre de masse. Un standard (0.5 µg) a subséquemment été injecté pour comparer avec le surnageant du mutant surproducteur de la souche sauvage. Le spectromètre de masse a aussi été utilisé pour fragmenter la molécule et comparer ce patron de fragmentation à celui du standard.

Des numérisations de l'interface du HPLC et de celle du spectromètre de masse sont disponibles à l'annexe I.

2.9 Mutagenèse chimique des bactéries

Dans le but d'obtenir une souche bactérienne surproduisant l'activité anti-*Saprolegnia*, une mutagenèse chimique a été effectuée sur la souche *P. fluorescens* C5. Une suspension de 1 ml contenant 2×10^8 cellules est centrifugée pour obtenir les cellules bactériennes sans le bouillon. Ces cellules sont ensuite lavées avec du tampon phosphate-sodium 0,1 M et le tampon est retiré après centrifugation. Un deuxième volume de tampon est ajouté aux cellules en plus de 15 µl de méthanesulfonate d'éthyle (EMS). Le tout doit être bien mélangé par inversion et incubé pour une durée de 60 minutes à une température de 25°C avec agitation. L'EMS et le tampon sont rapidement retirés après

centrifugation, puis le culot de cellules est resuspendu dans 200 µl de thiosulfate 5 %. Une fois resuspendu, le culot est transféré dans un nouveau microtube à centrifugation de type Eppendorf et ce tube est centrifugé pour retirer le thiosulfate. Ce lavage doit être répété à deux reprises avant de doucement resuspendre les cellules dans 1 ml de bouillon GY. Cette suspension peut ensuite être diluée et étalée sur gélose GY pour une incubation d'une durée de 48h à température pièce.

La conservation des mutants s'est faite en utilisant une série de duplicata. Lorsque l'incubation de 48h a été terminée, les colonies mutantes ont été repiquées à l'aide d'un cure-dent stérile, dans un puits d'une microplaque 96 puits contenant 100 µl de milieu GY. Le même cure-dent sert ensuite à ensemençer le même puits, contenant 200 µl de milieu GY, d'une deuxième microplaque qui sert de copie. La première série de plaques est incubée pour une durée de 24h à température pièce, puis 100 µl de glycérol 40 % est ajouté à chaque puits. Ces plaques sont alors faiblement agitées avant d'être congelées à -80°C. La deuxième série de plaques sert à tester les mutants en utilisant la méthode en microplaque.

2.9.1 Création d'une banque de l'ADN génomique muté

Le système choisi pour la création de la banque d'ADNg est basé sur l'utilisation du réplicon RK-2 publié par Aakvik (1). Le protocole utilisé consiste en une modification de celui proposé par Lale (140).

2.9.2 Préparation du vecteur (pRS44)

Le protocole de Lale (140) commence par la préparation du vecteur pRS44. Onensemence la souche EPI300 contenant le vecteur sur une gélose LB avec chloramphénicol à 12,5 µg/ml et on incube pour une période de 12 heures à une température de 37°C. Une colonie est alors inoculée dans 9 ml de bouillon LB chloramphénicol et 1 ml de L-arabinose à 10 mM est ajouté pour induire la multiplication du nombre de plasmides dans les bactéries. On incube le bouillon avec agitation (225-250 rpm) pendant 16 à 20 heures à 37°C avant d'extraire le plasmide au phénol acide. Une petite partie de l'ADN plasmidique est ensuite linéarisé, déphosphorylé et purifié avant d'y insérer l'ADN provenant de notre mutant surproducteur.

2.9.2.1 Extraction du plasmide par phénol acide

Pour extraire et purifier le vecteur vide, le protocole d'extraction par phénol acide a été suivi (59). Ce protocole est conçu pour traiter 100 ml de culture bactérienne, mais il a été adapté pour utiliser jusqu'à 250 ml par préparation. Il faut avant tout préparer les solutions énumérées ici-bas, à l'exception de la solution de lyse qui doit être aussi fraîche que possible.

- Solution de lyse : NaOH 0,2 N et sodium dodécylsulfate 1 %.
- Tampon d'extraction acide : NaCl 750 nM, EDTA 10 mM, NaOAc 0,3 M pH 4,2.
- TEG : glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris 25 mM pH 8.
- TE : EDTA 10 mM, Tris 25 mM pH 8.
- Solution à pH basique : EDTA 5 mM, Tris 1.5 M.

On commence par inoculer 100 ml de milieu GY avec antibiotique pour la sélection du plasmide avec 10 ml d'une préculture contenant le plasmide à extraire dans un flacon de type Erlenmeyer de 250 ml. Le flacon est incubé à 37°C pendant 12 heures avec agitation, et les bactéries sont récoltées après centrifugation de 10 minutes à 12000 rpm. Le culot bactérien est resuspendu dans 4 ml de TEG et incubé pour une période de 5 minutes à température pièce. Après l'incubation, 8 ml de solution de lyse est ajoutée et l'Erlenmeyer est incubé durant 10 minutes sur glace après en avoir bien mélangé le contenu. On ajoute et mélange ensuite 5 ml d'une solution d'acétate d'ammonium saturée au liquide dans le flacon Erlenmeyer. Après incubation de 10 minutes sur glace, on procède à la centrifugation du liquide pour une période de 10 minutes et à la filtration du surnageant sur gaze stérile en évitant de déloger le culot. Puis, il convient d'ajouter 0,7 volume d'isopropanol froid au surnageant filtré avant une incubation de 20 minutes sur glace. Par la suite, il faut retirer le surnageant par centrifugation pour une durée de 15 minutes à 12000 rpm. Une fois le culot sec, il est dissous dans 2,4 ml de tampon d'extraction acide et il doit être incubé pendant 5 minutes sur glace. On doit par la suite ajouter 2,4 ml de phénol et retirer la phase aqueuse par centrifugation. Une quantité supplémentaire de 2,4 ml de tampon d'extraction acide est ajoutée à la phase phénolique, puis le tout est passé au vortex avant d'être centrifugé durant 10 minutes à 12000 rpm. La phase aqueuse est alors retirée et on ajoute 1,4 ml de solution basique ainsi que 1,4 ml de chloroforme à la phase phénolique avant de mélanger les liquides au vortex. Par la suite, une centrifugation sert à séparer la phase aqueuse qui doit subir une extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25 :24 :1) avant d'être encore centrifugée. Une dernière extraction, au chloroforme-alcool isoamylique (24 :1), est effectuée sur la phase aqueuse qui est ensuite centrifugée. On ajoute finalement 0,1 volume de NaOAc pH 5,2 et 0,7 volume d'isopropanol à cette phase aqueuse avant de l'incuber durant au moins 30 minutes à une température de -20°C. Il ne reste qu'à

centrifuger et à laver le culot obtenu à l'éthanol 70 % avant de le resuspendre dans un petit volume de TE.

2.9.2.2 Digestion par BamHI

La digestion du plasmide pRS44 a été effectuée grâce à l'enzyme BamHI provenant de New England Biolabs® selon le protocole suivant. On mélange 1 µg d'ADN pRS44 à 5 µl de tampon numéro IV et à 5 µl de BSA. On y ajoute 2,5 µl d'enzyme BamHI à 20 U/µl avant de compléter le volume de liquide à 50 µl avec de l'eau distillée stérile. On termine par une incubation d'une heure à une température de 37°C au bain-marie.

2.9.2.3 Traitement à la phosphatase alcaline

Une fois l'ADN plasmidique linéarisé, un traitement à la phosphatase alcaline est nécessaire pour empêcher la re-ligation du plasmide sur lui-même. La réaction a été réalisée avec le rAPid Alkaline Phosphatase de Roche® en suivant le protocole suivant. On doit d'abord mélanger 1,25 µg de vecteur pRS44 linéarisé à 2 µl de tampon rAPid alkaline phosphatase 10X et à 9 µl d'enzyme rAPid alkaline phosphatase 1 U/µl. Il faut ensuite compléter le volume de liquide à 20 µl avec de l'eau distillée stérile et poursuivre avec une période d'incubation d'une heure à une température de 37°C. Cette incubation est suivie d'une seconde incubation d'une durée 10 minutes à une température de 75°C pour inactiver l'enzyme.

2.9.3 Isolation et purification de l'ADN à être cloné

L'ADN servant à construire la banque génomique peut provenir de plusieurs sources. En l'occurrence, le matériel a été extrait au CTAB du mutant C5-33 d'une

souche environnementale de *P. fluorescens*. Des digestions partielles ont été effectuées avec l'enzyme Sau3AI pour obtenir des fragments entre 1 et 5 kb et l'ADN a été séparé sur un gel d'agarose sans l'exposer à l'ultraviolet. Le gel a ensuite été découpé pour pouvoir purifier l'ADN avec le kit GFXtm PCR and Gel band purification kit de GE Healthcare[®] et la concentration de l'ADN purifié a été déterminée par spectrophotométrie.

2.9.3.1 Extraction de l'ADN génomique (CTAB)

La préparation de l'ADNg s'est faite en utilisant la méthode de Wilson dans Current Protocols in Molecular Biology (285). Il faut préparer les solutions suivantes au deuxième jour du protocole.

-TE : EDTA 10 mM, Tris 25 mM pH 8.

-Sodium dodécyl sulfate 10 %.

-Protéinase K à 20 mg/ml.

-NaCl 5 M.

-Éthanol 70 %.

-Solution bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB) / NaCl : 4.1g de NaCl dans 80 ml d'eau et lentement ajouter 10 g de CTAB en chauffant jusqu'à 65°C en plus d'agiter pour dissoudre le CTAB. Ensuite, on doit ajuster le volume final à 100 ml avec de l'eau distillée.

On poursuit alors l'extraction en récoltant le culot bactérien provenant d'une culture de 1.5 ml centrifugée à 12000 rpm. Le surnageant est jeté puis remplacé par 567 µl de TE en plus de 3 µl de protéinase K et de 30 µl de SDS 10 %. Le culot est donc resuspendu de ce mélange puis incubé durant une période d'une heure à une température de 37°C. On y ajoute ensuite 100 µl de NaCl 5M et 80 µl de la solution CTAB / NaCl avant d'incuber durant 10 minutes à une température

de 65°C. Il faut ensuite ajouter 750 µl de chloroforme et bien mélanger avant de centrifuger pendant 5 minutes à 12000 rpm pour transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube. On ajoute alors 450 µl d'isopropanol ce qui, à l'aide d'une centrifugation d'une minute à 12000 rpm, précipite l'ADN. Le culot d'ADN doit être lavé avec de l'éthanol 70 % et finalement resuspendu dans un petit volume de TE. Par précautions, l'ADNg a ensuite été traité à la RNase pendant 30 minutes à une température de 37°C.

2.9.3.2 Digestion par Sau3AI

La digestion de l'ADNg a été réalisée par l'enzyme Sau3AI provenant de New England Biolabs® selon le protocole proposé plus bas pour la digestion de 1 µg d'ADN. L'ADN est mélangé au tampon II et à de la BSA avant que l'enzyme Sau3AI ne soit ajoutée au mélange. De l'eau distillée stérile est ensuite ajoutée avant d'incuber le tout pendant 1 heure à une température de 37°C pour la digestion. Une incubation finale d'une durée de 20 minutes à une température de 65°C est requise pour inactiver l'enzyme. La digestion complète prend donc 1 heure, mais dans ce cas-ci, on récolte un aliquot à chaque intervalle de 15 minutes pour les digestions partielles. L'objectif est de récolter le génome digéré en fragments variant de 1000 bp à 5000 bp.

2.9.3.3 Ligation des fragments d'ADNg dans pRS44

Après l'obtention de l'ADNg digéré et du vecteur pRS44 linéarisé, il reste à lier les fragments du génome au vecteur. Le protocole de ligation a été effectué en trois réactions différentes pour ne pas favoriser l'insertion des petits fragments par rapport aux plus longs.

On doit donc mélanger le vecteur déphosphorylé au tampon ligase, à l'enzyme T4 DNA ligase et à l'insert avant de compléter le volume final avec de l'eau distillée stérile. La ligation s'effectue durant une incubation d'environ 20 heures à une température de 16°C. Les trois réactions ne contiennent pas exactement la même quantité d'insert puisque les petits fragments se lient plus facilement au vecteur que les gros. Ceci affecte donc la quantité des composants du mélange qui sont répertoriés précisément à l'annexe II.

Suite aux ligations, une petite partie de plasmide avec insert a été digérée par NotI pour vérifier la fréquence d'insertion au site de multiclonaage. Le vecteur pRS44 contient un site de multiclonaage flanqué de sites de restriction NotI, ce qui permet de déterminer la présence et la taille des inserts après migration sur gel d'agarose 0,6 %. Le protocole de digestion est donné ici-bas.

2.9.4 Introduction de la banque d'ADNg dans *E. coli* EPI300

Une fois la banque d'ADN génomique construite dans le plasmide pRS44, il reste à transformer la banque dans la souche EPI 300. L'insertion des plasmides pRS44 contenant les inserts se fait par transformation sur des cellules chimiquement compétentes en utilisant 12,5 µg/ml de chloramphénicol pour la sélection. Le protocole présenté ci-dessous débute par la préparation des tampons pour rendre les cellules compétentes (226).

TfB I

- Acétate de potassium 30 mM ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$)
- Chlorure de potassium 100 mM (KCl)
- Chlorure de calcium 10 mM ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Chlorure manganeux 50 mM ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- Glycérol 15 % ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)
- Ajuster le pH à 5.8 avec de l'acide acétique et stériliser par filtration.

TfB II

- Pipes 10 mM
- Chlorure de calcium 75 mM ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Chlorure de potassium 10 mM (KCl)
- Glycérol 15 % ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)
- Ajuster le pH à 6.5 avec de l'hydroxyde de potassium (KOH) et stériliser par filtration.

On débute par le repiquage d'une quinzaine de colonies d'*E. coli* EPI300 dans 20 ml de milieu 2YT. Ces colonies sont incubées à une température de 37°C avec agitation jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,28 à 550 nm. On ensemence 200 ml de milieu 2YT avec 10 ml de la première avant d'incuber jusqu'à l'obtention de la même densité optique. La culture bactérienne est ensuite refroidie sur glace et centrifugée à 4000 rpm pendant 10 minutes pour récolter les bactéries dans 4 tubes différents. Le surnageant est jeté et les parois internes des tubes sont essuyées avec des papiers Kimwipe. Chacun des culots est resuspendu dans 20 ml de TfB I et est gardé sur glace pendant 5 minutes. Le liquide est alors retiré par centrifugation à 3300 x g. et les parois internes des tubes sont essuyées avec des papiers Kimwipe. Les culots sont par la suite resuspendus dans 2 ml de TfB II et gardés sur glace pendant 15 minutes.

Les cellules étant maintenant compétentes, il faut rapidement les aliquoter en fractions de 100 µl en travaillant sur glace. On doit ensuite les congeler le plus rapidement possible à l'azote liquide ou avec un bain d'éthanol à -80°C.

Il est possible d'utiliser ces aliquots d'*E. coli* EPI 300 compétentes en leur ajoutant un maximum de 10 µl d'ADN. On garde ensuite les cellules sur la glace pendant 30 minutes avant de leur faire subir un choc thermique. Ce choc consiste en une courte période à une température de 42°C suivie d'un retour sur la glace. On ajoute alors doucement 400 µl de milieu 2YT avant d'incuber les cellules à une

température de 37°C pendant 1 heure avec agitation. Il ne reste plus qu'à étaler le contenu des aliquots sur une gélose LB contenant 12,5 µg/ml de chloramphénicol pour la sélection du plasmide pRS44 contenant l'insert d'ADNg.

2.9.5 Transfert de la banque d'ADNg vers *E. coli* S-17

Une fois la banque d'ADNg introduite dans EPI 300, on peut facilement en obtenir de grandes quantités grâce à l'induction du plasmide au L-arabinose et à un protocole de préparation de plasmide par lyse alcaline. La banque est ensuite insérée dans la souche *E. coli* S17-1, qui peut servir de donneur dans la conjugaison. La lyse alcaline utilisée représente une version modifiée du protocole de Maniatis et requiert la préparation des trois solutions ci-bas avant de commencer (226). La transformation a pour but d'introduire le plasmide dans *E. coli* S17-1 et est réalisée de la même manière que l'introduction de pRS44 contenant la banque génomique dans EPI 300 (section 2.9.4).

Solution I

- Tris 25 mM pH 8
- EDTA 10 mM
- Glucose 50 mM
- Conserver sur glace.

Solution II

- NaOH 0,2 N
- SDS 1 %
- Préparer juste avant usage.

Solution III

- KOAc 3 M pH 4,8 (Le pH est ajusté avec de l'acide acétique glacial)
- La solution contient du potassium à 3 M et de l'acétate à 5 M.

Par la suite, il faut poursuivre le protocole par l'inoculation de 10 ml de bouillon LB, supplémenté de 1 mM de L-arabinose et de l'antibiotique pour le maintien de l'insert, avec un aliquot de la banque d'ADNg contenue dans EPI 300. Après 12 heures d'incubation à une température de 37°C, on doit centrifuger la culture en aliquot de 1,5 ml pour une durée d'une minute à une température de 4°C dans une microcentrifugeuse à 12000 rpm. Le surnageant est alors remplacé par 100 µl de solution I et les culots, maintenant resuspendus, sont incubés durant 5 minutes à température pièce. On ajoute ensuite 200 µl de solution II avant de poursuivre avec une incubation d'une durée de 5 minutes sur glace. Par la suite, on ajoute 150 µl de solution III avant d'incuber sur glace pendant 5 minutes. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube après centrifugation et on lui ajoute 2 volumes d'éthanol à température ambiante. Une dernière centrifugation permet d'obtenir un culot qui doit être séché et resuspendu dans un petit volume de TE. C'est ce culot qui est alors transformé dans des cellules d'*E. coli* S17-1 compétentes.

2.9.6 Insertion du gène *trfA* pour le transfert de la banque d'ADNg

La méthode décrite dans le texte de Lale et al. (140) n'est pas adaptée à notre souche réceptrice, mais un protocole maison a été élaboré afin de faciliter la conjugaison. Le milieu PIA est utilisé pour empêcher la croissance du donneur tout en permettant la croissance de *P. fluorescens*. Le maintien du plasmide pRS48 dans *E. coli* S17-1 se fait avec 10 µg/ml de tétracycline et la sélection pour l'insertion de gène *trfA*, qui encode la protéine d'initiation de la réplication du plasmide pRS44, est effectuée avec de la tétracycline à 25 µg/ml.

Le donneur est incubé à une température de 37°C pour une période de 12 heures dans 3 ml de bouillon LB avec l'antibiotique pour le maintien du plasmide. Pendant ce temps, la réceptrice (*P. fluorescens*) est incubée à 25°C durant 16

heures dans 3 ml de bouillon LB. Après 12 et 16 heures, on récolte les cellules par centrifugation à 10000 rpm durant 10 minutes et on lave les culots avec du milieu LB. On doit ensuite resuspendre les cellules à une densité environnant $5 \cdot 10^9$ cellules par ml dans du milieu LB et mélanger 60 μ l du donneur à 60 μ l de la réceptrice. Puis, ce mélange est appliqué sur filtre 0,22 μ m qui repose sur une gélose LBA. Le montage expliqué précédemment est incubé durant 4h à une température de 27°C. Le mélange est ensuite récolté dans du milieu M9+glucose et dilué dans de la solution saline (0,85 % NaCl) avant d'être étalé sur gélose PIA pour la sélection du plasmide.

2.9.7 Conjugation entre le donneur *E. coli* S17-1 et la souche sauvage *Pseudomonas fluorescens* C5 (*trfA+*)

L'étape finale pour l'obtention des transconjugants contenant le plasmide pRS44 avec des fragments génomiques de *P. fluorescens* C5-33 a été réalisée par conjugaison. La méthode est la même que pour l'insertion de pRS48 dans la souche hôte de la banque en modifiant les antibiotiques pour la sélection du plasmide pRS44 pendant l'incubation initiale et après la conjugaison. Il faut donc utiliser 12,5 μ g/ml de chloramphénicol pour le maintien de pRS44 dans la souche *E. coli* S17-1 et 100 μ g/ml de chloramphénicol avec 50 μ g/ml de kanamycine pour la sélection du transfert vers *P. fluorescens* C5 (*trfA+*).

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Trois isolats capables d'inhiber la croissance de *Saprolegnia parasitica*

À la suite du criblage initial des échantillons d'eau de pisciculture pour la présence d'antagoniste à *S. parasitica*, il est essentiel de confirmer les résultats obtenus puisque la méthode utilisée demande une grande dose d'interprétation de la part de l'observateur. La Figure 8 montre justement un exemple d'isolat jugé capable d'inhiber l'oomycète à partir du criblage initial. La vérification de ce résultat se fait aussi sur gélose, mais en inoculant séparément les bactéries et le champignon. Ceci permet d'obtenir une colonie bactérienne de grande taille ayant déjà atteint la phase stationnaire avant d'être envahie par le champignon qui a tendance à recouvrir les petites colonies. À la Figure 9, on montre trois isolats sélectionnés parmi une trentaine sélectionnée après criblage initial. L'inhibition se présente comme une zone sans croissance fongique au pourtour des colonies bactériennes ou alors comme une zone où le champignon est moins dense. Ceci est assez facile à repérer puisqu'on peut voir des déformations dans la croissance concentrique de la moisissure. Lorsque positifs, les essais d'inhibition sont répétés trois fois et différentes conditions d'incubation sont utilisées pour s'assurer que la variation de croissance du champignon n'est pas fortuite.

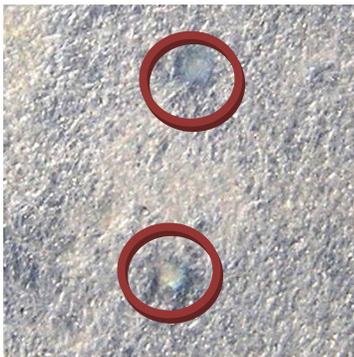


Figure 8 : Criblage initial pour l'inhibition de *Saprolegnia parasitica*

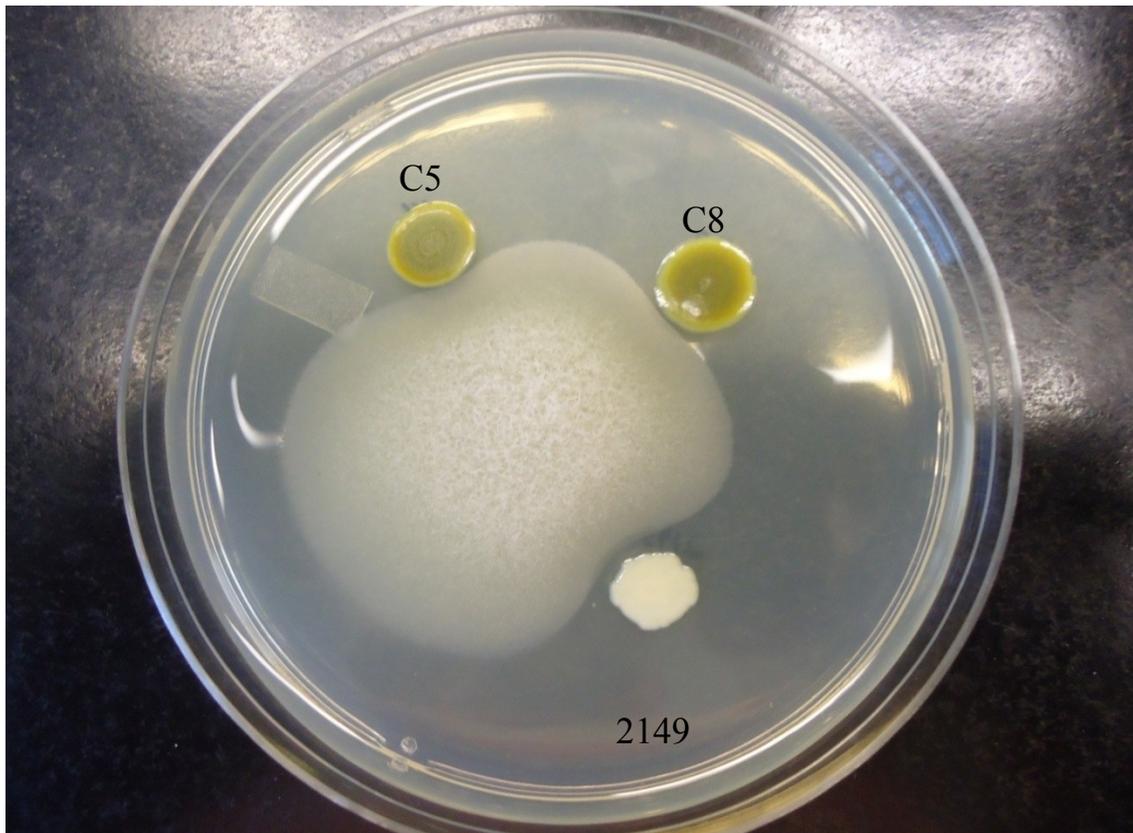


Figure 9 : Inhibition de *Saprolegnia* par trois colonies bactériennes sur gélose.

3.2 L'inhibition se retrouve dans le surnageant de culture

Le test à la Figure 9 nous renseigne uniquement sur la présence d'une activité antifongique. Pour savoir si elle est relâchée dans l'environnement extracellulaire, il faut exposer le champignon à un surnageant de culture bactérienne. Travailler avec un surnageant, obtenu séparément, est avantageux puisque l'expression génique de la bactérie n'est donc pas influencée par la présence d'un compétiteur dans le même milieu restreint. L'isolement de la bactérie permet également de varier l'éventail de températures de croissance, puisque le champignon limitait ce facteur dans les expériences précédentes. Par conséquent, il est préférable de faire varier la température puisque ce facteur

semble impliqué dans la régulation de la production de plusieurs métabolites. Il est possible d'évaluer l'activité d'un surnageant en immergeant un carré de gélose inoculé avec des zoospores dans un mélange de milieu GY et de surnageant stérile. La Figure 10 montre des résultats obtenus grâce à cette technique. Après une période d'incubation de 24h à 25°C on remarque que les hyphes ont complètement envahi les deux derniers tubes servant de témoins négatifs. À l'inverse de ce résultat, les trois premières éprouvettes et leur contenu ont gardé la même apparence qu'avant l'incubation. L'interprétation des résultats se fait de manière qualitative en comparant la croissance du champignon à un témoin contenant uniquement du milieu dilué avec de l'eau distillée stérile. Ce test a également été effectué en triplicata et avec des surnageants de cultures produits à différentes températures.

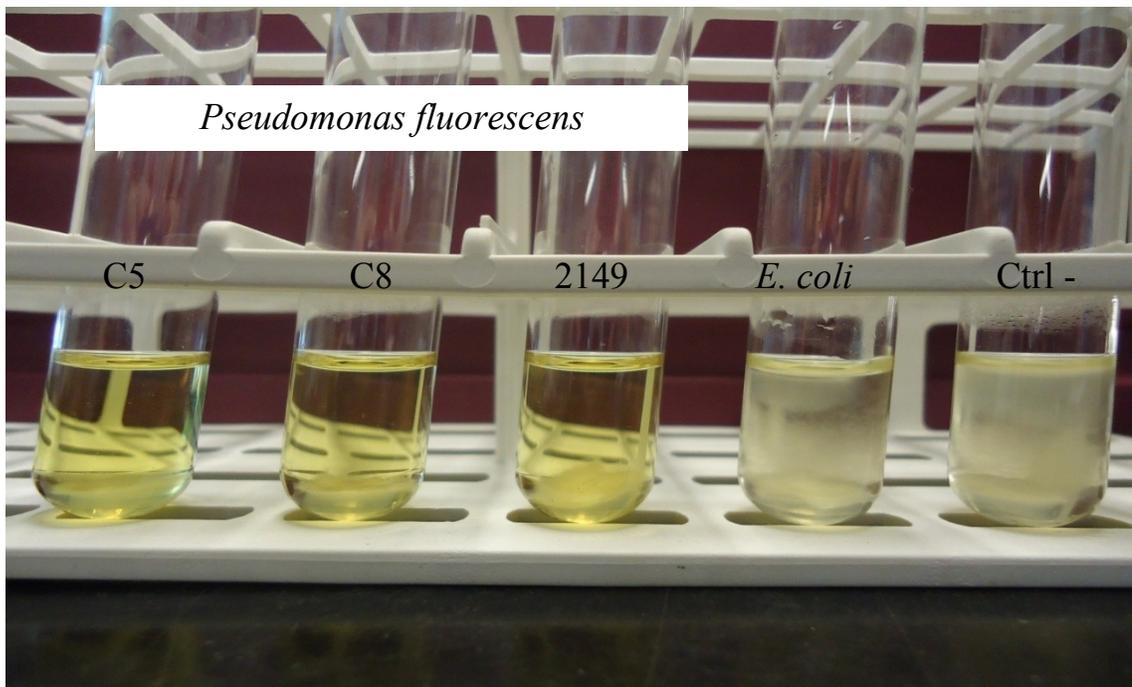


Figure 10 : Test du surnageant de trois isolats possiblement inhibiteurs de *Saprolegnia*. Les trois premières éprouvettes contiennent le surnageant d'un de nos isolats de *P. fluorescens* et les deux dernières recèlent respectivement le surnageant d'*E. coli* et aucun surnageant bactérien en témoin négatif.

Il est important de mentionner que ce test en éprouvette peut être modifié pour obtenir un résultat quantitatif. En effet, il est possible de quantifier la croissance du champignon en déterminant son poids sec. Par contre, cette méthode requiert l'utilisation d'un gros volume de surnageant et de milieu pour supporter la croissance d'une énorme masse de mycélium. Il faut ensuite la faire sécher afin de retirer l'eau et finalement peser la petite masse restante. Cette méthode n'a pas été retenue pour les tests rapides puisque trop longue et fastidieuse.

3.3 Les trois isolats appartiennent au groupe *Pseudomonas fluorescens*

L'identification de nos souches s'est faite en trois étapes pour accroître la fiabilité du résultat final. La première étape requiert l'utilisation du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, qui offre plusieurs tables et schémas d'identification en plus d'un protocole bien défini. Les cultures ayant précédemment été isolées sur gélose GY avec 10 µg/ml de ticarcilline, il ne restait qu'à vérifier la morphologie coloniale sur un milieu riche et non sélectif pour s'assurer d'une uniformité. Nos trois isolats, C5, C8 et 2149, furent caractérisés comme des bacilles uniformes de taille moyenne, à paroi Gram négatif, incapables de fermenter le glucose, capables de réduire le nitrate et positifs au test du cytochrome c oxydase. Selon nos manuels d'identification bactérienne, ces caractéristiques convergent vers le genre *Pseudomonas*. Une fois le genre possiblement défini, nous avons observé les colonies avec une lampe ultraviolette pour détecter visuellement la production de pyoverdine fluorescente. Encore une fois, les trois isolats réagissaient de façon similaire, émettant une lumière en réaction à la lampe UV (résultat non présenté). Ceci suggère que nos bactéries peuvent appartenir au sous-groupe des *Pseudomonas fluorescents*.

Il existe un autre système très rapide pour l'identification bactérienne et sa puissance a été mise à contribution pour confirmer les résultats de l'analyse des caractères morphologiques et physiologiques. En effet, le système de galeries développé par Biomérieux® permet la réalisation de vingt tests biochimiques miniatures pour l'identification rapide et peu coûteuse d'une bactérie. Les résultats obtenus sont comparés à une base donnée standardisée disponible à partir du site Web de la compagnie. Le système choisi fut la galerie API 20 NE qui, après incubation, présente le profil suivant pour les isolats C5 et C8. Le profil obtenu, numéro 1057455, est caractéristique du taxon *P. fluorescens* avec une forte certitude à 99.8 %.

En plus des tests biochimiques, notre identification bactérienne a été complétée par la biologie moléculaire en utilisant l'amplification en chaîne par polymérase et le séquençage des amplicons obtenus. Les amorces PsEG30f et PsEG790R furent utilisées dans un premier temps pour la confirmation de l'identification des trois *P. fluorescens* par leur gène *rpoD*. Le séquençage et la comparaison dans les banques de données ont permis de conclure que C5 et C8 étaient des souches de *P. fluorescens*. Les résultats de séquençage avec la souche 2149 étant moins concluants (espèces possibles de *fluorescens*, *chlororaphis*, *aureofaciens* et *antartica*), une autre région génomique a été amplifiée et séquencée. L'amplification d'une partie du gène ADNr 16S avec les amorces Ps-for et Ps-rev a permis de déterminer que la souche 2149 était aussi du *P. fluorescens*. L'identité des souches C5 et C8 a aussi été confirmée avec cette deuxième paire d'amorces.

3.4-Méthode en microplaque 96 puits

Les prochaines sections exigeaient une méthode plus précise que les puits dans une gélose et moins fastidieuse que la mesure du poids sec tout en restant quantitative. Dans la mesure de la croissance bactérienne, on peut facilement obtenir une valeur en utilisant un spectrophotomètre qui évalue l'absorbance d'une suspension homogène à une longueur d'onde donnée. Cette valeur peut être corrélée à la croissance bactérienne à condition d'avoir une suspension parfaitement homogène. Malheureusement, la croissance fongique de mycélium en milieu liquide produit une suspension extrêmement hétérogène. Conséquemment, on obtient plusieurs amas de mycélium qui remplissent la surface disponible d'une manière plus ou moins irrégulière. Ceci est particulièrement vrai lorsque le champignon remplit tout l'espace disponible et s'accumule sur la paroi d'une éprouvette ou du puits d'une microplaque générant des zones de croissance plus denses. La Figure 11 présente notre solution au problème de corrélation entre la croissance du champignon et la mesure de la croissance par densité optique à 595 nm. Cette corrélation a été évaluée en mesurant la densité optique d'un nombre croissant de zoospores après incubation de 40h, 70h et de 120h à 18°C. On remarque que si l'on mesure la croissance avant que les puits ne soient totalement envahis, on peut obtenir une bonne corrélation entre la croissance du champignon et la densité optique. Celle-ci est presque parfaite pour de basses densités optiques (à 40h et 70h) et se perd plus on augmente les valeurs (à 120h).

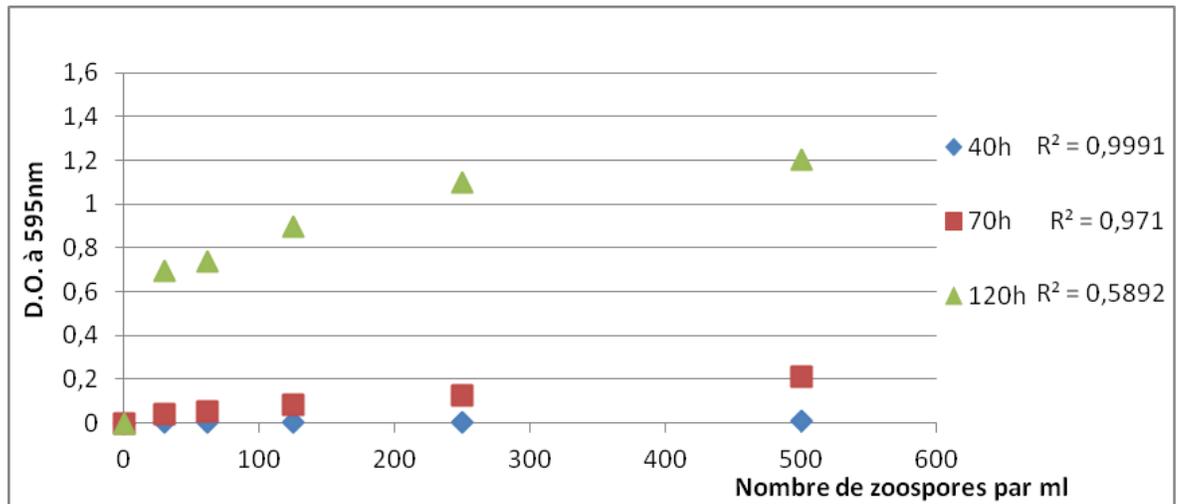


Figure 11 : Évaluation de la croissance de *Saprolegnia* par spectrophotométrie à différentes densités. La croissance a été mesurée au lecteur de plaque après 40h, 70h et 120h d'incubation en milieu GY.

3.5 Le pH, la carence en fer, le 2,4-DAPG et le HCN ne sont pas responsables de l'activité anti-*Saprolegnia* exprimée par les souches sélectionnées

L'activité anti-*Saprolegnia* par nos souches de *P. fluorescens* pourrait être médiée par un certain nombre métabolites connus, que nous avons d'abord investigués. En effet, la croissance bactérienne épuise les nutriments et entraîne une acidification du milieu de culture. Concernant l'épuisement, l'utilisation d'un mélange surnageant et du milieu 2X permet d'obtenir une concentration de nutriment égale ou supérieure à celle de la composition initiale ; ainsi, l'appauvrissement du milieu de culture expliquant une non-croissance fongique ou sa diminution fut rapidement écarté comme possibilité.

Quant au pH du milieu, on observe effectivement une diminution de sa valeur en fonction du temps de croissance. Plus une culture est incubée longtemps, plus le milieu de culture devient acide. Cependant, même après 100h,

le pH, mesuré avec un pH-mètre Fisher Scientific *accumet* AB15 Basic and BioBasic, ne descend pas plus bas que 6.5. Ce faible écart à la neutralité n'est pas suffisant pour inhiber la croissance de l'oomycète (131). Il est important de mentionner que la croissance de l'oomycète augmente légèrement le pH du milieu, ce qui pourrait influencer sa propre croissance dans des incubations plus longues (131). La Figure 12 présente l'effet du pH sur la croissance du champignon. Il faut porter attention à l'absence de différence des valeurs de D.O. entre les pH 7 et 6.5 puisque nos surnageants de cultures exposent l'oomycète à ces pH avoisinants la neutralité.

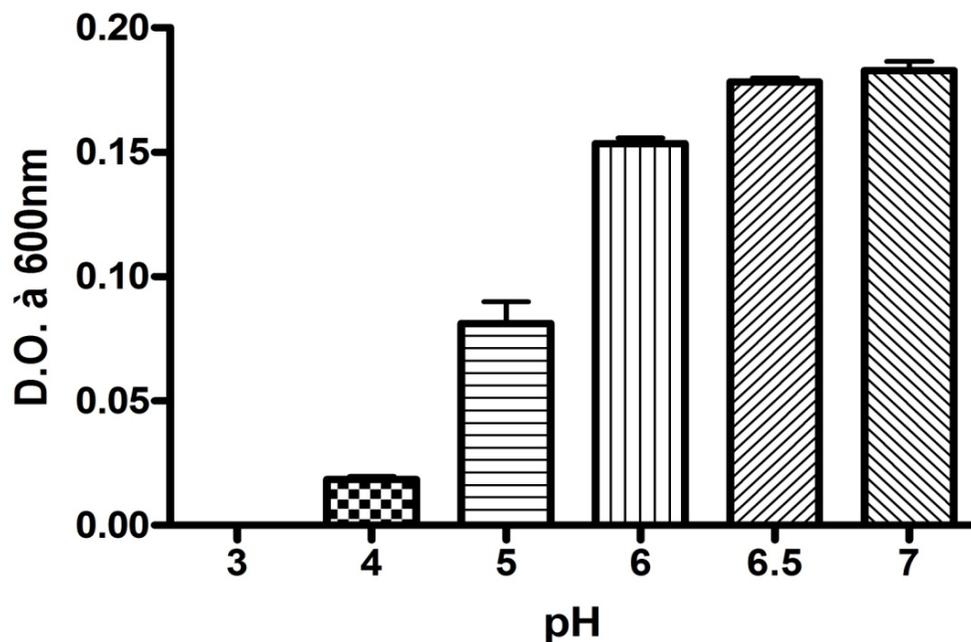


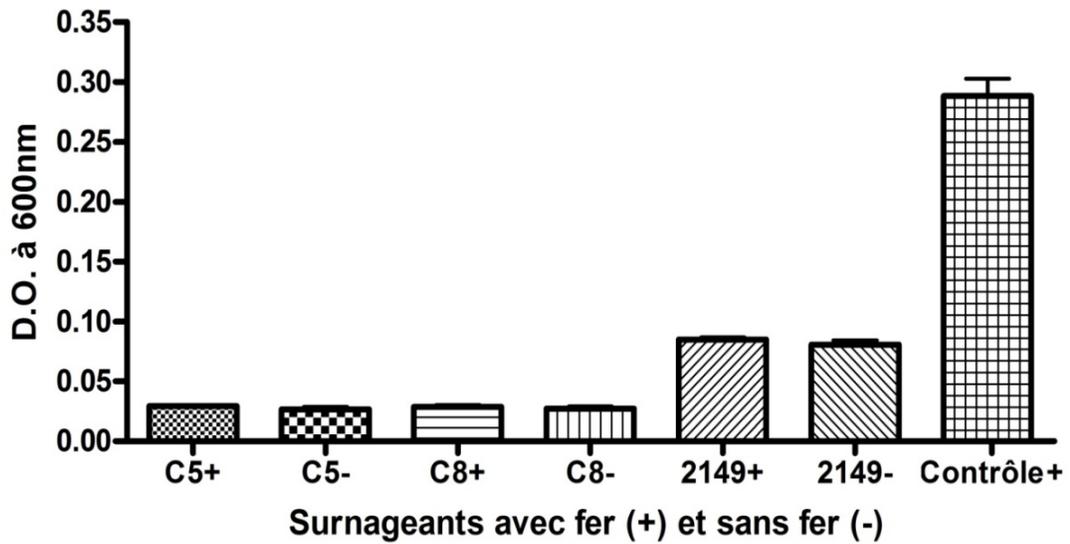
Figure 12 : Effet du pH sur la croissance de *Saprolegnia*. Les valeurs de densité optique ont été mesurées après une incubation de 100h en milieu GY.

Le pH étant éliminé comme facteur d'inhibition, nous avons considéré un des besoins nutritionnels des oomycètes. À cet égard, le fer est essentiel à la

croissance optimale de la plupart des organismes vivants. Ainsi, il envisageable d'inhiber *S. parasitica* en limitant son accès au fer (28 et 278). Le genre *Pseudomonas* produit justement certaines molécules capables d'agir comme sidérophores dont le rôle est de séquestrer le fer du milieu (61). Une de ces molécules, la pyoverdine, a justement été mise en évidence par le jaunissement du milieu B de King's ensemencé avec nos souches de *P. fluorescens* (résultat non présenté). Le possible rôle inhibiteur de la carence en fer a donc été étudié à l'aide de deux approches différentes. La première méthode consiste à ajouter du FeCl_3 dans le milieu de culture et d'y laisser pousser notre souche bactérienne. Nous avons ajouté $100\mu\text{M}$ de FeCl_3 pour s'assurer de réprimer la production de sidérophores par nos bactéries du genre *Pseudomonas*. Après incubation dans ces conditions, on obtient un surnageant, théoriquement dépourvu de sidérophores (228). Il est à noter que ce surnageant n'a pas la même apparence, moins jaune-vert, qu'un surnageant d'une culture en condition normale (résultat non présenté).

La deuxième méthode consiste à ajouter le FeCl_3 , encore à raison de $100\mu\text{M}$, dans le mélange surnageant et milieu de culture avec zoospores. Cela n'empêche pas la production du sidérophore, mais le fer en excès devrait corriger la carence en fer dû à la présence de sidérophores, si tel est le cas. La Figure 13 indique que l'absence de fer disponible ne semble pas être responsable de la réduction de croissance de *Saprolegnia* puisqu'il n'y a aucune différence entre le milieu de culture supplémenté en fer lors de la croissance bactérienne (Fig. 13A) ou après croissance (Fig. 13B). On peut aussi conclure que l'ajout de fer pendant la croissance bactérienne n'affecte pas la production de l'activité antifongique puisqu'il y a encore inhibition de *Saprolegnia* à la Figure 13A. L'absence de différence pour la croissance de *S. parasitica* lorsque qu'incubé 40h à 25°C en présence ou en absence de FeCl_3 (Fig. 13) est observable peu importe le surnageant testé et la méthode utilisée, l'ajout de fer ne semble donc pas affecter la croissance de *S. parasitica* de manière significative.

A



B

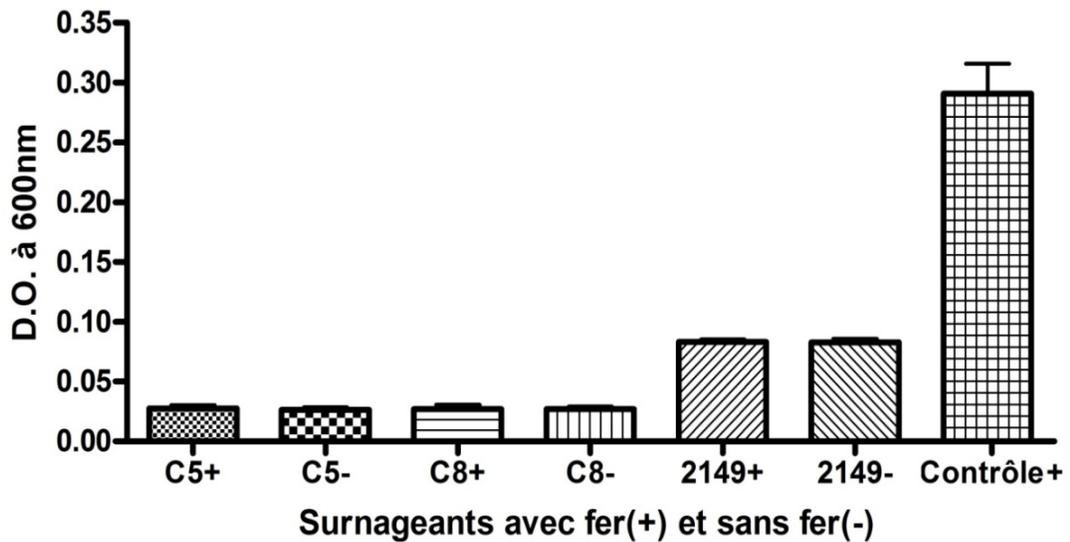


Figure 13 : Effet du fer (FeCl_3) sur la croissance de *Saprolegnia* lorsqu'ajouté (A) à la culture bactérienne ou (B) ajouté au surnageant stérile. Les cultures bactériennes ont été incubées 48h en milieu GY à 25°C avant d'en retirer le surnageant par filtration.

Puisque l'effet anti-*Saprolegnia* de nos souches de *P. fluorescens* ne semble pas médié par un milieu carencé en fer, l'implication d'autres métabolites associés au biocontrôle fût investiguée. Certains auteurs ont rapporté que le pouvoir antimicrobien de *P. fluorescens* pouvait être dû à la production de cyanure d'hydrogène (273). L'ionisation du HCN produit l'anion CN^- qui est hautement toxique puisque l'anion arrête la respiration cellulaire en inhibant le cytochrome c oxydase (8). Nous avons utilisé la méthode de Lorck afin d'avoir un résultat qualitatif pour la production ou l'absence de production du HCN (155). Cette méthode consiste à ensemencer une gélose avec ajout de glycine et de fixer un papier filtre à l'intérieur du couvercle de la gélose avant l'incubation. Ce papier filtre est saturé d'une solution contenant de l'acide picrique et du carbonate de sodium, ce qui permet la réduction du picrate de sodium en un composé rouge. Plus la couleur du filtre s'éloigne du jaune pour aller vers le rouge-brun, plus il y a production de HCN. Dans le cas de nos trois souches, les papiers sont restés jaunes tandis qu'une coloration brunâtre est apparue sur le filtre de la gélose ensemencée avec *P. fluorescens* Pf-5 (résultats non présentés). On peut donc conclure qu'il n'y a pas de production détectable de HCN par nos souches, sauf chez notre témoin positif.

Certains isolats de *P. fluorescens* possèdent les gènes requis pour la synthèse du 2,4-diacétylphloroglucinol qui sert déjà dans la lutte contre les phytopathogènes comme *Pythium* spp. et *Phytophthora* spp (18 et 126). Nous avons tenté de mettre en évidence le gène *phlD* indispensable à la synthèse du 2,4-DAPG par son amplification en utilisant les amorces décrites par Raaijmakers *et al.* (211). En utilisant la méthode publiée et certaines variations, nous n'avons jamais réussi à amplifier le fragment de 745 paires de bases indiquant la présence du gène recherché. La Figure 14 expose un des résultats négatifs pour l'amplification du gène *phlD* de nos trois souches de *P. fluorescens* et positif dans le cas de notre souche contrôle *P. fluorescens* Pf-5.

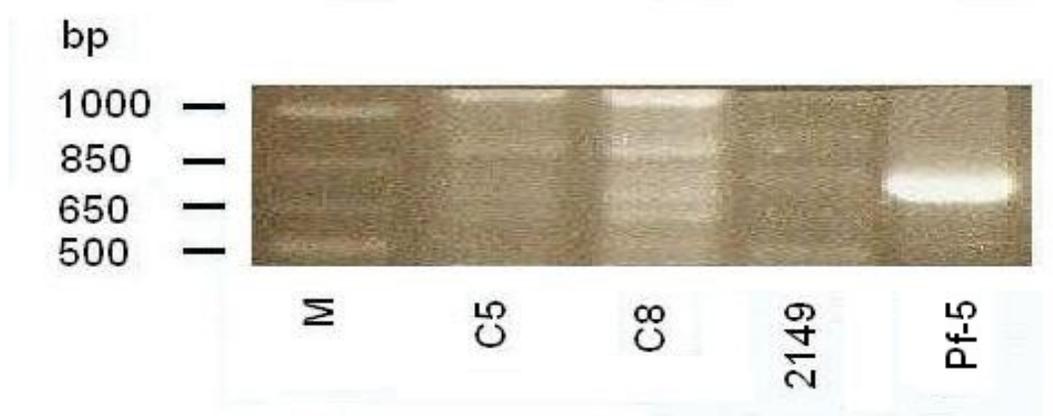


Figure 14 : Électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'ACP provenant de l'ADN génomique de nos souches *Pseudomonas fluorescens* C5, C8 et 2149 amplifié avec les amorces *phl2a* et *phl2b*. La colonne M contient le marqueur 1KB Plus DNA Ladder de Invitrogen™ et la colonne Pf-5 contient l'ADN génomique de *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, amplifié avec les mêmes amorces, en contrôle positif.

Les résultats des amplifications en chaîne par polymérase, tous semblables à la Figure 14, suggèrent que nos trois isolats sont incapables de produire cet antibiotique. Pour confirmer cette possibilité, les gènes *phl* de *P. fluorescens* Pf-5 pouvant être différents de ceux chez *P. fluorescens*, nous avons utilisé des plaques en silice pour effectuer des chromatographies sur couche mince (ccm). Un petit volume de surnageant ou d'extrait concentré a été déposé sur la plaque avec un capillaire et cette plaque a été migrée avec une mixture chloroforme/méthanol (1:9). On peut ensuite révéler la plaque à l'ultraviolet, puisque le 2,4-DAPG absorbe à 254 nm, et comparer la migration de nos échantillons avec celle du standard purifié. Dans ces conditions, le standard de 2,4-DAPG a un rapport frontal (Rf) de 0.77, ce qui ne correspond pas aux Rfs détectés dans nos échantillons (résultat non présenté). Les résultats de l'ACP et de la CCM éliminent le 2,4-DAPG comme responsable de l'activité anti-*Saprolegnia* dans nos échantillons.

Finalement, nous avons considéré l'implication des biosurfactants dans l'activité anti-*Saprolegnia* puisque *P. fluorescens* est une bactérie capable de produire des lipopeptides cycliques, certains rhamnolipides et orfamides ayant des propriétés antifongiques (25, 92 et 169). Nous avons utilisé les méthodes décrites par Morikawa *et al.* (177) et Jain *et al.* (116), qui permettent une évaluation visuelle de la production ou l'absence de surfactants. La première technique consiste à déposer une goutte de surnageant sur une mince couche d'huile flottant au-dessus de l'eau dans une gélose. Si un surfactant est présent, l'huile fuit rapidement la goutte déposée. C'est exactement ce qui s'est produit avec le surnageant de *P. aeruginosa* PA14, mais pas avec nos échantillons (résultats non présentés). La deuxième technique requiert un puits d'une plaque 96 puits que l'on enduit d'une mince couche d'huile. On dépose ensuite une petite goutte de surnageant sur l'huile. Si la goutte de liquide reste bien ronde et ne s'effondre pas sur elle-même, il n'y a pas de surfactant. Si la goutte s'effondre et remplit le fond du puits, il y a présence de surfactants. Le premier phénomène a été observé avec nos trois échantillons alors que l'effondrement de la goutte n'est visible qu'avec le surnageant de *P. aeruginosa* PA14 (résultats non présentés). Ainsi, l'implication des biosurfactants comme responsables de l'activité anti-*Saprolegnia* n'a pas été retenue.

3.6 Isolement de mutants surproduisant l'activité anti-*Saprolegnia*.

Puisque ce projet de recherche visait à l'identification de nouvelles activités microbiennes pouvant contrôler le problème de la saprolégnoise, nous avons décidé de tenter d'isoler des mutants surproduisant cette activité. C'est pourquoi nous avons effectué une mutagenèse chimique à l'éthyl méthane sulfonate (EMS) sur la souche C5. Pour ce faire, une culture en fin de phase exponentielle fut

exposée à 1,48 % d'EMS pendant 60 minutes à température pièce avant d'être étalée sur gélose afin d'obtenir des colonies isolées. Un tel traitement cause environ 75 % de mortalité et nous avons donc obtenu environ 7000 colonies d'apparences plutôt hétérogènes que nous avons ensuite congelées pour études futures.

Nous avons ensuite procédé au criblage de la banque de mutants pour identifier des surproducteurs de l'activité anti-*Saprolegnia* de même que des mutants ayant perdu cette capacité : ces derniers pouvaient être intéressants dans l'élucidation des voies de biosynthèse menant à cette activité antifongique. Ce criblage a été effectué avec du surnageant stérile, centrifugé et chauffé à 65°C, avant d'être mélangé à 8 % avec du milieu contenant des zoospores. Le chauffage est nécessaire, puisque la centrifugation des plaques n'est pas suffisante pour obtenir du surnageant stérile. La température de 65°C élimine les *P. fluorescens* mais ne détruit pas complètement notre activité. L'utilisation d'une petite quantité de surnageant avec une courte incubation permet de garder les valeurs de densité optique assez basses pour réaliser une lecture fiable au spectrophotomètre. Après le criblage initial, nous avons sélectionné une centaine de mutants à tester de manière plus précise avec plusieurs dilutions de leur surnageant (résultats non présentés). La Figure 15 présente les résultats pour les deux mutants potentiels sélectionnés en deuxième tour pour leur activité anti-*Saprolegnia*. On y voit, à quantité de surnageants égaux, que le champignon pousse moins bien lorsqu'en présence du surnageant du mutant C5-33 (Fig. 15C). Un résultat d'inhibition, intermédiaire à celui de la souche C5 (Fig. 15A) et du mutant C5-33, est obtenu lorsque *S. parasitica* est exposé au surnageant du mutant C5-10 (Fig. 15B).

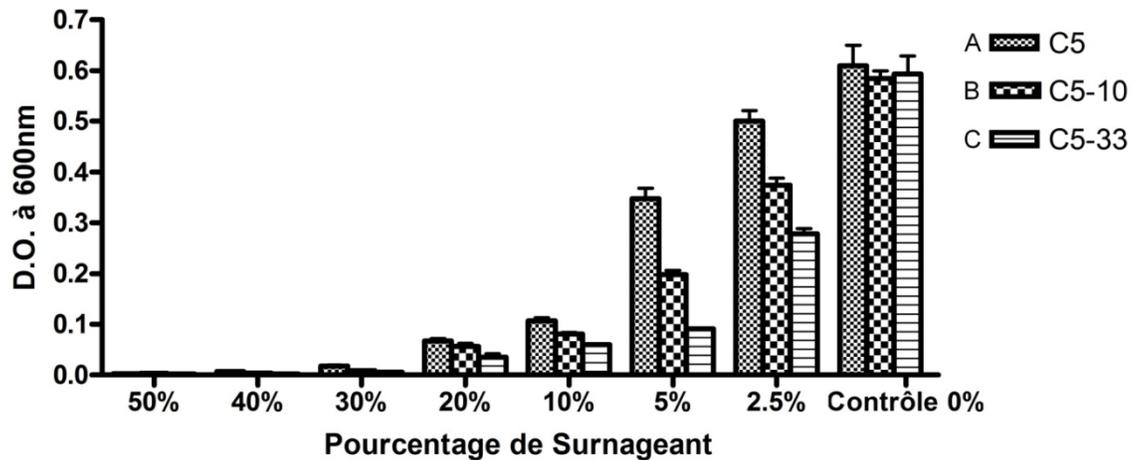


Figure 15 : Comparaison de la croissance de *Saprolegnia* lorsqu'en présence du surnageant de la souche sauvage (C5) ou des meilleurs mutants (C5-10 et C5-33) surproducteur de l'activité anti-*Saprolegnia*. Les bactéries ont été incubées 72h jusqu'à l'obtention d'une valeur de densité optique à 600 nm environ égale pour les trois cultures.

Les mutants C5-10 et C5-33 ne présentent pas uniquement le phénotype de surinhibition de l'oomycète. Les Figures 16 et 17 montrent certaines différences au niveau morphologique qui ont aussi été causées par la mutagenèse chimique. Les mutants ont tendance à développer de plus petites colonies avec une coloration verte plus marquée que la souche sauvage (Fig. 16). De plus, les motilités par « swimming » et « swarming » sont respectivement diminuées et augmentées par rapport à la souche sauvage C-5 (Fig. 17).

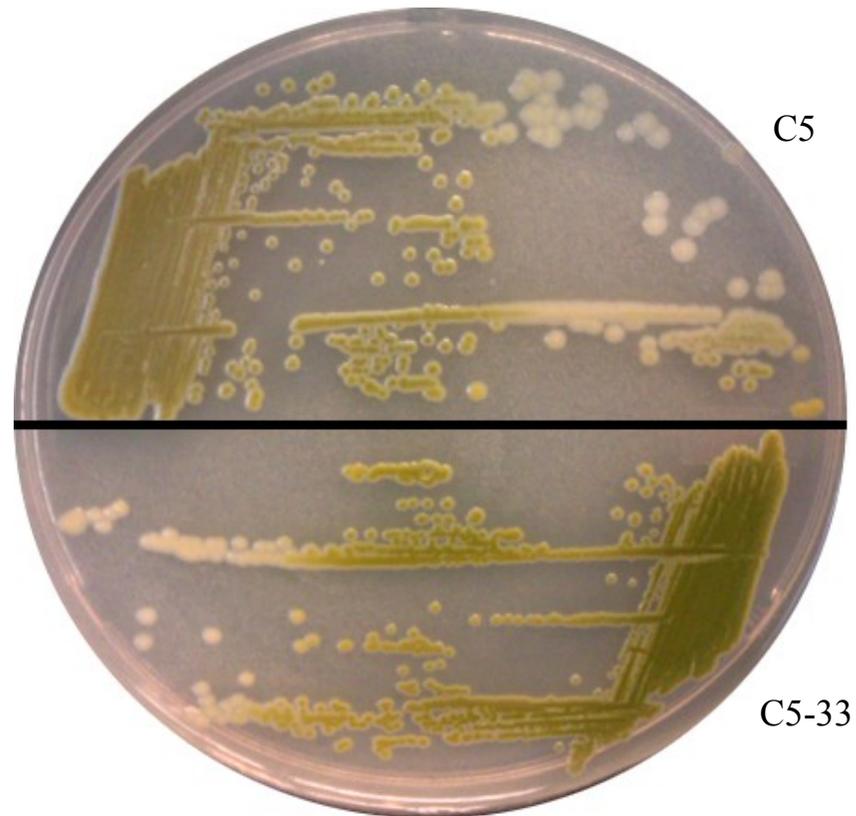


Figure 16 : Morphologie coloniale de la souche C5 et du mutant C5-33 sur gélose GY.

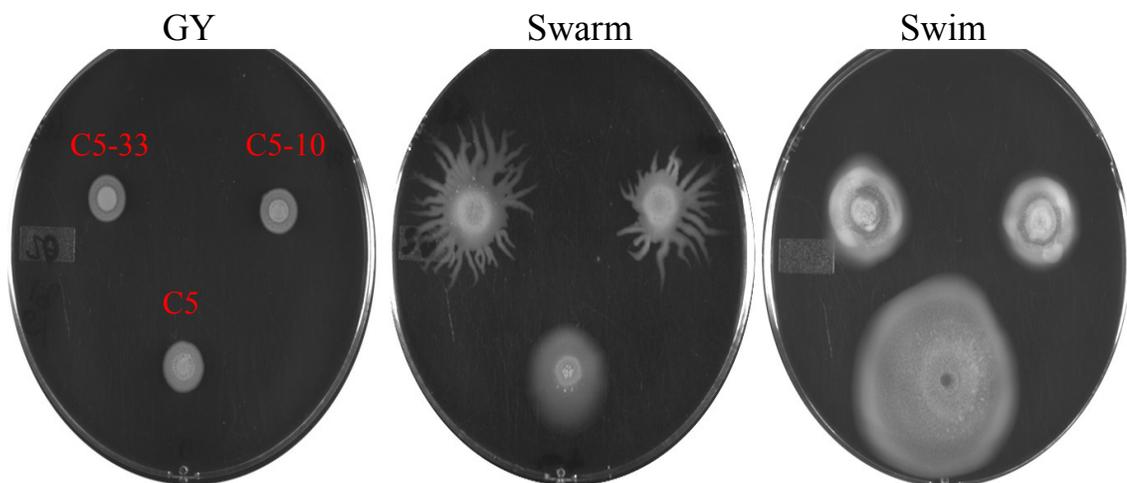


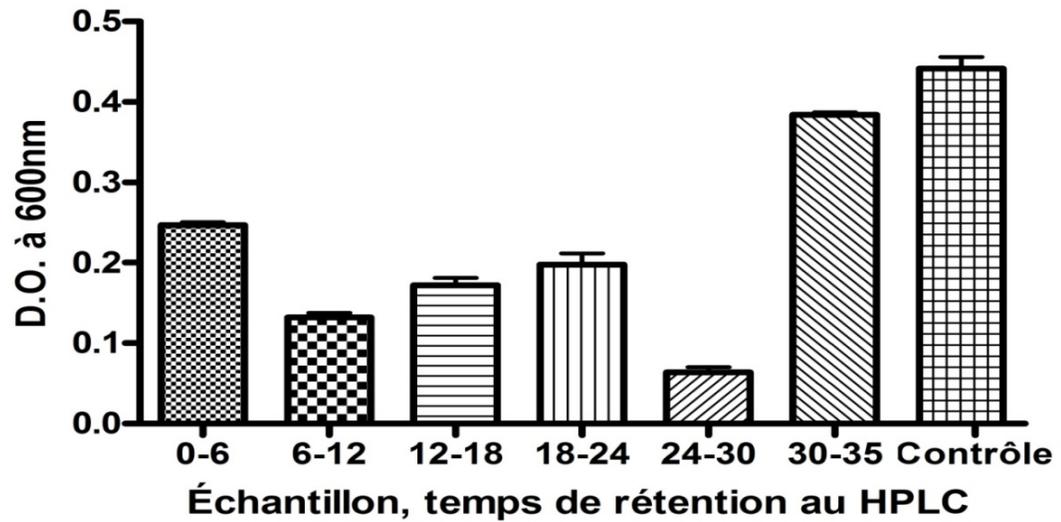
Figure 17 : Motilité des souches C5, C5-10 et C5-33 sur gélose GY, Swarm et Swim.

Étant désormais en possession d'un mutant intéressant, nous avons décidé de tenter d'isoler l'élément responsable du phénotype surproducteur et de le transférer dans la souche sauvage pour reproduire l'effet. Ceci a été effectué en modifiant le protocole de Lale *et al.* (140) (sections 2.9.1 à 2.9.7). Celui-ci permet l'expression de gènes dans une bactérie Gram négatif en utilisant un vecteur RK2 construit par le groupe de Valla (1). Le vecteur en question ne contient pas de promoteur, puisqu'il sert dans un criblage où la nature de l'insert est inconnue. Le plasmide pRS44 a été utilisé pour l'insertion, dans la souche sauvage, de l'ADNg provenant de notre souche mutée C5-33. Ce plasmide provient du produit commercial pCC1FOS (Epicentre) avec l'ajout de *parDE* pour la stabilité du réplicon. L'origine de conjugaison *oriT* a également été ajoutée pour permettre le transfert du plasmide à plusieurs hôtes différents. Le fonctionnement de cette deuxième origine, utilisée dans la bactérie réceptrice de la banque, requiert la présence de TrfA en *trans*. Il convient donc d'insérer le gène *trfA* dans le chromosome de la bactérie réceptrice, ici *P. fluorescens* C5, avant d'y conjuguer la banque d'ADNg. Ceci est possible grâce à un vecteur suicide, pRS48, contenant un transposon sélectionnable avec 25 µg/ml de tétracycline. Nous avons donc commencé par l'isolement du vecteur pRS44 pour ensuite le digérer avec l'enzyme BamHI. Nous avons par la suite extrait l'ADNg de notre mutant C5-33 et partiellement digéré cette préparation d'ADN avec l'enzyme Sau3AI. Les fragments d'ADNg digérés sont ensuite insérés dans le vecteur vide et le tout est réintroduit dans la souche sauvage C5. Nous avons utilisé la même méthode de criblage que pour la mutagenèse chimique. Après le criblage d'environ 2000 colonies, nous avons obtenu deux candidats possédant le phénotype de surproduction. Les deux plasmides furent extraits des bactéries respectives et réintroduits dans la souche sauvage, ce qui leur a encore conféré le phénotype recherché de surproducteur. Nous en sommes maintenant au séquençage des fragments génomiques présumément responsable de l'activité anti-*Saprolegnia*.

3.7 Responsable : l'acide phénazine-1-carboxylique

Ce travail a comme objectif à long terme le développement d'une nouvelle approche biothérapeutique visant à contrôler le problème de la saprolégniose. Pour ce faire, il serait nécessaire d'attribuer une identité à la molécule ou aux molécules responsables de l'activité anti-oomycète de nos surnageants de cultures. Nous avons donc tenté de réduire la complexité du milieu de culture de sorte à faciliter l'identification du facteur responsable de l'activité recherchée en utilisant le milieu SSM qui est plus pauvre que le milieu GY. Dans la même optique, le surnageant de culture a été extrait à l'acétate d'éthyle avant d'être concentré par évaporation et fractionné au HPLC pour tenter de séparer l'activité de reste du mélange. La Figure 18 illustre la croissance de *S. parasitica* lorsque incubé 46h à 18°C en présence des différentes fractions produites au HPLC pour les isolats C5 (Fig. 18A) et 2149 (Fig. 18B). Les fractions sont identifiées en fonction du temps écoulé après l'injection de l'extrait dans la machine. On remarque des variations dans l'inhibition de la croissance particulièrement pour la deuxième (6-15) et la sixième (24-29) fraction de la souche 2149 (Fig. 18B). Malgré une séparation intéressante, aucune suite n'a été donnée à ces fractions puisque l'activité de ces fractions n'était pas stable. Nous avons quand même pu constater que certaines fractions de l'échantillon C5 (Fig. 18A) présentent une légère coloration jaunâtre, particulièrement la deuxième (6-12) tandis que les autres sont incolores.

A



B

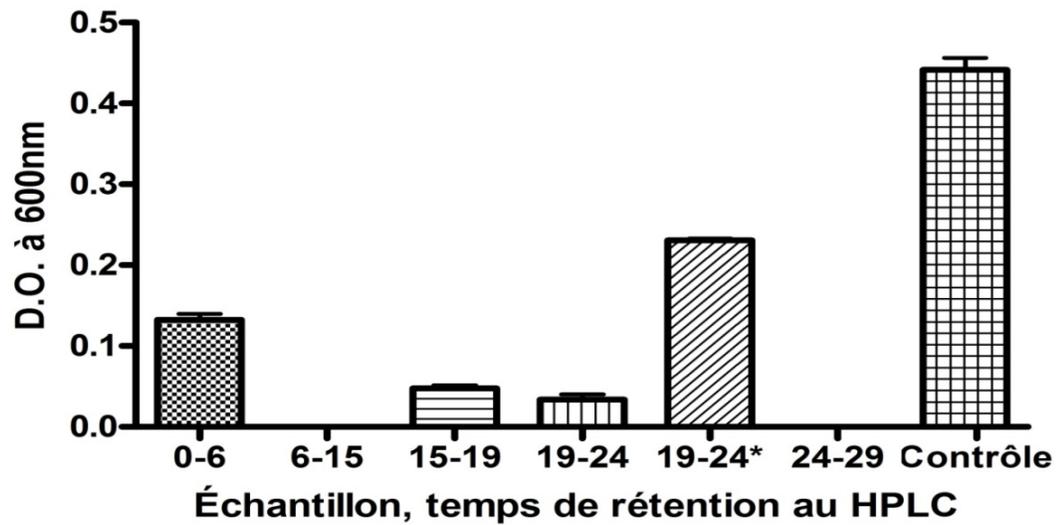
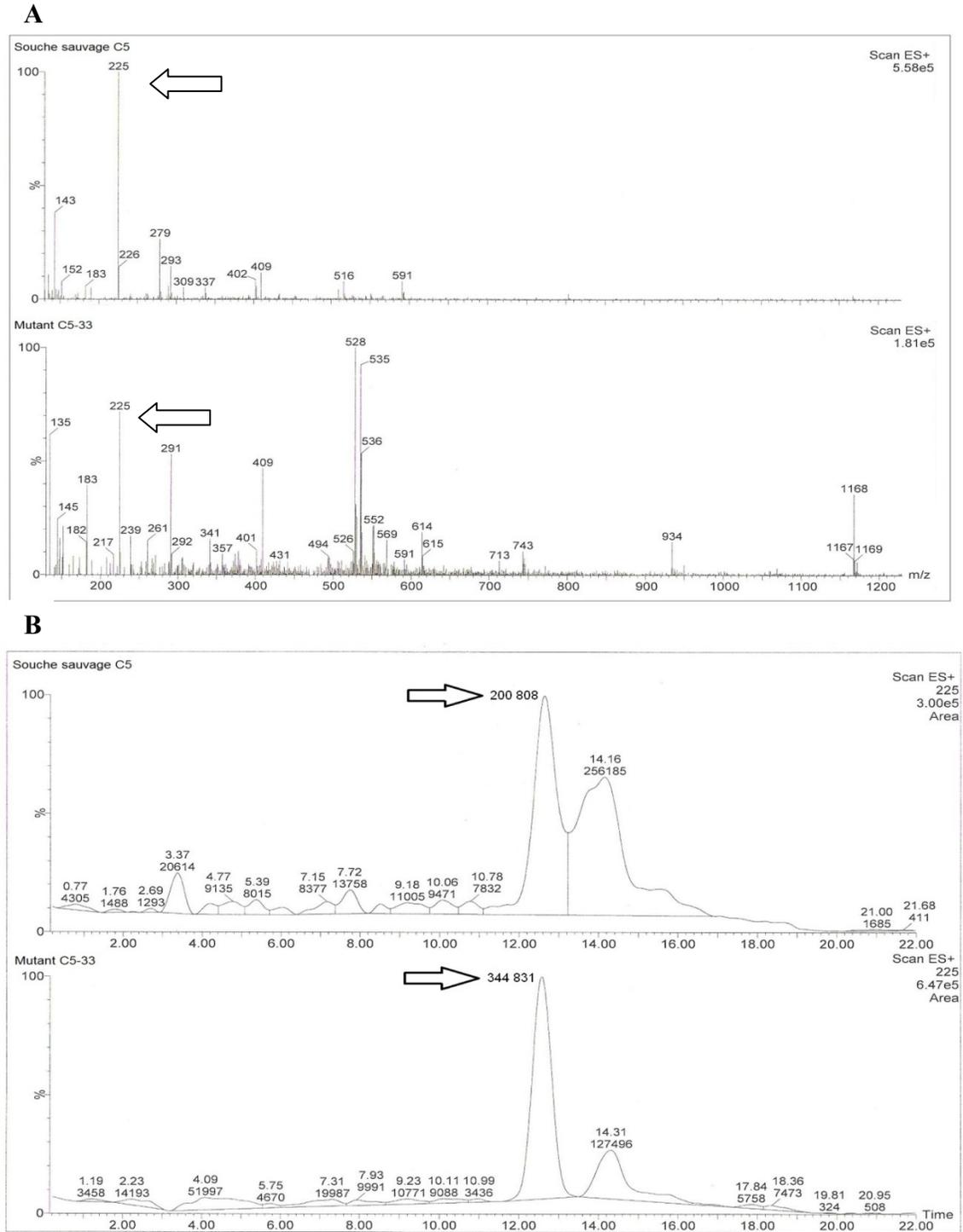


Figure 18 : Effet des fractions récoltées après séparation au HPLC provenant des isolats C5 (A) et 2149 (B) sur la croissance de *Saprolegnia* mesurée par densité optique.

Maintenant en possession du mutant surproducteur C5-33 et avec la certitude que l'activité anti-*Saprolegnia* n'est pas perdue dans le fractionnement, nous avons décidé de comparer le profil chromatographique obtenu au spectromètre de masse de la souche sauvage à celui du mutant (résultat non présenté). Ceci pourrait permettre l'identification d'un ion plus abondant responsable de l'activité anti-*Saprolegnia*. Ce dernier devrait être retrouvé près des intervalles de temps 6-12 ou 24-30 minutes, puisque ce sont les fractions les plus actives dans l'expérience préliminaire montrée à la Figure 18A. Cette masse devrait aussi être moins présente ou absente des fractions moins actives de la Figure 18. Nous avons finalement considéré la présence d'une couleur jaunâtre dans la recherche, puisqu'elle pourrait être reliée à l'activité. En utilisant les critères ci-haut, nous avons sélectionné les ions m/z 192, 225, 303, 331 et 376 pour poursuivre notre analyse (résultats non présentés). Nous avons ensuite commencé par l'analyse de l'ion 225, détectée à la Figure 19, puisqu'il répond le mieux aux critères mentionnés plus haut. De plus, cet ion correspond également à celui produit par un antifongique connu sous le nom d'acide phénazine-1-carboxylique. Cet antifongique possède des maximums d'absorptions à 208 nm, 254 nm, 371 nm et 450 nm, tout comme notre surnageant à la Figure 20 (212).



ion monitoring). Ce chromatogramme est reconstruit uniquement avec le m/z 225. L'aire sous la courbe indique que C5-33 produit plus de 225 que C5

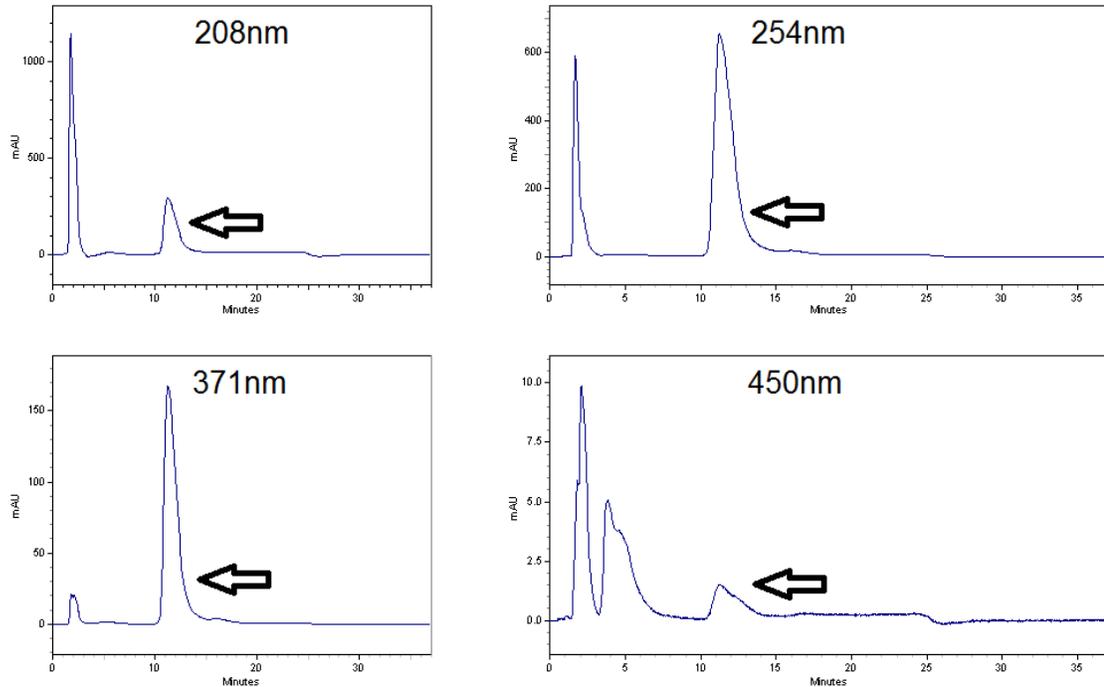


Figure 20 : Maximums d'absorptions du surnageant de la souche sauvage C5 au HPLC.

Finalement, nous avons utilisé un spectromètre de masse pour nous assurer d'avoir effectivement isolé et identifié la molécule responsable de l'activité anti-oomycète. Ceci est possible en comparant une fraction récoltée au HPLC à la molécule purifiée disponible commercialement. On s'assure avant tout que la fraction récoltée possède encore l'activité recherchée en utilisant la méthode en microplaque. Ensuite, notre échantillon est injecté dans le spectromètre de masse avant l'injection du produit purifié. Lorsque nécessaire, un standard interne, ici le HHQ-D4, est ajouté à l'échantillon pour s'assurer du bon fonctionnement de l'appareil analytique et aussi pour servir de standard interne pour la quantification relative. Les profils, retrouvés à la Figure 21, sont ensuite comparés en espérant retrouver des masses identiques dans les deux échantillons.

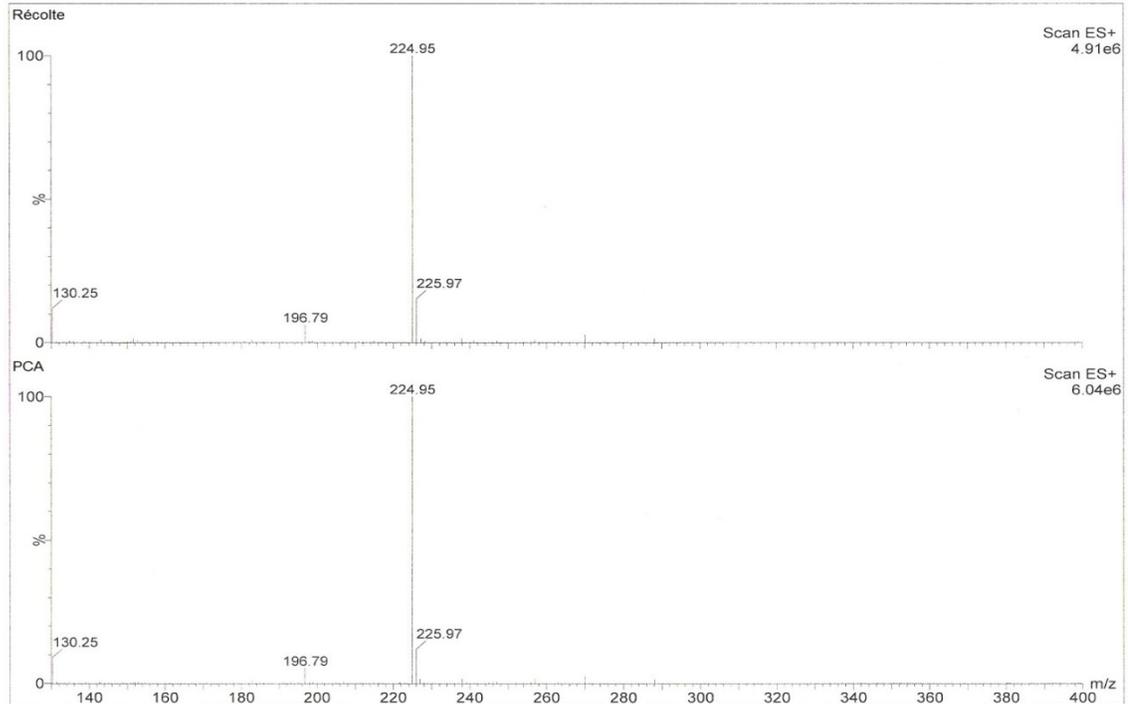


Figure 21 : Spectrophotogramme de l'échantillon récolté au HPLC et de l'acide phénazine-1-carboxylique pur.

Puisqu'on retrouve des masses identiques pour la récolte et le PCA standard à la Figure 21, nous avons procédé à l'analyse des ions fils générés par collision. Chaque molécule présente un patron différent lorsque fragmentée en ions et celui-ci peut être utilisé pour identifier une molécule par rapport à son standard purifié. On commence par faire un balayage pour trouver les fragments générés et on termine par une lecture uniquement aux masses concernées. Dans notre cas, la fragmentation du standard et de notre échantillon nous laisse les ions 224, 206 et 178, présentés à la Figure 22. Cette co-élution des ions-fils produits par la collision confirme que la nature du produit.

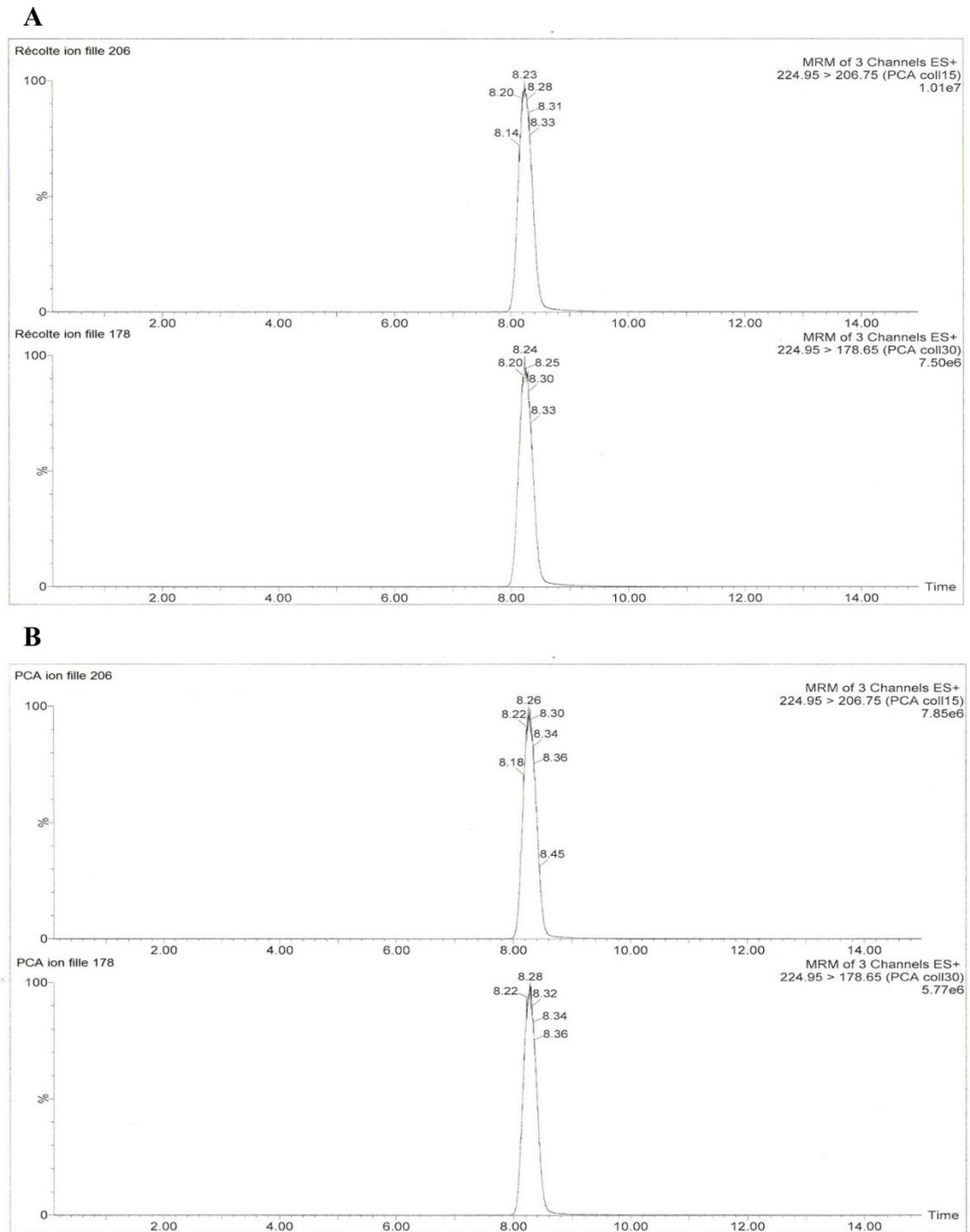


Figure 22 : Spectrophotogramme montrant les ions fils (206 et 178) d'une fraction d'un échantillon de surnageant récoltée au HPLC (A) et de l'acide phénazine-1-carboxylique pur (B).

3.8 Quantification de l'activité et de la production de PCA

Le PCA ayant été identifié comme un des possibles responsables de l'activité anti-*Saprolegnia* du surnageant de culture de l'isolat C5, nous avons procédé à la détermination de la concentration minimale inhibitrice. La faible solubilité du PCA dans l'eau empêche de tester de fortes concentrations à partir d'un stock en méthanol sur le champignon puisque la molécule précipite. Ce problème a été contourné en utilisant un stock en acétonitrile chauffé avant de diluer le produit à un maximum de 70 µg/ml. La concentration de 70 µg/ml est justifiée par le pourcentage d'acétonitrile qui ne doit pas dépasser 1.5 %, ce qui inhiberait *S. parasitica*. À la Figure 23, chaque concentration de PCA est ajustée pour contenir 1.5 % acétonitrile, comme dans le témoin de croissance positif. Cette Figure 23 présente les variations de croissance du champignon en présence de différentes quantités de PCA pur. L'activité anti-oomycète reste plutôt faible jusqu'à la dose de 20 µg/ml (Fig. 23) qui inhibe fortement *S. parasitica*.

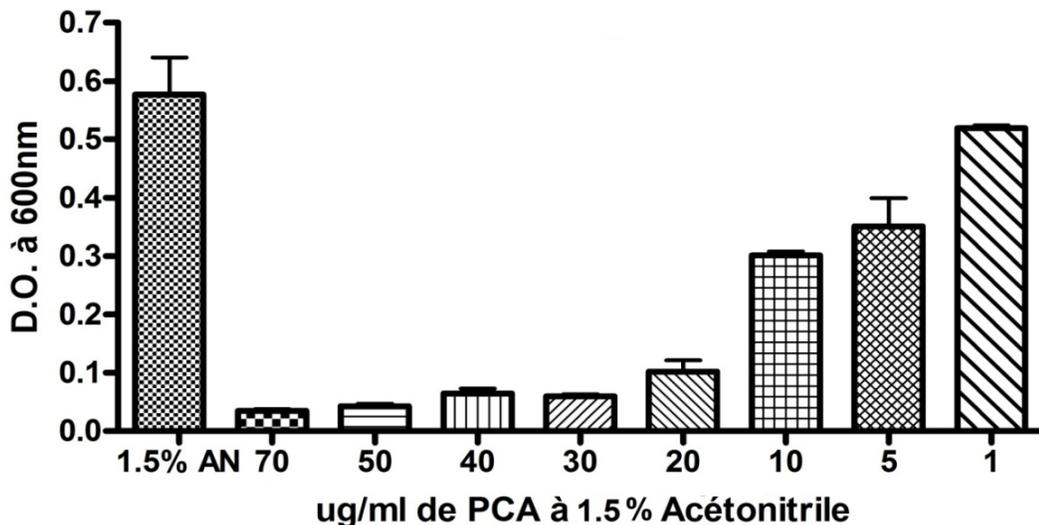


Figure 23 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice du PCA sur *Saprolegnia parasitica*. La croissance de *S. parasitica* est mesurée par densité optique en présence de différentes concentrations de PCA.

Ayant maintenant une idée de l'inhibition produite par le PCA, nous avons quantifié la molécule dans le surnageant en utilisant un HPLC et deux standards de concentrations connues à 2 µg/ml et 5 µg/ml. L'utilisation des standards, combinée à la fonction intégration du système, permet de trouver une valeur numérique indiquant la présence de 1 µg/ml de PCA dans le surnageant. Cette valeur mathématique a alors été comparée aux chiffres obtenus pour les injections des surnageants. Ceci a été effectué aux longueurs d'onde 254 nm et 371 nm, puisque ces valeurs sont deux maximums d'absorbance du PCA. Les données numériques ainsi récupérées sont présentées au tableau II ici-bas.

Tableau II : Valeurs pour la quantification relative du PCA par intégration présent dans les surnageants de culture. Les cultures ont été incubées en milieu GY à 25°C avec faible agitation pour 72h avant d'être filtrées et injectées au HPLC.

	à 254 nm	à 371 nm
Standard 2 µg/ml	5 238 562	1 245 224
Standard 5 µg/ml	14 288 576	3 230 979
Surnageant C5 à 10 %	59 776 443	14 709 424
Surnageant C5-33 à 10 %	115 496 656	29 799 786
Valeur calculée pour 1 µg/ml	2738 498	634 404
Concentration estimée C5	218 µg/ml	231 µg/ml
Concentration estimée C5-33	421 µg/ml	469 µg/ml

Ces valeurs mathématiques ne sont que des estimations selon une courbe standard à deux points. Nous avons vérifié les résultats en récoltant le pic correspondant à la molécule au HPLC et en testant son activité sur le champignon. En nous basant sur les données au tableau II, nous avons préparé un échantillon à 10 µg/ml (Fig. 24 R10) et un autre à 20 µg/ml (Fig. 24 R20) à partir du surnageant injecté au HPLC. Si les valeurs du tableau II sont fiables, les deux échantillons devraient inhiber le champignon autant que les dilutions 10 % et 5 % du surnageant de la souche C5. La Figure 24 montre le résultat attendu pour les deux

récoltes avec quelques variations probablement causées par la préparation des échantillons avant le test sur le champignon. Ceci suggère aussi que la très grande majorité de l'activité anti-*Saprolegnia* de *P. fluorescens* C5 est liée au PCA.

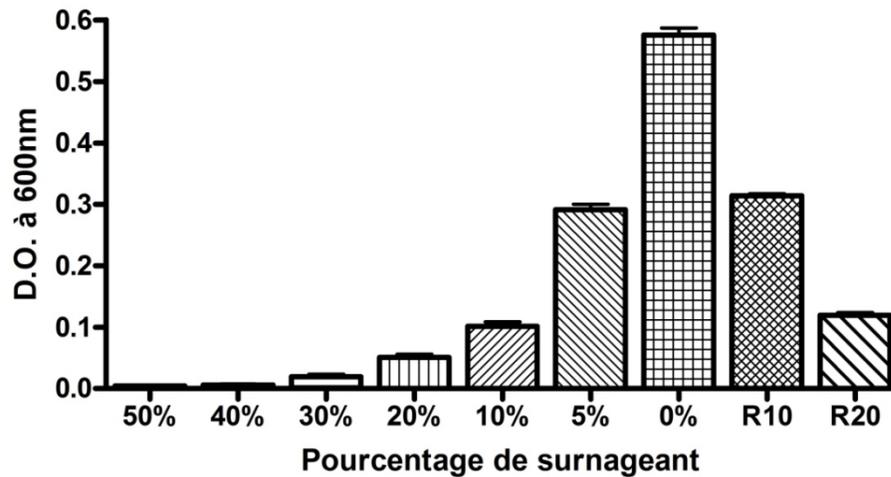


Figure 24 : Vérification de la quantification du PCA par l'évaluation de la croissance de *Saprolegnia parasitica*. La croissance de *S. parasitica* a été mesurée par densité optique en présence du surnageant de culture de la souche bactérienne C5 et en présence du surnageant récolté après fractionnement au HPLC pour obtenir uniquement du PCA.

Chapitre 4 : Discussion et perspectives

4.1 Collection des isolats

La méthode utilisée pour la collecte de microorganismes aquatiques s'est avérée extrêmement efficace. Il a suffi d'une petite quantité d'eau, récoltée dans un réceptacle stérile, pour ensemer un grand nombre de géloses. Une des limites de cette méthode provient de la variété des points d'échantillonnages possibles. Il est fort probable que, si nous avions criblé l'eau sortant du système de recirculation ou d'un autre bassin, nous aurions obtenu différents microorganismes. Nous avons choisi de procéder ainsi malgré cette limite puisque la récolte initiale a permis la collection d'un grand nombre d'organismes d'apparences variées. L'identification de certains de ces inconnus a été réalisée pour s'assurer de retrouver des microorganismes marins et non des contaminants humains. Nous avons retrouvé, identification par ACP, des *Vibrio* spp., des *Burkholderia* sp., et énormément de *Pseudomonas* sp., ce qui est conforme aux attentes pour un milieu aquatique contenant des animaux marins (33).

Étant confiants de la nature de nos échantillons, nous avons procédé au premier criblage pour l'activité anti-*Saprolegnia*. Cette manipulation est probablement la plus hasardeuse du projet puisque le repérage des colonies capables d'inhiber le champignon s'est fait à l'œil nu ce qui rend le processus très subjectif. Il va sans dire que si nous répétions la manipulation, sur les mêmes échantillons ou d'autres, nous pourrions obtenir des bactéries différentes avec ce phénotype inhibiteur. Ceci pourrait expliquer la différence entre nos résultats et ceux obtenus par Bly *et al.* en 1997 (28). Leur isolat de *P. fluorescens* produisait un surnageant incapable d'affecter *Saprolegnia* sp., tandis que nos isolats produisent le résultat inverse. Ces résultats ne sont pas nécessairement incompatibles, mais viennent plutôt proposer un exemple de la grande variété d'organismes retrouvés dans un environnement.

4.2 Variation et optimisation de la production de PCA

Les conditions environnementales affectent la production des différentes phénazines, et ce de manière souche dépendante (217). Dans cette optique, notre milieu GY a probablement contribué à la production d'une grande quantité de PCA puisque le glucose et le glycérol en augmentent la synthèse (238). Quant à l'azote, son rôle a brièvement été étudié en incorporant différentes sources à notre milieu. L'urée, l'asparagine, la peptone ou l'ion NH_4^+ n'ont pas semblé augmenter l'efficacité du surnageant pour l'inhibition l'oomycète, ce qui concorde avec les résultats obtenus chez *P. fluorescens* 2-79 (238). En ce qui concerne l'optimisation par rapport au pH, nous avons commencé avec un milieu à pH 7 puisque cela représente l'optimum de croissance de plusieurs *P. fluorescens* (200). Les changements de pH ont diminué l'inhibition de *Saprolegnia parasitica*, probablement à cause de l'effet négatif sur la croissance de la bactérie. Ceci est également compatible avec la souche *P. fluorescens* 2-79 produisant le plus de PCA à pH 7 (238). Il serait toujours pertinent de poursuivre l'optimisation avec l'ajout de certains acides aminés. En effet, la tyrosine et la phénylalanine stimulent la production de PCA chez *P. aeruginosa* A237 et chez *P. aureofaciens* 517 (138 et 139). L'ajout de magnésium est également à considérer, puisque cet ion améliore la production de PCA chez *P. fluorescens* 2-79 (237).

Que ce soit avec la souche sauvage C5 ou le mutant surproducteur, les rendements de PCA ont toujours légèrement varié probablement à cause de la régulation par « quorum sensing ». Ensuite, nous avons observé un changement dans la couleur du surnageant ainsi qu'un ralentissement de la croissance bactérienne lors de la préparation d'un gros volume de culture. La couleur jaune-vert fluorescente devient un vert très pâle chez les deux souches. Par la suite, nous avons découvert que ces surnageants avaient perdu plus de 50 % de leur capacité inhibitrice. Cette réduction de l'inhibition rendant l'isolement de la

molécule plus ardu, nous avons poussé l'analyse de cette situation. Une différence entre les deux conditions expérimentales s'explique par l'absence d'agitation à 250 rpm pour les flasques à gros volume. Ceci a tendance à causer la précipitation des bactéries au fond du flacon Erlenmeyer d'un litre, ce qui ne se produit pas avec les erlenmeyers de 250 ml qui sont bien agités. Cette précipitation semble aussi empêcher la formation d'agrégats bactériens sur les rebords et d'une pellicule sur le dessus de la culture. À la lumière de ces observations, nous avons considéré que l'agitation pourrait être importante pour le rendement de nos souches. Nous avons ensuite utilisé des plaques agitatrices pour tenter d'émuler le même effet que celui produit par l'incubateur agitateur sur les petits contenants. L'amélioration de l'aération a été accompagnée d'une augmentation de la croissance bactérienne et de la capacité d'inhibition, cette dernière restant malgré tout inférieure à celle observée en plus petits volumes de culture. Tout comme pour la production de protéase extracellulaire chez *Pseudomonas* sp., une agitation de la culture est capitale à une bonne synthèse de PCA (64). La synthèse de PCA, métabolite secondaire, étant contrôlée par « quorum sensing » il faudrait refaire les cultures à 10-20 % du volume du flacon Erlenmeyer pour obtenir une bonne agitation et aération menant probablement à une meilleure production de PCA.

Même avec une agitation et un milieu propice à une forte production de PCA, le rendement reste décevant lorsqu'en culture dépassant la capacité d'un petit flacon Erlenmeyer. Nous avons ensuite tenté de corriger le problème de rendement en augmentant l'aération de nos cultures puisque le changement de couleur du surnageant pourrait être lié à une diminution d'oxydation due à la présence réduite d'oxygène. *P. fluorescens* étant une bactérie à métabolisme strictement aérobie, la présence d'une importante quantité d'oxygène pourrait contribuer à une grande production de PCA. De plus, il est envisageable que la dernière étape d'oxydation menant au PCA soit positivement affectée par l'oxygène d'une manière semblable à la régénération du FMN en FMNH₂ (51). Une

meilleure aération a été obtenue grâce à l'utilisation d'erenmeyer de deux litres remplis avec un maximum d'un litre de cette culture. L'utilisation du plus gros récipient avec le même volume de milieu produit une plus grande surface de contact du liquide avec l'air ambiant. C'est finalement avec cette meilleure aération que nous avons pu obtenir un surnageant inhibant *Saprolegnia* aussi bien que celui venant d'une culture en éprouvette ou d'un flacon Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu. Cette dépendance à une certaine présence d'oxygène n'est pas différente de celle observée chez *Pseudomonas* sp. M18G pour la production d'acide phénazine-1-carboxylique (150).

4.3 Suivi sur la mutagenèse

L'objectif premier de la mutagenèse chimique étant l'obtention d'un surproducteur de l'activité anti-*Saprolegnia*, la caractérisation des mutants est demeurée très superficielle. Il a quand même été possible d'observer certaines différences entre des mutants et la souche sauvage. La première observation concerne bien sûr la différence d'activité anti-*Saprolegnia* entre la souche sauvage C5 et le mutant C5-33 montrée à la Figure 15. Cet effet pourrait être expliqué par une mutation affectant directement l'opéron *phz*, par exemple le gène *phzC*. Ce dernier est impliqué dans la modification positive de l'apport de carbone à la voie du shikimate menant au fort niveau d'acide chorismique nécessaire à la biosynthèse du PCA (168). Une activation hâtive de ce gène, une duplication, ou une élimination de la répression pourrait mener à une augmentation de la quantité de PCA produite.

D'autres différences entre les mutants et la souche sauvage nous ont poussés à considérer que la mutation ait affecté un gène à l'extérieur de l'opéron *phz*. En effet, la souche mutante C5-33 présente une morphologie (Fig. 16) à coloration plus foncée et à colonies plus petites que la souche sauvage. De plus,

les morphologies des motilités de type « swimming » et « swarming » (Fig. 17) sont inversées par rapport à la souche sauvage. Ces résultats morphologiques suggèrent qu'un régulateur global a été affecté par la mutagenèse. Une mutation ponctuelle pourrait avoir inactivé un système répresseur de la transcription. Un tel répresseur de la production de phénazines existe chez *P. aureofaciens* et *P. chlororaphis* sous la forme du système de « quorum sensing » RpeA et RpeB (276). Chez *P. fluorescens*, il existe justement deux histidines kinases non caractérisées faisant partie d'un système de régulation à deux composantes avec des séquences semblables à celles des gènes *rpeA* et *rpeB* (281). Il serait aussi pertinent d'investiguer la possibilité qu'une mutation ait affecté le système GacA/GacS en touchant un homologue des gènes *rsm*. Chez plusieurs espèces de *Pseudomonas* les gènes *rsmE* et *rsmA* encode une protéine liant l'ARNm qui cause une répression post-transcriptionnelle affectant, entre autres, la production d'antibiotique (143). Ce phénotype a déjà été remarqué chez *P. fluorescens* CHA0 puisqu'une inactivation d'un des deux gènes augmente légèrement la production de plusieurs antibiotiques (218). Dans le même article, il est intéressant de remarquer que la double inactivation de *rsmE* et *rsmA* augmente fortement la production d'antibiotiques par *P. fluorescens* CHA0.

À la fin de la section 3.6 des résultats, il est impossible d'affirmer avec certitude que notre phénotype d'augmentation de l'inhibition a bien été transféré de nouveau dans la souche sauvage. Le contenu du plasmide pRS44 avec insert initial n'ayant jamais été séquencé, il pourrait contenir un insert capable d'augmenter la production de PCA autre que la mutation causée par l'EMS. On peut penser que l'insert contient le gène *phzA* sauvage qui influence la production de PCA de manière dose dépendante (62) C'est justement la duplication de ce gène chez plusieurs *Pseudomonas* qui est responsable de leur forte production de PCA en comparaison avec les *Burkholderia*, *Pantoea*, *Vibrio* et *Pelagibacter* capables de synthétiser des phénazines (169). Toujours concernant les gènes *phz*, la présence de *phzI* sur le plasmide pourrait mener à la production d'une plus

grande quantité du 3-OH-C₆-HSL responsable de l'activation de *phzR* et du reste de l'opéron de biosynthèse par « quorum sensing » (127). Cette situation a déjà été décrite quant à la production de PCA par *P. aureofaciens* en présence d'une duplication des gènes de « quorum sensing » *csaI* ou *csaR* (299).

4.4 Le PCA

Au savoir de l'auteur, l'aboutissement de ce projet à l'acide phénazine-1-carboxylique constitue la première instance rapportant l'activité de cette molécule contre *S. parasitica*. En rétrospective, il n'est pas surprenant d'obtenir un tel résultat puisque le PCA était déjà reconnu pour son inhibition de certains oomycètes pathogènes tels que *Pythium myriotylum*, qui s'attaque aux racines des plants de taro (254). Les membres du genre *Pythium* ne sont pas les seuls oomycètes vulnérables au PCA puisque *F. oxysporum* est lui aussi inhibé par cette phénazine *in vitro* (44).

L'isolement du PCA est encourageant de par certaines caractéristiques de la molécule en question. Premièrement, cette phénazine est soluble dans l'eau jusqu'à environ 50 ppm (295), ce qui dépasse la dose requise pour atteindre la concentration minimale inhibitrice 50 % *in vitro*. Une bonne solubilité dans l'eau est critique, particulièrement pour une molécule destinée à être ajoutée à un bassin aquacole. Deuxièmement, la sensibilité à la chaleur ne semble pas être un problème dans la situation actuelle puisque la méthode d'extraction et de criblage chauffe les échantillons à plus de 65°C sans perte d'activité. Troisièmement, la conservation de la molécule purifiée ou des surnageants se fait facilement et sans perte d'activité. La molécule pure se garde à température pièce tandis que les surnageants doivent être réfrigérés. Nos échantillons liquides au froid ont conservé l'activité anti-*Saprolegnia* même après un mois d'entreposage.

Néanmoins, c'est la première fois que le PCA est associé à la possible réduction de la saprolégniose. Dans le futur, il sera nécessaire d'évaluer l'efficacité de la molécule sur l'oomycète dans un système plus complet que nos essais au laboratoire pour établir une concentration thérapeutique. De plus, il sera capital d'en vérifier la toxicité, *in vivo*, sur les poissons et sur les œufs pour s'assurer de disposer d'une marge importante en la dose thérapeutique et celle toxique. Cependant, il est encourageant de mentionner l'étude menée par Toohey *et al.* qui laisse croire à une faible toxicité du PCA sur les organismes supérieurs (souris, cobaye, coquerelle et poissons) (261).

4.5 La souche 2149

Depuis le début des analyses, cette souche de *P. fluorescens* se comporte très différemment des souches C5 et C8. À la Figure 9, on remarque rapidement l'absence de coloration jaune-vert de la colonie. Cette coloration est probablement causée par la présence d'un sidérophore, la pyoverdine, puisqu'elle s'affaiblit dans une culture utilisant un milieu avec ajout de fer pour les souches C5 et C8. Certaines souches de *P. fluorescens* utilisent d'autres sidérophores tels que la pyocheline et ses huit isomères ou la thioquinolobactine (296 et 164). Cette dernière molécule est particulièrement intéressante pour sa capacité à inhiber *Pythium debaryanum*, ainsi que par l'apparence blanchâtre de souches la sécrétant (164). L'isolation et l'identification de la thioquinolobactine au HPLC sont assez complexes à cause de l'instabilité et de la formation de dimères disulfide (37). Par contre, la présence du produit peut facilement être prédite par une ACP ciblant l'existence des gènes codant pour certaines enzymes agissant en sulfure transférase (163). Il serait donc intéressant de poursuivre l'analyse de la souche 2149 en portant une attention particulière aux sidérophores.

Après avoir identifié le PCA dans le surnageant de la souche C5 et C8, nous avons ensuite utilisé la même méthode au HPLC pour détecter la molécule dans le surnageant de la souche 2149. Nous n'avons pas réussi à détecter la phénazine, et ce même avec une limite de détection inférieure à 0,2 µg/ml (résultat non présenté). Cette absence du PCA coïncide avec les différences du patron d'inhibition des fractions à la Figure 18. On se retrouve donc avec une activité anti-*Saprolegnia* autre que celle provenant du PCA, mais qui n'est pas causée par le HCN, la séquestration du fer ou le 2,4-DAPG.

Avant de se lancer dans la recherche d'un nouvel anti-oomycète, il est plus prudent d'éliminer au préalable certains candidats, ce qui peut potentiellement sauver des heures de travail. La pyolutéorine figure justement dans la liste de candidats à tester puisqu'elle est produite par certains *Pseudomonas*, notamment la souche Pf-5 (191). De plus, cette molécule est déjà reconnue pour ses propriétés anti-oomycète contre *P. ultimum* et d'autres pathogènes provenant du sol (108 et 165). La séquence des gènes de la région responsable de la biosynthèse étant disponible et bien conservée chez plusieurs souches, une ACP permettrait de conclure rapidement sur la possibilité de production de cette molécule (190 et 110). Le même raisonnement s'applique à la pyrrolnitrine, antifongique à large spectre, en visant les gènes *prnABCD* aussi fortement conservés chez les bactéries sécrétant la pyrrolnitrine (96 et 97). Une vérification par LC/MS est aussi une avenue raisonnable à court terme pour tous métabolites secondaires.

Lors des manipulations avec la souche 2149, on remarque que les cultures liquides laissent aussi des agrégats visqueux (biofilms) sur le rebord des flacons Erlenmeyers. Il est intéressant de noter que les tests sur les surfactants qui ont produit de résultats clairement négatifs pour la souche C5 n'ont pas été aussi précis pour la souche 2149. Les méthodes de Jain *et al.* (116) et celle de Morikawa *et al.* (177) nous ont laissés avec un résultat intermédiaire à nos contrôles négatifs et positifs. L'interprétation visuelle du déplacement de l'huile ou

de la goutte d'eau étant plutôt subjective, il serait intéressant d'utiliser un tensiomètre de surface pour confirmer ces résultats avant de partir à la recherche d'un orfamide, d'un rhamnolipide ou d'un lipopeptide cyclique.

4.6 Applications possibles

Le but premier d'une pisciculture est l'élevage de poissons adultes destinés à la consommation humaine. En revanche, la production constante d'une bonne récolte dépend de plusieurs facteurs incluant le maintien de la qualité de l'eau. Un environnement nuisible a tendance à diminuer la production ainsi qu'à réduire la croissance et à affaiblir la résistance aux maladies d'un poisson. Un problème commun affectant la qualité de l'eau en circuit fermé est l'accumulation d'ammoniac toxique (NH_3) en provenance des déjections et de la décomposition de moulée accumulée au fond du bassin (109). Cet ammoniac peut être transformé en nitrate (NO_3^-) peu toxique, par oxydation bactérienne ou alors en nitrite toxique (NO_2). La manière la plus simple de retirer l'azote du système est de remplacer l'eau, mais cela s'avère long et coûteux. Il est aussi possible d'utiliser la dénitrification bactérienne qui transforme le NO_3 en azote gazeux (N_2) (134, 220 et 282). Plusieurs espèces bactériennes sont capables de dénitrification, notamment celles des genres *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Bacillus* et *Pseudomonas* (134). Le processus bactérien est mis à profit grâce à l'installation d'un biofiltre relié au système de recirculation de l'eau. De tels filtres sont déjà en fonction dans certains systèmes de culture de céphalopodes et de daurades royale (282, 146 et 179). L'utilisation de biofiltres est aussi possible pour de plus grands volumes d'eau, notamment l'exposition Living Seas au centre EPCOT et au New Jersey State Aquarium (220). Il pourrait donc être intéressant de se pencher sur une autre facette des biofiltres et de les considérer pour autre chose que leur impact sur le cycle de l'azote du milieu. L'incorporation d'un *Pseudomonas* dénitrifiant et sécrétant du PCA à un tel filtre pourrait s'avérer bénéfique à la qualité de l'eau en plus de s'attaquer à la saprolegniose. *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. aureofaciens*

sont justement des exemples du genre *Pseudomonas* où certaines souches présentent ces deux capacités (24, 256, 70 et 257). De plus, certains de ces filtres traitent les déjections et la moulée restante en les utilisant en tant que source de carbone pour la dénitrification, ce qui contribue à la conservation d'une eau saine à la vie aquatique (9).

Avant même l'utilisation d'un biofiltre, il ne faut pas négliger les possibilités plus simples. L'ajout de PCA purifiée à faible concentration ou de surnageant de culture à un bassin est aussi à envisager, tout comme la possibilité d'utiliser un mélange d'anti-*Saprolegnia* pour diminuer la quantité de PCA requise. Bien que sommairement, nous avons expérimenté avec des bains de sel à concentration sous-thérapeutique de 1 %. Le sel a été choisi puisqu'il est très présent et polyvalent sur les piscicultures (117). Le bain de sel à lui seul n'a pas d'effet sur l'oomycète, tandis que la combinaison bain et 5 % de surnageant inhibent significativement, mieux que le surnageant seul, la croissance du champignon (résultat non présenté).

Ce projet a démontré la possibilité d'utiliser la diversité d'un milieu, même artificiel, pour réguler l'écosystème de la niche écologique en question. En premier lieu, il a été possible de cribler un petit échantillon pour découvrir certaines bactéries capables d'inhiber la croissance de *Saprolegnia in vitro*. L'identification relativement simple de ses isolats a permis de découvrir la molécule responsable de l'effet sur l'oomycète. Les trois isolats étudiés se sont avérés être des *P. fluorescens*, une bactérie souvent retrouvée dans des systèmes marins. En second lieu, il a été démontré, que l'acide phénazine-1-carboxylique, seul et présent à faible concentration, est suffisant pour inhiber le dangereux pathogène. De plus, à l'aide d'une banque d'ADNg sur plasmide, nous avons créé une souche mutante qui surproduit la molécule d'intérêt. La suite de ce projet pourrait consister à augmenter encore plus la production de PCA par des mutations ciblées ou par des manipulations des conditions de cultures.

Bibliographie

1. **Aakvik, T., K. F. Degnes, R. Dahlsrud, F. Schmidt, R. Dam, L. Yu, U. Völker, T. E. Ellingsen, et S. Valla.** 2009. A plasmid RK2-based broad-host-range cloning vector useful for transfer of metagenomic libraries to a variety of bacterial species. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Research Letters* 296:149-158.
2. **Aarons, S., A. Abbas, C. Adams, A. Fenton, et F. O’Gara.** 2000. A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Bacteriology* 182:3913–3919.
3. **Aberoumand, A.** 2010. A review on *pseudomonas* in marine fish. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 2(4):291-296.
4. **Abken, H. J., M. Tietze, J. Brodersen, S. Baumer, U. Beifuss, et al.** 1998. Isolation and characterization of methanophenazine and function of phenazines in membrane-bound electron transport of *Methanosarcina mazei* Gol. *Journal of Bacteriology* 180:2027–2032.
5. **Allen, J.L.** 1990. Residues of malachite green in muscle, eggs, and fry of treated atlantic salmon and Chinook salmon. U.S. Fish and Wildlife Service National Fisheries Research Center.
6. **Allison, R.** 1962. The effect of formalin and other parasiticides upon oxygen concentration in ponds. *Proceedings Southeastern Association of Game and Fish Commisionners* 16:446-449.
7. **Altman, J.** 1970. In T. A. Toussoun, R. V. Bega, and P. E. Nelson (ed.), *Root Diseases and Soil-borne Pathogens*. University of California Press, Berkeley.

8. **Antonini, E., M. Brunori, C. Greenwood, B. G. Malmstrom, et G. C. Rotilio.** 1971. The interaction of cyanide with cytochrome oxidase. *European Journal of Biochemistry* 23:396-400.
9. **Arbiv, R., et J. van Rijn.** 1995. Performance of a treatment system for inorganic nitrogen removal in intensive aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 14:189-203.
10. **Archibald, F.** 1983. *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 19:29-32.
11. **Arima, K., H. Imanaka, M. Kousaka, A. Fukuda, and C. Tamura.** 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agricultural and Biological Chemistry* 28:575–576.
12. **Atlas, R. M.** 2004. *Handbook of Microbiological Media, Third Edition. Volume 1.* CRC Press. Boca Raton, United States of America. 2051 pages. consulté p876.
13. **Atlas, R. M.** 2005. *Handbook of Media for Environmental Microbiology.* CRC Press, Boca Raton, United States of America. 664 pages, consultées p461-462
14. **Ayyadurai, N., P. R. Naik, M. S. Rao, R. S. Kumar, S. K. Samrat, M. Manohar, et N. Sakthivel.** 2006. Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. *Journal of Applied Microbiology* 100:926-937.
15. **Bailey, D. M., R. E. Johnson, et U. J. Salvador.** 1973. Pyrrole antibacterial agents. 1. Compounds related to pyoluteorin. *Journal of Medicinal Chemistry* 16:1298–1300.

16. **Bakkevig, K., H. Sletta, M. Gimmetad, R. Aune, H. Ertesvåg, K. Degnes, B. E. Christensen, T. E., Ellingsen, et S. Valla.** 2005. Role of the *Pseudomonas fluorescens* alginate lyase (AlgL) in clearing the periplasm of alginates not exported to the extracellular environment. *Journal of Bacteriology* 187:8375-8384.
17. **Banat, I. M.** 2000. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités, *Biofutur* 198:44–47.
18. **Bangera, M.G., et L. S. Thomashow.** 1999. Characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2–87. *Journal of Bacteriology* 181:3155–3163.
19. **Beakes, G.W.** 1982. A comparative account of cyst coat ontogeny in saprophytic and fish-lesion (pathogenic) isolates of the *Saprolegnia declinata-parasitica* complex. *Canadian Journal of Botany* 61:603-625.
20. **Beakes, G.W., S. E. Wood, et A. W. Burr.** 1994. Features which characterize *Saprolegnia* isolates from salmonid fish lesions – A review. *In* Salmon Saprolegniasis. pp. 33-66.
21. **Bender, C. L., F. Alarcon-Chaidez, and D. C. Gross.** 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:266-292.
22. **Bender, C. L., et V. Rangaswamy.** 1999. Polyketide production by plant associated pseudomonads. *Annual Reviews of Phytopathology* 37:175–196.
23. **Bendig, J. W., P.W. Kyle, P. L. Giangrande, D. M. Samson, et B.S. Azadian.** 1987. Two neutropenic patients with multiple resistant *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia treated with ciprofloxacin. *Journal of the Royal Society of Medicine* 80:316–317.

24. **Bergey, D. H. Et American Society for Microbiology.** 1923. Bergey's manual of systematic bacteriology 1st edition. John G. Holt et al (editors), Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA.
25. **Berry, C., W. G. D. Fernando, P. C. Loewen, et T. R. de Kievit.** 2010. Lipopeptides are essential for *Pseudomonas* sp. DF41 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control* 55:211-218.
26. **Birkofer, L. et A. Birkofer.** 1949. Bakteriostatische Wirkung einiger Phenazinderivate auf *Mycobacterium tuberculosis* typ. *gallinaceus*. *Naturwiss* 36:92
27. **Bly, J. E., L. A. Lawson, D. J. Dale, A. J. Szalai, R. M. Durborow, et L. W. Clem.** 1992. Winter saprolegniosis in channel catfish. *Diseases of Aquatic Organisms* 13:155-164.
28. **Bly, J. E., S. M-A. Quiniou, L. A. Lawson, et L. W. Clem.** 1997. Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Fish Diseases* 20:35-40.
29. **Britton, G.** 1983. *Biochemistry of Natural Pigments*. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press. 366 pages.
30. **Brodhagen, M., I. Paulsen, et J. E. Loper.** 2005. Reciprocal Regulation of Pyoluteorin Production with Membrane Transporter Gene Expression in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology* 71(11):6900-6909.
31. **Brodhagen, M., M. D. Henkels, and J. E. Loper.** 2004. Positive autoregulation and signaling properties of pyoluteorin, an antibiotic produced by the biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology* 70:1758-1766.

32. **de Bruijn, I., M. J. D. de Kock, P. de Waard, T. A. van Beek, et J. M. Raaijmakers.** 2008. Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology* 190(8):2777-2789.
33. **Bruno, D. W., et B. P. Wood.** 1999. Fish diseases and disorders. Viral, Bacterial and fungal infections, vol 3, 1st ed. Aberdeen, United Kingdom. CAB International Pages 599 à 643.
34. **Bruno, D.W., et T. T. Poppe.** 1996. A Color Atlas of Salmonid Diseases. Academic Press, London, England. 194 pages.
35. **Bryce, D. M., B. Croshaw, J. E. Hall, V. R. Holland, et B. Lessel.** 1978. The activity and safety of the antimicrobial agent Bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1, 3diol). *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 29:3-24.
36. **Budzikiewicz, H.** 1993. Secondary metabolites from fluorescent *Pseudomonas*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* 104: 209-228.
37. **Budzikiewicz, H.** 2003. Heteroaromatic monothiocarboxylic acids from *Pseudomonas* spp. *Biodegradation* 14: 65–72.
38. **Burr, T. J., M. N. Schroth, and T. Suslow.** 1978. Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology* 68:1377-1383
39. **Byng, G. S., D. C. Eustice, R. Jensen.** 1979. Biosynthesis of phenazine pigments in mutant and wild-type cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 138:846–852.
40. **Campbell, R.E., J. H Lilley, Taukhid, V. Panyawachira, et S. Kanchanakhan.** 2001. In vitro screening of novel treatments for *Aphanomyces invadans*. *Aquaculture Research* 32 (3):223–233.

41. **Cappe, P., A. Mourey, Et G. Kilbertus.** 1994. Variation of lipolytic activity in the genus *Acinetobacter* sp. *Journal of General and Applied Microbiology* 4:113-114.
42. **Chain, E. B., et G. Mellows.** 1977. Pseudomonic acid. Part 1.(1 The structure of pseudomonic acid A, a novel antibiotic proml), produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions* 1:294–309.
43. **Chigusa, S., T. Hasegawa, N. Yamamoto, et Y. Watanabe.** 1996. Treatment of wastewater from oil manufacturing plant by yeasts. *Water Science and Technology* 34(11): 51-58.
44. **Chin-A-Woeng, T. F. C., G. V. Bloemberg, A. J. van der Bij, K. M. G. F. van der Drift, J. Schripsema, et al.** 1998. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Intereactions* 11:1069-1077.
45. **Choi, K. H., L. A. Trunck, A. Kumar, T. Mima, R. R. Karkhoff-Schweizer, et H. P. Schweizer.** 2008. Genetic tools for *Pseudomonas*, p. 65-86. In P. Cornelis (Ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Calister Academic Press, Norfolk, UK.
46. **Cline, G. R., C. P. P. Reid, P. E. Powell, and P. J. Szaniszlo.** 1984. Effects of a hydroxamate siderophore on iron absorption by sunflower and sorghum. *Plant Physiology* 76:36-39.
47. **Cline, G. R., P. E. Powell, P. J. Szaniszlo, and C. P. P. Reid.** 1982. Comparison of the abilities of hydroxamate, synthetic and other organic acids to chelate iron and other ions in nutrient solution. *Soil Science Society of America Journal* 46:1158-1164.

48. **Coker, W. C.** 1923. The *Saprolegniaceae* with notes on other water molds. University of North Carolina Press, Chapel Hill, NC, USA.
49. **Conway, H. F., W. C. Haynes, R. W. Jackson, J. M. Locke, T. G. Pridham, V. E. Sohns, et F. H. Stodola.** 1956. *Pseudomonas aureofaciens* Kluyver and phenazine-carboxylic acid, its characteristic pigment. *Journal of Bacteriology*. 72:412–417.
50. **Corbell, N. A., and J. E. Loper.** 1995. A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Journal of Bacteriology* 177:6230–6236.
51. **Crawford, P. W., R. G. Scamehorn, U. Hollstein, M. D. Ryan, et P. Kovacic.** 1986. Cyclic voltammetry of phenazines and quinoxalines including mono- and di-N-oxides. Relation to structure and antimicrobial activity. *Chemico-Biological Interactions - Journal* 60:67–84.
52. **Cruden, D. L., J. H. Wolfram, R. D. Rogers, et D. T. Gibson.** 1992. Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with *p*-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. *Applied and Environmental Microbiology* 58:2723–2729.
53. **Culp, S. J., et F. A. Beland.** 1996. Malachite green: a toxicological review. *Journal of the American College of Toxicology* 15:219-238.
54. **Dagher, F., E. Déziel, P. Lirette, G. Paquette, J. C. Bisailon, et R. Villemur.** 1997. Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. *Canadian Journal of Microbiology* 43:368-377.
55. **Dahiya, J. S., D. L. Woods, and J. P. Tewari.** 1988. Control of *Rhizoctonia solani*, casual agent of brown girdling root rot of rapeseed, by *Pseudomonas fluorescens*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 29:135-142.

56. **Dam, T.** 2005. Siderophores-potential candidate in the therapy of neonatal meningitis. *Journal of Medical Microbiology* 54:613.
57. **Delaney, S. M., D. V. Mavrodi, R. F. Bonsall, and L. S. Thomashow.** 2001. *PhzO*, a gene for biosynthesis of 2-hydrolyated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Journal of Bacteriology* 183:318–27.
58. **Delgado, C. L., N. Wada, M. W. Rosegrant, S. Meijer, et M. Ahmed.** 2003. Outlook for Fish to 2020: Meeting Global Demand. Report by the International Food Policy Research Institute.
59. **Dheekollu, J.** 2011. Design and synthesis of anticancer cobalt complexes: molecular mechanism of action on Topoisomerase II. Thèse de Ph.D. Université de Hyderabad, Inde.
60. **Dieguez-Uribeondo, J., J. M. Fregeneda-Grandes, L. Cerenius, E. Perez-Iniesta, J. M. Aller-Gancedo, M. T. Telleria, K. Söderhäll, et M. P. Martin.** 2007. Re-evaluation of the enigmatic species complex *Saprolegnia diclina-Saprolegnia parasitica* based on morphological physiological and molecular data. *Fungal Genetics and Biology* 44:585-601.
61. **Djibaoui, R., et A. Bensoltane.** 2005. Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Biotechnology* 4(7):697-702.
62. **McDonald, M., D. V. Mavrodi, L. S. Thomashow, et H. G. Floss.** 2001. Phenazine biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: branchpoint from the primary shikimate biosynthetic pathway and role of phenazine-1,6-dicarboxylic acid. *Journal of American Chemical Society* 123:9459–9560.
63. **den Dooren de Jong, L. E.** 1926. Bijdrage tot de kennis van het mineralisatieproces. Nijgh & Van Ditmar, Rotterdam. 200 pages

64. **Dutta, J. R., P. K. Dutta, et R. Banerjee.** 2004. Optimization of culture parameters for extracellular protease production from a newly isolated *Pseudomonas* sp. using response surface and artificial neural network models. *Process Biochemistry* 39:2193–2198.
65. **Dunny, G. M., et B. A. Leonard.** 1997. Cell cell communication in Gram Positive bacteria. *Annual Reviews of Microbiology* 51:527–564.
66. **Dwivedi, D., et B. N. Johri.** 2003. Antifungals from fluorescent pseudomonads: Biosynthesis and regulation. *Current Science* 85:1693-1703.
67. **Elad, Y., and R. Baker.** 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* sp. by *Pseudomonas* spp.. *Ecology and Epidemiology* 75:1053-1059.
68. **El-Sayed, A. K., J. Hothersall, et C. M. Thomas.** 2001. Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* 10586. *Microbiology* 147:2127-2139.
69. **El-Sayed, A. K., J. Hothersall, S. M. Cooper, E. Stephens, T. J. Simpson, et C. M. Thomas.** 2003. Characterization of the mupirocin biosynthesis gene cluster from *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Chemistry & Biology* 10(5):419-430.
70. **El-Sayed, W., M. Abd El-Megeed, A. B. Abd El-Razik, K. H. Soliman, et S. A. Ibrahim.** 2008. Isolation and identification of phenazine-1-carboxylic acid from different *Pseudomonas* isolates and its biological activity against *Alternaria solani*. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 4(6): 892-901.
71. **Emmerich, R., et D. Löw.** 1899. Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben. *Medical Microbiology and Immunology* 31:1-35.

72. **Faille, A., V. Domingue-Gauthier, É. Déziel, G. Vandenberg, et P. Belhumeur.** 2010. Inhibition of *Saprolegnia* sp. by the intracellular signaling molecules 4-hydroxy-2-heptylquinolinr (HHQ) produced by *Pseudomonas aeruginosa*. En preparation.
73. **Fernandez, D. U., R. Fuchs, M. Schäfer, H. Budzikiewicz et J. M. Meyer.** 2003. The pyoverdin of *Pseudomonas fluorescens* G173, a novel structural type accompanied by unexpected natural derivatives of the corresponding ferribactin. *Z. Naturforsch* 58,(1-2):1-10.
74. **Fgaier, H., et J. E. Eberl.** 2010. A competition model between *Pseudomonas fluorescens* and pathogens via iron chelation. *Journal of Theoretical Biology* 263:566-578.
75. **Flood, M. E., R. B. Herbert, et F. G. Holliman.** 1972. Pigments of *Pseudomonas* species. Part V. Biosynthesis of pyocyanin and the pigments of *P. aureofaciens*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 1:622–626.
76. **Fordos, J.** 1859. *Recueil des travaux de la Société d'Émulation pour les Sciences Pharmaceutiques*. 3:30.
77. **Franzetti, F., M. Cernuschi, R. Esposito, et M. Moroni.** 1992. *Pseudomonas* infections in patients with AIDS and AIDS-related complex. *Journal of Internal Medecine* 231:437–443
78. **Fuchs, R. L., S. A. McPherson, and D. J. Drahos.** 1986. Cloning of a *Serratia marcescens* gene encoding chitinase. *Applied and Environmental Microbiology* 51:504-509.
79. **Fuller, A. T., G. Mellows, M. Woodford, G. T. Banks, K. D. Barrow, et E. B. Chain.** 1971. Pseudomonic acid: an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Nature* 234:416–417.

80. **Fuqua, W. C., et S. C. Winans.** 1994. Quorum sensing in bacteria : the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* 176:2796–2806.
81. **Gardner, J. M., J. L. Chandler, and A. W. Feldman.** 1984. Growth promotion and inhibition by antibiotic-producing fluorescent pseudomonads on citrus roots. *Plant and Soil* 77:103-113.
82. **Gehmann, K., R. Neyfeler, A. Leadbeater, D. Nevill, and D. Sozzi.** 1990. CGA173506: a new phenylpyrrole fungicide for broad-spectrum disease control. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference Pests and Diseases* 2:399–406.
83. **Gene projects.** Online data:
<http://genome.igi-sf.org/draftmicrobes/bur94/bur94.home.html>
<http://genome.igi-psf.org/draftmicrobes/breli/breli.home.html>
84. **Geng, X., S. Ding, H. Sun, et J. Xie.** 2006. Immunogenicity and protective effects of *Pseudomonas fluorescens* vaccines on grass carp. *Journal of the Southwest Agricultural University Natural Science* 28:120–123.
85. **Gerundo, N., D. J. Alderman, R. S. Clifton-Hadely, et S. W. Feist.** 1991. Pathological effects of repeated doses of malachite green: a preliminary study. *Journal of Fish Diseases* 14:521–532.
86. **Gessard, C.** 1882. Sur les colorations bleu et verte des lignes à pansements. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Série D* 94:536–568.
87. **Gleeson O, F. O'Gara, et J. P. Morrissey.** 2010. The *Pseudomonas fluorescens* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol impairs mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek* 97:261–273.

88. **Gluth, G., et W. Hanke.** 1983. The effects of temperature on physiological changes in carp, *Cyprinus carpio* (L.) induced by phenol. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 7:373–389.
89. **Gordon, B. P., P. D. Hildebrand, T. C. Ells, et D. Y. Kobayashi.** 2001. Evidence and characterization of a gene cluster required for the production of viscosin, a lipopeptide biosurfactant, by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology* 47(4):294.
90. **Gouranchat, C.** 2000. Le vert de malachite en aquaculture (État des connaissances et perspectives). Étude bibliographique École nationale vétérinaire, 152 pages.
91. **Gram, L.** 1993. Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish. *Applied and Environmental Microbiology* 59:2197–2203.
92. **Gross, H., V. O. Stockwell, M. D. Henkels, B. Nowak-Thompson, J. E. Loper, et W. H. Gerwick.** 2007. The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. *Chemistry & Biology* 14, 53–63.
93. **Gurusiddaiah, S., D. M. Weller, A. Sarkar, and R. J. Cook.** 1986. Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 29:488-495.
94. **Haagen, Y.** 2007. Molecular and biochemical analyses of biosynthesis of phenazine and furanonaphthoquinone I in *Streptomyces cinnamomensis* DSM 1042. Ph.D. thesis. Eberhard Karls University, Tübingen, Germany.
95. **Haas, D., et C. Keel.** 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Reviews of Phytopathology* 41:117-153.

96. **Hammer, P. E., D. S. Hill, J. M. Ligon, et K. H. van Pée.** 1999. Conservation of the pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 180:39–44.
97. **Hammer, P. E., D. S. Hill, S. T. Lam, K. H. van Pée, et J. M. Ligon.** 1997. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:2147–2154.
98. **Hassan, H. M., et I. Fridovich.** 1980. Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine. *Journal of Bacteriology* 141:156–63.
99. **Hassett, D. J., W. A. Woodruff, D. J. Wozniak, M. L. Vasil, M. S. Cohen, and D. E. Ohman.** 1993. Cloning of *sodA* and *sodB* genes encoding manganese and iron superoxide dismutase in *Pseudomonas aeruginosa*: demonstration of increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria. *Journal of Bacteriology* 175:7658–7665.
100. **Hatai, K., et G-I. Hoshiai.** 1992. Mass mortality in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) due to *Saprolegnia parasitica* coker. *Journal of Wildlife Diseases* 28(4):532-536.
101. **Hatai, K., et G-I. Hoshiai.** 1994. Pathogenicity of *Saprolegnia parasitica* coker. *In Salmon Saprolegniasis. Edited by G. J. Mueller.* U.S. Department of Energy, Bonneville Power Administration, Portland, Oregon. pages 87-98.
102. **Haynes, W. C., F. H. Stodola, J. M. Locke, T. G. Pridham, H. F. Conway, V. E. Sohns, and R. W. Jackson.** 1956. *Pseudomonas aureofaciens* Kluyver and phenazine alpha-carboxylic acid, its characteristic pigment. *Journal of Bacteriology* 72:412-417.
103. **Hernandez, M. E., A. Kappler, et D. K. Newman.** 2004. Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Applied and Environmental Microbiology* 70:921-928.

104. **Hoffman, G. L., et F. P. Meyer.** 1974. Parasites of freshwater fishes. TFH publications
105. **Holliman, F. G.** 1969. Pigments of *Pseudomonas* species. Part I. Structure and synthesis of aeruginosin A. Journal of the Chemical Society. C: Organic 2514–2516.
106. **Howe, G.E., W. H. Gingerich, V. K. Dawson, et J. J. Olson.** 1999. Efficacy of hydrogen peroxide for treating Saprolegniasis in channel catfish. Journal of Aquatic Animal Health 11(3):222-230.
107. **Howell, C. R., and R. D. Stipanovic.** 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. Phytopathology 69:480-482.
108. **Howell, C. R., and R. D. Stipanovic.** 1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. Phytopathology 70:712-715.
109. **Hrubec, T. C., S. A. Smith, et J. T. Robertson.** 1996. Nitrate Toxicity: A Potential Problem of Recirculating Systems. Aquatic Toxicology 34:95-104.
110. **Huang, X., D. Zhu, Y. Ge, H. Hu, X. Zhang, et Y. Xu.** 2004. Identification and characterization of *pltZ*, a gene involved in the repression of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters 232:197–202.
111. **Hughes, J., et G. Mellows.** 1978. Inhibition of isoleucyl-transfer ribonucleic acid synthase in *Escherichia coli* by pseudomonic acid. Biochemical Journal 176:305–318.
112. **Hulvey, J. P., D. E. Padgett, et J. C. Bailey.** 2007. Species boundaries within *Saprolegnia* (*Saprolegniales*, Oomycota) based on morphological and DNA sequence data. The Mycological Society of America, Mycologia 99(3):421-429.

113. **Huxley, T. H.** 1882. A contribution to the pathology of the epidemic known as the salmon disease. *Proceedings of the Royal Society of London* 33:381-389.
114. **Islam, M. T., et Y. Fukushi.** 2010 Growth inhibition and excessive branching in *Aphanomyces cochlioides* induced by 2,4-diacetylphloroglucinol is linked to disruption of filamentous actin cytoskeleton in the hyphae. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:1163–1170.
115. **Isnansetyo, A., L. Cui, K. Hiramatsu, et Y. Kamei.** 2003. Antibacterial activity of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine alga, against vancomycinresistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22:545–547.
116. **Jain, D.K., D. L. Collins-Thompson, H. Lee, et J. T. Trevors.** 1991. A drop-collapsing test for screening biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 13, 271– 279.
117. **Johnson, C. W.** 2004. Twelve uses of salt on the trout farm. *Aquaculture Newsletter*.
118. **Johnson, J. L. et N. J. Palleroni.** 1989. Deoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species, *International Journal of Systematic Bacteriology* 39:230-235.
119. **Johnson, T W., R. L. Seymour, et D. E. Padgett.** 2002. Biology and systematics of the *Saprolegniaceae*. (Online) [Http://www.iluminadlib.org](http://www.iluminadlib.org)
120. **Kamei, Y., et A. Isnansetyo.** 2003. Lysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine alga. *International Journal of Antimicrobial Agents* 21:71–74.

121. **Kang, B. R., K. Y. Yang, B. H. Cho, T. H. Han, I. S. Kim, et al.** 2006. Production of indole-3-acetic acid in the plant-beneficial strain *Pseudomonas chlororaphis* O6 is negatively regulated by the global sensor kinase GacS. *Current Microbiology* 52:473–476.
122. **Karsa, D. R., R. M. Bailey, B. Shelmerdine, et S. A. McCann.** 1999. In: D.R. Karsa (Ed.), *Overview: a decade of change in the surfactant industry, Industrial Applications of Surfactants. Vol IV*, Royal Society of Chemistry pp.1-22.
123. **Kay, E., C. Dubuis, et D. Haas.** 2005 Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102:17136–17141.
124. **Ke, X., J. Wang, Z. Gu, M. Li, et X. Gong.** 2009. *Saprolegnia brachydanis*, a new oomycete isolated from Zebra Fish. *Mycopathologia* 167:107-113.
125. **Keel, C., C. Voisard, C. H. Berling, G. Kadr, and G. Defago.** 1989. Iron sufficiency, a prerequisite for the suppression of tobacco root rot by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 79:584-589.
126. **Keel, C., P. H. Wirthner, T. H. Oberhansli, C. Voisard, D. Burger, D. Haas, and G. Defago.** 1990. Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. *Symbiosis* 9:327-341.
127. **Khan, S. R., D. V. Mavrodi, G. J. Jog, H. Suga, L. S. Thomashow, et S. K. Farrand.** 2005. Activation of the *phz* Operon of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 Requires the LuxR Homolog PhzR, *N*-(3-OH-Hexanoyl)-L-Homoserine Lactone Produced by the LuxI Homolog PhzI, and a *cis*-Acting *phz* Box *Journal of Bacteriology* 187(18):6517-6527.

128. **Khomvilai, C., M. Kashiwagi, C. Sangrungruan, et M. Yoshioka.** 2007. Extent of chum salmon egg softening caused by sodium hypochlorite as an antifungal agent. *Fisheries Science* 73:1205-1207.
129. **Kielhofner, M., R. L. Atmar, R. J. Hamill, et D. M. Musher.** 1992. Life-threatening *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clinical Infectious Diseases* 14:403–411.
130. **Kirner, S., P. E. Hammer, D. S. Hill, A. Altmann, I. Fischer, L. J. Weislo, M. Lanahan, K. H. van Pée, et J. M. Ligon.** 1998. Functions encoded by Pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology* 180(7):1939-1943.
131. **Kitancharoen, N., K. Yuasa, et K. Hatai.** 1996. Effects of pH and temperature on growth of *Saprolegnia diclina* and *S. parasitica* isolated from various sources. *Mycoscience* 37(4):385-390.
132. **Kloepper, J. W., J. Leong, M. Teintze, and M. N. Schroth.** 1980. *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease suppressive soils. *Current Microbiology* 4: 317-320.
133. **Kloepper, J. W., M. N. Schroth, and T. D. Miller.** 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70:1078-1082.
134. **Knowles.** " Denitrification". 1982. *Microbiological reviews* 46:43-70.
135. **Koch, B., T. H. Nielsen, D. Sorensen, J. B. Andersen, C. Christophersen, et al.** 2002. Lipopeptide production in *Pseudomonas* sp. strain DSS73 is regulated by components of sugar beet seed exudate via the Gac two-component regulatory system. *Applied and Environmental Microbiology* 68:4509–4516.

136. **Kögl, F. et J. J. POSTOWSKY.** 1930 Über das grüne stoffwechselprodukt des *Bacillus chlororaphis*. Annalen der Chemie Juistuis Liebigs 480: 280-297.
137. **Köhler, J. L. D. Et C. van Delden.** 2007. Ribosome Protection Prevents Azithromycin-Mediated Quorum-Sensing Modulation and Stationary-Phase Killing of *Pseudomonas aeruginosa* Thilo. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51(12):4243-4248.
138. **Korth, H.** 1973. Carbon source regulation of the phenazine- α -carboxylic acid synthesis in *Pseudomonas aureofaciens*. Archives of Microbiology 92:175-177.
139. **Labeyrie, S., et E. Neuzil.** 1981. Influence of supplementary tyrosine or phenylalanine on bacterial growth and pigmentation of "*Pseudomonas aeruginosa*" (author's translation). Annales de Microbiologie 132A:31-40.
140. **Lale, R., T. Brautaset, et S. Valla.** 2011. Broad-host-range plasmid vectors for gene expression in bacteria. Methods in Molecular Biology 765:327-341.
141. **Lamont, I. L., et L. W. Martin.** 2003. Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 149:833-842.
142. **Lapouge, K., E. Sineva, M. Lindell, K. Starke, C. S. Baker, et al.** 2007. Mechanism of hcnA mRNA recognition in the Gac/Rsm signal transduction pathway of *Pseudomonas fluorescens*. Molecular Microbiology 66:341–356.
143. **Lapouge, K., M. Schubert, F. H. Allain, et D. Haas.** 2008 Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. Molecular Microbiology 67:241–253.

144. **Laville, J., C. Voisard, C. Keel, M. Maurhofer, G. Defago, et al.** 1992. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root-rot of tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89:1562–1566.
145. **Lee, J. Y., S. S. Moon, et B. K. Hwang.** 2003. Isolation and antifungal and antioomycete activities of aerugine produced by *Pseudomonas fluorescens* strain MM-B16. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2023-2031.
146. **Lee, P. G., R. N. Lea, E. Dohmann, W. Prebilsky, P. E. Turk, H. Ying, et J. L. Whitson.** 2000. Denitrification in aquaculture systems: an example of fuzzy logic control problem. *Aquacultural Engineering* 23:37-59.
147. **Leisinger, T., et R. Margraff.** 1979. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiological Reviews* 43:422-442.
148. **Lerat, E., et N. A. Moran.** 2004. The evolutionary history of quorum-sensing systems in bacteria. *Molecular Biology and Evolution* 21:903-913.
149. **Levy, S. B.** *The Antibiotic Paradox.* Cambridge, Massachusetts, United-States of America : Da Capo Press, 2002
150. **Li, Y., H. Jiang, X. Du, X. Huang, X. Zhang, Y. Xu, et Y. Xu.** 2010. Enhancement of phenazine-1-carboxylic acid production using batch and fed-batch culture of *gacA* inactivated *Pseudomonas* sp. M18G. *Bioresource Technology*. 101:3649-3656.
151. **Lifshitz, R., C. Simonson, F. M. Scher, J. W. Kloepper, C. Rodrick-Semple, and I. Zaleska.** 1986. Effect of rhizobacteria on the severity of *Phytophthora* root rot of soybean. *Canadian Journal of Plant Pathology* 8:102-106.

152. **Lifshitz, R., J. W. Kloepper, M. Kozlowski, C. Simonson, J. Carlson, E. M. Tipping, and I. Zaleska.** 1987. Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 33:390-395.
153. **Lindberg, G. D.** 1981. An antibiotic lethal to fungi. *Plant Disease* 65:680-683.
154. **Loper, J. E., et H. Gross.** 2007. Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *European Journal of Plant Pathology* 119:265-278.
155. **Lorck, H.** 1948. Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Plant Physiology* 1:142-146.
156. **Lovetro, D.** 1998 Hydrogen peroxide in fresh water and marine aquaculture. *Northern Aquaculture, Special Edition: Salmon Health Report*, Mars 13-15.
157. **MacDonald, J. C.** 1967 Phenazines. In *Antibiotics*; Gottlieb, D., Shaw, P. D., (Eds.); Springer-Verlag: New York; Vol. II, pp 52-65.
158. **MacMilan, J. R.** 2009. Potassium Permanganate: What is it and how can we ensure it is safely used in US Aquaculture. U.S. Department of Interior, Fish and Wildlife Service
159. **Marking, L.L., J. J. Rach, et T. M. Schreier.** 1994. Evaluation of antifungal agents for fish culture. *The Progressive Fish Culturist* 56(4):225-231.
160. **Marrie, T. J., et J. W. Costerton.** 1983. Scanning electron microscopic study of uropathogen adherence to a plastic surface. *Applied and Environmental Microbiology* 45:1018-1024.

161. **Martínez-Granero, F., A. Navazo, E. Barahona, M. Rendondo-Nieto, R. Rivilla, et M. Martín.** 2012. The Gac-Rsm and SadB Signal Transduction Pathways Converge on AlgU to Downregulate Motility in *Pseudomonas fluorescens*. *Plus One* 7(2):9 pages.
162. **Martínez-Granero, F., S. Capdevila, M. Sánchez-Contreras, M. Martín, et R. Rivilla.** 2005. Two site-specific recombinases are implicated in phenotypic variation and competitive rhizosphere colonization in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* 151:975–983.
163. **Matthijs, S., C. Baysse, N. Koedam, et A. K. Tehrani.** 2004. The *Pseudomonas* siderophore quinolobactin is synthesized from xanthurenic acid, an intermediate of the kynurenine pathway. *Molecular Microbiology* 52:371–384.
164. **Matthijs, S., K. A. Tehrani, G. Laus, R. W. Jackson, R. M. Cooper, et P. Cornelis.** 2007. Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-Pythium activity. *Environmental Microbiology* 9(2):425-434.
165. **Maurhofer, M., C. Keel, D. Haas, et G. Défago.** 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced antibiotic production. *Plant Pathology* 44:40–50.
166. **Mavrodi, D. V., R. F. Bonsall, S. M. Delaney, M. J. Soule, G. Phillips, et L. S. Thomashow.** 2001. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* 183:6454-6465.

167. **Mavrodi, D. V., T. L. Peever, O. V. Mavrodi, J. A. Parejko, J. M. Raaijmakers, P. Lemanceau, S. Mazurier, L. Heide, W. Blankenfeldt, D. M. Weller, et L. S. Thomashow.** 2010. Diversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway. *Applied and Environmental Microbiology* 76(3):866-879.
168. **Mavrodi, D. V., V. N. Ksenzenko, R. F. Bonsall, R. J. Cook, A. M. Boronin, et L. S. Thomashow.** 1998. A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Journal of Bacteriology* 180(9):2541-2548.
169. **Mavrodi, D. V., W. Blankenfeldt, et L. S. Thomashow.** 2006. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp.: biosynthesis and regulation. *Annual Review of Phytopathology* 44:417-445.
170. **Mazzola, M., R. J. Cook, L. S. Thomashow, D. M. Weller, and L. S. Pierson III.** 1992. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Applied and Environmental Microbiology* 58(8):2616–2624.
171. **Mentel, M., E. G. Ahuja, D. V. Mavrodi, R. Breinbauer, L. S. Thomashow and W. Blankenfeldt.** 2009. Of two make one: the biosynthesis of phenazines. *ChemBioChem* 10:2295-2304.
172. **Meyer, F.P.** 1991. Aquaculture disease and health management. *Journal of Animal Science* 69:4201-4208.
173. **Meyer, F.P., et T. A. Jorgensen.** 1983. Teratological and other effects of malachite green on the development of rainbow trout and rabbits. *Transactions of the American Fisheries Society* 112:(6)818–824.
174. **Meyer, J. M.** 2000. Pyoverdins: pigments siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of Microbiology* 174:135-142.

175. **Migula, W.** 1894. Über ein neues System der Bakterien. Arb Bakteriolog. Institut Karlsruhe 1:235-238.
176. **Molina, F. I., S. C. Jong, et G. Ma.** 1995. Molecular characterization and identification of *Saprolegnia* by restriction analysis of genes coding for ribosomal RNA. Antonie Van Leeuwenhoek 68:65-74.
177. **Morikawa, M., Y. Hirata, et T. Imanaka.** 2000. A study on the structure–function relationship of the lipopeptide biosurfactants. Biochimica et Biophysica Acta 1488:211–218.
178. **Morin, R.** 2009. Traitement des oeufs et des poissons contre les champignons du type *Saprolegnia*. Document d'information DADD-23. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation. 7 p. <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/Fr/Peche>
179. **Morrison, M. M., Y. Tal, et H. J. Schreier.** 2004. Granular starch as a carbon source for enhancing denitrification in biofilters connected to marine recirculating aquaculture systems. In: Proceedings of the 5th International Conference on Recirculating Aquaculture, Cooperative Extension/Sea Grant, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia, pp.481-488.
180. **Mueller, G. J.** 1994. Salmon Saprolegniasis, Report to Bonneville Power Administration, project 199006100. 266 pages.
181. **Mulet, M., A. Bennasar, J. Lalucat et E. Garcia-Valdes.** 2009. An rpoD–based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. Molecular and Cellular Probes 23:140–147.
182. **Murphy, T. M.** 1981. The use of chemosterilants to lower the frequency of skin fungal infection amongst precocious male 1+ Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L. Journal of Fish Diseases 4:387-395.

183. **Neilands, J. B.** 1981. Microbial iron compounds. Annual Review of Biochemistry 50:715-731.
184. **Neish, G. A.** 1977. Observations on saprolegniasis of adult sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum). Journal of Fish Biology 10:513-522.
185. **Neish, G. A., et B. R. Green.** 1980. Diseases of Fishes: fungal diseases of fishes, vol 6. T.H.F. publications Neptune, New Jersey USA.
186. **Nevill, D., R. Nyfeler, and D. Sozzi.** 1988. CGA142705: a novel fungicide for seed treatment. Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference Pest and Diseases 1:65–72.
187. **Nielsen, T. H., O. Nybroe, B. Koch, M. Hansen, et J. Sorensen.** 2005. Genes involved in cyclic lipopeptide production are important for seed and straw colonization by *Pseudomonas* sp. strain DSS73. Applied and Environmental Microbiology, 71:4112–4116.
188. **Noah, B., W. Xiang, et C. Hyun-Soon.** 2006. Iron chelators as therapeutic iron deletion agents. Expert Opinion on Therapeutic Patents 16(11):1533–1556.
189. **Noga, E. J.** 1996. Fish Disease Diagnosis and Treatment. Mosby-Year Book, Inc. St. Louis. MO. 367 pages.
190. **Nowak-Thompson, B., N. Chaney, J. S. Wing, S. J. Gould, and J. E. Loper.** 1999. Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Journal of Bacteriology 181:2166–2174.
191. **Nowak-Thompson, B., S. J. Gould, et J. E. Loper.** 1997. Identification and sequence analysis of the genes encoding a polyketide synthase required for pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Gene 204:17–24.

192. **Nybroe, O., et J. Sørensen.** 2004. Production of cyclic lipopeptides by fluorescent pseudomonads. In J. L. Ramos (Ed.), *Pseudomonas*, Vol. 3, Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism (pp. 147–172). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers
193. **Obunkowicz, M. G., F. J. Periak, K Kusano-Kretzmer, E. J. Mayer, and L. S. Watrud.** 1986. Integration of the deltaendotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing strains of pseudomonads using TnS. *Gene* 45:327-331.
194. **Palleroni, N.J., R. Kunisawa, R. Contopoulou, et M. Doudoroff.** 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 23:333-339.
195. **Palleroni, N.J.** 1978. The *Pseudomonas* Group. Meadowfield Press Ltd., Shildon. 80 pages.
196. **Pant, R. et A. N. Mukhopadhyay.** 2001. Integrated management of seed and seedling rot complex of soybean. *Indian Phytopathology* 54:345-350.
197. **Parker, R.B., et P. R. Elliker.** 1953. Effect of spoilage bacteria on biacetyl content and flavor of cottage cheese. *Journal of Dairy Science* 36(8):843-849.
198. **Parsek, M. R., et E. P. Greenberg.** 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(16):8789-8793.
199. Pêches et Océans Canada, texte archivé. Dernière modification en 2012. Disponible au : http://www.glf.dfo-mpo.gc.ca/Golfe/Guide-Au-bord-de-la-mer/Estuaires?is_mobile=1
200. **Pereira, M. O., M. J. Vieira, et L. F. Melo.** 2000. The effect of clay particles on the efficacy of a biocide. *Water Science and Technology* 41(4-5):61-64.

201. **Phillips, A. J., V. L. Anderson, E. J. Robertson, C. J. Secombes, et P. van West.** 2008. New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology* 16:13-19.
202. **Pickering, A. D.** 1994. Factors which predispose salmonid fish to Saprolegniasis. *Edited by* G. J. Mueller. U.S. Department of Energy, Bonneville Power Administration, Portland, Oregon. pages 67-84.
203. **Pickering, A. D., et L. G. Willoughby.** 1978. *Saprolegnia* infections of salmonid fish. A Symposium of the Society for General Microbiology 9:271-297.
204. **Pickering, A. D., et L. G. Willoughby.** 1982. *Saprolegnia* Infections. In *Microbial Diseases of Fish. Edited by* R.J. Roberts. Academic Press, London, England. pages. p.271-297.
205. **Pierson, L. S., and L. S. Thomashow.** 1992. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5(4):330-339.
206. **Pierson III, L. S. and E. A. Pierson.** 2010. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86(6):1659-1670.
207. **Pipke, R., I. Wagner-Döbler, K. N. Timmis, et D. F. Dwyer.** 1992. Survival and function of a genetically engineered Pseudomonad in aquatic sediment microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 58:1259–1265.
208. **Plakas S.M., K. R. El-Said, G. R. Stehly, W. H. Gingerich, et J. L. Allen.** 1996. Uptake, tissue distribution, and metabolism of malachite green in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 1427–1433.

209. **Pottinger, T. G., et J. G. Day.** 1999. A *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova. *Diseases of Aquatic Organisms* 36(2):129-141.
210. **Raaijmakers, J. M., I. de Bruijn, et M. J. D. de Kock.** 2006. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: Diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *The American Phytopathological Society* 19(7):699-710.
211. **Raaijmakers, J.M., D. M. Weller, and L. S. Thomashow.** 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas*-spp. in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology* 63:881-887.
212. **Rădulescu, D. et G. Ostrogovich.** 1931. Die Struktur der Gemeinschafts-Resonatoren im Anthracen, Acridin, Phenazin, Phenanthren und Pyren. *Chemische Berichte* 64:2233-2240.
213. **Rahier, J.M.** 2004 Conseil vétérinaire: un point sur le peroxyde d'hydrogène. *BioMag* 2. 2 pages.
214. **Rahme, L. G., E. J. Stevens, S. F. Wolfort, J. Shao, R. G. Tompkins, et al.** 1995 Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268:1899–1902.
215. **Rashid, M. H., et A. Kornberg.** 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(9):4885-4890.
216. **Raven, P. H., R. F. Evert, et S. E. Eichhorn.** 2000. Les protistes II: hétérokontées et algues vertes. Université (ed.), *Biologie végétale*, 6eme edition, Paris, France. Pages 370-399.

- 217. Reimann, C., M. Beyeler, A. Latifi, H. Winteler, M. Foglino, et al.** 1997. The global activator *GacA* of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyl-L-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Molecular Microbiology* 24:309–319.
- 218. Reimann, C., C. Valverde, E. Kay, et D. Haas.** 2005. Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Bacteriology* 187(1):276-285.
- 219. van Rij, E. T., M. Wesselink, T. F. C. Chin-A-Woeng, G. V. Bloemberg et B. J. J. Lugtenberg.** 2004. Influence of environmental conditions on the production of phenazine-1-carboxamide by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *The American Phytopathological Society* 17(5):557-566.
- 220. van Rijn, J., Y. Tal, et H. J. Schreier.** 2006. Denitrification in recirculating systems : Theory and applications. *Aquacultural Engineering* 34:364-376.
- 221. Roberts, R. J.** 1989. *Fish Pathology*, second edition. Bailliere Tindall Publishers, London, England. 467 pages.
- 222. Roberts R. J., et C. J. Shepherd.** 1997. *Handbook of trout and salmon diseases*, 3rd ed.. Fishing. new books. pages. 63-64 et 76-77.
- 223. Roongsawang, N., K. Washio, et M. Morikawa.** 2011. Diversity of nonribosomal peptide synthetase involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *International Journal of Molecular Sciences* 12:141-172.
- 224. Rossman, A. Y., et M. E. Palm.** 2006. Why are *Phytophthora* and other oomycota not true fungi ?. *Outlooks on Pest Management*. 17:217-219.

225. **Sacherer, P., G. Defago, et D. Haas.** 1994. Extracellular protease and phospholipase-C are controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters 116:155–160.
226. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, et T. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press pp.1.25-1.28.
227. **Sarniguet, A., J. Kraus, M. D. Henkels, A. M. Muehlchen, and J. E. Loper.** 1995. The sigma factor σ^S affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Proceeding of the National Academy of Sciences USA 92:12255–12259.
228. **Sayed, R. Z., M. D. Badgajar, H. M. Sonawane, M. M. Mhaske, et S. B. Chincholkar.** 2005. Production of microbial iron chelators (siderophores) by fluorescent Pseudomonads. Indian Journal of Biotechnology. 4:484-490.
229. **Schales, O., S. S. Schales, et D. A. Friedman.** 1945. Antibacterial activity of some phenazine and quinoxaline-derivatives. Archives of Biochemistry 6:329-335.
230. **Scher, F. M., and R. Baker.** 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. Phytopathology 72:1567-1573.
231. **Schnider-Keel, U. A. Seematter, M. Maurhofer, C. Blumer, B. Duffy, C. Gigot-Bonnefoy, C. Reimann, R. Notz, G. de Fago, D. Haas, et C. Keel.** 2000. Autoinduction of 2,4-Diacetylphloroglucinol Biosynthesis in the Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and Repression by the Bacterial Metabolites Salicylate and Pyoluteorin. Journal of Bacteriology 182(5):1215-1225.

232. **Schoettger, R.A.** 1970. Toxicology of thiodan in several fish and aquatic invertebrates. US Department of Interior Fish and Wildlife Series Report 35, p. 31
233. **Schubert, M., K. Lapouge, O. Duss, F. C. Oberstrass, I. Jelesarov, et al.** 2007. Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. *Nature Structural & Molecular Biology* 14:807–813.
234. **Selin, C., W. G. D. Fernando, et T. de Kievit.** 2012. The PhzI/PhzR quorum-sensing system is required for pyrrolnitrin and phenazine production, and exhibits cross-regulation with RpoS in *Pseudomonas chlororaphis* PA23. *Microbiology* 158:896-907.
235. **Seymour, R.L.** 1970. The Genus *Saprolegnia*. *Nova Hedwigia* 19:1-124
236. **Shiozawa, H., A. Shimada, et S. Takahashi.** 1997. Thiomarinols D, E, F, and G, new hybrid antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium. Isolation, structure, and antimicrobial activity. *The Journal of Antibiotics* 50:449–452.
237. **Slininger, P. J., et M. A. Jackson.** 1992. Nutritional factors regulating growth and accumulation of phenazine 1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37:388-392.
238. **Slininger, P. J., et M. A. Shea-Wilbur.** 1995. Liquid-culture pH, temperature, and carbon (not nitrogen) source regulate phenazine productivity of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43:794-800.
239. **Smirnov, V., E. Kiprianova.** 1990. Bacteria of *Pseudomonas* genus. Kiev: Naukova Dumka. 264.

240. **Smith, M.J., et A. G. Heath.** 1979. Acute toxicity of copper, chromate, zinc and cyanide to freshwater fish: effects of different temperature. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 22:113–119
241. **Sneh, B., M. Dupler, Y. Elad, and R. Baker.** 1984. Chlamyospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumennum as affected by fluorescent and lytic bacteria from Fusarium-suppressive soils. *Phytopathology* 74:1115-1124.
242. **Snieszko, S. F.** 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology* 6:197-208.
243. **Soberon-Chavez, G., F. Lépine, et E. Déziel.** 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68:718-725.
244. **de Souza, J.T., C. Arnould, C. Deulvot, P. Lemanceau, V. Gianinazzi-Pearson, et J. M. Raaijmakers.** 2003. Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Phytopathology* 93:966–975.
245. **Stanghellini, M. E., and R. M. Miller.** 1997. Biosurfactants: Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *The American Phytopathological Society* 81:4-12.
246. **Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, et M. Doudoroff.** 1966. The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *Journal of General Microbiology* 43:159-271.
247. **Steciow, M. M., A. Paul, et K. Bala.** 2007. *Saprolegnia bulbosa* sp. nov. Isolated from an Argentine stream: taxonomy and comparison with related species. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 268:225-230.

- 248. Stirling, A. B.** 1880. Extract from a paper read before the Royal Society of Edinburgh (Session 1879-80), entitled "Additional Observations on Fungus Disease of Dalmon and Other Fish". Appendix III, in Buckland, F., S. Walpole, and A. Young, Report on the disease which has recently prevailed among the salmon in the Tweed, Eden, and other rivers in England and Scotland. George Eyre & William Spottiswoode, Printers to the Queen's Most Excellent Majesty, Her Majesty's Stationery Office, London, pages 117-121.
- 249. Stueland, S., K. Hatai, et I. Skaar.** 2005. Morphological and physiological characteristics of *Saprolegnia* spp. Strains pathogenic to Atlantic Salmon, *Salmo salar*. Journal of Fish Diseases 28:445-453
- 250. Sudova, E., J. Machova, Z. Svobodova, et T. Vesley.** 2007. Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. Veterinari Medicina 52(12):527-539.
- 251 O'Sullivan, D. J., et F. O'Gara.** 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. Microbiology Reviews 56(4):662-676.
- 252. Suslow, T. V., and M. N. Schroth.** 1982. Rhizobacteria on sugar beets: effects of seed application and root colonization on yield. Phytopathology 72:199-206.
- 253. Swain, P., A. Behura, S. Dash, et S. K. Nayak.** 2007. Serum antibody response of Indian major carp, *Labeo rohita* to three species of pathogenic bacteria; *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* and *Pseudomonas fluorescens*. Veterinary Immunology and Immunopathology 117:137-141.
- 254. Tambong, J.T., et M, Hofte.** 2001 Phenazines are involved in biocontrol of *Pythium myriotylum* on cocoyam by *Pseudomonas aeruginosa* PNA1. European Journal of Plant Pathology 107:511-521.

- 255. Tawara, S., S. Matsumoto, T. Hirose, Y. Matsumoto, S. Nakamoto, M. Mitsuno, and T. Kamimura.** 1989. In vitro antifungal synergism between pyrrolnitrin and clotrimazole. *Japanese Journal of Medicinal Mycology* 30:202–210.
- 256. Thomashow, L. S., and D. M. Weller.** 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici. *Journal of Bacteriology* 170:3499-3508.
- 257. Thomashow, L. S., D. M. Weller, R. F. Bonsall, and L. S. Pierson.** 1990. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology* 56:908-912.
- 258. Thiem, S. M., M. L. Krumme, R. L. Smith, et J. M. Tiedje.** 1994. Use of molecular techniques to evaluate the survival of a microorganism injected into an aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 60:1059–1067.
- 259. von Tiedemann, A., et M. T. Islam.** 2011. 2,4-Diacetylphloroglucinol suppresses zoosporogenesis and impairs motility of *Peronosporomycete* zoospores. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27:2071-2079.
- 260. Tiffney, W. N.** 1939. The host range of *Saprolegnia parasitica*. *Mycologia* 31(3):310-321.
- 261. Toohey, J. L., C. D. Nelson and G. Kritkov.** 1965. Toxicity of phenazine carboxylic acids to some bacteria, algae, higher plants, and animals. *Canadian Journal of Botany* 43:1151-1155.
- 262. Tort, L., J. C. Balasch, et S. Mackenzie.** 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología* 22(3):277-286.

- 263. Torto-Alalibo, T., M. Tian, K. Gajendran, M. E. Waugh, P. Van West, et S. Kamoun.** 2005. Expressed sequence tags from the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* reveal putative virulence factors. *BCM Microbiology* 5:46.
- 264. Tripathi, R. K., et D. Gottlieb.** 1969. Mechanism of action of the antifungal antibiotic pyrrolnitrin. *Journal of Bacteriology* 100:310–318.
- 265. Udomkusonsri, P., et E. J. Noga.** 2005. The acute ulceration response (AUR): A potentially widespread and serious cause of skin infection in fish. *Aquaculture* 246:63-77.
- 266. Umland, C., I. Mikaelian, et D. Martineau.** 2000. Les lésions et les maladies fongiques, p. 391-392, *Maladies des poissons d'eau douce du Québec*, Montréal (Québec).
- 267. Umio, S., T. Kamimura, T. Kamishita, and Y. Mine.** 1986. Antifungal composition employing pyrrolnitrin in combination with an imidazole compound. U.S. patent 4,636,520.
- 268. Valverde, C., S. Heeb, C. Keel, et D. Haas.** 2003 RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Microbiology* 50:1361–1379.
- 269. Van West, P.** 2006. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist* 20:99-104.
- 270. Vasileva-Tonkova, E., A. Sotirova, et D. Galabova.** 2011. The effect of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens* on model bacteria strains and isolates from industrial wastewater. *Current Microbiology* 62(2):427-433.

271. **Ventre, I., A. L. Goodman, I. Vallet-Gely, P. Vasseur, C. Soscia, S. Molin, S. Bleves, A. Lazdunski, S. Lory, et A. Filloux.** 2006. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 103:171–176.
272. **Vijayan, K.K., I. S. Bright Singh, N. S. Jayaprakash, S. V. Alavandi, S. Somnath Pai, R. Preetha, J. J. S. Rajan, et T. C. Santiago.** 2006. A brackishwater isolate of *Pseudomonas* ps-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. Aquaculture 251:192-200.
273. **Voisard, C., C. Keel, D. Haas, and G. Defago.** 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. EMBO Journal 8:351-358.
274. **Walser, C. A., et R. P. Phelps.** 1994. The use of formalin and iodine to control *Saprolegnia* infection on channel catfish, *Ictalurus punctatus*, eggs. Journal of Applied Aquaculture 3(4):269–278.
275. **Walsh, U. F., J. P. Morrissey, et F. O’Gara.** 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. Current Opinion in Biotechnology 12(3):289-295.
276. **Wang, D., J. M. Yu, L. S. Pierson III, et E. A. Pierson.** 2012. Differential regulation of phenazine biosynthesis by RpeA and RpeB in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84. Microbiology 158(7):1745-1757.
277. **de Weger, L. A., C. I. M. van der Vlugt, A. H. M. WijOes, P. A. H. M. Bakker, B. Schippers, and B. Lugtenberg.** 1987. Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. Journal of Bacteriology 169:2769-2773.

278. **Weller, D. M., et R. J. Cook.** 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* 73:463-469.
279. **Whatling, C. A., J. E. Hodgson, M. K. R. Burnham, N. J. Clarke, F. C. H. Franklin, et C. M. Thomas.** 1995. Identification of a 60kb region of the chromosome of *Pseudomonas fluorescens* NCIB 10586 required for the biosynthesis of pseudomonic acid (mupirocin). *Microbiology* 141:973-982.
280. **Whisler, H. C.** 1996. Identification of *Saprolegnia* spp. Pathogenic in Chinook Salmon. Final Report, DE-AC79-90BP02836, US Department of Energy, Washington, D.C., page 43.
281. **Whistler, C. A., et L. S. Pierson III.** 2003. Repression of phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens* strain 30-84 by RpeA. *Journal of Bacteriology* 187(18):6517-6527.
282. **Whitson, J., P. Turk, et P. Lee.** 1993. Biological denitrification in a closed recirculating marine culture system. In: Wang, J.-K. (Ed.), *Techniques for Modern Aquaculture*. ASAE, St. Joseph, MI, pp. 458–466.
283. **Widmer, F., R. J. Seidler, P. M. Gillevet, L. S. Watrud, et G. D. DiGiovanni.** 1998. A highly selective PCR protocol for detection of 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 64(7):2545-2553.
284. **Williams, P. A., et M. J. Worsey.** 1976. Ubiquity of plasmids in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: evidence for the existence of new TOL plasmids. *Journal of Bacteriology* 125:818–828.
285. **Wilson, K.** 2001. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology* (Published Online).

286. **Wilson, M.** 1997. Biocontrol of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: Current approaches and future prospects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19:188-191.
287. **Willoughby, L. G.** 1985. Rapid preliminary screening of *Saprolegnia* on fish. *Journal of Fish Diseases* 8:473-476.
288. **Willoughby, L. G.** 1989. Continued defense of salmonid fish against *Saprolegnia* fungus, after its establishment. *Journal of Fish. Diseases* 12:63-67.
289. **Willoughby, L. G.** 1994. *Fungi and Fish Diseases*. Pisces Press, Stirling, Scotland. 57 pages.
290. **Willoughby, L. G., et R. J. Roberts.** 1992. Towards strategic use of fungicides against *Saprolegnia parasitica* in salmonid fish hatcheries. *Journal of Fish Diseases* 15:1-13.
291. **Woo, P. T. K., et D. Bruno.** 2011. *Fish diseases and disorders: Viral, bacterial and fungal infections, Volume 3*. CAB international, Cambridge, USA
292. **Wood, S. E., L. G. Willoughby, et G. W. Beakes.** 1986. Preliminary evidence for inhibition of *Saprolegnia* fungus in the mucus of brown trout, *Salmo trutta* L., following experimental challenge. *Journal of Fish Diseases* 9:557-560.
293. **Xu, G. W., and D. C. Gross.** 1986. Selection of fluorescent pseudomonads antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive of potato seed piece decay. *Phytopathology* 76:414-422.
294. **Yamamoto, S., H. Kasai, D. L. Arnold, R. W. Jackson, A. Vivian, et S. Harayama.** 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* 146:2385-2394

295. **Yang, Z., H. Hu, X. Zhang, et Y. Xu.** 2007. Solubility of Phenazine-1-carboxylic Acid in Water, Methanol, and Ethanol from (278.2 to 328.2)K. *Journal of Chemical & Engineering Data* 52:184-185.
296. **Youard, Z. A., G. L. A. Mislin, P. A. Majcherczyk, I. J. Schalk, et C. Reimmann.** 2007. *Pseudomonas fluorescens* CHA0 produces enantiopyochelin, the optical antipode of the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *The Journal of Biological Chemistry* 282:35546-35553.
297. **Yuen, G. Y., and M. N. Schroth.** 1986. Interactions of *Pseudomonas fluorescens* strain E6 with ornamental plants and its effect on the composition of root-colonizing microflora. *Phytopathology* 76:176-180.
298. **Zhang, W., Y. Hu, H. Wang, et L. Sun.** 2009. Identification and characterization of a virulence-associated protease from a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* strain. *Veterinary Microbiology* 139:183-188.
299. **Zhang, Z., et L. S. Pierson III.** 2001. A second quorum-sensing system regulates cell surface properties but not phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Applied and Environmental Microbiology* 67(9):4305-4315.
300. **Zuber, S., F. Carruthers, C. Keel, A. Mattart, C. Blumer, G. Pessi, C. Gigot-Bonnefoy, U. Schnider-Keel, S. Heeb, C. Reimmann, and D. Haas.** 2003. GacS sensor domains pertinent to the regulation of exoproduct formation and to the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Plant Microbe Interactions* 16:634-644

Annexe I : Interfaces HPLC

Inlet Method Report MassLynx 4.1 SCN 683 Page 1 of 2
 Method File: C:\MassLynx\HPLCMS_septembre2012.PRO\ACQUDB\00_PCA_15min20120927_KinetexC18_15cm
 Last Modified: Thursday, September 27, 2012 13:26:44 Eastern Daylight Time
 Printed: Thursday, September 27, 2012 14:54:51 Eastern Daylight Time

Waters Alliance 2795 LC Mobile Phase

Solvents
 A% 70.0 Water 1%AcOH
 B% 30.0 ACN 1%AcOH
 C% 0.0 Water 2mM NH4OAc
 D% 0.0 MeCN 2 mM NH4OAc

Flow Ramp 2.00
 Flow (ml/min) 0.400
 Stop Time (mins) 15.00
 Min Pressure (Bar) 0
 Max Pressure (Bar) 340
 Degasser On
 Stroke Volume 130.0 µl

Waters Alliance 2795 LC Column

Column Position Column 1
 Equilibration Time (mins) 0.00
 Column Temperature (°C) 30
 Column Temperature Limit (°C) 20

Waters Alliance 2795 LC Rapid Equilibration

System Path Off
 System Flow (ml/min) 0.00
 System Time (mins) 0.00
 Re-equilibration Time (mins) 0.00
 Pre column volume (µl) 0.00

Waters Alliance 2795 I/O

Switch 1 No Change
 Switch 2 No Change
 Switch 3 No Change
 Switch 4 No Change

Column Name

Analog Output Setting Flow Rate

Waters Alliance 2795 LC Gradient Timetable

The gradient Timetable contains 7 entries which are :

Time	A%	B%	C%	D%	Flow	Curve
------	----	----	----	----	------	-------

Inlet Method Report MassLynx 4.1 SCN 683 Page 2 of 2

Method File: C:\MassLynx\HPLCMS_septembre2012.PRO\ACQUDB\00_PCA_15min20120927_KinetexC18_15cm
 Last Modified: Thursday, September 27, 2012 13:26:44 Eastern Daylight Time
 Printed: Thursday, September 27, 2012 14:54:51 Eastern Daylight Time

0.00	70.0	30.0	0.0	0.0	0.400	1
0.30	70.0	30.0	0.0	0.0	0.400	6
3.00	65.0	35.0	0.0	0.0	0.400	6
9.00	0.0	100.0	0.0	0.0	0.400	6
11.00	0.0	100.0	0.0	0.0	0.400	6
12.00	70.0	30.0	0.0	0.0	0.400	6
15.00	70.0	30.0	0.0	0.0	0.400	6

Waters Alliance 2795 LC External Event Timetable

No Entries in the Pump External Event Timetable.

Waters Alliance 2795 Injection Parameters

Inject Type Sequential
 Fill Mode Partial Loop
 Pre-sample Air Boundary (µl) 2.0
 Post-sample Air Boundary (µl) 2.0
 Pre-load time (mins) 0.00

Waters Alliance 2795 Autosampler Parameters

Sample Temperature (°C) 4
 Sample Temperature Limit (°C) 20
 Draw Depth (mm) 0
 Draw Speed Normal
 Seek Well Bottom True
 Check Plate Height False

Waters Alliance 2795 Wash Parameters

Wash Frequency Inject
 Flush Time (s) 6
 Wash Time (s) 15
 Wash Cycles 1
 Secondary Wash Volume (µl) 600.0
 Wash Sequence Wash-Purge

Figure 25 : Interface du système de chromatographie liquide haute performance (Waters 2795 Alliance HT separation) utilisé pour le fractionnement.

Experiment Report - MassLynx 4.1 SCN 683

Page 1 of 2

File: c:\masslynx\hplcms_septembre2012.pro\acqddb\daughter225_pca_15min_modpos_20120927_v1.exp

Printed: Thursday, September 27, 2012 14:55:08 Eastern Daylight Time

Creation Time	Thu 27 Sep 2012 14:50:30
Instrument Identifier	
Version Number	1.0
Duration (min)	15.0
Analog Channel 1	detecteur uv 254 nm
Analog Channel 2	220 nm
Calibration Filename	C:\MassLynx\Shutdown\NaICs2012_23juillet.cal
Solvent Delay Divert Valve Enabled	0
Number Of Functions	3

Function 1 : Daughter Scan, Time 0.00 to 15.00, Mass 100.00 to 300.00 ES+

Daughters of	224.9
Type	Daughter Scan
Ion Mode	ES+
Data Format	Centroid
Start Mass	100.0
End Mass	300.0
Scan Time (sec)	0.50
InterScan Time (sec)	0.10
Start Time (min)	0.0
End Time (min)	15.0
Cone Voltage (V)	21.0
Collision Energy (eV)	30.0

Function 2 : Daughter Scan, Time 0.00 to 15.00, Mass 100.00 to 300.00 ES+

Daughters of	224.9
Type	Daughter Scan
Ion Mode	ES+
Data Format	Centroid
Start Mass	100.0
End Mass	300.0
Scan Time (sec)	0.50
InterScan Time (sec)	0.10
Start Time (min)	0.0
End Time (min)	15.0
Cone Voltage (V)	21.0
Collision Energy (eV)	20.0

Experiment Report - MassLynx 4.1 SCN 683

Page 2 of 2

File: c:\masslynx\hplcms_septembre2012.pro\acqddb\daughter225_pca_15min_modpos_20120927_v1.exp

Printed: Thursday, September 27, 2012 14:55:08 Eastern Daylight Time

Function 3 : Daughter Scan, Time 0.00 to 15.00, Mass 100.00 to 300.00 ES+

Daughters of	224.9
Type	Daughter Scan
Ion Mode	ES+
Data Format	Centroid
Start Mass	100.0
End Mass	300.0
Scan Time (sec)	0.50
InterScan Time (sec)	0.10
Start Time (min)	0.0
End Time (min)	15.0
Collision Energy (eV)	10.0

Figure 26 : Interface du spectromètre de masse (Quattro Premier XE Micromass R MS Technologies) pour la fragmentation de l'acide phénazine-1-carboxylique.

The screenshot displays the Beckman-Coulter HPLC Gold system interface. It includes several control panels: Solvent Select (ACN, H2O), Pump Heads (Analytical, Double Flow), Flow Rate (0.800 ml/min), Duration (0.00 min), Pressure (Upper/Lower Limit, Units: KPSI/MPascal), Composition (%A: 20.00, %B: 80.00), Re-equilibration (0.00 min), Relays (1-12), Scan Definition (3D Data, Scan Data Rate: 1, From nm: 200, To nm: 500, Scan Interval: 1), Channel Definition (Channel 1: 371 nm, 4 bandwidth; Channel 2: 254 nm, 4 bandwidth; Ref. Channel: 450 nm, 80 bandwidth), Peak Detect (Wavelength: 450 nm, Bandwidth: 10 nm, Threshold: 5.000, Peak Width: 0.500 min, Real Time Purity, Chart Marks, Fraction Collector, Delay: 0.0 sec).

#	Time (min)	Module	Function	Value	Duration (min)
1	0.02	Det 168-4	Autozero		
2	5.02	Pump	%B	65.00	15.00
3	22.04	Pump	%B	80.00	0.00
4	37.02	Det 168-4	Stop Data		
5	37.03	Pump	Flow Rate	0.000	0.00
6	0				

Figure 27 : Interface du système de chromatographie liquide haute performance (Beckman-Coulter-HPLC Gold system) utilisé pour la détection et la quantification de l'acide phénazine-1-carboxylique.

Annexe II : Protocoles détaillés

Cette annexe présente certains des protocoles utilisés tout au long de ce mémoire. Le titre des sections reste le même qu'au matériel et méthode pour faciliter une recherche rapide de l'information.

Conservation de *Saprolegnia parasitica*

- Inoculer une gélose GY avec l'isolat à conserver.
- Incuber 36h à 25°C.
- Découper des rectangles d'agar (environ 1 cm X 0,5 cm) avec un scalpel stérile. Le mycélium doit être visible sur les rectangles découpés.
- Déposer les trois carrés dans une éprouvette visée, 125 mm de haut, 15 mm de diamètre, contenant 7 ml d'eau distillée stérile.
- Conserver l'éprouvette à température pièce.

Sporulation de *Saprolegnia parasitica*

- Ensemencer une gélose GY avec un carré d'agar envahi par *Saprolegnia*. (Ces carrés proviennent des tubes vissés mentionnés dans la section 2.2.).
- Incuber 56h à 25°C.
- Découper trois carrés d'agar et les déposer dans un flacon de type Erlenmeyer de 125 ml contenant 25 ml de bouillon GY.
- Incuber 72h à 25°C.
- Retirer le mycélium de l'agar et le laver à trois reprises avec du milieu MSM.
- Transférer le mycélium dans un flacon de 125 ml contenant 20 ml de milieu MSM.
- Incuber pour 48h* à 18°C.
- Filtrer le milieu MSM avec une seringue de 10 ml contenant 1 cm³ de mousse à filtre d'aquarium préalablement lavée à l'eau distillée stérile.

- Centrifuger le filtrat à faible vitesse de 500 x g.
- Réduire le volume du filtrat en retirant environ 19.8 ml du milieu MSM et utiliser une hémacymètre pour le dénombrement des zoospores.

*L'incubation à 18°C peut requérir un temps plus long si le mycélium contient encore du GY ou de l'agar.

Amplifications en chaîne par polymérase, électrophorèse et amorces utilisées

Tampon de migration (226)

- 20 ml de tampon tris base, acide acétique et acide éthylène diamine tétraacétique (TAE) 50X.
 - 242 g Tris base
 - 57,1 ml d'acide acétique glacial
 - 100 ml d'une solution d'EDTA pH 8 à 0,146 g/ml
 - Compléter le volume à un litre avec de l'eau distillée
- 0,5 mg de bromure d'éthidium.
- Compléter le volume à un litre avec de l'eau distillée.

Gel d'agarose

- 0,025 mg bromure d'éthidium.
- 1 ml tampon tris base, acide acétique et acide éthylène diamine tétraacétique (TAE) 50X.
- 0,3 à 0,75 g d'agarose.
- Compléter le volume à 50 ml avec de l'eau distillée.

Mix pour une réaction d'ACP

- 5 µl de tampon PCR 10X.
- 1.75 µl de déoxynucléotide triphosphate (dNTP) à 10 mM.

- 6 µl de chlorure de magnésium (MgCl₂) à 25 mM.
- 0,75 µl d'enzyme TAQ polymérase à 5 U/µl
- 3 µl de l'amorce avant à 5 µM.
- 3 µl de l'amorce arrière à 5 µM.
- 1 à 5 µl d'ADN cible.
- Compléter à 50 µl avec de l'eau distillée stérile.

2.3.1 Conditions pour la détection de gènes impliqués dans la synthèse du 2,4-diacetylphloroglucinol

Amorces :

PhI2a : GAGGACGTCGAAGACCACCA

PhI2b : ACCGCAGCATCGTGTATGAG

Le programme ACP pour cette réaction est le suivant :

- 4 minutes à 94°C.
- 45 secondes à 94°C.
- 45 secondes à 55°C.
- 45 secondes à 72°C.
- Répétition 34X du cycle des trois étapes de 45 secondes.
- 7 minutes à 72°C.

2.3.2 Conditions pour l'identification de *Saprolegnia parasitica*

Amorces :

C1 : ACCCGCTGATTTAAGCAT

D2 : TCCGTGTTTCAAGACGG

ITS1 : TCCGTAGGTGAACCTGCGG

ITS4 : TCCTCCGCTTATTGATATGC

Le programme pour le thermocycleur est le suivant:

- 3 minutes à 94°C.
- 30 secondes à 94°C pour la dénaturation.
- 30 secondes à 50°C pour l'hybridation.
- 90 secondes à 72°C pour l'élongation.
- Répétition 35X du cycle de dénaturation, d'hybridation et d'élongation.
- 7 minutes à 72°C.

2.3.3 Conditions pour l'identification de *Pseudomonas fluorescens*

Amorces :

PsEG30F : ATYGAAATCGCCAARCG

PsEG790R : CGGTTGATKTCCTTGA

Ps-for : GGTCTGAGAGGATGATCAGT

Ps-rev : TTAGCTCCACCTCGCGGC

Le programme pour le thermocycleur est le suivant:

- 5 minutes à 94°C.
- 60 secondes à 94°C pour la dénaturation.
- 60 secondes à 55°C pour l'hybridation.
- 90 secondes à 72°C pour l'élongation.
- Répétition 30X du cycle de dénaturation, d'hybridation et d'élongation.
- 10 minutes à 72°C.

Test pour la détection de l'activité anti-*Saprolegnia* en gélose (Spot Test)

- Inoculer un bouillon GY avec une souche bactérienne.
- Incuber le bouillon pour 12h à 25°C pour *P. fluorescens*.
- Déposer 10 µl de la culture sur une gélose GY à 2,5 cm du centre.
- Incuber la gélose 48h à 25°C.
- Déposer un carré d'agar envahi par *Saprolegnia* ou 10 µl d'une suspension de spores à concentration avoisinant les $1 \cdot 10^5$ spores/ml dans le centre de la gélose.
- Incuber 96h à 18°C en suivant l'évolution de la croissance du champignon à chaque 12h d'incubation.

2.4.1 Test pour la détection de l'activité anti-*Saprolegnia* en milieu liquide

- Inoculer une colonie bactérienne dans 5 ml de bouillon GY.
- Incuber à 25°C avec agitation pour plus de 48h.
- Centrifuger la culture à 7500 x g pour 5 minutes.
- Récolter le surnageant et le filtrer sur membrane 0,22 µm.
- Transférer 2 ml de ce surnageant stérile dans une éprouvette contenant déjà 2 ml de GY 2X.
- Ajouter un carré d'agar envahi par *Saprolegnia* à l'éprouvette.
- Incuber 48h à 25°C.

La méthode suivante, en microplaque, permet une quantification de l'activité en utilisant un nombre de spores bien défini.

-Évaluer la concentration d'une préparation de spores fraîches en utilisant un hémacymètre.

-Préparer une suspension à 2000 spores par millilitre dans du milieu GY 2X.

-Dans chacun des puits d'une microplaque 96 puits, déposer 100 µl du surnageant stérile à tester.

-Ajouter 100 µl de la suspension de spores fraîchement préparée et bien mélanger avec un embout de micropipette stérile.

-Incuber la plaque à 18°C avec faible agitation pendant environ 50h.**

-Mesurer la croissance du champignon par densité optique au lecteur de plaque à 595 nm en retirant le couvercle de la plaque avant la lecture.

*Il est possible de diluer les surnageants dans du GY. L'important est d'avoir un volume de 100 µl par puits.

**Il est préférable d'incuber moins longtemps et de suivre la croissance du champignon à intervalle régulier.

Tentative d'association de l'activité anti-*Saprolegnia* à des activités microbiennes connues

-Ensemencer 4 ml de bouillon GY avec la souche *P. aeruginosa* PA14.

-Ensemencer 4 ml de bouillon GY avec les souches à tester.

-Ensemencer 4 ml de bouillon GY avec la souche *E. coli* S17-1.

-Incuber jusqu'à la phase stationnaire pour les différentes souches.

-Filtrer les cultures pour obtenir les surnageants stériles.

« Oil spreading technique »

-Dans une boîte de Pétri vide, transférer 50 ml d'eau distillée et 20 µl d'huile à moteur.

-Déposer 10 µl du surnageant et noter le retrait de l'huile.

« Drop collapse method »

- Dans le couvercle d'une plaque 96puits ajouter 2 µl d'huile minérale.
- Laisser l'huile envahir la surface pendant 1 heure.
- Déposer 5 µl de surnageant stérile à la surface de l'huile et observer l'apparence de la goutte.

Production de cyanure d'hydrogène

- Ensemencer une gélose GY, supplémentée de glycine 4.4 g/L, par striation.
- Préparer la solution de détection : 1,4 g acide picrique dissous dans 100 ml d'eau contenant 2.5 % de carbonate de sodium.
- Imbiber un papier filtre dans la solution d'acide picrique/ Na_2CO_3 pour 20 secondes et fixer ce papier à l'intérieur du couvercle de la gélose.
- Fermer la gélose et seller avec du parafilm.
- Incuber pour 48h à 25°C.
- Noter le changement de couleur du papier filtre de jaune à brun.

Chromatographie sur couche mince (CCM)

- Faire sécher la plaque de silice à 100°C pour 1h.
- Préparer les solvants et les verser dans la chambre de migration.
- Laisser la chambre de migration se remplir de vapeur en refermant le couvercle.
- Déposer 5-10 µl de surnageant ou 1-5 µl d'extrait au bas de la plaque refroidie.
- Faire sécher les échantillons avec un séchoir à cheveux.
- Rapidement glisser la plaque dans la chambre de migration.
- Attendre que le solvant atteigne 95 % de la hauteur de la plaque.
- Retirer la plaque et marquer le front de migration.
- Révéler la plaque avec la méthode choisie.

Extraction de l'activité anti-*Saprolegnia*

- Ensemencer 25 ml de milieu GY ou SSM dans un flacon Erlenmeyer de 125 ml.
- Incuber au moins 96h à 25°C avec faible agitation.
- Avant de stériliser le surnageant de culture obtenu par filtration sur membrane 0,22 µm, il convient de réduire la concentration bactérienne par centrifugation (14000 rpm, 2 min.).
- Transférer 20ml du surnageant stérile dans un Erlenmeyer de 125 ml.
- Ajouter 22 ml de solvant, ici d'acétate d'éthyle, non miscible à l'eau.
- Agiter vigoureusement puis laisser les phases se séparer.
- Retirer le solvant avec une pipette graduée ou une pipette pasteur en évitant la phase aqueuse.
- Répéter l'ajout de solvant, l'agitation et la collection du solvant au moins deux autres fois.
- Complètement évaporer le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif et d'un bain-marie à 65°C. Il est préférable d'avoir une lente évaporation sans bouillir le solvant ce qui peut durer plusieurs heures.
- Récupérer le résidu en ajoutant un faible volume de solvant et transférer dans une petite éprouvette à paroi mince.
- Évaporer le liquide avec un séchoir à cheveux et peser la poudre résiduelle.
- Suspendre à nouveau la poudre dans un petit volume de solvant ou d'eau.

Il est également possible de concentrer l'activité en utilisant une méthode de précipitation, ce qui évite les longues périodes d'évaporation du solvant d'extraction.

- Ajouter 3 volumes d'acétone froide à un surnageant stérile.
- Centrifuger à 5000 rpm pour 10 min.
- Décanté le mélange surnageant et acétone.
- Sécher le culot dans une hotte chimique sous un courant d'air.

Mutagenèse chimique des bactéries

- Ensemencer 3ml de bouillon GY avec la souche à muter.
- Incuber avec agitation à 25°C pour 16h.
- À l'aide du bouillon, préparer 1ml d'une suspension contenant 2×10^8 cellules et vérifier la concentration de la suspension au spectrophotomètre (viser $D_{0.600nm} = 0,6$).
- Centrifuger les cellules à 12000 rpm et décanter le surnageant.
- Laver les cellules avec 800 μ l de tampon phosphate-sodium 0,1 M.
- Centrifuger les cellules à 12000 rpm et retirer le tampon.
- Ajouter 1ml de tampon phosphate-sodium 0,1 M et ajouter 15 μ l de méthanesulfonate d'éthyle.
- Bien mélanger par inversion et incuber 60 min. à 25°C avec agitation.
- Centrifuger la suspension à 12000 rpm et retirer le tampon avec l'EMS.
- Resuspendre les cellules dans 200 μ l de thiosulfate 5 %.
- Transférer la suspension dans un nouveau microtube à centrifugation de type Eppendorf.
- Centrifuger la suspension à 12000 rpm et retirer le surnageant.
- Répéter le lavage au thiosulfate 5 % deux autres fois.
- Resuspendre les cellules dans 1 ml de bouillon GY.
- Diluer les cellules pour l'étalement sur gélose. Le bon facteur de dilution s'avère être 10^{-2} et 10^{-3} dans nos conditions.
- Étaler 100 μ l des dilutions sur gélose GY et incuber pour 48h à température pièce.
- Dans une enceinte de confinement biologique, repiquer à l'aide d'un cure-dent stérile chaque colonie dans un puits d'une microplaque 96 puits contenant 100 μ l de milieu GY.
- Avec le même cure-dent, ensemercer le puits d'une autre microplaque contenant 200 μ l de milieu GY. Cette deuxième plaque est donc une copie.
- Incuber la première série des plaques pour 24h à température pièce puis ajouter 100 μ l de glycérol 40 % à chaque puits.

- Agiter ces plaques pour mélanger le glycérol et congeler à -80°C.
- Incuber la deuxième série de plaques pour 84h à température pièce avec légère agitation
- Centrifuger ces plaques à 1200 x g pour une heure.
- Pour chaque puits, transférer 38 µl de surnageant dans un puits d'une nouvelle microplaque contenant 162 µl de milieu GY.
- Mettre les nouvelles plaques au bain-marie à 65°C pour 30 minutes.
- Placer les plaques à 4°C pour 12 heures.
- Ajouter 50 µl d'une suspension GY contenant 100 zoospores de *Saprolegnia* à chaque puits et agiter avec un embout de micropipette.
- Incuber ces plaques à température pièce pour 24h et noter les puits sans croissance de l'oomycète.
- Laisser incuber les plaques pour une autre période de 24h et noter les puits sans croissance de l'oomycète.
- L'activité anti-*Saprolegnia* des bactéries mutées, correspondantes aux puits marqués plus tôt, est ensuite testée avec la méthode en microplaque tout en comparant avec le surnageant de la souche sauvage à plusieurs dilutions différentes.

Préparation du vecteur (pRS44)

- Ensemencer la souche EPI300 contenant le plasmide pRS44 sur une gélose LB avec chloramphénicol à 12,5 µg/ml et incuber pour 12h à 37°C.
- Inoculer une colonie dans 9 ml de bouillon LB chloramphénicol à 12,5 µg/ml.
- Ajouter 1 ml d'une solution de L-arabinose à 10 mM de sorte à obtenir une concentration finale de 1 mM pour induire la multiplication du nombre de plasmides dans les bactéries.
- Incuber 16-20h avec agitation (225-250 rpm).
- Extraire le plasmide au phénol acide (ci-dessous).
- Linéariser 1 µg de plasmide par digestion avec l'enzyme BamHI.
- Déphosphoryler l'ADN par traitement à la phosphatase alcaline.

-Purifier l'ADN linéarisé par migration électrophorétique sur gel d'agarose et l'utilisation du kit GFXtm PCR and Gel band purification kit de GE Healthcare[®] en suivant intégralement les instructions du manufacturier.

Extraction du plasmide par phénol acide

Matériel à préparer :

- Solution de lyse : NaOH 0,2 N et sodium dodécylsulfate 1 %.
 - Tampon d'extraction acide : NaCl 750 nM, EDTA 10 mM, NaOAc 0,3 M pH 4,2.
 - TEG : glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris 25 mM pH 8.
 - TE : EDTA 10 mM, Tris 25 mM pH 8.
 - Solution à pH basique : EDTA 5 mM, Tris 1.5 M.
 - Acétate d'ammonium saturé (C₂H₇NO₂).
 - Isopropanol à -20°C.
 - Éthanol 70 %.
-
- Inoculer 100 ml de milieu GY avec 10 ml d'une préculture de la souche contenant le plasmide à extraire dans un flacon Erlenmeyer de 250 ml. Le milieu doit contenir l'antibiotique pour le maintien du plasmide.
 - Incuber à 37°C pour 12h avec agitation.
 - Récolter les bactéries après centrifugation de 10 minutes à 12000 rpm.
 - Suspendre à nouveau le culot bactérien dans 4 ml de TEG.
 - Incuber pour 5 minutes à température pièce.
 - Ajouter 8 ml de solution de lyse fraîche et mélanger par inversion.
 - Incuber 10 minutes sur glace.
 - Ajouter 5 ml d'acétate d'ammonium saturé et mélanger par inversion.
 - Incuber 10 minutes sur glace.
 - Centrifuger pour 10 minutes à 12000 rpm.
 - Filtrer le surnageant sur gaze stérile en évitant de déloger le culot.

- Ajouter 0,7 volume d'isopropanol froid au surnageant filtré.
 - Incuber sur glace pour 20 minutes.
 - Centrifuger 15 minutes à 12000 rpm puis retirer le surnageant et sécher le culot pour un maximum de 30 minutes.
 - Dissoudre le culot dans 2,4 ml de tampon d'extraction acide.
 - Incuber 5 minutes sur glace.
 - Ajouter 2,4 ml de phénol et mélanger au vortex pour 1 minute.
 - Centrifuger 10 minutes à 12000 rpm puis retirer la phase aqueuse.
 - Ajouter 2,4 ml de tampon d'extraction acide à la phase phénolique et passer au vortex.
 - Centrifuger pour 10 minutes à 12000 rpm.
 - Enlever la phase aqueuse sans toucher l'interface.
 - Ajouter 1,4 ml de solution basique et 1,4 ml de chloroforme à la phase phénolique et mélanger par vortex pour 1 minute.
 - Centrifuger pour 10 minutes à 12000 rpm.
 - Faire une extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25 :24 :1) sur la phase aqueuse.
 - Centrifuger pour 10 minutes à 12000 rpm et garder la phase aqueuse.
 - Faire une extraction au chloroforme-alcool isoamylique (24 :1) sur la phase aqueuse.
 - Centrifuger pour 10 minutes à 12000 rpm et garder la phase aqueuse.
 - Ajouter 0,1 volume de NaOAc pH 5,2 et 0,7 volume d'isopropanol à la phase aqueuse.
 - Incuber au moins 30 minutes à -20°C.
- Centrifuger 10 minutes à 12000 rpm à 4°C et jeter le surnageant.
- Ajouter un volume d'éthanol 70 %. Centrifuger pour retirer l'éthanol. Répéter le lavage une deuxième fois.
 - Sécher le culot pour un maximum de 5 minutes et suspendre à nouveau dans un petit volume de TE.

Digestion par BamHI

- 1 µg d'ADN pRS44.
- 5 µl de tampon 10X numéro IV.
- 5 µl de BSA 10X.
- 2,5 µl d'enzyme BamHI à 20 U/µl
- Compléter jusqu'à 50 µl avec de l'eau distillée stérile.
- Incuber 1h à 37°C.

Traitement à la phosphatase alcaline

- 1.25 µg de vecteur pRS44 linéarisé.
- 2 µl de tampon rAPid alcaline phosphatase 10X.
- 9 µl d'enzyme rAPid alcaline phosphatase à 1 U/µl.
- Compléter à un volume de 20 µl avec de l'eau distillée stérile.
- Agiter vigoureusement et centrifuger brièvement.
- Incuber 1h à 37°C pour la digestion.
- Incuber 10 minutes à 75°C pour inactiver l'enzyme.

Isolation et purification de l'ADN à être cloné

- Extraire et purifier l'ADN au CTAB (ci-dessous)
- Effectuer des digestions partielles tests avec Sau3AI pour obtenir des fragments entre 1 et 5 kb.
- Estimer la taille des fragments par migration sur gel d'agarose 0,6 %.
- Effectuer la digestion partielle avec toute la préparation d'ADN.
- Faire un gel d'agarose 0,6 % avec l'ADN digéré, mais sans exposer l'ADN à l'ultraviolet.
- Découper la région du gel contenant les fragments de la taille souhaitée.

-Purifier l'ADN avec le kit GFXtm PCR and Gel band purification kit de GE Healthcare[®].

-Déterminer la concentration de l'ADN purifié par spectrophotométrie.

Extraction de l'ADN génomique (CTAB)

Matériel à préparer :

-TE : EDTA 10 mM, Tris 25 mM pH 8.

-Sodium dodécyl sulfate 10 %.

-Protéinase K à 20 mg/ml.

-NaCl 5 M.

-Éthanol 70 %.

-Solution bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB) / NaCl : 4.1g de NaCl dans 80 ml d'eau et lentement ajouter 10 g de CTAB en chauffant jusqu'à 65°C en plus d'agiter pour dissoudre le CTAB. Ajuster le volume final à 100 ml avec de l'eau distillée.

-Ensemencer une éprouvette contenant 4ml de milieu avec la culture bactérienne.

-Incuber 18h à 25°C.

-Centrifuger 1.5 ml de culture à 12000 rpm.

-Jeter le surnageant et resuspendre le culot dans 567 µl de TE.

-Ajouter 3 µl de protéinase K.

-Ajouter 30 µl de SDS 10 %.

-Incuber 1h à 37°C.

-Ajouter 100 µl de NaCl 5 M et bien mélanger par inversion.

-Ajouter 80 µl de la solution CTAB / NaCl et bien mélanger par inversion.

-Incuber 10 minutes à 65°C.

-Ajouter 750 µl de chloroforme et bien mélanger par inversion.

-Centrifuger 5 minutes à 12000 rpm.

-Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube.

- Ajouter 450 µl d'isopropanol et agiter.
- Centrifuger 1 minute à 12000 rpm.
- Jeter le liquide et laver le culot avec 1 ml d'éthanol 70 %.
- Retirer le liquide et laisser sécher le culot pour un maximum de 10 minutes.
- Dissoudre le culot d'ADN dans un petit volume de TE.
- Ajouter la RNase à la préparation d'ADNg en utilisant 1 µl d'RNase à 10 mg/ml pour 100 µl de préparation.
- Incuber 30 minutes à 37°C.

Digestion par Sau3AI

- 1 µg d'ADN.
- 1 µl de tampon 10X numéro II.
- 0,5 µl de BSA 20X.
- 1 µl d'enzyme Sau3AI à 20 U/µl
- Compléter le volume à 10 µl avec de l'eau distillée stérile.
- Incuber 1h à 37°C pour la digestion.
- Incuber 20 minutes à 65°C pour inactiver l'enzyme.

Ligation des fragments d'ADNg dans pRS44

- 10 µl de vecteur déphosphoryllé.
- 2 µl de tampon ligase 10X.
- 1,5 µl d'enzyme T4 DNA ligase à 1 U/µl.
- 1.25 µl d'insert (fragments de 1000 à 2000 bp) (environ 100 ng d'ADN).
- 5.25 µl d'eau distillée stérile.

- 10 µl de vecteur déphosphoryllé.
- 2 µl de tampon ligase 10X.
- 1,5 µl d'enzyme T4 DNA ligase à 1 U/µl.
- 2 µl d'insert (fragments de 2000 à 3500 bp) (environ 150 ng d'ADN).
- 4.5 µl d'eau distillée stérile.

- 10 µl de vecteur déphosphoryllé.
- 2 µl de tampon ligase 10X.
- 1,5 µl d'enzyme T4 DNA ligase à 1 U/µl.
- 2,5 µl d'insert (fragments de 3500 à 5000 bp) (environ 200 ng d'ADN).
- 4 µl d'eau distillée stérile.

Les ligations sont effectuées à 16°C pendant 20h.

Digestion par NotI

- 1 µl d'ADN.
- 1 µl tampon NotI 10X.
- 6 µl d'eau distillée stérile.
- 0,5 µl BSA 20X.
- 0,5 µl Rnase A 20X.
- 0,2 µl d'enzyme NotI 10 U/µl.
- Incuber 1h à 37°C pour la digestion

Introduction de la banque d'ADNg dans *E. coli* EPI300

Matériel à préparer :

TfB I

- Acétate de potassium 30 mM ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$)
- Chlorure de potassium 100 mM (KCl)
- Chlorure de calcium 10 mM ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Chlorure manganeux 50 mM ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- Glycérol 15 % ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)
- Ajuster le pH à 5.8 avec de l'acide acétique et stériliser par filtration.

TfB II

- Pipes 10 mM
 - Chlorure de calcium 75 mM ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
 - Chlorure de potassium 10 mM (KCl)
 - Glycérol 15 % ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)
 - Ajuster le pH à 6.5 avec de l'hydroxyde de potassium (KOH) et stériliser par filtration.
-
- Strier la souche bactérienne sur une gélose LB.
 - Incuber 12h à 37°C.
 - Repiquer une quinzaine de colonies dans 20 ml de milieu 2YT.
 - Incuber à 37°C avec agitation jusqu'à l'obtention d'une densité optique 0,28 à 550 nm.
 - Ensemencer 200 ml de milieu 2YT avec 10 ml de la première culture.
 - Incuber à 37°C avec agitation jusqu'à l'obtention d'une densité optique 0,28 à 550 nm.
 - Refroidir la culture bactérienne sur glace.
 - Centrifuger les bactéries dans 4 tubes de 50 ml à 4000 rpm pour 10 minutes.
 - Jeter le surnageant et essuyer les parois internes des tubes avec des papiers Kimwipe.
 - Suspendre à nouveau chacun des culots dans 20 ml de TfB I.
 - Garder sur glace pour 5 minutes.
 - Centrifuger 10 minutes à 3300 x g.
 - Jeter le surnageant et essuyer les parois internes des tubes avec des papiers Kimwipe.
 - Suspendre chacun des culots dans 2 ml de TfB II.
 - Garder sur glace pour 15 minutes.
 - Aliquoter les cellules compétentes en fractions de 100 µl en travaillant sur glace.
 - Les congeler le plus rapidement possible à l'azote liquide ou avec un bain d'éthanol à -80°C.

- Utiliser un aliquot de cellules compétentes fraîches ou décongeler une ampoule sur glace.
- Ajouter un maximum de 10 µl d'ADN.
- Garder sur glace pour 30 minutes.
- Choc thermique sur l'ampoule pour 90 secondes à 42°C.
- Garder 2 minutes sur glace.
- Ajouter 400 µl de milieu 2YT.
- Incuber à 37°C pour 1h avec agitation.
- Étaler sur géloses LB avec l'antibiotique pour la sélection.
- Incuber à 37°C pour 12h.
- Ajouter un petit volume de bouillon LB aux géloses.
- Utiliser une pipette Pasteur pliée pour mélanger les colonies au liquide.
- Récolter ce liquide pour la congélation des transformants.

Transfert de la banque d'ADNg vers *E. coli* S-17

Matériel à préparer :

Solution I

- Tris 25 mM pH 8
- EDTA 10 mM
- Glucose 50 mM
- Conserver sur glace.

Solution II

- NaOH 0,2 N
- SDS 1 %
- Préparer juste avant usage.

Solution III

- KOAc 3 M pH 4,8 (Le pH est ajusté avec de l'acide acétique glacial)
- La solution contient du potassium à 3 M et de l'acétate à 5 M.

- Inoculer 10 ml de bouillon LB avec un aliquot de la banque contenue dans EPI 300 et ajouter l'antibiotique pour le maintien de la banque en plus d'ajouter 1 mM de L-arabinose.
- Incuber avec agitation pour 12h à 37°C.
- Centrifuger la culture en aliquot de 1,5 ml pour 1 minute à 4°C à 12000 rpm.
- Suspendre à nouveau les culots dans 100 µl de solution I.
- Incuber 5 minutes à température pièce.
- Ajouter 200 µl de solution II fraîche et mélanger par inversion.
- Incuber sur glace pour 5 minutes.
- Ajouter 150 µl de solution III et mélanger par inversion.
- Incuber sur glace pour 5 minutes.
- Centrifuger 5 minutes à 12000 rpm.
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube en évitant de toucher le culot fragile.
- Ajouter 2 volumes d'éthanol à température ambiante et mélanger par inversion.
- Incuber 2 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 5 minutes à 12000 rpm.
- Jeter le surnageant et sécher le culot pour un maximum de 15 minutes.
- Suspendre à nouveau le culot dans un petit volume de TE.

Insertion du gène *trfA* pour le transfert de la banque d'ADNg

- Incuber le donneur à 37°C pour 12h dans 3 ml de bouillon LB avec antibiotique pour le maintien du plasmide.
- Incuber la réceptrice (*P. fluorescens*) à 25°C pour 16h dans 3 ml de bouillon LB.
- Récolter les cellules par centrifugation à 10000 rpm pour 10 minutes.
- Laver les culots avec du milieu LB.
- Suspendre à nouveau les cellules à une densité environnant $5 \cdot 10^9$ cellules par ml dans du milieu LB.

- Dans un nouveau tube, mélanger 60 µl du donneur et 60 µl de la réceptrice.
- Appliquer au moins 100 µl du mélange sur un filtre 0,22 µm restant sur une gélose LBA.
- Incuber ce montage pour 4h à 27°C.
- Récolter la mixture de bactéries avec une spatule stérile et transférer dans 750 ml de milieu M9+glucose.
- Diluer le mélange dans de la saline (0,85 % NaCl) stérile jusqu'à un facteur de dilution 10^{-7} ou 10^{-8} .
- Étaler 100 µl des trois dernières dilutions sur gélose PIA avec antibiotique pour la sélection.