

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABDELHAMID IBN-BADIS DE MOSTAGANEM



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Domaine : S.N.V
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée
Option: Interactions Microorganismes, Hôtes et Environnement

THÈSE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT 3^{ème} cycle LMD

Par

M^{me} ZATOOUT Asma

Thème

***Staphylococcus* à coagulase négative isolés au Centre
Anti-Cancer de Batna: étude bactériologique, profil de
sensibilité aux antibiotiques, formation de biofilm et
thérapie antistaphylococcique**

Soutenue publiquement le: 14/10/2020

Devant le jury:

Président	Pr	CHIBANI Abdelouahab	Université de Mostaganem
Directeur de thèse	Pr	DJIBAOUI Rachid	Université de Mostaganem
Co-directeur	Pr	KASSAH-LAOUAR Ahmed	Université de Batna 2
Examinateur	Pr	BELAHCEN Miloud	Centre Universitaire d'Ain Temouchent
Examinateur	Pr	MEKHALDI Abdelkader	Université de Mostaganem
Examinatrice	MCA	REBAI Ouafa	Université de Mostaganem

Année universitaire: 2019-2020

Dédicace

Je dédie cette thèse

À mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et
qui m'ont encouragé et soutenu pendant mes études

À mes chers frères et mes chères sœurs

À mon cher mari

À ma chère fille Sidra

À mes chers beaux parents

À mes beaux frères et mes belles sœurs.

À toute ma famille

À tous mes collègues et mes amis

Asma

Remerciements

En premier, je tiens à remercier mon «DIEU», le très puissant, qui m'a donné la santé et le courage pour aller au bout de cette thèse.

Mes vifs remerciements sont adressés plus particulièrement : A mon directeur de thèse, Monsieur le Pr. **DJIBAOUI Rachid**, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance. Ses compétences, ses précieux conseils, sa disponibilité et sa gentillesse à mon égard ont contribué au bon déroulement de ce travail de recherche. J'ai trouvé en lui un directeur toujours disponible et ouvert.

Ma profonde gratitude va à Mr. **KASSAH-LAOUAR Ahmed** (Professeur à l'Université de Batna 2) et responsable du laboratoire central du Centre de Lutte Contre le Cancer de Batna qui a accepté d'être co-promoteur pour son aide précieuse, pour sa gentillesse, pour son accueil chaleureux, pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires pour le bon déroulement de mon travail au sein de son laboratoire central.

Je remercie vivement Mr. **CHIBANI Abdelouahab** (Professeur à l'Université de Mostaganem) pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Un grand merci aux membres du jury, Mr. **BELAHCEN Miloud** (Professeur au Centre Universitaire d'Ain Timouchent), Mr. **MEKHALDI Abdelkader** (Professeur à l'Université de Mostaganem) et Mme. **REBAI Ouafa** (Maître de conférence A, à l'Université de Mostaganem) de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Ce travail est le fruit de longues années d'études, auxquelles l'amour et le soutien inconditionnel de ma famille et mes amis ont largement contribué.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des employés du laboratoire central du Centre de Lutte Contre le Cancer et spécialement Dr. **MESSALA Amina** maître assistante en microbiologie clinique, pour l'aide qu'ils m'ont apporté.

Mes remerciements s'adressent également à tous les membres du laboratoire de microbiologie et biologie végétale, Université de Mostaganem.

Je remercie vivement Dr. **DADAH Hicham**, **BENKREDDA Ftima**, **MEZARI Hibbet Errahmen** de m'avoir aidé dans la partie de *Pseudomonas*.

Je tiens à remercier aussi Mr. **KAHOUL Amine**, ingénieur de laboratoire de recherche de biotechnologie alimentaire, département de biotechnologie alimentaire, Université de Batna 1 pour son aide.

Je remercie vivement Pr. OUDJEHIIH B., laboratoire de botanique, département réalisé l'identification des plantes.

Mes remerciements s'adressent également à Mr. **KERKOUD Mohamed**, gérant du laboratoire de DIAG GENE, pour son aide pour faire la caractérisation moléculaire.

Je tiens à remercier aussi Pr. **FLAMINI Guido**, département de pharmacie, Université de Pisa, Italie pour son aide à faire la CG-SM.

Je tiens à remercier mes collègues **BENBRAHIM Chahla**, **MALLEM Khalida**, **MECHAALA Sara**, **REGAZ Amina** et **ZAATOUT Nawel** pour l'aide et le soutien qu'elles m'ont apporté.

Je tiens à remercier aussi tous qui m'ont aidé de loin ou de près à la réalisation de ce travail .

المخلص

كانت المكورات العنقودية السلبية التخثير (SCN) تعرف فيما سبق أنها بكتيريا غير ممرضة ، وقد تبين حالياً أنها ممرضة انتهازية و مقاومة للمضادات الحيوية مع قدرتها على تشكيل البيوفيلم الذي قد يزيد من ضراوتها. في إطار هذه الأطروحة قمنا أولاً بعزل هذه البكتيريا من مصالغ مختلفة لمركز مكافحة السرطان (CAC) بباتنة (الجزائر) و بعدها إختبرنا مقاومتها للمضادات الحيوية و تشكيلها للبيوفيلم حيث عزل في هذا البحث 66 سلالة SCN سريرية وتم تقييم تشكيلها للبيوفيلم على أطباق البوليسترين ذات 96 بئر (TCP) وبطريقة أجار الكونغو الأحمر (RCA) كما كشفنا أيضاً عن مورثات *mecA* و *icaAD* في عزلات SCN.

أجرينا أيضاً دراسة لمعرفة التأثير ضد عزلات SCN بمجموعة بكتيرية تابعة لـ *Pseudomonas* ذات الفلورة. فقد تم عزل تسعة وعشرين عزلة تابعة لهذه المجموعة من جذور نجليات برية المعروفة بشعير الفأر *Hordeum murinum* لاستخدامها في تثبيط 20 عزلة من SCN باستخدام اختبار التضاد بالخطوط المتقاطعة. كما تم اختبار رشاحات مزارع هذه البكتيريا المأخوذة من وسط MH السائل. وقد استعملت العزلة *Pseudomonas fluorescens* PK الأكثر فعالية في تثبيط SCN لإنتاج مركبات الفينازين بزرعها في وسط NBY السائل ومن ثم تمت عملية الاستخلاص بمذيب أسيتات الإيثيل ليمت استخدام المركب الجاف ضد عزلات SCN.

وفي سياق آخر، قمنا بدراسة النشاط المضاد للبكتيريا والمضاد للبيوفيلم لزيت أساسية و لمستخلصات الميثانول من بعض النباتات المأخوذة من منطقة الأوراس وهي (*Juniperus oxycedrus* L. ، *Juniperus* ، *Thymus ciliatus* ssp. *munbyanus* (Boiss. & Reut.) و *Salvia officinalis* L. ، *thurifera* L. Batt. كما قمنا أيضاً بتحديد التركيب الكيميائي للزيوت الأساسية المستخلصة من النباتات المدروسة بواسطة كروماتوغرافيا الغاز مع القياس الطيفي الكتلي (CG-SM).

بينت النتائج المتحصل عليها تنوعاً في عزلات SCN . فقد تم تصنيفها إلى تسعة أنواع، (44 ٪) منها كانت قريبة من *Staphylococcus epidermidis* و قد عزلت في المقام الأول من مصلحة أمراض الدم. عزلات SCN كانت كلها تقريباً مقاومة للبنسلين ج بنسبة 98.5 ٪ ومعظمها مقاومة للسيفوكسيتين بنسبة (80.3 ٪) والأوكساسيلين ب (72.2 ٪). كان إختبار TCP أكثر حساسية (89.4 ٪) من إختبار RCA (31.8 ٪) في الكشف عن تشكيل البيوفيلم. تم الكشف عن المورثة *mecA* في (9 / 6) من مكورات SCN المقاومة للسيفوكسيتين أي بنسبة 66.7 ٪ و عن المورثة *icaAD* في (9/5) أي ما يعادل 55.6 ٪ من عزلات SCN الإيجابية لإختبار RCA.

قامت عزلات *Pseudomonas* المدروسة بتثبيط 19 من 20 من عزلات SCN وتعتبر العزلة PK *Pseudomonas fluorescens* الأكثر فعالية حيث قامت بتثبيط 14 عزلة من SCN بمناطق تثبيط تتراوح بين 12 ملم إلى 55 ملم. كما أظهر مركب الفينازين المستخلص منها و في حالته الجافة فعالية ضد 13 عزلة من المكورات العنقودية مع مناطق تثبيط تتراوح من 6.75 إلى 27.33 ملم. أظهر تحليل هذا المركب في مقاييس الطيف الضوئي المرئي و الأشعة فوق البنفسجية والأشعة تحت الحمراء الخصائص التي تجعل منه أقرب إلى Hydroxyphénazines .

تظهر نتائج تحليل التركيب الكيميائي بواسطة CG-SM ثراء وتنوعاً للزيوت الأساسية للنباتات المدروسة مثل ما هو الحال عند *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* الأكثر فعالية والذي يحتوي على 32 مركباً من بينها مركب التيمول (69 ٪). كما بينت نتائج التحليل لمستخلصات الميثانول للنباتات المدروسة بواسطة كروماتوغرافيا السائل ذو الأداء العالي (HPLC) تنوعاً في التركيب. أظهر الزيت الأساسي ومستخلص الميثانول لنبات *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* مقارنة بالنباتات الأخرى التي تمت دراستها نشاطاً مثبّطاً جيداً على عزلات SCN بأقطار تثبيط متوسطة تبلغ 24.99 مم و 15.76 مم على التوالي. و كانت عزلات SCN أكثر حساسية للزيت الأساسي لـ *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* مع قيم CMI و CMB تساوي 2.65 ملغ / مل و 5.31 ملغ / مل على التوالي وقدر تثبيط البيوفيلم بنفس الزيت الأساسي و مستخلص الميثانول بنسبة 65.63 ٪ و 58.08 ٪ على التوالي يليهما *officinalis* بنسبة 53.13 ٪ و 49.72 ٪ على التوالي.

الكلمات المفتاحية: المكورات العنقودية سلبية التخثر ، مقاومة المضادات الحيوية ، البيوفيلم ، المستخلصات النباتية ، *Pseudomonas* spp.

Résumé

Considérés depuis longtemps comme des commensaux avirulents, les Staphylocoques à Coagulase Négative (SCN) sont actuellement reconnus comme agents pathogènes opportunistes possédants de multiples propriétés de résistance aux antibiotiques et de formation de biofilms ce qui peut augmenter leur virulence. Dans le cadre de cette thèse, nous avons procédé premièrement à l'isolement des SCN cliniques des différents services du Centre Anti-Cancer (CAC) de Batna (Algérie) puis à l'évaluation de leur résistance aux antibiotiques et à l'étude de leur formation de biofilms. Au total 66 SCN ont été isolés et leur formation de biofilm a été évaluée par la méthode de culture de tissu en plaque (TCP) et la méthode de Rouge Congo Agar (RCA). Après, nous avons détecté la présence des gènes *mecA* et *icaAD* dans les génomes de quelques SCN.

Une étude de l'effet antistaphylococcique de quelques *Pseudomonas* fluorescents a été réalisée. 29 isolats de *Pseudomonas* ont été isolés à partir des racines d'une plante graminée sauvage (l'orge du rat = *Hordeum murinum*) pour les utiliser dans l'inhibition de 20 isolats de SCN en utilisant la méthode des stries croisés. Les surnageants des cultures des *Pseudomonas* dans le milieu MHB ont été aussi testés. L'isolat de *Pseudomonas fluorescens* PK le plus performant dans l'inhibition des SCN a été utilisé pour la production des composés phénaziniques. Il a été inoculé dans le milieu NBY liquide puis une extraction par le solvant d'acétate d'éthyle a été effectuée. Le composé obtenu à sec a été utilisé contre les isolats de SCN.

Une autre approche a été également menée et consiste en une étude de l'effet des huiles essentielles et des extraits méthanoliques de quelques plantes récoltées de la région des Aures (*Juniperus oxycedrus* L., *Juniperus thurifera* L., *Salvia officinalis* L. et *Thymus ciliatus* ssp. *munbyanus* (Boiss. & Reut.) Batt. sur la croissance des SCN et leur formation des biofilms. La composition chimique des huiles essentielles des plantes étudiées a été déterminée par la CG-SM.

Les résultats obtenus ont montré une diversité des SCN. Neuf espèces ont été obtenues dont 44% isolées principalement du service d'onco-hématologie sont rapprochées à *Staphylococcus epidermidis*. Presque tous les isolats étaient résistants à la pénicilline G (98.5%), et la majorité ont montré une résistance à la céfoxitine (80.3%) et à l'oxacilline (72.2%). La méthode TCP était plus sensible (89.4%) que la méthode RCA (31.8%) dans la détection de la formation des biofilms. Le gène *mecA* a été détecté dans 66.7% (6/9) isolats des SCN résistants à la céfoxitine et le gène *icaAD* dans 55.6% (5/9) isolats positifs des SCN sur RCA.

Les 29 isolats de *Pseudomonas* ont inhibé 19 sur 20 SCN. L'isolat le plus performant *P. fluorescens* PK a inhibé 14 isolats de SCN avec des zones d'inhibition allant de 12 mm à 55 mm. Le composé phénazinique extrait à sec a montré une efficacité contre 13 isolats de staphylocoques avec des zones d'inhibition allant de 6.75 à 27.33 mm. L'analyse du composé par les spectrophotomètres UV-visible et infrarouge ont montré des caractéristiques qui font rapprocher le composé obtenu aux hydroxyphénazines.

Les résultats de l'analyse de la composition chimique par CG-SM des HE montrent la richesse et la diversité des huiles essentielles des plantes étudiées dont la plante la plus active *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* qui contient 32 composés identifiés parmi lesquels le thymol (69%). Les résultats d'analyse des EM des plantes étudiées par HPLC montrent une variabilité de leur composition. L'huile essentielle et l'extrait méthanolique de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* par rapport à ceux des autres plantes étudiées ont montré une bonne activité inhibitrice sur les isolats de SCN avec des diamètres moyens d'inhibition de 24.99 mm et 15.76 mm respectivement. Les SCN ont été plus sensibles à l'huile essentielle de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* avec des valeurs de CMI et CMB égales à 2.65 mg/ml et 5.31 mg/ml respectivement. L'activité antibiofilm de l'HE et de l'EM de cette dernière plante est appréciable pour l'HE et l'EM avec un pourcentage de 65.63 % et 58.08 % respectivement suivie par l'HE et l'EM de *S. officinalis* avec 53.13 % et 49.72 % respectivement.

Mots clés: Staphylocoque à coagulase négative, résistance aux antibiotiques, biofilm, extraits de plantes, *Pseudomonas* spp.

Abstract

Long regarded as avirulent commensals, Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS) are currently recognized as opportunistic pathogens with multiple properties of antibiotic resistance and biofilm formation which can increase their virulence. Within the work of this thesis we proceeded first to the isolation of clinical CoNS from different services of the Anti-Cancer Center (CAC) of Batna (Algeria) then to the evaluation of their resistance to antibiotics and to the study of their biofilms formation. A total of 66 CoNS were isolated and their biofilms formation was evaluated by tissue culture plate (TCP) and Red Congo Agar (RCA) methods. Afterwards we detected the presence of the *mecA* and *icaAD* genes in the genomes of some CoNS.

A study of the antistaphylococcal effect of some fluorescent *Pseudomonas* has been carried out. 29 *Pseudomonas* isolates were isolated from the roots of a wild grass plant (rat barley = *Hordeum murinum*) for use in the inhibition of 20 CoNS isolates using the crossed streak method. Supernatants from *Pseudomonas* cultures in MHB were also tested. The high-performing *Pseudomonas fluorescens* PK isolate for inhibiting CoNS has been used for the production of phenazine compounds. It was inoculated into the NBY broth and then extraction with the ethyl acetate solvent was carried out. The dry compound was used against the CoNS isolates.

Another approach has also been carried out and consists of a study of the effects of essential oils and methanolic extracts of some plants harvested from the Aures region (*Juniperus oxycedrus* L., *Juniperus thurifera* L., *Salvia officinalis* L. and *Thymus ciliatus* ssp. *munbyanus* (Boiss. & Reut.) Batt. on the growth of CoNS and their formation of biofilms. The chemical composition of the essential oils of the plants studied has been determined by GC-MS.

The results obtained showed a diversity of CoNS. Nine species were obtained, whose 44% mainly isolated from the onco-hematology service are belonged to *Staphylococcus epidermidis*. Almost all of the isolates were resistant to penicillin G (98.5%), and the majority showed resistance to cefoxitin (80.3%) and oxacillin (72.2%). The TCP method was more sensitive (89.4%) than the RCA method (31.8%) in detecting the formation of biofilms. The *mecA* gene was detected in 66.7% (6/9) isolates of cefoxitin resistant CoNS and the *icaAD* gene was detected in (55.6%) (5/9) positive CoNS isolates on RCA.

The 29 *Pseudomonas* isolates inhibited 19 of 20 CoNS. The best-performing isolate *P. fluorescens* PK inhibited 14 CoNS isolates with zones of inhibition ranging from 12 mm to 55 mm. The dry extracted phenazine compound has shown efficacy against 13 staphylococcal isolates with zones of inhibition ranging from 6.75 mm to 27.33 mm. Analysis of the compound by UV-visible and infrared spectrophotometers has shown characteristics of the compound obtained closer to the hydroxyphenazines.

The results of analysis of the chemical composition by GC-MS show a richness and diversity of the essential oils of the plants studied including the most active plant *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* which contains 32 identified compounds among the thymol (69%). ME analysis of the plants studied by HPLC show variability in their composition. The oil and the methanolic extract of *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* compared to those of the other plants studied showed a high inhibitory activity on CoNS isolates with average inhibition diameters of 24.99 mm and 15.76 mm respectively. CoNS were more sensitive to the essential oil of *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* with MIC and MBC values equal to 2.65 mg/ml and 5.31 mg/ml respectively. The antibiofilm activity of EO and ME of this last plant is appreciable with a percentage of 65.63 % and 58.08 % respectively followed by the EO and the ME of *S. officinalis* with 53.13 % and 49.72 % respectively.

Keywords: Coagulase-negative staphylococci, antibiotic resistance, biofilm, plant extracts, *Pseudomonas* spp.

Table des matières

المُلخَص, résumé, abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I. Généralités sur les staphylocoques à coagulase négative 5

I.1. Historique..... 5

I.2. Taxonomie 6

I.3. Classification du genre *Staphylococcus* 6

I.4. Description des SCN 6

I.5. Habitat..... 7

I.6. Transmission 7

I.7. Pouvoir pathogène des SCN..... 8

I.8. Facteurs de virulence des SCN 9

I.8.1. Toxines..... 9

I.8.2. Enzymes 10

I.8.3. La capsule polysaccharidique et le biofilm 10

I.8.4. Persistance intracellulaire..... 10

I.9. Caractères bactériologiques des SCN 11

I.10. Caractéristiques biochimiques des SCN 11

I.11. Résistance aux antibiotiques 14

I.11.1. Origine génétique de la résistance et modalités de transfert génétique..... 14

I.11.1.1. Résistance naturelle (ou intrinsèque) 14

I.11.1.2. Résistance acquise..... 14

I.11.2. Mécanismes de résistance 15

I.11.3. Profil de résistance aux antibiotiques des SCN..... 16

I.11.4. Staphylococcal Cassette Chromosome mec Types (SCC*mec*)..... 20

I.11.4.1. Le complexe du gène *mec* 21

I.11.4.2. Le complexe du gène *ccr* 21

Chapitre II. Le biofilm des SCN 23

II.1. Définition du biofilm 23

II.2. Etapes de la formation du biofilm..... 24

II.2.1. Attachement (fixation)..... 24

II.2.1.1. Protéines de surface	25
II.2.1.2. Acides teichoïques	25
II.2.1.3. L'ADN extracellulaire.....	25
II.2.2. Accumulation et maturation des biofilms	25
II.2.2.1. Adhésine Intercellulaire Polysaccharidique (PIA) et le locus <i>ica</i>	26
II.2.2.2. Quorum Sensing	27
II.2.3. Détachement	27
II.3. Relation de la formation de biofilm à la sensibilité aux antibiotiques.....	27
Chapite III. Généralités sur les Pseudomonas fluorescents.....	29
III.1. Description de <i>Pseudomonas</i> spp.	29
III.2. Classification du genre <i>Pseudomonas</i>	31
III.3. Habitat	31
III.4. Production de substances inhibitrices de la croissance des pathogènes	31
III.4.1. Les antibiotiques.....	32
III.4.1.1. Le 2,4-Diacétylphloroglucinol (DAPG)	32
III.4.1.2. Les phénazines.....	33
III.4.1.3. La pyocyanine	35
III.4.1.4. Pyolutéorine.....	35
III.4.1.5. Pyrrolnitrine.....	35
III.4.2. Cyanure d'hydrogène	36
III.4.3. Les sidérophores.....	36
III.4.3.1. Pyoverdine.....	37
III.4.3.2. La Pyochéline	37
III.4.3.3. L'acide salicylique	38
III.4.4. Les enzymes	38
III.5. Régulation de la synthèse de phénazine et facteurs environnementaux.....	38
Chapitre IV. Les plantes étudiées et leurs métabolites secondaires.....	39
IV.1. Les huiles essentielles	39
IV.1.1. Définition des huiles essentielles	39
IV.1.2. Modes d'obtention des huiles essentielles.....	39
IV.1.2.1. Entraînement à la vapeur d'eau.....	40
IV.1.2.1.a. Hydrodistillation simple	40
IV.1.2.1.b. Distillation à la vapeur saturée	40
IV.1.2.2. Distillation sèche	40
IV.2. Les extraits de plantes	40
IV.2.1. Méthodes d'extraction avec des solvants organiques	40

IV.2.1.1. Macération.....	41
IV.2.1.2. Percolation.....	42
IV.2.1.3. Extraction par Soxhlet.....	42
IV.3. Composition chimique des métabolites secondaires	42
IV.3.1. Terpènes	42
IV.3.1.1. Les oxydes.....	43
IV.3.1.2. Les aldéhydes	43
IV.3.1.3. Les cétones	44
IV.3.1.4. Les esters	44
IV.3.1.5. Les lactones	44
IV.3.1.6. Les coumarines.....	44
IV.3.1.7. Les hydroxydes	45
IV.3.2. Les polyphénols.....	45
IV.4.2.1. Les acides phénoliques.....	46
IV.4.2.2. Les flavonoïdes	46
IV.4.2.3. Les tanins.....	46
IV.4. Les plantes étudiées.....	47
IV.4.1. <i>Juniperus oxycedrus</i> L.....	47
IV.4.1.1. Nomenclature et description de <i>J. oxycedrus</i> L.....	47
IV.4.1.2. Classification de <i>J. oxycedrus</i> L.....	47
IV.4.1.3. Vertus médicinales de <i>J. oxycedrus</i> L.	48
IV.4.2. <i>Juniperus thurifera</i> L.....	49
IV.4.2.1. Nomenclature et description de <i>J. thurifera</i> L.....	49
IV.4.2.2. Classification de <i>J. thurifera</i> L.....	49
IV.4.2.3. Vertus médicinales de <i>J. thurifera</i> L.	50
IV.4.3. <i>Salvia officinalis</i> L.	50
IV.4.3.1. Nomenclature et description de <i>S. officinalis</i> L.....	50
IV.4.3.2. Classification de <i>S. officinalis</i> L.....	51
IV.4.3.3. Vertus médicinales de <i>S. officinalis</i> L.	51
IV.4.4. <i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> (Boiss. et Reut.) Batt.....	52
IV.4.4.1. Nomenclature et description de <i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i>	52
IV.4.4.2. Classification de <i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> (Boiss. et Reut.) Batt.	53
IV.4.4.3. Vertus médicinales de <i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i>	54
Chapitre V. Moyens de lutte des SCN	55
V.1. Introduction	55
V.2. Thérapeutiques antibactériennes et antibiofilms possibles.....	55

V.2.1. Interférence avec les facteurs essentiels du biofilm staphylococcique.....	55
V.2.2. Modification des caractéristiques adhésives des dispositifs médicaux à demeure.....	55
V.2.3. Vaccination antibiofilm staphylococcique.....	56
V.2.4. Traitement des infections causées par <i>S. epidermidis</i> associée à un biomatériau.....	56
V.3. Métabolites de <i>Pseudomonas</i> antistaphylococciques	57
V.3.1. La Mupirocine (Acide pseudomonique).....	57
V.3.2. Plusbacine A ₃	58
V.3.3. 4-hydroxy-2-heptylquinoline N-oxide (HQNO).....	58
V.3.4. Les phénazines.....	58
V.3.5. LasA protéase	59
V.3.6. Acide cis-2-décénoïque	59
V.3.7. Les rhamnolipides.....	59
V.3.8. La Pyochéline	59
V.3.9. <i>P. aeruginosa</i> induit une dispersion du biofilm de <i>S. epidermidis</i>	59
V.4. Métabolites de plantes antistaphylococcique.....	61
V.4.1. Monotèrpenes	61
V.4.2. Thymol et carvacrol.....	62
V.4.2.1. Activité antibiofilm de thymol et de carvacrol	62
V.4.2.2. Activité antibactérienne de thymol et de carvacrol	62
V.4.3. Farnésol	63
V.4.4. Les composés phénoliques	63
V.4.4.1. Flavonoïdes.....	63

PARTIE PRATIQUE

Chapitre I. Matériel et méthodes	64
I.1. Isolats bactériens	64
I.1.1. Isolement et purification des SCN	64
I.1.2. Identification des isolats des SCN.....	64
I.1.2.1. Examen macroscopique de colonies des SCN	64
I.1.2.2. Examen microscopique des SCN	64
I.1.2.3. Test de coagulase libre	65
I.1.2.4. Test de la catalase.....	65
I.1.2.5. Identification des SCN par Galerie API Staph.....	65
I.1.3. Conservation des SCN	66
I.1.4. Sensibilité aux antibiotiques des isolats de SCN.....	66
I.1.5. Les concentrations minimales inhibitrices de vancomycine et oxacilline des SCN.....	66
I.2. Formation du biofilm	67

I.2.1. Etude de la formation du biofilm par la méthode <i>in vitro</i> de coloration au cristal violet sur microplaques.....	67
I.2.2. Etude de la formation du biofilm par la méthode <i>in vitro</i> de Rouge Congo Agar	68
I.3. Identification génotypique pour la détection des gènes <i>mecA</i> et <i>icaAD</i>	68
I.3.1. Extraction d'ADN.....	68
I.3.2. Quantification de l'ADN	69
I.3.3. Composition et concentration du mélange réactionnel dans les microtubes	69
I.3.4. Conditions de température de PCR.....	69
I.3.5. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	70
I.4. Séquençage des gènes ARNr 16S	70
I.5. Etude de <i>Pseudomonas</i> spp.	70
I.5.1. Isolement des <i>Pseudomonas</i>	70
I.5.2. Choix et purification des <i>Pseudomonas</i> fluorescents.....	71
I.5.3. Orientation vers l'identification des <i>Pseudomonas</i>	71
I.5.3.1. Etude morphologique	71
I.5.3.2. Recherche de cytochrome oxydase	71
I.5.3.3. Test de catalase (voir page 65).....	71
I.5.3.4. Identification de <i>Pseudomonas</i> par Galerie API NE.....	71
I.5.4. Conservation des <i>Pseudomonas</i> fluorescents.....	72
I.5.5. Test d'antagonisme <i>in vitro</i> des <i>Pseudomonas</i> vis-à-vis les SCN	72
I.5.5.1. Méthode directe.....	73
I.5.5.2. Méthode indirecte (Effet du surnageant).....	73
I.5.6. Production des métabolites extracellulaires	73
I.5.7. Extraction des métabolites extracellulaires	74
I.5.8. Séchage de la phase organique.....	74
I.5.9. Séchage sous pression réduite.....	74
I.5.10. Caractérisation et identification des métabolites extracellulaires de <i>P. fluorescens</i> PK	75
I.5.10.1. Analyses par spectrophotomètre UV-visible.....	75
I.5.10.2. Identification par infrarouge à transformation de fourier (FTIR)	75
I.6. Les plantes étudiées.....	75
I.6.1. Matériel végétal.....	75
I.6.1.1. <i>J. oxycedrus</i> L. et <i>J. thurifera</i> L.	75
I.6.1.2. <i>S. officinalis</i> L.	76
I.6.1.3. <i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> (Boiss. et Reut.) Batt.	77
I.6.2. Détermination de la teneur en eau.....	77

I.6.3. Extraction des huiles essentielles	78
I.6.4. Détermination du rendement des huiles essentielles.....	78
I.6.5. Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG-SM)..	78
I.6.6. Extraction méthanolique des plantes.....	79
I.6.7. Détermination du rendement des extraits méthanoliques des plantes	79
I.6.8. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes des extraits méthanoliques	79
1.6.8.1. Dosage des polyphénols totaux	79
1.6.8.2. Dosage des flavonoïdes	80
I.6.9. Analyses des extraits méthanoliques par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC).....	80
I.7. Effet antistaphylococciques des substances extraites.....	81
I.7.1. Etude de l'activité antibactérienne par la méthode des disques	81
I.7.2. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).....	81
I.7.3. Détermination des Concentrations Minimales Bactéricides (CMB).....	82
I.7.4. Activité antibiofilm des substances extraites	82
I.8. Etude statistique	83
Chapitre II. Résultats et discussion.....	84
II.1. Etude bactériologique des SCN	84
II.1.1. Examen macroscopique des SCN	84
II.1.2. Etude microscopique des SCN.....	84
II.1.3. Test de la coagulase	85
II.1.4. Test de catalase	86
II.1.5. Identification des isolats de SCN.....	86
II.1.6. Répartition des espèces de SCN en fonction de la nature de prélèvement	87
II.1.7. Distribution des espèces de SCN en fonction du service hospitalier	89
II.1.8. Profil de sensibilité aux antibiotiques et les CMI des SCN isolés	89
II.1.9. Profil de sensibilité aux antibiotiques et les CMI de <i>S. epidermidis</i>	92
II.2. Formation de biofilm	93
Détection de la formation du biofilm par la méthode TCP	93
II.2.2. Détection de la formation du biofilm par la méthode RCA.....	95
II.3. Identification génotypique pour la détection des gènes <i>mecA</i> et <i>icaAD</i>	96
II.3.1. Détection des gènes <i>mecA</i> et <i>icaAD</i> par PCR.....	96
II.3.2. Séquençage des gènes ARNr 16S.....	98
II.4. Activité antibactérienne et antibiofilm de l'extrait l'acétate d'éthyle de <i>Pseudomonas</i> spp. contre les SCN.....	99
II.4.1. Isolement et purification des isolats de <i>Pseudomonas</i>	99

II.4.2. Caractérisation des <i>Pseudomonas</i> isolés.....	99
II.4.2.1. Examen macroscopique.....	99
II.4.2.2. Examen microscopique.....	100
II.4.2.3. Résultats de la recherche de l'oxydase et de catalase chez <i>Pseudomonas</i>	101
II.4.2.4. Test d'antagonisme <i>in vitro</i>	101
II.4.2.5. Effet inhibiteur du surnageant de culture des <i>Pseudomonas</i>	107
II.4.2.6. Résultat de l'identification de l'isolat de <i>Pseudomonas</i> PK par la galerie Api ..	107
II.4.2.7. Effet antibactérien de l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>P. fluorescens</i> PK.....	107
II.4.2.8. CMI et CMB de l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>P. fluorescens</i> PK contre les SCN	110
II.4.2.9. Effet de l'extrait phénazinique sur la formation de biofilm des SCN	110
II.4.2.10. Caractérisation et identification du métabolite extracellulaire de <i>P. fluorescens</i> PK.....	111
II.4.2.10.a. Analyses par spectrophotomètre UV-visible.....	111
II.4.2.10.b. Identification par infrarouge à transformation de fourier (FTIR).....	111
II.5. Activité antibactérienne et antibiofilm des huiles essentielles et des extraits méthanoliques de quelques plantes contre les SCN.....	112
II.5.1. Détermination de la teneur en eau	112
II.5.2. Détermination de l'aspect, la couleur et le rendement des extraits des plantes étudiées	113
II.5.2.1. Huiles essentielles.....	113
II.5.2.2. Extraits méthanoliques.....	114
II.5.3. Composition chimique des huiles essentielles des plantes étudiées	115
II.5.4. Détermination de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes	119
II.5.4.1. Polyphénols totaux.....	119
II.5.4.2. Flavonoïdes.....	121
II.5.5. Résultats des analyses par HPLC des extraits méthanoliques étudiés	122
II.5.6. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits des plantes	129
II.5.6.1. Effets inhibiteurs des huiles essentielles sur les SCN.....	129
II.5.6.2. Effets inhibiteurs des extraits méthanoliques sur les SCN.....	130
II.5.7. Détermination de CMI et CMB des extraits de plantes étudiées	132
II.5.7.1. Huiles essentielles de <i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> et <i>S. officinalis</i>	132
II.5.7.2. Extraits méthanoliques de <i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> et <i>S. officinalis</i>	134
II.5.8. Effet des huiles essentielles et des extraits méthanoliques sur la formation de biofilm des SCN.....	135
II.5.8.1. Huiles essentielles de <i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> et <i>S. officinalis</i>	135

II.5.8.2. Extraits méthanoliques de <i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> et <i>S. officinalis</i>	136
Conclusion	138
Références bibliographiques	142
Annexes	
Publications et Communications	

Liste des abréviations

- ADN:** Acide DésoxyriboNucléique
- ARNr:** Acide RiboNucléique ribosomal
- ATB:** antibiotique
- BHIB:** Bouillon cœur cervelle
- CG-SM :** Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
- CLSI:** Clinical Laboratory Standards Institut
- CMB:** concentration minimale bactéricide.
- CMI:** concentration minimale inhibitrice.
- DAPG :** 2,4-Diacétylphloroglucinol.
- EM:** Extrait méthanolique.
- FTIR:** Fourier Transform InfraRed spectroscopy
- G+C:** Guanine+ Cytosine.
- GAE :** Equivalent Acide Gallique.
- GN:** Gélose Nutritive
- HE :** huile essentielle
- HQNO:** 4-hydroxy-2-heptylquinoline N-oxide.
- IR:** Infrarouge
- ISR:** Induction de la résistance systémique.
- LCR:** liquide céphalo-rachidien
- MH:** Mueller Hinton
- MHB:** Mueller Hinton Broth
- MLS:** Macrolides, Lincosamides et Streptogramines
- MOH :** méthanol
- MSCRAMM:** microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules.
- NBY:** Nutrient Broth Yeast Extract
- PCA:** Acide Phénazine-1-Carboxylique
- PCR:** Polymerase Chain Reaction
- PIA:** Polysaccharide Intracellular Adhesion
- PLP:** Protéine liant les pénicillines
- PLT:** pyolutéorine
- RCA:** Rouge Congo Agar
- SARM:** *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

SCN: Staphylocoques à coagulase négative

TCP: Culture de Tissu en Plaque

TSB: Trypticase Soy Broth

TSST-I: Toxic Shock Syndrome Toxin I

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

Liste des figures

Figure 1. Voies de transmission des staphylocoques (Avril <i>et al.</i> , 1992).....	8
Figure 2. Emplacements des gènes <i>mecA</i> et <i>ccr</i> dans la séquence SCC <i>mec</i> de type I – VIII (Saber <i>et al.</i> , 2017).....	22
Figure 3. Hypothèses pour expliquer le phénomène de tolérance du biofilm vis-à-vis des biocides (antibiotiques et antiseptiques) (Lebeaux et Ghigo, 2012).....	23
Figure 4. Modèle de différentes phases de formation de Biofilm (Mack <i>et al.</i> , 2006)....	24
Figure 5. Métabolites secondaires produits par <i>P. fluorescens</i> Pf-5 (Mavrodi <i>et al.</i> , 2007).	32
Figure 6. Quelques phénazines produites par <i>Pseudomonas</i> (Laursen et Nielsen, 2004).34	
Figure 7. Structures de quelques composants chimiques des huiles essentielles (Swamy <i>et al.</i> , 2016).	45
Figure 8. Partie aérienne de <i>J. oxycedrus</i> L. (Benlarbi, 2019).....	47
Figure 9. Partie aérienne de <i>J. thurifera</i> L. (Khater, 2018).....	49
Figure 10. La partie aérienne de <i>S. officinalis</i> L. (Fu <i>et al.</i> , 2013).	51
Figure 11. La partie aérienne de <i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> (Bendif <i>et al.</i> , 2018).....	53
Figure 12. Les facteurs extracellulaires produits par <i>P. aeruginosa</i> affectant <i>S. aureus</i> (Hotterbeekx <i>et al.</i> , 2017).	61
Figure 13. Galerie biochimique API Staph.....	66
Figure 14. Galerie biochimique API NE.....	72
Figure 15. Séparation de la phase organique d'acétate d'éthyle.	74
Figure 16. Échantillon de <i>J. oxycedrus</i> L.....	76
Figure 17. Échantillon de <i>J. thurifera</i> L.....	76
Figure 18. Échantillon de <i>S. officinalis</i> L.....	77
Figure 19. Échantillon de <i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> (Boiss. et Reut.) Batt.....	77
Figure 20. Aspect macroscopique des colonies des SCN sur gélose Chapman.....	84
Figure 21. Observation microscopique des SCN après coloration de Gram.	85
Figure 22. Test de la coagulase.....	85
Figure 23. Résultats de test de la catalase des SCN.....	86
Figure 24. Identification d'une espèce de SCN par Galerie API Staph.....	86
Figure 25. Sensibilité aux antibiotiques des SCN isolés.....	90
Figure 26. Exemple de sensibilité aux antibiotiques et CMI des SCN isolés.	91
Figure 27. Sensibilité de <i>S. epidermidis</i> aux antibiotiques.	93

Figure 28. Estimation de la production de biofilm par la méthode TCP.	94
Figure 29. Intensités de la formation du biofilm par la méthode TCP.....	94
Figure 30. Production de biofilm sur milieu RCA.....	95
Figure 31. Formation de biofilm selon les espèces de SCN par la technique RCA.....	96
Figure 32. Électrophorèse sur gel d'Agarose des gènes <i>mecA</i> et <i>icaAD</i>	97
Figure 33. Aspect macroscopique d'un isolat de <i>Pseudomonas</i> sur gélose King B.	100
Figure 34. Observation microscopique des <i>Pseudomonas</i> après coloration de Gram. ...	100
Figure 35. Résultats de l'oxydase et de catalase des <i>Pseudomonas</i>	101
Figure 36. Activité antagoniste des <i>Pseudomonas</i> vis-à-vis les isolats de SCN.....	101
Figure 37. Distances de zones d'inhibition entre les isolats de <i>Pseudomonas</i> et les <i>Staphylococcus</i>	105
Figure 38. Nombre de <i>Staphylococcus</i> inhibés par chaque isolat de <i>Pseudomonas</i>	106
Figure 39. Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>P. fluorescens</i> PK sur les SCN cibles.	108
Figure 40. Spectre d'identification de l'extrait sec de <i>P. fluorescens</i> PK par spectrophotomètre UV-visible.	111
Figure 41. Spectre d'identification de métabolite de <i>P. fluorescens</i> PK par FTIR.....	112
Figure 42. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	120
Figure 43 . Courbe d'étalonnage de la quercétine.	121
Figure 44. Chromatogramme de l'extrait méthanolique de <i>J. oxycedrus</i>	123
Figure 45 . Chromatogramme de l'extrait méthanolique de <i>J. thurifera</i>	123
Figure 46. Chromatogramme de l'extrait méthanolique de <i>S. officinalis</i>	125
Figure 47. Chromatogramme de l'extrait méthanolique de <i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i>	127
Figure 48. Diamètres des zones d'inhibition d'un SCN par les huiles essentielles de plantes étudiées.	129
Figure 49. Diamètres des zones d'inhibition des extraits méthanoliques sur les SCN....	131

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification du genre <i>Staphylococcus</i> (Delarras, 2007; Mathema <i>et al.</i> , 2009)	6
Tableau 2 . Caractéristiques biochimiques des SCN (Finch, 2006).	12
Tableau 3. Mécanismes de résistance aux antibiotiques (Carle, 2009).	16
Tableau 4. Mécanismes d'action et de résistance aux antibiotiques chez les SCN.....	17
Tableau 5. Caractéristiques morphologiques et biochimiques du genre <i>Pseudomonas</i> (Martin, 2007).	30
Tableau 6. Classification du genre <i>Pseudomonas</i> (Delarras, 2007).	31
Tableau 7. Solvants utilisés pour l'extraction de différents composants bioactifs (Alamgir, 2018).	41
Tableau 8. Classificaion de <i>J. oxycedrus</i> L. (Al-Snafi, 2018).	48
Tableau 9. Classification de <i>J. thurifera</i> L. (Gaussen, 1968).	50
Tableau 10. Classification de <i>S. officinalis</i> L.	51
Tableau 11. Classification de <i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> (Quezel et Santa 1963).....	53
Tableau 12. Composition et concentration du mélange réactionnel dans les microtubes. 69	
Tableau 13. Distribution des isolats de SCN en fonction d'espèce.	87
Tableau 14. Distribution des espèces de SCN en fonction des prélèvements.	88
Tableau 15. Distribution des espèces de SCN en fonction du service hospitalier.....	89
Tableau 16. Pourcentage de similitude et identification de deux isolats de SCN.	99
Tableau 17. Observations macroscopiques de quelques colonies.	99
Tableau 18. Résultats du test d'antagonisme par la méthode des stries croisée.	103
Tableau 19. Diamètres de zones d'inhibition, CMI, CMB et l'inhibition de biofilm de l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>P. fluorescens</i> PK sur les SCN.	109
Tableau 20. Détermination de la teneur en eau des plantes étudiées.....	113
Tableau 21. Détermination de l'aspect, la couleur et le rendement des huiles essentielles des plantes étudiées.....	113
Tableau 22. Détermination de l'aspect, la couleur et le rendement des extraits méthanoliques.	114
Tableau 23. Composition chimique des huiles essentielles étudiées.....	117
Tableau 24. Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits méthanoliques des plantes étudiées.....	120

Tableau 25. Résultats d'analyse par HPLC des extraits méthaoliques de <i>J. oxycedrus</i> et <i>J. thurifera</i>	124
Tableau 26. Résultats d'analyse par HPLC de l'extrait méthaolique de <i>S. officinalis</i>	126
Tableau 27. Résultats d'analyse par HPLC de l'extrait méthaolique de <i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i>	128
Tableau 28. Moyennes des diamètres de zones d'inhibition des huiles essentielles des plantes sur les espèces de SCN.	130
Tableau 29. Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des extraits méthanoliques des plantes étudiées sur les espèces de SCN.	131
Tableau 30 . CMI, CMB et CMB/CMI des HE de <i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> et <i>S. officinalis</i> sur les espèces de SCN.	133
Tableau 31. CMI, CMB et CMB/CMI des extraits méthanoliques de <i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> et <i>S. officinalis</i> sur les espèces de SCN.	134
Tableau 32. Activité antibiofilm des huiles essentielles de <i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> et <i>S. officinalis</i>	136
Tableau 33. Activité antibiofilm des extraits méthanoliques de <i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> et <i>S. officinalis</i>	137

Introduction

Introduction

Les Staphylocoques à Coagulase Négative (SCN) font partie de la flore microbienne normale la plus fréquente de la peau et des muqueuses humaines (Piette et Verschraegen, 2009; Shrestha *et al.*, 2017). Ces bactéries, longtemps considérées comme des contaminants, sont actuellement reconnues comme de véritables pathogènes (Bertrand *et al.*, 2002; Koksall *et al.*, 2009; Talebi *et al.*, 2016) notamment *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* (Garnier et Denis, 2007) et *S. hominis*. D'autres espèces telles que *S. warneri*, *S. lugdunensis*, *S. capitis*, *S. simulans*, *S. cohnii*, *S. saccharolyticus* et *S. xylosum* ont été considérées comme des pathogènes opportunistes (Al Tayyar *et al.*, 2015). Les SCN peuvent être responsables de conjonctivites, d'endophtalmies, d'infections cutanées, d'infections urinaires, d'endocardites, de péritonites, d'infections osseuses et articulaires, de méningites post-neurochirurgicales, d'infections sur matériel ou sur vulves ainsi que de septicémies dont le point de départ peut être un cathéter (Garnier *et Denis*, 2007). Ces bactéries sont l'une des causes d'infections nosocomiales et communautaires dans le monde entier (Seng *et al.*, 2017).

De nombreux antibiotiques sont disponibles pour le traitement de diverses bactéries pathogènes (Raut et Karuppaiyl, 2014). Cependant, l'utilisation excessive d'antibiotiques est par conséquent considérée comme un facteur le plus important qui contribue à l'apparition de différents types de microbes résistants (Schelz *et al.*, 2006) et donc une augmentation de la résistance aux antibiotiques qui conduit à une augmentation de la gravité des maladies causées par ces bactéries (Raut et Karuppaiyl, 2014). La multirésistance des SCN et plus particulièrement la résistance aux bêta-lactamines est très fréquente (Bertrand *et al.*, 2002). De même, la production de biofilms par les SCN a été identifiée comme un facteur important de la pathogénèse, protégeant contre les antibiotiques et le système immunitaire (Seng *et al.*, 2017), et facilite l'adhésion et la colonisation de ces bactéries sur les dispositifs médicaux (Soumya *et al.*, 2017). Le biofilm est constitué de couches d'agrégats de cellules intégrées dans une matrice de polysaccharide extracellulaire, appelée Adhésine Intercellulaire Polysaccharidique (PIA) (Seng *et al.*, 2017) codé par les gènes structurels *icaADBC* et le gène régulateur *icaR* (Kord *et al.*, 2018).

De plus, l'émergence des SCN en tant qu'agents pathogènes de différentes infections peut être le résultat de l'utilisation croissante de procédures invasives telles que les cathéters et les prothèses intravasculaires chez les patients soumis à un traitement

intensif, les patients atteints de cancer (Cunha *et al.*, 2004), les transplantés, les patients immunodéprimés et les enfants prématurés (Cunha *et al.*, 2004; Heikens *et al.*, 2005; Cavanagh *et al.*, 2016).

Cette situation a obligé les scientifiques à rechercher de nouvelles stratégies alternatives pour éliminer les bactéries résistantes aux antibiotiques (Karaman *et al.*, 2003; El Ouali Lalami *et al.*, 2013, Balkan *et al.*, 2016) et formatrices de biofilm en utilisant des substances antimicrobiennes naturelles provenant de diverses sources (Karaman *et al.*, 2003; El Ouali Lalami *et al.*, 2013; Balkan *et al.*, 2016, Olowo-Okere *et al.*, 2018) telles que les microorganismes telluriques et les plantes médicinales, qui sont de bonnes sources de nouveaux agents chimiothérapeutiques antimicrobiens (Karaman *et al.*, 2003) en particulier les métabolites secondaires des *Pseudomonas* et des plantes (Mezaache-Aichour *et al.*, 2012; Balkan *et al.*, 2016; Bouyahya *et al.*, 2017).

D'autre part, des composés antibactériens obtenus à partir d'autres microorganismes ont également été testés pour leurs capacités d'inhiber les SCN (El Amraoui *et al.*, 2014). Parmi les métabolites étudiés produits par divers groupes de microorganismes on trouve ceux des *Pseudomonas* (Chain et Mellows, 1997). La capacité de ce microorganisme à produire des pigments antimicrobiens a ouvert la porte à leur utilisation comme agents de lutte biologique (Devnath *et al.*, 2017).

Les *Pseudomonas* présentent des modes de vie dans les différents environnements, y compris le sol, l'eau, les surfaces végétales, les animaux et l'homme. Les espèces de *Pseudomonas* sont aussi des colonisateurs compétitifs dans la rhizosphère et sont bien adaptées aux différents stress biotiques et abiotiques. Elles sont bien connues pour leur capacité à utiliser une variété de composés organiques et par leur production de composés antimicrobiens utilisés dans le traitement des maladies d'origine bactérienne (Laine *et al.*, 1996), elles possèdent également une activité contre les staphylocoques (Cardozo *et al.*, 2013 ; Hotterbeekx *et al.*, 2017).

Pseudomonas fluorescens produit un grand nombre de métabolites secondaires qui pourraient jouer un rôle dans l'effet antagoniste de ces microorganismes dans le sol (Jacques *et al.*, 1993) et à la colonisation du système racinaire des plantes, et cela s'applique également au cas particulier des agents de lutte biologique de cette espèce (Igbinsa *et al.*, 2014). Parmi ses métabolites produits par cette espèce, on trouve les phénazines qui ont longtemps été reconnues pour leur importance dans la virulence et la

destruction microbienne, leurs rôles physiologiques positifs pour les bactéries qui les produisent sont de plus en plus appréciés (Grahl *et al.*, 2013).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à quatre espèces végétales très utilisées pour ses nombreuses vertus thérapeutiques (Zarzuelo et Crespo, 2002; Moujir *et al.*, 2008; Mehdizadeh *et al.*, 2016; Al-Snafi, 2018; Bendif *et al.*, 2018). Il s'agit de *Juniperus oxycedrus* L. et *Juniperus thurifera* L. de la famille des Cupressacées et *Salvia officinalis* L. et *Thymus ciliatus* ssp. *munbyanus* (Boiss. et Reut.) Batt. de la famille des Lamiacées.

Dans la littérature, quelques études ont été focalisées sur les effets antibactériens des espèces végétales choisies parmi lesquelles on trouve des recherches sur l'effet de *J. oxycedrus* (Marino *et al.*, 2010; Semerdjieva *et al.*, 2019) et de *J. thurifera* (Bahri *et al.*, 2013) et de l'effet antibiofilm de *S. officinalis* sur *S. aureus* (Harfouch *et al.*, 2019; Mohamed et Mustafa, 2019), et sur *S. epidermidis* (de Oliveira *et al.*, 2019).

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'activité antibactérienne et antibiofilm des huiles essentielles et des extraits méthanoliques extraites de *J. oxycedrus*, *J. thurifera*, *S. officinalis* et *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* et d'un métabolite secondaire de *Pseudomonas fluorescens* sur les SCN isolés du Centre Anti-Cancer du Batna.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons suivi les étapes suivantes:

- Isolement et identification des isolats de SCN de différents prélèvements.
- Etude de la sensibilité aux antibiotiques des isolats de SCN.
- Identification moléculaire de quelques isolats résistants à la méthicilline et formateurs du biofilm.
- Isolement à partir de la rhizosphère, un ensemble de *Pseudomonas* fluorescents pour examiner leur activité antagoniste et antibiofilm contre des isolats cliniques de SCN. Cette étape va nous mener à la recherche d'un métabolite extracellulaire efficace contre ces staphylocoques à intérêt médical.
- Extraction des huiles essentielles et des extraits méthanoliques de *J. thurifera*, *J. oxycedrus*, *S. officinalis* et *T. ciliatus* ssp. *munbyanus*.
- Détermination de la composition chimique des huiles essentielles étudiées par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM).

- Détermination de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits méthanoliques et analyse de ces derniers par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).
- Evaluation de l'activité antibactérienne et antibiofilm des extraits et des huiles essentielles obtenus sur les isolats de SCN.

Le manuscrit est divisé en deux parties, la première comporte une synthèse bibliographique sur les généralités des SCN, la formation de biofilm et sur les *Pseudomonas* fluorescents, généralités sur les plantes étudiées et enfin les moyens de lutte contre les SCN, la deuxième partie comporte le chapitre matériel et méthodes, résultats et discussion et il se termine par une conclusion et des perspectives.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I.

Généralités sur les staphylocoques à coagulase négative

Chapitre I. Généralités sur les staphylocoques à coagulase négative

I.1. Historique

Les staphylocoques ont été découverts par Pasteur et Koch entre 1877 et 1878 à partir d'un furoncle purulent et d'ostéomyélite (Avril *et al.*, 1992). En 1883, Ogston a créé le nom de « Staphylocoque » pour décrire ces grains (kokkos) groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin (staphylos) (Bhunja, 2008). En 1884, Rosenbach a obtenu des cultures pures de ces bactéries (Avril *et al.*, 1992), il a accepté le nom *Staphylococcus* donné par Ogston à des bactéries qu'il démontra être un groupe hétérogène, comprenant au moins deux germes, l'un donnant des colonies jaunes et l'autre des colonies blanches (Dedet, 2007).

En 1885, Zopf a placé les staphylocoques et les microcoques dans le genre *Micrococcus*. Puis, en 1886, Flügge a séparé le genre *Staphylococcus* du genre *Micrococcus*. Celui-ci a différencié les deux genres principalement sur la base de leur action sur la gélatine et la relation à leurs hôtes. Les staphylocoques liquéfiaient la gélatine et étaient parasitaires et/ou pathogènes, tandis que les microcoques étaient variables dans leur action sur la gélatine et saprophytes (Götz *et al.*, 2006).

En 1940, Fairbrother R. W. a introduit la production de coagulase en tant que principe de différenciation majeur pour les espèces de staphylocoques. Cependant, au lieu d'utiliser le terme "*S. epidermidis*", il a proposé le taxon "*S. saprophyticus*" pour distinguer le SCN non pathogène du SCP, désigné par "*S. pyogenes*". Par la suite, en 1951, Shaw *et al.* ont utilisé le terme "*S. saprophyticus*" dans un sens plus large (Becker *et al.*, 2014).

Vers le milieu des années 1960, une distinction claire a pu être faite entre les staphylocoques et les microcoques sur la base de leur contenu en G+C d'ADN (Götz *et al.*, 2006), les staphylocoques présentent un G+C% relativement faible (30 à 39%), alors que les microcoques possèdent une teneur en G+C% de 66 à 75% (Mathema *et al.*, 2009). D'autres études sur l'hybridation ADN-ADN et ADN-ARNr ainsi que l'étude des séquences de l'ARNr 16S ont clairement démontré les différences génétiques entre les staphylocoques et les microcoques. Jusqu'au début des années 1970, le genre *Staphylococcus* se composait de trois espèces: l'espèce à coagulase positive (*S. aureus*) et les espèces à coagulase négative (*S. epidermidis* et *S. saprophyticus*), cependant une étude plus poussée des propriétés chimiotaxonomiques et génotypiques des staphylocoques a conduit à la description de plusieurs nouvelles espèces (Götz *et al.*, 2006).

I.2. Taxonomie

La famille des *Staphylococcacées* a été proposée pour la première fois par des données taxonomiques au cours de la formulation de la 2^{ème} édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. En plus du genre *Staphylococcus*, la famille des *Staphylococcacées* comprend les genres *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Nosocomiicoccus* et *Salinicoccus*. Des espèces de *Jeotgalicoccus* et *Salinicoccus* ont été récupérées dans divers échantillons alimentaires et environnementaux. Maintenant, la famille des *Staphylococcacées* avec *Bacillacées*, *Listeriacees*, *Paenibacillacées*, *Planococcacées* et d'autres familles, appartiennent à l'ordre des Bacillales de la classe Bacilli. Les bacilli font partie du phylum des Firmicutes, qui comprend des bactéries à Gram positif ayant une teneur de G+C% faible (Becker *et al.*, 2014).

I.3. Classification du genre *Staphylococcus*

Les staphylocoques ont été classés selon le tableau 1.

Tableau 1. Classification du genre *Staphylococcus* (Delarras, 2007; Mathema *et al.*, 2009)

Domaine	<i>Bacteria</i> ou <i>eubacteria</i>
Embranchement	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Familles	Staphylococcacées
Genre	<i>Staphylococcus</i>

I.4. Description des SCN

Les staphylocoques sont des coques à Gram positif (Götz *et al.*, 2006; d'Azevedo *et al.*, 2008) de 0.5 à 1.5 µm de diamètre qui se retrouvent en amas sous la forme de grappes de raisins et, dans de plus rares cas, isolés, en paires (diplocoques), en tétrades, ou en chaînettes (3 à 4 cellules) (Götz *et al.*, 2006), immobiles et non sporulés. Ils sont aéro-anaérobies (Carip, 2008; Engelkirk et Duben-Engelkirk, 2008). Leur pH optimal de croissance est neutre ou alcalin (entre 6 et 9) et la température optimum est entre 15 et 45°C (ils sont mésophiles et psychrophiles). Ils résistent bien à la dessiccation pendant plusieurs mois. Ils sont oxydases négatives, réduisent les nitrates et sont capables de fermenter le glucose (Carip, 2008). Ils produisent une catalase, ce qui les distingue des

streptocoques et des entérocoques (Fauchère et Avril, 2005; Engelkirk et Duben-Engelkirk, 2008).

I.5. Habitat

Les SCN sont très répandus dans la nature (air, sol et eau). Ils font partie de la flore normale de la peau et des muqueuses des mammifères et oiseaux. Cette flore joue un rôle important dans l'équilibre physicochimique de la peau et constitue une barrière contre les bactéries de la flore transitoire (Abalain-Colloc *et al.*, 2014).

S. epidermidis et *S. hominis* sont les principales espèces résidentes vivant sur l'homme (Varaldo et Satta, 1988). *S. epidermidis* est une espèce très dispersée sur la peau et les muqueuses (Brun *et al.*, 2007) et particulièrement au niveau de la surface antérieure des narines (Avril *et al.*, 1992; Flandrois *et al.*, 1997) des creux axillaires, des plis inguinaux et des plantes des pieds (Flandrois *et al.*, 1997), cette espèce est résidente et peut persister plusieurs mois ou années chez un même sujet (Brun *et al.*, 2007), et même il peut être à l'origine d'auto-infection ou contaminer d'autres individus (Avril *et al.*, 1992). Les bras et les jambes sont colonisés par *S. hominis* et en sous dominance par *S. epidermidis* (Brun *et al.*, 2007). Pour ces deux espèces, ainsi que pour *S. capitis* et *S. saccharolyticus*, l'homme semble être l'unique hôte naturel. Les autres espèces humaines (ou certaines sous-espèces ou biotypes de celles-ci) peuvent également être trouvées sur d'autres hôtes mammifères et des volailles (Varaldo et Satta, 1988).

Le cuir chevelu est porteur de *S. capitis* ssp. *capitis* avec un pourcentage jusqu'à 90 % des staphylocoques apparaissant après la puberté. Avant la puberté, cette espèce est absente ou en faible quantité et les espèces de cuir chevelu sont *S. epidermidis*, *S. hominis* et *S. haemolyticus*. Ces trois espèces sont les plus représentées au niveau des aisselles, des orteils et le front en ajoutant *S. saprophyticus* dans des espaces interdigitaux (Brun *et al.*, 2007). *S. saprophyticus* peut être isolé au niveau de la région ano-rectale (Abalain-Colloc *et al.*, 2014).

I.6. Transmission

La transmission est surtout interhumaine directe (contact, dissémination manuportée, à partir du nez notamment) ou indirecte par l'intermédiaire des aliments ou du milieu extérieur (Avril *et al.*, 1992) (Figure 1).

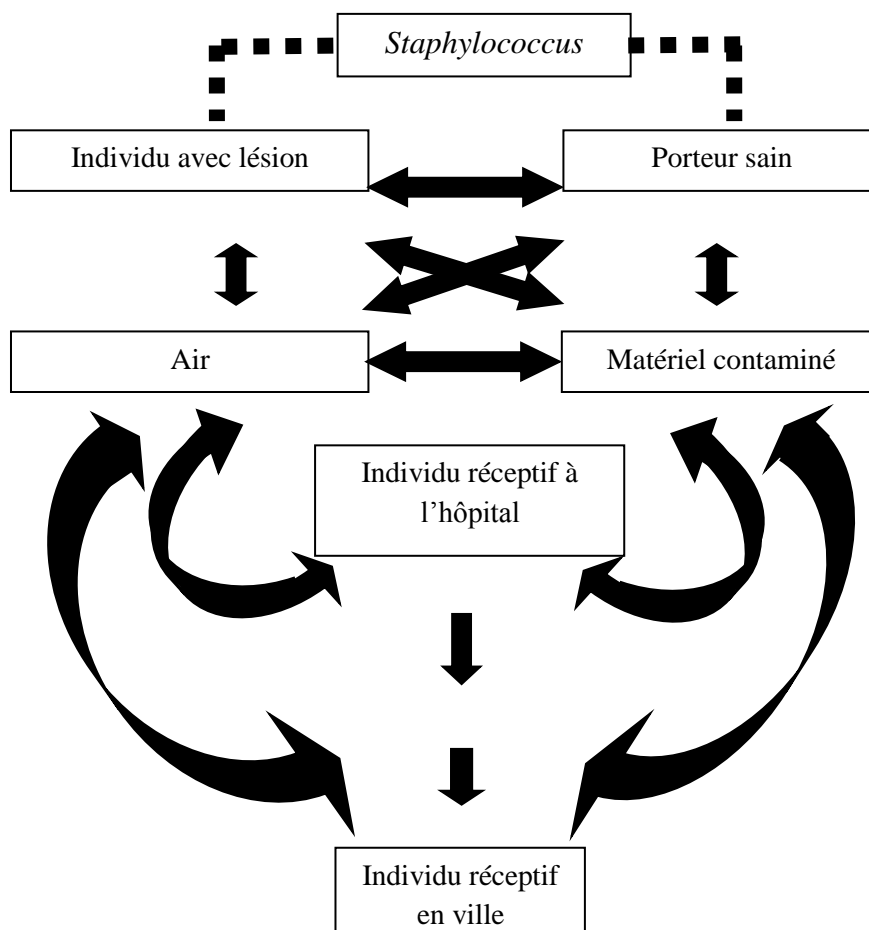


Figure 1. Voies de transmission des staphylocoques (Avril *et al.*, 1992).

I.7. Pouvoir pathogène des SCN

Une dizaine d'espèces et sous espèces faisant pour la plupart partie intégrante de la flore commensale sont potentiellement pathogènes pour l'homme (Abalain-Colloc *et al.*, 2014), possédant différentes stratégies permettant l'adhésion, l'agression, l'invasion, la persistance et/ou l'évasion de l'immunité innée et adaptative (Becker *et al.*, 2014).

S. epidermidis peut être responsable d'infections de prothèses vasculaires ou articulaires, de valves cardiaques, de valves de dérivation du LCR, il est également isolé des péritonites consécutives à des dialyses péritonéales, d'endocardites subaiguës chez les toxicomanes intraveineux (Abalain-Colloc *et al.*, 2014), ostéomyélites, endophtalmies ...etc (Cunha *et al.*, 2004). Des septicémies graves sont observées (Abalain-Colloc *et al.*, 2014). *S. epidermidis* est aussi isolé dans les infections urinaires à SCN avec une fréquence qui varie de 36 à 48%. On le retrouve plus particulièrement chez les patients hospitalisés et/ou porteurs d'une sonde vésicale (Herard *et al.*, 1998). Cette espèce est aussi liée à sa tendance à coloniser les cathéters veineux centraux et d'autres dispositifs médicaux implantés, ce qui repose sur sa capacité à développer une structure hautement consolidée

qui est le biofilm (Iorio *et al.*, 2011). Ce qui permet de faire la distinction entre une infection à *S. epidermidis* et une contamination du prélèvement, c'est l'isolement répété d'une souche ayant les mêmes caractères, ainsi que le contexte clinique (Nauciel et Vildé, 2005).

S. haemolyticus est le second des SCN le plus souvent isolé (Heikens *et al.*, 2005; Engelkirk et Duben-Engelkirk, 2008). On le retrouve plus fréquemment associé aux endocardites sur valves natives, aux bactériémies, aux péritonites et aux infections sur cathéters veineux centraux (Herard *et al.*, 1998). Il peut être responsable d'infections urinaires (Fauchère et Avril, 2005; Nauciel et Vildé, 2005).

S. saprophyticus est isolé d'infections urinaires authentiques qui ont la particularité de s'observer chez les jeunes femmes, entre 15 et 40 ans habituellement non hospitalisées (Fauchère et Avril, 2005), il serait responsable de 5 à 10% des infections urinaires en raison de son aptitude à s'adhérer à l'épithélium urinaire (Abalain-Colloc *et al.*, 2014). D'autres infections dont *S. saprophyticus* sont associées à l'urétrite, à la prostatite et aux infections de plaies (Engelkirk et Duben-Engelkirk, 2008).

S. xylosus n'est isolé que rarement dans les hémocultures, des rapports rares d'infections humaines ont été publiés, y compris l'endocardite, pyélonéphrite et infection intra-abdominale. *S. simulans* est principalement un pathogène des animaux, mais dans des rares cas, il peut être responsable d'ostéomyélite, d'endocardite à valve, de septicémie et de prothèse articulaire. *S. capitis* peut être responsable de bactériémie, d'endocardite, d'infection des voies urinaires et des tissus mous. L'infection causée par *S. cohnii* est rare chez l'homme, malgré sa présence occasionnelle dans des hémocultures. Des cas de septicémie, d'arthrite septique, de méningite et de pneumonie d'origine communautaire chez un patient infecté par le VIH et immunodéprimé ont été rapportés (Mack *et al.*, 2006).

I.8. Facteurs de virulence des SCN

I.8.1. Toxines

Les toxines telles que leucocidines, hémolysines, entérotoxines, TSST-I et exfoliatines sont principalement sécrétées par *S. aureus*. Cependant, des études *in vitro* ont montré la production de delta-toxine par *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* et *S. haemolyticus* (Herard *et al.*, 1998). Il est codé par le gène *hld* situé dans le locus régulateur *agr*. La δ -toxine provoque la lyse des érythrocytes en formant des pores dans la membrane cytoplasmique (Vuong et Otto, 2002).

I.8.2. Enzymes

Par définition, les SCN ne produisent pas de coagulase, mais ils produisent la lipase, la fibrinolysine et une variété de protéase. La lipase, en hydrolysant les lipides, permet aux SCN de coloniser les glandes sébacées de la peau. Le rôle spécifique des autres enzymes n'est pas clairement défini, mais il est probable qu'elles participent à la colonisation de ces bactéries ou du moins à leur persistance dans l'environnement (Herard *et al.*, 1998).

I.8.3. La capsule polysaccharidique et le biofilm

Les polysaccharides à la surface des SCN sont presque certainement des facteurs de virulence majeurs impliqués dans l'attachement et / ou la persistance des bactéries sur des matériaux étrangers (Huebner et Goldmann, 1999).

Elles réalisent en quelques heures un agrégat inclus dans une matrice polysaccharidique appelée biofilm. C'est une stratégie dont elles tirent profit en se réfugiant à l'abri des agresseurs dans une zone de concentration idéale en matériel énergétique. De même, cette organisation confère aux bactéries une protection accrue en diminuant l'action des antibiotiques, avec de lourdes conséquences en matière de risque nosocomial. Le «slime» semble inhiber le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles, ce qui diminue la phagocytose (Herard *et al.*, 1998).

I.8.4. Persistance intracellulaire

S. aureus est connu depuis plusieurs années pour sa persistance intracellulaire. Ce mécanisme est considéré comme responsable d'infections récurrentes à *S. aureus*. Les bactéries persistent dans un état de métabolisme faible et réduction de la production de facteurs de virulence extracellulaire. Il pourrait également être récemment démontré que *S. epidermidis* peut persister dans les macrophages du péri-cathéter, ce qui est très important pour notre compréhension des infections liées au cathéter à *S. epidermidis* (Vuong et Otto, 2002).

Pratiquement, les souches isolées d'infections (plaies, hémocultures et abcès) produisent plus fréquemment un ou plusieurs de ces facteurs de virulence que les souches isolées de sujets sains (Avril *et al.*, 1992).

I.9. Caractères bactériologiques des SCN

Après coloration de Gram, les staphylocoques apparaissent comme des cocci à Gram positif de 0.5 à 1 µm de diamètre. Ils peuvent être isolés, en diplocoque, en courtes chaînettes ou en amas. Le mode de regroupement en amas est le mode le plus classique. Ce sont des germes aérobie-anaérobie facultatifs (Abalain-Colloc *et al.*, 2014).

Les staphylocoques sont des germes peu exigeants et peuvent être isolés sur milieu gélosé non sélectif enrichi en sang, une gélose nutritive, une gélose trypticase soja ou une gélose cœur-cerveau, dans ce cas les colonies ont un diamètre de 1 à 3 mm après 24 h d'incubation et 3 à 8 mm après 3 jours d'incubation (Brun *et al.*, 2007). Les colonies sont circulaires, opaques, légèrement bombées ou aplaties (Garnier *et Denis*, 2007). *S. capitis* ssp. *capitis* et *S. auricularis* peuvent donner des colonies de taille inférieure (Brun *et al.*, 2007), alors que *S. saprophyticus* peut donner de grandes colonies de 5 à 8 mm, pigmentées en jeune et légèrement bombées (Garnier *et Denis*, 2007).

I.10. Caractéristiques biochimiques des SCN

Les milieux sélectifs par la présence de 7 à 8% de NaCl, tels que la gélose Chapman, sont les plus utilisés dans les laboratoires cliniques pour isoler les staphylocoques (Varaldo et Satta, 1988). Certaines souches de staphylocoques nécessitent la présence de CO₂ pour leur croissance. Il existe des variants exigeants en facteurs de croissance (Abalain-Colloc *et al.*, 2014).

Le tableau 2 montre les caractéristiques biochimiques des SCN.

Tableau 2 . Caractéristiques biochimiques des SCN (Finch, 2006).

	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. capitis</i> ssp. <i>capitis</i>	<i>S. auricularis</i>	<i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. hominis</i> ssp. <i>hominis</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. lugdunensis</i>
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP ^e	-	+	+	D	?	+	+	+	-	+
Coagulase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide de :										
Lactose	+	D	-	-	-	D	+	-	+	-
Maltose ^e	D	+	-	D	-	+	+	D	-	+
Mannitol	D	-	+	-	-	+ ^b	-	D	+	-
Fructose	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	D	-	+	+	+	+	+
Tréhalose ^e	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannose	+	+	+	-	+	-	-	-	D	+
Phosphatase ^e	+	+	-	-	?	D	-	-	W	-
Nitrate	+	+	+	D	+	+	+	-	+	+
Arginine ^e	+	+	+	-	+	+	+ ^d	+ ^d	+	- ^c
Novobiocine ^e	S	S	S	S	S	S	S	s	s	S

+ : 85- 100% des souches sont positives (tous, la plupart, beaucoup, en général); - : 0-15% des souches sont positives (aucun, un peu); ? : Ne sait pas ou pas suffisamment d'informations; d : 16-84% des souches positives (beaucoup, plusieurs, un peu); w : faible réaction; D: différentes réactions données par taxon inférieur (genres, espèces, variétés); s, sensible; r, résistant. a: Pas de croissance anaérobie. b: réaction habituelle. c: ornithine décarboxylase. d: réaction présumées. e: Ces tests sont généralement suffisants pour identifier les espèces qui peuvent infecter les humains.

Suite **tableau 2.**

	<i>S. cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. caprae</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. caseolyticus</i>	<i>S. arlettae</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. kloosii</i>	<i>S. lentus</i>	<i>S. sciuri</i>
Oxydase	-	-	-	-	+	-	-	-	W	+
VP ^e	+	-	+	+	-	-	-	D	-	-
Coagulase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide de :										
Lactose	-	+	+	-	+	+	D	D	+	-
Maltose ^e	+	+	D	-	+	+	+	+	D	+
Mannitol	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	-	+	-	-	D	+	+	-	+	+
Tréhalose ^e	+	+	+	D	D	+	+	+	+	+
Xylose	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	?	?	-	+	-	+	+
Raffinose	-	-	-	-	?	+	+	-	+	-
Mannose	-	+	+	+	-	D	+	-	+	D
Phosphatase ^e	+	+	+	?	?	+	+	+	+	+
Nitrate	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Arginine ^e	-	-	+	?	?	-	?	-	?	?
Novobiocine ^e	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R

+ : 85- 100% des souches sont positives (tous, la plupart, beaucoup, en général); - : 0-15% des souches sont positives (aucun, un peu); ?: Ne sait pas ou pas suffisamment d'informations; d: 16-84% des souches sont positives (beaucoup, plusieurs, un peu); w: faible réaction; D: différentes réactions données par taxon inférieur(genres, espèces, variétés); s, sensible; r, résistant. a: Pas de croissance anaérobie. b: réaction habituelle. c: ornithine décarboxylase. d: réaction présumée. e: Ces tests sont généralement suffisants pour identifier les espèces qui peuvent infecter les humains.

I.11. Résistance aux antibiotiques

I.11.1. Origine génétique de la résistance et modalités de transfert génétique

La résistance bactérienne à un antibiotique est d'origine génétique. Les gènes de résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique), soit dans un élément mobile comme les plasmides, les éléments transposables ou les intégrons (résistance extrachromosomique). La résistance peut être soit naturelle, soit acquise (Carle, 2009).

I.11.1.1. Résistance naturelle (ou intrinsèque)

Les gènes de résistance font partie du patrimoine génétique de la bactérie. La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées sur l'antibiotique afin de déterminer son activité et contribue à définir son spectre antibactérien. Cette résistance peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, à une faible affinité de la cible pour l'antibiotique ou encore à l'absence de la cible (Carle, 2009). Par exemple, *S. saprophyticus* est naturellement sensible aux aminosides, aux tétracyclines, aux furanes, aux macrolides et apparentés, au triméthoprim et aux sulfamides. Ce germe est naturellement résistant à la novobiocine, par mutation au niveau de la sous-unité GyrB de l'ADN gyrase, il présente aussi une résistance naturelle à la fosfomycine (Le Bouter, 2011).

La résistance bactérienne naturelle est permanente et d'origine chromosomique. Elle est stable et transmise à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire, mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale) (Carle, 2009).

I.11.1.2. Résistance acquise

Cette résistance est due à des modifications dans le profil d'expression génique via des mutations ponctuelles ou acquises. Grâce à ce processus, les bactéries partagent entre elles des informations génétiques, ce qui leur confère un très grand pouvoir d'adaptation aux milieux environnementaux qu'elles habitent. Ces changements peuvent être de deux types : soit une mutation spontanée, soit l'acquisition de gènes d'un autre microorganisme (Bouyahya *et al.*, 2017).

I.11.1.2.a. Mutation chromosomique spontanée (évolution verticale)

La mutation chromosomique spontanée constitue un mécanisme de résistance aux antibiotiques chez environ 10 à 20 % des bactéries. Les gènes de résistance se situent alors

dans le chromosome de la bactérie. Une mutation n'affecte qu'un caractère, et la résistance ne concerne généralement qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotiques ayant le même mécanisme d'action. L'utilisation d'une association de deux ou de plusieurs antibiotiques semble pouvoir prévenir l'émergence de mutants résistants. Par exemple, la résistance à la rifampicine et aux quinolones résulte toujours d'une mutation (Carle, 2009).

I.11.1.2.b. Acquisition de gènes de résistance d'un autre organisme (évolution horizontale)

La résistance bactérienne par acquisition d'information génétique exogène représente la majorité des cas isolés en clinique et s'observe aussi bien chez les bactéries à Gram positif qu'à Gram négatif. L'acquisition de nouveau matériel génétique peut se faire soit par échange direct de matériel chromosomique, soit par échange d'éléments mobiles. Dans ce dernier cas, les gènes de résistance se trouvent dans un fragment d'ADN bactérien situé à l'extérieur et sur certains éléments mobiles, tels que les plasmides. Cette forme de résistance est transférable d'une bactérie à l'autre et même à des bactéries d'espèces différentes. Le transfert d'un seul plasmide augmente aussi le risque d'une résistance à plusieurs antibiotiques (Carle, 2009).

Les gènes ou les groupes de gènes de résistance peuvent s'acquérir par transformation, transduction ou conjugaison. La transduction est le transfert des gènes via les bactériophages, la transformation est l'incorporation par une bactérie des fragments d'ADN libérés par d'autres bactéries et la conjugaison permet le transfert des fragments via des plasmides conjuguatifs. Dans certains cas, les éléments transposables (éléments mobiles qui se transposent d'une manière intra- ou interchromosomique) portent avec eux des copies des gènes via les trois mécanismes de transfert possibles mentionnés ci-dessus (Bouyahya *et al.*, 2017).

I.11.2. Mécanismes de résistance

Il existe quatre mécanismes principaux par lesquels les microorganismes développent de la résistance aux antibiotiques, et ils sont présentés dans le tableau 3 (Carle, 2009).

Tableau 3. Mécanismes de résistance aux antibiotiques (Carle, 2009).

Mécanismes de résistance	Conséquences
Inhibition enzymatique	Production d'une enzyme qui inactive ou détruit l'antibiotique; mécanisme de résistance le plus répandu.
Réduction de la perméabilité cellulaire	Changement de perméabilité de la paroi ou la membrane bactérienne empêchant le médicament d'atteindre sa cible.
Altération des sites de liaison ciblés par l'antibiotique	Baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action.
Pompe à efflux	Antibiotique éjecté de la cellule par transport actif et site d'action devenant inaccessible.

I.11.3. Profil de résistance aux antibiotiques des SCN

Le profil de résistance aux antibiotiques des SCN varie en fonction des agents antimicrobiens entre les espèces et les pays en raison de l'utilisation répandue d'antibiotiques pour la prophylaxie ou la thérapie, en particulier chez les patients hospitalisés (Al Tayyar *et al.*, 2015).

L'importance croissante des SCN en tant que cause d'infection humaine s'est accompagnée d'un problème croissant de résistance aux antibiotiques. La multi-résistance aux antibiotiques des SCN est maintenant communément reconnue soit comme colonisateur, soit comme agent pathogène. Les évidences croisée entre les patients et le personnel s'accroissent et les SCN, faisant partie de la flore humaine normale, constituent un réservoir dans lequel la résistance aux antibiotiques peut être transmise à d'autres SCN et à d'autres bactéries potentiellement pathogènes. La majorité des SCN sont capables d'élaborer une β -lactamase inductible et par conséquent sont résistants à la pénicilline, alors que la production d'une protéine liant les pénicillines de faible affinité, PLP2a, est responsable de la résistance à la méthicilline et aux antibiotiques antistaphylococciques apparentés. Le gène *mecA* est commun chez tous les staphylocoques présentant de la résistance à la méthicilline et est exprimé de manière hétérotypique chez une minorité variable d'isolats au sein d'une population bactérienne (Finch, 2006). Le tableau 4. représente les mécanismes d'action et de résistance aux antibiotiques chez les SCN.

Tableau 4. Mécanismes d'action et de résistance aux antibiotiques chez les SCN.

Antibiotique	Mécanisme d'action des antibiotiques	Mécanisme de résistance des antibiotiques
Béta-lactamines	Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne au niveau du peptidoglycane. Ils exercent une action bactéricide (Bégué, 1999).	-La production de β -lactamase (Pénicillinase). -La modification de cible: *l'acquisition d'une PLP exogène. *et /ou la modification des PLP endogènes (Drugeon, 2006).
Aminosides	Inhibition de la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome bactérien. Ils exercent une action bactéricide rapide (Daurel et Leclercq, 2008)	Acquisition d'enzymes modificateurs des aminosides codées par des gènes portés par des plasmides ou des éléments transposables (Davies et Smith, 1978). Elles sont divisées en trois classes en fonction de la réaction qu'elles catalysent : Phosphotransférase (APH), nucléotidyltransférase (ANT) et acétyltransférase (AAC) (Abalain-Colloc <i>et al.</i> , 2014).

Suite tableau 4.

Antibiotique	Mécanisme d'action des antibiotiques	Mécanisme de résistance des antibiotiques
Macrolides, Lincosamides et Streptogramines (MLS)	Inhibition de la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome (Abalain-Colloc <i>et al.</i> , 2014). Les macrolides et lincosamides ont un effet bactériostatique et les streptogramines ont un effet bactéricide (Leclercq <i>et al.</i> , 2008).	Production d'une méthylase responsable de la diméthylation d'une adénine de l'ARN 23S de la sous-unité ribosomale 50S (Leclercq <i>et al.</i> , 1990).
Glycopeptides	Fixation de manière non covalente sur la partie D-Ala-D-Ala terminale des peptides impliqués dans la polymérisation des peptidoglycanes. Ils sont bactéricides (Nauciel et Vildé, 2005).	Un épaissement de la paroi et donc un moindre accès de l'antibiotique à sa cible (Abalain-Colloc <i>et al.</i> , 2014).
Quinolones	Inhibition de l'ADN gyrase (permet le clivage temporaire des deux brins d'ADN. Ils exercent une action bactéricide (Bégué, 1999).	Défaut d'accumulation se fait par: *Efflux actif par expulsion d'antibiotique par la bactérie. *Modification de la cible: l'ADN-gyrase, et topoisomérase IV (Abalain-Colloc <i>et al.</i> , 2014).
Rifamycine	Inhibition de l'ARN polymérase ADN dépendante en se liant à leur cible résultant un arrêt de la synthèse de l'ARN messager (Nauciel et Vildé, 2005).	Mutation chromosomique: ADN polymérase (Abalain-Colloc <i>et al.</i> , 2014).

Suite tableau 4.

Antibiotique	Mécanisme d'action des antibiotiques	Mécanisme de résistance des antibiotiques
Acide fusidique	Fixation sur le facteur d'élongation de la synthèse protéique. Cet antibiotique a une action bactériostatique (Abalain-Colloc <i>et al.</i> , 2014).	*Mutation chromosomique: une enzyme modifiée de la translocase. *Médiation plasmidique (Verbist, 1990).
Phénicolés	Blocage de la peptidyltransférase de la sous unité 50 S empêchant la synthèse protéique dans le ribosome bactérien (Bégué, 1999). Ils exercent une action bactériostatique (Abalain-Colloc <i>et al.</i> , 2014).	Acquisition d'enzymes modificateurs : la fonction alcool primaire de l'antibiotique est acétylée par l'enzyme qui est la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) (Leclercq <i>et al.</i> , 1990).
Tétracycline	Inhibition au niveau du ribosome l'élongation de la chaîne peptidique. Leur fixation sur le site A du ribosome modifierait la configuration flexible de celui-ci et empêcherait la fixation de l'aminoacyl RNAt. Il exerce une action bactériostatique (Leclercq <i>et al.</i> , 1990).	*Mutations chromosomiques rares sont localisées dans des gènes codant pour l'ARNr 16S ou dans les gènes de protéines de transport membranaire. *Les gènes d'efflux localisés sur des plasmides codent pour des protéines membranaires permettant l'efflux de l'antibiotique hors de la cellule (Poyart, 2006).

Suite tableau 4.

Antibiotique	Mécanisme d'action des antibiotiques	Mécanisme de résistance des antibiotiques
Triméthoprimé/ Sulfamethoxazole	Inhibition de la voie métabolique de synthèse des acides foliques bactériens en intervenant comme co-facteurs dans la synthèse des acides nucléiques. Ils se fixent sur deux enzymes responsables de cette synthèse, la dihydroptéroate synthétase et la dihydrofolate réductase, respectivement (Leclercq <i>et al.</i> , 1990).	Une substitution de cible: des gènes plasmidiques de résistance au triméthoprimé codent pour une dihydrofolate réductase peu sensible à l'antibiotique (Leclercq <i>et al.</i> , 1990).

I.11.4. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Types (SCC*mec*)

La résistance à la méticilline et aux autres antibiotiques de bêta-lactamines des SCN sont médiées par une protéine liant la pénicilline (PLP2a) qui a une affinité réduite pour ces antibiotiques. Cette protéine est codée par le gène *mecA*, inséré dans un îlot génomique appelé "Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*" (SCC*mec*) (Machado *et al.*, 2007). SCC*mec* contient deux composants essentiels, le complexe de gènes *mec* et le complexe de gènes *ccr* (Ghaznavi-Rad *et al.*, 2018).

L'observation d'un transfert *in vivo* de SCC*mec* de *S. epidermidis* à *S. aureus* indique que le SCN pourrait servir de source pour l'acquisition de SCC*mec* par *S. aureus*. De plus, les types de SCC*mec* dans SCN sont plus hétérogènes que ceux dans SARM, comme les rapportent Hanssen *et al.*, (2004) et Zhang *et al.*, (2009). Ces résultats suggèrent la possibilité d'un transfert des gènes dans des organismes autres que les staphylocoques (Saber *et al.*, 2017).

À ce jour, 11 types différents de SCC*mec* (I–XI) sont définis sur la base de la combinaison de complexes *ccr* et *mec*, mais seuls les types (I–V) sont répartis à l'échelle mondiale, tandis que les autres semblent exister en tant que souches locales dans le pays d'origine (Ghaznavi-Rad *et al.*, 2018).

I.11.4.1. Le complexe du gène *mec*

Le complexe des gènes *mec* est composé de gènes régulateurs *mecA* et il a été classé en six classes différentes: les gènes A, B, C1, C2, D et E (Ghaznavi-Rad *et al.*, 2018). Ce complexe est composé de *mecA*, ses gènes régulateurs et les séquences d'insertion associées. Le complexe de gènes *mec* classe A est le complexe prototype, qui contient *mecA*, les gènes régulateurs *mecR1* et *mecI* complets en amont de *mecA*, la région hypervariable (HVR) et la séquence d'insertion IS431 en aval de *mecA*. Le complexe du gène *mec* (classe B) est composé de *mecA*, un *mecR1* tronqué résultant de l'insertion d'IS1272 en amont du *mecA*, et de HVR et IS431 en aval du *mecA*. Le complexe du gène *mec* (classe C) contient *mecA* et tronqué le *mecR1* par l'insertion d'IS431 en amont de *mecA* et HVR et IS431 en aval du *mecA*. C1 et C2 sont considérés comme des complexes de gènes *mec* différents, car ils ont probablement évolué indépendamment. Le complexe du gène *mec* (classe D) est composé de *mecA* et *mecR1* mais ne porte pas de séquence d'insertion en aval de *mecR1* (IWG-SCC, 2009) (figure 2).

I.11.4.2. Le complexe du gène *ccr*

Le complexe du gène *ccr* est composé du gène (s) *ccr* et Open Reading Frames (ORF), dont plusieurs ont des fonctions inconnues. Actuellement, trois gènes *ccr* phylogénétiquement distincts, *ccrA*, *ccrB* et *ccrC*, ont été identifiés chez *S. aureus* avec des similitudes de séquences d'ADN inférieures à 50% (IWG-SCC, 2009). Les gènes *ccrC* ou la paire de *ccrA* et *ccrB* codent pour "recombinases-mediating integration" et de l'excision de SCC*mec* dans et à partir du chromosome (Ghaznavi-Rad *et al.*, 2018) (figure 2).

L. 53, 2009

COMMENTARY 496

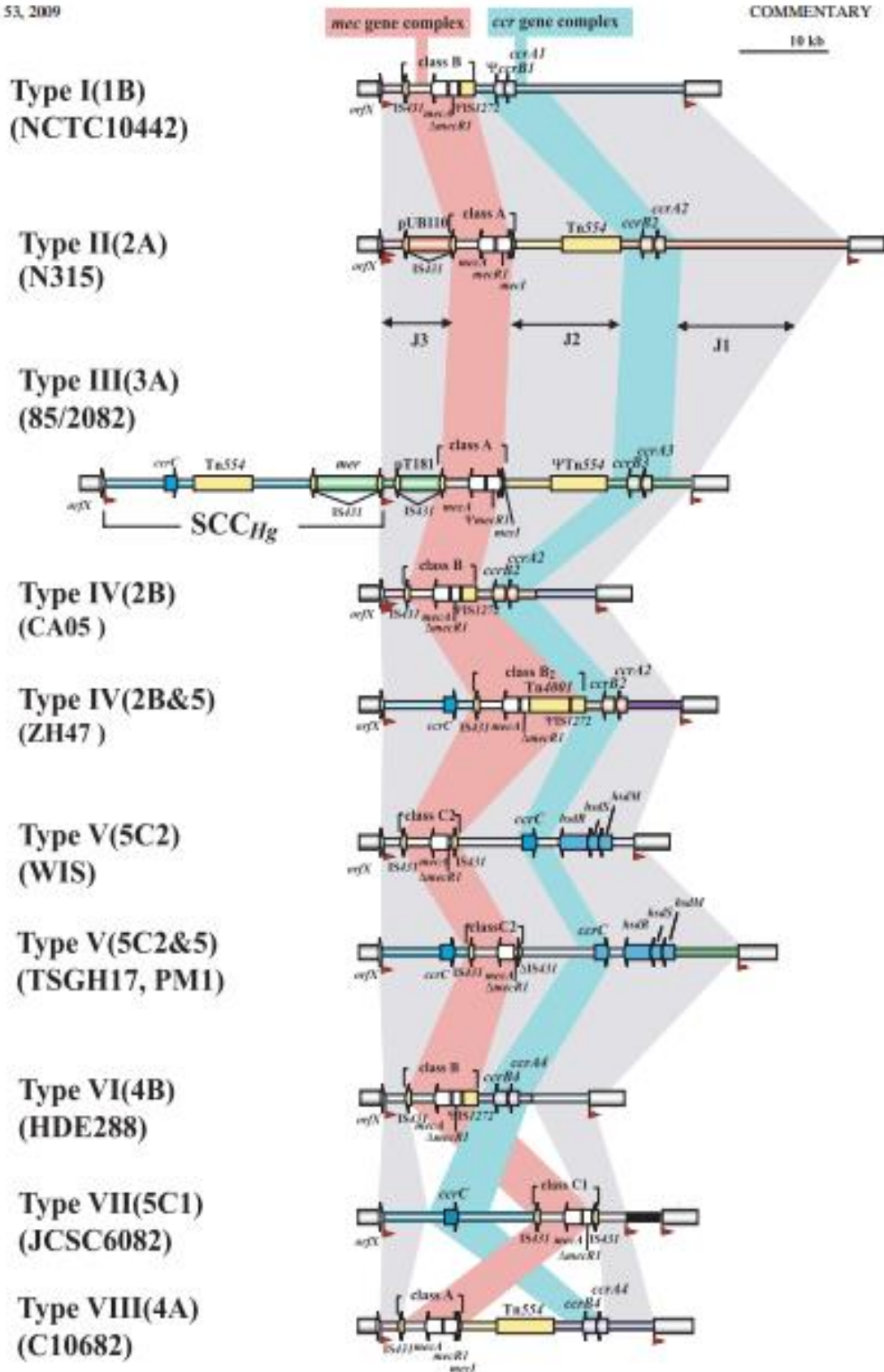


Figure 2. Emplacements des gènes *mecA* et *ccr* dans la séquence *SCC_{mec}* de type I – VIII (Saber *et al.*, 2017).

Chapitre II.

Le biofilm des SCN

Chapitre II. Le biofilm des SCN

II.1. Définition du biofilm

Le terme biofilm a été proposé en 1978 pour désigner une communauté de microorganismes enrobés d'une matrice hydratée, riche en polymères extracellulaires, et en contact avec une surface (Lebeaux et Ghigo, 2012).

Costerton *et al.* (1999) ont proposé une définition de base du biofilm comme : «une communauté structurée de cellules bactériennes enfermées dans une matrice polymérique autoproduite et adhérentes à une surface inerte ou vivante». Les composants de la matrice peuvent être des exopolysaccharides, des protéines, des acides nucléiques ou d'autres substances (appelées substances extrapolymeriques) censées fournir aux cellules de nombreux avantages par rapport aux cellules planctoniques (Balaban *et al.*, 2008). La matrice assure la stabilité structurelle et la protection du biofilm. Presque tous les microorganismes, y compris plus de 90% des bactéries, peuvent former un biofilm (Al-Shuneigat *et al.*, 2014).

Bien que bénéfiques dans la plupart des environnements, les biofilms bactériens se développant sur des implants ou lors d'infections chroniques constituent des réservoirs de pathogènes à l'origine de nombreuses infections nosocomiales. Malgré la mise en œuvre des mesures préventives, les biofilms sont difficiles à éradiquer en raison de leur tolérance caractéristique à des doses élevées d'antibiotiques. La figure 3 montre les hypothèses pour expliquer le phénomène de tolérance du biofilm vis-à-vis des biocides (antibiotiques et antiseptiques) (Lebeaux et Ghigo, 2012).

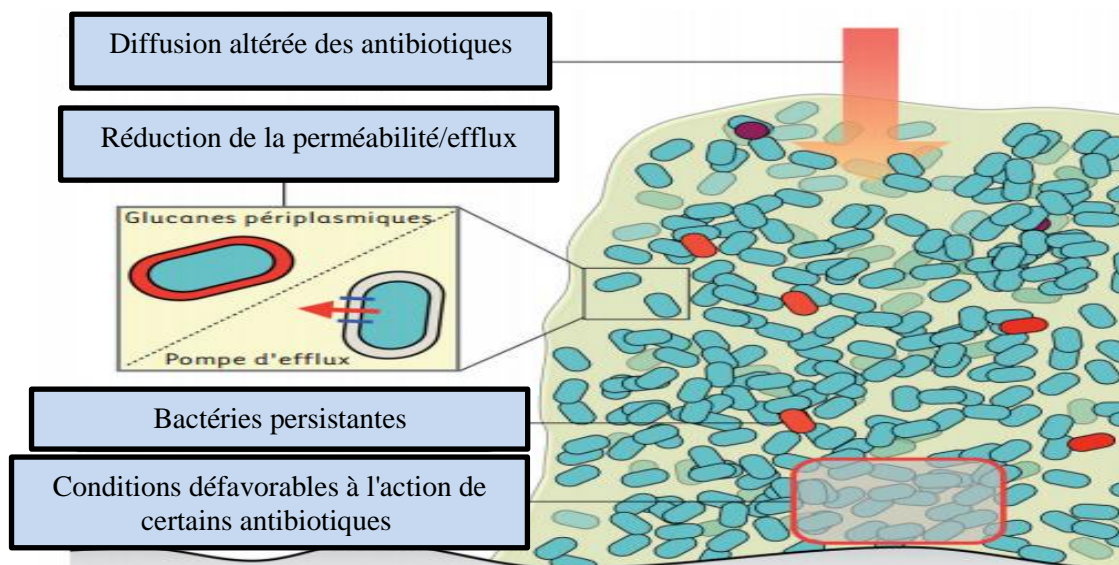


Figure 3. Hypothèses pour expliquer le phénomène de tolérance du biofilm vis-à-vis des biocides (antibiotiques et antiseptiques) (Lebeaux et Ghigo, 2012).

II.2. Etapes de la formation du biofilm

Le développement d'un biofilm bactérien peut être divisé en deux phases, qui impliquent des facteurs moléculaires spécifiques: fixation et maturation (Otto, 2013), ce qui conduit finalement à une structure de 3D caractéristique du biofilm avec des agglomérations bactériennes en forme de champignon entourées de canaux remplis de fluide (Wang *et al.*, 2011). Ces deux étapes sont physiologiquement différentes. Une phase finale de détachement (ou de dispersion) implique la dissémination de cellules individuelles ou de groupes de cellules pour coloniser de nouveaux sites d'infection dans le corps humain (Otto, 2008) (figure 4).

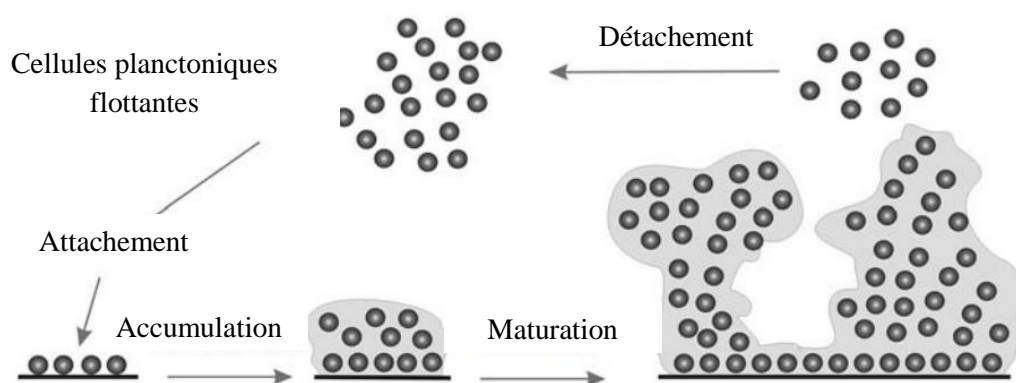


Figure 4. Modèle de différentes phases de formation de Biofilm (Mack *et al.*, 2006).

II.2.1. Attachement (fixation)

La colonisation de la surface du polymère d'un dispositif médical par la formation d'un biofilm à couches multiples a été considérée comme le facteur critique de la pathogénicité des infections associées à un corps étranger causées par les SCN. Parmi les SCN, *S. epidermidis* est l'espèce la plus retrouvée des infections associées aux biofilms. Les cellules bactériennes agglomérées sont enfermées dans un matériau extracellulaire amorphe et composé de produits bactériens, tels que les acides teichoïques, les protéines, les polysaccharides, l'ADN extracellulaire et les produits de l'hôte (Becker *et al.*, 2014).

L'attachement initial peut se produire sur des surfaces abiotiques ou biotiques. La fixation à une surface abiotique, telle que la surface en plastique d'un dispositif médical à demeure, dépend des caractéristiques physico-chimiques du dispositif et des surfaces bactériennes. Ce type de fixation est donc principalement entraîné par des interactions hydrophobes ou électrostatiques. L'attachement à une surface biotique telle qu'un tissu humain est régi par des interactions totalement différentes, beaucoup plus spécifiques.

II.2.1.1. Protéines de surface

Les staphylocoques expriment une grande variété de protéines de surface qui se lient aux protéines de la matrice de hôte, appelées collectivement MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) (Otto, 2013).

D'autres protéines ont été impliquées pour la fixation dans lesquelles les protéines de liaison staphylococcique telles que les autolysines / adhésines AtlE et Aae, la protéine liant le fibrinogène Fbe/Sdrg, la protéine liant la fibronectine Embp et la lipase GehD, jouent un rôle important. La molécule d'adhésion la plus importante est AtlE (Piette et Verschraegen, 2009).

II.2.1.2. Acides teichoïques

En plus des protéines, les acides teichoïques sont également impliqués dans l'adhérence de *S. epidermidis* aux facteurs de l'hôte (Becker *et al.*, 2014). L'acide teichoïque interagit avec d'autres polymères de surface via une interaction électrostatique, contribuant ainsi au réseau complexe qui forme la surface de la cellule staphylococcique (Otto, 2013).

II.2.1.3. L'ADN extracellulaire

Chez *S. epidermidis*, l'ADN extracellulaire est un composant essentiel nécessaire à la fixation initiale des bactéries sur les surfaces, ainsi qu'à la phase initiale du développement du biofilm. Dans ce cas également, l'ADN extracellulaire provient de la lyse d'une petite sous-population de *S. epidermidis*. La libération d'ADN de *S. epidermidis* semble être principalement médiée par la protéine d'autolysine AtlE, car l'inactivation de l'AtlE réduit considérablement la libération d'ADN (Arciola *et al.*, 2015).

Comme dans le cas des acides teichoïques, la charge négative de l'ADN peut jouer un rôle crucial dans l'interaction avec d'autres structures de surface (Otto, 2013).

II.2.2. Accumulation et maturation des biofilms

La maturation des biofilms comprend des processus adhésifs liant les bactéries entre elles au cours de la prolifération et des processus perturbateurs formant des canaux dans la structure du biofilm. Ces derniers sont nécessaires pour que les nutriments atteignent les cellules dans des couches plus profondes de biofilms (Otto, 2013).

Les bactéries se multiplient et s'accumulent dans des agrégats cellulaires multicouches, selon un processus nécessitant une adhésion intercellulaire. Cette dernière

peut être médiée par différentes macromolécules spécifiques, telles que les adhésines polysaccharidiques et certaines protéines qui induisent l'agrégation cellulaire. De plus, en raison de son caractère anionique, l'ADN extracellulaire et les acides teichoïques générés par les cellules lysées peuvent interagir avec les adhésines polysaccharidiques chargées positivement, augmentant ainsi l'accumulation de biofilm en agissant en outre comme une "colle" (Becker *et al.*, 2014), donnant un aspect tridimensionnel typique des biofilms matures sous forme de champignon entourant des canaux remplis de fluide (Otto, 2008).

II.2.2.1. Adhésine Intercellulaire Polysaccharidique (PIA) et le locus *ica*

Le principal polysaccharide de la matrice de biofilm staphylococcique est un homoglycane linéaire composé d'au moins de 130 résidus de liaison β -1,6 N-acétyl glucosamine, partiellement désacétylé (15-20% des résidus) et donc chargé positivement. Ce polysaccharide a été initialement découvert et caractérisé chez *S. epidermidis* où sa biosynthèse est codée par le locus d'adhésion intercellulaire (*icaADBC*). Pendant longtemps, le locus *ica* a été considéré comme un déterminant de la virulence propre aux souches de *S. epidermidis* responsables d'infections à cathéter ou liées aux dispositifs médicaux (Arciola, 2015). Le *icaA* fonctionne comme une N-acétyl glucosaminyl transférase, avec UDP-N acétyl glucosamine comme substrat (Thompson et Jefferson, 2009; Arciola, 2015).

L'*icaD*, associé à l'*icaA*, crée une augmentation significative de l'activité de N-acétyl glucosaminyl transférase et facilite la synthèse de 10 à 20 mères de N-acétyl glucosamine. L'*icaC* est nécessaire pour la synthèse d'oligomères de N-acétyl glucosamine plus longs que 20 résidus, et est supposé jouer un rôle dans l'exportation de ces polymères de la cellule (Thompson et Jefferson, 2009). Le produit d'*icaC* est impliqué dans l'externalisation du polysaccharide naissant. Le produit d'*icaB* est une N-désacétylase, responsable de la désacétylation partielle de polymère N-acétyl glucosamine (Arciola, 2015). L'*icaA*, *icaC* et *icaD* sont toutes des protéines membranaires, tandis que l'*icaB* est une protéine sécrétée (Thompson et Jefferson, 2009). Un cinquième gène, *icaR*, est situé en amont du gène *icaA* et est transcrit de manière divergente par rapport à l'opéron *icaADBC*. Le produit du gène *icaR* a une homologie à l'ADN liant des protéines régulatrices de transcription et peut être impliqué dans la régulation des gènes de structure *ica* (O'gara et Humphreys, 2001).

II.2.2.2. Quorum Sensing

De nombreux agents pathogènes microbiens communiquent via la production et la détection de molécules de signalisation auto-induites, appelées peptides auto-inducteurs, afin de contrôler l'expression des gènes spécifiques en réponse à la densité de population; c'est ce qu'on appelle la détection du quorum. Dans les staphylocoques, le système du quorum sensing est codé par le locus *agr* (régulateur des gènes accessoires), qui se compose des gènes *agrA*, *agrC*, *agrD* et *agrB* qui sont co-transcrits. Une fois que les peptides auto-inducteurs atteignent un niveau de seuil, les bactéries répondent en activant l'expression de séquences du gène spécifique dépendant de la densité cellulaire. La plupart des produits staphylococciques sont sous le contrôle *d'agr*, qui est activé lors du passage de la phase de croissance exponentielle à la phase de croissance stationnaire (Yousif *et al.*, 2015).

II.2.3. Détachement

Le détachement des biofilms est crucial pour la dissémination des bactéries vers d'autres sites de colonisation. Cela peut se produire par le détachement des cellules uniques ou d'agrégats de cellules. Plusieurs facteurs peuvent contribuer au décollement: (1) des forces mécaniques, telles que l'écoulement dans un vaisseau sanguin, (2) l'arrêt de la production de matériau de construction de biofilm, tel que l'exopolysaccharide, et (3) des facteurs de détachement au sens strict, tels que des enzymes détruisant la matrice, ou les tensio-actifs. En fait, le détachement contrôlé maintient une certaine épaisseur de biofilm et régit un taux spécifique de dissémination du biofilm. Pour les staphylocoques, ce mécanisme est contrôlé par le système de détection du quorum *agr* (Otto, 2008).

II.3. Relation de la formation de biofilm à la sensibilité aux antibiotiques

Les bactéries d'un biofilm sont généralement moins sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants que ces mêmes bactéries sous forme planctonique. En fait, les bactéries d'un biofilm peuvent être de 10 à 1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens (Tremblay *et al.*, 2014).

Plusieurs mécanismes de développement de la résistance sont discutés dans la littérature. La première de ces hypothèses suggère que le glycocalyx du biofilm empêche la diffusion des antibiotiques aux cellules ciblées. Cependant, des chercheurs ont montré qu'un biofilm de *S. epidermidis* n'empêchait pas la perfusion de vancomycine et la rifampicine. La deuxième hypothèse suggère que les taux de croissance bactérienne

diminuent la réponse aux agents antimicrobiens. La troisième hypothèse suggère que le microenvironnement dans un biofilm influence l'activité antimicrobienne et repose principalement sur différentes études de microenvironnement de biofilm par rapport aux tests de sensibilité standard sous différents pH, pCO₂, pO₂, concentrations de cations divalents, niveaux d'hydratation et concentrations de pyrimidine (Mack *et al.*, 2006).

D'autres facteurs ont été déterminés : le métabolisme des bactéries d'un biofilm joue également un rôle très important. Étant donné la faible concentration de certains nutriments, certaines cellules du biofilm seront peu actives métaboliquement et pourront même être sous forme dormante; ces cellules bactériennes dormantes sont d'ailleurs probablement responsables d'une grande partie de la tolérance associée aux biofilms. La proximité spatiale des bactéries au sein d'un biofilm mature favorise probablement le transfert horizontal des gènes et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques (Tremblay *et al.*, 2014).

Chapitre III.

Généralités sur les *Pseudomonas* fluorescents

Chapite III. Généralités sur les *Pseudomonas* fluorescents

III.1. Description de *Pseudomonas* spp.

les *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, droits et fins de 0.5 à 1.3 μm , non sporulés, mobiles par une ciliature polaire (monotriche ou multitriche), quelques souches et *P. mallei* sont immobiles (Avril *et al.*, 1992). Des pili ou fimbriae peuvent être observés chez de nombreuses espèces (Palleroni, 1986). Presque toujours oxydase positive c'est-à-dire possédant pour la plupart une chaîne cytochromique complète comprenant le cytochrome C et une cytochrome C oxydase (Avril *et al.*, 1992). Les espèces du genre *Pseudomonas* sont des bactéries chimio-organotrophes avec un métabolisme strictement respiratoire comme accepteur terminal d'électrons l'oxygène en aérobiose (Avril *et al.*, 1992; Couillerot *et al.*, 2009) et dans certains cas le nitrate en tant qu'accepteur d'électrons terminal) (Toder, 1999; Couillerot *et al.*, 2009). D'autres caractéristiques morphologiques et biochimiques sont montrées dans le tableau 5. Ce genre contient 58 à 69% de G+C (Couillerot *et al.*, 2009).

Le genre *Pseudomonas* comprend des espèces fluorescentes : *P. aeruginosa* produit la pyocyanine et la pyoverdine, mais pouvant être perdus par mutation (Avril *et al.*, 1992). D'autres espèces de *Pseudomonas* sont fluorescentes telles que *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. monteillii*, *P. mosselii*, *P. chlororaphis*, etc. produisant de la pyoverdine et des espèces non fluorescentes telles que: *P. alcaligenes*, *P. stutzeri*, *P. mendocina* (Martin, 2007). De nombreux facteurs environnementaux influent sur la synthèse de ces pigments, notamment la nature chimique du carbone organique et la source d'énergie, le degré d'aération du milieu de culture, le pH, la lumière et les cations Mg^{2+} , Zn^{2+} et Fe^{3+} (Meyer et Abdallah, 1978).

Tableau 5. Caractéristiques morphologiques et biochimiques du genre *Pseudomonas* (Martin, 2007).

Espèce	Caractères	Pigment	Nombre de flagelles	Oxydase	Croissance		Réduction NO ₃ ⁻	ADH	Hydrolyse			Citrate Simmons	Acidification					Remarque
					+41°C	+4°C			Géline	Lécithinase	Urée		Glucose	Tréhalose	Mannitol	Xylose	Maltose	
<i>P. aeruginosa</i>		PC+PV ^c	1	+	+	-	+	+	+	V	V	+	+	-	+	+	-	10 % de souches apigmentées
<i>P. fluorescens</i>		PV	>1	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>P. putida</i>		PV	>1	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	V	
<i>P. monteilii</i>		PV	>1	+	-	-	-	+	-	-	V	+	+	-	-	-	-	
<i>P. alcaligenes</i>		C	1	+	V	+	V	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
<i>P. pseudoalcaligenes</i>			1	+	+	+	+	V	-	-	-	V	+	-	-	-	-	
<i>P. stutzeri</i>		C	1	+	V	+	+	-	-	-	-	+	+	-	V	+	+	
<i>P. mendocina</i>		C	1	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	V	V	-	
<i>P. luteola</i> ^a		C	>1	-	+	+	V	+	V	-	V	+	+	ND	V	+	+	Esculine +
<i>P. oryzihabitans</i> ^b		C	1	-	V	+	-	-	-	-	V	+	+	ND	+	+	+	

+: positif, - négatif, V: variable, ND: non déterminé.

^a: appelé aussi *Chryseomonas luteola* (ancien CDC groupe Ve-1). ^b: appelé aussi *Flavimonas oryzihabitans* (ancien CDC groupe Ve-2).

^c: PC (pyocyanine), PV (pyoverdine), C (caroténoïde).

Réaction importante

III.2. Classification du genre *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* ont été classés comme suit (tableau 6).

Tableau 6. Classification du genre *Pseudomonas* (Delarras, 2007).

Domaine	<i>Bacteria</i> ou <i>eubacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	Pseudomonadales
Familles	Pseudomonadacées
Genre	<i>Pseudomonas</i>

III.3. Habitat

Les *Pseudomonas* sont des bactéries ubiquitaires et certaines espèces sont plus fréquemment rencontrées en médecine humaine. D'autres espèces ont été isolées de l'environnement ou sont des phytopathogènes présentant une spécificité d'hôte étroite (Martin, 2007). Elles peuvent être retrouvées dans les eaux douces et marines, dans les sols humides, dans les boues et les sédiments et dans l'air. Certaines espèces sont commensales de l'homme et les animaux, le plus souvent pathogènes opportunistes chez les personnes immunodéprimées ou responsables d'infections nosocomiales fréquentes ou graves chez les malades (Delarras, 2007).

Les *Pseudomonas* fluorescents qui ont été isolés des rhizosphères de nombreuses plantes sont, par exemple: *P. fluorescens* HV37a à partir de coton, *P. fluorescens* de blé et de riz, *P. aeruginosa* PNA1 de pois chiche et *P. chlororaphis* PCL1391 à partir de la tomate (Mezaache *et al.*, 2012).

III.4. Production de substances inhibitrices de la croissance des pathogènes

Les souches de *Pseudomonas* fluorescentes ont largement été étudiées comme agents potentiels de lutte biologique en raison de leur capacité à coloniser la rhizosphère et à protéger les plantes (Ge *et al.*, 2004) contre toute une gamme de maladies fongiques importantes en agriculture (Ge *et al.*, 2004; Munawar *et al.*, 2018) et qui pourraient jouer un rôle dans l'effet antagoniste de ces microorganismes dans le sol (Jacques *et al.*, 1993). Ces souches de *Pseudomonas* produisent un ou plusieurs métabolites, notamment des composés de la phénazine, du 2,4-diacétylphloroglucinol, de la pyolutéorine, de la pyrrolnitrine (Ge *et al.*, 2004; Mezaache-Aichour *et al.*, 2012), du cyanure d'hydrogène

(Ge *et al.*, 2004), les sidérophores (Jacques *et al.*, 1993; Munawar *et al.*, 2018), les pigments fluorescents (Munawar *et al.*, 2018) et les enzymes (Jacques *et al.*, 1993).

La biosynthèse de ces composés est généralement contrôlée par un système de régulation à deux composants comprenant le capteur kinase GacS et le régulateur de réponse GacA. Un système fonctionnel *GacS/GacA* est strictement nécessaire pour la production de 2,4-diacétylphloroglucinol, de pyolutéorine, de cyanure d'hydrogène et d'exoenzymes dans les souches *P. fluorescens* CHA0 et Pf-5 (Ge *et al.*, 2004). La figure 5 montre des métabolites secondaires produits par *P. fluorescens* Pf-5.

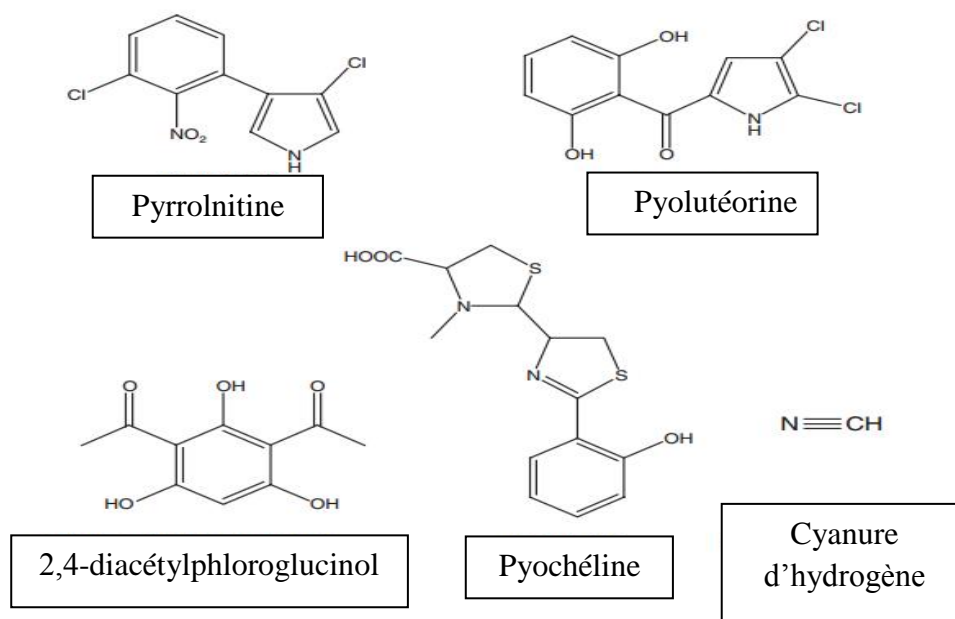


Figure 5. Métabolites secondaires produits par *P. fluorescens* Pf-5 (Mavrodi *et al.*, 2007).

III.4.1. Les antibiotiques

III.4.1.1. Le 2,4-Diacétylphloroglucinol (DAPG)

Le DAPG, un antibiotique polycétide (weller *et al.*, 2007), a des propriétés antibactériennes, antifongiques, herbicides (Weller et Thomashow, 1993; weller *et al.*, 2007), antivirales et antihelminthiques. Il est également un facteur déterminant du contrôle biologique des maladies des racines et des plantules: la souche *P. fluorescens* CHA0 supprimait la pourriture noire du tabac, la pourriture coronaire et racinaire de la tomate et la fonte des semis de concombre par le *Pythium*; la souche *P. fluorescens* F113 supprimait la fonte des semis de betterave à sucre et de nématode à kyste par *Pythium* et la pourriture molle de la pomme de terre. En plus, cette souche inhibe les agents pathogènes du sol dans la rhizosphère, il a été démontré que le 2,4-DAPG produit sur les racines

d'*Arabidopsis thaliana* induisait une résistance à *Peronospora parasitica* et à *P. syringae* pv. *tomato* (weller *et al.*, 2007).

III.4.1.2. Les phénazines

Plus de 6000 dérivés de phénazine ont été identifiés et décrits au cours des deux derniers siècles. Ces composés peuvent être produits de deux manières, à savoir la biosynthèse via des bactéries produisant de la phénazine et la chimiosynthèse (Nansathit *et al.*, 2009). Les phénazines constituent un groupe important de composés hétérocycliques contenant de l'azote (Nansathit *et al.*, 2009; Pierson III et Pierson, 2010; Cardozo *et al.*, 2013; Neemann *et al.*, 2015) qui se différencient par leurs propriétés chimiques et physiques basées sur le type et la position des groupes fonctionnels présents (Saleem *et al.*, 2009; Pierson III et Pierson, 2010).

Les phénazines d'origine naturelle sont isolées en tant que métabolites secondaires provenant principalement de *Pseudomonas*, *Streptomyces* (Laursen et Nielsen, 2004; Rane *et al.*, 2007; Saleem *et al.*, 2009; Cardozo *et al.*, 2013; Conda-Sheridan *et al.*, 2016), *Pelagibacter*, *Vibrio* (Saleem *et al.*, 2009), *Nocardia*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Bacillus* (Rane *et al.*, 2007) et quelques autres genres du sol ou des habitats marins (Laursen et Nielsen, 2004; Cardozo *et al.*, 2013). Les propriétés biologiques de cette classe incluent les activités antibiotiques, antitumorales et antiparasitaires (Blankenfeldt *et al.*, 2004; Laursen et Nielsen, 2004; Cardozo *et al.*, 2013).

La biosynthèse de la phénazine est régulée par l'épuisement des nutriments, par la densité cellulaire élevée et par la conversion de la bactérie sous forme de biofilm (Nansathit *et al.*, 2009). *Pseudomonas* est la principale bactérie productrice de phénazine avec près d'un tiers des toutes les phénazines connues. Parmi toutes les phénazines d'origine biochimique, la pyocyanine de *Pseudomonas* a été d'abord isolée par Fordos dans les années 1850. Jusqu'à ce jour, les *Pseudomonas* fluorescents sont les producteurs de phénazine les mieux étudiés qui comprennent: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *P. chlororaphis* (Chincholkar *et al.*, 2013). Ces métabolites sont pour la plupart des structures simples à substitution hydroxyle et carboxyle (Laursen et Nielsen, 2004; Cardozo *et al.*, 2013).

Des phénazines à structure simple, telles que l'acide phénazine-1-carboxylique (PCA) et ses dérivés hydroxy et carboxamide, sont produites par des souches bénéfiques de *Pseudomonas* sur les racines des plantes, où elles jouent un rôle essentiel dans la

suppression des agents pathogènes fongiques (Blankenfeldt *et al.*, 2004; Nansathit *et al.*, 2009) et bactériens (Nansathit *et al.*, 2009) et peuvent contribuer à la compétence écologique des souches qui les produisent (Blankenfeldt *et al.*, 2004). PCA est également connu sous le nom de tubermicine B en raison de son activité antibiotique contre *Mycobacterium tuberculosis* (Laursen et Nielsen, 2004; Rane *et al.*, 2007). Quelques phénazines produites par *Pseudomonas* sont montrées dans la figure 6.

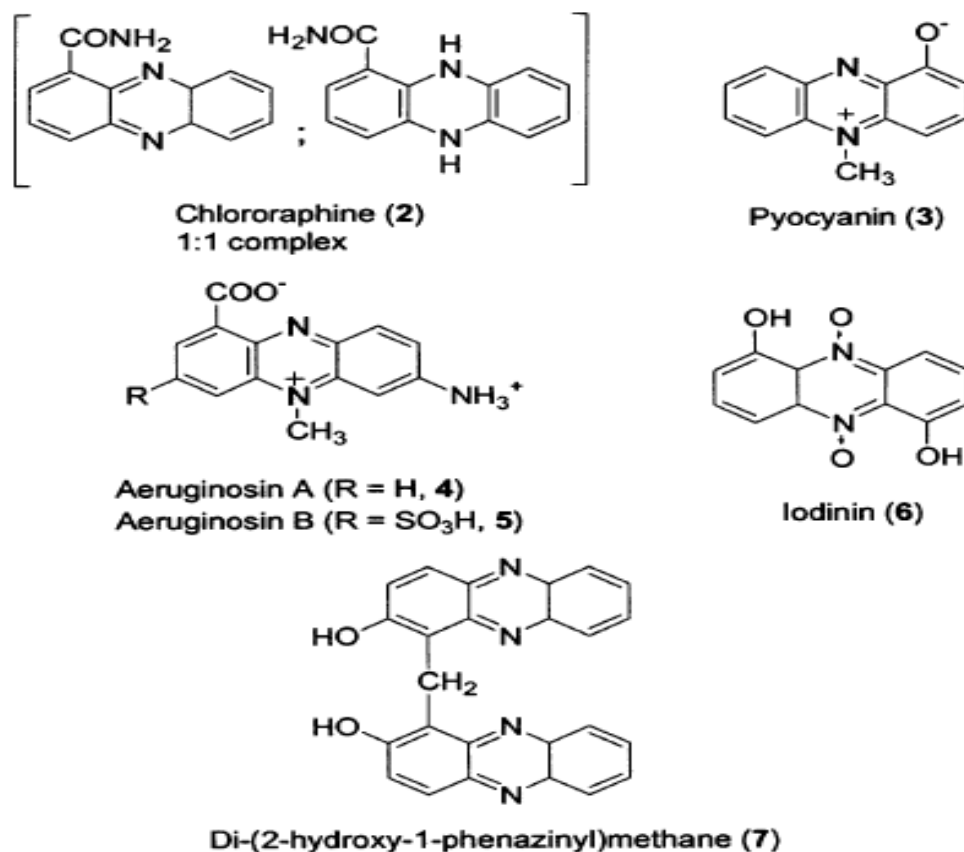


Figure 6. Quelques phénazines produites par *Pseudomonas* (Laursen et Nielsen, 2004).

P. fluorescens 2-79 synthétise le PCA (Thomashow *et al.*, 1990; Slininger et Jackson, 1992; Weller *et al.*, 2007), cet antibiotique inhibe *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* et d'autres agents pathogènes racinaires fongiques (Thomashow *et al.*, 1990; Slininger et Jackson, 1992) tels que *Pythium* spp. et *Rhizoctonia solani* (Slininger et Jackson, 1992) *in vitro* à moins de 1 µg/ml (Thomashow *et al.*, 1990). Il a été démontré que la production de PCA était le principal mécanisme responsable de la suppression des maladies dans la rhizosphère (Slininger et Jackson, 1992). *P. chlororaphis* spp. *aureofaciens* 30-84 produit le PCA, l'acide 2-hydroxyphénazine-1-carboxylique et 2-hydroxyphénazine et *P. chlororaphis* PCL1391 produit le PCA et de la phénazine-1-

carboxamide (PCN) qui suppriment la pourriture du pied et de la racine de la tomate (causée par *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*) (Weller *et al.*, 2007).

Les phénazines subissent des réactions d'oxydo-réduction avec NADH/NADPH, ce qui entraîne une augmentation des radicaux superoxydes toxiques et du peroxyde d'hydrogène dans les cellules cibles (Nesemann *et al.*, 2015).

III.4.1.3. La pyocyanine

P. aeruginosa produit plusieurs métabolites toxiques, le plus prédominant d'entre eux étant la pyocyanine qui est un composé phénazinique à activité redox (Žukovskaja *et al.*, 2017). Ce métabolite est un pigment bleu hautement diffusible, qui peut interagir avec l'oxygène moléculaire et stimuler la génération de radicaux d'oxygène, entraînant un déséquilibre redox, des lésions et la mort des cellules hôtes. En tant que facteur de virulence dans l'infection pulmonaire chronique, la pyocyanine perturbe le contrôle redox, inhibe la respiration dans les cellules humaines, accélère l'apoptose des neutrophiles, altérant ainsi la défense de l'hôte et favorisant la persistance bactérienne (Petrović *et al.*, 2019).

III.4.1.4. Pyolutéorine

La pyolutéorine est un antibiotique phénolique aromatique (Vinay *et al.*, 2016). Elle a été isolée pour la première fois de *P. aeruginosa* et plus tard de plusieurs *Pseudomonas* spp., Y compris *P. fluorescens* Pf-5 et CHA0 (Scales *et al.*, 2014; Vinay *et al.*, 2016) pour son activité antibactérienne et sa capacité à améliorer la santé des plantes (Scales *et al.*, 2014). La pyolutéorine a des activités bactéricides, herbicides et fongicides, en particulier contre *Pythium* spp. Howell et Stipanovic (1980) ont établi pour la première fois l'importance de la production d'antibiotiques pyolutéorines dans la suppression des agents pathogènes des plantules, tels que *Pythium ultimum*, provoquant une atténuation du coton par *P. fluorescens* pf-5. De même, l'efficacité de *P. fluorescens* Pf-5 pourrait être améliorée en modifiant l'expression des gènes produisant la pyolutéorine de manière à ce que les concentrations efficaces de l'antibiotique soient atteintes plus rapidement dans la spermosphère de la graine après la plantation (Vinay *et al.*, 2016).

III.4.1.5. Pyrrolnitrine

La pyrrolnitrine [3-chloro-4- (2'-nitro-3'-chlorophényl) pyrrole] a été isolée en 1964 en tant qu'antibiotique présentant une activité contre les champignons, les levures et

les bactéries à Gram positif produite au début par *P. pyrrocinia*. Il a été découvert que la pyrrolnitrine est produite aussi par une grande variété de bactéries telles que les espèces de *Pseudomonas*, *Burkholderia cepacia*, *Myxococcus fulvus*, *Corallocooccus exigu*, *Cystobacter ferrugineus*, *Enterobacter agglomerans* et *Serratia*. L'activité antibiotique de pyrrolnitrine est principalement due à l'inhibition de la glycérol kinase entraînant une accumulation de glycérol et donc une fuite de la membrane cellulaire (Van Pée, 2012).

III.4.2. Cyanure d'hydrogène

Le cyanure d'hydrogène (HCN) est un composé volatil et incolore qui inhibe les cytochromes oxydases C et d'autres métalloprotéines chez les bactéries concurrentes (Scales *et al.*, 2014). L'HCN est un facteur de biocontrôle de *P. fluorescens* CHAO, Voisard *et al.* ont découvert que la suppression de la pourriture noire des racines causée par le champignon *Thielaviopsis basicola* sur le tabac dépendait en partie de la production d'HCN par *P. fluorescens* CHAO (Haas et Keel, 2003).

L'HCN s'est avéré être un facteur de virulence puissant de *P. aeruginosa*, par exemple dans un test sur les nématodes (Haas et Keel, 2003). Bien qu'il n'est pas produit par *P. fluorescens*, d'autres *Pseudomonas* spp. sont capables de le produire au cours des maladies humaines telles que la fibrose kystique causée par *P. aeruginosa* (Scales *et al.*, 2014).

III.4.3. Les sidérophores

Les sidérophores sont des métabolites de faible poids moléculaire qui présentent une forte affinité pour le fer (Fe^{3+}). La structure des sidérophores produits par différentes souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents a été décrite. Ils sont constitués d'une petite chaîne peptidique d'acides aminés L et D en alternance, liée à un groupe chromophore fluorescent jaune-vert et à un groupe succinamide. Une fois émis dans le milieu, ils chélatent le fer (Fe^{3+}). Ce complexe est reconnu de façon plus ou moins spécifique par des protéines membranaires réceptrices, traverse la membrane cellulaire, puis intègre la cellule où il est réduit. Cette stratégie est plus ou moins efficace selon les microorganismes. Tous les sidérophores ne présentent pas en effet la même affinité pour le fer (Lemanceau, 1992).

Les *Pseudomonas* fluorescents produisent plusieurs sidérophores tels que la pyoverdine, la pyochéline et l'acide salicylique (Reddy *et al.*, 2008). Ainsi, les sidérophores appelés pyoverdines (Hamdan *et al.*, 1991; Lemanceau, 1992) ou pseudobactines possèdent une affinité élevée (Lemanceau, 1992; Jacques *et al.*, 1993) et

forment avec le fer un complexe (ferripyoverdine ou ferripseudobactine) (Lemanceau, 1992).

III.4.3.1. Pyoverdine

Turfreijer (1942) a proposé le terme «pyoverdine» pour désigner le pigment jaune-vert, fluorescent de *P. fluorescens* soluble dans l'eau: il a choisi ce nom par analogie avec celui du pigment phénazine, pyocyanine, produit par *P. aeruginosa*. D'autres auteurs ont étendu le nom de pyoverdine à tous les pigments produits par les *Pseudomonas* fluorescents (Meyer et Abdallah, 1978).

La pyoverdine consiste en un chromophore conservé attaché à une chaîne peptidique variable (Calcott *et al.*, 2014). Ce chromo-peptide est constitué de trois parties structurales, un chromophore de quinoline, une chaîne peptidique et une chaîne latérale. L'acide chromophore (1S) -5-amino-2,3-dihydro-8,9-dihydroxy-1H-pyrimido- [1,2-a] quinoléine-1-carboxylique est identique pour toutes les pyoverdines et son unité catéchol est une des sites de liaison pour le fer (III). Souvent, des composés apparentés supplémentaires peuvent être isolés à partir du bouillon de culture qui ne diffèrent des pyoverdines qu'en ce qui concerne leur structure du chromophore. Des différences structurelles entre les pyoverdines qui sont produites par différentes souches de *Pseudomonas* fluorescents sont observées dans leur chaîne peptidique qui est liée de manière N terminale au groupe carbonyle du chromophore (Fuchs *et al.*, 2001).

Les pyoverdines sont reconnues spécifiquement par les récepteurs de membranes des souches qui les produisent et, avec leurs récepteurs, fonctionnent comme un système d'absorption à haute affinité pour le fer ferrique. On pense que les pyoverdines facilitent la lutte biologique en séquestrant le fer des agents pathogènes, limitant ainsi leur croissance, et ont été impliquées dans la suppression des microorganismes délétères de la rhizosphère et des agents pathogènes des racines, y compris *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Hamdan *et al.*, 1991).

III.4.3.2. La Pyochéline

La pyochéline est un type de sidérophore couramment produit par le genre *Pseudomonas* et *Burkholderia*. Les agrégats de gènes biosynthétiques de la pyochéline, ainsi que sa capacité de solubilisation du fer, sont bien caractérisés. Cependant, la pyochéline a récemment démontré une autre activité biologique autre que d'être seulement un composé chélatant (Ong *et al.*, 2017).

III.4.3.3. L'acide salicylique

L'acide salicylique est un autre métabolite secondaire produit par *P. fluorescens* WCS 374 et par *P. aeruginosa* 7 NSK2. L'acide salicylique produit par *P. fluorescens* dans la rhizosphère serait impliqué dans l'induction de la résistance systémique (ISR) (Reddy *et al.*, 2008).

III.4.4. Les enzymes

La production d'enzymes mycolytiques est également évoquée pour expliquer l'action antagoniste des *Pseudomonas* fluorescents. Pour une souche de *P. stutzeri* (*Pseudomonas* non fluorescent), ils ont montré que la chitinase et la laminarinase produites par cette souche sont responsables de l'antagonisme *in vitro* observé vis-à-vis de *Fusarium solani* (Jacques *et al.*, 1993).

III.5. Régulation de la synthèse de phénazine et facteurs environnementaux

La biosynthèse de phénazine est basée sur l'expression du gène *phz*, qui s'active ou non et permet de contrôler leur production. Différents paramètres nutritionnels (carbone et azote), métalliques (fer et phosphate) et environnementaux (pH et concentration d'oxygène) se sont avérés régulateurs de l'expression des gènes *phz* (Huang *et al.*, 2020). De nombreux rapports ont suggéré la production de phénazine en fonction du taux de croissance et de la phase dépendante de la production de phénazines chez les *Pseudomonas*, c'est-à-dire la production maximale de phénazine à la phase exponentielle tardive de croissance et au début de la phase stationnaire. Avec le souci le plus important, la détection du quorum et la régulation du génome dépendant de la densité cellulaire sont les facteurs les plus déterminants pour la production de PCA et de PCN chez *P. chlororaphis* ssp. *aureofaciens* et de PCN chez *P. chlororaphis*. On pense que la molécule de PCA est le précurseur de tous les autres dérivés de la phénazine. L'ajout de PCA exogène, en tant que molécule précurseur dans un milieu de fermentation, a permis d'améliorer la production de phénazine dans *P. chlororaphis* GP72, postulant que le PCA exogène peut agir en tant qu'accepteur final d'électrons et auto-inducteur fournissant plus d'énergie pour la croissance bactérienne et la production des métabolites (Chincholkar *et al.*, 2013). L'opéron à sept gènes conservé *phzABCDEFG* est responsable de la synthèse de PCA par *P. fluorescens* 2-79 et autres *Pseudomonas* spp. fluorescents (Blankenfeldt *et al.*, 2004; Higgins *et al.*, 2018).

Chapitre IV.

Les plantes étudiées et
leurs métabolites
secondaires

Chapitre IV. Les plantes étudiées et leurs métabolites secondaires

IV.1. Les huiles essentielles

IV.1.1. Définition des huiles essentielles

Pour la 8^e édition de pharmacopée française (1965), les huiles essentielles (essences ou huiles volatiles) étaient: "des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus aux moins modifiés au cours de la préparation. Pour extraire ces principes volatils, il existe divers procédés. Deux seulement sont utilisables pour la préparation des essences officinales: celui par hydrodistillation dans la vapeur d'eau de plantes à essence ou de certains de leurs organes, et celui par expression mécanique" (Bruneton, 2009).

Pour la pharmacopée européenne (6^e éd.01/2008:2098) une huile essentielle est un "produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement de la vapeur d'eau soit par hydrodistillation sèche, ou par un procédé mécanique sans chauffage. Elle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition" (Bruneton, 2009).

Les HE, également appelées huiles volatiles ou étherées, sont des liquides huileux aromatiques (Al-Bayati, 2008), naturelles, complexes et caractérisées par une forte odeur (El Hattabi *et al.*, 2016) obtenues à partir de différentes parties de la plante et largement utilisées comme arômes alimentaires (Al-Bayati, 2008), elles ont longtemps été utilisées en pharmacologie, médecine, domaine alimentaire et industrie cosmétique (Lee *et al.*, 2005). Elles sont extraites de différentes parties de plantes telles que: les feuilles, les écorces, les fleurs, les graines, les bourgeons, les tiges et les fruits (Burt, 2004; Lee *et al.*, 2005) qui sont connues pour être douées de propriétés antioxydantes, antimicrobiennes (Lee *et al.*, 2005; El Ouali Lalami *et al.*, 2013; El Hattabi *et al.*, 2016) et antifongiques (El Hattabi *et al.*, 2016). En effet, beaucoup d'entre elles ont des propriétés antitoxiques, antivirales, antiseptiques et antiparasitaires. Plus récemment, on leur connaît des propriétés anticancéreuses (El Ouali Lalami *et al.*, 2013).

IV.1.2. Modes d'obtention des huiles essentielles

Les HE sont obtenues selon trois techniques. Les deux premières utilisent la chaleur (entraînement par la vapeur ou hydrodistillation, et la distillation sèche). La

troisième est l'expression mécanique réalisée à la température ambiante et ne concerne que les agrumes (fruits du genre *Citrus*) à l'état frais (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012). Les HE peuvent être obtenues à partir du matériel végétal par extraction, fermentation ou enfleurage (Lee *et al.*, 2005).

IV.1.2.1. Entraînement à la vapeur d'eau

Deux techniques sont utilisées, une hydrodistillation simple et distillation à la vapeur saturée:

IV.1.2.1.a. Hydrodistillation simple

L'hydrodistillation simple consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact) ou éventuellement broyé (turbodistillation) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite portée à l'ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'HE se sépare par différence de densité (Bruneton, 2009).

IV.1.2.1.b. Distillation à la vapeur saturée

Le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau: la vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées. Pour raccourcir le temps de traitement, limiter l'altération des constituants de l'HE et économiser l'énergie, il est possible de travailler en surpression modérée (de 1 à 3 bar). La conséquence de la surpression étant une augmentation de la température, la qualité du produit peut être altérée (Bruneton, 2009).

IV.1.2.2. Distillation sèche

Cette distillation est réalisée, de préférence à partir d'un bois ou des écorces. Elle n'utilise pas l'eau ou la vapeur d'eau ajoutée au végétal, contrairement à l'entraînement par la vapeur ou l'hydrodistillation. La distillation sèche conduit à un distillat ayant souvent l'apparence d'un goudron (liquide visqueux noirâtre). Ce mode de distillation est très peu utilisé (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012).

IV.2. Les extraits de plantes

IV.2.1. Méthodes d'extraction avec des solvants organiques

Avec les solvants, la détermination des composés bioactifs à partir de plantes médicinales dépend en grande partie du type de solvant utilisé dans la procédure d'extraction. Les propriétés d'un bon solvant d'extraction comprennent une faible toxicité,

une évaporation facile à basse température, une absorption physiologique rapide de l'extrait, une action conservatrice et une incapacité à provoquer la complexation ou la dissociation de l'extrait. Les facteurs qui influent sur le choix du solvant sont la quantité de composés phytochimiques à extraire, le taux d'extraction, la diversité des différents composés à extraire, la diversité des composés inhibiteurs à extraire, la facilité de manipulation ultérieure des extraits, la toxicité du solvant dans le procédé de bioanalyse, etc. De plus, le choix du solvant dépend des composés ciblés à extraire et est influencé par l'utilisation prévue de l'extrait. Étant donné que le produit final contiendra des traces de solvant résiduel, le solvant doit être non toxique et ne doit pas interférer avec le test biologique (Alamgir, 2018). Les divers solvants utilisés dans les procédures d'extraction sont: l'éther, l'acétone, le méthanol, l'éthanol, le chloroforme, etc., et sont utilisés pour extraire différents composés bioactifs (tableau 7).

Tableau 7. Solvants utilisés pour l'extraction de différents composants bioactifs (Alamgir, 2018).

Ethanol	Méthanol	Chloroforme	Ether de pétrol	Acétone
Tanins	Anthocyanes	Terpénoïdes	Alcaloïdes	Phénol
Polyphénols	Terpénoïdes	Flavonoïdes	Terpénoïdes	Flavonols
Polycétylènes	Saponines		Coumarins	
Flavonol	Tanins		Acides gras	
Stérols	Polyphénols			
Alcaloïdes	Xathoxylènes			
	Totarol			
	Quassinoïdes			
	Lactones			
	Flavones			
	Phénones			

IV.2.1.1. Macération

Le processus général de macération consiste à placer la matière végétale convenablement broyée, ou une poudre modérément grossière, dans un récipient fermé avec l'ajout de solvant sélectionné. Le système est autorisé à rester pendant sept jours, avec des agitations occasionnelles. Le liquide est ensuite filtré (Singh, 2008).

IV.2.1.2. Percolation

L'extraction par cette méthode implique l'utilisation d'un percolateur, un tube de verre avec un robinet intégré, dans lequel le matériel végétal en poudre est emballé, parfois humidifié avec de l'eau pour faciliter l'extraction. Le solvant d'extraction, généralement un solvant organique, est ensuite versé sur le matériau. Le solvant s'infiltre lentement à travers le matériel végétal, sort par le robinet ouvert et est recueilli dans un récipient placé en dessous. On laisse le solvant s'infiltrer continuellement dans le matériel végétal jusqu'à ce que l'extraction soit terminée (Alamgir, 2018).

IV.2.1.3. Extraction par Soxhlet

L'appareil de Soxhlet se compose d'un ballon, d'un extracteur Soxhlet et d'un condenseur. La matière première est généralement placée dans une cartouche en papier-filtre et insérée dans l'extracteur de Soxhlet, puis elle est emballée en veillant à ce que la sortie inférieure de l'extrait ne soit pas bloquée. Le solvant est placé dans le ballon et porté à son point d'ébullition. Ses vapeurs passent à travers le plus grand tube droit dans la partie supérieure de l'extracteur puis au condenseur où ils se condensent et retombent sur la matière première. Pendant cette période, les constituants solubles sont extraits. Le processus se poursuit jusqu'à ce que la matière première soit complètement extraite (Singh, 2008).

IV.3. Composition chimique des métabolites secondaires

Les plantes dans l'environnement naturel sont exposées à une gamme de stress abiotiques qui affectent leur croissance et d'autres processus métaboliques par la production d'une grande variété de métabolites secondaires telles que les composés volatils, les polyphénols, les tanins, les terpénoïdes, les alcaloïdes et les flavonoïdes (Mehalaine *et al.*, 2017). La figure 7 montre des structures de quelques composants chimiques des HE.

IV.3.1. Terpènes

Les terpènes sont synthétisés dans le cytoplasme de la cellule par la voie de l'acide mévalonique. Les terpènes sont composés d'unités d'isoprène et sont généralement représentés par la formule chimique $(C_5H_8)_n$. Les terpènes peuvent être acycliques, monocycliques, bicycliques ou tricycliques. En raison de la diversité de leurs structures chimiques, les terpènes sont classés en plusieurs groupes tels que les monoterpènes

(C₁₀H₁₆), les sesquiterpènes (C₁₅H₂₄), les diterpènes (C₂₀H₃₂) et les triterpènes (C₃₀H₄₀) (Swamy *et al.*, 2016).

Le composant principal (environ 90%) des HE bioactives est constitué de monoterpènes. Parmi les principaux composés figurent les hydrocarbures monoterpéniques (*p*-cymène, limonène, -pinène et -terpinène), les monoterpènes oxygénés (camphre, carvacrol, eugénol et thymol), les diterpènes (cembrène C, kaurène et camphorène), les hydrocarbures sesquiterpéniques (-caryophyllène, germacrene D et humulène), les sesquiterpènes oxygénés (spathuléol, oxyde de caryophyllène), les alcools monoterpéniques (géraniol, linalol et nérol), les alcools sesquiterpéniques (patchoulol), aldéhydes (citrin), les cétones (acétophénone et benzophénone), les lactones (bergaptène), les phénols (eugénol, thymol, carvacrol et catéchol), les esters (acétate de bornyle et acétate d'éthyle) et les coumarines (fumarine et benzofurane) (Swamy *et al.*, 2016).

Les monoterpènes sont classés selon :

- leurs fonctions : alcools (géraniol, linalol), esters (acétate de linalyle), aldéhydes (citral, citronellal), cétones (menthone, camphre, thuyone), éthers-oxydes (cinéole) ;
- leurs structures : linéaire (farnésène, farnésol), monocyclique (humulène, zingiberène), bicyclique (cadinène, caryophyllène, chamazulène) ou tricyclique (cubébol, patchoulol, viridiflorol) (Couic-Marinier et Lobstein, 2013).

IV.3.1.1. Les oxydes

Les oxydes stimulent les sécrétions glandulaires exocrines. Ils agissent sur l'arbre bronchopulmonaire. Certains ont une action antivirale et d'autres sont des antiparasitaires puissants, les principaux chémotypes sont: 1,8-cinéole, linaoloxyle, escalyptol...etc (Silvant, 2014).

IV.3.1.2. Les aldéhydes

Les aldéhydes terpéniques sont plutôt calmants et sédatifs, antibactériens (formes bactériennes sporulées), antiparasitaires, antiviraux et antifongiques. Ils favorisent la stimulation exocrine digestive (cholérétique et cholagogue). Ils sont mucolytiques et lipolytiques. Ce sont de bons cicatrisants cutanés, désclérosants et de très puissants anti-inflammatoires. Ils ne présentent aucune toxicité aux doses physiologiques mais peuvent, sur le long terme, irriter la peau (Couic-Marinier et Lobstein, 2013). Les aldéhydes trouvés

dans les HE les plus fréquemment rencontrés sont le cinnamaldéhyde, le benzaldéhyde et le géraniol (Hammer et Carson, 2011).

IV.3.1.3. Les cétones

Les cétones sont des composés très actifs, dont l'utilisation doit être contrôlée. À faible dose, les cétones sont calmantes, sédatives et faiblement antibactériennes (Couic-Marinier et Lobstein, 2013). Les composants des HE cétoniques les plus couramment rencontrés sont la menthone, la carvone, la pulegone et la pipéritone, qui sont monocycliques, et le camphre, le fenchone, la thuyone et la verbénone, qui sont bicycliques (Hammer et Carson, 2011).

IV.3.1.4. Les esters

Les esters sont des composants très bien tolérés par l'organisme. Ils sont moins solubles dans l'eau. Les HE riches en esters agissent au niveau des médiateurs du système neurovégétatif et au niveau des récepteurs musculaires. Ils sont anti-inflammatoires, calmants, antalgiques, antimycosique, anti-allergènes et anxiolytiques (Silvant, 2014). Les esters présents dans les HE sont oxygénés et peuvent également contenir un groupe hydroxyle. Ils peuvent être acycliques, comme le géranyle, le linalyle et l'acétate de néryle, ou cycliques, comme le méthyl salicylate et le benzyle acétate (Hammer et Carson, 2011).

IV.3.1.5. Les lactones

Les lactones sont formées par couplage d'un oxyde et d'une cétone. Les HE qui en renferment sont anti-infectieuses, antihelminthiques, stimulants hépatiques, mucolytiques et expectorantes. Elles présentent les mêmes risques de toxicité que les cétones, d'où des précautions d'emploi identiques (Couic-Marinier et Lobstein, 2013).

IV.3.1.6. Les coumarines

Les coumarines sont présentes sous forme de trace dans les HE. Elles sont anticoagulantes, antispasmodiques, sédatives et hypotensives, elles sont photosensibles donc déconseillées en application cutanée. Les principaux chémotypes sont: esculétine, angélicine furocoumarine, limettine, etc... (Silvant, 2014).

IV.3.1.7. Les hydroxydes

Les hydroxydes sont de très bons stimulants généraux et nerveux, des bactéricides à large spectre, de bons virucides, des anesthésiants (linalol, géranol et bornéol), des fongicides et des immuno-modulants (Couic-Marinier et Lobstein, 2013).

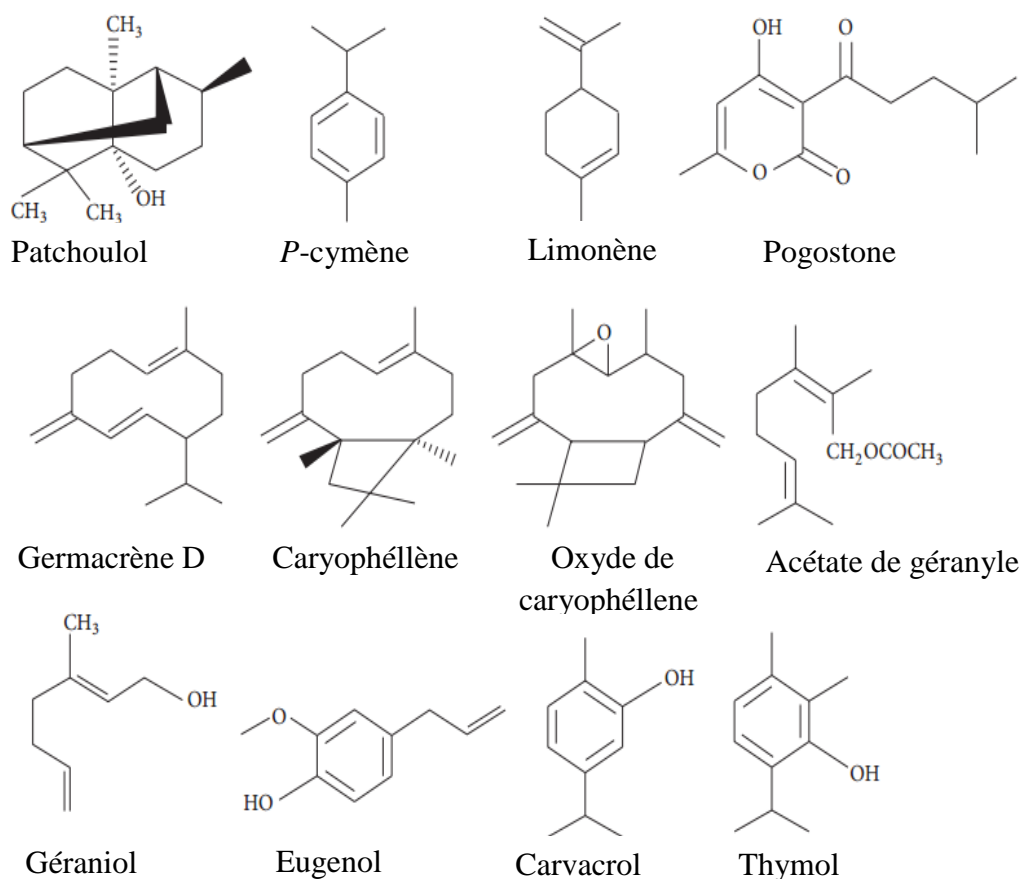


Figure 7. Structures de quelques composants chimiques des huiles essentielles (Swamy *et al.*, 2016).

IV.3.2. Les polyphénols

Les polyphénols représentent un groupe important d'au moins 10 000 composés différents contenant un ou plusieurs cycles aromatiques auxquels sont attachés un ou plusieurs groupes hydroxyles (Mojzer *et al.*, 2016).

L'activité antimicrobienne des polyphénols présents dans les aliments végétaux et les plantes médicinales a fait l'objet de recherches poussées contre un large éventail de microorganismes. Parmi les polyphénols, les flavan-3-ols, les flavonols et les tanins ont retenu l'attention en raison de leur large spectre et de leur activité antimicrobienne supérieure à celle d'autres polyphénols, et du fait que la plupart d'entre eux sont capables

de supprimer un certain nombre de facteurs de virulence microbienne (inhibition de la formation de biofilm, réduction de l'adhésion des ligands de l'hôte et neutralisation des toxines bactériennes) et synergie avec les antibiotiques (Daglia, 2012).

Les composés phénoliques sont parmi les principaux métabolites secondaires des plantes et peuvent être classés en plusieurs classes, dont les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (Lopes *et al.*, 2017).

IV.4.2.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques, qui peuvent être subdivisés en dérivés de l'acide benzoïque, tels que l'acide gallique et l'acide protocatéchique, et les dérivés de l'acide cinnamique, qui consistent principalement en acide coumarique, caféique et férulique (Daglia, 2012).

IV.4.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes partagent un squelette carboné commun de diphenylpropanes, deux cycles benzéniques (cycles A et B) reliés par une chaîne linéaire à trois carbones. La chaîne centrale à trois atomes de carbone forme un cycle pyrane fermé (cycle C) avec un cycle benzène A. Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés dans les fruits, les légumes et les boissons à base de plantes, telles que le thé et le vin, et la liste ne cesse de s'allonger. En fonction de l'état d'oxydation du noyau central de pyrane (Daglia, 2012), les flavonoïdes peuvent eux-mêmes être subdivisés en plusieurs sous-classes: flavonols, flavones, flavanones, anthocyanidines, flavanols et également isoflavones (Daglia, 2012; Sharma *et al.*, 2019).

Les flavonoïdes sont des molécules bioactives précieuses. Il a été démontré que leurs activités sont anti-inflammatoires, antioxydantes, antivirales, antibactériennes, anticancéreuses, anti-prolifératives et anti-artérioscléreuses (Sharma *et al.*, 2019).

IV.4.2.3. Les tanins

Les tanins sont des composés de poids moléculaire moyen à élever. Disposant de deux ou trois groupes hydroxyles phénoliques sur un cycle phényle, les tanins sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent donc interagir et former des complexes insolubles avec les glucides et les protéines (Mojzer *et al.*, 2016).

IV.4. Les plantes étudiées

IV.4.1. *Juniperus oxycedrus* L.

IV.4.1.1. Nomenclature et description de *J. oxycedrus* L.

Le genévrier oxycède (*J. oxycedrus* L.) aussi connu comme arbre de cade, est un arbre qui peut atteindre jusqu'à 8 m de hauteur et est originaire de la région méditerranéenne (Marongiu *et al.*, 2003). Le tronc présente un pelage d'écorce fibreux gris à brun-rouge en rayures longitudinales. Il a de nombreuses branches, étalées ou ascendantes. Les feuilles ressemblent à des aiguilles et alternent en trois tours. Les aiguilles ont une longueur de 1 à 2.5 cm et une largeur de 1 à 2.5 mm, avec deux sillons de stomates blancs et cireux au-dessus, une arête en dessous et une extrémité épineuse (figure 8) (Al-Snafi, 2018).



Figure 8. Partie aérienne de *J. oxycedrus* L. (Benlarbi, 2019).

IV.4.1.2. Classification de *J. oxycedrus* L.

Le genévrier oxycède a été classé comme suit (tableau 8).

Tableau 8. Classification de *J. oxycedrus* L. (Al-Snafi, 2018).

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	Tracheophyta
Sous embranchement	Spermatophytina
Classe	Pinopsida
Sous-classe	Pinidae
Ordre	Pinales
Famille	Cupressacées
Genre	<i>Juniperus</i>
Espèce	<i>Juniperus oxycedrus</i> L.

IV.4.1.3. Vertus médicinales de *J. oxycedrus* L.

Cet arbre était utilisé en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies, telles que l'hyperglycémie, l'obésité, la tuberculose, la bronchite et la pneumonie (Karaman *et al.*, 2003; Loizzo *et al.*, 2007; Chaouche *et al.*, 2013; Al-Snafi, 2018). L'huile de cade peut être utilisée comme composant de parfum dans les savons, les détergents, les crèmes, les lotions et les parfums (Karaman *et al.*, 2003; Al-Snafi, 2018). Elle possède des propriétés kératolytiques et antiprurigineuses et des activités antimicrobiennes *in vitro* (Salido *et al.*, 2002).

La décoction de baies de *J. oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. a été utilisée comme un thé et les fruits pilés sont consommés pour réduire le niveau du glucose dans le sang en Turquie (Al-Snafi, 2018).

Il a été démontré que les extraits du méthanol et du dichlorométhane des feuilles et des tiges de *J. oxycedrus* ssp. *oxycedrus* réduisent la pression artérielle des rats normotendus, inhibent la réponse à l'histamine, à la sérotonine et à l'acétylcholine et présentent une activité anti-inflammatoire significative (Karaman *et al.*, 2003; Loizzo *et al.*, 2007).

IV.4.2. *Juniperus thurifera* L.

IV.4.2.1. Nomenclature et description de *J. thurifera* L.

Le genre *Juniperus* comprend environ 60 espèces (Marongiu *et al.*, 2003; Mansouri *et al.*, 2010). Ce genre est un élément important des écosystèmes arides et semi-arides dans tout l'hémisphère du Nord (Elmhdwi *et al.*, 2015).

Le genévrier thurifère (*J. thurifera* L.), Aiwal ou Hazenzna en berbère, (Beghami *et al.*, 2013) est un arbre ou arbuste de la famille des Cupressacées (Gauquelin *et al.*, 2003) qui ne se trouve que dans des parties isolées du bassin occidental de la Méditerranée: la France, l'Italie et l'Espagne en Europe et l'Algérie et le Maroc en Afrique du Nord (Gauquelin *et al.*, 1999; Zeraib *et al.*, 2014).

En Algérie, le genévrier thurifère, mélangé au cèdre, est strictement limité aux montagnes des Aures avec un certain nombre d'arbres dispersés et souvent très grands qui sont probablement les restes de peuplements plus étendus de Juniper. Au niveau du col Baali, sous un bioclimat subhumide et semi-aride entre 1650 et 1800 m d'altitude, *J. thurifera* constitue néanmoins plusieurs peuplements monospécifiques de 10 ha avec *Artemisia campestris*, *Bupleurum spinosum* ou *Stipa tenacissima* (Gauquelin *et al.* 1999). C'est un arbre ou un arbuste dioïque, avec des feuilles d'échelle et des baies noires bleuâtres à maturité (Zeraib *et al.*, 2014) (figure 9).



Figure 9. Partie aérienne de *J. thurifera* L. (Khater, 2018).

IV.4.2.2. Classification de *J. thurifera* L.

Le genévrier thurifère a été classé comme suit (tableau 9).

Tableau 9. Classification de *J. thurifera* L. (Gaussen, 1968).

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	Spermaphytes
Sous- embranchement	Gymnospermes
Classe	Pinopsida
Ordre	Pinales
Famille	Cupressacées
Sous famille	Cupressoideae
Genre	<i>Juniperus</i>
Espèce	<i>Juniperus thurifera</i> L.

IV.4.2.3. Vertus médicinales de *J. thurifera* L.

Différentes espèces de *Juniperus* ont été utilisées en médecine traditionnelle depuis des siècles comme encens, diurétiques, remèdes pour l'indigestion (Milos et Radonic, 2000) agents antitussifs, anti-fertilité, comme remèdes contre la tuberculose, le rhume, la dysenterie, la leucorrhée, l'arthrite rhumatoïdale et la fièvre (Moujir *et al.*, 2008).

IV.4.3. *Salvia officinalis* L.

IV.4.3.1. Nomenclature et description de *S. officinalis* L.

S. officinalis L. (saugé, saugé du jardin, ou saugé commune) est un arbrisseau vivace, à feuilles persistantes (Abu-Darwish *et al.*, 2013), grises-vertes et présentent des rides sur la face supérieure et dans la surface inférieure sont presque blanches avec des peluches douces beaucoup plus courtes (Mosafa *et al.*, 2014), des tiges ligneuses, et des fleurs bleues aux violacées (figure 10) (Abu-Darwish *et al.*, 2013; Mehdizadeh *et al.*, 2016). *S. officinalis* L. fait partie de la famille des Lamiacées (El Ouadi *et al.*, 2015; Mehdizadeh *et al.*, 2016). Cette espèce est généralement cultivée, elle pousse spontanément à l'état sauvage dans différentes aires géographiques. Elle est rencontrée dans les clairières, les forêts, les broussailles, les pâturages, les steppes, les plaines, les hauts plateaux et les montagnes jusqu'à 2500 m d'altitude. La saugé se caractérise par une aire de répartition très répandue, elle se trouve essentiellement en Yougoslavie, Bulgarie, France, Italie, USA, Inde, Espagne, United Kingdom, Turquie, Maroc, Grèce, dans les

pays du pourtour méditerranéen, l'Afrique du Sud, le central, l'Amérique du Sud, et l'Asie du Sud Est (Jedidi *et al.*, 2018).



Figure 10. La partie aérienne de *S. officinalis* L. (Fu *et al.*, 2013).

IV.4.3.2. Classification de *S. officinalis* L.

La sauge officinale a été classée par Quezel et Santa (1963) comme suite (tableau 10).

Tableau 10. Classification de *S. officinalis* L.

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Salvia</i>
Espèce	<i>Salvia officinalis</i> L.

IV.4.3.3. Vertus médicinales de *S. officinalis* L.

S. officinalis a de nombreuses utilisations différentes, essentiellement, elle a été utilisée comme remède à base de plantes pour une large gamme de troubles et de maladies

en l'appliquant de manière interne ou externe. Elle est utilisée comme diurétique, tonique, soulagement de la douleur styptique, antiseptique, anti-inflammatoire, antifongique et spasmodique. Elle est également utilisée comme traitement pour la dysenterie, la toux, les ulcères, les varices, les piqûres d'insectes (Khalil et Li, 2011), l'obésité, le diabète, la dépression, le cancer des temps anciens (Mehdizadeh *et al.*, 2016), l'inflammation de la bouche et de la gorge (Mitić-Ćulafić *et al.*, 2005), contre la fièvre, les rhumatismes et dans le traitement de la bronchite chronique, ainsi que pour les maladies mentales (Miguel *et al.*, 2011).

Les HE de *S. officinalis* sont utilisées en raison de leurs propriétés curatives, dans un large éventail de maladies du système nerveux, du cœur et du système circulatoire, des maladies respiratoires, des maladies digestives, métaboliques et endocriniennes (Kadhim *et al.*, 2016).

IV.4.4. *Thymus ciliatus* ssp. *munbyanus* (Boiss. et Reut.) Batt.

IV.4.4.1. Nomenclature et description de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus*

Le genre *Thymus* comprend plus de 400 espèces (Kabouche *et al.*, 2005; Borugã *et al.*, 2014) plus abondantes dans la région méditerranéenne et en Iran; Dont 26 poussent en Algérie (Kabouche *et al.*, 2005).

T. ciliatus ssp. *munbyanus* (Boiss. et Reut.) Batt. connu sous le nom Arabe "Zaatar" est un arbrisseau de petite taille et un arbuste parfumé, avec des fleurs de 16-20 mm de long, regroupées en faux verticilles; les feuilles sont plus ou moins contractées, les fleurs qui les accompagnent étant morphologiquement différentes de celles insérées sur la tige, généralement plus larges à la base (figure 11) (Bendif *et al.*, 2018).



Figure 11. La partie aérienne de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* (Bendif *et al.*, 2018).

IV.4.4.2. Classification de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* (Boiss. et Reut.) Batt.

Selon Quezel et Santa (1963), la classification de *Thymus ciliatus* ssp. *munbyanus* est comme suite (tableau11).

Tableau 11. Classification de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* (Quezel et Santa 1963).

Embranchement	Phanérogames
Sous Embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicots
Sous Classe	Astéridées
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Thymus</i> L.
Espèce	<i>Thymus ciliatus</i>
Sous espèce	<i>Thymus ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> (Bois et Reut.) Batt., synonyme de <i>Thymus munbyanus</i> Boiss. et Reut. ssp. <i>munbyanus</i> (Dobignard et Chatelain, 2012).

IV.4.4.3. Vertus médicinales de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus*

L'HE et les infusions de thym sont traditionnellement utilisées pour traiter les blessures, les contusions, les ulcères infectés, les abcès, les ulcères cutanés, et divers types de dermatites. Le thym améliore le flux sanguin et l'oxygénation du cuir chevelu, réduit la séborrhée, régénère les glandes capillaires, améliore l'état des cheveux, prévient la calvitie et est donc utile en cas d'alopecie (Zarzuelo et Crespo, 2002).

Chamberlain (1887) est le premier chercheur qui à attribuer les propriétés antibactériennes de thym (sans préciser l'espèce), après avoir observé l'effet antibactérien de ses "vapeurs" sur *Bacillus anthracis*. Puis, de nombreuses études ont été réalisées avec des HE de différentes espèces de Thym. Il a été démontré qu'ils inhibent un large spectre de bactéries, généralement les bactéries à Gram positif étant plus sensibles que les bactéries à Gram négatif (Zarzuelo et Crespo, 2002).

Le *Thymus* est la plante médicinale la plus largement utilisée dans la médecine traditionnelle algérienne pour ses propriétés expectorantes, antitussives, antibroncholitiques, antispasmodiques, antihelminthiques, carminatives et diurétiques (Kabouche *et al.*, 2005).

T. ciliatus a été utilisé dans la région des Aures (Est algérien) comme remède traditionnel contre la bronchite, les infections pulmonaires, la grippe, la toux et certains troubles gastro-intestinaux (Kabouche *et al.*, 2009).

Chapitre V.

Moyens de lutte des SCN

Chapitre V. Moyens de lutte des SCN

V.1. Introduction

Les moyens de lutte contre les infections causées par les SCN sont compliqués. Ces bactéries peuvent devenir résistantes à un certain nombre d'antibiotiques grâce à divers mécanismes de résistance menant à l'échec thérapeutique. En outre, les SCN colonisent les cathéters par la formation de biofilms et les biofilms sont intrinsèquement résistants aux antibiotiques (Strasheim *et al.*, 2013).

V.2. Thérapeutiques antibactériennes et antibiofilms possibles

Les biofilms sont impliqués dans une multitude d'infections différentes et contribuent souvent de manière significative aux difficultés rencontrées lors du traitement. Le développement des médicaments antibiofilms vise à combiner ces médicaments avec des antibiotiques conventionnels, rétablissant ainsi l'efficacité que ces derniers montrent aux bactéries dans un statut non biofilm (Otto, 2008).

V.2.1. Interférence avec les facteurs essentiels du biofilm staphylococcique

Un antibiofilm idéal contre les staphylocoques inactiverait un facteur indispensable dans tous les cas d'infections associées aux biofilms staphylococciques. Cependant, un tel facteur n'existe probablement pas, car la formation de biofilms à staphylocoques, comme nous le savons maintenant, est multifactorielle. Encore, le ciblage de la biosynthèse d'un facteur qui apparaît être impliqué dans au moins la majorité des infections associées à un biofilm staphylococcique, tel que les PIA, semble utile d'envisager. Il est intéressant de noter que certaines bactéries produisent une enzyme qui peut dégrader le PIA staphylococcique et détruire les biofilms staphylococciques. Cette PIAse, nommée dispersine B, a été découverte pour la première fois chez *Actinobacillus actinomycetemcomitans* et semble avoir un potentiel antibiofilm. De même, bien que n'étant pas spécifique à un biofilm, la lysostaphine, une enzyme dégradant les peptidoglycanes est en cours d'évaluation en vue d'un usage thérapeutique contre les staphylocoques producteurs de biofilm (Otto, 2008).

V.2.2. Modification des caractéristiques adhésives des dispositifs médicaux à demeure

La surface des dispositifs médicaux à demeure peut être modifiée dans le but de diminuer l'adhésion bactérienne. Cependant, les staphylocoques font preuve d'une grande polyvalence et peuvent encore s'adhérer aux polymères modernes actuellement utilisés. En tant qu'approche complémentaire, il a été proposé de recouvrir les dispositifs médicaux à

demeure d'antibiotiques ou d'autres substances antibactériennes. Ces approches ont eu un succès limité, l'un des problèmes étant la résistance codée par un plasmide qui est largement répandue chez les staphylocoques (Otto, 2008).

V.2.3. Vaccination antibiofilm staphylococcique

De nombreux antisérums qui ont été développés, par exemple, contre les PIA et plusieurs protéines de surface, telles que la protéine de liaison à la fibronectine, ont prouvé leurs efficacités dans les modèles d'infection animale. Néanmoins, beaucoup de ces vaccins doivent encore être testés pour leurs utilités contre les infections associées aux biofilms (Otto, 2008).

V.2.4. Traitement des infections causées par *S. epidermidis* associée à un biomatériau

Les SCN, en particulier *S. epidermidis*, sont la principale cause des infections associées aux biomatériaux. Ces infections implantaires sont hautement persistantes malgré le traitement par des antibiotiques et nécessitent souvent le retrait de l'implant (Kwakman *et al.*, 2006).

Le traitement des infections associées aux biomatériaux causées par les SCN est en soi un défi clinique car *S. epidermidis* isolé des environnements nosocomiaux est presque toujours résistant à de multiples agents antimicrobiens (Rupp, 2014). Le traitement comprend l'administration d'antibiotiques par voie orale ou intraveineuse, la technique de verrouillage de l'antibiotique ou l'enlèvement et la réinsertion du cathéter. Selon les recommandations du traitement spécifique aux agents pathogènes de l'Infectious Diseases Society of America, les infections provoquées par les SCN devraient être traitées avec des antibiotiques pendant 5 jours à 7 jours si le cathéter est retiré et pendant 10 jours à 14 jours si le cathéter est retenu. La vancomycine constitue la base de la thérapie empirique antimicrobienne de ces infections. Cependant, l'efficacité de la monothérapie à la vancomycine montre des résultats contradictoires et le traitement devrait plutôt être une combinaison de vancomycine et d'autres antibiotiques, avec une activité antibiofilm, comme la rifampicine, la gentamicine ou la clindamycine (Strasheim *et al.*, 2013).

La persistance de *S. epidermidis* dans le tissu péri-implantaire a également été démontrée et associée à la formation d'abcès (Kwakman *et al.*, 2006). Les ingénieurs biomédicaux continuent de travailler sur des biomatériaux et des dispositifs prothétiques qui inhibent l'adhérence et la prolifération staphylococcique (Rupp, 2014).

V.3. Métabolites de *Pseudomonas* antistaphylococciques

Le genre *Pseudomonas* comprend de nombreuses espèces omniprésentes dans notre monde environnant. Bien que certaines puissent causer des infections seulement à certaines personnes immunodéprimées, cela n'a pas empêché les chercheurs d'essayer de trouver des espèces utiles dans le traitement des maladies causées particulièrement par des staphylocoques et des bactéries multirésistantes (Cardozo *et al.*, 2013; Dahah *et al.*, 2016).

Ainsi, pour faire face à la résistance croissante des staphylocoques et donc aux échecs des traitements de leurs infections, les chercheurs ont utilisé les composés sécrétés par des *Pseudomonas* dans le but de réduire les risques de staphylocoques à coagulase positive et à coagulase négative. Le choix des espèces du genre *Pseudomonas* est justifié par la simplicité de leur culture et par leur production de divers métabolites antistaphylococciques (Hotterbeekx *et al.*, 2017). *P. aeruginosa* réduit fortement ou complètement la croissance de *S. aureus* en co-culture dans de nombreux modèles planctoniques ou biofilm *in vitro* (Palmer *et al.*, 2005; Baldan *et al.*, 2014; Deleon *et al.*, 2014).

L'activité antistaphylococcique des espèces du genre *Pseudomonas* est due à un nombre de métabolites excrétés que nous mentionnons dans ce qui suit:

V.3.1. La Mupirocine (Acide pseudomonique)

C'est un antibiotique (Bactériocine) qui a été initialement isolé en 1971 à partir de *P. fluorescens*. Il est vendu sous le nom de la marque Bactroban, utilisé comme une crème ou une pommade appliquée sur la peau. La Mupirocine est un antibiotique topique utile contre les infections cutanées superficielles comme l'impétigo ou la folliculite. Il a été utilisé également contre SARM. La Mupirocine est un inhibiteur compétitif de l'isoleucyl-ARNt synthétase chez les staphylocoques, cette inhibition conduit à réduire la biosynthèse des protéines. Dans une étude présentée par Sutherland *et al.*, en 1985, toutes les espèces de staphylocoques ont été inhibées par 0.06 à 0.12 µg de mupirocine par ml, et il n'y avait pas une différence de sensibilité entre *S. aureus* et les staphylocoques à coagulase négative. Dans des tests contre 310 isolats cliniques de *S. aureus*, toutes les souches testées étaient sensibles à la mupirocine. *S. epidermidis* présent dans les narines et la peau humaine, peut être éradiquée par l'utilisation de mupirocine topique avant la chirurgie arthroplastique, ceci peut offrir un moyen de prévention des infections articulaires prothétiques (Salih *et al.*, 2018).

V.3.2. Plusbacine A₃

La plusbacine A₃ est un lipo-depsipeptide cyclique produit par *Pseudomonas* spp. PB-6250. Ce métabolite présente des activités antimicrobiennes puissantes contre les bactéries à Gram positif y compris SARM. La plusbacine A₃ inhibe la synthèse de la paroi cellulaire chez les bactéries à Gram positif en bloquant l'incorporation de N-acétyl glucosamine dans le peptidoglycane naissant. L'ajout de précurseurs de la membrane cellulaire antagonise cette activité, ce qui suggère que la plusbacine A₃ cible la biosynthèse du peptidoglycane (O'Connor *et al.*, 2017).

V.3.3. 4-hydroxy-2-heptylquinoline N-oxide (HQNO)

L'activité antistaphylococcique de *P. aeruginosa* a été décrite pour la première fois par Lightbown et Jackson (1956), qui a identifié le 4-hydroxy-2-heptylquinoline N-oxide (HQNO) en tant que composé majeur produit par *P. aeruginosa* inhibiteur des systèmes de cytochrome de certaines bactéries, y compris *S. aureus* (Lightbown et Jackson, 1956). Le même phénomène a été décrit à nouveau par Machan *et al.*, en 1991 en testant le surnageant de culture de cinquante isolats cliniques de *P. aeruginosa* sur 261 staphylocoques. La croissance de tous les staphylocoques étaient réduites par chacune des souches de *P. aeruginosa* sous l'effet du HQNO (Machan *et al.*, 1991).

V.3.4. Les phénazines

La pyocyanine, PCA et PCN ont des effets inhibiteurs contre les SARM et pourraient constituer un bon traitement alternatif pour contrôler les infections causées par ces derniers (Cardozo *et al.*, 2013). La pyocyanine bloque la respiration oxydative et inhibe la croissance de *S. aureus* (Biswas *et al.*, 2009; Noto *et al.*, 2017). C'est l'une des nombreuses phénazines pigmentées produites par *P. aeruginosa* et est un facteur de virulence important. De plus, la présence des organismes à Gram positif, y compris certains *Staphylococcus* spp., peut induire la production de pyocyanine chez *P. aeruginosa* (Whiley *et al.*, 2014).

En général, les bactéries à Gram positif, telles que les staphylocoques, semblent être plus sensibles à la toxicité de la phénazine que les microorganismes à Gram négatif. Dans un modèle d'invertébré pour l'infection à *P. aeruginosa*, la présence de membres du microbiome à Gram positif, de fragments de peptidoglycane ou de N-acétyl glucosamine activent la production de pyocyanine. De plus, l'augmentation de la production de

phénazines entraîne une réduction de la flore à Gram positif au site d'infection, ainsi qu'une virulence accrue (Grahl *et al.*, 2013).

V.3.5. LasA protéase

P. aeruginosa sécrète aussi une endopeptidase staphylolytique appelée LasA protéase ou staphylolysine qui dégrade la pentaglycine de la paroi cellulaire chez *S. aureus* provoquant la lyse cellulaire (Barequet *et al.*, 2009; Noto *et al.*, 2017). *P. aeruginosa* pourrait utiliser la protéase LasA pour concurrencer avec des staphylocoques mais aussi pour acquérir du fer (Mashburn *et al.*, 2005).

V.3.6. Acide cis-2-décénoïque

P. aeruginosa produit de l'acide cis-2-décénoïque, qui induit la dispersion dans les biofilms formés par une gamme de bactéries à Gram négatif et à Gram positif, y compris *S. aureus* (Davies et Marques, 2009).

V.3.7. Les rhamnolipides

Les rhamnolipides sont utilisés pour déloger les bactéries concurrentes du biofilm. Beaucoup de rhamnolipides sont produits en fonction de la souche de *Pseudomonas* et la source de carbone, et leur synthèse est régulée par le quorum-sensing (Soberón-Chávez *et al.*, 2005). La nature amphiphile des rhamnolipides leur permet d'intercaler dans les membranes cellulaires de différents microorganismes et former des complexes perméabilisant ainsi les membranes et provoquant une fuite de matériau intracellulaire (Sotirova *et al.*, 2008). Les bactéries à Gram positif semblent être plus sensibles à la perméabilisation par les rhamnolipides que les Gram négatif parce que la présence de lipopolysaccharides protège la membrane de cellule contre l'effet des surfactants (Soberón-Chávez *et al.*, 2005). Chez *S. aureus* et *S. epidermidis*, les rhamnolipides induit la dispersion du biofilm et inhibe son adhérence (Valle Gomes et Nitschke, 2012; Pihl *et al.*, 2013).

V.3.8. La Pyochéline

Dans une étude menée par Adler *et al.*, (2012), la Pyochéline peut inhiber particulièrement *S. aureus* et cette activité a été confirmée par une autre étude réalisée par Ong *et al.*, 2016 (Ong *et al.*, 2017).

V.3.9. *P. aeruginosa* induit une dispersion du biofilm de *S. epidermidis*

P. aeruginosa s'est avéré inhiber efficacement et perturber les biofilms établis par *S. epidermidis* et provoque le détachement sans tuer les cellules pendant la formation de

ces biofilms (Qin *et al.*, 2009; Pihl *et al.*, 2010). Après co-inoculation à proportions égales de *P. aeruginosa* et *S. epidermidis*, ces bactéries pourraient coexister jusqu'à 18 heures. Après cette période, les cellules de *S. epidermidis* dans le biofilm sont lysées par *P. aeruginosa*. Ces données suggèrent qu'il y a deux étapes dans les interactions entre *P. aeruginosa* et *S. epidermidis*, le premier comprend l'induction du détachement des cellules de *S. epidermidis* viables du biofilm, tandis que dans la deuxième étape c'est la lyse cellulaire et le détachement total (Pihl *et al.*, 2010). *P. aeruginosa* empêche la fixation initiale de certains *S. epidermidis*. En outre, l'exposition d'un biofilm à *S. epidermidis* formé sur un cathéter à un surnageant de *P. aeruginosa* cause également la dispersion de ce biofilm (Pihl *et al.*, 2013).

La figure 12 montre les facteurs extracellulaires produits par *P. aeruginosa* qui affectent la formation de biofilm, la respiration oxydative, la lyse cellulaire et la virulence de *S. aureus*. La lyse de *S. aureus* entraîne une augmentation du fer extracellulaire et le N-acétyl glucosamine (GlcNac), qui sont détectées par *P. aeruginosa*. En commun avec les AHL (N-acyl homoserine lactone), les PQS (*Pseudomonas* quinolone signal) régule la virulence, la production de rhamnolipides, le cis-2- acide décénoïque, la pyocyanine, LasA protéase et le 4-hydroxy-2-heptylquinoline N-oxide (HQNO).

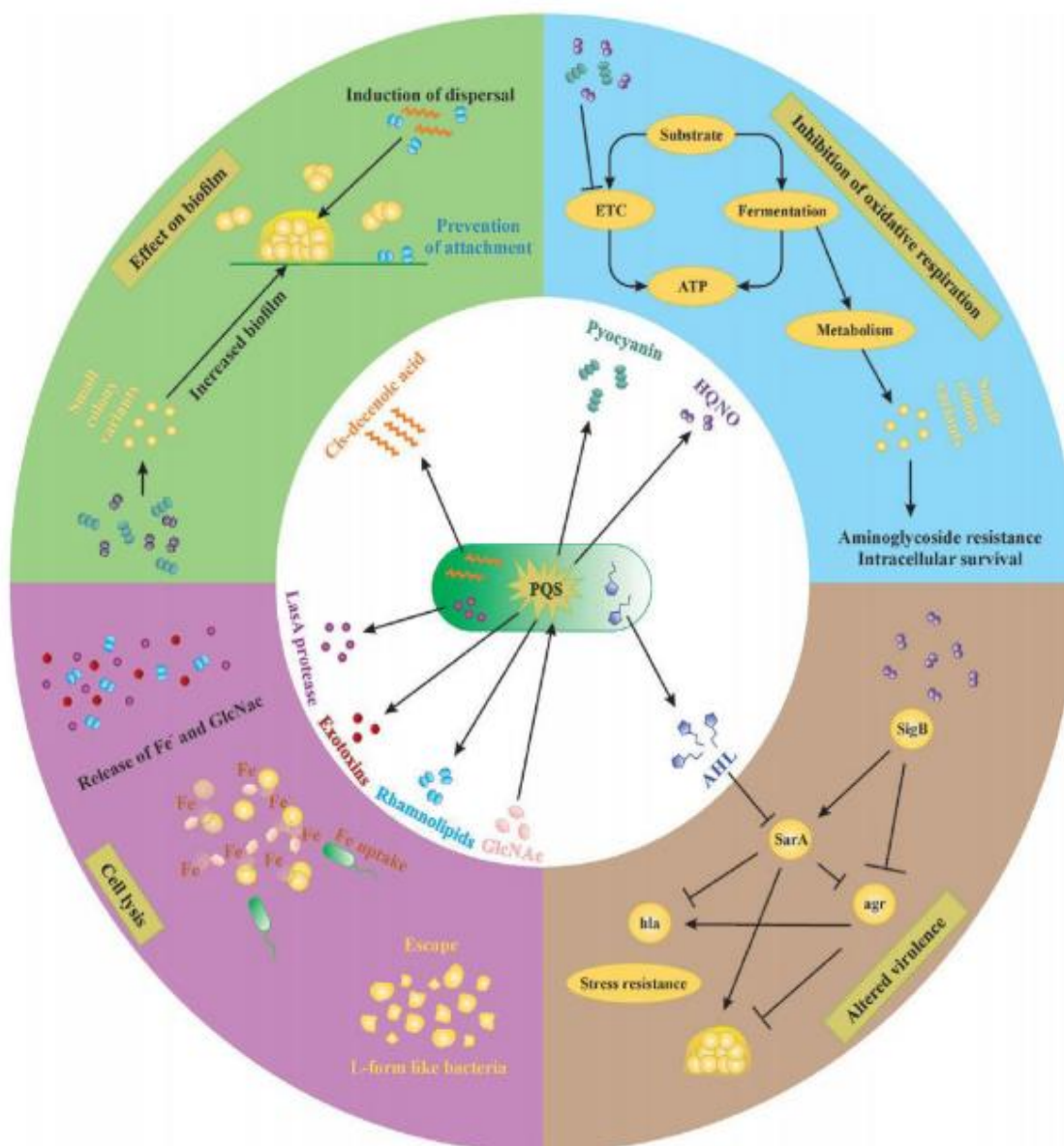


Figure 12. Les facteurs extracellulaires produits par *P. aeruginosa* affectant *S. aureus* (Hotterbeekx *et al.*, 2017).

V.4. Métabolites de plantes antistaphylococcique

V.4.1. Monoterpènes

Kifer *et al.*, (2016) ont montré que l'activité antimicrobienne des monoterpènes contre *S. aureus* a été comme suite ; CMI thymol <CMI menthol <CMI 1,8-cinéole. Trombeta *et al.*, (2005) ont proposé un mécanisme d'action antibactérien pour le thymol et le menthol. Ces composés lipophiles possèdent une solubilité dans l'eau décelable et pourraient migrer à travers le milieu extracellulaire aqueux et interagir avec les lipides membranaires, ceux qui entraîneraient des altérations de la perméabilité membranaire et

des fuites de matériaux intracellulaires. De plus, le transfert de monoterpène dans la bactérie et l'interaction avec les structures intracellulaires ne pouvaient être exclus. Compte tenu de la structure du 1,8-cinéole, Kifer *et al.*, (2016) ont supposé que cet éther monoterpène cyclique pourrait avoir un mécanisme d'action antibactérien similaire à celui proposé pour le thymol et le menthol (Kifer *et al.*, 2016).

V.4.2. Thymol et carvacrol

Le thymol (également appelé 2-isopropyl-5-méthylphénol), un composé phénolique présent dans les HE, est un monoterpène naturel et l'isomère de carvacrol du thym et d'autres types de plantes. Le thymol est moins soluble dans l'eau à pH neutre, mais il est également soluble dans certains solvants organiques et alcools. On a observé ses propriétés antioxydantes, antispasmodiques, antimicrobiennes et anti-inflammatoires. Il s'agit d'un composé dérivé du *p*-cymène et est également identifié pour ses effets antiseptiques et antimicrobiens. Certaines études ont rapporté l'utilisation de thymol pour la propriété anticancéreuse (Memar *et al.*, 2017).

Le carvacrol est un composant important des HE et a récemment attiré beaucoup d'attention en raison de ses propriétés biologiques, telles qu'un large spectre d'activité antimicrobienne. Parce que le carvacrol présente de fortes propriétés antioxydantes et des hydrophiles associées au groupe OH phénolique, de nombreuses études ont rapporté des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques, antiprotozoaires, anticarcinogènes, antidiociceptives, cardioprotectrices et propriétés neuroprotectrices (Memar *et al.*, 2017).

V.4.2.1. Activité antibiofilm de thymol et de carvacrol

Plusieurs études ont décrit que le thymol et le carvacrol agissent sur le biofilm préformé et interfèrent avec la formation de biofilm pendant la croissance planctonique (Hammer et Carson, 2011). Nostro *et al.*, (2016) ont rapporté que le carvacrol et le thymol ont atténué la formation de biofilms chez *S. aureus* et *S. epidermidis* sur des microplaques en polystyrène (Memar *et al.*, 2017).

V.4.2.2. Activité antibactérienne de thymol et de carvacrol

Trombetta *et al.*, (2005) rapportent l'efficacité antimicrobienne du thymol contre *S. aureus* et *E. coli*. Certains chercheurs ont émis l'hypothèse que le mécanisme antibactérien du thymol pourrait résulter, au moins en partie, d'une perturbation de la fraction lipidique

de la membrane plasmique bactérienne, entraînant des modifications de la perméabilité de la membrane et une fuite du contenu intracellulaire. Lambert *et al.*, (2005) a montré un effet antibactérien du thymol et du carvacrol sur *S. aureus* en raison d'une perturbation de l'intégrité de la membrane, qui affecte en outre l'homéostasie du pH et l'équilibre des ions inorganiques (Memar *et al.*, 2017).

V.4.3. Farnésol

Gomes *et al.*, (2009) ont montré que le farnésol a un effet inhibiteur significatif sur les cellules planctoniques de *S. epidermidis*. Dans les cellules de biofilm, l'effet du farnésol n'était pas aussi marqué et il semble être fortement dépendant de l'activité métabolique des cellules et de la quantité de matrice. Le farnésol pourrait agir sur les membranes cellulaires où les dommages causés pourraient constituer l'un des principaux modes d'action de cet alcool terpénique (Gomes *et al.*, 2009).

V.4.4. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques se sont révélés efficaces pour inhiber la croissance et la formation de biofilms par des bactéries pathogènes. Certains de ces composés, par exemple le diterpène totarol, l'acide tannique (tanin) et le flavonoïde tiliroside, exercent un effet modulateur sur la résistance aux antibiotiques chez *S. aureus* impliquant l'inhibition de la pompe d'efflux (Lopes *et al.*, 2017).

V.4.4.1. Flavonoïdes

Nishino *et al.*, (1987) ont montré que la plupart des flavonoïdes actifs ont été trouvés dans les flavones et les flavonols, dont les anneaux A/C prennent des structures planaires. Par conséquent, l'activité antibactérienne contre *S. epidermidis* semble être liée à la planarité moléculaire du composant cyclique A/C de la structure flavonoïde (Nishino *et al.*, 1987).

PARTIE PRATIQUE

Chapitre I.

Matériel et méthodes

Chapitre I. Matériel et méthodes

I.1. Isolats bactériens

Il s'agit d'une étude réalisée au laboratoire central du Centre Anti-Cancer de Batna. Soixante-six isolats des SCN ont été isolés entre 1^{er} janvier et 30 juin 2017 à partir de différents prélèvements (sondes urinaires, urines, hémocultures, pus, plaies, liquide pleural, LCR, Cathéter et Drain) provenant de divers services (Onco-Hématologie, Onco-Pédiatrie, Réanimation et Chirurgie Carcinologique) du Centre Anti-Cancer de Batna et de sujets non hospitalisés venus en consultation externe, les doublons ont été exclus.

I.1.1. Isolement et purification des SCN

L'isolement a été réalisé sur gélose Chapman et incubé à 37°C pendant 24 à 48 h. Afin de confirmer la pureté des isolats, nous avons effectué des repiquages successifs en utilisant un milieu liquide (bouillon nutritif) et un milieu gélosé sélectif de Chapman.

I.1.2. Identification des isolats des SCN

Tous les isolats ont été identifiés grâce aux méthodes bactériologiques classiques telles que la morphologie des colonies, la coloration de Gram, la production de catalase, le test de coagulase et par les Galeries API Staph (bioMérieux).

I.1.2.1. Examen macroscopique de colonies des SCN

Les isolats cliniques des SCN ont été ensemencés sur le milieu sélectif Chapman, sa teneur élevée en NaCl (7.5%) limite le développement de certains germes autres que *Staphylococcus*. Les SCN donnent des colonies de petites tailles sans ou avec fermentation du mannitol (Denis *et al.*, 2011).

I.1.2.2. Examen microscopique des SCN

Après une coloration de Gram, les staphylocoques apparaissent comme des cocci à Gram positif de 0.5 à 1 µm de diamètre. Ils peuvent être isolés, en diplocoques, en courtes chaînettes ou en amas, l'aspect en grappe de raisin (en amas) est le plus caractéristique. Sur les colorations directes des échantillons prélevés de l'homme, ces bactéries sont parfois difficilement différenciées des streptocoques et des microcoques et les cellules bactériennes sont à la fois à l'extérieur ou l'intérieur des polynucléaires (Brun *et al.*, 2007).

I.1.2.3. Test de coagulase libre

La coagulase est une protéine extracellulaire qui se lie à la prothrombine de l'hôte (Pellerin *et al.*, 2009) et forme un complexe appelé staphylothrombine. La thrombine ainsi activée transforme le fibrinogène en fibrine (Abalain-Colloc *et al.*, 2014).

La coagulase libre est présente chez *S. aureus*, mais peut aussi être produite par *S. intermedius* ou *S. hyicus*. Ce test consiste à mettre en évidence la coagulase libre dans le milieu extérieur. Dans un tube à hémolyse, on mélange 0.5 ml de plasma humain avec 0.5 ml d'une suspension d'une culture jeune de la souche à tester, puis le mélange est incubé 37°C pendant 24 h. Le mélange est observé d'heure en heure car la réaction positive de la coagulation peut être dégradée par une enzyme fibrinolysine (Garnier et Denis, 2007). Seulement les staphylocoques à coagulase négative ont été retenus pour des études complémentaires.

I.1.2.4. Test de la catalase

Ce test permet de différencier les staphylocoques des streptocoques. Il s'agit d'un caractère quasi constant chez les staphylocoques (Abalain-Colloc *et al.*, 2014). Ce test consiste à mettre quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène à 3% (10 volumes), sur des colonies d'une culture jeune de 18 à 24 h d'incubation. La formation immédiate de bulles d'oxygène témoigne la présence d'une catalase. Une fausse réaction positive peut survenir si les colonies sont prélevées sur gélose au sang en raison de l'activité catalasique érythrocytaire (Brun *et al.*, 2007; Engelkirk et Duben-Engelkirk, 2008).

I.1.2.5. Identification des SCN par Galerie API Staph

L'identification par Galerie API Staph (figure 13) repose sur l'utilisation d'une galerie biochimique qui comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés (annexe D). Un inoculum de la souche pure a été préparé dans une ampoule d'API Staph medium à partir d'une culture jeune de 18 à 24 h réalisée sur milieu GN ou Columbia avec une opacité égale à 0.5 McFarland, l'ensemencement a été effectué en remplissant les microtubes. L'huile de paraffine a été additionnée dans les microtubes des tests d'ADH et URE pour créer l'anaérobiose. Après une incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures, une goutte de chacun des réactifs NIT 1 et NIT 2, VP 1 et VP 2, ZYM A et ZYM B a été ajoutée aux tests NIT, VP, et PAL respectivement. La lecture a été faite à l'aide du tableau de lecture et l'identification a été effectuée à l'aide du logiciel d'identification **apiweb**TM.



Figure 13. Galerie biochimique API Staph.

I.1.3. Conservation des SCN

Les isolats identifiés des SCN ont été conservés dans les tubes de courte conservation et dans les géloses nutritives inclinées à +4°C, accompagnées de renseignements cliniques : sexe, l'âge du patient, l'hospitalisation (service) ou non (externe) et la nature du prélèvement (Delarras, 2007).

I.1.4. Sensibilité aux antibiotiques des isolats de SCN

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé Mueller Hinton comme l'a décrit Kirby-Bauer (1966).

Tous les isolats ont été testés pour leur sensibilité aux antibiotiques en utilisant les antibiotiques suivants: Pénicilline (10 UI), Céfoxitine (30 µg), Gentamicine (10 µg), Amikacine (30 µg), Kanamycine (30 µg), Erythromycine (15 µg), Tétracycline (30 µg), Ofloxacine (5 µg), Lévofoxacine (5 µg), Ciprofloxacine (5 µg), Clindamycine (2 µg), Chloramphénicol (30 µg), Rifampicine (5 µg), Triméthoprime-sulfaméthoxazole (1.25/23.75 µg), Acide fusidique (10 µg) et Pristinamycine (15 µg). Le disque de Céfoxitine est utilisé pour détecter les isolats résistants à la méthicilline.

Après une incubation de 24 h à 37°C, La lecture des résultats est faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibition. L'interprétation (Annexe II) a été faite selon les normes de Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2014).

I.1.5. Les concentrations minimales inhibitrices de vancomycine et oxacilline des SCN

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées pour l'oxacilline et la vancomycine par la méthode E-test sur gélose Mueller Hinton (MH). Les CMI ont été interprétées selon les recommandations du CLSI (2014). Pour l'oxacilline, La souche est dite sensible avec une CMI ≤ 0.25 µg/ml et dite résistante avec une CMI ≥ 0.5 µg/ml. Pour la vancomycine, elle est dite sensible avec une CMI ≤ 4 µg/ml, intermédiaire avec 8–16 µg/ml et résistante ≥ 32 µg/ml.

I.2. Formation du biofilm

I.2.1. Etude de la formation du biofilm par la méthode *in vitro* de coloration au cristal violet sur microplaques

La détermination quantitative de la formation de biofilm dans les microplaques a été évaluée comme l'a décrit Christensen *et al.* (1985) avec quelques modifications. Les microplaques utilisées sont en polystyrène comportant 96 puits sur lesquels les bactéries s'adhèrent et forment du biofilm.

Les bactéries ont été cultivées sur une GN pendant 18 à 24 h à 37°C, une colonie de chaque isolat a été mise en suspension dans 5 ml de bouillon trypticase soja (TSB) et incubée à 37°C pendant 24 h, puis chaque suspension jeune est diluée au 1/100^{ème} dans un TSB à 1% glucose, ensuite chaque puits de la microplaque a été rempli avec 200 µl de cette dilution (trois cultures indépendantes pour chaque espèce à l'étude). Un bouillon stérile de TSB à 1% Glu a été utilisé comme témoin. *S. aureus* ATCC 25923 est la souche de référence productrice de biofilm utilisé comme contrôle de la formation de biofilm. Ces microplaques ont été recouvertes, scellées stérilement et incubées à 37°C pendant 24 h. Après l'incubation, le contenu des puits a été versé et lavé trois fois avec de l'eau physiologique stérile pour éliminer les cellules non adhérentes puis séché en position inversée dans une étuve à une température de 60°C pendant 30 min, les cellules adhérentes au support de polystyrène dans chacun des puits sont colorées avec 200 µL de cristal violet à 1 % (p: v). Après 30 min d'incubation, l'excès du cristal violet a été éliminé par 5 lavages successifs avec de l'eau distillée stérile et les plaques ont été séchées à la température ambiante. Le colorant incorporé par les cellules ayant adhérentes ou ayant formées un biofilm a été solubilisé avec 200 µL d'éthanol à 95 % (v/v).

La quantité de cristal violet solubilisé a été mesurée par la lecture de la densité optique (DO) à 550 nm dans un lecteur ELISA Bio-Rad (PR 3100 TSC) (Rodrigues *et al.*, 2010).

L'interprétation des résultats a été effectuée selon les critères de Stepanovic *et al.*, (2007). La densité optique des isolats (DO_s) a été obtenue par la moyenne arithmétique de trois puits et cette valeur a été comparée avec l'absorbance moyenne de contrôle négatif (DO_{cn}), les isolats ont été classés comme suits : pas de production de biofilm ($DO_s \leq DO_{cn}$), production faible de biofilm ($DO_{cn} < DO_s \leq 2 \cdot DO_{cn}$), production modérée de biofilm ($2 \cdot DO_{cn} < DO_s \leq 4 \cdot DO_{cn}$) et forte production de biofilm ($4 \cdot DO_{cn} < DO_s$).

I.2.2. Etude de la formation du biofilm par la méthode *in vitro* de Rouge Congo Agar

La détermination qualitative de la formation de biofilm a été réalisée par culture des isolats de SCN dans le milieu Rouge Congo Agar (RCA) comme proposé par Freeman *et al.*, (1989).

Le milieu RCA est composé de : 37 g/l de Bouillon Cœur Cerveille (BHIB), 50 g/l de saccharose, 15 g/l d'agar agar et 0.8 g/l du colorant rouge congo. Le rouge congo préparé sous forme de solution aqueuse concentrée a été autoclavé à 121°C pendant 15 min, séparément des autres constituants du milieu et ensuite ajouté (55°C). Le milieu ainsi préparé est ensuite ensemencé par des isolats de SCN et incubé à 37° pendant 24 h à 48 h. Les bactéries formatrices de biofilm apparaissent noires avec un cristallin de consistance sèche où le colorant rouge congo interagit directement avec certains polysaccharides bactériens formant un slime contrairement aux colonies non formatrices qui restent rouge.

I.3. Identification génotypique pour la détection des gènes *mecA* et *icaAD*

Neuf isolats de SCN résistants à la méthicilline (numérotés de 1 à 9) et un isolat sensible à la méthicilline (n°10) ont été sélectionnés pour la recherche du gène *mecA*. De même, neuf isolats formateurs de biofilm (numérotés de 11 à 19) et un isolat non formateur de biofilm (n°20) ont été sélectionnés à partir des résultats de la méthode RCA pour la recherche du gène *icaAD*. L'amplification du gène *mecA* et *icaAD* a été effectuée par la réaction en chaîne par polymérase (PCR) comme l'a décrit Poulsen *et al.*, (2003) et Yazdani *et al.*, (2004) en utilisant les amorces spécifiques suivantes:

mecA: 5' GGGATCATAGCGTCATTATTC 3' F

et 5' AACGATTGTGACACGATAGCC 3' R (taille 527 pb);

icaAD: 5' TATTCAATTTACAGTCGCAC3' F

et 5' GATTCTCTCCCTCTCTGCCA3' R (taille 407pb).

I.3.1. Extraction d'ADN

L'ADN a été extrait selon le protocole d'utilisation de commercial GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit, Vivantis (Allemagne) en suivant la procédure d'extraction décrite par le fabricant (Annexe III).

I.3.2. Quantification de l'ADN

La quantité et la qualité des extraits d'ADN est contrôlée par spectrophotomètre NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Etats-Unis) et stockées à -20°C pour des prochaines utilisations.

I.3.3. Composition et concentration du mélange réactionnel dans les microtubes

Un volume de 4 µl d'ADN génomique extrait par un choc thermique est amplifié dans un volume de 25 µl du mélange réactionnel contenant les amorces, la *Taq* polymérase, les dNTP et le tampon de la *Taq* polymérase. Le tableau 12 représente la composition et la concentration du mélange réactionnel dans les microtubes.

Tableau 12. Composition et concentration du mélange réactionnel dans les microtubes.

Réactifs	Concentrations initiales	Concentrations finales	Volume à prélever
Eau ultra-pure			11.5 µl
Tampon de <i>Taq</i> Promega	5X	1X	5 µl
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5 µl
dNTP _s	25 mM	0.2 mM	0.2 µl
Amorce 27F	10 µM	0.5 µM	1.25 µl
Amorce 1492R	10 µM	0.5 µM	1.25 µl
<i>Taq</i> polymerase Promega	5U	1U	0.2 µl
ADN génomique			4 µl
Volume final			25µl

I.3.4. Conditions de température de PCR

L'amplification d'ADN a été faite dans un Thermocycleur de Mycycler (Biorad, USA) selon les étapes suivantes: une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, ensuite 35 cycles ont été effectués, chaque cycle est constitué de trois étapes: une dénaturation à 95°C pendant 30 sec, une hybridation des amorces à 55°C pour l'amplification du gène *mecA* et 58°C pour *icaAD* pendant 30 sec, puis une élongation à 72°C pendant 45 sec. Enfin, une élongation finale à 72°C pendant 7 min.

I.3.5. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification ont été révélés par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5 % par dépôt de 10 µl de produit de PCR suivie d'une coloration dans un bain de bromure d'éthidium (0.5 µg/ml). La migration a été effectuée à 100 volts pendant 20 min. Après migration, l'ADN a été visualisé et photographié sous UV.

I.4. Séquençage des gènes ARNr 16S

Le séquençage de l'ADNr 16S purifié de la souche n°3 (*mecA+*) et de la souche n°13 (*icaAD+*) a été réalisé comme l'a décrit Sanger *et al.*, (1977) en utilisant le kit BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) et deux amorces universelles 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') et 27F (5'ACTCCTACGGGAGGCAGCA3').

Les séquences 16S obtenues sont alors comparées avec celles de la banque de données GeneBank en utilisant le programme Blast (Altschul *et al.*, 1990).

La PCR et le séquençage sont effectués au laboratoire de DIAG-GENE (France).

I.5. Etude de *Pseudomonas* spp.

Le choix du *Pseudomonas* est basé sur: la diversité génétique, la versatilité métabolique et aussi facile à cultiver.

I.5.1. Isolement des *Pseudomonas*

Plusieurs prélèvements ont été effectués dans différents points des champs de vigne de deux régions de la wilaya de Mostaganem, l'un à Oued Elkhire et l'autre à Sidi Lakhdar au mois de Février 2018. Les échantillons sont des racines de graminées sauvages (orge des rats = *Hordeum murinum*). Quelques plantes ont été prélevées à l'aide d'une pioche dans des conditions aseptiques. Les plantes avec leurs racines sont introduites dans des sachets en plastique étiquetés et transportés rapidement au laboratoire.

Une quantité de 10 g de chaque échantillon a été mise dans un flacon contenant 90 ml d'eau physiologique stérile (0.9% de NaCl). Les flacons ont été alors mis en agitation, puis une série de dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-6}) a été effectuée à partir de chaque échantillon. 100 µl de surnageant de chaque dilution ont été déposés et étalés avec un étaloir stérile dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose King B, ces dernières ont été incubées à 30°C pendant 48h (Mezaache-Aichour *et al.*, 2012).

I.5.2. Choix et purification des *Pseudomonas* fluorescents

Dans notre étude, seules les colonies donnant un pigment jaune-vert fluorescent sous la lumière UV sur le milieu King B (présence de pyoverdine) ont été sélectionnées. Les bactéries choisies ont été numérotées puis purifiées par la méthode des stries. L'opération de purification a été renouvelée à deux reprises en prenant à chaque fois une colonie bien isolée sur gélose. Ceci conduit à l'obtention d'une culture pure vérifiée par observation macroscopique et microscopique (Mezaache-Aichour *et al.*, 2012).

I.5.3. Orientation vers l'identification des *Pseudomonas*

I.5.3.1. Etude morphologique

Une étude macroscopique a été faite pour les colonies sur milieu King B et a permis de révéler la pigmentation et l'aspect de ces dernières. D'une autre part une étude microscopique a été faite en deux étapes : une observation à l'état frais des isolats de *Pseudomonas* entre lame et lamelle afin d'observer leur état vital et leur mobilité fréquente ; et une observation après coloration de Gram qui a permis de connaître le type de Gram ainsi que la morphologie des cellules bactériennes (Denis *et al.*, 2011).

I.5.3.2. Recherche de cytochrome oxydase

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes.

Sur une lame porte objet un disque "Ox" imprégné de N,N,N,N-tetraméthyl-1,4-phénylène diamine est déposé puis imbibé avec une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile. Une colonie à étudier est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile et mise sur le disque. Une coloration violette foncée apparaît immédiatement sur le disque ou en quelques secondes puis vire au noir: test oxydase positive (Delarras, 2007).

I.5.3.3. Test de catalase (voir page 65).

I.5.3.4. Identification de *Pseudomonas* par Galerie API NE

La galerie API NE (figure 14) est composée de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés, le test oxydase constitue le 21^{ème} test d'identification à effectuer. Deux milieux de suspension sont utilisés: API NaCl 0.85 % Medium en ampoule de 2 ml et API AUX Medium. A partir d'une culture pure de 18 à 24 h d'un bacille à Gram négatif

(non entérobactérie et non fastidieux), une suspension bactérienne a été préparée avec une turbidité égale à 0.5 McFarland dans une ampoule d'API NaCl 0.85% Medium ou dans un tube contenant 2 ml de solution saline à 0.85% sans additif, puis les microtubes ont été remplis du test NO₃ à ONPG. Ensuite, un volume de 200 µl de la même suspension préparée a été transféré dans une ampoule d'API AUX Medium en homogénéisant avec la pipette Pasteur. Les microtubes et cupules ont été remplis du test GLU à PAC. Enfin, les cupules des trois soulignés (GLU, ADH, URE) ont été remplies par l'huile de paraffine. Les microplaques ont été incubées à 28 ± 2°C pendant 24h. Après incubation, la lecture de la galerie est faite en se référant au tableau de lecture (annexe IV). Les résultats de toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG) sont notés sur la fiche de résultats.

- **Test NO₃** : Une goutte de chaque réactif (NIT1 et NIT2) est ajoutée dans la cupule NO₃. Une couleur rouge indique une réaction positive. Une réaction négative peut être due à une présence de nitrate. Pour cela, 2-3 mg de poudre de Zn sont ajoutés dans la cupule NO₃. Une cupule restée incolore indique une réaction positive. Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative.
- **Test TRP**: Une goutte de réactif de kovacs est ajoutée dans la cupule TRP. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.
- **Tests d'assimilation**: La croissance bactérienne est observée, une cupule trouble indique une réaction positive (Delarras, 2007).



Figure 14. Galerie biochimique API NE.

I.5.4. Conservation des *Pseudomonas* fluorescents

Après purification et identification, les isolats ont été ensemencés sur gélose King B inclinée en tubes, ensuite incubés à 30°C pendant 48h. Les cultures en tubes ont été conservées à 4°C jusqu'à l'utilisation.

I.5.5. Test d'antagonisme *in vitro* des *Pseudomonas* vis-à-vis les SCN

Le test d'antagonisme a été réalisé par deux méthodes :

I.5.5.1. Méthode directe

Cette méthode de strie verticale (croisement) ou (confrontation bactérie ou champignon / bactérie) a été décrite par Selvin *et al.*, (2009).

Elle consiste à ensemencer l'isolat antagoniste de *Pseudomonas* en un seul trait à la surface du milieu solide et en bordure de la boîte de Pétri contenant la gélose MH. Après incubation à 30°C pendant 48 h, les SCN sont ensemencés perpendiculairement à *Pseudomonas*. La lecture des résultats se fait après 24 h d'incubation à 37°C en mesurant la distance d'inhibition (absence de croissance) entre les bordures de l'isolat de SCN et le *Pseudomonas* à l'aide d'un pied à coulisse.

I.5.5.2. Méthode indirecte (Effet du surnageant)

Cette méthode a été décrite par Veerendrakumar *et al.*, (2015). Elle repose sur la diffusion de l'agent inhibiteur dans des puits réalisés dans une gélose MH contenant une souche indicatrice. Le surnageant de culture des *Pseudomonas*, a été obtenu après centrifugation d'une culture dans le milieu MHB à 5000 g pendant 20 min pour faire sédimenté les cellules bactériennes et toutes les particules présentes, le surnageant a été filtré à travers un filtre millipore de 0.22 µm.

A partir d'une culture pure de 24 h des isolats de SCN dont la densité optique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à $\lambda=625$ nm (située entre 0.08 et 0.1 valeur équivalente au standard 0.5 McFarland), 0.1 ml a été ensemencé dans la masse d'une gélose MH. Après solidification du milieu, des puits de 4 mm de diamètre ont été réalisés à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, ensuite, chaque puits a été rempli par 50 µl de surnageant filtré.

Les boîtes ont été mises à 4°C pendant 2 h, afin que les métabolites puissent diffuser, puis incubées à 37°C pendant 24 h. La lecture a été effectuée après 24 h d'incubation. L'inhibition a été révélée par la présence des zones d'inhibitions (halo clair) autour des puits. Trois répétitions ont été faites pour chaque isolat de SCN.

I.5.6. Production des métabolites extracellulaires

L'extraction des métabolites extracellulaires a été faite selon la méthode décrite par Bonsall *et al.*, (1997). L'isolat performant de *P. fluorescens* PK a été ensemencé dans des boîtes de Pétri contenant le milieu King B solide qui sont incubées à 30°C pendant 24 h. Ensuite à partir de ces boîtes, 20 flacons de 200 ml contenant 50 ml du milieu Nutrient

Broth Yeast Extract (NBY) liquide ont été inoculés puis incubés à 30°C pendant 72 h, sous agitation continue de 180 tr/min.

Après incubation, les cultures ont été centrifugées et le surnageant a été acidifié à pH 2 par du HCl concentré afin d'éliminer les protéines (Delaney *et al.*, 2001).

I.5.7. Extraction des métabolites extracellulaires

Les métabolites extracellulaires ont été extraits du surnageant par l'acétate d'éthyle en raison de 1:1 (v/v). Les deux phases ont été introduites dans une ampoule à décanter. Après avoir bien fermé l'ampoule, une agitation a été faite énergiquement en prenant soin de dégazer régulièrement, ensuite, l'ampoule est reposée sur son support pour laisser décantée (figure 15). Une fois la décantation terminée, le robinet a été ouvert pour récupérer la phase aqueuse, puis la phase organique. La phase aqueuse est réintroduite à l'ampoule pour une deuxième extraction avec 1 (v/v) de l'acétate d'éthyle, une agitation a été faite puis une décantation. Les phases organiques ont été réunies puis filtrées sur un filtre de 0.22 µm pour éliminer les cellules bactériennes (Mezaache-Aichour *et al.*, 2012).

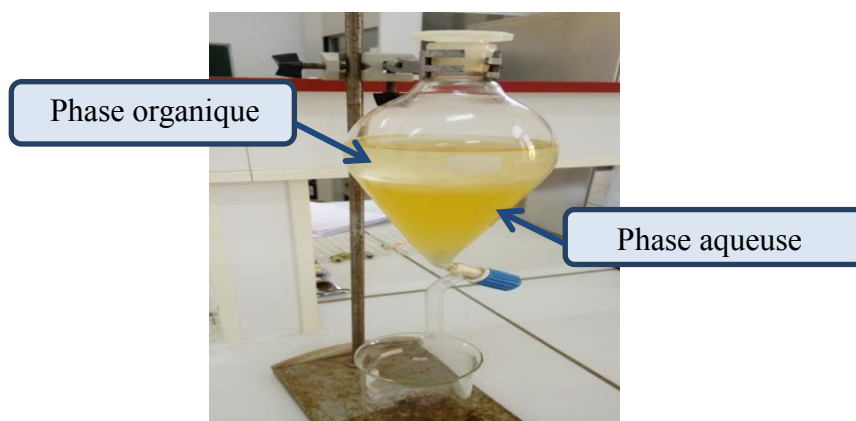


Figure 15. Séparation de la phase organique d'acétate d'éthyle.

I.5.8. Séchage de la phase organique

Cette opération consiste à éliminer les traces d'eau résiduelle, en introduisant un agent de séchage solide qui est le sulfate d'ammonium anhydre, une quantité a été ajoutée à l'aide d'une spatule avec une agitation permanente, après observation que la poudre s'agglomère au fond de l'erlenmeyer, on ajoute jusqu'à l'observation du solide libre non aggloméré. Ce dernier a été éliminé par filtration (Mezaache-Aichour *et al.*, 2012).

I.5.9. Séchage sous pression réduite

La phase organique a été ensuite concentrée à sec sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif à 55°C pour l'évaporation de l'acétate d'éthyle. L'acétate d'éthyle

condensé par un réfrigérant a été récupéré dans une ampoule (Mezaache-Aichour *et al.*, 2012).

I.5.10. Caractérisation et identification des métabolites extracellulaires de *P. fluorescens* PK

I.5.10.1. Analyses par spectrophotomètre UV-visible

L'extrait sec de métabolites extracellulaires a été mis dans une solution de méthanol puis mis dans une cuve pour une analyse par spectrophotomètre. L'échantillon est soumis à un balayage en spectrophotométrie entre 200 et 600 nm dans le but de caractériser le spectre d'absorption de ce métabolite.

I.5.10.2. Identification par infrarouge à transformation de fourier (FTIR)

Un échantillon de l'extrait a été analysé par infrarouge à transformation de fourier (FTIR) dans le but de caractériser partiellement la structure de l'extrait d'acétate d'éthyle (Dahah *et al.*, 2016).

I.6. Les plantes étudiées

Les plantes étudiées ont été choisies essentiellement sur la base de leur intérêt, leur disponibilité dans la région des Aures par rapport aux autres régions (climat et altitude), pas ou peu d'études sur l'activité antistaphylococcique et antibiofilm des plantes choisies sur les SCN et d'après une profonde recherche bibliographique.

I.6.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de feuilles de *S. officinalis* L. et *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* (Boiss. et Reut.) Batt. de la famille des Lamiacées et aussi *J. thurifera* L. et *J. oxycedrus* L. de la famille des Cupressacées. L'identification botanique des quatre plantes a été réalisée par le Pr. OUDJEHIH B., laboratoire de botanique, département d'agronomie, Université de Batna 1, d'après Quezel et Santa, (1963).

I.6.1.1. *J. oxycedrus* L. et *J. thurifera* L.

Les feuilles de *J. oxycedrus* L. et de *J. thurifera* L. ont été récoltées de la région d'El-Mahmel, Batna au mois d'octobre 2016 (figure 16 et 17).



Figure 16. Échantillon de *J. oxycedrus* L.



Figure 17. Échantillon de *J. thurifera* L.

I.6.1.2. *S. officinalis* L.

Les feuilles de *S. officinalis* L. ont été récoltées de la région de Tazoult, Batna au mois d'Avril 2017 (figure 18).



Figure 18. Échantillon de *S. officinalis* L.

I.6.1.3. *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* (Boiss. et Reut.) Batt.

Les feuilles de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* ont été obtenues de la région d'El-Madher, Batna au mois d'Avril 2017 (figure 19).



Figure 19. Échantillon de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* (Boiss. et Reut.) Batt.

Les feuilles des plantes ont été lavées, séchées à l'ombre puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique, les poudres obtenues sont conservées à l'abri de la lumière et l'humidité (Seidel, 2006).

I.6.2. Détermination de la teneur en eau

Afin de déterminer la teneur en eau (taux d'humidité) de quatre plantes comme décrite par Bourkhiss *et al.*, (2009), une quantité de feuilles fraîches de masse $M_f = 10$ g a été séchée dans une étuve de type Memmert à 105°C pendant 24 h jusqu'à l'obtention d'un

poids constant. La masse des feuilles séchées (M_s) a été déterminée à l'aide d'une balance de précision et la teneur en eau est donnée par la formule ci-dessous :

$$T_{\text{Eau}} = [(M_f - M_s) / M_f] \times 100.$$

I.6.3. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles (HE) décrite par (Clevenger, 1928) a été réalisée par hydrodistillation de quatre plantes dans un appareil de type Clevenger. Au cours de chaque essai, 100 g de matière première ont été traités. La distillation dure environ 180 min après l'apparition de la première goutte du distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur. Les HE récupérées ont été traitées avec quelques cristaux de sulfate de magnésium anhydre puis stockées à +4°C à l'obscurité. Trois distillations ont été réalisées pour chaque plante.

I.6.4. Détermination du rendement des huiles essentielles

Le rendement de l'HE décrit par Bourkhiss *et al.*, (2009), exprimé en g du distillat par 100 g de matière sèche, est exprimé par la relation suivante :

$$R_{\text{HE}} = [(M / M_s) \times 100] \pm [(\Delta M / M_s) \times 100]$$

R_{HE} : rendement en HE

M : masse de l'HE obtenue (g)

ΔM : erreur sur la lecture

M_s : masse végétale sèche (g).

I.6.5. Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG-SM)

Les analyses par (CG-SM) ont été effectuées avec un chromatographe en phase gazeuse Agilent 7890B (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) équipé d'un Agilent HP-5MS (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) colonne capillaire (30 m \times 0.25 mm; épaisseur du revêtement 0.25 μm) et un détecteur de masse quadripôle unique Agilent 5977B (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, ETATS-UNIS). Les conditions analytiques sont les suivantes: températures de l'injecteur et de la ligne de transfert 220 et 240°C, respectivement; température du four programmée de 60 à 240°C à 3 °C/min; hélium gaz vecteur à 1 ml/min; injection de 1 μl (solution à 5% de *n*-hexane de qualité HPLC); rapport de partage 1:25. Les paramètres d'acquisition sont les suivants: balayage complet; plage de numérisation: 30–300 m/z; temps de scan: 1.0 sec.

L'identification des constituants a été basée sur une comparaison des temps de rétention avec ceux des échantillons authentiques, comparer leurs indices de rétention linéaire par rapport à la série des n-hydrocarbures. La correspondance par ordinateur a également été utilisée contre le commerce (NIST 14 et ADAMS) et une bibliothèque de spectres de masse développée en laboratoire constituée de substances pures et de composants d'huiles connues et de données de la littérature de spectroscopie de masse (Stenhagen *et al.*, 1974; Masada, 1976; Swigar et Silverstein, 1981; Jennings et Shibamoto, 1982; Davies, 1990; Adams, 1995).

1.6.6. Extraction méthanolique des plantes

Une quantité de 200 g de matériel végétal séché de chaque plante a été extraite avec 2000 ml de méthanol maintenu sur un agitateur rotatif pendant 24 h. Ensuite, les mélanges ont été filtrés avec un papier Whatman n°1 et centrifugés à 5000 g pendant 15 min. Les surnageants ont été récupérés puis évaporés avec un rotavapeur. Les extraits obtenus ont été stockés à +4°C dans l'obscurité pour des études ultérieures (Parekh *et al.*, 2005).

1.6.7. Détermination du rendement des extraits méthanoliques des plantes

Le rendement décrit par Nawaz *et al.*, (2013) désigne la masse de l'extrait méthanolique (EM) déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction.

Le pourcentage de rendement de l'EM a été calculé comme suit:

$$\text{Rendement d'extrait (\%)} = (P_r \div P_e) \times 100.$$

P_r : le poids du résidu (g).

P_e : le poids de l'échantillon (g).

1.6.8. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes des extraits méthanoliques

1.6.8.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits de feuilles de quatre plantes étudiées, est effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Boizot et Charpentier, 2006), ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé. 1000 µl de réactif de Folin-Ciocalteu, (10 fois dilué) sont

ajoutés à 200 µl de chaque extrait de plante. Après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (à 7.5 %) sont additionnés. Après 2 h d'incubation à la température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc sans extrait. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à concentrations finales allant de (0-160 µg/ml). La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique et elle est exprimée en (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g d'extrait).

1.6.8.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (Ribéreau Gayon *et al.*, 1972).

Les flavonoïdes contenus dans les extraits des plantes ont été estimés par la méthode de de chlorure d'aluminium (AlCl₃) avec une légère modification (Gedikoglu *et al.*, 2019), 1 ml d'une solution de AlCl₃ (2% dans le méthanol) est rajouté à 1 ml de l'extrait de chaque plante (solution préparée dans le méthanol). L'ensemble est incubé à l'ombre et à la température ambiante pendant 10 min, l'absorbance est lue à 430 nm contre un blanc sans extrait. Une gamme d'étalonnage est établie séparément avec la quercétine (0-30 µg/ml) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans chaque extrait. La teneur en flavonoïde est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g d'extrait).

1.6.9. Analyses des extraits méthanoliques par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

Les analyses des extraits méthanoliques par HPLC ont été effectuées avec un appareil de type Shimadzu Prominence-i (LC-2030C 3D), équipé par un détecteur UV-Visible et une colonne RP-Amide 25 cm x 4.6 mm, 5 µm (Supelco). La phase mobile est composée d'une eau + acide acétique à pH=3 (solvant A) et le méthanol + acide acétique à pH=3 (solvant B). Le débit était de : 0.8 ml/min. La détection de l'UV a été réalisée à 280

nm et les composés phénoliques ont été identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des composés standards.

I.7. Effet antistaphylococciques des substances extraites

I.7.1. Etude de l'activité antibactérienne par la méthode des disques

Afin de déterminer l'activité antibactérienne des HE, des EM de plantes et de l'extrait de *P. fluorescens* PK, la technique des disques de diffusion décrite par Hazalin *et al.*, (2009) a été utilisée. Des cultures pures de 24 h des SCN ont été mises en suspension à 0.5 McFarland puisensemencées par écouvillonnage sur la gélose MH. Les disques stériles (6 mm de diamètre) ont été déposés à l'aide d'une pince stérile et imprégnés avec 10 µl de la solution de chaque substance extraite. Les solutions testées sont les HE pures et les solutions des EM préparés dans du méthanol à 200 mg/ml pour le thym et la sauge et à 500 mg/ml pour les deux espèces de *Juniperus*. Deux solutions de 250 et 500 mg/ml de l'extrait de *P. fluorescens* PK ont été préparées dans du méthanol. Les HE et les EM ont été testés sur les 66 isolats de SCN tandis que l'extrait de *P. fluorescens* PK a été testé sur 20 isolats seulement.

Le méthanol et la vancomycine (30 µg/ml) ont été utilisés comme contrôle négatif et positif respectivement. Ensuite, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 h. L'activité antibactérienne a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (mm) autour du disque (Sahgal *et al.*, 2009).

I.7.2. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

La détermination des CMI des HE et des EM de plantes et de l'extrait d'acétate d'éthyle de *P. fluorescens* PK, vis-à-vis des SCN a été réalisée selon la technique de dilution en milieu liquide décrite par Bazargani et Rohloff (2016) avec quelques modifications. Les isolats des SCN ont étéensemencés sur une gélose MH et incubées à 37°C pendant 12 h. Après incubation, 5 à 7 colonies isolées ont été inoculées dans des tubes contenant 5 ml de MHB et incubées à 37°C pendant 8 à 12 h pour assurer que les isolats étaient dans la phase exponentielle. Chaque suspension bactérienne a été diluée 1:100 dans le MHB. Les HE et les EM de plantes ont été solubilisés dans le MHB+ Tween 80 à 0.5% et le MHB+DMSO à 10% successivement pour obtenir des solutions à des concentrations de 400 mg/ml pour *S. officinalis* et 200 mg/ml pour *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* et 1000 mg/ml pour l'extrait d'acétate d'éthyle de *P. fluorescens* PK. Pour chaque puits de microplaque, 100 µl de MHB ont été ajoutés, ensuite, 100 µl de chaque

concentration ont été placés séparément dans le premier puits de microplaque et dilués dans du MHB stérile. Finalement, 100 µl des isolats des SCN dilués ont été ajoutés pour obtenir une gamme de concentration finale allant de 100-0.39 mg/ml et 50-0.195 mg/ml de *S. officinalis* et de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* respectivement et de 250 et 1.95 mg/ml de l'extrait d'acétate d'éthyle de *P. fluorescens* PK. 100 µl de l'EM + DMSO à 10 % avec 100 µl de MHB et 100 µl de l'HE + Tween 80 à 0.5% avec 100 µl de MHB ont été utilisés comme contrôles négatifs. Les plaques ont été préparées en trois répétitions.

Après incubation de 18 à 24h à 37°C, les CMI des HE, des EM de plantes et de l'extrait d'acétate d'éthyle de *P. fluorescens* PK ont été déterminées macroscopiquement via l'observation de turbidité, la CMI correspond à la faible concentration de chaque extrait où aucune croissance de souche testée n'est visible à l'œil nu après 24h d'incubation (Nostro *et al.*, 2016).

I.7.3. Détermination des Concentrations Minimales Bactéricides (CMB)

Les concentrations minimales bactéricides (CMB) ont été déterminées en ensemencant 20 µl de toutes les CMI sur gélose MH. La CMB a été définie comme la concentration de l'HE ou l'extrait la plus faible qui a tué 99.9% de l'inoculum final après 24 h d'incubation (Marino *et al.*, 2010).

I.7.4. Activité antibiofilm des substances extraites

Les HE, les EM de plantes et d'acétate d'éthyle de *P. fluorescens* PK à des concentrations qui correspondent aux CMI ont été évalués pour leur potentiel d'inhibition vis-à-vis des attachements cellulaires comme décrite Bazargani et Rohloff, (2016) avec quelques modifications. 100 µl de chaque EM de plantes et de l'extrait acétate d'éthyle de *P. fluorescens* PK solubilisé dans le TSB à 1% Glu+DMSO à 10% et 100 µl de chaque HE solubilisée dans le TSB à 1 % Glu+ tween 80 à 0.5% ont été ajoutés à chaque puits d'une microplaque à 96 puits à des concentrations qui correspondent aux (CMI×2). Le contrôle négatif contient 100 µl de TSB à 1% Glu. Enfin, 100 µl de chaque culture bactérienne des SCN (10^6 CFU/ml) ont été introduits dans chaque puits (le volume final était de 200 µl dans chaque puits). 200 µl de TSB à 1 % Glu + DMSO à 10% ont été ajoutés dans un puits sans culture bactérienne, 200 µl de TSB à 1% Glu + tween 80 à 0.5 % ont été ajoutés dans un autre. Les puits du contrôle à blanc sont remplis de l'extrait testé. Les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 24 h. Après incubation, le milieu a été aspiré, les microplaques ont été rincées trois fois avec un tampon phosphate salin (PBS), puis fixées par séchage à 60°C pendant 30 min, 200 ml de colorant cristal violet à 1% ont été ajoutés

aux puits pendant 30 min. Le contenu des puits a ensuite été aspiré et après rinçage à l'eau distillée, 200 ml d'éthanol 95 % (v/v) ont été ajoutés aux puits pour une analyse spectrophotométrique (DO 550 nm) par la mesure colorimétrique de l'incorporation du cristal violet par les cellules sessiles (Djordjevic *et al.*, 2002). L'absorbance moyenne des échantillons a été déterminée, l'absorbance dans le puits à blanc a été soustraite de l'absorbance moyenne de chaque échantillon ($DO_{\text{expérimental}}$) et le pourcentage d'inhibition de la formation du biofilm a été déterminé selon la formule suivante:

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = (DO_{\text{Contrôle Négatif}} - DO_{\text{expérimental}}) / DO_{\text{Contrôle Négatif}} \times 100.$$

I.8. Etude statistique

Le logiciel Whonet 5.6 a été utilisé pour l'étude de l'antibiogramme.

Les données expérimentales du dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes obtenues ont été analysées par Graph pad prism 7.

Le logiciel SPSS version 22 a été utilisé pour l'étude statistique, le test d'ANOVA à un facteur a été réalisé pour étudier l'effet de l'activité antibactérienne par la méthode de disque, les CMI, les CMB et l'activité antibiofilm des HE et des EM des plantes sur les SCN, $p \leq 0.05$ est considéré significatif, tous les tests réalisés ont été répétés trois fois.

Chapitre II.

Résultats et discussion

Chapitre II. Résultats et discussion

II.1. Etude bactériologique des SCN

II.1.1. Examen macroscopique des SCN

Sur le milieu de culture Chapman (figure 20), les colonies présentent un aspect macroscopique caractéristique du genre *Staphylococcus*. Les colonies sont de petite taille et la majorité ne fermente pas le mannitol (*S. epidermidis* et *S. haemolyticus*). Cependant, certains isolats ont la capacité de fermenter le mannitol, tout comme, *S. xylosum*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*. Quelques isolats de *S. epidermidis* ont donné une teinte rose à orange ce qui indique que ces isolats sont aussi mannitol positif (Denis *et al.*, 2011).

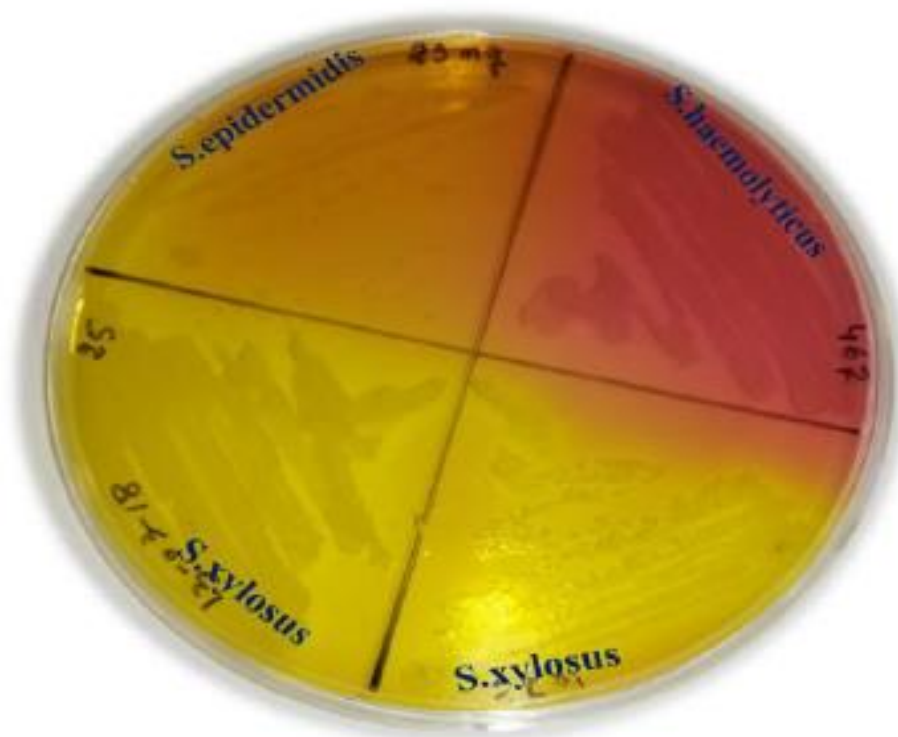


Figure 20. Aspect macroscopique des colonies des SCN sur gélose Chapman.

II.1.2. Etude microscopique des SCN

La coloration de Gram a montré des cocci à Gram positif (figure 21), isolés, regroupés en diplocoques ou en courts chaînettes et en amas ayant la forme de grappes de raisin (Götz *et al.*, 2006).

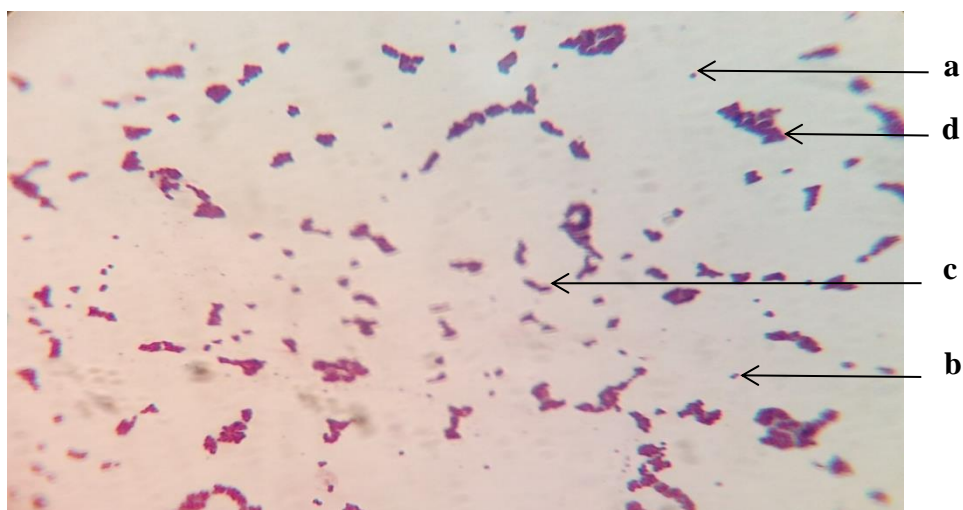


Figure 21. Observation microscopique des SCN après coloration de Gram.

a: isolés, **b:** regroupés en diplocoques, **c:** court chaînette, **d:** en amas.

Sakai *et al.*, (2004) ont mentionné que la coloration de Gram est couramment utilisée pour évaluer les flacons d'hémoculture signalant la présence de staphylocoques, mais elle ne permet pas de distinguer *S. aureus* des SCN, ces deux derniers apparaissent comme des coques à Gram positif en grappes. Par conséquent, d'autres méthodes phénotypiques et génotypiques sont utilisées pour différencier *S. aureus* des SCN.

II.1.3. Test de la coagulase

Les 66 isolats de staphylocoques ne possèdent pas une coagulase libre (figure 22).



Figure 22. Test de la coagulase.

a: Témoin positif (*S. aureus* ATCC 25923). **b:** *S. epidermidis* (à coagulase négative).

II.1.4. Test de catalase

Tous les SCN testés sont producteurs de catalase. Ils peuvent hydrolyser le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau qui se traduit par un dégagement de bulles de gaz (Hart et Shears, 1997) (figure 23).



Figure 23. Résultats de test de la catalase des SCN.

+: Résultat positif, -: Témoin négatif.

II.1.5. Identification des isolats de SCN

Nous avons identifié 66 isolats de SCN appartenant à 9 espèces différentes en utilisant des Galeries API Staph (figure 24).



Figure 24. Identification d'une espèce de SCN par Galerie API Staph.

S. epidermidis (n = 29) a été isolé comme l'espèce la plus dominante de SCN puis *S. haemolyticus* (n = 15), *S. hominis* (n = 8), *S. chromogenes* (n = 6), *S. xylosus* (n = 4) et enfin *S. capitis* (n = 1), *S. saprophyticus* (n = 1), *S. cohnii* (n = 1) et *S. simulans* (n = 1) (Tableau 13).

Tableau 13. Distribution des isolats de SCN en fonction d'espèce.

	Effectif	Pourcentage (%)
<i>S. epidermidis</i>	29	43.93
<i>S. haemolyticus</i>	15	22.72
<i>S. hominis</i>	8	12.12
<i>S. chromogenes</i>	6	9.09
<i>S. xylosum</i>	4	6.06
<i>S. capitis</i>	1	1.52
<i>S. cohnii</i>	1	1.52
<i>S. saprophyticus</i>	1	1.52
<i>S. simulans</i>	1	1.52
Total	66	100

Cette composante des SCN a été signalée aussi par Shah *et al.*, (2017) dans une étude faite au centre de diagnostic du Dr. Essa au Pakistan qui ont trouvé des résultats proches avec 35.1% de *S. epidermidis*, 3.5% de *S. xylosum* et 1.8% de *S. cohnii* et des résultats différents avec 8.8% de *S. haemolyticus* et 33.3% de *S. saprophyticus*.

Des résultats proches ont été trouvés par Lang *et al.*, (1999) à partir de cinq types d'infection dans trois hôpitaux différents en Royaume-Uni avec *S. capitis* (2%), *S. saprophyticus* (1%) et des résultats différents avec un pourcentage élevé de *S. epidermidis* (83%) suivis par *S. simulans* (6%), *S. hominis* (3%) *S. lugdunensis* (2%), *S. caprae* (1%) et *S. sciuri* (1%).

Des résultats différents ont été rapportés par plusieurs auteurs à travers les travaux effectués sur les SCN: Oliveira et Cunha (2010), Soumya *et al.*, (2017), Ehlersson *et al.*, (2017) et Shrestha *et al.*, (2017).

II.1.6. Répartition des espèces de SCN en fonction de la nature de prélèvement

Dans notre étude, 28 (42.42%) des SCN sont trouvés dans les prélèvements des hémocultures dont (11) *S. epidermidis*, (08) *S. haemolyticus*, (4) *S. hominis* et (2) *S. chromogenes* (Tableau 14). 13 (19.69%) des SCN sont trouvés dans les prélèvements de cathéter dont (08) *S. epidermidis*, (2) *S. haemolyticus*, (1) pour chacun de *S. chromogenes*, *S. xylosum* et *S. capitis*. 08 (12.12 %) des SCN sont trouvés dans les prélèvements des pus dont (2) *S. epidermidis*, (2) *S. chromogenes*, (1) *S. haemolyticus* et (3) *S. xylosum*. 06

(9.09%) des SCN sont aussi isolés des prélèvements des urines dont (3) *S. epidermidis*, (2) *S. haemolyticus* et (1) *S. hominis*.

Tableau 14. Distribution des espèces de SCN en fonction des prélèvements.

	Sonde urinaire n=01	Urines n=06	Hémo-cultures n=28	Pus n=08	Plaie n=01	Liquide pleural n=03	LCR n=05	Cathéter n=13	Drain n=01
<i>S. epidermidis</i>	0	3	11	2	0	0	4	8	1
<i>S. haemolyticus</i>	0	2	8	1	1	1	0	2	0
<i>S. hominis</i>	1	1	4	0	0	1	1	0	0
<i>S. chromogenes</i>	0	0	2	2	0	1	0	1	0
<i>S. xylosum</i>	0	0	0	3	0	0	0	1	0
<i>S. capitis</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>S. cohnii</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>S. simulans</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Total	1.52%	9.09%	42.42%	12.12%	1.52%	4.55%	7.57%	19.69%	1.52%

Des mêmes résultats ont été rapportés par plusieurs auteurs sur l'isolement à partir des hémocultures: Marsik et Brake (1982) dont *S. epidermidis* formait (33%), *S. haemolyticus* (33%) et *S. hominis* (18%). Nagasrilatha *et al.*, (2015) où 42.24% étaient des SCN, Ahmed *et al.*, (2016) dont 21/53 isolats étaient des SCN. Des résultats différents sont signalés par Soumya *et al.*, (2017), où la composante était *S. epidermidis* (63%), *S. haemolyticus* (8%), *S. saprophyticus* (4.16%), *S. hominis* (12.5%) et *S. capitis* (8.2%).

Javadpour *et al.*, (2010) ont trouvé un taux élevé des SCN dans les prélèvements des urines (78.6%) par contre Goudarzi *et al.*, (2014) ont trouvé seulement 32.3 %. Des résultats différents ont été rapportés par soumya *et al.*, (2017) sur les analyses des urines avec *S. haemolyticus* (50%) et *S. epidermidis* et *S. saprophyticus* (17% pour chacun).

Les SCN sont les microorganismes les plus fréquemment isolés des hémocultures et représentent un grave problème de santé dans de nombreux pays en développement et même pour les pays développés (Cunha *et al.*, 2004). De même, *S. epidermidis* est l'isolat le plus fréquemment isolé des infections de sang. Sa prévalence est associée à sa tendance

à coloniser les cathéters veineux centraux et autres dispositifs médicaux implantés (Iorio *et al.*, 2011).

II.1.7. Distribution des espèces de SCN en fonction du service hospitalier

Dans notre travail, une prédominance de SCN est trouvée dans le service d'onco-hématologie avec 45.45% (30/66) dont 13 sont des *S. epidermidis* (Tableau 15).

Tableau 15. Distribution des espèces de SCN en fonction du service hospitalier.

	Onco- hématologie n=30	Chirurgie carcinologique n=14	Onco- pédiatrie n=10	Réanimation n=7	Externes n=5
<i>S. epidermidis</i>	13	4	3	5	4
<i>S. haemolyticus</i>	7	3	3	1	1
<i>S. hominis</i>	4	2	2	0	0
<i>S. chromogenes</i>	4	2	0	0	0
<i>S. xylosus</i>	0	2	1	1	0
<i>S. capitis</i>	1	0	0	0	0
<i>S. cohnii</i>	1	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	0	1	0	0	0
<i>S. simulans</i>	0	0	1	0	0
Total	45.45%	21.21%	15.15%	10.61%	7.58%

Des résultats différents rapportés par Koksall *et al.*, (2009) dont 3/200 des SCN ont été isolés au service d'hématologie.

II.1.8. Profil de sensibilité aux antibiotiques et les CMI des SCN isolés

Le profil de sensibilité aux antibiotiques et les CMI des SCN sont détaillés dans la figure 25. En général, les antibiotiques testés ont présenté des activités différentes sur la croissance des isolats de SCN (figure 26).

Les résultats obtenus montrent une dominance des SCN résistants vis-à-vis la pénicilline G avec un taux de (98.5 %) suivis par la céfoxitine (80.3 %), l'oxacilline (74.24%) et l'acide fusidique (60.6 %).

Une sensibilité prédominante des isolats est remarquable pour l'amikacine, la gentamicine, la tétracycline, la clindamycine, la pristinaamycine, la teicoplanine, la

rifampicine, l'ofloxacine et la lévofloxacine. Une sensibilité totale est signalée pour le chloramphénicol et la vancomycine.

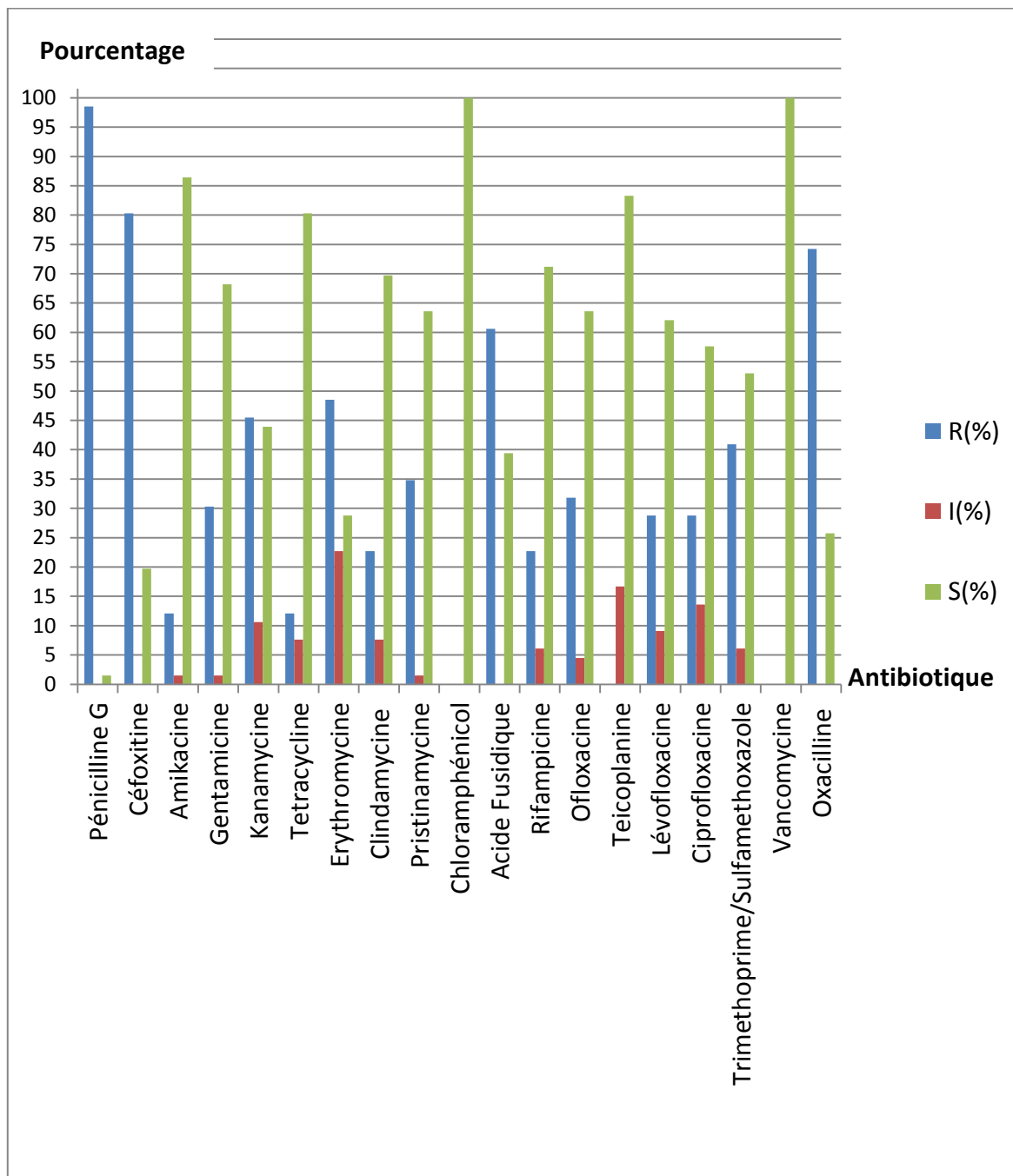


Figure 25. Sensibilité aux antibiotiques et CMI des SCN isolés.

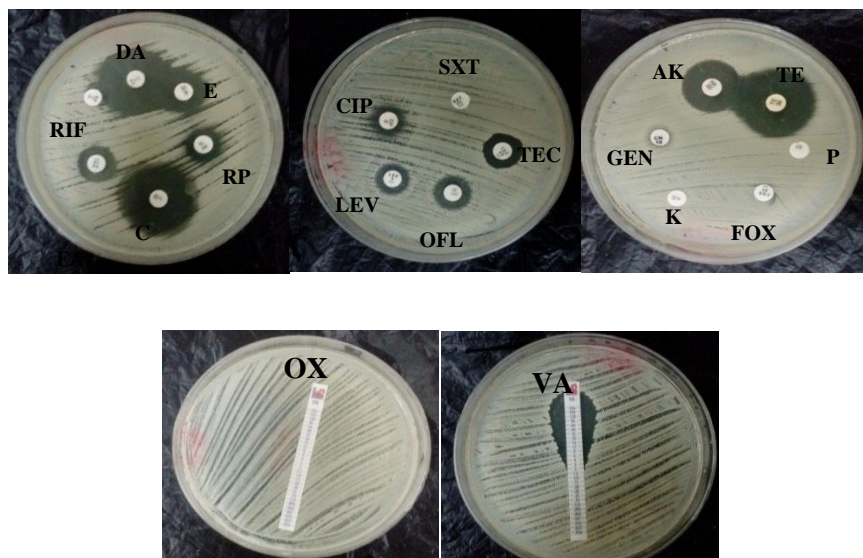


Figure 26. Exemple de sensibilité aux antibiotiques et CMI des SCN isolés.

P: Pénicilline, FOX: Céfoxitine, GEN: Gentamicine, AK: Amikacine, K: Kanamycine, E: Erythromycine, TE: Tétracycline, OFL: Ofloxacine, LEV: Lévofloxacine, CIP: Ciprofloxacine, DA: Clindamycine, C: Chloramphénicol, RIF: Rifampicine, SXT: Triméthoprime-sulfaméthoxazole, FA: Acide fusidique, RP: Pristinamycine, VAN: Vancomycine, OX: Oxacilline.

Des résultats presque similaires de résistance à la pénicilline ont été trouvés par Goudarzi *et al.*, (2014) (95.4%) par contre Pinna *et al.*, (1999) ont signalé une résistance de 67% à cet antibiotique. Les mêmes résultats ont été signalés par plusieurs auteurs pour la résistance à la céfoxitine comme Goudarzi *et al.*, (2014), Nagasrilatha *et al.*, (2015) et Soumya *et al.*, (2017) qui ont indiqué des résistances de (84.7%), (86.21%) et (70%) respectivement. D'autres chercheurs ont cité des pourcentages de résistance relativement faibles (67.5%) et (58%) par Koksai *et al.*, (2009) et Shrestha *et al.*, (2017) respectivement. La résistance à la pénicilline des staphylocoques est médiée par le gène chromosomique *blaZ*, qui code pour la bêta-lactamase (Balaban *et al.*, 2008).

La résistance bactérienne aux antibiotiques augmente de jour en jour tant dans la communauté qu'à l'hôpital. Elle a un impact significatif sur les taux de morbidité et de mortalité et sur la charge financière qui y est associée (Armas *et al.*, 2016). La résistance à la méthicilline confère une résistance à tous les bêta-lactamines y compris les céphalosporines (Balaban *et al.*, 2008). Elle est couramment associée au transport du gène *mecA* qui code pour la protéine liant la pénicilline PLP2a (Hanssen *et al.*, 2004; Zong *et al.*, 2011) et présente une faible affinité pour le β -lactame (Bhatt *et al.*, 2016). Les PLP

sont des enzymes liées à la membrane qui catalysent la réaction de transpeptidation nécessaire à la réticulation des chaînes de peptidoglycane (Balaban *et al.*, 2008). Le gène *mecA* est situé sur un élément génétique mobile appelé le chromosome de la cassette staphylococcique *mec* (SCC*mec*). 11 types de SCC*mec* sont actuellement signalés et le typage est basé sur différentes combinaisons de types *mec* (A, B, C1, C2 et D) et de types *ccr* (Cassette chromosome recombinase genes) (*ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3*, *ccrAB4* et *ccrC*) (Xu *et al.*, 2015). La résistance à la méthicilline des staphylocoques n'est pas détectable de manière fiable par les techniques phénotypiques et ce d'autant que son expression est variable selon les souches, certaines présentent une résistance hétérogène. D'où l'intérêt d'une recherche génotypique (Courvalin *et al.*, 2006).

Aucun isolat de SCN n'a montré de résistance vis-à-vis de la vancomycine. Jain *et al.*, (2004) et Shrestha *et al.*, (2017) ont trouvé des mêmes résultats pour cet antibiotique. La vancomycine est un antibiotique antistaphylocoque dont la résistance est rarement observée. son utilisation devrait être réservée au traitement des infections à staphylocoques résistants à tous les autres antibiotiques (Pinna *et al.*, 1999).

Dans cette étude, une faible résistance des isolats de SCN est observée pour l'amikacine (12.1%), la gentamicine (30.3%) et la kanamycine (45.5%). Des mêmes résultats pour la gentamicine ont été rapportés par Cuevas *et al.*, (2004) (27.8%) sur une étude statistique de l'année 2002 en Espagne.

Le présent travail indique aussi une résistance modérée pour la clindamycine (22.7%), la pristnamycine (34.8%) et l'érythromycine (48.5%). D'autres résultats différents ont été trouvés par Pinna *et al.*, (1999) dont (33%) des isolats de SCN sont résistants à l'érythromycine et des résultats similaires de résistance à la clindamycine ont été rapportés par Javadpour *et al.*, (2010) (30%).

II.1.9. Profil de sensibilité aux antibiotiques et les CMI de *S. epidermidis*

Dans cette étude, nous avons enregistré une résistance totale des *S. epidermidis* vis-à-vis la pénicilline G et une forte résistance vis-à-vis la céfoxitine (69%) (figure 27).

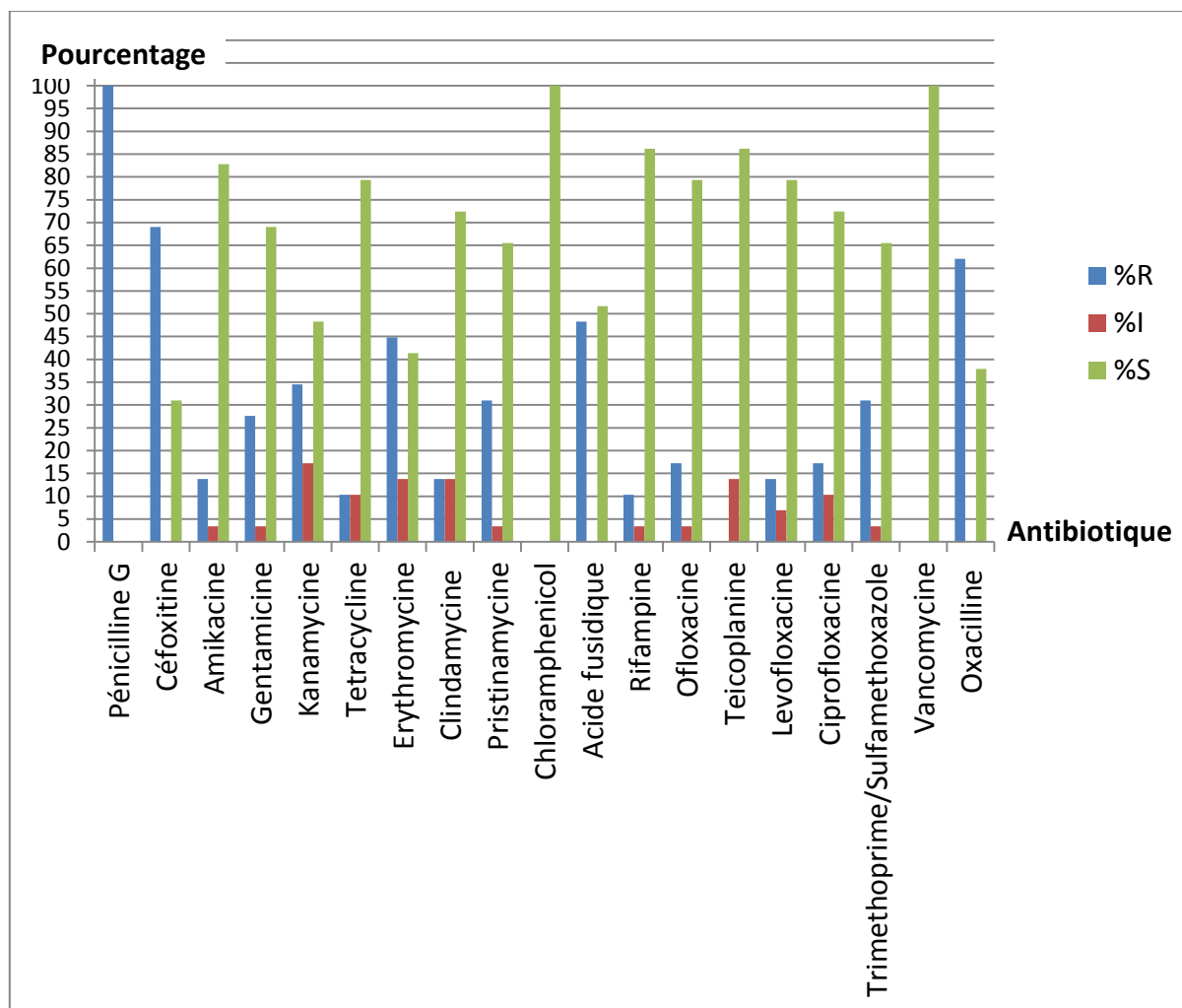


Figure 27. Sensibilité de *S. epidermidis* aux antibiotiques.

Une autre étude sur *S. epidermidis* a signalé une sensibilité à la méthicilline de 34%, à la kanamycine de 55%, à la tétracycline de 57% et aux triméthoprime/sulfaméthoxazole de 46% (Marsik et Brake ,1982).

Boukhatem *et al.*, (2015) dans un travail effectué à l’hôpital de Koléa (Tipaza, Algérie), ainsi que d'autres travaux réalisés par Farid *et al.*, (2015) et Gatermann *et al.*, (2007) ont tous signalé la résistance de *S. epidermidis* à la méhicilline et à l'érythromycine avec un pourcentage qui dépasse dans tous les cas les 60%.

II.2. Formation de biofilm

Détection de la formation du biofilm par la méthode TCP

La figure 28 montre la production de biofilm par la méthode TCP. Cette production a été détectée chez 59 des 66 isolats de staphylocoques (89.39%) avec différentes

intensités; 16 (24.24%) sont fortement producteurs de biofilm, 23 (34.85) sont modérés, 20 (30.30%) sont faibles tandis que 7 (10.61%) sont non producteurs de biofilm (figure 29).

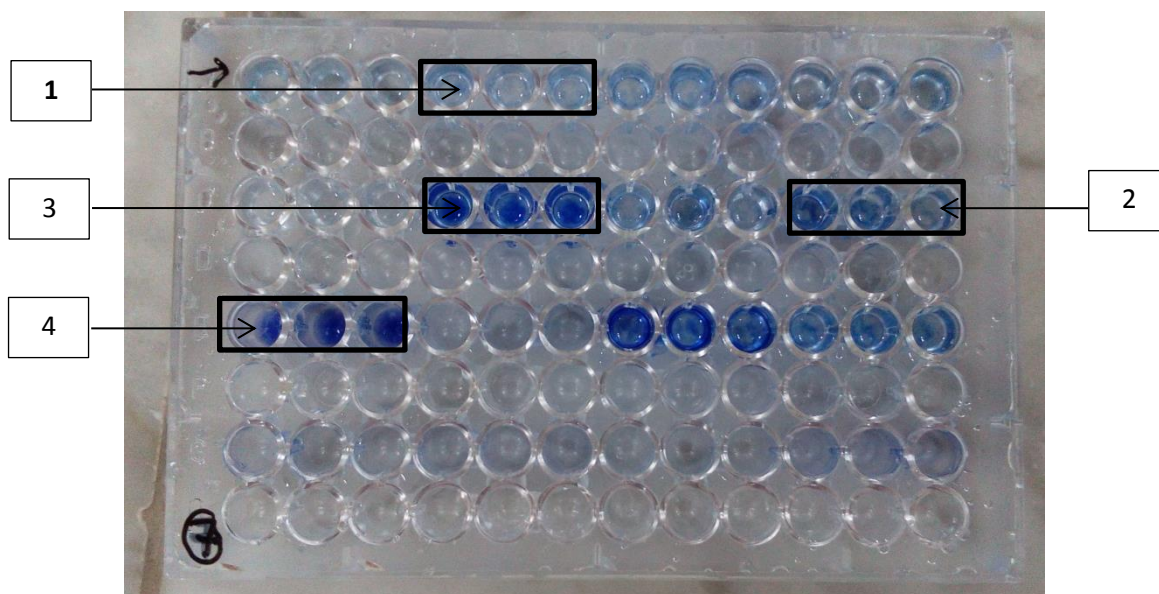


Figure 28. Estimation de la production de biofilm par la méthode TCP.

1: Non formatrice de biofilm; 2: Faible; 3: Modérée; 4: Forte.

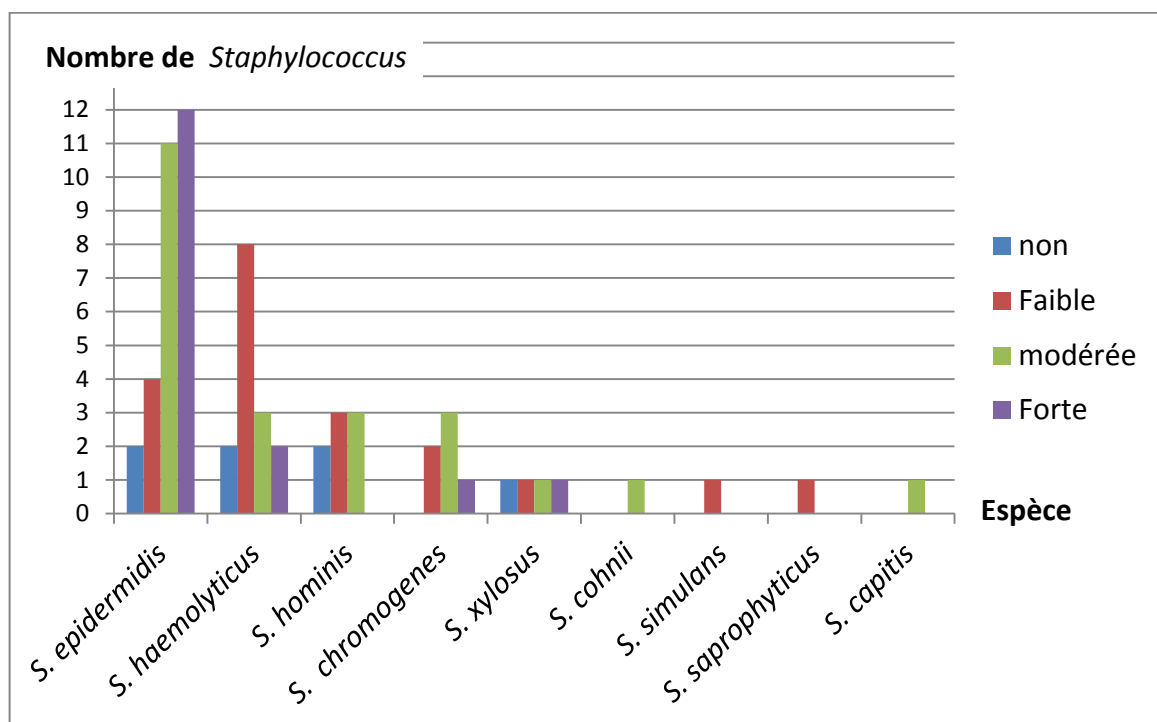


Figure 29. Intensités de la formation du biofilm par la méthode TCP.

Nasr *et al.*, (2012) ont rapporté en utilisant la méthode de microplaque que 66.6% des SCN isolés à partir des hémocultures et des cathéters intravasculaires ne forment pas

de biofilm, 16.6% sont des formateurs modérés et 16.6% sont des faibles formateurs de biofilms.

Des résultats rapportés par Oliveira et Cunha (2010), (35 %) et (46 %) des SCN ont été faiblement et fortement producteurs de biofilm respectivement. Shrestha *et al.*, (2017) ont trouvé (65.38%) des isolats de SCN producteurs de biofilm.

D'autres résultats trouvés par Soumya *et al.*, (2017), ont affirmé que uniquement 11% des isolats de SCN ont été fortement producteurs de biofilms et 16% ont été de formation modérés, mais Oliveira et Cunha (2010) ont indiqué que 46 % ont été fortement producteurs et que 35 % ont présenté une faible formation.

Hassan *et al.*, (2011) ont trouvé que la méthode TCP est une méthode quantitative et fiable pour détecter les microorganismes formant des biofilms et que l'ajout du 1% de glucose dans le TSB aide à cette formation.

II.2.2. Détection de la formation du biofilm par la méthode RCA

La figure 30 montre la production du biofilm sur milieu RCA.

Selon cette méthode, 21 isolats (31.82%) forment un biofilm et 45 isolats (68.18%) sont négatifs (figure 31).

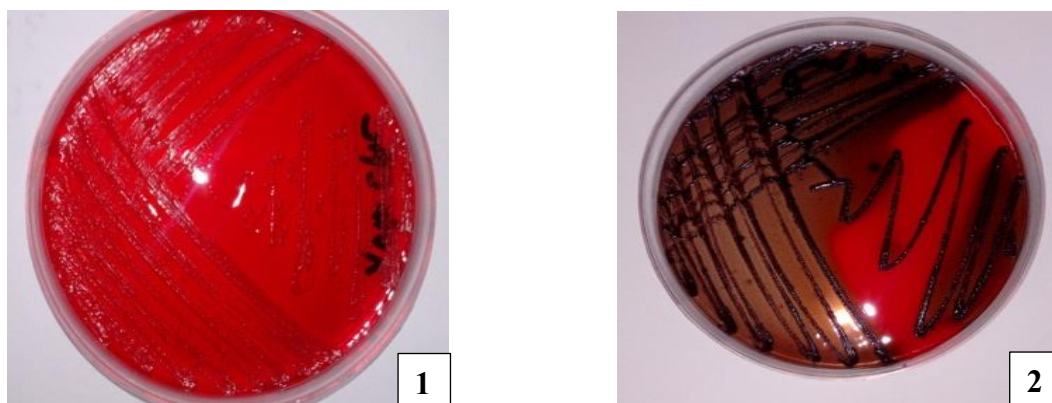


Figure 30. Production de biofilm sur milieu RCA.

1: non formatrice de biofilm; **2:** formatrice de biofilm.

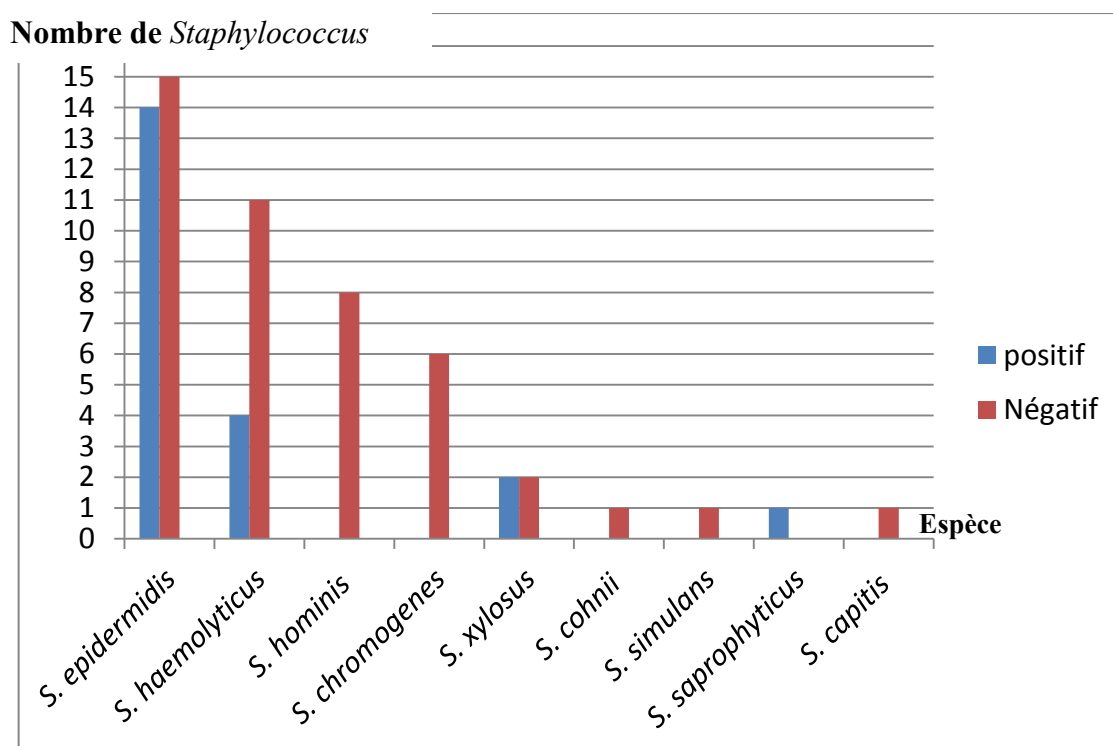


Figure 31. Formation de biofilm selon les espèces de SCN par la technique RCA.

Sur les 66 isolats de staphylocoques 21 (31.82%) étaient producteurs de biofilm et 45(68.18) étaient non producteurs. Nasr *et al.*, (2012) ont trouvé que (50%) des SCN isolés à partir des hémocultures et cathéters intravasculaires ont été producteurs de ces amas structurés. Oliveira et Cunha, (2010) ont mentionné que 73% des SCN étudiés formaient des biofilms. Quant à Soumya *et al.*, (2017), ils ont constaté que ce pourcentage atteint 87.5% et aussi atteint 85% d'après Shrestha *et al.*, (2017). D'autres résultats sur le *S. epidermidis* rapportés par Solati *et al.*, (2015) ont trouvé que 50% des isolats sont producteurs de cette biomasse adhérente.

II.3. Identification génotypique pour la détection des gènes *mecA* et *icaAD*

II.3.1. Détection des gènes *mecA* et *icaAD* par PCR

Les résultats de la détection des gènes *mecA* indiquent que sur neuf isolats des SCN résistants à la méthicilline (1-9), six isolats seulement possèdent ce gène (figure 32.a). De même, sur neuf isolats qui ont été apparus producteurs de biofilm (11-19) par la méthode RCA, uniquement cinq ont montré les gènes *icaAD* (figure 32.b).

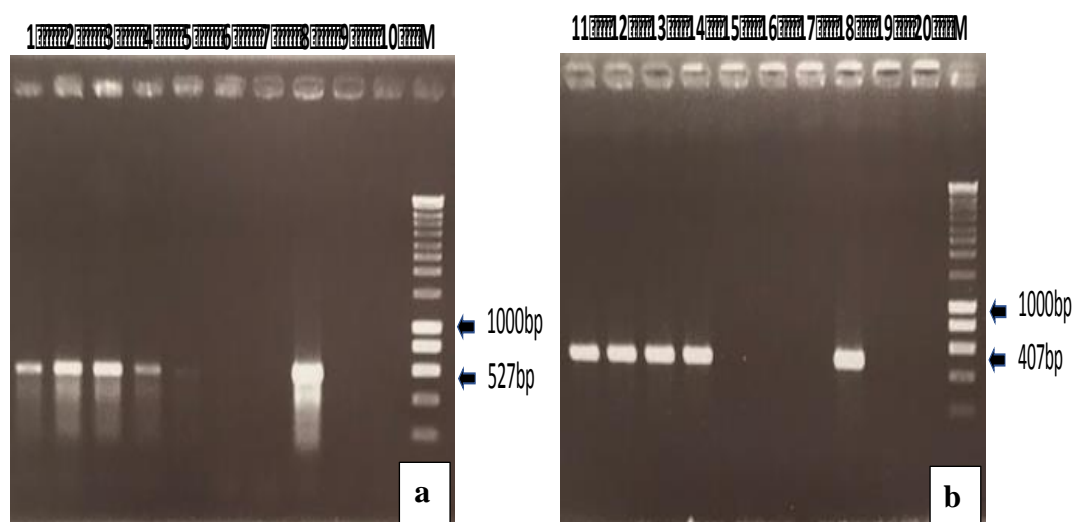


Figure 32. Électrophorèse sur gel d'Agarose des gènes *mecA* et *icaAD*.

M : marqueur de taille moléculaire (SmartLadder 200pb Eurogentech).

a: Gène *mecA* , **b**: Gène *icaAD*.

1. *S. xylosus*, 2. *S. saprophyticus*, 3. *S. haemolyticus*, 4. *S. haemolyticus*, 5. *S. epidermidis*, 6. *S. hominis*, 7. *S. epidermidis*, 8. *S. epidermidis*, 9. *S. xylosus*, 10. *S. chromogenes*, 11. *S. epidermidis*, 12. *S. xylosus*, 13. *S. epidermidis*, 14. *S. epidermidis*, 15. *S. epidermidis*, 16. *S. hominis*, 17. *S. epidermidis*, 18. *S. chromogenes*, 19. *S. xylosus*, 20. *S. epidermidis*.

Jain *et al.*, (2004) ont montré que la détection par PCR de gènes *mecA* pouvait constituer un complément bénéfique aux tests de sensibilité standard et permettre l'identification rapide et efficace de la résistance intrinsèque.

D'autres part, l'absence du gène *mecA* sur les autres isolats a été justifiée par : pour *S. xylosus*, un allotype du gène *mecC*, appelé *mecC1* a été décrit. Un autre allotype *mecC*, appelé *mecC2* a récemment été signalé pour *S. saprophyticus* ssp. *saprophyticus* résistant à la méthicilline (Becker *et al.*, 2014).

Nasr *et al.*, (2012) ont trouvé que le gène *icaAD* a été détecté dans 32% des isolats de staphylocoques et que la présence de ce gène n'a pas été toujours associée à la formation de biofilm *in vitro*. D'autre part, la capacité de certains isolats à former des biofilms en absence de gène *icaAD* souligne l'importance de nouvelles investigations génétiques sur les mécanismes de formation de biofilms indépendants de l'*ica*.

De plus, la détection simultanée des gènes de biofilm *icaAD* dans des isolats cliniques peut anticiper la possibilité de colonisation des cathéters par biofilm avant qu'elle

ne se produise réellement, prévenant peut être les conséquences potentiellement mortelles pour les patients infectés (Iorio *et al.*, 2011).

II.3.2. Séquençage des gènes ARNr 16S

L'identification des deux isolats *mecA*⁺ et *icaAD*⁺ par séquençage du gène de l'ARNr 16S a abouti aux résultats suivants :

Mec3: 100% *Staphylococcus haemolyticus* strain FC2950 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: MH532495.1

>*Mec3_1492r* -- 22.1031 of sequence

```
TAGCTCCAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTG
ACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATGCTGATCTA
CGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAA
CTGAGAACAACCTTTATGGGATTTGCTTGACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTA
TTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGA
CGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACTTAGAGTGCCCAA
CTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCA
ACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTTGTCCC
CCGAAGGGGAAGGCTCTATCTCTAGAGTTGTCAAAGGATGTCAAGATTTGGTA
AGGTTCTTCGCGTTGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTC
CCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCAGGCGGAGTGC
TTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACT
CATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGATCCCCACGCT
TTCGCACATCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTT
CTCCATATCTCTGCGCATTTACACCGCTACACATGGAATTCACCTTTCCTCTTCTG
CACTCAAGTTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCA
CATCAGACTTAAAAAACCGCCTACGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCCGGATA
ACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTT
TCTGATTAGGTACCGTCAAGACGTGCATAGTTACTTACACGTATG
```

Ica13: 100% *Staphylococcus epidermidis* strain K121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: KT361208.1

>*ICA13_1492r* -- 11.412 of sequence

```
AACCTTCGACGGCTAGCTCCAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAA
ACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGT
AGCATGCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATATAGTCGAGTTGCAG
ACTACAATCCGAACCTGAGAACAACCTTTATGGGATTTGCTTGACCTCGCGGTTT
GCTACCCTTTGTATTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGC
ATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACT
TAAAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGCG
GGACTTAACCCAACATCTCACGACACA
```

Le tableau 16 résume l'identification des isolats 3 et 13 par séquençage de leur gène l'ARNr 16.

Tableau 16. Pourcentage de similitude et identification de deux isolats de SCN.

N° d'isolats	% de similitude	Identification
<i>mec 3</i>	100	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> strain FC2950
<i>ica 13</i>	100	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain K121

II.4. Activité antibactérienne et antibiofilm de l'extrait l'acétate d'éthyle de *Pseudomonas* spp. contre les SCN

II.4.1. Isolement et purification des isolats de *Pseudomonas*

Dans notre étude nous avons pu isoler et purifier 29 isolats. L'isolement a été effectué sur le milieu King B. L'identification préliminaire des isolats rhizosphériques a été essentiellement basée sur les caractéristiques morphologiques, la coloration de Gram, la mobilité, la recherche de la catalase ainsi que l'oxydase. Ces caractères vont permettre de classer nos isolats dans le groupe des *Pseudomonas* fluorescents (Bossis *et al.*, 2000).

II.4.2. Caractérisation des *Pseudomonas* isolés

II.4.2.1. Examen macroscopique

L'étude macroscopique a permis d'isoler 3 types de colonies distinctes par les caractéristiques regroupées dans le tableau 17.

Tableau 17. Observations macroscopiques de quelques colonies.

	Couleur	Forme	Elévation	Contour	Consistance
Isolat 1	Verte	Ronde	Bombée	Régulier	Muqueuse
Isolat 2	Jaune verdâtre	Ronde	Bombée	Irrégulier	Crémeuse
Isolat 3	Verte	Ronde	Plate	Irrégulier	Lisse brillante

Nos isolats sont caractérisés par la production du pigment de pyoverdine (figure 33). Ce pigment diffuse dans les cultures sur gélose King B et les colonies colorent le milieu en jaune verdâtre, ces caractères sont spécifiques aux espèces fluorescentes du genre *Pseudomonas* (Singleton, 1999).



Figure 33. Aspect macroscopique d'un isolat de *Pseudomonas* sur gélose King B.

II.4.2.2. Examen microscopique

Les observations microscopiques ont été réalisées suivant deux étapes : la première est une observation à l'état frais de la forme et la mobilité des bactéries ; la deuxième est une observation après coloration de Gram.

Les résultats obtenus après observation à l'état frais montrent que les isolats sont des bâtonnets très mobiles (Delarras, 2014).

Les résultats obtenus après coloration de Gram montrent que les 29 isolats sont des bacilles à Gram négatif (figure 34), fins et droits, isolés ou en diplobacilles, dépourvus de spores (Delarras, 2014).

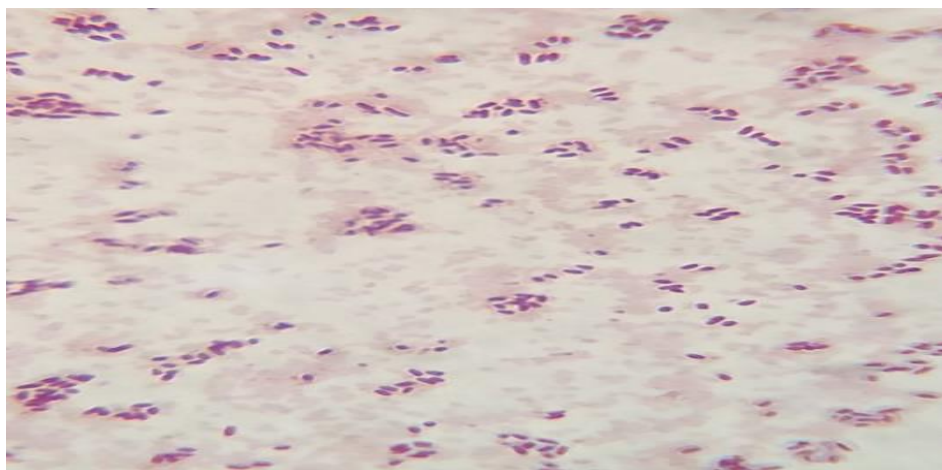


Figure 34. Observation microscopique des *Pseudomonas* après coloration de Gram.

II.4.2.3. Résultats de la recherche de l'oxydase et de catalase chez *Pseudomonas*

Tous nos isolats de *Pseudomonas* sont catalase positive (figure 35.a), ils dégagent des bulles d'air après contact avec l' H_2O_2 (Delarras, 2014), et possèdent une cytochrome oxydase (Palleroni, 1984) sauf les trois isolats P3, P12 et P26. Certains isolats comme le PN et le PQ présentent une activité oxydase intense (figure 35.b).

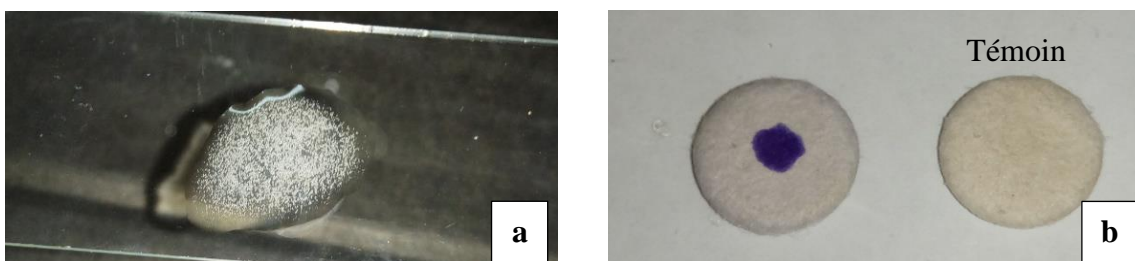


Figure 35. Résultats de l'oxydase et de catalase des *Pseudomonas*.

a: test de catalase; **b:** test d'oxydase

II.4.2.4. Test d'antagonisme *in vitro*

Les résultats du test d'antagonisme *in vitro* par la méthode des stries croisées montrent une inhibition de la croissance des SCN. Cette inhibition est variable selon l'isolat de *Pseudomonas* et l'isolat de SCN testé (figure 36).

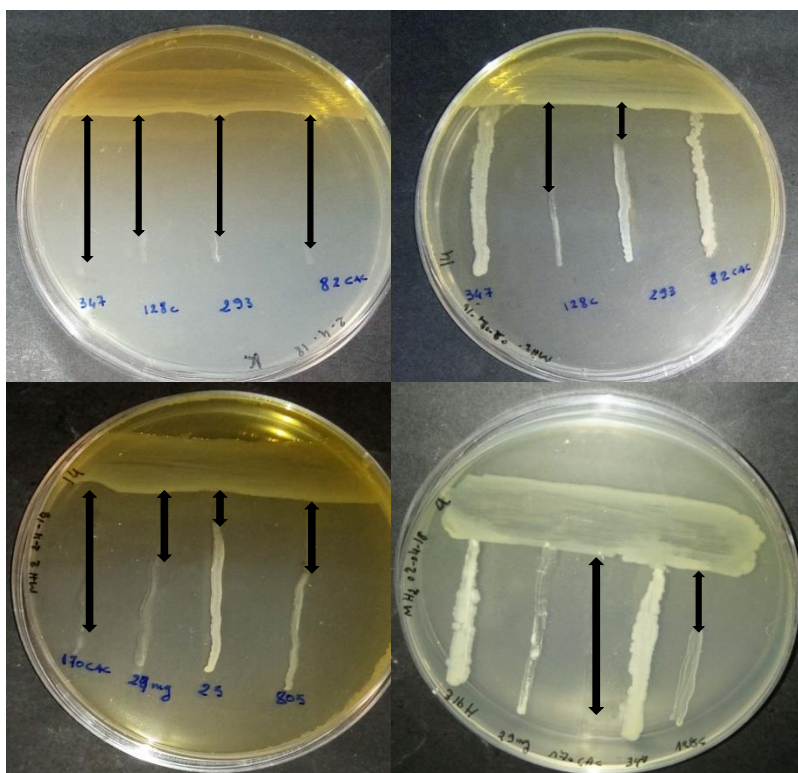


Figure 36. Activité antagoniste des *Pseudomonas* vis-à-vis les isolats de SCN.

Les résultats de ce test montrent que tous les 29 isolats de *Pseudomonas* testés ont révélé un pouvoir d'inhibition de croissance, 19 sur 20 des *Staphylococcus* ciblés sont inhibés (Tableau 18). Des zones claires entre *Pseudomonas* et certains *Staphylococcus* testés sont observées, ces zones varient entre 3 à 55 mm, l'histogramme donné par la figure 37 présente les différentes distances de zones d'inhibition en mm entre les isolats de *Pseudomonas* et les *Staphylococcus*. La zone la plus grande est obtenue par l'isolat de *Pseudomonas* PK contre la bactérie *S. epidermidis* 94C. Le deuxième histogramme donné par la figure 38 montre le nombre des *Staphylococcus* inhibés par chaque isolat de *Pseudomonas*. 14 différents *Staphylococcus* sont inhibés par l'isolat de *Pseudomonas* PK, tandis que l'isolat PR qui n'inhibe que 6 *Staphylococcus* a pu donner un effet sur *S. epidermidis* 316H résistant à tous les autres isolats de *Pseudomonas*, ce qui reflète la différence des substances inhibitrices responsables d'activité antagoniste chez chaque isolat.

Tableau 18. Résultats du test d'antagonisme par la méthode des stries croisée.

	<i>S. epidermidis</i>									<i>S. haemolyticus</i>						<i>S. xylosum</i>			<i>S. cohnii</i>	<i>S. hominis</i>	T
	29 mg	94 C	170	893	203 C	173 C	82C	128	123 C	805	182 H	467	1076	316 H	14 : 15	25	293	347 H	106C	132	
PK	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	14
P25	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	10
P14	+		-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	8
PI	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	7
P19	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	6
P10	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	6
PA	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	6
PR	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	6
P26	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	5
PL	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	5
PB	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	4
PE	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	4
PN	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	4
PQ	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4

+: positif, -: négatif

Suite tableau 18

	<i>S. epidermidis</i>									<i>S. haemolyticus</i>						<i>S. xylosum</i>			<i>S. cohnii</i>	<i>S. hominis</i>	T
	29 mg	94 C	170	893	203C	173 C	82C	128	123 C	805	182 H	467	1076	316H	14 : 15	25	293	347 H	106C	132	
PG	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	4
P15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	4
P9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	3
P11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	3
P3	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
PJ	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
PS	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	3
P22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	2
P1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2
PH	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
P28	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
P21	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
P12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
P17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
P2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

+: positif, -: négatif

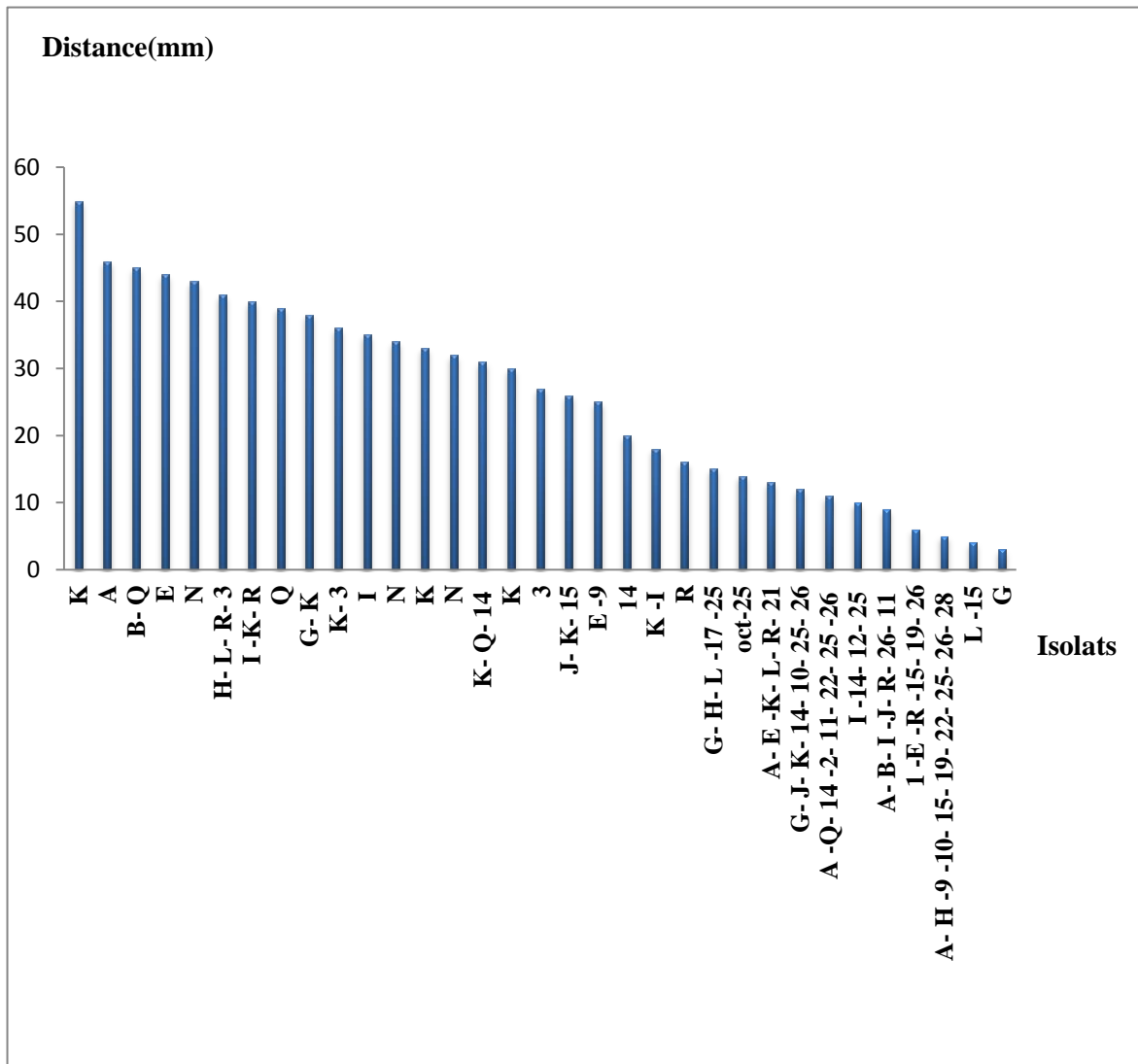


Figure 37. Distances de zones d’inhibition entre les isolats de *Pseudomonas* et les *Staphylococcus*.

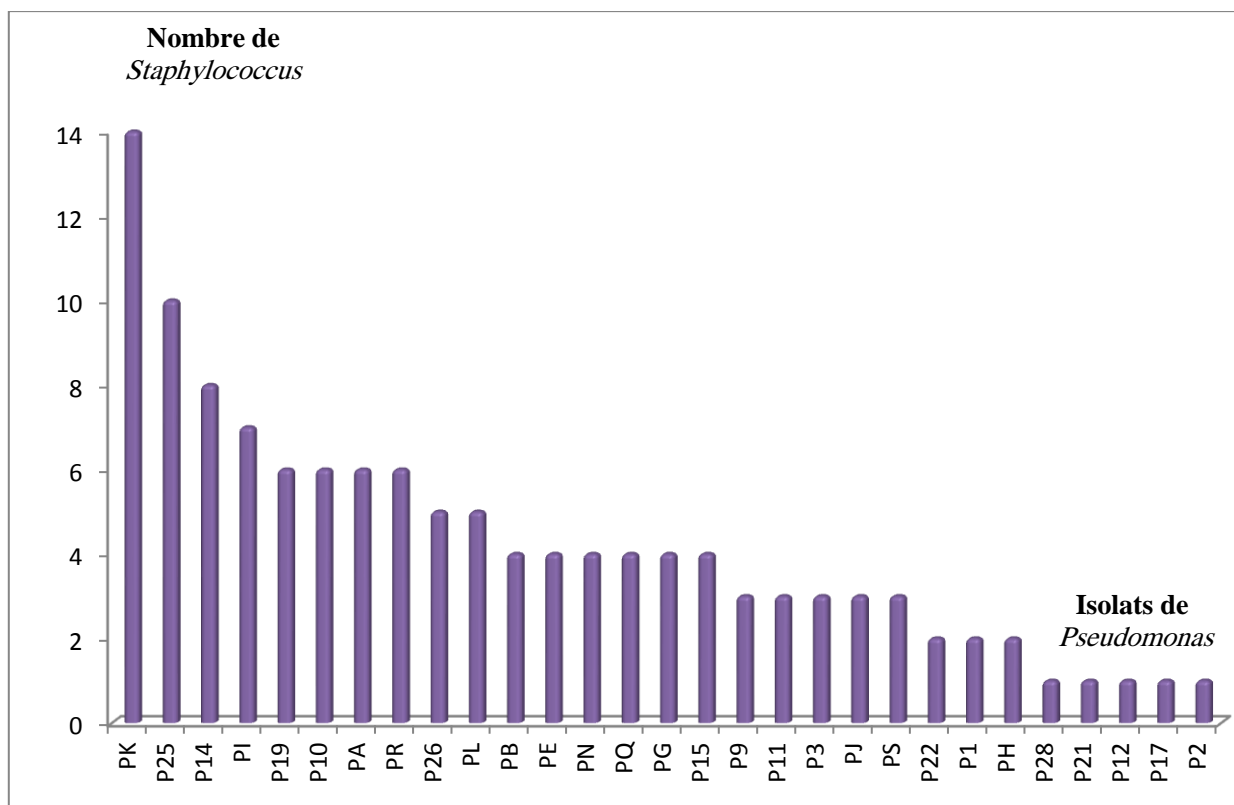


Figure 38. Nombre de *Staphylococcus* inhibés par chaque isolat de *Pseudomonas*.

les *Pseudomonas* fluorescents ont largement été étudiés comme des agents potentiels de lutte biologique en raison de leur capacité à coloniser la rhizosphère (Ge *et al.*, 2004). En plus de la compétition pour les sources de carbone, l'antagonisme peut être attribué en grande partie à la production de métabolites secondaires (antibiotiques, sidérophores, acide cyanhydrique, enzymes etc.) (Jacques *et al.*, 1993). En effet, *P. aeruginosa* produit plus de 55 quinolones / quinolines en plus de la 2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone, et celles-ci possèdent une activité antibiotique significative contre les bactéries à Gram positif. Les quinolones antimicrobiennes peuvent être conditionnées dans des vésicules membranaires extracellulaires pour provoquer une lyse directe de *S. epidermidis* (Mashburn *et al.*, 2005). Une autre protéine extracellulaire sécrétée par *P. aeruginosa* qui a une activité antistaphylolytique notable est la protéase LasA. Les polysaccharides extracellulaires sécrétés par *P. aeruginosa* pourraient représenter une stratégie prometteuse à utiliser contre les biofilms staphylococciques dans de futures applications (Qin *et al.*, 2009).

II.4.2.5. Effet inhibiteur du surnageant de culture des *Pseudomonas*

Parmi les 29 isolats ayant une activité antagoniste, 12 isolats sont sélectionnés en raison de leur spectre d'inhibition contre les *Staphylococcus* et les zones de leur inhibition à savoir : PK, P14, PG, PL, PN, PR, P3, PE, P25, PJ, PQ et PA. Les 12 isolats sélectionnés sont testés pour l'effet inhibiteur de leur surnageant. Cependant ce dernier ne présente aucune activité antagoniste. Ceci peut être justifié par la concentration faible des agents inhibiteurs dans le surnageant. Selon des études menées par Emmerich et Löw, le liquide de culture sans cellules de *P. aeruginosa* doit être concentré au dixième de son volume initial (Leisinger et Margraff, 1979).

II.4.2.6. Résultat de l'identification de l'isolat de *Pseudomonas* PK par la galerie Api

Une galerie d'identification a été utilisée pour nous orienter vers l'espèce de cet isolat de *Pseudomonas*. Après incubation, la lecture de la galerie a été faite à l'aide du logiciel d'identification **apiweb**TM, cette étape nous a permis de rapprocher notre isolat à l'espèce *Pseudomonas fluorescens*.

II.4.2.7. Effet antibactérien de l'extrait d'acétate d'éthyle de *P. fluorescens* PK

La production de métabolites extracellulaires par l'isolat a été effectuée sur le milieu NBY, et l'extraction a été faite par l'acétate d'éthyle.

Le rendement de l'extrait sec d'acétate d'éthyle de *P. fluorescens* PK est de 250 mg/l de culture bactérienne et est obtenu avec une couleur marron foncée. Cet extrait sec a été mis dans une solution de méthanol pour tester son effet antimicrobien.

Les résultats obtenus montrent que notre extrait présente une activité antistaphylococcique, comme le montre la figure 39, des zones claires autour les disques imprégnés de l'extrait d'acétate d'éthyle de *P. fluorescens* PK sont observées. Ces zones d'inhibition varient selon le SCN entre 6.75 et 27.33 mm (Tableau 19). La plus grande zone est remarquée contre l'isolat 347 (*S. xylosus*). Le disque supplémentaire imprégné par la solution de méthanol n'a donné aucun effet sur nos SCN cibles.

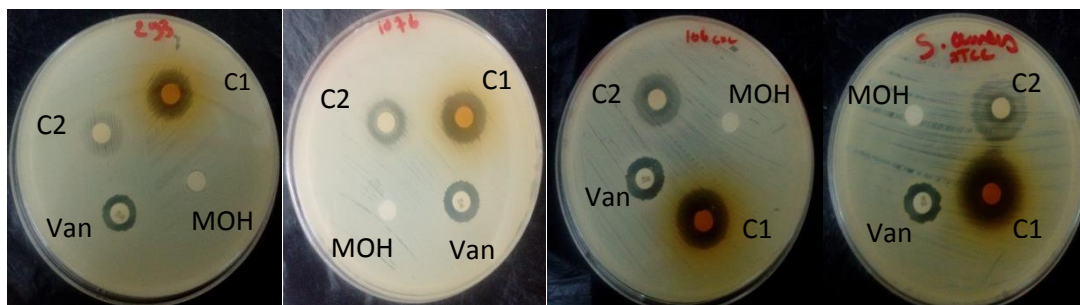


Figure 39. Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle de *P. fluorescens* PK sur les SCN cibles.

Van: vancomycine (30 μ g); **MOH:** Méthanol; **C1:** concentration de 500 mg/ml; **C2:** concentration de 250 mg/ml.

Nos résultats sont en accord avec les études de plusieurs auteurs, qui ont montré que les substances phénaziniques sont connues pour leurs activités antifongiques et antibactériennes (Shahid *et al.*, 2017). Le rapport de CMB/CMI permet de caractériser le type d'activité d'un extrait (Grare, 2009): $CMB/CMI \leq 2$: l'extrait est bactéricide; CMB/CMI 4 à 16 : l'extrait est bactériostatique, $CMB/CMI > 16$: bactérie dite tolérante à l'extrait. Dans notre travail, le rapport de CMB/CMI de l'extrait sec de l'acétate d'éthyle de *P. fluorescens* PK est bactéricide.

Tableau 19. Diamètres de zones d'inhibition, CMI, CMB et l'inhibition de biofilm de l'extrait d'acétate d'éthyle de *P. fluorescens* PK sur les SCN.

N° d'isolat	Bactéries testées	Diamètre de zones d'inhibition (mm)		CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMB/CMI	inhibition de biofilm (%)
		Concentration de 0.5 g/ml	Concentration de 0.25 g/ml				
106CAC	<i>S. cohnii</i>	18.5 ± 0.5	11 ± 0	7.81	7.81	1	32.20
316H	<i>S. haemolyticus</i>	14.83 ± 0.288	-	15.62	15.62	1	53.39
347 H	<i>S. xylosum</i>	27.33 ± 0.707	17.33 ± 0.288	3.9	7.81	2	70
82CAC	<i>S. epidermidis</i>	13.5 ± 0.5	8.5 ± 0	7.81	15.62	2	77.56
293	<i>S. xylosum</i>	13.5 ± 0.5	-	15.62	15.62	1	71.31
805	<i>S. haemolyticus</i>	10.67 ± 1.040	-	15.62	15.62	1	30
25	<i>S. xylosum</i>	12 ± 0.5	-	31.25	31.25	1	70.67
123	<i>S. epidermidis</i>	16.67 ± 0.577	08 ± 00	15.62	15.62	1	66.79
1076	<i>S. haemolyticus</i>	17 ± 01	12 ± 00	7.81	15.62	2	75
128	<i>S. epidermidis</i>	14.5 ± 0.5	7.83 ± 0.288	15.62	31.25	2	76.56
29mg	<i>S. epidermidis</i>	19.67 ± 1.443	-	31.25	31.25	1	61.11
170CAC	<i>S. epidermidis</i>	13.67 ± 0.577	6.75 ± 0.353	7.81	15.62	2	69.38
467	<i>S. haemolyticus</i>	16.67 ± 0.288	-	15.62	15.62	1	61.90
<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	16.16 ± 0.288	08 ± 00	7.81	15.62	2	Non testé

-: aucune activité.

Les *Pseudomonas* produisent une gamme de composés à base de phénazine dont les propriétés antibiotiques diffèrent largement, en fonction de la nature et de la position des groupes latéraux liés au noyau de la phénazine (Saleem *et al.*, 2010).

D'autres activités biologiques de la phénazine comprennent des produits naturels telles que des antitumoraux, des antipaludéens et des antiparasitaires. La 1,6-dihydroxyphénazine a montré une activité modeste contre les bactéries à Gram positif et

les actinomycètes, et aucune activité contre des souches à Gram négatif ou des champignons (Laursen et Nielsen, 2004).

II.4.2.8. CMI et CMB de l'extrait d'acétate d'éthyle de *P. fluorescens* PK contre les SCN

Dans la présente étude, les CMI ont été testées pour connaître la capacité de l'extrait obtenu à inhiber la croissance de 13 isolats de SCN. Cette CMI est comprise entre 3.9 à 31.25 mg/ml. La CMB est comprise entre 7.81 et 31.25 mg/ml (Tableau 19).

Selon les études de Nansathit *et al.*, (2009), l'acide phénazine-1-carboxylique a montré une inhibition plus puissante contre certains isolats tels que: *Acidovorax avenae* ssp. *citrulli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* et *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Le mécanisme d'inhibition des phénazines est le résultat de la toxicité du radical superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, décrite dans un rapport de Dwivedi et Johri (Nansathit *et al.*, 2009). Selon d'autres études menées par Borrero *et al.*, (2014), 13 composés phénaziniques, dont cinq d'origine naturelle, possèdent une activité inhibitrice contre *S. aureus* et *S. epidermidis*. L'acide phénazine-1-carboxylique et la chlororaphine n'ont montré qu'une faible activité antibiotique contre *S. aureus* (CMI > 5 µg / ml) (Laursen et Nielsen, 2004).

II.4.2.9. Effet de l'extrait phénazinique sur la formation de biofilm des SCN

Dans notre étude, l'extrait de *P. fluorescens* PK a montré une activité antibiofilm avec une réduction significative entre 32.2% et 77.56% (Tableau 19). Les staphylocoques colonisent généralement la peau et se retrouvent fréquemment dans les plaies et les implants. Fait intéressant, *S. epidermidis* n'a pas été considéré comme un agent pathogène opportuniste avant l'utilisation généralisée de dispositifs médicaux. La formation de biofilms peut donc être considérée comme un facteur de virulence et une stratégie bactérienne qui contribue à sa capacité à causer une infection (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Qin *et al.*, (2009) ont montré que les produits extracellulaires de *P. aeruginosa*, principalement des polysaccharides, perturbaient les biofilms établis par *S. epidermidis* et que ces produits extracellulaires sont des facteurs importants de concurrence microbienne permettant de vaincre *S. epidermidis*. Ces résultats peuvent fournir des indices pour le développement d'une nouvelle stratégie de contrôle de *S. epidermidis* résistants.

II.4.2.10. Caractérisation et identification du métabolite extracellulaire de *P. fluorescens* PK

II.4.2.10.a. Analyses par spectrophotomètre UV-visible

L'extrait sec de *P. fluorescens* PK a été mis dans une solution de méthanol, et après l'analyse par spectrophotomètre, nous avons obtenu un spectre UV-visible qui comporte un seul pic dans le domaine des ultraviolets à environ 220 nm qui indique la longueur d'onde pour laquelle l'absorbance est maximale (figure 40).

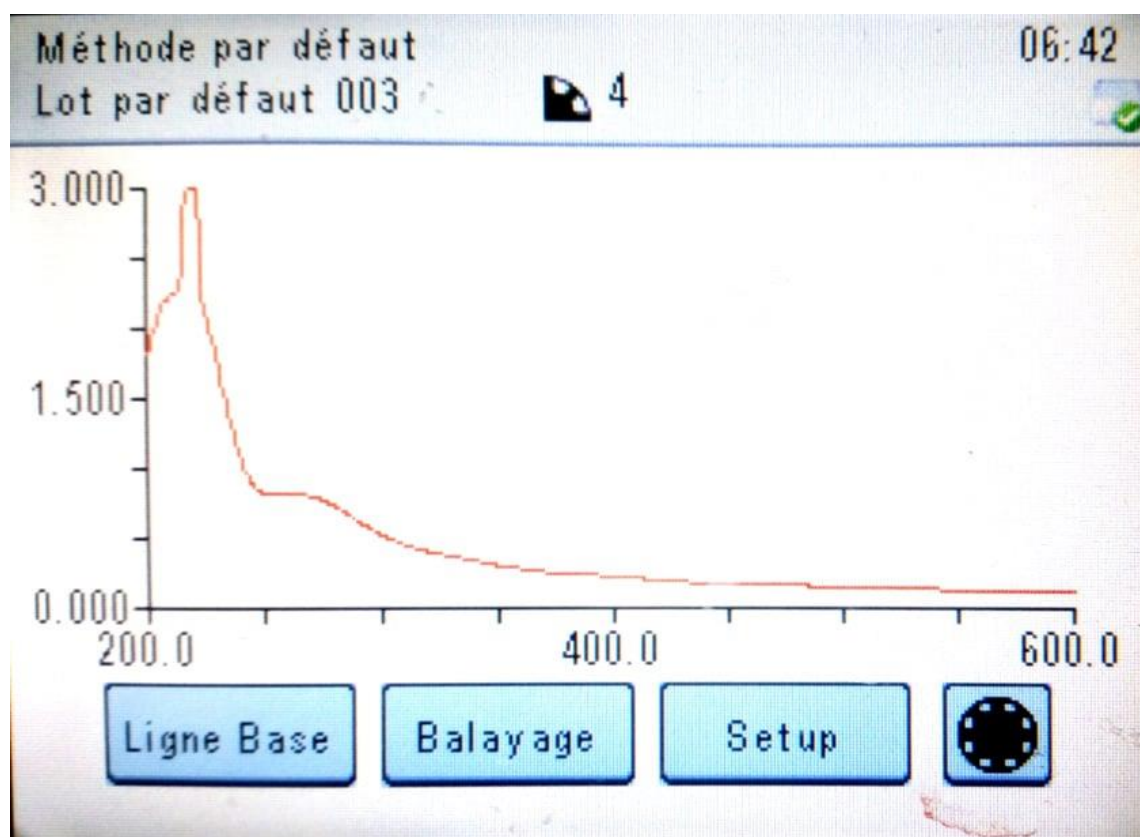


Figure 40. Spectre d'identification de l'extrait sec de *P. fluorescens* PK par spectrophotomètre UV-visible.

L'extrait a montré une longueur d'onde maximale λ_{\max} qui peut être proche à celles des composés phénaziniques des *Pseudomonas* (Amurthy Karpagam *et al.*, 2013).

II.4.2.10.b. Identification par infrarouge à transformation de fourier (FTIR)

Le spectre IR obtenu représente les vibrations caractéristiques des différentes liaisons constituant la structure de l'extrait étudié (figure 41). La majorité des pics apparaissent dans le domaine 400 à 4000 cm^{-1} . Les bandes d'absorption correspondent à la molécule dont le détail est le suivant :

- Une bande située à 3664 cm^{-1} , correspond à l'élongation du groupement O-H pour les phénols ;
- Une bande située à 2924 cm^{-1} , correspond à l'élongation du groupement C-H aromatique;
- Une bande située entre 1664 cm^{-1} , correspond à l'élongation du groupement C=N aromatique,
- Une bande située à 1401 cm^{-1} , correspond à l'élongation du groupement C-N;
- Une bande située à 1228 cm^{-1} , correspond à l'élongation C-C ;
- Une bande située à 1072 cm^{-1} , correspond à l'élongation =C-O-.

Les différentes bandes détectées rapprochent à la molécule de la hydroxyphénazine.

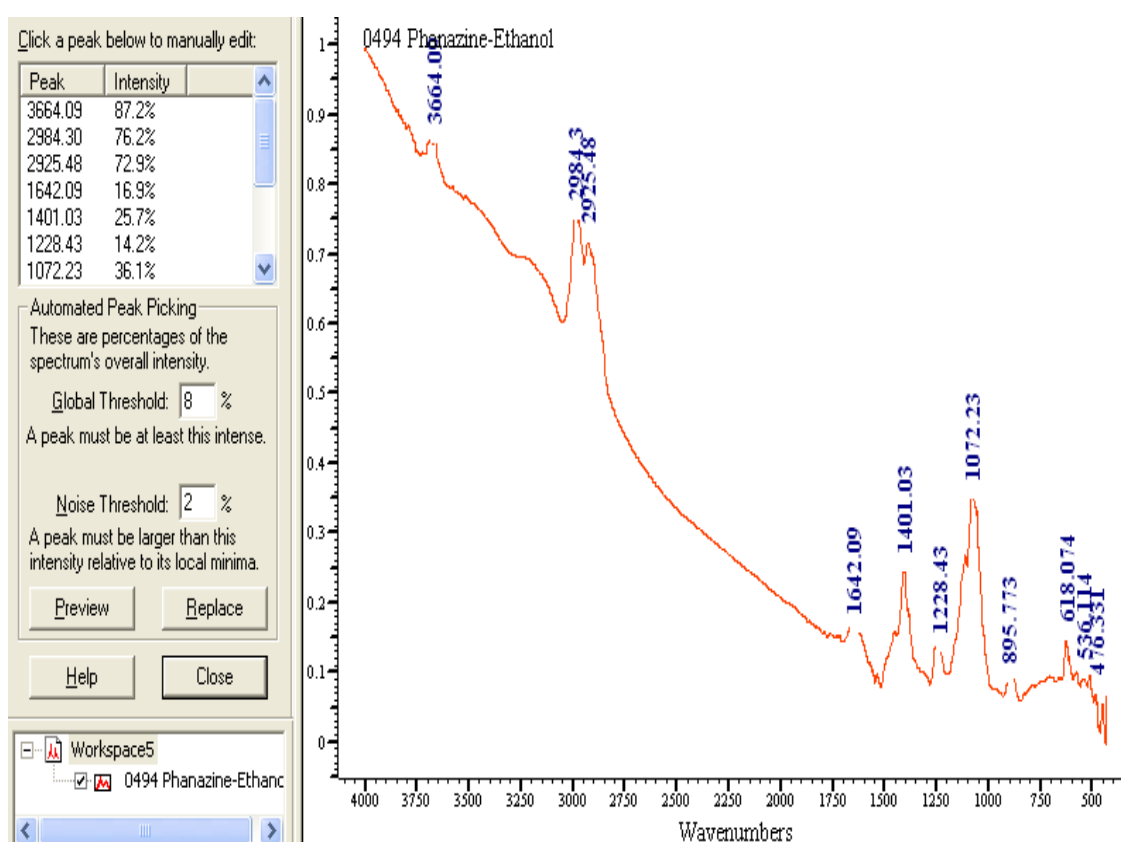


Figure 41. Spectre d'identification de métabolite de *P. fluorescens* PK par FTIR.

II.5. Activité antibactérienne et antibiofilm des huiles essentielles et des extraits méthanoliques de quelques plantes contre les SCN

II.5.1. Détermination de la teneur en eau

La détermination de la teneur en eau dans les quatre plantes a donné un taux d'humidité élevé chez *S. officinalis* L. (77.33 ± 1.17) et *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* (Boiss. et Reut.) Batt. (67.7 ± 0.87) et un taux d'humidité faible chez *J. thurifera* L. (34.63 ± 1.16) et *J. oxycedrus* L. (22.2 ± 0.3) (Tableau 20).

Tableau 20. Détermination de la teneur en eau des plantes étudiées.

	Teneur en eau (%)
<i>J. oxycedrus</i> L.	22.2 ± 0.3
<i>J. thurifera</i> L.	34.63 ± 1.16
<i>S. officinalis</i> L.	77.33 ± 1.17
<i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> (Boiss. et Reut.) Batt.	67.7 ± 0.87

El Jemli *et al.*, (2016) ont signalé des résultats proches pour *J. oxycedrus* (18.01 ± 0.08) et des résultats différents pour *J. thurifera* (17.69 ± 0.22). D'autres résultats différents ont été trouvés par Angioni *et al.*, (2003) pour *J. oxycedrus* (45 %).

II.5.2. Détermination de l'aspect, la couleur et le rendement des extraits des plantes étudiées

II.5.2.1. Huiles essentielles

Le rendement des HE a été exprimé par rapport au poids de la matière sèche végétale. L'extraction des HE par hydrodistillation a montré une rentabilité en HE chez *S. officinalis* L. de 1.25 ± 0.03 % et de 1.41 ± 0.05 % chez *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* (Boiss. et Reut.) Batt. Cette rentabilité était relativement faible chez les deux espèces du genévrier, 0.36 ± 0.04 % chez *J. oxycedrus* L. et 0.81 ± 0.04 % chez *J. thurifera* L. (Tableau 21).

Tableau 21. Détermination de l'aspect, la couleur et le rendement des huiles essentielles des plantes étudiées.

	Aspect	Couleur	Rendement (%)
<i>J. oxycedrus</i> L.	Liquide	Jaune claire	0.36 ± 0.04
<i>J. thurifera</i> L.	Liquide	Jaune claire	0.81 ± 0.04
<i>S. officinalis</i> L.	Liquide	Jaune claire	1.25 ± 0.03
<i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> (Boiss. et Reut.) Batt.	Liquide	Jaune foncée	1.41 ± 0.05

Sur les variétés du thym, Kabouche *et al.*, (2009) ont signalé un rendement de 2.1%, Alaoui Jamali *et al.*, (2012) (1.64 %), Belmalha *et al.*, (2015) (0.37%-0.38%), Heni *et al.*, (2015) (2.5%), Bousmaha-Marroki *et al.*, (2007) (3.0%- 5.1%), Amarti *et al.*, (2010) (1.2 %), Moukhles *et al.*, (2018) (0.39%) et enfin Ouknin *et al.*, (2018) (1.7 ± 0.10%).

Sur *S. officinalis* des rendements de 1.34%, 0.58%, 1.08 % et 0.65% ont été obtenus par Bozin *et al.*, (2007), Hayouni *et al.*, (2008), Senouci Bereksi et Abdelouahid (2010) et Mehalaine *et al.*, (2017) respectivement. Les rendements présentés par Khalil et Li (2011) étaient de 0.52% à une altitude de 100m et 0.14% à 500m.

Pour *J. thurifera*, Mansouri *et al.*, (2010), Bahri *et al.*, (2013) et Satrani *et al.*, (2015) ont trouvé des rendements en HE de 1.32 % , 1.03% et 1.32% respectivement.

Pour les résultats de *J. oxycedrus*, Stasis *et al.*, (1996) ont trouvé 0.15% , Adams *et al.*, (1999) (0.20%) et (0.42%), Angioni *et al.*, (2003) (0.04%), Marongiu *et al.*, (2003) (0.20%), Mansouri *et al.*, (2010) (0.15%) et Salido *et al.*, (2002) ont rapporté un rendement de *J. oxycedrus* ssp. *badia* (H. Gay) Debeaux de 0.27%.

Cette différence du rendement rapportée dans la littérature en comparaison avec nos résultats pourraient être attribuée à différents facteurs tels que la nature du sol, la variation génétique de la plante, le mode d'extraction de l'huile, le climat, la période de collecte, l'âge de la plante (Imelouane *et al.*, 2009; Heni *et al.*, 2015), l'altitude, ainsi que l'interaction de divers facteurs (Damjanović-Vratnica *et al.*, 2015), la partie de la plante extraite, et à la localisation géographique spécifique des plantes (Heni *et al.*, 2015).

II.5.2.2. Extraits méthanoliques

Chaque EM de plantes étudiées a été caractérisé par son aspect, sa couleur et son rendement par rapport à la matière sèche (Tableau 22).

Tableau 22. Détermination de l'aspect, la couleur et le rendement des extraits méthanoliques.

	Aspect	Couleur	Rendement (%)
<i>J. oxycedrus</i> L.	Pâteux	Marron	7.5 ± 0.16
<i>J. thurifera</i> L.	Poudreux	Verte	10.73 ± 0.25
<i>S. officinalis</i> L.	Poudreux	Verte	11.5 ± 0.23
<i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> (Boiss. et Reut.) Batt.	Poudreux	Verte foncée	14.58 ± 0.20

D'autres résultats différents sur *J. thurifera* ont été rapportés par Athamena *et al.*, (2019) et par Sharopov *et al.*, (2018) avec 8.5% et 4.2% respectivement.

De même, d'autres résultats différents sur *J. oxycedrus* ont été rapportés par Marino *et al.*, (2010): pour *J. oxycedrus* ssp. *oxycedrus* (11.58%) et *J. oxycedrus* ssp. *Macrocarpa* (9.69%).

II.5.3. Composition chimique des huiles essentielles des plantes étudiées

L'analyse chimique par CG-SM des HE des plantes étudiées est montrée dans le tableau 23.

Dans notre travail, 27 composés de *J. oxycedrus* L. sont identifiés parmi lesquels: l' α -pinène (56.1%), le β -phellandrène (17.9%), l' α -phellandrène (4.4%) et le myrcène (3.3%) où ils sont les composants les plus majoritaires. Des résultats différents sont trouvés par Angioni *et al.*, (2003) avec α -pinène (85.95%), δ -3-carene (2.81%) et myrcène (1.20%).

Pour *J. thurifera* L., 41 composés sont identifiés parmi lesquels : le sabinène (24.2%), le 4-terpinéol (12.5%), le méthyl eugénol (8.9%), le safrole (7.5%) et l' α -pinène (6.5%). Mansouri *et al.* (2010) ont trouvé que le composant majoritaire est le β -pinène (36.26 %) suivi par le terpin-4-ol (12.76 %), l' α -oxyde de pinène (10.89 %), la pipéritone (10 %), le β -E-ocymène (4.38 %), l' α -pinène (3.14%) et le myrcène (3.13%). Bahri *et al.*, (2013) ont trouvé les composés majoritaires suivants: le sabinène (36.2%), l'acétate de bornyle (14.6%), l' α -Phellandrène (4.5%) et le terpinèn-4-ol (4.3%) et Satrani *et al.*, (2015) ont trouvé : l' α -pinène (36.26%), le terpin-4-ol (12.76%), le pinène α -oxyde (10.89%), le pipéritone (10%), le (E) β -ocymene (4.38%), l' α -pinène (3.14%) et le myrcène (3.13%).

L'analyse de *S. officinalis* L. dans cette étude a identifié 45 composés dont l' α -thujone (16.7%), suivi par le camphre (14.9%), le 1,8-cinéole (11.8%) et le viridiflorol (10.1%). D'autres chercheurs ont trouvé des résultats différents: Elshafie *et al.*, (2016) ont trouvé le *trans*-thujone (37.9%), le camphre (13,9%) et le bornéol (7.6%); Nikolić *et al.*, (2016) ont aussi signalé la présence de *cis*-thujone (32.7%), du camphre (17.2%), du 1,8-cinéole (10.1%), de l' α -pinène (8.6%), du *trans*-thujone (7.7%) et du camphène (7.3%). Ben Khedher *et al.*, (2017) on cité que *S. officinalis* utilisée contient le camphre (25.14%), l' α -thujone (18.83%), le 1,8-cinéole (14.14%), le viridiflorol (7.98%) et le β -thujone (4.46%). Lakhali *et al.*, (2013) ont trouvé des résultats proches avec l' α -thujone (24.52%), le camphre (16.86%), le 1,8-cinéole (15.92%), le β -thujone (6.50%) et le viridiflorol (6.35%). On trouve fréquemment environ 14 composés dans les HE de *S. officinalis* avec

des quantités relativement appréciables de: l' α -thujone (1-66%), le 1,8-cinéole (1-59%), le camphre (1-50%), le viridiflorol (traces-26%), le β -thujone (1-26%), le bornéol (traces-24%), la β -pinène (traces-19%), le manool (traces-18%), l' α -humulène (traces-15%), la β -caryophyllène (traces-12%), le camphène (traces-9%), l'épinène (traces-9%), l'acétate de bornyle (traces-8%) et le limonène (traces-7%) (Miguel *et al.*, 2011).

Chez *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* (Boiss. et Reut.) Batt., 32 composés sont identifiés dans la présente étude parmi lesquels : le thymol (69%) est le composant principal, suivi par le γ -terpinène (5.1%), le *p*-cymène (3.7%), le carvacrol (3.7%) et le β -caryophyllène (3%). Ouknin *et al.*, (2018) ont trouvé des résultats différents de *T. munbyanus* avec le carvacrol (31.8%), le γ ter-terpinène (21.9%), le *p*-cymène (14.7%), le thymol (7.6%), le linalol (4.3%), le bornéol (3.9%) et l' α -terpinène (2.1%). D'après Moukhles *et al.*, (2018) : les principaux composants de *T. munbyanus* étaient le carvacrol (44.52%), le *p*-cymène (16.64%), le γ -terpinène (10.85%), ainsi que d'autres composants minoritaires comme le sesquiterpène et le β -caryophyllène.

Cette différence dont la composition chimique des HE peut être due à leur qualité et leur quantité qui varient en fonction de l'âge de la plante, les conditions écologiques, la méthode d'extraction (Khalil et Li, 2011), les organes de la plante et les conditions de stress (Kumari *et al.*, 2014).

Tableau 23. Composition chimique des huiles essentielles étudiées.

	IRL	<i>J.</i> <i>oxycedrus</i>	<i>J.</i> <i>thurifera</i>	<i>S.</i> <i>officinalis</i>	<i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i>
Tricyclène	928	0.1			
α -thujène	933		3.9	0.6	0.1
α -pinène	941	56.1	6.5	2.2	1.0
Camphène	955	0.3	0.1	3.1	0.3
Sabinène	977	0.4	24.2	2.9	
β -pinène	982	1.5	0.6	2.3	0.3
Myrcène	992	3.3	2.3	1.3	0.5
δ -2-carène	1002	0.4			
α -phellandrène	1006	4.4	0.1		0.1
α -terpinène	1020		3.9	0.7	0.9
<i>p</i> -cymène	1028	1.5	0.8	0.9	3.7
Limonène	1032		1.2	2.2	0.5
β -phellandrène	1033	17.9			0.8
1,8-cinéole	1034			11.8	
(<i>E</i>)- β -ocimène	1051		0.1		
γ -terpinène	1063	0.1	6.5	1.3	5.1
<i>Cis</i> -sabinène hydrate	1070		0.5	0.2	
Terpinolène	1090	0.8	1.7	0.5	0.1
<i>Trans</i> -sabinène hydrate	1099		0.5		
Linalool	1101		3.3	0.6	1.1
α -thujone	1105			16.7	0.7
β -thujone	1116			3.5	
<i>Cis-p</i> -menth-2-en-1-ol	1123		0.5		
α -campholénal	1126	0.3			
<i>Trans</i> -pinocarveol	1141			0.2	
<i>Trans-p</i> -menth-2-en-1-ol	1142		0.3		
Camphre	1144		0.1	14.9	1.1
Bornéol	1168			1.5	0.1
4-terpinéol	1179		12.5	2.7	0.3
α -terpinéol	1191	1.1	1.3	0.5	
Méthyl chavicole (=estragole)	1197		0.6		
Méthyl thymol	1234	0.2			0.9
Acétate de linalyle	1259		2.4	0.5	
Acétate de bornyle	1287			0.5	
Safrole	1287		7.5	1.6	
Thymol	1291		2.5	0.6	69.0
Carvacrol	1301				3.7

IRL: Indice de rétention linéaire.

Suite tableau 23.

	IRL	<i>J.</i> <i>oxycedrus</i>	<i>J.</i> <i>thurifera</i>	<i>S.</i> <i>officinalis</i>	<i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i>
Acétate de α -terpinyle	1352	0.2	0.7	0.2	
Oxyde de pipériténone	1365	1.4			
Acétate de néryle	1366		0.1		
β -bourbonène	1385	0.1			
Acétate de géranyl	1386		0.2		
Méthyl eugénol	1403		8.9	2.1	
β -caryophyllène	1419	0.3	0.2	2.0	3.0
α -humulène	1455			1.4	0.2
<i>Cis</i> -muurolo-4(14),5-diène	1463		0.1		
γ -muuroloène	1478			0.2	0.4
Germacrène D	1482	0.8	0.2	0.4	0.2
Valencène	1492				0.2
2-tridécanone	1497	0.3			
α -muuroloène	1499				0.1
β -bisabolène	1508				1.2
<i>Trans</i> - γ -cadinène	1515		0.4	0.3	0.4
δ -cadinène	1524	0.2	1.1	0.7	1.0
α -calacorène	1543				0.1
Elemol	1550		0.9	0.5	
Germacrène B	1556		0.2		
Élémicine	1557		0.8	0.3	
Oxyde de caryophyllène	1582			1.3	0.4
Viridiflorol	1591			10.1	1.6
Époxyde d'humulène II	1607			0.9	
1- <i>epi</i> -cubénol	1629		0.4	0.3	
γ -eudesmol	1630		0.2	0.2	
T-cadinol	1641			0.2	
β -eudesmol	1650		0.4	0.3	
α -eudesmol	1651		0.4	0.3	
α -cadinol	1652			0.3	
(<i>Z</i>)-9- tétradécène-1-ol	1665	2.8			
(<i>E,E</i>)-farnésol	1732	1.2			
Oxyde de manoyle	1993	0.7			
Abietatriene	2054	0.6			
Manool	2056			4.0	
Abietadiene	2081	2.5			

IRL: Indice de rétention linéaire.

Suite tableau 23.

	IRL	<i>J.</i> <i>oxycedrus</i>	<i>J.</i> <i>thurifera</i>	<i>S.</i> <i>officinalis</i>	<i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i>
Hydrocarbures monoterpéniques		86.8	51.9	18.0	13.4
Monoterpènes oxygénés		3.2	24.9	54.4	76.9
Hydrocarbures sesquiterpéniques		1.4	2.2	5.0	6.8
Sesquiterpènes oxygénés		1.2	2.3	14.4	2.0
Diterpènes		3.8	0.0	4.0	0.0
Phénylpropanoïdes		0.0	17.8	4.0	0.0
Dérivés non terpéniques		3.1	0.0	0.0	0.0
Total identifié		99,5	99.1	99.8	99.1

IRL: Indice de rétention linéaire.

II.5.4. Détermination de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes

II.5.4.1. Polyphénols totaux

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des EM a été faite en utilisant la méthode colorimétrique et a été analysée quantitativement par spectrophotomètre UV-visible pour déterminer la teneur en polyphénols totaux (Tableau 24) à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Figure 42). Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) d'extrait (mg EAG/g E). L'EM de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* a donné la teneur la plus élevée avec 112.9 ± 0.4453 mg EAG/g suivi par *S. officinalis* 85.32 ± 0.6699 mg EAG/g, puis *J. oxycedrus* 75.12 ± 0.1769 mg EAG/g et finalement *J. thurifera* qui a une faible teneur en polyphénols totaux avec 51.41 ± 1.592 mg EAG/g.

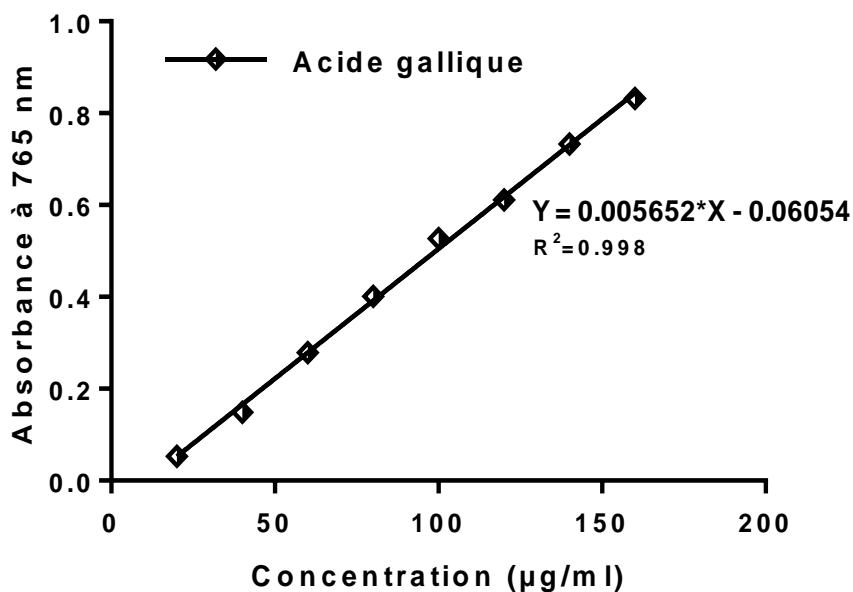


Figure 42. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Tableau 24. Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits méthanoliques des plantes étudiées.

	Polyphénols totaux (mg GAE/g E)	Flavonoïdes (mg EQ/g E)
<i>J. oxycedrus</i> L.	75.12 ± 0.1769	13.87 ± 0.1541
<i>J. thurifera</i> L.	51.41 ± 1.592	10.96 ± 0.1243
<i>S. officinalis</i> L.	85.32 ± 0.6699	17.03 ± 0.09496
<i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> (Boiss. et Reut.) Batt.	112.9 ± 0.4453	20.32 ± 0.04891

Djeridane et *al.*, (2006) dans des travaux sur l'extrait éthanolique (70%) de *J. oxycedrus* ont trouvé une teneur en polyphénols totaux égale à 12.66 ± 0.41 mg GAE/g. Aussi, le dosage des polyphénols totaux de *S. officinalis* a montré des résultats différents estimés à 34.58 ± 0.97 mg GAE/g (Taârit et *al.*, 2012). Le travail de Jasicka-Misiak et *al.*, (2018) sur deux variétés de sauge A et B a abouti à des valeurs de 93.8 ± 3.1 et 63.9 ± 2.9 mg GAE/g respectivement. Les feuilles de la sauge sont riches en composés phénoliques, tels que l'acide carnosique, l'acide rosmarinique et l'acide caféique, montrant des effets antiradicalaires, antioxydants et antibactériens (Doymaz et Karasu, 2018).

Messaoudi *et al.*, (2019) ont signalé des résultats différents de l'EM de *Thymus algeriensis* avec 79.45 mg GAE/g.

Cette différence en teneurs des polyphénols totaux chez les plantes est généralement induite en réponse à des stimuli biotiques et abiotiques tels que le rayonnement UV, la sécheresse, le froid, l'ozone, les métaux lourds, les attaques d'agents pathogènes, des blessures ou de carences en nutriments (Bettaieb *et al.*, 2011).

II.5.4.2. Flavonoïdes

Les EM des plantes étudiées sont analysés quantitativement par spectrophotomètre UV-visible pour déterminer la teneur en flavonoïdes (Tableau 24) à partir de la courbe d'étalonnage de quercétine (Figure 43). Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de quercétine par gramme (g) d'extrait (mg EQ/g E). L'EM de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* a donné la teneur la plus élevée avec 20.32 ± 0.04891 mg EQ/g suivi par *S. officinalis* (17.03 ± 0.09496 mg EQ/g), puis *J. oxycedrus* (13.87 ± 0.1541 mg EQ/g) et finalement *J. thurifera* qui a une faible teneur en flavonoïdes avec 10.96 ± 0.1243 mg EQ/g.

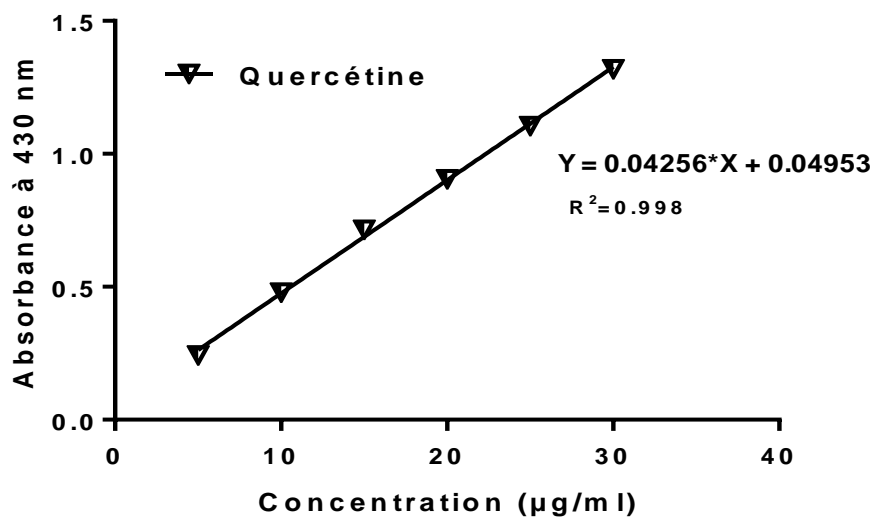


Figure 43 . Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Sharopov *et al.*, (2018) ont rapporté des résultats différents sur l'EM de *S. officinalis* (99.7 mg QE/100g). De même, Djeridane *et al.*, (2006) ont trouvé 3.50 ± 0.50 mg EQ/g dans l'extrait éthanolique (70%) de *J. oxycedrus*.

Messaoudi *et al.*, (2019) ont trouvé des résultats différents de l'EM de *T. algeriensis* (36.18 mg EQ/g).

II.5.5. Résultats des analyses par HPLC des extraits méthanoliques étudiés

La comparaison des temps de rétention des composés des EM des plantes étudiées avec ceux des différents standards a permis de suspecter la présence de différents composés phénoliques à travers les pics. Les résultats sont présentés dans les tableaux 25, 26 et 27. Les conditions de séparation utilisées ont permis d'obtenir des chromatogrammes montrés dans les figures 44, 45, 46 et 47.

La comparaison entre les chromatogrammes des deux espèces de *Juniperus* montre une similarité de 14 composés phénoliques, alors que la différence qui existe entre ces deux extraits se trouve dans la partie entre 44 min et 50 min. Cette dernière montre une richesse de l'EM chez *J. thurifera* en composés phénoliques qui ne sont pas signalés dans l'EM de *J. oxycedrus*. El-Achi *et al.*, (2014) ont identifié 11 composés de l'extrait éthanolique de *Juniperus excelsa*: l'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide hydroxybenzoïque, l'acide sinapique, l'acide férulique, l'acide coumarique, l'acide cinnamique, la myrcétine, l'héspéridine, la quercétine et l'acide ellagique.

Pour l'EM de *S. officinalis* étudié, l'analyse chromatographique par HPLC a permis de signaler 12 composés phénoliques. Gligor *et al.*, (2020) ont identifié 09 composés phénoliques de l'extrait éthanolique à 70% de cette plante, ces composés sont: la catéchine, l'acide syringique, l'acide cinnamique, le resvératrol, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide férulique, la rutine et la quercétine. Les bienfaits pour la santé de *S. officinalis* reposent sur les activités anti-inflammatoires, antidiabétiques, antioxydantes, antibactériennes, hypoglycémiques, antitumorales et neuroprotectrices. Ils sont attribués à la teneur en HE et en plusieurs composés phénoliques, tels que l'apigénine 7-O-glucoside, l'acide caféique, la quercétine 3-O-glucoside, l'isorhamnetine 3-O-rutinoside, le carnosol, l'acide rosmarinique et la rutine (Gligor *et al.*, 2020).

L'analyse par HPLC de l'EM de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* a permis de détecter 14 composés phénoliques dans la partie située entre 30 et 56 min. Onze composés phénoliques de l'EM de *Thymus hirtus* ssp. *algeriensis* ont été identifiés par Guesmi *et al.* (2014): l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide gallique, l'acide hydroxyphénylique, l'acide vanillique, l'acide syringique, le méthyl galate, l'hydroxybis, tyrosine, la rutine, (+) – la catéchine hydrate, la vanilline et la flavone.

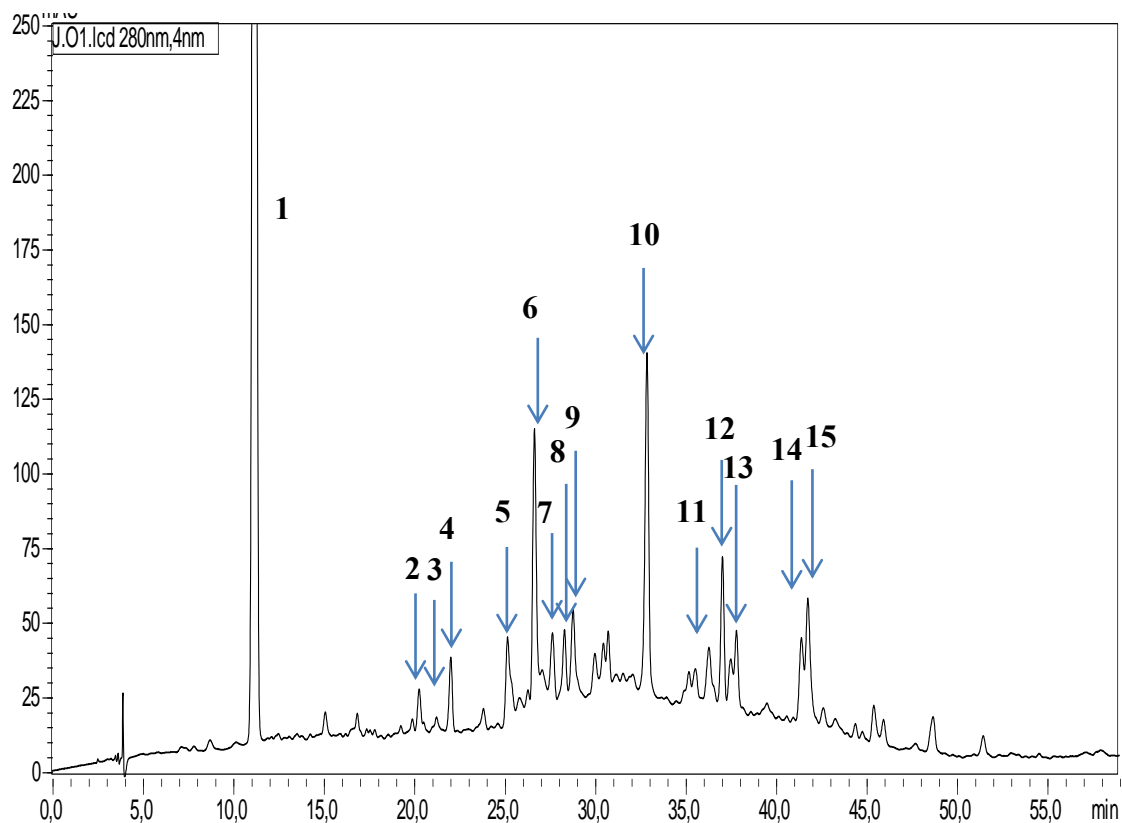


Figure 44. Chromatogramme de l'extrait méthanolique de *J. oxycedrus*.

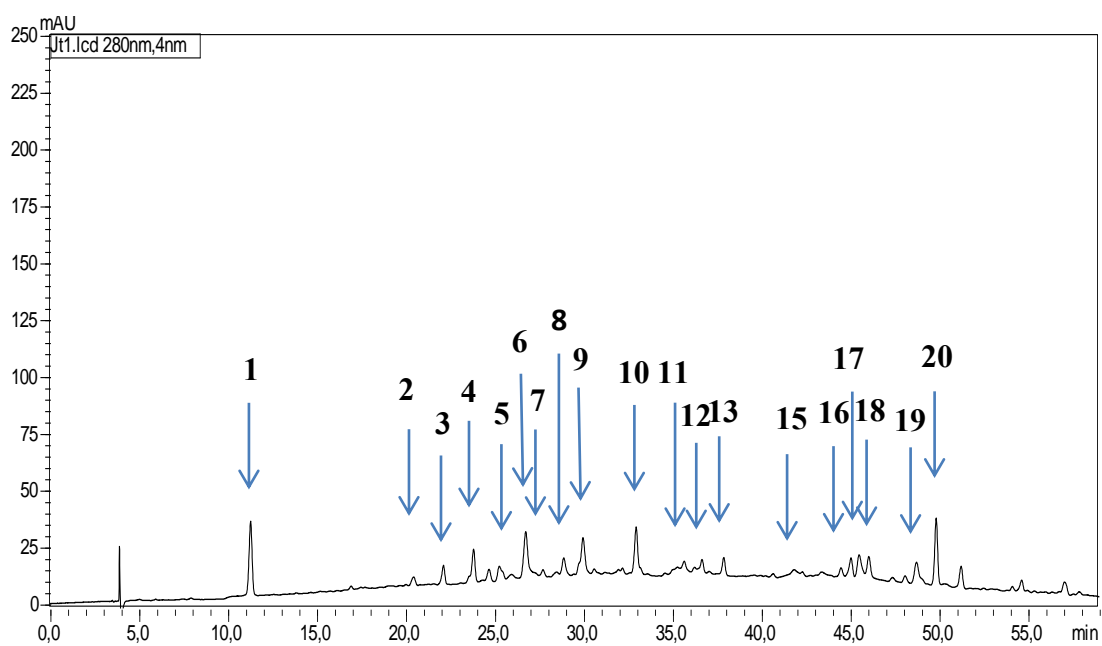


Figure 45 . Chromatogramme de l'extrait méthanolique de *J. thurifera*.

Tableau 25. Résultats d'analyse par HPLC des extraits méthanoliques de *J. oxycedrus* et *J. thurifera*.

Pic	Temps de rétention (min)	λ max	% Surface de <i>J. oxycedrus</i>	% Surface de <i>J. thurifera</i>	Molécule
1	11.202	270	36.650	1.719	Acide gallique
2	20.45	248 283	0.541	0.858	
3	22.05	315	0.757	1.141	
4	23.829	281	0.293	1.971	Naringine
5	25.18	275	1.504	1.341	Gallate d'épigallocatechine
6	26.67	273	3.333	3.609	Acide syringique
7	27.670	263 349 394	1.166	1.090	
8	28.335	279	1.210	1.192	
9	29.980	276	1.035	2.860	Catéchine
10	32.894	267 393	4.030	2.751	
11	35.566	262 374	0.558	2.751	
12	36.318	274 374 438	0.960	0.985	
13	37.068	279	1.450	0.977	
14	41.431	261 362	1.013	-	
15	41.787	252 353	1.688	2.861	
16	44.488	260 330	-	1.459	
17	45.509	249 347	-	1.709	
18	46.051	278 327 302	-	2.186	
19	48.732	277 317 327	-	2.219	
20	49.840	277 310	-	1.963	

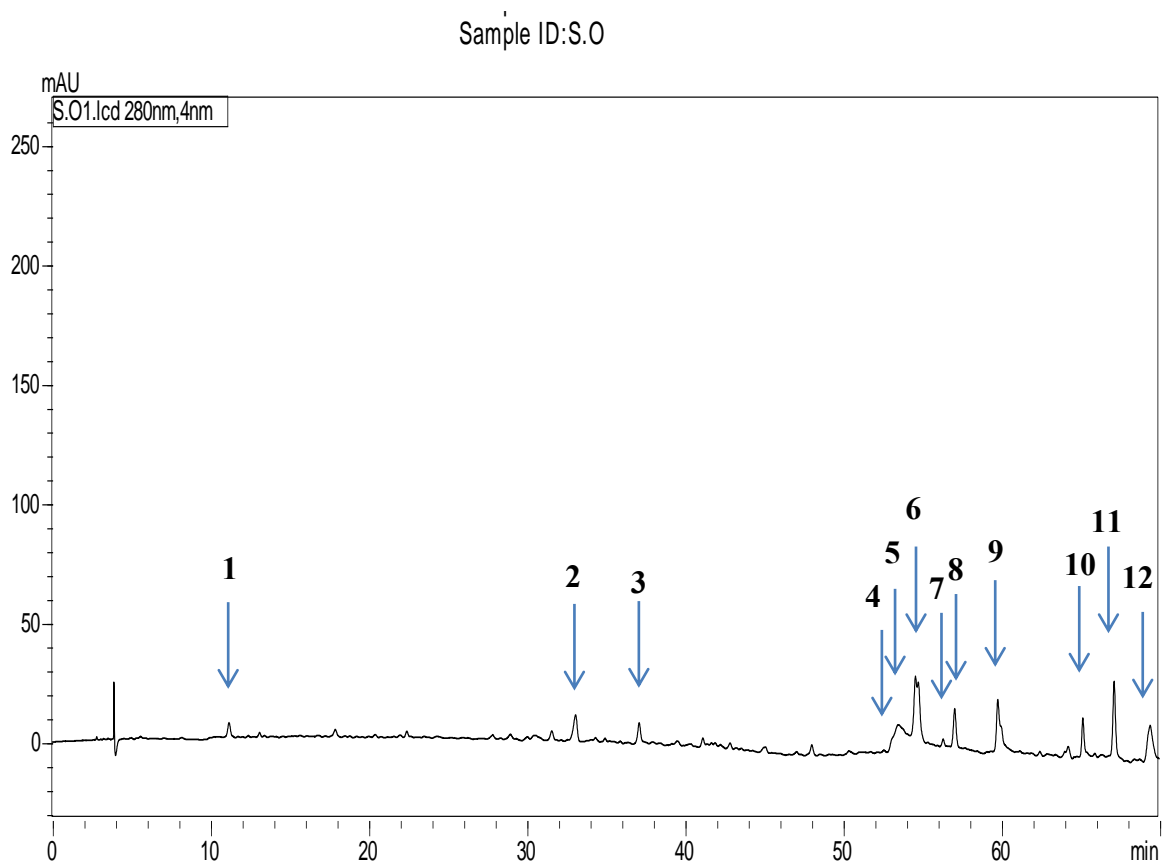


Figure 46. Chromatogramme de l'extrait méthanolique de *S. officinalis*.

Tableau 26. Résultats d'analyse par HPLC de l'extrait méthanolique de *S. officinalis*.

Pic	Temps de rétention (min)	Surface	% de surface	λ max	Molécule
1	11.185	115943	1.076	269 366	
2	33.087	193304	1.795	273	
3	37.110	147817	1.372	280	
4	53.514	787334	7.310	283 322	
5	54.574	541176	5.025	273 332	
6	54.752	493348	4.580	273 327	
7	56.324	159204	1.478	277 315	
8	57.054	361256	3.354	273 327	
9	59.778	658820	6.117	281 315 336	
10	65.154	244962	2.274	274	
11	67.129	447368	4.154	328	
12	69.407	423621	3.933	282	

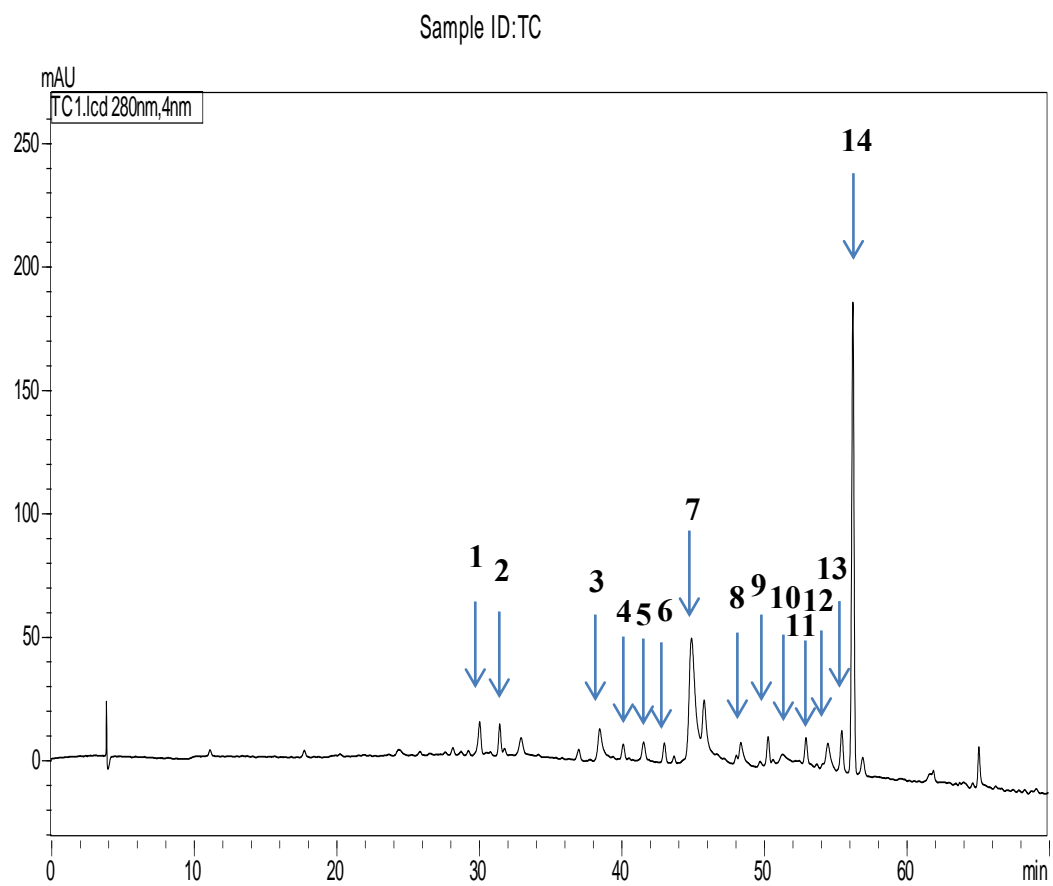


Figure 47. Chromatogramme de l'extrait méthanolique de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus*.

Tableau 27. Résultats d'analyse par HPLC de l'extrait méthanolique de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus*.

Pic	Temps de retention (min)	surface	% de surface	λ max	Molécule
1	30.096	247299	1.975	281	Naringine
2	31.502	171950	1.373	268 338	Apigénine
3	38.514	345423	2.758	285	
4	40.167	102710	0.820	285	
5	41.594	138735	1.108	282 335	
6	44.956	1618936	12.926	326	Acide chlorogénique
7	45.840	694945	5.549	285 391	
8	48.416	189450	1.513	282 340	
9	50.331	168573	1.346	284	
10	51.344	253152	2.021	345 410	
11	52.987	208842	1.667	270 343	
12	54.521	239359	1.911	262 335	
13	55.498	229253	1.830	275 344	
14	56.276	2182317	17.424	273 344	Gallate d'épicatéchine

II.5.6. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits des plantes

II.5.6.1. Effets inhibiteurs des huiles essentielles sur les SCN

Les tests de l'activité antibactérienne des HE ont révélé que l'inhibition de la croissance des SCN varie en fonction de l'espèce et le choix de l'HE testée (figure 48).

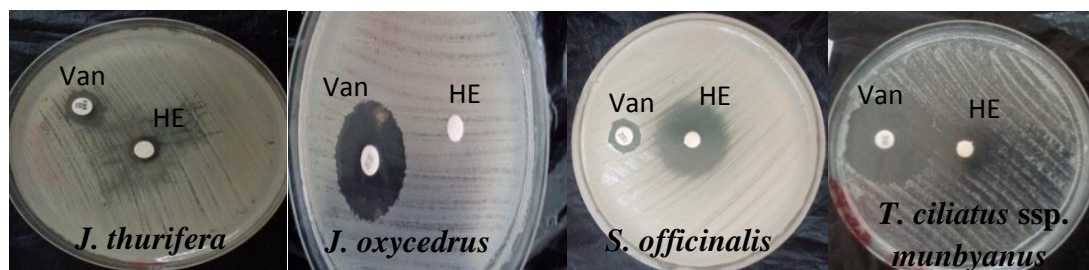


Figure 48. Diamètres des zones d'inhibition d'un SCN par les huiles essentielles de plantes étudiées.

Van: vancomycine (30 μ g); **HE:** huile essentielle pure.

Les résultats apparus dans le tableau 28 montrent que l'HE de *T. ciliatus ssp. munbyanus* (Boiss. et Reut.) Batt. a une bonne activité inhibitrice sur les isolats de SCN avec un diamètre moyen d'inhibition de 24.99 mm suivi par *S. officinalis* L. avec un diamètre moyen d'inhibition de 13.38 mm. Cependant, une très faible activité a été observée avec les deux HE de *J. oxycedrus* L. et *J. thurifera* L. avec des diamètres moyens d'inhibition de 6.67 mm et 6.40 mm respectivement.

Selon le test d'ANOVA à un facteur, les HE de toutes les plantes n'avaient pas un effet significatif sur les bactéries parce que le $P > 0.05$.

Tableau 28. Moyennes des diamètres de zones d'inhibition des huiles essentielles des plantes sur les espèces de SCN.

	<i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> (mm)	<i>S. officinalis</i> (mm)	<i>J. thurifera</i> (mm)	<i>J. oxycedrus</i> (mm)
<i>S. epidermidis</i>	26.35	14.56	6.43	6.32
<i>S. haemolyticus</i>	24.67	14.23	6.32	6.97
<i>S. hominis</i>	25.14	17.58	6.52	7.39
<i>S. chromogenes</i>	23.36	7.91	6.33	6.00
Autres espèces	25.43	12.62	6.41	6.70
Moyenne	24.99	13.38	6.40	6.67

L'activité antibactérienne des HE dépend de leur composition chimique. Elles sont généralement caractérisées par deux ou trois composants principaux à des concentrations assez élevées (jusqu'à 80%) par rapport aux autres composants présents uniquement à l'état de traces (Ait-Ouazzou *et al.*, 2011).

Khadir *et al.*, (2013) ont rapporté des résultats similaires avec l'HE de *T. munbyanus* ssp. *ciliatus* sur 19 isolats de SARM avec un diamètre de 25.8 mm.

De Billerbeck (2007) et Meziou-Chebouti *et al.*, (2014) ont obtenu des valeurs de zones d'inhibition différentes par *S. officinalis* avec deux isolats cliniques de *S. aureus* (35 mm pour chacun).

Pour *J. thurifera*, Bahri *et al.*, (2013) ont trouvé des zones d'inhibition sur *S. aureus* (ATCC 33862) avec un diamètre de 27.0 mm. Le travail de Zeraib *et al.*, (2014) sur les SARM en utilisant l'HE des feuilles dioïques de *J. thurifera* a montré des diamètres de zones d'inhibition de 12.66 ± 1.15 mm et 13.33 ± 1.15 mm respectivement.

II.5.6.2. Effets inhibiteurs des extraits méthanoliques sur les SCN

Les tests de l'activité antibactérienne des EM ont révélé que l'inhibition de la croissance des SCN varie en fonction de l'espèce de ces bactéries, de la concentration et le choix de l'extrait testé (figure 49).

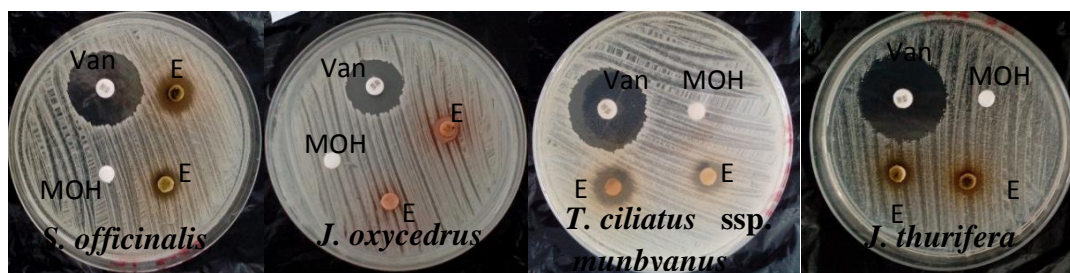


Figure 49. Diamètres des zones d'inhibition des extraits méthanoliques sur les SCN.

Van: vancomycine (30 µg); **E :** extrait méthanolique ; **MOH :** méthanol.

Les résultats apparus dans le tableau 29 montrent que l'EM de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* a une bonne activité inhibitrice sur les isolats de SCN avec un diamètre d'inhibition de 15.76 mm suivie par *S. officinalis* avec 8.66 mm à la concentration de (200 mg/ml).

Cependant, une activité nulle à très faible a été observée chez les extraits de *J. oxycedrus* et *J. thurifera* avec des diamètres d'inhibition de 6.00 mm et 6.28 mm respectivement à la concentration de 500mg/ml.

Selon le test d'ANOVA à un facteur, l'EM de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* a un effet significatif sur les isolats de SCN parce que le $P = 0.05$. Ensuite, un test post-hoc (test de tukey) est réalisé pour savoir les isolats influencés par l'EM de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus*, selon les résultats : l'activité de cet extrait est significative avec *S. epidermidis*.

Tableau 29. Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des extraits méthanoliques des plantes étudiées sur les espèces de SCN.

	<i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> (mm)	<i>S. officinalis</i> (mm)	<i>J. thurifera</i> (mm)	<i>J. oxycedrus</i> (mm)
<i>S. epidermidis</i>	13.38	8.88	6.43	6.00
<i>S. haemolyticus</i>	14.22	7.63	6.00	6.00
<i>S. hominis</i>	18.43	9.31	6.31	6.00
<i>S. chromogenes</i>	16.80	10.58	6.58	6.00
Autres espèces	16.00	6.91	6.12	6.00
Moyenne	15.76	8.66	6.28	6.00

La concentration de 300 µg/disque de l'EM de *J. oxycedrus* n'a enregistré aucune activité sur deux isolats de *S. epidermidis* selon Karaman *et al.*, (2003). Aussi, aucune activité de deux sous espèces de *J. oxycedrus* testé sur *S. aureus* a été rapportée par Marino *et al.*, (2010). Cependant, Diğrak *et al.*, (1999) ont trouvé des résultats différents avec cet extrait testé sur *S. aureus* Cowan I avec un diamètre de 19 mm.

Hassan *et al.*, (2017) ont rapporté que l'extrait éthanolique de *Thymus capitatus* n'a aucune activité sur *S. epidermidis* isolé des patients atteints des infections des voies respiratoires dans les hôpitaux de Kasr El-Aini, El-Rahma et Masr El Gedida en Égypte alors qu'il ont trouvé une activité sur un isolat de *S. epidermidis* isolé de patients atteints d'infections des voies respiratoires à la clinique universitaire de Giessen en Allemagne avec 13.5 ± 0.7 mm (une concentration de 5 mg/disque). Il est probable que l'effet antimicrobien montré par l'extrait testé de thym est dû aux polyphénols, et en particulier les flavonoïdes (Hassan *et al.*, 2017).

II.5.7. Détermination de CMI et CMB des extraits de plantes étudiées

II.5.7.1. Huiles essentielles de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* et *S. officinalis*

Les tests de CMI et CMB des HE ont révélé que l'activité bactéricide varie en fonction de l'espèce des SCN et de la concentration et le choix de l'HE testée.

Dans le tableau 30, les SCN sont plus sensibles à l'HE de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* avec des valeurs moyennes de CMI et CMB égales à 2.65 mg/ml et 5.31 mg/ml respectivement suivis par *S. officinalis* avec des valeurs moyennes de CMI et CMB égales à 27.53 mg/ml et 31.88 mg/ml respectivement.

Selon le test d'ANOVA à un facteur, les CMI de l'HE de *S. officinalis* a un effet significatif sur les SCN parce que le $p=0.03$ ($P \leq 0.05$). Ensuite, un test post-hoc (test de tukey) est réalisé pour savoir les SCN qui sont influencés par la CMI de cette HE, selon les résultats : la CMI de *S. officinalis* est significative avec *S. hominis*. Les CMB des HE de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* et *S. officinalis* n'avaient pas un effet significatif sur les SCN parce que les $P > 0.05$.

Tableau 30 . CMI, CMB et CMB/CMI des HE de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* et *S. officinalis* sur les espèces de SCN.

	<i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i>			<i>S. officinalis</i>		
	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMB/ CMI	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMB/ CMI
<i>S. epidermidis</i>	3.31	6.84	2.06	37.01	37.36	1.01
<i>S. haemolyticus</i>	2.55	4.61	1.80	26.33	43.15	1.63
<i>S. hominis</i>	3.49	6.02	1.72	8.20	15.36	1.87
<i>S. chromogenes</i>	1.59	4.40	2.76	50.00	>100	ND
Autres espèces	2.34	4.71	2.01	16.14	32.03	1.98
Moyenne	2.65	5.31	2.00	27.53	31.97	1.62

ND: non déterminé

Dans notre travail, le rapport de CMB/CMI est bactéricide ($CMB/CMI \leq 2$) avec les HE de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* et *S. officinalis* sur toutes les espèces.

Des résultats différents liés à l'HE de *T. ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. *eu-ciliatus* sur *S. aureus* clinique ont été trouvés par Bousmaha-Marroki *et al.*, (2007) dont la CMI de 920 µg/ml. Khadir *et al.*, (2013) ont rapporté aussi la CMI moyenne de *T. munbyanus* ssp. *ciliatus* sur 19 espèces de SARM avec 0.26% (v/v). Aussi Moukhles *et al.*, (2018) ont déclaré que la CMI de *T. munbyanus* sur *S. aureus* est de 0.125% (v/v) et la CMB est de 0.125% (v/v). Cette activité peut être due au thymol. Le principal mode d'action antibactérienne de ce composant n'est pas complètement compris, mais les chercheurs ont pensé qu'il provoque une perturbation des membranes interne et externe chez la bactérie et interagit avec les protéines membranaires et les cibles intracellulaires (Chouhan *et al.*, 2017) et/ou perturbe les systèmes enzymatiques bactériens (Tural et Turhan, 2017). Des études scientifiques ont démontré que le thymol peut exercer des effets bénéfiques dans le traitement de plusieurs troubles affectant le système respiratoire, cardiovasculaire et nerveux. Ce composant renforce également les propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, immunomodulatrices, anti-inflammatoires et antispasmodiques (Kryvtsova *et al.*, 2019).

Des résultats différents de *S. officinalis* sont trouvés par Delamare *et al.*, (2007) pour *S. epidermidis* IBSe-101 avec des CMI de 5 à 10 mg/ml et des CMB >10.0 mg/ml; alors que Soković *et al.*, (2007) ont rapporté une forte activité de *S. officinalis* sur *S.*

epidermidis (ATCC 12228) avec des valeurs de CMI et CMB égales à 6.0 µg/ml pour chacune. Pierozan *et al.*, (2009) ont trouvé aussi que *S. aureus* testé par deux plantes de *S. officinalis* 1 et *S. officinalis* 2 a donné des CMI de 3.42 mg/ml et 2.87 mg/ml respectivement. L'activité antimicrobienne de *S. officinalis* a été reconnue depuis plusieurs décennies et a été attribuée à la présence du 1,8-cinéole, d' α -thujone et du camphre (Fournomiti *et al.*, 2015; Kaèániová *et al.*, 2017). Elle est aussi attribuée au β -thujone, le bornéol, le *p*-cymène, et autres (Pierozan *et al.*, 2009).

II.5.7.2. Extraits méthanoliques de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* et *S. officinalis*

Les tests de CMI et de CMB des EM de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* et *S. officinalis* ont révélé que l'activité bactéricide varie en fonction de l'espèce des SCN, la concentration et le choix de l'extrait testé.

Les résultats dans le tableau 31 montrent que les SCN sont plus sensibles à l'EM de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* avec des valeurs moyennes de CMI et CMB égales à 7.54 mg/ml et 13.55 mg/ml respectivement suivis par *S. officinalis* avec des valeurs moyennes de CMI et CMB égales à 47.55 mg/ml et 57.47 mg/ml respectivement. Selon le test d'ANOVA à un facteur, les valeurs de CMI et CMB des deux EM n'avaient pas un effet significatif sur les SCN parce que $P > 0.05$.

Tableau 31. CMI, CMB et CMB/CMI des extraits méthanoliques de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* et *S. officinalis* sur les espèces de SCN.

	<i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i>			<i>S. officinalis</i>		
	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMB/ CMI	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMB/ CMI
<i>S. epidermidis</i>	12.94	22.76	1.75	51.3	68.28	1.33
<i>S. haemolyticus</i>	9.54	18.86	1.97	12.5	25	2
<i>S. hominis</i>	2.34	4.52	1.93	27.08	54.16	2
<i>S. chromogenes</i>	5.85	8.59	1.46	46.87	50	1.06
Autres espèces	7.03	13.02	1.85	100	ND	ND
Moyenne	7.54	13.55	1.79	47.55	49.36	1.59

ND: non déterminé.

Le rapport moyen de CMB/CMI est bactéricide ($CMB/CMI \leq 2$) chez les deux EM de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* et *S. officinalis* sur toutes les espèces de SCN étudiées.

Mojab *et al.*, (2008) ont déclaré que la faible concentration trouvée de l'EM de *Thymus daenensis* dans une étude sur 10 SARM est de 6.25 mg/ml. Cette activité de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* peut être due aux flavonoïdes qui ont la capacité de faire un complexe avec les protéines extracellulaires et les protéines solubles et former un complexe avec les parois cellulaires bactériennes, aussi les flavonoïdes lipophiles peuvent également perturber les membranes bactériennes (Mojab *et al.*, 2008).

Ali et Aboud (2010) ont obtenu des valeurs de CMI et de CMB égales à 25 mg/ml de l'EM de *S. officinalis* testé sur *S. aureus* et les mêmes études ont été faites par Et-Touys *et al.*, (2016) et ils ont trouvé la CMI et la CMB égales à 2 mg/ml pour chacune. Plusieurs études ont été menées sur l'activité antibactérienne de *S. officinalis* et montrent la capacité des extraits de cette plante à inhiber la croissance des bactéries pathogènes (Et-Touys *et al.*, 2016).

II.5.8. Effet des huiles essentielles et des extraits méthanoliques sur la formation de biofilm des SCN

II.5.8.1. Huiles essentielles de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* et *S. officinalis*

L'évaluation des HE de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* et *S. officinalis* sur les SCN producteurs de biofilms ont indiqué que l'inhibition du biofilm était plus élevée par *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* avec 65.63 % que l'HE de *S. officinalis* (53.13 %) (tableau 32).

Selon le test d'ANOVA à un facteur, l'HE de *T. munbyanus* ssp. *ciliatus* n'a pas d'effet significatif sur les SCN producteurs de biofilm car la valeur de p est >0.05 ($p=0.997$) alors que l'HE de *S. officinalis* a un effet significatif sur ces bactéries car le $p = 0.000133$ avec une différence significative entre les espèces. Le test post-hoc (test de tukey) a été utilisé ce qui a permis d'observer que l'HE de *S. officinalis* est active sur tous les SCN.

Tableau 32. Activité antibiofilm des huiles essentielles de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* et *S. officinalis*.

	<i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> (%)	<i>S. officinalis</i> (%)
<i>S. epidermidis</i>	65.78	48.22
<i>S. haemolyticus</i>	66.77	49.22
<i>S. hominis</i>	64.78	65.00
<i>S. chromogenes</i>	65.47	43.79
Autres espèces	65.36	59.45
Moyenne	65.63	53.13

Le thymol de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* peut empêcher les premières étapes de la formation de biofilms et interférer avec leur maturation du fait de l'inhibition de l'activité métabolique des biofilms. Tous ces événements peuvent conduire à bloquer la production d'excroissances en forme de thalles (formes filamenteuses) au début de la formation du biofilm. Ce dernier étant un événement multifactoriel, les divers mécanismes du thymol (terpènes) peuvent affecter diverses étapes de leur développement (Memar *et al.*, 2017).

De plus, dans une étude sur la formation de biofilm des staphylocoques, Al-Shuneigat *et al.*, (2005), ont démontré une sensibilité accrue des formes cellulaires sessiles (adhérées) à une HE par rapport aux cellules planctoniques. Le thymol est un composé phénolique qui possède à la fois des propriétés hydrophiles et hydrophobes, ce qui peut améliorer la diffusion de ce composé dans un biofilm et permettre son accès aux cellules bactériennes où il altère la perméabilité de leurs membranes plasmiques (Karpanen *et al.*, 2008).

II.5.8.2. Extraits méthanoliques de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* et *S. officinalis*

Les concentrations inhibitrices de la croissance des EM de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* et *S. officinalis* ont été testées sur la formation de biofilm chez les SCN. Les résultats du tableau 33 montrent que l'inhibition du biofilm est moyennement élevée pour l'EM de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* avec 58.08 % comparativement à l'EM de *S. officinalis* (49.72 %).

Selon le test de Kruskal Wallis, l'EM de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* n'a pas un effet significatif sur les SCN car la valeur $p = 0.523$ ($p > 0.05$). Selon le test d'ANOVA à un facteur, l'EM de *S. officinalis* n'a pas un effet significatif sur les SCN parce que le $p = 0.346$ ($p > 0.05$).

Tableau 33. Activité antibiofilm des extraits méthanoliques de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* et *S. officinalis*.

	<i>T. ciliatus</i> ssp. <i>munbyanus</i> (%)	<i>S. officinalis</i> (%)
<i>S. epidermidis</i>	55.66	50.79
<i>S. haemolyticus</i>	57.50	46.03
<i>S. hominis</i>	61.09	53.46
<i>S. chromogenes</i>	59.34	51.04
Autres espèces	56.81	47.31
Moyenne	58.08	49.72

Les résultats de ce travail indiquent que bien que la famille des Cupressacées (*J. thurifera* et *J. oxycedrus*) représente un nombre élevé des composés phénoliques identifiés par HPLC par rapport à la famille des Lamiacées (*T. ciliatus* ssp. *munbyanus* et *S. officinalis*), cette dernière par ses EM a montré une activité antistaphylococcique meilleure par rapport à la première famille.

Conclusion

Conclusion

Au total de 66 SCN isolés au Centre Anti-Cancer de Batna (Algérie), 45.45% sont originaires du service d'onco-hématologie, 42.42% de ces isolats provenaient des hémocultures. Principalement, 80.3% de ces isolats sont résistants à la méthicilline (céfoxitine), 98.5% à la pénicilline G et 74.24% présentent une résistance à l'oxacilline. Aucun isolat de ces SCN n'était résistant au chloramphénicol et à la vancomycine. Les résultats de la méthode TCP montrent que 89.39% des isolats forment des biofilms d'intensités différentes et ceux de la méthode RCA indiquent que 31.82% des SCN ont formé un biofilm. La présence de *mecA* et du gène *icaAD* ne correspond pas toujours à la résistance aux antibiotiques et à la formation de biofilms *in vitro*.

L'isolement des *Pseudomonas* a été réalisé à partir des racines d'une plante qui fait partie des graminées sauvages *Hordeum murinum*. Les 29 isolats de *Pseudomonas* ont subi un test d'antagonisme sur milieu gélosé MH afin d'évaluer leur pouvoir antistaphylococcique contre 20 isolats cliniques de SCN. Les zones d'inhibition varient entre 3 à 55 mm, la zone la plus grande a été constatée chez l'isolat de *P. fluorescens* PK contre l'isolat n° 94C de *S. epidermidis*. 14 différents *Staphylococcus* ssp. ont été inhibés par l'isolat de *P. fluorescens* PK. Les autres *Pseudomonas* ont inhibé au moins un isolat mais la majorité a inhibé un nombre non négligeable de *Staphylococcus* avec une diversité dans leur spectre, par conséquent tous les SCN (sauf un seul isolat) ont été inhibés par tous les isolats de *Pseudomonas* confondus. Ceci reflète une forte activité des *Pseudomonas* contre les staphylocoques et reflète aussi la diversité et la différence entre les substances inhibitrices responsables de l'activité antagoniste chez chaque isolat. L'extrait de *P. fluorescens* PK a montré une activité antistaphylococcique contre 13 isolats avec les diamètres de zones d'inhibition qui varient entre 6.75 et 27.33 mm, les CMI et les CMB sont comprises entre 3.9 à 31.25 mg/ml et 7.81 et 31.25 mg/ml respectivement et l'activité antibiofilm est comprise entre 32.2% et 77.56%.

Les résultats de l'analyse de la composition chimique des plantes par la CG-SM ont révélé une présence de 27 composés chez *J. oxycedrus* les plus majoritaires sont : l' α -pinène (56.1%), le β -phellandrène (17.9%), l' α -phellandrène (4.4%) et le myrcène (3.3%). Chez *J. thurifera*, 41 composés sont identifiés parmi lesquels : le sabinène (24.2%), le 4-

terpinéol (12.5%), le méthyl eugenol (8.9%), le safrole (7.5%) et l' α -pinène (6.5%) qui sont les plus majoritaires. Pour *T. ciliatus* ssp. *munbyanus*, 32 composés sont identifiés parmi lesquels : le thymol (69%) est le composant principal, suivi par γ -terpinène (5.1%), le *p*-cymène (3.7%), le carvacrol (3.7%) et le β -caryophyllène (3%). 45 composés sont déterminés chez *S. officinalis* parmi lesquels: l' α -thujone (16.7%) qui est le composant majoritaire, suivi par le camphre (14.9%), le 1,8-cinéole (11.8%) et le viridiflorol (10.1%).

L'EM de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* a donné la teneur en polyphénols totaux la plus élevée avec 112.9 ± 0.4453 mg EAG/g suivi par *S. officinalis* (85.32 ± 0.6699 mg EAG/g), puis *J. oxycedrus* (75.12 ± 0.1769 mg EAG/g) et finalement *J. thurifera* qui a une faible teneur en polyphénols totaux avec 51.41 ± 1.592 mg EAG/g. Aussi, l'EM de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* a donné la teneur en flavonoïdes la plus élevée avec 20.32 ± 0.04891 mg EQ/g suivi par *S. officinalis* (17.03 ± 0.09496 mg EQ/g), puis *J. oxycedrus* (13.87 ± 0.1541 mg EQ/g) et finalement *J. thurifera* qui a une faible teneur en flavonoïdes avec 10.96 ± 0.1243 mg EQ/g.

Les résultats de l'analyse des polyphénols par l'HPLC des EM des plantes étudiées ont révélé une présence de 15 composés chez *J. oxycedrus*, 19 composés chez *J. thurifera*, 12 composés chez *S. officinalis* et finalement 14 composés phénoliques chez *T. ciliatus* ssp. *munbyanus*.

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'HE et de l'EM de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* (notamment à la concentration de 200mg/ml) ont montré une bonne activité inhibitrice sur les isolats de SCN avec des diamètres moyens d'inhibition de 24.99 mm et de 15.76 mm respectivement. Cependant, une faible activité a été observée avec les extraits de *J. oxycedrus* et *J. thurifera* avec des diamètres d'inhibition de 6.00 mm et 6.28 mm à la concentration de 500 mg/ml. Les SCN sont plus sensibles à l'HE et l'EM de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* avec des valeurs de CMI et CMB égales à 2.65 mg/ml et 5.31 mg/ml et 7.54 mg/ml et 13.55 mg/ml respectivement. L'activité antibiofilm de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* est appréciable pour l'HE et l'EM avec un pourcentage de 65.63 % et 58.08 % respectivement suivie par l'HE et l'EM de *S. officinalis* avec 53.13 % et 49.72 % respectivement.

À la fin de ce travail, nous trouvons important de souligner les recommandations suivantes:

Nos résultats montrent un taux élevé de résistance aux antibiotiques chez les SCN étudiés avec des capacités à former des biofilms, ce qui fait de ces bactéries un danger potentiel pour les patients hospitaliers et une source de complications notamment pour les patients du Centre Anti-Cancer et surtout chez ceux qui suivent une chimiothérapie où le nombre de globules blancs diminue et le système immunitaire s'affaiblit.

La mise en œuvre de mesures et de contrôle de gestion des antibiotiques est nécessaire afin d'éviter les utilisations abusives et excessives des antibiotiques et aussi pour éviter le développement et la dissémination des bactéries résistantes. De même, l'émergence des SCN en tant qu'agents pathogènes formant des biofilms peut être aussi le résultat de l'utilisation croissante des dispositifs médicaux. Le personnel soignant doit donc respecter attentivement les principes d'hygiène et d'asepsie dans l'application de ces dispositifs médicaux pour éviter le risque de contamination par ces bactéries et suivre les conditions sur les soins à apporter. Finalement, l'hygiène personnelle (lavage des mains, bain...) et le port de bavettes doivent être strictement réguliers.

En perspective, il serait intéressant de poursuivre des études *in vivo* en utilisant des biomatériaux implantés dans des animaux de laboratoire pour vérifier l'efficacité antimicrobienne et antibiofilm des HE et des extraits étudiés. Enfin, le développement de nouvelles substances à base de plantes ou d'origines microbiennes nécessite un fractionnement entre les constituants et une compréhension de leurs mécanismes d'action et de poursuivre les procédés pour obtenir les principes actifs de ces métabolites.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abalain-Colloc M. L.**, Béraud J., Lay-Roguès G. L., Tandé D. et Tran Minoui A. (2014) Bactériologie. In" Béraud J., Le technicien d'analyses biomédicales. 2^{ème} Ed., 936-1067".
- Abu-Darwish M. S.**, Cabral C., Ferreira I. V., Gonçalves M. J., Cavaleiro C., Cruz M. T., Albdour T. H. and Salgueiro L. (2013) Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. *Bio Med Research International*, 2013, 1-9.
- Adams R. P.**, Altarejos J. , Fernandez C. and Camacho A. (1999) The Leaf Essential Oils and Taxonomy of *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus*, subsp. *badia* (H. Gay) Debeaux, and subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. *J Essent Oil Res.*, 11, 167-172.
- Ahmed R.**, Singh S., Farooq U., Bharti A. K. and Kaur N. (2016) Occurrence and antimicrobial susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant Coagulase-Negative Staphylococci isolated from different clinical specimens from the patients hospitalized in teerthanker mahaveer medical college and research centre, Moradabad, India. *Int. J. Sci. Study*, 3 (11), 41-47.
- Ait-Ouazzou A.**, Lorán S., Arakrak A., Laglaoui A., Rota C., Herrera A., Pagán R. and Conchello P. (2011) Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Res Int.*, 45(1), 1-7.
- Al Tayyar I. A.**, AL-Zoubi M. S., Hussein E., Khudairat S. and Sarosiekf K. (2015) Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from clinical specimens in Northern of Jordan. *Iran J Microbiol* , 7(6), 294-301.
- Alamgir A. N. M.** (2018) therapeutic use of medicinal plants and their extracts: phytochemistry and bioactive compounds. Volume 2, Ed. Springer, 724-725.
- Alaoui Jamali C.**, El Bouzidia L., Bekkouchea K., Lahcenb H., Markouka M., Wohlmuthc H., Leach D., and Abbad A. (2012) Chemical composition and antioxidant and anticandidal activities of essential oils from different wild moroccan *Thymus* Species. *Chem Biodivers.*, 9, 1188-1197.
- Al-Bayati F. A.** (2008) Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *J Ethnopharmacol.*, 116, 403-406.
- Ali M. R.** and Aboud A. S. (2010) Antimicrobial activities of aqueous and methanolic extracts from *Salvia officinalis* and *Salix acmophylla* used in the treatment of wound infection isolates. *Ibn Al- Haitham J For Pure & Appl Sci.*, 23 (3), 25-39.
- Al-Shuneigat J.**, Al-Sarayreh S., Al-Saraireh Y., Al-Tarawneh I., Al-Qudah M. and Albataineh E. (2014) Effects of wild *Artemisia herba-alba* essential oil on biofilm forming bacteria. *Br J Pharm Res.*, 4(19), 2273-2280.
- Al-Snafi A. E.** (2018) Pharmacological and therapeutic effects of *Juniperus oxycedrus*- a review. *IAJPS*, 05 (04), 2198-2205.

- Altschul S. F.**, Gish W., Miller W., Myers E. W. and Lipman D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3), 403-410.
- Amarti F.**, Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M., Abdelaziz C. (2010) Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc *Biotechnol Agron Soc Environ.*, 14(1), 141-148.
- Amurthy Karpagam S.**, Sudhakar T. and Lakshmi pathy M. (2013) Microbicidal response of pyocyanin produced by *P. aeruginosa* toward clinical isolates of fungi. *Int J Pharm Pharm Sci.*, 5(3), 870-873.
- Angioni A.**, Barra A., Russo M. T., Coroneo V., Dessi S. And Cabras P. (2003) Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. *J Agric Food Chem.*, 51, 3073-3077.
- Arciola C. R.**, Campoccia D., Ehrlich G. D. and Montanaro L. (2015) biofilm-based implant infections in orthopaedics In " Donelli G., Biofilm-based health care associated infections., Ed. Springer. Volume I., 36, 37".
- Armas J. R.**, Quiroz J. R., Roman R. A., Sanchez J. O., Pacheco M. P., Valdivia L. H., Rivera E. C., Asmat R. C. and Anampa-Guzmán A. (2016) Antibacterial activities of essential oils from three medicinal plants in combination with EDTA against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Br Microbiol Res J.*, 17(4), 1-10.
- Athamena S.**, Laroui S., Bouzid W. and Meziti A. (2019) The antioxidant, anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of *Juniperusthurifera*. *J Herbs Spices Med Plants.*, 25 (3), 271-286.
- Avril J. L.**, Dabernat H., Deni F. et Monteil H. (1992) Bactériologie clinique. 2ème Ed. Ellipses, 09-266.
- Bahri F.**, Harrak R., Achak N. and Romane A. (2013) Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils isolated from *Juniperus thurifera* L. var. *Africana*. *Nat Prod Res*, 27, (19), 1789-1794.
- Balaban N.**, Ren D., Givskov M. and Rasmussen T. B. (2008) introduction In "Balaban N., Control of biofilm infections by signal manipulation, Ed. Springer, 06".
- Balkan Ç. E.**, Karameşe M., Çelebi D., Aydoğdu S., Dicle Y., Çalık Z. (2016) The determination of the antibacterial activities of rose, thyme, centaury and ozone oils against some pathogenic microorganisms. *Kafkas J Med Sci.*, 6(1), 18-22.
- Barequet I. S.**, Habet-Wilner Z., Mann, O., Safrin M., Ohman D. E., Kessler E., & Rosner M. (2009) Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* staphylolysin (LasA protease) in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endophthalmitis in a rat model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.*, 247(7), 913-917.
- Bauer A. W.**, Kirby W. M. M., Sherris J. C., and Turck M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.*, 45, 493-496.

- Bazargani M. M.** and Rohloff J. (2016) Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 61, 156-164.
- Becker K.**, Heilmann C. and Peters G. (2014) Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.*, 27, 870-926.
- Beghami Y.**, Kalla M., Vela E., Thinon M. and Benmessaoud H. (2013) Thuriferous Juniper (*Juniperus thurifera* L.) in the Aurès area, Algeria: general considerations, cartography, ecology and plants communities. *Ecol mediterr.*, 39 (1), 17-30.
- Bégué P.** (1999) pharmacologie des antibiotiques. In "Bégué P., Astruc J., Pathologie infectieuse de l'enfant, 2^{ème} Ed. Masson, Paris, 44-50".
- Belmalha S.**, El Idrissi M., Amechrouq A. et Echchgadda G. (2015) Caractérisation chimique de certaines espèces de thym marocain du moyen atlas (région de Midelt). *GJPACR*, 3, 43-52.
- Ben Khedher M. R.**, Ben Khedher S., Chaieb I., Tounsi S., Hammami M. (2017) Chemical composition and biological activities of *Salvia officinalis* essential oil from Tunisia. *EXCLI Journal*, 16, 160-173.
- Bendif H.**, Adounic K., Mirad M. D., Baranauskienė R., Kraujalise P., Venskutonise P. R., Nabavif S. M. and Maggi F. (2018) Essential oils (EOs), pressurized liquid extracts (PLE) and carbon dioxide supercritical fluid extracts (SFE-CO₂) from Algerian *Thymus munbyanus* as valuable sources of antioxidants to be used on an industrial level. *Food Chem.* 260, 289-298.
- Benlarbi L.** (2019) Contribution à l'étude de *Fusarium oxysporum* f sp. *albedinis* agent causal de la fusariose vasculaire du palmier dattier et moyens de lutte. Thèse de doctorat, Université de Mostaganem, 38.
- Bertrand X.**, Lallemand S., Thouverez M., Boisson K. and Talon D. (2002) Bactériémies liées aux staphylocoques à coagulase négative : incidence, niveau de résistance à la teicoplanine et épidémiologie moléculaire. *Pathol Biol.*, 50, 552-559.
- Bettaieb I.**, Hamrouni-Sellami I., S. Bourgou, Limam F., Marzouk B. (2011) Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. *Acta Physiol Plant.*, 33, 1103-1111.
- Bhatt P.**, Tandel K., Singh A., Kumar M., Grover N. and Sahni A.K. (2016) Prevalence and molecular characterization of methicillin resistance among Coagulase-negative Staphylococci at a tertiary care center. *Med J Armed Forces India*, 710, 1-5.
- Bhunja A.K.** (2008) Foodborne microbial pathogens mechanisms and pathogenesis. Ed. Springer, USA, 350.
- Biswas L.**, Biswas R., Schlag M., Bertram R., and Götz F. (2009) Small colony variant selection as a survival strategy for *Staphylococcus aureus* in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.*, 75(21), 6910-6912.
- Blankenfeldt W.**, Kuzin A. P., Skarina T., Korniyenko Y., Tong L., Bayer P., Janning P., Thomashow L. S. and Mavrodi D. V. (2004) Structure and function of the phenazine biosynthetic protein *PhzF* from *Pseudomonas fluorescens*. *PNAS*, 101 (47), 16431-16436.

- Boizot N.** et Charpentier J. P. (2006) Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'inra*, numéro spécial : 79-82.
- Bonsall R. F.**, Weller D. M. and Thomashow L. S. (1997) Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. *In vitro* and in the rhizosphere of wheat. *Appl Environ Microbiol.*, 63(3), 951-955.
- Borrero N. V.**, Bai F., Perez C., Duong B. Q., Rocca J. R., Jin S. and Huigens R. W. (2014) Phenazine antibiotic inspired discovery of potent bromophenazine antibacterial agents against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Org Biomol Chem.*, 12(6), 881-886.
- Borugă O.**, Jianu C., Mișcă C., Goleț I., Gruia A. T., Horhat F. G. (2014) *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *J Med Life.*, 7 (3), 56-60.
- Boskovic M.**, Zdravkovic N., Ivanovic J., Janjic J., Djordjevic J., Starcevic M. and Baltic M. Z. (2015) Antimicrobial activity of Thyme (*Tymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms. *Procedia Food Sci.*, 5, 18-21.
- Bossis E.**, Lemanceau P., Latour X. and Gardan L. (2000) The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, 20, 51-63.
- Boukhatem M. N.**, Ferhat M. A., Hadj M. et Lalaoui N. (2015) Prévalence et antibiorésistance des staphylocoques isolés au niveau de l'hôpital de Koléa (Algérie). *J. Fundam Appl Sci.*, 7(2), 260-270.
- Bourkhiss M.**, Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine M., Chaouch A. et Satrani B. (2009) Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Agrosolutions*, 20(1), 44-48.
- Bousmaha-Marroki L.**, Atik-Bekkara F., Tomi F. and Casanova J. (2007) Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. *eu-ciliatus* Maire from Algeria. *J Essent Oil Res.*, 19, 490-493.
- Bouyahya A.**, Bakri Y., Et-Touys A., Talbaoui A., Khouchlaa A., Charfi S., Abrini J. et Dakka N. (2017) Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 16: S, 173-183.
- Bozin B.**, Mimica-Dukic N., Samojlik I., and Jovin E. (2007) Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. *J Agric Food Chem.*, 55, 7879-7885.
- Brun Y.**, Bes M. et Vandenesch F. (2007) *Staphylococcus*. In " Freney J., Renaud F., Leclercq R. et Riegel P., Bactériologie clinique, 2^{ème} Ed. ESKA, 798-8140 ".
- Bruneton J.** (2009) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Tec et Doc 4^e Ed., 567.
- Burt S.** (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J Food Microbiol.*, 94(3), 223-253.

- Calcott M. J.**, Owen J. G., Lamont I. L. and Ackerley D. F. (2014) Biosynthesis of novel pyoverdines by domain substitution in a nonribosomal peptide synthetase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.*, 80(18), 5723-5731.
- Cardozo V. F.**, Oliveira A. G., Nishio E.K., Perugini M. R. E., Andrade C. G. T. J., Silveira W. D., Durán N., Andrade G., Kobayashi R. K. T. and Nakazato G. (2013) Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*,12(1), 1-12.
- Carip C.** (2008) microbiologie hygiène (Bases microbiologiques de la diététique). Ed. Médicales internationales et Tec & Doc, Londres- Paris- New york, 103.
- Carle S.** (2009) La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important! figure sélection de souches. *Pharmactuel.*, 42, 6-21.
- Cavanagh J.P.**, Wolden R., Heise P., Esaiassen E., Klingenberg C., Aarag Fredheim E.G. (2016) Antimicrobial susceptibility and body site distribution of community isolates of coagulase-negative staphylococci. *APMIS.*, 1-6.
- Chaieb K.**, Kouidhi B., Jrah H., Mahdouani K. and Bakhrouf A. (2011) Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC Complement Altern Med.*, 11-29.
- Chambers H. F.** (1997) Methicillin resistance in staphylococci, molecular and chemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.*, 10, 781-91.
- Chaouche T. M.**, Haddouchi F., Ksouri R., Medini F., Atik-Bekara F. (2013) *In vitro* evaluation of antioxidant activity of the hydro-methanolic extracts of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*. *Phytothérapie*, 11, 244-249.
- Chincholkar S.**, Patil S., Sarode P. and Rane M. (2013) Fermentative production of bacterial phenazines. In "Chincholkar S. and Thomashow L. Microbial phenazines biosynthesis, agriculture and health, Ed. Springer, 91-92".
- Chouhan S.**, Sharma K. and Guleria S. (2017) Antimicrobial activity of some essential oils present status and future perspectives. *Medicines*, 4(58), 1-21.
- Christensen G. D.**, Simpson W. A., Yonger J. J., Baddor L. M., Barrett F. F., Melton D. M. and Beachey E. H. (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.*, 22, 996-1006.
- Chusri S.**, Sompetch K., Mukdee S., Jansrisewangwong S., Srichai T., Maneenoon K., Limsuwan S., and Voravuthikunchai S. P. (2012) Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by traditional thai herbal recipes used for wound treatment. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 1-8.
- Clevenger J. F.** (1928) Apparatus for the determination of volatile oil. *J Am Pharm Assoc.*, XVII. (4), 345-349.

- CLSI:** Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility; twenty-fourth informational supplement (2014).
- Conda-Sheridan M.**, Udumula V., Endres J. L., Harper C. N., Jaramillo L., Zhong H. A. and Bayles K. W. (2016) Simple synthesis of endophenazine G. and other phenazines and their evaluation as anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* agents. *Eur J Med Chem.*, 125, 710-721.
- Couic-Marinier F.** et Lobstein A. (2013) Composition chimique des huiles essentielles. *Actual Pharm.*, 22-25.
- Couillerot O.**, Prigent-Combaret C., Caballero-Mellado J. and Moenne-Loccoz Y. (2009) *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Lett Appl Microbiol.*, 48, 505-512.
- Courvalin P.**, Leclercq R. et Bingen E. (2006) AntibioGramme. Annexe. 2^e Ed. ESKA.
- Cuevas O.**, Cercenado E., Vindel A., Guinea J., Sa´nchez-Conde M., Sa´nchez-Somolinos M., Bouza E., and the spanish group for the study of *Staphylococcus* (2004) Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. In Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.*, 4240-4245.
- Cunha M. L. R. S.**, Sinzato Y. K. and Silveira L. V. A. (2004) Comparison of Methods for the identification of Coagulase Negative Staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 99(8), 855-860.
- d’Azevedo P. A.**, Secchi C., Antunes A. L. S., Sales T., Silva F. M., Tranchesi R., Pignatari A. C. C. (2008) Oxacilin-resistant Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS) bacteremia in a general hospital at São Paulo City, Brasil. *Braz J Microbiol* , 39, 631-635.
- Daglia M.** (2012) Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotech.*, 23, 174-181.
- Dahah H.**, Djibaoui R. and Nemmiche S. (2016) Antimicrobial, antioxidant and hemolytic effects of Pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from saline soil of Mina river, Algeria. *Int J Biosci.*, 9(5), 134-143.
- Damjanović-Vratnica B.**, Caković D., Perović S. (2015) Composition and antimicrobial studies of essential oil of *Thymus vulgaris* from Montenegro. *Biol Nyssana*, 6 (2), 67-73.
- Daurel C.** et Leclercq R. (2008) L’antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 81-90.
- Davies D.G.** and Marques C.N. (2009) A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol.*, 191(5), 1393-1403.
- Davies J. I.** and Smith D. (1978) Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Ann Rev Microbiol.* 32, 469-518
- De Billerbeck V.-G.** (2007) Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5, 249-253.
- de Oliveira J. R.**, Vilela P. d. G. F., de Aguiar Almeida R. B., de Oliveira F. E., Carvalho C.A. T., Camargo S. E. A., Jorge A. O. C. and de Oliveira L. D. (2019) Antimicrobial activity of

noncytotoxic concentrations of *Salvia officinalis* extract against bacterial and fungal species from the oral cavity. *General Dentistry*. 434, 22-27.

- Dedet J. P.** (2007) La Microbiologie, de ses origines aux maladies émergentes. Dunod, Paris, 84.
- Delamare A. P. L.**, Moschen-Pistorello I. T., Artico L., Atti-Serafini L., and Echeverrigaray S. (2007) Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chem.*, 100, 603-608.
- Delaney S. M.**, Mavrodi D. V., Bonsall R. F. and Thomashow L. S. (2001) phzO, a gene for biosynthesis of 2-hydrolyated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *J Bacteriol.*, 183, 318-327.
- Delarras C.** (2007) Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire, Ed. tec et doc, 64-369.
- Delarras C.** (2014) Pratiques en microbiologie de laboratoire, Ed. Lavoisier, France.
- Denis F.**, Poly M., Martin C., Bingen E. et Quentin R. (2011) Bactériologie Médicale: Techniques Usuelles. Elsevier Masson, France.
- Devnath P.**, Uddin Md. K., Ahamed F., Hossain Md. T. and Manchur M. A. (2017) Extraction, purification and characterization of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* and evaluation for its antimicrobial activity. *Int J Biol Sci.*, 6(5), 1-9.
- Dıđrak M.**, İlçim A. and Hakk Alma M. (1999) Antimicrobial Activities of Several Parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*. *Phytother Res.*, 13, 584-587.
- Djeridane A.**, Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. and Vidal N. (2006) Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*, 97, 654-660.
- Djordjevic D.**, Wiedmann M., Mclandsborough L.A. (2002) Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 68(6), 2950-2958.
- Dobignard A.** et Chatelain C. (2011) Index synonymique de la flore d'Afrique du nord. Volume 2: Dicotyledoneae: Acanthaceae - Asteraceae. Ed. des conservatoires et jardin botaniques - Genève.
- Doymaz İ.** and Karasu S. (2018) Effect of air temperature on drying kinetics, colour changes and total phenolic content of sage leaves (*Salvia officinalis*). *Qual Assur Saf Crop.*, 10 (3), 269-276.
- Drugeon H. B.** In "Courvalin P., Leclercq R. et Bingen E. (2006) AntibioGramme , 2^e Ed. ESKA".
- Ehlersson G.**, Hellmark B., Svartström O., Stenmark B. and Söderquist B. (2017) Phenotypic characterisation of Coagulase-Negative Staphylococci isolated from blood cultures in newborn infants, with a special focus on *Staphylococcus capitis*. *Acta Paediatr.*, 106(10), 1576-1582.

- El Amraoui B.**, El Amraoui M., Cohen N. *et al.*, (2014) Antifungal and antibacterial activity of marine microorganisms. *Ann Pharm Fr.*, 72, 107-111.
- El Hattabi L.**, Talbaoui A., Amzazi S., Bakri Y., Harhar H., Costa J., Desjobert J. M. and Tabyaoui M. (2016) Chemical composition and antibacterial activity of three essential oils from south of Morocco. (*Thymus satureoides*, *Thymus vulgaris* and *Chamaelum nobilis*). *J Mater Environ Sci.*, 7 (9), 3110-3117.
- El Jemli M.**, Kamal R., Marmouzi I., Zerrouki A., Cherrah Y., and Alaoui K. (2016) Radical-Scavenging Activity and Ferric Reducing Ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea* (L.) and *Tetraclinis articulata* (L.). *Adv pharmacol sci.*, 1-6.
- El Ouadi Y.**, Amirou A., Bouyanzer A., Elmsellem H., Majidi L., Bouhtit F. and Hammouti B. (2015) Antioxidant activity of phenols and flavonoids contents of aqueous extract of *Salvia officinalis* origin in the North-East Morocco. *Maghr J Pure & Appl Sci.*, 1(1), 18-24.
- El Ouali Lalami A.**, El-Akhal F., Ouedrhiri W., Ouazzani Chahdi F., Guemmouh R. and Hassane G. (2013) *Thymus* essential oils (*Thymus vulagris* and *Thymus satureioïdis*) from center of Morocco: chemical composition and antimicrobial activity. *Les Technologies de Laboratoires*, 8, 31.
- El-Achi N.**, Bakkour Y., El-Nakat H. and El-Omar F. (2014) HPLC analysis for identification and quantification of phenolic acids and flavonoids in *Juniperus excelsa*. *Journal of Natural Products*, 7, 162-167.
- Elmhdwi M. F.**, Attitalla I. H. and Khan B. A. (2015) Evaluation of antibacterial activity and antioxidant potential of different extracts from the leaves of *Juniperus Phoenicea*. *J Plant Pathol Microb.*, 6(300), 1-8.
- Elshafie H. S.**, Sakr S., Mang S. M., Belviso S., Feo V. D., and Camele I. (2016) Antimicrobial activity and chemical composition of three essential oils extracted from mediterranean aromatic plants. *J Med Food.*, 19 (11), 1-8.
- Engelkirk P. G.** and Duben-Engelkirk J. (2008) Laboratory diagnosis of infectious diseases: essentials of diagnostic microbiology. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, 215, 224.
- Et-Touys A.**, Fellah H., Mniouil M., Bouyahya A., Dakka N., El Hassane Abdennebi, Sadak A. and Bakri Y. (2016) Screening of antioxidant, antibacterial and antileishmanial activities of *Salvia officinalis* L. extracts from Morocco. *Br Microbiol Res J.*, 6(5), 1-10.
- Fani M.** and Kohanteb J. (2017) *In vitro* antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* essential oil against major oral pathogens. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 22(4), 660-666.
- Farid A.**, Naz I., Ashraf A., Ali A., Asad-ur-Rehman, Sarwar Y. and Haque A. (2015) Molecular detection of antimicrobial resistance in local isolates of *Staphylococcus epidermidis* from urinary tract infections in faisalabad region of pakistan. *EXCLI Journal*, 14, 697-705.
- Fauchère J. L.** et Avril J. L. (2005) Bactériologie générale et médicale, Ed. Ellipses, 213-218.

- Finch R. G.** (2006) Coagulase-Negative Staphylococci. In "Gillespie S. H. and Hawkey P. M., Principles and practice of clinical bacteriology, second Ed. John Wiley & Sons Ltd, 103-105".
- Flandrois J. P.**, Courcol R., Lemeland J. F., Ramuz M., Sirot J. and Soussy C. J. (1997) Bactériologie médicale. Presses universitaires, Lyon, 113.
- Fournomiti M.**, Kimbaris A., Mantzourani I., Plessas S., Theodoridou I., Papaemmanouil V., Kapsiotis I., Panopoulou M., Stavropoulou E., Bezirtzoglou E. E. and Alexopoulos A. (2015) Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Microb ecol health dis.*, 26, 1-7.
- Freeman D. J.**, Falkiner F. R., Keane C. T. (1989) New method for detecting slime production by Coagulase-Negative Staphylococci. *J Clin Pathol.*, 42, 872-874.
- Fu Z.**, Wang H., Hu X., Sun Z., Han C. (2013) The pharmacological properties of *Salvia* essential oils. *J Appl Pharm Sci.*, 3 (07), 122-127.
- Fuchs R.**, Schäfer M., Geoffroy V. and Meyer J. M., (2001) Siderotyping - A powerful tool for the characterization of pyoverdines. *Curr Top Med Chem.*, 1(1), 31-57.
- Garnier F.** et Denis F. (2007) Cocci à Gram positif. In "Denis F., Ploy M. C., Martin C., Bingen E. et Quentin R., Bactériologie médicale (Techniques usuelles), Ed. Elsevier Masson, 252-257".
- Gatermann S. G.**, Koschinski T. and Friedrich S. (2007) Distribution and expression of macrolide resistance genes in coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Infect.*, 13, 777-781.
- Gauquelin T.**, Bertaudière V., Cambecèdes J. et Largier G. (2003) Le genévrier thurifère (*Juniperus thurifera* L.) dans les pyrenées : état de conservation et perspectives. *Acta Bot Barc.*, 49, 83-94.
- Gauquelin T.**, Bertaudière V., Montes N., Badri W. and Asmode J.-F. (1999) Endangered stands of thuriferous juniper in the western Mediterranean basin: ecological status, conservation and management. *Biodivers Conserv.*, 8, 1479-1498.
- Gaussen H.** (1968) Les gymnospermes, actuelles et fossiles. Les Cupessassées. Travaux du laboratoire forestier de toulouse.
- Ge Y.**, Huang X., Wang S., Zhang X. and Xu Y. (2004) Phenazine-1-carboxylic acid is negatively regulated and pyoluteorin positively regulated by *gacA* in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiol Lett.*, 237, 41-47.
- Gedikoğlu A.**, Sökmen M. and Çivit A. (2019) Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food Sci Nutr.*, 7, 1704-1714.

- Ghaznavi-Rad E.**, Fard-Mousavi N., Shahsavari A., Japoni-Nejad A. and Van Belkum A. (2018) Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* types among methicillin-resistant coagulase negative staphylococci in central Iran. *Iran J Microbiol.*, 10 (1), 7-13.
- Gilani M.**, Usman J., Latif M., Munir T., Gill M. M., Anjum R. and Babar N. (2016) Methicillin resistant coagulase negative *Staphylococcus*: From colonizer to a pathogen. *Pak J Pharm Sci.*, 29(4), 1117-1121.
- Gligor F. G.**, Frum A., Vicaş L. G., Totan, M., Roman-Filip C., and Dobrea C. M. (2020) Determination of a mixture of *Plantago lanceolata* L. and *Salvia officinalis* L. by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection (HPLC-UV). *Analytical Letters*, 53(9), 1-16.
- Gomes F. I. A.**, Teixeira P., Azeredo J. and Oliveira R. (2009) Effect of farnesol on planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis*. *Curr Microbiol.*, 59, 118-122.
- Götz F.**, Bannerman T., and Schleider K.-H. (2006) The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. *Prokaryotes*, 4:5-75.
- Goudarzi M.**, Seyedjavadi S. S., Goudarzi H., Boromandi S., Ghazi M., Azad M. and Tayebi Z. (2014) Characterization of Coagulase-Negative Staphylococci isolated from hospitalized patients in Tehran, Iran. *J Paramed Sci.*, 5(2), 44-50.
- Grahl N.**, Kern S. E., Newman D. K. and Hogan D. A. (2013) The yin and yang of phenazine physiology. In "Chincholkar S. and Thomashow L. Microbial phenazines biosynthesis, agriculture and health, Ed. Springer, 55".
- Grare M.** (2009) De la genèse d'une nouvelle classe d'antibactériens à base de polyphénols cycliques de type calixarène. Etudes moléculaire(s), cellulaire(s), et structurale(s) en vue de l'identification des cibles d'action : le cas du paraganidinoéthylcalix[4]arène. Thèse de doctorat, Université Henri Poincaré, Nancy-I.
- Guesmi F.**, Ben Farhat M. , Mejri M. and Landoulsi A. (2014) *In-vitro* assessment of antioxidant and antimicrobial activities of methanol extracts and essential oil of *Thymus hirtus* sp. *Algeriensis*. *Lipids in Health and Disease*, 13(114), 1-12.
- Haas D.** and Keel C. (2003) Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu Rev Phytopathol.*, 41, 117-53.
- Hall-Stoodley L.**, Costerton J. W. and Stoodley P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.*, 2, 95-108.
- Hamdan H.**, Weller D. M., And Thomashow L. S. (1991) Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Appl Environ Microbiol.*, 57(11), 3270-3277.
- Hammer K. A.** and Carson C. F. (2011) Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In "Thormar H., Lipids and essential oils as antimicrobial agents, Ed. John Wiley and Sons, Ltd, 267-269".

- Hanssen A.-M.**, Kjeldsen G., and Sollid J. U. E. (2004) Local variants of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant Coagulase-Negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrob Agents Chemother.*, 48(1), 285-296.
- Harfouch R.M.**, Darwish M., Al-Asadi W., Mohamed Ali F., Gharib Nour M. and Haroun M. (2019) Antibacterial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* and *Anthemis nobilis* Widespread in the Syrian Coast. *Research Journal of Pharmacy and Technology.*, 12, 3410-3412.
- Hassan A.**, Usman J., Kaleem F., Omair M., Khalid A. and Iqbal M. (2011) Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis.*, 15(4), 305-311.
- Hassan G. O.**, Karamova N., Abu Mraheil M., Mohamed W., Chakraborty T. and Ilinskaya O. (2017) A comparative evaluation of antimicrobial effect of *Thymus capitatus* ethanolic extract on the different respiratory tract infections isolates. *Bio Nano Sci.*, 7, 644-647.
- Hayouni E.**, Chraief I., Abedrabba M., Bouix M., Leveau J.-Y., Mohammed H. and Hamdi M. (2008) Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *Int J Food Microbiol.*, 125, 242-251.
- Hazalin N. A.**, Ramasamy K., Meng Lim S. S., Abdul Wahab I., Cole A. L. J. and Abdul Majeed A. B. (2009) Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complement Altern Med.*, 09(1), 1-5.
- Heikens E.**, Fleer A., Paauw A., Florijn A., and Fluit A. C. (2005) Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of Coagulase-Negative Staphylococci. *J Clin Microbiol.*, 43(5), 2286-2290.
- Heni S.**, Bennadja S. and Djahoudi A. (2015) Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* growing wild in North Eastern Algeria. *J Appl Pharm Sci.*, 5 (12), 56-60.
- Herard A.**, Brasme L., Jaussaud R., Colin J., Vernet-Garnier V. et Lardennois B. (1998) Place actuelle des staphylocoques à coagulase négative en urologie. *Prog Urol.*, 8, 579-585.
- Higgins S.**, Heeb S., Rampioni G., Fletcher M. P. , Williams P. and Cámara M. (2018) Differential regulation of the phenazine biosynthetic operons by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-N. *Front Cell Infect Microbiol.*, 8, 1-13.
- Hotterbeekx A.**, Kumar-Singh S., Goossens H. and alhotra-Kumar S. (2017) *In vivo* and *In vitro* interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. *Front Cell Infect Mi.*, 7(106), 1-13.
- Huang L.**, Huang Y., Lou Y., Qian H., Xu D., Ma L., Jiang C. and Zhang D. (2020) Pyocyanin-modifying genes *phzM* and *phzS* regulated the extracellular electron transfer in

microbiologically-influenced corrosion of X80 carbon steel by *Pseudomonas aeruginosa*. *Corros Sci.*, 164, 11-23.

- Huebner J.** and Goldmann D. A. (1999) Coagulase-Negative Staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med.*, 50, 223-236.
- Imelouane B.**, Amhamdi H., Wathelet J. P., Ankit M., Khedid K. and EL Bachiri A. (2009) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *Int J Agric Biol.*, 11(2), 205-208.
- Iorio N. L. P.**, Azevedo M. B., Frazão V. H. et al. (2011) Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* carrying biofilm formation genes: detection of clinical isolates by multiplex PCR. *Int Microbiol*, 14, 13-17.
- IWG-SCC:** International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements. (2009) Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53(12), 4961-4967.
- Jacques P.**, Delfosse P., Ongena M., Lepoivre P., Cornélis P., Koedam N., Neirinckx L. et Thonart P. (1993) Les mécanismes biochimiques développés par les *Pseudomonas* fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol Syntèse. *Cah Agric.*, 2, 301-307.
- Jain A.**, Agarwal J. and Bansal S. (2004) Prevalence of methicillin-resistant, Coagulase Negative Staphylococci in neonatal intensive care units: findings from a tertiary care hospital in India. *J Med Microbiol.*, 53, 941-944.
- Jasicka-Misiak I.**, Poliwoda A., Petecka M. Buslovych O., Shlyapnikov V. A. and Wieczorek P. P. (2018) Antioxidant phenolic compounds in *Salvia officinalis* L. and *Salvia sclarea* L. *Ecol Chem Eng S.*, 25(1), 133-142.
- Javadpour S.**, Karimi E. and Karmostaji A. (2010) Frequency and antibiogram pattern of coagulase negative *Staphylococcus* in clinical specimens of Shahid Mohammadi Hospital in patients, Bandar-Abbas, Iran *Afr J Microbiol Res.*, 4(14), 1581-1583.
- Jedidi S.**, Aloui F., Selmi H., Rtibi K., Dallali S., Abbes C. and Sebai H. (2018) Enquête ethnobotanique sur l'utilisation traditionnelle de la sauge officinale (*Salvia officinalis* L.) dans les régions de Tabarka et Ain Draham (Nord-Ouest de la Tunisie). *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, (18), 3402-3412.
- Kabouche A.**, Ghannadi A. and Kabouche Z. (2009) *Thymus ciliatus* – the highest thymol containing essential oil of the genus. *Nat Prod Commun.*, 4 (9), 1251-1252.
- Kabouche Z.**, Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Ait-Kaki Z. and Benlabed K. (2005) Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *Int J Aromather.*, 15, 129-133.
- Kadhim S. M.**, Mohammed M. T., Ahmed O. M. And Jassim A. M. N. (2016) Study of some *Salvia officinalis* L. (Sage) components and effect of their aqueous extract on antioxidant. *Int J Chem Sci.*, 14(2), 711-719.

- Kaèániová M.**, Terentjeva M., Kántor A., Tokár M., Puchalski C., and Ivaniđová E. (2017) Antimicrobial effect of Sage (*Salvia officinalis* L.) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils on microbiota of chicken breas. *Proc Latv Acad Sci Sect B.*, 6 (71), 461-467.
- Kaloustian J.** et Hadji-Minaglou F. (2012) La connaissance des huiles essentielles : qualitologie et aromathérapie. Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée, Ed. Springer, Paris, France, 2-53.
- Karaman 'I.**, Sahin F., Güllüce M., Öğütçü H., Sengül M. and Adıgüzel A. (2003) Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol.*, 85, 231-235.
- Karpanen T. J.**, Worthington T., Hendry E. R., Conway B. R. and Lambert P. A. (2008) Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother.*, 62, 1031-1036.
- Khadir A.**, Bendahou M., Benbelaid F., Bellahcene C., Abdelouahid D.-E., Museili A., Paollini J., Desjobert J. and Costa J. (2013) Evaluation of the MRSA sensitivity to essential oils obtained from four Algerian medicinal plants. *J Appl Pharm Sci.*, 3 (05), 1-7.
- Khalil R.** and Li Z.-G. (2011) Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria. *Afr J Biotechnol.*, 10(42), 8397-8402.
- Khater N.** (2018) Contribution à l'étude de la régénération du Genévrier thurifère (*Juniperus thurifera* L. par la production de plants *in vitro*. Thèse de doctorat, Université de Batna 1, 19.
- Koksal F.**, Yasar H. and Samasti M. (2009) Antibiotic resistance patterns of Coagulase-negative *Staphylococcus* strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. *Microbiol Res.*, 164, 404-410.
- Kord M.**, Ardebili A., Jamalan M., Jahanbakhsh R., Behnampour N., Ghaemi E. A. (2018) Evaluation of biofilm formation and presence of *ica* genes in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Osong Public Health Res Perspect.*, 9(4), 160-166.
- Kryvtsova M. V.**, Salamon I., Koscova J., Bucko D. and Spivak M. (2019) Antimicrobial, antibiofilm and biochemical properties of *Thymus vulgaris* essential oil against clinical isolates of opportunistic infections. *Biosyst Divers.*, 27(3), 270-275.
- Kulis'ic' T.**, Kris'ko A., Dragovic' -Uzelac V., Milos' M. and Pifat G. (2007) The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L. spp. *hirtum*), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. *Int J Food Sci Nutr.*, 58(2), 8793.
- Kumari S.**, Pundhir S., Priya P., Jeena G., Punetha A., Chawla K., Jafaree Z. F., Mondal S. and Yadav G. (2014) EssOilDB: a database of essential oils reflecting terpene composition and variability in the plant kingdom. *Database*, 1-12.

- Kwakman P. H. S.**, Veldete A. A., Vandenbroucke-Grauls C. M. J. E., Deventer S. J. H. V. and Zaat S. A. J. (2006) Treatment and prevention of *Staphylococcus epidermidis* Experiment Biomaterial-Associated Infection by Bactericidal Peptide. *Antimicrob Agents Chemother.*, 50(12), 3977-3983.
- Lakhal H.**, Ghorab H., Chibani S, Kabouche A, Semra Z, Smati F., Abuhamdah S. and Kabouche Z. (2013) Chemical composition and biological activities of the essential oil of *Salvia officinalis* from Batna (Algeria). *Der Pharmacia Lettre*, 5 (3), 310-314.
- Lang S.**, Livesley M. A., Lambert P. A., Elliott J. and Elliott T. S. J. (1999) The genomic diversity of Coagulase-Negative Staphylococci associated with nosocomial infections. *J Hosp Infect.*, 43, 187-193.
- Laursen J. B.** and Nielsen J. (2004) Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chem Rev.*, 104(3), 1663-1686.
- Le Bouter A.** (2011) Infections à *Staphylococcus saprophyticus*. *Journal Des Anti-Infectieux*, 13(1), 12-19.
- Lebeaux D.** et Ghigo J.-M. (2012) Infections associées aux biofilms, Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale? *Med Sci.*, 28, 727-39.
- Leclercq R.** (2002) Résistance des staphylocoques aux antibiotiques. *Ann Fr Anesth Réanim.*, 21, 375-83.
- Leclercq R.**, Bismuth R. et Pierre J. (1990) Sensibilité et Résistance aux antibiotiques des staphylocoques à coagulase négative. *Med Maladies Infect.*, 29-40
- Lee S.-J.**, Umamo K., Shibamoto T. and Lee K.-G. (2005) Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem.*, 91, 131-137.
- Leisinger T.** and Margraff R. (1979) Secondary metabolites of the Fluorescent Pseudomonads. *Microbiol Rev.*, 43(3), 422-442.
- Lemanceau P.** (1992) Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents. *Agronomie*, 12 (6), 413-437.
- Lightbown J. W.** and Jackson F. L. (1956) Inhibition of cytochrome systems of heart muscle and certain bacteria by the antagonists of dihydrostreptomycin: 2-alkyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxides. *Biochem J.*, 63(1), 130-137.
- Lima C. F.**, Valentao P. C. R., Andrade P. B., Seabra R. M., Fernandes-Ferreira M., Pereira-Wilson C. (2007) Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from *t*-BHP induced oxidative damage. *Chem-Biol Interact.*, 167(2):107-115.
- Loizzo M. R.**, Tundis R., Conforti F., Saab A. M., Statti G. A., Menichini F. (2007) Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon. *Food Chem.*, 105, 572-578.

- Lopes L. A. A.**, dos Santos Rodrigues J. B., Magnani M., de Souza E. L. and de Siqueira-Júnior J. P. (2017) Inhibitory effects of flavonoids on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* that overexpresses efflux protein genes. *Microb Pathog.*, 107, 193-197.
- Luengo J. M.**, Arias S., Arcos M., and Olivera E. R. (2007) The catabolism of phenylacetic acid and other related molecules in *Pseudomonas putida* U, Ed. Springer, USA.
- Machado A. B. M. P.**, Reiter K. C., Paiva R. M. and Barth A. L. (2007) Distribution of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) types I, II, III and IV in Coagulase-Negative Staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. *J Med Microbiol.*, 56, 1328-1333.
- Machan Z. A.**, Pitt T. L., White W., Watson D., Taylort G. W., Cole P. J. and Wilson J. R. (1991) Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: description of an antistaphylococcal substance. *Microbiol.*, 34, 213-217.
- Mack D.**, Horstkotte M. A., Rohde H., and Knobloch J. K.-M. (2006) Coagulase-Negative Staphylococci. In" Pace J. L., Rupp M. E. and Finch R. G., Biofilms, infection, and antimicrobial therapy. Ed. Taylor and Francis, 115-131".
- Mansouri N.**, Satrani B., Ghanmi M., El ghadraoui L., Aafi A. et Farah A. (2010) Valorisation des huiles essentielles de *Juniperus thurifera* et de *Juniperus oxycedrus* du Maroc. *Phytothérapie*, 8, 166-70.
- Marino A.**, Bellinghieri V., Nostro A., N. Miceli, Taviano M. F., Güvenç A. and Bisignano G. (2010) *In vitro* effect of branch extracts of *Juniperus* species from Turkey on *Staphylococcus aureus* biofilm. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 59, 470-476.
- Marino M.**, Bersani C., and Comi G. (1999) Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *J. Food Prot.*, 62(9), 1017-1023.
- Marongiu B.**, Porcedda S., Caredda A., De Gioannis B., Vargiu L. and La Colla P. (2003) Extraction of *Juniperus oxycedrus* ssp. *Oxycedrus* essential oil by supercritical carbon dioxide: influence of some process parameters and biological activity. *Flavour Fragr J.*, 18, 390-397.
- Marsik F. J.** and Brake S. (1982) Species Identification and Susceptibility to 17 Antibiotics of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.*, 15(4), 640-645.
- Martin C.** (2007) Bacilles à Gram négatif non fermentaires. In " Denis F., Ploy M. C., Martin C., Bingen E. et Quentin R., Bactériologie médicale (Techniques usuelles), Ed. Elsevier Masson, 333".
- Mashburn L. M.**, Jett A. M., Akins D. R. and Whiteley M. (2005) *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during *in vivo* co-culture. *J Bacteriol.*, 187, 554-566.

- Mathema B.**, Mediavilla J. R., Chen L. and Kreiswirth B. N. (2009) Evolution and taxonomy of Staphylococci. In "Crossley K. B., Jefferson K. K., Archer G. L. And Fowler Jr. V. G., Staphylococci in human disease, second edition, wiley Blackwell, 33-38".
- Mavrodi D. V.**, Paulsen I. T., Ren Q., and Loper J. E. (2007) Genomics of *Pseudomonas fluorescens* PF-5. In "Ramos J.-L. and Filloux A. *Pseudomonas: A Model system in biology*, Ed. Springer, 6".
- Mehalaine S.**, Belfadel O., Menasria T. and Messaili A. (2017) Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of three medicinal plants from Algerian semi-arid climatic zone. *phytothérapie*, 1-6.
- Mehdizadeh T.**, Hashemzadeh M.S., Nazarizadeh A., Neyriz-Naghadehi M., Tat M., Ghalavand M. and Dorostkar R. (2016) Chemical composition and antibacterial properties of *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* and *Trachyspermum ammi* essential oils alone and in combination with nisin. *Res J Pharma.*, 3(4), 51-58.
- Memar M. Y.**, Raei P., Alizadeh N., Aghdam M. A. and Kafil H. S. (2017) Carvacrol and thymol: strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Rev Med Microbiol.*, 28, 63-68.
- Messaoudi M.**, Benregueig M., Merah M. and Z. A. Messaoudi (2019) Antibacterial effects of *Thymus algeriensis* extracts on some pathogenic bacteria. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 41, 1-11.
- Meyer J. M.** And Abdallah M. A. (1978) The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J Gen Microbiol.*, 107, 319-328.
- Mezaache-Aichour S.**, Guechi A., Nicklin J., Drider D., Prevost H. and Strange R. N. (2012) Isolation, identification and antimicrobial activity of Pseudomonads isolated from the rhizosphere of potatoes growing in Algeria. *Plant Pathol.*, 94 (1), 89-98.
- Meziou-Chebouti N.**, Merabet A., Behidj N. and Bissaad F.-Z. (2014) The antimicrobial activity of the essential oil of *Salvia officinalis* harvested in boumerdes. *IJCME.*, 8(11), 1276-1279.
- Miguel G.**, Cruz C., Faleiro M. L., Simões M. T. F., Figueiredo A. C., Barroso J. G. and Pedro L. G. (2011) *Salvia officinalis* L. essential oils: effect of hydrodistillation time on the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Nat Prod Res*, 25(5), 526-541.
- Miladinović D.** and Miladinović L. j. (2000) Antimicrobial activity of essential oil of sage from Serbia. *Physics Chem Technol.*, 2(2), 97-100.
- Milos M.** and Radonic A. (2000) Gas chromatography mass spectral analysis of free and glycosidically bound volatile compounds from *Juniperus oxycedrus* L. growing wild in Croatia. *Food Chem.*, 68, 333-338.
- Mitić-Ćulafić D.**, Vuković-Gačić B., Knežević-Vukčević J., Stanković S. and Simić D. (2005) Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.) *Arch Biol Sci.*, 57 (3), 173-178.

- Mohamed A. Y.** and Mustafa A. A. (2019) *In vitro* anti-microbial activity of essential oils and other extracts from *Salvia officinalis* against Some Bacteria. *Plant Sciences*.
- Mojab F.**, Poursaeed M., Mehrgan H. and Pakdaman S. (2008) Antibacterial activity of *Thymus daenensis* methanolic extract. *Pak J Pharm Sci.*, 21(3), 210-213.
- Mojzer E. B.**, Hrnčič M. K., Škerget M., Knez Ž. and Bren U. (2016) Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*, 21, 1-38.
- Mosafa E.**, Yahyaabadi S. and Douidi M. (2014) *In-vitro* antibacterial properties of Sage (*Salvia officinalis*) ethanol extract against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumonia*. *ZJRMS.*, 16 (10), 42-46.
- Moujir L.**, Seca A. M. L., Silva A. M. S. and Carmo Barreto M. (2008) Cytotoxic activity of diterpenes and extracts of *Juniperus brevifolia*. *Planta Med.*, 74, 751-753.
- Moukhles A.**, Ibn Mansour A., Ellaghdach A. and Abrini J. (2018) Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of the pure essential oils and essential oils extracted from their corresponding hydrolats from different wild varieties of Moroccan thyme. *J Mater Environ Sci.*, 9 (3), 794-803.
- Munawar T. M.**, Rao R. S. V. and Raj H. B. (2018) Screening and *In vitro* characterization of siderophore producing *Pseudomonas fluorescens*. *World J Pharm Res.*, 7(03), 741-750.
- Nagasrilatha B.**, Manmohan B., Sasidhar M., Shashikala A. and Bharathi M. (2015) A study on methicillin resistant Coagulase Negative Staphylococci isolated from medical intensive care unit at a tertiary care centre-India". *J Evol Med Dent Sci.*, 4(61), 10597-10601.
- Nansathit A.**, Apipattarakul S., Phaosiri C., Pongdontri P., Chanthai S. And Ruangviriyachai C. (2009) Synthesis, isolation of phenazine derivatives and their antimicrobial activities. *Walailak J Sci & Tech.*, 6(1), 79-91.
- Nasr R. A.**, AbuShady H. M. and Hussein H. S. (2012) Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. *Egypt J Med Hum Genet.*, 13, 269-274.
- Nauciel C.** et Vildé J.-L. (2005) Bactériologie médicale connaissances et pratique. 2^{ème} édition Masson Paris, 53- 80.
- Nawaz H.**, Shad M. A. and Batool Z. (2013) Inter-varietal variation in biochemical, phytochemical and antioxidant composition of maize (*Zea mays* L.) grains. *Food Sci Technol Res.*, 19 (6), 1133-1140.
- Nesemann K.**, Braus-Stromeyer S. A., Thuermer A., Daniel R., Mavrodi D. V., Thomashow L. S., Weller D. M. and Braus G. H. (2015) Draft genome sequence of the phenazine producing *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Genome Announc.*, 3(2), 1-2.
- Nikolić M.**, Marković T., Marković D., Glamočlija J., Ćirić A., Smiljković M. and Soković M. (2016) Antimicrobial activity of three Lamiaceae essential oils against common oral pathogens. *Balk J Dent Med.*, 20,160-167.

- Nostro A.**, Guerrini A., Marino A., Tacchini M., Di Giulio M., Grandini A., Akin M., Cellini L., Bisignano G. and Saracoglu H. T. (2016) *In vitro* activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria. *Int J Food Microbiol.*, 238, 33-39.
- Noto M. J.**, Burns W.J., Beavers W. N. and Skaa E. P. (2017) Mechanisms of pyocyanin toxicity and genetic determinants of resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 199(17), 1-13.
- O'Connor R. D.**, Singh M., Chang J., Kim S. J., Van Nieuwenhze M. and Schaefer J. (2017) dual mode of action for plusbacin A3 in *Staphylococcus aureus*. *J Phys Chem B*, 121(7), 1499-1505.
- O'gara J. P.** and Humphreys H. (2001) *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbio.*, 50, 582-587.
- Oliveira A.** and Cunha M. L. R.S. (2010) Comparison of methods for the detection of biofilm production in Coagulase-Negative Staphylococci. *BMC Research Notes*, 3, 260.
- Olowo-Okere A.**, Yusuf J. A., Shuaibu A. B., Abdullahi M. I., Aleku G. A., Nuhu T., Ungokore H. Y. and Ogunyinka I. A. (2018) Antibacterial and anti-Biofilm activities of *Neocarya Macrophylla* against clinical bacterial isolates. *Nig J Pharm Res.*, 14 (1), 111-119.
- Ong K. S.**, Cheow Y. L. and Lee S. M. (2017) The role of reactive oxygen species in the antimicrobial activity of pyochelin. *J Adv Res.*, 8, 393-398.
- Otto M.** (2008) Staphylococcal biofilms. In "Romeo T., Bacterial biofilms, Ed. Springer, 210-222".
- Otto M.** (2013) Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med.*, 64,175-88.
- Ouknin M.**, Romane A., Costa J., Ponthiaux P., Majidi L. (2018) Anticorrosion properties of *Thymus munbyanus* Boiss & Reut essential oil for mild steel in 1M HCl. *Mor J Chem.*, 6 , 548-559.
- Palleroni N. J.** (1984) Genus I. *Pseudomonas* Migula. In "Bergey's manual of systematic bacteriology, Ed. Williams and Wilkins, USA".
- Palleroni N. J.** (1986) Taxonomy of the Pseudomonads. In " Gunsalus C. , The bacteria a treatise on structure and function. Vol X., 1".
- Parekh J.**, Jadeja D. and Chanda S. (2005) Turk efficacy of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants for potential antibacterial activity. *J Biol*, 29, 203-210.
- Pellerin J. L.**, Gautier M. et Le Loir Y. (2009) In "Le Loir Y. et Gantier M. *Staphylococcus aureus*, 4".
- Petrović S.**, Bašić J., Mandinić Z., Božić D. D., Milenković M. and Vujić Z. (2019) Inhibitory effect of propafenone derivatives on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and pyocyanin production. *Srp Arh Celok Lek.*, 148 (3-4), 196-202.
- Pierozan M. K.**, Pauletti G. F., Rota L., Santos A. C. A. D, Lerin L. A., DI Luccio M., J. Moss A., Atti-Serafini L., Cansian R. L. and Vladimir Oliveira J. (2009) Chemical

characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species. *Ciencia Tecnol Alime.*, 29(4), 764-770.

- Pierson III L. S.** and Pierson E. A. (2010) Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 86, 1659-1670.
- Piette A.** and Verschraegen G. (2009) Role of Coagulase-Negative Staphylococci in human disease. *Vet Microbiol.*, 134, 45-54.
- Pihl M.**, Arvidsson A., Skepö M., Nilsson M., Givskov M., Tolker-Nielsen T. *et al.*, (2013) Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* on peritoneal dialysis catheters and the effects of extracellular products from *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathog Dis.*, 67, 192-198.
- Pihl M.**, Davies J. R., Chavez de Paz L. E. and Svensater G. (2010) Differential effects of *Pseudomonas aeruginosa* on biofilm formation by different strains of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunol. Med Microbiol.*, 59, 439-444.
- Pinna A.**, Zanetti S., Sotgiu M., Sechi L. A., Fadda G. and Carta F. (1999) Identification and antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated in corneal/external infections. *Br J Ophthalmol.*, 83, 771-773.
- Pop A-V.**, Tofană M., Socaci S. A., Vârban D., Nagy M., Borş M-D. and Sfechiş S. (2015) Evaluation of antioxidant activity and phenolic content in different *S. officinalis* L. extracts. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, 72(2), 210-214.
- Poulsen, A. B.**, Skov, R. and Pallesen, L. V. (2003) Detection of methicillin resistance in Coagulase-negative Staphylococci and in Staphylococci directly from simulated blood cultures using the EVIGENE MRSA. *J Antimicrob Chemother.*, 51, 419.
- Poyart C. (2006) Tetracyclines. In "Courvalin P., Leclercq R. et Bingen E. AntibioGramme, 2^e Ed. ESKA, 329".
- Qin Z.**, Yang L., Qu D., Molin S., and Tolker-Nielsen T. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* extracellular products inhibit staphylococcal growth, and disrupt established biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol.*, 155, 2148-2156.
- Quezel P.** et Santa S. (1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Ed. du centre national de la recherche scientifique, Paris, France.
- Rane M. R.**, Sarode P. D., Chaudhari B. L. and Chincholkar S. B. (2007) Detection, isolation and identification of phenazine-1- carboxylic acid produced by biocontrol strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Sci Ind Res India*, 66, 627-631.
- Raut J. S.** and Karuppayil S. M. (2014) "A status review on the medicinal properties of essential oils". *Ind Crops Prod.*, 62, 250-264.
- Reddy B. P.**, Reddy K. R. N., Subba Rao M. and. Rao K. S. (2008) Efficacy of antimicrobial metabolites of *Pseudomonas fluorescens* against rice fungal pathogens. *Curr trends biotechnol pharm.*, 2(1), 178-182.

- Ribéreau-Gayon J.**, Peynaud M., Ribéreau-Gayon P. and Sudraud P. (1972) Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et contrôle des vins, Ed. Dunod, Paris, 671.
- Rodrigues L. B.**, Santos L. R. D., Tagliari V. Z., Rizzo N. N., Trenhago G., de Oliveira A. P., Goetz F. and do Nascimento V. P. (2010) Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Braz J Microbiol.*, 41, 1082-1085.
- Rupp M. E.** (2014) Clinical characteristics of infections in humans due to *Staphylococcus epidermidis*. *Methods Mol Biol*, 1106, 1-16.
- Saber H.**, Jasni A. S., Jamaluddin T. Z. M. T. and Ibrahim R. (2017) A review of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) types in Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS) species. *Malays J Med Sci.*, 24(5), 7-18.
- Sahgal G.**, Sreeramanan S., Sasidharan S., Xavier R. and Ong M. T. (2009) Screening selected medicinal plants for antibacterial activity against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Adv Nat Appl Sci.*, 3(3), 330-338.
- Sakai H.**, Procop G. W., Kobayashi N., Togawa D., Wilson D. A., Borden L., Krebs V., Bauer and T. W. (2004) Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci in positive blood cultures by Real-Time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets. *J Clin Microbiol.*, 42(12), 5739-5744.
- Saleem M.**, Nazir M., Ali M. S., Hussain H., Lee Y. S., Riaz N. and Jabbar A. (2010) Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat Prod Rep.*, 27, 238-254.
- Salido S.**, Altarejos J., Nogueras M., Sa´nchez A., Pannecouque C., Witvrouw M., De Clercq E. (2002) Chemical studies of essential oils of *Juniperus oxycedrus* ssp. *Badia*. *J. Ethnopharmacol.*, 81, 129-134.
- Salih L.**, Tevell S., Mansson E., Nilsson-Augustinsson A., Hellmark B. and Söderquist B. (2018) *Staphylococcus epidermidis* isolates from nares and prosthetic joint infections are mupirocin susceptible. *J. Bone Joint Infect.*, 3(1), 1-4.
- Sanger F.**, Nicklen S. and Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.*, 74, 5463-5467.
- Satrani B.**, Ghanmi M., Mansouri N. and Amusant N. (2015) Antioxidant properties of essential oils extracted from three species of Moroccan Junipers. *ESAIJ.*, 11(7), 239-247.
- Scales B. S.**, Dickson R. P., Li Puma J. J. and Huffnagle G. B. (2014) Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clin Microbiol Rev.*, (4), 927-948.
- Scholz Z.**, Molnar J. and Hohmann J. (2006) Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77, 279-285.
- Seidel V.** (2006) Initial and Bulk Extraction. In "Sarker S. D., Latif Z., Gray A. I., Natural products isolation, second Edition, 29-30".

- Selvin J.**, Shanmughapriya S., Gandhimathi R., Seghal-Kiran G., Rajeetha R. T., Natarajaseenivasan K. and Hema T. A. (2009) Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardioopsis dassonvillei* MAD08. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 83, 435-445.
- Semerdjieva I.**, Zheljazkov V. D., Radoukova T., Radanović D., Marković T., Dincheva I. and Kačániová M. (2019) Essential oil yield, composition, bioactivity and leaf morphology of *Juniperus oxycedrus* L. from Bulgaria and Serbia. *Biochem Syst Ecol.*, 84, 55-63.
- Seng R.**, Kittit T., Thummeepak R., Kongthai P., Leungtongkam U., Wannalerdsakun S., *et al.* (2017) Biofilm formation of methicillin-resistant Coagulase Negative Staphylococci (MR-CoNS) isolated from community and hospital environments. *PLoS ONE*, 12(8), 1-13.
- Senouci Berekxi M.** and Abdelouahid D. E. (2010) Antibacterial activity of essential oils of some Algerian aromatic plants against multidrug resistant bacteria. *Jeobp.*, 13 (3), 362-370.
- Shah D. A.**, Wasim S. and Abdullah F. E. (2017) Comparison of oxacillin and cefoxitin for the detection of *mecA* gene to determine methicillin resistance in Coagulase Negative Staphylococci (CoNs). *J Coll Physicians Surg Pak.*, 27 (8), 520-522.
- Shahid I.**, Rizwan M., Baig D. N., Saleem R. S., Malik K. A., and Mehnaz S. J. (2017) Secondary metabolites production and plant growth promotion by *Pseudomonas chlororaphis* and *P. aurantiaca* strains isolated from Cactus, Cotton, and Para Grass. *Microbiol Biotechnol.*, 27(3), 480-491.
- Sharma K.**, Zha J., Chouhan S., Guleria S., and Koffas M. A. G. (2019) Biosynthesis of polyphenols in recombinant micro-organisms a path to sustainability. In " Halbwirth H., Stich K., Cheynier V. and Quideau S., Recent advances in polyphenol Research, Ed. Wiley Blackwell, 239-251".
- Sharopov F.**, Valiev A., Sobeh M., Arnold E., and Winka M. (2018) Bioactivity of three *Salvia* species in relation to their total phenolic and flavonoid contents. *Pharm Chem J.*, 52(7), 596-600.
- Shrestha L. B.**, Bhattarai N. R. and Khanal B. (2017) Antibiotic resistance and biofilm formation among Coagulase-Negative Staphylococci isolated from clinical samples at a tertiary care hospital of eastern Nepal. *Antimicrob Resist Infect Control.*, 6, 89.
- Sienkiewicz M.**, Łysakowska M., Denys P. and Kowalczyk E. (2012) The antimicrobial activity of thyme essential oil against multidrug resistant clinical bacterial strains. *Microb Drug Resist.*, 18(2), 137-148.
- Silvant C.** (2014) L'Aromathérapie: La nature au service de l'humanité, Ed. Publibook Amazon France, 26-30.
- Singh J.** (2008) Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants. In " Handa S. S., Khanuja S. P. S., Longo G., Rakesh D. D. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, Ed. International Center for Science and High Technology, 70-78".

- Singleton P.** (1999) Bactériologie, Ed. Duonod, Paris, 415.
- Slininger P. J.** and Jackson M. A. (1992) Nutritional factors regulating growth and accumulation of phenazine 1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 37, 388-392.
- Soberón-Chávez G., Lépine F., and Déziel E. (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 68(6), 718-725.
- Soković M.**, Marin P. D., Brkić D. and van Griensven L. J. L. D. (2007) Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. *Global Science Books*, 1(1), 1-21.
- Solati S. M.**, Tajbakhsh E., Khamesipour F. and Gugnani H. C. (2015) Prevalence of virulence genes of biofilm producing strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in Iran. *AMB Expr.*, 5, 47.
- Sotirova A. V.**, Spasova D. I., Galabova D. N., Karpenko E. and Shulga A. (2008) Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on Gram positive and Gram negative bacterial strains. *Curr Microbiol.*, 56(6), 639-644.
- Soumya K. R.**, Philip S., Sugathan S., Mathew J. and Radhakrishnan E. K. (2017) Virulence factors associated with Coagulase Negative Staphylococci isolated from human infections. *Biotech.*, 7, 140.
- Stasis V.**, Verykokidou E., Loukis A., Harvala C. and Philianos S. (1996) The Antimicrobial activity of the essential oils of four *Juniperus* Species growing wild in Greece. *Flavour Frag J.*, 11, 71-74.
- Stepanovic S.**, Vukovi D., Hola V., Bonaventura G., Djukic S., C'irkovic' I. and Ruzicka F. (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci. *APMIS.*, 115, 891-899.
- Strasheim W.**, Kock M. M., Dreyer A. W. and Ehlers M. M. (2013) Molecular markers of resistance in Coagulase-Negative Staphylococci implicated in catheter-related bloodstream infections. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, 3, 1822-1832.
- Swamy M. K.**, Akhtar M. S., and Sinniah U. R. (2016) Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An Updated Review. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 1-21.
- Taârit M. B.**, Msaada K., Hosni K., and Marzouk B. (2012) Physiological changes, phenolic content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* L. grown under saline conditions. *J Sci Food Agric.*, 92(8), 16145-1619.
- Talebi M.**, Shafiee M., Sadeghi J., Moghadam N. A., Saifi M. and Pourshafie M. R. (2016) Genotypic diversity of methicillin-resistant Coagulase-Negative Staphylococci isolated from inpatients and outpatients. *Microb Drug Resist.*, 22(2), 147-54.

- Thomashow L. S.**, Weller D. M., Bonsall R. F. and Pierson III S. L. (1990) Production of the antibiotic Phenazine-1-Carboxylic Acid by Fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl Environ Microbiol.*, 56(4), 908-912.
- Thompson K. M.** and Jefferson K. K. (2009) Adaptation to Stress: Biofilms and small-colony Variants. In "Crossley K. B., Jefferson K. K., Archer G. L. And Fowler Jr V. G., Staphylococci in human disease, second Ed. wiley Blackwell, 110-111".
- Toder D. S.** (1999) *Pseudomonas aeruginosa*: pathogène ubiquitaire. In " Schaechter M., Medoff G., Eisenstein B. I., microbiologie et pathologie infectieuse. 2^{ème} Ed., 284"
- Tremblay Y. D. N.**, Hathroubi S. et Jacques M. (2014) Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can J Vet Res.*, 78, 110-116.
- Tural S.** and Turhan S. (2017) Antimicrobial and antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and laurel (*Lauris nobilis* L.) essential oils and their mixtures. *J. Food*, 42 (5), 588-596.
- Valle Gomes M. Z.**, and Nitschke M. (2012) Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. *Food Control*, 25(2), 441-447.
- Van Pée K.-H.** (2012) Biosynthesis of halogenated alkaloids. *The Alkaloids: Chem Bio.*, 167-210.
- Varaldo P. E.** and Satta G. (1988) Staphylococcal diseases. In "Balows A., Hausler W. J. Jr., Ohashi M. and Turano A., Laboratory diagnosis of infectious diseases principles and Practice, Volume I. Ed. Springer-Verlag, 475".
- Veerendrakumar M.** and Janakiram P. (2015) Antagonistic activity exhibited by crude extracts of *Pseudomonas aeruginosa* (PIC-4) against *Aeromonas hydrophila* and *E. coli*. *Int J Life Sci Biotechnol Pharma Res.*, 4(1), 36-41.
- Verbist L.** (1990) The antimicrobial activity of fusidic acid. *J Antimicrob Chemother.*, 25, 1-5.
- Vinay J. U.**, Naik M. K., Rangeshwaran R., Chennappa G., Shaikh S. S. and Sayyed R. Z. (2016) Detection of antimicrobial traits in Fluorescent pseudomonads and molecular characterization of an antibiotic pyoluteorin. *Biotech.*, 6(2), 227.
- Vuong C.** and Otto M. (2002) *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microb Infect.*, 4, 481-489.
- Wang R.**, Khan B. A., Cheung G. Y. C., Bach T-H. L., Jameson-Lee M., Kong K.-F., Queck S.Y., and Otto M. (2011) *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J Clinl Invest.*, 121(1), 238-248.
- Weller D. M.** and Thomashow L. S. (1993) Use of rhizobacteria for biocontrol. *Curr Opin Biotech.*, 4, 306-311.
- Weller D. M.**, Landa B. B., Mavrodi O. V., Schroeder K. L., De La Fuente L., Bankhead S. B., Molar R. A., Bonsall R. F., Mavrodi D. V., and Thomashow L. S. (2007) Role of 2,4-

Diacetylphloroglucinol-Producing Fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant Biol.*, 9, 4-20.

- Whiley R. A.**, Sheikh N. P., Mushtaq N., Hagi-Pavli E., Personne Y., Javaid D. and Waite R. D. (2014) Differential potentiation of the virulence of the *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis liverpool epidemic strain by oral commensal Streptococci. *J Infect Dis.*, 209(5), 769-780.
- Xu Z.**, Mkrtychyan H. V. and Cutler R. R. (2015) Antibiotic resistance and *mecA* characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from three hotels in London, UK. *Front Microbiol.*, 6, 947.
- Yazdani R.**, Oshaghi M., Havayi A., Pishva E., Salehi R. and Sadeghizadeh M. (2006) Detection of *icaAD* gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from wound infections. *Iran J Public Health*, 35, 25.
- Yousif A.**, Jamal M. A., and Raad I. (2015) Biofilm-based central line associated bloodstream infections. In " Donelli G., Biofilm-based Health care associated infections, Ed. Springer, Vol I., 164".
- Zarzuolo A.** and Crespo E. (2002) The medicinal and non-medicinal uses of thyme. In "Stahl-Biskup E. and Sàez F., thyme, the genus *Thymus*, Ed. Taylor & Francis".
- Zeraib A.**, Ramdani M., Boudjedjou L. Chalard P., Figuredo G. (2014) Chemical composition and antibacterial activity of *Juniperus thurifera* L. essential oils. *J Bio Sci Biotech.*, 3(2), 147-154.
- Zong Z.**, Peng C. and Lu" X. (2011) Diversity of SCC*mec* elements in methicillin-resistant Coagulase-Negative Staphylococci clinical isolates. *PLoS ONE*, 6 (5), 1-6.
- Žukovskaja O.**, Jahn I. J., Weber K., Cialla-May D. and Popp J. (2017) Detection of *Pseudomonas aeruginosa* metabolite pyocyanin in water and saliva by employing the SERS technique. *Sensors*, 17, 1-11.

Annexes

Annexe I. Tableau de lecture de Galerie API Staph

Tests	Composants actifs	Réactions/enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
0	Aucun	Témoin négatif	Rouge	-
GLU	D-glucose	Témoin positif	Rouge*	Jaune
FRU	D-fructose	acidification (D-FRUctose)		
MNE	D-mannose	acidification (D-ManNosE)		
MAL	Maltose	acidification (MALtose)		
LAC	Lactose	acidification (LACtose)		
TRE	D-tréhalose	acidification (D-TREhalose)		
MAN	D-mannitol	acidification (D-MANnitol)		
XLT	Xylitol	acidification (XyLiTol)		
MEL	D-melibiose	acidification (D-MELibiose)		
NIT	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites		
			Incolore	Rouge
PAL	B-naphtyl ac. phosphate	Phosphatase alcaline	ZYM A+ ZYM B / 10min	
			Jaune	violet
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl-carbonyl	VP 1+ VP 2 /10min	
			Incolore/rose	Violet/rose
RAF	Raffinose	Acidification à partir du carbohydrate	Rouge	Jaune
XYL	Xylose			
SAC	Saccharose			
MDG	α -méthyl-D-glucosamine			
NAG	N-acétyl-glucosamine			
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/violet

Les tests d'acidification doivent être lus comparativement aux témoins négatifs (0) et positif (GLU). * Les tests MNE et XLT peuvent être oranges, lorsqu'ils sont entourés ou précédés de tests positifs. On doit alors les considérer comme négatifs.

Annexe II. Valeurs des diamètres des zones d'inhibition pour *Staphylococcus* spp.
(CLSI, 2014).

Antibiotique	Charge de disque	diamètres de zones (mm)			Critères d'interprétation de CMI (µg/ml)		
		S	I	R	S	I	R
Pénicilline	10 UI	≥29	-	≤28	≤0.12	-	≥0.25
Oxacilline (SCN à l'exception de <i>S. lugdunensis</i>)	-	-	-	-	≤0.25	-	≥0.5
Céfoxitine	30 µg	≥25	-	≤24	-	-	-
Vancomycine (SCN)	-	-	-	-	≤4	8-16	≥32
Teicoplanine	30 µg	≥14	11-13	≤10	≤8	16	≥32
Gentamicine	10 µg	≥15	13-14	≤12	≤4	8	≥16
Amikacine	30 µg	≥17	15-16	≤14	≤16	32	≥64
kanamycine	30 µg	≥18	14-17	≤13	≤16	32	≥64
Erythromycine	15 µg	≥23	14-22	≤13	≤0.5	1-4	≥8
Tétracycline	30 µg	≥19	15-18	≤14	≤4	8	≥16
Ciprofloxacine	5 µg	≥21	16-20	≤15	≤1	2	≥4
Lévofloxacine	5 µg	≥19	16-18	≤15	≤1	2	≥4
Ofloxacine	5 µg	≥18	15-17	≤14	≤1	2	≥4
Clindamycine	2 µg	≥21	15-20	≤14	≤0.5	1-2	≥4
Triméthoprime-sulfaméthoxazole	1.25/23.75µg	≥16	11-15	≤10	≤2/38	-	≥4/76
Chloramphénicol	30 µg	≥18	13-17	≤12	≤8	16	≥32
Rifampicine	5 µg	≥20	17-19	≤16	≤1	2	≥4
Pristinamycine	15 µg	≥19	16-18	≤15	≤1	2	≥4
Acide fusidique	10µg	≥25		≤24			

Annexe III. Extraction de l'ADN

-Toutes les étapes doivent être effectuées à température ambiante, sauf indication contraire.

-Le tampon de lavage (concentré) doit être dilué avec de l'éthanol absolu avant utilisation.

*Centrifugation

-1-3 ml de culture bactérienne cultivée pendant une nuit est centrifugé à 6000 g pendant 2 min à température ambiante. Décantez complètement le surnageant.

-Une élimination complète du surnageant est essentielle car les milieux de culture résiduels peuvent affecter à la fois le rendement et la pureté.

*Remise en suspension du culot

-Ajouter 100 µl de tampon R1 au culot et remettre complètement les cellules en suspension en pipetant de haut en bas.

*Traitement par lysozyme

-Ajoutez 20 µl de lysozyme (50 mg/ml) dans la suspension cellulaire.

-Bien mélanger et incuber à 37°C pendant 20 min.

*Centrifugation

-Centrifugez la suspension à 10 000 x g pendant 3 min. Décantez complètement le surnageant.

*Dénaturation des protéines

-Remettre en suspension le culot dans 180 µl de tampon R2 et ajouter 20 µl de protéinase K. Bien mélanger.

-Incuber à 65 ° C pendant 20 min dans un bain-marie à agitation ou avec un mélange occasionnel toutes les 5 min.

*Facultatif: élimination de l'ARN

-Si de l'ADN sans ARN est requis, ajoutez 20 µl de RNase A (sans DNase, 20 mg/ml). Mélanger et incuber à 37 ° C pendant 5 min.

*Homogénéisation

-Ajouter 2 volumes (~ 400 µl sans traitement RNase A, ~ 440 µl avec traitement RNase A) de tampon BG et bien mélanger en inversant le tube plusieurs fois jusqu'à ce qu'une solution homogène soit obtenue. Incuber pendant 10 min à 65 ° C.

*Ajout d'éthanol

-Ajouter 200 µl d'éthanol absolu. Mélangez immédiatement et soigneusement.

*Chargement dans la colonne

-Transférer l'échantillon (maximum 650 µl) dans une colonne assemblée dans un tube de prélèvement propre (fourni).

-Centrifuger à 10 000 x g pendant 1 min. Jeter le flux.

*Lavage de la colonne

-Laver la colonne avec 650 µl de tampon de lavage et centrifuger à 10 000 x g pendant 1 min. Jeter le flux.

*Séchage sur colonne

-Centrifuger la colonne à 10 000 x g pendant 1 min pour éliminer l'éthanol résiduel.

*Elution d'ADN

-Placez la colonne dans un tube de microcentrifugeuse propre. Ajouter 50 à 100 µl de tampon d'élution préchauffé, tampon TE ou eau stérile directement sur la membrane de la colonne et reposer pendant 2 min.

-Centrifuger à 10 000 x g pendant 1 min pour éluer l'ADN. Conservez l'ADN à 4 ° C ou -20 ° C.

Annexe IV. Extrait du tableau de lecture de la galerie api 20 NE (Delarras, 2007).

Tests	Composants actifs (réaction/ enzymes)	Réactions	
		Négatif	Positif
No₃	Potassium nitrate	Incolore	Rose-rouge
	(réduction des nitrates en nitrites)	Rose après Zn	Incolore après Zn
TRP	L-tryptophane (formation d'indole)	Incolore à vert pâle/ jaune	Rose
GLU	D-glucose (fermentation)	Bleu à vert	Jaune
ADH	L-arginine (arginine dihydrolase)	Jaune	Orange /rose / rouge
URE	Urée (uréase)	Jaune	Rose
ESC	Esculine et citrate de fer (hydrolyse de l'esculine)	Jaune	Gris/ marron/ noir
GEL	Gélatine (origine bovine hydrolyse par protéase)	Pas de diffusion de pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-βD- galactopyranoside (β-galactosidase)	Incolore	Jaune
GLU	D-glucose	Transparence	Trouble
ARA	L-arabinose	Transparence	Trouble
MNE	D-mannose	Transparence	Trouble
MAN	D-mannitol	Transparence	Trouble
NAG	N-acétyl glucosamine	Transparence	Trouble
MAL	D-maltose	Transparence	Trouble
GNT	Potassium gluconate	Transparence	Trouble
CAP	Acide caprique	Transparence	Trouble
ADI	Acide adipique	Transparence	Trouble
MLT	Acide malique	Transparence	Trouble
CIT	Trisodium citrate	Transparence	Trouble
PAC	Acide phénylacétique	Transparence	Trouble
OX	Test oxydase hors galerie	(voir notice du test oxydase)	

Annexe V. Milieux de culture utilisés

<p>Gélose nutritive</p> <p>Peptone.....5g Extrait de viande.....1g Extrait de levure.....2g Chlorure de sodium.....15g Agar.....15 g pH = 7.4</p>	<p>Bouillon nutritif</p> <p>Peptone.....5g Extrait de viande.....1g Extrait de levure.....2g Chlorure de sodium.....15g pH = 7.4</p>
<p>Bouillon Trypticase Soja</p> <p>Peptone de caséine (bovin).....17g Peptone de soja.....3g Chlorure de sodium.....5g Phosphate bipotassique.....2.5g Glucose.....2.5g pH= 7.3</p>	<p>Gélose Chapman</p> <p>Extrait de viande.....1 g Peptone de caséine et de viande.... 10 g Chlorure de sodium.....75 g D-Mannitol.....10 g Agar.....15 g Rouge de phénol0.025g pH = 7.4</p>
<p>Rouge Congo Agar</p> <p>Bouillon Cœur Cervelle37 g/l Saccharose.....50 g Agar agar10 g Colorant rouge Congo..... 0,8 g</p>	<p>Milieu Mueller Hinton</p> <p>Protéose-peptone.....10 g Infusion de cervelle de veau.....12,5 g Infusion de cœur de bœuf.....5,0 g Glucose.....2,0 g Chlorure de sodium.....5,0 g Hydrogénophosphate de sodium...2,5 g pH=7,4</p>
<p>King B solide</p> <p>Peptone bactériologique "B".....20 g Glycérol10 ml Hydrogénophosphate de potassium anhydre (K₂HPO₄).....1,5 g Sulfate de magnésium hydraté (MgSO₄·7H₂O).....1,5 g Agar purifié.....12 g</p>	<p>NBY à 2% de glucose</p> <p>Bouillon nutritif 8,0 g Extrait de levure2,0 g K₂HPO₄2,0g KH₂PO₄ 0.5 g Glucose2,0 g MgSO₄·7H₂O0.25 g pH =7,0</p>

pH = 7,2 ± 0.2	
Bouillon cœur servelle	
Protéose-peptone.....10 g	
Infusion de cervelle de veau12,5 g	
Infusion de cœur de bœuf.....5,0 g	
Glucose2 g	
Chlorure de sodium5 g	
Hydrogénophosphate de sodium2,5 g	
pH = 7,4	

Annexe VI. Moyennes de diamètres des zones d'inhibition des HE et des EM.

SPSS Statistics Viewer

Données Transformer Insérer Format Analyse Marketing direct Graphes Utilitaires

Tableau de bord

espèce		DiaHTc	DiaHSo	DiaHJo	DiaHJt
S. epidermidis	Moyenne	26.3500	14.5667	6.3222	6.4389
	N	90	90	90	90
	Maximum	35.00	25.00	10.00	8.50
	Minimum	13.50	6.00	6.00	6.00
S. haemolyticus	Moyenne	24.6786	14.2381	6.9762	6.3214
	N	42	42	42	42
	Maximum	36.00	24.00	10.50	9.00
	Minimum	18.00	6.00	6.00	6.00
S. hominis	Moyenne	25.1458	17.5833	7.3958	6.5208
	N	24	24	24	24
	Maximum	34.00	25.00	11.50	9.50
	Minimum	16.50	6.00	6.00	6.00
S. chromogenes	Moyenne	23.3611	7.9167	6.0000	6.3333
	N	18	18	18	18
	Maximum	36.00	10.50	6.00	8.00
	Minimum	19.00	6.00	6.00	6.00
autres espèces	Moyenne	25.4375	12.6250	6.7083	6.4167
	N	24	24	24	24
	Maximum	35.00	25.00	10.00	8.00
	Minimum	14.00	6.00	6.00	6.00

*Résultats2 [Document2] - IBM SPSS Statistics Viewer

Fichier Edition Affichage Données Transformer Insérer Format Analyse Marketing direct Graphes Utilitaires

Résultats

- Log
- Moyennes
 - Titre
 - Remarques
 - Ensemble de don
 - Observation Calcu
 - Tableau de bord
- Log
- Moyennes
 - Titre
 - Remarques
 - Ensemble de don
 - Observation Calcu
 - Tableau de bord
 - Tableau ANOVA
 - Mesures des ass

Tableau de bord

espèce		DiaMtc	DiaMSo	DiaMJo	DiaMJt
S. epidermidis	Moyenne	13.3833	8.8833	6.0000	6.4389
	Maximum	20.50	20.00	6.00	9.00
	Minimum	8.00	6.00	6.00	6.00
	N	90	90	90	90
S. haemolyticus	Moyenne	14.2262	7.6310	6.0000	6.0000
	Maximum	23.00	16.00	6.00	6.00
	Minimum	8.00	6.00	6.00	6.00
	N	42	42	42	42
S. hominis	Moyenne	18.4375	9.3125	6.0000	6.3125
	Maximum	25.00	19.00	6.00	8.50
	Minimum	11.00	6.00	6.00	6.00
	N	24	24	24	24
S. chromogenes	Moyenne	16.8056	10.5833	6.0000	6.5833
	Maximum	25.00	17.00	6.00	9.50
	Minimum	10.00	6.00	6.00	6.00
	N	18	18	18	18
autres espèces	Moyenne	16.0000	6.9167	6.0000	6.1250
	Maximum	24.00	10.50	6.00	7.00
	Minimum	8.00	6.00	6.00	6.00
	N	24	24	24	24

Annexe VII. Moyennes des CMI et CMB des HE et des EM.

*Résultats2 [Document2] - IBM SPSS Statistics Viewer

Fichier Edition Affichage Données Transformer Insérer Format Analyse Marketing direct Gra

Remarques Ensemble de d Observation Ca Tableau de bor Tableau ANOVA Mesures des a

Log Moyennes Titre Remarques Ensemble de d Observation Ca Tableau de bor Tableau ANOVA Mesures des a

Log Moyennes Titre Remarques Ensemble de d Avertissements Observation Ca Tableau de bor Tableau ANOVA Mesures des a

Log Moyennes Titre Remarques

CMIHJt * espèce		0	0.0%	198	10
Tableau de bord					
espèce		CMIHTc	CMIHSo		
S. epidermidis	Moyenne	3.3142	48.2790		
	Maximum	12.50	100.00		
	Minimum	.19	3.13		
	N	90	69		
S. haemolyticus	Moyenne	2.5571	36.8750		
	Maximum	12.50	100.00		
	Minimum	.39	6.25		
	N	42	30		
S. hominis	Moyenne	3.4900	10.9375		
	Maximum	12.50	25.00		
	Minimum	.19	3.13		
	N	24	18		
S. chromogenes	Moyenne	1.5933	100.0000		
	Maximum	3.13	100.00		
	Minimum	.19	100.00		
	N	18	9		
autres espèces	Moyenne	2.3431	25.8333		
	Maximum	6.25	50.00		
	Minimum	.39	3.13		
	N	24	15		

Fichier Edition Affichage Données Transformer Insérer Format Analyse Marketing direct Gr

Tableau de bord

espèce		CMBHTc	CMBHSo
S. epidermidis	Moyenne	6.8463	65.9314
	Maximum	25.00	100.00
	Minimum	.19	6.25
	N	90	51
S. haemolyticus	Moyenne	4.6126	67.1296
	Maximum	25.00	100.00
	Minimum	.78	12.50
	N	42	27
S. hominis	Moyenne	6.0208	20.4861
	Maximum	25.00	50.00
	Minimum	.39	6.25
	N	24	18
S. chromogenes	Moyenne	4.4067	
	Maximum	6.25	
	Minimum	.39	
	N	18	
autres espèces	Moyenne	4.7188	51.2500
	Maximum	12.50	100.00
	Minimum	.78	6.25
	N	24	15

Remarques
Ensemble de données actif
Observation Calculer Récap
Tableau de bord
Tableau ANOVA
Mesures des associations
Log
Moyennes
Titre
Remarques
Ensemble de données actif
Avertissements
Observation Calculer Récap
Tableau de bord
Tableau ANOVA
Mesures des associations
Log
Moyennes
Titre
Remarques
Ensemble de données actif
Avertissements
Observation Calculer Récap
Tableau de bord
Tableau ANOVA
Mesures des associations
Log
Moyennes

Annexe VIII. Moyennes de l'activité antibiofilm des HE et EM.

Tableau de bord

espèce		inhibitionsoh	inhibitionTCH	inhibitionmtc	inhibitionmso
S epidermidis	Moyenne	48.2279	65.7898	55.6682	50.7991
	Minimum	37.55	45.39	45.36	43.64
	Maximum	70.60	81.30	70.23	61.30
	N	66	84	84	33
S haemolyticus	Moyenne	49.2204	66.7758	57.5028	46.0333
	Minimum	40.71	45.06	35.87	35.06
	Maximum	55.67	80.04	70.66	52.80
	N	24	36	36	9
S hominis	Moyenne	65.0000	64.7894	61.0961	53.4622
	Minimum	59.30	42.77	55.54	49.30
	Maximum	70.52	81.08	66.66	55.54
	N	15	18	18	9
S chromogenes	Moyenne	43.7967	65.4711	59.3473	51.0442
	Minimum	39.38	50.60	49.49	40.60
	Maximum	47.80	80.49	69.81	65.68
	N	9	18	15	12
Autres espèce	Moyenne	59.4533	65.3667	56.8157	47.3167
	Minimum	47.22	49.98	50.62	47.30
	Maximum	69.22	73.39	62.67	47.33
	N	12	21	21	3
	Moyenne	51.1662	65.8060	57.0649	50.3986

21	Moyenne	32.5000	.3900	1.3000	13.0000	6.2500	12.5000
	Ecart-type	.00000	.00000	.45033	.00000	.00000	.00000
22	Moyenne	30.0000	.7800	1.5600	16.3333	1.5600	3.1300
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.57735	.00000	.00000
23	Moyenne	24.5000	3.1250	6.2500	13.0000	6.2500	12.5000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
24	Moyenne	30.5000	.1900	.6500	14.3333	6.2500	12.5000
	Ecart-type	.00000	.00000	.22517	.57735	.00000	.00000
25	Moyenne	33.0000	.3900	.7800	18.0000	1.5600	4.1700
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	1.80133
26	Moyenne	34.0000	.7800	1.0400	15.5000	3.1300	6.2500
	Ecart-type	.00000	.00000	.45033	.00000	.00000	.00000
27	Moyenne	18.3333	6.2500	12.5000	12.0000	12.5000	25.0000
	Ecart-type	.57735	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
28	Moyenne	33.6667	.7800	1.0400	17.0000	1.5600	3.1300
	Ecart-type	.28868	.00000	.45033	.00000	.00000	.00000
29	Moyenne	21.5000	1.5600	3.1300	9.0000	25.0000	50.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
30	Moyenne	31.3333	.3867	1.0400	19.6667	1.0400	2.0833
	Ecart-type	.57735	.34064	.45033	.57735	.45033	.90644
31	Moyenne	32.0000	.3900	.7800	22.3333	.7800	1.5600
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.57735	.00000	.00000
32	Moyenne	25.5000	.7800	1.5600	14.6667	6.2500	12.5000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.28868	.00000	.00000
33	Moyenne	19.0000	3.1250	6.2500	8.0000	25.0000	50.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
34	Moyenne	20.1667	6.2500	6.2500	10.0000	12.5000	25.0000
	Ecart-type	.28868	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
35	Moyenne	26.0000	.7800	1.5600	10.0000	25.0000	50.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
36	Moyenne	19.0000	1.5600	2.6067	12.0000	12.5000	25.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.90644	.00000	.00000	.00000
37	Moyenne	18.0000	12.5000	25.0000	11.1667	12.5000	25.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.28868	.00000	.00000
38	Moyenne	25.0000	.7800	1.5600	15.0000	1.5600	3.1300
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
39	Moyenne	22.5000	3.1250	6.2500	15.0000	3.1300	3.1300
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
40	Moyenne	22.0000	3.1300	6.2500	18.0000	1.5600	3.1300
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
41	Moyenne	26.0000	.6500	1.0400	8.0000	25.0000	50.0000
	Ecart-type	.00000	.22517	.45033	.00000	.00000	.00000

42	Moyenne	31.0000	.7800	1.5600	19.0000	.7800	1.5600
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
43	Moyenne	36.0000	.3900	.7800	22.0000	.7800	1.5600
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
44	Moyenne	23.3333	1.5600	3.1300	14.0000	6.2500	12.5000
	Ecart-type	.28868	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
45	Moyenne	25.3333	.7800	1.5600	18.0000	3.1300	6.2500
	Ecart-type	.57735	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
46	Moyenne	34.0000	.1900	.5200	19.6667	1.5600	2.6067
	Ecart-type	.00000	.00000	.22517	.28868	.00000	.90644
47	Moyenne	31.0000	.7800	1.5600	25.0000	.7800	.7800
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
48	Moyenne	19.0000	6.2500	8.3333	17.0000	1.5600	3.1300
	Ecart-type	.00000	.00000	3.60844	.00000	.00000	.00000
49	Moyenne	20.5000	6.2500	12.5000	15.5000	3.1300	6.2500
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.50000	.00000	.00000
50	Moyenne	16.8333	12.5000	20.8333	11.0000	6.2500	12.5000
	Ecart-type	.28868	.00000	7.21688	.00000	.00000	.00000
51	Moyenne	29.5000	.3900	1.3000	23.0000	.7800	1.5600
	Ecart-type	.00000	.00000	.45033	.00000	.00000	.00000
52	Moyenne	25.0000	.7800	1.5600	18.3333	1.5600	3.1300
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.57735	.00000	.00000
53	Moyenne	19.3333	1.5600	3.1300	12.3333	12.5000	20.8333
	Ecart-type	.57735	.00000	.00000	.57735	.00000	7.21688
54	Moyenne	19.0000	1.5600	4.1700	14.5000	6.2500	6.2500
	Ecart-type	.00000	.00000	1.80133	.00000	.00000	.00000
55	Moyenne	36.0000	.1900	.3900	25.0000	.7800	1.5600
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
56	Moyenne	22.6667	3.1300	6.2500	19.0000	1.5600	3.1300
	Ecart-type	.28868	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
57	Moyenne	24.0000	1.5600	6.2500	20.0000	1.5600	3.1300
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
58	Moyenne	19.1667	1.5600	6.2500	10.0000	12.5000	16.6667
	Ecart-type	.28868	.00000	.00000	.00000	.00000	7.21688
59	Moyenne	35.0000	.3900	.7800	20.0000	1.5600	3.1300
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
60	Moyenne	33.1667	.3900	1.0400	23.0000	.7800	1.5600
	Ecart-type	.28868	.00000	.45033	.00000	.00000	.00000
61	Moyenne	33.0000	.7800	1.5600	24.0000	.7800	1.5600
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
62	Moyenne	20.0000	3.1250	6.2500	14.5000	6.2500	12.5000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.50000	.00000	.00000

63	Moyenne	15.0000	6.2500	12.5000	8.0000	25.0000	50.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
64	Moyenne	24.1667	.7800	1.5600	14.0000	6.2500	12.5000
	Ecart-type	.28868	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
65	Moyenne	14.0000	6.2500	12.5000	9.5000	12.5000	16.6667
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	7.21688
66	Moyenne	29.1667	.7800	1.5600	15.0000	3.1300	6.2500
	Ecart-type	.28868	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000

Tableau de bord

espèce		DiaHSo	CMIHSo	CMBHSo	DiaMSo	CMIMSo	CMBMSo
1	Moyenne	14.8333	50.0000	50.0000	10.0000	100.0000	
	Ecart-type	.28868	.00000	.00000	.00000	.00000	
2	Moyenne	25.0000	12.5000	25.0000	6.0000		
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000		
3	Moyenne	6.0000			6.0000		
	Ecart-type	.00000			.00000		
4	Moyenne	18.0000	50.0000	100.0000	6.0000		
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000		
5	Moyenne	18.3333	12.5000	50.0000	6.0000		
	Ecart-type	.57735	.00000	.00000	.00000		
6	Moyenne	6.0000			6.0000		
	Ecart-type	.00000			.00000		
7	Moyenne	6.0000			6.0000		
	Ecart-type	.00000			.00000		
8	Moyenne	18.0000	50.0000	100.0000	6.0000		
	Ecart-type	.00000			.00000		
9	Moyenne	15.0000	50.0000	100.0000	10.0000	100.0000	
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	
10	Moyenne	17.1667	50.0000	100.0000	12.0000	50.0000	100.0000
	Ecart-type	.28868	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
11	Moyenne	22.0000	25.0000	50.0000	14.0000	50.0000	100.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
12	Moyenne	22.0000	12.5000	50.0000	6.0000		
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000		
13	Moyenne	19.0000	50.0000	100.0000	6.0000		
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000		
14	Moyenne	6.0000			20.0000	3.1300	6.2500
	Ecart-type	.00000			.00000	.00000	.00000
15	Moyenne	9.0000	100.0000		11.8333	50.0000	83.3333
	Ecart-type	.00000	.00000		.28868	.00000	28.86751

16	Moyenne	8.1667	100.0000		14.0000	25.0000	50.0000
	Ecart-type	.28868	.00000		.00000	.00000	.00000
17	Moyenne	10.0000	100.0000		8.0000		
	Ecart-type	.00000	.00000		.00000		
18	Moyenne	15.0000	25.0000	100.0000	7.0000		
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000		
19	Moyenne	8.0000	100.0000		6.0000		
	Ecart-type	.00000	.00000		.00000		
20	Moyenne	6.0000			6.0000		
	Ecart-type	.00000			.00000		
21	Moyenne	20.5000	25.0000	50.0000	6.0000		
	Ecart-type	.50000	.00000	.00000	.00000		
22	Moyenne	25.0000	3.1250	6.2500	14.8333	25.0000	50.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.28868	.00000	.00000
23	Moyenne	19.6667	16.6667	33.3333	12.6667	50.0000	100.0000
	Ecart-type	.28868	7.21688	14.43376	.28868	.00000	.00000
24	Moyenne	10.0000	100.0000		15.6667	12.5000	25.0000
	Ecart-type	.00000	.00000		.57735	.00000	.00000
25	Moyenne	20.0000	25.0000	100.0000	6.0000		
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000		
26	Moyenne	23.1667	3.1250	6.2500	6.0000		
	Ecart-type	.28868	.00000	.00000	.00000		
27	Moyenne	6.0000			6.0000		
	Ecart-type	.00000			.00000		
28	Moyenne	13.6667	50.0000	100.0000	9.5000	100.0000	
	Ecart-type	.57735	.00000	.00000	.00000	.00000	
29	Moyenne	11.5000	100.0000		11.0000	50.0000	100.0000
	Ecart-type	.00000	.00000		.00000	.00000	.00000
30	Moyenne	18.0000	50.0000	100.0000	6.0000		
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000		
31	Moyenne	17.0000	50.0000	100.0000	6.0000		
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000		
32	Moyenne	6.0000			6.0000		
	Ecart-type	.00000			.00000		
33	Moyenne	6.0000			6.0000		
	Ecart-type	.00000			.00000		
34	Moyenne	6.0000			6.0000		
	Ecart-type	.00000			.00000		
35	Moyenne	23.3333	6.2500	12.5000	6.0000		
	Ecart-type	.57735	.00000	.00000	.00000		
36	Moyenne	22.5000	12.5000	50.0000	6.0000		
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000		

37	Moyenne	6.0000			15.5000	12.5000	25.0000
	Ecart-type	.00000			.50000	.00000	.00000
38	Moyenne	13.5000	50.0000	100.0000	6.0000		
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000		
39	Moyenne	19.6667	25.0000	50.0000	6.5000		
	Ecart-type	.28868	.00000	.00000	.00000		
40	Moyenne	17.0000	25.0000	100.0000	15.0000	12.5000	25.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
41	Moyenne	20.5000	25.0000	50.0000	6.0000		
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000		
42	Moyenne	15.0000	50.0000	100.0000	6.0000		
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000		
43	Moyenne	17.3333	25.0000	41.6667	6.0000		
	Ecart-type	.28868	.00000	14.43376	.00000		
44	Moyenne	9.5000	100.0000		9.8333	100.0000	
	Ecart-type	.00000	.00000		.28868	.00000	
45	Moyenne	23.0000	6.2500	12.5000	12.5000	50.0000	100.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
46	Moyenne	21.0000	12.5000	25.0000	6.0000		
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000		
47	Moyenne	25.0000	3.1250	6.2500	6.0000		
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000		
48	Moyenne	22.0000	6.2500	12.5000	13.0000	25.0000	50.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.50000	.00000	.00000
49	Moyenne	18.6667	12.5000	25.0000	19.0000	6.2500	12.5000
	Ecart-type	.28868	.00000	.00000	.00000	.00000	.00000
50	Moyenne	6.0000			6.0000		
	Ecart-type	.00000			.00000		
51	Moyenne	6.0000			6.0000		
	Ecart-type	.00000			.00000		
52	Moyenne	19.0000	25.0000	41.6667	6.0000		
	Ecart-type	.00000	.00000	14.43376	.00000		
53	Moyenne	9.5000	100.0000		16.6667	12.5000	25.0000
	Ecart-type	.00000	.00000		.57735	.00000	.00000
54	Moyenne	8.5000	100.0000		14.0000	25.0000	25.0000
	Ecart-type	.00000	.00000		.00000	.00000	.00000
55	Moyenne	7.0000			11.8333	50.0000	100.0000
	Ecart-type	.00000			.28868	.00000	.00000
56	Moyenne	6.0000			6.0000		
	Ecart-type	.00000			.00000		
57	Moyenne	10.5000	100.0000		6.0000		
	Ecart-type	.00000	.00000		.00000		

58	Moyenne	6.0000			9.0000	100.0000
	Ecart-type	.00000			.00000	.00000
59	Moyenne	15.0000	25.0000	50.0000	8.0000	
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	
60	Moyenne	12.5000	25.0000	50.0000	7.0000	
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	
61	Moyenne	25.0000	4.1667	6.2500	10.3333	100.0000
	Ecart-type	.00000	1.80422	.00000	.28868	.00000
62	Moyenne	6.0000			6.0000	
	Ecart-type	.00000			.00000	
63	Moyenne	6.0000			6.0000	
	Ecart-type	.00000			.00000	
64	Moyenne	12.0000	50.0000	100.0000	6.0000	
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000	
65	Moyenne	6.0000			6.0000	
	Ecart-type	.00000			.00000	
66	Moyenne	18.5000	25.0000	50.0000	6.0000	
	Ecart-type	.50000	.00000	.00000	.00000	

Tableau de bord

espèce		DiaHJo	DiaMJo	DiaHJt	DiaMJt
1	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
2	Moyenne	6.0000	6.0000	8.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
3	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	8.8333
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.28868
4	Moyenne	9.6667	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.28868	.00000	.00000	.00000
5	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
6	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	7.3333
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.28868
7	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	8.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
8	Moyenne	6.0000	6.0000	6.6667	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	1.15470	.00000
9	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
10	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000

11	Moyenne	8.5000	6.0000	7.1667	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.28868	.00000
12	Moyenne	6.0000	6.0000	8.1667	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.28868	.00000
13	Moyenne	6.0000	6.0000	7.6667	8.5000
	Ecart-type	.00000	.00000	.28868	.00000
14	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
15	Moyenne	6.0000	6.0000	6.5000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
16	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
17	Moyenne	9.5000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.50000	.00000	.00000	.00000
18	Moyenne	6.0000	6.0000	8.0000	9.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
19	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
20	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
21	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
22	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
23	Moyenne	6.0000	6.0000	6.5000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
24	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	7.5000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
25	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
26	Moyenne	6.0000	6.0000	7.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
27	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
28	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
29	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
30	Moyenne	6.0000	6.0000	7.5000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	1.32288	.00000
31	Moyenne	10.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000

32	Moyenne	6.0000	6.0000	7.5000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
33	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
34	Moyenne	9.8333	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.28868	.00000	.00000	.00000
35	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
36	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
37	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
38	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
39	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
40	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
41	Moyenne	7.5000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
42	Moyenne	6.0000	6.0000	9.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
43	Moyenne	10.3333	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.28868	.00000	.00000	.00000
44	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
45	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
46	Moyenne	8.5000	6.0000	9.1667	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.28868	.00000
47	Moyenne	9.5000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.50000	.00000	.00000	.00000
48	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	8.5000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
49	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
50	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
51	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
52	Moyenne	11.1667	6.0000	7.0000	6.0000
	Ecart-type	.28868	.00000	.00000	.00000

53	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
54	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
55	Moyenne	6.0000	6.0000	8.0000	9.5000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
56	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
57	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
58	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
59	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
60	Moyenne	6.0000	6.0000	8.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
61	Moyenne	9.6667	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.57735	.00000	.00000	.00000
62	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
63	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
64	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
65	Moyenne	6.0000	6.0000	6.0000	7.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.00000	.00000
66	Moyenne	8.0000	6.0000	7.3333	6.0000
	Ecart-type	.00000	.00000	.28868	.00000

Publications et Communications

Publications

Zatout Asma, Djibaoui Rachid, Dahah Hicham, Mazari Hibat Errahmen, Benkredda Fatima and Kassah-Laouar Ahmed (2019) Antibacterial and antibiofilm activity of the phenazine extract of a fluorescent *Pseudomonas* on coagulase-negative staphylococci isolated from the Anti-Cancer Center of Batna, Algeria. *International Journal of Biosciences*, 15(3), 412-424.

Zatout Asma, Djibaoui Rachid, Kassah-Laouar Ahmed and Benbrahim Chahla (2020) Coagulase negative staphylococci in Anti-Cancer Center, Batna, Algeria: antibiotic resistance pattern, biofilm formation, and detection of *mecA* and *icaAD* genes. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 21 (1): 21 – 29.

Communications

Communications nationales

Zatout Asma, Benbrahim Chahla, Kassah-Laouar Ahmed et Djibaoui Rachid. Profil de résistance aux antibiotiques du portage nasal du staphylocoque à coagulase négative chez le personnel soignant en fonction des critères sociodémographiques. 2^{ème} Séminaire National de Biologie et Santé, Sidi BelAbbes, 18 Décembre 2017.

Zatout Asma, Benbrahim Chahla, Kassah-Laouar Ahmed et Djibaoui Rachid. Evaluation de la formation de biofilm des staphylocoques à coagulase négative isolés au centre Anti-Cancer du Batna par la méthode de rouge congo agar. Premières rencontres aurassiennes locales, résistance bactérienne aux antibiotiques, état des lieux au 3^{ème} millénaire, 7 mars 2018.

Zatout Asma, Benbrahim Chahla, Djibaoui Rachid et Kassah-Laouar Ahmed. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique de *Salvia officinalis* contre les staphylocoques à coagulase négative isolés du Centre Anti-Cancer, Batna. 1^{ères} journées d'étude sur la chimie et ses applications, Batna, 1, 27 novembre 2019.

Zatout Asma, Benkredda Fatima, Mazari Hibat Errahmen, Benbrahim Chahla, Djibaoui Rachid, Dahah Hicham et Kassah-Laouar Ahmed. Activité antibiofilm de l'extrait phénazinique de *Pseudomonas fluorescens* sur les staphylocoques à coagulase négative isolés du Centre Anti-Cancer de Batna, Algérie. 1^{er} séminaire national de l'apport des biotechnologies sur la protection de l'Environnement, M'sila, 15-16 décembre, 2019.

Zatout Asma, Benbrahim Chahla, Mazari Hibat Errahmen, Benkredda Fatima, Kassah-Laouar Ahmed et Djibaoui Rachid. Portage nasal du staphylocoque à coagulase négative chez le personnel soignant au CHU de Batna. Conférence National sur l'environnement et le développement durable, Mascara, 22-23 Janvier 2020.

Zatout Asma, Benbrahim Chahla, Djibaoui Rachid et Kassah-Laouar Ahmed. Profil de résistance aux antibiotiques et détection de gène *mecA* des staphylocoques à coagulase négative isolés au centre de Lutte contre le Cancer de Batna. 3^{ème} Rencontres Aurassiennes de Microbiologie Clinique, Batna, 11 et 12 Mars, 2020.

Communications internationales

Zatout Asma, Benbrahim Chahla, Djibaoui Rachid and Kassah-Laouar Ahmed. The Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Juniperus thurifera* from Aures region. 1st international congress on biotechnologies for sustainable development, Boumerdes, Algeria, 24-25 Octobre 2017.

Zatout Asma, Benbrahim Chahla, Kassah-Laouar Ahmed et Djibaoui Rachid. Prévalence du portage nasal du staphylocoque à coagulase positive (SCP) chez le personnel soignant dans divers services du CHU de Batna. Première Conférence Internationale d'Infectiologie. Annaba, Algérie, 27-28 octobre 2017.

Zatout Asma, Benbrahim Chahla, Djibaoui Rachid et Kassah-Laouar Ahmed. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits de *Juniperus oxycedrus*. 3^{ème} Congrès International de la Société Algérienne de Nutrition, Constantine, 28 -30 novembre 2017.

Zatout Asma, Benbrahim Chahla, Latab Aicha, Djibaoui Rachid et Kassah-Laouar Ahmed. Effet de molécules bioactives extraites de feuilles de *Juniperus thurifera* de la région des Aures (Algérie). Séminaire International sur les Plantes Médicinales, El Oued, 17-18 Janvier 2018.

Zatout Asma, Benbrahim Chahla, Mechaala Sara, Mazari Hibat Errahmen, Benkredda Fatima, Djibaoui Rachid and Kassah-Laouar Ahmed. Chemical composition and antibiofilm activity of *Thymus munbyanus* subsp. *ciliatus* essential oil against coagulase-negative staphylococci isolated from Anti-Cancer Center of Batna, Algeria. Third International symposium of Medicinal Plants and Materials, 25-27 février, 2020.



Antibacterial and antibiofilm activity of the phenazine extract of a fluorescent *Pseudomonas* on coagulase-negative staphylococci isolated from the Anti-Cancer Center of Batna, Algeria

Zatout Asma¹, Djibaoui Rachid¹, Dahah Hicham¹, Mazari Hibat Errahmen², Benkredda Fatima², Kassah-Laouar Ahmed³

¹Laboratory of Microbiology and Plant Biology, Department of Biological Sciences, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Abdlhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algeria

²Department of Biological Sciences, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Abdlhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algeria

³Laboratoire Central de Biologie, Anti-Cancer Centre, Batna, Algérie

Key words: Coagulase-negative staphylococci, *Pseudomonas*, Inhibition, Biofilm, Phenazine compounds

<http://dx.doi.org/10.12692/ijb/15.3.412-424> Article published on September 30, 2019

Abstract

Faced with many failures in the elimination of CoNS pathogens, we aimed to find an effective agent to eradicate these bacteria. In the present study we tested 20 isolates of CoNS collected from the Anti-Cancer Center of Batna (Algeria). As antistaphylococcal agents we used in our experiment 29 *Pseudomonas* isolates selected from the roots of plant (*Hordeum murinum*). The results of crossed streak method on MHA medium showed that the 29 isolates of *Pseudomonas* inhibited 19 CoNS. The strain with the greater inhibitory effect PK inhibited 14 CoNS. The high performing *Pseudomonas* PK has been used for the production of phenazine compounds. The dry compound of PK from ethyl acetate extraction has been shown to be effective against 13 isolates of staphylococci. The percentage of biofilm inhibition by the PK phenazine extract was between (32.2%) and (77.56%). The analysis of the compound obtained by UV-visible and infrared spectrum showed that it was similar to hydroxyphenazine.

* Corresponding Author: Zatout Asma ✉ asma.zatout@univ-mosta.dz

Introduction

Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are among the most frequently isolated microorganisms in microbiological samples. These bacteria, long regarded as contaminants, are currently recognized as true pathogens (Bertrand *et al.*, 2002; Koksal *et al.*, 2009) including species *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* and *S. saprophyticus*, CoNS are causative agents of conjunctivitis, endophthalmitis, skin infections, urinary tract infections, endocarditis, peritonitis, bone and joint infections, post-neurosurgical meningitis, infections originated from equipments and valves as well as septicemia whose starting point can be a catheter (Garnier and Denis, 2007).

Many antibiotics are available for the treatment of various pathogenic bacteria. However, the increase in antibiotic resistance has led to more severity of diseases caused by CoNS. In addition, low immunity in hosts and the ability of bacteria to develop antibiotic resistance associated with biofilm have further increased the number of life-threatening bacterial infections in humans (Raut and Karuppaiyl, 2014). Consequently, treatment choices for resistant CoNS infections extend to natural antibacterial (Singh *et al.*, 2015; Moloney, 2016). The capacity of the antibacterial compounds obtained from other microorganisms to inhibit CoNS has also been tested (El Amraoui *et al.*, 2014). Among the metabolites studied produced by various groups of microorganisms those of *Pseudomonas* (Chain and Mellows, 1977). The members of this bacterium are found in the different environments, including soil, water, plant surfaces, animals and plants. They are also competitive colonizers in the rhizosphere and are well adapted to different biotic and abiotic stresses. *Pseudomonas* is well known for its ability to use a variety of organic compounds and for its production of antimicrobial compounds some of them are used in the treatment of bacterial diseases (Laine *et al.*, 1996). It also shows activity against staphylococci (Cardozo *et al.*, 2013; Hotterbeekx *et al.*, 2017). *Pseudomonas fluorescens* is a non-pathogenic saprophyte that colonizes water, soil

and plants surfaces. It lives in a commensally relationship with plants, allowing them to acquire essential nutrients, degradation of chemicals and biological pollutants species (Igbinoza *et al.*, 2014). *P. fluorescens* also produce a large number of secondary metabolites that could play a role in the antagonistic effect in soil (Jacques *et al.*, 1993) making the bacteria a performing biocontrol agent (Igbinoza *et al.*, 2014). Among its metabolites produced are phenazines which have long been recognized for their importance in microbial destruction and their positive physiological roles for the bacteria that produce them are increasingly appreciated (Grahl *et al.*, 2013). The aim of this study is to isolate, from plant rhizospheres, a set of fluorescent *Pseudomonas* to examine their antagonist and antibiofilm activity against clinical isolates of CoNS. This step will lead us to search for an extracellular metabolite effective against staphylococci of medical interest.

Materials and methods

Bacterial material

20 CoNS isolates were collected between January 1 and February 28, 2017 from hospitalized patients in different departments (Onco-Pediatric, Onco-Hematology, intensive care, Carcinological Surgery) of the Anti-Cancer Center of Batna (Algeria) and non-hospitalized patients who came for external consultation.

Clinical strains of CoNS were grown on Chapman medium and identified using standard bacteriological methods. CoNS were used as target microorganisms to determine the antagonistic activities and spectrum of action of *Pseudomonas* isolates.

Antibiotic susceptibility and minimum inhibitory concentrations (MIC) of CoNS strains

Antibiotic sensitivity of CoNS isolates was achieved by the MHA disk diffusion method, as described by Bauer *et al.* (1966). The diameters of the inhibition zones were measured with caliper. The results were interpreted according to the recommendations of Clinical and Laboratory Standards Institute (2014).

MICs were determined for Oxacillin and Vancomycin on MHA using E-test method and interpreted

according to Clinical and Laboratory Standards Institute (2014).

Study of biofilm formation by the in vitro crystal violet staining method of on microplates (TCP)

Polystyrene microplates with 96 wells were used to study adherence and biofilm formation in CoNS isolates. The quantitative determination of biofilm formation in the microplates was evaluated according to Christensen *et al.* (1985) method with some modifications. Briefly, the CoNS were grown in nutrient agar medium for 18-24h at 37°C; one colony of each isolate was suspended in 5ml of TSB and incubated at 37°C for 24 h. Each suspension is diluted 1 / 100th in the same TSB + 1% glucose and each well of the microplate was filled with 200µL of this dilution (three independent cultures for each species were used). A sterile TSB + 1% glucose was used as a control. These microplates were covered and incubated for 24 h at 37°C. The contents of the wells were gently poured and washed three times with sterile physiological water, dried in an inverted position in an oven at 60°C for 60 min, adherent cells are stained with 200µl of 1% crystal violet (w/v). After 30 min of incubation, excess of crystal violet was removed by 5 successive washes with sterile distilled water. The dye incorporated by the adhered or biofilm-forming cells was solubilised with 200µL of 95% ethanol (v/v). The amount of solubilised crystal violet was measured by reading the OD at 550nm (Rodrigues *et al.*, 2010). The interpretation of the results was performed according to Stepanovic *et al.*, (2007) recommendations.

Isolation of Pseudomonas

Several samples were taken from different points in the vineyards of two regions of the state of Mostaganem, one of Oued Elkhire and the other of Sidi Lakhdar on February 2018. Samples are wild grass roots (barley of rats = *Hordeum murinum*). The isolated strains were identified using conventional bacteriological methods. Only the colonies giving a fluorescent yellow-green pigment on King B medium were selected (Bossis *et al.*, 2000).

In Vitro Antagonism Test

A cross streak method as described by Selvin *et al.*, (2009) was used. It consists in seeding the

Pseudomonas antagonist strain in a single streak at the edge of the surface of MHA plate. After incubation for 48h at 30°C, *Staphylococcus* isolates are seeded perpendicular to *Pseudomonas*. After 24h further incubation, the antimicrobial interactions are analyzed by measuring the inhibition zone size using a caliper.

Inhibitory effect of Pseudomonas culture supernatants

The method used in the present work described by Veerendra kumar and Janakiram (2015) is based on the diffusion of the inhibitory agent into wells made in an agar containing an indicator strain. The culture supernatant of *Pseudomonas* was obtained after centrifugation of a culture in MHB, the supernatant was filtered through a millipore filter of 0.22µm. 0.1ml of a pure culture of 24 h indicator strain, whose optical density located between 0.08 and 0.1 at $\lambda = 625\text{nm}$ was placed in each Petri dish containing 20ml of MHA. Wells of 4 mm of diameter were made, and then each well was filled with 50µL of supernatant and incubated at 37°C for 24 h. The inhibition zones were revealed around the wells.

Production and extraction of phenazines

The phenazine compounds were extracted according to the method described by by Bonsall *et al.*, (1997) and Dahah *et al.*, (2016). The performing isolate PK was inoculated on solid King B medium and incubated at 30°C for 24h. Flasks containing 50ml of Nutrient Broth Yeast Extract (NBY) were inoculated with the PK isolate, and then incubated at 30°C for 72 h with continuous shaking of 180rpm. Then cultures were centrifuged and the supernatant was acidified to pH 2 with concentrated HCl (Delaney *et al.*, 2001). Phenazines were extracted from the supernatant by ethyl acetate 1(v/v). The organic phase was treated with anhydrous ammonium sulfate, filtered and then concentrated to dryness under reduced pressure using a rotary evaporator at 55°C (Mezaache-Aichour *et al.*, 2012). The dry substrate is solubilised separately in methanol and in DMSO 10% for subsequent utilizations (Delaney *et al.*, 2001).

Study of the antimicrobial activity of the extract by the disk method

Antibacterial activity of the extract obtained, was determined using a diffusion disc method of Hazalin *et al.*, (2009). Two solutions of 0.25g/ml and 0.5g/ml of the dry substrate were prepared in DMSO 10%. 0.1ml of inoculum of each of the 20 isolates of CoNS was swabbed on MHA plate. The sterile disks (6mm in diameter) were deposited and impregnated with 10 μ l of the extract. The Vancomycin disk (30 μ g) was used as a positive control and the DMSO 10% disk as a negative control. Then, the dishes were incubated at 37°C for 24 h.

MICs of phenazine extract

The determination of the MICs of The phenazine extract against the CoNS was carried out according to the dilution technique in liquid medium described by (Bazargani and Rohloff, 2016) with some modifications. The bacterial strains were cultured on MHA and incubated at 37°C for 12 h, after incubation, 5-7 isolated colonies were inoculated in tubes containing 5ml MHB and incubated at 37°C for 8 to 12 h, then, the bacterial suspension was diluted 1: 100 in sterile MHB (10⁶ CFU/ml). For each microplate well, 100 μ L of MHB were added, then 100 μ L of the extract was placed in the first microplate well and two-fold serially diluted was performed in MHB. Finally, 100 μ L of the diluted bacterial strain was added to obtain a final concentration between 250 and 1.95mg /ml. 100 μ L of DMSO 10% was used as a negative control with 100 μ L of MHB. *S. aureus* ATCC 25923 was used as a control.

After incubation for 18 to 24h at 37°C, the MIC was determined macroscopically via turbidity observation (Nostro *et al.*, 2016). Minimum bactericidal concentration (MBC) was determined by inoculating 10 μ L of all MICs on MHA (Marino *et al.*, 2010).

Effect of phenazine extract on biofilm formation

The extract at the MICs concentration was evaluated for their inhibitory potential against cell attachments described by Bazargani and Rohloff (2016). 100 μ l of the extract at the MICs value were added to each well of a 96-well microplate. The negative control contained 100 μ l of TSB + 1% Glu. Finally, 100 μ l of each bacterial culture (10⁶ CFU/ml) were put into each

well. 200 μ l of TSB + 1% Glu + DMSO 10 % were added without bacterial culture and a blank control (TSB + 1% glucose + extract) were included. The microplates were incubated at 37°C for 24h. Then, the biomass biofilm was assayed using the crystal violet staining test as described above. The mean absorbance of the samples was determined, the absorbance in blank well was subtracted from absorbance reading and percentage inhibition and efficiency were determined.

UV-visible spectrophotometer analysis

Phenazine analysis by UV-visible spectrophotometer described by Veselova *et al.*, (2008) was assayed. The dry phenazine extract was put into a methanol solution and then put into a vat for spectrophotometer analysis in order to characterize the absorption spectrum of this metabolite.

Fourier Transform Infrared Identification (FTIR)

A sample of the extract was analyzed by a Fourier Transform Infrared spectroscopy technique in order to characterize partially the structure of the extracted phenazine (Dahah *et al.*, 2016).

Results and discussion

Identification of CoNS

We identified 20 isolates of CoNS belonging to 5 different species following conventional methods. (45%) of CoNS studied were belonged to, *S. epidermidis*, (30%) to *S. haemolyticus*, (15%) to *S. xyloso*, (5%) to *S. hominis* and finally, (5%) too to *S. cohnii*. Similar study on blood culture samples reported by Koksai *et al.* (2009). Ehlersson *et al.* (2017) found different results. A dozen of species and subspecies, most of which part of the commensal flora, are potentially pathogenic for man through the breaking of the cutaneous -mucous barrier. *S. epidermidis* may be responsible for vascular or joint prosthetic infections, heart valves, CSF bypass valves; it is also isolated from peritoneal dialysis, peritonitis, subacute endocarditis treatment and from intravenous drug users (Abalain-Colloc *et al.*, 2014). *S. haemolyticus* is the second most commonly isolated of CoNS. It is more frequently associated with endocarditis on native valves, bacteraemia, peritonitis and central venous catheter infections (Herard *et al.*, 1998). It can be responsible for urinary tract infections (Gaucherie and

Avril 2005; Nauciel and Vildé 2005). *S. xylosus* is rarely isolated in blood cultures, rare reports of human infections have been reported, including endocarditis, pyelonephritis, and intra-abdominal infection (Mack *et al.*, 2006).

Antibiotic resistance of CoNS

The isolates are resistant to antibiotics with different percentages (Table 1). Different results were found by Pinna *et al.* (1999) of which (67%) CoNS are Penicillin-resistant. No strain of CoNS showed resistance to Vancomycin. Similar results are also reported by Jain *et al.* (2004). Different findings are reported by Soumya *et al.* (2017) with a (7%) resistance to Vancomycin. According to Leclercq (2002), the strains with diminished susceptibility to glycopeptides appear to be rare but may be underestimated because of the difficulty of *in vitro* detection of resistance. Results showing deference with our findings have been reported by Shrestha *et al.* (2017) for Amikacin with a sensitivity of (67%) and for Chloramphenicol (12.6%) and (8.9%) were reported by Cuevas *et al.* (2004) in Spain by statistical studies of the years 1996 and 2002 successively.

Table 1. Antibiotic resistance and MIC of CoNS.

Antibiotics	Percentage (%)
Penicillin	100
Cefoxitin	90
Fucidic acid	65
Erythromycin	55
Clindamycin	25
Pristinamycin	40
Amikacin	10
Kanamycin	50
Gentamycin	35
Chloramphenicol	00
Rifampicin	40
Teicoplanin	00
Ofloxacin	20
Levofloxacin	35
Ciprofloxacin	35
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	35
Tetracyclin	05
Vancomycin	00
Oxacillin	75

Detection of CoNS biofilm formation by *in vitro* microplate crystal violet staining (TCP) method

In the TCP method, biofilm production was detected in all isolated CoNS (100%) with different intensities:

(35%) are highly biofilm producing, (25%) are moderate and (40%) are low. Soumya *et al.* (2017) found that (11%) of CoNS strains were strongly biofilm forming and (6%) were moderate. Other different results have been reported by Nasr *et al.* (2012).

Isolation of *Pseudomonas* isolates and identification of PK isolate

In our study we selected 29 isolates cultivated on King B medium. Their preliminary identification was essentially based on morphological characteristics, Gram stain, mobility, catalase search and oxidase. These characters allowed us to classify them with the group of fluorescent *Pseudomonas* (Bossis *et al.*, 2000). Results of the *in vitro* antagonism tests Showed that inhibition was variable depending on the *Pseudomonas* isolate and the strain of CoNS tested (Fig. 1).

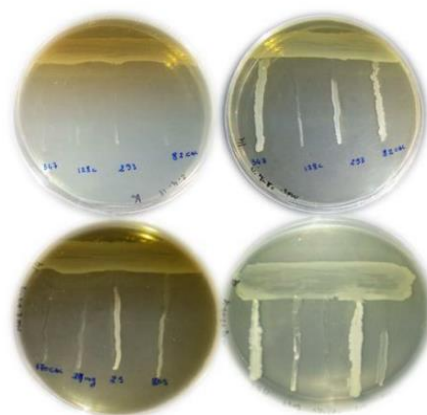


Fig. 1. *Pseudomonas* antagonistic activity against CoNS isolates.

Overall, the results of this test showed that all 29 *Pseudomonas* showed a growth inhibition of 19 of the targeted Staphylococci (Table 2). Clear areas between *Pseudomonas* and the most of Staphylococci tested were observed; these areas vary from 3 to 55mm, the histograms given by (Fig. 2) show the different inhibition zone distances in mm between *Pseudomonas* isolates and Staphylococci. The largest area was noted by the PK isolate against *S. epidermidis* 94C. The second histogram given by (Fig. 3) shows the number of Staphylococci inhibited by each *Pseudomonas* isolate. 14 different Staphylococci were inhibited by the PK isolate,

while the PR isolate inhibited only 6 *Staphylococcus* could have an effect on *S. epidermidis* 203CAC which is Resistant to all other isolates of *Pseudomonas*, reflecting the difference of the inhibitory substances

responsible for antagonistic activity in each strain. The identification of PK isolate by API NE Gallery directs us towards the species *P. fluorescens*.

Table 2. Antagonism test results by crossing technique.

	<i>S. epidermidis</i>							<i>S. haemolyticus</i>					<i>S. xylosus</i>				<i>S. cohnii</i>		<i>S. Homini</i>	T	
	29 mg	94 C	170 CAC	89 3	203 G	173 C	82 C	128	123 C	805	182 H	46 7	1076	316 H	14:15	25	293	347 H	106 CAC		132
PK	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	14
P25	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	10
P14	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	8
PI	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	7
P19	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	6
P10	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	6
PA	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	6
PR	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	6
P26	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	5
PL	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	5
PB	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	4
PE	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	4
PN	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	4
PQ	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
PG	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	4
P15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	4
P9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	3
P11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	3
P3	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
PJ	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
PS	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	3
P22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	2
P1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2
PH	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
P28	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
P21	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
P12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
P17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
P2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

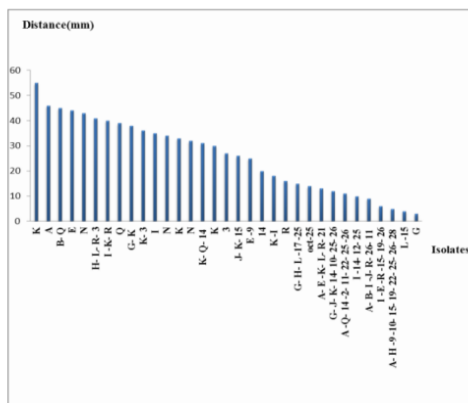


Fig. 2. Distances of inhibition zones between *Pseudomonas* isolates and *Staphylococci*.

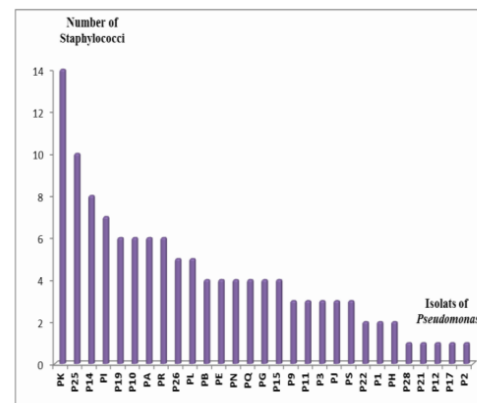


Fig. 3. Number of *Staphylococci* Inhibited by each *Pseudomonas* Isolate.

Some strains of fluorescent *Pseudomonas* that colonize agricultural soils have several intrinsic characteristics that make them particularly attractive for use as biological control agents (Haas and Keel, 2003). In addition to competition for carbon sources, antagonism can be attributed largely to the production of secondary metabolites (antibiotics, siderophores, hydrogen cyanide, enzymes etc.) (Jacques *et al.*, 1993). Indeed, *P. aeruginosa* produces more than 55 quinolones/quinolines in addition to 2-heptyl-3-hydroxy-4 (1H) -quinolone, and these have significant antibiotic activity against gram-positive bacteria. Antimicrobial quinolones can be inserted in extracellular membrane vesicles to cause a *S. epidermidis* lysis (Mashburn *et al.*, 2005). Another extracellular protein secreted by *P. aeruginosa* which has notable staphylococcal activity is the LasA protease. Extracellular polysaccharides secreted by *P. aeruginosa* may be a promising strategy for use against staphylococcal biofilms in future applications (Qin *et al.*, 2007).

The inhibitory effect of the culture supernatant of Pseudomonas

Among the 29 isolates with antagonistic activity, 12 isolates namely: PK, P14, PG, PL, PN, PR, P3, PE, P25, PJ, PQ and PA were selected because of their inhibition spectrum against *Staphylococcus* and the zones of their inhibition. The 12 isolates selected were tested for the inhibitory effect of their supernatants. However, they did not show any antagonist activity. This may be justified by the low concentration of inhibitory agents in the supernatants. According to studies by Emmerich and Löwthe cell-free culture fluid of *P. aeruginosa* should be concentrated to one tenth of its initial volume to be effective (Leisinger and Margraff, 1979).

The antimicrobial effect, MICs and BICs of phenazines extract

Phenazine production by PK isolate was performed on NBY medium, and extraction was by ethyl acetate. The dry phenazine extract was then melted in a (DMSO 10%) solution to test its antimicrobial effect. The results obtained showed that our extract exhibits anti staphylococcal activity, as shown in (Fig. 4) clear areas around the disks impregnated with the phenazine

extract were observed. These zones of inhibition vary according to the strain tested between 6.75 ± 0.353 and 27.33 ± 0.707 mm (Table 3). The largest zone was found against isolate 347 H (*S. xylosus*).

Pseudomonas produce a range of phenazine compounds that differ widely in their antibiotic properties, depending on the nature and position of the side groups attached to the phenazine nucleus (Saleem *et al.*, 2010). Other biological activities of phenazine include natural products such as anti tumoral, anti malarials and antiparasitics have been reported (Laurson and Nielsen, 2004). Our results are in agreement with the studies of several authors, who showed that phenazine substances are known for their antifungal and antibacterial activities (Shahid *et al.*, 2017).

In the present study, the MICs were tested to know the ability of phenazines to inhibit the growth of 13 CoNS strains. This MIC of phenazine extract was from 3.9mg/ml to 31.25mg/ml. The MBC was ranging from 7.81mg/ml to 31.25mg/ml (Table 3).

According the studies of Nansathit *et al.* (2009), phenazine-1-carboxylic acid showed more potent inhibition against some strains such us: *A. avenae* subsp *citrulli*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *E. coli* and *X. campestris* pv. *vesicatoria*. The inhibitory mechanism of phenazines was the result of the toxicity of the superoxide radical and hydrogen peroxide, described in a report by Dwivedi and Johri (Nansathit *et al.*, 2009). According to other studies conducted by Borrero *et al.*, (2014), 13 various phenazine compounds, five of which are of natural origin, possess inhibitory activity against *S. aureus* and *S. epidermidis*. Phenazine-1-carboxylic acid and chlororaphine showed only weak antibiotic activity against *S. aureus* (MIC > 5µg/ml) (Laurson and Nielsen, 2004).

Effect of phenazine extract on CoNS biofilm formation

In our study, the phenazine extract showed antibiofilm activity with significant reduction between (32.2%) and (77.56%) (Table 3). Staphylococci commonly colonize the skin and are

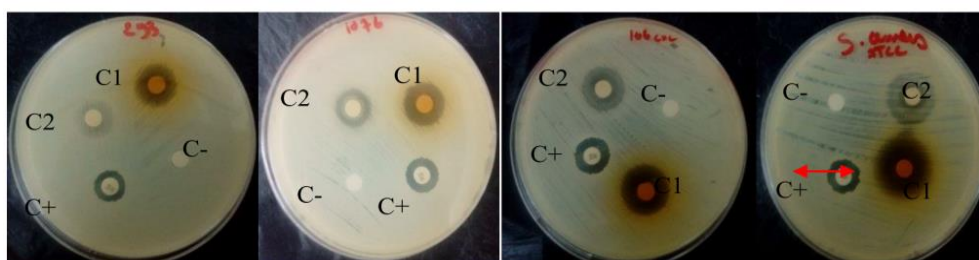
frequently found in wounds and implants. Interestingly, *S. epidermidis* was not considered an opportunistic pathogen until the widespread use of medical devices. Biofilm formation, then, can be thought of a virulence factor a bacterial strategy that contributes to its ability to cause an infection (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Qin *et al.* (2009) found that *P.*

aeruginosa extracellular products, mainly polysaccharides, disrupted established *S. epidermidis* biofilms and these extracellular products are important microbial competition factors that overcome competition with *S. epidermidis*, and the results may provide clues for the development of a novel strategy for controlling *S. epidermidis* biofilms.

Table 3. Diameters of the zones of inhibition (mm), MICs, BICs and biofilm inhibition of phenazine extract of PK strain against isolates of CoNS.

Isolate number	Bacteria tested	Diameter of zones	Inhibition (mm)	MIC	BIC	BIC /MIC	Biofilm inhibition
		Concentration of 0.5 g /ml	Concentration of 0.25 g /ml	(mg/ml)	(mg/ml)		(%)
106CAC	<i>S. cohnii</i>	18.5±0.5	11±0	7.81	7.81	1	32.20
316H	<i>S. haemolyticus</i>	14.83±0.288	-	15.62	15.62	1	53.39
347 H	<i>S. xyloso</i>	27.33± 0.707	17.33±0.288	3.9	7.81	2	70
82CAC	<i>S. epidermidis</i>	13.5±0.5	8.5±0	7.81	15.62	2	77.56
293	<i>S. xyloso</i>	13.5±0.5	-	15.62	15.62	1	71.31
805	<i>S. haemolyticus</i>	10.67±1.040	-	15.62	15.62	1	30
25	<i>S. xyloso</i>	12±0.5	-	31.25	31.25	1	70.67
123	<i>S. epidermidis</i>	16.67±0.577	08±00	15.62	15.62	1	66.79
1076	<i>S. haemolyticus</i>	17±01	12±00	7.81	15.62	2	75
128	<i>S. epidermidis</i>	14.5±0.5	7.83 ± 0.288	15.62	31.25	2	76.56
29mg	<i>S. epidermidis</i>	19.67±1.443	-	31.25	31.25	1	61.11
170CAC	<i>S. epidermidis</i>	13.67±0.577	6.75±0.353	7.81	15.62	2	69.38
467	<i>S. haemolyticus</i>	16.67±0.288	-	15.62	15.62	1	61.90
<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	16.16±0.288	08±00	7.81	15.62	2	Non tested

-: non inhibited



C1: concentration 0.5 g /ml, C2: concentration 0.25g /ml, C (-): negative control (DMSO 10%), C (+): positive control (Van 30µg).

Fig. 4. Antimicrobial effect of the phenazine extract on the target bacteria.

Characterization and identification of the extracted metabolite

The dry phenazine extract was dissolved in a methanol solution, and after spectrophotometric analysis by UV-visible spectrophotometer we

obtained a single peak. The peak obtained is shown in (Fig. 5). The extract showed absorption characteristics at about 220nm.

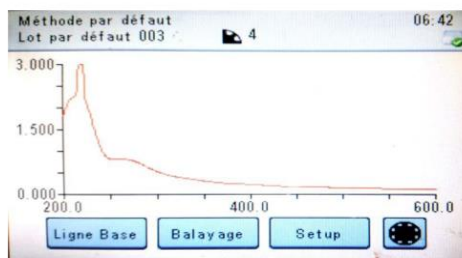


Fig. 5. Spectrum of phenazine identification by UV-visible spectrophotometer.

Fourier Transform Infrared Identification (FTIR)

The IR spectrum obtained represents the characteristic vibrations of the various bonds

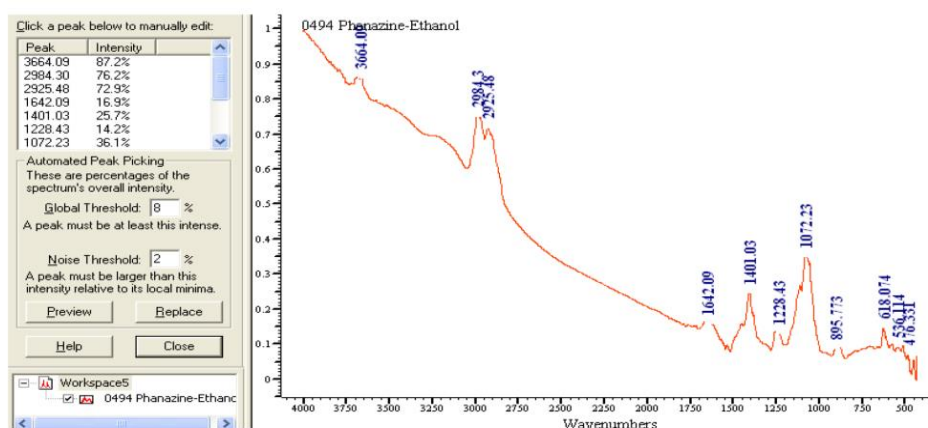


Fig. 6. Spectrum of phenazine identification by FTIR.

Conclusion

The aim of the present work is to isolate a group of fluorescent *Pseudomonas* from rhizosphere soil (which is known for its high ability to synthesize secondary metabolites) to control CoNS. Isolates from the Anti-Cancer Center belong to the following species: *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. xylosum*, *S. hominis* and *S. cohnii*. These isolates are all susceptible to these antibiotics: Chloramphenicol and Vancomycin. The 29 *Pseudomonas* from the root samples of the wild *Hordeum murinum* were antagonized on MHA, in order to evaluate their antistaphylococcal capacity against 20 clinical isolates of CoNS. Thus,

constituting the structure of the extract studied (Fig. 6). The majority of peaks appear in the 400 to 4000 cm^{-1} range. The absorption bands correspond to the molecule whose details are as follows:

A band at 3664 cm^{-1} corresponds to the elongation of the O-H group for phenols;

A band located at 2924 cm^{-1} corresponds to the elongation of the aromatic C-H group;

A band located between 1664 cm^{-1} corresponds to the elongation of the aromatic C = N group;

A band at 1401 cm^{-1} corresponds to the elongation of the C-N group;

A band at 1228 cm^{-1} corresponds to the C-C elongation;

A band at 1072 cm^{-1} corresponds to the elongation = C-O-

The different bands detected correspond to the molecule of hydroxyphenazine.

Pseudomonas isolates tested, revealed a power of inhibition on 19 CoNS. These zones of inhibition vary from 3 to 55mm, the largest zone has been observed in the PK isolate against *S. epidermidis* isolate No. 94C. 13 different CoNS were inhibited by the PK isolate. The other *Pseudomonas* inhibited a significant number of *Staphylococcus* with diversity in their spectrum. Therefore all CoNS (except one isolate) were inhibited by all *Pseudomonas* isolates combined. This reflects the difference of the inhibitory substances responsible for the antagonist activity in each strain. The obtained dry compound of PK has been shown to be effective against staphylococci and. The MICs and MBCs values

of the phenazine extract showed a remarkable activity. The percentages of its inhibition of the CoNS biofilms were relatively elevated. Analysis of the compound by UV-visible spectrum and infrared has shown that it is probably close to hydroxyphenazine.

References

- Abalain-Collocml, Béraud J, Lay-Roguès GL, Tandé D, Tran Minoui A.** 2014. Bactériologie. In: Béraud J, Ed. Le technicien d'analyses biomédicales. 2^{ème} édition, 936-1067.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M.** 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. American Journal of Clinical Pathology **45**, 493-496.
- Bazarganimm and Rohloff J.** 2016. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. Food Control **61**, 156-164.
- Bertrand X, Lallemand S, Thouverez M, Boisson K, Talon D.** 2002. Bactériémies liées aux staphylocoques à coagulase négative : incidence, niveau de résistance à la teicoplanine et épidémiologie moléculaire. Pathologie Biologie **50**, 552-559.
- Bonsall RF, Weller DM, Thomashow LS.** 1997. Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. *in vitro* and in the rhizosphere of wheat. Applied and Environmental Microbiology **3**, 951-955.
- Borrero NV, Bai F, Perez C, Duong BQ, Rocca JR, Jin S, Huigens III RW.** 2014. Phenazine Antibiotic Inspired Discovery of Potent Bromophenazine Antibacterial Agents against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Organic & Biomolecular Chemistry **12**, 1-6.
- Bossis E, Lemanceau P, Latour X, Gardan L.** 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. Agronomie **20**, 51-63.
- Cardozo VF, Oliveira AG, Nishio EK, Perugini MRE, Andrade CGTJ, Silveira WD, Durán N, Andrade G, Kobayashi RKT, Nakazato G.** 2013. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillinresistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials **12**, 1-8.
- Chain EB, Mellows G.** 1977. Pseudomonic acid. Part 1: The structure of Pseudomonic acid A, a novel antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions **1**, 294.
- Christensen GD, Simpson WA, Yonger JJ, Baddor LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH.** 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. Journal of Clinical Microbiology **22**, 996-1006.
- Clinical and Laboratory Standard Institute.** 2014. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility; Twenty-Fourth informational supplement.
- Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sa'nchez-Conde M, Sa'nchez-Somolinos M, Bouza E, and the Spanish Group for the Study of *Staphylococcus*.** 2004. Evolution of the Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus* spp. In Spain: Five Nationwide Prevalence Studies, 1986 to 2002. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **42**, 4240-4245.
- Dahah H, Djibaoui R, Nemmiche S.** 2016. Antimicrobial, antioxidant and hemolytic effects of Pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from saline soil of Mina river, Algeria. International Journal of Biosciences **9**, 134-143.
- Delaney SM, Mavrodi DV, Bonsall RF, Thomashow LS.** 2001. phzO, a gene for biosynthesis of 2-hydrolyated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. Journal of Bacteriology **183**, 318-327.

- Ehlersson G, Hellmark B, Svartström O, Stenmark B, Söderquist B.** 2017. Phenotypic characterisation of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures in newborn infants, with a special focus on *Staphylococcus capitis*. *Acta paediatrica* **106**, 1576-1582.
- El Amraoui B, El Amraoui M, Cohen N et al.** 2014. Antifungal and antibacterial activity of marine microorganisms *Annales Pharmaceutiques Françaises* **72**, 107-111.
- Fauchère JL, Avril JL.** 2005. Bactériologie générale et médicale. Ed. Ellipses 213-218.
- Garnier F, Denis F.** 2007. Cocci à Gram positif. In: Denis F., Ploy M. C., Martin C., Bingen E et Quentin R, *Bactériologie médicale (Techniques usuelles)*. Ed. Elsevier Masson p. 252-257.
- Grahl N, Kern SE, Newman DK, Hogan DA.** 2013. The Yin and Yang of Phenazine Physiology. In: Chincholkar S, Thomashow L, Ed. *Microbial Phenazines Biosynthesis, Agriculture and Health*, Springer p. 48.
- Haas D, Keel C.** 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology* **41**, 117-153.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P.** 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 95-108.
- Hazalin NA, Ramasamy K, Meng Lim SS, Abdul Wahab I, Cole ALJ, Abdul Majeed AB.** 2009. Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **09**, 1-5.
- Herard A, Brasme L, Jaussaud R, Colin J, Vernet-Garnier V, Lardennois B.** 1998. Place actuelle des staphylocoques à coagulase négative en urologie. *Progrès en Urologie* **8**, 579-585.
- Hotterbeekx A, Kumar-Singh S, Goossens H, alhotra-Kumar S.** 2017. *In vivo* and *In vitro* Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **7**, 1-13
- Igbinosa IH, Igbinosa EO, Okoh AI.** 2014. Molecular Detection of Metallo- β - Lactamase and Putative Virulence Genes in Environmental Isolates of *Pseudomonas* Species. *Polish Journal of Environmental Studies*. **23**, 2327-2331.
- Jacques P, Delfosse P, Ongena M, Lepoivre P, Cornélis P, Koedam N, Neirinckx L, Thonart P.** 1993. Les mécanismes biochimiques développés par les *Pseudomonas* fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol. *Cahiers Agricultures* **2**, 301-307.
- Jain A, Agarwal J, Bansal S.** 2004. Prevalence of methicillin-resistant, coagulase negative staphylococci in neonatal intensive care units: findings from a tertiary care hospital in India. *Journal of Medical Microbiology* **53**, 941-944
- Koksal F, Yasar H, Samasti M.** 2009. Antibiotic resistance patterns of coagulase negative *Staphylococcus* strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. *Microbiological Research* **164**, 404-410.
- Laine MH, Karwowski MT, Raaska LB, Sandholm TM.** 1996. Antimicrobial activity of *Pseudomonas* spp. against food poisoning bacteria and moulds. *Letters in Applied Microbiology* **22**, 214-218.
- Laursen JB, Nielsen J.** 2004. Phenazine Natural Products: Biosynthesis, Synthetic Analogues, and Biological Activity. *Chemical Reviews* **104**, 1663-1685.
- Leclercq R.** 2002. Résistance des staphylocoques aux antibiotiques *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation* **21**, 375-383.

- Leisinger T, Margraff R.** 1979. Secondary Metabolites of the Fluorescent Pseudomonads. *Microbiological Reviews* **43**, 422-442.
- Mack D, Horstkotte MA, Rohde H, Knobloch JK-M.** 2006. Coagulase-Negative Staphylococci. In: Pace JL, Rupp ME, Finch RG, Ed. *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*. Taylor and Francis p.115.
- Marino A, Bellinghieri V, Nostro A, Miceli N, Taviano MF, Güvenç A, Bisignano G.** 2010. *In vitro* effect of branch extracts of *Juniperus* species from Turkey on *Staphylococcus aureus* biofilm. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **470**-476.
- Mashburn LM, Jett AM, Akins DR, Whiteley M.** 2005. *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during *in vivo* co-culture. *Journal of Bacteriology* **187**, 554-566.
- Mezaache-Aichour S, Guechi A, Nicklin J, Drider D, Prevost H, Strange RN.** 2012. Isolation, identification and antimicrobial activity of pseudomonads isolated from the rhizosphere of potatoes growing in Algeria. *Journal of Plant Pathology* **94**, 89-98.
- Moloneyng.** 2016. Natural products as a source for novel antibiotics. *Trends in pharmacological sciences* **37**, 689-701.
- Nansathit A, Apipattarakul S, Phaosiri C, Pongdontri P, Chanthai S, Ruangviriyachai C.** 2009. Synthesis, Isolation of Phenazine Derivatives and Their Antimicrobial Activities. *Walailak Journal of Science and Technology* **6**, 79-91.
- Nasr RA, AbuShady HM, Hussein HS.** 2012. Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* **13**, 269-274.
- Nauciel C, Vildé JL.** 2005. *Bactériologie médicale connaissances et pratique*. 2^{ème} édition Masson Paris p. 53- 80.
- Nostro A, Guerrini A, Marino A, Tacchini M, Di Giulio M, Grandini A, Akin M, Cellini L, Bisignano G, Saracoglu HT.** 2016. *In vitro* activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **6**, 79-91.
- Pinna A, Zanetti S, Sotgiu M, Sechi LA, Fadda G, Carta F.** 1999. Identification and antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated in corneal/external infections. *British Journal of Ophthalmology* **83**, 771-773.
- Qin Z, Yang L, Qu D, Molin S, Tolker-Nielsen T.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa* extracellular products inhibit staphylococcal growth, and disrupt established biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **155**, 2148-2156.
- Qin Z, Yang X, Yang L, Jiang J, Ou Y, Molin S, et al.** 2007. Formation and properties of *in vitro* biofilms of *ica*-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology* **56**, 83-93.
- Raut JS, Karuppayil SM.** 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* **62**, 250-264.
- Rodrigues LB, Santos LRD, Tagliari VZ, Rizzo NN, Trenhago G, de Oliveira AP, Goetz F, do Nascimento VP.** 2010. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Brazilian Journal of Microbiology* **41**, 1082-1085.
- Saleem M, Nazir M, Ali MS, Hussain H, Lee YS, Riaz N, Jabbar A.** 2010. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Natural Product Reports* **27**, 238-254.
- Selvin J, Shanmughapriya S, Gandhimathi R, Seghal-Kiran G, Rajeetha RT, Natarajaseenivasan K, Hema TA.** 2009. Optimization and production of novel antimicrobial

agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardiopsis dassonvillei* MAD08. Applied Microbiology and Biotechnology **83**, 435-445.

Shahid I, Rizwan M, Baig DN, Saleem RS, Malik KA, Mehnaz S. 2017. Secondary Metabolites Production and Plant Growth Promotion by *Pseudomonas chlororaphis* and *P. aurantiaca* Strains Isolated from Cactus, Cotton, and Para Grass. Journal of Microbiology and Biotechnology **27**, 480-491.

Shrestha LB, Bhattarai NR, Khanal B. 2017. Antibiotic resistance and biofilm formation among coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples at a tertiary care hospital of eastern Nepal. Antimicrobial Resistance and Infection Control **6**, 89.

Singh RP, Kunari P, Reddy CR. 2015. Antimicrobial compounds from sea-weeds associated bacteria and fungi. Applied Microbiology and Biotechnology **99**, 1571-1586.

Soumya KR, Philip S, Sugathan S, Mathew J, Radhakrishnan EK. 2017. Virulence factors

associated with Coagulase Negative Staphylococci isolated from human infections. 3 Biotech **7**, 1-10.

Stepanovic S, Vukovi D, Hola V, Bonaventura G, Djukic S, C'irkovic' I, Ruzicka F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci. Journal of Pathology, Microbiology and Immunology **115**, 891-899.

Veerendrakumar M, Janakiram P. 2015. Antagonistic Activity Exhibited by Crude Extracts of *Pseudomonas aeruginosa* (PIC-4) against *Aeromona shydrophila* and *E. coli*. International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research **4**, 36-41.

Veselova A, Klein SH, Bass IA, Lipasova VA, Metlitskaya AZ, Ovadis MI, Chernin LS, Khmel IA. 2008. Quorum sensing systems of regulation, synthesis of phenazine antibiotics, and antifungal activity in rhizospheric bacterium *Pseudomonas chlororaphis* 449. Russian Journal of Genetics **44**, 1400-1408.

**Original Article****Open Access****Coagulase negative staphylococci in Anti-Cancer Center, Batna, Algeria: antibiotic resistance pattern, biofilm formation, and detection of *mecA* and *icaAD* genes**^{1*}Zatout, A., ²Djibaoui, R., ²Kassah-Laouar, A., and ³Benbrahim, C.¹Laboratory of Microbiology and Plant Biology, Department of Biological Sciences, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Abdlhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algeria²Central Laboratory of Biology, Anticancer Center of Batna, Algeria³Laboratory of Microbiology Applied to the Agroalimentary Biomedical and the Environment, Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University Abou BekrBelkaid, Tlemcen, Algeria*Correspondence to: asma.zatout@univ-mosta.dz**Abstract:****Background:** Coagulase-negative staphylococci (CoNS) are normal microbial flora found on the skin and mucous membranes of mammals. Considered for a long time as avirulent commensals, these bacteria are now recognized as opportunistic pathogens by virtue of their high resistance to multiple antibiotics and capacity for biofilm formations, which made them important agents of nosocomial and community-acquired infections. The objectives of this study are to determine the antibiotic resistance pattern, biofilm formation, and to detect *mecA* and *icaAD* genes in clinical CoNS isolates from Batna's Anti-Cancer Center (ACC) in Algeria.**Methods:** A total of 66 CoNS were isolated from different samples and identified by API Staph system. *In vitro* antibiotic susceptibility testing (AST) of each isolate to selected antibiotics was determined by the disk diffusion method, and minimum inhibitory concentrations (MICs) of oxacillin and vancomycin were determined by E-test. Biofilm formation was assessed by Tissue Culture Plate (TCP) and Congo Red Agar (CRA) methods. The polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify *mecA* gene in 9 cefoxitin-resistant and 1 cefoxitin-sensitive CoNS, and *icaAD* gene in 9 biofilm forming and 1 non-biofilm forming CoNS. Sequencing of the 16S rDNA of 1 *mecA* and 1 *icaAD* positive isolates was performed by the Sanger method.**Results:** Nine species of CoNS were identified, with *Staphylococcus epidermidis* (n=29, 44%) and *Staphylococcus haemolyticus* (n=15, 22.7%) constituting the largest proportion, and isolated mainly from the onco-haematology service unit of the center. The isolates were resistant to penicillin G (98.5%), cefoxitin (80.3%) and oxacillin (72.2%). The TCP method was more sensitive (89.4%) than CRA method (31.8%) in detecting biofilm formation. The *mecA* gene was detected in 66.7% (6/9) of cefoxitin resistant CoNS and the *icaAD* gene in 55.6% (5/9) of TCP positive CoNS isolates**Conclusion:** *In vitro* resistance to methicillin (cefepime) and biofilm formation were high among the CoNS isolates in this study, but the association of these with respective carriage of *mecA* and *icaAD* genes was low.**Keywords:** Coagulase negative staphylococci, identification, antibiotic resistance, biofilm, PCR

Received April 26, 2019; Revised October 2, 2019; Accepted October 5, 2019

Copyright 2020 AJCEM Open Access. This article is licensed and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided credit is given to the original author(s) and the source.**Staphylocoques à coagulase négative au Centre Anti-Cancer de Batna, Algérie: résistance aux antibiotiques, formation de biofilms et détection des gènes *mecA* et *icaAD***^{1*}Zatout, A., ²Djibaoui, R., ²Kassah-Laouar, A., et ³Benbrahim, C.¹Laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale, Département des Sciences Biologiques, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdlhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algérie²Laboratoire Central de Biologie, Centre Anti-Cancer (ACC), Batna, Algérie³Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, AlgérieCorrespondance à: asma.zatout@univ-mosta.dz

Abstrait :

Contexte: Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont une flore microbienne normale présente sur la peau et les muqueuses des mammifères. Considérés depuis longtemps comme des commensales avirulentes, ces bactéries sont actuellement connues comme agents pathogènes opportunistes grâce à leurs multiples propriétés coexistantes de résistance aux antibiotiques et de formation de biofilms qui constituent des agents importants d'infections nosocomiales et communautaires. L'objectif de cette étude est de déterminer la résistance aux antibiotiques, la formation de biofilms et pour rechercher des gènes *mecA* et *icaAD* dans les isolats cliniques de SCN du Centre Anti-Cancer (AAC) de Batna en Algérie.

Méthodes: au total de 66 des SCN ont été isolés de différents prélèvements et identifiés par galerie API Staph. Le test de sensibilité aux antibiotiques *In vitro* de chaque isolat par rapport aux antibiotiques sélectionnés a été déterminé par la méthode de diffusion sur disque, et les concentrations minimales inhibitrices (MICs) de l'oxacilline et de la vancomycine ont été déterminées par E-test. La formation de biofilm a été évaluée par la méthode de culture de tissu en plaque (TCP) et la méthode de Rouge Congo Agar (CRA). La réaction en chaîne par polymérase (PCR) a été utilisée pour amplifier l'ADN du gène *mecA* dont 9 des SCN résistants à au céfoxitine et 1 sensible à au céfoxitine et le gène *icaAD* dont 9 des SCN formant biofilm et 1 non-formant biofilm. Le séquençage de l'ADNr 16S des isolats positifs, 1 *mecA* et 1 *icaAD* ont été réalisés par la méthode de Sanger.

Résultats: Neuf espèces des SCN ont été identifiées avec *Staphylococcus epidermidis* (n=29, 44%) et *Staphylococcus haemolyticus* (n=15, 22,7%) constituant la plus grande proportion, et isolées principalement de l'unité de service d'onco-hématologie du centre. Les isolats étaient résistants à la pénicilline G (98,5%), à la céfoxitine (80,3%) et à l'oxacilline (72,2%). La méthode TCP était plus sensible (89,4%) que la méthode CRA (31,8%) dans la détection de la formation de biofilm. Le gène *mecA* a été détecté dans 66,7% (6/9) des SCN résistants à au céfoxitine et le gène *icaAD* dans 55,6% (5/9) des isolats positifs des SCN pour CRA.

Conclusion: La résistance à la méthicilline (au céfoxitine) *in vitro* et la formation de biofilms étaient élevées chez les isolats des SCN de cette étude, mais leur corrélation avec le portage respectif des gènes *mecA* et *icaAD* était faible.

Mots-clés: Staphylocoque à coagulase négative, identification, résistance aux antibiotiques, biofilm, PCR

Introduction:

Coagulase negative staphylococci (CoNS) are normal microbial flora found on the skin and human mucous membranes of mammals (1). These bacteria, which have for a long time adjudged to be avirulent commensals, are currently considered the predominant pathogens (2) and major cause of nosocomial and community-acquired infections (3).

The most common species that cause disease in humans are *Staphylococcus epidermidis* which causes bacteremia in patients with implanted medical devices (such as prostheses and catheters), surgical wound infection, peritonitis in patients with continuous peritoneal dialysis, osteomyelitis, and endophthalmitis; *Staphylococcus haemolyticus* which causes endocarditis, peritonitis, sepsis and infections of the urinary tract, wounds, bones and joints; and *Staphylococcus saprophyticus* which causes urinary tract infections and septicemia. The other important opportunistic pathogenic species include *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus saccharolyticus* (4).

The treatment of the infections by CoNS is difficult because many clinical isolates exhibit multiple and high resistance to antibiotics, leading to increased inefficiency of a wide range of antibiotics (5). There are several reports in literature showing high

resistance to methicillin and other antibiotics among CoNS isolates (6, 7, 8). Methicillin resistance in CoNS is caused by the *mecA* gene that encodes penicillin-binding protein 2a (PBP2a) that has low binding affinity to β -lactams (2, 9, 10, 11).

The ability to form biofilm is the most important virulence factor in CoNS, which facilitates its adhesion to and colonization of artificial materials (8). Bacteria in biofilms can resist antibiotics at concentrations up to 1000 times higher than those active on the same bacteria in the planktonic state (12). The biofilm consists of layers of cellular clusters integrated in a matrix of extracellular polysaccharide, called polysaccharide intracellular adhesion (PIA). The enzymes implied in the synthesis of PIA are encoded by the *ica* operon including the *icaA*, *icaD*, *icaB* and *icaC* genes (13).

The two common phenotypic methods for detecting biofilm formation, Tissue Culture Plate (TCP) and Congo Red Agar (CRA), were described by Christensen et al., (14) and Freeman et al., (15) respectively. Molecular detection of the *icaAD* locus was initially described by Heilmann, et al., (16) in *S. epidermidis* but few years later, its presence was confirmed in many other species of staphylococci isolated from implant related-infections (12). The objectives of this study are to evaluate antibiotic resistance and biofilm formation in CoNS isolated from patients at the Anti-Cancer Center of Batna, Algeria, and to detect the responsible *mecA* and *icaAD* genes in these isolates.

Materials and method:

Study setting and bacterial isolates

This study was conducted at the Microbiology Laboratory of the Anti-Cancer Center (ACC), Batna, Algeria. Sixty six coagulase negative staphylococci (CoNS) were isolated from clinical samples (urinary probes, urine, blood culture, pus, wound, pleural fluid, cerebrospinal fluid, intravenous catheter, and drain) obtained from hospitalised patients in various service units (onco-haematology, onco-paediatric, intensive care and carcinological surgery) of the center and from outpatients, between 1st of January and 30th of June, 2017. Duplicate samples were excluded.

The samples were cultured on Mannitol Salt (Chapman) agar and incubated at 37°C for 48 hours. All strains were identified by colony morphology, Gram stain reaction, catalase production, coagulase assay, and the API Staph system (bioMérieux, France). The purified isolates were stored at 4°C.

Antibiotic susceptibility testing of isolates

In vitro antibiotic susceptibility testing (AST) was performed by the disk diffusion test on Mueller-Hinton (MH) agar as described by Bauer et al., (17) and the interpretation of the results was done according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (18). All isolates were tested with the following antibiotics: penicillin (10 UI), cefoxitin (30 µg), gentamicin (10 µg), amikacin (30 µg), kanamycin (30 µg), erythromycin (15 µg), tetracycline (30 µg), ofloxacin (5 µg), laevofloxacin (5 µg), ciprofloxacin (5 µg), clindamycin (2 µg), chloramphenicol (30 µg), rifampicin (5µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg), fusidic acid (10 µg), pristinamycin (15 µg) and teicoplanin (30 µg). The minimum inhibitory concentrations (MICs) of oxacillin and vancomycin for each isolate were determined on MH using E-test method, and results interpreted according to CLSI guidelines (18).

Detection of biofilm formation by Congo Red Agar (CRA) method

The qualitative determination of the biofilm formation was carried out by culturing CoNS isolates on Congo Red Agar as proposed by Freeman et al., (15). The prepared medium was inoculated with CoNS isolates and incubated at 37°C for 24 to 48 hours. Biofilm-forming bacteria appear black with a crystalline lens of dry consistency where the Congo Red dye interacts directly with certain bacterial polysaccharides forming a slime while the non-biofilm forming colonies remained red.

Detection of biofilm formation by Tissue Culture Plate (TCP) method

Quantitative determination of biofilm formation on microplates was evaluated as described by Christensen et al., (14) with some modifications. The microplates used were made of polystyrene with 96 wells on which the bacteria adhere and form biofilm. The isolates were cultivated on nutrient agar for 18-24 hours at 37°C. A colony of each isolate was inoculated into 5 ml Trypticase Soy Broth (TSB) and incubated at 37°C for 24 hours, and the culture was then diluted 1:100 in the TSB (+1% glucose). Each well of the microplate was filled with 200µL of this dilution (three independent cultures for each isolate). A sterile broth of TSB (+1% glucose) was used as a negative control.

The microplates were sealed and incubated for 24 hours at 37°C. Thereafter, the contents of the wells were gently removed and washed four times with sterile physiological water and then dried at 60°C for 30 minutes. The cells adhering to the polystyrene support in each of the wells were stained with 200µl of 1% crystal violet (w/v) and incubated for 30 minutes following which excess crystal violet was removed by 5 successive washes with sterile distilled water and the plates dried at room temperature. The dye incorporated by the adhered cells was solubilized with 200µL of 95% ethanol (v/v).

The amount of dye solubilized was measured by reading the optical density (OD) at 550 nm using Bio-Rad ELISA reader (PR 3100 TSC) (19). The interpretation of the results was performed according to the criteria of Stepanovic et al., (20). The OD of the isolate was obtained by the arithmetic mean of three wells and this value was compared with the mean absorbance of negative control (ODc). The isolates were classified as non-biofilm producer (OD ≤ ODc), weak biofilm producer (ODc < OD ≤ 2 ODc), moderate biofilm producer (2ODc < OD ≤ 4ODc) and strong biofilm producer (4ODc < OD).

Detection of *mecA* and *icaAD* genes by PCR and 16s rDNA sequencing

The PCR of *mecA* and *icaAD* genes and the sequencing of the 16S rRNA genes were performed in the Laboratory of DIAG-GENE, Angers, France. Nine MRCoNS strains (no 1 to 9) and 1 MSCoNS strain (no 10), were selected for *mecA* gene detection. Similarly, 9 biofilm-forming strains (no 11 to 19) and 1 non-biofilm forming strain (no. 20) were selected from the TCP results for *icaAD* gene detection.

PCR assay

The *mecA* and *icaAD* genes amplifications were performed by PCR as described by

Poulsen et al., (21) and Yazdani et al., (22) respectively, using the following specific primers; *mecA*-F:5'-GGGATCATAGCGTCATTATTC-3' and *mecA*-R:5'-AACGATTGTGACACGATAGCC-3', *icaAD*-F: 5'-TATTCAATTTACAGTCGCAC-3' and *icaAD*-R: 5'-GATTCTCTCCCTCTCTGCCA-3'. The DNA amplification was done in a Mycycler thermal cycler (Bio-Rad, USA). The amplification products (10µL) were electrophoresed on 1.5% agarose gel followed by staining in an ethidium bromide bath (0.5µg/ml). The amplified DNA products were visualized under UV transillumination.

Sequencing of the 16S rRNA genes

Sequencing of amplified and purified 16S rDNA of strain number 3 (*mecA*+) and strain number 13 (*icaAD*+) was performed as described by Sanger et al., (23), using the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA) and two universal primers (27F and 1492R). The 16S sequences obtained were then compared with those of the GeneBank database using the BLAST programme (24).

Results:

Identification of CoNS isolates

Sixty six CoNS belonging to 9 different species were identified by the conventional methods; *S. epidermidis* 29, *S. haemolyticus* 15, *S. hominis* 8, *S. chromogenes* 6, *S. xylosus* 4, *S. capitis* 1, *S. saprophyticus* 1, *S. cohnii* 1, and *S. simulans* 1 (Table 1).

Table 1: Species distribution of CoNS isolates in Anti-Cancer Center, Batna, Algeria

CoNS isolate	Frequency	Percentage
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	29	43.9
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	15	22.7
<i>Staphylococcus hominis</i>	8	12.1
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	6	9.1
<i>Staphylococcus xylosus</i>	4	6.1
<i>Staphylococcus capitis</i>	1	1.5
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	1.5
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	1.5
<i>Staphylococcus simulans</i>	1	1.5
Total	66	100

Table 2 shows the distribution of the CoNS according to the clinical samples; 28 (42.4%) were from blood cultures (*S. epidermidis* 11, *S. haemolyticus* 8, *S. hominis* 8 and *S. chromogenes* 2); 13 (19.7%) from catheter samples (*S. epidermidis* 8, *S. haemolyticus* 2, *S. chromogenes* 1, *S. xylosus* 1 and *S. capitis* 1); 8 (12.1%) from pus

samples (*S. epidermidis* 2, *S. chromogenes* 2, *S. haemolyticus* 1, and *S. xylosus* 3); 6 (9.1%) from urine samples (*S. epidermidis* 3, *S. haemolyticus* 2, and *S. hominis* 1).

Table 2: Specimen distribution of CoNS isolates in Anti-Cancer Center, Batna, Algeria

Samples	Frequency	Percentage
Blood	28	42.4
Vascular catheter	13	19.7
Pus	8	12.1
Urine	6	9.1
CSF	5	7.6
Pleural fluid	3	4.5
Wound	1	1.5
Urinary probe	1	1.5
Drain	1	1.5
Total	66	100

CoNS = coagulase negative staphylococci

The CoNS isolates were found mainly in the onco-haematology service (n=30, 45.5%), out of which 13 were *S. epidermidis* (Table 3).

Table 3: Distribution of CoNS isolates by service unit in Anti-Cancer Center, Batna, Algeria

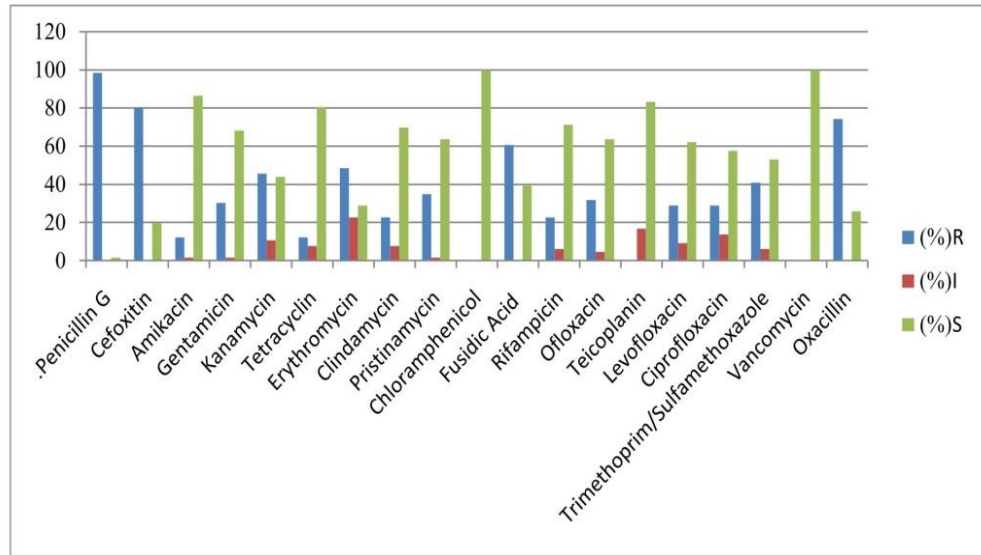
Service unit	No of CoNS	Percentage
Onco-haematology	30	45.5
Carcinological surgery	14	21.2
Onco-paediatric	10	15.2
Intensive care	7	10.6
Outpatient	5	7.6
Total	66	100

CoNS = coagulase negative staphylococci

Antimicrobial susceptibility profiles of CoNS isolates

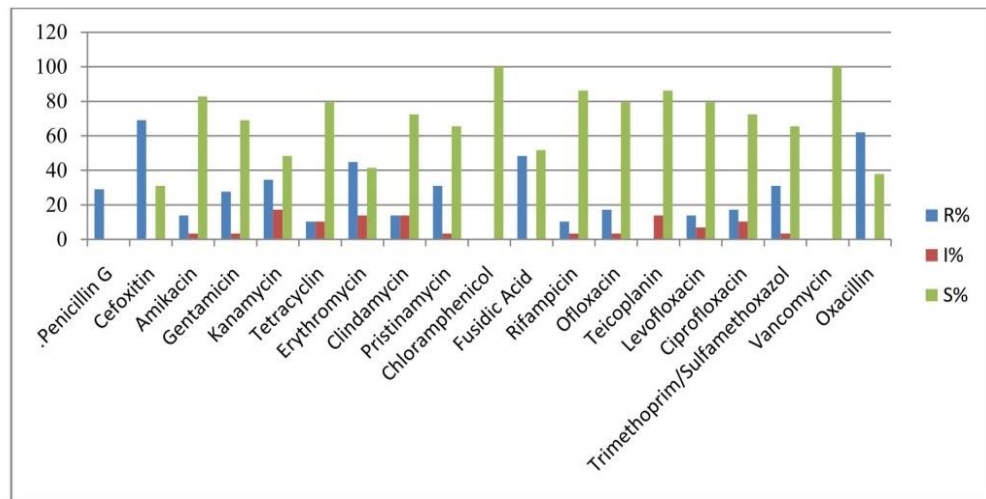
The AST profile of the isolates is detailed in Fig 1. The isolates exhibited high resistance to penicillin G (98.5%), cefoxitin (80.3%), oxacillin (74.2%), fusidic acid (60.6%), but were totally sensitive to chloramphenicol and vancomycin (by the E-test). The isolates were also largely sensitive to amikacin (86.4%), teicoplanin (83.3%) and tetracycline (80.3%) but susceptibility was reduced to rifampicin (71.2%), clindamycin (69.7%), gentamicin (68.2%), pristinamycin (63.6%), ofloxacin (63.6%), laevofloxacin (62.1%), erythromycin (50%) and kanamycin (45%).

The most frequent CoNS isolates, *S. epidermidis*, was totally resistant to penicillin G (100%), 69% to cefoxitin, and 60% to oxacillin by the E-test (Fig. 2).



R = resistance; I = intermediate; S = sensitive

Fig 1: Antimicrobial susceptibility profiles of coagulase negative staphylococci isolates



R = resistance; I = intermediate; S = sensitive

Fig 2: Antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus epidermidis*

Biofilm formation

Fig. 3 shows the result of biofilm formation by the CRA method with 21 (31.8%) CoNS isolates forming biofilm while 45 (68.2%) were negative. The results of biofilm formation by the TCP method showed

that 59 (89.4%) of the 66 isolates formed biofilms with different intensities (Fig 4); 16 (24.2%) were strong biofilm forming, 23 (34.9%) were moderate, 20 (30.3%) were weak, and 7 (10.6%) were non-biofilm forming bacteria.

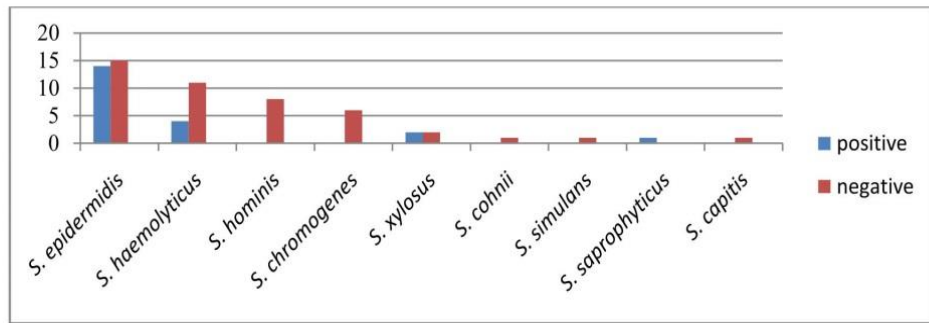


Fig 3: Biofilm formation tested by Congo Red Agar method

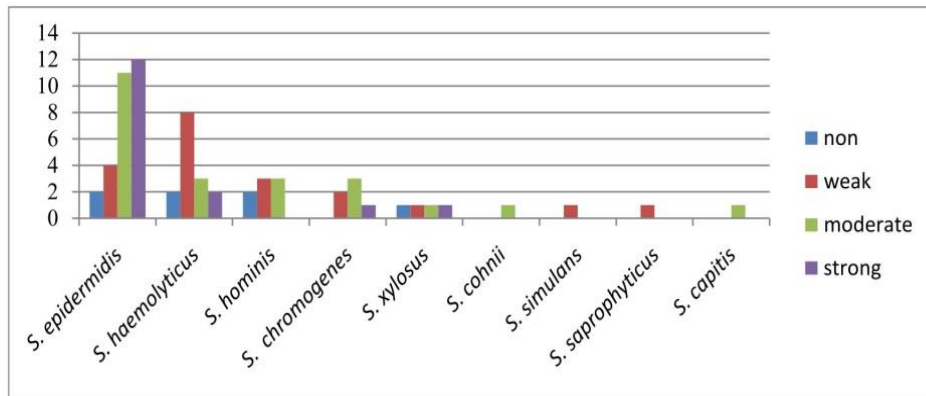
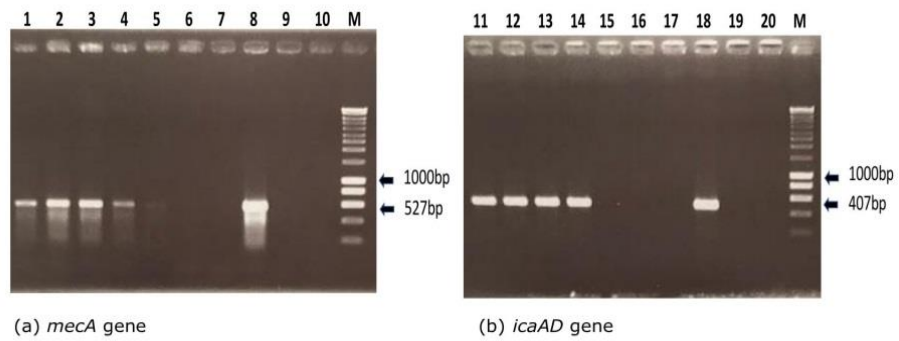


Fig 4: Biofilm formation tested by the Tissue Culture Plate method

Result of *mecA* and *icaAD* genes PCR

Of the 9 CoNS isolates resistant to cefoxitin by the AST tested for carriage of *mecA* gene, only 6 amplified for the gene (Fig 5a). Similarly, only 5 of the 9 CoNS isolates positive for biofilm production by the CRA

method amplified for the *icaAD* genes (Fig 5b). Sequencing of the 16S rRNA genes of in each isolate positive for *mecA* and *icaAD* shows percentage similarity to respective GenBank strains as shown in Table 4.



M: molecular size marker (Smart Ladder 200bp, Eurogentech); 1-9: MRCoNS; 10: MSCoNS; 11-19: TCP+ CoNS; TCP- CoNS

Fig 5: Agarose gel electrophoresis of *mecA* and *icaAD* genes

Table 4: Percentage similarity of two CoNS isolates on BLAST analysis

Identification number (N°) isolate	%similarity to strain in GenBanI	Identification
3	100	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> strain FC2950
13	100	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain K121

Discussion:

Our study identified 9 species out of the 66 CoNS characterized, with predominance of *S. epidermidis* (44%), *S. haemolyticus* (22.7%) and *S. hominis* (12.1%). This similar pattern has been reported by Shah et al., (25) who reported 35.1% for *S. epidermidis*, 33.1% for *S. saprophyticus* and 8.8% for *S. haemolyticus*, as well as by many other researchers (1,8,26,27). The CoNS in our study especially *S. epidermidis* were found in onco-haematology service unit mainly from blood cultures which is similar to what Marsik et al., reported in their study (28). CoNS is the most frequently isolated bacteria from blood cultures and is a serious health challenge in developing as well as in many developed countries (4). *S. epidermidis* is the most common species involved in blood stream infections, which is attributed to its ability to colonize central venous catheters and other implanted medical devices (29).

CoNS resistant to multiple antibiotics have become a great challenge in nosocomial infections. In this study, 80.3% of the CoNS isolates were methicillin resistant by the cefoxitin disk and 74.2% by the oxacillin E-test, and resistance to penicillin G was 98.5%. This high resistance rate to both methicillin and penicillin G have been reported by several other researchers (1,6,7,30,31,32). Methicillin resistance is usually associated with *mecA* gene that encodes abnormal penicillin binding protein PBP2a (PBP2a) with low binding affinity for β -lactam antibiotics (5). The *mecA* gene is located on a mobile genetic element, the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) which can be transferred between and within the staphylococcal species (33). MRSA isolates are usually not reliably detected by phenotypic techniques, especially as the expression of *mecA* gene varies according to strains, some of which may possess heterogeneous resistance, hence the need for genotypic characterization (34).

In our study, no CoNS isolates were resistant to vancomycin by the E-test MIC, which agrees with the reports of Jain et al., (35) and Shrestha et al., (1). Vancomycin

and teicoplanin are anti-staphylococcal antibiotics to which resistance is rarely observed. These antibiotics should however be reserved for the treatment of staphylococcal infections resistant to all other antibiotics (32). The CoNS isolates were also largely sensitive to amikacin and tetracycline (>80%) but susceptibility to fluoroquinolones (ofloxacin, ciprofloxacin and laevofloxacin), clindamycin, pristinamycin, erythromycin and trimethoprim/sulfamethoxazole were reduced with resistance rate being over 20% for each of these isolates. Our findings are similar to what others have reported for CoNS clinical isolates (3, 28, 29, 36, 37, 38).

The ability of staphylococci to form biofilms helps the bacterium to resist host immune response and is considered responsible for chronicity as biofilm protects microorganisms from opsono-phagocytosis and antimicrobial agents. In view of the large number of infections caused by biofilm producing bacteria, a reliable method for their diagnosis is necessary. Nasr et al., (39) reported that 50% of CoNS isolated from intravascular blood cultures and catheters were biofilm producers using the CRA method, which is higher than 31.8% reported in our current study. The TCP method has however been reported to be a more sensitive, accurate and reproducible screening method for detecting biofilm production in clinical staphylococci isolates with added advantage of being a quantitative tool for comparing the adherence of different strains (39). Oliveira et al., (26), Soumya et al., (8) and Shrestha et al., (1) reported that 73%, 87.5% and 85% CoNS respectively produce biofilm by the TCP method. This is similar to the high rate of 89.4% reported in our current study.

The ability of CoNS to be resistant to methicillin and produce biofilm is an important factor in infectivity which occurs through expression of *mecA* and *ica* genes respectively. Jain et al., (35) have reported that detection of *mecA* gene by PCR can be a beneficial complement to standard susceptibility test that can allow the identification of intrinsic resistance quickly and efficiently, as most strains carry the classical *mecA* gene. Six of the 9 (66.7%) selected CoNS isolates resistant to methicillin (by cefoxitin disk) in

our study amplified for *mecA* gene. However, other allotypes of *mecA* gene, have been described for subspecies of *S. sciuri* (*mecA1*) and for *S. vitulinus* (*mecA2*) among animal-derived isolates. Another *mecC* allotype, *mecC2*, was recently reported for methicillin resistant *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* (40). The *icaAD* gene amplified in 5 of the 9 (55.5%) selected CoNS isolates in our study. This rate is higher than the 32% reported by Nasr et al., (39). It has been reported that the *icaAD* gene is not always associated with *in vitro* biofilm formation (39). The biofilm-forming ability of some isolates in the absence of *icaAD* gene highlights the need to investigate the genetic basis of *ica*-independent biofilm formation.

Conclusion:

In vitro resistance to methicillin (cefoxitin) and biofilm formation were high among the CoNS isolates in Anti-Cancer Center, Batna, Algeria, but the association of these phenotypes with respective carriage of *mecA* and *icaAD* genes was low. Further studies are needed to investigate the genetic basis of biofilm formation independent of *icaAD* genes.

References:

- Shrestha, L. B., Bhattarai, N. R., and Khanal, B. Antibiotic resistance and biofilm formation among coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples at a tertiary care hospital of eastern Nepal. *Antimicrob Resist Infect Contr.* 2017; 6 (89): 1-7.
- Ahmed, R., Singh, S., Farooq, U., et al. Occurrence and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-resistant Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Different Clinical Specimens from the Patients Hospitalized in Teerthanker Mahaveer Medical College and Research Centre, Moradabad, India. *Intern J. Sci Study.* 2016; 3 (11): 41-47.
- Cuevas, O., Cercenado, E., Vindel, A., et al. Evolution of the Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus* spp. In Spain: Five Nationwide Prevalence Studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48 (11): 4240-4245.
- Cunha, Mde L., Sinzato, Y. K., and Silveira, L. V. A. Comparison of Methods for the Identification of Coagulase negative Staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99 (8): 855-860.
- Xu, Z., Mkrtychyan, H. V., and Cutler, R. R. Antibiotic resistance and *mecA* characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from three hotels in London, UK. *Front Microbiol.* 2015; 6: 1-6.
- Koksal, F., Yasar, H., and Samasti, M. Antibiotic resistance patterns of coagulase negative *Staphylococcus* strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. *Microbiol Res.* 2009; 164: 404-410.
- Nagasrilatha, B., Manmohan, B., Sasidhar, M., et al. A Study on Methicillin Resistant Coagulase Negative Staphylococci Isolated from Medical Intensive Care Unit at a Tertiary Care Centre-India". *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences.* 2015; 4 (61): 10597-10601.
- Soumya, K. R., Philip, S., Sugathan, S., et al. Virulence factors associated with Coagulase Negative Staphylococci isolated from human infections. *Biotechnol.* 2017; 7 (14): 1 - 10.
- Hanssen, A. M., Kjeldsen, G., and Sollid, J. U. E. Local Variants of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in Sporadic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci: Evidence of Horizontal Gene Transfer? *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 285: 296.
- Zong, Z., Peng, C., and Lu, X. Diversity of *SCCmec* Elements in Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Clinical Isolates. *PLoS One.* 2011; 6 (5): 1-6.
- Bhatt, P., Tandel, K., Singh, A., et al. Prevalence and molecular characterization of methicillin resistance among Coagulase-negative Staphylococci at a tertiary care center. *Med J Armed Forces India.* 2016; 710: 1-5.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Ravaoli, S., et al. Polysaccharide intercellular adhesion in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015; 5: 1-10.
- Cho, S.H., Naber, K., Hacker, J., et al. Detection of the *icaADBC* gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2002; 19: 570-575.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Yonger, J. J., et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985; 22: 996-1006.
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R., and Keane, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 1989; 42: 872-874.
- Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., et al. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol.* 1996; 20: 1083-1091.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., et al. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *Am J Clin Pathol.* 1966; 45: 493-496.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility; Twenty-Fourth informational supplement, 2014 Philadelphia
- Rodrigues, L. B., Santos, L. R. D., Tagliari, V. Z., et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Braz J Microbiol.* 2010; 41: 1082-1085.
- Stepanovic, S., Vukovi, D., Hola, V., et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci. *APMIS.* 2007; 115 (89): 1-9.
- Poulsen, A. B., Skov, R., and Pallesen, L. V. Detection of Methicillin Resistance in Coagulase-negative Staphylococci and in Staphylococci Directly from Simulated Blood Cultures Using the EVIGENE MRSA. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51: 419.
- Yazdani, R., Oshaghi, M., Havayi, A., et al. Detection of *icaAD* Gene and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* isolates from wound infections. *Iranian J Publ Health* 2006; 35: 25-28.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977; 74: 5463-5467.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215 (3): 403-410.
- Shah, D. A., Wasim, S., and Abdullah, F. E.

- Comparison of Oxacillin and Cefoxitin for the Detection of *mecA* Gene to Determine Methicillin Resistance in Coagulase Negative Staphylococci (CoNS). Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan. 2017; 27 (8): 520-522.
26. Oliveira, A., and Cunha, M. L. R. S. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. BMC Res Notes. 2010; 3: 260
 27. Igbinsola, E. O., and Beshiru, A. Characterization of antibiotic resistance and species diversity of staphylococci isolated from apparently healthy farm animals. Afr J Clin Exper Microbiol. 2019; 20 (4): 289-298
 28. Marsik, F. J., and Brake, S. Species Identification and Susceptibility to 17 Antibiotics of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Clinical Specimens. J Clin Microbiol. 1982; 15: 640 - 645
 29. Javadpour, S., Karimi, E., and Karmostaji, A. Frequency and antibiogram pattern of coagulase negative *Staphylococcus* in clinical specimens of Shahid Mohammadi Hospital in patients, Bandar-Abbas, Iran. Afr J Microbiol Res. 2010; 4 (14): 1581-1583.
 30. Goudarzi, M., Seyedjavadi, S., Goudarzi, H., et al. Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from hospitalized patients in Tehran, Iran. Journal of Paramedical Sciences. 2014; 5 (2): 44-50.
 31. Iorio, N. L. P., Azevedo, M. B., Frazão, V. H., et al. Methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* carrying biofilm formation genes: detection of clinical isolates by multiplex PCR. Int Microbiol. 2011; 14: 13-17.
 32. Pinna, A., Zanetti, S., Sotgiu, M., et al. Identification and antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated in corneal/external infections. Br J Ophthalmol. 1999; 83: 771-773.
 33. Pinheiro, L., Mello, P. L., Abraao, L. M., et al. Evaluation of reference values for phenotypic tests to detect oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. Future Microbiol. 2018; 13 (5): 565-575.
 34. Courvalin, P., Leclercq, R., et Bingen, E. Antibiogramme. Annexe. 2^e édition ESKA; 2006.
 35. Jain, A., Agarwal, J., and Bansal, S. Prevalence of methicillin-resistant, coagulase negative staphylococci in neonatal intensive care units: findings from a tertiary care hospital in India. J Med Microbiol. 2004; 53: 941-944.
 36. Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Mohamed, H., et al. Prevalence and antibiotic resistance of Staphylococci isolated from Kolea Hospital, Algeria. Journal of Fundamental and Applied Sciences. 2015; 7 (2): 260-270.
 37. Farid, A., Naz, I., Ashraf, A., et al. Molecular detection of antimicrobial resistance in local isolates of *Staphylococcus epidermidis* from urinary tract infections in Faisalabad region of Pakistan. EXCLI Journal. 2015; 14: 697-705.
 38. Gatermann, S. G., Koschinski, T., and Friedrich, S. Distribution and expression of macrolide resistance genes in coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Infect. 2007; 13: 777-778.
 39. Nasr, R. A., AbuShady, H. M., and Hussein, H. S. Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. The Egyptian Journal of Medical Human Genetics. 2012; 13: 269-274.
 40. Becker, K., Heilmann, C. and Peters, G. Coagulase-Negative Staphylococci. CMR. 2014; 27: 870-926



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mohamed Boudiaf de M'Sila

Faculté des Sciences
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

1985



جامعة محمد بوضياف - المسيلة
Université Mohamed Boudiaf - M'Sila

1^{er} Séminaire National : L'Apport des Biotechnologies sur la Protection de l'Environnement

Le 15-16 décembre 2019 à M'Sila

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le comité scientifique du Séminaire atteste que :
Melle/Mme/Mr : ZATOUT ASMA

A présenté **une communication affichée**

Intitulée: **Activité antibiofilm de l'extrait phénazinique de *Pseudomonas fluorescens* sur les staphylocoques à coagulase négative isolés du Centre Anti-Cancer de Batna, Algérie**

Co Auteurs: BENKREDDA FATIMA, MAZARI HIBAT ERRAHMEN, BENBRAHIM CHAHLA, DJIBAOUI RACHID, DAHAH HICHAM, KASSAH-LAOUAR AHMED

Le Président du Séminaire

Dr. Mouloud GHADBANE

Univ M. B. M'Sila
Faculté des Sciences / SNV
SNABPE 15-16.12.2019



Le Doyen de la Faculté des Sciences

Pr. Ettayib BENSACI



Université Mustapha Stambouli – Mascara
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Conférence Nationale sur l'Environnement et le Développement Durable

CNEDD, 22 et 23 Janvier 2020



Laboratoire de Géomatique
Ecologie et Environnement

Attestation de participation

Cette attestation confirme que:

ZATOUT Asma

a présenté une communication affichée à la Conférence Nationale sur « l'Environnement et le Développement Durable », qui a eu lieu le 22 et 23 Janvier 2020 à l'Université de Mascara.

Intitulée: Portage nasal du staphylocoque à coagulase négative chez le personnel soignant en fonction des critères sociodémographiques.

**Co-auteurs: BENBRAHIM C. , MAZARI H.E, BENKREDDA F., KASSAH-LAOUARA.,
DJIBAOU I.R.**



Dr : FETATI Aïcha
Présidente de CNEDDA
Université de Mascara
Faculté des S. N.-V



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Echahid Hamma Lakhdar d'El-Oued
Faculté des Sciences Exactes

Séminaire International sur les Plantes Médicinales (SIPM-2018)

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Asma ZATOUT

a présenté UNE COMMUNICATION PAR AFFICHE

au Séminaire International sur les Plantes Médicinales (SIPM-2018), organisé du 17 au 18 janvier 2018 à l'Université d'El-Oued, intitulée : «Effet de molécules bioactives extraites de feuilles de *Juniperus thurifera* de la région des Aures (Algérie)»

Co-auteur (s) : Chahla BENBRAHIM, Aïch LATAB, Rachid DJIBAOUI, Ahmed KASSAH-LAOUAR



Présidente du Séminaire
Dr. Naima BENCHIKHA



ATTESTATION DE COMMUNICATION

A L'occasion de la Première Conférence Internationale d'Infectiologie d'Annaba (Ciia)

Nous attestons par ce document que le Dr A.ZATOUT a présenté une communication affichée intitulée :

Prévalence du portage nasal du Staphylocoque à coagulase positive chez le personnel soignant dans divers services du CHU de Batna.
(Co-auteur):

C.BENBRAHIM, A.KASSAH-LAOUAR, R.DJIBAOUI

Lors de cette journée, organisée à la faculté de médecine d'Annaba le 27 et 28 octobre 2017

Président du comité d'organisation

Président de la séance

Président du Comité Scientifique

Centre Hospitalier, Université d'Annaba
Service d'Infectiologie
Pr. MEGRADECHE Mohamed
Maître de Conférences Hospitalo-Universitaire
N° 237



Clinique des Maladies Infectieuses
CHU d'ANNABA
Hôpital Universitaire D'ANNABA
N° 118

H. M. LAOUAR



ATTESTATION DE PARTICIPATION

Je soussignée, Malika BOUCHENAK, Présidente de la Société Algérienne de Nutrition, atteste que

Asma ZATOUT

A assisté au 3^{ème} Congrès International de la SAN du 28 au 30 novembre 2017 à Constantine, Université des Frères Mentouri Constantine 1 et a présenté une **communication affichée** intitulée : **Étude de l'activité antibactérienne des extraits de *Juniperus oxycedrus***

Coauteurs : BENBRAHIM C., DJIBAOU I R., KASSAH-LAOUAR A.

Fait à Constantine, le 30 Novembre 2017



Pr Malika BOUCHENAK
Présidente



PREMIÈRES REUNIONS ASSOCIATIONES LOCALS
 Microbiologie Clinique
 Laboratoire Central de Biologie Médicale CAC - Batna

RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES :

Etat des lieux au 3ème millénaire

07 Mars 2018, A la salle des conférences CAC Batna

ATTESTATION DE COMMUNICATION

Le comité d'organisation atteste, que la communication affichée intitulée :
 Evaluation de la formation de biofilm des staphylocoques à coagulase négative isolés au
 Centre Anti Cancer du Batna par la méthode de Rouge Congo Agar

A été présentée par : A.Zatout

Co-auteurs : Benbrahim.C, Kassah-Laouar.A, Djibaoui.R

Le président de la séance

Dr. A. BENBOUZ
 Maître de Conférences
 Faculté de Médecine - Batna

Le président du comité d'organisation

Professeur A. BOUJAHJOUH
 Chef de Service
 CAC Batna



Centre De Lutte Contre Le Cancer Batna
Laboratoire Central de Biologie Médicale
Association de Microbiologie Clinique des Aurès (AMICA)
3^{èmes} Rencontres Aurassiennes de Microbiologie clinique
11 & 12 Mars 2020



ATTESTATION DE COMMUNICATION

Le comité d'organisation atteste, que la communication affichée intitulée :
«Profil de résistance aux antibiotiques et détection de gène mecA des
staphylocoques à coagulase négative isolés au Centre de Lutte Contre
le Cancer de Batna.» a été présentée par : **Zatout A,**
Co-auteurs : Benbrahim C, Djibaoui R, Kassah-Laouar A

Le président de la séance

Dr. LOUCIF LOTFI

Le président du comité d'organisation

Professeur A. KASSAH-LAOUAR

LEADER CENTRE DE LUTTE CONTRE LE CANCER

Professeur A. KASSAH-LAOUAR

CHIEF OF SERVICE

CALBATNA



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Hadj Lakhdar Batna 1



Faculté des Sciences de la Matière en collaboration avec le Laboratoire
de Chimie des Matériaux et des Vivants : Activité & Réactivité (LCMVAR)

**Les 1^{ères} Journées d'Etude sur la Chimie et ses
Applications (JECA-1-2019)**

Batna, 27 Novembre 2019

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le président du comité d'organisation des 1^{ères} Journées d'Etude sur la Chimie et ses Applications (JECA-1-2019) organisé le
27 Novembre 2019 à l'Université Batna1, atteste que Mr, Mme, Mlle :

Asma Zatout

a participé à cette manifestation avec une communication Poster intitulée :

**Activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique de *Salvia officinalis* L. contre les *Staphylococcus*
à coagulase négative isolés du Centre de lutte Contre le Cancer, Batna, Algérie**

Co-organisateur (s) : Benbrahim Chahla, Djibsoni Rachid, Kassab-Lamnat Ahmed

Directeur du laboratoire/ Président de la journée
Prof. Abdelatif MESSAOUDI
معتود عبد المطلب
معتود عبد المطلب



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
UNIVERSITÉ DJILLALI LIABÈS DE SIDI-BEL-ABBÈS

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

2^{ème} Séminaire National Biologie et Santé (2^{ème} SNBS 2017)
19 Décembre 2017



Attestation de Participation

Le comité d'organisation atteste que ZATOUIT Asma a présenté une communication affichée N° MA23 intitulée : PROFIL DE RESISTANCE AUX ANTI-BIOTIQUES DU PORTAGE NASAL DU STAPHYLOCOQUE A COAGULASE NEGATIVE CHEZ LE PERSONNEL SOIGNANT AU CHU DE BATNA., lors du 2^{ème} Séminaire National Biologie et Santé (2^{ème} SNBS 2017).

Co-auteurs: BENBRAHIM Chahla., KASSAH-LAOUAR Ahmed., DJIBAOUI Rachid.

PRÉSIDENT DU SÉMINAIRE
Pr BENALI MOHAMED

Président du Séminaire
Pr Benali Mohamed
2017-2018



COMITÉ D'ORGANISATION



CERTIFICATE OF ATTENDANCE



The CIBSDD 2017 organizing committee confirms the participation of **ZATOUT Asma**
Co-authors **DJIBAOUI Rachid, KASSAH-LAOUAR Ahmed, BENBRAHIM Chahla** With Poster presentation

Activité antibactérienne de l'huile essentielle de Juniperus thurifera de la région des Aures

At The First International Congress On Biotechnologies For Sustainable Development

CIBSDD 2017 BOWMERDES ALGERIA 24-25 OCTOBER



Organizing Committee **CHAH**

Pr. SAHIR-HALOUANE BSSDD

Pr. SAHIR-HALOUANE
Présidente
CIBSDD 2017

Résumé

Considérés depuis longtemps comme des commensaux avirulents, les Staphylocoques à Coagulase Négative (SCN) sont actuellement reconnus comme agents pathogènes opportunistes possédants de multiples propriétés de résistance aux antibiotiques et de formation de biofilms ce qui peut augmenter leur virulence. Dans le cadre de cette thèse, nous avons procédé premièrement à l'isolement des SCN cliniques des différents services du Centre Anti-Cancer (CAC) de Batna (Algérie) puis à l'évaluation de leur résistance aux antibiotiques et à l'étude de leur formation de biofilms. Au total 66 SCN ont été isolés et leur formation de biofilm a été évaluée par la méthode de culture de tissu en plaque (TCP) et la méthode de Rouge Congo Agar (RCA). Après, nous avons détecté la présence des gènes *mecA* et *icaAD* dans les génomes de quelques SCN.

Une étude de l'effet antistaphylococcique de quelques *Pseudomonas* fluorescents a été réalisée. 29 isolats de *Pseudomonas* ont été isolés à partir des racines d'une plante graminée sauvage (l'orge du rat = *Hordeum murinum*) pour les utiliser dans l'inhibition de 20 isolats de SCN en utilisant la méthode des stries croisés. Les surnageants des cultures des *Pseudomonas* dans le milieu MHB ont été aussi testés. L'isolat de *Pseudomonas fluorescens* PK le plus performant dans l'inhibition des SCN a été utilisé pour la production des composés phénaziniques. Il a été inoculé dans le milieu NBY liquide puis une extraction par le solvant d'acétate d'éthyle a été effectuée. Le composé obtenu à sec a été utilisé contre les isolats de SCN.

Une autre approche a été également menée et consiste en une étude de l'effet des huiles essentielles et des extraits méthanoliques de quelques plantes récoltées de la région des Aures (*Juniperus oxycedrus* L., *Juniperus thurifera* L., *Salvia officinalis* L. et *Thymus ciliatus* ssp. *munbyanus* (Boiss. & Reut.) Batt. sur la croissance des SCN et leur formation des biofilms. La composition chimique des huiles essentielles des plantes étudiées a été déterminée par la CG-SM.

Les résultats obtenus ont montré une diversité des SCN. Neuf espèces ont été obtenues dont 44% isolées principalement du service d'onco-hématologie sont rapprochées à *Staphylococcus epidermidis*. Presque tous les isolats étaient résistants à la pénicilline G (98.5%), et la majorité ont montré une résistance à la céfoxitine (80.3%) et à l'oxacilline (72.2%). La méthode TCP était plus sensible (89.4%) que la méthode RCA (31.8%) dans la détection de la formation des biofilms. Le gène *mecA* a été détecté dans 66.7% (6/9) isolats des SCN résistants à la céfoxitine et le gène *icaAD* dans 55.6% (5/9) isolats positifs des SCN sur RCA.

Les 29 isolats de *Pseudomonas* ont inhibé 19 sur 20 SCN. L'isolat le plus performant *P. fluorescens* PK a inhibé 14 isolats de SCN avec des zones d'inhibition allant de 12 mm à 55 mm. Le composé phénazinique extrait à sec a montré une efficacité contre 13 isolats de staphylocoques avec des zones d'inhibition allant de 6.75 à 27.33 mm. L'analyse du composé par les spectrophotomètres UV-visible et infrarouge ont montré des caractéristiques qui font rapprocher le composé obtenu aux hydroxyphénazines.

Les résultats de l'analyse de la composition chimique par CG-SM des HE montrent la richesse et la diversité des huiles essentielles des plantes étudiées dont la plante la plus active *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* qui contient 32 composés identifiés parmi lesquels le thymol (69%). Les résultats d'analyse des EM des plantes étudiées par HPLC montrent une variabilité de leur composition. L'huile essentielle et l'extrait méthanolique de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* par rapport à ceux des autres plantes étudiées ont montré une bonne activité inhibitrice sur les isolats de SCN avec des diamètres moyens d'inhibition de 24.99 mm et 15.76 mm respectivement. Les SCN ont été plus sensibles à l'huile essentielle de *T. ciliatus* ssp. *munbyanus* avec des valeurs de CMI et CMB égales à 2.65 mg/ml et 5.31 mg/ml respectivement. L'activité antibiofilm de l'HE et de l'EM de cette dernière plante est appréciable pour l'HE et l'EM avec un pourcentage de 65.63 % et 58.08 % respectivement suivie par l'HE et l'EM de *S. officinalis* avec 53.13 % et 49.72 % respectivement.

Mots clés: Staphylocoque à coagulase négative, résistance aux antibiotiques, biofilm, extraits de plantes, *Pseudomonas* spp.