

République Algérienne Démocratique et Populaire

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



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

MOUMENE Nadjette

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Microbiologie appliquée

THÈME

Valorisation du rôle anti-staphylococcique chez
les *Pseudomonas* spp. fluorescents isolés à partir des racines
d'une plante graminée sauvage.

Soutenue publiquement : le 13 / 07 / 2021.

JURY

Président :	Mekhaldi Abdelkader	Professeur	U. Mostaganem
Encadreur :	Djibaoui Rachid	Professeur	U. Mostaganem
Examinatrice :	Sidhoum Warda	MCB	U. Mostaganem

Année universitaire : 2020-2021

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

À mes très chers parents qui m'avez appris à faire mes premiers pas dans la vie.

Vous avez fait tant de sacrifices pour mon éducation et mes études.

Vous m'avez comblé par votre soutien et votre générosité.

*Aujourd'hui, je dépose le fruit de votre patience et de vos innombrables sacrifices, soit-il l'exhaussement de
vos vœux et vos prières.*

À mes chères sœurs qui m'avaient également soutenu en les ayant dans ma vie

À toute ma famille,

Puisse ce travail le témoignage de mon estime et ma profonde affection.

Que dieu vous comble de bonheur, de santé et de la prospérité dans votre vie et vous protège

Nadjette

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier « ALLAH », le créateur, le tout miséricordieux pour m'avoir aidé et donné le courage pour réaliser ce modeste travail.

Mes vifs remerciements à :

Mon promoteur de ce mémoire, monsieur le Pr. **DJIBAOUI Rachid**, de m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail pour me guider dans le chemin correct de la recherche.

Sans votre clairvoyance, vos corrections méticuleuses, ce travail n'aurait pu être préparé et dirigé dans des conditions favorables.

Je n'oublierai jamais la gentillesse et la disponibilité.

Mes gratitude à **M^{me} Amir** pour son accueil chaleureux, pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires pour le bon déroulement de ce travail au sein de son laboratoire.

Je remercie vivement les membres du jury :

Monsieur **MEKHALDI Abdelkader** (Professeur à l'Université de Mostaganem),

vous avez accordé un immense honneur et un grand privilège en acceptant la présidence du jury.

Madame **SIDHOUM Warda** (Maître de conférence à l'Université de Mostaganem), de m'avoir fait l'honneur également d'examiner ce travail.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à tous les professeurs qui m'ont enseigné et m'ont soutenu dans mon cursus universitaire grâce à leurs compétences.

Enfin, je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

المخلص

إن بعض البكتيريا الموجودة في الأغشية الحيوية تكون ثابتة للدلالة على قدرتها على البقاء على قيد الحياة بجرعات عالية من المضادات الحيوية. تصبح مستعصية عن طريق إبطاء نموها، كما لو كانت في طريقها إلى "السبات" للحماية من العلاجات بالمضادات الحيوية.

من بين هذه الميكروبات نجد المكورات العنقودية وهي بكتيريا متورطة في أمراض مختلفة ودرجات متفاوتة الشدة. هم أحد العوامل الرئيسية المسؤولة عن عدوى المستشفيات والمجتمع. إن العلاجات الهادفة إلى التقليل من انتشار العدوى أصبحت صعبة لأن العديد من السلالات متعددة المقاومة. لهذا ، من المهم إيجاد استراتيجيات علاجية بديلة صالحة.

كجزء من هذا العمل ، تم جمع سلالتين من المكورات العنقودية الذهبية: واحدة معزولة من تجويف الأنف والأخرى من مختبر الأحياء الدقيقة التعليمي. تم تحديدها بناءً على اختبارات تحديد النمط الظاهري بما في ذلك API STAPH.

في محاولة لحل هذا الاضطراب المنتشر ، تم إجراء دراسة عن التأثير المضاد للمكورات العنقودية لبعض *Pseudomonas* الفلورية. تم اختيار 26 عزلة من بكتيريا *Pseudomonas* من ثلاث عينات من جذور الحشائش البرية. تم استخدام أربع عزلات في تثبيط سلالتين من بكتيريا *Staphylococcus aureus* عن طريق تطبيق طريقة الخط المتقاطع على وسط Mueller Hinton ووسط King B ، وتم التعرف على أفضل أداء في اختبار التناقض من خلال اختبارات الكيمياء الحيوية والفسولوجية لتحديد نوعها.

تظهر النتائج أن الأخير من المحتمل أن ينتمي إلى الأنواع *Pseudomonas fluorescens* من بين أربع عزلات من *Pseudomonas* ، أعاق اثنان من نمو المكورات العنقودية المستهدفة. تم الحصول على هذا النشاط المثبط في وسط King B وليس وسط Mueller Hinton ، أفضل عزلة P₂₁ قامت بتثبيط كلا من سلالتين *Staphylococcus* "SI" و "SH" مع مناطق تثبيط 9 ملليمتر و 17 ملليمتر على التوالي.

يشير هذا إلى أن المستقلب الذي تسبب في هذا التثبيط قد يكون pyoverdine ، والذي يعمل عن طريق استنفاد الوسط. تستحق نتائج استخلاص البيوفيرديينات وتوصيفها مزيداً من الوقت لتأكيداتها من خلال التكرارات.

الكلمات المفتاحية

Staphylococcus aureus - عدوى - مضادات حيوية - *Pseudomonas* - Pyoverdines

Résumé

Certaines bactéries généralement en biofilm sont dites persistantes pour désigner leur capacité à survivre à des doses élevées d'antibiotiques. Elles deviennent persistantes en ralentissant leur croissance, un peu comme si elles entraient en « hibernation » pour se protéger des traitements antibiotiques.

Parmi ces microbes on trouve les Staphylocoques qui sont des bactéries impliquées dans des pathologies variées et de degrés de gravité divers. Elles sont un des premiers agents responsables d'infections nosocomiales et communautaires. Les traitements visant à éradiquer les infections sont difficiles car de nombreuses souches sont multi-résistantes. Pour cela, il est important de trouver des stratégies thérapeutiques alternatives valides.

Dans le cadre de ce travail, deux souches de *Staphylococcus aureus* ont été recueillies: une isolée à partir des fosses nasales et l'autre provenant du laboratoire pédagogique de microbiologie. Elles ont été identifiées en se basant sur des tests d'identification phénotypiques dont la galerie API STAPH.

Dans le but d'essayer de résoudre ce trouble diffus, une étude de l'effet anti-staphylococcique de quelques *Pseudomonas* fluorescents a été effectuée. 26 isolats de *Pseudomonas* ont été sélectionnés parmi des bactéries obtenus à partir de trois échantillons de racines des plantes graminées sauvages. Quatre isolats ont été utilisés dans l'inhibition de deux souches de *Staphylococcus aureus* en appliquant la méthode des stries croisées sur milieu Mueller Hinton et milieu King B. Les *Pseudomonas* les plus performants dans ce test d'antagonisme ont été identifiés via des tests biochimiques et physiologiques pour déterminer leurs espèces.

Les résultats montrent que ces derniers sont susceptibles d'appartenir à l'espèce *Pseudomonas fluorescens*.

Parmi les quatre isolats de *Pseudomonas*, deux ont inhibé la croissance des Staphylocoques cibles. Cette activité inhibitrice a été obtenue sur milieu King B et non sur milieu Mueller Hinton. L'isolat le plus performant P₂₁ a inhibé les deux souches de Staphylocoques « SI » et « SH » avec des zones d'inhibition de 9 mm et 17 mm respectivement. Cela indique que le métabolite qui a provoqué cette inhibition peut être une pyoverdine, qui agissent par appauvrissement du milieu.

Les résultats de l'extraction et de la caractérisation des pyoverdines méritent plus de temps pour être confirmés par des répétitions.

Mots clés : *Staphylococcus aureus* - infections – antibiotiques – *Pseudomonas* – pyoverdines.

Abstract

Some bacteria generally in biofilm are said to be persistent to denote their ability to survive high doses of antibiotics. They become persistent by slowing their growth, a bit as if they were going into "hibernation" to protect themselves from antibiotic treatments.

Among these microbes we find Staphylococci which are bacteria involved in various pathologies and of varying degrees of severity. They are one of the primary agents responsible for nosocomial and community infections. Treatments to eradicate infections are difficult because many strains are multi-resistant. For this, it is important to find valid alternative therapeutic strategies.

As part of this work, two strains of *Staphylococcus aureus* were collected: one isolated from the nasal cavity and the other from the educational microbiology laboratory. They were identified based on phenotypic identification tests including the API STAPH gallery.

In an attempt to resolve this diffuse disorder, a study of the anti-staphylococcal effect of some fluorescent *Pseudomonas* was carried out. 26 *Pseudomonas* isolates were selected from bacteria obtained from three samples of roots of wild grasses. Four isolates were used in the inhibition of two strains of *Staphylococcus aureus* by applying the cross-streak method on Mueller Hinton medium and King B medium. The best performing *Pseudomonas* in this antagonism test were identified via biochemical tests and physiological to determine their species.

The results show that the latter are likely to belong to the species *Pseudomonas fluorescens*. Of the four isolates of *Pseudomonas*, two inhibited the growth of target Staphylococci. This inhibitory activity was obtained on King B medium and not on Mueller Hinton medium. The best performing isolate P21 inhibited both strains of *Staphylococcus* "SI" and "SH" with zones of inhibition of 9mm and 17mm respectively. This indicates that the metabolite which caused this inhibition may be pyoverdine, which acts by depletion of the medium.

The results of the extraction and characterization of pyoverdins deserve more time to be confirmed by replicates.

Keywords: *Staphylococcus aureus* - infections - antibiotics - *Pseudomonas* - pyoverdins.

Table des matières

المخلص, résumé, abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Revue bibliographique

Chapitre I : Les germes du genre *Staphylococcus*.....5

1)- Position taxonomique, classification et phylogénie des staphylocoques.....5

2)- Caractères bactériologiques.....12

2)-1. Caractères morphologiques.....12

2)-2. Caractères culturels.....12

3)- Habitat et transmission.....13

4)- Pouvoir pathogène chez l'homme.....14

4)-1. Infections nosocomiales.....15

4)-2. Infections cutanéomuqueuses.....15

4)-3. Infections systémiques.....16

4)-3.1. Septicémies.....16

4)-3.2. Endocardites.....16

4)-4. Adhésion des Staphylocoques et formation des biofilms.....17

4)-4.1. Staphylocoques et biofilms.....17

4)-4.2. Etapes de formation du biofilm.....17

4)-4.3. Mécanisme de formation d'un biofilm Staphylococcique.....18

4)-4.3.1. Adhésion.....	18
a. Adhésion aux surfaces abiotiques.....	18
b. Attachement aux surfaces biotiques.....	18
4)-4.3.2. Multiplication des bactéries et maturation du biofilm.....	19
4)-4.3.3. Détachement du biofilm.....	19
4)-5. Toxi-infections alimentaires.....	19
5)- Les antibiotiques anti-Staphylococciques habituels.....	20
5)-1. Bêta-lactamines.....	20
5)-2. Glycopeptides.....	21
5)-3. Fosfomycines.....	22
5)-4. Aminosides.....	22
5)-5. Fluoroquinolones.....	23
5)-6. Tétracyclines.....	23
6)- Résistance de <i>S.aureus</i> aux agents anti-infectieux.....	24
7)- Mécanismes généraux de résistance des bactéries aux ATB.....	24
8)- Les types de résistance.....	25
Chapitre II : Les bactéries du genre <i>Pseudomonas</i>.....	27
1)-Taxonomie et classification.....	27
2)-Habitat.....	31
3)-Caractères généraux des <i>Pseudomonas</i> sp.....	32
3)-1 Caractères morphologiques.....	32
3)-2 Caractères cultureux.....	32
3)-3 Caractères métaboliques.....	33
3)-4 Caractères génomiques.....	33

4)-Les <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents.....	34
5)-Métabolites secondaires et facteurs extracellulaires secrétés chez les rhizobactéries du genre <i>Pseudomonas</i> sp.....	36
5)-1. Les antibiotiques.....	37
5)-1.1. Phénazines.....	37
5)-1.2. Pyolutéorine (PLN).....	38
5)-1.3. Pyrrolnitrine (PRN).....	38
5)-1.4. Le 2,4 diacétylphloroglucinol (DAPG).....	39
5)-1.5. Rhamnolipides.....	39
5)-1.6. Mupirocine.....	40
5)-2. Les sidérophores.....	41
5)-2.1 Pyoverdines.....	42
5)-2.2 Pyochélines.....	42
5)-2.3 Autres types des sidérophores produits par les <i>Pseudomonas</i> sp fluorescents.....	43
5)-3. Les composées volatiles « Cyanure d'Hydrogène (HCN) »	44
5)-4. Autres substances inhibitrices produites par les <i>Pseudomonas</i> sp fluorescents.....	45
6)- Régulation de la synthèse des substances antimicrobiennes chez les <i>Pseudomonas</i> sp.....	45
6)-1. Signalisation intercellulaire (SI).....	45
6)-1.1 Une nouvelle communication extracellulaire.....	47
6)-2. Le système à deux composantes GacA / GacS.....	47

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes.....	51
1. Matériel.....	51
1.1. Matériel biologique.....	51
1.2. Milieux de culture.....	51
2. Méthodes.....	52
2.1. Etude, recherche et identification des souches de Staphylocoques.....	52
2.1.1. Isolement des Staphylocoques.....	52
2.1.2. Purification des Staphylocoques	52
2.1.3. Identification des isolats de Staphylocoques purifiées.....	52
2.1.3.1. Examen macroscopique des Staphylocoques.....	52
2.1.3.2. Examen microscopique des Staphylocoques.....	53
2.1.3.3. Recherche de la catalase.....	54
2.1.3.4. Recherche de l'oxydase.....	54
2.1.3.5. Recherche de la coagulase.....	55
2.1.3.6. Identification biochimique classique des souches de Staphylocoques.....	56
2.1.3.7. Identification confirmative de l'isolat de Staphylocoque par galerie API Staph.....	58
2.1.4. Conservation des souches.....	59
2.2. Etude, recherche et identification des <i>Pseudomonas</i>	59
2.2.1. Echantillonnage.....	59
2.2.2. Isolement des souches de <i>Pseudomonas</i>	60
2.2.3. Purification des isolats des <i>Pseudomonas</i> fluorescents.....	60

2.2.4. Identification présumptive des isolats purs des <i>Pseudomonas</i> fluorescents suspects.....	60
2.2.4.1. Etude morphologique.....	60
2.2.4.2. Test de T.S.I.....	61
2.2.4.3. Recherche de cytochrome oxydase.....	61
2.2.4.4. Recherche de la catalase.....	61
2.2.4.5. Test de la croissance à 4°C et à 42°C.....	61
2.2.5. Mise en évidence du pouvoir antagoniste des souches de <i>Pseudomonas</i> suspectes vis-à-vis les Staphylocoques.....	62
2.2.6. Identification des souches de <i>Pseudomonas</i> antagonistes.....	62
2.2.6.1. Etude microscopique.....	62
2.2.6.2. Etude biochimique classique.....	63
➤ Recherche de nitrate réductase.....	63
➤ Recherche de l'uréase et de la production d'indole.....	63
➤ Test de fermentation du mannitol et de mobilité.....	63
➤ Test d'utilisation du citrate.....	63
➤ Test de VP / RM.....	63
➤ Test de fermentation du lactose et de la production de gaz.....	64
➤ Test d'utilisation d'arabinose.....	64
➤ Test de la lécithinase.....	64
➤ Test de la gélatinase.....	65
➤ II.2.7. Conservation des souches de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes.....	65
2.2.8. Production et extraction des métabolites à partir des souches de <i>Pseudomonas</i> antagoniste.....	66
2.2.8.1. Production et extraction des pyoverdines.....	66
2.2.9. Caractérisation des extraits bactériens.....	68
2.2.9.1. Identification des pyoverdines par spectrophotométrie UV – Visible.....	68

Chapitre II : Résultats & Discussion.....	70
1. Etude, recherche et identification des souches de Staphylocoques.....	70
1.1. Identification des isolats de Staphylocoques purifiées.....	70
1.1.1. Examen macroscopique des Staphylocoques.....	70
1.1.2. Examen microscopique des Staphylocoques.....	71
1.1.3. Recherche de la catalase et de l'oxydase.....	71
1.1.4. Recherche de la coagulase.....	72
1.1.5. Identification biochimique classique des souches de Staphylocoques.....	73
1.1.5.1. Fermentation des sucres et production de gaz sur milieu T.S.I.....	73
1.1.5.2. Test de la fermentation du mannitol et la mise en évidence de la mobilité.....	73
1.1.5.3. Test de nitrate réductase.....	74
1.1.6. Identification confirmative de l'isolat de Staphylocoque par galerie API Staph.....	75
2. Etude, recherche et identification des <i>Pseudomonas</i> spp fluorescents.....	77
2.1. Isolement et purification des <i>Pseudomonas</i> fluorescents.....	77
2.2. Identification présomptive des isolats purifiés de <i>Pseudomonas</i> fluorescents.....	78
2.2.1. Etude morphologique.....	78
2.2.2. Test de Fermentation des sucres et production de gaz sur milieu T.S.I.....	79
2.2.3. Test de cytochrome oxydase et de la catalase.....	79
2.2.4. Test de la croissance à 4°C et à 42°C.....	80
2.2.5. Mise en évidence du pouvoir antagoniste des <i>Pseudomonas</i> fluorescents vis-à-vis les souches de Staphylocoques.....	81
2.2.6. Caractérisation de l'espèce des isolats du genre <i>Pseudomonas</i> antagonistes.....	83
2.2.6.1. Etude microscopique.....	83

2.2.6.2. Etude biochimique.....	83
2.2.6.2.1. Recherche de nitrate réductase.....	84
2.2.6.2.2. Recherche de l'uréase et de la production d'indole.....	84
2.2.6.2.3. Test de fermentation du mannitol et la mise en évidence de la mobilité.....	85
2.2.6.2.4. Test d'utilisation du citrate.....	85
2.2.6.2.5. Test de VP / RM.....	86
2.2.6.2.6. Test de fermentation du lactose et de la production du gaz.....	86
2.2.6.2.7. Test d'utilisation d'arabinose.....	87
2.2.6.2.8. Test d'hydrolyse de la lécithine.....	87
2.2.6.2.9. Test d'hydrolyse de la gélatine.....	88
2.3. Extraction et détermination du spectre du surnageant.....	90
Conclusion et perspectives.....	92
Références bibliographiques.....	93

Annexes

Liste des abréviations

AHL : N-acyl-L-homoserine Lactone.

API Staph : Appareil et Procédés d'Identification des Staphylocoques.

ATB : Antibiotique.

HAQ : Hydroxy-Alkyl-Quinoline.

HCN : Cyanure d'Hydrogène.

HHQ : Hydroxy Heptyl Quinoline.

HSL : L-Homosérine Lactone.

IN : Infections Nosocomiales.

MMCRAMM : Microbioal Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules.

NGS : Next Generation Sequencing.

NR : Nitrate réductase.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

PLN : Pyolutéorine.

PQS : *Pseudomonas* Quinoloe Signal.

P : *Pseudomonas*.

PRN : Pyrrolnitrine.

QS : Quorum Sensing.

RM : Rouge de Méthyle.

S : *Staphylococcus*.

SARM : *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicillie.

SASM : *Staphylococcus aureus* sensible la méthicillie.

SCN : Staphylocoques à coagulase négative.

SCP : Staphylocoques à coagulase positives.

SI : Signalisation Intercellulaire.

UMAB : Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem

UV : Ultra violet.

VP : Vogues Prosqueur.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure 1	Dessin d'observation de cocci regroupés en amas à partir d'un abcès, réalisé par Alexander Ogston	5
Figure 2	Chronologie de la découverte des espèces appartenant au genre <i>Staphylococcus</i> . Les espèces à coagulase négative sont représentées en bleu; coagulase positive et les espèces à coagulase variable sont indiquées en rouge	8
Figure 3	Relations évolutives des espèces de staphylocoques basées sur la région ARNr 16S-23S.	11
Figure 4	Observation de <i>Staphylococcus aureus</i> après coloration de Gram	12
Figure 5	Etapes de formation du biofilm	18
Figure 6	Structures chimiques des bêta-lactamines	21
Figure 7	Structure de la vancomycine	22
Figure 8	Structure des fosfomycines	22
Figure 9	Structure générale des aminosides	22
Figure 10	Structure des fluoroquinolones	23
Figure 11	Structure des tétracyclines	23
Figure 12	Restructuration taxonomique du genre <i>Pseudomonas</i> « <i>Sensu lato</i> »	28
Figure 13	Arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences du gène de l'ADNr 16S	30
Figure 14	Coloration de Gram d'une souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
Figure 15	Croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur gélose Mac Conkey	33
Figure 16	Les principaux antibiotiques sécrétés par les <i>Pseudomonas</i> fluorescents	37
Figure 17	Composition chimique et structure moléculaire de la mupirocine	40
Figure 18	Structure moléculaire des pyoverdines	42
Figure 19	Structure moléculaire des pyochélines	43
Figure 20	Structure moléculaire d'HCN produits chez les <i>Pseudomonas</i> sp fluorescents	44
Figure 21	Schéma des systèmes de SI las et rhl de <i>P. aeruginosa</i>	46
Figure 22	Voie de régulation sous l'influence du système à deux composantes GacA / GacS chez <i>P. aeruginosa</i>	48
Figure 23	Organigramme de l'identification des Staphylocoques	53
Figure 24	Aspect de galerie biochimique API Staph inoculée avant incubation	59
Figure 25	Aspect des graminées sauvages	59
Figure 26	Schéma synthétique illustratif du processus d'extraction des pyoverdines	67
Figure 27	Aspect macroscopique des colonies des souches de Staphylocoques sur milieu Chapman	70
Figure 28	Observation microscopique des souches de Staphylocoques x100	71
Figure 29	Aspect du test de la catalase es souches de Staphylocoques	71
Figure 30	Aspect du test de l'oxydase chez les souches de Staphylocoques	72
Figure 31	Aspect du test de la coagulase chez les souches de Staphylocoques	72
Figure 32	Aspect du milieu T.S.I chez les souches de Staphylocoques après incubation	73
Figure 33	Aspect du milieu mannitol mobilité chez les souches de Staphylocoques	74
Figure 34	Aspect du bouillon nitraté chez les souches de Staphylocoques	74

Figure 35	Identification de la souche isolée par galerie API Staph	75
Figure 36	Répartition des isolats fluorescents dans les trois sites	77
Figure 37	Aspect macroscopique des isolats de <i>Pseudomonas</i>	78
Figure 38	Observation microscopique d'un des isolats des <i>Pseudomonas</i> fluorescents après coloration simple (x100)	78
Figure 39	Aspect du milieu TSI chez les souches de <i>Pseudomonas</i> suspectes	79
Figure 40	Résultats des tests d'oxydase et de la catalase chez les quatre souches suspectes	80
Figure 41	Résultats de la croissance des souches suspectes à 4°C	80
Figure 42	Résultats de l'activité antagoniste des <i>Pseudomonas</i> fluorescents vis-à-vis les souches de <i>S.aureus</i>	81
Figure 43	Observations microscopiques des isolats de <i>Pseudomonas</i> après coloration de Gram (x100)	83
Figure 44	Résultat du test de nitrate réductase chez les isolats de <i>Pseudomonas</i>	84
Figure 45	Résultats du test de l'uréase et d'indole chez les isolats de <i>Pseudomonas</i>	84
Figure 46	Aspect du milieu mannitol mobilité chez les isolats de <i>Pseudomonas</i>	85
Figure 47	Aspect du milieu citrate de Simmons chez les isolats de <i>Pseudomonas</i>	85
Figure 48	Résultats du test VP / RM chez les isolats de <i>Pseudomonas</i>	86
Figure 49	Aspect du milieu BCPL chez les isolats de <i>Pseudomonas</i>	86
Figure 50	Aspect du milieu Hugh Leifson chez les isolats de <i>Pseudomonas</i>	87
Figure 51	Résultats du test de la lécithinase chez les isolats de <i>Pseudomonas</i>	87
Figure 52	Résultats du test de la gélatinase chez les isolats de <i>Pseudomonas</i>	88
Figure 53	Spectre d'absorption de l'extrait bactérien	90

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Présentation des espèces du genre <i>Staphylococcus</i>	7
Tableau 2	Séparation phylogénétique des espèces et sous-espèces staphylococciques (ssp.), étendue par des caractéristiques diagnostiques clés comme proposé par Lamers <i>et al</i>	9
Tableau 3	Classification des Pseudomonaceae selon Palleroni et Doudoroff	28
Tableau 4	Autres types des sidérophores produits par les <i>Pseudomonas</i> fluorescents	43
Tableau 5	Résultats des tests biochimiques pour l'identification de l'isolat de Staphylocoques.	76
Tableau 6	distribution des isolats fluorescents dans les racines des graminées sauvages des trois régions.	77
Tableau 7	Distances des zones d'inhibition (mm) entre les souches de <i>Pseudomonas</i> antagonistes et <i>S.aureus</i> .	82
Tableau 8	Résultats de caractérisation biochimique des isolats de <i>Pseudomonas</i> antagonists.	89

Introduction

Introduction :

Les infections nosocomiales (IN) ont toujours occupées une place importante dans les différents services hospitaliers en raison de taux élevés de mortalités, de morbidité et des coûts d'hospitalisations dont elles sont responsables.

La plupart de ces infections sont causées par des bactéries pyogènes banales. (**Acar et al., 1989**).

Dès lors, la quête des substances anti-infectieuses est devenue un intérêt de santé publique. A partir d'une succession d'observation et de travaux de nombreux chercheurs dont Pasteur, Joubert, Duchesne puis Fleming, cette quête a abouti à la découverte des antibiotiques (ATB). Depuis, les ATB ont permis de réaliser des grandes avancées en thérapeutique et ont contribué à l'essor de la médecine moderne. (**Moroh, 2013**).

L'introduction et l'utilisation en clinique des premières classes de ces molécules ont considérablement réduit la mortalité imputable à des maladies autrefois incurables.

L'efficacité de l'antibiothérapie dans le contrôle et la limitation de dissémination des agents pathogènes a ainsi fait naître l'espoir de pouvoir éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses. Malheureusement, l'émergence de bactéries résistantes aux ATB a mis un terme à cette vague d'optimisme. (**El Amri., 2014**).

La résistance des bactéries aux ATB constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale. Chaque jour, de nouveaux mécanismes de résistance voient le jour et se propagent à l'échelle mondiale, compromettant la capacité de traiter les maladies infectieuses les plus courantes. (**Azmoun, 2016**).

Les espèces du genre *Staphylococcus* figurent parmi ces germes qui ont un fort pouvoir adaptatif et ont développé des différents mécanismes de résistance aux ATB (**Fernandez-Gerlinger et Mainardi, 2014**). Ces espèces sont impliquées dans diverses pathologies humaines et animales et constituent aussi un risque majeur dans les toxi-infections alimentaires. Elles possèdent un pouvoir de pathogénicité très varié, primordialement virulent, toxigénique et hémolytique ; comme elles acquièrent de multiples résistances aux ATB et une capacité à former des biofilms sur différentes surfaces biotiques (ex : cellules de la muqueuse) ou abiotiques (ex : biomatériaux).

L'aptitude des Staphylocoques à former des biofilms constitue un souci majeur en industries agro-alimentaires à cause de l'inefficacité des procédures de nettoyage et désinfection et la difficulté d'éradiquer ces bactéries des surfaces alimentaires ; aussi constitue un problème en médecine humaine et animale, parce que les matrices de biofilms constituent une barrière contre l'effet des

ATB et diminuent leur efficacité thérapeutique. Plusieurs études ont établies, les liens entre la pathogénicité des souches de Staphylocoques et la résistance aux ATB d'une part, le portage des gènes d'adhésion aux surfaces et le potentiel de formation de biofilm d'une autre part. (**Achek *et al.*, 2018**).

Ainsi, et à la lumière de la propagation de ce phénomène et du nombre limité d'ATB en cours de développement, la découverte de nouveaux agents antibactériens, est devenue plus qu'indispensable. (**Kitouni, 2007**).

Depuis une vingtaine d'années, un grand intérêt est porté envers les rhizobactéries du genre *Pseudomonas* à cause de leur capacité remarquable à inhiber la croissance des agents pathogènes. De plus, il a été démontré que la production d'ATB par différentes souches de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chlororapis* et *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* est directement liée à ce pouvoir inhibiteur. Pour certains de ces ATB comme le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), l'acide phénazine carboxylique (PCA), la pyrrolnitrine (PRN) et la pyoluteorine (PLT), les voies métaboliques menant à la synthèse de ces produits ont été caractérisées et les gènes codant pour les enzymes impliquées dans ces voies ont été séquencés. (**Mathieu, 2005**).

L'objectif du présent travail s'inscrit principalement dans la mise en évidence de l'action inhibitrice des substances actives produites par des souches de *Pseudomonas* fluorescentes isolées à partir des racines de plantes graminées vis-à-vis des souches de Staphylocoques.

Le plan de ce travail s'articule autour de trois axes fondamentaux :

- Identification morphologique, culturale et biochimique des souches de Staphylocoques cible.
- Etude et la mise en évidence de l'activité antagoniste des isolats de *Pseudomonas* fluorescents vis-à-vis les Staphylocoques.
- Caractérisation morphologiques, culturale, biochimiques et physiologiques des isolats de *Pseudomonas* présentant un pouvoir antagoniste.
- Un essai pour extraire cette substance antagoniste et connaître certaines de ses propriétés.

Revue bibliographique

Chapitre I :

Les germes du genre *Staphylococcus*

Chapitre I : Les germes du genre *Staphylococcus*.

Les Staphylocoques fut découvert par Louis Pasteur en 1880 : l'observation au microscope d'un pus de furoncle faisait apparaître des « amas de grains ». En 1881, un chirurgien écossais du nom Alexander Ogston isola de son côté la bactérie à partir d'un abcès post-opératoire et a donné à ces bactéries en associant les mots grecs « *Staphyle* », qui signifie « grappe de raisin », et « *kokkos* », qui signifie « graine » (Maali, 2019).

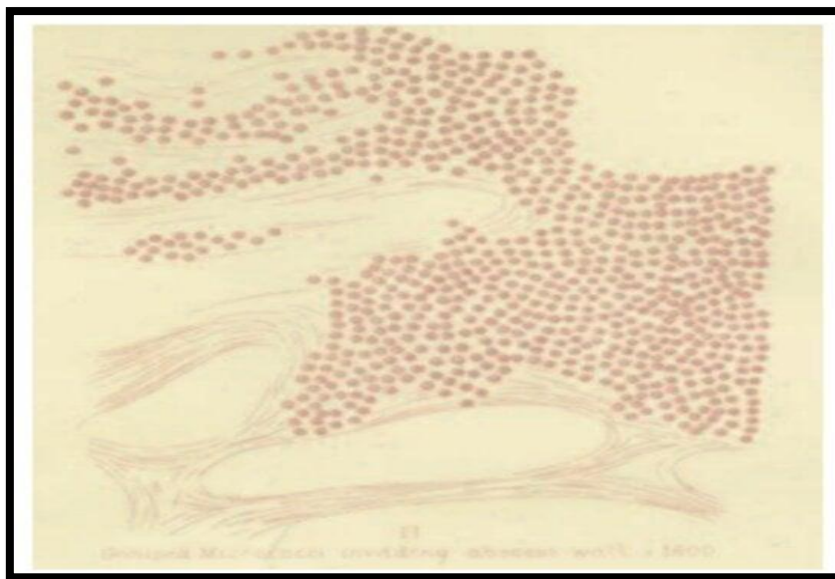


Figure 1 : Dessin d'observation de cocci regroupés en amas à partir d'un abcès, réalisé par Alexander Ogston en 1881 (Maali, 2019).

1)- Position taxonomique, classification et phylogénie des staphylocoques :

Les membres du genre *Staphylococcus* diffèrent de ceux de *Micrococcus* en étant des anaérobies facultatifs avec une teneur en G+C de 30 à 39 mol%, contenant des cytochromes a et b et des acides teichoïques dans leurs peptidoglycane avec des pentaglycine dans le pont interpeptidique. Etant sensible à la furazolidone et résistante à la bacitracine; la plupart des souches sont sensibles à la lysostaphine. Sur la base du test de coagulase, l'enzyme provoquant la coagulation du sérum humain et de lapin, le genre a été initialement divisé en l'espèce *S. aureus* à coagulase positive et les staphylocoques à coagulase négative (SCN). La détermination de l'activité de la coagulase reste le test le plus fréquemment utilisé pour le identification de *S. aureus* (Bascomb et Manafi, 1998).

Selon la classification de **Garrity et al (2007)** ; le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des Firmicutes constitué de quatre classes : *Clostridia*, *Mollicutes*, *Bacilli* et *Togobacteria*. La classe *Bacilli* est constituée de deux ordres : *Bacillales* et *Lactobacillales*, dont chacun est divisé en quatre familles ; les *Staphylococcaceae* constitue la quatrième famille des *Bacillales*, celle-ci comprend un seul genre : *Staphylococcus*.

Selon **Delarras (2007)**, il existe plusieurs types de classification du genre *Staphylococcus* dont la plus utilisée est la classification de Bergey comme montré dans le tableau suivant :

Domaine	Bacteria ou Eubacteria.
Classe	<i>Bacilli</i> .
Ordre	<i>Bacillales</i> .
Famille	<i>Staphylococcaceae</i> .
Genre	<i>Staphylococcus</i> .

Jusqu'à sa reclassification en 1974, comme noté dans le Manuel de Bergey de bactériologie déterminative. L'ère d'un nombre limité d'espèces staphylococciques est arrivée à une fin dans les années 1970, avec des descriptions de 10 espèces nouvellement identifiées (par exemple, *S. haemolyticus*, *S. hominis* et *S. intermedius*). Parmi les espèces retrouvées chez l'homme, trois espèces occupent une place privilégiée *S.aureus*, *S.epidermidis* et *S.saprophyticus*, les autres sont rarement impliqués en pathologie humaine. Le genre *Staphylococcus* est séparé en deux groupes sur la base de la présence de la coagulase (**Alomar, 2007**). D'après **Freney et al., 1999**, le groupe des Staphylocoques à coagulase négative (SCN) avec 33 espèces dont la majorité ne présente pas de risque sanitaire telle que :

S. xylophilus, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus sciuri* (**Morea et al., 1999 ; Blaiotta et al., 2004**). D'autres espèces telles que *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* sont impliquées dans les infections nosocomiales (**Freney et al., 1999**).

La taxonomie du genre *Staphylococcus* a subi plusieurs remaniements successifs grâce au développement du séquençage d'ARNr 16S. Selon **Alomar (2007)**, **Avril et al (2000)** et **Quinn et al (2011)** on distingue plus de quarante espèces de *Staphylococcus* dont 24 sous espèces comme il est indiqué dans le Tableau (1) (Un certain nombre d'entre elles sont trouvés chez l'homme, d'autres sont présentes chez les animaux ou dans les aliments (viandes, produits laitiers, etc...)).

Tableau 1 : Présentation des espèces du genre *Staphylococcus* (Kreig et Manual, 1984).

Espèces	présence en produits alimentaires	Risque ou intérêt
Staphylococcus à coagulase positive		
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	Lait, fromage, viande	Pathogène
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>		
<i>S. delphini</i>		
<i>S. hyicus</i> subsp. <i>chromogenes</i>		
<i>S. hyicus</i> subsp. <i>hyicus</i>		
<i>S. intermedius</i>		
<i>S. lutrae</i>		
<i>S. pseudointermidius</i>	Lait	
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>		
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>		
Staphylococcus coagulase négative		
<i>S. arlettae</i>	Lait	
<i>S. auricularis</i>	Lait, fromage, viande	
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	Lait, viande	
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	Lait	
<i>S. caprae</i>	Lait, viande	
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>	Saucisson, Mozzarella	Ferment
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>utilis</i>	Lait	
<i>S. caseolyticus</i>		
<i>S. chromogenes</i>		
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	Lait, fromage	
<i>S. colmiis</i> subsp. <i>urealyticus</i>		
<i>S. condimenti</i>		
<i>S. epidermidis</i>	Lait, fromage, Saucisson	Ferment
<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i>	Lait, fromage, Saucisson	
<i>S. equorum</i> subsp. <i>plinius</i>	Lait, fromage	
<i>S. felis</i>		
<i>S. fleurettii</i>	Lait, fromage	
<i>S. gallinarum</i>	fromage	
<i>S. haemolyticus</i>	Lait, viande	
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	Lait	
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>		
<i>S. kloosii</i>		
<i>S. lentus</i>	Lait, fromage	
<i>S. lugdunensis</i>	Lait	
<i>S. muscae</i>		
<i>S. nepalensis</i>		
<i>S. pasteurii</i>	Saucisson	
<i>S. piscifermentans</i>	Poisson	
<i>S. pulvereri</i>	Saucisson	
<i>S. saccharolyticus</i>		
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	Lait, fromage, Saucisson	
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>		
<i>S. sciuris</i> subsp. <i>sciuri</i>	Lait	
<i>S. sciuris</i> subsp. <i>caromaticus</i>	Lait, fromage	
<i>S. sciuris</i> subsp. <i>prodentium</i>		
<i>S. sciuris</i> subsp. <i>plentus</i>	Lait	
<i>S. simiae</i>		
<i>S. simulans</i>	Lait	
<i>S. succinus</i> subsp. <i>casei</i>		
<i>S. succinus</i> subsp. <i>succinus</i>	Saucisson	
<i>S. vitulinus</i>	Saucisson	
<i>S. warneri</i>	Lait, Saucisson	
<i>S. wylosus</i>	Lait, fromage, viande, saucisson	Ferment

Le groupe des *Staphylococcus* à coagulase positive (SCP) est constitué de sept espèces identifiées à *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus pseudointermidius*,

Staphylococcus schleiferi. Celle-ci peuvent être impliquées dans des infections humaines (Avril et al., 2000 ; Quinn et al., 2011). Outre les découvertes phylogénétiques et les classifications, un schéma simplifié mais plus utile et bien accepté, basé principalement sur les aspects cliniques et diagnostiques, est toujours utilisé en médecine humaine: les staphylocoques sont divisés en SCP, presque exclusivement représenté par *S. aureus*, et SCN (Figure 2) (Becker et al., 2014).

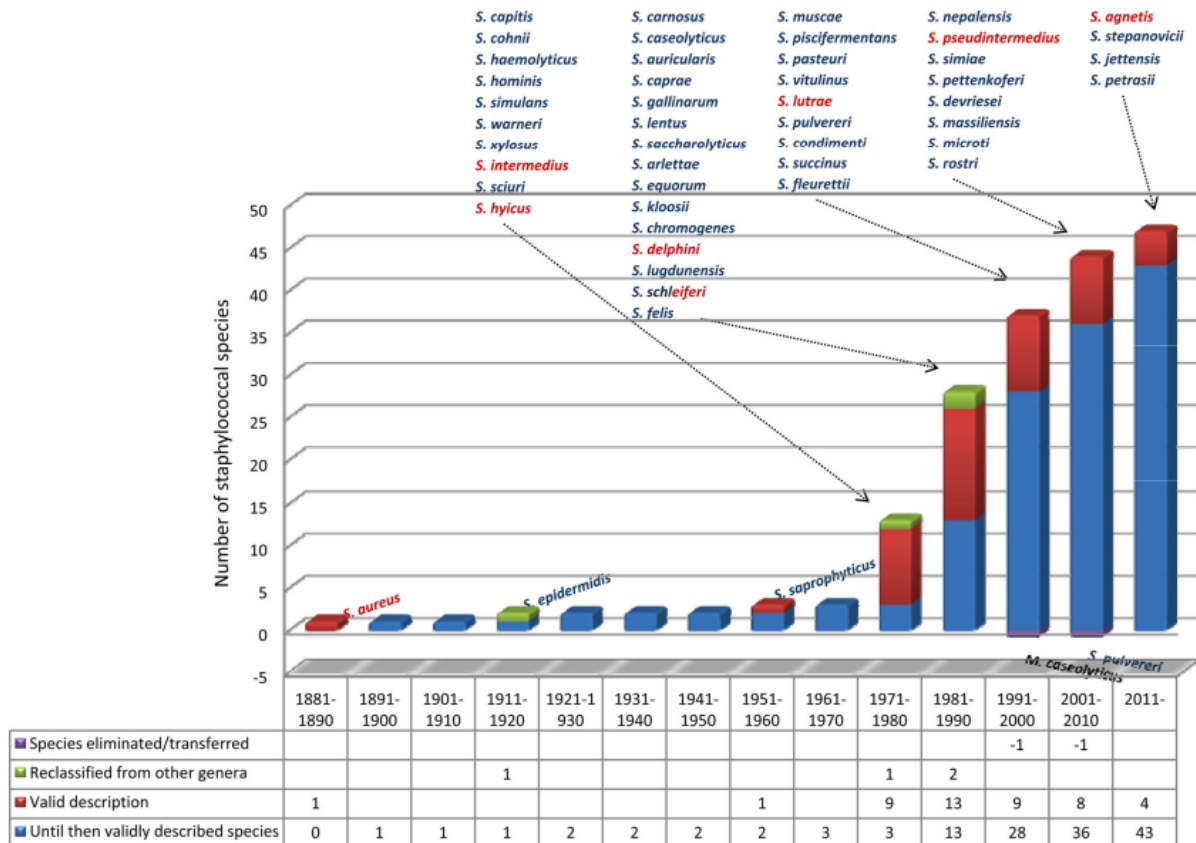


FIG 1 Time line of the discovery of the species belonging to the genus *Staphylococcus*. Coagulase-negative species are shown in blue; coagulase-positive and coagulase-variable species are shown in red (note that only *S. schleiferi* subsp. *coagulans* is coagulase positive). Note that at the times of establishment of the first three species designations, *S. aureus*, *S. epidermidis*, and *S. saprophyticus*, these terms comprised a broader content than that accepted today. In particular, *S. epidermidis* and *S. saprophyticus* were used to describe nonpathogenic, saprophytic staphylococci (and other Gram-positive cocci occurring in clusters).

Figure 2 : Chronologie de la découverte des espèces appartenant au genre *Staphylococcus*. Les espèces à coagulase négative sont représentées en bleu; coagulase positive et les espèces à coagulase variable sont indiquées en rouge (Becker et al., 2014).

En ce qui concerne les autres SCN, le « groupe de *S. epidermidis* », comprenant *S. epidermidis* et *S. haemolyticus* comme le plus espèces prédominantes, ainsi que d'autres espèces traditionnellement incluses (par exemple, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. simulans* et *S. warneri*), peuvent être se distingue de *S. saprophyticus* par le fait que ce dernier est un cause de l'urétrite aiguë. Cependant, *S. saprophyticus* peut également être trouvé comme agent pathogène causant des infections comme celles connues des membres du groupe

S. epidermidis. Certaines espèces de SCN des récemment découverts, telles que *S. pettenkoferi* et *S. massiliensis*, pourraient appartenir également à ce groupe. Notamment, les gradations dans la capacité pathogénique au sein de ce groupe hétérogène ne se produit pas seulement au niveau de l'espèce mais aussi au niveau de la souche.

Récemment, *S. lugdunensis* est de plus en plus connu comme une espèce SCN dans une position intermédiaire entre *S. aureus* et le groupe *S. epidermidis*, présentant les caractéristiques cliniques des deux groupes (Becker et al., 2014).

Sur la base des quatre locus, c'est-à-dire le gène codant ARNr16S et trois gènes codant pour les protéines (**dnaJ**, **rpoB** et **tuf**), Lamers et collaborateurs a récemment proposé une classification raffinée basée sur des données moléculaires pour le genre *Staphylococcus*, avec des espèces appartenant à des classes classifiées dans 15 groupes. Il a été démontré que ces groupes appartiennent à six groupes d'espèces (groupes d'espèces *Auricularis*, *Hycicus-Intermedius*, *Epidermidis-Aureus*, *Saprophyticus*, *Simulans* et *Sciuri*) en fonction des propriétés phénotypiques. La **tableau 2** montre la distribution d'espèces et des sous-espèces de Staphylococques dans ces groupes (Becker et al., 2014).

Tableau 2 : Séparation phylogénétique des espèces et sous-espèces staphylococciques (ssp.), étendue par des caractéristiques diagnostiques clés comme proposé par Lamers et al (Becker et al., 2014).

Oxidase	Negative							
Novobiocin	Susceptible							
Coagulase	Negative	Positive ¹ – variable ² – negative ³			Negative			
Species group	Hycicus-Intermedius			Epidermidis-Aureus				
Cluster group	Muscae	Hycicus	Intermedius	Aureus	Epidermidis	Warneri	Haemolyticus	Lugdunensis
Species	<i>S. muscae</i> <i>S. microti</i> <i>S. rostri</i>	<i>S. hycicus</i> ² <i>S. agnetis</i> ² <i>S. chromogenes</i> ³ <i>S. felis</i> ³	<i>S. intermedius</i> ¹ <i>S. delphini</i> ¹ <i>S. lutrae</i> ¹ <i>S. pseudintermedius</i> ¹ <i>S. schleiferi</i> <i>ssp. schleiferi</i> ³ <i>ssp. coagulans</i> ¹	<i>S. aureus</i> <i>ssp. aureus</i> ¹ <i>ssp. anaerobius</i> ¹ <i>S. simiae</i> ¹	<i>S. epidermidis</i> <i>S. capitis</i> <i>ssp. capitis</i> <i>ssp. urealyticus</i> <i>S. caprae</i> <i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. warneri</i> <i>S. pasteurii</i>	<i>S. haemolyticus</i> <i>S. devriesei</i> <i>S. hominis</i> <i>ssp. hominis</i> <i>ssp. novobiosepticus</i> <i>S. jettensis</i> <i>S. petrasii</i> <i>ssp. croceilyticus</i> <i>ssp. petrasii</i>	<i>S. lugdunensis</i>
Oxidase	Negative						Positive	
Novobiocin	Susceptible			Resistant				
Coagulase	Negative							
Species group	Auricularis	Simulans	Saprophyticus			Arlettae-Kloosii		Sciuri
Cluster group	Auricularis	Simulans-Carnosus	Pettenkoferi-Massiliensis	Saprophyticus	Cohnii-Nepalensis	Arlettae-Kloosii		Sciuri
Species	<i>S. auricularis</i>	<i>S. simulans</i> <i>S. carnosus</i> <i>ssp. carnosus</i> <i>ssp. utilis</i> <i>S. condimenti</i> <i>S. piscifermentans</i>	<i>S. pettenkoferi</i> <i>S. massiliensis</i>	<i>S. saprophyticus</i> <i>ssp. saprophyticus</i> <i>ssp. bovis</i> <i>S. equorum</i> <i>ssp. equorum</i> <i>ssp. linens</i> <i>S. gallinarum</i> <i>S. succinus</i> <i>ssp. succinus</i> <i>ssp. casei</i> <i>S. xylosum</i>	<i>S. cohnii</i> <i>ssp. cohnii</i> <i>ssp. urealyticus</i> <i>S. nepalensis</i>	<i>S. arlettae</i> <i>S. kloosii</i>		<i>S. sciuri</i> <i>ssp. sciuri</i> <i>ssp. carmaticus</i> <i>ssp. rodentium</i> <i>S. fleurettii</i> <i>S. lentus</i> <i>S. stepanovicii</i> <i>S. vitulinus</i>

Cependant, des changements dans les populations de patients, tels que l'augmentation du nombre de nouveau-nés prématurés, de patients âgés et immunodéprimés, et l'utilisation croissante de matériel prothétique étranger implanté et de cathéters à demeure ont conduit à une augmentation des infections documentées causées par SCN et SCP autres que *S. aureus* (**Kosecka-Strojek et al., 2019**).

Étant donné que la plupart des études rapportent que ces infections sont causées par les SCN et ne différencient pas les isolats au niveau de l'espèce, l'impact réel d'une seule espèce, en particulier les espèces moins fréquentes, est sous-déclaré. De plus, les espèces qui n'ont été découvertes que ces dernières années ne font pas partie des tests de diagnostic de routine pour identifier les espèces bactériennes. Une identification précise est hautement souhaitable (**Kosecka-Strojek et al., 2019**).

Dans les diagnostics de routine, des tests phénotypiques dépendant de la culture sont utilisés pour identifier les espèces bactériennes. Cependant, ces méthodes ne sont pas toujours suffisamment fiables en raison de l'expression variable des caractéristiques phénotypiques, et les bases de données sont limitées à quelques espèces seulement. Par conséquent, les méthodes génétiques basées sur la PCR ou le séquençage sont de bons candidats à des fins d'identification. La plupart de ces méthodes sont basées sur une amplification et un séquençage d'acide nucléique cible spécifique (**Kosecka-Strojek et al., 2019**).

Pour les échantillons poly-microbiens qui doivent être analysés à l'aide de tests indépendants de la culture, l'identification simultanée d'espèces de différents genres à l'aide d'une seule paire d'amorces est une approche utile. Comme le gène de l'ARNr 16S est universellement présent dans les bactéries, est hautement conservé et peut être facilement amplifié à l'aide d'amorces universelles, les analyses microbiennes sont souvent effectuées en utilisant le séquençage d'amplicon d'ARNr 16S. Bien que cette méthode soit largement utilisée et précise, le degré élevé de similitude entre les espèces étroitement apparentées a limité son utilité pour identifier plusieurs espèces de SCN ainsi que pour distinguer les espèces récemment établies du complexe *S.aureus* (**Kosecka-Strojek et al., 2019**).

Le séquençage de nouvelle génération (Next-Generation Sequencing) « NGS » a grandement amélioré les investigations génétiques microbiologiques en fournissant une méthode rentable pour caractériser les génomes bactériens. Les technologies NGS produisent des lectures avec une qualité de séquence élevée et un débit élevé.

Récemment, une méthode basée sur le NGS pour la région de l'ARNr 16S-23S a été développée par Sabat et ses collègues. Cette méthode est basée sur l'amplification par PCR de la région ARNr 16S-23S, suivie d'un séquençage d'amplicon.

Les lectures résultantes sont de novo assemblées en contigs. L'identification des espèces est basée sur l'alignement des séquences de contigs avec les séquences déposées dans les bases de données de référence.

En 2019, le genre *Staphylococcus* comprend plus de 50 espèces validement décrites et proposées, y compris les SCP et les SCN. De plus, une espèce SCN supplémentaire («*S.pseudolugdunensis*») a été suggérée (fig.2) (Kosecka-Strojek *et al.*, 2019).

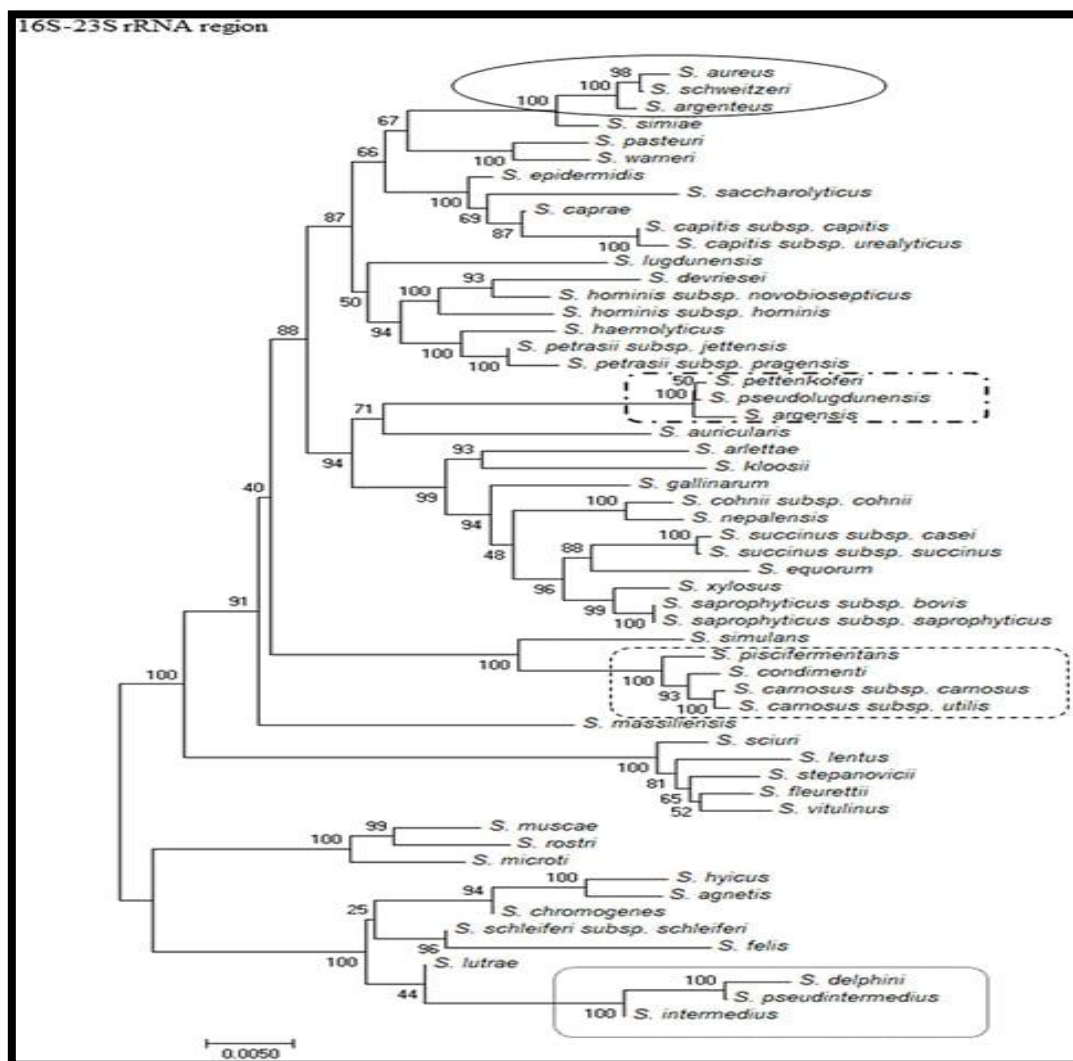


Figure 3 : Relations évolutives des espèces de staphylocoques basées sur la région ARNr 16S-23S. (Kosecka-Strojek *et al.*, 2019).

2)- Caractères bactériologiques :

2)-1. Caractères morphologiques :

Les Staphylocoques sont des coques à Gram positif de forme sphérique de 1µm de diamètre, immobiles, non sporulés, ne possédant pas de capsule visible au microscope optique sauf pour de très rares souches, d'autre forment des colonies mucoïde et sont entourés d'un pseudo capsule (Fauchere et Avril, 2002).

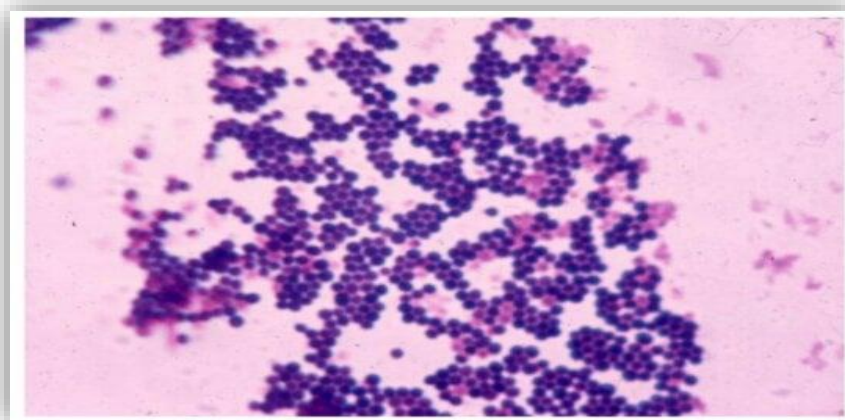


Figure 4 : Observation de *Staphylococcus aureus* après coloration de Gram (Howden *et al.*,2010).

-Sur les cultures en milieu solide, ils se disposent en amas irréguliers polyédriques, évoquant un aspect caractéristique de « grappe de raisin » (Ananthanarayan, 2006).

- Alors qu'en milieu liquide, ils sont souvent isolés, en diplocoques en tétrades ou en très courtes chainettes (en général de 3 à 5 éléments) (Le loir *et al.*, 2003).

2)-2. Caractères cultureux :

Peu exigeants sur le plan nutritif, les Staphylocoques sont anaérobies facultatifs (quelques souches exigent le CO₂ pour croître), et croissent bien sur les milieux usuels simples, de même que sur la plupart des milieux qui favorisent la croissance des bactéries à Gram positif. Certains facteurs de croissance sont indispensables (vitamines B1, acide nicotinique) mais ils n'exigent pas de biotine ni de tryptophane, ils poussent en milieu synthétique contenant des sels, du glucose et des acides aminés. La température optimale de croissance est de 37°C et le pH optimal est 7.5 mais de grandes variations sont tolérées (Couture, 1990).

-En bouillon : la culture est rapide en quelques heures un trouble homogène puis un dépôt sont observés, il n'y a pas de production de pigments en milieu liquide (Kloos et Veron, 1990 ; Chibi, 2015).

-En milieu de Chapman : particulièrement utilisé, il ne laisse croître au bout de 24 à 48 heures que les Staphylocoques, germes halophiles qui tolèrent des concentrations élevées de Na Cl jusqu'à 7.5%, ce milieu sélectif rendu différentiel par l'addition de Mannitol à 1% et d'un indicateur d'acidité, le rouge de phénol permet à la fois d'isoler les Staphylocoques à partir d'un prélèvement contenant un mélange de germes et oriente vers un *S.aureus* ou *S.epidermidis* (Kloos et Veron, 1990).

3)- Habitat et transmission :

Il s'agit des germes ubiquitaires, les Staphylocoques sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (Nagase *et al.*, 2002 ; Quinn *et al.*, 2011).

Adaptés à l'écosystème cutané, les Staphylocoques jouent un rôle important dans l'équilibre physico-chimique de la peau et constituent une barrière contre les bactéries de la flore transitoire. Adaptés à l'hôte et même co-évolués, les espèces Staphylococciques diffèrent sensiblement chez l'homme et chez l'animal. Ainsi, l'homme héberge majoritairement des espèces comme *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* (Wertheim *et al.*, 2005 ; Kleinschmidt *et al.*, 2015).

Ces espèces font parti de la flore résidente cutanée de nombreux individus qui sont des porteurs asymptomatiques. (Wylie et Nowicki, 2005).

L'habitat préférentiel de *S.aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale (Eveillard, 2007).

Une étude ayant porté sur le portage nasal des Staphylocoques des patients hospitalisés en service de chirurgie orthopédique et intensive a montré cette distribution : *S.epidermidis* (64.1%), suivi de *S.aureus* (13.4%), *S.haemolyticus* (10.1%), *S.captis* (3%), *S.warneri* (3%), *S.hominis* (2.4%), *S.lugduensis* (1.6%) (Trouillet *et al.*, 2015).

Toutefois, la distribution des différentes espèces sur le corps de l'homme dépend fortement du microenvironnement du site échantillonné (Byrd *et al.*, 2018).

Comme chez l'homme, les Staphylocoques retrouvés chez les animaux ont pour habitat principal la peau et les muqueuses. Néanmoins, les espèces de Staphylocoques hébergées chez les animaux ne sont pas tout le temps retrouvées chez l'homme (**Gotz et al, 2006**).

Parmi les Staphylocoques retrouvés chez les animaux, *S.intermedius* est isolé chez de nombreuses espèces. Ce Staphylocoque a comme hôte préférentiel, le chien, et c'est la principale bactérie isolée de la peau et des muqueuses de ces animaux. Chez le chat, *S.intermedius* n'est pas une bactérie fréquente mais elle peut être isolée des poils et plus rarement des muqueuses comme *S.intermedius*, *S.felis* peut être isolée chez le chien et le chat.

Cependant, chez le chat, cette espèce constitue le Staphylocoque le plus abondant et présente une des principales bactéries des flores cutanées et orales de ces animaux. *S.hyicus*, *S.chromogenes*, *S.sciuri*, *S.lentus* et *S.vitulussont*, quant à eux, des résidents communs des ongulés (bovins, caprins, équins...). De plus, les trois dernières espèces sont aussi des résidents communs des baleines et des mammifères aquatiques apparentés (**Gotz et al, 2006**).

Certains Staphylocoques humains se retrouvent également comme bactéries résidentes ou transitoires chez les animaux domestiques. Par exemple, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus* et *S.warneri* peuvent se retrouver occasionnellement sur les animaux domestiques mais ces bactéries sont probablement transférées à partir de leurs maîtres (**Gotz et al, 2006**).

Du fait de leur forte résistance à la dessiccation, la transmission interhumaine des Staphylocoques se fait par contact direct (essentiellement par transmission manuportée) mais aussi plus rarement par l'intermédiaires des objets ou des aliments (**Knox et al., 2015**).

4)- Pouvoir pathogène chez l'homme :

Le pouvoir pathogène se définit comme l'aptitude de ce germe (*Staphylococcus*) à provoquer des troubles dans un organisme, soit par virulence, soit par toxinogénèse, soit l'association de ces deux mécanismes (**Grunfeld, 1994**).

Les Staphylocoques sont responsables d'une pléthore de problèmes médicaux, comprenant les infections cutanées et des tissus mous, les infections des sites opératoires, ainsi que les endocardites et les septicémies acquises à l'hôpital. Un nombre croissant d'infections sont liées à l'évolution des pratiques médicales (utilisation des prothèses et de cathéters, ainsi que d'immunosuppresseurs) (**Klein et al., 2007 ; Biedenbach et Jones, 2009 ; Koksall et al., 2009 ; Otto, 2009 ; Morad Asaad et al., 2016**).

4)-1. Infections nosocomiales :

L'espèce de Staphylocoque à coagulase positive (SCP), *S.aureus*, est une cause majeure d'infections communautaires et nosocomiales (**Bannerman, 2007**). *S.aureus* est responsable d'un large éventail d'infections graves, avec des taux de morbidité et de mortalité pouvant atteindre 64% en fonction du site de l'infection. Ce pathogène est capable de produire une variété des toxines et de s'attacher solidement à un matériel prothétique par la production d'un glycocalyx (**Morad Asaad et al., 2016**).

Bien que les Staphylocoques constituent une composante de la microflore normale de l'homme, leur rôle dans les (IN) a été reconnu et bien documenté au cours des deux dernières décennies. L'augmentation des infections par ces organismes a été corrélée avec l'usage d'appareils médicaux et le nombre croissant de patients immunodéprimés en milieu hospitalier. Le processus infectieux peut résulter de l'introduction de Staphylocoques endogènes au-delà des barrières tégumentaires normales. Parmi ces espèces, *S.epidermidis* est la plus fréquemment rencontrée dans les infections cliniques chez l'homme, suivi par l'espèce *S.haemolyticus* (**Irlinger, 2008**).

4)-2. Infections cutané-muqueuses :

Les infections de la peau et des muqueuses causées par les Staphylocoques sont favorisées par des facteurs locaux ou généraux. Toute lésion, même minime du revêtement cutané (excoriations, traumatismes, blessures, brûlures, piqûres, incisions chirurgicales...) permet une colonisation des tissus par les souches de Staphylocoques provenant de la peau (**Koksal et al., 2009**). Il faut insister sur la gravité des infections dues aux Staphylocoques chez les sujets aux défenses immunitaires amoindries : immunodépression acquise (virale, chimiothérapie) ou congénitales, ou encore malades atteints d'affections chroniques (diabète, mucoviscidose, cancer, alcoolisme, insuffisance rénale chronique).

S.aureus est la principale espèce de Staphylocoques impliquée dans les infections cutané-muqueuses. Les infections cutanées à *S.aureus* sont des folliculites, des furoncles et des impétigos (surtout chez l'enfant). *S.aureus* est aussi responsable d'infection des muqueuses, telles que les conjonctivites, les infections génitales (salpingites) et les infections des voies aériennes supérieures (sinusites, mastoidites, infections pulmonaires) (**Gotz et al., 2006**).

4)-3. Infections systémiques :

4)-3.1. Septicémies :

Les septicémies sont la conséquence de la dissémination des germes à partir d'un foyer localisé et peuvent survenir chez les personnes non immunodéprimées. Les septicémies sont favorisées par des traumatismes locaux, des corps étrangers (cathéters, sondes, interventions chirurgicales, brûlures étendues, traumatismes vasculaires répétés). Parmi les septicémies occasionnées par les Staphylocoques, deux tiers des cas présentent une infection sous-jacente (diabète, insuffisance rénale chronique, leucose, cancer, hépatite chronique, immunodépression) (Casey *et al.*, 2007).

La septicémie à *S.aureus* est le fléau majeur des soins médicaux modernes. Autours des deux tiers des cas sont reliés aux (IN), la plupart d'entre elles sont associées à l'usage de matériel intraveineux. Un des plus grands défis qui se posent dans les soins aux personnes atteintes par *S.aureus* est de déterminer si la maladie est associée à une dissémination bactérienne impliquant un ou plusieurs sites distants. Les sites les plus communs d'infections profondes comportent les os, les jointures et les valves cardiaques (Bannerman, 2007).

Au cours des dernières décennies, l'implication des (SCN) comme cause de septicémie a augmenté. Cela coïncide avec les progrès de la pratique médicale, comme l'utilisation accrue des dispositifs médicaux cathéters vasculaires, prothèses articulaires, greffes vasculaires, prothèses valvulaires cardiaques et cathéters péritonéaux), ainsi qu'avec le nombre croissant de patients immunodéprimés (Ruhe *et al.*, 2004).

Les principales espèces de (SCN), impliquées dans les septicémies, sont *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.hominis* et *S.lugdunensis* (Ruhe *et al.*, 2004 ; Gotz *et al.*, 2006 ; Bannerman, 2007).

4)-3.2. Endocardites :

Les (SCN) sont maintenant reconnus comme étant des agents pathogéniques responsables des endocardites sur les prothèses valvulaires et sur les valves natives (Casey *et al.*, 2007 ; Piette et Verschragen, 2009).

Parmi les espèces de Staphylocoques, *S.lugdunensis* a été rapporté comme une cause importante d'endocardites. La nature agressive de l'endocardite par *S.lugdunensis*, comme le reflète la nécessité fréquente d'un remplacement valvulaire et le haut taux de mortalité, indique que

l'identification rapide de cette espèce est nécessaire (Freney *et al.*, 1988 ; Hajek *et al.*, 1996 ; Ebright *et al.*, 2004 ; Bannermen, 2007).

S.aureus est également une cause notable d'endocardite à la fois sur les valves natives et prothétiques. Les taux d'endocardites par *S.aureus* ont augmenté, durant les dernières années, avec l'usage de cathéters intraveineux. Comme les septicémies, les endocardites Staphylococciques sont graves (Casey *et al.*, 2007).

4)-4. Adhésion des Staphylocoques et formation des biofilms :

4)-4.1. Stapylocoques et biofilms :

Les bactéries du genre *Staphylococcus* ont une aptitude à former des « biofilms » adhérant à des surfaces très diverses, avec une implication directe en pathologie humaine. Actuellement, il est considéré qu'environ 70% des infections chroniques sont en lien avec la formation de biofilm, tous genres ou espèces confondues (Bergon, 2016).

4)-4.2. Etapes de formation du biofilm :

La formation du biofilm est un processus en plusieurs étapes qui nécessite l'adhésion des bactéries à une surface, suivie de la croissance des cellules bactériennes et la création d'un premier consortium appelé « microcolonie », pour aboutir à un film multicouches où les cellules sont engluées dans le « slime », qui progressivement va recouvrir la surface qui sera colonisée (Von Eiff *et al.*, 1999).

Les biofilms peuvent se former sur des surfaces abiotiques comme des dispositifs médicaux implantés, ou sur des surfaces biotiques pouvant être des tissus de l'hôte, ou des dispositifs médicaux ayant été recouverts de protéines de la matrice extracellulaire par contact avec le plasma sanguin. Généralement, le biofilm est décrit comme un processus cyclique en trois étapes principales : l'adhésion, la prolifération/ maturation et le détachement (dispersion) (MAALI, 2019).

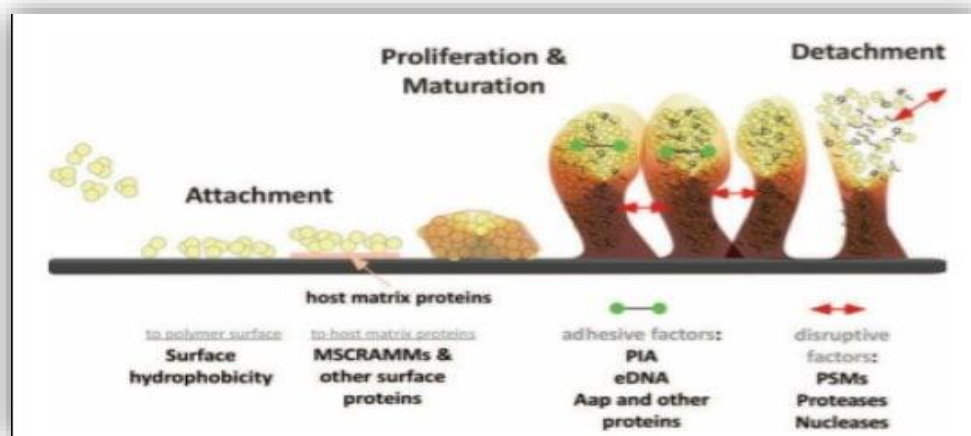


Figure 5 : Etapes de formation du biofilm. D'après (Otto, 2018).

4)-4.3. Mécanisme de formation d'un biofilm Staphylococcique :

5)-4.3.1. Adhésion :

a. Adhésion aux surfaces abiotiques :

L'adhérence des microorganismes aux biomatériaux dépend la nature de ces derniers et des caractéristiques de la surface cellulaire. Les interactions initiales surviennent par l'intermédiaire de forces physico-chimiques non spécifiques telles que les interactions électrostatiques, les forces de Van Der Walls, les interactions hydrophobes et les interactions acide-base (interactions de Lewis) (Speranza *et al.*, 2004 ; Garrett *et al.*, 2008).

La colonisation des surfaces abiotiques par les Staphylocoques dépend de la charge de ses acides téicoïques (Gross *et al.*, 2001). L'attachement initial sur une surface abiotique est aussi attribué aux protéines de surface. C'est le cas de « Bap » (biofilm-associated protein) (Cucarella *et al.*, 2001) et de la protéine A (Henry-Stanley *et al.*, 2011).

b. Attachement aux surfaces biotiques :

Dans le corps humain, la formation du biofilm est initiée par l'attachement irréversible des adhésines des cellules bactériennes aux protéines de la matrice extracellulaire. Chez *S.aureus*, l'adhérence est médiée par les adhésines protéiques de surface de la famille de MSCRAMM qui ont la capacité de se fixer aux différentes protéines du plasma ou de la matrice extracellulaire telles que le fibrinogène ou la fibronectine (Foster et Hook, 1998). Après leur implantation, les biomatériaux (cathéters, prothèses orthopédiques, sondes urinaires, valves cardiaques...) sont aussitôt couverts par les protéines de la matrice extracellulaire ou du plasma. Les interactions spécifiques entre les

protéines de l'hôte et les MSCRAMMs sont alors très importantes pour l'établissement d'une colonisation bactérienne (Otto, 2008).

4)-4.3.2. Multiplication des bactéries et maturation du biofilm :

Après l'attachement à la surface, les bactéries vont se multiplier et s'accumuler. Cette phase est caractérisée par l'agrégation intercellulaire pouvant s'accomplir par une variété de molécules telles que les protéines d'adhésion ou le plus souvent par les exopolymères polysaccharidiques, et la structuration conduisant à l'obtention d'une communauté mature, multicouche sous forme de champignon, et contenant des canaux qui permettent le passage des nutriments pour les bactéries présentes à l'intérieur du biofilm (Otto, 2008).

4)-4.3.3. Détachement du biofilm :

La dispersion du biofilm joue un rôle très important dans les infections associées aux biofilms. C'est le cas des infections métastatiques telles que les ostéomyélites et les abcès, les complications d'embolies d'une endocardite provoquée par le détachement d'un biofilm des valves (Von Eiff *et al.*, 2005 ; Boles et Horswill, 2011b). Le principale mécanisme de détachement du biofilm utilisé par *Staphylococcus* est la production d'enzymes extracellulaires ou des surfactants qui dégradent et solubilisent les différents composants de la matrice du biofilm. Ainsi, les principaux facteurs de détachement sont les protéases, les DNases et les surfactants PSM (Phenol-soluble modulins) (Boles et Horswill, 2011a ; McDougald *et al.*, 2012).

4)-5. Toxi-infections alimentaires :

Les toxi-infections alimentaires dues aux Staphylocoques résultent de l'ingestion d'entérotoxines Staphylococciques à partir d'aliments contaminés (produits laitiers, viandes).

La contamination de l'aliment est presque exclusivement due à une mauvaise manipulation de l'aliment par des porteurs sains ne respectant pas les exigences d'hygiène. L'intoxication est caractérisée par une incubation courte (1 à 6 heures après ingestion), des crampes abdominales douloureuses, des diarrhées, des vomissements et l'absence de fièvre. L'évolution est le plus souvent favorable en l'absence de traitement mais la survenue du choc Staphylococcique est possible lors d'une intoxication massive (Gotz *et al.*, 2006).

S.aureus a été confirmé comme étant l'agent causal dans de nombreux cas de toxi-infections graves. En fonction des études, les intoxications alimentaires à *S.aureus* représentaient 15 à 30% des toxi-

infections alimentaires. Sa présence dans les aliments est donc une préoccupation majeure (**Gotz et al., 2006**).

5)- Les antibiotiques anti-Staphylococciques habituels :

Différentes familles d'ATB peuvent être utilisées contre *Staphylococcus aureus*.

Une antibiothérapie probabiliste est mise en place puis adaptées en fonction des résultats de l'antibiogramme. Le choix de l'antibiotique dépend de la localisation de l'infection et des caractéristiques cliniques du patient. Les deux principales familles utilisées pour le traitement des infections à *S.aureus* sont les B-lactamines et les glycopeptides. Elles ciblent toutes deux la synthèse de la paroi bactérienne. D'autres familles d'ATB peuvent également être utilisées (**Roch, 2015**).

5)-1. Bêta-lactamines :

Les Bêta-lactamines sont des ATB bactéricides. Elles agissent par inhibition de la synthèse du peptidoglycane. Différentes générations ont été développées leur conférant des spécificités pharmacocinétiques et dans leur spectre d'activité.

Les pénicillines G et aminopénicillines (amoxicilline, ampicilline) ne sont pas utilisées pour le traitement des infections à Staphylocoque doré en raison de la résistance de la quasi-totalité des souches en circulation.

Les pénicillines du groupe M (oxacilline et cloxacilline) sont les ATB de choix des infections à *S.aureus* sensible à la méticilline (SASM). Il s'agit des ATB ayant la meilleure efficacité clinique pour les infections graves à SASM.

D'autres B-lactamines présentent une assez bonne efficacité contre les SASM :

Aminopénicillines ou uréidopénicillines en association avec des inhibiteurs de B-lactamases (ex : amoxicilline/acide clavulanique ; pipéracilline/tazobactam), les céphalosporines (céfazoline, céfuroxime et céfoxitine), et les carbapénèmes...

Ces ATB ne sont pas actifs en cas de souches de *S.aureus* résistantes à la méticilline (SARM) (**Saravolatz et al., 2011**).

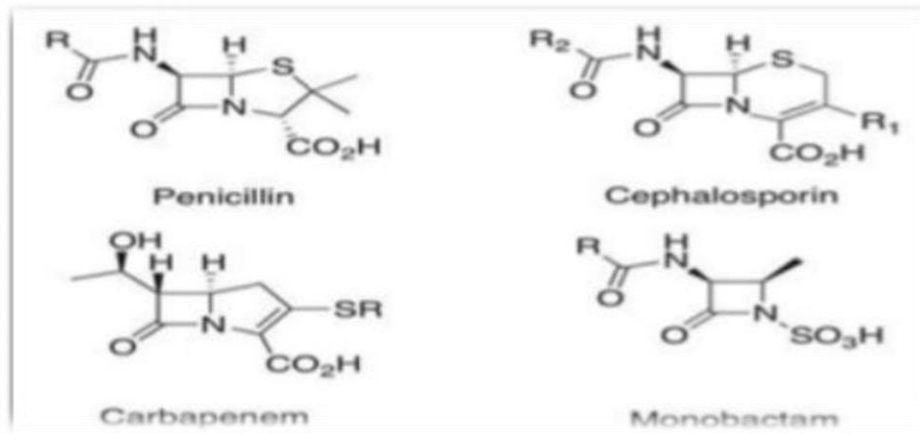


Figure 6 : Structures chimiques des bêta-lactamines (Chevrier, 2019).

5)-2. Glycopeptides :

Les glycopeptides sont des ATB à activité bactéricide lente qui inhibe la synthèse de la paroi.

Les deux molécules de cette famille sont la vancomycine et la téicoplanine. La vancomycine est le traitement de choix des infections à SARM et ce malgré sa toxicité rénale et auditive.

La vancomycine ne doit pas être utilisées pour les SARM, sauf en cas d'allergies aux bêta-lactamines, car son efficacité est plus faible (Gonzalez *et al.*, 1999). La téicoplanine est relativement semblable à la vancomycine avec pour principale différence une demi-vie plus longue et une moindre toxicité rénale de la téicoplanine (Roch, 2015).

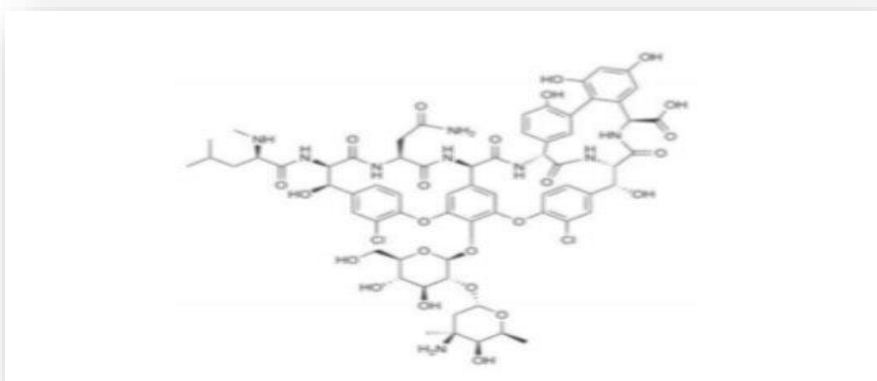


Figure 7 : Structure de la vancomycine (Rubinstein et Keynan, 2014).

5)-3. Fosfomycines :

La fosfomycine est un ATB bactéricide qui inhibe la synthèse des précurseurs de la paroi bactérienne. Compte-tenu de l'apparition rapide de résistances, il est nécessaire de l'utiliser en association avec un autre ATB dont la diffusion est aussi bonne que celle de la fosfomycine (**Roch, 2015**).

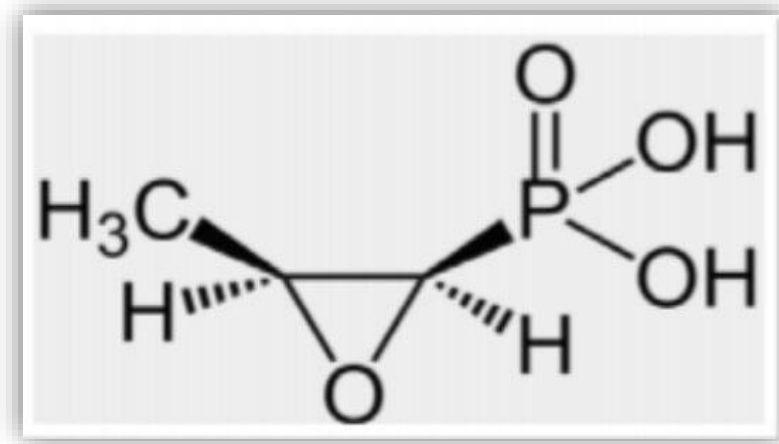


Figure 8 : Structure des fosfomycines (**Brahimi, 2013**).

5)-4. Aminosides :

Les aminosides sont des ATB bactéricides qui se fixent à la sous-unité 30S du ribosome bactérien induisant des erreurs de traduction et donc la synthèse de protéines aberrantes (**Mingeot-Leclercq et al., 1999**). Ils sont utilisés en association avec les bêta-lactamines ou la vancomycine dans les infections graves (**Roch, 2015**).

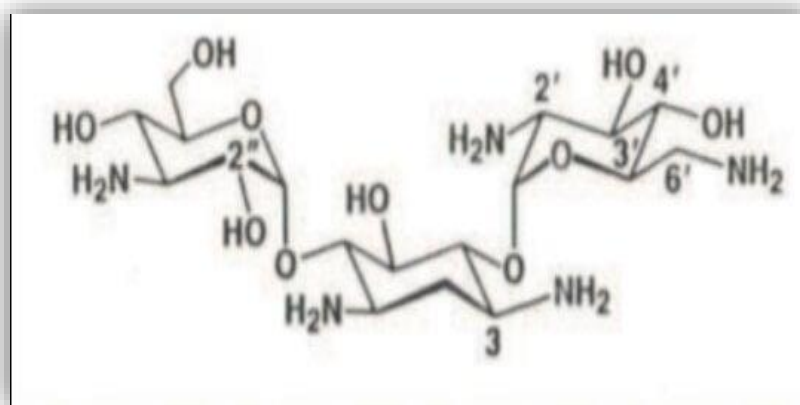


Figure 9 : Structure générale des aminosides (**Labbouz et Benameur, 2006**).

5)-5. Fluoroquinolones :

Les fluoroquinolones ciblent l'ADN gyrase bactérienne empêchant ainsi la réplication de l'ADN. Elles possèdent par rapport aux quinolones de première génération, un spectre élargi aux bactéries à Gram positif ce qui leur permet d'être utilisées dans les infections à Staphylocoques. Cependant, les SARM étant souvent résistants, elles ne doivent donc pas être utilisées en traitement probabiliste (Gade et Qazi, 2013).

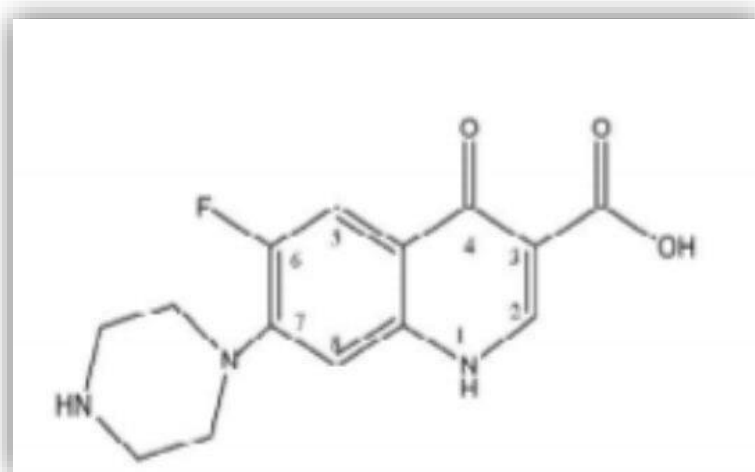


Figure 10 : Structure des fluoroquinolones (Victoria-Samanidou, 2008).

5)-6. Tétracyclines :

Les tétracyclines comme la doxycycline peuvent être utilisées dans le traitement des infections de la peau et des tissus mous à *S.aureus* (Liu *et al.*, 2011) mais les données ne sont pas suffisantes concernant le traitement des infections graves (Roch, 2015).

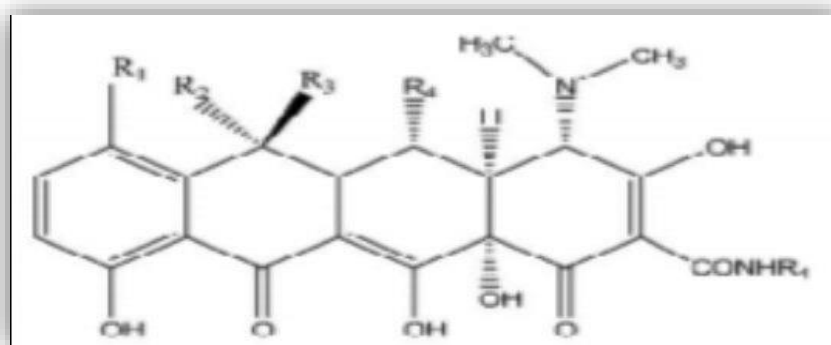


Figure 11 : Structure des tétracyclines (Victoria, 2008).

6)- Résistance de *S.aureus* aux agents anti-infectieux :

S.aureus est une des bactéries qui soulèvent le plus d'inquiétudes dans le contexte actuel d'émergence de bactéries multi-résistantes. Au cours du dernier siècle, *S.aureus* a montré de grandes capacités d'adaptation à son environnement en développant au fil du temps des stratégies vis-à-vis de la quasi-totalité des ATB commercialisés (bêta-lactamines et glycopeptides en particulier). La multiplicité des infections qu'elle provoque, associée aux résistances qui rendent le traitement compliqué en font une bactérie particulièrement redoutée dans le cadre des IN et de plus en plus dans le cadre des infections communautaires (**Roch, 2015**).

7)- Mécanismes généraux de résistance des bactéries aux ATB :

Les Staphylocoques ont développés des différentes stratégies pour contrecarrer l'action des ATB.

Quatre mécanismes de résistance sont connus :

- Production d'enzymes (e.g : B-lactamase) capables d'hydrolyser les composés

B-lactamines ou de modifier les aminoglycosides (par transfert des groupes chimiques) ce qui inactive les ATB et les rend inoffensifs vis-à-vis de leur cible (B-lactamines, aminosides, fosfomicines...).

- Modification de la perméabilité, bloquant ainsi l'influx des antimicrobiens et empêchant l'accès de l'ATB à sa cible.
- Augmentation de l'efflux des ATB par pompes à efflux (e.g : tétracyclines, fluoroquinolones...)
- Substitution ou modification des cibles des ATB (e.g : fluoroquinolones, méthiciline, glycopeptides...) (**Dembélé, 2005**).

8)- Les types de résistance :

Il existe chez les bactéries deux types de résistance : naturelle et acquise.

- ✓ La résistance naturelle est programmée sur le génome bactérien, donc fixe constante à l'intérieur du taxon. A ce titre, elle constitue un critère d'identification. Cette résistance est connue dès la découverte des ATB.
- ✓ La résistance acquise est consécutive à une mutation ou à l'acquisition d'un déterminant génétique comme un plasmide, un phage un transposon ou un intégron. Elle constitue un marqueur épidémiologique car varie dans le temps et dans l'espace et ne concerne que quelques souches d'une même espèce (**Dembélé, 2005**).

Chapitre II :
Les bactéries du genre *Pseudomonas*

Chapitre II : Les bactéries du genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* fait partie de la famille des Pseudomonadaceae qui contient des membres plutôt disparates et ubiquitaires. Ceux-ci sont reconnus pour leur diversité métabolique ainsi que leur caractère bioactif et leur capacité à coloniser agressivement un milieu (Aberoumand, 2010).

Ce genre est composé de bactéries à Gram négatif, en forme de bacilles avec un ou des flagelles polaires. Quelques espèces du genre sont phytopathogènes ou pathogènes d'animaux d'autres espèces sont des pourrisseurs de denrées alimentaires, Ce genre contient également d'autres espèces sont bénéfiques utilisées dans de biocontrôle des germes pathogènes, dans la biorestauration et comme PGPR (Vincent, 2013).

1) Taxonomie et classification :

Le genre *Pseudomonas* « *stricto sensu* » appartient au phylum des Protéobactéries, à la classe des Gammaprotéobactéries, l'ordre des *Pseudomonadales*, et la famille des *Pseudomonadaceae* (Tournus, 2016).

Le genre *Pseudomonas* est décrit par Migula en 1894 et inclut de nombreux bacilles à Gram négatif non fermentant, aérobies stricts à flagellation polaire (Anzai *et al.*, 2000).

En 1895, Migula y inclut *Pseudomonas pyocyanea*, espèce type du genre. Cette espèce est maintenant appelée *Pseudomonas aeruginosa* (Scales *et al.*, 2014).

En 1984, Palleroni subdivise le genre *Pseudomonas* en 5 groupes (I à V) sur la base de l'hybridation ADN-ARN (Figure 01) (Anzai *et al.*, 2000 ; Palleroni, 2010 ; Tournus, 2016).

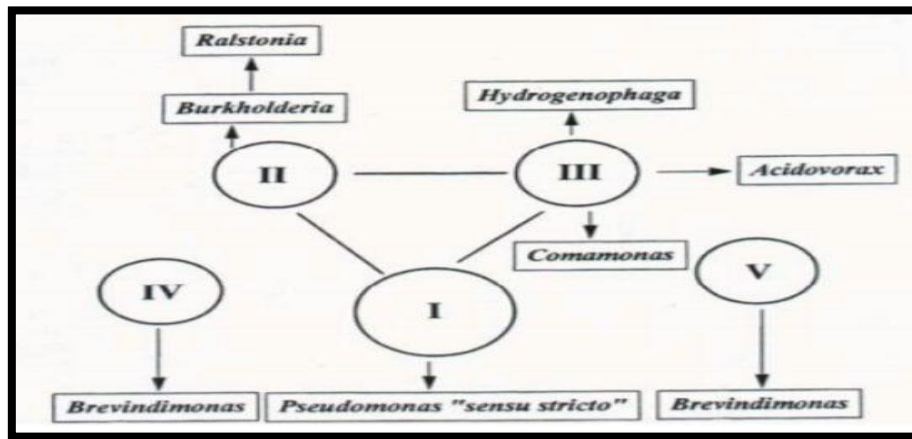


Figure 12 : Restructuration taxonomique du genre *Pseudomonas* « *Sensu lato* »

(Meghdas *et al.*, 2003).

Puis, entre 1984 et 2000, les espèces des groupes II à V sont transférées dans d’autres genres (Tableau 3). Le genre *Pseudomonas* est alors restreint aux espèces du groupe ARN de type I (Tableau 3) (Anzai *et al.*, 2000 ; Palleroni, 2010 ; TOURNUS, 2016).

Tableau 3 : Classification des Pseudomonaceae selon Palleroni et Doudoroff

(Brenner *et al.*, 2005 ; Palleroni, 2010).

Groupe d'ARN	Genres
Groupe I	<i>Pseudomonas stricto sensu</i>
Groupe II	<i>Burkholderia, Pandoraea, Ralstonia</i>
Groupe III	<i>Acidovorax, Comamonas, Delftia</i>
Groupe IV	<i>Brevundimonas</i>
Groupe V	<i>Stenotrophomonas</i>

Le Bergey's Manual retenait 29 espèces dont 13 d'intérêt médical dans l'édition 1974, puis 30 espèces principales dans l'édition de 1984. En 1998, 118 espèces sont décrites dans le genre *Pseudomonas*, alors qu'en 2016, 231 espèces sont intégrées dans le genre (Tournus, 2016).

C'est donc un genre en constante évolution. Des espèces quittent le genre *Pseudomonas* pour être affiliées à un autre et de nouvelles espèces sont décrites au sein du genre grâce à l'avancée des méthodes d'identification. L'arbre phylogénétique construit à partir des séquences partielles de l'ADNr 16S regroupe les principales espèces du genre *Pseudomonas* et illustre la notion de groupes distincts ou clusters (**Figure 13**) (**Anzai et al., 2000 ; Brenner et al., 2005**).

- groupe *putida*,
- groupe *fluorescens*,
- groupe *aeruginosa*,
- groupe *syringae*,
- groupe *chlororaphis*,
- groupe *stutzeri*,
- groupe *pertucinogena*.

Le séquençage du génome entier de toutes les souches types et l'analyse par Multilocus Sequence Analysis (MLSA) fournit des informations précieuses sur l'évolution et les relations taxonomiques en bactériologie. Au sein du genre *Pseudomonas*, elle a permis de différencier à ce jour 19 groupes (**Gomila et al., 2015**) :

- *fluorescens* (contient les espèces *fluorescens*, *azotoformans*, *marginalis*, *libaniensis*), *gessardii* (contient les espèces *gessardii*, *proteolytica*, *brenneri*, *meridiana*), *fragi*, *jessenii*, *koreensis*, *mandelii*, *chlororaphis*, *corrugata*, *asplenii*, *lutea*, *syringae* (contient les espèces *savastanoi*, *caricapapaye*), *anguilliseptica*, *putida* (contient les espèces *entomophila*, *monteilii*, *mosselii*, *plecoglossicida*), *straminea*, *aeruginosa* (contient les espèces *alcaligenes*, *resinovorans*, *otitidis*), *oleovorans* (contient les espèces *mendocina*, *oleovorans*), *stutzeri*, *oryzihabitans*, *pertucinogena*.

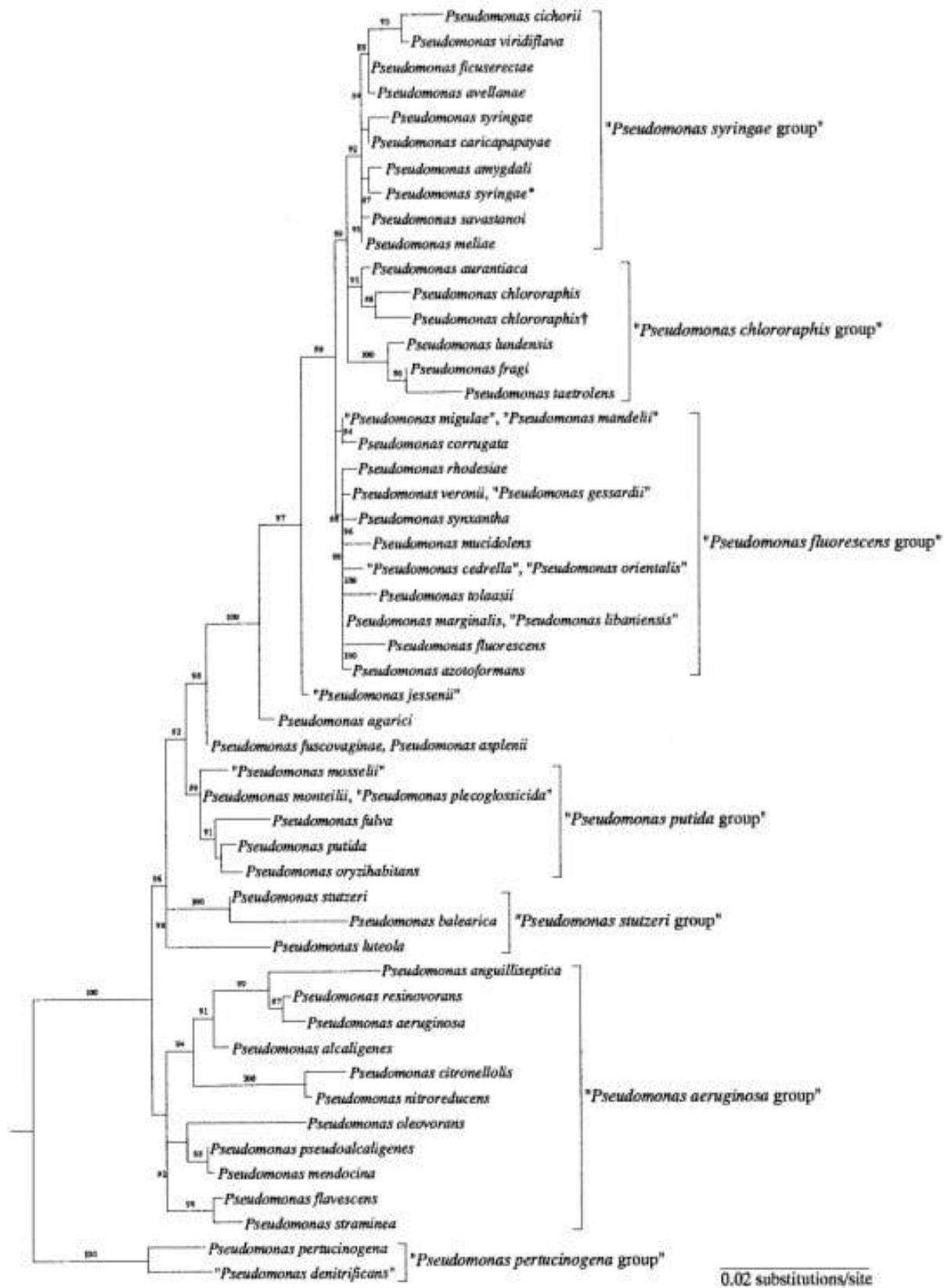


Figure 13 : Arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences du gène de l'ADNr 16S (Anzai *et al.*, 2000 ; Brenner *et al.*, 2005).

Domaine	Protéobactéries
Classe	Gammaprotéobactéries.
Ordre	<i>Pseudomonadales.</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae.</i>
Genre	<i>Pseudomonas.</i>

2) Habitat :

Ces bactéries ont des exigences nutritives très modestes. Elles survivent et se multiplient dans des environnements humides. Ce sont des bactéries ubiquitaires présentes dans l'eau, le sol, les végétaux et les tissus biologiques. Elles ont une capacité à s'installer dans des niches différentes (**Fernandez et al., 2015**).

Il existe des souches psychrotropes (capables de se développer de 0 à 20°C mais dont la température optimale de croissance est entre 20 et 35°) (**Bornert, 2000**) responsables de la détérioration des denrées alimentaires et des produits biologiques conservés au froid (espèces *fluorescens*, *putida*) (**Ercolini et al., 2007**).

Certaines espèces sont considérées comme des dépolluants car elles présentent des capacités à dégrader les hydrocarbures cycliques et linéaires présents dans les sols et dans les eaux (espèces *alcaligenes*, *putida* et *mendocina*). Pour cela, elles fabriquent des biosurfactants qui les protègent et aident à la dégradation des polluants (**Keys et al., 1983 ; Zylstra et al., 1988 ; O'Mahony et al., 2006 ; Suzuki et al., 2013**).

Elles peuvent être présentes dans l'eau destinée à la consommation humaine (**Tournus, 2016**).

3) Caractères généraux des *Pseudomonas* sp :

3)-1 Caractères morphologiques :

Pseudomonas sp, est un bacille fin sous forme de bâtonnet de 1 à 5 µm de longueur et 0,5 à 1 µm de largeur (Chaker, 2012).

C'est une bactérie à Gram négatif, non sporulée, strictement aérobie (cytochrome oxydase), généralement non capsulée mais parfois entourée d'une pseudo-capsule, elle est très mobile grâce à la présence de plusieurs flagelles polaires. Elle est mésophile et capable de se développer dans des températures allant de +4°C à +45°C, mais il faut bien savoir que sa température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C (Clave, 2011).

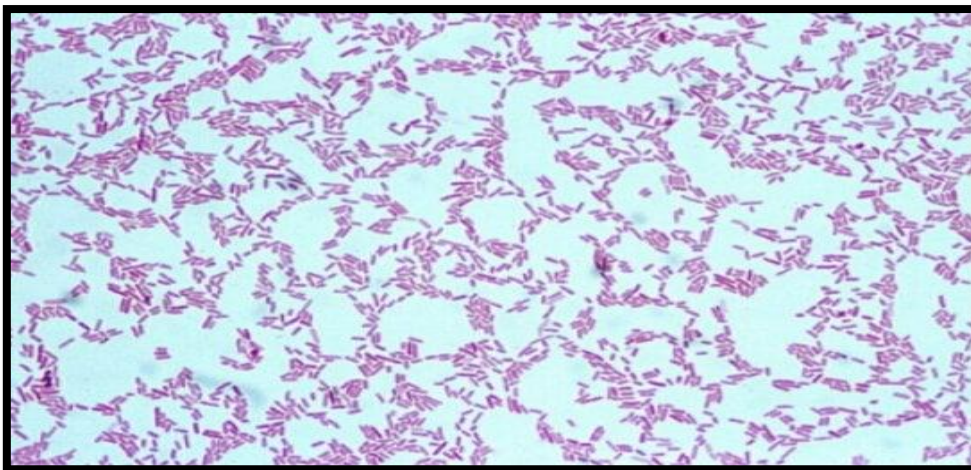


Figure 14 : Coloration de Gram d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* (Tournus, 2016).

3)-2 Caractères cultureux :

Pseudomonas sp., sont des aérobies à métabolisme strictement respiratoire, oxydase+ (Clave, 2011) (utilisent l'oxygène comme accepteur d'électrons, mais en absence ou en carence de ce dernier, elles utilisent les nitrates) (Vasil, 1986), et chimio-organo-trophes puisqu'elles peuvent croître dans un milieu minéral ne contenant qu'une seule source de carbone. Elles sont aussi catalase positive (Mezaache, 2012).

Toutes les espèces de ce genre ne peuvent croître à pH inférieur à 4.5, ni métaboliser le lactose sur Mac Conkey, l'examen au rouge de méthyle et celui de Voges Proskauer (VP) sont négatifs (Palleroni, 1984).



Figure 15 : Croissance de *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose Mac Conkey

(Vishwajith *et al.*, 2019).

3)-3 Caractères métaboliques :

Pseudomonas sp., sont Caractérisée par un métabolisme oxydatif et non fermentatif (Mezaache , 2012).

Ces bactéries ont la capacité de dégrader des composés complexes, tels que les protéines et les polysaccharides complexes comme l'amidon, la cellulose (Palleroni, 1984).

Les espèces du genre *Pseudomonas* produisent une couche d'exo-polysaccharide (E.P.S) entourant leurs cellules, la protègent de la phagocytose par les macrophages chez les mammifères. Cette couche d'exo-polysaccharide leur permet de former des bio films, grâce auxquels elles peuvent rester collées aux surfaces, de telle manière qu'il est difficile de les déloger (Visca *et al.*,2007).

Ce genre produit beaucoup de poly-hydroxy-alcanoates et d'alginate ainsi que d'autres substances métaboliques. Ce qui les rend d'un grand intérêt biotechnologique (Holloway, 1992).

3)-4 Caractères génomiques :

Le génome de cette bactérie a été séquencé en 2000 et a été publiée et révélait le plus large génome bactérien séquencé à ce jour. Il possède 6.3 millions de paires de bases, codant 5570 cadres de lecture de la souche modèle PAO1 (Stover *et al.*, 2000).

Ce génome contient un nombre important de gènes régulateurs impliqués dans le métabolisme, le transport, l'efflux de composés organiques et différents systèmes de sécrétion et de mobilité (Stover *et al.*, 2000), mais il contient aussi une quantité très élevée de gènes codant pour des facteurs de

virulence et des mécanismes de régulation, ce qui lui confère une grande capacité à s'adapter à divers environnements et la capacité d'infecter différents hôtes (Faille, 2010).

La virulence de *Pseudomonas* sp., est multifactorielle (Lamont et Martin, 2003), cette bactérie pouvant produire une multitude de métabolites secondaires dont des facteurs de virulence extracellulaires de faibles poids moléculaire, qui sont régulés en partie par la signalisation intercellulaire. De plus, de nombreux facteurs de virulence se retrouvant à la surface des cellules font de cette espèce un pathogène redoutable. Parmi ces facteurs, on retrouve le flagelle qui permet à la bactérie de nager, les pilis pour le déplacement et l'adhésion, et la couche de lipopolysaccharides (LPS) qui se situe à la surface externe de la membrane et qui est aussi nécessaire à l'adhésion (Kipnis *et al.*, 2006).

4) Les *Pseudomonas* spp fluorescents :

Les *Pseudomonas* fluorescents ont une grande importance environnementale car certains d'entre eux sont des pathogènes des animaux et des végétaux tout en étant aussi reconnus pour leur potentiel comme agent de biocontrôle (Upadhyay et Srivastava, 2008).

En effet, plusieurs études démontrent leur capacité à contrer certaines infections des plantes dues à des pathogènes fongiques (Haas et Keel, 2003 ; Baehler *et al.*, 2005 ; Dubuis *et al.*, 2007).

Des activités antagonistes contre des pathogènes en aquaculture ont aussi été décrites chez les *Pseudomonas* fluorescents. Par exemple, *P. fluorescens* est capable d'inhiber la croissance du champignon aquatique *Saprolegnia* sp (Faille, 2010), de la bactérie *Vibrio anguillarum* (Gram *et al.*, 1999) et aussi de la bactérie *Aeromonas salmonicida* (Preetha *et al.*, 2006).

Ces qualités antagonistes reconnues des *Pseudomonas* fluorescents proviennent en grande partie de la production de métabolites secondaires diffusibles et/ou volatils qui ont des activités antibiotiques (Upadhyay et Srivastava, 2008).

En effet, certaines de ces espèces produisent de nombreux antimicrobiens à spectre large permettant donc aux *Pseudomonas* de compétitionner avec les nombreux microorganismes vivant à leurs côtés (Faille, 2010).

- Quelques espèces des *Pseudomonas* fluorescents :
- *Pseudomonas aeruginosa* :

P. aeruginosa, espèce type du genre *Pseudomonas*, est souvent décrite comme une bactérie présente dans l'environnement et agissant en tant que pathogène sous certaines conditions. La nature ubiquitaire de la bactérie s'explique entre autres par sa capacité de coloniser plusieurs niches distinctes et par son utilisation de plusieurs composés comme source d'énergie (Vincent, 2013).

Son génome contient une quantité très élevée de gènes codant pour des facteurs de virulence et des mécanismes de régulation, ce qui lui confère une grande capacité à s'adapter à divers environnements (Soberon-Chavez *et al.*, 2005) et la capacité d'infecter différents hôtes (Walker *et al.*, 2004 ; Kipnis *et al.*, 2006).

De tous les *Pseudomonas sp.*, *P. aeruginosa* est l'espèce-type la plus étudiée. La virulence de *P. aeruginosa* est multifactorielle, cette bactérie pouvant produire une multitude de métabolites secondaires dont des facteurs de virulence extracellulaires de faibles poids moléculaire, qui sont régulés en partie par la signalisation intercellulaire (Faille, 2010).

- *Pseudomonas fluorescens* :

L'attention reçue par cette bactérie provient surtout de son potentiel à réduire les dégâts causés par certaines maladies fongiques s'attaquant à des plantes cultivables destinées à l'alimentation humaine ou animale (Pant et Mukhopadhyay, 2001) .

Justement, les souches capables de coloniser la rhizosphère portent l'appellation PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) et *P. fluorescens* est l'organisme pour lequel le terme a été inventé (Vincent, 2013).

L'habilité de production des sidérophores rend cette bactérie particulièrement intéressante pour le contrôle de plusieurs maladies animales ou végétales. Ceci évite l'utilisation abusive d'antibiotiques et le recours à une main-oeuvre pour des campagnes de vaccinations massives (Fgaier et Eberl, 2010).

Tout comme la plupart des autres membres de son genre, cette espèce colonise principalement le sol et certains milieux aquatiques. Les *Pseudomonas* aquatiques sont surtout étudiés pour leur tendance à inhiber la croissance des bactéries ou des champignons pathogènes envers la vie aquatique (Vijayan *et al.*, 2006).

Cette aptitude à l'inhibition de pathogènes provient vraisemblablement de la myriade de métabolites secondaires sécrétés par *P. fluorescens* (Vincent, 2013).

○ *Pseudomonas putida* :

C'est une bactérie ubiquitaire fréquemment isolée à partir du sol et plus particulièrement les polluées, la rhizosphère et de l'eau. *P. putida* est un paradigme 'une bactérie du sol métaboliquement polyvalente, dont KT2440 est la meilleure souche caractérisée, c'est une bactérie modèle pour le développement d'applications biotechnologiques et présente un rôle remarquable dans la biorestauration des sols contaminés, le développement de bio-pesticides et la promotion de croissance végétale (Meliani, 2012).

○ *Pseudomonas chlororaphis* :

L'avenir de cette bactérie en tant qu'agent de lutte biologique est très prometteur.

P. chlororaphis est omniprésent dans l'environnement, n'a pas de propriétés toxiques allergènes connues et a des antécédents d'utilisation sans danger dans l'agriculture et dans les cultures fourragères. Elle est considérée comme non pathogène pour l'homme, la faune ou l'environnement selon l'Agence américaine de protection de l'environnement (EPA) (Arrebola, 2019).

5) Métabolites secondaires et facteurs extracellulaires sécrétés chez les rhizobactéries du genre *Pseudomonas* sp :

L'utilisation d'antimicrobiens provenant des *Pseudomonas* sp a commencé en 1899 par l'observation d'Emmerich et Löw, qui ont remarqué que le concentré de culture exempt de cellules de *P. aeruginosa* pouvait inhiber la croissance de plusieurs bactéries.

Ce concentré appelé « pyocyanase » a été produit commercialement et utilisé durant plusieurs années comme traitement contre la diphtérie, l'influenza et la méningite (Faille, 2010). L'utilisation de la « pyocyanase » a plus tard été interrompue dû à la variation de l'efficacité et à la toxicité de certaines molécules présentes dans ce mélange. Depuis, les nombreux métabolites secondaires produits par les *Pseudomonas* fluorescents ont été étudiés pour leurs activités antibiotiques. Ces métabolites secondaires permettent aux bactéries de compétitionner avec d'autres espèces, d'infecter différents hôtes et de coloniser divers environnements (Vial *et al.*, 2008).

Les principaux antibiotiques sécrétés qui font des *Pseudomonas* fluorescents de grands pathogènes sont les suivants : les phénazines, le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), la pyolutéorine (PLT), la pyrrolnitrine (PRN), ainsi que les rhamnolipides (Dwivedi et Johri, 2003 ; Lee *et al.*, 2003).

5)-1. Les antibiotiques :

La production d'antibiotiques par *Pseudomonas* est désormais reconnue comme un facteur important dans le contrôle de plusieurs maladies. Ce genre bactérien produit une myriade de composés présentant des activités antimicrobiennes.

Leur spectre d'action varie grandement d'une molécule à l'autre (Vincent, 2013).

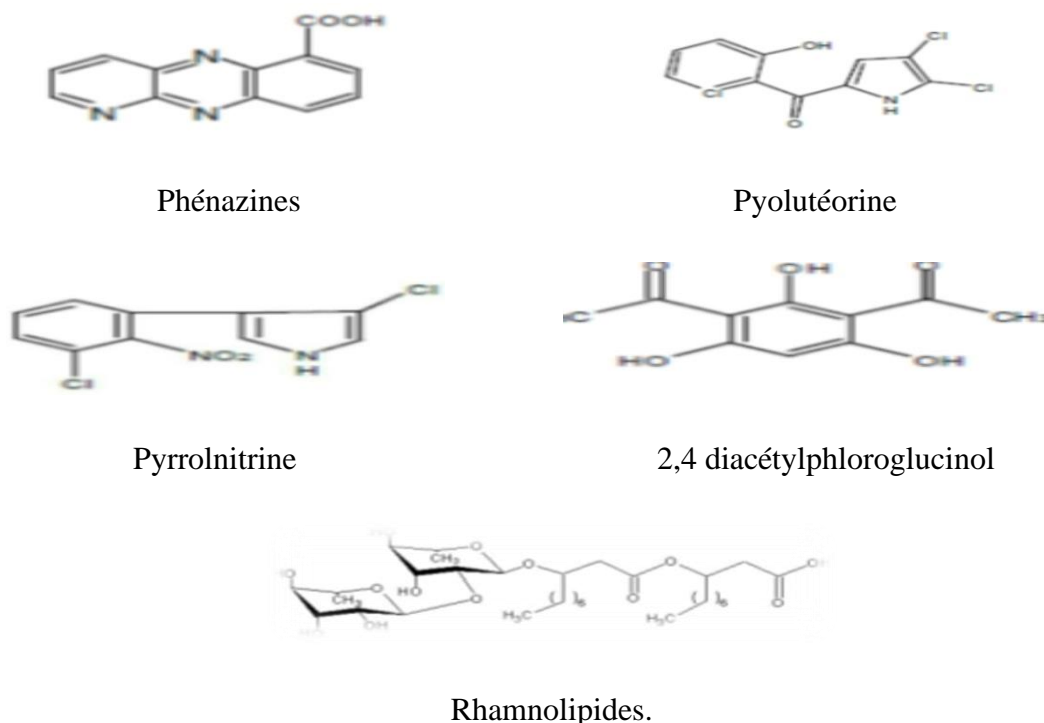


Figure 16 : Les principaux antibiotiques sécrétés par les *Pseudomonas* fluorescents (Faille, 2010).

5)-1.1 Phénazines :

Cette famille de composés aromatiques comprend plus de 80 molécules naturelles. Ce sont des hétérocycles contenant de l'azote et possèdent des propriétés antibiotiques principalement produites par des espèces des genres *Pseudomonas* (Vincent, 2013).

Les *Pseudomonas* fluorescents synthétisent différents phénazines avec un grand spectre d'activité contre les bactéries et champignons (Dwivedi et Johri, 2003).

Ces molécules sont des pigments qui peuvent avoir plusieurs effets toxiques (**Gibson *et al.*, 2009**).

Historiquement, *P. aeruginosa* est la première souche à avoir été rapportée comme productrice de phénazines à la fin du 19^e siècle. Le pigment bleu-vert 5-Nméthyle-1-dihydroxyphénazine, caractéristique de cette espèce, constitue fort probablement la première phénazine connue et décrite sous le nom de pyocyanine (**Vincent, 2013**).

5)-1.2 Pyolutéorine (PLN) :

Cette molécule est avant tout un antibiotique produit par plusieurs souches de *P. fluorescens* et exceptionnellement de *P. aeruginosa*. On la connaît surtout grâce à *P. fluorescens* Pf-5, une bactérie résidente de la rhizosphère. (**Vincent, 2013**).

La région responsable de la synthèse de la pyolutéorine contient neuf gènes structuraux, *pltA-G* avec *pltL-M* et deux gènes codant pour des régulateurs de la transcription (**Noga, 1996 ; Nowak-Thompson *et al.*, 1997**).

PltR est l'activateur des neuf autres gènes tandis que *PltZ* est le répresseur de la production (**Huang *et al.*, 2004**).

En plus de son rôle antibiotique, la molécule agit comme auto-inducteur de sa propre production et est impliquée dans la signalisation inter et intra espèces dans la rhizosphère (**Brodhagen *et al.*, 2004 ; Brodhagen *et al.*, 2005**).

5)-1.3 Pyrrolnitrine (PRN) :

La découverte de la pyrrolnitrine, produite par un *Pseudomonas sp* a eu lieu une soixantaine d'années après celle du premier antibiotique utilisé en clinique ; la pyocyanase.

Ce métabolite secondaire, également produit par certains *Burkholderia sp.*, et *P. fluorescens* Pf-5, est en fait un antifongique à large spectre qui fut d'abord utilisé pour le traitement de mycoses cutanées. L'antibiotique fonctionne comme inhibiteur de la chaîne respiratoire chez les Basidiomycètes, les Deutéromycètes et les Ascomycètes (**Vincent, 2013**).

La synthèse de la pyrrolnitrine (PRN), bien caractérisée, débute avec du L-tryptophane, chloré en 7-chloro-L-tryptophane par *PrnA*, décarboxylé en monodechloroaminopyrrolnitrine par *PrnB*, chloré en aminopyrrolnitrine par *PrnC* puis finalement oxydé en pyrrolnitrine par *PrnD* (**Kirner *et al.*, 1998**).

5)-1.4 Le 2,4 diacétylphloroglucinol (DAPG) :

Cet antibiotique polyketide s'avère efficace contre plusieurs formes de vie (**Vincent, 2013**).

Le (DAPG) possède des propriétés antibiotiques mais avec emphase contre les phytopathogènes tel *Pythium ultimum* (**Faile, 2010**).

Le DAPG est un composé phénolique qui contrairement à plusieurs antibiotiques produits par les *Pseudomonas* fluorescents ne contient pas d'azote. La biosynthèse de cette molécule se fait par les gènes *phlA-F* (**Dwivedi et Johri, 2003**).

5)-1.5 Rhamnolipides :

Cette classe de molécule amphiphile possède une région hydrophobe ainsi qu'une région hydrophile. Ceci leur confère la capacité de s'insérer dans la membrane plasmique et de provoquer la lyse cellulaire par instabilité de la membrane.

Les rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* ont justement la capacité de lyser les zoospores de *Pythium aphanidermatum*, de *Phytophthora capsici* et de *Plasmopara lactucae-radici* en utilisant ce processus (**Vincent, 2013**).

Les rhamnolipides possèdent la caractéristique d'être tensio-actifs, ce qui suscite un intérêt de la part du milieu industriel pour leur pouvoir détergent (**Soberon-Chavez et al., 2005**).

P. fluorescens produit également des rhamnolipides possédant de nombreux avantages sur les surfactants synthétiques, tels que leur faible toxicité, leur capacité à se biodégrader, leur activité sélective, leur activité modulable en fonction de la température, du pH et de la salinité (**Vincent, 2013**).

Il est à noter que la production de rhamnolipides par *P. fluorescens* n'est pas très répandue, un exemple de souche en produisant est *P. fluorescens* HW (**Vasileva-Tonkova et al., 2011**).

5)-1.6 Mupirocine :

Mupirocine, un mélange d'acides pseudomoniques, produit par *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586, est un antibiotique cliniquement important contre les bactéries à Gram positif, y compris les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM).

Il inhibe l'ARN de transfert isoleucyl synthétase bactérien et est actuellement le traitement standard utilisé à l'échelle mondiale pour le contrôle tropical des SARM.

Le composant majeur de mupirocine est l'acide pseudomonique A (**Figure 17**), qui représente 90% du mélange. Il a été identifié comme l'une des premières familles extensives d'antibiotiques produits par les «Trans-AT» classe de polyketides synthétases (PKS) modulaires. Il est constitué d'une sous-structure dérivée du polyketide C17 (acide monique) estérifié par 9-hydroxynonanoïqueacide (9-HN). Les autres principaux composants sont l'acide pseudomonique B (PA-B, 8%) possédant un groupement hydroxyle additionnel au niveau du Carbone C8 et l'acide pseudomonique C (PA-C, < 2%) possédant une double liaison au lieu du groupement époxyde au niveau du Carbone C10-C11, l'acide pseudomonique D (PA-D) (1, 4'-5'-alcène) a été également signalé comme un très mineur composant (**Gao et al., 2014**).

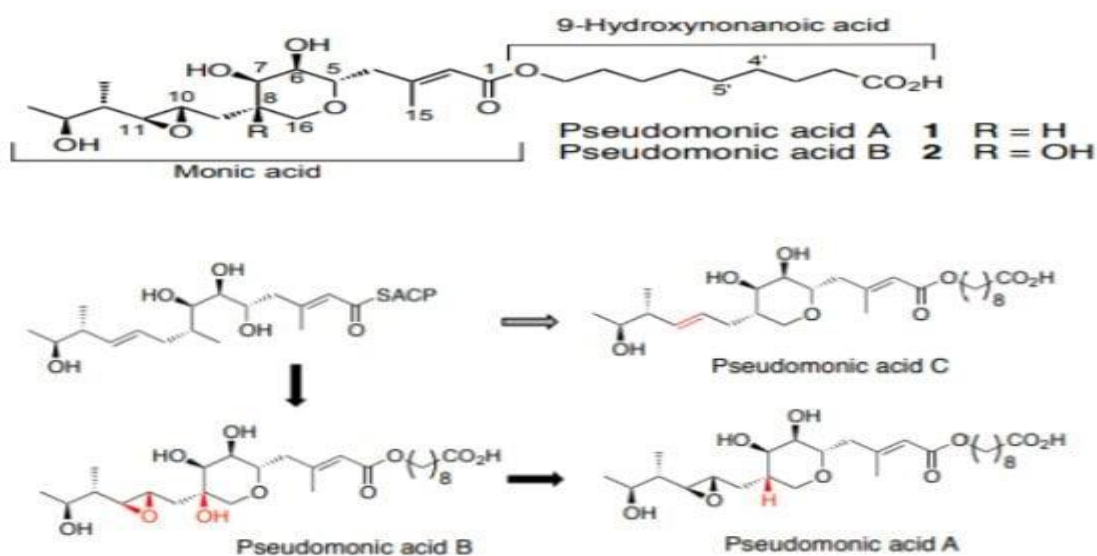


Figure 17 : Composition chimique et structure moléculaire de la mupirocine (**Gao et al., 2014**).

5)-2. Les sidérophores :

La biodisponibilité du fer dans un environnement comme la rhizosphère constitue souvent un facteur limitant la croissance microbienne. Puisque la plupart des organismes vivants utilisent le fer dans leur métabolisme, il s'en suit une compétition pour l'acquisition du métal présent en quantité limitée.

Le phénomène de rareté du fer, un élément pourtant fort commun dans la croûte terrestre, s'explique par l'insolubilité du minerai. Dans l'environnement, on retrouve le fer ferreux (Fe^{2+}) et le fer ferrique (Fe^{3+}) à des taux trop faibles pour supporter la croissance microbienne. Au fil du temps, plusieurs organismes ont développé un système de ligands servant à s'emparer du fer ferrique ainsi le rendant plus soluble et disponible pour leur croissance. Ces sidérophores sont caractérisés par leur faible masse moléculaire, leur forte spécificité au Fe^{3+} , ainsi que leur biosynthèse contrôlée par la disponibilité du fer (**Vincent, 2013**).

Les sidérophores sont sécrétés par plusieurs microorganismes surtout dans des conditions où la quantité de fer soluble est limitée et agissent comme des chélateurs de fer (Fe^{3+}). La production de sidérophores est très exigeante mais peut profiter à plusieurs cellules qui sont dans l'entourage et qui ont les récepteurs appropriés (**Harrison et al., 2008**).

Les sidérophores sont des facteurs de virulence importants chez les microorganismes producteurs (**Lamont et al., 2002**).

Les *Pseudomonas* fluorescents se distinguent des autres *Pseudomonas* par la production de pigments fluorescents jaune-vert dont le principal est nommé pyoverdine (**Lamont et Martin, 2003**).

Chez *P. aeruginosa*, deux types de sidérophores sont retrouvés. soit la pyoverdine et la pyochéline (**Lamont et al., 2002**).

5)-2.1 Pyoverdines :

Ces composés sont les sidérophores typiques des *Pseudomonas* fluorescents comme

P. aeruginosa et *P. fluorescens*. La pyoverdine de *P. fluorescens* est un pigment vert/jaune fluorescent sous la lumière UV qui est directement impliqué dans le transport haute affinité du fer vers la cellule (**Budzikiewicz, 1993**).

La découverte de plus d'une cinquantaine de dérivés de pyoverdine a contribué à augmenter l'intérêt pour l'utilisation de sidérophores comme bio-pesticides en plus d'ouvrir une nouvelle avenue pour la classification des *Pseudomonas* sp. (**Wilson, 1997 ; Meyer, 2000**).

Leur structure consiste en un chromophore di-hydroxy-quinoline flanqué d'une chaîne de peptide de 6 à 12 acides aminés liée au groupement carboxyle et à un acide di-carboxylique connecté sur le groupement NH₂ du chromophore (**Fernandez et al., 2003**).

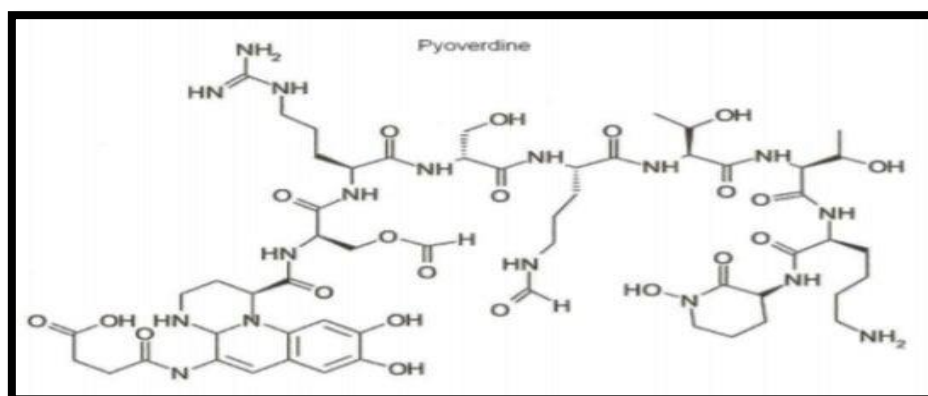


Figure 18 : Structure moléculaire des pyoverdines (**Vincent, 2013**).

5)-2.2 Pyochélines :

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

(**Zatout, 2020**).

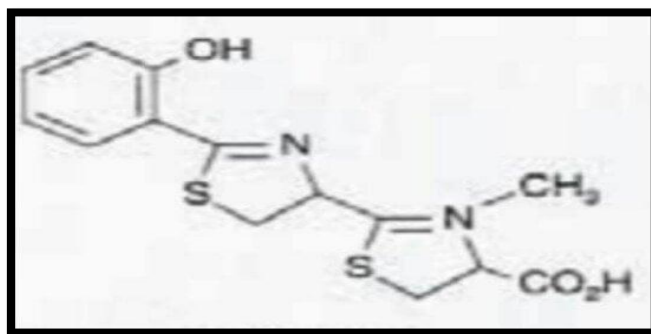
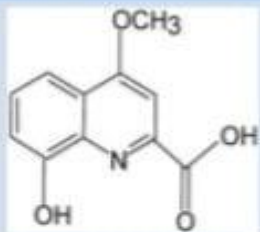
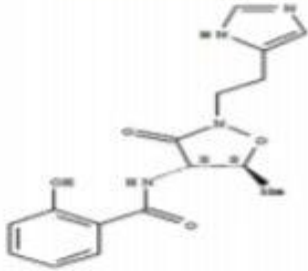
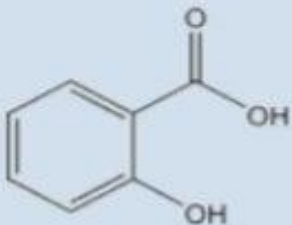


Figure 19 : Structure moléculaire des pyochélines (Benchabane, 2005).

5)-2.3 Autres types des sidérophores produits par les *Pseudomonas* sp fluorescents :

Les *Pseudomonas* fluorescents ont la capacité de produire d'autres types de sidérophores. Le tableau (4) suivant montre quelques exemples (Zenasni, 2018).

Tableau 4 : Autres types des sidérophores produits par les *Pseudomonas* fluorescents (Zenasni, 2018).

Type des sidérophores	Caractéristiques	Structure
Quinolobactine	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Comporte une structure quinoléine ✓ Une affinité moyenne pour le fer ✓ Anti-Pythium 	 <p>Chemical structure of Quinolobactin, a quinolone siderophore. It features a quinoline ring system with a methoxy group (OCH₃), a hydroxyl group (OH), and a carboxylic acid group (COOH).</p>
Pseudomonine	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Nouveau isoxazolidone similaire à la pyocheline ✓ Possède un fragment histamine 	 <p>Chemical structure of Pseudomonine, a siderophore with a complex structure including an isoxazolidone ring and a histamine fragment.</p>
Acide salicylique	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Faible affinité pour le fer 	 <p>Chemical structure of Salicylic acid, a simple siderophore consisting of a benzene ring with a hydroxyl group (OH) and a carboxylic acid group (COOH) in the ortho position.</p>

5)-3. Les composées volatiles « Cyanure d'Hydrogène (HCN) » :

La production d'HCN par les *Pseudomonas* est impliquée dans la suppression d'agents pathogènes comme *Thielaviopsis basicola*, *Septoria tritici* et *Puccinia recondita* (Ramette *et al.*, 2003).

Le composé agit directement sur les cellules de l'agent pathogène en bloquant le cytochrome oxydase dans la chaîne respiratoire. Cependant, en plus d'une activité protectrice, le HCN peut également être nocif pour la plante. La différence entre biocontrôle et effet nocif serait probablement due à des différences dans les niveaux d'expression des gènes de production d'HCN. Chez les procaryotes, la production d'HCN semble confinée aux protéobactéries et elle a été mise en évidence chez plusieurs souches de *Pseudomonas fluorescens* (Laville *et al.*, 1998).

Une fonction écologique de la synthèse d'HCN a été mise en évidence chez la souche CHA0. Chez cette dernière, la production d'HCN compte pour une grande partie du pouvoir inhibiteur envers *Thielaviopsis basicola* (Laville *et al.*, 1998).

Au niveau de l'adaptation à la rhizosphère, la production d'HCN peut être avantageuse pour acquérir des nutriments. Par exemple, le HCN cause une augmentation de l'exudation de nutriments par les tissus de la plante. Il peut aussi contribuer à l'acquisition de certains ions métalliques en formant des complexes avec ceux-ci. De plus, en culture *in vitro*, la production d'HCN peut même inhiber la croissance de plusieurs champignons phytopathogènes via la phase gazeuse (Blumer et Haas, 2000).

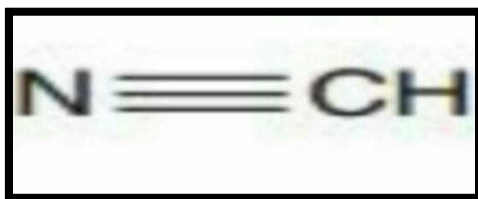


Figure 20 : Structure moléculaire d'HCN produits chez les *Pseudomonas* sp fluorescents (Zatout, 2020).

5)-4. Autres substances inhibitrices produites par les *Pseudomonas* sp fluorescents :

En plus des ATB mentionnés ci-haut, qui sont de loin les plus étudiés, d'autres composés secondaires ainsi que certaines enzymes extracellulaires produits par les *Pseudomonas* peuvent avoir un effet sur le biocontrôle. Par exemple, la production de trois lipopeptides cycliques (viscosianmide, tensine et amphisine) a été démontrée chez une souche isolée de la rhizosphère de la betterave à sucre (**Haas et Keel, 2003**).

Ces composés démontrent tous une activité antagoniste contre *Pytium ultimum* et *Rhizoctonia solani* (**Mathieu, 2005**).

6)- Régulation de la synthèse des substances antimicrobiennes chez les *Pseudomonas* sp :

6)-1. Signalisation intercellulaire (SI) :

Plutôt que de vivre en tant que cellules individuelles, les bactéries ont développé un système de communication qui leur permet d'unir leurs forces et d'agir de façon similaire à un organisme pluricellulaire. Ces cellules communiquent donc à l'aide de petites molécules extracellulaires et peuvent ainsi réguler l'expression de leurs gènes en fonction de la densité cellulaire. Ce mécanisme de communication retrouvé chez les bactéries Gram-négative se nomme « signalisation intercellulaire (SI)» (**Kipnis et al., 2006**).

Plusieurs systèmes de (SI) ont été décrits dans la nature mais *Pseudomonas aeruginosa* est le modèle le plus étudié (**Deziel et al., 2004 ; Kipnis et al., 2006**).

Chez cette espèce, on retrouve des systèmes de SI utilisant les N-acyl-L-homosérine lactones (AHLs) comme molécules de signalisation intercellulaire (aussi appelées auto-inducteurs). Les deux systèmes de SI principaux chez *P. aeruginosa* sont las et rhl qui interagissent selon une cascade hiérarchique. Chaque système a son propre régulateur transcriptionnel (LasR ou RhIR) ainsi que son auto-inducteur synthétase (LasI ou RhII), une enzyme qui produit son AHL spécifique (**Lépine et al., 2003**).

Les AHLs majoritairement produits par LasI et RhII sont respectivement N-(3-oxododécanoyl)-L-homosérine lactone (oxo-C12-HSL) et Nbutanoyl-L-homosérine lactone (C4-HSL) (**Pearson et al., 1995**).

La quantité d'auto-inducteurs augmente en fonction de la densité de la population bactérienne. Lorsque la quantité d'auto-inducteurs atteint un certain seuil (quorum) les AHLs se lient aux

régulateurs de transcription provoquant leur changement de conformation. Ceci ayant pour conséquence, leur attachement à l'ADN et l'activation de plusieurs gènes de virulence ainsi que la production de signaux supplémentaires du quorum sensing (QS) (Ruimy et Andremont, 2004) (Figure 21).

Les principaux gènes régulés par les systèmes rhl et las sont ceux codant pour les sidérophores, la pyocyanine, l'acide cyanhydrique, la lécithine (LecA), la protéase alcaline, l'élastase (LasB), les rhamnolipides ainsi que ceux impliqués dans la formation de biofilms (Faille, 2010).

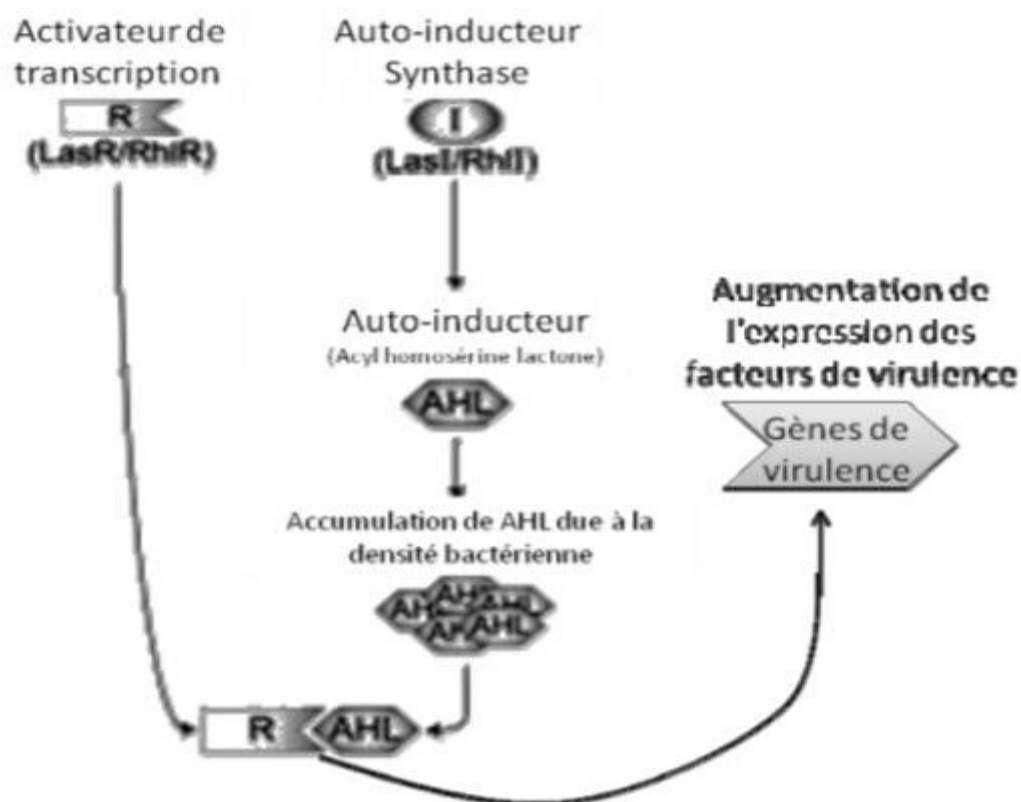


Figure 21 : Schéma des systèmes de SI las et rhl de *P. aeruginosa* (Kipnis *et al.*, 2006).

Malgré la grande similitude entre ces deux systèmes de SI, ils sont deux voies distinctes dont les composantes de l'une ne peuvent remplacer celles de l'autre (Ruimy et Andremont, 2004).

Par contre, elles peuvent interagir via l'activateur LasR, qui a un effet positif sur l'expression des gènes rhlR ainsi que rhlI (Deziel *et al.*, 2005).

LasR peut aussi contrôler l'expression de son auto-inducteur lasI (Gallagher *et al.*, 2002).

6)-1.1 Une nouvelle communication extracellulaire :

Une nouvelle molécule de signalisation intermoléculaire distincte des AHLs a récemment été découverte chez *Pseudomonas aeruginosa*. Cette molécule qui vient s'imbriquer dans l'hierarchie de la SI est le 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline dénommé le « *Pseudomonas* quinolone signal » (PQS). Elle fait partie d'une grande classe de métabolites secondaires ayant des propriétés antimicrobiennes soit les 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) dont le précurseur le 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) fait aussi partie (Faïlle, 2010).

Ces molécules, HHQ et PQS, sont les deux HAQs agissant en tant que molécules de signalisation extracellulaire chez *P. aeruginosa* (Dubern et Diggle, 2008).

Le rôle de ces molécules est entre autre de maintenir une bonne concentration de fer à l'intérieur de la cellule en agissant comme un chélateur de fer. PQS n'intervient pas à titre de sidérophore mais plutôt en retenant le fer à la surface de la cellule afin de faciliter l'action des sidérophores. Il est aussi impliqué dans la régulation de gènes comme l'élastase, les rhamnolipides, la lectine (LecA), la pyocyanine ainsi que la formation des biofilms (Diggle *et al.*, 2007).

Ces gènes sont aussi régulés par le système de SI rhl. Une étude a donc suggéré que PQS agissait en activant le système de SI rhl. D'autres travaux ont par la suite menés à l'hypothèse que PQS puisse réguler directement ces gènes sans passer par la régulation de rhlR ou rhlI (Faïlle, 2010).

6)-2. Le système à deux composantes GacA / GacS :

Le système à deux composantes GacA / GacS est d'une grande importance chez plusieurs *Pseudomonas* fluorescents car il gouverne la production de divers métabolites secondaires et exoenzymes (Zuber *et al.*, 2003).

La première composante de ce système est la protéine GacA, un régulateur de réponse cytoplasmique très conservé chez les bactéries Gram-négatives. GacS (LemA), la deuxième composante, est une kinase associée à la membrane interne (Reimmann *et al.*, 1997 ; Zuber *et al.*, 2003 ; Upadhyay et Srivastava, 2008).

Le système GacA / GacS fonctionne en activant la production des petits ARN non codants RsmY et RsmZ. Ces derniers vont annuler l'effet répresseur de la protéine RsmA qui est liée près ou au site de liaison du ribosome des gènes cibles (Zuber *et al.*, 2003 ; Reimmann *et al.*, 2005).

GacA est un régulateur global surtout chez *P. fluorescens*, *P. syringae* ainsi que *P. viridiflava* où une mutation de ce gène abolit la production de métabolites secondaires et d'exoenzymes.

L'inactivation de GacA chez *P. aeruginosa*, entraîne une réduction dans la formation de C4-HSL, RhIR et LasR. Une pathogénicité diminuée observée chez un mutant GacA de *P. aeruginosa* est donc le résultat de la réduction dans l'activation des facteurs de virulence contrôlés surtout par le système de QS rhl (**Faille, 2010**).

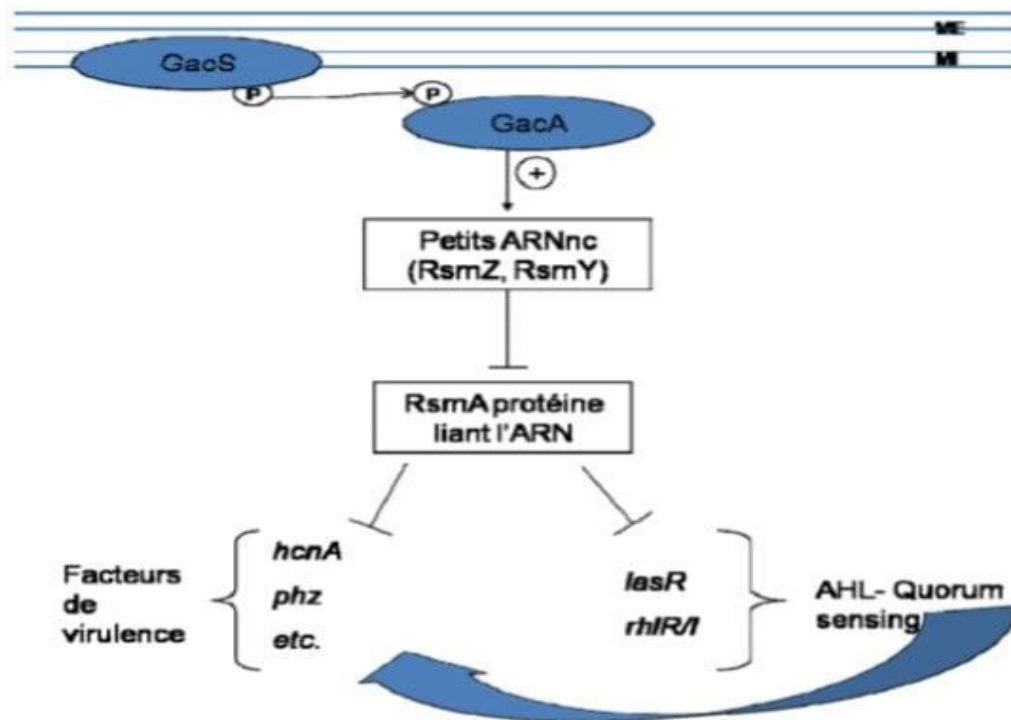


Figure 22 : Voie de régulation sous l'influence du système à deux composantes GacA / GacS chez *P. aeruginosa* (**Dubuis et al., 2007**).

Partie expérimentale

Chapitre I :
Matériel & méthodes

Chapitre I: Matériel et Méthodes.

▪ Lieu et durée de travail :

Le travail présenté a été réalisé au niveau de laboratoire pédagogique de biologie n°01 de l'université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, durant la période allant du 25 Avril au 22 Juin de l'année 2020/2021.

1. Matériel :

1.1. Matériel biologique:

✓ Deux souches appartenant au genre *Staphylococcus* ont été obtenues :

-Une isolée à partir des fosses nasales,

-Et une autre souche référenciée « *S.aureus* » provenant du laboratoire pédagogique de microbiologie n°03.

✓ Les souches de *Pseudomonas* ont été obtenues en effectuant un isolement à partir des racines de graminées sauvages.

1.2. Milieux de culture :

Les milieux de culture employés durant ce travail pratique sont :

- ✓ Bouillon nutritif : pour l'activation des souches bactériennes.
- ✓ Gélose Chapman : pour l'isolement et purification des Staphylocoques.
- ✓ Milieu King A et King B : pour la recherche l'isolement des souches de *Pseudomonas*.
- ✓ Gélose T.S.I/ Mannitol mobilité/ Clark et Lubs/ Bouillon nitraté/ Schubert/ Citrate de Simmons : pour l'identification biochimique des souches bactériennes étudiées.

2. Méthodes :

2.1. Etude, recherche et identification des souches de Staphylocoques :

2.1.1. Isolement des Staphylocoques :

Un prélèvement a été effectué à l'aide d'un écouvillon sec et stérile en l'insérant dans la narine antérieure. Ensuite, le prélèvement a été ensemencé à la surface d'une boîte contenant la gélose Chapman en réalisant des stries simples. La culture a été incubée par la suite à 37°C pendant 24 à 48 heures.

2.1.2. Purification des Staphylocoques :

Les souches ont été purifiées en réalisant des stries sur la surface de la gélose Chapman et incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

2.1.3. Identification des isolats de Staphylocoques purifiées :

2.1.3.1. Examen macroscopique des Staphylocoques :

Après incubation, les colonies qui apparaissent bien isolées ont été identifiées macroscopiquement et celles présentant les caractéristiques des Staphylocoques ont été sélectionnées pour des tests d'identification ultérieurs.

La pureté des souches de Staphylocoques a été vérifiée par coloration de Gram pour sélectionner les cocci à Gram positif. Les souches ont été identifiées grâce aux méthodes bactériologiques et biochimiques classiques (production de catalase et de coagulase, test d'oxydase...) suivis d'une identification confirmative de leurs caractères biochimiques à l'aide d'une galerie API 20 Staph (Bio Mérieux).

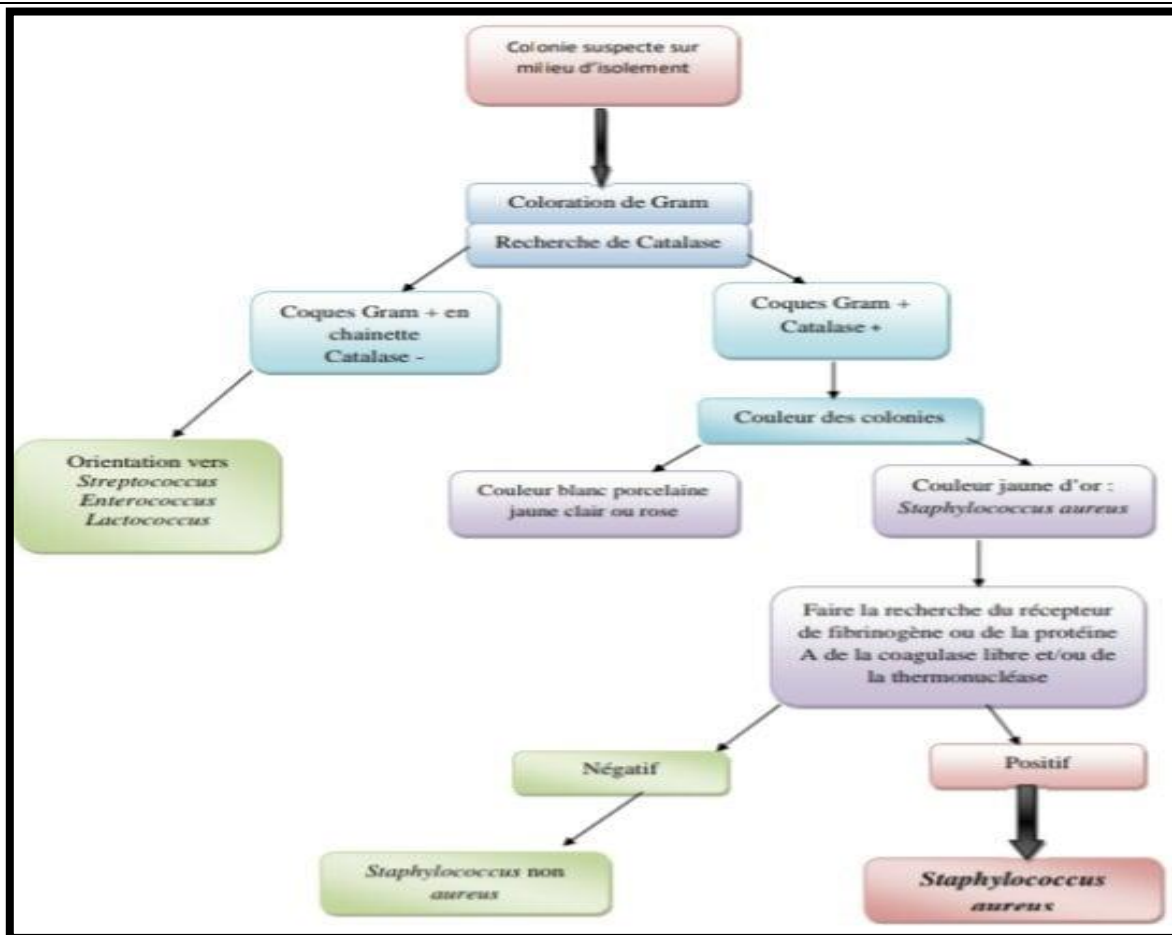


Figure 23 : Organigramme de l'identification des Staphylocoques (Rebiahi, 2012).

2.1.3.2. Examen microscopique des Staphylocoques :

Les souches à identifier ont été dans un premier temps soumises à l'examen d'un frottis après coloration de Gram (Annexe 3). Les frottis ont été examinés au microscope à un grossissement de 100X.

Généralement, lors de l'observation microscopique, les Staphylocoques apparaissent comme des coques à Gram positif mesurant 0.5 à 1.5 μm de diamètre, isolés, en diplocoques en courtes chaînettes ou en amas (Dembélé, 2005).

2.1.3.3. Recherche de la catalase :

Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes H_2O_2 dont l'accumulation a un effet létal pour les bactéries.

La catalase a la propriété de décomposer le peroxyde d'Hydrogène H_2O_2 avec dégagement d' O_2 sous forme gazeuse selon la réaction suivante.



Les colonies correspondant à des coques à Gram positif étaient vérifiées pour leur capacité à produire l'enzyme « catalase ».

Ce test permet de différencier les Staphylocoques des Streptocoques (**Dembélé, 2005**).

A partir d'un milieu solide, une quantité suffisante de culture bactérienne a été prélevée et mise en suspension dans une goutte d'eau oxygénée (à 10 volumes) déposée sur une lame.

La présence de catalase est marquée par la formation immédiate des bulles d' O_2 .

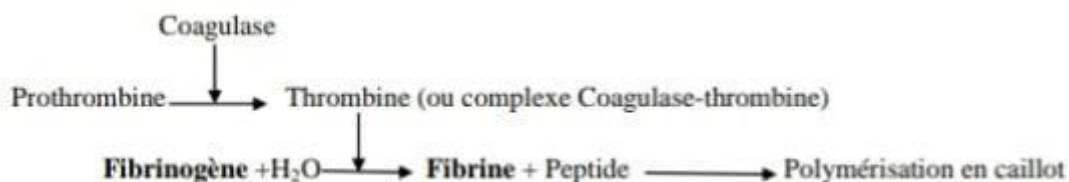
2.1.3.4. Recherche de l'oxydase :

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes (**Zatout, 2020**).

Sur une lame porte objet un disque oxydase imprégné avec une goutte d'eau distillée. Une colonie à étudier à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée stérile a été mise sur le disque. Une coloration violette foncée apparaît immédiatement sur le disque en quelques secondes puis vire au noir « test oxydase positif ».

2.1.3.5. Recherche de la coagulase :

La propriété de *Staphylococcus aureus* de provoquer la coagulation d'un plasma recueilli sur anticoagulant est un critère important de son identification. Elle est due à la sécrétion d'une enzyme thermostable : « la staphylocoagulase » ou « coagulase ». La staphylocoagulase agit en liaison avec la prothrombine et en absence de Calcium (**Rebiahi, 2012**).



L'activité de la coagulase sur le plasma humain a été prise comme un critère principal pour différencier les espèces du genre *Staphylococcus* à coagulase positive des autres espèces à coagulase négative.

Les isolats soupçonnés d'appartenir au genre *Staphylococcus* ont subi un test de coagulase.

Le principe de ce test consiste à mettre en contact du plasma oxalaté une culture bactérienne en suspension.

Des tubes à hémolyse contenant 0.5 ml de plasma humain ont été inoculés avec 0.5 ml de suspension préparée à partir d'une culture jeune de la souche à identifier. Après homogénéisation du mélange, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures.

Le résultat positif se traduit par la formation d'un caillot sur le fond du tube. Le mélange est observé d'heure en heure car le coagulum peut être suivi d'une redissolution du caillot provoquée par la fibrinolyse (**Denis, 2007**).

2.1.3.6. Identification biochimique classique des souches de Staphylocoques :

Pour cela, les deux souches ont été ensemencées sur des milieux précis afin de déterminer leur métabolisme.

- **Milieu T.S.I :**

C'est un milieu d'identification rapide permettant de mettre en évidence la fermentation de glucose (avec ou sans dégagement gazeux), du saccharose, de lactose, et la production de H₂S.

Elle consiste à ensemencer à l'aide d'une anse stérile la souche à identifier en tries serrées dans la pente de la gélose puis par piqûre centrale dans le culot.

La lecture se fait après 24 heures d'incubation à 37°C.

-La fermentation de glucose se traduit par le virage du culot au jaune.

-La fermentation du lactose et/ou du saccharose se traduit par le virage de la pente au jaune

- La production de gaz se traduit par la formation de bulles de gaz au niveau de la gélose ou le décollement de celle-ci.

-La production de H₂S se traduit par un noircissement du milieu.

- **Milieu mannitol-mobilité :**

Le milieu mannitol-mobilité (**Annexe 1**) est utilisé pour déterminer la capacité des bactéries à fermenter le mannitol et de déduire la mobilité au même temps.

L'ensemencement se fait au moyen d'une anse par une simple piqûre centrale jusqu'au fond du tube. La lecture se fait après 24 heures d'incubation à 37°C.

-La fermentation du mannitol se traduit par un virage de couleur du rouge au jaune.

-La présence des colonies bactériennes au-delà de l'axe central signifie qu'elles sont mobiles, cependant leur présence uniquement au niveau de la piqûre centrale signifie qu'elles sont immobiles.

➤ **Bouillon nitraté :**

L'étude de la réduction des nitrates se fait par la mise en évidence des nitrites formés.

La réaction de ces derniers avec le NIT 1 et le NIT 2 donne au milieu une rose rougeâtre L'enzyme de nitrate réductase catalyse la réaction des nitrates en nitrites :



Les nitrates peuvent aller également jusqu'au stade azote (N_2). Dans ce cas, on doit compléter par une épreuve qui consiste à ajouter de la poudre de zinc au milieu :

-Si le zinc réduit les nitrates encore présents en nitrites, la coloration rouge apparaît et la réaction est négative (bactéries sans nitrate réductase).

-Si au contraire, la teinte du milieu reste inchangée, le stade nitrite a été dépassé donc les bactéries possédant une nitrate réductase très active.

A partir d'une culture de bouillon nitraté (**Annexe 1**) de 24 heures d'incubation à 37°C, on ajoute deux gouttes de réactif NIT 1 et NIT 2 (**Annexe 2**). Après agitation, la lecture est immédiate.

-Coloration rose ou rouge : nitrates réduits en nitrites (nitrate réductase positive NR +).

-Milieu restant incolore : on ajoute un peu de poudre de zinc (réducteurs des nitrates), avec une agitation et inclinaison du tube de culture en position presque horizontale et on attend cinq minutes avant la lecture :

- Si le milieu devient alors rose ou rouge, il reste des nitrates, donc ces derniers n'ont pas été réduits par la bactérie : nitrate réductase négative NR (-).
- Si le milieu reste incolore, il ne reste plus de nitrate, les bactéries les ont réduits au-

delà de stade nitrites : nitrate réductase positive NR (+).

2.1.3.7. Identification confirmative de l'isolat de Staphylocoque par galerie API Staph :

➤ Principe :

La galerie API Staph comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Les micro-tubes ont été inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

➤ Préparation de la galerie :

Le fond et le couvercle de la boîte d'incubation sont réunis et environ 5 ml d'eau distillé ou déminéralisée est répartie dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. La référence de la souche à identifier a été inscrite sur la languette latérale de la boîte, puis, la galerie a été placée dans la boîte d'incubation.

➤ Préparation de l'inoculum et inoculation de la galerie :

A partir d'une culture jeune de 18 - 24 heures, une suspension bactérienne homogène d'opacité égale à 0.5 de McFarland a été préparée.

A l'aide d'une pipette, les micro-tubes de la galerie ont été inoculés avec la suspension.

Les cupules des tests ADH et URE ont été remplies avec l'huile de vaseline afin de créer une anaérobiose. Ensuite, la boîte a été refermée et incubée à 37°C pendant 18-24 heures.

➤ Lecture et interprétation :

Après incubation, la lecture des réactions se fait conformément au tableau de lecture en ajoutant une goutte de chacun des réactifs : VP1, VP2, NIT1, NIT2, ZYM A et ZYM B dans les micro-tubes des tests VP, NIT et PAL respectivement.

L'identification a été obtenue à l'aide du tableau représenté dans l'**annexe 4**.



Figure 24 : Aspect de galerie biochimique API Staph inoculée avant incubation.

2.1.4. Conservation des souches :

Après identification, les souches de Staphylocoques ont été ensemencées dans des tubes de gélose nutritive inclinée et incubées 37°C pendant 24 à 48 heures. Dès qu'une croissance est observée, les cultures ont été par la suite conservées à 4°C jusqu'à une réactivation ultérieure.

2.2. Etude, recherche et identification des *Pseudomonas* :

2.2.1. Echantillonnage :

Pour la recherche de ce genre de microorganismes, des plantes dites « orge des rats » *Hordeum murinum* (**Figure 25**) ont été prélevées à partir de leurs racines.

Le prélèvement a été effectué le 05 Mai 2021 au niveau de trois sites distincts de la région de Mostaganem : Stidia, Mezaghran et l'université d'ITA. Les échantillons obtenus ont été introduits aseptiquement dans des sachets plastiques identifiés et transportés rapidement au laboratoire.



Figure 25 : Aspect des graminées sauvages.

a : partie aérienne ; *b* : partie racinaire (rhizosphérique).

2.2.2. Isolement des souches de *Pseudomonas* :

A partir de chaque échantillon, une masse de 1 g de racines a été pesée et mise dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile, la solution obtenue a été mise dans un vortex pour une agitation. C'est la suspension mère (10^{-1}) à partir de laquelle des dilutions décimales (10^{-2} à 10^{-5}) ont été préparées.

A l'aide d'une pipette pasteur, un volume 100 μ L de chaque dilution (10^{-2} jusqu'à 10^{-5}) a été prélevé et déposé en surface des boîtes contenant le milieu King B (**Annexe 1**) solide, puis étalé avec un étaloir à la surface de la gélose.

Les boîtesensemencées ont été incubées à 28°C pendant 48 heures.

2.2.3. Purification des isolats des *Pseudomonas* fluorescents :

Après incubation, les colonies qui apparaissent avec une fluorescence jaune verdâtre ont été sélectionnées et numérotées.

Les colonies choisies ont été purifiées en faisant des stries simples à la surface de la gélose King B et incubées à 28 °C pendant 48 heures.

Ces cultures pures obtenues ont ensuite été identifiées via des observations microscopiques et des tests biochimiques.

2.2.4. Identification présomptive des isolats purs des *Pseudomonas* fluorescents suspects :

Pour cela des différents caractères clés ont été recherchés :

2.2.4.1. Etude morphologique :

A partir des cultures microbiennes purifiées, des frottis fixés ont été préparés, colorés avec la fuchsine durant une minute, rincés avec l'eau distillée, séchés puis observés sous microscope à l'objectif x100. Les frottis à partir desquels on observe des petits bâtonnets droits purs ont été retenus.

2.2.4.2. Test de T.S.I :

Généralement, les bactéries du genre *Pseudomonas* ont un métabolisme oxydatif et non fermentatif. Ils ont l'aptitude de dégrader les substrats organiques par voie respiratoire.

Pour s'orienter vers l'identification du genre *Pseudomonas*, les cultures pures ont été ensemencées dans gélose T.S.I (Triple Sugar Iron) (**Annexe 1**) on réalisant des stries sur la pente puis une piqûre centrale dans le culot. Les tubes ont été par la suite incubés à 37°C pendant 18 heures.

Après incubation, les souches ayant pas fermenté les sucres présents dans le milieu ni produits des Sulfure d'Hydrogène (H₂S) ont été retenues.

2.2.4.3. Recherche de cytochrome oxydase :

Sur des lames contenant des disques d'oxydase imprégnés avec une goutte d'eau distillées, une colonie a été prélevée à partir d'une culture de la souche suspecte et déposée sur le disque.

L'apparition d'une coloration violette pendant environ 30 secondes indique que la souche est dite oxydase positive. Les souches montrant une réaction positive ont été sélectionnées.

2.2.4.4. Recherche de la catalase :

Sur une lame propre, une colonie bactérienne de la souche suspecte a été prélevée et déposée et émulsionnée avec une goutte de peroxyde d'Hydrogène.

L'observation d'une effervescence immédiate est le signe d'une réaction positive (bactérie dite catalase positive).

2.2.4.5. Test de la croissance à 4°C et à 42°C :

Pour caractériser l'espèce du genre *Pseudomonas*, les souches suspectes à identifier ont été ensemencées à la surface de la gélose King A (**Annexe 1**) par des stries simples et incubées à 4°C et à 42°C. La lecture des résultats repose sur la présence ou l'absence de la croissance des cultures dans le milieu.

2.2.5. Mise en évidence du pouvoir antagoniste des souches de *Pseudomonas* suspectes vis-à-vis les Staphylocoques :

Pour étudier l'effet antagoniste des souches du genre *Pseudomonas*, une méthode d'antagonisme dite « méthode de stries croisées » (méthode de strie verticale) suivie par **Zatout (2020)** et décrite par **Selvin et al., (2009)** a été appliquée.

Elle consiste à ensemencer l'isolat antagoniste en un seul trait à la surface et en bordure de la boîte de Pétri contenant la gélose King B.

Après incubation à 30°C pendant 48 heures, les souches du genre *Staphylococcus* ont été ensemencées perpendiculairement à la souche productrice des substances inhibitrices. Les boîtes ont été par la suite incubées à 37°C pendant 24 heures.

La lecture des résultats a été faite par mesure de la distance d'inhibition entre les bordures de la souche antagoniste et la souche test du genre *Staphylococcus*.

2.2.6. Identification des souches de *Pseudomonas* antagonistes :

Après la lecture des résultats d'antagonismes, les souches de *Pseudomonas* suspectes montrant une activité inhibitrice vis-à-vis les souches cibles de Staphylocoques ont été retenues pour être identifiées via des observations microscopiques et des tests biochimiques classiques en utilisant des milieux de culture définis tels que : Bouillon nitraté, Schubert, Mannitol mobilité, Citrate de Simmons, Clark et Lubs, BCPL (**Annexe 1**).

2.2.6.1. Etude microscopique :

Pour confirmer microscopiquement la forme et la disposition des cellules bactérienne du genre suspect « *Pseudomonas* », des frottis fixés ont été préparés à partir des souches antagonistes pures et colorés par la coloration de Gram décrite dans l'**annexe 3**.

Les frottis ont été observés sous microscope optique à l'objectif x1000 après la mise d'une goutte de l'huile à immersion.

2.2.6.2. Etude biochimique classique :

Cette étude a été réalisée afin de définir le métabolisme protidique et glucidique des isolats antagonistes, parmi les tests d'identification appliqués, on cite :

➤ **Recherche de nitrate réductase :**

Avec une pipette pasteur stérile, une colonie a été prélevée à partir de chaque isolat pur et inoculée dans un tube contenant le bouillon nitraté. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Après incubation, des gouttes du réactif NIT 1 et NIT 2 ont été ajoutées.

➤ **Recherche de l'uréase et de la production d'indole :**

Le milieu Schubert (**Annexe 1**) a été utilisé pour réaliser ces deux tests.

A partir de chaque souche, une colonie a étéensemencée dans des tubes contenant ce milieu.

Ces derniers ont été incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Après incubation, quelques gouttes du réactif de Kovacs (**Annexe 2**) ont été ajoutées.

➤ **Test de fermentation du mannitol et de mobilité :**

Une colonie de la souche à identifier a été prélevée etensemencée dans le milieu mannitol mobilité par piqûre centrale. Les tubes contenant le milieuensemencé ont été incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures.

➤ **Test d'utilisation du citrate :**

La gélose citrate de Simmons (**Annexe 1**) a étéensemencée avec la souche suspecte en faisant des simples stries à la surface du milieu. Les cultures sont incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures.

➤ **Test de VP / RM :**

Le milieu Clark et Lubs (**Annexe 1**) a étéensemencé avec la souche présumée puis incubé à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Après incubation, le bouillon a été réparti dans deux tubes et des gouttes des réactifs RM,

VP I et VP II (**Annexe 2**) ont été mises dans chaque tube respectivement.

➤ **Test de fermentation du lactose et de la production de gaz :**

Chacune des souches à identifier ont été ensemencées dans des tubes de BCP liquide (Bromocrésol Pourpre) (**Annexe 1**) muni d'une cloche. Ces derniers ont été incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures.

➤ **Test d'utilisation d'arabinose :**

Pour mettre en évidence de la capacité d'utiliser ce type des glucides chez les souches de *Pseudomonas* antagonistes, le milieu Hugh Leifson à base d'arabinose (**Annexe 1**) a été employé.

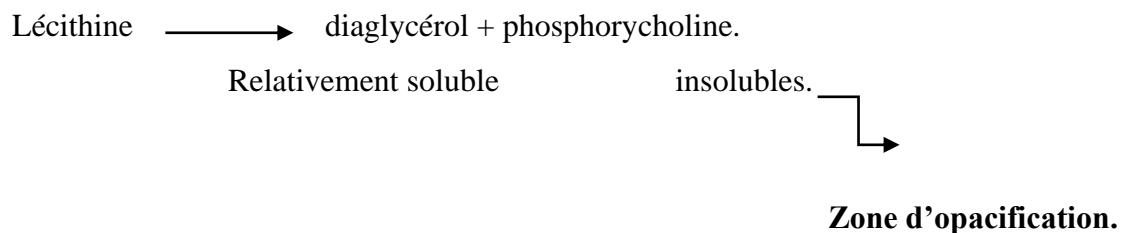
A l'aide d'une anse stérile, une colonie de la souche à tester a été prélevée et ensemencée dans des tubes contenant ce milieu. Ces derniers ont été incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Après incubation, la lecture se fait par l'observation du virage de la couleur du milieu grâce à la présence de l'indicateur bleu de bromothymol.

S'il vire vers le jaune, cela indique que la souche est arabinose (+).

➤ **Test de la lécithinase :**

La **lécithinase** est une enzyme hydrolysant la lécithine et libèrent un diacylgérol et la phosphorycholine selon cette réaction :



Ce test a été effectué dans la gélose nutritive au jaune d'œuf (**Annexe 1**).

Une colonie de la souche à identifier a été prélevée et ensemencée à la surface de la gélose par des simples stries centrales puis incubée à 37°C pendant 24 à 48 heures.

La lecture se fait par détection de la présence d'une zone opaque autour de la souche ensemencée (aspect du test positif).

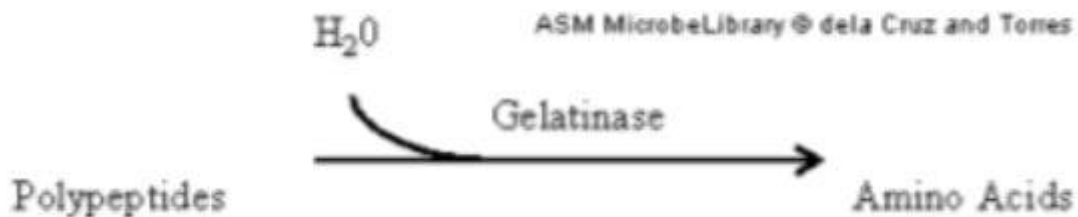
➤ **Test de la gélatinase :**

La gélatinase est une protéase extracellulaire sécrétée par certaines bactéries qui hydrolyse la gélatine (**Edison et Martin, 2012**). Ce processus se produit par deux réactions séquentielles :

- Dans la première réaction, la gélatinase dégrade la gélatine en polypeptides :



- Dans la seconde réaction, les polypeptides sont convertis en acides aminés.



La souche à tester a étéensemencée dans des tubes contenant de la gélatine nutritive (**Annexe1**) ensuite incubée à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Après incubation, les tubes ont été mis dans le réfrigérateur à 4°C pendant 30 minutes.

L'aspect liquide du milieu montre que la gélatine présente dans le milieu a été hydrolysée par la souche grâce à sa propre gélatinase.

2.2.7. Conservation des souches de *Pseudomonas* fluorescentes :

Les souches de *Pseudomonas* identifiées ont été repiquées dans des tubes de gélose King B inclinée et incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures. Dès qu'une croissance a été observée les cultures ont été conservées dans le réfrigérateur à 4°C jusqu'à réactivation.

2.2.8. Production et extraction des métabolites à partir des souches de *Pseudomonas* antagoniste :

L'antagonisme microbien (la méthode directe) a été effectué dans la gélose King B, ce qui nous montre que le métabolite susceptible d'avoir un effet inhibiteur sur les souches tests de Staphylocoques pourrait être des pyoverdines.

Ces derniers ont été produits et extraits selon une méthode référenciée.

2.2.8.1. Production et extraction des pyoverdines :

La production et l'extraction de ces métabolites microbiens ont été effectuées selon la méthode suivie par **Dahah (2017)**, décrite par **Meyer et Abdallah (1978)**.

Elle consiste àensemencer la souche performante des *Pseudomonas* (P₂₁) sélectionnée pour la production de la pyoverdine dans des tubes contenant 3 ml de milieu King B liquide et incubée à 30°C pendant 24 heures.

Après incubation, les tubes ont été versés dans des flacon de 250 ml contenant 80 ml du milieu King B liquide puis incubés à 30 °C pendant 40 à 48 heures sous agitation continue de 180 tours par minute.

Ensuite, les cultures ont été centrifugées à 6000 tours par minute pendant 15 minutes à 4°C, les surnageant ont été par la suite récupérés et filtrés à travers un papier filtre.

Après filtration, le phénol/ chloroforme (v/v) à raison de ½ le volume du surnageant a été mélangé avec le surnageant filtré. Le mélange a été agité puis laissé pour être séparé en formant deux phases (organique et aqueuse).

A près décantation, la phase organique a été retenue et mélangé avec 3/2 le volume du surnageant d'éther diéthylique puis agitée et laissé pour se décanter pendant environ 3 heures.

La phase organique a été ensuite filtrée et concentrée à sec par un évaporateur rotatif à 34.6°C (**Figure 26**).

1. Culture de la souche *Pseudomonas* sur milieu King B liquide



2. Centrifugation à froid (6000 tpm / 15 min 4°C).



3. Extraction par l'éther diéthylique.



4. Extraction par le mélange phénol/chloroforme.



5. Séchage de l'extrait par un évaporateur rotatif.

Figure 26 : Schéma synthétique illustratif du processus d'extraction des pyoverdines.

2.2.9. Caractérisation des extraits bactériens :**2.2.9.1. Identification des pyoverdines par spectrophotométrie UV – Visible :**

Cette analyse a été faite dans le but de détecter la présence des pyoverdines dans l'extrait obtenu.

Ce dernier a été mis dans une solution de méthanol puis mis dans une cuve et introduit dans le spectrophotomètre. Le balayage spectral a été effectué entre 200 et 500 nm afin de déterminer le spectre d'absorption de ces métabolites.

Chapitre II :

Résultats & Discussion

Chapitre II : Résultats & Discussion

1. Etude, recherche et identification des souches de Staphylocoques :

1.1. Identification des isolats de Staphylocoques purifiées :

1.1.1. Examen macroscopique des Staphylocoques :

Après incubation, les deux souches de Staphylocoques (la souche isolée « SI » et la souche référenciée provenant du laboratoire « SH ») ont présenté une croissance sur le milieu Chapman. Des colonies pures de petite taille ont été observées avec fermentation du mannitol présent dans le milieu qui se traduit par un virage du rouge de phénol du milieu du rouge vers le jaune (**Figure 27**).

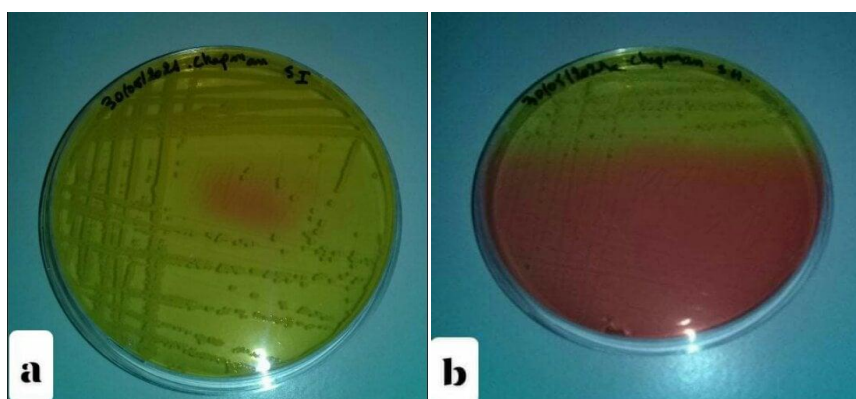


Figure 27 : Aspect macroscopique des colonies des souches de Staphylocoques sur milieu Chapman.

a : souche « SI ». *b* : souche « SH ».

En raison de leur caractère halophile, ces germes ont la capacité à se développer dans des milieux sélectifs tels que le milieu Chapman contenant une teneur élevée en sels (7.5% de NaCl) (**Morgene, 2018**).

1.1.2. Examen microscopique des Staphylocoques :

Après réalisation de la coloration de Gram, des petits cocci à Gram positif groupés en amas (forme des grappes de raisin) ont été observés sous microscope chez les deux souches (**Figure 28**).

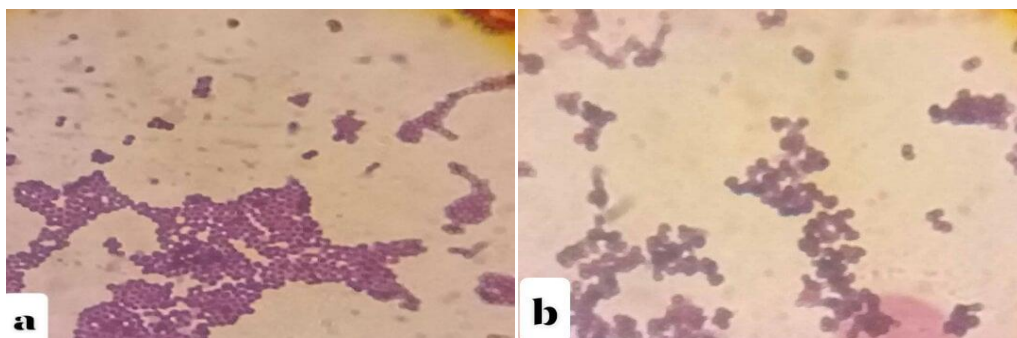


Figure 28 : Observation microscopique des souches de Staphylocoques x100.

a : souche « SI ». *b* : souche « SH ».

Ces sont des bactéries en forme de coques (sphérique) immobiles qui peuvent être isolées ou groupées en diplocoques ou le plus souvent en amas évoquant la forme dite en grappe de raisins. Le diamètre des cellules varie entre 0.5 et 1µm. A la coloration de Gram, la paroi épaisse et riche en peptidoglycanes fait apparaître leurs cellules en violet, les classant ainsi dans le groupe des bactéries à Gram positif (**Morgene, 2018**).

1.1.3. Recherche de la catalase et de l'oxydase :

Les deux souches de Staphylocoques ont présentées une effervescence remarquable lors de leur réaction avec le peroxyde d'Hydrogène (H₂O₂) (**Figure 29**). Elles sont toutes catalase positif.

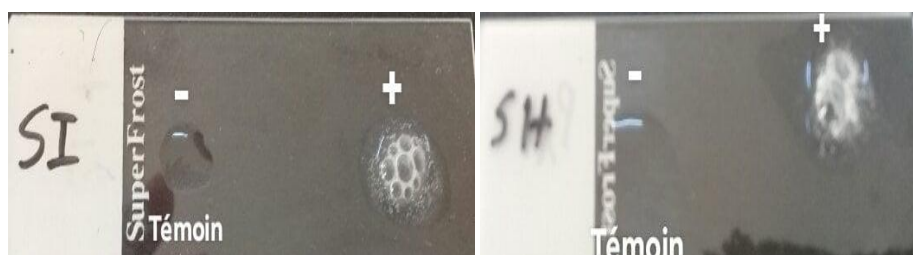


Figure 29 : Aspect du test de la catalase chez les souches de Staphylocoques.

Chez ces souches le test d'oxydase était négatif en raison de l'absence de la couleur violette caractéristique, ceci pourrait être expliqué par le fait qu'elles n'ont pas oxydé le N-diméthyl-paraphénylène diamine imprégné dans les disques. Elles sont oxydase (-) (**Figure 30**).

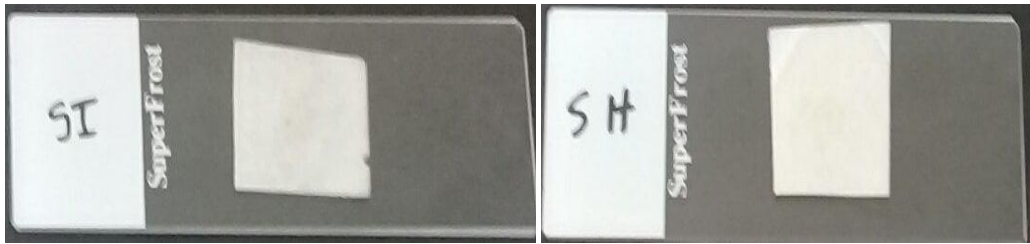


Figure 30 : Aspect du test de l'oxydase chez les souches de Staphylocoques.

Au niveau de leurs caractères phénotypiques, les Staphylocoques sont des bactéries catalase positive. La plupart des espèces sont aéro-anaérobies facultatives (Morot-Bizot, 2006).

1.1.4. Recherche de la coagulase :

Après incubation, un caillou a été formé dans le plasma chez les deux souches de Staphylocoques ce qui signifie qu'elles ont pu coaguler le fibrinogène contenu dans ce plasma en fibrine grâce à leur propre enzyme « coagulase (Staphylocoagulase) ». Elles sont donc dites coagulase positive (**Figure 31**).

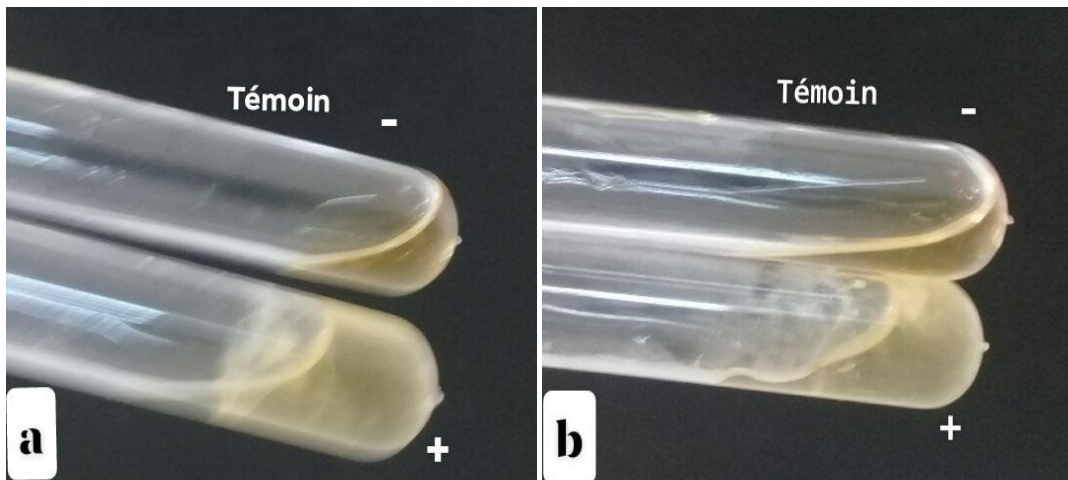


Figure 31 : Aspect du test de la coagulase chez les souches de Staphylocoques.

a : souche « SI ». *b* : souche « SH ».

Par conséquent, il est plus probable que les deux souches de Staphylocoques font parti de l'espèce « *Staphylococcus aureus* ».

Le test de la coagulase en tube est la méthode de référence pour distinguer *S.aureus* et les autres Staphylocoques à coagulase positive (ex : *S.intermedius*) des Staphylocoques à coagulase négative (Fonsale *et al.*, 2003).

La protéine coagulase est un déterminant phénotypique important et considéré comme un facteur de virulence majeur de *S.aureus* (Basil *et al.*, 2014).

1.1.5. Identification biochimique classique des souches de Staphylocoques :

1.1.5.1. Fermentation des sucres et production de gaz sur milieu T.S.I :

Chez les deux souches, un virage de couleur dans la totalité de la gélose (culot et pente) a été observé (du rouge vers le jaune) issu d'une acidification de ce milieu suite à la fermentation des sucres sans production du gaz ni de H₂S (Figure 32).

Elles sont donc : glucose (+), Saccharose (+), lactose (+), gaz (-) et H₂S (-).

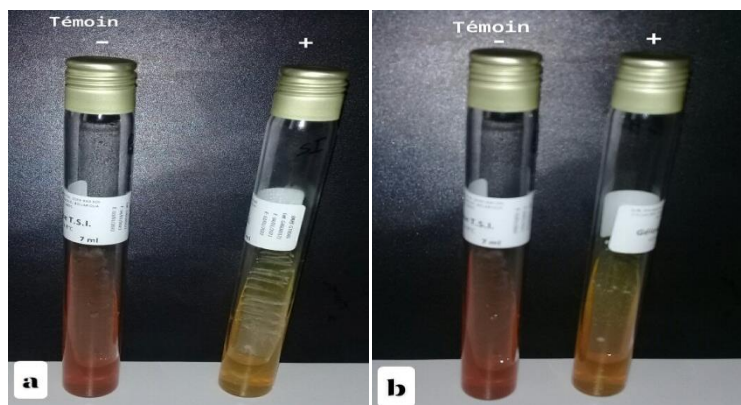


Figure 32 : Aspect du milieu T.S.I chez les souches de Staphylocoques après incubation.

a : souche « SI ». b : souche « SH ».

1.1.5.2. Test de la fermentation du mannitol et la mise en évidence de la mobilité :

Comme dans le milieu Chapman, un virage de couleur du rouge vers le jaune a été remarqué dans le milieu mannitol mobilité chez les deux souches grâce à la fermentation du mannitol ce qui a provoqué une acidification du milieu.

La croissance des deux souches de Staphylocoques a été observable seulement au niveau de la piqûre centrale d'ensemencement (**Figure 33**).

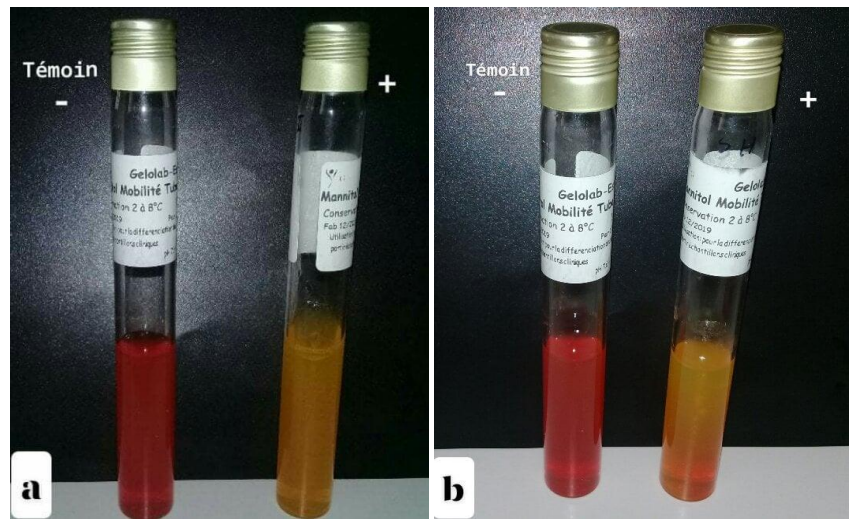


Figure 33 : Aspect du milieu mannitol mobilité chez les souches de Staphylocoques.

a : souche « SI ». *b* : souche « SH ».

Elles sont donc dites : mannitol (+) et immobiles.

1.1.5.3. Test de nitrate réductase :

Après la mise des réactifs NIT 1 et NIT 2 dans le bouillon nitraté ensemencé avec les souches tests des Staphylocoques, une coloration rouge a apparue immédiatement (**Figure 34**).

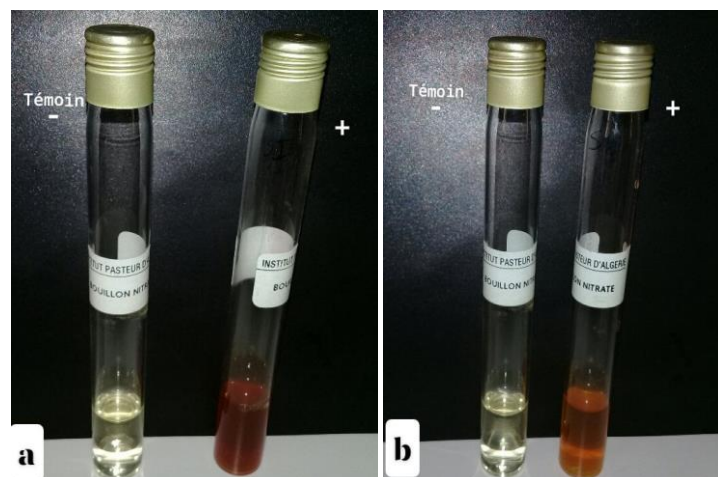


Figure 34 : Aspect du bouillon nitraté chez les souches de Staphylocoques.

a : souche « SI ». *b* : souche « SH ».

Ces souches ont par conséquent l'enzyme de nitrate réductase permettant de catalyser la réaction de transformation des nitrates en nitrites, elles sont dites : nitrate réductase (+).

1.1.6. Identification confirmative de l'isolat de Staphylocoque par galerie API Staph :

Après incubation de l'isolat à identifier dans la galerie et l'ajout des réactifs dans les micro-tubes correspondants, la lecture de la galerie a été faite en se référant au tableau d'identification (**Annexe 4**).

Les résultats montrent que l'isolat a fermenté la majorité des glucides avec une légère fermentation du lactose tandis que les autres glucides comme : le xylitol, le D-mélibiose, le raffinose et le xylose n'ont pas été fermenté. Cette souche a montré une réaction positive vis-à-vis les tests de : NIT, PAL, VP, NAG, ADH et URE (**Figure 35**).



Figure 35 : Identification de la souche isolée par galerie API Staph.

Le **tableau 5** résume les résultats d'identification biochimique obtenus.

Tableau 5 : Résultats des tests biochimiques pour l'identification de l'isolat de Staphylocoques.

Tests	Réactions / Enzymes	Résultats
GLU	Fermentation du D-glucose	+
FRU	Fermentation du D-fructose	+
MNE	Fermentation du D-mannose	+
MAL	Fermentation du maltose	+
LAC	Fermentation du lactose	+
TRE	Fermentation du D-tréhalose	+
MAN	Fermentation du D-mannitol	+
XLT	Fermentation du xylitol	-
MEL	Fermentation du D-mélibiose	-
NIT	Réduction des nitrates en nitrites	+
PAL	Phosphatase alcaline	+
VP	Production d'acétyl méthyl-carbonyl	+
RAF	Fermentation du raffinose	-
XYL	Fermentation de xylose	-
SAC	Fermentation de saccharose	+
MDG	Fermentation de alpha-méthyl-D-glucosamine	-
NAG	Fermentation de N-acétyl-glucosamine	+
ADH	Arginine dihydrolase	+
URE	Uréase	+
OX	Oxydase	-

(+) : Réaction positive.

(-) : Réaction négative.

En se basant sur le tableau d'identification (**Annexe 4**), il paraît que l'isolat fait parti de l'espèce *Staphylococcus aureus*.

Des résultats similaires ont été obtenus par **Chaalal**, *S.aureus* fermentent plusieurs sucres, l'attaque de ces derniers se traduit par le virage de couleur vers le jaune. Le virage de couleur du rose vers le rouge indique la réduction des nitrates en nitrites. Le virage du jaune vers le rose désigne la présence d'arginine dihydrolase (ADH⁺) et de l'uréase (URE⁺). Pour la production d'acétoïne (VP⁺) par *S.aureus* se traduit par la couleur violette (**Chaalal, 2013**).

2. Etude, recherche et identification des *Pseudomonas* spp fluorescents :

2.1. Isolement et purification des *Pseudomonas* fluorescents :

Après 48 heures d'incubation, 26 isolats fluorescents de *Pseudomonas* ont été sélectionnés sur le milieu King B à partir des trois échantillons, le **tableau 6** montre la distribution des isolats dans les trois échantillons.

Tableau 6 : distribution des isolats fluorescents dans les racines des graminées sauvages des trois régions.

Echantillon (E)	Zone de Stidia (E ₁)	Zone de Mezaghran (E ₂)	Zone de (UMAB) (E ₃)
Nombre des isolats	1	14	11

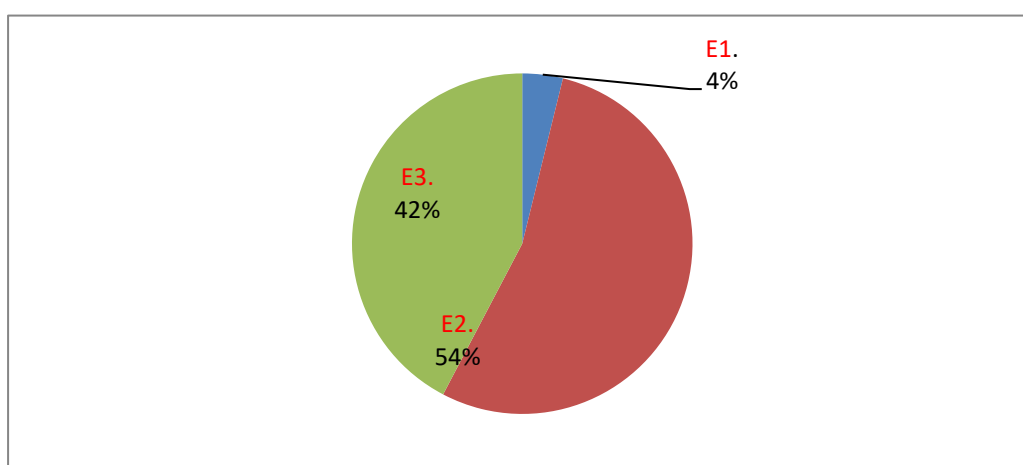


Figure 36 : Répartition des isolats fluorescents dans les trois sites.

Lors de la purification de ces derniers sur le même milieu, les isolats purifiés apparaissent fluorescents grâce à la production d'un pigment caractéristique de couleur jaune verdâtre (**Figure 37**).

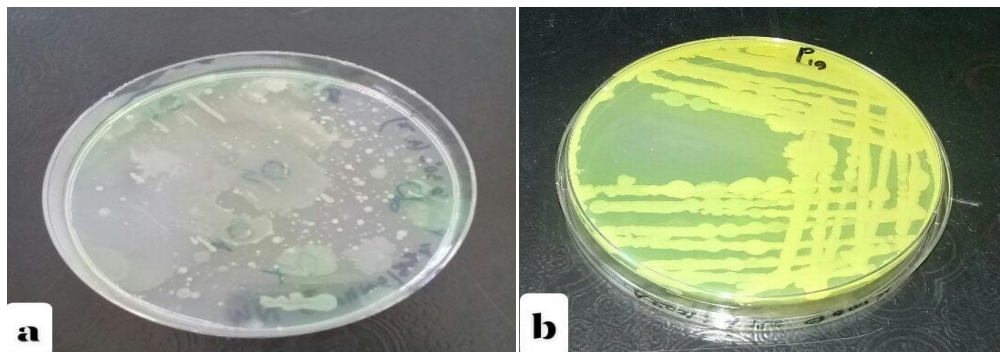


Figure 37 : Aspect macroscopique des isolats de *Pseudomonas*.

a : colonies obtenues après isolement. *b* : colonie obtenue après purification.

Le groupe des *Pseudomonas* spp fluorescents sécrète des pigments qui sont des sidérophores à fluorescence jaune verdâtre appelés « pyoverdines » (**Bikram et al., 2018**).

2.2. Identification présumptive des isolats purifiés de *Pseudomonas* fluorescents :

2.2.1. Etude morphologique :

Après la coloration des frottis avec la fucshine et la réalisation des observations microscopiques, parmi les 26 isolats 14 souches présentaient sous microscope des bacilles purs fins et droits dépourvus de spores (**Figure 38**).

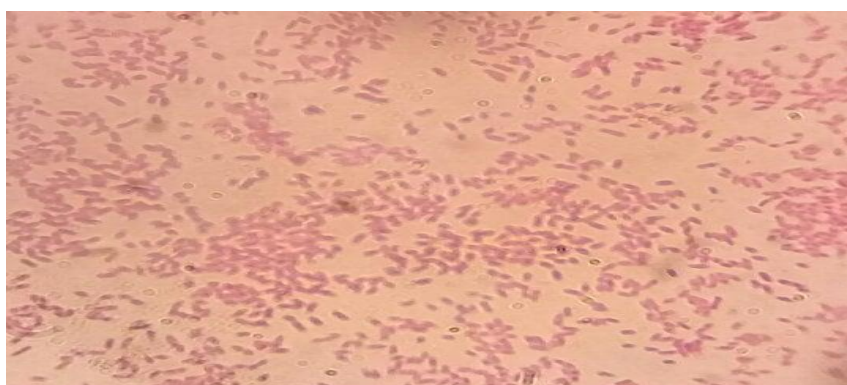


Figure 38 : Observation microscopique d'un des isolats des *Pseudomonas* fluorescents après coloration simple (x100).

2.2.2. Test de Fermentation des sucres et production de gaz sur milieu T.S.I :

Parmi les 14 souches ensemencées sur le milieu TSI, quatre souches (P₁₃, P₁₉, P₂₀ et P₂₁) n'ont pas métabolisés les substrats (glucose, saccharose et lactose) présents dans ce milieu, aucun virage de couleur n'a pas été observé ni dans la pente ni dans le culot (pas d'acidification) (**Figure 39**), ce qui indique qu'elles n'utilisent pas ces sucres par voie fermentative.

D'une façon générale, les *Pseudomonas* sont des bactéries avec un métabolisme strictement oxydatif aérobie (**Méliani, 2012**).

Chez ces quatre souches, il n'y a pas de production de gaz ni de production d'H₂S (pas de noircissement du milieu).

Ces souches suspectes sont retenues pour d'autres tests d'identification.



Figure 39 : Aspect du milieu TSI chez les souches de *Pseudomonas* suspectes.

2.2.3. Test de cytochrome oxydase et de la catalase :

Les quatre souches suspectes susceptibles d'appartenir au genre *Pseudomonas* ont présentées une réaction positive pour le test d'oxydase en raison de l'observation d'une couleur violette dans les disques ce qui indique qu'elles ont oxydés le N-diméthyl-paraphénylène diamine des disques grâce à leur propre enzyme « la cytochrome C oxydase » qu'elles possèdent.

Elles ont été également catalase (+) grâce au dégagement des bulles après l'exposition au H₂O₂ (**Figure 40**).

Le groupe des *Pseudomonas* inclut des petits bâtonnets, aérobies, catalase positive, oxydase positive (Bikram *et al.*, 2018).

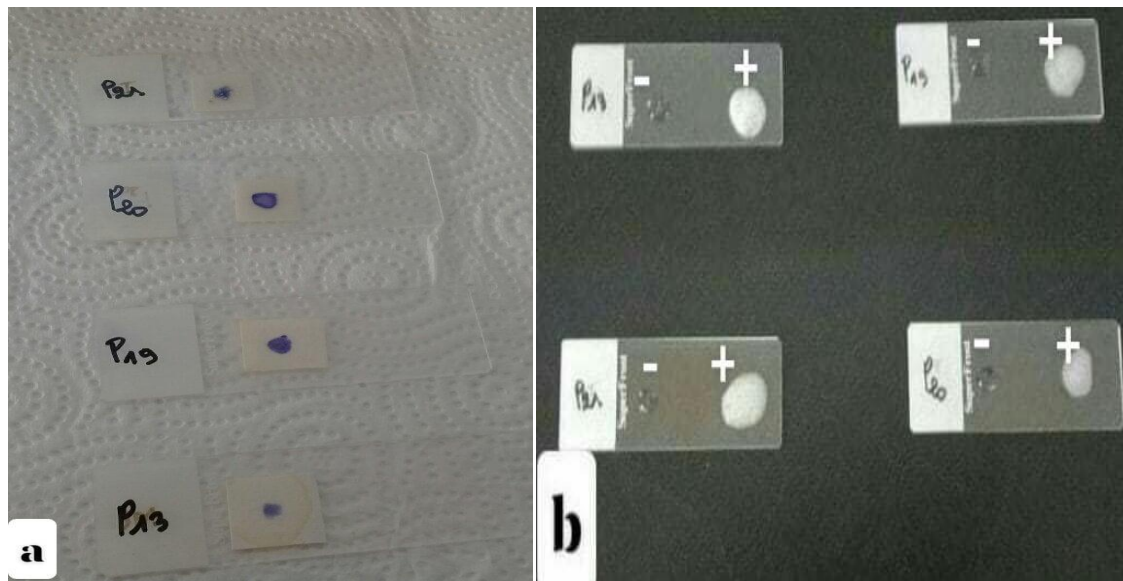


Figure 40 : Résultats des tests d'oxydase et de la catalase chez les quatre souches suspectes.

a : Test de l'oxydase. *b* : Test de la catalase.

2.2.4. Test de la croissance à 4°C et à 42°C :

Les souches suspectes ont présenté une croissance visible dans le milieu King A seulement à 4°C tandis qu'à 42°C aucun développement n'a été observé (**Figure 41**).

Cela indique que ces souches font parti du groupe des *Pseudomonas non aeruginosa*, il est probable qu'elles appartiennent à l'espèce *Pseudomonas fluorescens* ou *Pseudomonas putida*.



Figure 41 : Résultats de la croissance des souches suspectes à 4°C.

a : isolat *P*₁₃. *b* : isolat *P*₁₉. *c* : isolat *P*₂₀. *d* : isolat *P*₂₁.

Les *Pseudomonas* spp fluorescents sont des bactéries rencontrées dans l'eau et dans le sol particulièrement au niveau de rhizosphère. Dans ce dernier milieu deux espèces de groupes fluorescents des *Pseudomonas* à savoir, *P.fluorescens* et *P.putida* sont prédominants et peuvent constituer plus de 60% de la flore bactérienne (Benzina Tihar *et al.*, 2020).

2.2.5. Mise en évidence du pouvoir antagoniste des *Pseudomonas* fluorescents vis-à-vis les souches de Staphylocoques :

Les essais du test d'antagonisme *in vitro* par méthode des stries croisées sur le milieu Mueller Hinton n'ont montré aucune activité inhibitrice contre les souches de *S.aureus* indicatrices.

D'autre part, sur le milieu King B l'essai du test montre une inhibition remarquable de la croissance des souches de *S.aureus*, l'effet inhibiteur varie en fonction de l'isolat de *Pseudomonas* et les souches de *S.aureus* inhibées (Figure 42).

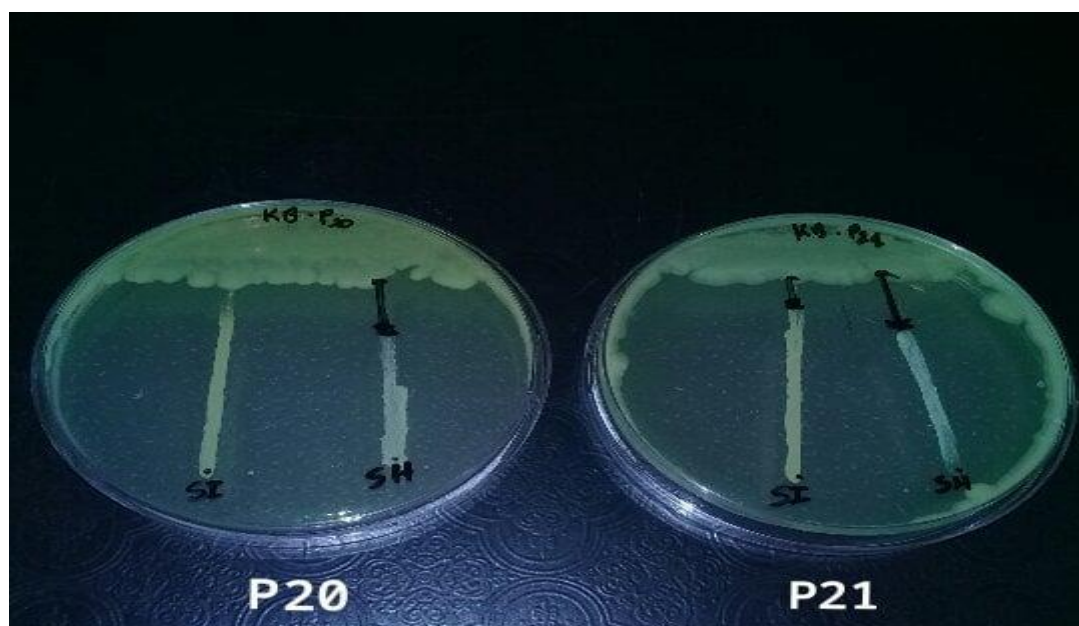


Figure 42 : Résultats de l'activité antagoniste des *Pseudomonas* fluorescents vis-à-vis les souches de *S.aureus*.

Selon les résultats présentés dans la **figure 42** ci-dessus, le test d'antagonisme montre que parmi les quatre souches de *Pseudomonas* (P₁₃, P₁₉, P₂₀ et P₂₁) deux souches P₂₀ et P₂₁ ont exercé une activité antagoniste vis-à-vis les souches de *S.aureus* (Tableau 7).

La zone d'inhibition la plus grande a été obtenue chez l'isolat P₂₁ contre les souches de *S.aureus* « SH » et « SI » tandis que l'isolat P₂₀ n'a inhibé que la souche « SH ».

Tableau 7 : Distances des zones d'inhibition (mm) entre les souches de *Pseudomonas* antagonistes et *S.aureus*.

Souche antagoniste \ Souche test	P ₂₀	P ₂₁
<i>S.aureus</i> « SH »	16 mm	17 mm
<i>S.aureus</i> « SI »	0 mm	9 mm

Ces résultats d'antagonisme ont été obtenus sur le milieu King B et pas sur le milieu Mueller Hinton, ce qui indique que ce dernier (King B) a favorisé la synthèse des métabolites antibactériens par la souche de *Pseudomonas* inhibitrice.

Ces résultats indiquent que le métabolite inhibiteur de la prolifération des souches de *S.aureus* peut être des pyoverdines car le milieu King B permet la détection de la production de ces substances en raison de la présence du Sulfate de magnésium qui fournit les cations nécessaires à l'activation la synthèse de ce types des sidérophores qui se manifeste en colorant le milieu en vert-jaune fluorescent.

Selon **Benzina Tihar et al (2020)**, dans des conditions limitant en fer, les microorganismes ont développés des systèmes d'acquisitions du fer spécifiques et performants pour assurer leur survie et de s'adapter à leur environnement, il s'agit de la sécrétion des sidérophores. Puisque la synthèse des sidérophores est réglée par le fer et souvent influencée par d'autres facteurs environnementaux, les conditions de croissance sont importantes pour maximiser leurs productions. Une étude a montré que la meilleure synthèse de sidérophores a été révélée dans le milieu King B, considéré comme un substrat carencé en fer, à travers la production d'un pigment fluorescent diffusible dans le milieu.

Les souches des *Pseudomonas* fluorescentes ont développé une stratégie active pour la prise de fer basée sur des sidérophores appelés pyoverdines qui montrent une affinité pour le Fe³⁺.

Des études menées actuellement, notamment sur le groupe des *Pseudomonas* spp fluorescents, permettent d'accroître progressivement nos connaissances sur les mécanismes permettant à ces microorganismes d'assimiler les quantités de fer nécessaire à leur prolifération (**Benzina Tihar et al., 2020**).

Certaines de ces molécules présentent également des activités antagonistes, ils restreignent donc la croissance des microorganismes qui eux présentent une faible capacité de compétition pour le fer (Galet, 2014).

2.2.6. Caractérisation de l'espèce des isolats du genre *Pseudomonas* antagonistes :

2.2.6.1. Etude microscopique :

Après réalisation de la coloration de Gram, les observations microscopiques montrent que les deux isolats P₂₀ et P₂₁ apparaissent sous forme des petits bacilles à Gram négatif fins et droits asporulés (Figure 43).

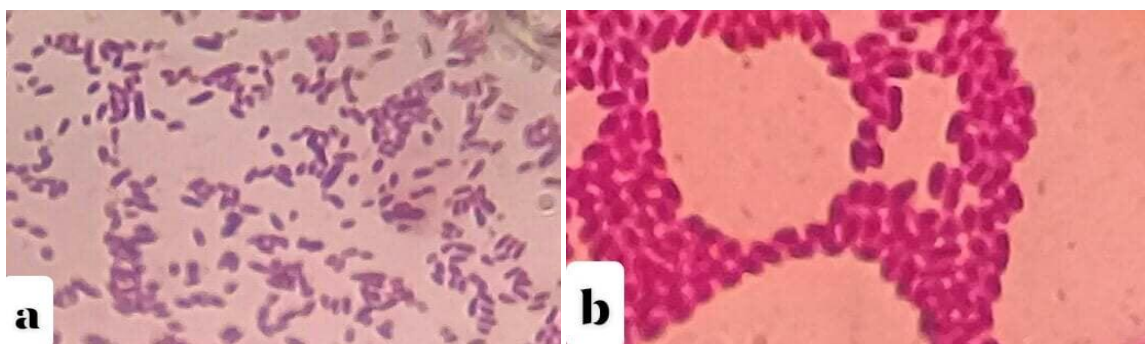


Figure 43 : Observations microscopiques des isolats de *Pseudomonas* après coloration de Gram (x100).

a : isolat P₂₀. *b* : isolat P₂₁.

2.2.6.2. Etude biochimique :

Pour déterminer l'espèce des souches de *Pseudomonas* (P₂₀ et P₂₁) antagonistes (*P.fluorescens* ou *P.putida*) des différents tests biochimiques ont été effectués, les résultats obtenus étaient comme suivant :

2.2.6.2.1. Recherche de nitrate réductase :

Après incubation et l'ajout des réactifs NIT 1 et NIT 2 dans le bouillon nitraté ensemencé, une coloration rouge immédiate apparaît chez les deux souches (**Figure 44**). Cela indique que ces isolats possèdent l'enzyme de **nitrate réductase**.

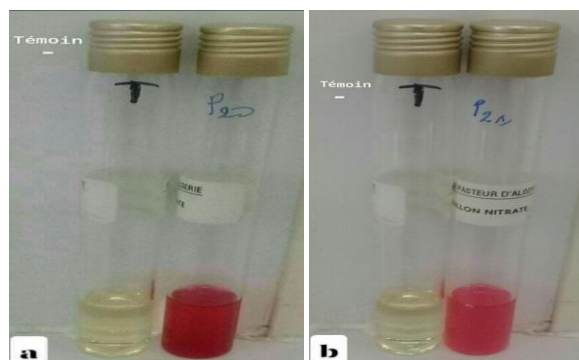


Figure 44 : Résultat du test de nitrate réductase chez les isolats de *Pseudomonas*.

a : isolat *P*₂₀. *b* : isolat *P*₂₁.

2.2.6.2.2. Recherche de l'uréase et de la production d'indole :

Après incubation, la couleur du milieu Schubert n'a pas changé chez les deux souches, sa couleur reste jaune, ce qui montre qu'elles n'ont pas l'enzyme d'uréase.

Lors de l'ajout du réactif de Kovacs, la réaction était négative vis-à-vis l'indole chez les deux isolats en raison de l'absence de la formation d'un anneau rouge à la surface du milieu.

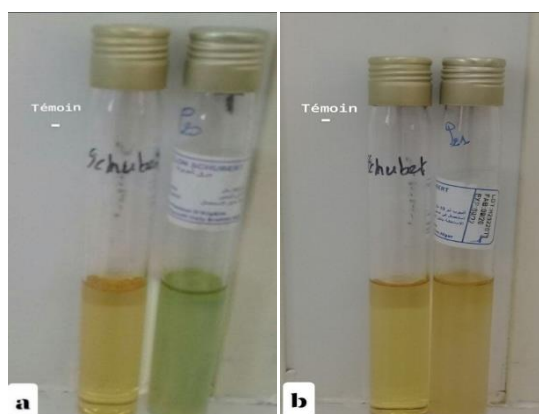


Figure 45 : Résultats du test de l'uréase et d'indole chez les isolats de *Pseudomonas*.

a : isolat *P*₂₀. *b* : isolat *P*₂₁.

2.2.6.2.3. Test de fermentation du mannitol et la mise en évidence de la mobilité :

Chez les deux souches, un virage de couleur du rouge vers le jaune orangé a été observé dans le milieu indiquant qu'elles ont fermenté le mannitol présent avec une croissance visible au-delà de la piqûre d'ensemencement ce qui explique que ces souches sont mobiles.

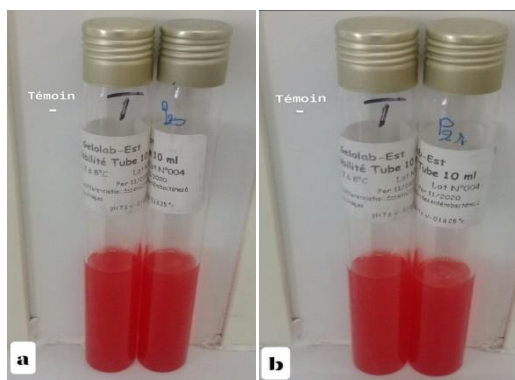


Figure 46 : Aspect du milieu mannitol mobilité chez les isolats de *Pseudomonas*.

a : isolat P_{20} . *b* : isolat P_{21} .

2.2.6.2.4. Test d'utilisation du citrate :

La couleur du milieu citrate de Simmons après incubation a viré du vert vers le bleu chez les deux isolats de *Pseudomonas* (**Figure 47**). Ils ont utilisé le citrate du milieu comme une seule source de Carbone, ce sont par conséquent citrate (+).



Figure 47 : Aspect du milieu citrate de Simmons chez les isolats de *Pseudomonas*.

a : isolat P_{20} . *b* : isolat P_{21} .

2.2.6.2.5. Test de VP / RM :

Après la répartition du bouillon Clark et Lubs dans deux tubes et l'addition des réactifs, VP1, VP2 et RM, aucune réaction positive n'a été observée chez les deux isolats, ce qui montre qu'ils n'ont pas fermenté le glucose présent dans le milieu ni par voie des acides mixtes ni par voie butylène glycolique. Ils sont donc VP(-) et RM(-).

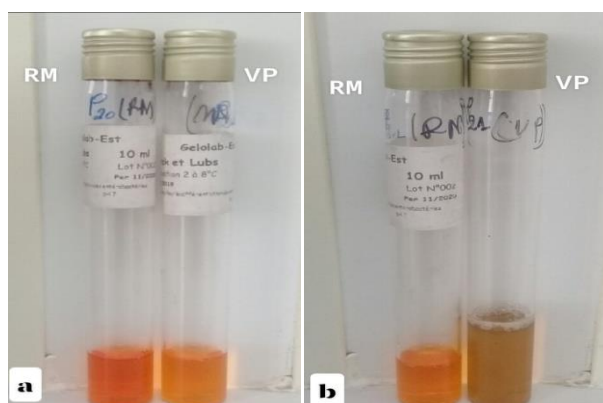


Figure 48 : Résultats du test VP / RM chez les isolats de *Pseudomonas*.

a : isolat *P*₂₀. *b* : isolat *P*₂₁.

2.2.6.2.6. Test de fermentation du lactose et de la production du gaz :

La couleur du milieu BCPL n'a pas changé, il reste violet avec une absence de la production du gaz chez les deux souches (**Figure 48**). Le lactose du milieu n'a pas été fermenté, elles sont alors lactose (-) et gaz (-).



Figure 49 : Aspect du milieu BCPL chez les isolats de *Pseudomonas*.

a : isolat *P*₂₀. *b* : isolat *P*₂₁.

2.2.6.2.7. Test d'utilisation d'arabinose :

Chez les deux isolats, la couleur du milieu Hugh Leifson a viré du bleu vers le vert jaunâtre ce qui signifie qu'ils ont pu fermenté l'arabinose contenu dans le milieu. Ils sont dits arabinose (+).

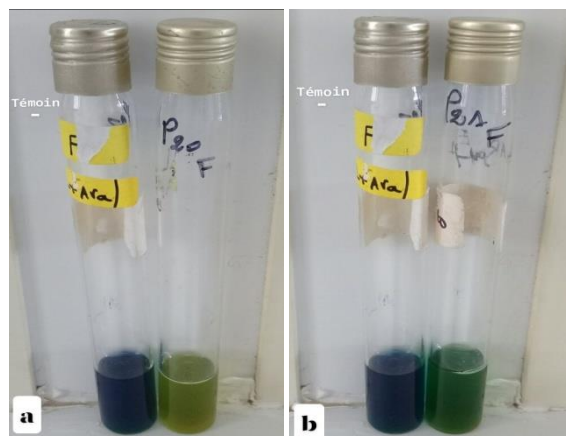


Figure 50 : Aspect du milieu Hugh Leifson chez les isolats de *Pseudomonas*.

a : isolat *P*₂₀. *b* : isolat *P*₂₁.

2.2.6.2.8. Test d'hydrolyse de la lécithine:

Sur la gélose nutritive au jaune d'œuf, un précipité blanc a été observé autour de la strie d'ensemencement chez les deux isolats (**Figure 51**) indiquant qu'ils ont dégradé la lécithine en libérant la choline formant ce précipité grâce à leur propre lécithinase.

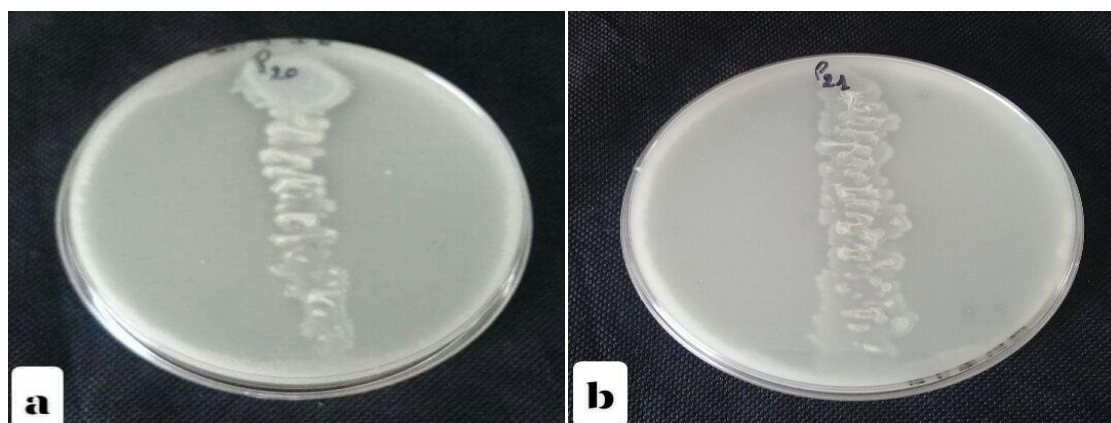


Figure 51 : Résultats du test de la lécithinase chez les isolats de *Pseudomonas*.

a : isolat *P*₂₀. *b* : isolat *P*₂₁.

2.2.6.2.9. Test d'hydrolyse de la gélatine :

Après incubation et la mise des tubes contenant la gélatine nutritiveensemencée à 4°C pendant 30 minutes, le milieu reste encore liquide chez les deux souches (**Figure 52**) montrant que la gélatine a été dégradée par l'action de la gélatinase qu'elles possèdent. Elles sont dites gélatinase (+).

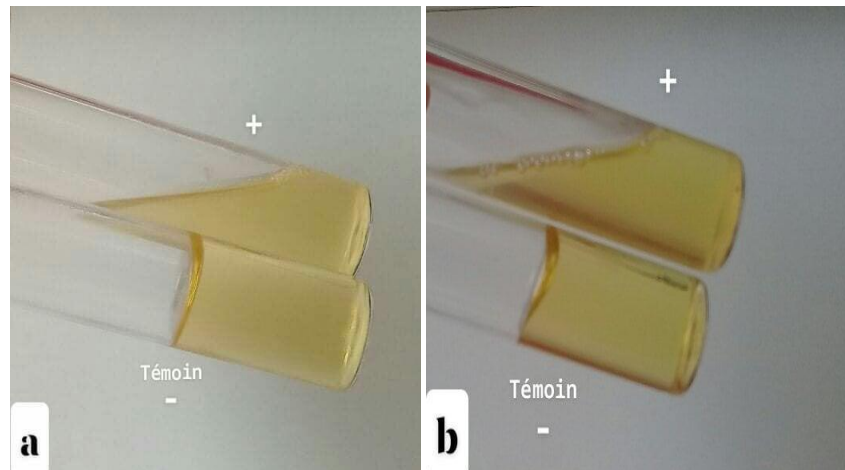


Figure 52 : Résultats du test de la gélatinase chez les isolats de *Pseudomonas*.

a : isolat *P*₂₀. *b* : isolat *P*₂₁.

Le **tableau 8** résume les résultats des tests d'identification obtenus chez les deux souches de *Pseudomonas* antagonistes.

Tableau 8 : Résultats de caractérisation biochimique des isolats de *Pseudomonas* antagonistes.

Test biochimique \ Isolat	P ₂₀	P ₂₁
Réduction des nitrates	+	+
Uréase	-	-
Production d'indole	-	-
Fermentation du mannitol	-	-
Croissance à 4°C	+	+
Croissance à 42°C	-	-
Utilisation du citrate	+	+
VP / RM	-	-
Fermentation du lactose	-	-
Production de gaz	-	-
Utilisation d'arabinose	+	+
Lécithinase	+	+
Gélatinase	+	+

(+) : Réaction positive.

(-) : Réaction négative.

D'après les résultats des tests biochimiques obtenus, il est probable que les deux isolats P₂₀ et P₂₁ appartiennent à l'espèce *Pseudomonas fluorescens*.

Cela concorde avec les résultats trouvés par **Mezaache (2012)**, ils sont définis comme étant des microorganismes aérobies utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons, caractérisés par des cytochromes oxydases, transporteurs d'électrons qui réagissent avec l'oxygène, capables d'utiliser les nitrates à la place de l'oxygène comme accepteur final d'électrons grâce à une nitrate réductase, et donc croître de manière anaérobie.

La production de protéases extracellulaires, comme évidence l'hydrolyse de la gélatine, est une propriété présente chez *P. fluorescens* mais absente chez *P. putida*, cette enzyme connue sous le nom de la « gélatinase » permet la distinction de *P. putida* des autres *Pseudomonas* spp. fluorescents.

Ils utilisent préférentiellement les acides organiques du cycle de Krebs y compris le citrate et d'autres acides. *P. fluorescens* est l'une des espèces du genre *Pseudomonas* capables d'assimiler comme seule source de carbone les sucres à 5 atomes de Carbone comme l'arabinose et le ribose.

2.3. Extraction et détermination du spectre du surnageant :

Après extraction, l'analyse spectrale UV-visible (**Figure 53**) montre que le spectre d'absorption de l'extrait obtenu a trois pics dans le domaine 200 – 350 nm.

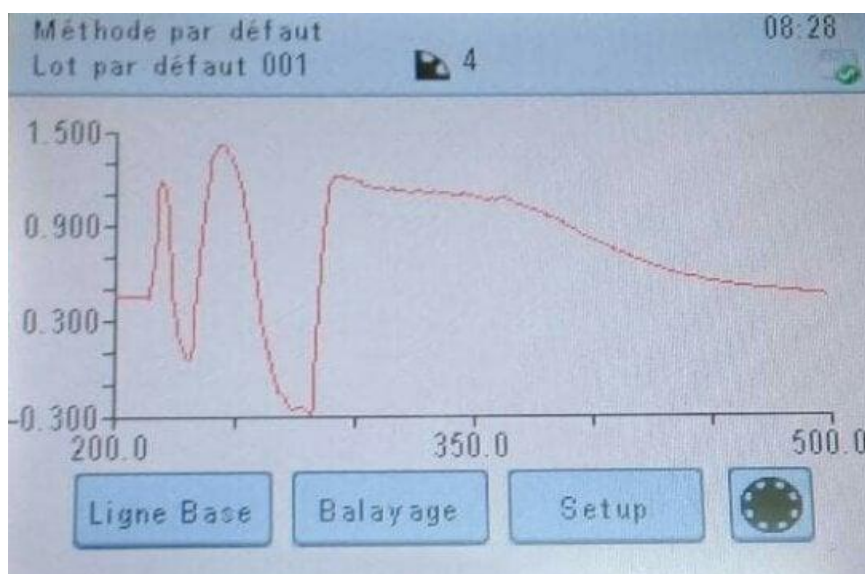


Figure 53 : Spectre d'absorption de l'extrait bactérien.

D'après les études spectrophotométrique faites par **Meyer J.M et Abdallah M.A (1978)**, le spectre d'absorption des pyoverdines a montré deux pics principaux : une à 230 nm avec un épaulement à 255 nm, l'autre à 385 nm avec des épaulements à 365 et 400 nm.

Conclusion & perspectives

Conclusion et perspectives

Ce modeste travail a pour objectif de chercher d'autres outils plus efficaces pour la lutte contre les infections récurrentes liées aux Staphylocoques suite à leur persistance et l'acquisition d'une résistance aux agents antimicrobiens usuels. Pour cela, des souches de *Pseudomonas fluorescens* ont été isolées dans le but de les utiliser comme un moyen inhibiteur de la prolifération de ces pathogènes.

Les Staphylocoques cibles ont été identifiés via des tests clés qui comprennent la coloration de Gram, la mise en culture sur milieu Chapman, recherche de la coagulase, la catalase, l'oxydase et d'autres tests complémentaires dont une galerie API STAPH. Ces germes appartiennent à l'espèce *Staphylococcus aureus*.

L'isolement des *Pseudomonas* a été réalisé à partir des échantillons de racines d'une plante graminée sauvage. Quatre isolats sélectionnés de *Pseudomonas* ont subis un test d'antagonisme sur milieu Mueller Hinton et milieu King B afin d'évaluer leur pouvoir anti-staphylococcique.

Par conséquent, deux isolats de *Pseudomonas* ont pu inhiber la croissance des souches de *S. aureus* cibles grâce à l'excrétion d'un intermédiaire antimicrobien défini sur milieu King B et pas sur le milieu Mueller Hinton. Ce résultat explique que peut être ce métabolite inhibiteur fait partie des groupes des pyoverdines qui sont aussi connues dans d'autres recherches par leur effet antagoniste contre des divers microorganismes pathogènes y compris les bactéries et les champignons par captation du fer en inhibant leur croissance.

Les isolats de *Pseudomonas* antagonistes ont été caractérisés en se basant sur des tests d'identification biochimiques pour préciser l'espèce à laquelle ils appartiennent.

Les résultats d'identification ont permis de rapprocher les deux isolats à l'espèce *Pseudomonas fluorescens*.

Cette étude a abouti à développer plusieurs perspectives :

- Il serait intéressant de réaliser une identification bien précise des isolats de *Pseudomonas* et de leurs souches cibles en se basant sur des méthodes moléculaires.
- Une extraction du métabolite originaire de l'inhibition des souches cibles suivie d'une caractérisation afin de déterminer la molécule inhibitrice correspondante.
- Une étude approfondie de l'activité antagoniste de cette molécule extraite vis-à-vis les Staphylocoques pathogènes.

Références bibliographiques

Aberoumand A (2010). A review on *Pseudomonas* in marine fish. World Journal of Fish and Marine Sciences ; 2(4) : 291 – 296.

Acar J.F, Bouanchaud D.H et BUU-HOI A (1989). Résistance bactérienne aux antibiotiques in Le minor L, véron m. Bactériologie médicale Flammarion Medecine Science, Paris, 2^{ème} édition : 213-224.

Achek R, Cantekin Z, Nabi I, Hamdi T.M, Neubauer H et El-Adawy H (2018). Emergence de la résistance aux antimicrobiens chez les Staphylocoques isolés à partir de données cliniques et échantillons d'aliments en Algérie. BMC research notes ; 11 : 663.

Alomar J (2007). Etude des Propriétés Physiologiques de *Lactococcus lactis* et de *Lactococcus garviae* pour la maîtrise de *Staphylococcus aureus* en technologie fromagère. Thèse de doctorat en Procédés biotechnologiques et alimentaires. Institut National Polytechnique de Lorraine.

Ananthanarayan P (2006). Text book of Microbiology, 7th Edition, India : 665p.

Anzai Y, Kim H, Park J.Y, Wakabayashi H et Oyaizu H (2000). Phylogenetic affiliation of the Pseudomonads based on 16S rRNA sequence. International of Systématique and Evolutionary Microbiology ; 50 : 1563 – 1589.

Arrebola E, Tienda S, Vida C, de Vicent A et Cazorle F.M (2019). Caractéristiques de fitness impliquées dans l'interaction de biocontrôle de *Pseudomonas chlororaphis* avec les plantes hôtes : l'étude cas de Pc PCL 1606. Frontiers en Microbiologie Interactions phytopathogènes ; 10(719).

Avril J.L, Dabernat H, Denis F, Monteil H, Denis F, Monteil H (2000). Bactériologie clinique. Ellipses Edition Marketing SA.

Azmoun S (2016). Epidémiologie de la résistance Bactérienne Aux Antibiotiques Au CHU De Merrakech. Thèse pour l'obtention du doctorat en Médecine. Merrakech, Faculté De Médecine Et De Pharmacie : 91p.

Baehler E, Bottiglieri M, Pechy-Tarr M, Maurhofer M et Keel C (2005). Use of green fluorescent protein-based reporters to monitor balanced production of antifungal compounds in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Journal of Applied Microbiology ;

99 : 24 - 38.

- Bannerman T.L** (2007). *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci. Manual of Clinical Microbiology : 390 – 411.
- Bascomb et Manafi** (1998). Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultatively Gram positive cocci. *Clinical Microbiology Reviews* ; 11(2) : 318 – 340.
- Basil A**, Mohammed H, et Basim M (2014). Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine and the detection of its coagulase gene (coa) using polymerase chain reaction (PCR). *Scientific Research and Essays* ; 9(2) : 864 – 868.
- Becker K**, Heilmann C, Peters G (2014). Coagulase-Negative Staphylococci. Institute of Medical Microbiology. University Hospital Munster, Germany. *Clinical Microbiology Reviews*; 4(27) : 870 – 926.
- Benchabane M** (2005). Caractérisation des effets d'antagonisme microbien et de promotion de la croissance végétale de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat d'état en Sciences de la Nature , Microbiologie. Université de Hourai, Bab Ezzouar : 230p.
- Benzina Tihar F**, Oulebsir-Mohand Kaci H, Hamid S, Reghmit A.E et Sahir-Haloune F (2020). Détermination et caractérisation des sidérophores synthétisés par quelques souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents phyto-bénéfiques. *Revue Nature et Technologie* ; 13(1) : 39 – 52.
- Bergon L** (2016). *S. caprae* et *S. lugdunensis* : rôle dans les infections ostéo-articulaires et impact du biofilm sur la sensibilité aux antibiotiques. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Toulouse III Paul Sabatier, France : 93p.
- Biedenbach D.J et Jones R.N** (2009). Multicenter evaluation *in vitro* of the activity of dalbavancin tested against Staphylococci and Streptococci in 5 European countries : results from the DECIDE Surveillance Program (2007). *Diagnostic microbiology and infectious diseases* ; 64 : 177 – 184.
- Bikram N**, Sabin B et Jiban S (2018). Identification of *Pseudomonas fluorescens* using different biochemical tests. *International Journal of Applied Biology* ; 2(2) : 27 – 31.
- Blaiotta G**, Pennacchia C, Villani F, Ricciardi A, Tafalo R, Parente E (2004). Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative Staphylococci in traditional fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* ; 97 : 271 – 284.

- Blumer C et Haas D** (2000). Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives Microbiology* ; 173 : 170 - 177.
- Boles B.R et Horswill A.R** (2011a). Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends in Microbiology* ; 19 : 449 – 455.
- Boles B.R et Horswill A.R** (2011b). Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends in Microbiology* ; 19 : 449 – 455.
- Bornert G** (2000). Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. *Revue Médicale* ; 151(11) : 1003 – 1010.
- Brahimi L** (2013). Sensibilité aux Antibiotiques des Entérobactéries isolées d'infections urinaires. Thèse pour l'obtention du doctorat en Pharmacie. Université Mohammed V – Souissi, Rabat : 96p.
- Brenner D.J**, Krieg N.R, Staley J.T et Garrity G.M (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ; volume 2, 2^{ème} édition.
- Brodhagen M**, Henkels M.D et Loper J.E (2004). Positive autoregulation and signaling properties of pyoluteorin, an antibiotic produced by the biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology* ; 70 : 1758 – 1766.
- Brodhagen M**, Paulsen I et Loper J.E. (2005). Reciprocal Regulation of Pyoluteorin Production with Membrane Transporter Gene Expression in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology* ; 71(11) : 6900 - 6909.
- Budzikiewicz,H** (1993). Secondary metabolites from fluorescent *Pseudomonas*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews* ; 104 : 209 - 228.
- Byrd A.L**, Belkaid Yet Segre J.A (2018). The human skin microbiome. *National Reviews Microbiology* ; 16(3) : 143 – 155.
- Casey A**, Lambert P et Elliott T (2007). Staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents* ; 29 : 23 – 32.
- Chaalal W** (2013). Occurrence et profil d'antibiorésistance des *Staphylococcus aureus* isolés de produits alimentaires. Mémoire pour l'obtention du diplôme de magister en Sciences Biologiques. Université d'Es-Senia Oran : 74p.

Chaker H (2012). Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites du tryptophane. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat en Médecine. Université de Grenoble.

Chevrier C (2019). Suivi Therapeutique Pharmacologique des Béta-lactamines chez le patient de soins critiques : Atteintes Des Concertations Cibles et Variabilité. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en Pharmacie. Faculté de Pharmacie, Marseille : 98p.

Chibi A (2015). Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université de Tlemcen :79p.

Clave D (2011). Fiche technique bactériologie *Pseudomonas aeruginosa* centre toulousain pour le contrôle de qualité en biologie clinique.

Couture B (1990). Etude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical. Bactériologie Médicale, Paris : 13 – 151.

Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I et Penades J.R (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein invilved in biofilm formation. Journal of bacteriology ; 183 : 2888 – 2896.

Dahah H (2017) Etude de l'effet antimicrobien et antioxydant des métabolites secondaires secrétés par des *Pseudomonas* originaires des conditions extrêmes. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat en Biologie. Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem : 114p.

Delarras C (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : 476p.

Dembélé M (2005). Identification et caractérisation des isolats de *Staphylococcus coagulase* négative provenant du lait de vache. Etudes supérieures en vue de l'obtention du grade de maître de Sciences vétérinaires. Université de Montréal : 72p.

Denis M.T (2007). Evaluation contrôlée du test IDI-MRSA pour la détection de la colonisation par *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline dans divers échantillons cutanéomuqueux. Journal de Microbiologie Clinique ; 45(4) : 1098 – 1109.

Deziel E, Lepine F, Milot S, He J, Mindrinos M.N, Tompkins R.G et Rahme L.G (2004). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A ; 101 : 1339- 1344.

Deziel E, Gopalan S, Tampakaki A.P, Lepine F, Padfield K.E, Saucier M, Xiao G, et Rahme L.G (2005). The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Molecular Microbiology* ; 55 : 998 - 1014.

Diggle S. P, Matthijs S, Wright V.J, Fletcher M.P, Chhabra S.R, Lamont I.L , Kong X,

Hider R.C, Cornelis P, Camara M et Williams P (2007). The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chemical Biology* ; 14 : 87 - 96.

Dubern J. F et Diggle S.P (2008). Quorum sensing by 2-alkyl-4quinolones in

Pseudomonas aeruginosa and other bacterial species. *Molecular Biosystematic* ; 4: 882 - 888.

Dubuis C, Keel C et Haas D (2007). Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. *European Journal of Plant Pathology*. KPNV.

Dwivedi D et Johri B.N (2003). Antifungals from fluorescent pseudomonads: Biosynthesis and regulation. *Current Science* ; 85 : 1693 – 1703.

Ebright J.R, Penugonda N et Brown W (2004). Clinical experience with *Staphylococcus lugdunensis* bacteremia : a retrospective analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* ; 48 : 17 – 21.

Edison E et Martin J (2012). Gelatin Hydrolysis Test Protocol. *American Society for Microbiology* : 1 – 7.

El Amri J, Elbadaoui K, Zair T, Bouharb H, Chakir S et Alaoui T (2014). Etude de l'activité antibactérienne de *Teucrium capitatum L* et l'extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testées. *Journal des Biosciences Appliquées* ; 82 : 7481 – 7492.

Ercolini D, Russo F, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G et Villani F (2007). Simultaneous detection of *Pseudomona fragi*, *P. lundensis* and *P. putida* from meat by use of a multiplex PCR assay targeting the car A gene. *Applied Environmental Microbiology* ; 7(37) :

2354 – 2359.

Eveillard M (2007). Politique de dépistage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline à l'admission : adaptation à la diversification des facteurs de risque de portage, conséquences de cette politique pour les indicateurs de surveillance et la transmission. Thèse de doctorat en Biologie Cellulaire. Université d'Angers : 159p.

Faille A (2010). Identification de composés naturels contre *Saprolegnia* sp un champignon pathogène en Aquaculture. Mémoire en vue de l'obtention du grade de maître de science en Microbiologie et Immunologie. Université de Montréal : 68p.

Fauchere J.L et Avril J.L (2002). Bactériologie Générale et Médicale. Ellipes, Paris :
213 – 217.

Fernandez D. U, Fuchs R, Schäfer M, Budzikiewicz H et Meyer J.M (2003). The pyoverdinin of *Pseudomonas fluorescens* G173, a novel structural type accompanied by unexpected natural derivatives of the corresponding ferribactin. Z. Naturforsch ; 58(1-2) :

1 - 10.

Fernandez-Gerlinger M.P et Mainardi J.L (2014). Nouvelles Associations dans le Traitement des Infections Graves à Cocci à Gram Positif. Journal des Anti-infectieux ; 16 :

18 - 23.

Fernandez M, Porcel M, de la Torre J, Molina Henares M.A, Daddaoua A, Llamas M.A, Roca A, Carriel V, Garzon I, Ramos J.L, Alaminos M et Duque E (2015). Analysis of the pathogenic potential of nosocomial *Pseudomonas putida* strains. Frontiers Microbiology ; 6 : 871.

Fgaier H et Eberl J.E (2010). A competition model between *Pseudomonas fluorescens* and pathogens via iron chelation. Journal of Theoretical Biology ; 263: 566 - 578.

Fonsale N, Bes M, Verdier I, Carricajo A, Ploton C, Aubert G, Etienne J, Vandenesch F et Freydiere A.M (2003). Specific Identification of *Staphylococcus aureus* by Staphychrom II, a Rapid Chromogenic Staphylocoagulase Test. Journal of Clinical Microbiology ; 5(42) :

1962 – 1964.

Foster T.J et Hook M (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiology ; 6 : 484 – 488.

Freney J, Kloos W, Hajek V, Webster J, Bes M, Brun Y et Vernozy-Rozand C (1999). Recommended minimal standards for description of new *Staphylococcal* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ; 49 : 489 – 502.

Freney J, Brun Y, Bes M, Meugnier H, Grimont F, Grimont P.A, Nervi C et Fleurette J (1988). *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ; 38 : 168 – 172.

Gade N.D et Qazi M.S (2013). Fluoroquinolone therapy in *Staphylococcus aureus* infections : Where do we stand ?. *Journal Laboratory Physicians* ; 5 : 109 – 112.

Galet J (2014). Vers la compréhension des dialogues microbiens dans l'écosystème du sol : étude de l'interaction entre *Streptomyces* et *Pseudomonas*. Thèse pour l'obtention du titre de docteur en Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes. Université de Lorraine : 111p.

Gallagher L. A, McKnight S.L, Kuznetsova M.S, Pesci E.C et Manoil C (2002). Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* ; 184: 6472 - 6480.

Gao S.S, Hothersall J, Wu J, Murphy A. C, Song Z, Stephens E. R, Thomas C. M.,

Crump M. P, Cox R. J, Simpson T. J et Willis C. L (2014). Biosynthesis of Mupirocin by *Pseudomonas fluorescens*. NCIMB 10586 Involves Parallel Pathways. *Journal of the American Chemical Society* ; 136 (14) : 5501 - 5507.

Garrett T.R, Bhakoo M et Zhang Z (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* ; 18 : 149 – 1056.

Garrity G.M, Johnson K.L, Bell J et Searles D.B (2007). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2^{ème} Edition. New York.

Gibson J, Sood A, et Hogan D.B (2009). *Pseudomonas aeruginosa Candida albicans* Interactions: Localization and Fungal Toxicity of a Phenazine Derivative. *Applied and Environmental Microbiology* ; 75 : 504 - 513.

Gomila M, Pena A, Mulet M, Lalucat J et Garcia-Valdés E (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers Microbiology* ; 6 : 214.

Gonzalez C, Rubio M, Romeo-Vivas J, Gnzaldez M et Picazo J.J (1999). Bacteremic pneumonia due to *Staphylococcus aureus* : A comparison of disease caused by methicillin resistant and methicillin susceptible organims. *Clinical Infectious Diseases*. 29(5) :

1171 – 1177.

Gotz D, Bennerman T et Schleifer K.H (2006). The genera *Staphylococcus* and *Macrocooccus*. The procaryotes : Volume 4 : Bacteria : Firmicutes, Cyanobacteria : 5 – 75.

Gram L, Melchiorsen J, Spanggaard B, Huber I et Nielsen T.F. (1999). Inhibition of *vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied Environmental Microbiology* ; 65: 969 - 973.

Gross M, Cramton S.E, Gotz F et Peschel A (2001). Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infection and immunity* ; 69 : 3423 – 3426.

Grunfeld J.P (1994). Dictionnaire de Médecine Flammarion. Médecine-Sciences.

Haas D et Keel C (2003). Regulation of antibiotic production in rootcolonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 41 : 117 - 153.

Hajek V, Meugnier H, Bes M, Brun Y, Fielder F, Chmela Z, Lasne Y, Fleirette J et Freney J (1996). *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *Bovis* subsp. nov., isolated from bovine nostrils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ; 46 : 792 – 796.

Harrison F, Paul J, Massey R.C et Buckling A (2008). Interspecific competition and siderophore-mediated cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* ; 2(1) : 49 - 55.

Henry-Stanley M.J, Shephred M.M, Wells C.L et Hess D.J (2011). Role of *Staphylococcus aureus* protein A in adherence to silastic catheters. *Journal of Surgical Research* ; 167 : 9 – 13.

Holloway B.W (1992). *Pseudomonas* in the late twentieth century. In ; *Pseudomonas*, Molecular Biology and Biotechnology. American Society for Microbiology, Washington :

1 – 8.

Howden B.P, Davies J.K, Johnson P.D.R, Stinear T.P, Grayson M.L (2010). Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin intermediate strains : Resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews* ; 23(1) : 99 – 139.

Huang X, Zhu D, Ge Y, Hu H, Zhang X et Xu Y(2004). Identification and characterization of *pltZ*, a gene involved in the repression of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* ; 232: 197 – 202.

Irlinger F (2008). Safety assessment of dairy microorganisms : coagulase-negative Staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* ; 126 : 302 – 310.

Keys T.F, Melton L.J, Maker M.D et Illstrup D.M (1983). A suspected hospital outbreak of pseudobacteremia due to *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of Infectious Disease.* ; 147(3) : 489 – 493.

Kipnis E, Sawa T et Wiener-Kronich J (2006). Target mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Médecine et maladies infectieuses* ; 36 : 78 – 91.

Kirner S, Hammer P.E, Hill D.S, Altmann A, Fischer I, Weislo L.J, Lanahan M, van Pée K.H et Ligon J.M (1998). Functions encoded by Pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology* ; 180(7) : 1939 - 1943.

Kitouni M (2007). Isolement des bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Thèse de doctorat d'état en Microbiologie Appliquée. Université de Mentouri de Constantine, Algérie : 176p.

Klein E, Smith D.L et Laxminarayan R (2007). Hospitalizations and deaths caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999 – 2005. *Emerging infections diseases* ; 13 : 1840p.

Kleinschmidt S, Hyuens F, Foagali J, Rathnayake I.U et Hafner L.M (2015). *Staphylococcus epidermidis* a cause of bacteremia. *Future Microbiology* ; 10(11) : 1859 – 1879.

- Kloos W.E et Veron M** (1990). Bactériologie Médicale « *Staphylococcus* et *Micrococcus* » J. Fleurette, 2^{ème} édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris : 773 – 794.
- Koksal F, Yasar H et 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.
- Kosecka-Strojek M, Sabat A.J, Akkerboom V, Becker K, Zanten E.V, Wisselink G, Miedzobrodzki J, Kooistra-Smid A.M.D et Friedrich A.W** (2019). Development and Validation of a Reference Data Set for Assigning *Staphylococcus* Species Based on Next-Generation Sequencing of the 16S-23S rRNA Region. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* ; 278(9).
- Knox J, Uhlemann A.C et Lowy F.D** (2015). *Staphylococcus aureus* infections : transmission within households and the community. *Trends Microbiology* ; 23(7) : 437 – 444.
- Kreig N.R et Manual H** (1984). Systematic Bacteriology. Williams Baltimore.
- Labbouz A et Benameur F** (2006). Efficacité des Aminocyclitolides sur l'otite moyenne chronique à l'hôpital Mohammed Boudiaf Ouargla. Etudes supérieures en Biologie. Université de Kasdi Merbah, Ouargla : 54p.
- Lamont I. L, Baere P.A, Ochsner U, Vasil A.I et Vasil M.L** (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* ; 99(10) : 7072 - 7077.
- Lamont I.L et Martin L.W** (2003). Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* ; 149 : 833 – 842.
- Laville J, Blumer C, Von Schroetter C, Gaia V, Défago G, Keel C et Haas D** (1998). Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Bacteriology* ; 180 : 3187 - 3196.
- Lee J. Y, Moon S.S et Hwang B.K** (2003). Isolation and antifungal and antioomycete activities of aeruginine produced by *Pseudomonas fluorescens* strain MM-B16. *Applied and Environmental Microbiology* ; 69 : 2023 -2031.

- Le loir Y**, Baron F et Gauthier M (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Molecular Genetic Reviews* ; 2(1) : 63 – 76.
- Lépine F**, Déziel E, Milot S et Rahme L.G (2003). A stable isotope dilution assay for the quantification of the *Pseudomonas* quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *Biochemical and Biophysical Acts* ; 1622 : 36 - 41.
- Liu C**, Bayer A, Cosgrove S.E, Daun R.S, Fridkin S.K et Gorwitz R.J (2011). Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clinical Infectious Diseases* ; 52(3).
- Maali Y** (2019). Physiopathologie des Infections Ostéo-articulaires liées aux *Staphylococcus non-aureus*. Thèse de doctorat en Microbiologie. Université de Claude Bernard, Lyon : 245p.
- Mathieu A** (2005). Diversité Fonctionnelle des *Pseudomonas* Producteurs d'Antibiotiques dans les Rhizosphères de Conifères en Pépinières et en Milieu Naturel. Mémoire pour l'obtention du grade Maître de Sciences en Microbiologie Agricole. Université de Laval, Québec : 67p.
- McDougald D**, Rice S.A, Barraud N, Steinberg P.D et Kjelleberg S (2012). Should we stay or should we go : Mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology* ; 10 : 39p.
- Meghdas I**, Hamze M, Dabboussi F, Baida N et Izard D (2003). Taxonomie de genre *Pseudomonas* : Rétrospective et actualité. *Lebanese Science Journal* ; 1(5) : 115 – 138.
- Méliani A** (2012). Contribution à l'étude de la diversité écologique et fonctionnelle des *Pseudomonas* spp. fluorescents. Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur en Sciences Biologiques. Université d'Oran : 195p.
- Meyer J.M et Abdallah M.A** (1978). The fluorescent of *Pseudomonas fluorescens* : Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. *Journal of General Microbiology* ; 107 : 319 – 328.
- Meyer J. M** (2000). Pyoverdins: pigments siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of Microbiology* ; 174 : 135 - 142.
- Mezaache S** (2012). Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Thèse pour obtenir le diplôme de doctorat en Microbiologie. Université Ferhat Abbas, Sétif : 141p.

Mingeot-Leclercq M.P, Glupczynski Y et Tulkens P.M (1999). Aminoglycosides : Activity and Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* ; 43(4) : 727 – 737.

Morad Asaad A, Ansar Qureshi M et Mujeeb Hasan S (2016). Clinical significance on coagulase-negative Staphylococci isolated from nosocomial bloodstream infections. *Infectious Diseases* ; 48 : 356 – 360.

Morea M, Baruzzi F et Cocconcelli P (1999). Molecular and Physiological Characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. *Journal of Applied Microbiology* ; 87 : 574 – 582.

Morgene M.F (2018). Modélisation *in vitro* de la colonisation nasale à *Staphylococcus aureus* ; interactions avec l'infection à rhinovirus. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat en Biologie moléculaire et cellulaire. Université de Lyon : 204p.

Moroh J.L.A (2013). Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides*. Thèse pour l'obtention du titre d'un docteur en microbiologie et biochimie. France, Université de Bretagne Occidentale : 197p.

Morot-Bizot S.C (2006). Les Staphylocoques à coagulase négative dans l'écosystème des salaisons. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat en Sciences des Aliments. Université Blaise Pascal : 105p.

Nagase N, Shimizu A, Kawano J, Yamashita K, Yoshimura H, Ishimaru M et Kojima A (2002). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* ; 64 : 1169 – 1172.

Noga E. J (1996). *Fish Disease Diagnosis and Treatment*. Mosby-Year Book, Inc. St. Louis. MO. 367p.

Nowak-Thompson B, Gould S.J et Loper J.E (1997). Identification and sequence analysis of the genes encoding a polyketide synthase required for pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Genetic* ; 204: 17 – 24.

O'Mahony MM, Dobson A.D, Barnes J.D et Singleton I (2006). The use of ozone in the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated sol. *Chemosphere* ; 63(2) : 307 – 314.

- Otto M** (2008). Staphylococcal biofilms, In : Bacterial biofilms. Springer : 207 – 228.
- Otto M** (2018). Staphylococcal Biofilms. Microbiology Spectrum ; 6(4).
- Palleroni N** (1984). Manual of Systematic Bacteriology. USA : 141 – 171.
- Palleroni N** (2010). The *Pseudomonas* story. Environmental Microbiology ; 12(6) : 1377 – 1383.
- Pant R et Mukhopadhyay A.N**(2001). Integrated management of seed and seedling rot complex of soybean. Indian Phytopathology ; 54: 345 - 350.
- Pearson J. P**, Passador L, Iglewski B.H et Greenberg E.P (1995). A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy Sciences U S A ; 92 : 1490 - 1494.
- Piette A et Verschragen G** (2009). Role of coagulase-negative Staphylococci in human disease. Veterinary Microbiology ; 134 : 45 – 54.
- Preetha R**, Jayaprakash N.S, Philip R et Bright Singh I.S (2006). Optimization of carbon and nitrogen sources and growth factors for the production of an aquaculture probiotic (*Pseudomonas* MCCB 103) using response surface methodology. Journal of Applied Microbiology ; 102: 1043 - 1051.
- Quinn P.J**, Markzey B.K, Leonard F.C, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick E (2011). Veterinary microbiology and microbial disease. John Wiley & Sons.
- Ramette A**, Frapolli M, Défago G et Moëgne-Loccoz Y (2003). Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. Molecular Plant Microbe Interactions ; 16 : 525 - 535.
- Rebiahi S.A** (2012). Caractérisation de souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leur antibiorésistance au niveau du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat en Biologie. Université de Tlemcen : 131p.
- Reimmann C**, Beyeler M, Latifi A, Winteler H, Foglino M, Lazdunski A et Haas D (1997). The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. Molecular Microbiology ; 24 : 309 – 319.

- Reimmann C**, Valverde C, Kay E et Haas D (2005). Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *Journal of Bacteriology* ; 187 : 276 - 285.
- Roch M** (2015). Induction d'une résistance aux glycopeptides par les B-lactamines chez *Staphylococcus aureus*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en Pharmacie. Université Claud Berbard, Lyon : 128p
- Rubinstein E et Keynan Y** (2014). Vancomycin revisited – 60 years later. *Frontiers Public Health* ; 2 : 217 – 232.
- Ruhe J**, Menon A, Mushatt D, Dejace P et Hasbun R (2004). Non-epidermidis coagulase-negative Staphylococcal bacteremia : Clinical predictors of true bacteremia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* ; 23 : 495 – 498.
- Ruimy R et Andremont A** (2004). Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* : mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition. *Réanimation* ; 13 :176 – 184.
- Saravolatz L.D**, Stein G.E et Johnson L.B (2011). Ceftaroline : a novel cephalosporin with activity against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases* ; 52(9) : 1156 – 1163.
- Scales B.S**, Dickson R.P, LIPuma J.J et Huffinale G.B (2014). Microbiology, genomics and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clinical Microbiology Reviews* ; 27(4) : 927 – 948.
- Selvin J**, Shanmughapriya S, Gandhimathi R, Seghal-Kiran G, Rajeetha R. T, Natarajaseenivasan K et Hema T. A (2009). Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardiopsis dassonvillei* MAD08. *Applied Microbiology and Biotechnology* ; 83 : 435 - 445.
- Soberon-Chavez G**, Lepine F et Deziel E (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnol* ; 68 : 718 - 725.
- Speranza G**, Gottardi G, Pederzoli C, Lunelli L, Canteri R, Pasquardini L, Carli E, Lui A, Maniglio D et Brugnara M (2004). Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. *Biomaterials* ; 25 : 2029 – 2037.

Stover C.K, Pham X.Q, Erwin A.L, Mizoguchi S.D, Warrenner P et Hickey M.J (2000). Complexe genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* ; 406(6799) : 959 – 964.

Suzuki M, Suzuki S, Matsui M, Hiraki Y, Kawano F et Shibayama K (2013). Genome sequence of a strain of the human pathogenic bacterium *Pseudomonas alcaligenes* that causes bloodstream infection. *Genome Announc* ; 1(5).

Tournus C (2016). Validation de l'identification des *Pseudomonas* sp. par spectrométrie de masse type MALDI-TOF via la caractérisation d'une collection de souches environnementales et cliniques. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en Pharmacie. Université de Rouen : 155p.

Trouillet-Assant S, Flammier S, Sapin A, Dupieux C, Dumitrescu O et Tristan A (2015). Mupirocin Resistance in isolates of *Staphylococcus* spp. From Nasal Swabs in a Tertiary in France. *Journal of Clinical Microbiology* ; 53(8) : 2713 - 2715.

Upadhyay A et S. Srivastava S (2008). Characterization of a new isolate of *Pseudomonas fluorescens* strain Psd as a potential biocontrol agent. *Letters in Applied Microbiology* ; 47: 98 - 105.

Vasil M.L (1986). *Pseudomonas aeruginosa* : biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *Journal of Pediatrics* ; 108 : 800 – 805.

Vasileva-Tonkova E, Sotirova A et Galabova D (2011). The effect of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens* on model bacteria strains and isolates from industrial wastewater. *Current Microbiology* ; 62(2) : 427 - 433.

Vial L, Lepine F, Milot S, Groleau M.C, Dekimpe V, Woods D.E et E. Deziel E (2008). *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis*, and *B. ambifaria* produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3rd position that is required for quorum-sensing regulation. *Journal of Bacteriol* ; 190 : 5339 - 5532.

Victoria-Samanidou S.N (2008). Multi-residue methods for confirmatory determination of antibiotics in milk. *Journal of Separation Science* ; 31(11) : 2068 – 2090.

Vijayan K.K, Bright Singh I.S, Jayaprakash N.S, Alavandi S.V, Somnath Pai S, Preetha R, J.Rajan J.J.S et Santiago (2006). A brackishwater isolate of *Pseudomonas* ps-102, a potential antagonistic

bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. *Aquaculture* ; 251 : 192 - 200.

Vincent D.G (2013). Inhibition du pathogène des salmonidés *Saprolegnia parasitica* par des bactéries aquatiques. Mémoire en vue de l'obtention du grade de Maître des Sciences en Microbiologie et Immunologie. Université de Montréal : 141p.

Visca P, Imperi F et Lamont I.L (2007). Pyoverdine siderophores : from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiology* ; 15 : 22 – 30.

Vishwajith K.P, Archana Rao K, Sangeeth S, Lakshminarayan S.A (2019). Ventilator associated pneumonia : An enduring hitch in intensive care units !! A study from a tertiary care center. *Indian Journal of Microbiology Research* ; 6 : 194 – 197.

Von Eiff C, Helimann C et Peters G (1999). New aspects in the molecular basis of polymer associated infections due to Staphylococci. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases Official Public European Social Clinical Microbiology* ; 18(12) : 843 – 846.

Von Eiff C, Jansen B, Kohnen W et Becker K (2005). Infections associated with medical devices. *Drugs* ; 65 : 179 – 214.

Walker T. S, Bais H.P, Deziel E, Schweizer H.P, Rahme, L.G, Fall R et Vivanco J.M (2004). *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiology* ; 134: 320 - 331.

Wertheim H.F, Muelles D.C, Van Leeuwen W, Van Belkum A et Verbrugh H.A (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infection Disease* ; 12 :

751 – 762.

Wilson M (1997). Biocontrol of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: Current approaches and future prospects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* ; 19 : 188 - 191.

Wylie J.L et Nowicki D.L (2005). Molecular epidemiology of community and health care associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Manitoba, Canada. *Journal of clinical microbiology* ; 43 : 2830 – 2836

Zatout A (2020). *Staphylococcus* à coagulase négative isolés au Centre Anti-Cancer de Batna : étude bactériologique, profil de sensibilité aux antibiotiques, formation de biofilm et thérapie anti-staphylococcique. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat en Microbiologie. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem : 140 p.

Zenasni A (2018). Isolement des souches de *Pseudomonas* spp fluorescents rhizosphériques à partir de sol agricole et évaluation de leur rôle dans la croissance végétale et biocontrôle des phytopathogènes. Mémoire pour l'obtention du diplôme de master en Sciences Biologiques, Microbiologie. Centre universitaire Belhadj d'Ain-Témouchent : 70p.

Zuber S, Carruthers F, Keel C, Mattart A, Blumer C, Pessi G, Gigot-Bonnefoy C, Schnider-Keel U, Heeb S, Reimann C et Haas D (2003). GacS sensor domains pertinent to the regulation of exoproduct formation and to the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Plant Microbe Interactions* ; 16 : 634 - 644.

Zylstra G.J, McCombie W.R, Gibson D.T et Finette B.A (1988). Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1 : genetic organization of the tod operon. *Applied Environmental Microbiology* ; 54(6) : 1498 – 1503.

Annexes

Annexe 1 : Les milieux de culture.○ **Bouillon nutritive**

Composition en g/l	
Peptone.....	5g.
Extrait de viande.....	1g.
Extrait de levure.....	2g.
Chlorure de Sodium.....	15g.
pH = 7.4.	

○ **Gélose nutritive :**

Composition en g/l	
Peptone.....	5g.
Extrait de viande.....	1g.
Extrait de levure.....	2g.
Chlorure de Sodium.....	5g.
Agar.....	15g.
pH = 7.4.	

○ **Gélose Chapman :**

Composition en g/l	
Extrait de viande.....	1g.
Peptone de caséine et de viande.....	10g.
Chlorure de Sodium.....	75g.
D-Mannitol.....	10g.
Agar.....	15g.
Rouge de phénol.....	0.025g.
pH = 7.4	

○ **King B solide :**

Composition en g/l	
Peptone bactériologique « B ».....	20g.
Glycérol.....	10ml.
Hydrogénophosphate de potassium anhydre (K ₂ HPO ₄).....	1.5g.
Sulfate de magnésium hydraté (MgSO ₄ 7H ₂ O).....	1.5g.
Agar.....	12g.
pH = 7.2.	

○ **King B liquide :**

Composition en g/l	
Peptone de caséine (Tryptone).....	20g.
Sulfate de magnésium.....	1.5g.
Phosphate bipotassique.....	1.5g.
Glycérol.....	10ml.
pH = 7.2.	

○ **King A solide :**

Composition en g/l	
Peptone de caséine (Tryptone).....	20g.
Sulfate de potassium.....	10g.
Chlorure de magnésium.....	1.4g.
Glycérol.....	1ml.
Agar.....	20g.
pH = 7.2.	

○ **Milieu Mueller Hinton :**

Composition en g/l	
Protéose-peptone.....	10g.
Infusion de cervelle de veau.....	12.5g.
Infusion de cœur.....	5g.
Glucose.....	2g.
Chlorure de Sodium.....	5g.
Hydrogénophosphate de Sodium.....	2.5g.
pH= 7.4.	

○ **Milieu T.S.I :**

Composition en g/l	
Extrait autolytique de levure.....	3g.
Extrait de viande.....	3g.
Peptone.....	20g.
Chlorure de Sodium.....	5g.
Lactose.....	10g.
Saccharose.....	10g.
Glucose.....	1g.
Thiosulfate de sodium.....	0.3g.
Citrate de fer ferrique.....	0.3g.
Rouge de phénol.....	24g.
Agar bactériologique.....	9g.
pH = 7.4.	

○ **Citrate de Simmons :**

Composition en g/l	
Chlorure de sodium.....	5g.
Sulfate de magnésium.....	0.2g.
Phosphate d'ammonium (POH).....	1g.
Phosphate bipotassique.....	2g.
Citrate trisodique.....	2g.
Solution de bleu de bromothymol à 1%.....	8ml.
Agar.....	15g.
pH = 6.8.	

○ **Mannitol mobilité :**

Composition en g/l	
Peptone pancréatique de viande.....	10g.
Mannitol.....	7.5g.
Nitrate de potassium.....	1g.
Solution du rouge de phénol à 1%.....	4g.
Agar.....	4g.
pH = 7.6.	

○ **Bouillon Schubert :**

Composition en g/l	
Peptone.....	10g.
Tryptone.....	10g.
Acide glutamique.....	0.2g.
Tryptophane.....	0.2g.
Sulfate de magnésium.....	0.7g.
Sulfate d'ammonium.....	0.4g.
Citrate de sodium.....	0.2g.
Mannitol.....	7.5g.
pH = 7.6.	

○ **Clark et Lubs :**

Composition en g/l	
Peptone trypsique.....	5g.
Hydrogénophosphate de potassium (K ₂ PO ₄).....	5g.
Glucose.....	5g.
pH = 7.5.	

○ **Bouillon nitraté :**

Composition en g/l	
Infusion cœur-cerveille.....	25g.
Nitrate de sodium.....	10g.

○ **BCPL :**

Composition en g/l	
Peptone.....	5g.
Extrait de viande.....	3g.
Lactose.....	10g.
Pourpre bromocrésol.....	25mg.
pH = 7.	

○ **Milieu Hugh et Leifson à base d'arabinose :**

Composition en g/l	
Tryptone.....	2g.
Chlorure de Sodium.....	5g.
Phosphate dipotassique.....	0.3g.
Bleu de bromothymol.....	0.08ml.
pH = 6.8 +/- 0.2	

N.B : Ajout du sucre d'arabinose après la stérilisation du milieu.

○ **Gélatine nutritive :**

Composition en g/l	
Extrait de viande.....	3g.
Peptone.....	5g.
Gélatine.....	120g.
pH = 6.8.	

○ **Gélose nutritive au jaune d'œuf :**

Préparation :

- Mise d'un jaune d'œuf dans 100 ml d'eau physiologique stérile et agitation du mélange.
- Ajout de 15ml de la solution du jaune d'œuf 250 ml de gélose nutritive puis agitation du mélange.
- Le milieu est coulé dans des boîtes pétri.

Annexe 2 : Les réactifs.

○ Réactifs de la coloration de Gram :

Violet de gentiane	
Phénol.....	2g.
Violet de gentiane.....	1g.
Ethanol à 90°.....	10ml.
Eau distillée.....	100ml.
Lugol	
Iodure de potassium.....	2g.
Iode métalloïde.....	1g.
Eau distillée.....	300ml.
Alcool (Ethanol)	
Fuchsine de Ziehl	
Fuchsine basique.....	1g.
Phénol.....	5g.
Ethanol à 90°.....	10ml.
Eau distillée.....	100ml.

○ Vogues Proskauer 1 (VP1) :

Hydroxyde de potassium (KOH).....	40g.
Eau distillée.....	100ml.

○ Vogues Proskauer 2 (VP) :

Alpha naphthol.....	6g.
Acide chlorhydrique concentré (HCl).....	20ml.
Ethanol.....	100ml.

○ **Rouge de méthyle :**

Rouge de méthyle.....	5g.
Ethanol à 60%.....	1L.

○ **Réactifs Nitrite 1 et Nitrite 1 :**

Nirtite 1	Acide Sulfanilique
Nitrite 2	Alpha-naphtylamine

○ **Réactif de kovacs :**

Para-dimethyl-amino-benzaldéhyde.
Acide chlorhydrique.
Alcool isoamylique.

Annexe 3 : Protocole de la coloration de Gram.

a) Préparation d'un frottis fixé :

A l'aide d'une anse de platine stérile, une colonies bactérienne est prélevée et mélangée avec une goutte d'eau distillée sur une lame de verre stérile.

La préparation est fixée et séchée soigneusement sur la flamme du bec bunsen puis refroidit.

b) Coloration du frottis :

Le violet de gentiane est mis sur la lame contenant le frottis préparé pendant une minute.

La lame est couverte avec le mordant « lugol » pendant une minute, suivi d'un rinçage avec l'eau distillée.

Le frottis est décoloré par ajout d'alcool goutte à goutte jusqu'à disparition du colorant, puis rincé avec l'eau distillée.

Une solution de fuchsine est mise sur la lame durant une minute. Ensuite, la lame est rincée avec l'eau distillée.

La lame est séchée par un passage rapide à la chaleur du bec bunsen.

Finalement, on l'observe au microscope à l'objectif x100 après ajout de l'huile à immersion.

Annexe 4 : Tableaux de lecture de la 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.

Galeries API-STAPH	O	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XYL	MEL
Staph. aureus	0	100	100	99	93	90	96	85	1	1
Staph. epidermidis	0	100	100	60	89	74	2	1	0	1
Staph. saprophyticus	0	100	100	2	99	99	94	99	1	1
Staph. cohnii	0	100	100	17	75	0	92	92	33	0
Staph. xylosum 1	0	100	100	99	27	5	72	88	1	1
Staph. xylosum 2	0	100	100	89	88	98	98	96	26	48
Staph. haemolyticus 1	0	100	1	1	99	88	95	50	1	0
Staph. haemolyticus 2	0	100	1	1	99	88	95	50	1	0
Staph. hominis 1	0	100	100	1	99	19	99	25	0	0
Staph. hominis 2	0	100	100	70	99	19	99	1	0	0
Staph. warneri	0	100	100	50	99	5	100	60	0	0
Staph. capitis	0	100	100	94	13	7	2	30	0	0
Staph. simulans	0	100	100	85	1	99	99	99	0	0
Staph. hyicus*	0	100	100	99	1	95	80	1	0	0
Staph. sciuri*	0	100	100	40	72	9	90	100	0	2
Staph. lentus	0	100	100	99	67	78	90	100	0	99
Micrococcus spp	0	11	16	4	4	0	0	0	0	0
Micrococcus varians	0	100	81	18	0	54	22	0	0	0

Galeries API-STAPH	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE
Staph. aureus	99	98	99	0	0	96	1	98	71	54
Staph. epidermidis	56	92	75	1	0	100	11	29	51	75
Staph. saprophyticus	3	8	95	0	0	100	1	54	4	95
Staph. cohnii	0	33	99	33	0	1	1	1	1	1
Staph. xylosum 1	77	22	94	1	99	99	5	5	5	11
Staph. xylosum 2	87	89	75	21	99	99	1	93	6	90
Staph. haemolyticus 1	93	50	60	0	0	99	45	96	94	10
Staph. haemolyticus 2	98	40	6	0	0	99	1	5	10	90
Staph. hominis 1	99	50	90	0	0	100	3	5	92	96
Staph. hominis 2	95	5	35	0	0	100	80	95	5	80
Staph. warneri	17	12	99	0	0	100	1	1	93	94
Staph. capitis	99	1	93	0	0	20	1	1	60	15
Staph. simulans	99	1	65	0	0	99	1	99	85	85
Staph. hyicus*	50	99	85	0	0	100	1	85	99	60
Staph. sciuri*	100	25	0	1	1	100	1	99	1	1
Staph. lentus	100	75	0	89	33	100	1	99	1	1
Micrococcus spp	31	36	36	0	4	4	0	0	4	18
Micrococcus varians	100	11	45	0	0	0	0	0	0	93