



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Benkredda Fatima – Mazari Hibat Errahmen

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Microbiologie appliquée

THÈME

**Utilisation des métabolites extracellulaires des *Pseudomonas*
fluorescents dans la lutte contre les *Staphylococcus* à
coagulase négative.**

Soutenue publiquement le 30/06/2018

DEVANT LE JURY

Président :	Mr MEKHALDI Abdelkader	Professeur	U. Mostaganem
Encadreur :	Mr DJIBAOUI Rachid	Professeur	U. Mostaganem
Examineur :	Mr BOUZNED Ahcene	MCB	U. Mostaganem
Co-encadreur 1 :	Mr DAHAH Hicham	Docteur	
Co-encadreur 2 :	Mme ZATOUT Asma	Doctorante	U. Mostaganem

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

Dédicaces

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

Nous dédions ce modeste travail :

A nos chers parents nos mères et nos pères qui ont sacrifié leur vie pour notre réussite

A nos frères et sœurs qui n'ont cessé d'être pour nous des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

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

Hiba & Fatima

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier « **Allah** » de nous avoir aidés à réaliser ce modeste travail.

Nous voudrions présenter nos remerciements à notre encadreur « **DJIBAOUI Rachid** ». Nous voudrions également lui témoigner notre gratitude pour sa patience et son aide qui nous a été précieux afin de mener notre travail à bon port. Merci

Nous tenant à remercier sincèrement Monsieur « **DAHAH Hicham** » et Madame « **ZATOUT Asma** », qui, en tant que co-encadreur de mémoire, se sont toujours montrés à l'écoute et ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'ils ont bien voulu nous consacrer.

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

Nous adressons une pensée spéciale à : **Mr Zerhoni Mustapha, Mr Arabi Abed, Mr Souane Abdelkader** et aux laborantins de l'Université de Mostaganem : **Mr Mohamed, Mr Djilali, M^{me} Hafida, M^{me} Amir** qui ont accepté de nous faire partager leur expérience pour ce travail.

Nos remerciements vont sincèrement à tout le personnel de la bibliothèque SNV.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

A nos familles et nos amis qui par leurs prières et leurs encouragements, on a pu surmonter tous les obstacles.

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

الملخص:

من الخصائص المميزة لبكتريا المكورات العنقودية السالبة (SCN) coagulase وعلى رأسها النوع *Staphylococcus epidermidis* أنها غير ضارة لجسم الإنسان إلى حد كبير، إلا أن ضعف الجهاز المناعي من جهة، وانتشار هذه البكتريا على العناصر الاصطناعية داخل الجسم من جهة أخرى، قد يحولها من بكتريا الجلد المتعايشة إلى مسببة للمرض (ممرضة). ففي هذه الحالة تنتشر هذه البكتريا في الدم، أو في البيوفيلم لتصبح أكثر مقاومة لوسائل العلاج. وأمام الإخفاقات الكثيرة في القضاء على هذه العناصر الممرضة أصبح يكتسي أهمية بالغة في البحث عن مواد علاجية فعالة. فبعد أن قمنا بتأكيد امتلاك عزلات SCN لبعض خصائص هذه المجموعة، وبناء على دراسات سابقة، قمنا باستخدام 29 عزلة تابعة للجنس *Pseudomonas* مأخوذة من جذور نبات إحدى النجيليات البرية (*Hordeum murinum*) (شعير الفأر) حيث استخدمت ضد 20 عزلة من SCN باستخدام اختبار التضاد بالخطوط المتقاطعة على MH الصلب و باستخدام رُشاحات مأخوذة من مزارع MH سائل. و بعد اختيار عزلة *Pseudomonas* الأكثر تثبيطاً، التي تم تصنيفها بنظام (API 20 NE) استعملت لإنتاج مركبات الفينازين. تم تحصيلها في الوسط السائل NBY ثم تمت عملية الاستخلاص بمذيب أسنات الإيثيل. ليتم استخدام المركب المستخلص الجاف ضد عزلات SCN. أظهرت النتائج أن 29/29 من عزلات (*Pseudomonas*) قامت بتثبيط 20/19 من عزلات SCN. وتعتبر العزلة PK التي تم تصنيفها إلى (*Pseudomonas fluorescens*) أنها الأكثر فعالية حيث قامت بتثبيط 14 عزلة من المكورات SCN بمناطق تثبيط تتراوح من 12 ملم إلى 55 ملم. أما الرُشاحات السائلة لمزارع *Pseudomonas* فلم تثبط عزلات المكورات بسبب ضعف تركيز المواد الفعالة فيها. وأدت عملية استخلاص مركبات الفينازين بواسطة مذيب اسينات الإيثيل إلى الحصول على مسحوق (مضاد حيوي)، حيث أظهر هذا الأخير فعالية ضد 13 من أنواع المكورات وبمناطق تثبيط تتراوح من 6.5 إلى 28.5. كما أظهر تحليل المركب المستخلص بواسطة جهاز الطيف للأشعة فوق البنفسجية و المرئية و جهاز طيف الأشعة تحت الحمراء خصائص تجعل من هذا المركب قريب من (Hydroxyphénazines).

الكلمات المفتاحية: المكورات العنقودية السالبة (SCN) coagulase - *Pseudomonas* - التثبيط - مركبات الفينازين.

Résumé

Les *Staphylococcus* à coagulase négative (SCN), en particulier *Staphylococcus epidermidis*, sont inoffensifs pour le corps humain. Toutefois, l'immunodéficience chez l'hôte ou la colonisation d'un matériel étranger à l'intérieur du corps par ce groupe bactérien font transformer ces commensaux cutanés en formes virulentes. Dans ce cas ces bactéries sont retrouvées dans le sang ou dans les biofilms adhérents au matériel étranger. Face à la résistance de ces formes aux moyens de traitements et à de nombreux échecs dans l'élimination de ces pathogènes, il est devenu nécessaire de trouver des moyens thérapeutiques efficaces. Après avoir confirmé que les isolats de SCN présentent certaines caractéristiques de ce groupe et en se basant sur d'autres études citées dans la littérature, nous avons sélectionné 29 isolats de *Pseudomonas* à partir des racines d'une plante graminée sauvage (l'orge du rat = *Hordeum murinum*) pour les utiliser dans l'inhibition de 20 isolats de SCN en utilisant la méthode des stries croisées. Les surnageants des cultures des *Pseudomonas* dans le milieu MH liquide ont été aussi testés. L'isolat de *Pseudomonas* PK le plus performant dans l'inhibition des SCN a été identifié par le système API 20 NE et utilisé pour la production des composés phénaziniques. Il a été inoculé dans le milieu NBY liquide puis une extraction par le solvant d'acétate d'éthyle a été effectuée. Le composé obtenu à sec a été utilisé contre les isolats de SCN.

Les résultats de cette étude montrent que les 29 isolats de *Pseudomonas* ont inhibé 19 sur 20 d'isolats de SCN et que chaque *Pseudomonas* a inhibé un groupe de SCN. La souche à plus grand effet inhibiteur PK a inhibé 14 isolats de SCN avec des zones d'inhibition allant de 12 mm à 55 mm. Les surnageants des cultures de *Pseudomonas* dans le milieu MH liquide n'ont montré aucun effet inhibiteur ceci est due à la faible concentration de la substance active dans chaque surnageant. Le composé phénazinique extrait à sec a montré une efficacité contre 13 isolats de staphylocoques avec des zones d'inhibition allant de 6,5 à 28,5 mm.

L'analyse du composé obtenu dans des spectrophotomètres UV-visible et infrarouge a montré des caractéristiques qui font rapprocher le composé obtenu aux hydroxyphénazines.

Mots clés : Les *Staphylococcus* à coagulase négative – *Pseudomonas* – inhibition - composés phénaziniques.

Abstract

Coagulase-negative Staphylococci (CoNS), particularly *Staphylococcus epidermidis*, are harmless to human body. However, the immunodeficiency in the host or the colonization of foreign material inside the body by this bacterial group transforms these skin commensals into virulent forms. In this case, these bacteria are found in blood or in biofilms adhered to foreign material. To face the resistance of these forms to treatment and failures in the elimination of these pathogens, it has become necessary to find effective therapeutic agents. After confirming that the CoNS isolates have certain characteristics of this group and based on other studies cited in the literature, we selected 29 isolates of *Pseudomonas* from the roots of a wild grass plant (Rat barley = *Hordeum murinum*) for use in the inhibition of 20 CoNS isolates using the crossed streak method. The supernatants of *Pseudomonas* cultures in liquid MH medium were also tested. The best performing *Pseudomonas* PK isolate in CoNS inhibition has been identified by the API 20 NE system and used for the production of phenazinic compounds. It was inoculated into the liquid NBY medium and then solvent extraction by ethyl acetate was carried out. The dry compound was used against CoNS isolates.

The results of this study showed that the 29 *Pseudomonas* inhibited 19/20 *Staphylococcus* and that each *Pseudomonas* inhibited a group of CoNS. The larger inhibitory strain PK inhibited 14 CoNS isolates with inhibition zones ranging from 12 mm to 55 mm. The supernatants of *Pseudomonas* cultures in liquid MH medium showed no inhibitory effect, this is due to the low concentration of active substance in each supernatant. The dry extract phenazine compound inhibited 13 staphylococcal isolates with inhibition zones ranging from 6.5 to 28.5 mm.

The analysis of the compound obtained by the UV-visible and the infrared spectrophotometers showed some characteristics that make the compound belong hydroxyphenazine.

Key words: Coagulase-negative Staphylococci (CoNS)-*Pseudomonas* -inhibition - phenazine compounds

Liste des abréviations

A: Adénine

AAP: Protéine associée à l'accumulation

ADN: Acide Désoxyribo-Nucléique

AHL: N-acyl homoserine lactone

ARN: Acide Ribo-Nucléique

ARNm : Acide Ribo-Nucléique messenger

ARNr : Acide Ribo-Nucléique ribosomique

ATPase : Adénosine Tri-Phosphatase

C : Cytosine

C° : Celsius

CNA : Colistine et Acide Nalidixique

CRBSI: Catheter-related bloodstream infection

DA : Dalton

DAPG : Diacétylphloroglucinol

G : Guanine

H: Heure

HCN : Cyanure d'Hydrogène

HQNO: 2-n-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide

IL-8 : Interleukine 8

INICC : Consortium international de contrôle des infections nosocomiales

IOL : Intra Ocular Lens

Kb : Kilo bite

MH: Mueller Hinton

min : minute

ml : millilitre

MLS : Macrolides, Lincosamides et Streptogramines

mm : millimètre

Mpb : Méga paire de base

MRSE : Meticilline resistant *Staphylococcus epidermidis*

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide phosphate

NNIS: National Nosocomial Infections Surveillance

P. : *Pseudomonas*

PhAc : Acide Phénylacétique

PIA : Adhésine Intercellulaire Polysaccharidique

PLP : Protéines de Liaison à la Pénicilline

PLT : Pyolutéorine

PMMA: polyméthacrylate de méthyle

PQS : *Pseudomonas* quinolone signal

PRN : Pyrrolnitrine

PSA : Adhésine Poly-Saccharidique capsulaire

PVE : Endocardite à valve prothétique

QB : Quinolo-Bactine

S. : *Staphylococcus*

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

SCN : *Staphylococcus* à coagulase négative

SCP : *Staphylococcus* à coagulase positive

SES : *Staphylococcus epidermidis* surface proteins

T : Thymine

Tr: tour

TSST-I : Toxic shock syndrome toxin- 1

µm: micrometer

UV: Ultra violet

Sommaire

Résumé, ملخص

Abstract

Liste des abréviations

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Analyse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les *Staphylococcus* à coagulase négative

1. Historique.	3
2. Taxonomie et classification	4
2.1.La famille <i>Staphylococcaceae</i>	4
2.2.Différenciation entre les staphylocoques à coagulase négatif et à coagulase positive.....	4
3. Habitat	8
4. Signification clinique et infections	8
4.1.Septicémie	9
4.2.Endocardites	9
4.3.Infections urinaires	9
5. Pathogénicité et facteurs de virulence	9
5.1.Substances élaborées	9
5.1.1. Toxines	9
5.1.2. Enzymes	10
5.1.3. Le « slime »	10
5.2.Adhérence aux surfaces et formation de biofilm.....	10
6. Résistance aux antibiotiques	11
6.1.Résistance aux inhibiteurs des parois	11
6.1.1. Résistance aux bêta-lactamines	11
6.1.1.1.La pénicilline	11
6.1.1.2.La méticilline	12

6.1.1.3. Les glycopeptides	12
6.2. Résistance aux inhibiteurs de la synthèse des protéines	13
6.2.1. Les aminosides	13
6.2.2. Les macrolides, lincosamides et streptogramines.....	13
7. Diagnostic au laboratoire	13
7.1. Prélèvement et transport	13
7.2. Examen direct	13
7.3. Culture	14
7.4. L'identification de l'espèce	14
7.4.1. Recherche de la catalase	14
7.4.2. Autres tests	15
7.4.3. Galerie d'identification	15

Chapitre II :

1. Généralités sur les <i>Pseudomonas</i>	16
2. Génome de <i>Pseudomonas</i>	16
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
7.5. <i>Pseudomonas putida</i>	17
7.6. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	
8. La versatilité des <i>Pseudomonas</i>	18
9. Production de substances inhibitrices de la croissance des pathogènes	
9.1. Les Antibiotiques	
9.1.1. Le 2,4-Diacétylphloroglucinol	22
9.1.2. Les Phénazines	
9.1.3. La Pyocyanine	
9.1.4. La Pyolutéorine	
9.1.5. La Pyrrolnitrine	
9.2. Les Sidérophores	
9.2.1. La Pyoverdine	
9.2.2. La Pyochéline	
9.2.3. La Quinolobactine	
9.3. Production de substances volatiles (HCN)	
9.4. Les Enzymes	
9.5. Les Rhamnolipides	

Chapitre III : Les staphylocoques à coagulase négative dans les infections associées aux biomatériaux (cas de *Staphylococcus epidermidis*)

10. Compréhension de la virulence de <i>S. epidermidis</i>	5
11. Facteurs d'attachement et formation du biofilm chez <i>S. epidermidis</i>	5
12. Fréquence de <i>Staphylococcus epidermidis</i> dans les infections nosocomiales.....	5
13. Moyens de lutte	5

Partie pratique

Matériel et Méthodes

1. Provenance des isolats bactériens	47
2. Tests de confirmation des <i>Staphylococcus</i> à coagulase négative	47
2.1. Coloration de Gram	
2.2. Recherche de la catalase	47
2.3. Recherche de la coagulase	47
3. Isolement des <i>Pseudomonas</i>	47
3.1. Préparation de l'échantillon	
3.2. Purification des bactéries	
3.3. Conservation des bactéries	
4. Orientation vers l'identification des <i>Pseudomonas</i>	
4.1. Etude morphologique	
4.2. Etude microscopique	
4.2.1. État frais	
4.2.2.	

Résultats	49
------------------------	----

Discussion	59
-------------------------	----

Conclusion	63
-------------------------	----

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Figure 01 : Phases de la formation de biofilm de <i>S. epidermidis</i>	11
Figure 02 : Schéma d'un cathéter intraveineux montrant les facteurs favorisant la formation de biofilm.....	27
Figure 03 : Répartition des SCN responsables d'infections urinaires.....	31
Figure 04 : Les facteurs extracellulaires produits par <i>P. aeruginosa</i> affectant <i>S. aureus</i> ..	37
Figure 05 : Séparation de la phase organique d'acétate d'éthyle	43
Figure 06 : Séchage sous pression réduite par Rotavapeur	43
Figure 07 : Aspect macroscopique des colonies des SCN sur gélose Chapman	45
Figure 08 : Observation microscopique des <i>Staphylococcus</i> après coloration de Gram (x1000)	45
Figure 09 : Résultats de test de la catalase des SCN	46
Figure 10 : Recherche de coagulase libre	46
Figure 11 : L'analyse de l'antibiogramme des <i>Staphylococcus</i> à coagulase négative.....	47
Figure 12 : Aspect macroscopique d'un isolat de <i>Pseudomonas</i> sur gélose King B	48
Figure 13 : Observation microscopique des <i>Pseudomonas</i> après coloration de Gram (x1000)	49
Figure 14 : a. Test de catalase pour un isolat de <i>Pseudomonas</i> b. Test d'oxydase isolat de <i>Pseudomonas</i>	49
Figure 15 : Activité antagoniste des <i>Pseudomonas</i> vis-à-vis les isolats de SCN	50
Figure 16 : Les distances de zones d'inhibition entre les isolats de <i>Pseudomonas</i> et les <i>Staphylococcus</i>	51
Figure 17 : Nombre de <i>Staphylococcus</i> inhibés par chaque isolat de <i>Pseudomonas</i>	51
Figure 18 : Effet antimicrobien de l'extrait de phénazine sur les bactéries cibles	55
Figure 19 : Résultats d'orientation vers l'identification de l'isolat PK sur galerie API NE 20.....	57
Figure 20 : Spectre de l'identification de phénazine par spectrophotomètre UV-visible .	59
Figure 21 : Spectre de l'identification de phénazine par FTIR	60

Liste des tableaux

Tableau 01 : Séparation phylogénétique des espèces et des sous-espèces (ssp.) des staphylocoques, étendue par les principales caractéristiques diagnostiques proposées par Lamers <i>et al.</i> , en 2012	6
Tableau 02 : Caractères de quelques espèces de <i>Staphylococcus</i>	15
Tableau 03 : Activité de la muripocine contre les <i>Staphylococcus</i> et les <i>Streptococcus</i> ..	34
Tableau 04 : Observations macroscopiques de quelques colonies	48
Tableau 05 : Résultats du test d'antagonisme par la technique du croisement.....	53
Tableau 06 : Activité antimicrobienne de l'extrait de phénazine	56
Tableau 07: Résultats des différents tests biochimique de la galerie API 20 NE	58

Introduction

Introduction

Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont des bactéries à caractère ubiquitaire et un nombre de leurs espèces font partie de la flore humaine normale, colonisant à la fois la peau et les muqueuses, y compris les narines. Ces bactéries peuvent devenir pathogènes lors d'une rupture de l'équilibre hôte-bactérie (virose, diabète, antibiothérapie) (Mack *et al.*, 2013) ou lors de la présence de dispositifs biomédicaux implantés dans le corps humain tels que les cathéters, les valves cardiaques, les prothèses d'articulations etc. (Mack *et al.*, 2013 ; Jamal *et al.*, 2011). Dans les deux cas, il en résulte une infection due à la multiplication de ces bactéries et à la production de facteurs de virulence. Ceci explique comment l'extension de l'infection pouvant aboutir à une septicémie ou à une bactériémie.

Parmi les stratégies suivies par les SCN, est de s'attacher à la surface des dispositifs médicaux et s'assembler fortement entre elles pour former des biofilms stables. Ces derniers sont constitués de nombreuses cellules très résistantes aux antibiotiques. Ces bactéries sont particulièrement difficiles à éliminer et à l'origine de nombreuses maladies dont les infections nosocomiales, par exemple *S. epidermidis* est responsable de la grande majorité des infections nosocomiales de flux sanguin liées au cathéter et au unités de soins intensifs (Büttner *et al.*, 2015).

Les choix de traitement des infections à SCN résistant s'élargit aux antibactériens naturels (Singh *et al.*, 2015 ; Moloney, 2016). La capacité des composés antibactériens obtenus à partir d'autres microorganismes pour inhiber les SCN a également été testée (El Amraoui *et al.*, 2014). Parmi les métabolites étudiés produit par divers groupes de microorganismes on trouve ceux des *Pseudomonas* (Chain et Mellows, 1997). Le *Pseudomonas* est un genre parmi les divers Gamma-proteobacteria avec plus de 60 espèces présentant des modes de vie dans les différents environnements, y compris le sol, l'eau, les surfaces végétales, les animaux et l'homme. Le genre *Pseudomonas* est aussi un colonisateur compétitif dans la rhizosphère et est bien adapté aux différents stress biotiques et abiotiques. Ces espèces sont bien connues pour leur capacité à utiliser une variété de composés organiques et par leur production de composés antimicrobiens utilisés dans le traitement des maladies causées particulièrement par *Salmonella typhimurium* (Laine *et al.*, 1996), *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* et *Candida albicans* (Trujillo *et al.*, 2007). Il possède également une activité contre les staphylocoques (Cardozo *et al.*, 2013 ; Hotterbeekx *et al.*, 2017).

Le but de cette présente étude est d'isoler, des rhizosphères des plantes, un ensemble de *Pseudomonas* fluorescents pour examiner leur activité antagoniste contre des isolats cliniques de SCN. Cette étape va nous mener à la recherche d'un métabolite extracellulaire efficace contre ces staphylocoques à intérêt médical.

Dans ce manuscrit, nous présentons tout d'abord une recherche bibliographique composée de trois chapitres : Le premier chapitre présente des généralités sur les *Staphylococcus* à coagulase négative, Le deuxième chapitre est sur les caractéristiques génétiques et métaboliques des *Pseudomonas* fluorescents et enfin un troisième sur les staphylocoques à coagulase négative dans les infections associées aux biomatériaux (cas de *S. epidermidis*).

Nous exposons par la suite le matériel et les méthodes employés pour mener à bien nos travaux d'isolements, de sélections, et l'exploitation des *Pseudomonas* comme agents de lutte anti-SCN. Ainsi, nous présenterons les résultats de notre étude en traitant successivement :

- les isolats de *Pseudomonas* obtenus et leur caractérisation.
- l'effet antagoniste des *Pseudomonas* vis-à-vis les SCN sur milieu solide.
- l'effet du surnagent de la culture de *Pseudomonas* sur les SCN.
- extraction d'un métabolite et étude de son effet inhibiteur sur les SCN.
- analyses du produit extrait par spectrophotomètre UV-visible et infra rouge.

Finalement, ce manuscrit s'achève par une conclusion qui souligne les résultats marquant de ce travail et présente les perspectives de cette étude.

Chapitre I

1. Historique

Les staphylocoques ont été découverts par Pasteur et Koch en 1877-1878 à partir du pus de furoncle et d'ostéomyélite (Avril *et al.*, 1992; Corne, 2004). En 1883, le nom de «staphylocoque» a été proposé par Ogston, staphyle, mot grec signifiant grappe de raisin et kokkos, mot grec signifiant un grain ou une baie (Bhunia, 2008), pour un groupe de microcoques causant une inflammation accompagnée d'une suppuration. Ogston a été le premier auteur à différencier entre deux types de coques pyogènes: un premier groupe arrangé en groupe ou amas appelé « *Staphylococcus* » et un second groupe organisé en chaînette nommé « *Streptococcus* de Billroth ». En 1884, une description formelle du genre *Staphylococcus* a été fournie par Rosenbach. Celui-ci a divisé le genre «*Staphylococcus*» en deux espèces, *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré) et *Staphylococcus albus* (staphylocoque blanc). En 1885, Zopf a placé les staphylocoques et les microcoques dans le genre *Micrococcus*. Puis, en 1886, le genre *Staphylococcus* a été séparé du genre *Micrococcus* par Flugge. Celui-ci a différencié les deux genres principalement sur la base de leur action sur la gélatine et la relation à leurs hôtes. Les staphylocoques liquéfiaient la gélatine et étaient parasitaires et/ou pathogènes, tandis que les microcoques étaient variables dans leur action sur la gélatine et étaient saprophytes (Gôtz *et al.*, 2006).

Les genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Planococcus* (genres contenant des coques à Gram positif et catalase positive) ont ensuite été placés dans la famille *Micrococcaceae*. Vers le milieu des années 1960, une distinction claire a pu être faite entre les staphylocoques et les microcoques sur la base de leur contenu en G+C d'ADN (Glazunova *et al.*, 2010). La composition de l'ADN des membres du genre *Micrococcus* présente une teneur en G+C plus élevée que les membres du genre *Staphylococcus*. D'autres études, comme les études d'hybridation ADN-ADN et ADN-ARNr ainsi que l'étude des séquences de l'ARNr 16S ont clairement démontré les différences génétiques entre les staphylocoques et les microcoques (Gôtz *et al.*, 2006).

Les membres du genre *Staphylococcus* forment, en effet, un groupe cohérent et bien défini d'espèces apparentées qui sont largement divergentes des espèces appartenant au genre *Micrococcus*. Jusqu'au début des années 1970, le genre *Staphylococcus* se composait de trois espèces: l'espèce à coagulase positive *Staphylococcus aureus* et les espèces à coagulase négative *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus saprophyticus* ; cependant une étude plus poussée des propriétés chimio-taxonomiques et génotypiques des

staphylocoques a conduit à la description de plusieurs nouvelles espèces de staphylocoques (Götz *et al.*, 2006).

2. Taxonomie et classification

2.1. La famille *Staphylococcaceae*

La famille *Staphylococcaceae* fut proposée par des données taxonomiques au cours de la formulation de la 2^{ème} édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Ludwig *et al.*, 2009). En plus du genre *Staphylococcus*, la famille *Staphylococcaceae* comprend les genres *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Nosocomiicoccus*, et *Salinicoccus*. Les espèces de *Jeotgalicoccus* et *Salinicoccus* ont été isolés de divers échantillons alimentaires et environnementaux. À ce jour, le genre *Macrococcus* comprend sept espèces, adaptées aux animaux à sabots (Becker *et al.*, 2014).

Maintenant la famille *Staphylococcaceae*, avec *Bacilliaceae*, *Planococcaceae*, *Listeriaceae*, *Paenibacillaceae* et d'autres familles appartient à l'ordre des *Bacillales* de la classe *Bacilli*. Les *Bacilli* font partie du phylum des *Firmicutes*, qui comprend les bactéries à Gram-positives avec un ADN plutôt faible en contenu G+C. En revanche, le phylum *Actinobacteria* contient maintenant des espèces micrococciques, qui sont caractérisées par un ADN à forte teneur en G+C (Becker *et al.*, 2014).

La séparation phylogénétique des espèces et des sous-espèces (ssp.) des staphylocoques est représentée dans le Tableau 01.

2.2. Différenciation entre les staphylocoques à coagulase positive et à coagulase négative

Selon le Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire (Euzéby, 1997) le genre *Staphylococcus* comprend 47 espèces et sous-espèces. Néanmoins, le nombre d'espèces n'a cessé d'augmenter au cours des 20 dernières années et le genre a été remanié.

Le critère de base de la classification des espèces de staphylocoques reste la production de coagulase libre, enzyme responsable de la coagulation des sérums humains et cunicoles. On distingue ainsi sept espèces et sous-espèces à coagulase positive (SCP) dont *S. aureus* et quarante à coagulase négative (SCN) (Tableau 01). Les SCN sont divisés en trois groupes suivant leur sensibilité à la novobiocine et leur activité oxydasique. On peut toutefois noter que l'espèce *S. schleiferi* constitue un cas particulier, car la sous-espèce *S. schleiferi* subsp. *Coagulans* fait partie des SCP, tandis que la sous-espèce *S. schleiferi* subsp. *Schleiferi* est classée parmi les SCN à oxydase négative et sensible à

la novobiocine. En outre, parmi les SCN, on trouve quelques espèces pathogènes opportunistes pour l'homme et les mammifères, telles que *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. hominis* et *S. saprophyticus*. Ainsi, depuis la découverte de l'implication de certaines espèces de SCN dans des infections humaines, l'identification plus précise des membres du groupe des SCN présente un intérêt majeur (Morot-Bizot, 2006).

Tableau 01 : Séparation phylogénétique des espèces et des sous-espèces (ssp.) des staphylocoques, étendue par les principales caractéristiques diagnostiques proposées par Lamers *et al.*, en 2012 (Becker *et al.*, 2014).

Oxydase	Négative							
Novobiocine	Sensible							
Coagulase	Négative	Positive ¹ - variable ² - négative ³			Négative			
Groupe des Espèces	Hyicus-Intermedius			Epidermidis-Aureus				
Cluster groupe	Muscae	Hyicus	Intermedius	Aureus	Epidermidis	Wameri	Haemolyticus	Lugdunensis
Espèces	<i>S. muscae</i> <i>S. microti</i> <i>S. rostri</i>	<i>S. hyicus</i> ² <i>S. agnetis</i> ² <i>S. felis</i> ³ <i>S. chromogenes</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> spp. <i>scheleifri</i> ³ spp. <i>coagulans</i> ¹	<i>S. aureus</i> spp. <i>aureus</i> ¹ spp. <i>anaerobus</i> ¹ <i>S. simiae</i> ¹	<i>S. epidermidis</i> <i>S. capitis</i> spp. <i>capitis</i> spp. <i>urealyticus</i> <i>S. capae</i> <i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. wameri</i> <i>S. pasteurii</i>	<i>S. haemolyticus</i> <i>S. devriesei</i> <i>S. hominis</i> spp. <i>hominis</i> spp. <i>novobiosepticus</i> <i>S. jettensis</i> <i>S. petrasii</i> spp. <i>croceilyticus</i> spp. <i>petrasii</i>	<i>S. lgdunensis</i>

Oxydase	Négative						Positive
Novobiocine	Sensible			Résistant			
Coagulase	Négative						
Groupe des Espèces	Auricularis	Simulans	Saprophyticus				Sciuri
Cluster groupe	Auricularis	Simulans-carnosus	Pettenkoferi-massiliensi	Saprophyticus	Cohnii-Nepalensis	Arlettae-Kloosii	Sciuri
Espèces	<i>S. auricularis</i>	<i>S. simulans</i> <i>S. carnosus</i> spp. <i>carneus</i> spp. <i>utilis</i> <i>S. condimentii</i> <i>S. piscifermentans</i>	<i>S. pettenkoferi</i> <i>S. massiliensis</i>	<i>S. saprophyticus</i> spp. <i>Saprophyticus</i> spp. <i>bovis</i> <i>S. equorum</i> spp. <i>linens</i> <i>S. gallinarum</i> <i>S. succinus</i> spp. <i>succinus</i> spp. <i>casei</i> <i>S. xylosus</i>	<i>S. cohnii</i> spp. <i>cohnii</i> spp. <i>urealyticus</i> <i>S. nepalensis</i>	<i>S. arlettae</i> <i>S. kloosii</i>	<i>S. sciuri</i> spp. <i>sciuri</i> spp. <i>camaticus</i> spp. <i>rodentium</i> <i>S. fleuretii</i> <i>S. lentus</i> <i>S. stepanovicii</i> <i>S. vitulinus</i>

3. Habitat

Les staphylocoques à coagulase négatives sont des germes ubiquitaires (Grosjean *et al.*, 2016). Ils peuvent vivre dans la nature comme saprophytes ou comme des commensales généralement inoffensives sur la peau, les tissus membranaires et les muqueuses de l'homme et des animaux (mammifères et oiseaux) (Delarras, 2014).

Elles sont généralement localisées dans la bouche, les glandes mammaires, l'intestin, les voies génitales et urinaires et les voies respiratoires supérieures des hôtes. Cependant, *S. epidermidis* est l'espèce principale, largement répartie sur toute la surface du corps et particulièrement au niveau de la surface antérieure des narines, des creux axillaires, des plis inguinaux et des plantes des pieds (Flandrois *et al.*, 1997).

D'autre part, *S. hominis* et *S. haemolyticus* sont abondants au niveau des régions riches en glandes sudoripares (périnée, creux axillaires et plis inguinaux) mais peuvent également coloniser mieux que d'autres espèces les régions les plus sèches que sont les extrémités. Le cuir chevelu, où les glandes sébacées sont nombreuses, est l'habitat de prédilection de *S. auricularis* (Flandrois *et al.*, 1997). Par exemple, *S. capitis* ssp. *capitis* est trouvé en abondance sur la tête des adultes, particulièrement le cuir chevelu et le front, alors que *S. capitis* ssp. *urealyticus* est également trouvé sur la tête mais beaucoup plus au niveau des aisselles de quelques individus (Gemmell et Dawson, 1982).

Les staphylocoques résistants à la novobiocine, tel que *S. cohnii* se rencontrent particulièrement sur les pieds des humains. Cependant *S. saprophyticus* apparaît particulièrement chez les femmes âgées de 10 à 29 ans (Tan *et al.*, 2006).

4. Signification clinique et infections

Bien que les staphylocoques à coagulase négative constituent une composante majeure de la microflore normale de l'homme, leur rôle dans les infections nosocomiales 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, suivie par l'espèce *S. haemolyticus* (Irlinger, 2008).

4.1. Septicémie

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. Les principales espèces des SCN impliquées dans les septicémies, sont *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* et *S. lugdunensis* (Sistek, 2010).

4.2. Endocardites

Les SCN sont reconnus comme étant des agents pathogéniques responsables des endocardites sur les prothèses valvulaires et sur les valves natives, en particulier du côté droit chez les toxicomanes par voie intraveineuse. Parmi les espèces de SCN, *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 *S. lugdunensis* est nécessaire (Sistek, 2010).

4.3. Infections urinaires

Les infections urinaires à SCN sont la plupart du temps dues à l'espèce *S. saprophyticus*. Cette espèce entraîne des infections des voies urinaires chez les femmes et même chez les hommes (cystite, pyurie ou pyélonéphrite). Ces infections chez les hommes se produisent le plus fréquemment chez des personnes âgées qui sont prédisposées aux maladies des voies urinaires. D'autres espèces des SCN comme *S. warneri*, *S. epidermidis* et *S. haemolyticus* peuvent aussi être impliquées dans les infections urinaires (Sistek, 2010).

5. Pathogénicité et facteurs de virulence

5.1. Substances élaborées

5.1.1. Toxines

Les toxines telles que l'hémolysine, leucocidine, entérotoxine, TSST-I et l'exfoliatine sont principalement sécrétées par *Staphylococcus aureus*. Cependant, des études *in vitro* ont montré la production d'une delta-toxine par *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* et *S. haemolyticus*. Son rôle exact dans les infections est mal connu (Becker *et al.*, 2014).

5.1.2. Enzymes

Par définition, les SCN ne produisent pas de coagulase, mais ils produisent la lipase, la fibrinolysine et une variété de protéase. La lipase, en hydrolysant les lipides, permet aux SCN de coloniser les glandes sébacées de la peau. Le rôle spécifique des autres enzymes n'est pas clairement défini, mais il est probable qu'elles participent à la colonisation de ces bactéries ou du moins à leur persistance dans l'environnement (Becker *et al.*, 2014).

5.1.3. Le « Slime »

Certaines souches des SCN peuvent être caractérisées par leur capacité de produire une substance visqueuse extracellulaire glucurono-conjugée appelée autrement le « slime ». Plusieurs études montrent que cette substance permet aux SCN d'adhérer aux surfaces lisses comme celles des cathéters. Elle semble inhiber le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles, ce qui diminue la phagocytose. Ces propriétés dues au slime pourraient caractériser les souches nosocomiales et permettraient la distinction entre simples contaminants et isolats potentiellement pathogènes (Herard *et al.*, 1998).

5.2. Adhérence aux surfaces et formation de biofilm

La production de polysaccharides capsulaires et la capacité de former un biofilm ont été décrites comme facteur potentiel de virulence de *S. epidermidis* et d'autres SCN (Akinkunmi *et al.*, 2014). Les biofilms permettent aux SCN de résister aux contraintes mécaniques, à la désinfection, au traitement antibiotique, et d'échapper au système immunitaire (Ali *et al.*, 2014).

Un processus d'accumulation cellulaire pour former le biofilm mature suit une fixation initiale rapide sur une surface de plastique inerte (Ogara et Humphreys, 2001). La matrice de ce biofilm comprend de nombreuses substances bactériennes, y compris des adhésines polysaccharidiques associés à l'adhésion et à l'accumulation, des acides teichoïques et des exo-polysaccharides (Ali *et al.*, 2014). Les adhésines polysaccharidiques extracellulaires jouent un rôle essentiel dans l'adhésion bactérienne initiale et l'adhésion intercellulaire (formation de biofilm). Deux polysaccharides majeurs produits par *S. epidermidis* ont été examinés, l'adhésine polysaccharidique capsulaire (PSA) et l'adhésine intercellulaire polysaccharidique (PIA) (Ogara et Humphreys, 2001 ; Martini *et al.*, 2016).

Dans le modèle en deux phases proposé par Mack *et al.*, l'adhérence initiale est médiée par les PSA et l'accumulation de cellules est due à la production de PIA (fig. 01) (Ogara et Humphreys, 2001).

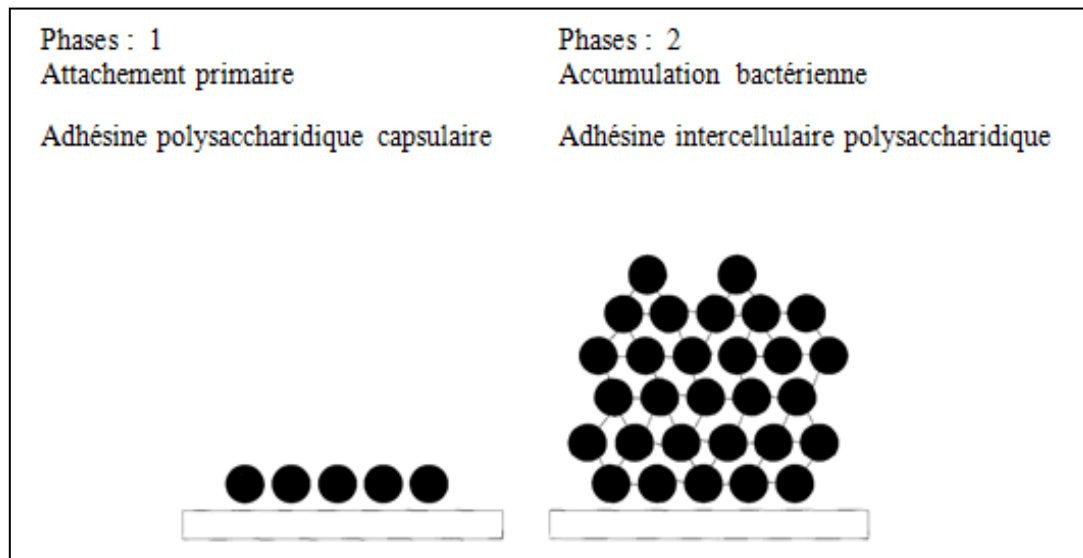


Figure 01 : Phases de la formation de biofilm de *S. epidermidis* (Mack, 1999).

6. Résistance aux antibiotiques

De plus de leur virulence, les SCN ont développés une résistance aux antibiotiques, le profil de leur résistance varie en fonction des agents antimicrobiens entre les espèces et les pays en raison de l'utilisation répandue d'antibiotiques pour la prophylaxie ou la thérapie, en particulier chez les patients hospitalisés (Al Tassar, 2015). Les mécanismes et les gènes de résistance des staphylocoques dorés et des SCN sont les mêmes. En revanche, la fréquence des résistances diffère : elle est plus élevée chez les SCN, au moins ceux que l'on isole dans les infections humaines (*S. epidermidis* et *S. haemolyticus*) (Leclercq, 2002).

6.1. Résistance aux inhibiteurs de la synthèse des parois

6.1.1. Résistance aux bêta-lactamines

6.1.1.1. La pénicilline

Les SCN n'ont pas de membrane externe et les β -lactames peuvent diffuser directement à travers la paroi cellulaire et se lier aux protéines de liaison à la pénicilline (PLP). Les PLP sont des trans-peptidases, impliquées dans la réticulation du peptidoglycane, principal constituant de la paroi cellulaire des bactéries à Gram-positives.

Les deux mécanismes principaux de la résistance à la pénicilline sont la dégradation de cette dernière par la production d'une enzyme pénicillinase codée par un gène blaZ (généralement porté sur un plasmide) et la production d'une protéine liant la pénicilline (PLP), qui est codée par le gène mecA. Près de 90 % des souches de SCN isolées en milieu hospitalier et en milieu extrahospitalier résistent à la pénicilline G par production de pénicillinases. Ces pénicillinases sont extracellulaires et inductibles. Elles inactivent les pénicillines G et V, les aminopénicillines, les carboxypénicillines et les uréidopénicillines (Strasheim, 2013).

6.1.1.2. La méticilline

Le mécanisme de résistance aux bêta-lactamines a été observé dès 1961, époque de l'introduction de la méticilline en thérapeutique. Les souches qui le possèdent sont dites résistantes à la méthicilline ou « méti R ». Chez une souche méti R, seule une faible proportion des bactéries est capable d'exprimer la résistance et de croître en présence de méticilline (Avril et al., 1992). La résistance à la méticilline entraîne une résistance à toutes les bêta-lactamines, et est déterminée par la présence d'un gène chromosomique (mecA) qui code pour la PLP2a. Cette PLP additionnelle a moins d'affinité pour les bêta-lactamines et en particulier pour la méticilline. Ce mécanisme est présent chez les *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) et chez les SCN (Quincampoix et Mainardi.2001).

6.1.2. Les glycopeptides

La vancomycine et la teicoplanine sont les antibiotiques glycopeptidiques essentiellement utilisés en alternative aux bêta-lactamines dans le traitement des infections dues aux staphylocoques résistants à la méticilline, qui appartiennent surtout aux espèces *S. epidermidis* et *S. haemolyticus*, ou en cas d'intolérance chez les patients. L'isolement des premières souches de SCN résistantes aux glycopeptides a eu lieu au début des années 1980. Cette résistance concerne en particulier la teicoplanine. La fréquence de cette résistance varie pour les SCN en fonction des pays ainsi que des techniques utilisées. La résistance à la vancomycine est apparue secondairement et reste beaucoup moins fréquente que pour la teicoplanine (Quincampoix et Mainardi.2001).

6.2. Résistance aux inhibiteurs de la synthèse des protéines

6.2.1. Les aminosides

Les aminosides empêchent la synthèse des protéines, en se liant à la sous-unité ribosomale 30S, empêchant ensuite la fixation de l'ARNm. Ces antibiotiques peuvent être modifiés par diverses enzymes staphylococciques phospho-transférases, nucléotidyl-transférases et acétyltransférases. Les souches résistantes à la gentamicine sont aussi résistantes à la tobramycine et à la kanamycine (Strasheim, 2013).

6.2.2. Les macrolides, lincosamides et streptogramines

Les macrolides, les lincosamides et les streptogramines (MLS), inhibent la synthèse protéique en stimulant la dissociation du ribosome et du complexe ARN de transfert-peptide. Cela entraîne une terminaison réversible de l'élongation protéique. Les macrolides et les lincosamides (lincomycine et clindamycine) n'ont qu'une activité bactériostatique sur les staphylocoques alors que les streptogramines (pristinamycine, quinupristine-dalfopristine), qui résultent de l'association de deux composés A et B agissant en synergie et possédant une activité bactéricide. Trois mécanismes sont impliqués : une modification de la cible de l'antibiotique, un mécanisme d'efflux et une modification enzymatique de l'antibiotique (Quincampoix et Mainardi, 2001).

7. Diagnostic au laboratoire

7.1. Prélèvements et transport

Les staphylocoques sont suffisamment résistants à la dessiccation et au refroidissement pour qu'il n'y ait pas de conditions particulières de prélèvement et de transport. Les staphylocoques peuvent se retrouver à partir de n'importe quel prélèvement. En effet, il ne faut pas oublier les risques de contamination des échantillons du fait de la présence, au niveau peau et muqueuses, de flores hébergeant de nombreux staphylocoques (Denis *et al.*, 2016).

7.2. Examen direct

Les staphylocoques sont des germes pyogènes et dans les pus on retrouve de nombreux polynucléaires plus ou moins altérés ainsi que des staphylocoques qui apparaissent comme des cocci à Gram positif de 0,8-1 µm de diamètre, isolés, ou en diplocoques, en courtes chaînettes voire classiquement en amas, l'aspect en grappe étant alors le plus caractéristique (Becker *et al.*, 2014).

7.3. Culture

Les staphylocoques sont des germes peu exigeants et peuvent être isolés en bouillons ou sur milieux solides simples tels que les géloses ordinaires ou gélose au sang, et sur les milieux usuels. Les colonies de staphylocoques sont de tailles variables (1-3 mm) circulaires, opaques, légèrement bombées ou aplaties. La pigmentation des colonies peut varier du blanc au jaune ou au jaune orangé. A noter que *S. saprophyticus* produit à l'isolement primaire des colonies plus grandes (5-8 mm), pigmentées en jaune et légèrement plus bombées. La plupart des espèces de SCN ne peuvent être différenciées entre elles après une culture de 24 heures, aussi il est recommandé d'attendre une incubation de 2 à 3 jours pour distinguer les différentes colonies sur milieu gélosé. Pour les produits pathologiques poly-microbiens, des milieux sélectifs sont utilisés tels que :

Le milieu de Chapman un milieu gélosé hyper salé (7.5 de NaCl) qui contient du mannitol. Les SCN donnent des colonies de plus petites tailles sans fermenter le mannitol. Quelques espèces peuvent parfois fermenter le mannitol comme *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* et *S. chonii*. Toutefois, la pousse sur ce milieu ne constitue qu'une indication puisque d'autres germes tels que les entérocoques ou les *Proteus* peuvent être cultivé dessus (Denis *et al.*, 2016).

Le milieu gélosé Columbia, CNA (colistine et acide nalidixique) inhibe les bactéries à Gram négatif et permet la culture des bactéries à Gram positif, cocci ou bacilles (Denis *et al.*, 2016).

7.4. Identification de l'espèce

Généralement les staphylocoques à coagulase négative ne sont identifiés complètement que lorsque les circonstances de leur isolement indiquent qu'ils sont potentiellement en situation de jouer un rôle de pathogène.

7.4.1. Recherche de la catalase

Le test de catalase permet d'établir un diagnostic différentiel entre les *Streptococcus* et les *Staphylococcus* (Danessa, 2015). Toutes les espèces du genre *Staphylococcus* possèdent une catalase à l'exception de *S. aureus* sous espèce *anaerobius*. Ce test consiste à réaliser un frottis à partir de colonies isolées, déposer quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène, puis rechercher une libération immédiate d'oxygène (Kloos et Bannermant, 1994).

7.4.2. Autres tests

En pratique, différents tests peuvent être utilisés pour le diagnostic différentiel entre les SCN et *S. aureus*, le tableau 02 indique les caractères bactériologiques qui permettent de faire le diagnostic d'espèce.

Tableau 02 : Caractères de quelques espèces de *Staphylococcus* (Martineau, 1997 ; Avril *et al.*, 1992)

Test	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Production de la coagulase	+	-	-
Fermentation du mannitol	+	-	+(-)a
Production d'ADNase	+	-	-
Résistance à la novobiocine	-	-	+b
Croissance anaérobique	+	+	(-)c
Hémolyse	+	-	(+)d
Nitrate-réductase	+	+	±
Phosphatase	+	+	±
D-mannitol (acidification)	+	±	±

a Habituellement positif; occasionnellement négatif.

b Croissance en présence de <1.6 mg/mL de novobiocine.

c Pas de croissance ou croissance faible

d Habituellement négatif; occasionnellement positif.

7.4.3. Galerie d'identification

Des galeries miniaturisées sont utilisées reposant sur des tests enzymatiques, des tests d'acidification ou d'utilisation des sucres ainsi que des tests de résistance à des substances inhibitrices (Danessa, 2015).

Chapitre II

1. Généralités sur les *Pseudomonas*

Les bactéries classées dans le genre *Pseudomonas* comprennent une grande variété de microorganismes vivants dans diverses niches écologiques. Ces bactéries peuvent être trouvées en tant que des agents pathogènes humains (Hernández-Salmerón *et al.*, 2017) ou pathogène des plantes (Marcelletti et Scortichini, 2014) et, sont présentes en grand nombre dans tous les principaux milieux naturels et forment également des associations avec les plantes (Spiers *et al.*, 2000) principalement, associées à la rhizosphère et à l'endosphère. Ainsi, montrant des modes de vie polyvalents et des métabolismes variés, qui aident à bien répondre à une grande variété de facteurs biotiques et abiotiques (Hernández-Salmerón *et al.*, 2017).

La classification en genres et en espèces à l'intérieur de la famille des *Pseudomonadaceae* a longtemps reposée sur des caractères d'orientation phénotypiques simples. Les *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, aérobies stricts, oxydase positive, non fermentaires, mobiles par une ciliature polaire monotriche ou multitriche, sauf quelques exceptions, respirant ou non les nitrates, oxydant ou non le glucose et n'accumulant pas du poly- β -hydroxybutyrate. Le genre *Pseudomonas* comprend des espèces fluorescentes (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. monteillii*, *P. mosselii*, *P. chlororaphis*, etc.) produisant de la pyoverdine et des espèces non fluorescentes (*P. alcaligenes*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*) (Denis *et al.*, 2011).

2. Génome de *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* englobe un groupe des bactéries très diversifié et représente un degré remarquable de capacité d'adaptation physiologique et génétique (Spiers *et al.*, 2000).

Le génome de *Pseudomonas* varie de taille entre 6 et 7 Mpb par rapport à plus d'une centaine de génomes bactériens séquencés, seulement une partie d'entre eux sont plus grands que les génomes de *Pseudomonas* (Jensen *et al.*, 2004).

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Le génome de *P. aeruginosa* est le plus grand génome bactérien au moment où il a été séquencé, bien que le génome semble plus proche de la taille typique pour une bactérie environnementale (Jensen *et al.*, 2004). Il s'agit de l'un des plus grands génomes bactériens connus avec 6,3 méga bases codant 5570 cadres de lecture de la souche modèle *P. aeruginosa* PAO1. *P. aeruginosa* possède un nombre important de gènes impliqués dans des systèmes de régulation et des fonctions métaboliques. Le taux des gènes impliqués dans la régulation (8,4%) est élevé par rapport aux autres bactéries, ces gènes représentent respectivement 5.8%

et 5.3% des génomes chez *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. Les autres gènes surreprésentés par rapport aux autres bactéries sont ceux codant pour les pompes d'efflux, les systèmes d'import de nutriments et les systèmes de chimiotactisme. Cette diversité lui confère une grande adaptabilité face à son environnement. *P.aeruginosa* est capable de métaboliser plus de 50 composés organiques et des composés inorganiques. Elle peut donc se développer dans de nombreuses niches écologiques, même si elles sont pauvres en nutriments (Chaker, 2012).

2.2. *Pseudomonas putida*

P. putida est une bactérie ubiquitaire fréquemment isolée à partir du sol et plus particulièrement les sols pollués, la rhizosphère et l'eau. *P. putida* est une bactérie modèle pour le développement d'applications biotechnologiques et présente un rôle remarquable dans la biorestauration des sols contaminés, le développement de biopesticides et la promotion de croissance végétale. Cette espèce est un paradigme d'une bactérie du sol métaboliquement polyvalente, dont *P. putida* KT2440 est la souche la plus caractérisée. La souche KT2440 est un dérivé sans plasmide de l'isolat original désigné *P. arvilla* souche MT-2, l'hôte naturel de l'archétype TOL p_{ww} plasmide, et par la suite reclassée *P. putida* mt-2. Elle a maintenue sa capacité à survivre dans son environnement naturel et est la première bactérie du sol à coloration de Gram négatif qui a été certifiée comme un hôte de biosécurité pour l'expression de gènes étrangers. Ce génome offrant un nouvel volé de la biologie d'un groupe de bactéries telluriques adaptables et métaboliquement polyvalentes (Meliani, 2012).

D'après sa séquence génomique, il a été prédit que *P. putida* KT2440 tolérerait divers métaux lourds, et les propriétés de résistance aux métaux de cette souche ont été confirmées expérimentalement. La plupart des régions insérées dans le génome de *P. putida* ont un contenu en A+T très élevé par rapport à la moyenne du génome *Pseudomonas*. Ceci, ajouté au nombre d'insertions, indique que *P. putida* est très sensible au transfert de gènes (Jensen *et al.*, 2004).

Chez *P. putida* U la dégradation de l'acide phénylacétique (PhAc) est réalisée par une voie catabolique centrale en aérobiose (García *et al.*, 2000), les gènes codants pour cette voie catabolique sont situés dans un fragment d'ADN de 18 kb contenant cinq opérons consécutifs (paaABCEF, paaGHIJK, paaLMN, paaY et paaX) contenant toutes les informations nécessaires à la dégradation aérobie de ce composé. Les analyses des séquences ont révélé que ces gènes codent 13 enzymes cataboliques (PaaABCEFGHIJKLMN), une protéine régulatrice (PaaX) et une protéine différente (PaaY) dont la fonction particulière n'a pas

encore été clarifié, bien qu'elle semble nécessaire pour le catabolisme efficace de PhAc (Luengo *et al.*, 2007).

2.3. *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens est un saprophyte non pathogène, qui colonise l'eau, le sol et la surface des plantes. Il vit en relation commensale avec les plantes, permettant aux plantes d'acquérir des nutriments essentiels, la dégradation des polluants chimiques et biologiques, et la suppression des agents pathogènes au moyen de productions d'antibiotiques (Igbinosa *et al.*, 2014). Il est bien adapté à la survie dans l'environnement du sol et à la colonisation du système racinaire des plantes, et cela s'applique également au cas particulier des agents de lutte biologique de cette espèce (Igbinosa *et al.*, 2014).

P. fluorescens PCL1751 est une souche isolée de la rhizosphère d'une plante de tomate cultivée en serre. Le génome de *P. fluorescens* PCL1751 consiste en un chromosome circulaire d'une taille de 6 143 950 paires de bases (pb); ne contenant aucun plasmide. Il comprend 19 ARNr, 70 ARNt et 5 534 gènes codant pour des protéines. Il contient un grand nombre de gènes impliqués dans la chimiotaxie et la motilité, la colonisation de la rhizosphère, la biosynthèse des sidérophores et la production d'osmoprotecteurs. La comparaison avec d'autres génomes de *Pseudomonas* révèle des variations importantes dans la taille de leur génome et la teneur en gènes. La présence et l'absence des gènes du système de sécrétion sont très variables (Cho *et al.*, 2015).

3. La versatilité des *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* représentent un groupe de bactéries extrêmement polyvalent, le plus étudié pour ses diverses applications biotechnologiques (Bernd, 2008). Ce genre est caractérisé par une grande capacité de colonisation (omniprésence environnementale), sa capacité remarquable à produire des métabolites secondaires par l'utilisation d'une diversité de molécules organiques simples comme source d'énergie (polyvalence métabolique) (Mercado-Blanco, 2015). Les souches de *Pseudomonas* présentent également un intérêt écophysiological pour leurs capacités à dégrader les solvants (*P. putida*, *P. mendocina*), une large gamme de composés organiques nocifs, y compris les polluants chaotropiques et aromatiques (*P. vesicularis*, *P. stutzeri*), et en raison de leurs capacités à tolérer les basses températures (*P. fluorescens*, *P. syringae*, *P. fragi*) (Baysse et O'Gara, 2007).

La grande versatilité métabolique des microorganismes, en particulier celle des bactéries, a conduit de nombreux scientifiques à étudier les processus microbiens qui minéralisent les

composés organiques, parmi toutes les bactéries, celles appartenant au genre *Pseudomonas* sont capables de minéraliser un grand nombre de composés organiques qui sont toxiques ou peuvent être dangereux pour les animaux, les plantes et d'autres microbes. Le fort potentiel catabolique de ces bactéries semble avoir été acquis car, au cours de leur évolution, ces microbes ont pu organiser de nouvelles voies cataboliques en utilisant des séquences génétiques collectées de différentes origines (Luengo *et al.*, 2007).

Ces bactéries ont aussi la capacité de dégrader des composés complexes, tel que les protéines et les polysaccharides complexes comme l'amidon, la cellulose, certaines seulement comme *P. pseudoalcaligenes* peuvent dégrader le poly β -hydroxybutyrate. L'aptitude de certains isolats à dégrader des substances xénobiotiques a également attirée l'attention de différents chercheurs. De nombreux isolats de *P. fluorescens* et *P. putida* ont été cités en exemple comme souches capables de dégrader des molécules aromatiques plus ou moins complexes (Mezaache, 2012).

P. putida a réussi à incorporer plusieurs voies de dégradation indépendantes qui forment une unité fonctionnelle complexe, définie comme le phénylacétyl-CoAcatabolon, qui permet la dégradation de plusieurs composés aromatiques (2- phényléthylamine, 2-phényléthanol, phénylacétaldéhyde, éthylbenzène, acide tropique, phénylacétaldoxime, phénylacétamide et autres esters de l'acide phénylacétique, de l'acide trans-styrylacétique, des acides n-phénylalcanoïques et des poly-3-hydroxyphénylalcanoates avec un nombre pair d'atomes de carbone) (Luengo *et al.*, 2007).

Comme d'autres espèces de *Pseudomonas*, les propriétés prédites de *P. entomophila* indiquent que cette souche contient un grand nombre de gènes impliqués dans l'adaptation à de multiples sources de carbone. Ceci suggère que *P. entomophila* est une bactérie métaboliquement polyvalente capable de survivre dans le sol, la rhizosphère et l'eau. Notamment, le génome de *P. entomophila* contient plusieurs gènes qui codent pour des protéines ayant des activités hydrolytiques telles que les chitinases, les lipases, les protéases et les hydrolases non caractérisées qui pourraient être impliquées dans la dégradation des polymères présents dans le sol. De plus, le génome de *P. entomophila* abrite des déterminants du catabolisme de divers composés aromatiques et hydrates de carbone à longue chaîne le rendant potentiellement utile pour la biorestauration. *P. entomophila* code plus de 535 transporteurs et un grand nombre de régulateurs qui suggèrent d'être capable de s'adapter à des différentes variations de substrat (Dieppois *et al.*, 2015).

4. Production de substances inhibitrices de la croissance des pathogènes

Les *Pseudomonas* fluorescents produisent un grand nombre de métabolites secondaires qui pourraient jouer un rôle dans l'effet antagoniste de ces microorganismes dans le sol. Ces agents inhibiteurs peuvent être scindés en 4 groupes : les antibiotiques, les sidérophores, les enzymes et l'acide cyanhydrique (HCN) (Jacques *et al.*, 1993).

Les premières molécules antibiotiques à avoir été isolées d'une souche (Pf-5) de *P. fluorescens* et identifiées sont la pyrrolnitrine en 1979 puis la pyolutéorine en 1980. Par la suite, d'autres composés ont été isolés comme la phénazine, le DAPG, la pyocyanine et la viscosamide (Bojanowski, 2011). A ces métabolites secondaires, il convient d'ajouter une molécule dérivant du métabolisme primaire, l'ammoniaque, qui, par l'alcalinisation du milieu qu'elle provoque, peut avoir un effet inhibiteur, principalement sur la croissance d'espèces fongiques phytopathogènes (Jacques *et al.*, 1993).

Il a été démontré que ces métabolites permettent aux *Pseudomonas* de concurrencer directement les pathogènes des plantes, de favoriser leur croissance ou de leur induire une résistance systémique (Caulier *et al.*, 2018).

4.1. Les Antibiotiques

4.1.1. Le 2,4-Diacétylphloroglucinol

La production de l'antibiotique 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG) contribue à l'activité de contrôle biologique de nombreuses souches bénéfiques de *P. fluorescens* (Meyer *et al.*, 2009). La biosynthèse et la régulation du 2,4-DAPG sont bien décrites, mais le mode d'action contre les organismes cibles est mal compris (Kwak *et al.*, 2011), il est actif contre de nombreux organismes, y compris les plantes, les champignons, les virus, les bactéries et les nématodes (Meyer *et al.*, 2009), il joue un rôle clé dans les interactions microbiennes et la défense des plantes dans une grande variété d'écosystèmes naturels et agricoles (Kwak *et al.*, 2011).

Le DAPG affecte plusieurs processus cellulaires, notamment la lyse cellulaire par un mécanisme inusité, la disruption du cytosquelette d'actine des *Aphanomyces* et l'inhibition des fonctions mitochondriales chez *Saccharomyces cerevisiae* (Gauthier, 2013). La souche CHA0 de *P. fluorescens* supprimait la pourriture noire du tabac, la pourriture de la couronne et des racines de la tomate, la fonte des semis du concombre et du blé. La souche F113 de *Pseudomonas* a supprimé la pourriture des racines de la betterave à sucre, la nématode à kyste et la pourriture molle de la pomme de terre (Kwak *et al.*, 2013).

Le DAPG induit également une résistance systémique chez les plantes, favorise l'exsudation des acides aminés des racines, il a une toxicité pour les cellules de mammifères, et est un puissant inhibiteur de la réactivation kystique des protistes et inhibe *Staphylococcus aureus* qui est un pathogène humain multirésistant aux antibiotiques (Kwak *et al.*, 2011).

4.1.2. Les Phénazines

Historiquement, *P. aeruginosa* est la première souche à avoir été rapportée comme productrice de phénazines à la fin du 19^e siècle. Cette souche est une des premiers microorganismes dont on a démontré que les pigments présentaient un effet antibiotique (Beaulac, 1995). Le pigment bleu-vert 5-N-méthyle-1-dihydroxy-phénazine, caractéristique de cette espèce, constitue fort probablement la première phénazine connue et décrite sous le nom de pyocyanine (Gauthier, 2013). La présence de ces pigments peut expliquer la colonisation dominante de *P.aeruginosa* et l'inhibition des autres bactéries qui sont normalement présentes dans la flore de l'arbre respiratoire. La phénazine vient principalement inhiber la fonction des flagelles et par le fait même altérer la réponse immunitaire chez l'humain (Beaulac, 1995).

Les phénazines sont des pigments hétérocycliques contenant de l'azote (Mezaache, 2012). Leur rôle dans la compétition écologique se traduit également par une action directe sur le biocontrôle des pathogènes racinaires fongiques. Il a ainsi été montré que les phénazines permettent d'inhiber la croissance de champignons phytopathogènes tels que *Gaeumannomyces graminis*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Gibberella avenacea* ou *Drechslera graminea* (Barakat, 2012) par leur capacité oxydo-réductrice cellulaire ; en présence d'oxygène et d'agents réducteurs (incluant le NADH et le NADPH), causant ainsi l'accumulation de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène toxique (Mezaache, 2012).

D'autres études suggèrent que les phénazines pourraient avoir d'autres fonctions en plus de leur rôle écologique. Les phénazines pourraient modifier la disponibilité du fer présent dans le milieu. En effet, les phénazines excrétées dans le milieu pourraient réduire le fer et le rendre plus disponible. Il a été montré que *P. chlororaphis* peut solubiliser des cristaux d'oxyde de fer via une phénazine (la 1-carboxamide phénazine) (Barakat, 2012).

4.1.3. La Pyocyanine

La pyocyanine est un pigment bleu sécrété par la bactérie, qui est impliquée dans de nombreux mécanismes pathogènes. Elle réprime la réponse immunitaire de la cellule hôte, induit l'apoptose des neutrophiles et augmente la production d'interleukine IL-8. La

pyocyanine a un rôle crucial dans la virulence de *P. aeruginosa*. Plusieurs auteurs ont montré ses propriétés oxydoréductives : la pyocyanine oxyde le glutathion et inactive la catalase dans les cellules épithéliales respiratoires et les cellules endothéliales, participant ainsi au stress oxydatif et entraînant une nécrose du tissu respiratoire. Récemment, il a été démontré que la pyocyanine inactive l'ATPase vacuolaire et le transport mitochondrial, ce qui a pour conséquence une détérioration des canaux chlorures au cours de la mucoviscidose (Khalifa *et al.*, 2011).

4.1.3. La Pyolutéorine

La pyolutéorine (PLT) est un antibiotique polycétide phénolique aromatique (Vinay *et al.*, 2016), cette petite molécule naturelle synthétisée par des *Pseudomonas* fluorescents (Doi *et al.*, 2004) a été isolée pour la première fois chez *P. aeruginosa* et plus tard chez les souches Pf-5 et CHA0 de *P. fluorescens* (Vinay *et al.*, 2016).

Cette molécule est composée d'un anneau résocriinol synthétisé par la voie de polycétide, relié à une partie pyrrole bichlorée (Thompson *et al.*, 1999), elle est actuellement à l'étude pour ses activités antibiotiques, antifongiques et herbicides (Doi *et al.*, 2004).

La pyolutéorine pourrait inhiber les champignons oomycètes, y compris le phytopathogène *Pythium ultimum*, et supprime les maladies des plantes causées par ce champignon (Thompson *et al.*, 1999).

Elle possède des activités antimicrobiennes contre les bactéries à Gram positives et à Gram négatives (Brodhagen *et al.*, 2005) y compris *Erwinia amylovora* (Yan *et al.*, 2017).

4.1.4. La Pyrrolnitrine

La pyrrolnitrine (PRN) [3-chloro-4-(3-chloro-2-nitrophenyl) pyrrole] est un antibiotique à large spectre isolé pour la première fois dans les années soixante à partir de *P. pyrrocinia*, le composé pyrrole est produit par les *Pseudomonas* fluorescents comme *P. fluorescens* et *P. chlororaphis* (Mezaache, 2012). Ce composé a été isolé chez plusieurs autres espèces de bactéries incluant *Myxococcus fluvus*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia* spp., ainsi que plusieurs *Pseudomonas* et *Burkholderia* (Allaire, 2005).

La pyrrolnitrine a trouvé son application comme composé à usage clinique pour le traitement des mycoses cutanées plutôt que fongicide agricole. La production de ce composé par *P. fluorescens* est impliquée dans le contrôle de certains agents pathogènes racinaires notamment *Botrytis cinerea* (Ossowicki *et al.*, 2017), *Rhizobia solani*, *Verticilium dahliae*, *Gaeumannomyces graminis* et *Fusarium oxysporum* (Mezaache, 2012).

4.2. Les Sidérophores

Les sidérophores (dérivés du grec signifiant «transporteurs de fer») sont des agents chélatants à faible masse moléculaire (inférieure à 1000 Da), spécifiques des ions ferriques, produits par les bactéries et champignons pour combattre le stress dû au fer (Ngamau *et al.*, 2014). En raison de leur potentiel dans le contrôle biologique des phytopathogènes fongiques, ils peuvent être utilisés comme une stratégie alternative à la lutte chimique. Pour plusieurs *Pseudomonas* fluorescents, il a été suggéré que la compétition de sidérophores pour le fer avec des agents pathogènes du sol est un mécanisme important pour le contrôle biologique car la plupart de ces plantes peuvent utiliser des complexes de sidérophores-fer comme source de fer dans le sol. Un avantage compétitif sous contrainte de fer et ainsi limiter la prolifération et la colonisation des racines par les phytopathogènes (Sasirekha et Srividya, 2016).

4.2.1. La Pyoverdine

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

4.2.2. La Pyochéline

La pyochéline est un type de sidérophore couramment produit par le genre *Pseudomonas* et *Burkholderia*. Les agrégats de gènes biosynthétiques de la pyochéline, ainsi que sa capacité de solubilisation du fer, sont bien caractérisés. Cependant, la pyochéline a récemment démontré une autre activité biologique autre que d'être seulement un composé chélatant. Ce composé peut inhiber particulièrement *S. aureus* dans une étude menée par Adler *et al.*, 2012 et cette activité a été confirmée par une autre étude réalisée par Ong *et al.*, 2016 (Ong *et al.*, 2017).

4.2.3. La Quinolobactine

La quinolobactine (QB), un acide 8-hydroxy-4-méthoxy-2-quinoléine carboxylique, a été décrite pour la première fois en 1980 et identifiée plus tard comme sidérophore pour *P. fluorescens* ATCC 17400 (Matthijs, 2004). La quinolobactine résulte de l'hydrolyse rapide de la molécule précurseur acide 8-hydroxy-4-méthoxy-2-quinoléine-thio-carboxylique (thioquinolobactine), qui, contrairement à la quinolobactine, possède une forte activité antifongique contre le phytopathogène *Pythium debaryanum* (Heeb *et al.*, 2010).

4.3. Production de substances volatiles (HCN)

Les souches de *Pseudomonas* produisent une gamme de métabolites bioactifs volatils, y compris le cyanure d'hydrogène (HCN) (Ossowicki *et al.*, 2017). L'HCN a été étudié pour ses propriétés antifongiques et son implication dans la suppression des maladies telles que la pourriture noire des racines du tabac (Paulin, 2017), d'agents pathogènes comme *Septoria tritici* et *Puccinia recondita* (Allaire, 2005) et peut participer à l'inhibition de nombreuses métallo-enzymes (Ossowicki *et al.*, 2017).

Une corrélation positive existe entre la production de cyanure d'hydrogène et le poids des plants de concombre confrontés au flétrissement par *P. ultimum*. Le composé agit directement sur les cellules de l'agent pathogène en bloquant la cytochrome oxydase dans la chaîne respiratoire. Cependant, en plus d'une activité protectrice, une fonction écologique de la synthèse de cyanure d'hydrogène 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*. Au niveau de l'adaptation dans la rhizosphère, la production d'HCN peut être avantageuse pour acquérir des nutriments. Par exemple, l'HCN cause une augmentation de l'exsudation 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 (Allaire, 2005).

4.4. Les Enzymes

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

1993). *P. cepacia* produisant la β -1,3 glucanase, réduit l'incidence des maladies causées par *Rhizoctonia solani*, *P. ultimum* et *Sclerotium rolfsii* (Mezaache, 2012).

4.5. Les Rhamnolipides

Les agents biosurfactants sont des composés naturels tensioactifs produits par de nombreux microorganismes (Ismail *et al.*, 2014). Ils peuvent solubiliser des molécules hydrophobes dans l'eau. La plupart des biosurfactants connus sont des glycolipides. Les biosurfactants suivants ont été rapportés comme étant produits par les *Pseudomonas* :

Rhamnolipides (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. chlororaphis*), Viscosine (*P. fluorescens*), Carbohydre-protéine-lipide (*P. fluorescens*) et Protéine PA (*P. aeruginosa*) (Bernd, 2008).

Les rhamnolipides sont des glycolipides extracellulaires amphiphiles les plus connus (Khalifa *et al.*, 2011). Ils présentent une faible toxicité et sont entièrement biodégradables, ce qui augmente fortement leur acceptation écologique (Bernd, 2008). Les rhamnolipides possèdent un pouvoir détergent sur les phospholipides du surfactant pulmonaire, ce qui les rend ainsi plus accessibles aux phospholipases bactériennes. Ils perturbent le transport mucociliaire et les mouvements ciliaires de l'épithélium respiratoire humain. De plus, ils inhibent la phagocytose. Ils contribuent donc à l'invasion du tissu pulmonaire par *P. aeruginosa*. Comme le flagelle et les pili de type IV, les rhamnolipides sont impliqués dans la mobilité de type "swarming" et la formation de biofilms (Khalifa *et al.*, 2011).

Le rôle joué par les rhamnolipides n'est pas parfaitement élucidé mais il est généralement accepté qu'ils participent à la pathogenèse des microorganismes qui en produisent. Par exemple, *P. aeruginosa* sécrète des rhamnolipides qui ont la capacité de lyser les zoospores de plusieurs phytopathogènes tels que *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici* et *Plasmopara lactucae-radici* (Faille, 2010).

Chapitre III

1. Compréhension de la virulence de *S. epidermidis*

Parmi les SCN, *S. epidermidis* est l'espèce la plus fréquemment isolée des épithéliums humains, colonisant principalement l'aisselle, la tête et les narines. Leur capacité à produire des facteurs d'adhérence et à supporter des concentrations élevées de sel est importante pour coloniser les tissus humains (Kloos, 1975).

La colonisation omniprésente de *S. epidermidis* sur la peau humaine et les muqueuses leur donne l'opportunité de provoquer des infections dans des circonstances particulières. Malgré, *S. epidermidis* est une bactérie faiblement virulente avec peu de facteurs de virulence (Otto, 2004). Des circonstances particulières ont fait de cette bactérie un pathogène humain opportuniste important, reflétant l'utilisation accrue de dispositifs médicaux implantables et un nombre croissant de patients ayant un système immunitaire affaibli, par ex. les patients recevant un traitement immunosuppresseur, les enfants prématurés, les malades du SIDA et les toxicomanes (Otto, 2004). *S. epidermidis* est maintenant considérée comme l'une des causes les plus fréquentes d'infections nosocomiales (Vuong et Otto, 2002).

Chez les humains immunocompétents, *S. epidermidis* devient principalement pathogène (i) lorsqu'il est associé à des dispositifs médicaux implantables sur lesquels il forme des biofilm, tels que des shunts artério-veineux, des lentilles de contact, des cathéters veineux urinaires et centraux, des appareils orthopédiques et des cathéters de dialyse péritonéale (Otto, 2004) et (ii) dans de rares cas, associé à une valve endocarditique native. En général, *S. epidermidis* a peu de facteurs de virulence qui causent directement des dommages à l'hôte, par rapport à son parent plus virulent, *S. aureus*. *S. epidermidis* doit donc s'appuyer sur des facteurs modulant le système immunitaire de l'hôte afin de maintenir une infection persistante (Mylonakis et Calderwood, 2001).

2. Facteurs d'attachement et formation du biofilm chez *S. epidermidis*

La formation de biofilm est le facteur de virulence le plus important de *S. epidermidis*. L'adaptation aux facteurs environnementaux et le changement métabolique favorisent la colonisation des tissus de l'hôte et les dispositifs médicaux par *S. epidermidis* et protègent cette bactérie contre le système immunitaire de l'hôte et contre les traitements antibiotiques (Stewart et Costerton, 2001). Il est maintenant admis que les infections à *S. epidermidis* dépendent de la capacité de l'espèce à adhérer à des surfaces artificielles et à assembler des groupements de biofilm (Mack *et al.*, 2013).

La formation de biofilm est généralement décrite comme un processus en deux étapes : une fixation initiale sur les surfaces, une agrégation et une maturation subséquentes en structures

multicellulaires. Une phase finale de détachement après l'acquisition de l'état stationnaire suit ensuite. Les facteurs favorisant la formation de biofilm sont représentés dans la (fig. 02).

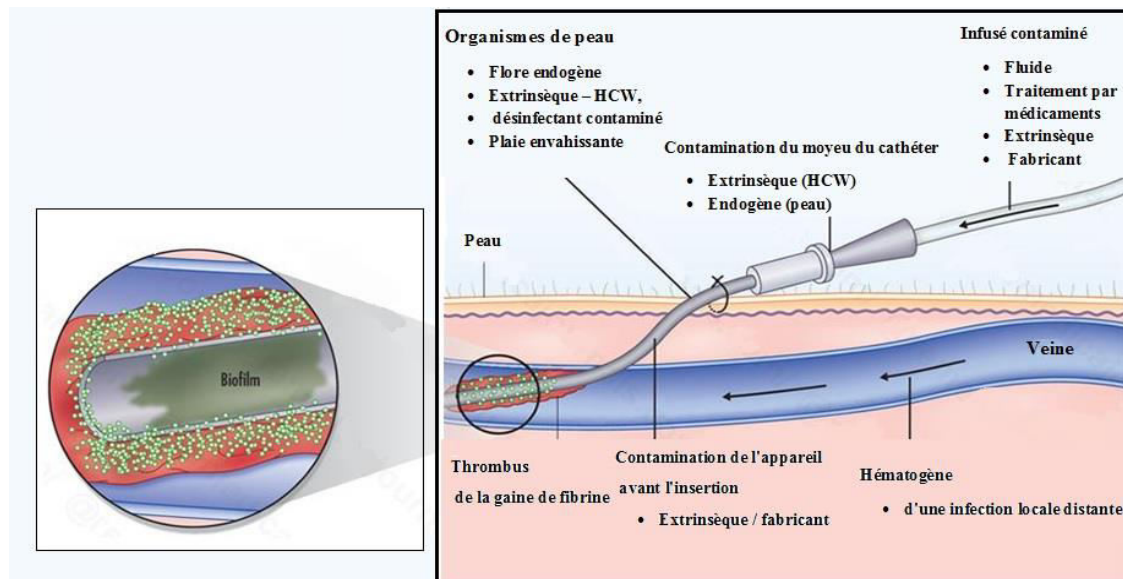


Figure 02 : schéma d'un cathéter intraveineux montrant les facteurs favorisant la formation de biofilm (James *et al.*, 2011)

Attachement

La fixation initiale de *S. epidermidis* au corps étranger (par exemple un dispositif médicale implanté) peut se produire soit directement sur une surface synthétique non modifiée, soit pour héberger sur des protéines qui ont déjà recouvert la surface (surface modifiée). Les surfaces abiotiques impliquées dans les infections associées au biofilm de *S. epidermidis* sont des surfaces hydrophobes en plastique, souvent utilisées dans les cathéters ou d'autres dispositifs (Otto, 2004). Les protéines de surface de *S. epidermidis* (SES) impliquées dans la fixation aux surfaces non modifiées sont les acides SSP1 et 2, le AAE et le AtlE, acides teichoïques et les lipo-teichoïques. Les quatre derniers peuvent également participer à l'attachement sur les surfaces modifiées (Heilmann *et al.*, 2003).

Accumulation et maturation

Cette phase est caractérisée (i) par l'agrégation intercellulaire entre les cellules accomplies par une variété de molécules telles que les polysaccharides et les protéines adhésives, (ii) par les forces de structuration du biofilm conduisant à l'aspect tridimensionnel typique d'un biofilm mature. La matrice de biofilm peut être constituée d'exopolysaccharides (par exemple PIA), d'ADN, de protéines et de macromolécules accessoires (comme les acides teichoïques) favorisant l'agrégation intercellulaire (Heilmann *et al.*, 2003).

Adhésine intercellulaire polysaccharidique (PIA)

La PIA est la composante matricielle la mieux décrite des biofilms de *S. epidermidis*. La PIA est un homopolymère linéaire non ramifié de résidus N-acétylglucosamine liés en β -1,6 (Martini *et al.*, 2016). La PIA est codée par l'opéron *ica* composé de *icaA* et *icaD* (exprimant les N-acétylglucosamine transférases) produisant des chaînes des monomères N-acétylglucosamines (GlcNAc). Le *icaC* (un exportateur PIA putatif) provoque l'allongement des monomères GlcNAc, et le *icaB* (PIA désacétylase) qui code pour une enzyme de surface qui désacétyle les monomères après l'exportation. Les protéines telles que Aap et Bhp ont des domaines ayant des propriétés putatives de liaison au PIA et pourraient contribuer à créer un biofilm fort (Vuong *et al.*, 2004).

Formation de biofilm indépendant du PIA

Il a été reconnu que le PIA n'est pas essentiel pour la formation du biofilm de *S. epidermidis*. Un certain nombre de souches productrices de biofilm dépourvues de l'opéron *ica* ont été identifiées (Qin *et al.*, 2007). Ces souches *ica*-négatives ont également été isolées à partir d'infections associées au biofilm. Les protéines adhésives remplacent probablement le PIA dans ces biofilms. En particulier, deux protéines ont été décrites comme importantes dans la formation de biofilms protéiniques. La protéine associée à l'accumulation (AAP) est une protéine associée à la surface cellulaire liée de manière covalente à la surface cellulaire (Rohde *et al.*, 2007).

La protéine de liaison à la matrice extracellulaire est une adhésine intercellulaire protéique, attachée de manière non covalente à la surface cellulaire. Les biofilms PIA et non-PIA semblent avoir une architecture différente. Les biofilms PIA ont des régions d'une architecture plate avec d'autres zones constituées de grands agrégats de cellules proéminentes et de cavités, conduisant à une structure de surface de biofilm irrégulière globale. Les biofilms non-PIA sont généralement plus fins et présentent une surface régulière et lisse. Les biofilms indépendants du PIA sont considérés comme "plus faibles" que les biofilms dépendants du PIA, cela signifie qu'ils ont souvent une quantité inférieure de matériau de matrice extracellulaire (Rohde *et al.*, 2007).

Détachement

La phase de détachement implique le détachement de cellules individuelles ou de groupes de cellules par divers mécanismes, provoquant la propagation des infections à de nouveaux sites et assure la survie de la bactérie. Plusieurs mécanismes de détachement du biofilm de *S. epidermidis* ont été suggérés: dégradation enzymatique de la matrice de biofilm et

perturbation des interactions non covalentes par des molécules de type détergent, comme les modulines phénoliques solubles (Kong *et al.*, 2006). Les forces mécaniques, comme le partage des fluides, la privation de nutriments et l'arrêt de la production de matrices peuvent également contribuer au détachement (Hunt *et al.*, 2004).

3. Fréquence de *Staphylococcus epidermidis* dans les infections nosocomiales (cas des dispositifs médicaux implantés)

3.1. Infections liées aux cathéters intravasculaires

Staphylococcus epidermidis est l'espèce la plus fréquemment isolée d'infections liées aux cathéters en raison de sa prédominance dans la flore commensale cutanée et sa capacité à adhérer à la surface des biomatériaux grâce à la production de biofilm. Ce biofilm permet à *S. epidermidis* d'échapper à l'activité des antibiotiques et de contrecarrer la réponse immunitaire. De mai 2002 à mai 2004, 39 infections liées aux cathéters ont été observées suite à la mise en place de 213 cathéters veineux centraux. L'incidence globale des infections liées aux cathéters veineux centraux a été de 5,5 pour 1000 journées-cathéters. Dans la littérature, elle est comprise entre 2 et 11 pour 1000 journées-cathéters (Touati *et al.*, 2007).

Plus de 150 millions de cathéters intravasculaires sont utilisés aux États-Unis chaque année. Bien que l'on estime que 80 000 infections de cathéters vasculaires se produisent dans les unités de soins intensifs et les unités d'hémodialyse. Le nombre d'infections de la circulation sanguine liées au cathéter pourrait être aussi élevé que 250 000 si les patients dans d'autres milieux de soins ont été évalués. Les patients immunodéprimés, en particulier les nouveau-nés ou ceux présentant une neutropénie sévère, sont exposés à un risque accru d'infection sanguine (Rupp, 2014).

3.2. Endocardite et infection des appareils cardiaques et les greffes vasculaires

3.2.1. L'endocardite à valve prothétique

L'endocardite à valve prothétique (PVE) est causée par des staphylocoques à coagulase négative, généralement *S. epidermidis* dans 15 à 40% des cas. L'infection est habituellement liée à l'inoculation au moment de la chirurgie et se manifeste dans les 12 mois qui suit le placement de la valve. Une présentation aiguë est caractérisée par la fièvre et des signes physiques de dysfonctionnement valvulaire, alors que les stigmates périphériques de l'endocardite sont plus fréquemment observés chez les patients présentant une évolution plus indolente. Le diagnostic est généralement confirmé en effectuant plusieurs reprises des hémocultures positives et des végétations par échocardiographie transœsophagienne. L'insuffisance cardiaque survient dans 54% des cas et plus de 80% ont des complications, y

compris un dysfonctionnement de la valve prothétique et des abcès intracardiaques (Rupp, 2014).

3.2.2. L'endocardite à valve native

Contrairement à la PVE, l'endocardite à valve native causée par les SCN est relativement rare, se manifestant seulement dans 5-8% des cas. Le plus souvent elle est causée par l'utilisation de cathéters intravasculaires et de dispositifs cardiaques, et les isolats causatifs sont généralement résistants à la méticilline. Les symptômes prolongés et les signes physiques (fièvre, vasculaire ou immunologique) avant le diagnostic sont relativement fréquents. L'infection par un dispositif électrophysiologique cardiaque (stimulateurs cardiaques, défibrillateurs) se produit dans 1-2% des procédures de placement des dispositifs et les staphylocoques à coagulase négative (principalement *S. epidermidis*) représentent environ 50-60% de ces infections (Rupp, 2014).

3.2.3. Infections de circulation sanguine liées au corps étranger (FBR-BSIs)

Les SCN et *S. epidermidis* en particulier sont une cause très fréquente de la bactériémie associée aux soins de santé. La plupart des FBR-BSIs sont des infections de la circulation sanguine liées au cathéter (CRBSI), c'est-à-dire celles qui résultent de l'insertion de cathéters intravasculaires ou d'orifices totalement implanté. D'après une étude portant sur 422 unités de soins intensifs hospitalisés dans 36 pays ayant participé au Consortium international de contrôle des infections nosocomiales (INICC) entre 2004 et 2009, le taux combiné de bactériémies associées aux cathéters centraux était de 6,8 par 1 000 jours-ligne. Alors que les programmes de contrôle des infections focalisées sur la surveillance des infections liés aux soins associées aux appareils (DA-HAI) ont réduit l'incidence de ces derniers jusqu'à 30%, les taux pour les CRBSI allaient encore d'environ 2 par 1000 jours-ligne, aux États-Unis. Unités de soins intensifs, à > 30 par 1 000 jours-ligne centraux, en unités brûlées. Au bout d'une période de sept ans, les isolats les plus fréquemment retrouvés dans les bactériémies nosocomiales, étaient des SCN (31%) *S. aureus* (20%) (Rupp, 2014).

3.2.4. Les Endophtalmies

Staphylococcus epidermidis représente le germe le plus fréquemment retrouvé au cours des endophtalmies aiguës (50 % à 60 % des cas). Il a été montré que les bactéries pénètrent dans la chambre antérieure lors de la chirurgie de la cataracte, par le biais du liquide d'irrigation et/ou par simple dépôt sur l'IOL (« IOL » en anglo-saxon pour « Intra Ocular Lens ») lors de son implantation. La capacité des organismes à adhérer aux implants est alors associée au risque d'infection du site d'implantation. Cette corrélation entre adhérence bactérienne et

endophtalmie a été prouvée en ophtalmologie par 4 études complémentaires. Ils ont démontré que d'une part, l'adhérence bactérienne au polypropylène était plus élevée que celle au PMMA et d'autre part, que le risque d'endophtalmie était plus important avec le polypropylène qu'avec le PMMA. Quelle que soit le type de surface, les bactéries adhèrent facilement et rapidement aux biomatériaux. Ainsi, un IOL placé sur la section conjonctivale pendant 5 secondes au cours d'une chirurgie de la cataracte se contamine dans 26 % des cas (principalement par *S. epidermidis*, 87 %), démontrant ainsi la capacité des bactéries à adhérer instantanément aux IOLs (Kodjikian *et al.*, 2005).

3.2.5. Les infections urinaires

Selon l'étude du NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance) les SCN représentent 9% des bactéries responsables d'infections nosocomiales, tous sites confondus. Ils sont également responsables de 4% des infections urinaires d'origine nosocomiale. Une étude japonaise retrouve même jusqu'à 10% de SCN isolés dans les urines. En urologie, *S. epidermidis* est isolé dans les infections urinaires à SCN avec une fréquence qui varie de 36 à 48% (fig. 03). On le retrouve plus particulièrement chez les patients hospitalisés et/ou porteurs d'une sonde vésicale. Prostatite dans les formes aiguës, l'agent le plus fréquemment isolé est *Escherichia coli*. Parmi les cocci à Gram positif, *S. aureus* est le principal responsable des abcès prostatiques. Par contre, en pathologie chronique, WEDREN a observé une bactériurie à Cocci Gram+, et plus particulièrement à *S. epidermidis*, chez 43% des hommes présentant une prostatite chronique bactérienne. La prostatite chronique à SCN s'accompagne dans la plupart des cas d'un nombre normal de leucocytes dans les sécrétions prostatiques (Becker, 2014).

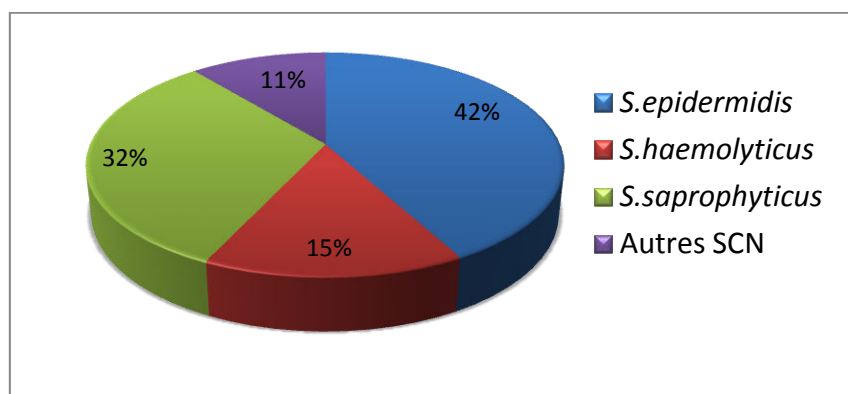


Figure 03 : Répartition des SCN responsables d'infections urinaires (Becker, 2014).

4. Moyens de lutte

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

4.1. Traitement des l'infections par *S. epidermidis* associée à un biomatériau

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

Le traitement des infections associées aux biomatériaux causées par les SCN est en soi un défi clinique car *S. epidermidis* isolé des environnements nosocomiaux est presque toujours résistants à de multiples agents antimicrobiens (Rupp, 2014). Le traitement comprend l'administration d'antimicrobiens par voie orale ou intraveineuse, la technique de verrouillage antibiotique ou l'enlèvement et la réinsertion du cathéter (Strasheim *et al.*, 2013). Selon les recommandations de traitement spécifiques aux agents pathogènes de l'Infectious Diseases Society of America, les infections provoquées par les SCN devraient être traités avec des antimicrobiens pendant 5 jours à 7 jours si le cathéter est retiré et pendant 10 jours à 14 jours si le cathéter est retenu, combinaison avec une antibiothérapie (Strasheim *et al.*, 2013).

La vancomycine constitue la base de la thérapie empirique antimicrobienne de ces infections. Cependant, l'efficacité de la monothérapie à la vancomycine montre des résultats contradictoires et le traitement devrait plutôt être une combinaison de vancomycine et d'autres antimicrobiens, avec une activité antibiofilm, comme la rifampicine, la gentamicine ou la clindamycine (Strasheim *et al.*, 2013).

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

4.2. Métabolites de *Pseudomonas* anti-staphylococciques

Le genre *Pseudomonas* comprend de nombreuses espèces omniprésentes dans notre monde environnant. Bien que certaines puissent causer des infections seulement à certaines personnes immunodéprimées, cela n'a pas empêché les chercheurs d'essayer de trouver des

espèces utiles dans le traitement des maladies causées particulièrement par des staphylocoques et des bactéries multirésistantes (Cardozo *et al.*, 2013 ; Dahah *et al.*, 2016).

Plusieurs études ont confirmé l'existence de quelques espèces de *Pseudomonas* qui ne présentent aucun risque pour la santé humaine, telles que ; les souches MA 342 et DSMZ 13134 de *P. chlororaphis*, la souche A506 de *P. fluorescens* et les souches ESC-10 et ESC de *P. syringae* (Anderson *et al.*, 2018).

Ainsi pour faire face à la résistance croissante des staphylocoques et donc aux échecs des traitements de leurs infections, les chercheurs ont utilisé les composés sécrétés par des *Pseudomonas* dans le but de réduire les risques de staphylocoques à coagulase positive et à coagulase négative. Le choix des espèces du genre *Pseudomonas* est justifié par la simplicité de leur culture et par leur production de divers métabolites anti-staphylococciques (Hotterbeekx *et al.*, 2017).

En dehors des pigments, des métabolites secondaires produits par les *Pseudomonas* fluorescents ont été détectés et étudiés en raison de leur activité antibiotique. L'utilisation pratique des antibiotiques des *Pseudomonas* remonte à la période précédant «l'ère des antibiotiques». En 1899, Emmerich et Löw ont rapporté que le liquide de culture sans cellules de *P. aeruginosa*, concentré au dixième de son volume initial, tuait plusieurs types de bactéries (Leisinger et Margraff, 1979). Cette activité anti-staphylococcique des espèces du genre *Pseudomonas* est due à un nombre de métabolites excrétés que nous mentionnons dans ce qui suit :

1- **La Mupirocine (Acide pseudomonique) :** C'est un antibiotique (Bactériocine) qui a été initialement isolé en 1971 à partir de *P. fluorescens*. Il est vendu sous le nom de la marque **Bactroban**, utilisé comme une crème ou une pommade appliquée sur la peau. La Mupirocine est un antibiotique topique utile contre les infections cutanées superficielles comme l'impétigo ou la folliculite. Il a été utilisé également contre *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM). La Mupirocine est un inhibiteur compétitif de l'isoleucyl-ARNt synthétase chez les staphylocoques, cette inhibition conduit à réduire la biosynthèse des protéines. Dans une étude présentée par Sutherland *et al.*, en 1985 toutes les espèces de staphylocoques ont été inhibées par 0,06 à 0,12, µg de mupirocine par ml, et il n'y avait pas une différence de sensibilité entre *S. aureus* et les staphylocoques à coagulase négative. Dans des tests contre 310 isolats cliniques de *S. aureus*, toutes les souches testées étaient sensibles à la mupirocine. *S. epidermidis* présent dans les narines et la peau humaine, peut être éradiquée par l'utilisation de mupirocine topique avant la chirurgie arthroplastique, ceci peut offrir un moyen de prévention des infections articulaires prothétiques (Salih *et al.*, 2018). Le tableau 03 illustre la

sensibilité à la mupirocine des staphylocoques à coagulase positive et négative et aussi les streptocoques (Sutherland *et al.*, 1985).

2- **Les plusbacins A1 ~ A4 et Bj ~ B4** : Dans une étude de Shoji *et al.*, en 1991 une souche numérotée PB-6250 apparenté au genre *Pseudomonas* a été trouvée productrice d'un complexe d'antibiotiques peptidiques, qui a montré une activité inhibitrice de *S. aureus* résistant à la méthicilline et s'est révélée être un inhibiteur de synthèse de la paroi cellulaire. Ils ont été montrés pour être de nouveaux antibiotiques nommés plusbacins A1 ~ A4 et Bj ~ B4.

Tableau 03 : Activité de la muripocine contre les *Staphylococcus* et les *Streptococcus* (Sutherland *et al.*, 1985)

Organisme	Muripocine MIC µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 6571	0.12
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NCTC 11047	0.12
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 136	0.12
<i>Staphylococcus hominis</i> NCTC 11320	0.12
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> NCTC 11042	0.12
<i>Staphylococcus capitis</i> NCTC 11045	0.12
<i>Staphylococcus cohnii</i> NCTC 11041	0.6
<i>Staphylococcus intermedius</i> NCTC 11048	0.6
<i>Staphylococcus warneri</i> NCTC 11044	0.12
<i>Staphylococcus xylosum</i> NCTC 11043	0.12
<i>Streptococcus pyogenes</i> (A'') 5936	0.12
<i>Streptococcus agalactiae</i> (B) 2866	0.5
<i>Streptococcus equisimilis</i> (C) 2873	0.25
<i>Streptococcus bovis</i> (D) 989	32
<i>Streptococcus faecalis</i> (D) K	32
<i>Streptococcus faecium</i> (D) 22	64
Groupe G <i>Streptococcus</i> (A) 2373	0.12
<i>Streptococcus salivarius</i> (K) 1974	0.5
<i>Streptococcus mitis</i> (viridans) 1324	0.25
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 1760	0.12

* Groupement de Lancefield

3- 4-hydroxy-2-heptylquinoline N-oxide (HQNO): *P. aeruginosa* réduit fortement ou complètement la croissance de *S. aureus* en co-culture dans de nombreux modèles planctoniques ou biofilm *in vitro* (Palmer *et al.*, 2005; Baldan *et al.*, 2014; Deleon *et al.*, 2014). Cette activité anti-staphylococcique de *P. aeruginosa* a été décrite pour la première fois par Lightbown et Jackson (1956), qui a identifié le 4-hydroxy-2-heptylquinoline N-oxide (HQNO) en tant que composé majeur produit par *P. aeruginosa* inhibiteur des systèmes de cytochrome de certaines bactéries, y compris *S. aureus* (Lightbown et Jackson, 1956). Le même phénomène a été décrit à nouveau par Machan *et al.*, en 1991 en testant le surnageant de culture de cinquante isolats cliniques de *P. aeruginosa* sur 261 staphylocoques. La croissance de tous les staphylocoques étaient réduits par chacune des souches de *P. aeruginosa* sous l'effet du HQNO (Machan *et al.*, 1991).

5- Les phénazines : Les phénazines sont des produits naturels produits par les *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* et quelques autres genres du sol ou des habitats marins. Les phénazines sont une grande famille de molécules tricycliques azotées avec une activité antibiotique, antitumorale et antiparasitaire (Laursen et Nielsen, 2004). Les Phénazines isolés de *Pseudomonas* (par exemple *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. fluorescens* et *P. cepacia*) sont pour la plupart des structures simples substituées par des groupes hydroxyle et carboxyle. La pyocyanine (5-N-méthyl-1-hydroxyphénazine), phénazine-1-carboxylique et la phénazine-1-carboxamide sont parmi les phénazines produites par *Pseudomonas*, ont des effets inhibiteurs contre le SARM et pourraient constituer un bon traitement alternatif pour contrôler les infections causées par le SARM (Cardozo *et al.* , 2013). La pyocyanine bloque la respiration oxydative et inhibe la croissance de *S. aureus* (Biswas *et al.*, 2009). C'est l'une des nombreuses phénazines pigmentées produites par *P. aeruginosa* et est un facteur de virulence important. De plus, la présence des organismes à Gram positifs, y compris certains *Staphylococcus* spp., peut induire la production de pyocyanine chez *P. aeruginosa* (Whiley *et al.*, 2014). Par conséquent, la pyocyanine semble être un composé antagoniste sécrétée pour fournir un avantage compétitif à *P. aeruginosa* en inhibant *S. aureus* et d'autres bactéries à Gram positives.

6- LasA protéase : *P. aeruginosa* sécrète aussi une endopeptidase staphylolytique appelée LasA protéase ou staphylolysine, qui dégrade la pentaglycine de la paroi cellulaire chez *S. aureus* provoquant la lyse cellulaire (Kessler *et al.*, 1993). *P. aeruginosa* pourrait utiliser la protéase LasA pour concurrencer avec des staphylocoques mais aussi pour acquérir du fer (Mashburn *et al.*, 2005).

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

8- Les rhamnolipides : Alors que le cis-2- l'acide décénoïque est principalement utilisé comme signal commun pour la dispersion aux stades finaux des biofilms, les rhamnolipides sont utilisés pour déloger les bactéries concurrentes du biofilm. Beaucoup de rhamnolipides sont produits en fonction de la souche de *Pseudomonas* et la source de carbone, et leur synthèse est régulée par le quorum-sensing (Soberón-Chávez *et al.*, 2005). La nature amphiphile des rhamnolipides leur permet d'intercaler dans les membranes cellulaires de différents microorganismes et former des complexes perméabilisant ainsi les membranes et provoquant une fuite de matériau intracellulaire (Sotirova *et al.*, 2008). Les organismes à Gram positifs semblent être plus sensibles à la perméabilisation par les rhamnolipides que les Gram négatif parce que la présence de lipopolysaccharides protège la membrane de cellule contre l'effet des surfactants (Soberón-Chávez *et al.*, 2005). Pour *S. aureus* et *S. epidermidis*, les rhamnolipides induit la dispersion du biofilm et inhibe son adhérence (Valle Gomes et Nitschke, 2012; Pihl *et al.*, 2013).

9 - P. aeruginosa induit une dispersion du biofilm S.epidermidis

Les molécules anti-staphylococciques produites par *P. aeruginosa* sont également actif contre d'autres staphylocoques, y compris *S. epidermidis*. *P. aeruginosa* s'est avéré inhiber efficacement et perturber les biofilms établis par *S. epidermidis* et provoque le détachement sans tuer les cellules pendant la formation du biofilm des deux espèces (Qin *et al.*, 2009; Pihl *et al.*, 2010). Après co-inoculation à proportions égales de *P. aeruginosa* et *S. epidermidis* pourraient coexister jusqu'à 18 heures. Après cette période, les cellules de *S. epidermidis* dans le biofilm sont lysées par *P. aeruginosa* (Pihl *et al.*, 2010). Ces données suggèrent qu'il y a deux étapes dans les interactions entre *P. aeruginosa* et *S. epidermidis*, le premier comprend l'induction du détachement de cellules de *S. epidermidis* viables du biofilm, tandis que dans la deuxième étape c'est la lyse cellulaire et le détachement total (Pihl *et al.*, 2010). *P. aeruginosa* empêche la fixation initiale de certains *S. epidermidis*. En outre, l'exposition d'un biofilm à *S. épidermidis* formé sur un cathéter à un surnageant de *P. aeruginosa* cause également la dispersion de ce biofilm (Pihl *et al.*, 2013).

La figure 04 montre les facteurs extracellulaires produits par *P. aeruginosa* qui affectent la formation de biofilm, la respiration oxydative, la lyse cellulaire et la virulence de *S. aureus*. La lyse de *S. aureus* entraîne une augmentation du fer extracellulaire et le N-acétyl glucosamine (GlcNac), qui sont détectées par *P. aeruginosa*. En commun avec les AHL (N-

acyl homoserine lactone), les PQS (*Pseudomonas* quinolone signal) régule la virulence, la production de rhamnolipides, le cis-2- l'acide décénoïque , la pyocyanine, LasA protéase et le 4-hydroxy-2-heptylquinoline N-oxide (HQNO).

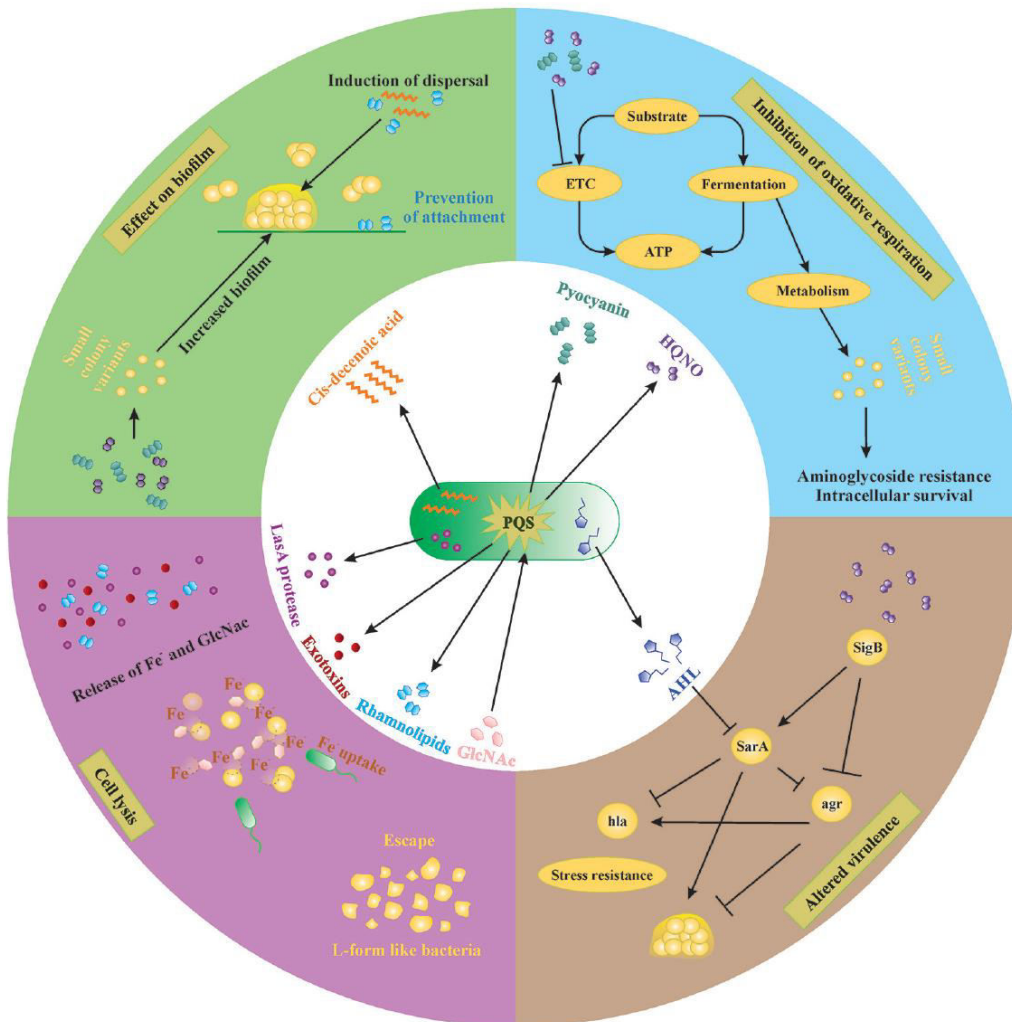


Figure 04 : Les facteurs extracellulaires produits par *P. aeruginosa* affectant *S. aureus* (Hotterbeekx *et al.*, 2017)

Matériel et méthodes

1. Provenance des isolats de *Staphylococcus* à coagulase négative (SCN)

20 isolats cliniques de SCN ont été sélectionnés pour cette étude, ils ont été fournis par M^{me} ZATOUT Asma du laboratoire de Microbiologie et de Biologie végétale de Mostaganem identifiés par galerie API Staph. Ces souches provenaient de prélèvements pathologiques (des cathéters, des urines et des hémocultures) des patients au niveau du centre anti cancer de Batna. Dans cette étude, les SCN ont été utilisés comme microorganismes-cibles pour déterminer les activités antagonistes et le spectre d'action des *Pseudomonas*.

2. Identification confirmative des isolats

Les isolats cliniques des SCN ont été ensemencés sur milieu Chapman. Ce milieu permet de confirmer la tolérance de ces isolats aux fortes concentrations du NaCl. Les SCN donnent des colonies de petites tailles sans ou avec fermentation du mannitol (Denis *et al.*, 2011).

2.1. Etude microscopique

Cette étude est réalisée après une coloration de Gram qui permet de connaître le type de Gram de la bactérie ainsi que la morphologie de ses cellules.

2.2. Recherche de la catalase

Ce test permet de différencier les staphylocoques des streptocoques (Garnier et Denis, 2007). Il est basé sur la détection de la production de l'enzyme catalase par la bactérie. Il s'agit de mettre en contact une colonie bactérienne avec de l'eau oxygénée. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un dégagement gazeux sous forme de mousse ou de bulles.

2.3. Recherche de la coagulase

La coagulation du plasma humain citraté (Baylass et Hall, 1965) par une coagulase a été réalisée dans un bouillon de cœur-cerveille (BHIB), incubé pendant 18h à 37°C est mis en contact volume à volume avec du plasma pendant 30 minutes à 24h à 37°C. Si la bactérie possède une coagulase, il y aura coagulation du plasma (Denis *et al.*, 2011).

3. Isolement des *Pseudomonas*

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

conditions aseptiques. Les plantes avec leurs racines sont introduites dans des sachets en plastique étiquetés et transportés rapidement au laboratoire.

3.1. Préparation des échantillons

10 g de chaque échantillon sont mis dans un flacon de 250 ml contenant 100 ml d'eau physiologique stérile (9% de NaCl). Les flacons sont alors mis en agitation, puis une série de dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-6}) est effectuée à partir de chaque échantillon. Dans une boîte de Pétri contenant de la gélose King B, 0,1 ml de surnageant est déposé et étalé avec un étaleur stérile. Après l'ensemencement les boîtes sont incubées à 30°C pendant 48h.

3.2. Choix et Purification des *Pseudomonas* fluorescents

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

3.3. Conservation des bactéries

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

4. Orientation vers l'identification des *Pseudomonas*

4.1. Etude morphologique

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

4.2. Recherche du cytochrome oxydase

Ce test est employé couramment pour l'identification des bacilles à Gram négatif. A l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, une partie de la culture a été mise en contact avec un disque

d'oxydase. La réaction est considérée comme étant positive après apparition d'une couleur violette après 30 à 60 secondes (Denis *et al.*, 2011).

4.3. Test de catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage. Sur une lame en verre bien nettoyée, on dépose une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes, puis on émulsionne un peu de la colonie suspecte ou de la culture obtenue sur gélose. Le dégagement d'oxygène se traduit par effervescence qui est un résultat positif visible à l'œil nu, l'absence d'effervescence est un résultat négatif (Delarras 2014).

5. Test d'antagonisme *in vitro* :

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

Méthode directe : (confrontation bactérie ou champignon / bactérie) (Fleming *et al.*, 1975).

Méthode indirecte : (confrontation surnageant bactérien / bactérie) (Barefoot et Klaenhammer, 1983).

5.1. Méthode directe : Méthode de strie verticale (croisement)

Cette méthode consiste à ensemercer la souche antagoniste de *Pseudomonas* en un seul trait à la surface du milieu solide et en bordure de la boîte de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton (MH). Après incubation de pendant 48h à 30°C, les *Staphylococcus* sont ensemencés perpendiculairement à *Pseudomonas*. La lecture des résultats se fait en mesurant la distance d'inhibition (absence de croissance du SCN) entre les bordures de la souche cible et de la souche de *Pseudomonas* à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle graduée. Le résultat de l'interaction entre l'isolat antagoniste et le *Staphylococcus* est noté après 24h d'incubation à 37°C (Selvin *et al.*, 2009).

5.2. Méthode indirecte : Recherche de l'effet inhibiteur du surnageant de culture des *Pseudomonas*

Cette méthode repose sur la diffusion de l'agent inhibiteur dans des puits réalisés dans une gélose contenant une souche indicatrice. Le surnageant de culture des *Pseudomonas*, a été obtenu après centrifugation d'une culture dans le milieu MH liquide à 5000g pendant 20 minutes pour faire sédimenter les particules présentes, le surnageant a été filtré à travers un filtre millipore de 0,22 µm.

A partir d'une culture pure de 24h des souches indicatrices, dont la densité optique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à $\lambda=625$ nm (située entre 0,08 et 0,1 valeur

équivalente au standard 0,5 MacFarland), 0,1 ml a été déposé dans chaque boîte de Pétri contenant 20 ml de gélose MH. Après solidification du milieu, des puits de 4 mm de diamètre ont été réalisés à l'aide d'une pipette pasteur stérile, ensuite, chaque puits a été rempli par 50µl de surnageant filtré.

Les boîtes ont été mises à 4°C pendant 2h, afin que les métabolites puissent diffuser, puis incubées à 37°C pendant 24h. La lecture a été effectuée après 24h d'incubation. L'inhibition a été révélée par la présence des zones d'inhibitions (halo transparent) autour des puits (Veerendrakumar *et al.*, 2015).

6. Identification par galerie API 20NE

Afin d'obtenir une orientation vers le genre et l'espèce de l'isolat performant (k), une identification biochimique par galerie API 20NE a été effectuée. La galerie API 20 NE est composée de 20 microtubes (surmontés de cupules) contenant des substrats déshydratés, qui permettent de réaliser 20 tests biochimiques dont 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation. Le test d'oxydase constitue le 21^{ème} test d'identification à effectuer hors galerie (Delarras, 2014). La lecture des résultats se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification par un logiciel d'identification.

6.1. Préparation, inoculation et incubation de la galerie

Le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation sont réunis, ensuite environ 5 ml d'eau distillée stérile sont répartis dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Puis, à partir d'une culture de 18 à 24h, une suspension bactérienne ajustée à (DO) équivalent à 0.5 de McFarland est préparée. Les microtubes des tests NO₃ à PNPG sont remplis avec la suspension préparée. Ensuite environ 200 µl de la suspension précédente est transférée dans une ampoule d'API AUX Medium pour remplir les microtubes et les cupules des tests GLU à PAC. Les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) sont remplies d'huile de paraffine stérile. A la fin la boîte d'incubation est fermée et incubée à 30°C pendant 24h.

6.2. Lecture et interprétation

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

- **Test NO₃** : Une goutte de chaque réactif (NIT1 et NIT2) est ajoutée dans la cupule NO₃. Après 5 minutes, une couleur rouge indique une réaction positive. Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles).

Pour cela, 2-3 mg de poudre de Zn sont ajoutés dans la cupule NO₃. Après 5 minutes, une cupule restée incolore indique une réaction positive. Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative.

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

7. Production et extraction des phénazines

L'extraction des composés phénaziniques a été faite selon la méthode décrite par Bonsall *et al.*, 1997 et Dahah *et al.*, 2016. L'isolat performant de PK a étéensemencé dans des boîtes de Pétri contenant le milieu King B solide qui sont incubées à 30°C pendant 24h. 20 flacons de 200 ml contenant 50 ml du milieu NBY (Nutrient Broth Yeast Extract) liquide ont été inoculés par l'isolat PK, ensuite incubés à 30°C pendant 72h, sous agitation permanente de 180 tr/min.

Les cultures ont été centrifugées après incubation et le surnageant a été acidifié à pH 2 par du HCl concentré afin d'éliminer les protéines (Delaney *et al.*, 2001 ; Dahah, 2017).

7.1. L'extraction des Phénazines

Les phénazines ont été extraits du surnageant par l'acétate d'éthyle en raison de 1 v /v. Les deux phases ont été introduites dans une ampoule à décanté (fig. 05). Après avoir bien fermé l'ampoule, une agitation a été faite énergiquement en prenant soin de dégazer régulièrement, ensuite, l'ampoule est reposée sur son support pour laisser décanter. Une fois la décantation terminée le robinet est ouvert pour récupérer la phase aqueuse, puis la phase organique. La phase aqueuse est réintroduite à l'ampoule pour une deuxième extraction avec 1v/v de l'acétate d'éthyle, une agitation est faite, et après décantation les phases organique sont réunies et l'extraction proprement dite est terminée.

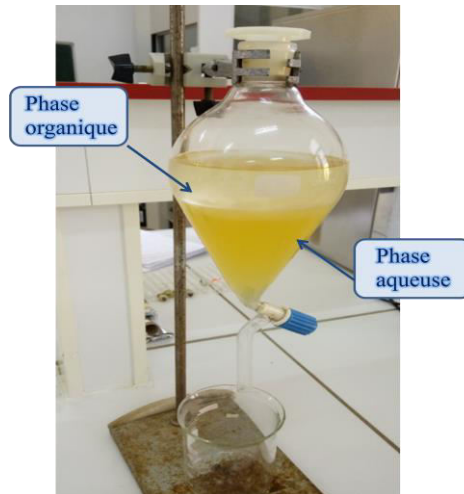


Figure 05 : photo de la séparation de la phase organique d'acétate d'éthyle.

7.2. Séchage de la phase organique

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

7.3. Séchage sous pression réduite

La phase organique a été ensuite concentrée à sec sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif à 55°C pour l'évaporation de l'acétate d'éthyle (fig. 06). L'acétate d'éthyle qui est condensé par un réfrigérant est récupéré dans une ampoule (Mezaache, 2012). Le substrat sec est resuspendu dans du méthanol pour des manipulations ultérieures (Delaney *et al.*, 2001 ; Dahah , 2017).

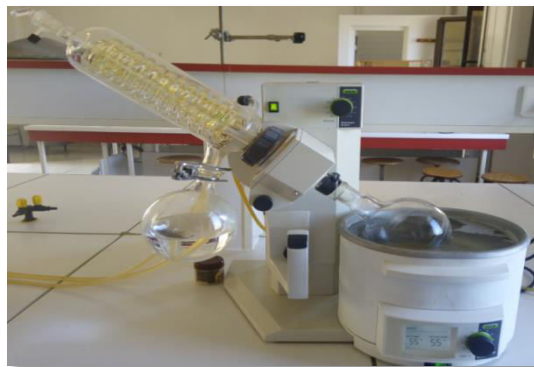


Figure 06 : photo de l'étape de séchage par Rotavapeur.

8. Etude de l'activité antimicrobienne de l'extrait par la méthode des disques

Afin de déterminer l'activité antibactérienne de l'extrait obtenu, une méthode des disques de diffusion a été réalisée. Deux solutions de 0,25 g/ml et 0,5g/ml du substrat sec ont été préparées dans du méthanol. 0,1 ml d'inoculum de chacun des 20 isolats de *Staphylococcus* a été déposé et étalé par écouvillonnage dans chaque boîte de Pétri contenant environ 15 ml de gélose MH. Les disques stériles (6 mm de diamètre) ont été déposés à l'aide d'une pince flambée et imprégnés avec 10 µl de l'extrait (Hazalin *et al.*, 2009). Ensuite, les boîtes ont été mises à 4°C pendant 2h afin que les métabolites puissent diffuser puis incubées à 37°C pendant 24h.

9. Caractérisation et identification du métabolite extrait

9.1. Analyses par spectrophotomètre UV-visible

L'extrait sec de phénazine a été mis dans une solution de méthanol puis mis dans une cuve pour une analyse par spectrophotomètre dans le but de caractériser le spectre d'absorption de ce métabolite.

9.2. Identification par infrarouge à transformation de fourrier (FTIR)

Un échantillon de l'extrait a été envoyé pour une analyse par infrarouge à transformation de fourrier (FTIR) dans le but de caractériser partiellement la structure de l'extrait phénazinique (Dahah *et al.*, 2016).

Résultats et discussions

1. Confirmation de l'identification des SCN

Sur le milieu de culture Chapman (fig. 07), les colonies présentent un aspect macroscopique caractéristique du genre *Staphylococcus*. Les colonies sont de petite taille sans fermenter le mannitol (*S. epidermidis* et *S. haemolyticus*). Cependant, certaines souches ont fermenté le mannitol, tout comme, *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii* et *S. epidermidis* (quelques souche ont donné une teinte rose / orange : mannitol +) (Denis *et al.*, 2011).

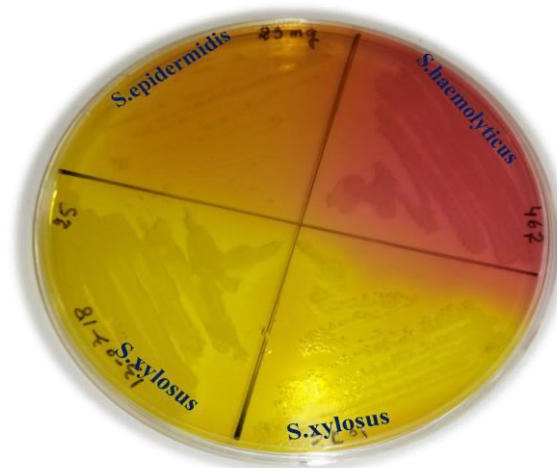


Figure 07 : Aspect macroscopique des colonies des SCN sur gélose Chapman.

1.1. Etude microscopique

La coloration de Gram a montrée des cocci à Gram positif (fig. 08), isolés (a), regroupés en diplocoques (b) ou en court chainette (c), et en amas ayant la forme de grappes de raisin (d) (Avril, 1992).

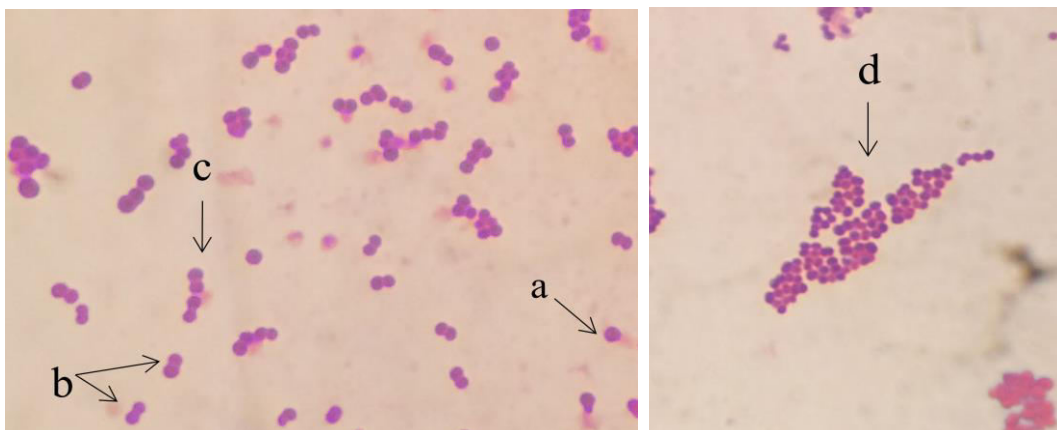


Figure 08 : Observation microscopique des *Staphylococcus* après coloration de Gram (x1000)

1.2. Test de catalase

Toutes les souches des staphylocoques testées pour la production d'une catalase, ont décomposé l'eau oxygénée en eau et en oxygène qui se traduit par le dégagement des bulles de gaz (fig. 09).



Figure 09 : Résultats de test de la catalase des SCN

+ Résultat positif, - Témoin négatif

1.3. Recherche de la coagulase

La présence d'une coagulase est utilisée pour distinguer entre les staphylocoques à coagulase positive principalement *S. aureus*, ainsi *S. intermedius*, *S. hyicus* et les staphylocoques à coagulase négative (Hart and Shears, 1999). Les 20 isolats de staphylocoques ne possèdent pas une coagulase libre (fig. 10).



Figure 10 : Recherche de coagulase libre

(A) : Témoin négatif (plasma+ bouillon), (B) : *S. epidermidis*, coagulase négative;.(24h à 37°C)

2. L'analyse de l'antibiogramme

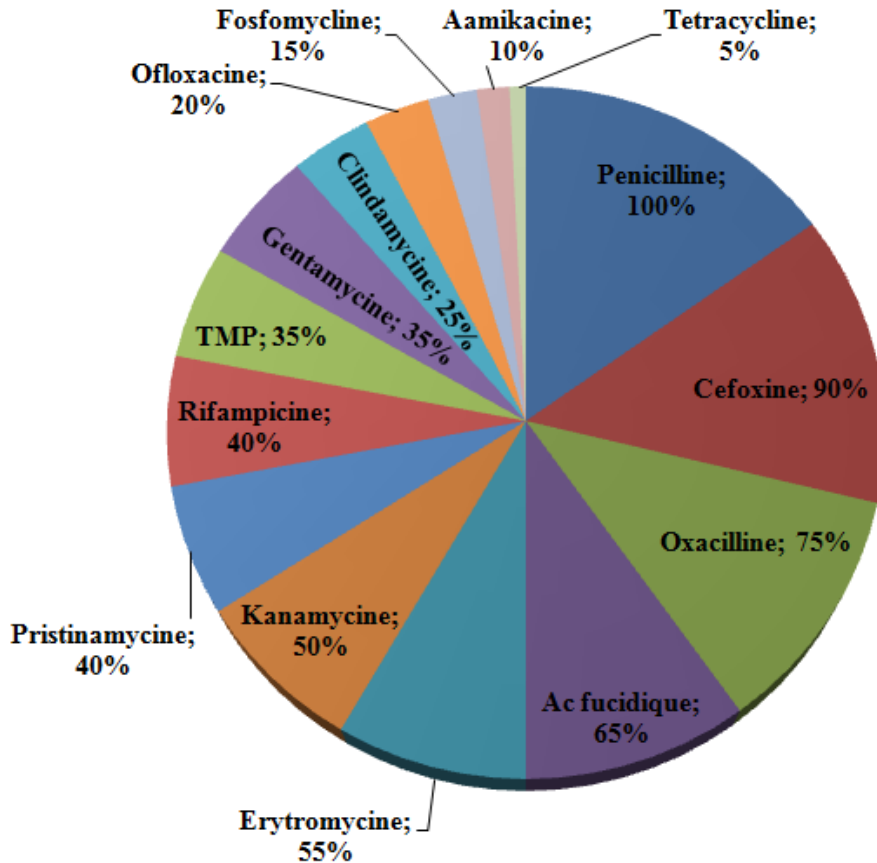


Figure 11 : L'analyse de l'antibiogramme des *Staphylococcus* à coagulase négative

Il ressort de l'analyse de l'antibiogramme que ces germes présentent des réponses différentes vis-à-vis les antibiotiques testés (fig. 11). Les isolats ont résistés aux 15 antibiotiques avec des pourcentages différents. Par contre ils sont complètement sensibles aux trois autres antibiotiques : Chloramphenicol, Vancomycine et Teicoplanine.

3. Isolement et purification des isolats de *Pseudomonas*

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

4. Caractérisation des bactéries isolées et purifiées

4.1. L'examen macroscopique

L'étude macroscopique a permis d'isoler 3 types de colonies distinctes par les caractéristiques regroupés dans le tableau 04.

Tableau 04 : Observations macroscopiques de quelques colonies

	Couleur	Contour	Elévation	Contour	Consistance
I1	Verte	Ronde	Bombée	Régulier	Muqueuse
I2	Jaune verdâtre	Ronde	Bombée	Irrégulier	Crémeuse
I3	Verte	Ronde	Plate	Irrégulier	Lisse brillante

Nos isolats sont caractérisés par la production du pigment pyoverdine (fig. 12). Ce pigment diffuse dans les cultures sur gélose King B et les colonies colorent le milieu en jaune verdâtre, ces caractères sont spécifiques des espèces fluorescentes du genre *Pseudomonas* (Singleton, 1999).



Figure 12 : Aspect macroscopique d'un isolat de *Pseudomonas* sur gélose King B

4.2. L'examen microscopique

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

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

Les résultats obtenus suite à la coloration de Gram montrent que les 29 isolats sont des bacilles à Gram négatif (fig. 13) ; fins et droits ; isolés ou en diplobacilles ; dépourvu de spores (Delarras, 2014).



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

4.3. Résultats des tests biochimiques

Tous nos isolats sont catalase positif (fig. 14a), ils ont dégagé des bulles d'air après contact avec l' H_2O_2 (Delarras, 2014), et ont une cytochrome oxydase (Palleroni, 1984) sauf les trois isolats P3, P12 et P26. Certains isolats comme le PN et le PQ ont présenté une activité oxydase intense (fig. 14b).

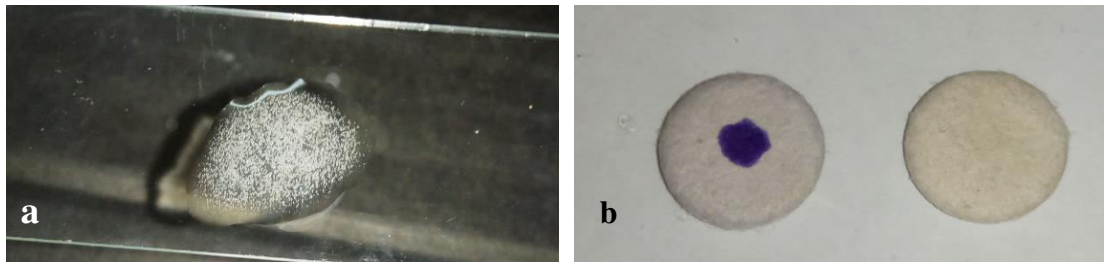


Figure 14 : a. Test de catalase pour un isolat de *Pseudomonas* b. Test d'oxydase isolat de *Pseudomonas*.

5. Résultats du test d'antagonisme *in vitro*

Les résultats du test d'antagonisme *in vitro* par la méthode directe, technique du croisement vertical, ont montré une inhibition de la croissance des SCN. Cette inhibition est variable selon l'isolat de *Pseudomonas* et la souche de SCN testée (fig. 15).

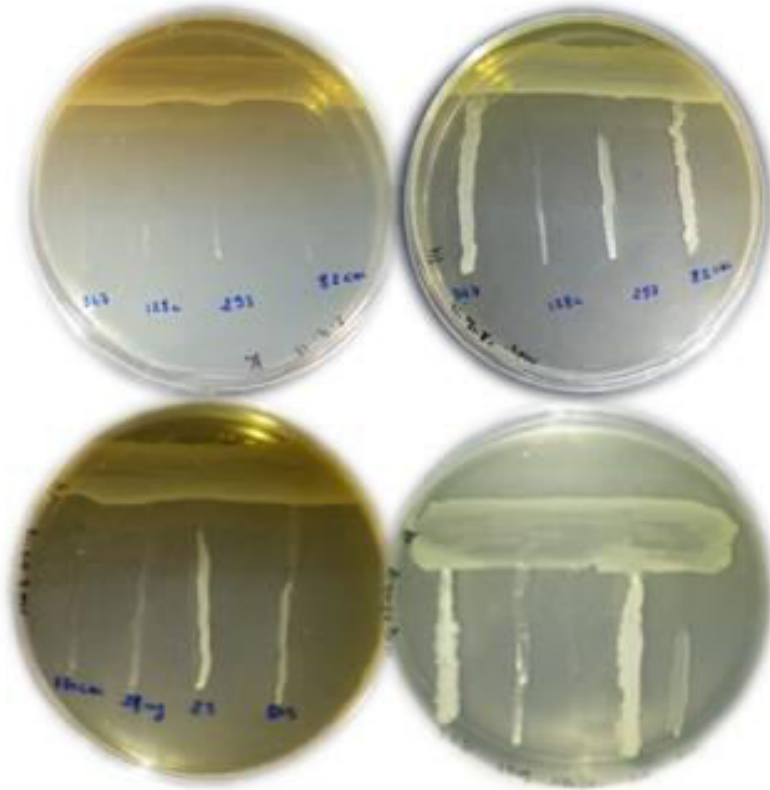


Figure 15 : Activité antagoniste des *Pseudomonas* vis-à-vis les isolats de SCN

Les résultats de ce test ont montré globalement que tous les 29 isolats de *Pseudomonas* testés, ont révélés un pouvoir d'inhibition de croissance, 19 sur 20 des *Staphylococcus* ciblés ont été inhibés (Tableau 05). Des zones claires entre *Pseudomonas* et certains *Staphylococcus* testés ont été observées, ces zones varient de 3 à 55 mm, l'histogramme donné par la (fig. 16) présente les différentes distances de zones d'inhibition en mm entre les isolats de *Pseudomonas* et les *Staphylococcus*. La zone la plus grande a été remarquée par l'isolat PK contre la bactérie *S. epidermidis* 94C. Le deuxième histogramme donné par la (fig. 17) montre le nombre des *Staphylococcus* inhibés par chaque isolat de *Pseudomonas*. 14 différents *Staphylococcus* ont été inhibés par l'isolat PK, tandis que l'isolat PR qui n'a inhibé que 6 *Staphylococcus* a pu donner un effet sur *S. epidermidis* 203CAC. résistant à tous les autres isolats de *Pseudomonas*, ce qui reflète la différence des substances inhibitrices responsables d'activité antagoniste chez chaque souche.

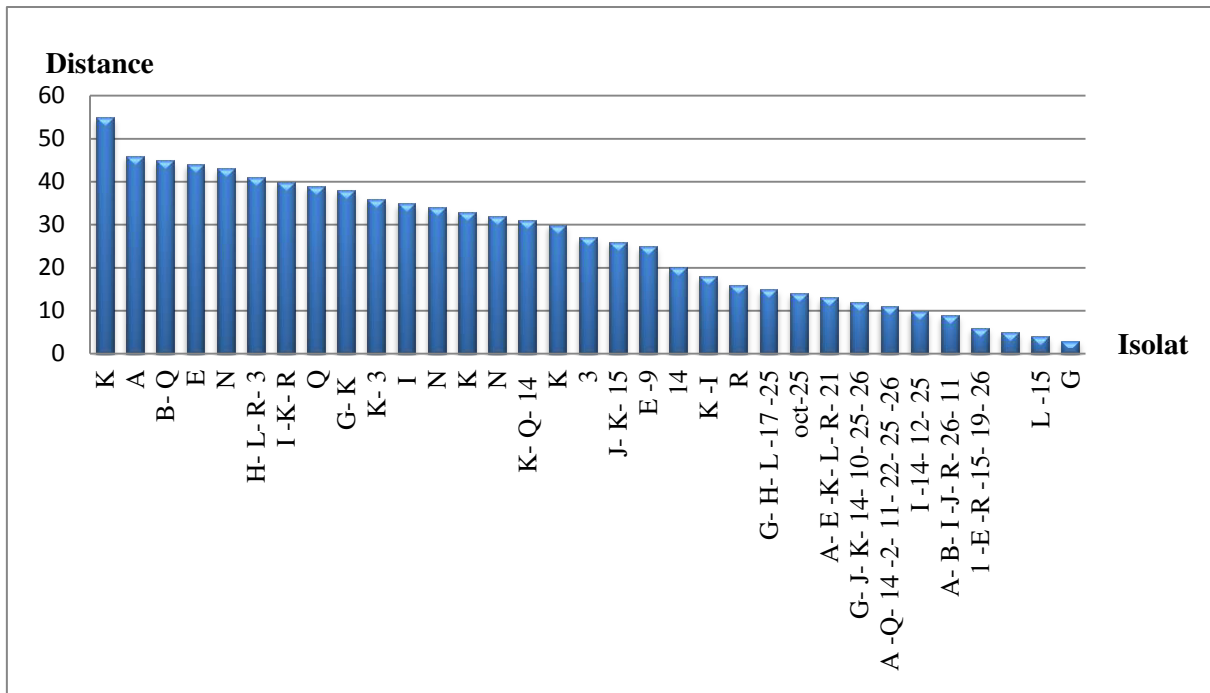


Figure 16 : les distances de zones d’inhibition entre les isolats de *Pseudomonas* et les *Staphylococcus*

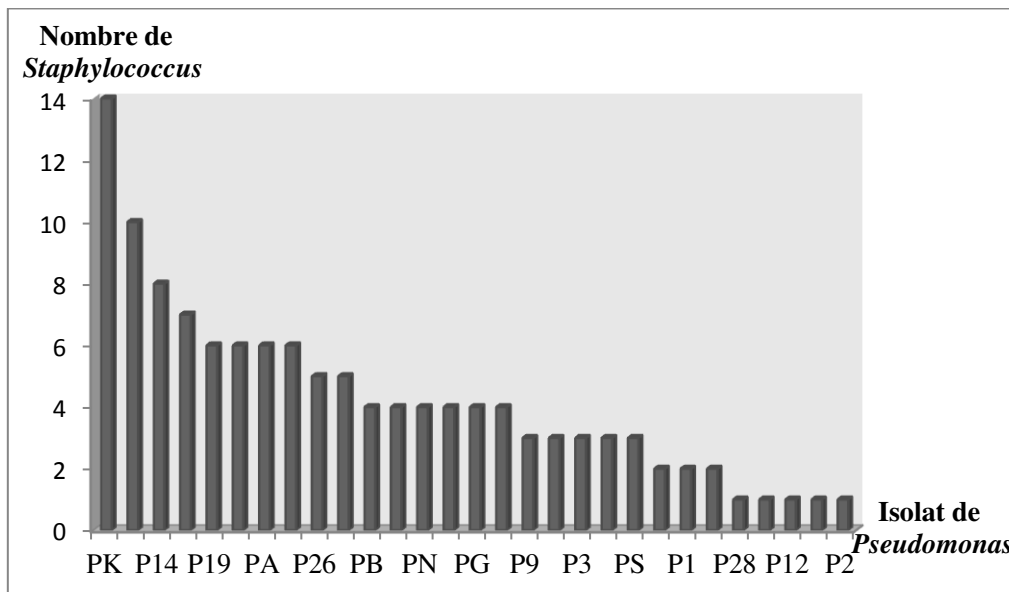


Figure 17: Nombre de *Staphylococcus* inhibés par chaque isolat de *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* fluorescents qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique (Allaire, 2005). En plus de la compétition pour les sources de carbone, l'antagonisme peut être attribué en grande partie à la production de métabolites

secondaires (antibiotiques, sidérophores, acide cyanhydrique, les enzymes etc.) (Jaques *et al.*, 1993).

En effet, *P. aeruginosa* produit plus de 55 quinolones / quinoléines en plus de la 2-heptyl-3-hydroxy-4 (1H) -quinolone, et celles-ci possèdent une activité antibiotique significative contre les bactéries à Gram positives. Les quinolines antimicrobiennes peuvent être conditionnées dans des vésicules membranaires extracellulaires pour provoquer une lyse directe de *S. epidermidis* (Mashburn & Whiteley, 2005). Une autre protéine extracellulaire sécrétée par *P. aeruginosa* qui a une activité staphylolytique notable est la protéase LasA. Les polysaccharides extracellulaires sécrétés par *P. aeruginosa* pourraient représenter une stratégie prometteuse à utiliser contre les biofilms staphylococciques dans de futures applications (Qin *et al.*, 2009).

6. L'effet inhibiteur du surnageant de culture des *Pseudomonas*

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

	<i>S.epidermidis</i>									<i>S.haemolyticus</i>						<i>S.xylosum</i>			<i>S.cohinii</i> spp <i>cohinii</i>	<i>S.homi</i> <i>-nis</i>	T
	29mg	94 C	170	893	203 C	173	82 C	128	123 C	805	182 H	467	10 76	316 H	14 : 15	25	293	34 7H	106C	132	
PG	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	4
P15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	4
P9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	3
P11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	3
P3	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
PJ	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
PS	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	3
P22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	2
P1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2
PH	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
P28	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
P21	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
P12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
P17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
P2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

+ : positif - : Négatif **T** : Total

1. L'effet antimicrobien de l'extrait de phénazines

La production de phénazine par l'isolat PK a été effectuée sur le milieu NBY, et l'extraction a été faite par l'acétate d'éthyle. L'extrait de phénazine sec a été mis ensuite dans une solution de méthanol pour tester son effet antimicrobien.

Les résultats obtenus ont montré que notre extrait présente une activité anti-staphylococcique, comme le montre la (fig. 18) des zones claires autour les disques imprégnés de l'extrait de phénazine ont été observées. Ces zones d'inhibition varient selon la souche testée entre 6,5 et 28,5 mm (Tableau 06). La plus grande zone a été remarquée contre la l'isolat 347 (*S. xylosus*). Un disque supplémentaire a été imprégné par la solution de méthanol et n'a donné aucun effet sur nos bactéries cibles.

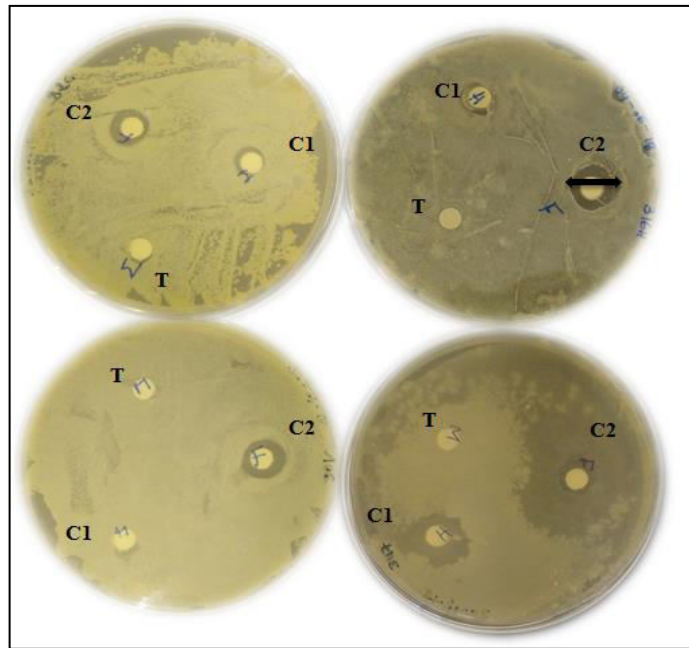


Figure 18 : Effet antimicrobien de l'extrait de phénazines sur les bactéries cibles

Tableau 06 : Activité antimicrobienne de l'extrait de phénazines

Numéro de l'isolat	Les bactéries testées	Diamètre des zones d'inhibition (mm)
106CAC	<i>S. cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>	12
316H	<i>S. haemolyticus</i>	14.5
347	<i>S. xylosus</i>	28.5
82CAC	<i>S.epidermidis</i>	10.5
293	<i>S. xylosus</i>	9.5
805	<i>S. haemolyticus</i>	9.5
25	<i>S. xylosus</i>	11.5
123	<i>S.epidermidis</i>	16
1076	<i>S. haemolyticus</i>	18
128	<i>S. epidermidis</i>	11.5
29mg	<i>S. epidermidis</i>	20.5
170CAC	<i>S. epidermidis</i>	13
467	<i>S. haemolyticus</i>	16.5

Nos résultats sont en accord avec les études de plusieurs auteurs, qui ont montré que les substances phénaziniques sont connues pour leurs activités antifongiques et antibactériennes (Shahid *et al.*, 2017). Selon d'autres études menées par Borrero *et al.*,(2014) des extraits de phénazine à partir des isolats de *Pseudomonas* ont inhibé la croissance de *S. aureus* et *S. epidermidis*. L'activité inhibitrice de ce métabolite peut être attribuée à son pouvoir oxydo-réducteur cellulaire ; en présence d'oxygène et d'agents réducteurs (incluant le NADH et le NADPH), causant ainsi l'accumulation de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène toxique (Mezaache, 2012).

2. Résultat de l'identification de l'isolat Pk par la galerie Api

L'isolat PK était parmi les isolats les plus performants, il a inhibé le plus grand nombre des *Staphylococcus* testés avec de grandes zones d'inhibition. Une galerie d'identification a été utilisée pour nous orienter vers le genre et l'espèce de cet isolat de *Pseudomonas*. Après incubation, la lecture de la galerie a été faite en se référant au tableau de lecture (Tableau 07). Les résultats de toutes les réactions sont notés sur la fiche de résultats (fig.19), et ils nous orientent vers l'identification de l'espèce *Pseudomonas fluorescens*.

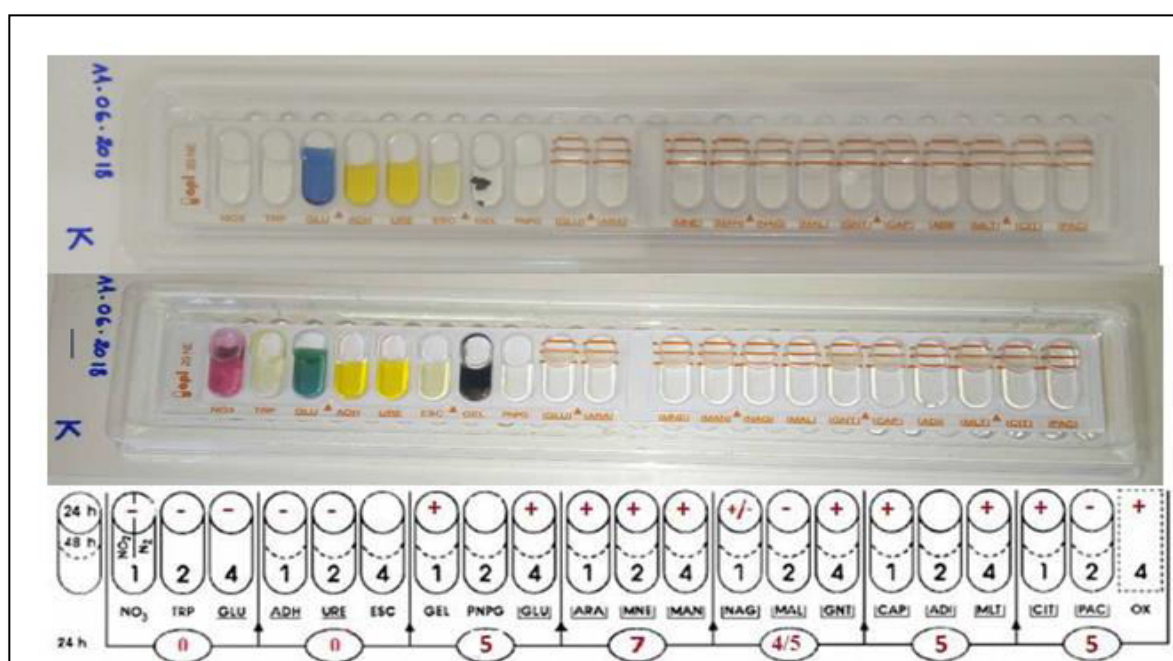


Figure 19: Résultats d'orientation vers l'identification de l'isolat PK sur galerie API NE 20

Tableau 07: Résultats des différents tests biochimique de la galerie API 20 NE

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

3. Caractérisation et identification du métabolite extrait

3.1. Analyses par spectrophotomètre UV-visible

L'extrait sec de phénazine a été mis dans une solution de méthanol, et après analyse par spectrophotomètre nous avons obtenu un seul pic. Le pic obtenu est montré dans la (fig. 20). L'extrait a montré des caractéristiques d'absorption à environ 220 nm.

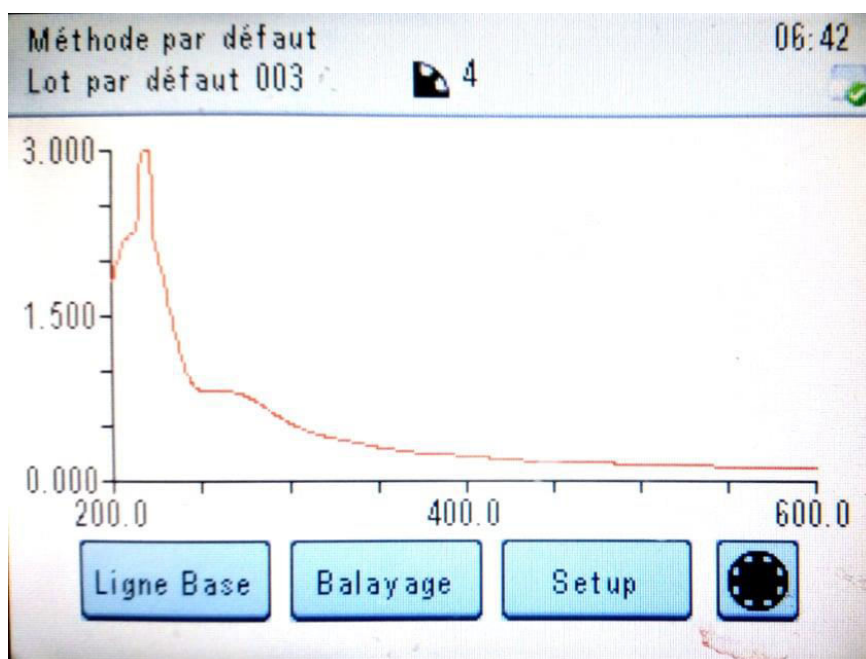


Figure 20 : Spectre d'absorption de phénazine par spectrophotomètre UV-visible

9.2. Identification par infrarouge à transformation de fourrier (FTIR)

Le spectre IR obtenu représente les vibrations caractéristiques des différentes liaisons constituant la structure de l'extrait étudié (fig. 21). La majorité des pics apparaissent dans le domaine 400 à 4000 cm^{-1} . Les bandes d'absorption correspondent à la molécule dont le détail est le suivant :

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

- Une bande située à 1072 cm^{-1} , correspond à l'élongation $=\text{C}-\text{O}-$.

Les différentes bandes détectées correspondent à la molécule de la hydroxyphénazine

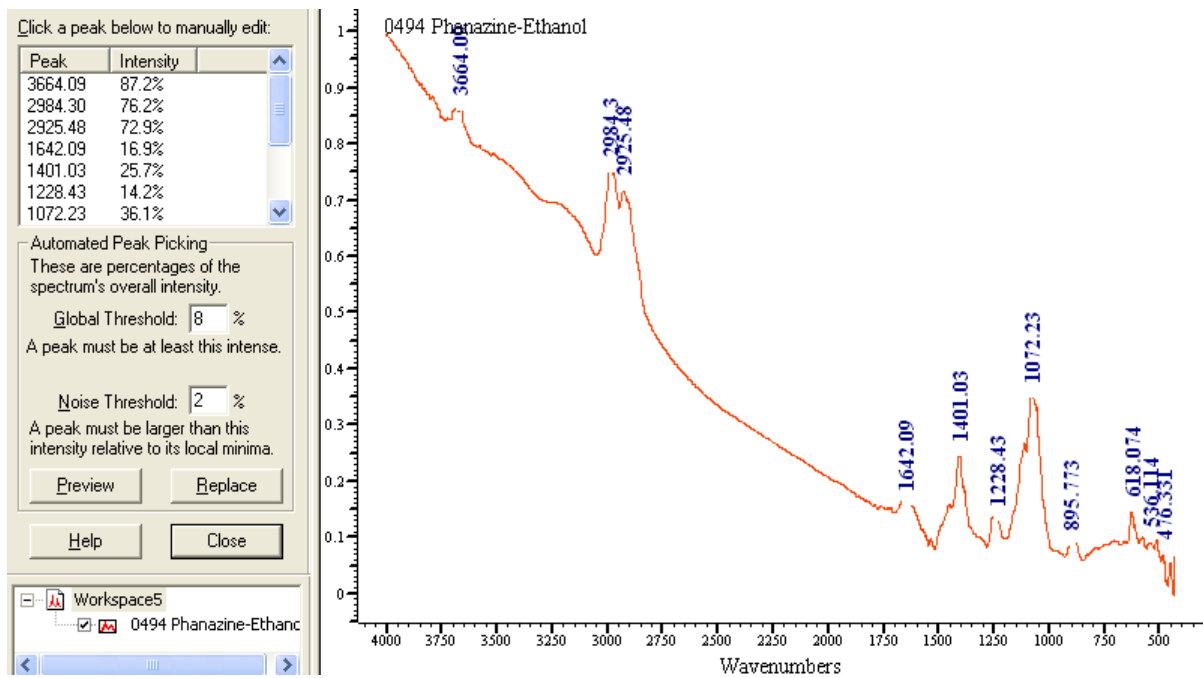


Figure 21: Spectre de l'identification de phénazine par FTIR.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Le présent travail a pour objectif d'isoler à partir d'un sol rhizosphérique des *Pseudomonas* fluorescents (qui sont connus par leur grande capacité à synthétiser des métabolites secondaires) pour les utiliser comme un moyen de lutte contre des *Staphylococcus* à coagulase négative.

Les SCN cibles utilisés dans cette étude ont été isolés des patients hospitalisés. Ces germes ont été obtenus du laboratoire de microbiologie et biologie végétale appartenant aux espèces suivantes : *S. epidermidis*, *S. cohnii* ssp. *cohnii*, *S. haemolyticus*, *S. xylosum*, *S. cohnii* et *S. hominis*. Des tests d'identification répétés ont été effectués dans cette étude pour confirmer quelques caractères de ce groupe bactérien. Les SCN obtenus pour cette étude présentent tous un aspect caractéristique du genre *Staphylococcus* sur le milieu de culture Chapman. Ils sont des cocci à Gram positif, à catalase positif et à coagulase négative. Ces isolats sont tous sensibles aux trois antibiotiques : Chloramphénicol, Vancomycine et Teicoplanine.

L'isolement des *Pseudomonas* a été réalisé à partir des échantillons de racines d'une plante qui fait partie des graminées sauvages *Hordeum murinum*. Les 29 isolats de *Pseudomonas* ont subi un test d'antagonisme sur milieu le Mueller-Hinton solide afin d'évaluer leur pouvoir anti-staphylococcique contre 20 isolats cliniques de SCN. Ainsi, 29 isolats de *Pseudomonas* testés, ont révélés un pouvoir d'inhibition sur 19 *Staphylococcus*. Ces zones d'inhibition varient de 3 à 55 mm, la zone la plus grande a été constatée chez l'isolat PK contre l'isolat n° 94C de *S. epidermidis*. 14 différents *Staphylococcus* ont été inhibés par l'isolat PK. Les autres *Pseudomonas* ont inhibé moins d'isolats que PK mais la majorité a inhibé un nombre non négligeable de *Staphylococcus* avec une diversité dans leur spectre, par conséquent tous les SNC (sauf un seul isolat) ont été inhibés par tous les isolats de *Pseudomonas* confondus. Ceci reflète la différence des substances inhibitrices responsables de l'activité antagoniste chez chaque souche.

Le résultat de l'identification de l'isolat PK par la galerie API NE nous a permis de le rapprocher à l'espèce *Pseudomonas fluorescens*.

L'extrait phénazinique produit par l'isolat PK présente une activité anti-staphylococcique. Ses zones d'inhibition varient selon la souche testée entre 6,5 et 28,5 mm. La plus grande zone a été remarquée contre l'isolat 347 (*S. xylosum*).

L'analyse de cet extrait par un spectrophotomètre UV-visible a montré un pic d'absorption à environ 220 nm . L'identification par infrarouge à transformation de fourrier (FTIR) a révélé que la majorité des pics apparaissent dans le domaine 400 à 4000 cm⁻¹ et que les différentes bandes détectées correspondent à la molécule de la hydroxyphénazine.

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

- du point de vue taxonomique, il serait nécessaire d'effectuer une étude moléculaire des isolats de *Pseudomonas* et leurs bactéries cibles les SCN.
- la purification et l'identification des substances inhibitrices responsables de l'activité des 29 *Pseudomonas*.
- l'étude de l'activité des substances inhibitrices vis-à-vis la formation des biofilms et les biofilms matures des SCN.

Références bibliographiques

- Akinkunmi EO, Adeyemi OI, Igbeneghu OA, Olaniyan EO, Omonisi AE and Lamikanra A, (2014). The pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* on the intestinal organs of rats and mice: an experimental investigation. BMC Gastroenterology. Vol: 14(126): 2-8.
- Ali H, Greco-Stewart VS, Jacobs MR, Yomtovian RA, Rood IGH, De Korte D and Ramirez-Arcos SM, (2014). Characterization of the growth dynamics and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from contaminated platelet units. Journal of medical microbiology. Vol: 63(6): 884-891.
- Al Tayyar IA, AL-Zoubi MS, Hussein E, Khudairat S and Sarosiekf K, (2015). Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from clinical specimens in Northern of Jordan. Iranian journal of microbiology. Vol: 7(6): 294-301.
- Allaire, (2005). Diversité fonctionnelle des *Pseudomonas* producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel. Mémoire des sciences. Université Laval, Québec, Canada.
- Anderson JA, Staley J, Challender M and Heuton J, (2018). Safety of *Pseudomonas chlororaphis* as a gene source for genetically modified crops. Transgenic Res. Vol 27(1): 103-113.
- Avril JL, Dabernat H, Deni F et Monteil H, (1992). Bactériologie clinique. 2^{ème} Ed. Ellipses, Paris. P602.
- Baldan R, Cigana C, Testa F, Bianconi I, Simone MD, Pellin D, Serio CD, Bragonzi A and Cirillo DM, (2014). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Airways Influences Virulence of *Staphylococcus aureus* In Vitro and Murine Models of Co-Infection. Vol: 40(1): 1-10.
- Barakat R, 2012. Etude des propriétés biologiques et antimicrobiennes de la pyocyanine, pigment redox-actif produit par *Pseudomonas aeruginosa*. Sciences agricoles. Thèse de Doctorat. Université de La Rochelle, France.
- Barefoot SF and Klaenhammer TR, (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *L. acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology. Vol : 45: 1808-1815.
- Bayliss BG and Hall ER, (1965). Plasma coagulation by organisms other than *Staphylococcus aureus*. Journal of bacteriology. Vol: 89(1).

- Baysse C and O’Gara F, (2007). Role of membranes structure during stress signalling and adaptation in *Pseudomonas*. In *Pseudomonas: A Model System in Biology*. Juan-Luis Ramos, Spain. P193-224
- Beaulac C, (1995). Elaboration et évaluation de chémoliposomes à action bactéricide anti *Pseudomonas aeruginosa* chez un modèle animal d'infection chronique. Thèse de Doctorat. Université du Québec, Canada.
- Becker k, Heilmann C and Peters G, (2014). Coagulase Negative Staphylococci. *Clinical microbiology reviews*. Vol: 27(4): 870-926.
- Bernd HAR, (2008). *Pseudomonas Model Organism, Pathogen, Cell Factory*. Editor: Bernd H. A. Rehm. Germany.
- Bhunia AK, (2008). *Foodborne Microbial Pathogens Mechanisms and Pathogenesis*. E: Springer, USA. P350.
- Biswas L, Biswas R, Schlag M, Bertram R, and Gôtz F, (2009). Small colony variant selection as a survival strategy for *Staphylococcus aureus* in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol: 75(21): 6910-6912.
- Bojanowski A, (2011). Molécules antifongiques et activité antagoniste de deux souches de *Pseudomonas* envers *helminthosporium solani*, agent responsable de la tache argentée de la pomme de terre. Mémoire maître es sciences. Université Laval, France.
- Bonsall RF, Weller DM and Thomashow LS, (1997). Quantification of 2,4 diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. *in vitro* and in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol : 63(3): 951-955.
- Borrero NV, Bai F, Perez C, Duong BQ, Rocca JR, Jin S and Huigens RW, (2014). Phenazine antibiotic inspired discovery of potent bromophenazine antibacterial agents against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Org. Biomol. Chem.* Vol: 12: 881-886.
- Bossis E, Lemanceau P, Latour X and Gardan L, (2000). The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*. Vol: 20: 51-63.
- Brodhagen M, Paulsen I, and Loper JE, (2005). Reciprocal Regulation of Pyoluteorin Production with Membrane Transporter Gene Expression in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and environmental microbiology*. Vol: 71(11): 6900-6909.

- Büttner H, Mack D and Rohde H, (2015). Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Front. Cell. Microbial.* Vol: 5(14).
- Calcott MJ, Owen JG, Lamont IL and Ackerley DF, (2014). Biosynthesis of Novel Pyoverdines by Domain Substitution in a Nonribosomal Peptide Synthetase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol : 80(18): 5723-5731.
- Cardozo VF, Oliveira AG, Nishio EK, Perugini MRE, Andrade C GTJ, Silveira WD, Durán N, Andrade G, Kobayashi RKT and Nakazato G, (2013). Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* Vol : 12(12).
- Caulier S, Gillis A, Colau G, Licciardi F, Liépin M, Desoignies N, Modrie P, Legrève A, Mahillon J and Bragard C, (2018). Versatile Antagonistic Activities of Soil-Borne *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. against *Phytophthora infestans* and Other Potato Pathogens. *Biological control of potato diseases.* Vol: 143.
- Chain EB and Mellows G, (1977). Pseudomonic acid. Part 1: The structure of Pseudomonic acid A, a novel antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *J chem. Soc perkins Trans.* Vol: 1: 294.
- Chaker H, (2012). Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites du tryptophane. Thèse de Doctorat. Université de Grenoble, France.
- Coleman CS, Rocetes JP, Park DJ, Wallick CJ, Warn-Cramer BJ, Michel K, Dudler R and Bachmann AS, (2006). Cell Proliferation. Vol : 39(6): 599-609.
- Corne P, (2004). *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation: étude génétique, phénotypique et épidémiologique. Thèse de Doctorat. Université Montpellier, France.
- Dahah H, (2017). Etude de l'effet antimicrobien et antioxydant des métabolites secondaires secrétés par des *Pseudomonas* originaires des conditions extrêmes. Thèse de Doctorat. Université Abdelhamid Ibn-Badis Mostaganem, Algérie.
- Dahah H, Djibaoui R and Nemmiche S, (2016). Antimicrobial, antioxidant and hemolytic effects of Pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from saline soil of Mina river, Algeria. *Int. J. Biosci.* Vol: 9(5): 134-143.

- Danessa MD, (2015). Introduction to diagnostic microbiology for the laboratory sciences. Kindle Edition, America. P552
- Davies DG and Marques CN, (2009). A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J. Bacteriol.* Vol: 191(5): 1393-1403.
- Delaney SM, Mavrodi DV, Bonsall RF and Thomashow LS, (2001). *phzO*, a gene for biosynthesis of 2-hydrolyated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30–84. *J Bacteriol.* Vol : 183: 318-327.
- Denis F, Poly M, Martin C, Bingen E, Quentin R, (2011). *Bactériologie Médicale : Techniques Usuelles.* Elsevier Masson, France.
- Denis F, Ploy M, Martin C, Bingen E, Quentin R, (2016). *Bactériologie Médicale : Techniques Usuelles.* Elsevier Masson, France.
- Delarras C, (2014). *Pratiques en microbiologie de laboratoire.* Lavoisier, France.
- DeLeon S, Clinton A, Fowler H, Everett J, Horswill AR, Rumbaugh KP, (2014). Synergistic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an in vitro wound model. *Infect Immun.* Vol: 82(11): 4718-4728.
- Dieppois G, Opota O, Lalucat J and Lemaitre B, (2015). *Pseudomonas entomophila: A Versatile Bacterium with Entomopathogenic Properties.* Juan-Luis Ramos, Spain.
- Doi1 K, Gowda K, Liu Q, Lin JM, Sung S, Dower C, Claxton D, Loughran T, Amin S, and Wang HG, (2004). Pyoluteorin derivatives induce Mcl-1 degradation and apoptosis in hematological cancer cells. *Cancer Biology & Therapy.* Vol:15(12): 1688-1699.
- El Amraoui B, El Amraoui M, Cohen N *et al.*, (2014). Antifungal and antibacterial activity of marine microorganisms. *Ann Pharm Fr.* Vol: 72: 107-111.
- Euzéby JP, (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol.* Vol : 47 : 590-592.
- Faille A, (2010). Identification de composés naturels contre *Saprolegnia* sp., un champignon pathogène en Aquaculture. Mémoire ès Science. Université de Montréal, France.
- Flandrois JP, Courcol R, Lemeland Jf, Ramuz M, Sirot J and Soussy CJ, (1997). *Bactériologie Médicale.* Presses universitaires, Lyon.
- Fleming HPJL and Costilow RN, (1975). Microbiological inhibition of isolate of *Pediococcus* from cucumber brine. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol: 30: 1040-1042.

- Fuchs R, Schäfer M, Geoffroy V and Meyer JM, (2001). Siderotyping – A Powerful Tool for the Characterization of Pyoverdines. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. Vol: 1(1): 31-57.
- Garcia B, Olivera ER, Minambers B, Carnicero D, Muniz C, Naharro G and Luengo JM, (2000). Phenyl-acetyl-Coenzyme A Is the True Inducer of the Phenylacetic Acid Catabolism Pathway in *Pseudomonas putida* U. *Applied and environmental microbiology*. Vol: 66(10).
- Garnier F et Denis F, (2007). *Bactériologie médical : Techniques usuelles : Cocci à Gram positif*. Masson, France.
- Gauthier VD, (2013). Inhibition du pathogène des salmonidés *Saprolegnia parasitica* par des bactéries aquatique. Mémoire ès sciences. Université de Montréal, France.
- Gemmell and Dawson, (1982). Identification of Coagulase Negative Staphylococci with the API Staph System. *Journal of clinical microbiology*. Vol: 16(5): 874-877.
- Cho ST, Chang HH, Egamberdieva D, Kamilova F, Lugtenberg B and Kuo CH, (2015). Genome Analysis of *Pseudomonas fluorescens* PCL1751: A Rhizobacterium that Controls Root Diseases and Alleviates Salt Stress for Its Plant Host. Vol: 10(10):e0140231.
- Glazunova OO, Raoult D, and Roux V, (2010). Partial recN gene sequencing: a new tool for identification and phylogeny within the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Plos one*. Vol: 60(11): 2140-2148.
- Gôtz F, Bannerman T, and Schleider KH, (2006). *The genera Staphylococcus and Micrococcus in Prokaryotes*. Springer, USA.
- Grosjean J, Clavé D, Archamband M, Pasquier C, (2016). *Bactériologie et virologie pratique*. De Boeck, Belgique.
- Hazalin NA, K Ramasamy, Meng Lim SS, Abdul Wahab I, Cole ALJ and Abdul Majeed AB, (2009). Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. Vol : 09(46).
- Heeb S, Fletcher MP, Chhabra SR, Diggle SP, Williams P and Camara M, (2010). Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiol Rev*. Vol: 35(2): 247-274.
- Heilmann C, Thumm G, Chhatwal GS, Hartleib J, Uekotter A and Peters G, (2003). Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*. Vol: 149(10): 2769-2778.

- Herard A, Brasme L, Jaussaud R, Colin J, Vernet-Garnier V et Lardennois B, (1998). Place actuelle des staphylocoques à coagulase négative en urologie. Progrès en Urologie. Vol: 8(6): 579-585.
- Hernández-Salmerón, Hagelsieb G et Santoyo G, (2017). Genome Comparison of *Pseudomonas fluorescens* UM270 with Related Fluorescent Strains Unveils Genes Involved in Rhizosphere Competence and Colonization. Journal of Genomics. Vol: 5: 91-98.
- Hotterbeekx A, Kumar-Singh S, Goossens H and alhotra-Kumar S, (2017). *In vivo* and *In vitro* Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp.. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Vol: 7(106).
- Hunt SM, Werner EM, Huang B, Hamilton MA and Stewart PS. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. Appl Environ Microbiol. Vol: 70(12): 7418-7425.
- Igbinosa IH, Igbinosa EO and Okoh AI, (2014). Molecular Detection of Metallo- β -Lactamase and Putative Virulence Genes in Environmental Isolates of *Pseudomonas* Species. Pol. J. Environ. Stud. Vol : 23(6) : 2327-2331.
- Ismail W, El Noyal AM, Ramadan AR and Abotalib N, (2014). Sulfur source-mediated transcriptional regulation of the *rhlABC* genes involved in biosurfactants production by *Pseudomonas* sp. strain AK6U. Frontiers in microbiology. Vol : 5(423).
- Irlinger F, (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. International Journal of Food Microbiology. Vol: 126(3): 302-310.
- James H, Ghannoum MA and Jurevic R, (2011). The story of biofilms. Journal of invasive fungal infections. Vol: 5(2): 37-42.
- Jacques P, Delfosse P, Ongena M, Lepoivre P, Cornélis P, Koedam N, Neirinckx L, Thonart P, (1993). Les mécanismes biochimiques développés par les *Pseudomonas* fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol Synthèse. Cahiers Agricultures. Vol: 2: 301-307.
- Jensen LJ, Skovgaard M, Ponten TS, Hansen NT, Johansson H, Jorgensen MK, Kiil K, Hallinl PF, and Ussery D, (2004). Comparative genomics of four *Pseudomonas* species. *Pseudomonas*, Volume 1, edited by Juan-Luis Ramos.
- Kessler E, Safrin M, Olson JC and Ohman DE, (1993). Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. J. Biol. Chem. Vol: 268(): 7503-7508.

- Khalifa BH, Moissenet D, Thien VH, Khedher M, (2011). Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations. *Analyses de Biologie Clinique*. Vol : 69(4) : 393-403.
- Kloos WE and Mussel White MS, (1975). Distribution and Persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* Species and Other Aerobic Bacteria on Human Skin. *Applied Microbiology*. Vol: 30(3): 381-395.
- Kloos WE and Bannerman TL, (1994). Update on Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol: 7(1): 117-140.
- Kodjikian L, Roques, Campanac, Doleans, Baillif, Renaud, Hartmann, Freney et Burillon, (2005). Biofilms à *Staphylococcus epidermidis* à la surface des implants intraoculaires. *J Fr. Ophtalmol*. Vol: 28(2): 224-230.
- Kong KF, Vuong C and Otto M, (2006). *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *International Journal of Medical Microbiology*. Vol: 296(2-3):133-139.
- Kwak YS, Han S, Thomashow LS, Rice JT, Paulitz TC, Kim D, and Weller DM, (2011). *Saccharomyces cerevisiae* Genome-Wide Mutant Screen for Sensitivity to 2, 4-Diacetylphloroglucinol, an Antibiotic Produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and environmental microbiology*. Vol: 77(5): 1770-1776.
- Kwak YS and Weller DM, (2013). Take-all of Wheat and Natural Disease Suppression. *The Plant Pathology Journal*. Vol: 29(2): 125-135.
- Kwakman PHS, Velde te AA, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Deventer SJHV and Zaat SAJ, (2006). Treatment and Prevention of *Staphylococcus epidermidis* Experiment Biomaterial-Associated Infection by Bactericidal Peptide. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Vol 50(12): 3977-3983.
- Laine MH, Karwoski MT, Raaska LB and Sandholm TM, (1996). Antimicrobial activity of *Pseudomonas* spp. against food poisoning bacteria and moulds. *Letters in Applied Microbiology*. Vol: 22(3): 214-218.
- Laursen JB and Nielsen J, (2004). Phenazine Natural Products: Biosynthesis, Synthetic Analogues, and Biological Activity. *Chem Rev*. Vol : 104(3): 1663-1686.
- Lecrecq R, (2002). Résistance des staphylocoques aux antibiotiques. *Ann Fr Anesth Réanim*. Vol: 21(5) : 375-383.
- Leisinger T and Margraff R, (1979). Secondary Metabolites of the Fluorescent *Pseudomonads*. *Microbiol. Rev*. Vol: 43(3): 422-442.

- Lightbown J W and Jackson FL, (1956). Inhibition of cytochrome systems of heart muscle and certain bacteria by the antagonists of dihydrostreptomycin: 2-alkyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxides. *Biochem J*. Vol: 63(1): 130-137.
- Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, (2009). Revised road map to the phylum *Firmicutes*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, USA.
- Luengo JM, Arias S, Arcos M, and Olivera ER, (2007). The catabolism of phenylacetic acid and other related molecules in *Pseudomonas putida* U. Springer, USA.
- Machan ZA, Pitt TL, White W, Watson D, G. W.TAYLOR, P. J. COLE and R Wilson J, (1991). Med. The Pathological Society of Great Britain and Ireland Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: description of an antistaphylococcal substance. *Microbiol*. Vol: 34: 213-217.
- Mack D, (1999). Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Journal of hospital infection*. Vol: 43: 113-125.
- Mack D, Davies AP, Harris LG, Jeeves R, Pascoe B, Knobloch JKM, Rohde H, and Wilkinson TS, (2013). *Staphylococcus epidermidis* in Biomaterial-Associated Infections. Springer, USA.
- Marcelletti S and Scortichini M, (2014). Definition of Plant-Pathogenic *Pseudomonas* Genom species of the *Pseudomonas syringae* Complex Through Multiple Comparative Approaches. *Bacteriology*. Vol: 104(12): 1274-1282.
- Martini R, Hörner R, Rampelotto RF, Garzon LR, Nunes MS, Teixeira MD and Graichen DAS, (2016). Investigation of biofilm formation in coagulase-negative staphylococci isolated from platelet concentrate bags. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. Vol : 58(1).
- Martineau F, (1997). Développement de tests de diagnostic basés sur l'AND pour l'identification de *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* associés aux infections chez l'humain. Mémoire des sciences. Université Laval, France.
- Mashburn LM, Jett AM, Akins DR, and Whiteley M, (2005). *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during *in vivo* co-culture. *J. Bacteriol*. Vol: 187: 554-566.
- Matthijs S, Baysse C, Koedam N, Tehrani KA, Verheyden L, Budzikiewicz H, Schäfer M, Hoorelbeke B, Meyer JM, Greve HD and Cornelis P, (2004). The *Pseudomonas* siderophore quinolobactin is synthesized from xanthurenic acid, an

- intermediate of the kynurenine pathway. *Molecular Microbiology*. Vol: 52(2): 371-384.
- Meliani A, (2012). Contribution à l'étude de la diversité écologique et fonctionnelle des *Pseudomonas fluorescens*. Mémoire ès sciences. Université d'Oran, Algérie.
 - Mercado-Blanco J, (2015). *Pseudomonas* Strains that Exert Biocontrol of Plant Pathogens. Springer, USA.
 - Meyer LF, Halberndt JM, Carta L, Skantar M, Liu T, Abdelnabby HME and Vinyard B, (2009). Toxicity of 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) to Plant-parasitic and Bacterial-feeding Nematodes. *Journal of Nematology*. Vol : 41(4): 274-280.
 - Mezaache S, (2012). Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Thèse de Doctorat. Université de Ferhat Abbas Sétif, Algérie.
 - Moloney MG, (2016). Natural products as a source for novel antibiotics. *Trends in Pharmacol Sci*. Vol: 37: 689-701.
 - Morot-Bizot SC, (2006). Les staphylocoques à coagulase négative dans l'écosystème des salaisons. Thèse de Doctorat. Université Blaise Pascal, France.
 - Mylonakis E and Calderwood SB, (2001). Infective endocarditis in adults. *N Engl J Med*. Vol: 345(18): 1318-1330.
 - Ngamau CN, Matiru VN, Tani CW, Muthuri A, (2014). Potential use of endophytic bacteria as biofertilizer for sustainable banana (*Musa* spp.) production. *Afr. J. Hort. Sci*. Vol: 8: 1-11.
 - Ogara JP and Humphreys H, (2001). *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J. Med Microbiol*. Vol: 50: 582-587.
 - Ong KS, Cheow YL and Lee SM, (2017). The role of reactive oxygen species in the antimicrobial activity of pyochelin. *Journal of Advanced Research*. Vol: 8: 393-398.
 - Ossowicki A, Jafra S, Garbeva P, (2017). The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. *PLOS ONE*. Vol: 12(3).
 - Otto M, (2004). Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Front Biosci*. Vol: 1(9): 841-863.
 - Palleroni NJ, (1984). Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, USA.
 - Palmer MA, Bernhardt ES, Allan JD, Lake PS, Alexander G, Brook's S, Carr J, Clayton S, Dahm CN, Follstad J, Galat DL, Loss SG, Goodwin, Hart DD, Hassett B,

- Jenkinson R, Kondolf GM, Lave R, Meyer JL, O' Donnell TK, Pagano L and Sudduth E, (2005). Standards for ecologically successful river restoration. *J. App. Eco.* Vol: 42: 208-217.
- Paulin M, Novinscak A, Lanteigne C, Gadkar VJ, Filion M, (2017). Interaction between 2, 4-diacetylphloroglucinol and hydrogen cyanide-producing *Pseudomonas brassicacearum* LBUM300 and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the tomato rhizosphere. *Appl Environ Microbiol.* Vol: 83.
 - Pihl M, Davies JR, Chavez de Paz LE and Svensater G, (2010). Differential effects of *Pseudomonas aeruginosa* on biofilm formation by different strains of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* Vol: 59: 439-444.
 - Pihl M, Arvidsson A, Skepö M, Nilsson M, Givskov M, Tolker-Nielsen T *et al.*, (2013). Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* on peritoneal dialysis catheters and the effects of extracellular products from *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathog. Dis.* Vol: 67: 192-198.
 - Qin Z, Yang X, Yang L, Jiang J, Ou Y, Molin S, et al, (2007). Formation and properties of *in vitro* biofilms of ica-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *J Med Microbiol.* Vol: 56(1): 83-93.
 - Qin Z, Yang L, Qu D, Molin S, and Tolker-Nielsen T, (2009). *Pseudomonas aeruginosa* extracellular products inhibit staphylococcal growth, and disrupt established biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology.* Vol: 155: 2148-2156.
 - Quincampoix JC, Mainardi JL, (2001). Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation.* Vol : 10 : 267-275.
 - Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, et al, (2007). Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials.* Vol: 28(9): 1711-1720.
 - Rupp ME, (2014). Clinical Characteristics of Infections in Humans Due to *Staphylococcus epidermidis*. *Staphylococcus epidermidis Methods in Molecular Biology.* Vol: 1106: 1-16.
 - Salih L, Tevell S, Mansson E, Nilsson-Augustinsson A, Hellmark B, and Söderquist B, (2018). *Staphylococcus epidermidis* isolates from nares and prosthetic joint infections are mupirocin susceptible. *J. Bone Joint Infect.* Vol: 3.

- Sasirekha B and Srividya S, (2016). Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli. Agriculture and Natural Resources. Vol: 50(4): 250-256.
- Selvin J, Shanmughapriya S, Gandhimathi R, Seghal-Kiran G, Rajeetha RT, Natarajaseenivasan K and Hema TA, (2009). Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardioopsis dassonvillei* MAD08. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol : 83 : 435-445.
- Shahid I, Rizwan M, Baig DN, Saleem RS, Malik KA, and Mehnaz S, (2017). Secondary Metabolites Production and Plant Growth Promotion by *Pseudomonas chlororaphis* and *P. aurantiaca* Strains Isolated from Cactus, Cotton, and Para Grass. J. Microbiol. Biotechnol. Vol: 27(3): 480-491.
- Shoji J, Hino H, Katayama T, Matsumoto K, Tanimoto T, Hattori T, Higashiyama I, Miwa H, Motokawa K and Yoshida T, (1991). Isolation and characterization of new peptide antibiotics, plusbacins ax ~a4 and bt ~b4. The journal of antibiotics. Vol: 45(6): 817-823.
- Singh RP, Kunari P, Reddy CR, (2015). Antimicrobial compounds from sea-weeds-associated bacteria and fungi. Appl Microbiol Biotechnol. Vol: 99: 1571-1586.
- Singleton P, (1999). Bactériologie. Edition Duonod, Paris. P415.
- Sistek V, (2010). Identification des staphylocoques, streptocoques et entérocoques par des méthodes génotypiques. Thèse de Doctorat. Université Laval, Québec.
- Soberón-Chávez, G, Lépine F, and Déziel E, (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol: 68(6): 718-725.
- Sotirova AV, Spasova DI, Galabova DN, Karpenko E and Shulga A, (2008). Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on gram positive and gram-negative bacterial strains. Curr. Microbiol. Vol: 56(6): 639-644.
- Spiers AJ, Buckling A and Rainey PB, (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. Microbiology. Vol: 146: 2345-2350.
- Stewart PS and Costerton JW, (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. Vol : 358(9276): 135-138.
- Strasheim W, Kock MM, Dreyer AW and Ehlers MM, (2013). Molecular markers of resistance in coagulase-negative staphylococci implicated in catheter-related bloodstream infections. Vol: 3: 1822-1832.

- Sutherland R, Boon RJ, Karen E, Griffin PJ, Masters B, Slocombe And White AR, (1985). Antibacterial Activity of Mupirocin (Pseudomonic Acid), a New Antibiotic for topical use antimicrobial agents and chemotherapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol: 27(4): 495-498.
- Tan TY, Yong S and Xing W, (2006). Clinical significance of coagulase negative staphylococci recovered from non sterile sites. *Journal of clinical microbiology*. Vol: 44(9): 3413-3414.
- Thompson B, Chaney N, Wing JS, Gould SJ and LOPER JE, (1999). Characterization of the Pyoluteorin Biosynthetic Gene Cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Journal of bacteriology*. Vol: 181(7): 2166-2174.
- Touati A, Achour W, Abbassi MS, Ben Hassen A, (2007). Detection of ica genes and slime production in a collection of *Staphylococcus epidermidis* strains from catheter-related infections in neutropenic patients. *Pathology and Biology*. Vol : 55: 277-282.
- Trujillo M, Velazquez E, Miguelez S, Jimenez M, Mateos P and Martinez ME, (2007). Characterization of a strain of *Pseudomonas fluorescens* that solubilizes phosphates *in vitro* and produces high antibiotic activity against several microorganisms. *Biomedical and Life Sciences*. Vol: 102: 265-268.
- Valle Gomes MZ, and Nitschke M, (2012). Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. *Food Control*. Vol: 25(2): 441-447.
- Veerendrakumar M and Janakiram P, (2015). Antagonistic Activity Exhibited by Crude Extracts of *Pseudomonas aeruginosa* (PIC-4) against *Aeromonas hydrophila* and *E. coli*. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*. Vol: 4(1).
- Vinay JU, Naik MK, Rangeshwaran R, Chennappa G, Shaikh SS, Sayyed RZ, (2016). Detection of antimicrobial traits in fluorescent *Pseudomonas* and molecular characterization of an antibiotic pyoluteorin. *3 Biotech*. Vol: 6(2): 227.
- Vuong C and Otto M, (2002). *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection*. Vol: 4(4): 481-489.
- Vuong C, Voyich JM, Fischer ER, Braughton KR, Whitney AR, DeLeon FR, et al (2004). Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol*. Vol: 6(3): 269-275.

- Whiley RA, Sheikh NP, Mushtaq N, Hagi-Pavli E, Personne Y, Javaid D and Waite RD, (2014). Differential potentiation of the virulence of the *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis liverpool epidemic strain by oral commensal Streptococci. *J. Infect. Dis.* Vol: 209(5): 769-780.
- Yan Q, Philmus B, Chang JH, Loper JE, (2017). Novel mechanism of metabolic co-regulation coordinates the biosynthesis of secondary metabolites in *Pseudomonas protegens*. *eLife sciences*. Vol: 6: e22835.

Annexes

Annexes :

Principaux Milieux de culture (Composants g/ litre)

<p>Gélose Chapman</p> <p>Composition : Peptone..... 10 g Extrait de viande.....0,1 g Chlorure de sodium.....75 g Mannitol.....10 g Agar.....15 g Rouge de phénol0.025g pH = 7.4</p>	<p>Gélose nutritive</p> <p>Peptone.....10g Extrait de levure.....3g Extrait de viande.....3g Le chlorure de sodium.....5g Agar.....15 g pH = 7.4</p>
<p>Muller Hinton solide</p> <p>Extrait de viande:3g Peptone de caséine:..... 17,5 g Amidon:1,5 g Agar:16 g pH = 7,4</p>	<p>Muller Hinton bouillon</p> <p>Extrait de viande:3g Peptone de caséine:..... 17,5 g Amidon:1,5 g pH = 7,4</p>
<p>King B solide</p> <p>Peptone de caséine20 g Sulfate de magnésium1,5 g Phosphate bi-potassique.....1,5 g Glycérol10 ml Agar20 g pH =7,2</p>	<p>NBY à 2% de glucose :</p> <p>Bouillon nutritif 8,0 g Extrait de levure2,0 g K₂HP042,0g KH₂PO₄ 0.5 g Glucose2,0 g MgSO₄-7H₂O0.25 g pH =7,0</p>

Tableau d'identification de la galerie Api 20 NE

API 20 NE	V6.0	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUa	ARAa	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	ADLa	MLTa	CITa	PACa	OX
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	96	0	0	80	20	1	92	1	99	1	1	89	84	1	97	98	91	98	99	1	98	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	27	0	0	80	1	1	39	1	99	71	97	89	85	1	99	99	10	99	99	16	99	
<i>Pseudomonas mendocina</i>	100	0	0	94	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	99	100	0	100	100	0	100	
<i>Pseudomonas putida</i>	3	0	1	88	1	0	0	1	99	56	57	5	2	1	97	99	1	100	99	58	99	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	94	0	0	1	1	0	1	0	98	1	10	67	0	75	87	87	1	99	85	1	100	
<i>Burkholderia cepacia</i>	39	0	24	1	1	46	70	72	100	75	99	96	99	8	97	99	93	100	99	99	91	
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	100	0	0	98	0	5	100	0	100	0	99	100	100	0	100	100	99	100	99	94	100	
<i>Brevundimonas diminuta/Oligella urethralis</i>	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	1	99	33	0	100	
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	16	0	0	0	0	98	12	34	72	1	1	3	10	72	1	1	1	40	0	0	98	
<i>Comamonas acidovorans</i>	96	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	76	0	0	99	71	89	99	28	83	100	
<i>Comamonas testosteroni/Ps.alcaligenes</i>	75	0	0	6	4	0	4	1	11	3	3	4	1	2	42	55	38	87	32	3	98	
<i>Chryseomonas luteola</i>	78	0	13	71	1	100	30	98	99	99	99	88	12	76	85	62	1	94	94	1	2	
<i>Flavimonas oryzae/habitans</i>	0	0	0	0	1	0	11	1	100	99	99	100	0	84	99	88	2	99	99	0	1	
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	21	0	0	0	76	0	0	0	21	40	0	0	1	0	7	0	5	75	8	0	99	
<i>Ralstonia pickettii</i>	32	0	1	1	3	0	1	0	96	35	1	10	14	0	99	86	62	99	98	16	99	
<i>Shewanella putrefaciens</i>	96	0	1	0	1	71	95	0	6	11	0	0	95	10	1	71	1	90	2	0	100	
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	10	0	0	0	1	97	1	90	99	83	75	15	64	95	34	9	3	61	45	1	73	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	37	1	0	0	0	99	99	87	84	3	95	2	98	99	2	1	0	99	98	0	7	
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	2	0	8	0	1	1	1	0	67	70	1	1	1	1	20	98	80	100	99	87	0	
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	1	0	14	0	0	0	96	0	1	0	0	0	0	0	99	2	99	81	1	0		
<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	24	8	2	0	0	0	99	4	95	70	0	0		
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	3	0	0	0	2	0	0	0	11	1	0	1	1	0	70	20	46	1	36	0		
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	2	2	0	2	0	0	0	0	19	2	0	0	2	0	97	100	2	2	97	0		
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	99	89	99	78	1	89	97	98	99	80	78	99	99	99	95	84	1	99	37	1	99	
<i>Aer.salm.ssp masoucida/achromogenes</i>	100	21	9	0	0	2	33	0	66	0	33	50	2	21	2	0	0	2	0	0	100	
<i>Aeromonas salmonicida ssp salmonicida</i>	100	0	57	36	0	100	99	18	84	1	0	96	84	99	99	0	1	99	1	0	100	
<i>Aeromonas sobria</i>	100	86	96	86	0	1	99	99	100	12	99	99	99	100	100	93	0	99	81	0	100	
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	98	0	0	0	65	99	1	99	100	100	100	100	99	99	90	2	0	100	0	1	99	
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	93	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	86	20	96	99	94	93	100	
<i>Alcaligenes faecalis 1</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3	77	7	100	97	97	98	