



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2017

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**BENHASNA Nabil**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité : BIOTECHNOLOGIE DES MICROORGANISMES**

THÈME

**L'effet des métabolites de *Pseudomonas*  
d'origine marine sur *Staphylococcus aureus***

Souten publiquement le **02/07/2017**

DEVANT LE JURY

Président	<b>MEKHALDI ABEDLKADER</b>	U. Mostaganem
Encadreur	<b>DJIBAOUI Rachid</b>	U. Mostaganem
Examineurs	<b>BOUZNED Ahcène</b>	U. Mostaganem

*Année universitaire 2016/2017*

*Thème réalisé au Laboratoire de microbiologie au niveau de l'université de Mostaganem*

# Remerciements

*Au début et avant tout, je remercie le Dieu le tout puissant, de m'avoir donné le courage, la santé de finaliser ce travail.*

Je dois l'aboutissement de ce mémoire à de nombreuses personnes. Tout d'abord, je remercie mon encadreur **Mr DJIBAOUI Rachid**, professeur à l'université *Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem*, pour l'honneur qu'il m'a fait en dirigeant ce travail, je tiens à lui exprimer mon reconnaissance pour sa grande disponibilité et ses conseils tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

Je remercie **le PROFESSEUR MEKHALDI ABDEKADER**, à l'université *Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem*, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury.

Je remercie également **Mr BOUZNAD AHCENE** d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Un remerciement spécial s'adresse aux techniciens et ingénieurs des laboratoires de Microbiologie et à **MR BENMIMOUN MOHAMED** et **M<sup>elle</sup> LAZREUG HAFIDA** pour ses Conseil.

En fin, mes remerciements vont également à l'ensemble de nos enseignants qui nous ont accompagnés pendant notre cursus universitaire.

# *Dédicace*

*C'est grâce à Dieu « الله », le tout puissant qui m'a donné le courage et la volonté pour achever ce modeste travail que je dédie :*

*A mon Père et ma très chère Mère que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée, leur encouragement continu, leur aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices*

*A mes très chères sœurs et à mes Frères*

*Je dédie aussi ce mémoire à tous mes collègues.*

## Liste de figure :

<b>Figure 1 :</b> Les espèces appartenant actuellement au genre <i>Pseudomonas</i> .....	5
<b>Figure 2:</b> Les principaux antibiotiques produits par les souches de biocontrôle jouent un rôle central entre les éléments impliqués dans les interactions.....	8
<b>Figure 3:</b> Facteurs de virulence de <i>S. aureus</i> .....	18
<b>Figure 4 :</b> Schéma présentant les étapes du développement du biofilm.....	21
<b>Figure 5:</b> Image obtenue par microscopie confocale d'un biofilm formé par <i>Staphylococcus</i> spp. À la surface d'un cathéter veineux.....	22
<b>Figure 6 :</b> Schéma de la méthode de diffusion en puits.....	25
<b>Figure 7:</b> Bandelette d'oxydase.....	28
<b>Figure 8:</b> coloration de Gram des <i>Staphylococcus</i> .....	29
<b>Figure 9:</b> Activité antagoniste de la souche <i>S<sub>2</sub></i> vis-à-vis <i>Staphylococcus</i> .....	30
<b>Figure 10:</b> Activité antagoniste de la souche <i>S<sub>2</sub></i> vis-à-vis <i>Staphylococcus</i> sur milieu .....	30
<b>Figure 11:</b> Zones d'inhibitions de <i>Pseudomonas</i> ( <i>S<sub>2</sub></i> ) vis-à-vis de <i>Staphylococcus</i> .....	31
<b>Figure 12:</b> Aspect macroscopique de <i>Pseudomonas</i> Sur milieu King B solide.....	31
<b>Figure 13:</b> observation microscopique de <i>Pseudomonas</i> .....	32
<b>Figure 14:</b> Test de catalase.....	32
<b>Figure 15:</b> Test de croissance à 4°C et 42°C sur King A.....	32
<b>Figure 16:</b> test oxydase positive.....	33
<b>Figure 17:</b> Identification de <i>Pseudomonas</i> par la galerie API 20 NE.....	34

## Liste de tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Principales protéines de surface de <i>Staphylococcus</i> .....	16
<b>Tableau2:</b> résultats des tests Test biochimiques <i>PSEUDOMONAS</i> .....	34

## Liste des abréviations

PGPR: plant growth promoting rhizobacteria.

SCV: Small-colony variants

HCN : l'acide cyanhydrique

APC : l'acide phénazine-1-carboxylique

PYO : pyocyanine

PVd : pyoverdine

PRN : Pyrolnitrine

PLT: Pyolutéorine

SOD : superoxyde dismutase

CLPs : lipopeptides cycliques.

DAPG : le 2,4-diacetylphloroglucinol

PCN : phénazine-1-carboxamide

Phz :phénazine

SCN: Staphylocoques à coagulase négative

MSCRAMM : (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule)

µm:micromètre

µM : micromole

UV :Ultraviolets

µg :microgramme

ml : Millilitre

°C : Celsius

SM : solution mère

BN : bouillon nitrite

h : heures

tr : tour

min :minute

MH: Muller Hilton

cm: centimeter

NaCl : Chlore sodium

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : eau oxygénée

NO<sub>3</sub> : ion nitrite

PAC: phyényl-acétate.

GLU : glucose

URE : urée

mm: millimeter.

O<sub>2</sub>: Dioxyde

GEL: gélatine

PNPG: para – Nitrophényl –βD- Galactopyranosidase

UFC : Unité Formant Colonie

% : Pourcentage.

## الملخص

اخترنا في هذه الدراسة بكتيريا من الجنس *Pseudomonas* التي تمتلك مجموع مورثي منتج للكثير من مواد الأيض التي تفرزها هذه البكتيريا. وبما أن الإجهاد الملحي قد يحفز البكتيريا على تحسين إنتاج هذه المواد كما ونوعا ' فقد قمنا في هذه الدراسة بعزل هذه البكتيريا من البحر. وقد اخترنا أن تكون عملية العزل من 3 عينات مختلفة وهي مياه البحر والطحالب البحرية والرمال الواقعة في عمق البحر. بينت النتائج أن رمال عمق البحر فقط هي من كانت غنية بهذه البكتيريا. اخترنا من هذه البكتيريا المزروعة على وسط King B 15 عزلة كانت كلها منتجة لصبغة صفراء مخضرة مفلورة و سالبة تلوين غرام و تمتلك إنزيمات الكتلز والاكسيداز .

سمح اختبار التضاد بين عزلات *Pseudomonas* و إحدى البكتيريا الممرضة وهي *Staphylococcus aureus* بانتفاء سلالة واحدة أظهرت تثبيطا للبكتيريا الممرضة على وسط King B بينما لم يظهر هذا التثبيط على وسط Muller Hinton. ظهر هذا التثبيط أيضا حول الأبار المنجزة على وسط King B صلب والمملوءة برشاحة هذه السلالة المأخوذة من مزرعة سائلة لوسط King B . تدل هذه النتائج على أن مادة الأيض التي قامت بتثبيط *Staphylococcus aureus* قد تكون هي البيوفارديينات التي وجدت في كثير من الأعمال مثبتة للبكتيريا والفطريات بسبب اقتناصها للحديد وإفكارها للوسط من هذا العنصر .

الكلمات الرئيسية : *Pseudomonas* - الإجهاد الملحي - King B - *Staphylococcus aureus* - البيوفارديينات

## Résumé

Dans la présente étude nous avons choisi une bactérie du genre *Pseudomonas*, qui possède un génome codant pour de nombreux métabolites sécrétés par cette bactérie. Étant donné que le stress salin peut stimuler les bactéries pour améliorer la qualité et la quantité de ces substances, nous avons isolé ces bactéries de la mer. L'isolement a été effectué à partir de 3 échantillons différents: l'eau de mer, les algues et le sable du fond de la mer. Les résultats ont montré que seul le sable du fond de mer était riche en *Pseudomonas* fluorescents. 15 isolats ont été choisis parmi ces bactéries cultivées sur King B solide, tous ces isolats sécrètent un pigment fluorescent jaune verdâtre, présentent une coloration de Gram négative et possèdent la catalase et l'oxydase.

Un test d'antagonisme entre les isolats de *Pseudomonas* et une bactérie pathogène *Staphylococcus aureus* a permis de sélectionner un seul isolat qui a inhibé la bactérie pathogène sur King B et non sur Muller Hinton. Cette inhibition est également apparue autour des puits réalisés sur King B et remplis du surnageant d'une culture de King B liquide de cette souche. Ces résultats indiquent que le métabolite qui inhibe *Staphylococcus aureus* peut

être des pyoverdines, qui ont été trouvées dans de nombreuses études inhibitrices de bactéries et de champignons en raison de leur acquisition du fer et en conséquence leur appauvrissement du milieu de cet élément.

**Mots clés :** *Pseudomonas*- stress salin- King B- *Staphylococcus aureus* -pyoverdines.

## **Abstract**

In the present study we chose a bacterium of the genus *Pseudomonas*, which possesses a genome coding for many metabolites secreted by this bacterium. Since salt stress can stimulate bacteria to improve the quality and quantity of these substances, we have isolated these bacteria from the sea. The isolation was carried out from 3 different samples: sea water, Algae and sand from the bottom of the sea. The results showed that only sand from the sea bottom was rich in fluorescent *Pseudomonas*. 15 isolates were selected from bacteria cultured on solid King B, all these isolates secrete a greenish yellow fluorescent pigment and exhibit Gram-negative staining and possess catalase and oxidase.

An antagonism test between the *Pseudomonas* isolates and a pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus* allowed selecting a single isolate that inhibited the pathogenic bacterium on King B but not on Muller Hinton medium . This inhibition also appeared around the wells made on King B and filled with the supernatant of a liquid king B culture of this strain. These results indicate that the metabolite which inhibits *Staphylococcus aureus* may be pyoverdins which have been found in numerous studies inhibiting bacteria and fungi due to their iron acquisition and consequently their depletion of the medium of this element.

**Key words:** *Pseudomonas*- Salt stress - King B- *Staphylococcus aureus* -Pyoverdins

## Sommaire

Remerciements	
Dédicace	
Liste des figures et des tableaux	
Liste des abréviations	
Résumé	
Introduction.....	1
<b>Partie I : Synthèse bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Généralité <i>Pseudomonas</i></b>	
I-Historique.....	2
II-Généralité.....	2
III-Habitat.....	3
V- classification de <i>Pseudomonas</i> .....	3
VI- Caractéristiques morphologiques et culturels.....	5
VI. Pathogénicité .....	6
IV-L'importance du genre <i>Pseudomonas</i> .....	6
VIII- Effets de la salinité sur les <i>Pseudomonas</i> .....	7
<b>Chapitre II : Métabolite de <i>Pseudomonas</i></b>	
I- Métabolite de <i>Pseudomonas</i> .....	8
I.1-Antibiose.....	8
I.1.1.Les phénazines .....	9
I.1.2-La pyocyanine.....	9
I.1.2.1- L'effet antimicrobien de la pyocyanine.....	9
I.1.3-Phloroglucinols.....	10
I.1.4- Pyroline (PRN).....	11
I.1.5-Pyolutéorine (PLT).....	11
I.1.6-Mupirocine.....	11
I.1.7- Antibiotiques peptidique.....	11
I.1.8- Enzymes dégradant les parois fongiques.....	12
I.1.9-Les sidérophores de <i>Pseudomonas</i> .....	12
I.1.10-L'acide cyanhydrique (HCN).....	13
<b>Chapitre III : Généralités sur le genre <i>Staphylococcus</i></b>	
I. Généralités sur le genre <i>Staphylococcus</i> .....	14
I.1. Généralités.....	14
I.2. Taxonomie et classification .....	14
I.2.1. Classification .....	14
I.3. Caractères phénotypiques et culturels.....	14
I.4. Habitat.....	15
I.5. Pathogénicité et virulence.....	15
I.5.1. Constituants de la paroi.....	15
I.5.2. Toxines et facteurs de virulence chez les <i>staphylococcus</i> .....	16
I.6. Formation de biofilm .....	18
I.6.1.Historique.....	18
I.6.2. Définition .....	18

I.6.3. Etapes de formation des biofilms .....	19
I.6.3.1. L'adhérence réversible .....	19
I.6.3.2. L'adhérence irréversible .....	19
I.6.4. Le développement précoce du biofilm .....	19
I.6.5. La maturation du biofilm .....	20
I.6.6. Le détachement de bactéries .....	20
I.6.7. La formation de biofilm par <i>Staphylococcus</i> .....	22

**PARTIE II : Etude Expérimentale**  
Matériel et Méthodes

I.1. Matériel biologique .....	23
II. Méthode .....	23
II.1. Purification et conservation des souches.....	23
III. Mise en évidence de l'effet antagoniste.....	24
III.1 Préparation de la bactérie test.....	24
III.2. Test d'antagonisme <i>in vitro</i> .....	24
III.3. L'effet de surnageant de <i>Pseudomonas</i> sur la croissance de <i>Staphylococcus</i> .....	24
III.4. L'application de la méthode des puits .....	24
V. Identification des souches isolées.....	26
V.1 Etude morphologique.....	26
V.1.1. Etude macroscopique .....	26
V.1.2. Etude microscopique.....	26
V.2 Etude biochimique.....	26
V.2.1. Test de catalase .....	26
V.2.2. Test de croissance à 4°C et 42°C .....	26
V.2.3. Galerie API 20 NE (bio Mérieux).....	27
V.2.4. Test d'oxydase.....	28

**Résultats et discussion**

I. Caractérisation de la souche test.....	29
II. Identification des <i>Pseudomonas</i> .....	29
III. Test antagoniste sur milieu King B.....	29
V. Test antagonisme sur milieu MH.....	30
IV. L'effet de surnageant de <i>Pseudomonas</i> sur la croissance de <i>Staphylococcus</i> .....	31
VII. Identification de l'isolat antagoniste (S <sub>2</sub> ) .....	31
VII.1. Etude macroscopique .....	31
VII.2. Etude microscopique .....	32
VII.3. test de catalase .....	32
VII.4. Test de croissance à 4°C et 42°C sur King A .....	32
VII.5. test d'oxydase .....	33
VII.6. identification biochimique par API 20 NE <i>Pseudomonas</i> .....	33
Discussions.....	36
conclusion.....	39

Référence bibliographique

annexe

# Introduction

# Introduction

L'environnement marin est extrêmement complexe, montrant à la fois une immense diversité biologique et chimique inexplorées. Plusieurs programmes de recherche sont lancés pour la découverte de nouveaux microorganismes marins produisant des composés pharmaceutiques, alimentaires, cosmétiques, chimique, agrochimique. Durant ses cinq dernières décennies, approximativement 16.000 produits naturels d'origine marine ont été découverts et isolés à partir d'organismes marins, dont un nombre de métabolites originaux présentent une grande activité biologique et des propriétés pharmacologique efficaces (**Bakkl et al., 2012**). Les *Pseudomonas* forment un large groupe colonisant l'eau de mer. Ils inhibent les microorganismes pathogènes, cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes. Ces métabolites secondaires, en plus des enzymes dégradant les parois cellulaires. Les plus caractérisées de ces métabolites secondaires sont les : phénazines, phloroglucinols, pyrrolnitrine, lipopeptides, et le cyanure d'hydrogène. Ces métabolites secondaires sont actifs vis à vis d'une large gamme de bactéries et de champignons.

Ce travail consiste à l'isolement des *Pseudomonas* fluorescents à partir de 3 échantillons différents : l'eau de mer, les algues marines et le sable du fond de la mer, puis mettre en évidence l'effet antagoniste de ces bactéries vis à vis d'une bactérie pathogène qui est le *Staphylococcus aureus*, l'étude est présentée comme suite :

- La première partie consiste à réaliser une recherche bibliographique sur les *Pseudomonas* et leurs métabolites et des généralités sur les staphylocoques.
- La deuxième partie est consacrée aux matériel et méthodes utilisés dans la présente étude.
- La troisième partie contient les résultats obtenus suivies d'une discussion.
- Et enfin, du document en trouve une conclusion qui reprend les résultats principaux de ce travail.

# Partie I

## Synthèse bibliographique

# Chapitre I

### I. Historique

En raison de leur présence généralisée dans l'eau et des graines de plantes telles que les dicotylédones, les *Pseudomonas* ont été observés au début de l'histoire de microbiologie. Le nom générique *Pseudomonas* créé pour ces organismes a été défini en terme assez vague, en 1894 par Migula, comme un genre de bactéries à Gram-négatives, en forme de tige et possédants des flagelles polaires. Peu de temps après, les *Pseudomonas* ont été isolées de nombreuses niches naturelles et un grand nombre de noms d'espèces a été initialement attribuée au genre. Selon la deuxième édition du **(Williams et al., 1986)**.

### II. Généralité

Le genre *Pseudomonas* est le groupe le plus hétérogène écologiquement significatif de bactéries connues, et comprend des bâtonnets aérobies Gram-négatives qui sont largement répandues dans la nature et caractérisées par une polyvalence élevée du métabolisme, grâce à la présence d'un système enzymatique complexe. Les exigences nutritionnelles de *Pseudomonas* sont très simples, et le genre se retrouve dans des habitats naturels comme le sol, l'eau douce, le de mer, etc. Mais il a également été isolé des sujets cliniques, des solutions aseptiques, des cosmétiques et produits médicaux **(Franzetti et Scarpellini, 2007)**.

Certains membres du genre *Pseudomonas* appartiennent aux Gamma- Protéobactéries. Ce groupe en globela majorité des espèces de bactéries phyto-pathogènes importants et des agents porteurs d'infections humaines, alors que d'autres souches et espèces sont responsables des activités de bioremédiation et de contrôle biologique **(Tripathy et al., 2006)**

Le genre *Pseudomonas* appartient à la famille des *Pseudomonaceae*, il comprend une soixantaine d'espèces. Plusieurs études ont souligné le haut degré de diversité au sein de *Pseudomonas fluorescens*, ce qui a mené à la subdivision de cette espèce en différentes biovars. Le groupe de *Pseudomonas* se compose de bactéries sous forme de bâtonnets, Gram négatifs, mobiles par ciliature polaire (sauf *Pseudomonas mallei*), non sporulant, elles sont aérobies obligatoires. Les *Pseudomonas* ont un métabolisme mésophile et chimio-organotrophe, peu exigeantes, et incapable de fermenter le glucose, se caractérisent par la pluralité des substances hydrocarbonées utilisées comme source de carbone et d'énergie, produisant des pigments, la plupart étant saprophytes et pouvant coloniser les cellules corticales mortes des racines **(Cook et al., 1996)**. Les membres du genre *Pseudomonas*

présentent une polyvalence métabolique et physiologique remarquable. Les *Pseudomonas* ont un grand intérêt en raison de leur rôle dans les maladies végétales et humaines et de leur potentiel croissant dans les applications biotechnologiques (Mena et al., 2009).

### III. Habitat

Le genre de *Pseudomonas* se retrouve dans des habitats naturels comme le sol, l'eau douce, les eaux marines etc., mais il a également été isolé des instruments cliniques, des solutions aseptiques, des cosmétiques et produits médicaux (Franzetti et Scarpellini, 2007).

### IV. Classification de *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* sont classés selon la hiérarchie suivante (Palleroni, 1984 ; Krieg et al., 1984; Holt et al., 1994) :

Règne :	Bacteria
Embranchement :	Prokaryota
Division :	Proteobacteria
Classe :	Gammaproteobacteria
Ordre :	Pseudomonadales
Famille :	Pseudomonadaceae
Genre :	<i>Pseudomonas</i>

Dans l'édition de 1974 du **Bergey's Manual**, ces bactéries sont incluses dans la famille des *Pseudomonadaceae*. Leur classification repose sur des caractéristiques phénotypiques, seules la composition en G+C furent rajoutées comme caractéristique génétique. Dans la première décennie du nouveau millénaire, la révision taxonomique la plus détaillée du genre *Pseudomonas* basée sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S, fût entreprise par (Anzai et al., 2000).

En analysant les séquences de 128 espèces de *Pseudomonas* (certaines sont des souches de références), ils ont conclu que 57 seulement appartenaient au groupe des *Pseudomonas sensu stricto*; la comparaison de 1073 nucléotides les a subdivisées en 7 groupes:

## Chapitre I Généralités sur les pseudomonas

---

- Le groupe des *P. syringae*.
- Le groupe des *P. chlororaphis*.
- Le groupe des *P. fluorescens*.
- Le groupe des *P. putida*.
- Le groupe des *P. stutzeri*.
- Le groupe des *P. aeruginosa*.
- Le groupe des *P. pertucinogena*.

Depuis l'an 2000, la reclassification continue toujours d'être améliorée (**figure 1**). Plusieurs espèces étant mal classées comme *P. aureofaciens* et *P. aurantiaca* qui sont désormais des sous espèces du groupe *P. chlororaphis* (**Johnson et Palleroni, 1989; Peix et al., 2007**), qui compte actuellement trois sous espèces: *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp. nov.; *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov. comb. nov. et *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov. comb. nov. (**Peix et al., 2007**).

<i>P. abietaniphila</i> <sup>a</sup>	<i>P. cuatrocienegasensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. mandelii</i> <sup>a</sup>	<i>P. pseudoalcaligenes</i> <sup>a</sup>
<i>P. aeruginosa</i> <sup>a</sup>	<i>P. delhiensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. marginalis</i> <sup>a</sup>	<i>P. psychrophila</i> <sup>b</sup>
<i>P. agarici</i> <sup>a</sup>	<i>P. duriflava</i> <sup>b</sup>	<i>P. marincola</i> <sup>b</sup>	<i>P. psychrotolerans</i> <sup>b</sup>
<i>P. alcaligenes</i> <sup>a</sup>	<i>P. extremorientalis</i> <sup>b</sup>	<i>P. mediterranea</i> <sup>c</sup>	<i>P. putida</i> <sup>a</sup>
<i>P. alcaliphila</i> <sup>b</sup>	<i>P. ficuserectae</i> <sup>a</sup>	<i>P. meliae</i> <sup>a</sup>	<i>P. reinkei</i> <sup>b</sup>
<i>P. amygdali</i> <sup>a</sup>	<i>P. flavescens</i> <sup>a</sup>	<i>P. mendocina</i> <sup>a</sup>	<i>P. resinovorans</i> <sup>a</sup>
<i>P. anguilliseptica</i> <sup>a</sup>	<i>P. flectens</i> <sup>a</sup>	<i>P. meridiana</i> <sup>c</sup>	<i>P. rhizosphaerae</i> <sup>b</sup>
<i>P. antarctica</i> <sup>b</sup>	<i>P. fluorescens</i> <sup>a</sup>	<i>P. migulae</i> <sup>a</sup>	<i>P. rhodesiae</i> <sup>a</sup>
<i>P. argentinensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. fragi</i> <sup>a</sup>	<i>P. mohnii</i> <sup>b</sup>	<i>P. sabulinigri</i> <sup>b</sup>
<i>P. asplenii</i> <sup>a</sup>	<i>P. frederiksbergensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. monteiliti</i> <sup>a</sup>	<i>P. salomonii</i> <sup>b</sup>
<i>P. avellanae</i> <sup>a</sup>	<i>P. fulva</i> <sup>a</sup>	<i>P. moorei</i> <sup>b</sup>	<i>P. savastanoi</i> <sup>a</sup>
<i>P. azotifigens</i> <sup>b</sup>	<i>P. fuscovaginae</i> <sup>a</sup>	<i>P. moraviensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. segetis</i> <sup>b</sup>
<i>P. azotoformans</i> <sup>a</sup>	<i>P. gelidicola</i> <sup>c</sup>	<i>P. mosselii</i> <sup>b</sup>	<i>P. simiae</i> <sup>b</sup>
<i>P. balearica</i> <sup>a</sup>	<i>P. geniculata</i> <sup>c</sup>	<i>P. mucidolens</i> <sup>a</sup>	<i>P. straminea</i> <sup>a</sup>
<i>P. betelii</i> <sup>c</sup>	<i>P. gessardii</i> <sup>a</sup>	<i>P. multiresinivorans</i> <sup>a</sup>	<i>P. stutzeri</i> <sup>a</sup>
<i>P. borbori</i> <sup>b</sup>	<i>P. graminis</i> <sup>a</sup>	<i>P. nitroreducens</i> <sup>a</sup>	<i>P. synxantha</i> <sup>a</sup>
<i>P. boreopolis</i> <sup>b</sup>	<i>P. grimonitii</i> <sup>b</sup>	<i>P. oleovorans</i> <sup>a</sup>	<i>P. syringae</i> <sup>a</sup>
<i>P. brassicacearum</i> <sup>b</sup>	<i>P. guineae</i> <sup>b</sup>	<i>P. orientalis</i> <sup>a</sup>	<i>P. taetrolens</i> <sup>a</sup>
<i>P. brenneri</i> <sup>b</sup>	<i>P. halophila</i> <sup>a</sup>	<i>P. oryzihabitans</i> <sup>a</sup>	<i>P. thermotolerans</i> <sup>b</sup>
<i>P. caeni</i> <sup>b</sup>	<i>P. indica</i> <sup>b</sup>	<i>P. otitidis</i> <sup>b</sup>	<i>P. thivervalensis</i> <sup>b</sup>
<i>P. cannabina</i> <sup>a</sup>	<i>P. japonica</i> <sup>b</sup>	<i>P. pachastrellae</i> <sup>b</sup>	<i>P. tolaasii</i> <sup>a</sup>
<i>P. caricapayae</i> <sup>a</sup>	<i>P. jessenii</i> <sup>a</sup>	<i>P. palleroniana</i> <sup>b</sup>	<i>P. tremae</i> <sup>a</sup>
<i>P. cedrella</i> <sup>a</sup>	<i>P. jinjuensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. panacis</i> <sup>b</sup>	<i>P. trivialis</i> <sup>b</sup>
<i>P. chloritidismutans</i> <sup>b</sup>	<i>P. kilonensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. panipatensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. tuomuerensis</i> <sup>b</sup>
<i>P. chlororaphis</i> <sup>a</sup>	<i>P. knackmussii</i> <sup>b</sup>	<i>P. parafulva</i> <sup>b</sup>	<i>P. umsongensis</i> <sup>b</sup>
<i>P. cichorii</i> <sup>a</sup>	<i>P. koreensis</i> <sup>b</sup>	<i>P. peli</i> <sup>b</sup>	<i>P. vancouverensis</i> <sup>a</sup>
<i>P. cissicola</i> <sup>b</sup>	<i>P. libanensis</i> <sup>a</sup>	<i>P. pertucinogena</i> <sup>a</sup>	<i>P. veronii</i> <sup>a</sup>
<i>P. citronellolis</i> <sup>a</sup>	<i>P. lini</i> <sup>b</sup>	<i>P. pictorum</i> <sup>c</sup>	<i>P. viridiflava</i> <sup>a</sup>
<i>P. congelans</i> <sup>b</sup>	<i>P. lundensis</i> <sup>a</sup>	<i>P. plecoglossicida</i> <sup>b</sup>	<i>P. vranovensis</i> <sup>b</sup>

**Figure 1** : Les espèces appartenant actuellement au genre *Pseudomonas* (Peix et al., 2009).

## V. Caractéristiques morphologiques et cultureux

Les *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, droits ou légèrement incurvés, de 0,5 à 1,0 µm de diamètre sur 1,5 à 5,0 µm (ou plus) de longueur, non sporulés. Ces bactéries sont généralement mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires (Garrity, 2005). La culture de ces bactéries est facile avec ou sans production de pigments, sur des milieux minéraux synthétiques avec une source simple de carbone : acétate, pyruvate et des milieux sélectifs à base de cétimide que l'on peut additionner d'acide nalidixique.

Les colonies de *P. aeruginosa* sont polymorphes, soit large avec une partie centrale bombée et un contour irrégulier (oeufs sur le plat), soit des petites colonies mates légèrement bombées avec un bord circulaire régulier, des colonies muqueuses bombées, opaques, visqueuses parfois coulantes. (Avril et al., 2000).

Le genre *Pseudomonas* comprend des espèces fluorescentes produisant des pigments spécifiques. Les deux pigments les plus fréquents et caractéristiques sont la pyocyanine et la pyoverdine qui sont solubles dans les milieux de culture. Les espèces pigmentées sont par exemple : *P. aeruginosa* produit les deux pigments, mais pouvant être perdus par mutation. *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*, et *P. cichorii* produisent de la pyoverdine et *P. aureofaciens* : produit un pigment jaune orange ou pourpre. Certaines souches sont apigmentées tel que *P. alcaligenes*, *P. stutzeri*. (Martin, 2007).

### VI. Pathogénicité

*Pseudomonas aeruginosa* est un agent pathogène opportuniste qui est important dans l'étiologie de nombreuses maladies infectieuses humaines (Silby et al., 2011).

Les infections avec cette bactérie sont souvent accompagnées par un pus bleu, et la bactérie est communément isolée des spécimens cliniques (plaies, brûlures et infections des voies urinaires) (Miyada et Lory, 2003).

### VII. L'importance du genre *Pseudomonas*

Les bactéries du genre *Pseudomonas* occupent la plupart des environnements naturels. Elles sont isolées de l'eau, du sol et des végétaux. Elles présentent un fort potentiel d'adaptation physiologique et génétique et sont capables d'utiliser une grande variété de nutriments. D'un point de vue écologique, les *Pseudomonas* regroupent des espèces bénéfiques pour l'environnement et des espèces pathogènes (Talon et al., 2006).

Au niveau de la rhizosphère les *Pseudomonas* peuvent avoir un effet bénéfique en mobilisant certains nutriments nécessaires à la croissance de la plante. Elles peuvent aussi la protéger contre des micro-organismes pathogènes en stimulant les mécanismes de résistance intrinsèques de la plante par la sécrétion des composés antibactériens et antifongiques et/ou par la compétition vis-à-vis de certains nutriments. C'est notamment le cas de souches de *P. fluorescens*, décrites comme des bactéries phytoprotectrices jouant un rôle prépondérant dans le biocontrôle de la rhizosphère (Walsh et al., 2001).

D'autres espèces sont des pathogènes pour les plantes, comme l'espèce *P. syringae* qui compte au moins 37 pathovars capables d'infecter de nombreuses espèces de végétaux (Sawada et al., 2002).

Les *Pseudomonas spp.* Sont capables de dégrader de nombreux composés organiques, tels des composés halogénés, des hydrocarbures aromatiques et desherbicides (**Ramos, 2004**). elles peuvent ainsi être utilisées dans les processus de décontamination des sols « bioremédiation » (**Stallwood et al., 2005**).

Les *Pseudomonas spp.* Peuvent également se comporter comme des agents opportunistes et être à l'origine d'infections iatrogènes et/ou nosocomiales. En raison de la richesse de leurs voies métaboliques, souvent capables de résister à de nombreux antiseptiques ou antibiotiques. Ceci explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier, où elles peuvent être isolées de l'environnement humide, des denrées alimentaires, des réactifs biologiques, des solutés injectables, du sang ou des dérivés sanguins conservés au froid (**Feuilloy et al., 2007**).

### **VIII. Effets de la salinité sur les *Pseudomonas***

Le métabolisme des *Pseudomonas* des diverses niches écologiques est contrôlé par le degré de salinité et des facteurs environnementaux. Son activité antagoniste est due principalement à la sécrétion des métabolites. Ces bactéries sont également connues par le contrôle des agents phytopathogènes dans les sols salins (**Prabhakaran et al., 2014**).

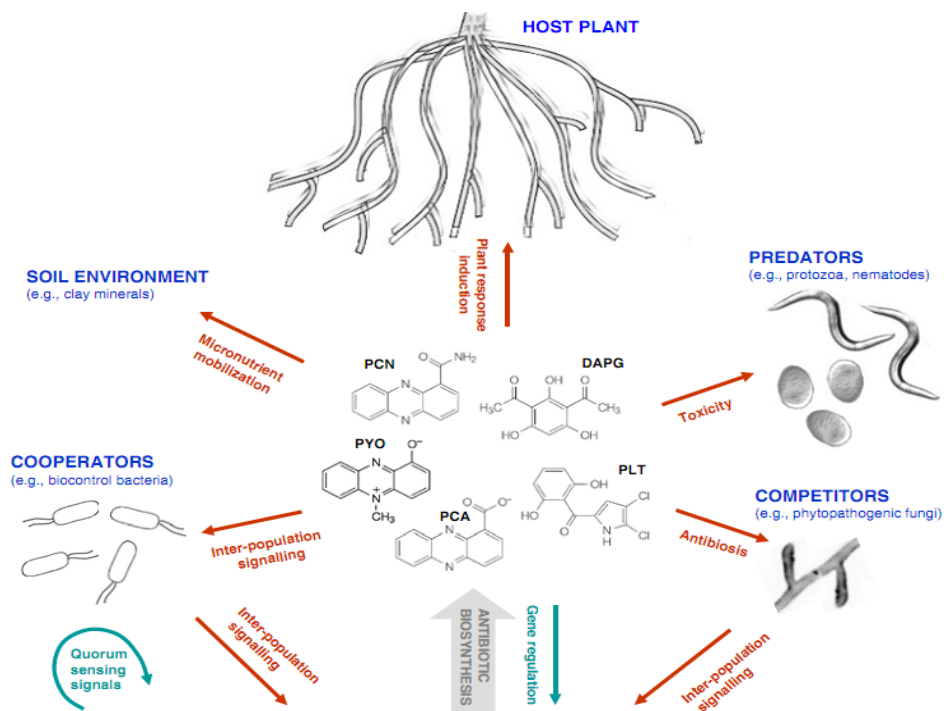
Dans leur habitat naturel, les *Pseudomonas* sont fréquemment exposés à des variations de pression osmotique du milieu environnant. En effet, la salinité élevée du sol peut interférer avec la croissance et l'activité des *Pseudomonas*. La membrane cytoplasmique de ces bactéries est perméable à l'eau mais constitue une barrière efficace vis-à-vis des solutés du milieu et des métabolites présents dans le cytoplasme (**Csonka, 1989**).

La circulation des molécules d'eau à travers cette bicouche lipidique est accélérée par la présence de canaux dits aqueux (**Kempf et Bremer, 1998**).

# Chapitre II

## I. Métabolites de *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas* spp. *fluorescents* produisent une gamme importante de métabolites secondaires, en plus des enzymes dégradant les parois cellulaires. Les plus caractérisées ces métabolites secondaires sont les: phénazines, phloroglucinols, pyrrolnitrine, lipopeptides, et le cyanure d'hydrogène. Ces métabolites secondaires sont actifs vis à vis une large gamme de bactéries et de champignons (**Figure2**).



**Figure 2:** Les principaux antibiotiques produits par les souches de biocontrôle jouent un rôle central entre les éléments impliqués dans les interactions (**Dubuis et al., 2007**).

### I.1. Antibiose

L'antibiose consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Les souches de *Pseudomonas* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants impliqués dans le biocontrôle, par exemple l'acide cyanhydrique (HCN), la viscosamide, la pyrolutérine, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine, les phénazines, les butyrolactones, les tensines et les tropolones (**Defago, 1993; Haas et Defago 2005**).

D'autre part l'oligomycine A, la kanosamine, la zwittermicine et la xanthobacine sont produites par *Bacillus* spp. , *Streptomyces* spp et *Stenotrophomonas* spp. (Milner *et al.*, 1996 ; Nakayama *et al.*, 1999). Certaines souches de PGPR ont la capacité de dégrader les parois cellulaires fongiques à travers la production d'enzymes hydrolytiques tels <sup>2</sup>-1,3-gluconase, exo- et endo-polygalacturonases, pectinolyases, cellulases et chitinases (Whippes, 2001).

### I.1.1. Les phénazines

Plusieurs espèces de *Pseudomonas* ont la capacité de produire des phénazines. Ces métabolites ont de différentes fonctions biologiques notamment dans la virulence de la bactérie (Mazzola *et al.*, 1992; Mahajan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2011).

Plusieurs phénazines tel que : la pyocyanine (1-hydroxy-5-méthyl-phénazine), l'acide phénazine-1-carboxylique (APC), le 1-hydroxyphénazine et la phénazine-1-carboxamide (PCN) sont produites par *P. aeruginosa* (Budzikiewicz, 1993).

Ces composés ont une activité d'oxydo-réduction. Les deux loci *phzA1B1C1D1E1F1G1* et *phzA2B2C2D2E2F2G2* sont à l'origine de la production de l'APC. Ce dernier est transformé en pyocyanine et PCN grâce aux trois gènes *phzM*, *phzS*, et *phzH* (Mavrodi *et al.*, 2001).

### I.1.2-La pyocyanine (PYO)

Le principal pigment phénazinique produit par *Pa* est la pyocyanine. Ce métabolite secondaire est retrouvé en large quantité : jusqu'à 27,3 µg/ml ( 130 µM) dans les mucus de patients atteints de mucoviscidose présentant une infection chronique à *Pa* (Wilson *et al.*, 1988).

#### I.1.2.1- L'effet antimicrobien de la pyocyanin

L'activité antimicrobienne de la pyocyanine pourrait ainsi être expliquée par sa capacité à induire un stress oxydatif.

Hassan et Fridovich (1980) ont observé qu'*Escherichia coli* est sensible à la pyocyanine lorsqu'elle est cultivée en milieu minimum, et qu'elle l'est nettement moins lorsque le milieu est enrichi en extrait de levures. Ils ont constaté que l'ajout de PYO dans le milieu enrichi induit l'expression des enzymes antioxydantes, la catalase et dans une moindre mesure le superoxyde dismutase (SOD), et que l'ajout de SOD et de catalase exogène protège les cellules de la toxicité de pyocyanine. Ces auteurs ont donc suggéré que

la pyocyanine génère de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) et par dismutation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) à l'extérieur de la cellule, puis qu'une partie d' $H_2O_2$  traverse la membrane cellulaire et induit l'expression de catalase.

**Voggu et al., (2006)** ont observés que la coculture de *Staphylococcus aureus* en présence de *Pa* induit l'apparition de souches de *Staphylococcus aureus* communément appelées "Small-colony variants SCVs" ce phénomène est due à la sécrétion de la pyocyanin par *Pa*.

La pyocyanine joue aussi un rôle primordiale dans l'inhibition de *Candida albicans*, en effet, plusieurs études cliniques ont mentionné la limitation de croissance de *Candida albicans* par *Pa*. De plus, un traitement antibiotique ciblant *Pa* a pour conséquence une prolifération de *C. albicans* (**Kerr, 1994**).

Des études préliminaires ont permis de mettre en évidence *in vitro* l'effet négatif exercé par certains métabolites tels que la PYO et l'hydroxyphénazine sur la croissance de *C. albicans* (**Kerr, 1994; Kerr et al., 1999**).

La première étude de **Hogan et Kolter, (2002)** a clarifié les conditions dans lesquelles *Pa* et *C. albicans* interagissent : l'interaction de *Pa* avec *C. albicans* se déroule lorsque les bactéries sont en phase stationnaire de croissance et que les levures sont sous forme filamenteuse. Elle aboutit au terme de 72 h de coculture à l'agglutination d'un conglomérat bactérien autour de filament puis à la formation d'un biofilm autour des colonies bactériennes entraînant la mort de *C. albicans*.

L'utilisation des souches mutées sur les gènes de synthèse des phénazines et de la PYO s'est traduit par une réduction marquée de l'activité fongicide de *Pa* (**Mahajan et al., 1999**).

### I.1.3. Phloroglucinols

Les phloroglucinols sont des antibiotiques à large spectre, produits par une large variété de souches bactériennes. Le 2,4-diacétyl phloroglucinol (DAPG) est aussi un antibiotique phénolique à large spectre d'action produit par *P. fluorescens* Pf-5 (**Howell et Stipanovich, 1979**), *P. fluorescens* F113 (**Fenton et al., 1992**), *P. fluorescens* CHAO et *P. fluorescens* Q2-87 (**Bangera et Thomashow, 1996**).

Cet antibiotique possède aussi une activité herbicide, ressemblant à l'acide 2, 4-dichlorophénoxyacétique (2, 4-D) un herbicide de post-émergence, pour le contrôle des mauvaises herbes des céréales, de la canne à sucre et d'autres plantations. Le DAPG induit

aussi la résistance systémique chez les plantes, et joue donc le rôle d'un éliciteur des phytoaléxines (Dwivedi et Johri 2003).

#### I.1.4. Pyrolnitrine (PRN)

La pyrolnitrine (PRN) (3-chloro-4-(2'-nitro-3'-chlorophenyl) un composé pyrrole, est produite par les *Pseudomonas* spp. fluorescents comme *P. fluorescens* et *P. chlororaphis* (Elander et al., 1968). La pyrolnitrine a trouvé son application comme composé à usage clinique pour le traitement des mycoses cutanées plutôt que fongicide agricole (Hammer et al., 1997 ; McSpadden Gardener et Fravel, 2002).

La production de ce composé par *P. fluorescens* est impliquée dans le contrôle de certains agents pathogènes racinaires comme *R. solani*, *Verticillium dahliae*, *G. graminis* et *Fusarium oxysporum* (Howell et Stipatovic, 1979 ; Homma et al., 1989).

#### I.1.5-Pyolutéorine (PLT)

La pyolutéorine, un autre antibiotique produit par différents *Pseudomonas*. Les souches produisant la PLT sont à l'origine de la suppression de nombreuses maladies telluriques (Howell et Stipanovic, 1980 ; Défago et al., 1990; Maurhofer et al., 1994).

Cette molécule, isolée pour la première chez *P. aeruginosa*, est composée d'un anneau résocinol synthétisé par la voie de polycétide, relié à une partie pyrrole bichlorée (Nowak et al., 1997,1999), possédant un pouvoir fongitoxique efficace contre les oomycètes, notamment *Pythium ultimum* (Maurhofer et al., 1992).

#### I.1.6. Mupirocine

Plus connu comme l'acide pseudomonique, est un antibiotique polycétide naturellement présent chez les *Pseudomonas* spp. Fluorescents. La mupirocine produite par *P. fluorescens* NCIMB 10586, est d'une activité élevée contre *Staphylococcus aureus* et d'autres bactéries à Gram positif (El-sayed et al., 2001). C'est un antibiotique largement utilisé dans les maladies tropicales (Carcanague, 1997).

#### I.1.7. Antibiotiques peptidique

Les antibiotiques peptidiques sont aussi bien produits par les bactéries à Gram positif (Katz et Demain, 1977) que celles à Gram-négatif (Dowling et O'Gara, 1994), par une synthèse multienzymatique non-ribosomique (Kleinkauf et Dohren, 1996).

Récemment, il a été démontré que des *Pseudomonas* spp. fluorescent produisent des lipopeptides cycliques (CLPs). La tensine produite par *P. fluorescens* 96.578, a montré un effet potentiel sur le basidiomycète *R. solani* (Nielsen et al., 2000). La Viscosinamide un autre lipopeptide cyclique produit par *P. fluorescens* DR54 (Nielsen et al., 1999), est aussi actif sur *R. solani* par la réduction de la biomasse mycélienne et donc la formation de sclérotés (Thane et al., 2000).

L'Oomycin A est un antibiotique produit par *P. fluorescens* HV37a, est à l'origine de la suppression du damping-off du coton causé par *P. ultimum* (Gutterson et al., 1988).

### I.1.8. Enzymes dégradant les parois fongiques

L'excrétion d'enzymes qui dégradent les parois cellulaires fongiques est fréquemment impliqué dans les attaques des champignons phytopathogènes (Martin et Loper 1999; Nielsen et Sorensen, 1998; Picard et al., 2000). La lyse des parois cellulaires, par les enzymes de dégradation excrétées par les microorganismes est une fonction bien connue du mycoparasitisme. La Chitinase, la  $\alpha$ -1,3 glucanase et la cellulase sont d'importantes enzymes spécialement dans le contrôle fongique, par leurs activités dégradatives des composés des parois cellulaires tels que : la chitine, le  $\alpha$ -1-6 glucane et les ponts glucosidiques (Schroth et Hancock, 1981; Chet, 1987; Lorito et al., 1996).

Les microorganismes excréant la chitinase ont été rapportés comme des agents de biocontrôle efficaces (Ordentlich et al., 1988; Inbar et Chet, 1991). Le contrôle biologique de *Fusarium solani*, se fait essentiellement via les activités des laminarinase et chitinase chez *P. stutzeri* YPL-1 (Lim et al., 1991). *P. cepacia* produisant la  $\alpha$ -1,3 glucanase, réduit l'incidence des maladies causées par *R. solani*, *P. ultimum* et *Sclerotium rolfsii* (Fridlender et al., 1993).

Nielsen et al., (1998) ont rapporté que dans la rhizosphère de la betterave à sucre, les *Pseudomonas* spp. fluorescents inhibaient *R. solani* par production d'endochitinase.

### II.1.9. Les sidérophores de *Pseudomonas*

Pour subvenir à ses besoins en fer, *Pseudomonas* synthétise et sécrète, la pyoverdine (Pvd). La Pvd est le sidérophore majeur produit par cette bactérie et se caractérise par une très forte affinité pour le fer ( $10^{32} \text{ M}^{-1}$ ) (Albrecht-Gary et al., 1994; Abdallah and Pattus, 2000).

Ces composés sont les sidérophores typiques des *Pseudomonas* fluorescents comme *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*. La pyoverdine de *P. fluorescens* est un pigment vert/jaune fluorescent sous la lumière UV qui est directement impliqué dans un transport de haute affinité du fer vers la cellule (**Budzikiewicz, 1993**).

La découverte de plus d'une cinquantaine de dérivés de la pyoverdine a contribué à augmenter l'intérêt pour l'utilisation de sidérophores comme fongicide et biopesticides, en plus d'ouvrir une nouvelle avenue pour la classification des *Pseudomonas* sp. (**Wilson, 1997; Meyer, 2000**). Leur structure consiste en un chromophore dihydroxyquinoline flanqué d'une chaîne de peptide à 6-12 acides aminés liée au groupement carboxyle et à un acide dicarboxylique connecté sur le groupement NH<sub>2</sub> du chromophore (**Fernandez, et al., 2003**).

#### II.1.10. L'acide cyanhydrique (HCN)

L'acide cyanhydrique (HCN) qui est produit par plusieurs *Pseudomonas* sp est un métabolite secondaire responsable de l'activité biologique contre divers champignons (**Haas et al., 2003**). Ce composé volatil est un facteur de virulence qui peut s'avérer toxique.

# Chapitre III

## I. Généralités sur le genre *Staphylococcus*

### I.1. Généralités

Les staphylocoques sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'homme et de l'animal. L'homme est le principal réservoir naturel de *Staphylococcus*, il présente un portage sain, principalement au niveau des cavités nasales. Chez l'homme, les staphylocoques en particulier les espèces *S. aureus* et *S. epidermidis* font partie de la flore résidente cutanée de nombreux individus qui sont des « porteurs asymptomatiques » (Wylie et al., 2005).

### I.2. Taxonomie et classification (Delarras, 2007)

#### I.2.1. Classification de Bergey (1994)

Selon la deuxième édition de Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology, la classification phylogénétique du genre *Staphylococcus* est la suivante:

- Domaine : *Bacteria* -Phylum XIII: *Firmicutes*
- Classe: *Bacilli*
- Ordre: *Bacillales*
- Famille: *Staphylococcaceae*
- Genre: *Staphylococcus* avec 38 espèces et des sous-espèces.

Plusieurs espèces sont retrouvées chez l'homme. D'autres sont présentes chez les animaux ou dans les aliments (Aouati, 2009).

Parmi celles retrouvées chez l'homme, trois espèces occupent une place privilégiée essentiellement dans la pathologie humaine: *S.aureus*, *S.epidermidis* et *S. saprophyticus*. Les autres sont rarement impliquées (Avril et Dabernat, 2003).

*S.epidermidis*, que l'on retrouve sur la peau est une bactérie commensale qui provoque rarement des maladies cutanée. *S. aureus* est moins fréquemment retrouvé mais il est généralement pathogène opportuniste. Une troisième espèce, *S. saprophyticus*, est unique en ce sens qu'elle n'est responsable que d'infections urinaires (Figarella, 2004).

### I.3. Caractères phénotypiques et cultureux

La coloration de Gram, la morphologie des colonies sur milieux gélosés et différents tests biochimiques permettent d'identifier le genre *Staphylococcus* et l'espèce *S. aureus*. Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif, isolés ou groupés en amas, immobiles, non sporulés, parfois encapsulés, catalase-positif et oxydase-négative.

La production d'une coagulase, d'un pigment caroténoïde jaune doré et la présence d'une protéine A de paroi caractérisent *Staphylococcus aureus*. Les autres espèces sont regroupées sous le terme de staphylocoques à coagulase négative (SCN), dont le représentant principal est *S. epidermidis* (El Kour, 2003).

#### I.4. Habitat

Les staphylocoques sont des bactéries ubiquitaires présentes sur la peau, les muqueuses et la sphère rhino-pharyngée chez les animaux à sang chaud (mammifères, volailles) et en particulier chez l'homme. Les staphylocoques ont également été isolés de l'environnement naturel (sol, eau douce et eau de mer, poussière, air), de l'environnement domestique de l'Homme (cuisine, réfrigérateur), de l'environnement hospitalier et des ateliers de préparation alimentaires et à partir de denrées alimentaires. La peau et les muqueuses de l'homme et des animaux constituant l'habitat primaire de *S. aureus*, la présence de ce germe dans l'environnement est vraisemblablement due à une contamination par l'homme ou les animaux (Bergdoll, 1979).

#### I.5. Pathogénicité et virulence

Les infections par les staphylocoques sont caractérisées d'une part par les caractères destructifs, profonds et des foyers métastatiques, la rapide dissémination des métastases septiques et l'existence de signes généraux marqués, et d'autre part, la possibilité d'une persistance prolongée en plusieurs dizaines d'années (Proctor et al., 1998).

Les constituants de la paroi des staphylocoques, les substances enzymatiques et toxiques produites, hydrolysant les différents constituants cellulaires contribuent à la pathogénie des staphylocoques (Arvidson, 2000 ; Fauchere, 2002).

##### I.5.1. Constituants de la paroi

*S. aureus* possède un grand nombre de protéines de surface appelées adhésines, qui ont la capacité de se fixer sur les molécules de l'hôte (ou à des surfaces inertes type cathéters) (Tableau 1). La grande majorité de ces adhésines appartiennent à la famille des MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule) (Foster et Hook, 1998).

Parmi les mieux caractérisées on peut citer notamment la protéine de liaison au collagène CNA, les protéines de liaison à la fibronectine FnBPA et FnBPB, les protéines de liaison au fibrinogène (Clumping factor) ClfA et ClfB et la protéine A (ou SpA) qui possède également une activité super antigénique (Clarke et Foster, 2006).

**Tableau1** : Principales protéines de surface de *S. aureus* (Foster et Mcdevitt, 1994; Foster et Hook, 1998).

Abréviations	Nom complet de la protéine	Ligands
FnBP-A	Protéine de liaison à la fibronectine -A	Fibronectine fibrinogène Elastine
FnBP-B	Protéine de liaison à la fibronectine -B	Fibronectine Elastine
CIfA	Protéine de liaison au fibrinogène -A	Chaîne y du fibrinogène fibrine
CIfB	Protéine de liaison au fibrinogène -B	Chaines et B du fibrinogène Cytokeratine 10 Type I
Cna	Protéine de liaison au collagène	Collagène
EbpS	Protéine de liaison à l'élastine	Elastine
Spa	Protéine A	Facteur Von Willebrand
Bbp	Protéine de liaison à la sialoprotéine de l'os	Sialoprotéine de l'os
EbhAB	Protéine de liaison a la matrice extracellulaire	Fibronectine

### I.5.2. Toxines et facteurs des virulence chez les *staphylococcus*

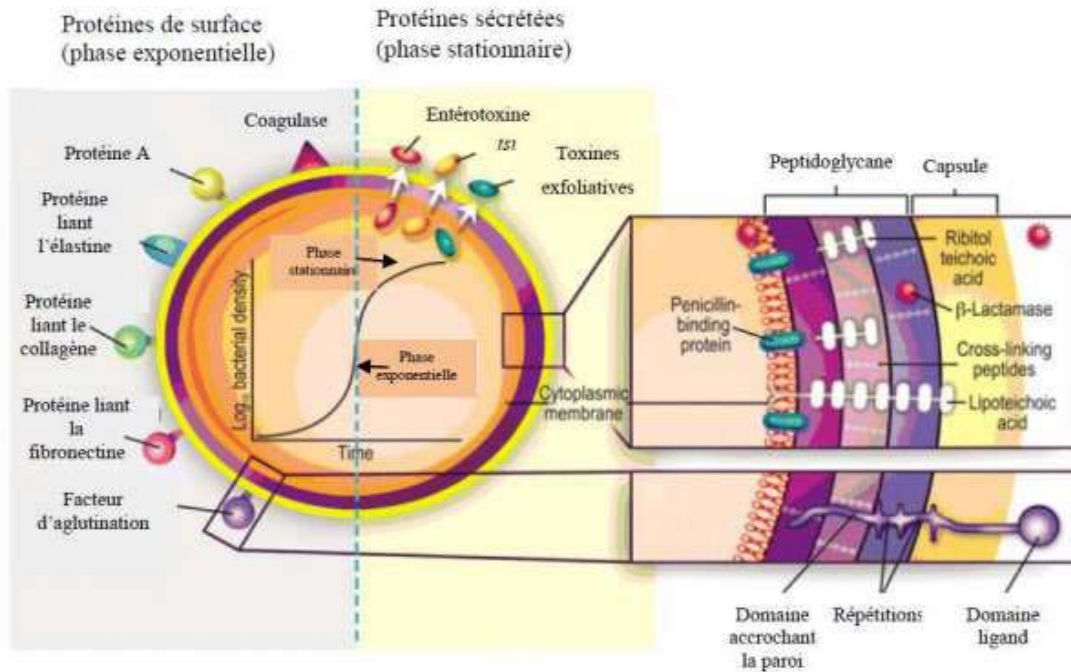
Les principales toxines sont les hémolysines, la leucocidine, exfoliatines, et la toxine de choc toxique TSST-1 (Arvidson, 2000). Les staphylolysines ont un effet cytotoxique ils sont mis en évidence sur les hématies (Fauchere, 2002).

La leucocidine est cytotoxique, agissant sur les polynucléaires et les macrophages chez lesquels elle provoque la perte de mobilité, la dégranulation, la destruction nucléaire et la lyse cellulaire (**Figarella, 2004**). La toxine du syndrome de choc toxique staphylococcique ou TSST-1 est un super-antigène retrouvé chez plus de 90% des souches responsables de ce syndrome (**Fauchere, 2002**).

La pathogénie des infections à staphylocoque coagulase négative (SCN), bien qu'encore mal connue, diffère sensiblement de celle des infections à *S. aureus*. Les infections à *S. epidermidis* sont caractérisées par deux éléments : elles sont souvent associées à un corps étranger, et comme pour la plupart des infections à SCN, elles évoluent sur un mode indolent, subaigu. *S. epidermidis* produit en effet beaucoup moins d'enzymes et de toxines que *S. aureus* (**Von Eiff et al., 2002**).

Les capacités d'adhésion des staphylocoques aux cellules humaines, aux matrices extracellulaires et aux corps étrangers sont des facteurs essentiels des processus de colonisation et d'infection, aboutissant à la formation de ces communautés structurées de cellules bactériennes entourées d'une matrice polymérique autoproduite et adhérant à une surface inerte ou vivante, que sont les biofilms (**Costerton et al., 1999**).

Par la diversité de ses facteurs de virulence ( **figure 3**), lui permettant entre autres de former des biofilms au contact des corps étrangers et de survivre au sein de cellules eucaryotes, les espèces *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* sont les germes les plus fréquemment responsables d'infections à corps étrangers, tels que les cathéters intra-vasculaires, les valves cardiaques prothétiques et les prothèses ostéo-articulaires (**Peters, 1982 ; Pittet et Wenzel, 1995 ;Tattevin et al., 1999**).



**Figure 3:** Facteurs de virulence de *S. aureus* (Gordon, et al., 2008)

## I.6. Formation de biofilm

### I.6.1. Historique

On attribue la découverte des biofilms à l'inventeur du microscope Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723) ; qui observa vers **1683** avec cet appareil des communautés de microorganismes au niveau de ses dents (Donlan, 2002). En **1932** ; Henerici observa des communautés bactériennes fixées sur ces lames lors de l'expérience visant à observer la croissance des algues sur des lames de verre placées dans un aquarium. Il a été déduit l'hypothèse que la plupart des bactéries vivant en milieu aqueux ne sont pas sous la forme planctonique, mais plutôt elles sont organisées sous forme de communautés sessiles fixées à une surface (Henerici, 1932; Trautner et al., 2009). Le terme « biofilm » a été utilisé pour la première fois par Zobell en **1943**.

### I.6.2. Définition

Le biofilm est une communauté structurée de micro-organismes, se fixant à une surface inerte ou vivante et réunis au sein d'une matrice d'exo-polysaccharides (Jain et al., 2011) adhésive et protectrice qu'ils sécrètent. C'est une structure vivante en perpétuel remaniement. Il constitue le mode de vie majoritaire des micro-organismes, par opposition à l'état planctonique, libre et isolé dans l'environnement (Espinasse et al., 2010). Un biofilm peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de microorganismes (Behlau et Gilmore, 2008).

### I.6.3. Etapes de formation des biofilms

Les bactéries semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale (Annous *et al.*, 2009), telle que le manque d'oxygène et de nutriments ou la présence d'un traitement (Vu *et al.*, 2009).

Les biofilms peuvent se développer sur une grande variété de surfaces incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, ou tout autre support retrouvé dans le sol ou dans les milieux aquatiques. On distingue généralement cinq étapes de formation de biofilm (**figure 4**) (Talaro, 2008).

#### I.6.3.1. L'adhérence réversible

En milieu liquide ou exposé à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide (Høiby *et al.*, 2011) par mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active (présence de flagelles). Elles s'y attachent de manière réversible des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques. Cette étape est influencée par des conditions environnementales impliquant le pH, l'osmolarité, la température, la concentration en oxygène et en nutriments et l'hydrodynamique de fluide (Beloin *et al.*, 2008).

L'adhérence des bactéries est également influencée par la nature de la surface, notamment sa rugosité et son hydrophobicité. Les bactéries adhèrent facilement sur une surface rugueuse, hydrophobe et non polaire (Beloin *et al.*, 2008).

#### I.6.3.2. L'adhérence irréversible

La fixation à la surface solide devient irréversible en raison de la production d'exopolysaccharides par les bactéries (Høiby, 2011) et surtout grâce à des structures d'adhérence variables selon les espèces bactériennes, par exemple les fimbriae et les curli pour *E.coli*, qui interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface (Beloin *et al.*, 2008).

### I.6.4. Le développement précoce du biofilm

Les bactéries se multiplient lentement et continuent de produire des exopolysaccharides. Elles s'agrègent entre elles et forment des microcolonies, qui sont protégées par la matrice exopolysaccharidique (Jacobosen *et al.*, 2008).

### I.6.5. La maturation du biofilm

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et de pores entre les microcolonies (**Folkesson et al., 2008**), permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance de micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets (**Tenke et al., 2006**).

La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoque la dégradation des résidus présents dans les surfaces environnantes et permet ainsi la libération de nutriments (**Jacolsen et al., 2008**).

### I.6.6. Le détachement de bactéries

Un biofilm est approximativement constitué de 85% de matrice extracellulaire et de 15% de microorganismes (**Bahlau et Gilmore, 2008**). La matrice extracellulaire est principalement constituée d'eau (97%) et incluse également des polymères d'exo-polysaccharides, de protéines, des phospholipides, des nutriments et des métabolites. Cette matrice a un rôle protecteur et un rôle structurel (**Beloin et al., 2008**).

Les bactéries acquièrent un mode de croissance, une physiologie et un métabolisme différent des bactéries planctoniques. Ces changements phénotypiques résultent d'une révolution du profil d'expression de leurs gènes. Toutes ces transformations sont coordonnées grâce à un système de communication entre les bactéries d'une même espèce au sein du biofilm, appelé quorum sensing (**Behlau et Gilmore, 2008**).

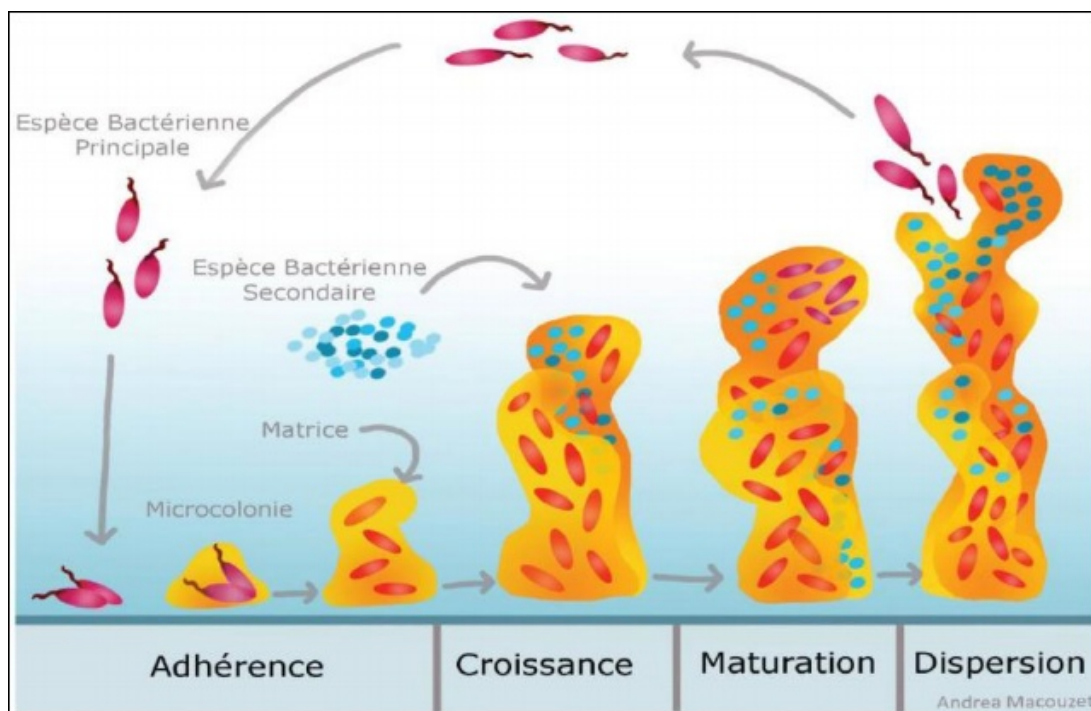
Ce système est fondé sur la production de molécules diffusibles par les bactéries, par exemple les acyl-homoserine lactones chez les bactéries à Gram négatif, qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné (**Filloux et Vallet, 2003**).

Les biofilms matures possèdent une structure tridimensionnelle avec plusieurs microenvironnements différents qui évoluent selon l'osmolarité, le pH et la densité cellulaire. Du fait de cette hétérogénéité, l'état métabolique d'une bactérie diffère selon sa localisation, il existe une variété de phénotypes bactériens au sein de biofilm. Les contacts rapprochés entre les micro-organismes favorisent le transfert horizontal de matériel génétique. Ce phénomène pourrait notamment faciliter la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques (**Trautner et Darouiche, 2004**).

Des bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnant après un retour à l'état planctonique. Traditionnellement, le détachement de bactéries est considéré comme un phénomène passif, dépendant notamment des forces du flux du milieu dans lequel le biofilm se trouve. Cependant, le détachement de bactéries peut aussi être une stratégie active, initiée par les bactéries elles mêmes, leur permettant de coloniser de nouvelles surfaces et de survivre lorsque l'espace et les nutriments deviennent limités. Les bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas selon les mécanismes impliqués (Kaplan, 2010).

Comme pour les autres étapes, le détachement de bactéries est un processus complexe qui implique des signaux environnementaux et une communication entre les bactéries (Joshi et al., 2010).

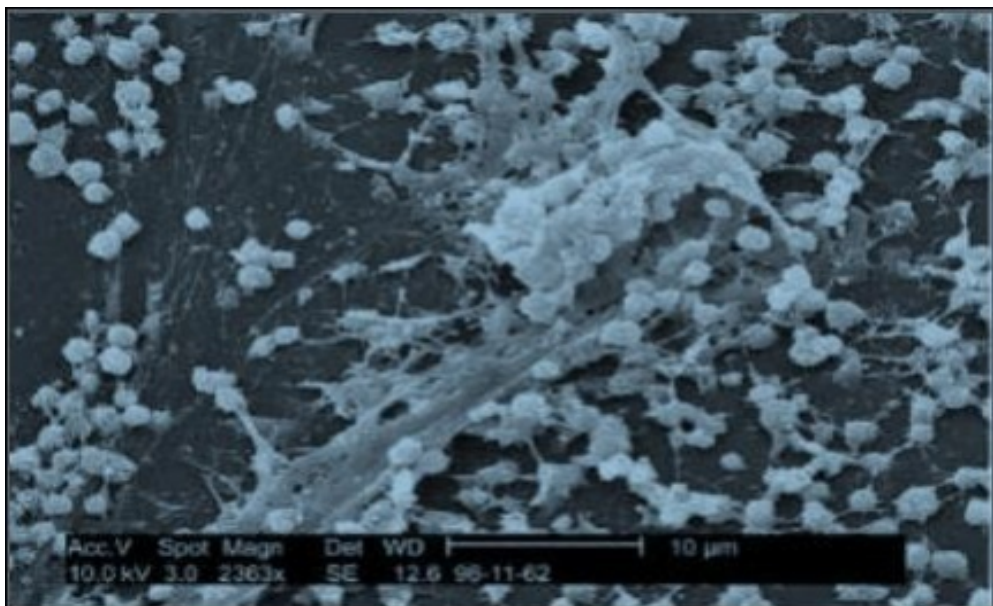
Ainsi un biofilm établi constitue un réservoir de bactéries viables, capables d'aller coloniser d'autres surfaces (Joshi et al., 2010).



**Figure 4** : Schéma présentant les étapes du développement du biofilm (Yannik et al., 2014).

### I.6.7. La formation de biofilm par *Staphylococcus*

La formation d'un biofilm de *Staphylococcus* est un processus qui se déroule en deux phases. La première phase consiste en l'attachement initial des cellules sur une surface, et la seconde à la multiplication et à la formation d'une communauté structurée, mature et multicouche des cellules bactériennes. Ces deux phases sont physiologiquement différentes l'une de l'autre et requièrent chacune des facteurs spécifiques. Le détachement de cellules du biofilm mature permet la dissémination des bactéries et la colonisation de nouveaux sites d'infection chez l'homme (Otto, 2008).



**Figure5:** Image obtenue par microscopie confocale d'un biofilm formé par *Staphylococcus* spp. à la surface d'un cathéter veineux (Center for Disease Control and Prevention, 2009).

# Partie II

## Etude Expérimental

# Matériel Et Méthode

### I. Matériel et Méthodes :

- **Lieu de travail :**

Notre stage a été réalisée au laboratoire de microbiologie, de l'université Abd El Hamid Ibn Badis Mostaganem.

#### I.1. Matériel biologique :

- **Souche test**

La souche utilisée dans notre travail *Staphylococcus aureus* a été fournies par le laboratoire de microbiologie (Université de Mostaganem).

La croissance de la souche a été réalisée à 37°C sur la gélose Chapman.

- **Isolement des *Pseudomonas***

L'isolement des *Pseudomonas* a été effectué à partir de sable d'origine marine au niveau de la plage de Salamandre (Mostaganem).Le milieu de culture utilisé pour l'isolement est le milieu King B solide.(annexe)

### II. Méthode :

1g du sable de mer, est placé dans un tube a essai contenant 9ml de l'eau distillé stérile(SM).La préparation des dilutions allant de  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-3}$  en procédant au changement des pipettes à chaque dilution.

A partir des dilutions décimales de  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$ ; 0.1 ml de chaque solutions est déposé ensuite étalé en surface du milieu King B dans des boites de Pétri numérotée successivement. Les boites seront incubées à 28°C pendant 48h.

#### II.1. Purification et conservation des souches :

La purification des souches a été effectuée selon la méthode de stries simple sur le milieu King B et incubés à 28°C pendant 48 heures. Les souches obtenues sont

Conservées à 4°C dans des tubes contenant la gélose inclinée.

### III. Mise en évidence de l'effet antagoniste:

#### III.1 Préparation de la bactérie test :

La bactérie test *Staphylococcus aureus* est cultivée dans 10 ml de bouillon BN à 37°C pendant 24 h. Puis un repiquage sur boîtes de Pétri dans contenant le milieu Chapman et incubé à 37°C pendant 24h.

Après obtention de colonies pures, la bactérie test est cultivée dans 10 ml de bouillon BN à 37°C pendant 18h à 24 h.

#### III.2. Test d'antagonisme *in vitro*:

Le but de ce test est de déterminer si la souche possède des caractères de performance.

Ce test consiste à déposer la souche de *Pseudomonas* isolé, en trait dans des boîtes de Pétri contentent de milieu King B et des boîtes contenant de milieu MH.

Après incubation de 48h à 28°C on dépose aseptiquement des traits perpendiculaires au trait de *Pseudomonas* la souchede *Staphylococcus*.

La lecture de résultats consisteà mesurer la distance de zones d'inhibition entre la souche antagoniste et la souche à tester.

#### III.3. L'effet de surnagent de *Pseudomonas* sur la croissance de *Stphylococcus* :

A l'aide d'une anse stérile, on prélève une colonie de *Pseudomonas* à tester et on l'introduit dans un flaconqui contient 100 ml de milieu King B liquide, et on incube à 28°C pendant 48 heures. Après l'incubation la culture est mise en centrifugation à 6000 tr/ 10min.

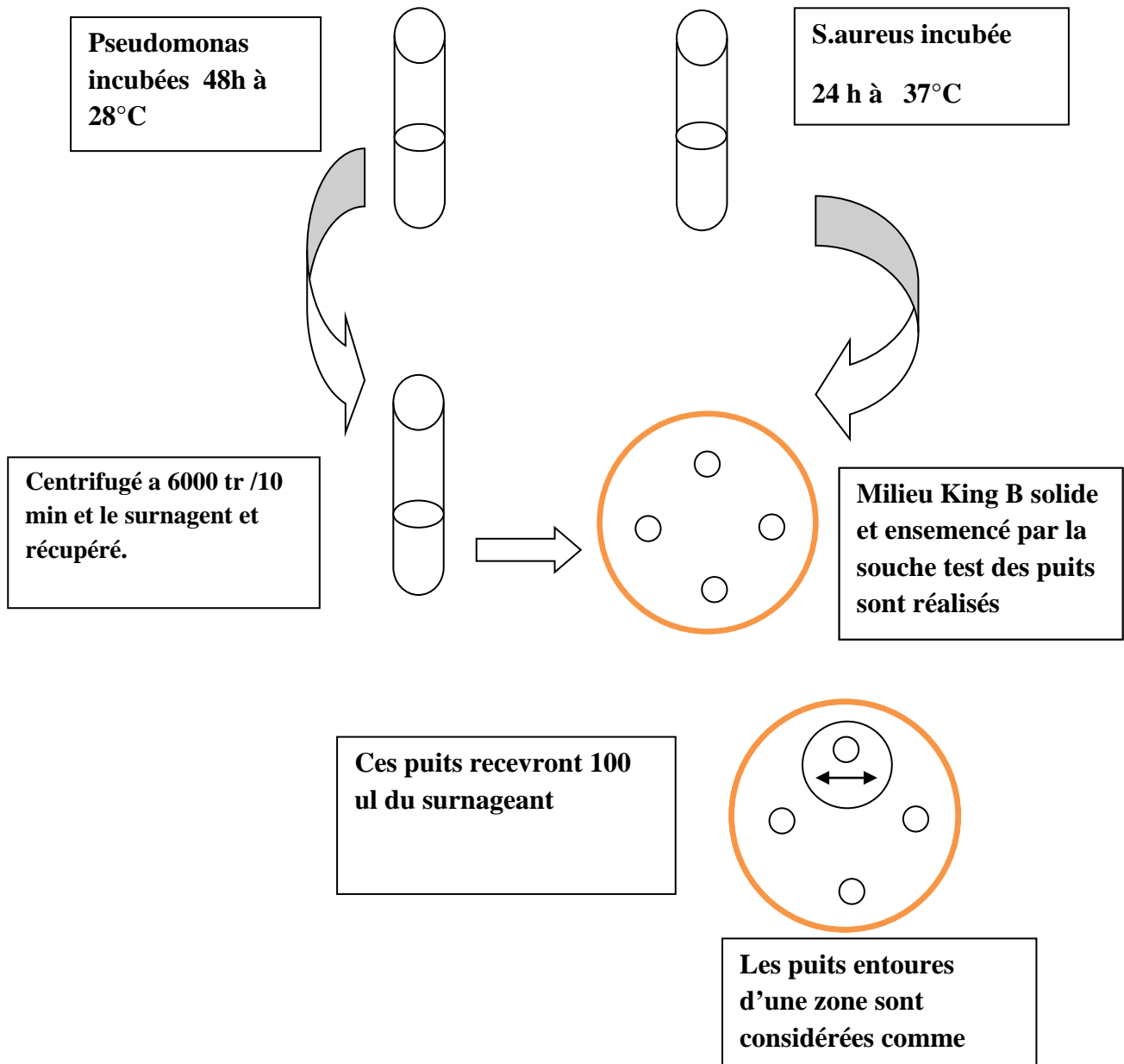
Le surnagentcontenant des métabolites est récupérer.

#### III.4. L'application de la méthode des puits :

On a appliqué cette méthode sur le milieu King B solide, Un volume de 20 ml de King B est coulés dans des boîtes de Pétri. Et on ensemence la souche testée par un écouvillon. Ensuite on réalise des puits de diamètre entre 0.5 et 0,8 cm. Les puits seront rempli par le surnagent. L'incubation se fait à 28°C pendant 24 à 48 heures.

La lecture de résultats se fait par la mesure des zones d'inhibition autour des puits.(Figure 06)

## Matériel et Méthodes



**Figure6 :** Schéma de la méthode de diffusion en puits.

### V. Identification des souches isolées :

L'identification a été basé sur les caractères morphologiques et divers caractères biochimiques.

#### V.1 Etude morphologique:

##### V.1.1. Etude macroscopique :

Cette étude est réalisée par observation à l'œil nu de la taille, la forme, la couleur et l'aspect des colonies sur milieu solide.

##### V.1.2. Etude microscopique :

- **Coloration de Gram**

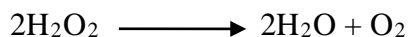
Cette étude est réalisée par l'observation sous microscope optique de la forme de la disposition des bactéries à la suite d'une coloration de Gram, les bactéries qui apparaissent en violée sont dit « Gram positive » et celle qui présentant une couleur rose sont appelées « Gram négative ».

La méthode est présentée dans l'Annexe.

#### V.2 Etude biochimique :

##### V.2.1. Test de catalase :

La catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée, sa présence est mise en évidence en déposant, à l'aide d'une pipette Pasteur, quelques gouttes d'eau oxygénée à 10% sur une colonie isolée (**Guiraud et al., 2003**). La décomposition de l'eau oxygénée se traduit par un dégagement de bulles de gaz (catalase positif) selon la réaction suivante :



##### V.2.2. Test de croissance à 4°C et 42°C :

Des stries sont réalisées à partir d'une culture purifiée sur le milieu King A, en suite on incube pendant 48 heures à 42°C et à 4°C. L'incubation est prolongé jusqu'à 4 jour.

La lecture des résultats se base sur la présence ou l'absence d'une croissance sur les boites.

### V.2.3. Galerie API 20 NE (bio Mérieux) :

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non enterobactéries et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.) combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données. La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

#### Préparation de la galerie :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation.)
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

#### Préparation de l'inoculum :

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (2 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" de la notice du produit ou utiliser un tube contenant 2 ml de solution saline à 0.85 %, sans additif.
- A l'aide d'une pipette, prélever 1 à 4 colonies de morphologie identique, par aspirations ou par touches successives. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension d'opacité égale à 0,5 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

#### Inoculation de la galerie :

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO<sub>3</sub> à ONPG avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des

## Matériel et Méthodes

---

tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.

- Ouvrir une ampoule d'API AUX Medium comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" et y transférer environ 200 µl de la suspension précédente. Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles.
- Remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation et incuber à  $29\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 24 heures ( $\pm 2$  heures).

### V.2.4. Test d'oxydase :

Le test oxydase doit être réalisé selon les instructions du fabricant, il constitue le 21ème test d'identification à noter sur la fiche de résultats. Les bandelettes imprégnées de para diméthyle para phényle diamine, sur les quelle en dépose une quantité de crème bactérienne le résultat est immédiat.



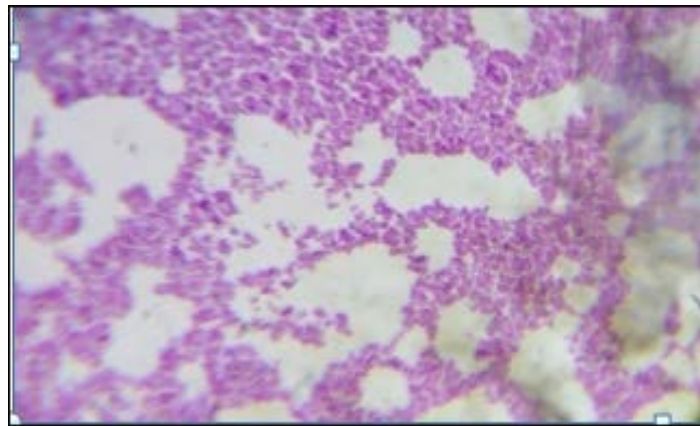
**Figure7** Bandelette d'oxydase.

# Résultats et discussions

### I. Caractérisation de la souche test :

La souche obtenue de *Staphylococcus* à été cultivée sur milieu Chapman. L'observation macroscopique des souches de *Staphylococcus* sur milieu de Chapman (annexe) montre des colonies crémeuses, pigmentées typiquement jaune d'orée, qui mesurent a peu près 4 mm de diamètre, opaque le virage de couleur de ce milieu rouge vers le jaune indique la dégradation du mannitol et l'acidification de milieu.

L'aspect microscopique a été vérifié par une coloration de Gram. L'étude microscopique de *Staphylococcus* présente des coques en amas (grappe de raisin) arrondis, coloration de Gram positive. (**Figure 8**)



**Figure 8:** Coloration de Gram des *Staphylococcus* (G : x100)

### II. Identification des *Pseudomonas*

L'isolement des bactéries à partir de sable prélevé sous l'eau de mer nous a permis de sélectionner 15 isolats de *Pseudomonas fluorescents*, c'est dernier ont été purifiés et examinés par une coloration de Gram.

Les isolats purs ont été sélectionné pour réaliser le test d'antagonisme vis-a- vis de *Staphylococcus*.

### III. Test antagoniste sur milieu King B

Les résultats obtenus dans le test d'antagonisme sur milieu King B indiquent qu'un seul isolat (**S<sub>2</sub>**) seulement a montré un effet contre la souche de *Staphylococcus* avec une zone d'inhibition de 16 mm (**figure9**).

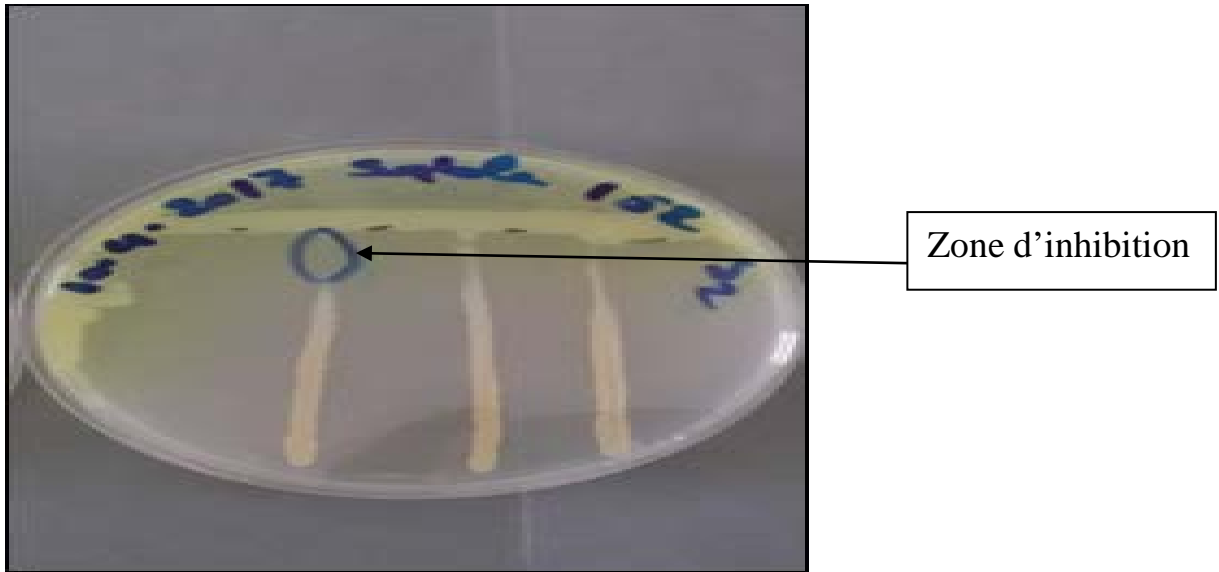


Figure 9: Activité antagoniste de la souche  $S_2$  vis-à-vis de *Staphylococcus*

### V. Test antagonisme sur milieu MH:

Les résultats obtenus dans l'essai d'antagonisme sur milieu MH n'a montré aucun effet antagoniste sur la souche étudiée *Staphylococcus*.

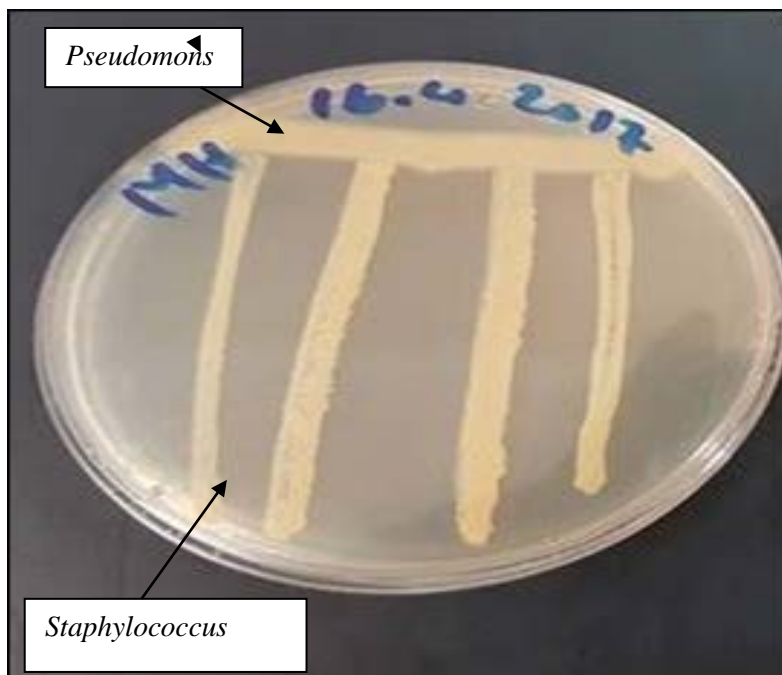
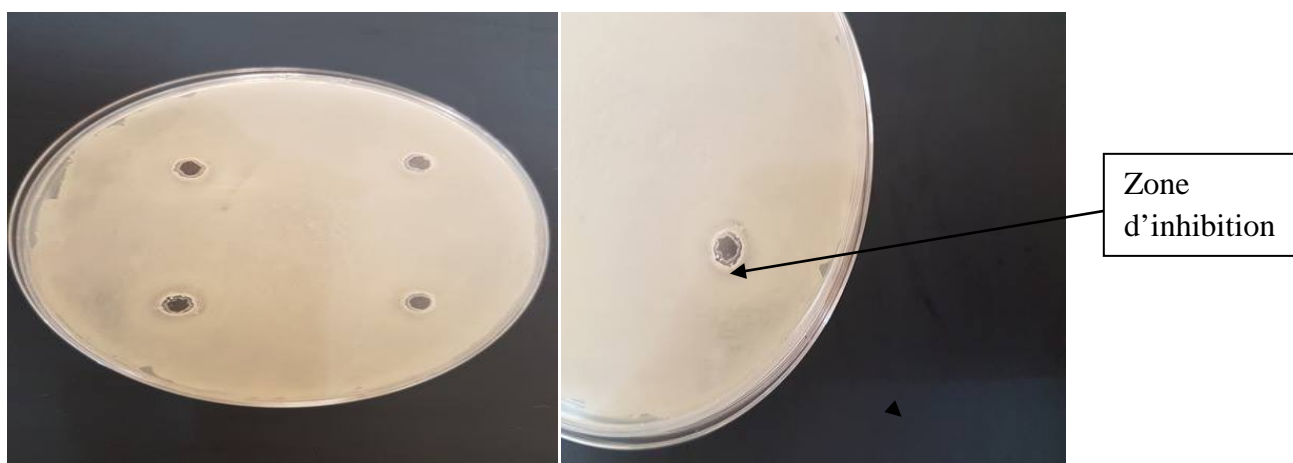


Figure 10: Activité antagoniste de la souche  $S_2$  vis-à-vis de *Staphylococcus* sur milieu

### IV. L'effet de surnagent de *Pseudomonas* sur la croissance de *Staphylococcus*

L'application de surnagent obtenu après centrifugation d'une culture liquide dans un milieu King B dans des puits, a permis d'obtenir de faibles zone d'inhibition (**figure 11**).

Cela a permis de dire que les métabolites qui se trouvent dans surnagent n'ont pas exercé un effet remarquable sur la souche contient pas de métabolites inhibiteur pour le *Staphylococcus*.



**Figure 11:** Zones d'inhibitions de *Pseudomonas* ( $S_2$ ) vis-à-vis de *Staphylococcus*.

### VII. Identification de l'isolat antagoniste ( $S_2$ ) :

#### VII.1. Etude macroscopique :

L'observation macroscopique des colonies développées sur le milieu King B (annexe) à 28°C pendant 48h a montré une forme des colonies moyenne, irrégulière, a pigment diffusible fluorescent de couleur jaune verdâtre.



**Figure 12:** Aspect macroscopique de *Pseudomonas* sur milieu King B solide.

### VII.2. Etude microscopique :

La souche isolée est un bacille droit de taille moyenne de couleur rose qui indique une coloration de Gram négative (figure13)



Figure13: observation microscopique de *Pseudomonas*

### VII.3. Test de catalase :

L'isolat de *Pseudomonas* (S2) possède une catalase déterminée par une présence de dégagement gazeux (O<sub>2</sub>) elle est dite catalase positive (Figure 14).

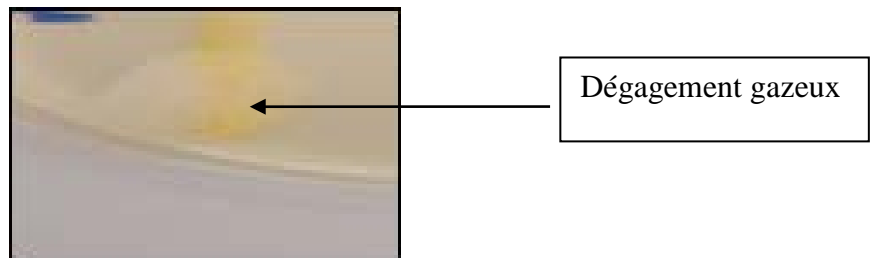


Figure 14: Test de catalase

### VII.4. Test de croissance à 4°C et 42°C sur King A :

Les résultats de la croissance à 4°C et 42°C indiquent que la souche de *Pseudomonas* présente une faible croissance à 42°C et une forte croissance à 4°C (Figure15).



Figure 15: Test de croissance à 4°C et 42°C sur King A

### VII.5. Test d'oxydase :

Ce test est réalisé directement par un dépôt d'une quantité de crème bactérienne sur une bandelette imprégné d'oxalate N-diméthyl phnyléne-diamine. Ce réactif au contact du cytochrome c'est des bactéries oxydase positive se traduit par une coloration rose ou violette foncée en deux minutes environ (**figure 16**).



Figure 16 : Test oxydase T.

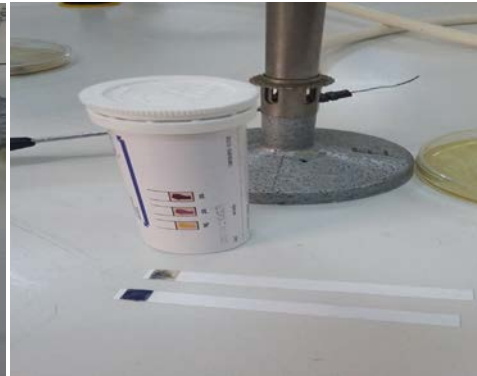


Figure 16 : Test oxydase positive.

### VII.6. Indentification biochimique par API 20 NE *Pseudomonas* :

Après incubation de API Ensemence par la bactérie le lecteur a été faite selon les figurent.

Le tableau présente les résultats d'identification par API 20 NE, ce tableau montre que la souche isolée ne fermente pas d'indole, ne fermente pas le glucose et hydrolysent la gélatine(GEL), ne décompose pas le substrat 4-nitrophényl-<sup>2</sup> D-galactopyranoside par la <sup>2</sup>-Galactosidase (para – Nitrophényl –<sup>2</sup> D- Galactopyranosidase ou (PNPG). La totalité des tests biochimiques de la galerie API 20 NE est montré dans le tableau 2. La réaction de l'oxydase constitue le 21<sup>e</sup> test.

**Tableau 02** : résultats des tests biochimiques *PSEUDOMONAS*

Les tests API 20 NE	Positive	Négative
No3		-
TRP		-
GLU		-
ADH	+	
URE	+	
ESC		-
GEL	+	
PNPG		-
GLU	+	
ARA		-
MNE		-
MAN	+	
NAG		-
MAL		-
GNT	+	
CAP	+	
ADI		-
MLT	+	
CIT		-
PAC		
OX	+	

+ : Test positive.

- : Test négative.



**Figure 17:** Identification de *Pseudomonas* par la galerie API 20 NE

## Résultat et discussion

---

Après lecture des résultats et numérotation des triplettes des tests par les chiffres 1,2,4 On a obtenu les 7 chiffres suivant : 0344451.

Identification a été réalise a l'aide du logiciel d'identification API web Le résultat montre que l'isolat **S<sub>2</sub>** de cette étude fait partie du complexe *Pseudomonas fluorescens-putida*.

### Discussion

Les bactéries marines doivent s'adapter aux conditions physiques, chimiques et biologiques. La présence d'une concentration relativement élevée d'ions Na<sup>+</sup> dans l'eau de mer a influencé l'exigence de ces ions par la plupart des bactéries marines (**Macleod, 1965**). Les halophiles extrêmes peuvent même avoir des conditions de croissance optimales à 10% (P / v) de NaCl (**Bowers et al., 2009**). Les bactéries marines sont également capables de vivre dans des conditions nutritionnelles épuisées et de survivre à de longues périodes de famine (**Wai et al., 1999**). En outre, la grande majorité de l'environnement marin est caractérisé par des températures basses (inférieures à 4°C) et des pressions élevées (supérieures à 100 × 10<sup>5</sup> Pa), ce qui a entraîné des bactéries psychophiles et barophiles (**Delong et Yayanos, 1987**). Il existe même des souches bactériennes considérées comme poly-extrémophiles (**Bowers et al., 2009**). La diversité des milieux marins a exercé une force motrice sur la sélection des bactéries conduisant à de nouvelles stratégies adaptatives et la synthèse de nouveaux métabolites. Appelés métabolites secondaires. Les adaptations aux conditions de la mer peuvent affecter la production de métabolites secondaires. Par exemple, quatre isolats d'actinomycètes qui produisent de nouveaux métabolites, ont tous augmenté dans une certaine mesure lorsque l'eau de mer était remplacée par un milieu de fermentation complexe dans de l'eau désionisée, mais seulement l'un des quatre a pu produire le métabolite en l'absence d'eau de mer (**Jensen et Fenical, 1996**). Les approches moléculaires telles que l'extraction de l'ADN provenant de l'eau de mer ont montré beaucoup plus loin la diversité bactérienne que celle obtenue par des méthodes basées sur la culture. Les conditions de culture dans le laboratoire reflètent rarement les conditions naturelles trouvées dans le site d'échantillonnage et donc des souches de croissance rapide sont sélectionnées (**Bull et Stach, 2007**).

Les *Pseudomonas* forment un large groupe colonisant l'eau de mer. Ces bactéries à coloration de Gram négatives, non sporulées, sont aérobies obligatoires, à l'exception de certaines pouvant utiliser le NO<sub>3</sub> comme accepteur d'électrons. leur mobilité est assurée par un ou plusieurs flagelles polaires, et elles ont un métabolisme mésophile et chimioorganotrophe, la plupart étant saprophytes (**Bossis et al., 2000**). Quelques espèces peuvent causer des infections chez l'humain. particulièrement *P. aeruginosa*, reconnu comme pathogène opportuniste et causant des infections pulmonaires mortelles

chez les patients atteints de fibrose kystique (**Mavrodi et al., 2001**). Les *Pseudomonas* inhibent les microorganismes pathogènes, cette capacité d'inhibition peut se faire selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes (**kim et al., 2004. iavicoli et al., 2003**).

Dans la présente étude nous avons choisi une bactérie qui se distingue par la production de pigments jaune-vert fluorescents (pyoverdine ou pseudobactine) dans des conditions de carence en fer. Étant donné que le stress salin peut stimuler les bactéries pour améliorer la qualité et la quantité de ces substances (**Carla et al., 2010**), nous avons isolé ces bactéries de la mer. L'isolement a été effectué à partir de 3 échantillons différents: l'eau de mer, les algues et le sable du fond de la mer. Les résultats ont montré que seul le sable du fond de mer était riche en *Pseudomonas fluorescents*. 15 isolats ont été choisis parmi ces bactéries cultivées sur King B solide, tous ces isolats sécrètent un pigment fluorescent jaune verdâtre, présentent une coloration de gram négative et possèdent la catalase et l'oxydase. Plusieurs travaux ont signalé aussi la présence des *Pseudomonas* dans le sable de mer : Dans le sable de plage dans une plage marine subtropicale en Floride, aux États-Unis (**Esiobu et al., 2004**) et à partir de sable sec sur les plages maritimes de Caroline du Sud (**Stevens et al., 2012**). **Mendes et al. (1993)** ont couramment détecté *P. aeruginosa* dans les sables de plage sur les plages maritimes en Portugal, et les valeurs ont été mesurées jusqu'à  $2,4 \times 10^7$  cellules / g de sable. *P. aeruginosa* était également couramment détecté dans le sable de plage dans les plages des Açores, dépassant  $10^3$  UCF / g de sable (**Mendes et al., 1997**). **Mohammed et al. (2012)** a suggéré *P. aeruginosa* pourrait être utile pour évaluer les conditions sanitaires du sable de plage en l'absence d'indicateurs idéaux de non- risques pour la santé.

Un test d'antagonisme entre les isolats de *Pseudomonas* et une bactérie pathogène *Staphylococcus aureus* a permis de sélectionner un seul isolat qui a inhibé la bactérie pathogène sur King B et nom sur Muller Hinton. Cette inhibition est également apparue autour des puits réalisés sur King B et remplis du surnageant d'une culture de King B liquide de cette souche. Ces résultats indiquent que le métabolite qui inhibe *Staphylococcus aureus* peut être dû à des pyoverdines, qui ont été trouvées dans de nombreuses études inhibitrices de bactéries et de champignons en raison de leur acquisition du fer et en conséquence leur appauvrissement du milieu de cet élément (**Zhang et al., 2016**).

La gélose King B permet la production de pyoverdine, Le phosphate dipotassique augmente la concentration en phosphore apporté par la peptone et stimule ainsi la production de pyoverdine, tout en inhibant la production de pyocyanine. Le sulfate de magnésium apporte les cations nécessaires à la production de pyoverdine. **Selon zhang et al (2016)** la pyoverdine a montré différents degrés d'effets inhibiteurs sur la croissance de *Vibrio sp.* Marin. L'effet inhibiteur de la pyoverdine était probablement dû à sa capacité à séquestrer le fer, mais le complexe de la pyrrodine ferrique ne pouvait être reconnu et utilisé par le *vibrio sp.* Ils ont également montré que le biofilm développé par *Vibrio parahaemolyticus* wzv1 et wz2121 et *Vibrio cyclitrophicus* hs12 était significativement réduit en présence de pyoverdine. Les résultats ont démontré que la pyoverdine peut être un agent prometteur qui pourrait être potentiellement appliqué pour lutter contre les infections de *Vibrio*.

# Conclusion

## Conclusion

Ce travail est un petit aperçu sur les bactéries d'origine marine qui sont considérées comme un matériel biologique d'une importance biotechnologique. Les *Pseudomonas* choisis dans cette étude sont l'un des grands groupes de bactéries vivantes qui vivent principalement dans le sol, l'eau de mer et l'eau douce, et beaucoup d'autres environnements, ce qui se reflète dans leur capacité métabolique polyvalente et large potentiel d'adaptation aux fluctuations des conditions environnementales. Leurs métabolites sont d'un grand intérêt en raison de leur importance dans l'industrie, dans les applications biotechnologiques et en médecine (Silby et al., 2009). Les *Pseudomonas sp.* produisent une gamme importante de métabolites secondaires, en plus des enzymes dégradant les parois cellulaires. Les pyoverdines, les phénazines, phloroglucinols, pyrrolnitrine, lipopeptides, et le cyanure d'hydrogène. Ces métabolites secondaires sont actifs vis-à-vis d'une large gamme de bactéries et de champignons. La pyoverdine pourrait inhiber la croissance et la formation de biofilm. L'effet inhibiteur de la pyoverdine est probablement dû à sa capacité à séquestrer le fer. En fin nous pouvons constater que l'obstacle majeur à l'évaluation complète des métabolites bactériens et des mécanismes adaptatifs est la difficulté de reproduire en laboratoire les conditions habituellement rencontrées par la bactérie dans des environnements stressants naturels.

D'autres progrès dans les méthodologies analytiques récentes nous permettront peut-être de clarifier les mécanismes et le potentiel des bactéries marines et leurs produits biochimiques particuliers.

# Références bibliographiques

- Abdallah, M.A. and Pattus, F. (2000). Siderophores and Iron-transport in Microorganisms. *J Chin Chem Soc*, 47, 1-20.
- Albrecht-Gary, A.M., Blanc, S.R., Ocacktan, A.Z. and Abdallah, M.A. (1994). Bacterial iron transport coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg Chem*, 33, 6391-6402.
- Annous, B., Fratamico, P. and Smith, J. L. (2009). Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do, *Journal of Food Science*, Vol. 74 No. 1, pp. 24-37
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J-Y., Wakabayashi, H. and Oyaizu, H., (2000). Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonads* based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1563-1589.
- Aouati, H. (2009). Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline: étude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Département De Biochimie et De Microbiologie, Algérie: thèse N° : 006 / SN / 2009.
- Arvidson S. (2000). Extracellular enzymes. Gram-positive pathogens, ed. by Fischetti et
- Avril J.L., Dabernat H., Denis F. and Monteil H. (2003). Bactériologie clinique. 3<sup>ème</sup> édition. Ellipses, Paris. 8-28.
- Avril, J. M., Dabernat, H., et Monteil, D. H. (2000). Bactériologie clinique. 3<sup>ème</sup> Ed. Ed. Ellipses. Paris. 602 P.
- Bakkal Suphan, M., Sandra, A. Margaret (2012): Bacteriocins of Aquatic Microorganisms and their potential application in the seafood Industry. *carvalho.edmir .in tech*. 978-953.
- Banger, M. G. and Thomashow, L. S., (1996). Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 83-90.
- Behlou, I. et Gilmore, M. S. (2008). Microbial biofilms in ophthalmology and infectious diseases. *Arch Ophthalmol* 126, 1572-1581
- Behlou, I. et Gilmore, M. S. (2008). Microbial biofilms in ophthalmology and infectious diseases. *Arch Ophthalmol* 126, 1572-1581.
- Beloin C, Roux A, Ghigo JM (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol.*

- Bergdoll, M. (1979). Staphylococcal intoxications. In H. Riemann et F. L. Bryan (Eds) *Food-borne infection and intoxications* (pp. 443-494). New York: Academic Press. Chapter 39: 379-385.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (1986).
- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X., Gardan, L. (2000). The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: Current status and need for revision. *Agronomie*. **20**, 51-63.
- Bowers, K.; Mesbah, N.; Wiegel, J. Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: Does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physicochemical boundary for life *Saline Syst.* (2009), 5, 9.
- Budzikiewicz, H., (1993). Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol. Rev.* 104: 209-228.
- Budzikiewicz, H., (1993). Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol. Rev.* 104: 209-228.
- Bull, A. T. & Stach, J. E. (2007). *Trends Microbiol.* 15, 491-499.
- Carcanague, D.R., (1997). Novel derivatives of pseudomonic acid. *Bioorganic Medicinal Chem. Lett.* 7(21): 2805-2808.
- Carcanague, D.R., (1997). Novel derivatives of pseudomonic acid. *Bioorganic Medicinal Chem. Lett.* 7(21): 2805-2808.
- Carla C. C. R. de Carvalho and Pedro Fernandes (2010). Production of metabolites as Bacterial Responses to the Marine Environment. *Mar. Drugs* 2010, 8, 705-727; doi:10.3390/md8030705
- Chet, I., (1987). Trichoderma - application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: *Innovative Approaches to Plant Disease Control*, I. Chet (ed.), John Wiley & Sons: New York. pp. 137-160.
- Clarke S.R., Foster S.J. (2006). Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Adv Microb*
- Cook, R., Bruckart, W., Coulson, J., Goettel, M., Lumsden, R., Maddox, J., McManus, M., Moore, L., Meyer, S., Quimby, P., Stack, J et Vaughn, J. (1996). Sécurité des micro-organismes destinés à la lutte antiparasitaire et de lutte contre les maladies des plantes: un cadre pour l'évaluation scientifique. *Biol. Contrôle.* 14-24p.
- Costerton P.S, Stewart E.P, Greenberg E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause

- Csonka. L.N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53:121-147.
- Defago, G. (1993). 2,4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant Pathol.* 42: 311–312
- Défago, G., Berling, C.H. and Burger, U., (1990). Suppression of Black Root Rot of Tobacco and Other Root Diseases by Strains of *Pseudomonas fluorescens*: Potential Applications and Mechanisms. In: *Biological Control of Soilborne Plant Pathogens*. Hornby D, (ed). Oxon, UK: CAB International, Wellingford, pp. 93–108.
- Delarras, C. (2007). *microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de controle sanitaire*. Paris: Lavoisier
- Delong, E.F.; Yayanos, A.A. Properties of the glucose-transport system in some deep-sea bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987, 53, 527–532.
- Donlan RM (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseasejournal.* 8 (9): 881-890.
- Dowling, D.N. and O’Gara, F, (1994). Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.* 12: 133-140.
- Dowling, D.N. and O’Gara, F, (1994). Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.* 12: 133-140.
- Dubuis, C. and Haas, D.,( 2007). Cross-species GacA-controlled induction of antibiosis in pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 650-654.
- Dwivedi, D. and Johri, B.N., (2003). Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation. *Curr. Sci.* 85(12): 1693-1673.
- El Kouir, D. P. (2003). Infections à staphylocoques : aspects cliniques et bactériologiques. *EMC, maladies infectieuses*, 8-007-A-10.
- Elander, R.P., Mabe, J.A., Hamili, R.H. and Gorman, M., (1968). Metabolism of tryptophane by *Pseudomonas aureofaciens*. VI. Production of pyrrolnitrin by selected *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol.* 16:753-758.
- El-Sayed, A.K., Hothersall, J. and Thomas, C.M., (2001). Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Microbiol.* 147: 2127-2139
- Esiobu N, Mohammed R, Echeverry A, et al. The application of peptide nucleic acid probes for rapid detection and enumeration of eubacteria, *Staphylococcus*

aureus and *Pseudomonas aeruginosa* in recreational beaches of S. Florida. *Journal of Microbiological Methods*. (2004); 57:157–162.

- Espinasse, f., Page, B. et Cottard-Bouelle, B. (2010). Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue Francophone des Laboratoires* 426, 51-63.
- Fauchere, J. L. (2002). *Bacteriologie générale et médicale*. Paris: ellipses.
- Fernandez, D. U., R. Fuchs, M. Schäfer, H. Budzikiewicz et J. M. Meyer. (2003). The pyoverdinin of *Pseudomonas fluorescens* G173, a novel structural type accompanied by unexpected natural derivatives of the corresponding ferribactin. *Z. Naturforsch* 58, (1-2): 1-10.
- Feuilloley M.G.J., Chapalain A., Rossignol G., Lesouhaitier O., Merieau A., Geoffroy V.,
- Figarella, J. L. (2004). *Microbiologie générale et appliquée*. Paris: DELAGRAVE.
- Filloux, A. et Vallet, I. (2003). Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *MedSci (Paris)* 19, 77-83.
- Folkesson, A., Haagenen, J. A. J., Zampaloni, C., Sternberg, C. and Molin, S. (2008). Biofilm induced tolerance towards antimicrobial peptides, *Public Library of Science*, Vol. 3 No. 4, pp. 1-11
- Foster T.J, Hook M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends*
- Foster T.J, Mcdevitt D. (1994). Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*.
- Franzetti L and Scarpellini M (2007). Characterisation of *Pseudomonas spp.* isolated from foods. *Annals of Microbiology*. 57(1): 39-47. *Immunol*, 322: 249- 289 *Interface*, *Microbes and Microbial Technology*, Springer, New York, pp. 59-85.
- Fridlender, M., Inbar, J. and Chet. I., (1993). Biological control of soil-borne plant pathogens by a  $\beta$ -1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* 25:1211–1221.
- Garrity, G.M. (2005). The Proteobacteria - Part B: The Gammaproteobacteria. In 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'. (Springer: New York).
- Gordon, L., Cloeckart, A., Doublet, B., Schwarz, S., Bouju-Albert, A., Ganiere, J. P., et al. (2008). Complete sequence of the florocarrington miltiresistance plasmid pAB5S9 from fresh water *Aeromonas bestiarum*. *J. Antimicrob. Chemother*, 62: 65-71.
- Guerillon J., Meyer J.M., Orange N. (2007). Comparative study of seven fluorescent *Pseudomonas* clinical isolates. *Revue canadienne de microbiologie* 54 : 19- 27.

- Gutterson, N., Ziegle, J.S., Warren, G.J. and Layton, T.L., (1988). Genetic determinants for catabolite induction of antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* HV37a. *J. Bacteriol.* 170: 380-385.
- Haas, D., and C. Keel. (2003). Regulation of antibiotic production in rootcolonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathology* 41:117-153.
- Haas, D., et G. Defago.(2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *pseudomonads*. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 307-319
- Hammer, P.E., Hill, D.S., Lam, S.T., Van Pee, K.H. and Ligon, J.M.,( 1997). Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2147-2154.
- Hassan, H. M. et Fridovich, I. (1980). Mechanism of the antibiotic action pyocyanine. *J Bacteriol* 141, 156-163.
- Henerici A., T., (1932).studies of freshwater bacteria i. a direct microscopic technique, *Journal of bacteriology*, 25
- Hogan, D.A. et Kolter, R.(2002).*Pseudomonas-Candida* interactions: An Ecological Role for Virulence Factors. *Science* 296,2229-2232.
- Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., Song, Z. J., Moser, C., Jensen, P. and Bjarnsholt, T. (2011).The clinical impact of bacterial biofilms\*, *International Journal of Oral Sciences*, Vol. 3 No. 2, pp. 55-65
- Holt, J.G., Kreig, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (1994). *Bergy's*

- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A. and Métraux, J.P. (2003). Induced systemecresistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonasfluorescens*CHA0. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, No.10. 851-858.
- Inbar, J. and Chet, I., (1991). Evidence that chitinase produced by *Aeromonascaviaeis* involved in the biological control of soil borne plant pathogens by this bacterium. *Soil Biol. Biochem.* 23: 973-978.
- Jacobsen,S.M., Stickler,D.J.Mobley,M.L. Et shitoliff,M.E.(2008).Complicated Catheterassocited urinary tract infectious due to Echerichia coli and Proteus mirabilis.*ClinMicrobiol Rev* 21,26-59.
- Jain, A., Marsili, E. and Bhosle, N. B. (2011).The Biofilm Returns: Microbial Life at the
- Jensen, P.R. & Fenical, W. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (1996) 17: 346. Doi: 10.1007/BF01574765
- Johnson, J. L. et N. J. Palleroni. (1989). Deoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species, *International Journal of Systematic Bacteriology* 39:230-235.
- Joshi, P., Wadhvani, T., Bahaley, P. and Kothari, V. (2010). Microbial Chit-Chat: Quorum Sensing•, *The IUP Journal of Life Sciences.* Vol. 4 No. 1, pp. 59-72
- Kaplan, J. B. (2010).Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res*89, 205-218.
- Katz, E. and Demain, A. L., (1977). The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacteriol. Rev.* 40: 449–474.
- Kempf, B., et E. Bremer.(1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* 170: 319-330.
- Kerr, J. R. (1994). Suppression of fungal growth exhibited by pseudomonas *aeruginosa*.*J ClinMicrobiol* 32,525-527.*Microbiol.* 6 (12) : 484-488.mortality, and contribution to total hospital deaths. *Arch Intern Med* 155:1177-1184.negative staphylococci. *Lancet Infect Dis.*2:677-85.
- Kerr, J. R., Taylor, G. W., Rutman, A., Hoiby, N., Cole, P. J et Wilson, R. (1999).*pseudomonas aeruginos*apycocyanin and 1-hydroxphenazine inhibit fungal growth. *J ClinPathol* 52,385-387.
- Kim, M. S., Y. C., Kim, and Cho, B. H. (2004). Gene expression analysis in cucumberleaves primed by root colonization with *Pseudomonas chlororaphis*O6

upon challenge inoculation with *Corynesporacassiicola*. *Plant Biol.* Mar-Apr;6(2),105-108.

- Kirner, S., Hammer, P.E., Hill, D.S., Altmann, A., Fischer, I., Weislo, L.J., Lanahan, M., van Pée, K.H. and Ligon, J.M., (1998). Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 180(7): 1939-1943
- Kleinkauf, H. and von Dohren, H., (1996). A non ribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 236:335-351.
- Krieg, N.R., Holt, J.G., (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. I, 9th Edition. The Williams & Wilkins Co., Baltimore
- Lim, H.S., Kim, Y.S. and Kim, S.D., (1991). *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation and Antifungal Mechanism against *Fusarium solani*, an Agent of Plant Root Rot. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(2): 510-516
- Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B. and Kubicek, C.P., (1996). Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.* 178: 6382-6385.
- Macleod, R.A. Question of existence of specific marine bacteria. *Bacteriol. Rev.* (1965), 29, 9-23
- Macleod, R.A. Question of existence of specific marine bacteria. *Bacteriol. Rev.* (1965), 29, 9-23
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M. W., Rahme, L. G. & Ausubel, F. M. (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96, 47-56.
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M. W., Rahme, L. G. & Ausubel, F. M. (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96, 47-56.
- Martin, C. (2007). Bacilles à Gram négatif non fermentaires. In : Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R. *Bactériologie médicale: Techniques usuelles*. Ed Elsevier Masson. Paris. P : 330-343.
- Martin, F. N. and Loper, J. E., (1999). Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: Ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18:111-181.
- Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Mettraux, J.P. and Défago, G., (1994). Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing

*Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathol.* 84: 139–146.

- Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C., Haas, D. and Défago, G., (1992). Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. *Phytopathol.* 82(2): 190–195.
- Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G. Et Thomashow, L. S. (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1 carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 183, 6454-6465.
- Mazzola, M., Cook, R. J., Thomashow, L. S., Weller, D. M. Et Pierson, L. S. 3rd. (1992). Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent *pseudomonads* in soil habitats. *Appl Environ Microbiol* 58, 2616-2624
- McSpadden Gardener, B.B. and Fravel, D.R., (2002). Biological control of plant pathogens: Research, commercialization, and application in the USA. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2002-0510-01-RV.
- Mena, K.D., and Gerba, C.P., (2009). Risk Assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in Water, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 201, 71-115.
- Mendes B, Nascimento MJ, Oliveira JS. Preliminary characterization and proposal of microbiological quality standard of sand beaches. *Water Science and Technology.* (1993); 27:453–456.
- Mendes B, Urbano P, Alves C, Lapa N, Morais J, Nascimento J, Oliveira J. Sanitary quality of sands from beaches of Azores islands. *Water Science and Technology.* (1997); 35:147–150.
- Meyer, J. M. (2000). Pyoverdins: pigments siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of Microbiology* 174:135-142.
- Milner, J.L., L. Silo-Suh, J.C. Lee, H. He, J. Clardy, et J. Handelsman. (1996). Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3061-3065
- Miyada, C.G., Lory, S., (2003). Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *PNAS*, 100 (14) 8484–8489.

- Mohammed R, Echeverry A, Stinson C, et al. Survival trends of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Clostridium perfringens* in a sandy South Florida beach. *Marine Pollution Bulletin*. (2012; 64:1201). PubMed: 22516512
- Nakayama, T., Y. Homma, Y. Hashidoko, J. Mizutani, et S. Tahara. (1999). Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4334-4339.
- Nielsen, M.N., Sørensen, J., Fels, J. and Pedersen, H.C., (1998). Secondary metabolite- and endochitinase-dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3563–3569.
- Nielsen, T.H., Christophersen, C., Anthoni, U. and Sorensen, J., (1999). Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *J. Appl. Microbiol.* 87: 80-90.
- Nielsen, T.H., Thrane, C., Christophersen, C., Anthoni, U. and Sorensen, J., (2000). Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin - a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *J. Appl. Microbiol.* 89: 992-1001.
- Nowak-Thompson, B., Chaney, N., Wing, J. S., Gould, S. J. and Loper, J. E., (1999). Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* 181: 2166–2174.
- Nowak-Thompson, B., Gould, S.J. and Loper, J.E., (1997). Identification and sequence analysis of the genes encoding a polyketide synthase required for pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Gene*, 204:17–24 of persistent infections. *Science* 284. 1318-1322. *Physiol* 51: 187-224. Their possible roles in virulence. *FEMS Microbiol Lett.* 118 (3): 199-205.
- Ordentlich, A., Elad, Y. and Chet, L., (1988). The Role of Chitinase of *Serratia marcescens* in Biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathol.* 78: 84-88.
- Otto M (2008). Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 322: 207- 228.
- Palleroni, N.J. (1984). Genus I. *Pseudomonas* Migula 237 AL (n. m. cons. opin. 5

- Peix, A., RamírezBahena, M.H., and Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evolution*, 9: 1132–1147.
- Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J.M., Ramírez Bahena, M.H., Mateos, P.F., Santa Regina, I., Rodríguez Barrueco, C., Martínez Molina, E. and Velazquez, E. (2007). Reclassification of *Pseudomonas aurantiaca* into *Pseudomonas chlororaphis* and proposal of three subspecies, *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp. nov., *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov. and *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiacas* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1286–1290.
- Peters, G. L. (1982). Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis* , 146: 479-482.
- Picard, C., Di Cello, F., Ventura, M., Fani, R. and Guckert, A., (2000). Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 948–955
- Pittet D, Wenzel R.P. (1995). Nosocomial bloodstream infections. Secular trends in rates,
- Prabhakaran Priyaja<sup>1</sup>, Puthumana Jayesh<sup>1</sup>, Neil Scolastin Correya<sup>2</sup>, Balachandran Sreelakshmi<sup>1</sup>, Naduthalmuriparambil SSudheer<sup>1</sup>, Rosamma Philip<sup>2</sup>, Isaac Sarogeni Bright Singh<sup>1</sup> (2014). Antagonistic effect of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from various ecological niches on *Vibrio* species pathogenic to crustaceans. *Journal of Coastal Life Medicine* 2(1): 76-84.
- Proctor, RA.; Kahl, B.; von Eiff, C.; Vaudaux, PE.; Lew, DP. Et Peters, G. (1998). Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clin Infect Dis*, Vol.27 Suppl 1, pp. S68-74, ISSN: 1058-4838
- Sawada H., Kanaya S., Tsuda M., Suzuki F., Azegami K., Saitou N. (2002). A phylogenomic study of the OCTase genes in *Pseudomonas syringae* pathovars: the horizontal transfer of the argK-tox cluster and the evolutionary history of OCTase genes on their genomes. *J Mol Evol* 54: 437-457.
- Schroth, M.N. and Hancock, J.G., (1981). Selected topics in biological control. *Annu. Rev. Microbiol.* 35:453-476.
- Silby, M., Cerdano-Tarraga, A., Vernikos, G., Giddens, S., Jackson, R., Preston, G., Zhang, X., Moon, C., Gehrig, S., Godfrey, S., et al. (2009). Genomic and genetic

analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biol.* 10:R51.

- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A.C., Levy, S.B., Jackson, R.W., (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable, *FEMS Microbiol Rev.*, 35, 652–680.
- Stallwood B., Shears J., Williams P.A., Hughes K.A. (2005). Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with a *Pseudomonas* sp. from maritime Antarctica. *J Appl Microbiol* 99: 794-802.
- Talaro, Kathleen, Park (2008). *Foundation in Microbiology: Basic Principles*, McGrawHill, New York
- Talon D., Thouverez M., Bertrand X. (2006). Role des *Pseudomonas* et apparentés dans les infections nosocomiales. XVIIe Congrès national de la SFHH. 22-24.
- Tattevin P, Cremieux A.C, Pottier P, Hutten D, Carbon C. (1999). Prosthetic joint infection: when can prosthesis salvage be considered? *Clin Infect Dis* 29:292-295.
- Tenke, P., Kovacs, B., Jackel, M. ET Nagy, E. (2006). The role of biofilm infection in urology. *World J Urol* 24, 13-20
- Thane, C., Nielsen, T. H., Neidam, M., Sørensen, J. and Olsson, S., (2000). Viscosinamid-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33: 139–146.
- Trautner B., W., Darouiche R., O., (2009). Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection, *Am J Infect Control*, 32 (3), 177–183.
- Trautner, B.W. Et Darouiche, R.O. (2004). Catheter-associated infection pathogenesis affects prevention. *Arch Intern Med* 164-842-850
- Tripathy S, Kumar N, Mohanty S, Samanta M, Mandal RN and Maiti NK. (2006). Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from freshwater culture systems. *Microbiol. Res.* 162:391-396.
- Voguu, L., Schlag, S., Biswas, R., Rosenstein, R., Rausch, C. et Gotz, F. (2006). Microevolution of Cytochrome bd Oxidase in Staphylococci and Its Implication in Resistance to Respiratory Toxins Released by *pseudomonas*. *J Bacteriol* 188, 8079-8086.
- Von Eiff C, Peters G, Heilmann C. (2002). Pathogenesis of infections due to coagulase

- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J. and Ivanova, E. P. (2009). Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation, *Molecules*, Vol. 14 No. 7, pp. 2535-2554.
- Wai, S.N.; Mizunoe, Y.; Yoshida, S. How *Vibrio cholerae* survive during starvation. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999, 180, 123–131.
- Walsh U.F., Morrissey J.P., and O'Gara F. (2001). *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens : from functional genomics to commercial exploitation. *Curr Opin Biotechnol* 12: 289-295.
- Wang, Y., Wilks, J. C., Danhorn, T., Ramos, I., Croal, L. Et Newman, D. K. (2011). Phenazine-1- carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition. *J Bacteriol* 193, 3606-3617
- Whipps, J. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp Bot.* 52: 487-511
- Williams and Wilkins, Baltimore. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. & Holt, J.G. (eds., 1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed., vol. 2 .
- Wilson, M. (1997). Biocontrol of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: Current approaches and future prospects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19:188-191.
- Wilson, R., Sykes, D. A., Watson, D., Rutman, A., Taylor, G. W. Et Cole, P. J. (1988). Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium. *Infect Immun* 56, 2515-7.
- Wylie JL, Deborah L, Nowicki L (2005). Molecular epidemiology of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Manitoba, Canada. *J Clin Microbiol* 2005;43:2830-2836
- Yannick D.N., Skander T., Mario Jacques H. (2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can. J. Veterinary. Res.* 78:110-116.
- Zhang ww, Liang wk, Li ch (2016). Inhibition of marine vibrio sp. by pyoverdine from *Pseudomonas aeruginosa* pa1. *J Hazard Mater* 302:217–224
- ZOBELL CE (1943). The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bacteriol.*, 46, 39-56.

# Annexe

**King B solide :**

Peptone de caséine (Tryptone).....	20 g
Sulfate de magnésium .....	1.5 g
Phosphate bipotassique .....	1.5 g
Glycérol .....	10 ml
Agar .....	20g
Eau distillé .....	1000 ml
PH .....	7.2

**King A solide :**

Peptone de caséine (Tryptone).....	20 g
Sulfate de potassium .....	10 g
Chlorure de magnésium .....	1.4 g
Glycérol .....	10 ml
Agar .....	20 g
Eau distillé .....	1000 ml
PH .....	7.2

**King B liquide :**

Peptone de caséine (Tryptone).....	20 g
Sulfate de magnésium .....	1.5 g
Phosphate bipotassique .....	1.5 g
Glycérol .....	10 ml
Eau distillé .....	1000 ml
PH .....	7.2

**Chapman :**

Extrait de viande de bœuf.....	1g
Peptones .....	10g
Manntiol.....	10g
Chlorure de sodium.....	75g
Rouge de phenol.....	0.025g
Agar.....	15g
Ph.....	7.4g

**Mueller Hinton solide**

Peptone de caséine (Tryptone) .....	17,5 g
Extrait de viande .....	2g

Amidon .....	1, 5g
Agar .....	18g
Eau distillé .....	1000 ml
PH .....	7,3

**Bouillon nutritif**

Peptone .....	6 g
Extrait de viande .....	1g
Extrait de levure.....	2g
NaCl.....	5g
Eau distillé .....	1000 ml
pH .....	7,2

**Coloration de Gram :**

On prépare une goutte de suspension bactérienne avec l'eau distillée sur une lame ; et on réalise un frottis ou un étalement.

On fixe la préparation a flamme, on sèche soigneusement puis on laisse refroidir la lame.

On procède à la coloration avec le violet de gentiane (1min), puis on rince avec l'eau distillée.

On recouvre la lame au Lugol (1min).

On décolore jusqu'à disparition de la couleur violet par l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée .Ensuite on rince avec de l'eau distillée.

On recouvre la lame par fuchine pendant une minute, on rince avec de l'eau distillée.

On sèche la lame l'air et on l'observe à l'objective x100, en immersion avec de l'huile.