

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi-Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée



Mémoire de MASTER

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Option : Microbiologie Appliquée à la Santé et l'environnement

Thème

Potentiel enzymatique et antimicrobien des bactéries des genres *Bacillus* et *Pseudomonas*

Présenté par :

Farah chaima

Nadji Feryel

Daghboudj Imene

Date de soutenance : 28 / 06 / 2020

DEVANT LE JURY

BOUKOUCHA Mourad	MCA Université de Tébessa	Président
BENHADJ Mabrouka	MCB Université de Tébessa	Examinatrice
MENASRIA Taha	MCB Université de Tébessa	Encadreur

Année universitaire : 2019 / 2020

Remerciement

En premier lieu et avant tout, nous remercions grand Dieu le tout puissant qui nous a éclairé notre chemin, et nous a donné le courage, la force, la patience.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, université Laarbi Tébessi – Tébessa.

Nous voulons adresser tous nos remerciements aux personnes avec lesquelles nous avons pu échanger et qui nous aidons pour la rédaction de ce mémoire.

*On remercie, en premier lieu, notre encadreur **Monsieur Menasseria Taha** qui a bien dirigé ce travail, avec ses conseils, sa compétence et sa gentillesse qui nous a permis de bien améliorer ce travail.*

*On remercie également les membres du jury : **Mme Benhadj M et Mr Boukoucha M** Pour l'honneur qu'il nous a accordé en présidant le jury.*

Nos vifs remerciements vont à tous les enseignants du département de Biologie, particulièrement à ceux ayant contribué à notre formation, ainsi qu'aux techniciens et Ingénieurs des laboratoires.

Enfin, nous remercions tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à la réalisation de ce modeste travail.

Deghboudj Imen, Farah chaima et Nadji Feyyel

Dédicaces

Nous dédions cette thèse a...

Nos **parents** ; nos **sources de courage** et de réussite, qui nous ont donné l'amour et le soutien moral dont nous avons besoin pour surmonter les obstacles et l'épreuve de la vie ... la réalisation de ce travail est le témoignage sincère de nos gratitude ainsi que le fruit de leurs efforts. À nos **frères** ; qui nous ont soutenu dans les moments les plus difficile.

À nos chers amis et à toutes les personnes qui ayant contribué à la réalisation de ce modeste travail et à tous ce qui nous sont chers.

Résumé

Les efforts en matière de protection de l'environnement et l'être humain n'ont cessé de s'intensifier depuis la fin du XXème siècle, notamment, en vue de l'obtention de nouvelles molécules actives d'origine biologique. C'est le cas des enzymes et de biomolécules antimicrobiennes qui sont très utilisés dans un grand nombre d'applications industrielles et médicales. La recherche de métabolites actifs d'origine microbienne, est une importante voie alternative à explorer afin de découvrir de nouvelles molécules efficaces à moindre effets secondaires. Parmi les différents molécules recensés, on trouve aujourd'hui des les antibiotiques et les enzymes. Ces derniers, communément synthétisés par les microorganismes, plus particulièrement, ceux du genre *Bacillus* et *Pseudomonas*, sont les plus prometteurs, en raison de leurs excellentes propriétés inter-faciales et leurs activités biologiques. Compte tenu de leurs potentialités et de leur innocuité, les Métabolites secondaires sont aujourd'hui utilisés dans différents domaines d'application, tels que l'environnement, l'industrie pétrolière, l'agronomie ou encore la cosmétologie et devraient rapidement trouver leur place dans de nouveaux secteurs d'applications, tels que les industries agroalimentaires, pharmaceutiques ou encore le domaine médical. Ce document a pour principal objectif de faire une synthèse sur les connaissances acquises à ce jour sur les deux grands groupes bactériens *Bacillus* et *Pseudomonas* et les métabolites produits en se focalisant sur leurs activités biologiques et leurs applications potentielles.

Mots clés : *Bacillus*, *Pseudomonas*, diversity, enzymes, métabolites secondaires

Abstract

Efforts to protect the environment and human beings have steadily intensified since the end of the 20th century, in particular, with a view to obtaining new active molecules of biological origin. This is the case with antimicrobial enzymes and biomolecules, which are widely used in a large number of industrial and medical applications. The search for active metabolites of microbial origin is an important alternative way to explore in order to discover new effective molecules with fewer side effects. Among the various molecules identified, there are today antibiotics and enzymes. The latter, commonly synthesized by microorganisms, more particularly, those of the genus *Bacillus* and *Pseudomonas*, are the most promising, because of their excellent inter-facial properties and their biological activities. Given their potential and safety, Secondary metabolites are used in different fields of application, such as the environment, the petroleum industry, agronomy or even cosmetology and should quickly find their place in new application sectors, such as industries. agrifood, pharmaceutical or even the medical field. The main objective of this document is to synthesize the knowledge acquired to date on the two major bacterial groups *Bacillus* and *Pseudomonas* and the metabolites produced by focusing on their biological activities and their potential applications.

Keywords: *Bacillus*, *Pseudomonas*, diversity, enzymes, secondary metabolites

ملخص

تنوعت الجهود المبذولة لحماية البيئة والبشر بشكل مطرد منذ نهاية القرن العشرين ، على وجه الخصوص ، بهدف الحصول على جزيئات نشطة جديدة من أصل بيولوجي. هذا هو الحال مع الإنزيمات والجزيئات الحيوية المضادة للجراثيم التي تستخدم على نطاق واسع في عدد كبير من التطبيقات الصناعية والطبية. البحث عن المستقلبات النشطة ذات المنشأ الميكروبي هو طريق بديل مهم لاكتشاف جزيئات فعالة جديدة ذات آثار جانبية أقل. من بين الجزيئات المختلفة التي تم تحديدها ، هناك اليوم المضادات الحيوية والإنزيمات. هذا الأخير ، الذي يتم تصنيعه بشكل شائع بواسطة الكائنات الحية الدقيقة ، وبشكل أكثر تحديداً ، من جنس *Bacillus* و *Pseudomonas*، بسبب خصائصها الممتازة بين الوجه وأنشطتها البيولوجية. نظراً لإمكاناتهم وسلامتهم ، يتم استخدام المستقلبات الثانوية اليوم في مجالات التطبيق المختلفة ، مثل البيئة ، صناعة البترول ، الهندسة الزراعية أو حتى التجميل ، ويجب أن تجد مكانها بسرعة في قطاعات التطبيق الجديدة ، مثل الصناعات الغذائية والدوائية والطبية. الهدف الرئيسي من هذه الوثيقة هو تجميع المعارف المكتسبة حتى الآن على المجموعتين البكتيريتين الرئيسيتين *Bacillus* و *Pseudomonas* والمستقلبات المنتجة من خلال التركيز على أنشطتها البيولوجية وتطبيقاتها المحتملة.

الكلمات المفتاحية: *Pseudomonas*، *Bacillus* ، التنوع ، الإنزيمات ، المستقلبات الثانوية

Liste des tableaux

Tableau 1: Taxonomie de <i>Pseudomonas</i> sp.....	6
Tableau 2: Principales pathologies causées par <i>Pseudomonas</i> sp. et classées selon le site d'infection.	12
Tableau 3: Structures peptidiques trouvées dans les pyoverdines synthétisées par diverses souches fluorescentes de <i>Pseudomonas</i> . La chaîne peptidique est attachée au chromophore par son extrémité NH ₂ . Les résidus amino-acyle soulignés correspondent aux acides D-aminés. (Ac Acetyl ; <i>aThr</i> , <i>allo</i> -threonine, <i>bv</i> . biovar, <i>c(amino acids)</i> cyclic structure for the amino acids in parentheses, <i>cOHOrn</i> cyclo-hydroxyornithine, <i>Dab</i> acide diaminobutyric, <i>Fo</i> formyl)	34
Tableau 4: Liste des espèces de <i>Bacillus</i> utilisées pour la production d'enzymes.	45

Liste des figures

Figure 1: Relation phylogénétiques entre les différents groupes des protéo-bactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux <i>Pseudomonas</i>	7
Figure 2: Antibiogramme de la souche sauvage de référence <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.....	13
Figure 3: Analyse des liens phylogénétiques des espèces de <i>Bacillus</i>	21
Figure 4: Caractéristiques morphologiques des <i>Bacillus</i> (A : Cellules végétatives, B : Spores)	23
Figure 5: Rangs fonctionnels et environnementaux de <i>Pseudomonas</i>	33
Figure 6: Structure de la pyoverdine (succinyl isoforme) synthétisée par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Le complexe formé avec Fe ³ est représenté (Meyer, 2000).	34
Figure 7: Structure de DAPG.....	35
Figure 8: Phénazine . Phénazines produites par les différentes espèces de <i>Pseudomonas</i> . Avec 2-OHPCA : 2-hydroxyphénazine; PCA : phénazine-1-carboxylique acide; 1-OHPHZ : 1-hydroxyphénazine; PYO : pyocyanine (Price-.....	36
Figure 9: Formule développée de la pyocyanine en milieu acide et en milieu basique.	37
Figure 10: Structure de la Pyrrolnitrine	37
Figure 11: Structure chimiques des orfamides (Orfamides A, 1; B, 2; et C, 3).....	38
Figure 12: Structures Structures des bactériocines de <i>Bacillus</i> , subtiline, subtilosine A,et sublancin	40
Figure 13: Principales familles de lipopeptides	42

Liste d'abréviations

VP : VogesProskauer

EPS : ExoPolySaccharide

LPS : LypoPolysSccharide

TIA : Toxi-Infection Alimentaire

AFLP : Amplified Fragment Lenght Polymorphism

MLST : Multi Locus Sequance Typing

MLEE: Multi locus Enzyme Electrophoresis

PVDS: Pyoverdines

DAPG: DiAcetylPhloroGlucinol

PHZ: PHénaZine

PCA : Phénazine Carboxylique Acide

PYO : Pyocyanine

HCN : Cyanure d'Hydrogène

cLPS : Lipopeptides Cycliques

NRPS : Non Ribosomal Peptide Synthétase

FDA : Food And Drug Administration

Sommaire

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
ملخص	
Abstract	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
Chapitre I :	4
<i>Pseudomonas</i>	4
<i>Biologie et diversité</i>	4
1. <i>Pseudomonas</i> sp.....	6
1.1 Taxonomie.....	6
1.2. Phylogénie et classification génétique	6
1.3. Habitat	8
1.4 Caractères généraux des <i>Pseudomonas</i>	8
1.4.1. Caractères morphologiques	8
1.4.2. Caractères cultureux	9
1.4.3. Caractéristiques métaboliques	9
1.4.4 Caractères génomiques	10
1.5. Pouvoir pathogène.....	11
1.6 Antibiorésistance	12
1.6.1 Résistance naturelle	12
1.6.2 Résistance acquise	13
1.7 Exemples d'espèces de <i>Pseudomonas</i>	13
1.7.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1. 7.2 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	14
1.7.3 <i>Pseudomonas putida</i>	14
1. 7.4 <i>Pseudomonas stutzeri</i>	15
Chapitre II :	16
<i>Bacillus et Bacillaceae</i>	16
2. <i>Bacillus</i> sp.....	17
2.1 Taxonomie.....	17
2.2 Phylogénie des <i>Bacillaceae</i>	20
2.3 Habitat	21
2.4 Caractères généraux des <i>Bacillus</i>	22
2.4.1 Caractères morphologiques :	22
2.4.2 Caractères métaboliques	23
2.5 Pouvoir pathogène.....	23
2.6. Certaines espèces du genre <i>Bacillus</i>	24
2.6.1 <i>Bacillus subtilis</i>	24
2.6.2. <i>Bacillus licheniformis</i>	25
2.6.3. <i>Bacillus cereus</i>	25
2.6.4. <i>Bacillus anthracis</i>	25

1.6.5. <i>Bacillus thuringiensis</i>	26
I.6.6. <i>Bacillus megaterium</i>	26
Chapitre III :.....	28
<i>Potentialités biologiques des Pseudomonas et Bacillus</i>	28
3.1 Activités microbiennes	29
3.2 Activité antagoniste.....	30
Phénomènes de l'antagonisme.....	31
3.3 Les métabolites de <i>Pseudomonas</i>	32
3.3.1. Les siderophores	33
3.3.2 Les antibiotiques.....	35
a. Le 2, 4 diacetylphloroglucinol (DAPG)	35
b. Les phénazines (PHZ)	36
c. Pyrrolnitrine (PRN)	37
d. Cyanure d'hydrogène (HCN)	37
e. Les Orfamides	38
3.4 Les métabolites de <i>Bacillus</i> 3.4.1 Bactériocines	39
3.4.2 Lipopeptides cycliques	41
3.4.3 Enzymes hydrolytiques.....	42
a. Lipases et estérases	43
b. Amylases	43
c. Protéases.....	43
d. Cellulase	44
Conclusion Général.....	46
Référence Bibliographiques	47

INTRODUCTION

Introduction

L'écologie microbienne est une discipline située au carrefour de deux grands champs de recherche : l'écologie et la microbiologie. Elle a pour objectif d'étendre la compréhension des relations entre la biodiversité des microorganismes, l'activité microbienne, et les facteurs écologiques du milieu, de l'échelle individuelle à celle des communautés microbiennes. Il s'agit donc d'une modélisation des écosystèmes (eau, air, sol) où les microorganismes sont des acteurs majeurs du fonctionnement.

Face aux demandes sociétales vis-à-vis des changements globaux, du développement durable, de l'extension industrielle, de la préservation de la santé humaine et animale, et de la biodiversité et ressources naturelles, cette discipline est actuellement en plein essor, se devant d'apporter des réponses aux perturbations anthropiques de l'environnement. Ces dernières années, les études relevant, à des degrés divers, du concept de biodiversité se sont multipliées. Les analyses de diversité microbienne, sensu inventaire des espèces et sous-espèces d'un environnement, se sont notamment considérablement développées. En effet, l'étude des microorganismes habitant les environnements naturels avait longtemps consisté en une approche culturelle puis une caractérisation des isolats purs selon des critères définis par la taxonomie (Alain, 2003).

La vie dépend d'une série bien-orchestrée de réactions chimiques basées sur des catalyseurs que nous appelons maintenant des enzymes, pour accélérer considérablement les taux de ces réactions chimiques. La puissance catalytique des enzymes facilite les processus vitaux dans pratiquement toutes les formes de vie des virus aux humains (Copeland, 2004).

En effet, certains organismes, à l'aide d'enzymes, peuvent dégrader des composés se trouvant dans leur environnement, et ce caractère peut être utilisé par certaines industries dans différents domaines. Les microorganismes sont de remarquables agents de dégradation. En effet, dans leur environnement naturel, ils participent à la biodégradation de la matière organique, même la plus complexe comme la cellulose, la lignine, la chitine, la pectine et le xylan..etc , et ce par production de divers enzymes extracellulaires (Mswaka et Magan , 1998 ; Tuomela et al.,2000 ; Perez et al., 2002).

A l'heure actuelle, seulement quelques 2% environ des microorganismes dans le monde ont été testés comme sources d'enzymes ou de métabolites secondaires et des taux de manipulation génétique ou environnementales sont continuellement menés

avec les souches microbiennes déjà répertoriées et classées GRAS (Generally Reconized As Safe) afin d'augmenter le rendement des cellules ou la qualité des enzymes et de métabolites produites. Cependant, le monde microbien regorge de potentialités catalytique et les travaux de criblage (screening) de nouvelles activités n'en demeure pas moins une alternative valable, et certainement plus accessible, de recherche de nouvelles biomolécules, en particulier au niveau de niches écologiques exotiques et de souches microbiennes non encore explorées.

Considérant l'importance de telle situation, qu'il nous a paru nécessaire d'entreprendre cette analyse bibliographique focalisant sur les groupes bactériens (*Pseudomonas* et *Bacillus*), décrivant leurs caractéristiques phénotypiques et potentialités métaboliques. Cette approche représente l'ossature de la recherche qui traite l'état des connaissances acquises sur les deux classes microbiennes.

Synthèse Bibliographique

Chapitre I

Pseudomonas

Biologie et diversité

1. *Pseudomonas* sp.

Considéré longtemps comme un organisme largement opportuniste, *Pseudomonas* sp. est aujourd'hui clairement reconnu comme un pathogène nosocomial majeur chez les patients immuno-compromis ou affaiblis (Pier et Ramphal, 2005). Cette souche a été isolée pour la première fois en 1882 par Charles Gessard comme agent de surinfection des plaies au cours de la 1^{ère} guerre mondiale (Chaker, 2012). C'est une bactérie redoutable car elle est considérée comme le paradigme des espèces environnementales pathogènes opportunistes de l'homme (Plesiat, 2011).

1.1 Taxonomie

Il s'agit d'une bactérie que l'on répertorie conventionnellement comme mentionné dans le tableau I.

Plusieurs espèces liées à ce genre ont subi de nombreux changements principalement dues à la description de nouvelles espèces. Le nombre des espèces inclus dans ce genre a été changé selon les outils taxonomiques disponibles. Dans la 7^{ème} édition du Bergey Manual de la bactériologie déterminative (1957), 149 espèces ont été décrites, 235 espèces dans la 8^{ème} édition (1974), 82 espèces sont décrites dans trois sections suivant le manuel de systématique de Bergey; et actuellement 213 espèces de *Pseudomonas* sont citées dans la liste des noms des procaryotes selon la nomenclature de Parte (2014), mais seulement 147 espèces sont acceptées dans la taxonomie réelle.

Tableau 1: Taxonomie de *Pseudomonas* sp. (Chaker, 2012)

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

1.2. Phylogénie et classification génétique

Le genre *Pseudomonas* sp. Est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe γ des protéobactéries. La figure 1 représente la relation phylogénétique entre les différents groupes des protéo-bactéries.

Comme tous les procaryotes, les *Pseudomonas* sont représentés par un ADN compacté dans un seul chromosome haploïde circulaire. Ils peuvent avoir de l'ADNextra-

chromosomique sous la forme des plasmides ou transposons. Ce genre comprenant plus de 200 espèces présent dans les diverses niches écologiques. Le génome de plus de soixante-dix souches importantes telles que *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. protegens*, *P. syringae*, *P. canabina*, *P. entomophila*, *P. mendocina* et *P. stutzeri* ont été séquencées et comparées (Paulsen *et al.*, 2005; Kung *et al.*, 2010; Klockgether *et al.*, 2011; Silby *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011).

Les espèces de ce genre ont une grande taille de génome comparativement à *E. coli* et aux espèces apparentées. Le génome de la souche *Pseudomonas fluorescens* Pf5, classé actuellement *Pseudomonas protegens*, est considéré comme le plus grand génome mesurant 7074893 pb avant le séquençage de la souche *Pseudomonas bauzanensis* W13Z2 qui contient un génome de 8,6 Mb avec un rapport en GC de 61.8 % (Wang *et al.*, 2014).

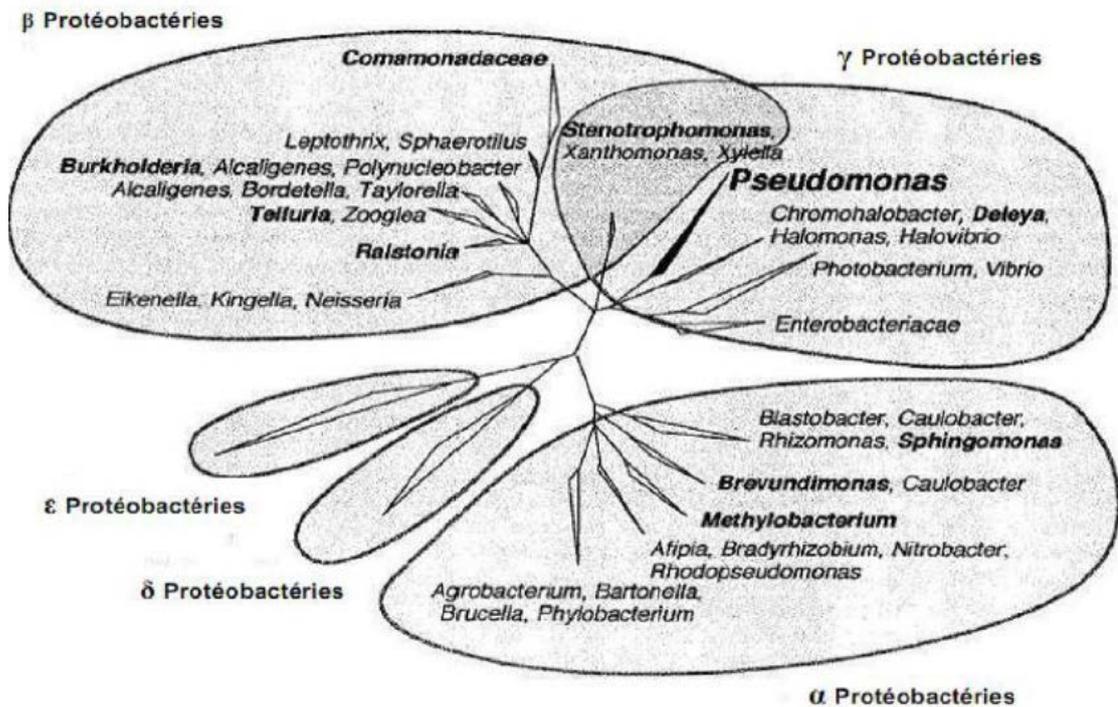


Figure 1: Relation phylogénétique entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (Bossis *et al.*, 2000).

Dans la phylogénie des *Pseudomonas*, deux lignées sont clairement distinctes. La première lignée de *P. fluorescens*, divisé en six groupes, *P. fluorescens* (56 espèces), *P. syringae* (12 espèces), *P. lutea* (3 espèces), *P. putida* (12 espèces), *P. anguilliseptica* (8 espèces), et *P. straminea* (4 espèces). Le groupe de *P. fluorescens* était le plus complexe et comprenait neuf sous-groupes (SG) qui étaient représentés par les espèces *P. fluorescens*, *P. gessardi*, *P. fragi*, *P. mandelii*, *P. jesseni*, *P. koreensis*, *P. corrugata*, *P. chlororaphis* et *P. asplenii*.

La deuxième lignée de *P. aeruginosa*, est divisée en quatre groupes principaux, représentée par les espèces *P. aeruginosa* (15 espèces), *P. oleovorans* (6 espèces), *P. stutzeri* (4 espèces) et *P. oryzihabitans* (2 espèces). La plupart des espèces sont incluses dans des groupes phylogénétiques qui coïncident avec les groupes phénotypiques classiques de *P. fluorescens*, *P. syringae*, *P. putida*, *P. stutzeri* et *P. aeruginosa*, et les caractéristiques de chacun d'entre eux peuvent être étendues probablement à l'ensemble du groupe.

1.3. Habitat

La bactérie *Pseudomonas* sp., est omniprésente dans l'environnement, on la trouve dans de très nombreux milieux : végétaux, poussières, aliments crus (particulièrement les légumes : tomates, carottes, céleris) et même parfois commensale du tube digestif de l'homme (Leclerc, 2002). C'est une bactérie saprophyte d'eau, ubiquitaire de l'environnement humide, son réservoir naturel est le sol, les lacs, les rivières, l'eau polluée, les piscines et les jacuzzis...etc (Floret, 2009). *Pseudomonas* sp. , est un germe aquicole qui se multiplie dans l'eau quel que soit son contenu en matières organiques (Leclerc ,2002) et comme leur multiplication est favorisée par la température, on les trouve aussi dans les eaux chaudes sanitaires, dans les tours de refroidissement, et dans les piscines, les bains bouillonnants, ventilateurs, nébuliseurs, humidificateurs et malheureusement au milieu hospitalier [évier, siphons, vases, antiseptiques (dans les solutions de désinfectants)] incriminé dans les infections nosocomiales (Leclerc, 2002).

1.4 Caractères généraux des *Pseudomonas*

1.4.1. Caractères morphologiques

Pseudomonas sp. Est un bacille fin sous forme de bâtonnet de 1 à 5 μm de longueur et 0,5 à 1 μm de largeur (Chaker, 2012). C'est une bactérie à Gram négatif, non sporulée, strictement aérobie (cytochrome oxydase), généralement non capsulée mais parfois entourée d'une pseudo-capsule, elle est très mobile grâce à la présence de plusieurs flagelles polaires. Elle est mésophile et capable de se développer dans des températures allant de +4°C à +45°C, Mais il faut bien savoir que sa température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C (Clave, 2011).

1.4.2. Caractères cultureux

Pseudomonas sp., sont des aérobies à métabolisme strictement respiratoire, oxydase+ (CLAVE, 2011) (utilisent l'oxygène comme accepteur d'électrons, mais en absence ou en carence de ce dernier, elles utilisent les nitrates (VASIL, 1986), et chimio-organotrophes puisqu'elles peuvent croître dans un milieu minéral ne contenant qu'une seule source de carbone. Elles sont aussi catalase positive (MEZAACHE, 2012). Toutes les espèces de ce genre ne peuvent croître à pH inférieur à 4.5, ni métaboliser le lactose sur Mc Conkey, l'examen au rouge de méthyle et celui de Voges Proskauer (VP) sont négatifs (PALLERONI, 1984).

1.4.3. Caractéristiques métaboliques

Pseudomonas sp., sont caractérisée par un métabolisme oxydatif et non fermentatif (MEZAACHE S, 2012), utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons à l'exception de certaines souches pouvant utiliser le NO₃ comme accepteur d'électrons en anaérobiose. Ces bactéries ont la capacité de dégrader des composés complexes, tels que les protéines et les polysaccharides complexes comme l'amidon, la cellulose (PALLERONI, 1984). Tandis que certaines particularités peuvent exister pour quelques souches chimio-organotrophes facultatifs, qui n'ont pas besoin de facteurs de croissance et peuvent utiliser l'hydrogène comme source d'énergie

Les espèces du genre *Pseudomonas* produisent une couche d'exopolysaccharide entourant leurs cellules, la protègent de la phagocytose par les macrophages chez les mammifères. Cette couche d'exo-polysaccharide (E.P.S) leur permet de former des bio films, grâce auxquels elles peuvent rester collées aux surfaces, de telle manière qu'il est difficile de les déloger (VISCAet al., 2007). Ce genre produit beaucoup de poly hydroxy alcanates et d'alginate ainsi que d'autres substances métaboliques. Ce qui les rend d'un grand intérêt biotechnologique (HOLLOWAY, 1992).

Ces bactéries peuvent se multiplier dans un intervalle de température qui varie de 4 à 42 °C, la limite supérieure de ce dernier est spécifique à l'espèce *P.aeruginosa*, tandis que les saprophytes ont un optimum de croissance situé entre 28 et 30 °C. La plupart des *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* et les espèces saprophytes) possédant une chaîne cytochromique complète comprenant une cytochrome C oxydase ,contrairement au espèces phytopathogènes

dépourvues de cette enzyme. Ces espèces ont la capacité de dégrader des xénobiotiques et certaines composés tel que les protéines et les polysaccharides complexes comme l'amidon et la cellulose dues à la variété fonctionnelle de ces enzymes dégradatives (BOSSIS *et al.*, 2000).

Les *Pseudomonas* sont dépourvues des enzymes de la glycolyse (voie d'Embden-Meyerhof). Le glucose en aérobiose est catabolisé par la voie d'Entner- Doudoroff. Les voies de catabolisme des acides aminés et organiques sont assurées par les cycles de Krebs et du glyoxylate qui jouent un rôle important dans leurs métabolismes. Ces bactéries peuvent aussi tirer leurs énergies en anaérobiose par hydrolyse de l'arginine. Ce dernier est un acide aminé polaire chargé positivement, requit pour la constitution de la polyamine (induisant la résistance au peptide cationique, l'aminoglycoside, et les antibiotiques de quinolone) et produisent de l'ATP dans des conditions déplétions en énergie.

1.4.4 Caractères génomiques

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

Ce génome contient un nombre important de gènes régulateurs impliqués dans le métabolisme, le transport, l'efflux de composés organiques et différents systèmes de sécrétion et de mobilité, (STOVER *et al.*,2000) mais il contient aussi une quantité très élevée de gènes codant pour des facteurs de virulence et des mécanismes de régulation, ce qui lui confère une grande capacité à s'adapter à divers environnements et la capacité d'infecter différents hôtes (FAILLE, 2010).

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

1.5. Pouvoir pathogène

Pseudomonas sp., sont des bactérie opportuniste qui provoquent rarement des infections chez les sujets en bonne santé. Il s'agit alors :

- D'infestations massives par exemple chez les nageurs de piscines contaminées.
- Ou d'inoculations traumatiques directes dans un tissu ou une cavité (méningites ou ostéomyélite d'inoculation).

En fait, il est de règle que les infections à pyocyanique surviennent chez les malades fragilisés en milieu hospitalier. L'antibiothérapie favorise l'implantation des bactéries sur la peau ou les muqueuses de ces malades. Le concept d'immunodépression inclut l'état consécutif aux stress, à des traumatismes divers (brûlures, fractures, interventions chirurgicales, injections intraveineuses d'héroïne, manoeuvres instrumentales), a des chimiothérapies neutro-péniantes utilisées par le traitement des cancers ou des leucémies mais aussi les tares (diabète, mucoviscidose...) la malnutrition, l'âge (prématurité) ou le délabrement physiologique (vieillesse) (SOULEY, 2002). Les principales pathologies causées par *Pseudomonassp.*, sont résumées dans le Tableau 2

Tableau 2: Principales pathologies causées par *Pseudomonas sp.* et classées selon le site d'infection (MESAROS, 2007).

Site d'infection	Pathologie spécifique	Fréquence (dans une population à risque)
Tractus respiratoire	Pneumonie aiguë Infections chroniques de l'arbre bronchique	Fréquent (hôpital, soins intensifs) Mucoviscidose
Sang	Bactériémie et septicémie	Fréquent
Tractus urinaire	Infections aiguës Infection chroniques	Relativement fréquent (complication suite à la présence de corps étrangers)
Oreille	Otite externe ("oreille du nageur") Otite externe maligne Otite moyenne chronique suppurative	Fréquent
Peau et tissus mous	Dermatite Infections de plaies Ecthyma gangrenosa pyodermite Folliculiteacnevulgaris résistant	Relativement fréquent (Traumatismes) Relativement fréquent (Traumatismes)
OEil	Kératite (ulcère cornéen) Enophtalmie Ophtalmie néonatale	Rare (traumatisme)
Système nerveux central	Méningite Abées cérébral	Rare (secondaire à une neurochirurgie ou à un traumatisme)
Tractus gastrointestinal	Entérocolite nécrosante Infections périrectales	Rare
Os et articulations	Pyoarthrose sténo-articulaire Ostéomyélite vertébrale Infection de la symphyse pubienne Ostéochondrite du pied Ostéomyélite	Rare

1.6 Antibiorésistance

La résistance bactérienne à un antibiotique est définie comme la capacité d'une bactérie à survivre à une concentration bien déterminée de cette molécule. En pratique, cette résistance se traduit de différentes façons. Pour le clinicien, c'est la présence d'échec clinique d'antibiothérapie après un traitement adapté, Pour le biologiste, c'est l'acquisition par une bactérie de mécanismes lui permettant de résister à la concentration minimale inhibitrice déterminée pour des souches sensibles (WEISS, 2002).

1.6.1 Résistance naturelle

Pseudomonas sp., possèdent une résistance naturelle à un grand nombre d'antibiotiques en raison de la production d'une bêta-lactamase chromosomique inductible de classe C qui n'est pas inhibé par le clavulanate, et une mauvaise perméabilité membranaire. *Pseudomonas sp.*, sont donc naturellement résistants aux pénicillines des groupes V G M et A, à la plupart des céphalosporines de troisième génération . *Pseudomonas sp* sont aussi résistants à la kanamycine (POOLE, 2004).

1.6.2 Résistance acquise

A côté de la résistance naturelle, il existe aussi la résistance acquise. Cette résistance ne concerne que quelques ou de nombreuses souches d'une espèce donnée. Ces souches dérivent de bactéries initialement sensibles (phénotype résistance). Elle résulte de changements dans le génome bactérien par une mutation comme l'acquisition des informations génétiques étrangères (MULVEY et SIMOR, 2009).



Figure 2 : Antibiogramme de la souche sauvage de référence *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (MESAROS et al., 2007).

1.7 Exemples d'espèces de *Pseudomonas*

1.7.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est largement répandu dans l'environnement. C'est une bactérie ubiquitaire qui peut vivre à l'état saprophyte dans les eaux douces et marines, le sol, les végétaux, les solutions antiseptiques et sur des surface inorganiques. La présence de cette bactérie dans les différentes niches écologiques est due à la capacité de respirer en aérobose et en anaérobose. Elle est très fréquente en milieu hospitalier où elle est impliquée dans de nombreuses infections nosocomiales. Elle est capable de sécréter certains produits toxiques vis-à-vis les nématodes, les insectes et quelques bactéries pathogènes (Rahme *et al.*, 2000 ; Miyata *et al.*, 2003 ; Gellatly et Hancock, 2013).

Le développement de *Pseudomonas aeruginosa* en anaérobose est dû à l'utilisation des nitrates ou des nitrites comme accepteurs finaux d'électrons. La transformation des nitrates en

azote est catalysé en quatre étapes par les enzymes suivants : le nitrate réductase membranaire (NAR), le cytochrome cd1 nitrite réductase (NIR) périplasmique, le cytochrome c oxyde nitrique réductase (NOR), le cytochrome c oxyde nitreux réductase (N₂OR) périplasmique.

Les gènes qui codent pour ces quatre réductases sont aussi exprimés en conditions micro-aérophiles (Alvarez-Ortega et Harwood, 2007). Cette bactérie est capable de se déplacer de manière isolée grâce à son flagelle. Elle se trouve souvent sous forme planctonique ou adhérer à une surface dont elle est enrobée dans une matrice d'exopolysaccharides (EPS) à l'état de biofilm. La formation de ce dernier dépend du quorum sensing et d'autres facteurs environnementaux.

1.7.2 *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens est une bactérie commensal, apparaît singulière ou sous forme de paires mobiles grâce aux flagelles amphitriches. Cette bactérie est très répandue dans la rhizosphère, la phyllosphère et exerce une activité antagoniste efficace. Cette dernière joue un rôle important dans le biocontrôle et la promotion de la croissance des plantes par la suppression des maladies causés par les bactéries et les champignons phytopathogènes (Mavrodi *et al.*, 2006; Pierson et Pierson, 2010).

Elle produit plusieurs métabolites tels que la pyoverdine, polyketides 2,4 diacetylphloroglucinol, pyoluteorin et la rhizoxin; les dérivés chlorés de tryptophane, pyrrolnitrine et le cyanure d'hydrogène formé par oxydation de glycine (Howell et Stipanovic 1980; Nowak-Thompson *et al.*, 1994; Weller, 2007). Une étude génomique sur 10 souches de *Pseudomonas fluorescens* a montré la présence des gènes codant pour des bactériocines diverses comprenant les pyocines S1/2/3/AP41, S5, les colicines M-like et les lectin-like Llp (Parret et De Mot, 2002; Barreteau *et al.*, 2009).

1.7.3 *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida est une autre espèce parmi les espèces importantes des *Pseudomonas*, qui se trouve dans les différentes niches écologiques telles que le sol, l'eau et particulièrement dans les zones contaminées par les polluants chimiques et organiques. Elle a un type trophique varié et joue un rôle important dans le recyclage des déchets organiques en aérobiose et en conditions micro-aérophiles.

Cette bactérie peut utiliser plus de 80 composés organiques comme sources de carbone et d'énergie (Timmis, 2002). Plusieurs outils génétiques basés sur les mini-transposons ont été

développés afin d'analyser et manipuler cette espèce pour des applications biotechnologiques telles que la production du bioplastique (de Lorenzo et Timmis, 1994). La souche *Pseudomonas putida* a été exploitée pour le développement des applications commerciales et la conception des nouvelles voies cataboliques, la production des vaccins, production des intermédiaires de biosynthèses et la production des biopesticides (Galan *et al.*, 2000; Espinosa-Urgel *et al.*, 2002).

1. 7.4 *Pseudomonas stutzeri*

Pseudomonas stutzeri est définie comme une bactérie de sol avec une importance remarquable dans la biodégradation ainsi qu'en biorémediation. Cette espèce est saprophyte et non fluorescente à cause de l'absence de production des pigments fluorescents, ce qui permet de différencier cette souche des *Pseudomonas* fluorescents. Cette bactérie exhibe des fonctions métaboliques étendues et elle est capable d'utiliser plusieurs sucres et acides aminés, l'acétate et le pyruvate comme sources de carbone et d'énergie. Elle peut coloniser les racines des plantes en raison de la capacité de quelques souches à fixer l'azote (Silby *et al.*, 2011). Beaucoup de souches de cette espèce ont été isolées à partir des cas cliniques (Scotta *et al.*, 2013).

Chapitre II

Bacillus et Bacillaceae

2. *Bacillus* sp.

Le genre *Bacillus* renferme des germes telluriques aérobies stricts ou aéro-anaérobies, sporogènes, se présentant sous forme de bâtonnets à Gram positif généralement mobiles. En dehors de *Bacillus anthracis*, les *Bacillus* sont habituellement considérés comme des germes de l'environnement et leur rôle en pathologie humaine est souvent négligé. En réalité, il est actuellement bien établi que certaines espèces du genre *Bacillus* peuvent être responsables chez l'homme de toxico-infections alimentaires ou, plus rarement, d'infections opportunistes. *Bacillus cereus* est le principal germe incriminé, mais d'autres espèces comme *Bacillus licheniformis* ou *Bacillus subtilis* peuvent également être mises en cause (Gaillard, 1989).

2.1 Taxonomie

Les bactéries qui produisent des endospores résistantes à la chaleur sont classées en plusieurs genres de la famille *Bacillaceae*. À l'exception des bactéries anaérobies, formant des endospores, le genre *Bacillus* est le plus grand et le plus connu membre de cette famille, qui inclut également les *Sporosarcina* et les *Sporolactobacillus* (Berkeley et Goodfellow., 1981). La morphologie des spores a été traditionnellement un principal facteur dans leurs classifications et identification.

L'intérêt des secteurs médical, industriel et agronomique face aux *Bacillaceae* a vite révélé un énorme besoin de classification pour distinguer et identifier les différentes espèces. Dans un premier temps, les *Bacillaceae* ont été classifiés en utilisant des approches phénétiques telles que les caractères morphologiques, physiologiques (composition des cellules), biochimiques (test API) et nutritionnels (Gordon *et al.*, 1973, Logan et Berkeley 1984). Puis, dans un deuxième temps, d'autres approches moléculaires basées sur l'hybridation ADN-ADN (Priest *et al.*, 1981) et la composition d'ADN, (Fahmy *et al.*, 1985) ont aussi été utilisées, puis la classification s'est orienté sur les séquences du gène 16S (Ash *et al.*, 1991 ; Acinas *et al.*, 2004). L'insuffisance de la classification surtout du genre *Bacillus* a été soulignée par des études moléculaires. La large gamme de la composition de base de l'ADN chromosomique indique la diversité génétique (Priest., 1981 ; Fahmy *et al.*, 1985).

Le genre *Bacillus* est extrêmement hétérogène tant sur le plan génétique (le pourcentage GC) que phénotypique (type respiratoire, métabolisme des sucres, composition de la paroi...). L'étude des ARNr 16S et 23S confirme cette hétérogénéité

et montre que le genre *Bacillus* doit être scindé en plusieurs genres. Ainsi, en 1991, l'analyse des séquences des ARNr 16S de 51 espèces permettait à Ash et *al.*, (1991) de caractériser cinq groupes phylogénétiques. La réorganisation de ce genre a été initiée en 1992 par la création du genre *Alicyclobacillus* rassemblant 3 espèces acidophiles et thermophiles (Wisotzkey et *al.*, 1992). Plusieurs genres qui rassemblent au moins une espèce initialement incluse dans le genre *Bacillus* ont été proposés et validement publiés.

La classification du genre *Bacillus* selon **Bergey's Manual of systematic Bacteriology (2^{ème} ed 2004)** est :

- **Règne :** *Bacteria*
- **Embranchement :** *Firmicutes*
- **Classe :** *Bacilli*
- **Ordre :** *Bacillales*
- **Famille :** *Bacillaceae*
- **Genre :** *Bacillus*

L'ancienne taxonomie des bacilles était très confuse, ce qui donne la nomenclature de plus de 150 espèces, souvent décrite selon des caractéristiques physiologiques ou écologiques simples. Dans une étude comparative de plus de 1000 souches, Smith et *al.*, (1952) ont utilisé la forme, la taille et l'emplacement des spores comme un moyen de différencier les groupes dans le genre et de réduire le nombre d'espèces à 19. Ces divisions morphologiques sont restées en usage général (Hobbs et Cross., 1983). Traditionnellement, les espèces du genre *Bacillus* sont réparties en 3 groupes selon la morphologie de la spore et du sporange (Gordon et *al.*, 1973) :

Le groupe I est constitué des bacilles à Gram positif, présentant une spore centrale ou, sphérique ou ovoïde, ne déformant pas la cellule. Ce groupe est divisé en 2 sous-groupes : le groupe IA constitué des bacilles d'un diamètre supérieur à 1 µm et contenant des inclusions de poly-bêta-hydroxybutyrate (*Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoïdes*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*) ; et le groupe IB rassemblant des bacilles d'un diamètre inférieur à 1 µm et dépourvus d'inclusions de poly-bêta-hydroxybutyrate

(*Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*...).

- Le groupe II est constitué des espèces à Gram variable, présentant une spore ovoïde, centrale ou terminale, déformante (*Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*...).

- Le groupe III est caractérisé par des bacilles à Gram variable et présentant une spore sphérique, déformante, terminale ou sub-terminale (*Bacillus globisporus*, *Bacillus insolitus*...).

Actuellement, le groupe *Bacillus* inclut six espèces génétiquement apparentées et 9 groupes :

- *Bacillus anthracis*, responsable de la maladie du charbon (MOCK et FOUET, 2001).
- *Bacillus thuringiensis*, qui synthétise un cristal parasporal contenant des toxines létales pour les insectes (SCHNEPF et al., 1998).
- *Bacillus mycoides* et *Bacillus pseudomycoïdes* forment des colonies rhizoïdes (NAKAMURA, 1998).
- *Bacillus weihenstephanensis* est une espèce psychrotolérante pouvant se développer à des températures de réfrigération comprises entre 4°C et 7°C (LECHNER, et al., 1998).
- *Bacillus cereus* sensu stricto aussi appelé *Bacillus cereus*, reconnu comme agent causal de toxi-infections alimentaires (TIA) mais aussi responsable dans une moindre mesure d'infections opportunistes locales et systémiques (BOTTONNE, 2010, LOGAN, 2012).

Plusieurs études basées sur différents types d'analyses tels que les profils AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), MLST (Multi Locus Sequence Typing), MLEE (MultiLocus Enzyme Electrophoresis), les séquences des gènes ribosomiaux et la séquence du gène pan C ont montré que ces espèces se répartissent en sept groupes phylogénétiques, chacun se divisant en sous-groupes (GUINEBRETIERE, et al., 2008, TOURASSE, et al., 2011). Le groupe phylogénétique I inclut l'espèce *Bacillus pseudomycoïdes*. Les groupes II, III, IV, V contiennent les espèces *Bacillus cereus* et *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus anthracis* est quant à lui présent uniquement dans le groupe III. *Bacillus weihenstephanensis* et *Bacillus pseudomycoïdes* appartiennent au

groupe VI. Le groupe VII contient une espèce nouvellement décrite : *Bacillus cytotoxicus* (GUINEBRETIERE, et al., 2012).

2.2 Phylogénie des *Bacillaceae*

L'intérêt des secteurs médical, industriel et agronomique face aux *Bacillaceae* a vite révélé un énorme besoin de classification pour distinguer et identifier les différentes espèces. Dans un premier temps, les *Bacillaceae* ont été classifiés en utilisant des approches phénétiques telles que les caractères morphologiques, physiologiques (composition des cellules), biochimiques (test API) et nutritionnels (Berkeley et al., 1984; Gordon et al., 1973; Logan et Berkeley 1984; Smith et al., 1952; Stackebrandt et al., 1987). Puis, dans un deuxième temps, d'autres approches moléculaires basées sur l'hybridation ADN-ADN (Priest et al., 1981) et la composition d'ADN (Fahmy et al., 1985) ont aussi été utilisées.

Cependant, ces classifications basées sur les approches phénétiques ou moléculaires se sont avérées lentes, coûteuses, peu fiables et peu concluantes en raison de la très grande hétérogénéité des espèces à l'intérieur du genre, notamment aux niveaux physiologique et écologique (Claus & Berkeley, 1986; Priest et al., 1988; Turnball et K.ramer, 1991). Pour surmonter ces difficultés, l'intérêt s'est alors orienté vers la classification des *Bacillaceae* en se basant sur les séquences du gène 16S (Ash et al., 1991 b; Rössler et al., 1991). des arbres phylogénétiques des *Bacillaceae* à partir de la séquence d'une seule copie du gène 16S par espèce. Néanmoins, cette approche, n'a pas permis de révéler les hétérogénéités au niveau intra-spécifique. De plus, de récentes études ont montré que les différents allèles intra-spécifiques du gène 16S peuvent présenter un taux élevé de divergence (Clayton et al., 1995)..Il apparaît dès lors important de s'interroger sur la robustesse de la classification actuelle des *Bacillaceae* basée sur la séquence d'un seul allèle du gène 16S. Ne pas prendre en considération la possible hétérogénéité des différents allèles du gène 16S pourrait mener à la construction d'arbres phylogénétiques non fiables (Crosby et Criddle, 2003); différentes allèles pouvant générer différents arbres. Ceci nous amène à se poser la question suivante: quelle allèle faut-il choisir et combien d'allèles sont nécessaires pour élucider, s'il y a lieu, l'hétérogénéité intra-spécifique au sein des *Bacillaceae*. Le présent travail portera sur toutes les allèles de chaque gène formant

L'habitat primaire du genre *Bacillus* est le sol et la rhizosphère particulièrement les systèmes racinaires des plantes. Ils font partie de la flore zymogène du sol et sont retrouvés dans les épiphytes ou les endophytes des plantes, et la rhizosphère de diverses plantes cultivées comprenant le blé, le maïs, le sorgho, la canne à sucre, l'orge, et des arbres forestiers tels que le pin et le sapin. (Holl et Chanway, 1992). De multiples espèces de *Bacillus* et de *Paenibacillus* peuvent être aisément cultivées et en grande partie des sols et de la rhizosphère.

Le taux cultivable de ces bactéries s'étend généralement de \log_3 à \log_6 cellules par gramme de sol rhizosphérique, tandis que le sol compte un taux excédant ceux obtenus à partir de la rhizosphère (Mahaffee et Kloepper, 1997 ; Seldin et al., 1998). Une variété d'espèces peuvent être isolées du sol et de la rhizosphère (Seldin et al., 1998), mais peu de travaux ont été effectués pour indiquer l'espèce la plus isolée. La plupart des espèces sont globalement distribuées et répandues surtout les espèces *B. subtilis* et *B. cereus* reconnues pour leur lutte contre les pathogènes des plantes (Stabb et al., 1994). En effet, *B. subtilis* est isolé à partir de la rhizosphère de nombreuses espèces végétales à une concentration aussi élevée que 107 par gramme de sol (Wipat et Harwood, 1999).

Récemment, les séquences ribosomales amplifiées des échantillons environnementaux sont utilisées pour la caractérisation et la distribution relative des espèces de *Bacillus* et de *Paenibacillus* spp. Entre les sols et les tissus végétaux. De façon générale, la composition des communautés bactériennes est variable selon le type de sol (Garbeva et al., 2003).

Cependant, l'importance d'une telle variation peut être relativement minime pour les espèces de ces deux genres. Les techniques moléculaires utilisées pour étudier la diversité ont montré que la majorité des bactéries Gram-positives de différents types de sol, sont des *Bacillus*. De ce fait ils sont capables de survivre pendant de longues périodes sous des conditions environnementales défavorables (Garbeva et al., 2003).

2.4 Caractères généraux des *Bacillus*

2.4.1 Caractères morphologiques :

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 x 1,2 μm jusqu'à 2,5 x 10 μm), sporulés, à

Gram positif ou à Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que pour les très jeunes cultures). Généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche (*B. anthracis* et mycoïdes sont immobiles et pour les espèces mobiles, la mobilité est variable selon les souches), parfois capsulés (*B. anthracis*, licheniformis, megaterium et subtilis peuvent élaborer une capsule formée d'un polymère d'acide glutamique), aérobies ou aéro-anaérobies, le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase (Holt et al., 1994).

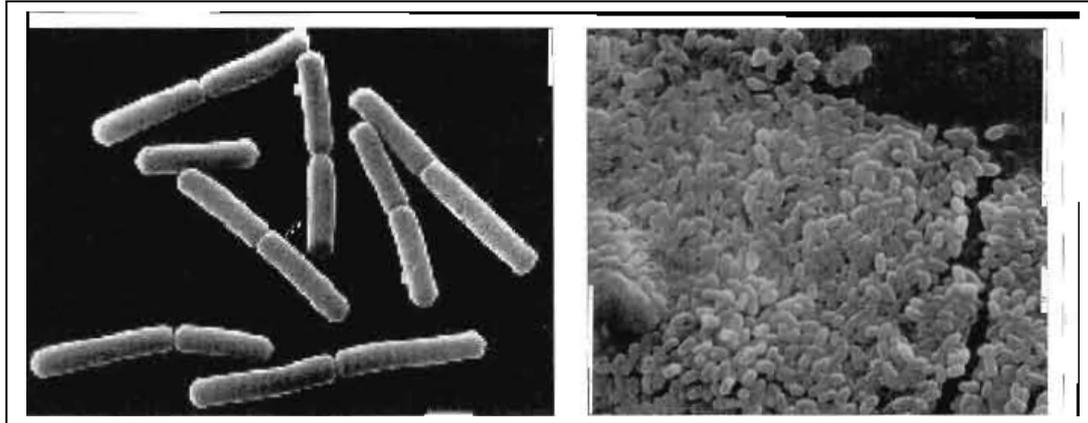


Figure 4: Caractéristiques morphologiques des *Bacillus* (A : Cellules végétatives, B : Spores)

2.4.2 Caractères métaboliques

Les caractères physiologiques des *Bacillus* sont impressionnants. Ils peuvent dégrader la plupart de la matière organique animale ou végétale (cellulose, amidon, protéines, hydrocarbures...) par la production d'enzymes extracellulaires, produisent aussi des antibiotiques peptidiques, des molécules peptidiques de signal. Ils sont hétérotrophes, nitrifiants, dénitrifiants, fixateurs d'azote, précepteurs de fer, oxydants le sélénium, oxydants et réduisant le manganèse. Ces microorganismes sont des chimiolithotrophes facultatifs, acidophiles, alcalophiles, psychrophiles, thermophiles, halotolérants, ou halophiles et sont capables de croître à des valeurs de pH, de température et de concentrations de sel où peu d'autres organismes peuvent survivre. A cause de cette variabilité physiologique, nos connaissances sur l'écologie du *Bacillus* sont très insignifiantes (Holt et al., 1994).

2.5 Pouvoir pathogène

Les toxi-infections alimentaires à *Bacillus* sont presque exclusivement dues à *B. cereus*. Elles représentent près de 5% de l'ensemble des toxi-infections alimentaires dans certains statistiques anglo-saxonnes (Gaillard, 1989).

Deux aspects cliniques différents peuvent être observés (i) la première forme, la période d'incubation est de 8 à 16 heures et le symptôme exclusif ou principal est une diarrhée persistant 12 à 14 heures. De nombreux aliments peuvent être à l'origine d'un tel syndrome : viandes, légumes, sauces...etc. La seconde forme (ii), la période d'incubation n'est que de 1 à 5 heures et les vomissements, cédant en 6 à 24 heures, sont au premier plan. Les intoxications alimentaires provoquées par *B. cereus* ne s'accompagnent pas de fièvre.

L'évolution est toujours bénigne et ne nécessite le plus souvent aucun traitement particulier. Des spores de *B. cereus* peuvent contaminer de nombreux produits : viandes, légumes. En cas de cuisson insuffisante, les spores restent viables et donnent naissance aux formes végétatives de la bactérie. Celles-ci peuvent ainsi se multiplier à une température située entre 15 à 50°C et élaborer leur toxines. Les symptômes diarrhéiques sont liés à la sécrétion d'une entérotoxine, constituée de plusieurs composés protéiques agissant probablement en synergie (Gaillard, 1989).

2.6. Certaines espèces du genre *Bacillus*

2.6.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis et *Escherichia coli* sont parmi les espèces les mieux connues du point de vue génétique et biochimique. *B. subtilis* est une bactérie qui forme des spores capables de survivre dans des conditions extrêmes. C'est une bactérie inféodée aux plantes et retrouvée à la surface du sol. Elle n'est pas considérée comme pathogène pour l'homme, mais elle peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire. (Kunst *et al.*, 1997).

B. subtilis constitue un excellent modèle pour l'étude de nombreuses bactéries pathogènes telles que *Bacillus anthracis* responsable de la maladie du charbon, *Listeria monocytogenes* causant de graves infections alimentaires et *Streptococcus pneumoniae* à l'origine d'infections nosocomiales sévères. Plusieurs secteurs industriels s'intéressent à *Bacillus subtilis*. Cette bactérie est une source d'enzyme tel que les amylases utilisées dans l'industrie du pain, les protéases et les cellulases employés dans les industries agroalimentaires et des détergents. L'industrie pharmaceutique exploite la capacité de *B. subtilis* à produire des antibiotiques, comme la bacitracine, pour fabriquer des médicaments pour les maux de gorge (Kunst *et al.*, 1997).

2.6.2. *Bacillus licheniformis*

B. licheniformis se retrouve principalement dans le sol et les plantes (Sneath *et al.*, 1986). Cette espèce peut causer occasionnellement des toxi-infections alimentaires et des infections oculaires. Certaines souches de *B. licheniformis* possèdent un pouvoir dénitrifiant (élimination des nitrates). Cette propriété, très intéressante, est utilisée dans la dépollution de l'environnement (Alexander., 1977).

B. licheniformis présente un intérêt pour le secteur industriel où elle est utilisée pour la production à grande échelle de coenzymes (Schallmey *et al.*,2004) et particulièrement de protéases pour les industries du textile et des détergents (Erickson, 1976). Le domaine agricole utilise cette bactérie dans la lutte contre certains microorganismes fongiques pathogènes attaquant les récoltes de maïs. Finalement, *B. licheniformis* suscite l'intérêt du monde médical grâce à sa capacité de produire de la proticine et de l'acide poly-glutamique (Neyra *et al.*,1996).

2.6.3. *Bacillus cereus*

B. cereus est une bactérie qui appartient au groupe *cereus* au sens large (sensu lato). Les membres de ce groupe présentent à la fois de grandes similarités génétiques et une grande diversité de virulence et de pathogénicité (Helgason *et al.*,2000 ; Patra *et al.*, 2002). *B. cereus* est un micro-organisme qui est généralement retrouvé dans la nourriture telle que le lait, les céréales et le riz (Jackson *et al.*,1995). De plus en plus d'études montrent que cette bactérie produit une toxine émétique et des entérotoxines qui causent plusieurs types d'infections chez l'homme dont la pneumonie et la méningite (Drobniewski, 1993; Logan et Turnbull, 1999).

2.6.4. *Bacillus anthracis*

B. anthracis est un autre membre du groupe *cereus* au sens large. Elle a été identifiée comme non hémolytique, non mobile, sporulante, aérobie, sensible à la pénicilline et encapsulée. Elle est l'agent étiologique de la maladie du charbon ou anthrax. Cette maladie est une zoonose (maladie animale contagieuse) touchant principalement les mammifères (y compris l'homme). Certaines souches de *B. anthracis* sont très virulentes et sont considérées comme des armes biologiques (Mock & Fouet., 2001; Jernigan *et al.*,2002). Les spores de *B. anthracis* sont hautement résistantes à la sécheresse, la chaleur, les rayons ultra-violet, les rayons gamma et à de nombreuses substances désinfectantes. La virulence de *B. anthracis* provient de la

synthèse de toxines composées de trois protéines distinctes et de la formation d'une capsule qui lui permet d'échapper à la phagocytose.

1.6.5. *Bacillus thuringiensis*

Bt est l'abréviation de *B. thuringiensis*. Cette bactérie fait partie du groupe *cereus* au sens large (Joung et Côté., 2001). *Bacillus thuringiensis* a été isolé en 1901 à partir du ver à soie. On le retrouve dans l'air, l'eau, le feuillage des végétaux et dans pratiquement tous les sols.

Il se distingue des autres *Bacillus* du groupe *cereus* par sa capacité à synthétiser des cristaux formés de multiples protéines. Ces dernières présentent certaines propriétés insecticides pour certains lépidoptères, coléoptères et diptères. Ces protéines agissent en détruisant les cellules de l'intestin moyen de la larve de l'insecte.

Bacillus thuringiensis pathogène des insectes, a une importance économique considérable car certaines souches de cette espèce sont utilisées dans la lutte biologique contre les insectes. On l'appelle un biopesticide et elle représente à ce titre 90 % du marché mondial des biopesticides. Plusieurs espèces du genre *Bacillus* sont efficaces dans le biocontrôle de divers champignons phyto-pathogènes .

1.6.6. *Bacillus megaterium*

La bactérie *B. megaterium* ; était d'abord décrite par De Bary (1884) il ya plus d'un siècle, caractérisée par sa taille ponymouse, dérivée de la langue Grec « gros animal ». Cette bactérie du sol est également trouvée dans divers environnements : l'eau de mer ; les sédiments ; les poissons ; les rizières et même dans le miel d'abeille (Vary, 1994). De point de vue taxonomique le *B. megaterium* est placé dans le groupe de *B. subtilis* (Priest, 1993 ; Vary, 1994).

C'est l'une des plus grosses bactéries rencontrées dans le sol ; sa taille dépasse 5 µm avec un volume d'environ 100 fois celle de *E. coli*. Ces bactéries forment souvent des chaînes au sein desquelles les cellules sont jointes par des polysaccharides issus de leur paroi. *Bacillus megaterium* est capable de survivre dans des environnements extrêmes comme les déserts grâce à sa capacité de sporuler. Parfois cette bactérie peut être retrouvée sur des surfaces communes que l'on touche régulièrement.

B. megaterium est impliqué dans le cycle du phosphore et la minéralisation microbienne du phosphore organique nécessaire pour les végétaux. En effet, le phosphate passant d'un état organique à un état inorganique, il sera libéré et utilisé par les végétaux. Dans ce cycle, les bactéries du type *Pseudomonas* et *Bacillus subtilis*, ainsi que les mycètes du genre *Aspergillus* sont aussi impliquées dans ce phénomène de minéralisation (De Bary., 1884).

Chapitre III

Potentialités biologiques des Pseudomonas et Bacillus

3.1 Activités microbiennes

Les micro-organismes présentent une très grande diversité métabolique. Leur métabolisme repose sur des réactions d'oxydo-réduction au cours desquelles des molécules ou ions, appelés donneurs ou substrats, sont oxydés aux dépens d'autres, appelés accepteurs, qui, eux, sont réduits par les cellules. La quantité d'énergie que les cellules peuvent récupérer en réalisant ces réactions est directement proportionnelle à la différence de potentiel existant entre les couples donneur et accepteur (Gourdon et al., 1996). Cette énergie sert simultanément à la croissance, à la biosynthèse, à la reproduction et à la mobilité éventuelle des micro-organismes.

Les micro-organismes sont chimiolithotrophes ou chimioorganotrophes lorsqu'ils retirent leur énergie respectivement aux dépens de produits minéraux ou organiques. Ces micro-organismes peuvent agir sur le devenir des matrices et polluants qu'elles contiennent. En effet, leurs actions sur les métaux lourds, par la mise en œuvre de voies métaboliques, influent sur leur spéciation et aboutissent soit à leur solubilisation, soit à leur précipitation. Les micro-organismes peuvent utiliser de très nombreuses substances comme source d'énergie, source de matière, et comme accepteurs finaux d'électrons (Pelmont, 1993). Leur activité nécessite la présence de nutriments tels que C, N, O, S, P, ... (présents dans les matrices et / ou apportés par l'air et / ou l'eau) ainsi que des oligo-éléments tels que Fe, Cu, Mg, ... (apportés par dissolution des matériaux) (Aouad et al., 2004).

Les micro-organismes se multiplient donc à partir des nutriments disponibles dans leur milieu de vie. Globalement, pour se développer, ils ont un certain nombre de besoins communs. Il s'agit de l'eau, une source d'énergie, une source de carbone, une source d'azote et d'autres éléments minéraux.

Les conditions environnementales très variées des différents biotopes composant la planète confèrent au monde microbien une grande diversité et des capacités métaboliques très vastes ainsi qu'une très grande capacité d'adaptation. La vie microbienne est ainsi possible jusque dans des environnements extrêmes (hautes ou basses températures, pH alcalins, ...).

L'activité microbienne peut se traduire notamment par :

- variation de la quantité et de la composition de la matière organique et minérale,
- variation du pH par production de métabolites oxydants ou alcalinisants,
- variation du potentiel d'oxydo-réduction par consommation de l'O₂ ou la production de Corps oxydants ou réducteurs.

Des variations des conditions physico-chimiques (de la matrice ou de son environnement) peuvent induire des modifications dans le comportement de la microflore et réciproquement, les activités microbiennes peuvent modifier le contexte physico-chimique. La microflore présente dans un milieu carencé en éléments minéraux solubles produira beaucoup d'agents chélatants (acides acétique, citrique, formique, furamique, oxalique, ...) afin de solubiliser la quantité maximale d'éléments indispensables à son développement (Perfettini, 1989). La création de conditions anaérobies (enfouissement, inondation, ...) favorise l'activité de la microflore anaérobie et donc, en présence de matière organique, la production d'acides organiques volatils (acétique, butyrique, formique et lactique). Cette activité modifie la mobilisation de certains métaux et augmente notamment la mobilisation du fer et du calcium tout en diminuant celle de l'aluminium et du silicium (Perfettini, 1989). L'activité microbienne globale peut être évaluée en tenant compte des différentes espèces microbiennes et des quantités de substrats énergétiques et carbonés dont elles disposent mais aussi des cycles qui peuvent se mettre en place. Le CO₂ produit par l'activité des micro-organismes hétérotrophes pourra être utilisé comme source de carbone par la microflore autotrophe (Perfettini, 1989).

Dans certains cas, une microflore peut disparaître au profit d'une autre. En effet, la consommation d'oxygène par les micro-organismes aérobies dans un système biotique fermé peut provoquer la disparition de ceux-ci et la prolifération de bactéries anaérobies qui étaient protégées dans une micro-niche anaérobie (Perfettini, 1989). La grande diversité des micro-organismes et leurs capacités métaboliques leur permettent de se développer dans la plupart des biotopes. (Warscheid et Braams, 2000)

3.2 Activité antagoniste

Parmi les antagonistes qui règnent dans les sols saturés en microflore équilibrée pour le milieu et le biotope, on rencontre presque toujours des espèces du genre *Pseudomonas* et *Bacillus*, ces microorganismes ont une grande capacité à produire des substances antimicrobiennes et à entrer en compétition spatiale et nutritionnelle avec les agents phytopathogènes. Le contrôle des phytopathogènes de manière biologique est plus avantageux pour l'environnement en comparaison avec le contrôle chimique (Nautiyal, 2001) aussi Interactions microbiennes, biofilms et probiotiques

Les écosystèmes microbiens sont très complexes, renfermant aussi bien une flore nuisible et parfois pathogène qu'une flore d'intérêt. Aussi bien sur surfaces biotiques (muqueuses humaines et animales, végétaux) que sur surfaces abiotiques (milieu industriel, milieu hospitalier...), ces écosystèmes s'établissent et les communautés microbiennes les formant s'interagissent. L'objectif final est le maintien d'une niche écologique favorable au développement microbien. L'Homme a su exploiter ces différentes interactions (symbiose et antagonisme) pour mettre au point divers produits alimentaires (classiques fermentés aussi bien qu'innovateurs probiotiques). Depuis que l'Homme a appris à déchiffrer ces différentes interactions, la microbiologie appliquée a connu de nombreuses avancées dans la maîtrise du développement microbien.

Ce troisième axe de recherche développé au sein du LMA vise: L'étude des interactions (symbiose, antagonisme...) microbiennes dans un écosystème naturel (alimentaire ou environnemental) ou artificiel. l'étude des communautés microbiennes en biofilms, compréhension et exploitations des biofilms positifs et moyens de lutte contre les biofilms négatifs aussi bien dans le secteur industriel que médical (plaque dentaire, implants médicaux), La production de métabolites microbiens d'intérêt (bactériocines, exo polysaccharides, bio surfactants), La mise au point de produits laitiers probiotiques et synbiotiques en exploitant les souches et les matrices végétales locales.

Phénomènes de l'antagonisme

En lutte biologique, certaines bactéries ou champignons auxiliaires peuvent être utilisés pour empêcher le développement de maladies dues aux microorganismes, selon plusieurs modes d'action (une même espèce, voir une même souche, d'agent de lutte biologique peut posséder plusieurs de ces modes d'action) .- **l'hyperparasitisme** : (ou mycoparasitisme chez les champignons) l'antagoniste attaque le pathogène en perçant les hyphes et les envahissant. - **l'antibiose** : formation de substances toxiques pour l'agent pathogène, exemple de l'agrocine d'Agrobacterium radiobacter. - **l'occupation de la même niche écologique** : la tendance est de rechercher comme antagoniste soit une souche avirulente de la même espèce que le pathogène, soit une autre espèce du même genre que le pathogène. On a pu démontrer à l'aide de mutants que des souches très faiblement virulentes et occupant la même niche mettent en action les mécanismes de défenses de la plante (production de phytoalexines), ce qui

suffit à la sauver de l'infection d'un pathogène virulent (Rucci, 1986 ; in Henni, 1998).

- la compétition pour les éléments nutritifs : en relation avec une occupation rapide du milieu. Elle a été mise en évidence tant dans la rhizosphère que sur le phylloplan. Dans les sols suppressifs où les agents pathogènes se développent mal, par opposition aux sols réceptifs où ils se multiplient rapidement, la biomasse est particulièrement dense ; pour déclencher la germination de chlamydospores de *Fusarium* il faut des concentrations de nutriments beaucoup plus élevées que dans les sols réceptifs. La compétition pour le fer est un des mécanismes attribués à *Pseudomonas fluorescens*. Sur le phylloplan, les densités de levures atteignent 10⁴ -10⁵/cm². La compétition pour les exsudats, le miellat ou les graines de pollen est active et serait en grande partie responsable de la diminution jusqu'à 50% des attaques des parasites nécrotrophes.

-La modification du milieu : la modification du milieu ; en particulier du pH, qui lorsqu'il est abaissé devient inhibiteur pour les bactéries. C'est une des actions bénéfiques de l'engrais vert enfoui dans le sol ; mais le même phénomène se répète aussi sur le phylloplan. L'augmentation du pH freine *Botrytis cinerea* sur fraisier.

-l'induction de résistance chez la plante hôte : l'agent de lutte biologique déclenche chez la plante des mécanismes de défense (épaississement des parois végétales, production de molécules de défenses...) qui s'opposent au développement de l'infection par l'agent pathogène (Fernandes, 2005).

3.3 Les métabolites de *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* est un large groupe qui appartient à la sous-classe des Gamma-protéobactéries et englobe plus de 60 espèces colonisant le sol, les plantes, les eaux douces et marines (Gross and Loeper, 2009).

Cette adaptation à diverse niches écologiques reflète la capacité de ce genre à produire de nombreux métabolites, qui sont connus par leurs importances pour les plantes, les maladies humaines et potentiellement dans le domaine de la biotechnologie (Silby *et al.*, 2011) (Figure 1).

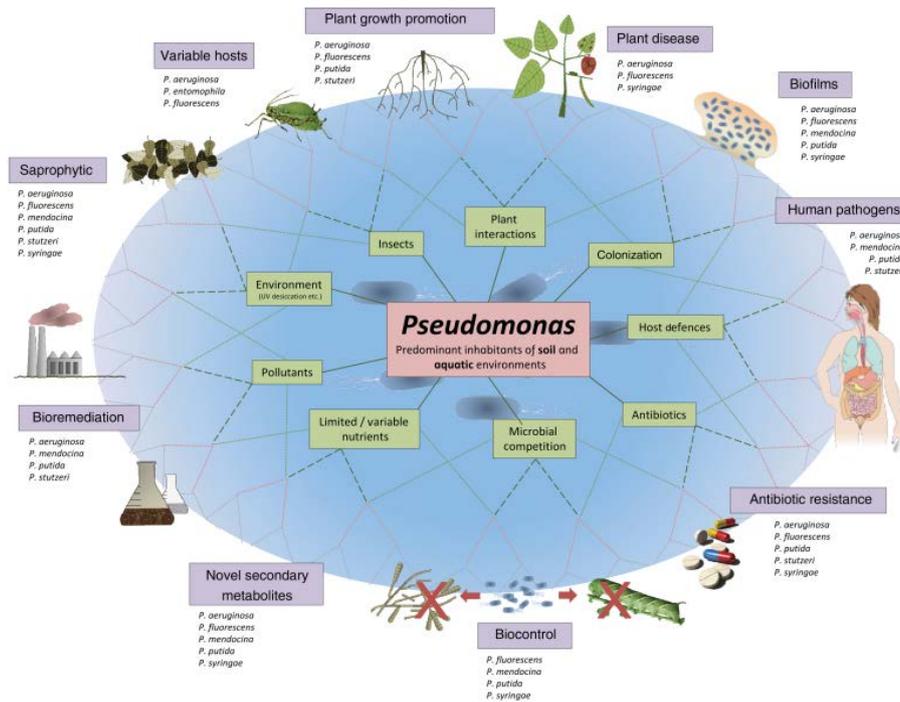


Figure 5: Rangs fonctionnels et environnementaux de *Pseudomonas* (Silby et al., 2011).

3.3.1. Les siderophores

Les Pyoverdines sont une classe hétérogène de sidérophores fluorescents qui définissent les *Pseudomonas fluorescences* et sont considérés comme les sidérophores primaires de ces bactéries. Ils ont été caractérisés comme sidérophores en 1978 et la structure d'un complexe de ferri-pyoverdine a d'abord été déterminée en 1981. Différentes souches de *Pseudomonas* sécrètent des pyoverdines chimiquement diversifiées, à ce jour, plus de 70 pyoverdines différentes ont été décrites (Meyer et al., 2008). Les pyoverdines sont composées d'un chromophore dérivé de la 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline. En position C-3 de ce chromophore est fixé un groupement peptidique et une chaîne latérale (un acide carboxylique ou un amide) (Budzikiewicz, 2004). La longueur et la composition de la chaîne peptidique, généralement composée de 6 à 12 AA, est spécifique de chaque souche de *Pseudomonas*. Elle peut être linéaire, cyclique ou partiellement cyclique (Abdallah & Pattus, 2000). Les Pvds correspondent à un groupe de sidérophores étroitement apparentés et complexes, de par leurs tailles et structure. Les Pvds, de couleur vert jaune fluorescente, sont synthétisées et secrétées dans le milieu extracellulaire par les *Pseudomonas fluorescences* dans les conditions de carence en fer. Elles sont solubles dans l'eau avec une affinité pour le fer (Rehm, 2008).

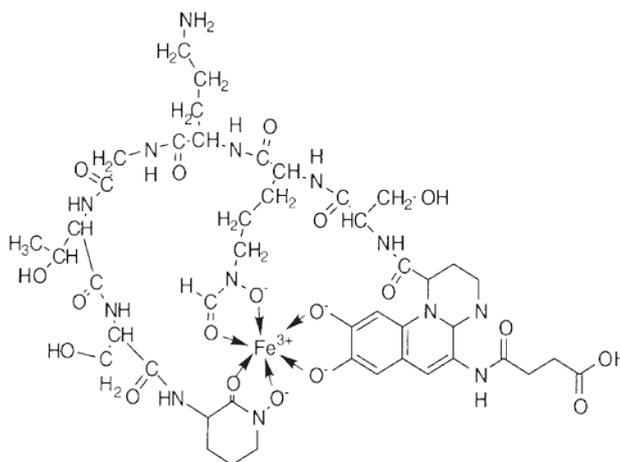


Figure 6: Structure de la pyoverdine (succinyl isoforme) synthétisée par *Pseudomonas aeruginosa*. Le complexe formé avec Fe³⁺ est représenté (Meyer, 2000).

L'implication dans l'acquisition du fer a été établie de manière concluante à la fin des années 1970 grâce aux travaux fondateurs de J-M. Meyer et ses collaborateurs (Meyer & Abdallah, 1978). Les Pvds sont toutes composées de trois parties caractéristiques : un chromophore, une chaîne latérale et une chaîne peptidique variable de la couleur et de la fluorescence typiques des Pvds (Meyer, 2000). La structure des Pvds varie d'une espèce à l'autre et même entre les souches de la même espèce. Les différentes souches de *P. aeruginosa* produisent trois types de Pvds de structures différentes : PvdI, PvdII et PvdIII (fig.29A) (Meyer et al., 1999). Cette variabilité structurale constitue un outil de différenciation et de taxonomie au sein du genre *Pseudomonas* : le sidérotypage.

Tableau 3: Structures peptidiques trouvées dans les pyoverdines synthétisées par diverses souches fluorescentes de *Pseudomonas*. La chaîne peptidique est attachée au chromophore par son extrémité NH₂. Les résidus amino-acyle soulignés correspondent aux acides D-aminés. (Ac Acetyl ; *aThr*, *allo*-threonine, *bv*. biovar, *c(amino acids)* cyclic structure for the amino acids in parentheses, *cOHOrn* cyclo-hydroxyornithine, *Dab* acide diaminobutyric, *Fo* formyl)

<i>Pseudomonas</i> species	Strain	Structure of the pyoverdine peptide chain ^a
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 15692	<u>Ser</u> -Arg- <u>Ser</u> -FoOHOrn-c(Lys-FoOHOrn-Thr-Thr)
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	<u>Ser</u> -FoOHOrn-Orn-Gly-a <u>Thr</u> -Ser-cOHOrn
<i>P. aeruginosa</i>	Pa6	<u>Ser</u> -Dab-FoOHOrn-Gln- <u>Gln</u> -FoOHOrn-Gly
<i>P. chlororaphis</i>	ATCC 9446	<u>Ser</u> -Lys-Gly-FoOHOrn-c(Lys-FoOHOrn-Ser)
<i>P. fluorescens</i> bv. I	ATCC 13525	<u>Ser</u> -Lys-Gly-FoOHOrn-c(Lys-FoOHOrn-Ser)
<i>P. fluorescens</i> bv. I	9AW	<u>Ser</u> -Lys-OHHis-a <u>Thr</u> -Ser-cOHOrn
<i>P. fluorescens</i> bv. III	ATCC 17400	<u>Ala</u> -Lys-Gly-Gly-OHAsp- <u>Gln</u> /Dab-Ser- <u>Ala</u> -cOHOrn
<i>P. fluorescens</i> bv. V	51W	<u>Ala</u> -Lys-Gly-Gly-OHAsp- <u>Gln</u> -Ser- <u>Ala</u> -Gly-a <u>Thr</u> -cOHOrn
<i>P. fluorescens</i> bv. V	1W	<u>Ser</u> -Lys-Gly-FoOHOrn-c(Lys-FoOHOrn-Ser)
<i>P. fluorescens</i> bv. V	10CW	<u>Ser</u> -Lys-Gly-FoOHOrn-c(Lys-FoOHOrn-Ser)
<i>P. fluorescens</i> bv. VI	PL7	<u>Ser</u> -AcOHOrn- <u>Ala</u> -Gly-a <u>Thr</u> -Ala-cOHOrn
<i>P. fluorescens</i> bv. VI	PL8	<u>Lys</u> -AcOHOrn- <u>Ala</u> -Gly-a <u>Thr</u> -Ser-cOHOrn
<i>P. fluorescens</i>	1.3	<u>Ala</u> -Lys-Gly-Gly-OHAsp- <u>Gln</u> /Dab-Gly-Ser-cOHOrn
<i>P. fluorescens</i>	18.1	<u>Ser</u> -Lys-Gly-FoOHOrn-Ser- <u>Ser</u> -Gly-c(Lys-FoOHOrn-Ser)
<i>P. fluorescens</i>	CCM 2798	Ser-Dab-Gly-Ser-OHAsp- <u>Ala</u> -Gly- <u>Ala</u> -Gly-cOHOrn
<i>P. fluorescens</i>	CFBP 2392	<u>Lys</u> -AcOHOrn-Gly-a <u>Thr</u> -Thr-Gln-Gly- <u>Ser</u> -cOHOrn
<i>P. fluorescens</i>	CHA0	Asp-FoOHOrn-Lys-c(Thr- <u>Ala</u> - <u>Ala</u> -FoOHOrn-Lys)
<i>P. putida</i> bv. B	9BW	<u>Ser</u> -Lys-OHHis-a <u>Thr</u> -Ser-cOHOrn
<i>P. putida</i>	CFBP 2461	Asp-Lys-OHAsp-Ser-a <u>Thr</u> - <u>Ala</u> -Thr- <u>Lys</u> -cOHOrn
<i>P. tolaasii</i>	NCPPB 2192	<u>Ser</u> -Lys-Ser- <u>Ser</u> -Thr- <u>Ser</u> -AcOHOrn-Thr- <u>Ser</u> -cOHOrn

3.3.2 Les antibiotiques

Plusieurs antibiotiques ont été identifiés chez le genre *Pseudomonas*, tels que le 2,4- diacetylphloroglucinol (DAPG), le cyanure d'hydrogène, l'oomycine A, la phénazine, la pyolutéorine, la pyocyanine, la pyrrolnitrine, la tropolone ou encore des lipopeptides cycliques (viscosinamide, tensine, amphisine...) (Keel et al., 1992 ; Raaijmakers et al., 2002 ; Magnin-Robert, 2007).

a. Le 2, 4 diacetylphloroglucinol (DAPG)

La production du DAPG par *P. fluorescens* semble être impliquée dans l'induction de cette résistance systémique. En effet, lors de la confrontation entre *P. parasitica* et *A. thaliana* colonisé par différents mutants de *P. fluorescens* (déficient en HCN, DAPG, pyolutéorine, exoprotéase de sidérophores) (Iavicoli et al., 2005).

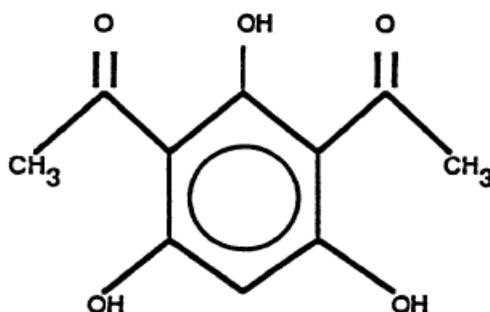


Figure 7: Structure de DAPG (Shanahan et al, 1992)

b. Les phénazines (PHZ)

Les phénazines représentent une vaste famille de molécules hétérocycliques azotées fortement pigmentées et capables d'une action antibiotique à large spectre. Cela fait bien 150 ans qu'ils sont reconnus mais les données sur leurs synthèses et activités antimicrobiennes sont récentes. La capacité d'en produire ces métabolites est très bien documenté dans trois espèces : *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* et *P. aureofaciens* (Rehm, 2008).

Plus de 50 phénazines sont présentement connus, toutes ayant le même noyau hétérocyclique, et certaines souches peuvent produire jusqu'à 10 dérivés différents en même temps (Delaney et al., 2001; Chin-A-Woeng et al., 2003). A l'exception des *P. fluorescens* qui produisent un seul type de phénazine-1-carboxylique acide (PCA), la majorité des autres *Pseudomonads* en produisent une variété importante. Le principal pigment phénazinique produit par *Pseudomonas aeruginosa* est la pyocyanine. La pyocyanine est également la phénazine la plus étudiée.

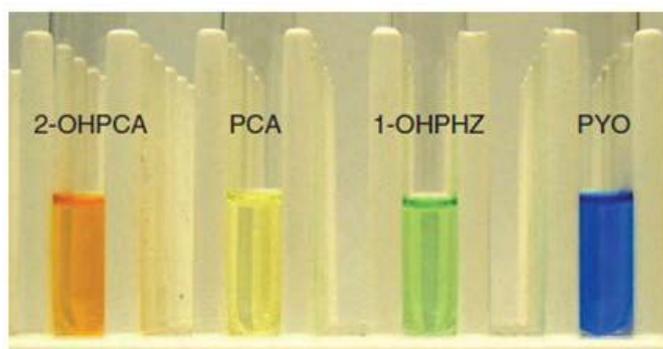


Figure 8: Phénazine . Phénazines produites par les différentes espèces de *Pseudomonas*. Avec 2-OHPCA : 2-hydroxyphénazine; PCA : phénazine-1-carboxylique acide; 1-OHPHZ : 1-hydroxyphénazine; PYO : pyocyanine (Price-Whelan et al., 2006).

Chimiquement, la PYO est la N-méthyl-1-hydroxyphénazine, elle est peu soluble dans l'eau, mais soluble dans le chloroforme et dans les solvants organiques (Méthanol, Ethanol...). En solution aqueuse, la PYO présente la propriété de changer de couleur en fonction du pH et de son état d'oxydation: la PYO oxydée est rouge en milieu acide ($\text{pH} < 4,9$) et bleue en milieu neutre et alcalin (Figure). La PYO réduite ou leucopyocyanine est incolore.

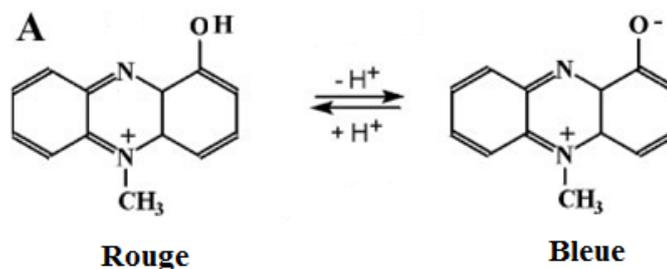


Figure 9: Formule développée de la pyocyanine en milieu acide et en milieu basique (O'Malley et al. 2004).

c. Pyrrolnitrine (PRN)

La pyrrolnitrine (3-chloro-4-(2'-nitro-3'-chlorophényl)-pyrrole) est un antibiotique à large spectre isolé pour la première fois dans les années soixante à partir de *Pseudomonas pyrricinia*. Par la suite, ce composé a été isolé chez plusieurs autres espèces de bactéries incluant *Myxococcus flavus*, *Entérobacter agglomerans*, *Serratiasp.*, ainsi que plusieurs *Pseudomonas* et *Burkholderia* (Hammer et al., 1999). Ce métabolite très actif a également connu un usage médical pour le traitement des mycoses cutanées tandis qu'un dérivé de la molécule a été développé comme fongicide agricole (fludioxonil) (McSpadden Gardener et al., 2002). La production de ce composé par *P. fluorescens* est impliquée dans le contrôle de certains agents pathogènes racinaires comme *Fusarium oxysporum* (Homma et al., 1989).

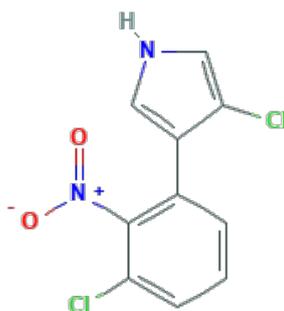


Figure 10: Structure de la Pyrrolnitrine

d. Cyanure d'hydrogène (HCN)

La production de HCN semble confinée aux Proteobactérie et elle a été mise en évidence chez plusieurs souches de *P. fluorescens*. La production de HCN par les *Pseudomonas* est impliquée dans la suppression d'agents pathogènes comme *Thielaviopsis basicola*, *Septoria tritici* et *Puccinia recondita* (Ramette et al., 2003).

Le composé agit directement sur les cellules de l'agent pathogène en bloquant le cytochrome oxydase dans la chaîne respiratoire.

e. Les Orfamides

Ces molécules sont des lipopeptides cycliques récemment découverts, dont la structure a été déchiffrée suite aux données du séquençage génomique et utilisant une nouvelle approche génomi-isotopique. Cette approche a abouti à la découverte du gène orphelin codant pour la synthèse de l'orfamide chez la souche Pf-5 (Loper et al., 2007; Mavrodi et al., 2007). Ce métabolite présente un important rôle dans la lutte biologique (Loper & Gross, 2007).

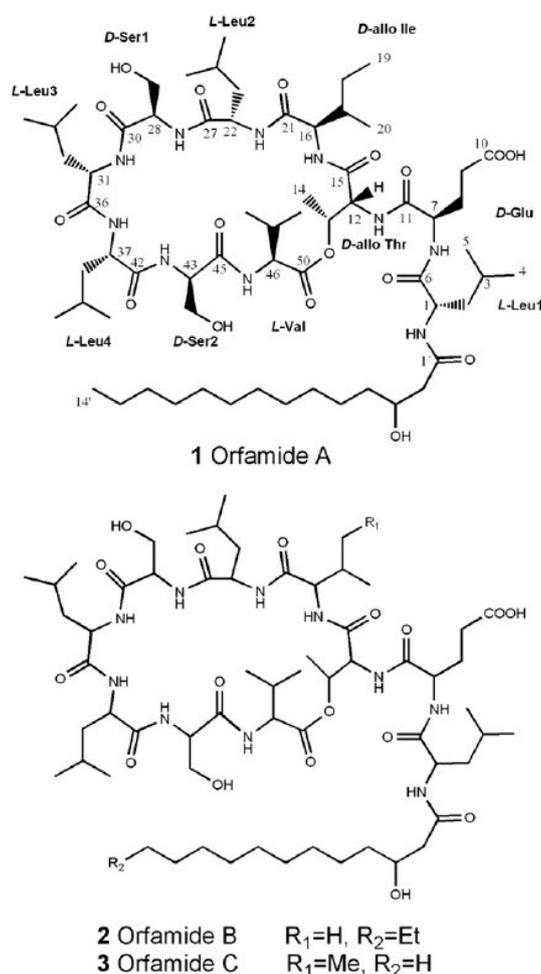


Figure 11: Structure chimiques des orfamides (Orfamides A, 1; B, 2; et C, 3) (Gross et al. 2007).

3.4 Les métabolites de *Bacillus*

3.4.1 Bactériocines

Le potentiel de *Bacillus* à produire des antibiotiques a reconnu depuis 50 ans avec des antibiotiques peptidiques représentant la classe prédominante. Les bactériocines sont protéines ou peptides ribosomiques avec activité bactéricide vers des espèces souvent étroitement liées aux bactéries productrices présentant des molécules à poids variables, propriétés biochimiques, spectres inhibiteurs, et des mécanismes d'action différents. En raison de leur potentielle utilisation comme conservateurs naturels, les bactériocines produites par les bactéries lactiques ont fait l'objet d'intense enquête ces dernières années et *Bacillus* spp. semble être une source relativement abondante d'antimicrobiens, puisque de nombreuses espèces de ce genre synthétisent des antimicrobienspeptides (Cherif et al.2001; Lisboa et al.2006).

La possibilité de rechercher un nouveau producteur de bactériocine est considérée comme l'un des principaux intérêts de la recherche sur la bactériocine chez *Bacillus*. *B. subtilis*, l'exemple modèle pour les organismes Gram-positifs, est capable de produire plus de douzaines d'antibiotiques avec une variété de structures et activités (Stein 2005).Plusieurs bactériocines ont été signalées, comme la lichénine produite par la souche *B. licheniformis* 26-103RA (Pattnaik et al.2001), la mégacine produite par des souches de *B. megaterium* (Lisboa et al.2006), la coaguline antilisteriale produite par *B. coagulans*(Le Marrec et al. 2000), polyfermenticine SCD produite par *B. polyfermenticus* (Lee et al. 2001), et céréine produite par des souches de *B. cereus* (Torkar et Matijas'ic' 2003; Bizani et al. 2005). De plus, certaines de ces bactériocines ont été indiquées comme bioconservateurs potentiels dans les systèmes alimentaires et les boissons, comme agents de lutte biologique contre les phytopathogènes (Bais et al. 2004) et comme précurseurs d'antibiotiques.

La production et la sécrétion de bactériocine ont été observées en phase stationnaire, après 10 à 16 h de croissance de la population bactérienne dans du milieu riche.Comme il est bien connu, les bactériocines, en particulier les lantibiotiques, sont généralement produites au cours de la phase de croissance moyenne. La production de bactériocines se déroule avec succès à la fois dans un milieu en bouillon et sur un milieu solide (Khalil et al. 2009).Khalil et al.(2009) ont décrit l'influence des conditions culturelles et physiques telles que les nutriments, les concentrations de nutriments, les combinaisons / interactions de nutriments, l'aération et d'autres facteurs physiques, y compris la chaleur, les UV, le pH et les conditions de stockage,

pour obtenir une activité bactériocine meilleure et plus stable à partir de une souche nouvellement isolée de *B. megaterium*

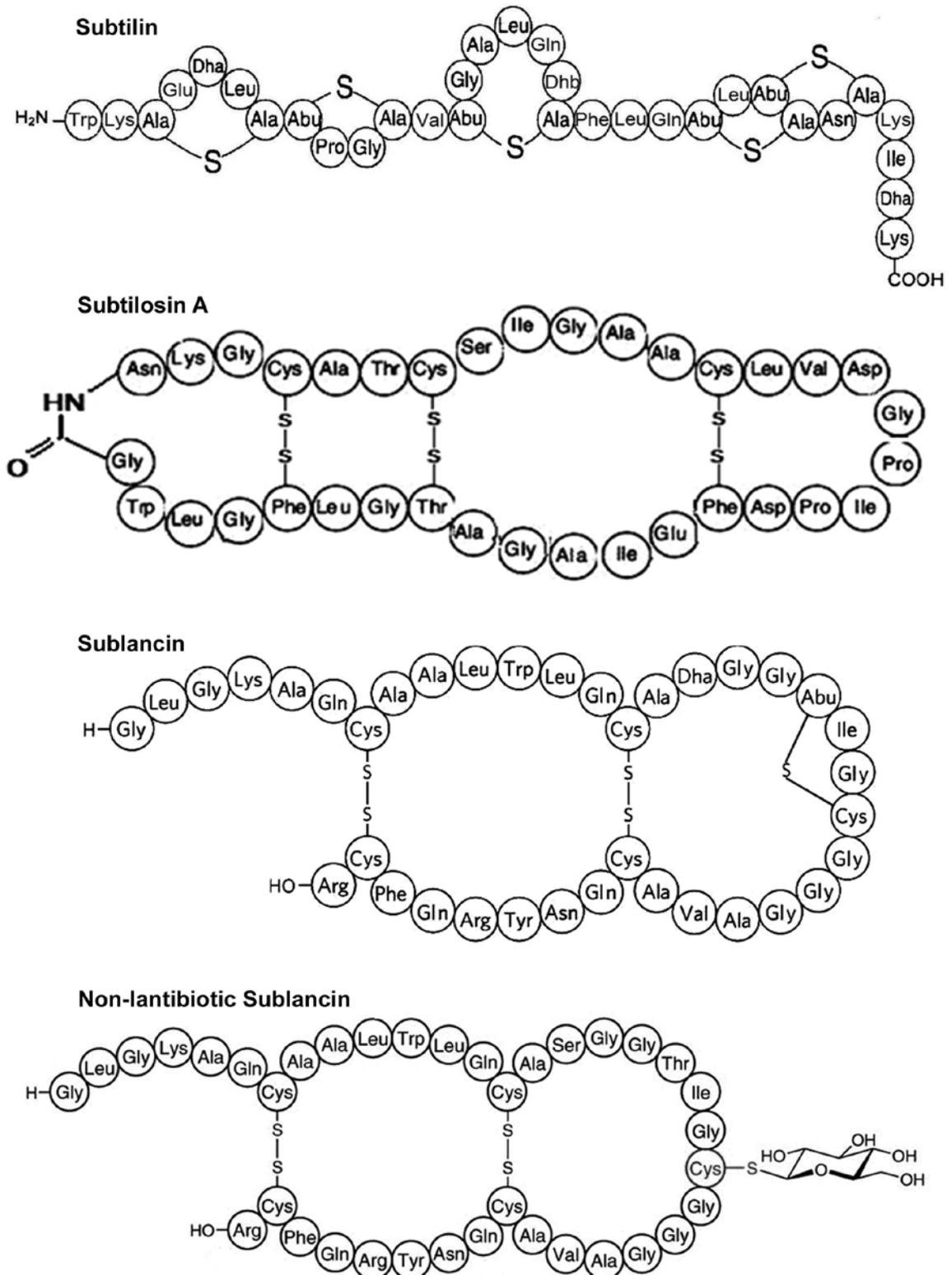


Figure 12: Structures Structures des bactériocines de *Bacillus*, subtiline, subtilosine A, et sublancin (Wiyada, 2012)

3.4.2 Lipopeptides cycliques

Les lipopeptides cycliques (cLPS) représentent une classe prometteuse de produits naturels avec une activité antimicrobienne puissante. Les lipopeptides sont synthétisés par des peptides non ribosomaux synthétases (NRPSs) par le processus de «thiotemplate». En effet cette voie indépendante du ribosome utilise des complexes multi-enzymatiques qui permettent une synthèse peptidique dite « non ribosomale ». Ces enzymes appelées « non ribosomal peptides synthétase (NRPS) », sont des enzymes de grande taille et sont organisées en modules.

Aujourd'hui ces lipopeptides ont des applications cliniques, cosmétiques, dans la préservation des aliments, des produits laitiers, en industrie pétrochimique et le contrôle des maladies des plantes. La demande en lipopeptides est également aussi en augmentation en raison de leur utilité pour le bien-être humain. Les lipopeptides ont été approuvés aux États-Unis en tant qu'antibiotiques en 2003. Le daptomycine est le premier antibiotique lipopeptidique cyclique à être approuvé aux États-Unis par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement des infections graves du sang et de la peau causées par certains microorganismes à Gram positifs (Meena et Kanwar, 2015).

Les lipopeptides pourraient constituer un chiffre d'affaire d'un milliard de dollars et leurs utilisations dans des domaines variés de l'agriculture, de la pharmacie et de l'industrie cosmétique a été approuvée dans plus de 70 pays (Meena et Kanwar, 2015). Parmi les lipopeptides, les lipopeptides cycliques (cLPs) ont fait l'objet de plusieurs revues qui couvrent des aspects de leur diversité structurale et de leur activités biologiques (Nielsen et al., 2002, Raaijmakers et al., 2006), leur biosynthèse (Kleinkauf et von Döhren, 1987), leur production en fermenteur (Shaligram et Singhal, 2010), leur régulation naturelle (Raaijmakers et al., 2010). Ces molécules ont été détectées dans plusieurs genres bactériens, principalement les *Bacillus*, les *Pseudomonas*, les *Streptomyces*, ainsi que dans les champignons. Plusieurs lipopeptides caractérisés jusqu'à ces jours ont montré diverses activités surfactant, antimicrobien et cytotoxique, antitumoral, immunosuppresseur (Raaijmakers et al., 2010). Bien que les *Bacillus* produisent plusieurs antibiotiques selon les souches, les principaux lipopeptides excrétés par l'espèce bactérienne peuvent être classés en trois principales familles: les surfactines, les iturines et les fengycines selon leurs rôles en lutte biologique contre les maladies des plantes.

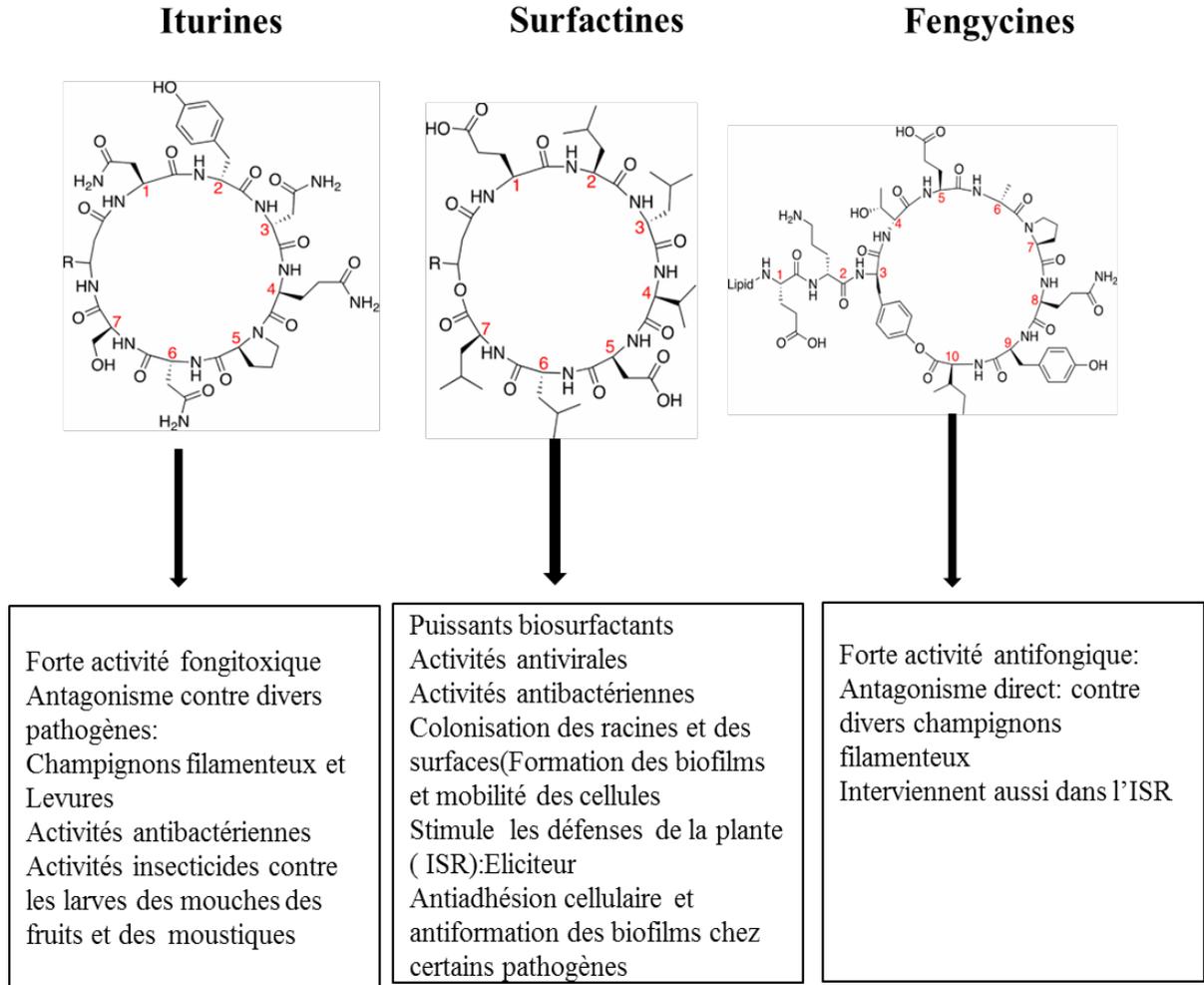


Figure 13: Principales familles de lipopeptides

3.4.3 Enzymes hydrolytiques

Une large gamme d'enzymes de *Bacillus* ont trouvé des applications en biotechnologie, en comparaison avec les enzymes des autres microorganismes. *Bacillus* sont métaboliquement actives, et leurs activités enzymatiques sont plus diversifiées (lipases, protéases, amylases, cellulases, nucléases...) (Oren, 2002). Ces enzymes sont de bons candidats pour des applications industrielles du fait de leur capacité d'activité en présence de fortes concentrations en sel, de tolérer des températures relativement élevées et des variations de pH etc. (Amoozegar *et al.*, 2017).

L'utilisation de ces molécules est particulièrement importante car elles sont caractérisées par des propriétés structurales spécifiques, une activité élevée, un large spectre d'utilisation, une spécificité de substrat et surtout une stabilité et une résistance à la dénaturation exceptionnelle conduisant à un maintien de leur fonctionnalité dans des

conditions même défavorables. De plus, ces enzymes actives dans des milieux organiques peuvent être utilisées comme biocatalyseurs en présence de solvants organiques (Kumar *et al.*, 2011).

a. Lipases et estérases

Les enzymes hydrolysant les esters carboxyliques sont ubiquistes et ont été trouvées dans les trois domaines du vivant. Ces enzymes peuvent agir en tant qu'hydrolases qui catalysent l'hydrolyse des triglycérides en acides gras et en glycérol (Schreck et Grunden, 2014). Dans un solvant organique, elles peuvent catalyser la réaction inverse ou une trans-estérification. Ils sont largement utilisés comme biocatalyseurs en raison de leur capacité à produire des composés purs. Les estérases se distinguent des lipases par leur préférence pour les chaînes carbonées courtes. Elles ont trouvé de multiples applications dans les industries médicales, agroalimentaires, de production d'énergie, grâce à leurs propriétés en synthèse organique (d'arômes, de détergents et de biodiesel notamment) (Raddadi *et al.*, 2015).

Ces enzymes sont également actives sur les pNP-esters et présentent un intérêt pour la détoxification des pesticides. Ces activités sont remarquablement bien conservées en présence de détergents, d'urée et de solvants organiques d'usage courant.

b. Amylases

Les enzymes de la famille des glycosylases, impliquées dans le métabolisme des glucides, revêtent un intérêt industriel important. En particulier, celles qui convertissent l'amidon sont fondamentales dans les procédés de production de biocarburants, textiles, l'alimentation et autres. *Bacillus* constitue un gisement extrêmement varié d'enzymes intéressantes pour la dégradation de l'amidon : les amylases, glucoamylases et α -glucosidases (Dey *et al.*, 2016). Ces enzymes ont pour rôle de catalyser la dégradation des polymères d'amidon pour produire des dextrans et différents gluco-oligosaccharides (Saxena *et al.*, 2007). Les alpha-amylases de plusieurs espèces de *Bacillus* ont été caractérisées.

c. Protéases

Les protéases, dont l'intérêt majeur réside dans leur grande stabilité et leur aptitude à fonctionner en présence de détergents et d'agents dénaturants. Ces enzymes sont de bons candidats pour une utilisation dans les processus industriels. Les protéases peuvent avoir

une action spécifique, qui est à l'origine de leur exploitation et leur application biotechnologique (Litchfield, 2011). Ces enzymes sont utilisées dans les industries alimentaires, les produits laitiers, dans les industries de tannage de cuir, comme détergents et aussi pour la gestion des déchets (Karbalaeei-Heidari *et al.*, 2009).

d. Cellulase

La cellulase est l'une des enzymes les plus utiles de l'industrie (Jutur *et al.* 2014). Il est produit par des champignons, des bactéries ou des actinomycètes. La plupart des cellulases commerciales sont d'origine fongique; cependant, les bactéries ont également été considérées comme des producteurs d'enzymes robustes et polyvalents en raison de leur taux de croissance élevé, de leur stabilité dans des conditions extrêmes et de la présence de complexes multi-enzymatiques. Parmi les bactéries, les espèces de *Bacillus* peuvent produire plusieurs enzymes extracellulaires hydrolysantes de polysaccharidiques, dont la cellulase [2]. Cependant, l'étude de la cellulase de *Bacillus a*, jusqu'à récemment, pris du retard sur celle des enzymes fongiques. Cela est dû en grande partie au fait que la plupart des cellulases de *Bacillus* hydrolysent la carboxyméthylcellulose synthétique, mais hydrolysent à peine la forme cristalline de la cellulose (Arifin *et al.* 2006).

Le potentiel des cellulases a été révélé dans divers processus industriels, comme le ramollissement du coton et la finition du denim dans l'industrie textile, le désencrage, l'amélioration du drainage et la modification des fibres dans les industries des pâtes et papiers, ainsi que dans les détergents à lessive comme le ramollissement, agents anti-boulochage et raviveurs de couleur (Kuhad *et al.*, 2011).

Tableau 4: Liste des espèces de *Bacillus* utilisées pour la production d'enzymes.

Classe d'enzymes	Enzymes	Espèces de <i>Bacillus</i>
Polymers de sucres	a-Amylase, b-Amylase, Arabinase, Cellulase, Chitinase, Chitosanase, Dextranase, Galactanase, b-1,3-glucanase, b-1,6-glucanase, Isoamylase, Lichenase, Levansucrase, Maltase, Mannanase, Pactate lysase, Phosphomannase, Pullulanase, Xylanase, Glucose isomerase	<i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. amyloliquifaciens</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. caldolyticus</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. firmus</i> , <i>B. brevis</i> , <i>B. macerans</i> , <i>B. stearothermophilus</i>
Protéase	Aminopeptidase, Esterase, metal proteases, Serine proteases	<i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. amyloliquifaciens</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. thermoproteolyticus</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. pumilus</i>
Lipase	Phospholipase C, Thiaminase	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. thiaminolyticus</i>
Nucléases	Doxyribonuclease, Ribonucleases, 3-nucleotidases, 5-nucleotidases	<i>B. amyloliquifaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i>
Phosphatase	Alkaline phosphatase	<i>B. amyloliquifaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i>
Autres	Beta-lactamase, Endo-N-acetylglucosaminidase, Exo-N-acetylglucosaminidase, Endo-N-acetylmuraminidase, Exo-N-acetylglucosaminidase	<i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i>

Conclusion Général

Les espèces de *Pseudomonas* spp. et *Bacillus* spp. sont fréquemment isolées de différentes niches écologiques. Certaines peuvent agir comme des pathogènes des animaux des plantes ou des champignons, alors que d'autres sont des bactéries bénéfiques vivant librement dans le sol.

Le bagage enzymatique des microorganismes est directement influencé par la disponibilité des nutriments dans l'environnement et fait partie de l'adaptation de ces microorganismes à leur milieu naturel. Autre point important il semble qu'une plus grande adaptabilité de certains souches aux conditions de température, de pH et de salinité a une relation avec la capacité de ces mêmes souches à produire des enzymes extracellulaires: une plus grande capacité d'adaptation implique des mécanismes métaboliques plus développés comparativement à des organismes qui ont sont dépourvus.

Plusieurs travaux ont permis d'apporter une contribution à l'étude des biomolécules de *Bacillus* et *Pseudomonas* qui représentent une famille de molécules dont la diversité de structures offre un large spectre de propriétés physicochimiques pouvant donner lieu à des applications industrielles variées, répondant aux besoins des consommateurs et de l'industrie.

Outre leur intérêt connu depuis de nombreuses années dans l'agriculture comme agents de biocontrôle, les scientifiques et les industriels s'intéressent de plus en plus aux activités biologiques de ces groupes bactériens et à leurs applications dans le domaine thérapeutique. Sur ce point, la littérature scientifique s'enrichit régulièrement de données relatives aux activités biologiques de leurs métabolites et leurs applications potentielles dans différents secteurs de la santé.

Références Bibliographiques

- **Acinas, S. G., Marcelino, L. A., K1epac-Ceraj, V. et Polz, M. F. (2004).**Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. 1. *Bacteriol.* 9: 2629 -2635.
- **AIT BELKACEM ,C.BELGRADE ,A.,(2017).** Extraction et caractérisation de quelques molécules bioactives à partir des souches de *Pseudomonas* fluorescents et *Bacillus* sp. Mémoire de master : Biotechnologie Microbienne. Boumerdes : UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA DE BOUMERDES,85P.
- **Andrea, M.S., A.M. Boyd, S. Henrik, F. Jorg, NT. Kenneth, et JM. Terry (2008).**Diversity of *Bacillus*–like organisms isolated from deep-sea hypersaline anoxic sediments. *BioMed. Central* 4:8.
- **Ash, c., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S. et Collins, M. O. (1991b).**Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-submitribosomal RNA sequence.*Let!. Appl. Microbiol.* 13: 202 -206.
- **bacteries :Pseudomonassp et Bacillus sp vis-à-vis des champignons phytopathogènes.**[En ligne Mémoire de master : Biotechnologie microbienne. Tizi-Ouzou: Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, 89P.
- **BAUMETAL.(1998).** Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol.Molecular Biology. Rev.*62:775–806.
- **Berkeley, R. C. W., Logan, N. A., Shute, L. A., Capey, A. G. (1984).**Identification of *Bacillus* species.*In. Met. Microbiol.*16 ed. Bergan, T. London: Academie Press. pp. 291-328.
- **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.
- **BOTTONE EJ. (2010).** *Bacillus cereus, a Volatile Human Pathogen. Clinical Microbiology Reviews* 23:382.
- **Bounoua., M.** Essai d'utilisation des *Pseudomonas spp. et Bacillus sp.* dans le bio contrôle de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* sur tomate et *Verticullium dahliae* sur l'olive. Mémoire de magistère : biotechnologie. Oran : Université d'Oran, 90P.
- **CHAKER H.(2012).**Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosaa* son hôte : implication des métabolites du tryptophane.
- **Cheikh rouhou,M.,(2006).**Évaluation des classifications phylogénétiques des*Bacillaceae* basées sur les gènes de l'opéron *rrn* et de gènes de ménages. Mémoire de la maîtrise en biologie : microbiologie moléculaire et appliquée. Québec : UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL, 114P.
- **Cherif,H.,(2014).**Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec *Bacillus* sp. Et *Pantoea agglomeeans* isolées de sols arides. Thèse de doctorat : Microbiologie. Sétif : Université Ferhat Abbas Sétif 1, 162P.

- **Claus, D. et Berkeley, R. C. W. (1986).** Genus *Bacillus* Cohn 1872. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins. vol 2: 1105-1139.
- **CLAVE D.(2011).** Fiche technique bactériologie *Pseudomonas aeruginosa* centre toulousain pour le contrôle de qualité en biologie clinique.
- **Clayton, R. A., Sutton, G., Hinkle, P. S. Jr., Bult, C. et Fields, C. (1995).** Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 595-599.
- **Crosby, L. D. et Criddle, C. S. (2003).** Understanding bias in microbial community analysis techniques due to *rrn* operon copy number heterogeneity. *Biotech.* 34 :790-802.
- **Fahmy, F., Flossdorf, J. et Claus, D. (1985).** The DNA composition of the type strains of the genus *Bacillus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 6: 60-65.
- **FAILLE A.(2010).** identification de composés naturels contre *Saprolegnia* sp un champignon pathogène en Aquaculture. ariane faille
- **Fernandes, B., (2005).** Lutte biologique. PHM- Revue horticole, 465, pp.31-34
- **FLORET D.(2009).** Immunization: process of elaborating guidelines and their evolution In France. *Ann Pharm Fr* 67, 219-223.
- **Gaillard B., Breton A. et Bernalier A. (1989).** *Curr Microbiol.* 19: 103-107.
- **Garbeva, P., J. A. van Veen, et J. D. van Elsas (2003).** Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE, *Microbiol. Ecol.* 45:302-316.
- **Gordon, R. E., Hayens, W. C & Pang, C. H. N. (1973).** The genus *Bacillus*. In *Bacillus* Edited by Colin R. Harwood. New York & London: Plenum Press. p: 293-320.
- **GUINEBRETIER MH, AUGER S, GALLERON N, et al. (2012).** *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiol* 17: 17.
- **GUINEBRETIER MH, THOMPSON FL, SOROKIN A, et al. (2008)** .Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology* 10: 851-865.
- **Henni, J.E., (1998).** Morphologie, pouvoir pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Thèse de Doctorat. Université d'Oran, 172.
- **Holl, FB. et CP. Chanway (1992).** Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Can. J. Microbiol.* 38: 303-308.

- **HOLLOWAY B. (1992).** *Pseudomonas* in the late twentieth century. In: *Pseudomonas, Molecular Biology and Biotechnology* (E Galli, S Silver, Witholt, eds), Am Soc Microbiol, Washington, DC, 1-8.
- **Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley et S.T. Williams (1994).** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. pp: 518-537. 9th Edn., Williams and Wilkins, Baltimore.
- **KIPNIS E., SAWA T., WIENER-KRONISH J.(2006).** Targeting mechanisms of
- **LAMONT I L., MARTIN L W. (2003).** Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 149:833-842.
- **LECHNER S, MAYR R, FRANCIS KP, et al. (1998)** .*Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 1373-1382.
- **LECLERC H.(2002).** Presse therm climat bacteriologie de pseudomonas aeruginosa, Société française d'hydrologie et de climatologie médicales.
- **LOGAN NA.(2012)** *Bacillus and relatives in foodborne illness. Journal of Applied Microbiology* **112**: 417-429..
- **Logan, N. A. & Berkeley, R C. W. (1984).** Identification of *Bacillus* strains using API system. 1. *Gen. Microbiol.* 130: 1871 -1882.
- **Mahaffee, WF. et JW. Kloepper (1997).** Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Microbiol Ecol* **34**:210–223.
- **Mami,A.,(2013).** Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en algérie. Thèse de doctorat : Microbiologie appliquée. Oran : Université d'Oran, 164P.
- **Mebarki,H.,Benakli,L.,(2018).** Evaluation de l'activité antagoniste de deux
- **MESAROS N., P NORDMANN., P PLESIAT., M ROUSSEL-DELVALLEZ., J VAN ELDERE., Y GLUPEZYNSKI., Y VAN LAETHEM., F JACOBS., P LEBECQUE., A MALFROOT., P M TULKENS., F VAN BAMBEKE.(2007).** *Pseudomonas aeruginosa* : résistance et options thérapeutique à l'aube du deuxième millénaire. *ANTIBIOTIQUES*. P.189-198
- **Messoudi,A.,(2013).** Contribution à la caractérisation de souche d'actinomycètes productrices de métabolites antimicrobiens isolées de la sebkhia de kenadsa (Bechar). Mémoire de magistère : Maitrise de la Qualité Microbiologique et du Développement Microbien (MQMDM). Tlemcen : Université ABOU BAKR BELKAID de Tlemcen, 106P.
- **MEZAACHE S. (2012).** localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre.

- **MOCK M & FOUET A. (2001).** ANTHRAX. Annual Review of Microbiology **55**:647-671.
- **MULVEY M R., A E SIMOR.(2009).**Antimicrobial resistance in hospitals :How concerned should we be ? *Canadian Medical Association Journal* 180(4) :408-415.
- **NAKAMURA LK.(1998).** *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 1031-1035.
- **PALLERONI N.(1984).** Manual of Systematic Bacteriology.USA, pp. 141–171.
- **PALLERONI, N.J., 1984.** Genus I. Pseudomonas Migula 1894. In: Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds.), Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, vol. I.Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp. 141–171.
- **Pestre, C., (2007).**Evaluation du rôle des activités microbiennes dans le devenir de déchets essentiellement minéraux en fonction du scénario de valorisation ou de stockage. Thèse de doctorat : science de l’environnement industriel et urbain. Lyon : école doctorale de chimie de Lyon, 348P.
- **PIER, G.B. and RAMPHAL, R. (2005)** Pseudomonas aeruginosa. In: Mandell, G.L., Bennett, J.E. and Dolin, R., Eds., Mandell, Douglas and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Disease, 6th Edition, Churchill Livingstone, New York, 2587-2615
- **PLESIAT P. (2011).** GDR *Pseudomonas* centre national de la recherche scientifique
- **POOLE K.(2004).**Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect.2004Jan; 10(1):126.
- **Priest, F. G, Goodfellow, M. & Todd, C. (1988).**A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1847 -1882.
- **Priest, F. G., Goodfellow, M. & Todd, C. (1981).** The genus *Bacillus*: a numerical analysis. In the aerobic endospore-forming bacteria: classification and identification ed. Berkeley, R.C.W. and Goodfellow, M. New York: Academic Press. p: 91-103.
- *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis.Médecine et maladies infectieuses 36:78-91.
- **Rosler, D., Ludwig,W., SchJeifer, K. H., Lin, c., McGIH, T. J., Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, P. Jr. & Fox, G. E. (1991).**Phylogenetic diversity in the genus *Bacillus* as seen by 16S rRNA sequencing studies.*Syst. Appl. Microbiol.* 14: 266 -269.
- **Rucci, T., (1986).** Study of the pathogenicity of causal agents wilt in tomato. Bulletin I Shkencave Bujqesore, 52(2), pp.91-97
- **SCHNEPF, E., N. CRICKMORE, J. VAN RIE, D. LERECLUS, J.**
- **Seldin, L., A. Soares Rosado, DW. da Cruz, A. Nobrega, JDE. van Elsas et M. Paiva (1998).** Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3860–3868.

- **SOULEY LIE MOUSTAPHA F S.(2002).** Sensibilité et évolution de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques à l'hôpital du point G .Université de BAMAKO Thèse présenté pour obtenir le grade de docteur en pharmacie. 95.
- **Stabb, EV., LM. Jacobson et J. Handelsman (1994).** Zwittermicin A producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Appl. Environ. Microbiol.***60**:4404–4412.
- **Stackebrandt, E., Ludwig, W. et Weizenegger, M. (1987).** Comparative 16S rRNA oligonucleotide analyses and murein types of round-spore-forming bacilli and nonspore-forming relatives.*J. Gen. Microbiol.* 133: 2523 -2529.
- **STOVER CK., PHAM XQ., ERWIN AL., MIZOGUCHI SD., WARRENER P., HICKEY MJ et al.(2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*;406(6799) : 959-64.
- **TOURRASE NJ, HELGASON E, KLEVAN A, et al. (2011)** .Extended and global phylogenetic view of the *Bacillus cereus* group population by combination of MLST, AFLP, and MLEE genotyping data. *Food Microbiology* **28**: 236-244
- **Turnbull, P. C. B. et Kramer, J. M. (1991).***Bacillus*. In *Manual of Clinical Microbiology*, 5th edn. Edited by A. Balows, W. 1. Hausler, Jr, K. 1. p: 296 - 303.
- **VASIL M L.(1986).** *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *JPediatr* 108, 800-805.
- **VISCA P., IMPERI F., LAMONT I L.(2007).** Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* 15: 22–30.
- **WEISS C .(2002).** La résistance bactérienne : nouvelle guerre froide. *Le médecin du Québec* 37, (3) :41-49.
- **Wipat, A., et CR. Harwood (1999).** The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium, *FEMS Microb. Ecol.* **28**:1-9.