

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD DAHLEB – Blida 1



Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département De Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière sciences biologiques

Option : Microbiologie

Thème

Evaluation de l'utilisation des bactériophages vis-à-vis des germes pathogènes

Présenté par :

- HADJ MEHDI Hiba
- CHIKH Sidali
- ABIDI Mohamed

Devant le jury :

Présidente : BOUKRETA. S	M.A.A.	Université de Blida 01
Examinatrice : TOBBAL SGHEIR. S	M.A.A.	Université de Blida 01
Promotrice : HAMAIDI-CHERGUI. F	Professeur	Université de Blida 01
Co-promoteur : ZIANI Borhane	M.R.A	Centre de recherche scientifique

CRAPC

Promotion : 2020-2021

Remerciements

En tout premier lieu, nous tenons à remercier « Allah », le tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté, la patience, la santé et la force pour accomplir et dépasser toutes les difficultés de ce travail.

Nos profonds remerciements s'adressent à notre promotrice Prof. Hamaidi pour l'encadrement exemplaire qu'elle nous a accordé. Nos vifs remerciements s'adresse également à notre Co promoteur Dr. Ziani Borhane Eddine Cherif pour le suivi de notre travail est et l'effort précieux que vous avez apporté.

Nous remercions les membres de jury pour l'intérêt porté à notre travail, Merci à Mme Boukreta qui nous à fait l'honneur d'avoir bien voulu présider le jury

Merci Mme Tobal pour le temps que vous avez consacré à lire et examiner notre mémoire

Nos remerciements les plus chaleureuses s'adressent à toute l'équipe du laboratoire centrale de l'hôpital de kolea qui ont aidé à la réalisation de ce travail. Nous remercions tout particulièrement monsieur le chef du service Mr. Aouni Djamel, Mr.Zaibek Toufik, Mme khireddine Djamila, Et Mr. Moumni. Merci pour vos qualités humaines, vos précieux conseils, et surtout pour l'encouragement et le bonheur que vous nous avez apporté au quotidien.

Nous adressons également nos vifs remerciements à tous le personnel du centre de recherche scientifique CRAPC de Bou Ismail qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

Nous remercions à l'occasion nos chères professeurs Mme Mohamed Mahmoud et Mme Debib.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail particulièrement à mes chers parents, qui ont consacré leur existence à bâtir la mienne, pour leur soutien, patience et soucis de tendresse et d'affection pour tout ce qu'ils ont fait pour que je puisse arriver à ce stade.

*A mon père «**Mourad**», qui est toujours disponible pour moi et prêt à m'aider, je lui confirme mon attachement et mon profond respect.*

*A ma merveilleuse mère «**Abla** » qui m'a encouragé durant toutes mes études, et qui sans elle, ma réussite n'aura pas eu lieu, que je fasse ou que je dise, je me saurai plus te remercie comme il se doit.*

*A ma petite sœur «**Weam** » ça ne suffit pas de dire simplement ma sœur avec votre tendresse votre amour. Vous m'avez soutenu pendant mes moments de faiblesse, de peur et de stress je te souhaite tout le bonheur du monde que Dieu vous bénisse.*

*A tous les familles «**HADJ MEHDI**» et «**ABABZI**»*

Pour leurs encouragements.

*A mes chères trinôme pour les plus beaux souvenirs que je garderai toute ma vie et à toutes ses familles «**Mohamed et Sidali** ».*

Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur.

Enfin a tous mes amis que je n'ai pas cité et tous ceux qui me connaissent.

Je vous dis Merci

Hiba

Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

*A l'homme de ma vie, mon précieux offre de Dieu, mon support, qui est toujours disponible pour moi, symbole de bonté de soutien et de compréhension mon cher père «**Hamid**».*

*A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse, synonyme de sagesse, d'amour et de courage, mon adorable mère «**Nassima** ».*

Mes chers parents, je vous remercie pour vos sacrifices, votre amour, soutien et vos prières accompagnées tout au long de mes études. Sans vous je ne suis pas là.

*A mes adorables frères «**Redouane et Abderahmane** », ma force dans la vie.*

En témoignage de la fraternité, avec mes souhaits de bonheur et de santé et de succès.

*A mes chères trinôme pour les plus beaux souvenirs que je garderai toute ma vie et à toutes ses familles « **Mohamed et Hiba** ».*

*A mes amis «**Samir, Bidjed, Idriss, iskander ,hacen , fatima zohra , lina , mellisa**» pour les plus beaux souvenirs que je garderai toute ma vie. C'était vraiment un plaisir d'être avec vous et de vivre des moments formidables et importants avec vous, je vous souhaite une vie pleine de joie.*

A tout ceux qui ne sont pas mentionnés dans ce modeste travail mais qui sont dans mon cœur.

A tout qui me connaisse de près ou de lo

Sidali

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère

*A l'homme mon précieux offre d'Allah, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect, mon très cher père : **Rabah** , tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.*

*A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse, mon adorable mère : **Nacera***

*A ma grande mère : **kelthoum***

*Sans oublier mon trinôme, **Sidali et Hiba** pour ses soutient morales, ses patiences et ses compréhensions tout au long de ce projet,*

A celui qui j'adore beaucoup qui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles,

À mes amis de toujours en souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère, je vous aime.

Et à tous ceux qui m'aiment

Mohamed

Liste des figures

Figure 1 : Chaîne de transmission.....	4
Figure 2 :Types d'infections nosocomiales.....	4
Figure 3 :Pourcentage des micro-organismes isolés des infections nosocomiales en France ..	6
Figure 4 : Structure générale des bactériophages T4	11
Figure 5 : Principales familles des bactériophages selon ICTV (a-Siphoviridae b- Podoviridae c-Filamentous phage)	12
Figure 6 : Phages T4 adsorbés à la surface d' <i>Escherichia coli</i> , vus au microscope électronique.....	15
Figure 7 : Etapes de cycle lytique et lysogénique d'un bactériophage.....	16
Figure 8 : Principe et résultat de la méthode d'isolement en quadrant.....	25
Figure 9 : Étapes de la coloration du Gram.....	26
Figure 10 : test d'oxydase	27
Figure 11 : Recherche d'une nitrate réductase.....	28
Figure 12 : Test d'agglutination Pastorex Staph-plus	29
Figure 13 : Test d'agglutination Pastorex Strep.....	30
Figure 14 : MALDI -TOF Biotyper - CM de Bruker Daltonic (CRAPC) et son Principe de fonctionnement.....	34
Figure 15 : Antibiogramme sur MH simple et MH au sang	38
Figure 16 : conservation des souches sur gélose conservateur	38
Figure 17 : Organigramme du protocole opératoire.....	39
Figure 18 : Echantillons d'eau usée, de boue liquide et semi-solide.....	40
Figure 19 : Système de filtration	42
Figure 20 : Etape d'enrichissement en bactériophage.....	43
Figure 21 : Filtration par seringue.....	44
Figure 22 : Solution phagique diluée	44
Figure 23 : Cadrant de la boîte pétrie.....	45
Figure 24 : Technique de double couche d'agar	46
Figure 25 : Technique de spot.....	46
Figure 26 : technique de découpage de gélose.....	47
Figure 27 : techniques des 4 dernières dilutions	48
Figure 28 : l'efficacité d'un phage testée in vitro avec 3 bactéries hôte (<i>CiF</i> , <i>Ecoli</i> , <i>KiP</i>) à 37 C° et à 27 C°	48

Figure 29 : technique de combinaison phage-ATB.....	49
Figure 30 : Résultat de la coloration de Gram	53
Figure 31 : a : Bacille à Gram négatif (BGN), b : Cocci à Gram positif (CGP), c : bacille à Gram positif (BGP), d : levure (Fungi) après coloration de Gram	53
Figure 32 : test d'oxydase positif	54
Figure 33 : Test de la coagulase +.....	54
Figure 34 : Test d'agglutination (Pastorex staph-plus) : facteur de liaison au fibrinogène = Clumping factor, Protéine A Antigènes	55
Figure 35 : test de DNase	55
Figure 36 : la mini galerie de l'espèce <i>staphylococcus epidermidis</i>	56
Figure 37 : la mini galerie de l'espèce <i>staphylococcus aureus</i>	56
Figure 38 : API Staph (espèce <i>staphylococcus aureus</i>)	56
Figure 39 : Résultats de l'identification des streptocoques et entérocoques.....	57
Figure 40 : Résultat de l'agglutination de streptocoque de groupe antigénique B	58
Figure 41 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur King B pigmentation bleu	59
Figure 42 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur King A pigmentation verte	59
Figure 43 : API 20 NE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
Figure 44 : <i>Morganella morgani</i>	60
Figure 45 : <i>Serratia marcescens</i>	61
Figure 46 : <i>Escherichia coli</i>	61
Figure 47 : <i>Enterobacter cloacae</i>	61
Figure 48 : Profil de l'antibiogramme pour les entérobactéries isolées.....	63
Figure 49 : profil d'antibiogramme pour les <i>Pseudomonas</i> isolées	64
Figure 50 : Profil d'antibiogramme pour les <i>staphylococcus</i> isolés	64
Figure 51 : profil d'antibiogramme pour les streptocoques et les entérocoques isolées.....	65
Figure 52 : antibiogramme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> résistante à la ceftazidime.....	65
Figure 53 : profil de résistance de <i>Proteus mirabilis</i>	66
Figure 54 : profil de résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	66
Figure 55 : Absence de trouble dans les 7 tubes du 1er essai après l'étape d'enrichissement	69
Figure 56 : Différence entre les tubes témoin à droite et les tubes positifs à gauche	69
Figure 57 : Résultat de la filtration par seringue des EF.....	70
Figure 58 : phagogramme d' <i>E. coli</i> dans l'essai 01 :.....	74
Figure 59 : présence deux plages de lyse (phagogramme de <i>pseudomonas aeruginosa</i>).....	74

Figure 60 : pour <i>Escherichia coli</i> à gauche le témoin positif (LB + bactérie) à droite la coupe de gélose de la plage de lyse sans trouble après incubation 5h.....	76
Figure 61 : résultat de culture de 3 dernières dilutions de phage avec <i>Citrobacter freundii</i>	76
Figure 62 : courbes de croissance des bactéries à 37 C° par heure.....	77
Figure 63 : courbes de croissance des bactéries en présence des phages lytiques à 37 C° par heure	77
Figure 64 : courbes de croissance des bactéries en présence des phages lytiques à 27 C° par heure	78

Liste des tableaux

Tableau I. Persistance des bactéries nosocomiales sur les surfaces.....	6
Tableau II. Tableau de classification des principaux ordres de phages détaillant le type de génome et les spécificités qui sont associées	12
Tableau III. Synthèse des avantages et inconvénients de l'utilisation thérapeutique des bactériophages	19
Tableau IV. Avantages et inconvénients comparés de la phagothérapie et de l'antibiothérapie	20
Tableau V. Origine des prélèvements biologiques et services concernés.....	24
Tableau VI. Galeries API SYSTEM	30
Tableau VII : Technique d'antibiogramme (diffusion de disque).....	37
Tableau VIII. Prélèvements réalisés dans la station d'épuration de Beni Merad	40
Tableau IX. Méthodes de filtration suivies pour l'obtention des phages isolés	42
Tableau X. Nombre de prélèvements positifs / Service et par prélèvements pathologiques ..	51
Tableau XI. Aspect des cultures des germes isolés dans cette étude	52
Tableau XII. Résultat du catalase et d'oxydase	54
Tableau XIII. Différenciation entre les <i>Staphylococcus</i> et les <i>Micrococcus</i>	55
Tableau XIV. Principaux caractères de la mini galerie	56
Tableau XV. Résultats des tests positifs pour les différentes espèces de <i>staphylococcus</i> dans la galerie API Staph.....	56
Tableau XVI. Caractères positifs et négatifs des entérocoques et des streptocoques (API 20 Strep)	58
Tableau XVII. Résultat d'API 20 NE, API 20E pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
Tableau XVIII. Caractères positifs et négatifs des entérobactéries isolées dans l'API 20 E .	60
Tableau XIX. Nombre total des isolats par espèces identifiés dans cette étude	62
Tableau XX. Récapitulatif des Bactéries multi résistantes (BMR) sélectionnées pour la suite de l'étude	67
Tableau XXI. Identification des souches par MALDI TOF	68
Tableau XXII. Nombre d'isolats de phages par bactérie cible	70
Tableau XXIII. Nombre d'isolats de phages obtenu par échantillons.....	71
Tableau XXIV. Nombre d'isolats par rapport aux 25 souches des BMR.....	72
Tableau XXV. Nombre de plage de lyse par espèces	73
Tableau XXVI. Concentration de bactériophage /ml dans chaque préparations phagiques ...	75

Liste des abréviations

ACi : *Acinetobacter baumannii*

ATCC : American Type Culture Collection

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ADNsb : Acide désoxyribonucléique simple brin.

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché.

ARN : Acide ribonucléique.

ARNm : Acide ribonucléique messenger.

ARNsb : Acide ribonucléique simple brin.

ATB : Antibiotique.

BEA : gélose à l'esculine biliaire

BLSE : bêta-lactamase à spectre étendu

BMR : Bactérie multirésistante.

CiF : *Citrobacter freundii*

ECBU : examen cytobactériologique des urines

Ecoli : *Escherichia coli*

ERV : entérocoque résistante à la vancomycine

FDA : Food and Drug Administration.

GN : Gélose Nutritive.

GSC : Gélose au sang cuit

GSF : Gélose au sang frais

HCASE : résistantes aux céphalosporines de 3e génération par haut niveau de production de céphalosporinase

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses.

IN : INFECTION NOSOCOMIALE

KiP : *Klebsiella pneumoniae*.

LB : Luria-Bertani

LCR : liquide céphalo-rachidien

LPS : lipopolysaccharides

MH : Muller-Hinton.

MOI : "multiplicity of infection"

OMS : Organisation mondiale de la santé.

PAS : Phage-antibiotique synergy.

PLR : protéine de liaison au récepteur

PsA : *Pseudomonas aeruginosa*

PrM : *Proteus mirabilis*

R : Résistance.

RT : room temperature

RVB : Rapport du virus sur bactérie.

SaA: *Staphylococcus aureus*

SEA-PHAGES: Science Education Alliance-Phage Hunters Advancing Genomics and Evolutionary Science.

SM: Sodium-Magnésium.

UFP/ml : Unité formatrice de plages de lyse, par millilitre.

UV : Ultraviolet. SaA

Résumé

Les infections nosocomiales sont causées par des germes opportunistes souvent résistants aux antibiotiques et persistants sur les surfaces, représentant une source constante de risque d'infection en milieu hospitalier. Dans ce contexte, l'isolement et la caractérisation de bactériophages s'attaquant spécifiquement aux bactéries nosocomiales, pourraient fournir une alternative bactéricide naturelle contre ces bactéries.

Cette étude prospective a porté sur 179 prélèvements cliniques issus de patients de l'EPH de koléa, 87 prélèvements se sont révélés positifs. Les résultats de l'identification ont permis de caractériser 85 souches. L'étude du profil de résistance vis à vis des antibiotiques a montré que parmi les 85 souches identifiées, 25 souches sont des BMR.

La deuxième partie est environnementale. Les échantillons d'eau et de boues liquides et semi-liquides ont été prélevés au niveau de la station d'épuration des eaux usées de Beni Merad.

L'isolement des bactériophages a été effectué par la méthode de filtration sous vide en utilisant un papier filtre de porosité 0.22µm. En appliquant plusieurs méthodes sur les 25 bactéries multirésistantes, 16 phages ont été isolés et caractérisés : quatre phages contre *Klebsiella pneumoniae*, 04 phages contre *Escherichia coli*, 03 phages contre *Staphylococcus aureus résistant (SARM)*, 02 contre *Pseudomonas aeruginosa*, 02 contre *Citrobacter freundii*, et 01 contre *Enterococcus faecalis*.

Le phagogramme et l'efficacité de lyse in vitro des phages a été testée en milieu LB à 37°C et RT et ont donné des résultats très prometteurs.

Une dernière étape de conservation des phages a été faite dans un tampon SM pour des études supplémentaires.

Mots-clés : Bactériophages, antibiotiques, bactéries multirésistantes, eau usée, boues, phagogramme

Abstract

Nosocomial infections are caused by opportunistic germs that are often resistant to antibiotics and persist on surfaces, representing a constant source of risk of infection in hospitals. In this context, the isolation and characterization of bacteriophages specifically targeting nosocomial bacteria could provide a natural bactericidal alternative against these bacteria.

This prospective study involved 179 clinical samples from Koléa EPHU patients, 87 samples were found to be positive. The results of the identification allowed the characterization of 85 strains. The study of the resistance profile to antibiotics showed that among the 85 strains identified, 25 strains are BMRs.

The second part is environmental. Samples of water and liquid and semi-liquid sludge were taken at the Beni Merad wastewater treatment plant.

Isolation of the bacteriophages was carried out by the vacuum filtration method using filter paper with a porosity of 0.22 μm . By applying several methods on the 25 multiresistant bacteria, 16 phages were isolated and characterized: fort phages against *Klebsiella pneumoniae*, 4 phages against *Escherichia coli*, 03 phages against resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), 02 against *Pseudomonas aeruginosa*, 02 against *Citrobacter freundii*, and 01 against *Enterococcus faecalis*.

The phagogram and the in vitro lysis efficiency of phages was tested in LB medium at 37 ° C and RT and gave very promising results.

A final phage conservation step was done in SM buffer for further studies.

Keywords: Bacteriophages, antibiotics, multidrug-resistant bacteria, wastewater, sludge, phagogram

ملخص

تحدث عدوى المستشفيات بسبب الجراثيم الانتهازية التي غالباً ما تكون مقاومة للمضادات الحيوية وتستمر على الأسطح ، مما يمثل مصدراً ثابتاً لخطر العدوى في المستشفيات. في هذا السياق ، يمكن أن يوفر عزل وتوصيف العاثيات التي تستهدف على وجه التحديد بكتيريا المستشفيات بديلاً طبيعياً للجراثيم ضد هذه البكتيريا

تضمنت هذه الدراسة المرتقبة 179 عينة سريرية من مرضى مستشفى القليعة ، ووجد أن 87 عينة إيجابية. سمحت نتائج سلالة تم تحديدها ، 85 سلالة. أظهرت دراسة خصائص المقاومة للمضادات الحيوية أنه من بين 85 التحديد بتوصيف هناك 25 سلالة هي باكتيريا متعددة المقاومة.

الجزء الثاني بيئي. تم أخذ عينات من الماء والحماة السائلة وشبه السائلة في محطة معالجة مياه الصرف الصحي ببني مراد م عزل العاثيات بطريقة الترشيح الفراغي باستخدام ورق الترشيح بمسامية 0.22 ميكرومتر. من خلال تطبيق عدة طرق 04، و *Klebsiella* على 25 بكتيريا متعددة المقاومة ، تم عزل وتمييز 16 عاثية: لاقمات قوية ضد الالتهاب الرئوي ، و 02 ضد *Escherichia coli* ، و 03 عاثيات ضد *MRSA* (المقاومة *Staphylococcus aureus* لاقمات ضد ، و 01 ضد المكورات المعوية البرازية *Citrobacter freundii* ، و 02 ضد *Pseudomonas aeruginosa* .

تم اختبار فاغوجرام وكفاءة التحلل في المختبر للعاثيات في وسط مرق لوريا عند 37 درجة مئوية وفي درجة حرارة الغرفة .وأعطت نتائج واعدة للغاية

تم إجراء خطوة أخيرة لحفظ العاثيات في محلول ملحي بالفوسفات لمزيد من الدراسات

الكلمات الرئيسية: البكتيريا ، المضادات الحيوية ، البكتيريا المقاومة للأدوية المتعددة ، مياه الصرف الصحي ، الحماة ، فاغوجرام

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

INTRODUCTION	1
I. INFECTIONS NOSOCOMIALES	3
I.1 Définition	3
I.2 Modes de transmission	3
I.3 Principales infections nosocomiales (IN).....	4
I.3.1 Infections urinaires nosocomiales	4
I.3.2 Infections respiratoires	5
I.3.3 Infections du site opératoire	5
I.3.4 Bactériémies et septicémies	5
I.3.5 Autres infections	5
I.4 Bactéries nosocomiales	5
II. RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES	7
II.1 Définition	7
II.2 Types de résistance.....	7
II.3 Bactéries multi-résistantes (BMR) et infections nosocomiales.....	8
III. BACTERIOPHAGES	9
III.1 Définition	9
III.2 Structure et classification	9
III.2.1 Composition et structure	9
III.2.1.1 Génome viral	10
III.2.1.2 Diversité des capsides	10
III.2.2 Classification	11

III.3	Habitat	14
III.4	Résistance dans l'environnement.	14
III.5	Relation phage/cellule hôte.	15
III.6	Cycle de multiplication des bactériophages.	15
III.6.1	Cycle lytique (phage virulent)	16
III.6.1.1	Adsorption	16
III.6.1.2	Injection.....	17
III.6.1.3	Expression du génome phagique.....	17
III.6.1.4	Assemblage et relargage.....	18
III.6.1.5	Lyse cellulaire	18
III.7	Phagothérapie	19
III.7.1	Définition	19
III.7.1.	Principe d'utilisation de la phagothérapie	20
III.8	Résistance bactérienne au bactériophage	21
I.	MATERIEL ET METHODES.....	23
1.	Matériel	23
1.1	Matériel biologique	23
1.2	Matériel non biologique	23
2.	Méthode expérimentale	24
2.1	Souches hospitalières	24
2.1.1	Provenance des souches	24
2.1.2	Méthodes d'isolement	24
2.1.3	Techniques d'identification utilisées	25
2.1.4	Spectrométrie de masse	34
2.1.5	Étude de l'antibiorésistance	36
2.1.6	Stockage/conservation des souches.....	38
2.2	Bactériophages	39
2.2.1	Prélèvement des échantillons	39
2.2.2	Isolement des bactériophages.....	41
2.2.2.1	Filtration	41
2.2.2.2.	Enrichissement en bactériophages.....	43

2.2.2.3	Préparation des échantillons à tester pour la recherche de phages	44
2.2.2.4	Formation d'un tapis bactérien : double couche d'agar	44
2.2.2.5	Tests de confirmation des bactériophages.....	46
2.2.2.6	Efficacité in vitro.....	48
2.2.3	Combinaison phage-ATB.....	49
2.2.4	Purification	49
2.2.5	Conservation des phages	50
II.	RESULTATS ET DISCUSSION	51
1.	Résultats du dénombrement	51
2.	Résultats Isolement et identification des souches	51
3.	Résultats de l'antibiogramme.....	62
4.	Identification par MALDI TOF.....	67
5.	Résultats sur les bactériophages	68
5.1	Isolement des bactériophages.....	69
5.2	Titration des bactériophages.....	72
5.3	Tests de confirmation des bactériophages.....	75
5.4	Efficacité in vitro.....	76
5.5	Combinaison phage-ATB.....	78
	Discussion.....	79
	CONCLUSION.....	86
	Références bibliographiques	
	Annexes	

Introduction

INTRODUCTION

La découverte des antibiotiques a constitué une véritable et importante révolution médicale qui a sauvé et qui sauve des millions de vies chaque année (Parveau, 2011).

Depuis l'introduction au milieu des années 40, des antibiotiques en usage clinique et agricole, les microorganismes ont montré une remarquable capacité à se protéger en développant des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Actuellement, il y a de plus en plus de problèmes dans le monde avec les bactéries multirésistantes à cause de l'utilisation non rationnelle des antibiotiques sachant que les BMR sont des bactéries résistantes à un ou plusieurs antibiotiques (Dennesen et *al.*, 1998).

Bien qu'une grande attention soit actuellement accordée aux agents pathogènes à Gram positif et mycobactéries, les bactéries à Gram négatif, en particulier celles présentant un phénotype multirésistance, peuvent toujours constituer une menace sérieuse de maladies infectieuses (Poole, 2004).

L'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques et le manque de moyens thérapeutiques ont ramené sur le devant de la scène une thérapeutique ancienne oubliée : la phagothérapie. Cette méthode consiste à mettre à profit les armes que l'évolution a créé pour lutter contre les bactéries. Ces armes sont les bactériophages (Ravat et *al.*, 2015).

Les bactériophages font partie de la grande famille des virus. Ils n'ont de particulier que leur spécificité, à savoir qu'ils infectent exclusivement des bactéries. En tant que virus, ils ont un mode de propagation classique : ils se multiplient au détriment des bactéries, ils ont été découverts au début du 20^{ème} siècle en France (Debarbieux, 2008). Ils sont présents et actifs dans la nature ce qui les rend facile à isoler et à utiliser (Massali and Bouaninba, 2016).

Leur utilisation est reconsidérée dans de nombreux pays devant le double constat du développement inquiétant des infections nosocomiales à bactéries multirésistantes et de l'absence de nouveaux antibiotiques efficaces. Aujourd'hui, des applications sont envisagées non seulement dans le domaine médical mais aussi dentaire, vétérinaire, agricole ou environnemental (Dublanchet, 2008).

La phagothérapie est l'utilisation de bactériophages (parfois simplement appelés phages) dans le but de traiter et de guérir des infections bactériennes. La phagothérapie est donc un traitement spécifique de maladies bactériennes par des phages. Elle met à profit les

propriétés destructrices, lytiques et spécifiques de tel ou tel phage vis à vis d'une bactérie infectante (Courtault, 2014.)

En Algérie, très peu d'études se sont intéressées à l'isolement des bactériophages à partir du sol ou des eaux usées. Aucune recherche n'a été réalisée sur les bactériophages à des fins thérapeutiques alors qu'ils méritent plus d'attention vu leur importance.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude préliminaire qui vise à isoler les bactériophages à partir des eaux usées et des boues et de les appliquer sur des bactéries multirésistantes. Nous nous sommes fixées les objectifs suivants :

- (i)-Isolement et identification des souches bactériennes à partir de différents types de prélèvements pathologiques au niveau de l'hôpital de Koléa,
- (ii)- Évaluation de la sensibilité des souches isolées *vis-à-vis* des antibiotiques,
- (iii)-Prévalence des souches multirésistantes ou BMR,
- (iiii) Isolement des bactériophages à partir des échantillons d'eau usée et de boues liquides et semi-liquides,
- (iiii)- Evaluation de leur pouvoir thérapeutique sur les bactéries multirésistantes par l'étude du phagogramme et leur efficacité *in vitro*.

Enfin de rechercher le meilleur moyen pour assurer leur conservation en vue d'études plus approfondies sur leurs propriétés antigéniques et médicales.

Revue bibliographiques

I. INFECTIONS NOSOCOMIALES

I.1 Définition

Les infections nosocomiales (du latin nosocomium signifiant hôpital) sont des infections chez les patients hospitalisés qui n'étaient ni ne présentes ni en incubation au moment de l'admission du patient à l'hôpital. En raison de la difficulté d'évaluer la présence d'une infection, une approche pratique consiste à définir toute infection bactérienne comme nosocomiale si elle devient apparente après 48 à 72 heures après l'admission. Les infections virales avec des périodes d'incubation bien définies peuvent être plus facilement attribuées à une apparition communautaire ou nosocomiale (Jenkins, 2017).

Pour les infections de stades opératoires (ou infections de site opératoire ISO), on accepte comme nosocomiale, les infections survenues dans les 30 jours suivants l'intervention ou, s'il y a mise en place d'une prothèse ou d'un implant, dans l'année qui suit l'intervention (Godin, 2012).

I.2 Modes de transmission

Il existe cinq modes de transmission des microorganismes : par contact direct ou indirect, par gouttelettes (toux, éternuement), par aérosols (ou voie aérienne), par un véhicule commun (source unique, comme la nourriture par exemple) et par un vecteur (insecte).

La transmission par les mains du personnel soignant est le meilleur exemple de transmission par contact direct. Ce mode de transmission qui est le plus répandu, nécessite un contact physique entre une personne infectée ou colonisée et un hôte réceptif (ex. : SARM). Dans la transmission par contact indirect, un hôte réceptif entre en contact avec un objet ou une surface contaminé qui sert de vecteur de transmission comme les spores de *Clostridium difficile*.

La transmission par gouttelettes projetées dans l'air sur une courte distance (moins d'un mètre), d'un patient infecté à la muqueuse nasale ou buccale d'un autre patient est plus rare. La transmission par voie aérienne désigne la dissémination de microorganismes dans l'air qui peuvent rester en suspension pendant de longues périodes (ex. : tuberculose, varicelle, rubéole) (Martineau, 2009) (Figure 1).

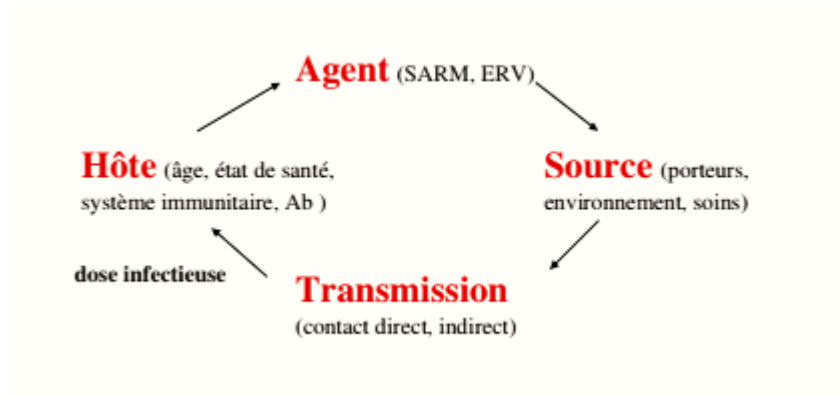


Figure 1 : Chaîne de transmission(Martineau, 2009.)

I.3 Principales infections nosocomiales (IN)

L'infection nosocomiale est très variable, selon la région étudiée, le type de service hospitalier et les patients concernés. Les sites les plus fréquemment infectés sont les sites urinaires, opératoires et pulmonaires (Figure 02)(Courtault, 2014)

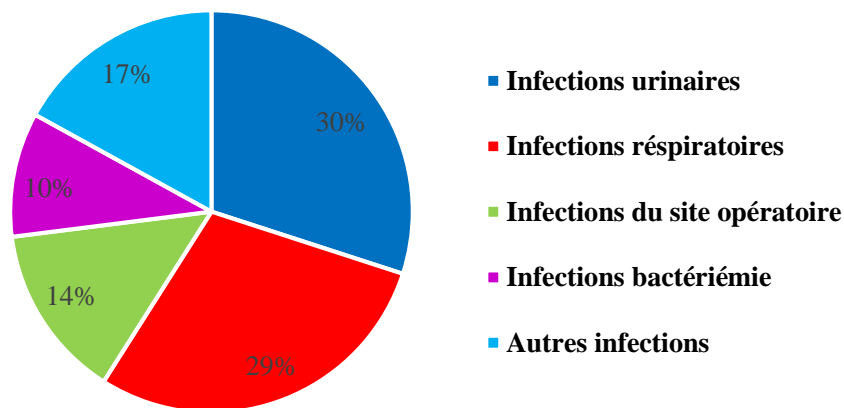


Figure 2 :Types d'infections nosocomiales.(Courtault, 2014)

I.3.1 Infections urinaires nosocomiales

L'infection urinaire est la plus fréquente des infections nosocomiales. Elle occupe le premier rang avec 30à 40% des infections acquises à l'hôpital, cela s'explique par l'utilisation courante des bandelettes urinaires (Dia et al., 2008). 80% de ces infections sont associées à la mise en place d'une sonde vésicale, comme environ 15% des patients hospitalisés seront sondés au cours de leur hospitalisation (Belhamal et al., 2020).

I.3.2 Infections respiratoires

Elles sont à la première place des infections dans les unités de réanimation et de soins intensifs (Belhamal *et al.*, 2020). Fréquemment, les facteurs de risque sont les dispositifs invasifs : ventilation mécanique, intubation trachéale ainsi que les sondes naso-gastriques (42,1%) qui peuvent causer 29% des infections nosocomiales pulmonaires (Dia *et al.*, 2008).

I.3.3 Infections du site opératoire

Toute intervention chirurgicale peut se compliquer d'une infection du site opératoire (ISO), qui résulte de la multiplication d'un agent infectieux. Cette infection représente la troisième cause des maladies nosocomiales (13,5%) (Belhamal *et al.*, 2020; Drancourt *et al.*, 2004).

I.3.4 Bactériémies et septicémies

Les septicémies sont des affections graves, responsables d'une morbidité et d'une mortalité significatives à travers le monde. Le taux de mortalité observé varie entre 30 à 50 % des cas. Leur importance clinique est souvent sous-estimée en Afrique subsaharienne. Ces affections constituent une urgence diagnostique et thérapeutique. Elles sont généralement évoquées sur des arguments cliniques, mais leur diagnostic repose sur l'isolement de germes par les hémocultures (Accrombessy *et al.*, 2014). Une bactériémie nosocomiale est définie comme une hémoculture positive documentée plus de 48 heures après l'admission du patient associée à la présence de signes cliniques évocateurs d'un état septique (Lakikza *et al.*, 2018).

I.3.5 Autres infections

Il existe de nombreux autres sites potentiels d'infections comme les infections de la peau (ulcères, brûlures, escarres), les infections de l'œil et de la sphère ORL, les infections des voies génitales, ainsi que les infections gastro-intestinales (Johnson *et al.*, 2007; Samou Fotso, 2005).

I.4 Bactéries nosocomiales

Les bactéries représentent 90% des micro-organismes impliqués dans les infections nosocomiales (Lakikza *et al.*, 2018).

Les bacilles à Gram négatif constituent 60% des germes rencontrés, représentés majoritairement par *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Les

coques à Gram positif, quant à eux constituent 30% et sont représentées essentiellement par les genres *Staphylococcus* et *Enterococcus* (Belhamal et al., 2020)(Figure 03).

Les trois principaux micro-organismes responsables des infections nosocomiales représentent 50,3% des cas, avec *Escherichia coli* (26%), *Staphylococcus aureus* (15,9%) et *Pseudomonas aeruginosa* (8,4%). A noter que les dix micro-organismes les plus fréquemment rapportés représentent 75,9% des cas d'infections nosocomiales (Figure 03)

La persistance des bactéries sur les surfaces est représentée par le Tableau I.

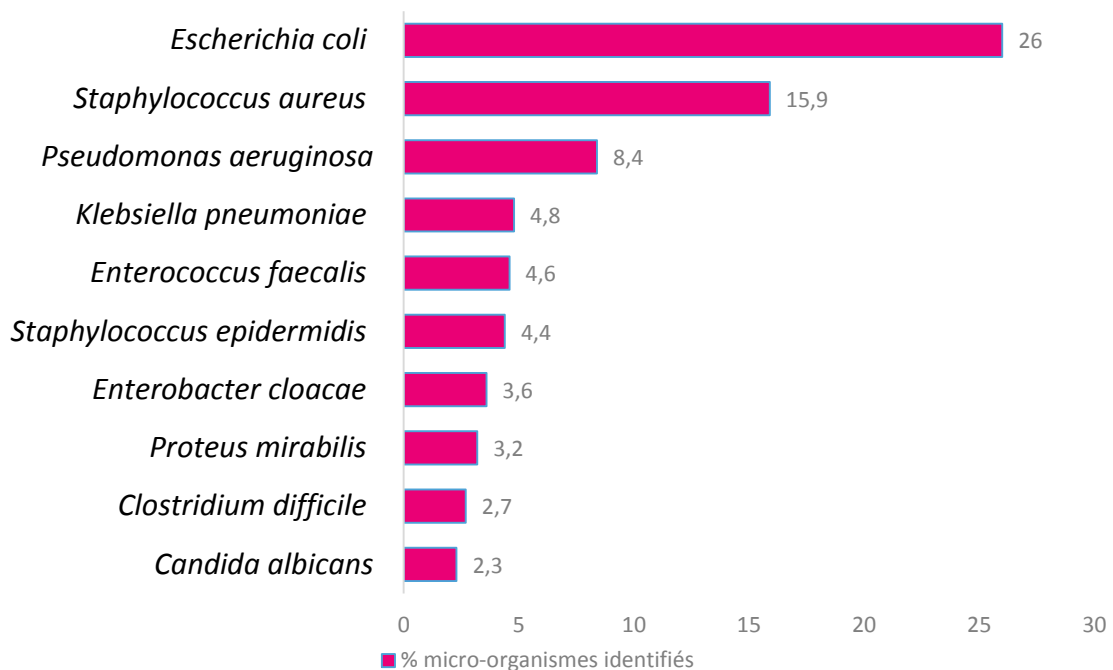


Figure 3 : Pourcentage des micro-organismes isolés des infections nosocomiales en France (Courtault, 2014)

Tableau I. Persistance des bactéries nosocomiales sur les surfaces

Type de bactérie	Durée
<i>Staphylococcus aureus</i>	7 jours-7 mois
<i>Acinetobacter sp</i>	3 jours à 5 mois
<i>Clostridium difficile</i> (spores)	5 mois
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6h-16mois/ sur planchers 5 sem
<i>Enterococcus sp</i>	5 jours à 4 mois

(Martineau, 2009.)

II. RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES

II.1 Définition

La résistance aux antibiotiques est la résistance d'une bactérie à un antibiotique auquel était jusque -là sensible (Meskine et *al*, 2016). On peut dire aussi qu'une souche est résistante lorsqu'elle est capable de supporter une concentration d'antibiotiques beaucoup plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (Pistes, 2002).

II.2 Types de résistance

La progression de la résistance bactérienne aux antibiotiques cause des infections difficiles à traiter et pose un problème de santé publique. Les bactéries résistantes sont souvent la cause des infections nosocomiales aggravant le pronostic des malades, prolongent leur hospitalisation et augmentent les coûts de traitement (Billy, 2003).

On distingue deux types de résistance bactérienne :

❖ Résistance naturelle

La résistance naturelle ou résistance intrinsèque est une caractéristique propre à une espèce bactérienne et partagée par toutes les souches de cette espèce. Elle peut être due à la présence d'un gène chromosomique commun à toutes les bactéries de l'espèce. Pour chaque classe d'antibiotique, il existe des espèces bactériennes pour lesquelles l'antibiotique est inactif par défaut de cible ou d'accès à la cible. Ainsi, l'absence de paroi chez les mycoplasmes rend les β -lactamines inactives vis à vis de ces bactéries (Meskine, 2016).

❖ Résistance acquise

La résistance bactérienne acquise à un antibiotique est un phénomène qui apparaît au niveau des souches d'une espèce donnée, normalement sensible à cet antibiotique. C'est l'acquisition d'un facteur génétique qui se traduit par une réduction de la sensibilité à la molécule qui lui était fatale. Elle peut donc se faire soit par mutation chromosomique soit par acquisition des gènes transférés d'un autre micro-organisme (Meskine, 2016).

❖ Multirésistance

La définition de la multirésistance est difficile à établir. Il est couramment admis de parler de multirésistance lorsqu'une souche bactérienne a accumulé sur son profil sauvage de

sensibilité aux antibiotiques des résistances acquises telles que la souche ne reste sensible qu'à un nombre restreint d'antibiotiques utilisables en thérapeutique (Cattoen, 2015).

II.3 Bactéries multi-résistantes (BMR) et infections nosocomiales

Les BMR représentent 20 à 30 % des infections nosocomiales. L'utilisation massive des antibiotiques à l'hôpital détermine une pression de sélection favorisant l'émergence des BMR. Chez les patients, cette pression de sélection amène une réduction des flores commensale et saprophyte en faveur des BMR, soit en portage soit directement impliquées dans des processus pathogènes. Dans l'environnement, la pression de sélection exercée par les antibiotiques et antiseptiques renforce l'émergence des bactéries les plus résistantes. Ces réservoirs de BMR, environnementaux et humains, conjugués aux nombreux facteurs de risque de transmission croisée de pathogènes en milieu hospitalier (densité de population, fréquence des soins, mobilité des malades au sein de la structure...) favorisent l'implication des BMR dans les infections nosocomiales (Errafyg, 2016).

Parmi les BMR impliquées dans les infections nosocomiales, on retrouve notamment : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), les entérocoques résistant à la vancomycine (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*), *Pseudomonas aeruginosa* résistant (PAR) à la ceftazidime et aux carbapénèmes, les entérobactéries (notamment *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) résistantes aux céphalosporines de 3^e génération par haut niveau de production de céphalosporinase (HCASE) ou par sécrétion d'une bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) et *Acinetobacter baumannii* multirésistant (Errafyg, 2016).

III. BACTERIOPHAGES

III.1 Définition

Les bactériophages font partie des virus. Ils ont le mode classique de reproduction de l'ensemble des virus qui ne peuvent se multiplier qu'aux dépens de cellules vivantes qu'ils parasitent. Les bactériophages forment cependant un groupe particulier car ils n'utilisent que les constituants des cellules procaryotes qui sont appelées bactéries hôtes (Dublanche Alain, 2017) et les archées (Ye et *al.*, 2019) et n'ont pas d'impact sur les tissus humains ((Hamzeh, 2014).

Les bactériophages sont présents partout sur la planète et sont reconnus comme étant l'entité vivante la plus abondante sur Terre. Ils seraient dix fois plus nombreux que les bactéries (Jończyk et *al.*, 2011). En effet, on estime entre 10^{30} et 10^{32} bactériophages dans notre environnement. Ils se retrouvent dans les océans, dans le sol, dans l'eau potable et même dans la nourriture que nous consommons. Chaque phage contient son génome qui est enveloppé dans une couche de protéines ou de lipoprotéines appelée capsid (Kutter et Sulakvelidze, 2004)

III.2 Structure et classification

III.2.1 Composition et structure

Les bactériophages sont de taille beaucoup plus petite que les bactéries. En générale, leur taille varie de 20 à 300 nm. Ce sont des particules visibles uniquement au microscope électronique grâce à l'utilisation de la coloration négative (Massali et *al.*, 2016) Les bactériophages possèdent tous la même structure générale(Figure 4) (St-Pierre-Lemieux, 2014) relativement simple composée de protéines (60%) qui encapsulent le génome (40%) (Ye et *al.*, 2019).

- L'acide nucléique porteur de l'information génétique sous la forme d'un ARN (Magin, 2019). Sachant que les phages à ARN sont plus stables que les phages à ADN (Pierre-Collet, 2010).
- La capsule de protéine appelée capsid permet au bactériophage de protéger son code génétique contre le milieu et de faciliter l'entrée dans l'hôte (St-Pierre-Lemieux, 2014).
- L'acide nucléique associé à la capsid forme la nucléocapsid que l'on appelle aussi « tête » du bactériophage. Dans certains cas, cette dernière peut être entourée de lipides et de protéines virales formant une enveloppe, on parle alors de phages « fragiles », *a*

contrario des phages non enveloppés qui sont qualifiés de « résistants »(Guttman et *al.*, 2005)

- La queue rigide ou flexible de longueur variable, peut être contractile ou non, elle constitue un tube creux, recouvert d'une gaine protéique portant également quelques enzymes (lysosomes) pour percer la paroi bactérienne (Bourema et *al.*, 2014) (Figure 4).

III.2.1.1 Génome viral

L'information génétique portée par le génome viral est à l'origine de la synthèse des protéines virales. Ce dernier est constitué d'une molécule d'acide nucléique (ADN ou ARN) qui peut être bicaténaire (double brin) ou monocaténaire (simple brin), segmenté ou non, mais également linéaire ou circulaire (Magin, 2019) .

III.2.1.2 Diversité des capsides

La capside, est une coque de nature protéique qui entoure le génome et est capable d'assurer sa protection et sa persistance dans le milieu extérieur. Selon l'architecture de la capside, quatre types de symétries sont représentées parmi les phages :

- Symétrie hélicoïdale : la capside est cylindrique. Les bactériophages ont alors une forme de filaments ou de bâtonnets,
- Symétrie cubique ou icosaèdre : la capside est à symétrie icosaédrique. Les bactériophages peuvent alors apparaître sphériques,
- Symétrie binaire ou phage caudé : la capside ou « tête » est à symétrie icosaédrique et la «queue » est à symétrie hélicoïdale,
- Symétrie complexe : la capside est de forme très diverse, on parle alors de phage pléomorphe,

Les variations de forme, de taille, de symétrie dans la morphologie des phages permettent de les classer en sept groupes différents, eux- mêmes scindés en vingt et un sous-groupes, parfois composés d'éléments très polymorphes (Magin, 2019)

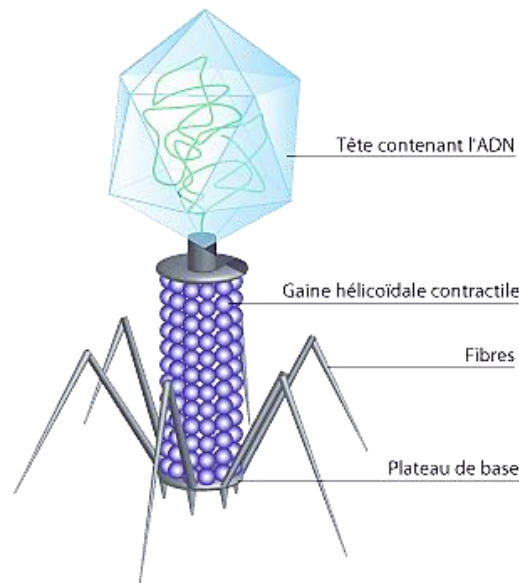


Figure 4 : Structure générale des bactériophages T4

III.2.2 Classification

Actuellement, au minimum 5500 bactériophages ont été examinés au microscope électronique et présentent des morphologies très diverses (Kolenda et *al.*, 2020).

La classification est basée sur la structure des bactériophages (Dublanchet, 2014)

Les critères de classification sont :

- La nature de l'acide nucléique (ADN ou ARN);
- La forme de la capsid (icosaédrique ou tubulaire);
- La présence ou non d'une enveloppe (péplos) (Errafyg, 2016)

Plus de 5000 bactériophages ont été analysés et ces derniers sont classés (Barrette, 2015) en *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Myoviridae* et phages filamenteux selon l'ICTV («International Committee on Taxonomy of Viruses») comme le montre la figure 5 et le Tableau II (Ye et *al.*, 2019).

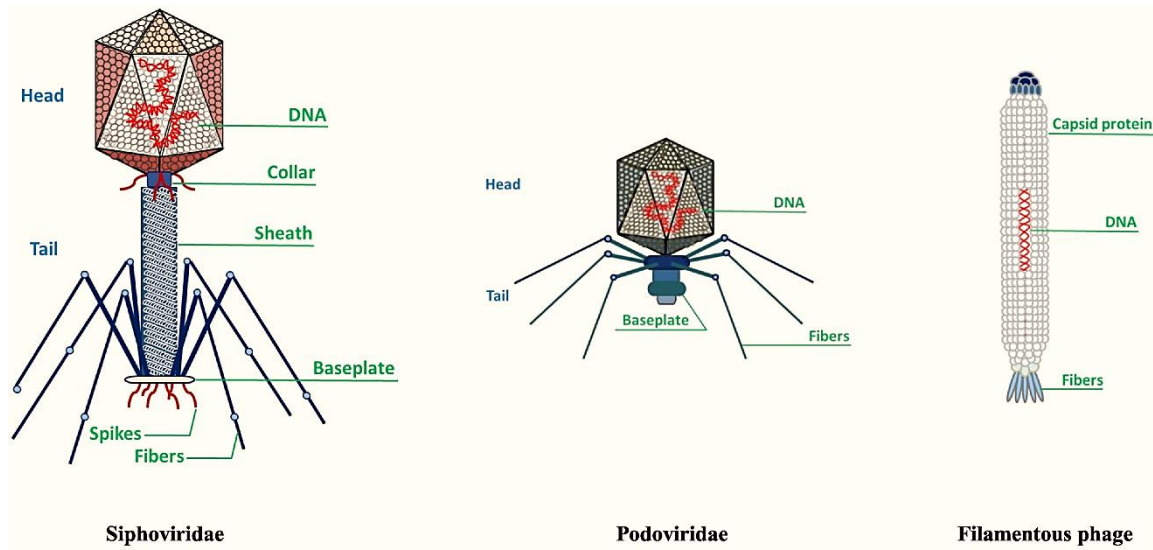


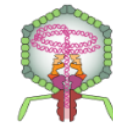
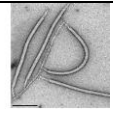






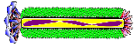
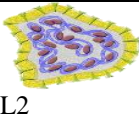
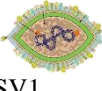
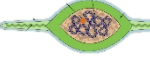

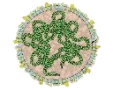



Figure 5 : Principales familles des bactériophages selon ICTV (a-Siphoviridae b- Podoviridae c- Filamentous phage) (Ye et al., 2019)

Tableau II. Tableau de classification des principaux ordres de phages détaillant le type de génome et les spécificités qui sont associées

Ordre	Famille	Symétrie	Spécificité	Génome	Genre /espèce	Exemple
Caudovirales	Myoviridae	Capsides icosaoédriques et queue hélicoïdales	Queue longue et contractile	ADN db non segmenté et linéaire	6 sous-familles /39 genres	 T4
	Siphoviridae		Queue longue mais non contractile		6 sous-familles / 94 genres	 λ
	Podoviridae		Queue courte et non contractile		3 sous-familles / 20 genre	 T7, P22
Ligamenvirales	Lipothrixiviridae	Capsides hélicoïdales	Enveloppe lipoprotéique	ADN db linéaire	3 genres / 8 espèces	 TTV1

	Rudiviridae		Dépourvu d'enveloppe		1 genre / 3 espèces	 SIRV-1
Autres	Familles n'étant rattachées à aucun ordre / phages regroupés selon la géométrie de leur capsid					
Cubiques	Corticoviridae	Capsides icosaédriques	Capside complexe	ADN db circulaire	1 genre / 1 espèce	 PM2
	Cystoviridae		Enveloppe lipidique	ARN db linéaire	1 genre / 1 espèce	 φ6
	Leviviridae		Pas d'enveloppe	ARN sb linéaire	2 genres / 4 espèces	 MS2
	Microviridae		Petite capsid non enveloppée	ADN sb circulaire	4 genres / 12 espèces	 φX174
	Tectiviridae		Pas d'enveloppe	ADN db linéaire	1 genre / 5 espèces	 PRD1
Filamenteux	Inoviridae	hélicoïdales	Pas d'enveloppe	ADN sb circulaire	2 genres / 43 espèces	 M13
Pléomorphes	Plasmiviridae	Capsides à symétries complexes	Enveloppe lipidique / pas de capsid	ADN db circulaire	1 genre / 1 espèce	 L2
	Fuselloviridae				2 genres / 9 espèces	 SSV1
	Bicaudaviridae				1 genre / 1 espèce	 ATV
	pas rattaché à une famille			le seul genre		Salterprovirus / 1 espèce

	Ampullaviridae			ADN db linéaire	1 genre / 1 espèce	 ABV
	Globuloviridae				1 genre / 2 espèces	 PSV
	Guttaviridae		Enveloppe lipidique	ADN db	2 genres / 2 espèces	 SNDV

(Magin, 2019)

III.3 Habitat

Tous les bactériophages participent à un vaste écosystème dans une relation dynamique avec tous les micro-organismes (Dublanche Alain, 2017) .

La plupart des particules virales de différentes niches écologiques correspondent à des bactériophages. Ces derniers sont fréquemment retrouvés dans le sol avec 10^7 - 10^9 phages/g de sol et dans les environnements aquatiques avec 10^7 particules virales par millilitre d'eau. Dans le milieu marin, les virus constituent 94% du matériel génétique global et sont 15 fois plus nombreux que les bactéries et les archées. Dans toutes les niches écologiques, l'abondance des bactériophages varie généralement avec la densité et la croissance des bactéries. Cette relation est exprimée par le rapport du virus sur bactérie (RVB) (Essoh, 2013).

III.4 Résistance dans l'environnement.

Dans les premières recherches de d'Hérelle en 1921, le bactériophage qu'il étudiait pouvait survivre à une température dépassant 65 °C, température létale pour la majorité des bactéries non sporulées, et ce bactériophage était assez difficilement détruits par des agents physiques (chaleur ou rayons ultra-violets par exemple) et chimique (antiseptiques par exemple).

Depuis, la recherche a fait des progrès, et a permis de comprendre qu'il n'existait pas un unique bactériophage mais des milliers de type et que chaque bactériophage possédait des caractéristiques différentes. Cependant, certaines caractéristiques sont communes à tous les bactériophages, notamment leur résistance aux milieux extrêmes, généralement meilleure que celle des bactéries (Jacquet et *al.*, 2010).

III.5 Relation phage/cellule hôte.

Les bactériophages reconnaissent à la surface de la bactérie des récepteurs spécifiques auxquels ils se lient puis injectent leur matériel génétique à l'intérieur de la bactérie. Son matériel génétique utilise le métabolisme de la bactérie afin de synthétiser les éléments viraux nécessaires à la réplication des phages (Massali et *al.*, 2016).

Tout d'abord, l'adsorption du phage à son hôte se fait généralement par l'interaction entre une protéine ou un complexe protéique retrouvé sur le phage et un récepteur spécifique à la surface bactérienne.

L'attachement peut se faire au niveau des lipopolysaccharides, des protéines de la paroi cellulaire, des acides téichoïques, des flagelles ou des pilis (Prescott et *al.*, 2003).

Chez les lactophages du groupe 936 (qui infectent *Lactococcus lactis*), l'adsorption se fait par un complexe protéique situé à l'extrémité de leur queue composé d'une protéine de liaison au récepteur (PLR) et d'une plaque basale (Spinelli et *al.*, 2020). Par contre, chez le phage T4 (figure 06), le phénomène de la reconnaissance repose sur l'interaction spécifique entre les fibres caudales du phage et les polysaccharides qui composent la couche externe de la paroi des bactéries à Gram négatif (Madigan et *al.*, 2007) ;

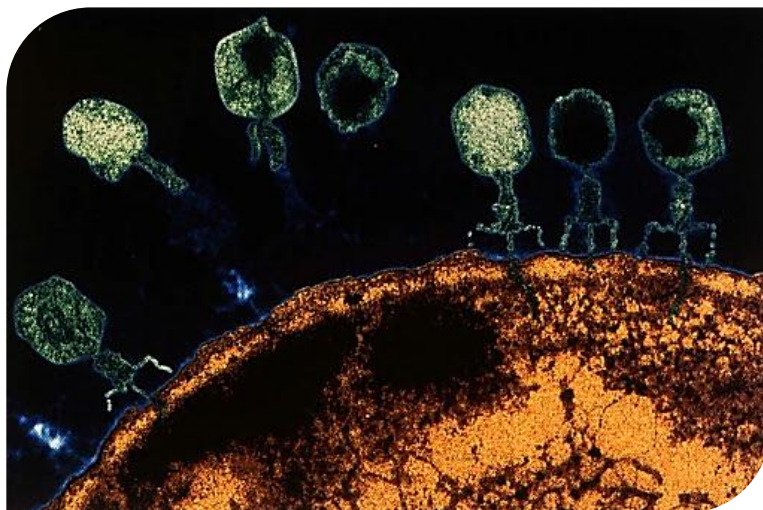


Figure 6 : Phages T4 adsorbés à la surface d'*Escherichia coli*, vus au microscope électronique, (Baguelin, 2003).

III.6 Cycle de multiplication des bactériophages.

Lorsqu'un bactériophage a la capacité d'infecter une bactérie donnée, deux principaux cycles sont possibles :

- ❖ Soit lytique les phages virulents ou lytiques’’ représentant près de 90% des bactériophages,
- ❖ Soit lysogénique ’’les phages tempérés ou endogènes’ ’représentant environ 10%,
- ❖ Ou d’autres cycles dits chronique ’’les phages filamenteux ’’représentant moins de 1% (Errafy, 2016) et pseudo-lysogénique (Magin, 2019).

Parmi tous les bactériophages existants, les plus étudiés sont le phage T4, appartenant aux phages virulents, et le phage λ , appartenant aux phages tempérés. Le type de cycle qui nous intéresse pour les traitements thérapeutiques correspond au cycle des phages virulents, appelé « cycle lytique » (Dublanche, 2009). Nous les développerons dans cette partie bibliographique.

III.6.1 Cycle lytique (phage virulent)

Le cycle lytique est un cycle de réplication virale qui va aboutir à la mort de la bactérie hôte en provoquant la lyse de cette dernière et la libération dans le milieu des particules virales (St-Pierre-Lemieux, 2014). Le processus de cycle lytique peut être décomposé en plusieurs phases (fig. 7).

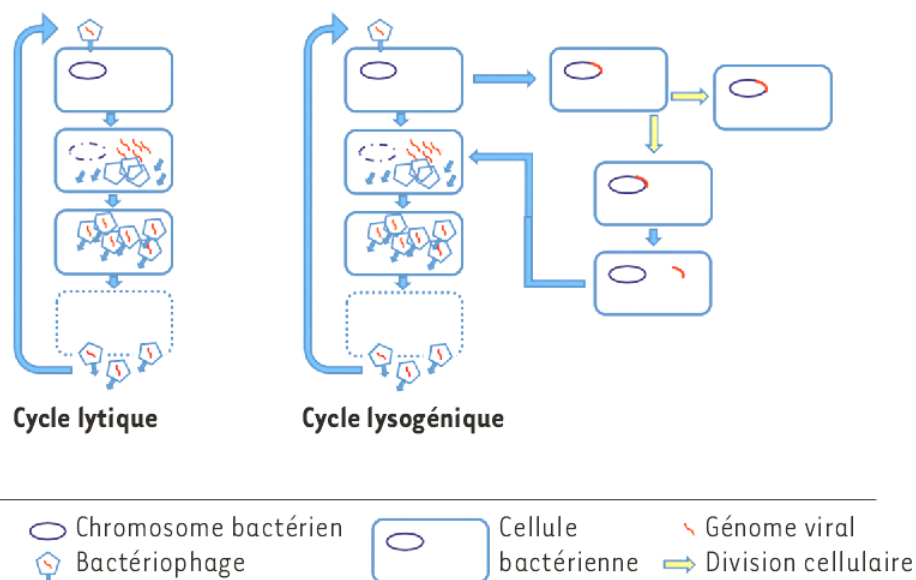


Figure 7 : Etapes de cycle lytique et lysogénique d'un bactériophage (Dufour et Debarbieux, 2017)

III.6.1.1 Adsorption

Une souche de bactériophage spécifique est connue pour être capable d'infecter une gamme d'hôtes étroite. Cette spécificité de l'interaction de la cellule bactérienne avec le phage est déterminée par la spécificité d'adsorption, qui à son tour dépend de la nature et de la structure des récepteurs de la surface cellulaire bactérienne (Rakhuba et *al.*, 2010). Les phages

s'adsorbent en deux étapes. La première, réversible, implique des interactions faibles de type Van der Waals. À ce stade, le phage peut ne pas poursuivre l'infection de la bactérie si les conditions environnementales ou intrinsèques ne le permettent pas. Parfois deux récepteurs sont impliqués dans l'adsorption. Le premier fixe le phage très en surface, par exemple une flagelline d'un flagelle bactérien. Puis des changements conformationnels engendrés par cette liaison modifient l'organisation du support du récepteur qui va alors « tracter » le phage au contact d'un second récepteur plus proche de la membrane bactérienne. L'emplacement et le type de récepteur de surface des cellules bactériennes peuvent varier (Fokine and Rossmann, 2014) : chez les bactéries Gram -, il peut s'agir des acides téichoïques de la paroi cellulaire, des protéines flagellaires ou des lipopolysaccharides (LPS). Le site d'interaction phagique quant à lui peut être situé au niveau des fibres caudales (courtes ou longues) ou au niveau de la capsid. Cette fixation, réversible à son début via des interactions électrostatiques, devient donc rapidement irréversible. Outre l'adsorption via le flagelle bactérien, certains phages peuvent également débiter leur infection en s'attachant au pili (Magin, 2019).

III.6.1.2 Injection

Une fois l'adsorption terminée le processus de « tunnélisation » de la paroi bactérienne débute immédiatement. Les phages disposent d'un équipement enzymatique et glycoprotéique, adjacent à leurs sites de fixation, capable de perforer la paroi des bactéries. Les phages vont être confrontés au peptidoglycane bactérien. L'activation des équipements enzymatiques est déclenchée par la cascade de modifications structurelles de la paroi du phage, provoquée par la deuxième étape de l'adsorption (Orlova, 2012). La digestion du peptidoglycane se poursuit jusqu'à la membrane bactérienne qui sera perforée de la même manière. L'adhésion irréversible produit un signal en cascade qui est transmis le long de la queue du phage, entraînant l'ouverture du canal du connecteur et permettant à l'acide nucléique du virus d'être transporté dans le cytoplasme bactérien tandis que la capsid reste l'extérieur (Plisson et *al.*, 2007).

Une fois que l'ADN phagique linéaire est complètement entré dans le cytoplasme, il se circularise pour éviter les défenses de la cellule hôte contre l'ADN linéaire.

III.6.1.3 Expression du génome phagique

Une fois que l'ADN du phage a atteint le cytoplasme, certains gènes du phage commencent à être exprimés « gènes précoces ». Les protéines exprimées à partir de ces gènes peuvent inclure des polymérases nécessaires à la réplication de l'ADN phagique, des facteurs de

transcription nécessaires à l'expression d'autres gènes du phage et des enzymes dégradant l'ADN de la cellule hôte

III.6.1.4 Assemblage et relargage

Après l'expression précoce des gènes, un nouvel ensemble de gènes de phage est exprimé «gènes tardifs ». Les produits de ces gènes comprennent les protéines structurales (tête, queue et fibres) qui composent les nouvelles particules de phage (fig. 7)

III.6.1.5 Lyse cellulaire

Se produit lorsque des enzymes codées par un phage dégradent la paroi cellulaire et la rupture de la membrane cellulaire. À l'exception des bactériophages filamenteux, dont les particules virales sont libérées à partir de l'hôte par un mécanisme lié à la sécrétion qui maintient l'intégrité des cellules bactériennes (Russel, 1995). Les phages induisent généralement une lyse de bactéries infectées pour permettre l'échappement efficace de la descendance vers le milieu extracellulaire. Les phages lytiques procèdent essentiellement par deux mécanismes de base. Les phages icosaédriques avec de petits génomes simple brin semblent utiliser un seul effecteur de lyse, dont la fonction est d'inhiber une étape donnée de la synthèse du peptidoglycane de la paroi cellulaire bactérienne (Bernhardt et al., 2001). Cette stratégie requiert une croissance active des cellules et la lyse semble être une conséquence de la rupture de la paroi cellulaire en développement, au niveau du septum (Bernhardt et al., 2002). Les phages à ADN double brin, qui représentent plus de 95 % des virus bactériens connus, emploient au moins deux protéines dont l'action coordonnée aboutit à la lyse efficace de la cellule hôte au bon moment. Il s'agit d'une petite protéine hydrophobe appelée holine qui s'oligomérisent dans la membrane cytoplasmique provoquant la formation de pores, et d'une endolysine, enzyme clivant des liaisons du peptidoglycane de la paroi cellulaire. La lyse des bactéries Gram- infectées est, par nécessité, sous l'influence de deux processus chronologiques finement régulés, aboutissant à la destruction des trois couches de l'enveloppe cellulaire bactérienne : la membrane interne, le peptidoglycane de la paroi cellulaire et la membrane externe. Toujours en adéquation avec la diversité des phages, les premières étapes de la lyse font appel à un système à double composants (Catalão et al., 2013).

Une seule cellule infectée peut produire 100 particules de phage ou plus lors de la lyse (Poxleitner et al. 2018).

III.7 Phagothérapie

III.7.1 Définition

La phagothérapie est l'utilisation des phages virulents afin de traiter et guérir spécifiquement les infections d'origine bactériennes. Elle met à profit la propriété destructrice, lytique, spécifique de tel ou tel bactériophage vis-à-vis d'une bactérie en situation pathogène (Dublanche, 2017).

Certains experts contemporains affirment que la phagothérapie peut être plus efficace que les antibiotiques dans certaines conditions cliniques : de ce fait, elle se voudrait une solution à l'antibiorésistance (Fruciano, 2011).

La synthèse des avantages et des inconvénients de l'utilisation thérapeutique des bactériophages est résumé dans le Tableau suivant :

Tableau III. Synthèse des avantages et inconvénients de l'utilisation thérapeutique des bactériophages

Caractéristiques	Avantages	Inconvénients
Spectre d'hôte étroit	<ul style="list-style-type: none"> Impact nul sur les bactéries non ciblées (microbiote) Limitation du nombre de souches susceptibles de développer une résistance à un bactériophage donné 	<ul style="list-style-type: none"> Pour les approches probabilistes, cela implique l'utilisation de cocktails de bactériophages pour augmenter la couverture antibactérienne
Grande diversité	<ul style="list-style-type: none"> Probabilité élevée d'isoler un bactériophage infectant une souche pathogène 	<ul style="list-style-type: none"> Comme les antibiotiques, relargage d'endotoxines (et autres) lors de la lyse
Mécanisme d'action	<ul style="list-style-type: none"> Activité bactéricide rapide Activité lytique indépendante de la résistance aux antibiotiques Activité anti-biofilm de certains bactériophages (capables de dépolymériser les polysaccharides composant les biofilms) 	
Nature virale (virus de bactéries)	<ul style="list-style-type: none"> Diffusion prouvée dans un grand nombre de tissus Incapacité à infecter les cellules eucaryotes <ul style="list-style-type: none"> Réplicatif : augmentation de la concentration sur le lieu de l'infection Présents naturellement dans l'environnement, il n'est pas nécessaire de les fabriquer Isolement rapide de nouveaux bactériophages possible (en quelques heures ou jours) pour un grand nombre de pathogènes 	<ul style="list-style-type: none"> Mise en jeu possible d'une immunité humorale avec production d'anticorps neutralisants Stabilité variable dans le temps, influencée par les conditions de stockage (pH, température, UV. . .) Capacité potentielle à induire du transfert horizontal de gènes par transduction généralisée (facteur de virulence, résistance aux antibiotiques)

(Ansaldi et al., 2018)

III.7.1. Principe d'utilisation de la phagothérapie

Comme dans le cas de l'antibiothérapie, il existe deux possibilités de traitement par phagothérapie, dont le choix varie selon que la bactérie pathogène soit identifiée ou non :

- ❖ Soit la bactérie pathogène est inconnue, et on va alors traiter en probabiliste, en administrant un cocktail de bactériophages et en misant sur la probabilité que l'infection que l'on souhaite traiter soit causée par une bactérie qui sera ciblée par au moins un type de phages du cocktail ;
- ❖ Soit la bactérie incriminée est connue auquel cas un phagogramme sera effectué pour cibler cette bactérie et choisir le phage lui correspondant. Cette deuxième approche est préférable en phagothérapie car les phages sont très spécifiques d'une espèce donnée (Neurohr, 2016).

III.7.2. Avantages et inconvénients comparés de la phagothérapie et de l'antibiothérapie

Le Tableau IV présente une comparaison entre la phagothérapie et l'antibiothérapie :

Tableau IV. Avantages et inconvénients comparés de la phagothérapie et de l'antibiothérapie

	PHAGOTHÉRAPIE	ANTIBIOTHÉRAPIE
Mode d'action et Pharmacologie	Les phages se multiplient au foyer infectieux, disparaissent avec les bactéries. Une dose unique est théoriquement suffisante. Le cycle de reproduction est variable selon le phage, la pharmacocinétique est mal connue → applications limitées aux foyers accessibles localisés (plaies).	Les antibiotiques (ATB) sont métabolisés in vivo et ont une diffusion variable selon les tissus. La pharmacocinétique est bien connue pour les ATB → les modes d'administration (dose, rythme, durée) sont précisés.
Spécificité	Un phage ne s'attaque qu'à l'espèce bactérienne pathogène ciblée → respect des flores commensales.	Un antibiotique à large spectre est actif sur plusieurs espèces bactériennes → non-respect de flores commensales (diarrhée, mycoses).
Effets secondaires	Rareté des effets secondaires (fièvre, céphalée) si la suspension phagique est purifiée.	Nombreux effets secondaires (rénaux, cardiaques, digestifs, allergiques, neurologiques...)
Impact environnemental	1. Peu de risque si les phages sont naturels. 2. Risque existant avec des phages modifiés génétiquement.	Risques d'autant plus importants que les spectres d'ATB sont larges et leur emploi massif (utilisation dans l'élevage).

Limites	1. La bactérie pathogène doit être isolée. 2. Absence de centre spécialisé.	1. Les contre indications connues (toxicité). 2. Les résistances (R) aux ATB.
Résistance	1. La résistance bactérienne aux phages peut apparaître en cours de traitement → utiliser plusieurs phages (« cocktail »). 2. Les phages restent actifs sur les bactéries R aux ATB et ne les sélectionnent pas.	1- Les R des bactéries aux ATB sont en augmentation pour toutes les espèces et pour toutes les classes d'ATB partout dans le monde. 2- Les résistances sont souvent multiples
Production et coût	1. Les phages naturels sont peu coûteux et rapidement utilisables. 2. Avec des phages génétiquement Modifiés → coût important, possible, délai...	1. La mise sur le marché d'un nouvel ATB est très longue et très coûteuse. 2. Des intérêts actuels de l'industrie Pharmaceutique
Efficacité	L'efficacité est prouvée dans de nombreuses études expérimentales animales	1- L'efficacité est reconnue si les indications sont bien posées 2- Echec si la bactérie est méconnue et/ou résistante. 3- Les études expérimentales rigoureuses sont nombreuses avec l'autorisation de mise sur le marché (AMM)
Indications	Les indications sont mal définies et il n'existe aucune standardisation pour l'utilisation thérapeutique des phages.	La prescription des ATB est standardisée, les normes et indications bien établies

(Dublanche, 2014)

III.8 Résistance bactérienne au bactériophage

Comme avec les antibiotiques, les bactéries sont capables de devenir résistantes aux phages (Dufour et Debarbieux, 2017).

Les protagonistes (phages-bactéries) entretiennent des rapports étroits qui assurent un équilibre permanent de l'un par l'autre avec une succession de modifications. Comme au cours de toute répllication génomique, il se produit spontanément des erreurs de copie appelées mutations du matériel génétique bactérien ou phagique. Pour une bactérie, le hasard d'une mutation peut modifier des récepteurs phagiques présents à sa surface. La bactérie devient alors résistante au phage. Par le même processus, le bactériophage est capable de s'adapter aux stratégies de résistance bactérienne (Dublanche, 2014).

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

I. MATERIEL ET METHODES

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire central de l'EPH de Koléa et dans le centre de recherche et analyse physico-chimique CRAPC à Bousmail durant une période allant du 27 mars au 1 juillet 2021.

Rappelons que notre étude a pour but d'isoler les bactériophages à partir des eaux usées et de différents types de boues (liquide, semi-solide) et d'évaluer leur pouvoir thérapeutique sur les bactéries multirésistantes vis-à-vis des antibiotiques. Ces dernières ont été isolées à partir de différents prélèvements pathologiques et testées au préalable par l'antibiogramme pour sélectionner les BMR

1. Matériel

1.1 Matériel biologique

Les microorganismes utilisés lors de cette expérimentation sont :

- Des bactériophages isolés des échantillons d'eaux,
- Des souches de références.
- Des souches clinique isolées de prélèvements physiologiques (pus, hémoculture, liquide plural, expectorations, LCR, urine, liquide d'ascite) à partir des patients hospitalisés aux unités de soins de l'hôpital Fares Yahia de koléa.

Les souches de références récupérées de l'institut pasteur sont :

Une espèce Gram + : *Staphylococcus aureus* 25923 et deux espèces Gram - : *Escherichia coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* 25853

1.2 Matériel non biologique

Les produits chimiques, standards, étalons, milieux de culture, réactifs ainsi que les équipements scientifiques utilisés lors de cette étude sont présentés en annexe 02.

2. Méthode expérimentale

2.1 Souches hospitalières

2.1.1 Provenance des souches

179 échantillons ont été prélevés à partir de différents échantillons pathologiques, pus, hémoculture, LCR, crachats, liquides, gynécologiques et urines. Le Tableau suivant récapitule les différents prélèvements, natures et services concernés.

Tableau V. Origine des prélèvements biologiques et services concernés

	Chirurgie	Pédiatre	M.I	Nph	Gyn	M.In	HD	URG	Total
ECBU	05	12	12	10	00	06	00	00	45
LCR	00	26	00	00	00	00	00	00	26
Hémoculture	01	10	06	03	00	02	11	05	38
Pus	08	08	04	00	01	01	02	04	28
KT	00	00	02	02	02	00	01	00	07
Expectoration	07	02	03	00	00	00	00	00	12
Liquide plural	05	02	03	00	00	02	00	01	13
Liquide d'ascite	00	02	02	00	00	00	00	02	06
Liquide de dialyse	00	00	00	01	00	00	03	00	04
Total	26	62	29	16	03	11	16	12	179

Chiru. Chirurgie ; **Pédi.** Pédiatrie ; **MI.** Médecine interne ; **Nph.** néphrologie ; **Gyn.** Gynécologie ; **MIT.** Maladie infectieuse ; **HD.** Hémodialyse ; **URG.** Urgence médical

2.1.2 Méthodes d'isolement

À l'arrivée au laboratoire, les prélèvements biologiques sont ensemencés par stries sur milieu Sabouraud pour la mycologie et dans des boîtes de pétri contenant les milieux de culture suivant : (GN), Hektoen, Chapman, gélose au sang (GSF), gélose au sang cuit (GSC), gélose à l'esculine biliaire(BEA) pour l'isolement des bactéries (Figure 08).

Les boîtes sont ensuite incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24 h, à l'exception de celles contenant la GSC et GSF, qu'on les met avant dans une jarre en conditions capnophiles (atmosphère enrichi en CO₂) pour favoriser la multiplication des bactéries exigeantes.

La jarre est placée ensuite dans l'étuve pour laisser incuber les boîtes à 37°C pendant 24 à 48h.

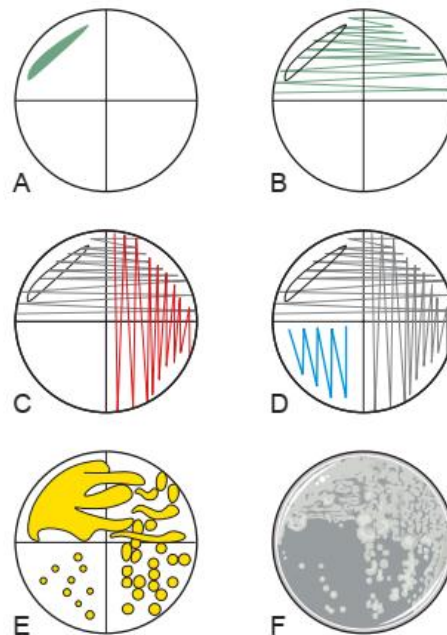


Figure 8 : Principe et résultat de la méthode d'isolement en quadrant.
A. Dépôt de l'échantillon. **B.** Stries serrées sur la première moitié de la boîte (stries vertes). **C.** Après avoir tourné la boîte de 90°, des stries serrées sont à nouveau effectuées sur une moitié de boîte (stries rouges). **D.** Le dernier quadrant estensemencé sans rentrer au contact des quadrants précédents. Cette technique permet d'obtenir dans le dernier quadrant des colonies isolées schématisées en **E** et en pratique en **F** (Denis et *al.*, 2016).

2.1.3 Techniques d'identification utilisées

Pour identifier les souches, nous avons procédé comme suit :

- ✓ A l'examen à l'état frais par observation directe de l'échantillon biologique entre lame et lamelle à l'objectif 40x10 sans coloration,
- ✓ Ou après coloration de Gram

Le premier examen nous permet d'avoir une orientation de diagnostic de la bactérie en cause. Il fournit des renseignements sur la présence ou non des germes, leurs morphologies, ainsi que la mobilité des bactéries et des propriétés tinctoriales particulières après coloration de Gram

A/ Coloration de Gram

C'est la coloration de référence en bactériologie. Elle est réalisée comme suit (Denis et al., 2016).

Sur frottis fixé à la chaleur puis à l'alcool:

- Etaler une goutte de suspension microbienne sur une lame
- Laisser bien sécher à l'air
- Recouvrir la lame avec du violet de Gentiane; laisser agir 1min.
- Par-dessus ajouter le lugol 1min
- Rejeter le lugol ;
- Eliminer les colorants et décolorer rapidement à l'alcool 30sec
- Rincer à l'eau pour arrêter la décoloration
- Recouvrir la lame de Fuchsine ou safranine 1 min
- Rincer à l'eau et laisser sécher à l'air (ou à la flamme)
- Observation à l'objectif X 100 avec l'huile à immersion.

Les bactéries à Gram positif doivent apparaître colorées en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

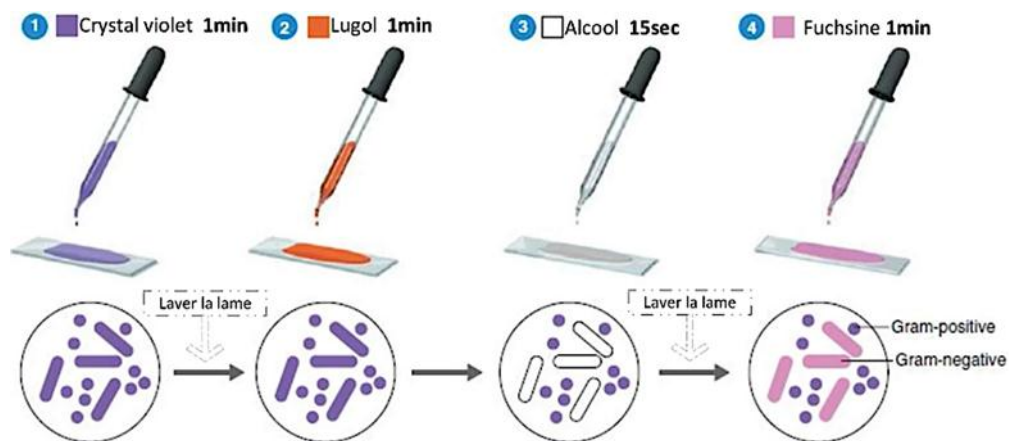


Figure 9 : Étapes de la coloration du Gram

B/ Principaux tests d'orientation

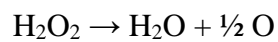
En fonction de l'aspect morphologique des colonies bactériennes, de la morphologie des bactéries après coloration, de leurs caractéristiques de croissance (vitesse, type respiratoire, exigences culturelles, etc.), de leur pigmentation, de leur odeur, de leur caractère hémolytique

sur gélose au sang, qui nous oriente sur une famille bactérienne ou un genre bactérien en particulier.

Dans le cas échéant compléter sa présomption de genre bactérien par des tests d'orientation (type respiratoire, catalase et oxydase). (Denis et *al.*, 2016)

✚ Recherche de la catalase

Certaines bactéries ont la faculté de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). En présence d'une bactérie productrice de catalase, on observe à partir d'H₂O₂ une libération d'oxygène gazeux selon la réaction :



✚ Recherche d'une cytochrome oxydase

Un disque d'oxydase a été placé sur une lame bien propre et une colonie bactérienne a été déposée avec une pipette Pasteur stérilisée au préalable. Au bout de 30 secondes, on note l'apparition d'une coloration violette ce qui signifie que la bactérie est pourvue d'un cytochrome oxydase. L'absence de la coloration violette signifie que la bactérie est dépourvue de cette enzyme respiratoire (Figure 10).

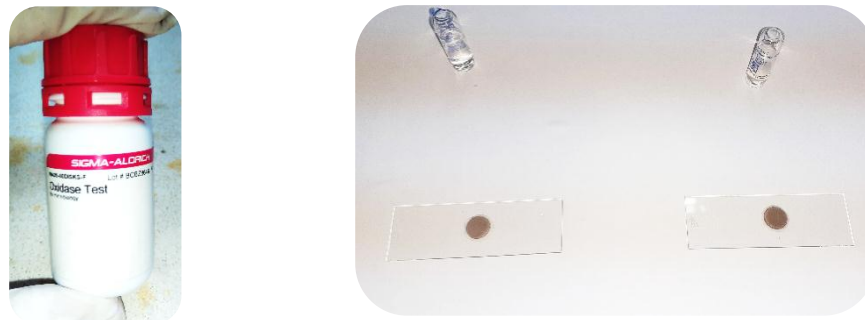


Figure 10 : test d'oxydase

✚ Recherche d'une nitrate réductase

Les bactéries, lorsqu'elles possèdent une nitrate réductase, sont capables de transformer les nitrates (NO₃⁻) en nitrites (NO₂⁻) et éventuellement en azote (N₂).

Un bouillon nitraté (bouillon nutritif supplémenté de 1,5 % de nitrates de potassium) est ensemencé avec la bactérie à étudier et incubé 18 heures à 37 °C.

Après incubation, 3 gouttes d'une solution d'acide sulfanilique (Griess A) et 3 gouttes d'une solution de naphthylamine (Griess B) sont ajoutées au bouillon. Si une coloration rose fugace apparaît (Figure 11), les nitrates ont été réduits au stade nitrites.

En l'absence de coloration, soit les nitrates ont été réduits au stade azote, soit la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. L'addition de poudre de Zinc (réactif de Zobell), va réduire les nitrates en nitrites) et permet de trancher.

Si une coloration rose apparaît, alors la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. Si il n'y a aucune modification dans la coloration après ajout de zinc, alors les nitrates ont été réduits au stade azote

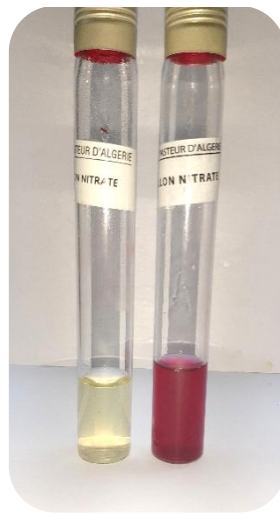


Figure 11 : Recherche d'une nitrate réductase

✚ Milieu mannitol-mobilité

Le milieu mannitol mobilité permet d'étudier la mobilité des germes, et la recherche de la fermentation du mannitol (produit de réduction du D-mannose).

A l'aide d'une pipette Pasteur, ensemercer le milieu par piqure centrale avec la souche à étudier puis incuber à 37°C pendant 18h à 24h.

- Lecture :
- Virage de la couleur du milieu vers le jaune indique la dégradation du mannitol.
- Diffusion des germes autour de la piqure en tour-billant indique la mobilité.

✚ Recherche d'une DNase

La mise en évidence de la production d'une DNase est effectuée sur une gélose contenant de l'ADN. Les bactéries sont ensemencées en réalisant une strie à la surface de la gélose. La gélose est incubée 18 heures à 37 °C. L'hydrolyse de l'ADN est révélée en ajoutant de l'acide chlorhydrique.

Lorsque l'ADN a été dégradé, un halo clair est visible au pourtour de la strie, alors que l'ADN, sous l'action de l'acide, est à l'origine d'un précipité blanchâtre.

🚦 Recherche d'une coagulase

La coagulation du plasma de lapin oxalaté par une coagulase s'effectue à partir d'un bouillon enrichi comme le bouillon staphylocoagulase. Un bouillon de 18 heures incubé à 37 °C est mis en contact volume à volume avec du plasma de lapin oxalaté pendant au moins 30 minutes à 37 °C. Si la bactérie possède une coagulase, il y a coagulation du plasma de lapin.

🚦 PASTOREX™ STAPH-PLUS (BIO-RAD)

C'est un test rapide d'agglutination sur lame pour la détection simultanée du facteur d'affinité pour le fibrinogène («clumping factor»), de la protéine A et des polysaccharides capsulaires de Staphylocoque (Figure 12) (annexe 04)



Figure 12 : Test d'agglutination Pastorex Staph-plus

🚦 PASTOREX™ Strep (BIO-RAD)

C'est un test d'agglutination rapide (Figure 13) pour le groupage des streptocoques selon la classification de Lancefield. Le test comporte des suspensions de latex spécifiques permettant d'identifier les groupes A, B, C, D, F et G.

L'identification des antigènes spécifiques de groupe par des antisérums homologues nécessite une extraction enzymatique préalable (annexe 05).

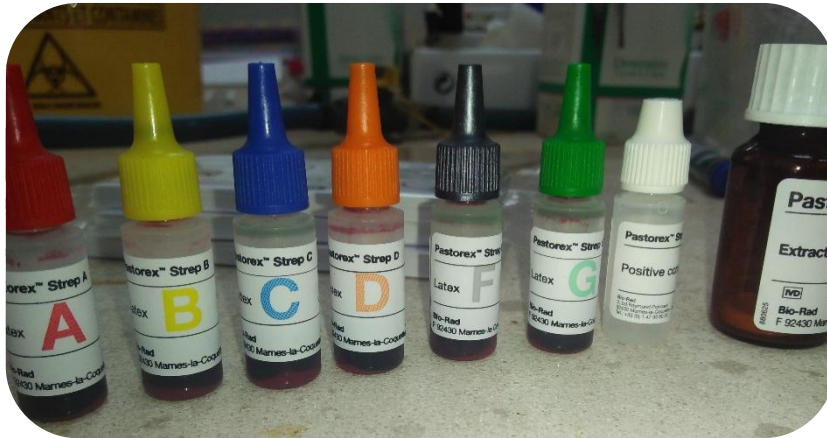


Figure 13 : Test d'agglutination Pastorex Strep

C/ Identification par galerie API SYSTEM

Nous avons procédé à l'identification des différents germes par différentes galeries API. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactif (Voir annexe 06) (Tableau VI).

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue en consultant la liste des profils de la notice ou à l'aide d'un logiciel d'identification.

Tableau VI. Galeries API SYSTEM

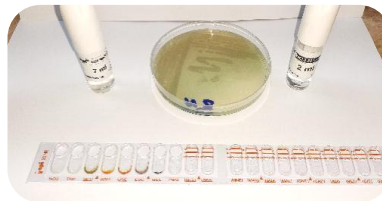
La Galerie	API 20E
<p>- est un système pour l'identification des <i>Enterobacteriaceae</i> et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux,. La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.</p>	

Pour identifier directement les micro-organismes à partir des différents prélèvements cités précédemment, nous avons utilisé la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

- Mode opératoire**
- Les microtube sont été inoculés avec une suspension bactérienne (trouble correspondant au tube 0,5 de l'échelle Mc Farland) qui reconstitue les tests.
 - Ensemencement de la suspension bactérienne dans chaque microtube à l'aide d'une micropipette où la pointe de l'embout est appuyé sur le côté intérieur pour éviter la formation de bulles. Les microtubes des tests ADH, LDC, ODC, H2S et URE ont été remplis par la suspension puis recouvrir d'huile de paraffine alors que les microtubes CIT, VP et GEL ont été remplis par l'inoculum jusqu'à la cupule, renfermer la boîte et incuber à 37 C° pendant 24 heures

La Galerie

API 20 NE



- est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Aeromonas* etc.) combinat 08 tests conventionnels, 12 test d'assimilation et une base de données

Mode opératoire

- Les microtube sont été inoculés avec une suspension bactérienne (trouble correspondant au tube 0,5 de l'échelle Mc Farland) qui reconstitue les tests.
- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPG avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement.
- Ouvrir une ampoule d'API AUX Medium et y transférer environ 200 µl de la suspension bactérienne précédente.
- Remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, remplir d'huile de paraffine les cupules des trois testes soulignés (GLU, ADH, URE), renfermer la boîte et incuber à 29 C° pendant 24 heures.

La Galerie

API 20 Strep



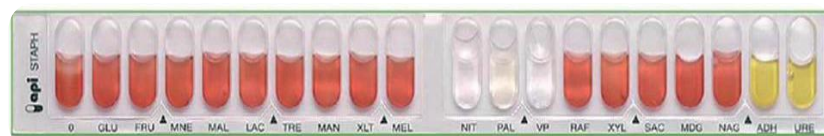
- est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des *streptocoques*, *entérocoques* et pour les germes apparentés les plus courants.
- La galerie API 20 Strep comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres.

Mode opératoire

- Ouvrir une ampoule d'API Suspension Medium (2 ml) ou utiliser un tube contenant 2 ml d'eau distillée sans additif. A l'aide d'un écouvillon, prélever toute la culture préalablement préparée. Réaliser une suspension très dense : opacité supérieure à 4 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.
- Dans la première moitié de la galerie (tests VP à ADH) répartir la suspension précédente en évitant la formation de bulles
- pour les tests VP à LAP : environ 100 µl dans chaque cupule. pour le test ADH : remplir uniquement le tube.
- Dans la deuxième moitié de la galerie (tests RIB à GLYG) : - ouvrir une ampoule d'API GP Medium et y transférer le reste de la suspension, soit 0,5 ml au minimum. Bien homogénéiser. - répartir cette nouvelle suspension dans les tubes uniquement. Remplir les cupules des tests soulignés ADH à GLYG avec de l'huile de paraffine en formant un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation. Incuber à 36°C ± 2°C en aérobose pendant 4H00 - 4H30 pour une première lecture et 24 heures (± 2 heures) si nécessaire pour une deuxième lecture.

La Galerie

API 20 Staph



- est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria* comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données.
- La galerie API Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph Medium qui reconstitue les tests.

- Mode opératoire**
- Ouvrir une ampoule d'API Staph Medium. Préparer une suspension bactérienne homogène, d'opacité égale à 0,5 de McFarland. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
 - A l'aide d'une pipette ou d'une PSipette, remplir les tubes de la galerie avec API Staph Mediumensemencé. Ne remplir que les tubes et non les cupules, sans dépasser le niveau du tube. Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe. Renfermer la boîte d'incubation.
 - Incuber à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 18-24 heures.

La Galerie

API 20 NH



- est un système standardisé pour l'identification des *Neisseria*, *Haemophilus* (et genres apparentés) et *Moraxella catarrhalis* (*Branhamella catarrhalis*) comprenant des tests miniaturisés, ainsi qu'une base de données.
- La galerie API NH comporte 10 microtubes contenant des substrats déshydratés, pour réaliser 12 tests d'identification (réactions enzymatiques ou fermentations de sucres), ainsi que la recherche d'une pénicillinase (notamment chez *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Moraxella catarrhalis* (*Branhamella catarrhalis*) et *Neisseria gonorrhoeae*).

- Mode opératoire**
- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (2 mL) comme indiqué au paragraphe "Précautions" (ampoule sans bouchon compte-gouttes). A l'aide d'un écouvillon, prélever plusieurs colonies bien isolées et réaliser une suspension d'opacité égale à celle de l'étalon 4 de McFarland, en veillant à bien homogénéiser. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
 - Répartir la suspension bactérienne précédente dans les cupules en évitant la formation de bulles .remplir uniquement la partie tube des 7 premiers microtubes (PEN à URE) : 50 µl environ.
 - remplir tube et cupule des 3 derniers microtubes,LIP/ProA , PAL/GGT , βGAL/IND : 150 µl environ, en veillant à ne pas créer un ménisque convexe. Recouvrir les 7 premiers tests (PEN à URE) d'huile de paraffine (tests soulignés)
 - Refermer la boîte d'incubation. Incuber 2 à 2 H 15 à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en atmosphère aérobie

2.1.4 Spectrométrie de masse

Récemment sont apparus sur le marché des spectromètres de masse fondés sur la technologie MALDI-TOF (*matrixassisted laser desorption/ionisation-time-of-flight*) (Figure 14) utilisant des bactéries entières et permettant l'identification bactérienne au rang d'espèce par comparaison des pics protéiques obtenus avec les banques de données.

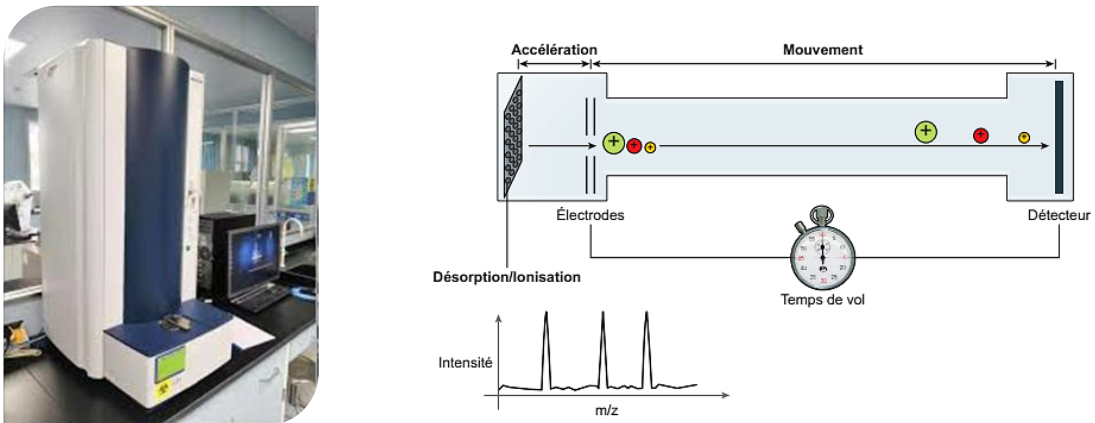


Figure 14 : MALDI -TOF Biotyper - CM de Bruker Daltonic (CRAPC) et son Principe de fonctionnement

Ces solutions d'identification présentent l'intérêt majeur d'être très rapides (quelques minutes) et de pouvoir tester très facilement plusieurs colonies d'une même boîte. La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF repose sur l'analyse de l'ensemble des protéines de chacune des bactéries. Le principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF est décrit à la figure 18 (Denis et al., 2016).

Trois étapes distinctes se succèdent dans l'analyse par spectrométrie de masse :

- ❖ ionisation/désorption : les colonies bactériennes ou le matériel à analyser sont déposés sur un support et sont inclus dans une matrice (l'alpha-cyano 4-hydroxy cinnamique ou l'acide sinapinique par exemple). Le complexe ainsi formé est bombardé par un faisceau laser émettant dans la zone d'absorption de la matrice. Les ions gazeux alors générés sont accélérés sous haut voltage dans un champ électrique qui les dirige vers l'analyseur ;

- ❖ l'analyseur permet de séparer et de classer les ions libres selon leur temps de vol, time of flight (TOF) qui dépend du rapport masse/charge (m/z). Les ions présentant le rapport m/z le plus petit sont les premiers à arriver ;
- ❖ le détecteur transforme le courant ionique en courant électrique. Le courant généré est alors amplifié, numérisé et enregistré sous forme de spectres de masse (rapport m/z en fonction de l'intensité).

Afin de minimiser les interférences pouvant provenir de la collision de particules entre elles, toutes ces opérations sont réalisées dans une enceinte soumise à un vide poussé.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF permet l'identification de bactéries par l'étude de leurs protéines totales.

Le dépôt peut être réalisé sous deux formes ; soit on part directement de la culture bactérienne, soit on effectue au préalable une extraction des protéines. Quelle que soit la méthodologie choisie, le dépôt est réalisé sous forme d'une couche mince sur un support, puis recouvert de la matrice donneuse d'électron ; le tout sera ensuite bombardé par un faisceau laser. Les spectres sont lus pour des masses comprises entre 2000 et 20 000 Dalton (Da).

Une banque de spectres est construite par plusieurs mesures d'une espèce bactérienne ou d'une souche connue sous différentes conditions de cultures. Un profil moyen est alors obtenu après mesure d'environ 20 spectres. Le logiciel génère automatiquement la liste des pics obtenus de tous les spectres et extrait les pics typiques présents dans un certain nombre de spectres d'une seule espèce. Selon les différentes études publiées jusqu'à maintenant, 95 à 97,5 % des bactéries isolées dans les laboratoires de microbiologie sont identifiées correctement à l'aide de la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ces résultats sont comparables (voire meilleurs) à ceux obtenus avec des automates utilisant des méthodes conventionnelles.

L'identification d'un spectre inconnu est réalisée à l'aide d'un algorithme de reconnaissance qui considère la position des pics dont l'intensité est comprise dans une échelle de 1 à 1000. Une fois le spectre obtenu, il est comparé aux spectres de la banque de données en tenant compte de la masse et de l'intensité des pics. Un algorithme statistique permettra alors de donner l'identification du micro-organisme. Les algorithmes, les bases de données et la présentation des résultats diffèrent selon les constructeurs (Denis et *al.*, 2016)

Trois automates sont actuellement commercialisés en France : le Vitek® MS (bioMérieux), le Microflex® (Bruker) et le LT2-Andromas®.(Denis et *al.*, 2016)

Durant cette étude, nous avons travaillé avec le Microflex® (Bruker).

2.1.5 Étude de l'antibiorésistance

❖ Antibiogramme

Pour l'antibiogramme standard, nous avons testé la liste des antibiotiques recommandée selon la standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle nationale 8ème édition parue en 2020).

La liste des antibiotiques à tester selon la bactérie isolée est reportée sur l'annexe N°=07.

La technique d'antibiogramme (diffusion de disque) pour chaque genre et espèces de bactéries est reportée sur le Tableau VII

❖ Milieu pour l'antibiogramme

- Le milieu adéquat (Tableau VII) être coulé en boîtes de pétri sur une épaisseur de 4 mm
- Les géloses doivent être séchées avant l'emploi. (Figure 15)

❖ Préparation de l'inoculum

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

Dans le cas de *Streptococcus spp.* Et d'*Haemophilus spp.*, on utilise un écouvillon pour prélever plus facilement les colonies bactériennes.

- Bien décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 %.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 MF ou une D.O de 0.08 à 0.10 lue à 625 nm.

❖ Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum
- L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube afin de décharger au maximum
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut e bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois

❖ Application des disques d'antibiotiques :

- Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm
- Pour les bactéries exigeantes (*Streptococcus spp*, *Neisseria gonorrhoeae*) ne pas mettre plus de 4 disques par boîtes de 90 mm.
- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologiques stériles et ne pas déplacer les disques après application

❖ **Condition d'incubation :**

- Respecter la température, l'atmosphère et la durée d'incubation recommandées pour chaque bactérie (Voir tableau VII)

❖ **Lecture :**

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.
- Pour les bactéries testées sur Mueller-Hinton simple, les mesures seront prises en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de pétri fermée.
- Pour les bactéries testées sur milieu Mueller-Hinton au sang, les mesures de diamètre de zone d'inhibition seront prises, boîte pétri ouverte et bien éclairée.
- Comparer les résultats obtenus aux valeurs critiques,
- Classer les bactéries dans l'une des catégories Résistant (R), Sensible (S) ou Intermédiaire (I)

Tableau VII : Technique d'antibiogramme (diffusion de disque)

Microorganismes	Milieu	Inoculum	Condition d'incubation
<i>Enterobacteries, Pseudomon aeruginosa, Acinetobacter spp, Staphylococcus spp, Enterococcus spp, Vibrio spp, Aeromonas spp, Plesiomonas spp, autres bacteries non exigeantes</i>	Gélose Mueller-Hinton (Figure 16)	0.5 MF en eau physiologique	18 heures 35 C° Atmosphère ordinaire
<i>Streptococcus spp</i>	Gélose Mueller-Hinton + 5% sang de mouton (Figure 16)	0.5 MF en eau physiologique	20-24 heures 35 C° 5% CO2
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Gélose GC+ 1% supplément	0.5 MF en tampon PBS	20-24 heures 35 C° 5% CO2

<i>Neisseria meningitidis</i>	Gélose Mueller-Hinton + 5% sang de mouton	0.5 MF en tampon PBS ou eau physiologique	20-24 heures 35 C° 5% CO2 Atmosphère humidifiée
<i>Haemophilus spp</i>	Gélose Haemophilus Test Medium	0.5 MF en eau physiologique	16-18 heures 35 C° 5% CO2



Figure 15 : Antibiogramme sur MH simple et MH au sang

2.1.6 Stockage/conservation des souches

Le stockage des souches bactériennes est effectué à 4°C dans un milieu conservateur afin de les maintenir en vie pour une réutilisation dans les étapes suivantes de l'étude.

Le milieu de culture est conditionné dans des tubes de 7 ml et l'ensemencement est réalisé par piqûre centrale dans la gélose. La pipette Pasteur portant les colonies bactériennes est alors plongée profondément dans la gélose. Ensuite, les tubes sont serrés et incubés à 37°C pendant 24h puis stockés au réfrigérateur à 4°C (Figure16).



Figure 16 : conservation des souches sur gélose conservateur

2.2 Bactériophages

La figure 17 illustre le protocole suivi lors de notre expérimentation :

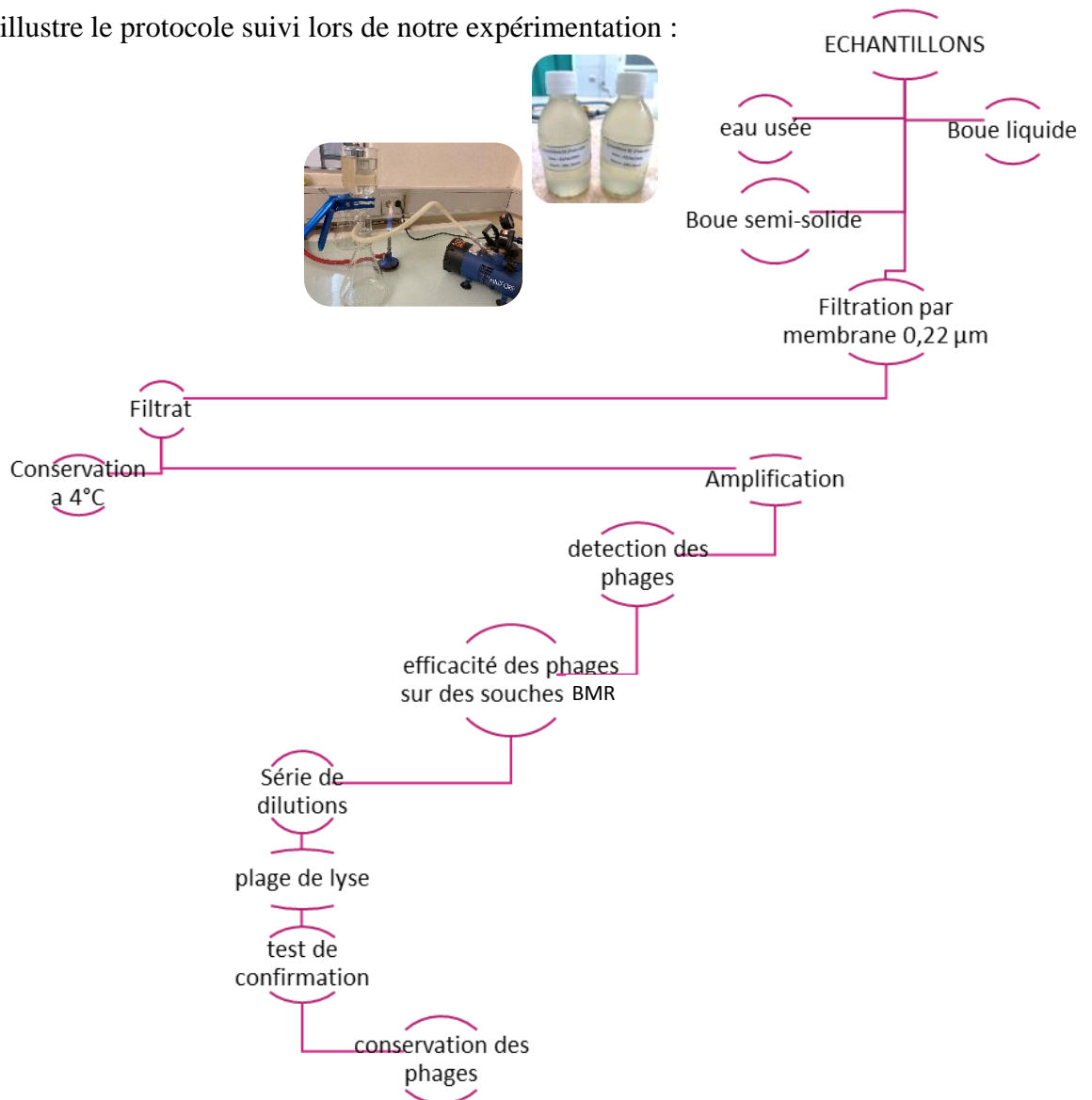






Figure 17 : Organigramme du protocole opératoire

2.2.2 Prélèvement des échantillons

Les prélèvements ont été effectués au niveau de la station d'épuration des eaux usées de Beni Merad dans la wilaya de Blida située à l'Est de la route nationale N°1 à proximité de l'oued Béni Azza. Cette station est à boues activées construite sur six hectares et traite les eaux usées de la ville de Blida. Les prélèvements ont été réalisés comme suit :

- Quatre prélèvements ont été réalisés à partir des eaux usées après déshuilage
- Deux prélèvements à partir des Boues liquides,
- Un prélèvement à partir des boues semi-solides dans des conditions du jour (Tableau VIII), (Figure 18).

Tableau VIII. Prélèvements réalisés dans la station d'épuration de Beni Merad

Echantillon	Date	Heure	Température	Lieu de prélèvement
Eau usée : 02 flacons de 200 ml	07/06/2021	9h15min	D'eau : 14°C Du jour : 25°C	
	20/06/2021	9h15min	D'eau : 17°C Du jour : 27°C	
Boue liquide : 02 flacons de 200 ml	20/06/2021	9h20min	Du jour : 27°C	
Boue semi solide : 200 g	20/06/2021	9h30min	Du jour : 27°C	

Ces échantillons sont placés dans des flacons transparents stériles en verre en laissant environ 1/10 du volume total du flacon pour l'air. L'échantillon a été transporté dans des conditions isothermes de 4°C et manipulés le même jour du prélèvement.



Figure 18 : Echantillons d'eau usée, de boue liquide et semi-solide

2.2.3 Isolement des bactériophages

Dans notre étude, nous nous sommes appuyés sur plusieurs méthodes à partir de la littérature se rapportant aux bactériophages des études antérieures pour élaborer un protocole modifié que nous avons suivi.

La plupart des méthodes décrites dans cette section ont été élaborées chez SEAPHAGES (Poxleitner et *al.*, 2018).

2.2.3.1 Filtration

Avant l'étape d'isolement, les échantillons ont été filtrés par la méthode de filtration sur membrane à l'aide d'un système de filtration de 300 ml stérile, muni d'une pompe à vide (**Figure 21** .) et en utilisant une membrane filtrante stérile de 0,22 μm dont la taille des pores ne laisse pas passer les bactéries mais peut retenir les débris cellulaires et elle permet le passage des phages (Tableau IX).

Tableau IX. Méthodes de filtration suivies pour l'obtention des phages isolés

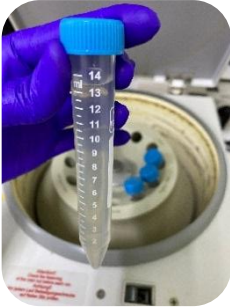


Echantillon	Eaux usées
<p>Méthodes</p> 	<p>Méthode 1 :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 100 ml d'eau usée a été filtrée directement par système de filtration sur membrane de porosité 0,22 μm (Van Twest and Kropinski, 2009). <p>Méthode 2 :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 100 ml d'eau usée a été centrifugée dans des tubes de 15 ml à 4500 tr/min pendant 10 min ; - Le surnageant a été filtré par un papier filtre 0,22 μm (Van Twest et Kropinski, 2009)
<p>Echantillon</p> <p>Méthodes</p> 	<p>Boue liquide</p> <ul style="list-style-type: none"> - Avant la filtration, l'échantillon devait être sédimenter environ 2h. - Après avoir obtenu environ 100 ml de surnageant qui a été filtré traditionnellement en utilisant un coton dans un entonnoir et Erlenmeyer pour éliminer les gros débris. Puis le filtrat résultant a été passé par une deuxième filtration par membrane de 0,45 μm et une 3ème filtration par membrane 0,22μm (Poxleitner et <i>al.</i>, 2018).
<p>Echantillon</p> <p>Méthodes</p> 	<p>Boue semi- solide</p> <ul style="list-style-type: none"> - 10 g de boue semi-solide a été utilisée et mise en suspension dans 20 ml de tampon SM (Annexe) qui était bien mélangée et restait au repos pendant 1-30h à 2h pour la sédimentation. <p>Ensuite, on a récupéré le surnageant et on a fait la filtration de ce dernier en utilisant la membrane 0,22μm (Poxleitner et <i>al.</i>, 2018).</p>



Figure 19 : Système defiltration

Tous les filtrats résultants « suspensions phagiques » ont été conservés dans des bouteilles stériles en verre à 4°C jusqu'au moment de leur utilisation.

2.2.2.2. Enrichissement en bactériophages

Nous avons procédé à l'enrichissement en bactériophages comme préconisé par (Courtault, 2014.) éventuellement présents dans les eaux, en suivant les étapes suivantes :

L'échantillon filtré (F) est d'abord mis en contact avec la bactérie cible :

- Prélever 9 ml du filtrat F et les transférer dans 1 tube à essai stérile noté E (pour "Enrichissement") (Figure 20)
- Conserver le volume restant du filtrat F à 4 °C pour une utilisation ultérieure.
- Ajouter 1 ml de milieu Luria Broth (LB) 10x (concentré dix fois) aux 9 ml d'eau filtrée du tube E.
- À l'aide d'une anse stérile, prélever un peu d'une culture bactérienne de la bactérie cible et la resuspendre dans les 10 ml de solution du tube E.
- Fermer le tube et Incuber 24 h à 37 °C.

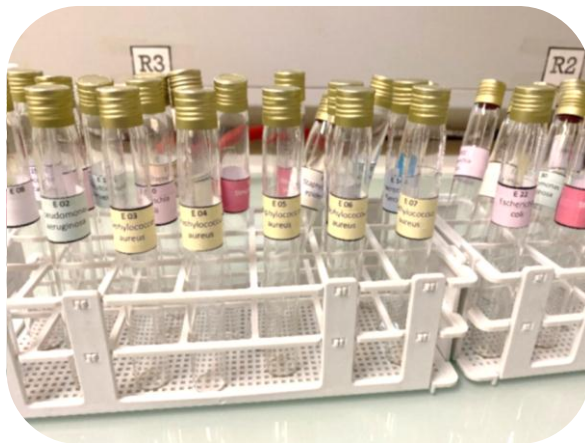


Figure 20 : Etape d'enrichissement en bactériophage

Les souches BMR vont se multiplier grâce au milieu de culture. Si un ou plusieurs phages capables d'infecter ces bactéries sont présentes dans les 9 ml de l'échantillon d'eau, ils vont l'infecter et s'y multiplier. Après 24h, un nombre suffisant de bactériophages pourront être mis en évidence.

Après cette période d'incubation, le tube peut être gardé 1 semaine à 4 °C.

- Élimination des bactéries du bouillon d'enrichissement (selon Courtault, 2014.)

Cette étape permet d'éliminer les bactéries qui n'ont pas été lysées par les éventuels bactériophages, en suivant les étapes suivantes :

- On a filtré 5 ml du milieu d'enrichissement, en condition aseptique avec les seringues de filtration de 0.22 μm de diamètre (Figure 21).
- Récupération de filtrat dans un tube à hémolyse stérile noté EF. Et Parafilmer.
- On a gardé notre filtrat EF à 4 °C. Les bactériophages sont relativement stables et la préparation peut être conservée au moins une année dans ces conditions.

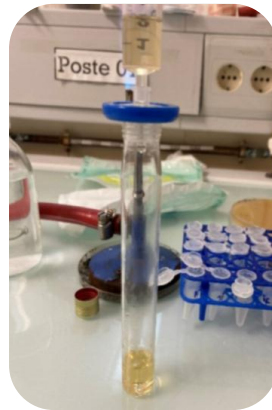


Figure 21 : Filtration par seringue

2.2.3.3 Préparation des échantillons à tester pour la recherche de phages (selon Droguet, 2021)

Diluer en série jusqu'à 10^{-7} le filtrat EF sous un volume final de 100 μl en tubes (Figure 22) ;

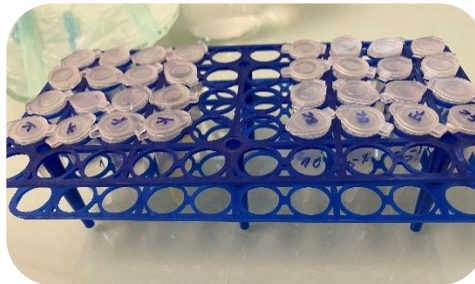


Figure 22 : Solution phagique diluée

2.2.3.4 Formation d'un tapis bactérien : double couche d'agar

Nous avons choisi la technique de la double couche d'agar pour effectuer le test antibactérien avec les phages. (Selon Courtault, 2014.)

Cette méthode est plus rapide que l'étalement permet d'obtenir une distribution homogène des bactéries avec une accélération de diffusion des particules phagiques et le développement de plaque de lyse et donc les variations de la morphologie des plaques peuvent être plus facile à étudier.

❖ Préparation des milieux de culture

Préparer les milieux de culture en suivant les étapes suivantes :

- Sur le fond d'une grande boîte de pétri stérile, tracer 1 cercle central de 1 cm de diamètre et fractionner la boîte en 8 parts égales (Figure.23) Noter sur la tranche : numéro poste – nom bactérie testée – origine de l'échantillon testé.
- Couler dans la boîte de Pétri 15 ml de gélose "dure" Mueller-Hinton maintenue en surfusion à 55 °C.
- Laisser la gélose se solidifier).

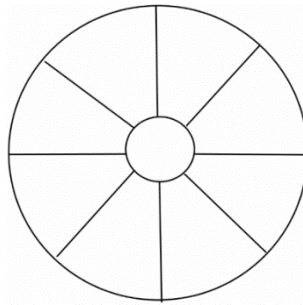


Figure 23 : Cadrant de la boîte pétrie

❖ Préparation des cultures bactériennes à tester

On prépare les cultures bactériennes en suivant les étapes suivantes :

- Préparer une suspension bactérienne en utilisant la même bactérie que celle utilisée pour l'étape d'enrichissement ou utiliser un bouillon de 6 h de la bactérie.
- Sortir un tube de gélose molle Mueller-Hinton à 6 g/l, maintenue en surfusion à 55 °C.
- Laisser redescendre la température de quelques degrés (environ 45 °C) ==> tube pouvant être tenu à main nue.
- Inoculer la gélose molle légèrement refroidie avec 0,2 ml de la suspension bactérienne.
- Homogénéiser rapidement le contenu du tube (vortex)(Figure 24).
- Couler immédiatement la gélose molle inoculée sur la gélose dure solidifiée. Laisser solidifier.
- Réaliser un isolement de la souche testée, à partir de la suspension, sur une gélose Mueller-Hinton en petite boîte de Pétri, afin de vérifier sa pureté.

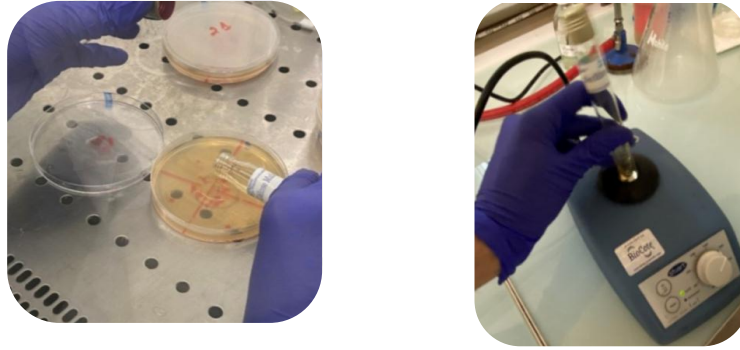


Figure 24 : Technique de double couche d'agar

❖ **Titration des phages (Technique des spots)**

Après solidification du tapis bactérien, 10 µl des suspensions phagique (EF) diluées en série, 5 µl d'eau physiologique stérile (contrôle négatif) et 5 µl de l'eau filtrée non enrichie F, sont déposés sur le tapis bactérien, ainsi que centre 5 µl d'eau physiologique stérile (contrôle négatif) (Figure 25). Une fois les gouttes séchées, la boîte de pétri est incubée toute la nuit à 37°C. Le lendemain, les plages de lyse sont comptées et la concentration du phage est calculée comme suit : selon (Martineau, 2009.)

$$ufp/ ml = \text{Nombre de plage de lyse} \times \text{dilution} \times 100$$

- Les boîtes peuvent être conservées ensuite à 4°C

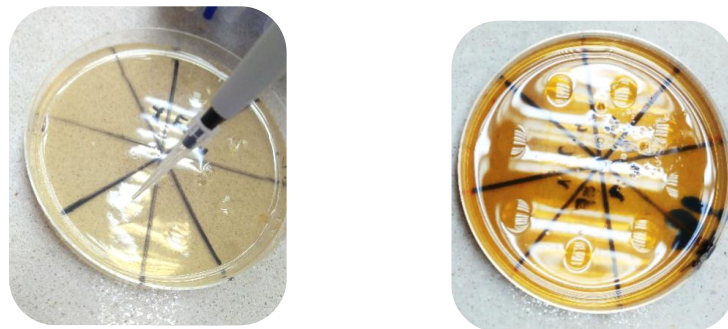


Figure 25 : Technique de spot

2.2.3.5 Tests de confirmation des bactériophages

Les bactériophages se sont donc multipliés en infectant des bactéries incluses dans la couche de gélose "molle".(Courtaut, 2014.) Après avoir découpé un fragment de gélose dans lequel on

a pu voir que les phages se sont multipliés par l'apparition de plages de lyses, nous réalisons les étapes suivantes (Figures 26) :

- ✓ Les fragments sont introduits dans un bouillon nutritif préalablement inoculé avec la bactérie hôte spécifique de ce phage.
- ✓ Un tube témoin de croissance de la bactérie hôte a été inoculé également.
- ✓ Les deux bouillons seront incubés pendant 5h à 37 °C



Figure 26 : technique de découpage de gélose

Après 18 h d'incubation :

- ✓ On filtre sur une membrane de 0,22 μm de diamètre, le bouillon d'enrichissement (bactérie + phages) afin d'obtenir un filtrat ne contenant plus que les phages,
- ✓ On réalise une dilution en série jusqu'à 10^{-12} .
- ✓ On dénombre par la technique de référence : Incorporation dans 10 ml de gélose molle en surfusion de 200 μl de la bactérie sensible + 100 μl de chacune des cinq dernières dilutions.(Figure 27)

- ✓ Le résultat est obtenu après seulement 5 h d'incubation à 37 °C.

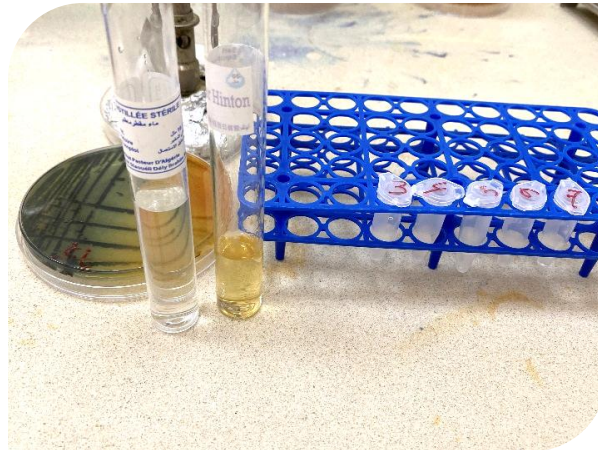


Figure 27 : techniques des 4 dernières dilutions

2.2.3.6 Efficacité in vitro

Selon Martineau (2009), l'efficacité d'un phage testée in vitro est un bon indicateur pour procéder à la vérification de la capacité d'un phage à éliminer ou diminuer la quantité d'une bactérie.

Il s'agit d'une amplification à 37°C et/ou à température ambiante (Figure 28) au cours de laquelle la densité optique à 600 nm et la concentration des phages sont évaluées à chaque heure afin de vérifier la capacité du phage à diminuer le nombre de bactéries viables dans le temps. La lecture de l'absorbance à 600nm a été effectuée par un spectrophotomètre UV-Vis SPECORD 210 Plus

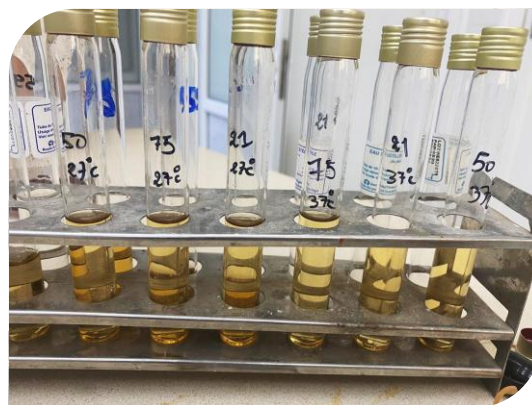


Figure 28 : l'efficacité d'un phage testée in vitro avec 3 bactéries hôte (CiF , Ecoli, KiP) a 37 C° et à 27 C°

2.2.4 Combinaison phage-ATB

La combinaison entre les phages et ATB est une méthode rationnelle pour lutter contre la résistance aux ATB (Kebriaei et *al.*, 2020).

Lorsque les phages infectent des bactéries cultivées en présence de doses sub-létales d'ATB, les tailles des plaques de phages sont considérablement augmentées. Ce phénomène est connu sous le nom de synergie phage-ATB ou PAS (Kim et *al.*, 2018).

Pour réaliser cette étape, nous nous sommes référés au protocole de Kim et *al.*, (2018).

Dans un premier temps, la méthode de double couche d'agar déjà décrite ci-dessus a été appliquée pour les phages. Après 15 min, les disques d'ATB ont été déposés à la surface de la gélose et les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h (Figure 29).

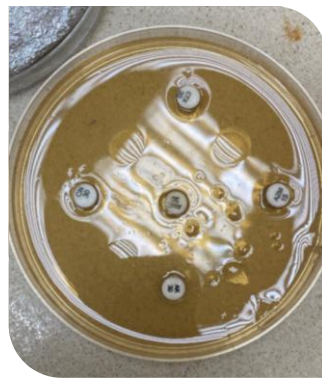


Figure 29 : technique de combinaison phage-ATB

2.2.5 Purification

Une seule méthode de purification a été testée (Martineau, 2009).

✚ Centrifugation

Afin de déterminer quelles sont les meilleures conditions de purification des phages en terme de pureté et de pourcentage de récupération, une préparation de 20 à 25 ml de phages est centrifugée à différentes vitesses soient, 8000, 12 000, 135 00 g (6000 rpm) pendant 1h.

Le surnageant est retiré, le culot resuspendu dans un tampon (SM), filtré (Millipore 0,22 µm-GF) et la concentration de chaque culot et surnageant est évaluée par titration sur tapis bactérien et comparée à la préparation initiale.

2.2.6 Conservation des phages

Différentes méthodes de conservation telles que le stockage de lysats de phage bruts ou purifiés à 4°C. La congélation et le stockage à -80°C ou dans de l'azote liquide et enfin le stockage des phages sèches ou lyophilisés ont été utilisées dans différents laboratoires (Golec et al., 2011). Dans cette expérimentation, on a conservé les phages purifiés et dans un tampon SM à 4°C

Résultats et discussion

II. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats du dénombrement

179 prélèvements biologiques (pus, hémoculture, liquide plural, Cracha, LCR, urine, liquide d'ascite) provenant de patients durant la période allant du 27 mars au 01 juillet ont été analysés au niveau de l'EHP de kolea. 87 échantillons se sont révélés positifs. Le tableau suivant présente les cas positifs en fonction des services.

Tableau X. Nombre de prélèvements positifs / Service et par prélèvements pathologiques

	Chir.	Pédi.	M.I	Nph	Gyn	M.IT	HD	URG	Total	Positif
ECBU	05	12	12	10	00	06	00	00	45	18
LCR	00	26	00	00	00	00	00	00	26	02
Hémoculture	01	10	06	03	00	02	11	05	38	26
Pus	08	08	04	00	01	01	02	04	28	22
KT	00	00	02	02	02	00	01	00	07	05
Crachat	07	02	03	00	00	00	00	00	12	07
Liquide plural	05	02	03	00	00	02	00	01	13	03
Liquide d'ascite	00	02	02	00	00	00	00	02	06	02
Liquide de dialyse	00	00	00	01	00	00	03	00	04	02
Total	26	62	32	16	03	11	17	12	179	87
Positif	18	20	15	08	02	09	09	06	87	

Chiru. Chirurgie ; **Pédi.** Pédiatrie ; **MI.** Médecine interne ; **Nph.** néphrologie ; **Gyn.** Gynécologie ; **MIT.** Maladie infectieuse ; **HD.** Hémodialyse ; **URG.** Urgence médical

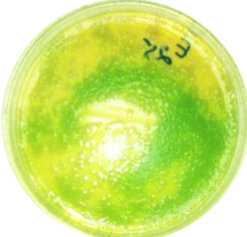





2. Résultats Isolement et identification des souches

Après incubation, les isolats bactériens ont montré divers aspects cultureux, en fonction du milieu de culture utilisé, des tests d'orientation et des tests biochimiques et cela en fonction de leur appartenance (toutes les photos sont originales).

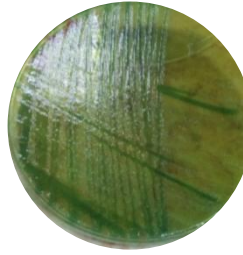
A/ Aspect des cultures

L'aspect des cultures des germes isolés dans cette étude est présenté dans le tableau suivant :

Tableau XI. Aspect des cultures des germes isolés dans cette étude

Germes isolés	Aspect des cultures	Observation
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Pigmentation verte dans le milieu King A due à l'espèce <i>Pseudomonas aeruginosa</i> qui a produit cette pigmentation pyoverdine
<i>Enterococcus faecium</i>		Des colonies d'un halo noir. C'est un aspect des colonies des entérocoques (transformation d'esculine en esculétine)
<i>Escherichia coli</i>		Coloration orange qui signifie l'acidification de milieu et la dégradation de lactose dans le milieu Hektoen par cette bactérie
<i>Streptocoque pneumonie</i>		Hémolyse alpha due à la bactérie streptocoque pneumonie qui a hémolysé partiellement les globules rouges dans la gélose au sang frais
<i>Staphylococcus aureus</i>		La couleur jaune signifie l'acidification de milieu (dégradation de mannitol) par cette bactérie
<i>Citrobacter freundii</i>		Des colonies centre noir signifie que la bactérie elle est de H ₂ S

Proteus mirabilis



Des colonies vertes dans l'Hektoen qui signifie que cette bactérie elle est de lactose moins comme *Proteus mirabilis*

B/ Coloration de Gram

Après la coloration de Gram, Sur les 87 isolats, nous avons observé au total 85 bactéries et 02 levures (Figures 30 et 31) qui sont répartis comme suit :

- 41 bacilles à Gram négatif
- 43 Cocci à Gram positif
- 01 bacille à Gram positif (Bacillus)
- 02 levures Candida

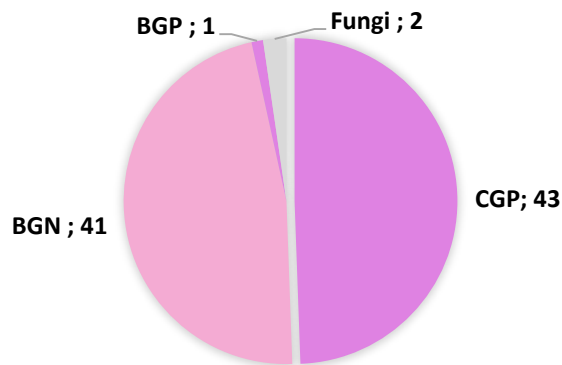


Figure 30 : Résultat de la coloration de Gram

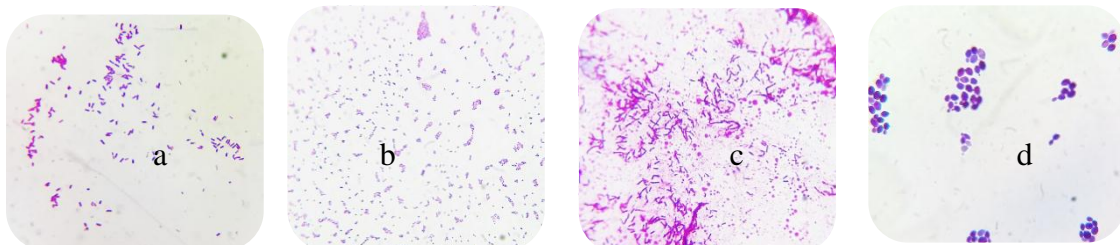


Figure 31 : a : Bacille à Gram négatif (BGN), b : Cocci à Gram positif (CGP), c : bacille à Gram positif (BGP), d : levure (Fungi) après coloration de Gram

C/ Tests d'orientation

- **Tests de catalase et d'oxydase**

Le bilan total des résultats du test de catalase et d'oxydase (Figure 32) est présenté dans le tableau suivant :

Tableau XII. Résultat du catalase et d'oxydase

Catalase	Cocci gram positif		Bacille à gram négatif	
	Positive	Négative	Positive	Négative
	21	23	41	-
Oxydase	Positif	Négatif	Positif	Négatif
	-	-	10	31
Orientation	<i>Staphylococcus</i> <i>Micrococcus</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Entérobactéries</i>

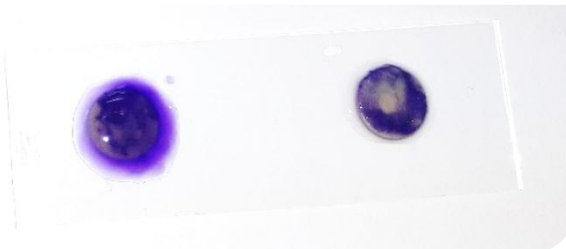


Figure 32 : test d'oxydase positif

- **Test de coagulase**

Afin de pouvoir distinguer *Staphylococcus aureus* des autres bactéries à Gram positive et catalase positive, on procède à la recherche de la Coagulase (Figures 33). *S. aureus* est coagulase positive



Figure 33 : Test de la coagulase +

- **PASTOREX™ STAPH-PLUS**

Une agglutination en moins de 40 secondes (test positif) (Figure 34): *S. aureus*.



Figure 34 : Test d'agglutination (Pastorex staph-plus) : facteur de liason au fibrinogène = Clumping factor, Protéine A Antigènes

- **Test de la DNase**

Afin de pouvoir distinguer le *S. aureus* des autres bactéries à Gram positive et catalase positive, la recherche de la DNase peut être réalisée (Une enzyme capable d'hydrolyser l'ADN en nucléotides constitutifs) qui se traduit par l'apparition d'un halo clair visible au pourtour de la strie DNase +. (Figure 35).



Figure 35 : test de DNase

D/ Mini galerie et API STAPH

La lecture et l'identification de ses réactions se fait à l'aide du catalogue analytique et sont présentés dans les tableaux et les figures suivants :

Tableau XIII. Différenciation entre les *Staphylococcus* et les *Micrococcus*.

	<i>Staphylococcus</i>	<i>Micrococcus</i>
Glucose	+	-

Tableau XIV. Principaux caractères de la mini galerie

	ADH	NITRATE	Coagulasse	Mannitol
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	+	-	+



Figure 37 : la mini galerie de l'espèce *staphylococcus aureus*



Figure 36 : la mini galerie de l'espèce *staphylococcus epidermidis*

Tableau XV. Résultats des tests positifs pour les différentes espèces de *staphylococcus* dans la galerie API Staph

Caractère \ Bactérie	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-

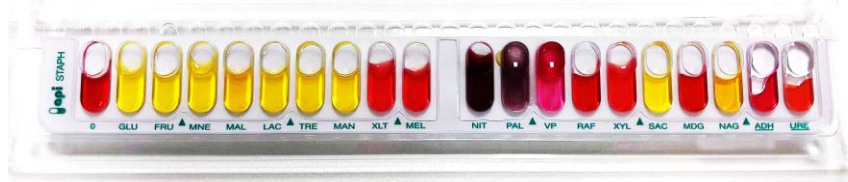


Figure 38 : API Staph (espèce *staphylococcus aureus*)

E/ Identification les bactéries à Gram positif et catalase négative

La figure 39 montre les résultats de l'identification des CGP catalase - :

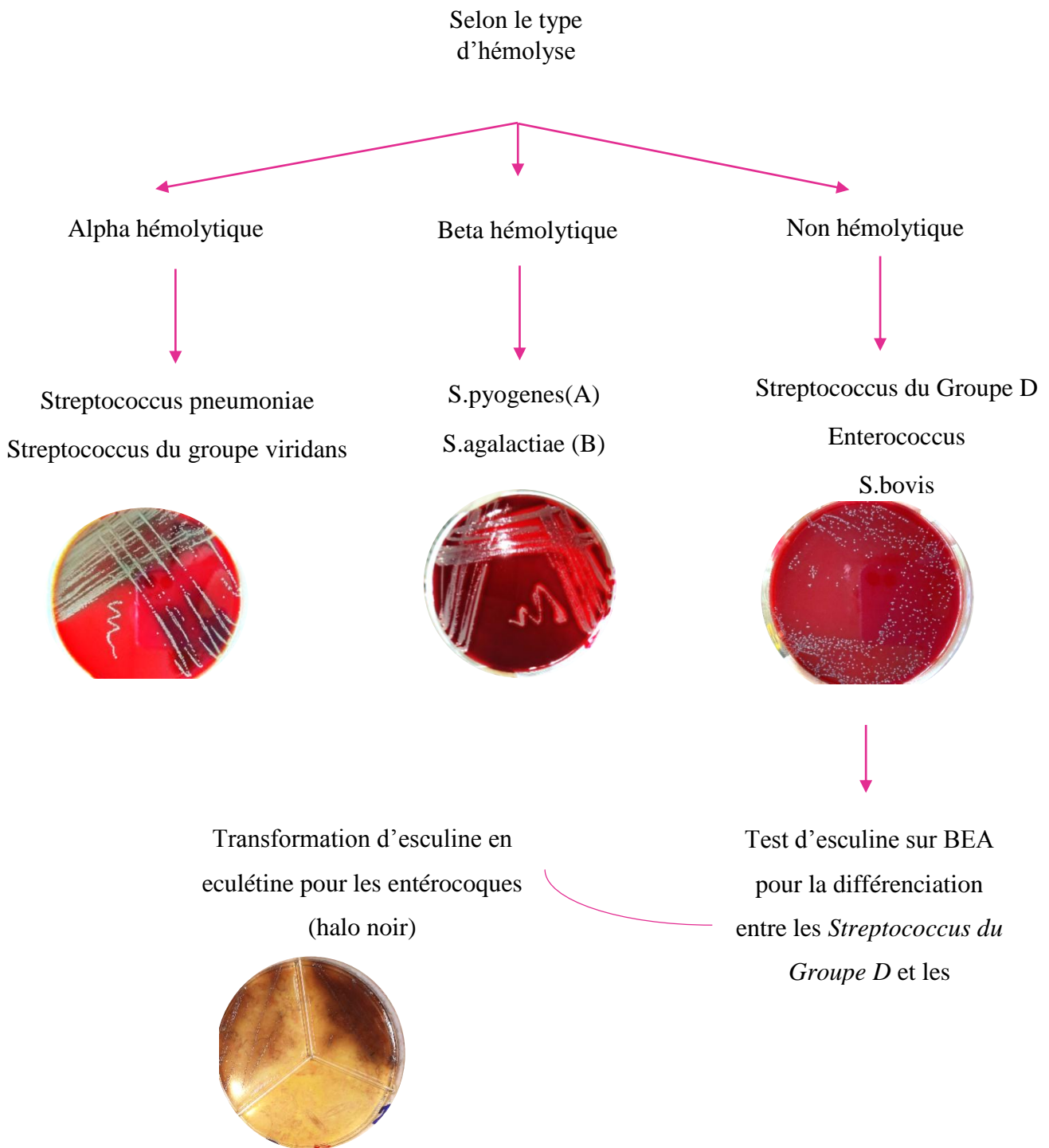


Figure 39 : Résultats de l'identification des streptocoques et entérocoques

F/ Test d'agglutination PASTOREX Strep

Le résultat du test d'agglutination PASTOREX Strep est illustré par la Figure 40.

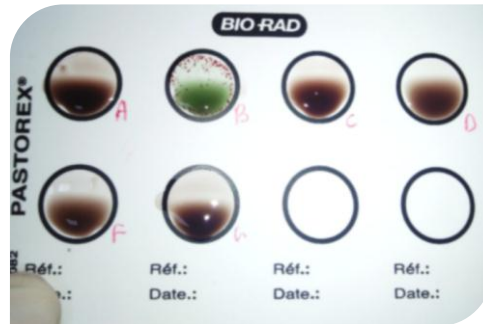


Figure 40 : Résultat de l'agglutination de streptocoque de groupe antigénique B

G/ galerie API Strep

Les résultats de la galerie API Strep sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau XVI. Caractères positifs et négatifs des entérocoques et des streptocoques (API 20 Strep)

Caractère Bactérie	Caractère																			
	VP	HIP	ESC	PYRA	a-GAL	b-GUR	b-GAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	b-HEM
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>Enterococcus faecium</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-

H/ Identification les bactéries à Gram négative oxydase +

L'identification les bactéries à Gram négative et oxydase positive pour la confirmation de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* par la culture dans les deux milieux King A ET King B (Figure 41,42), et par la galerie API 20 NE ou bien Galerie API 20E (Tableau XVII) (Figure 43).

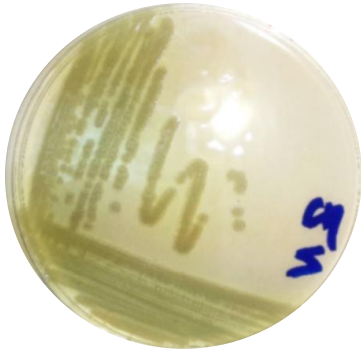


Figure 42 : *Pseudomonas aeruginosa* sur King A pigmentation verte



Figure 41 : *Pseudomonas aeruginosa* sur King B pigmentation bleu

Tableau XVII. Résultat d'API 20 NE, API 20E pour *Pseudomonas aeruginosa*

API 20 NE	Caractère	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MIL	CIT	PAC	OX	
	Bactérie																					
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	
API 20 E	Caractère	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	
	Bactérie																					
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Figure 43 : API 20 NE *Pseudomonas aeruginosa*

I/ Identification des bactéries Gram négative et oxydase négative

L'identification des bactéries GN et oxydase - par la galerie classique ou bien par la galerie API 20E est présenté dans le Tableau suivant et les Figures de 45 à 47 :

Tableau XVIII. Caractères positifs et négatifs des entérobactéries isolées dans l'API 20 E

Caractère Bactérie	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
<i>Yersinia aldovea</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Providencia rettgi</i>	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Morganella morgani</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Proteus penneri</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+



Figure 444 : *Morganella morgani*



Figure 455 : *Serratia marcescens*



Figure 466 : *Escherichia coli*



Figure 477 : *Enterobacter cloacae*

Le Tableau suivant récapitule les germes isolés et le nombre de souches trouvés pour chaque groupe. Au total 20 espèces ont été isolées dans les 87 prélèvements positifs.

Tableau XIX. Nombre total des isolats par espèces identifiés dans cette étude

Espèces	nombre d'isolats
<i>Escherichia coli</i>	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	05
<i>Serratia marcescens</i>	03
<i>Morganella morgani</i>	02
<i>Proteus mirabilis</i>	01
<i>Proteus vulgaris</i>	01
<i>Proteus penneri</i>	01
<i>Enterobacter cloacae,</i>	02
<i>Citrobacter freundii</i>	01
<i>Acinetobacter baumannii</i>	02
<i>Yersinia aldovea</i>	01
<i>Providencia relt gri</i>	01
<i>Staphylococcus aureus</i>	14
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	06
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	01
<i>Streptocoque de groupe D</i>	04
<i>Streptocoque de groupe B,</i>	03
<i>Enterococcus faecalis</i>	09
<i>Enterococcus faecium</i>	06
85	

Species Group	Percentage
enterbacteries	37%
streptococcus et enterococcus	25%
staphylococcus	24%
pseudomonas	14%

3. Résultats de l'antibiogramme

Le profil de résistance et de sensibilité vis-à-vis des antibiotiques des bactéries isolées comme suit :

- Pour les *Enterobacteriaceae* (Figure 48,53-54) :

Les 41 souches des entérobactéries présentent une résistance très élevée vis-à-vis de l'ampicilline et de l'amoxicilline. 11 souches sont résistantes à la céphalosporine de 3^{ème} génération (céfotaxime). Une forte sensibilité vis-à-vis des aminosides (Gentamicine, Amikacine).

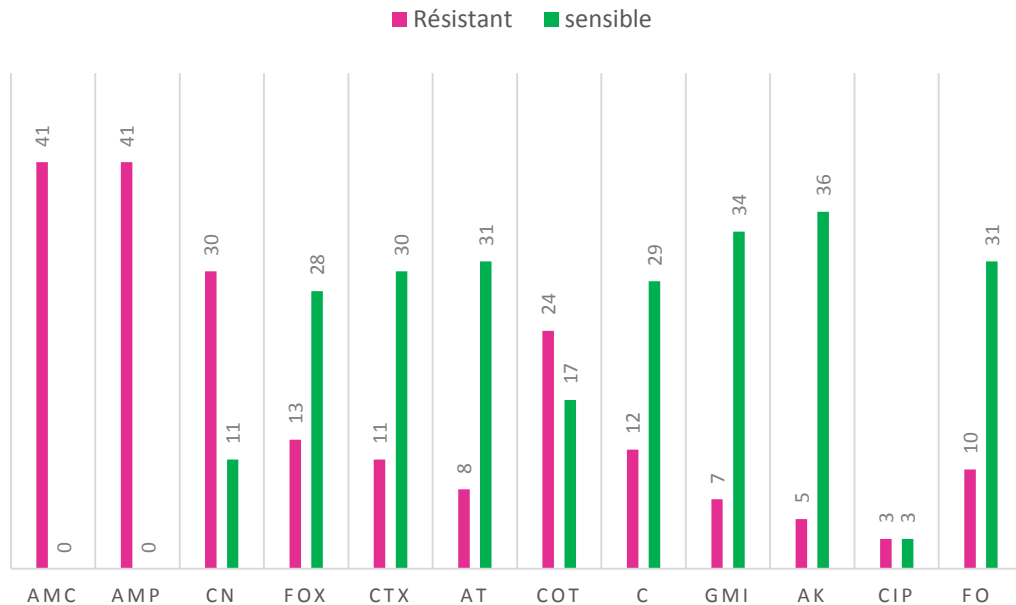


Figure 48 : Profil de l'antibiogramme pour les entérobactéries isolées

- Pour les *Pseudomonas* (Figure 49, 52) :

Les 12 souches de *Pseudomonas aeruginosa* présentent une résistance vis-à-vis des ticarcilines et les ticarcilines avec l'acide clavulanique. Sept (07) souches sont résistantes à la ceftazidime (les plus intéressantes). Ces bactéries présentent une grande sensibilité aux quinolones (Lévofloxacine, Ciprofloxacine) et à la fosfomycine.

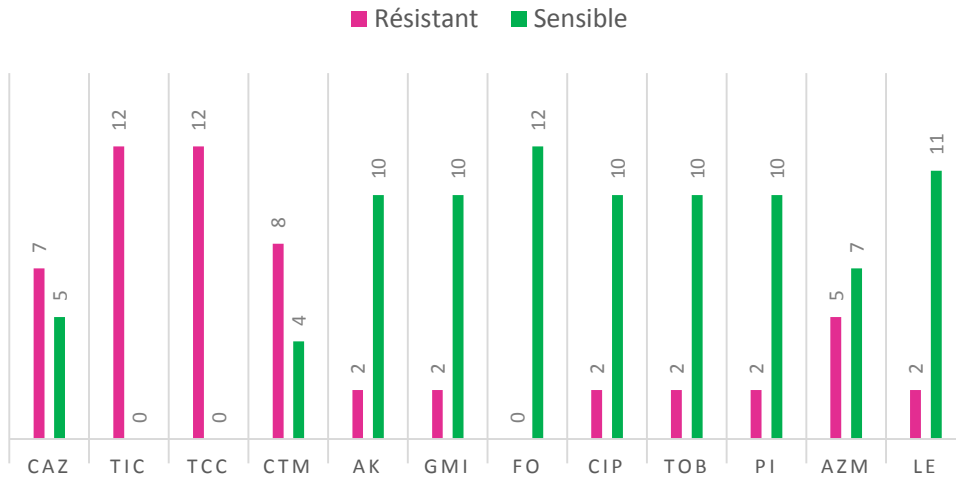


Figure 49 : profil d'antibiogramme pour les *Pseudomonas* isolées

- Pour les *Staphylococcus* (Figure 50) :

Les 21 souches sont résistantes à la pénicilline, 20 à l'oxacilline et 18 à la Céfoxitine.

Aucune souche n'est résistante à la vancomycine. Elles ont une forte sensibilité vis-à-vis de la fosfomycine.

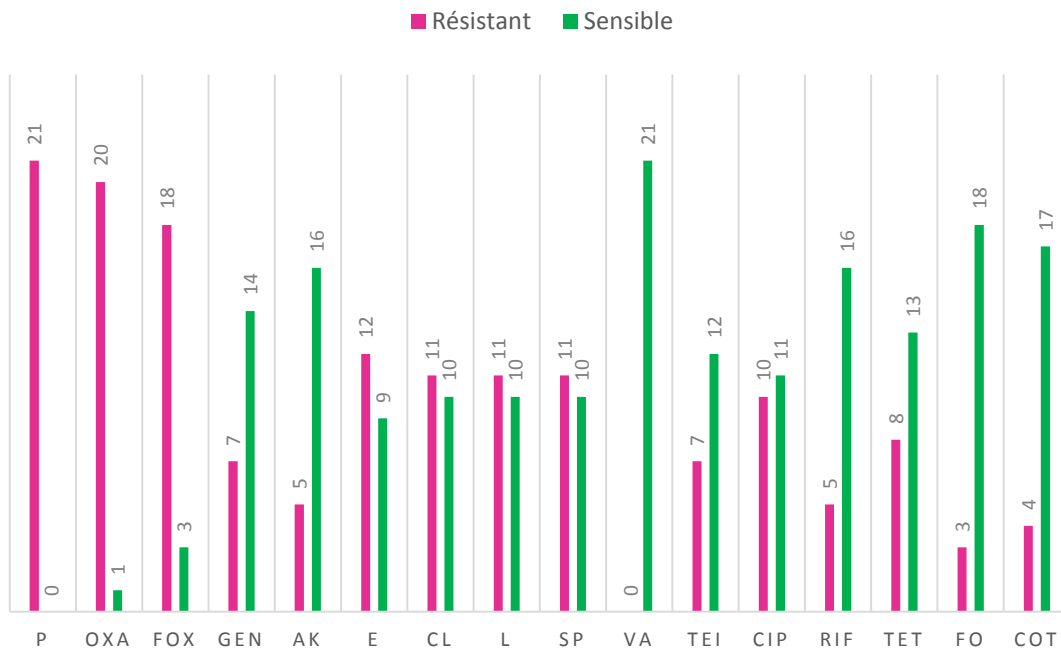


Figure 50 : Profil d'antibiogramme pour les *staphylococcus* isolés

- Pour les streptocoques et les entérocoques (Figure 51)

Les 22 souches présentent une résistance élevée vis-à-vis de l'ampicilline et de la streptomycine.

Une résistance élevée aux macrolides (Erythromycine) est relevée dans cette étude. Deux sont résistantes à la vancomycine (les plus intéressantes).

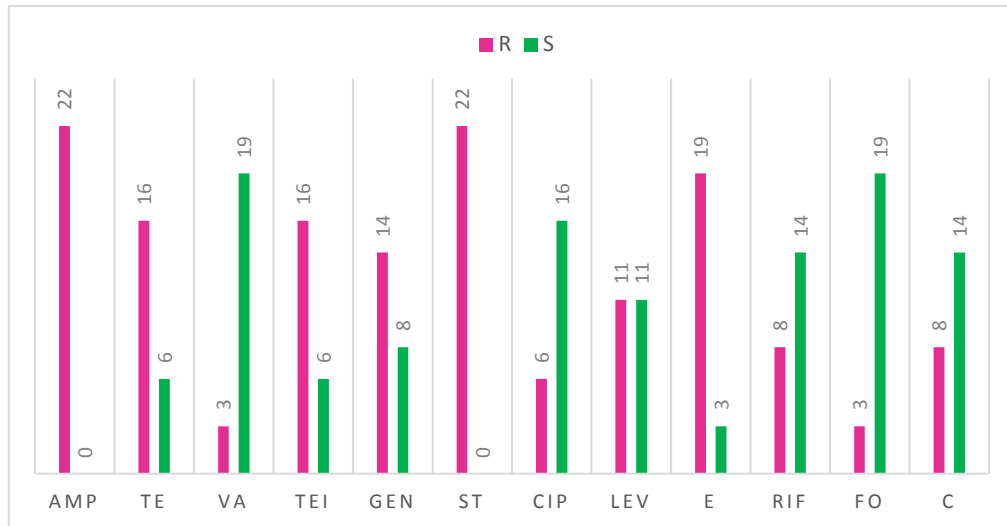


Figure 51 : profil d'antibiogramme pour les streptocoques et les entérocoques isolées

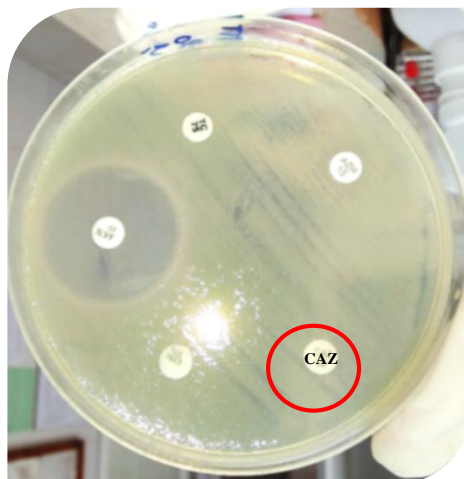


Figure 52 : antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa* résistante à la ceftazidime

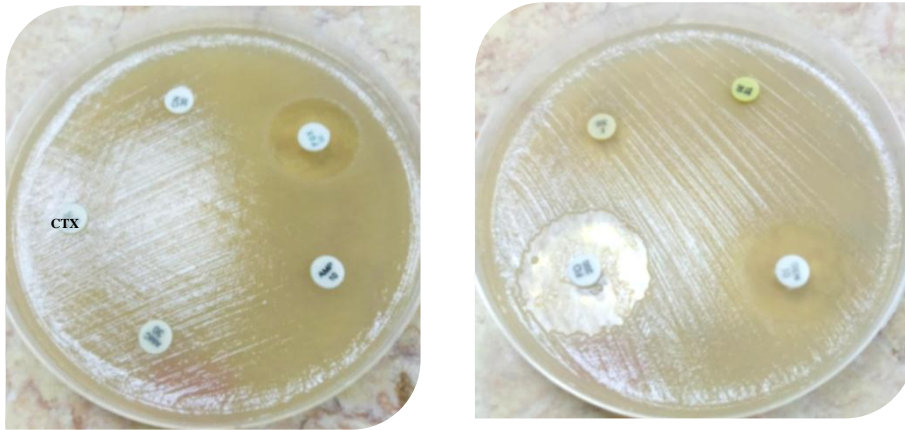


Figure 53 : profil de résistance de *Proteus mirabilis*

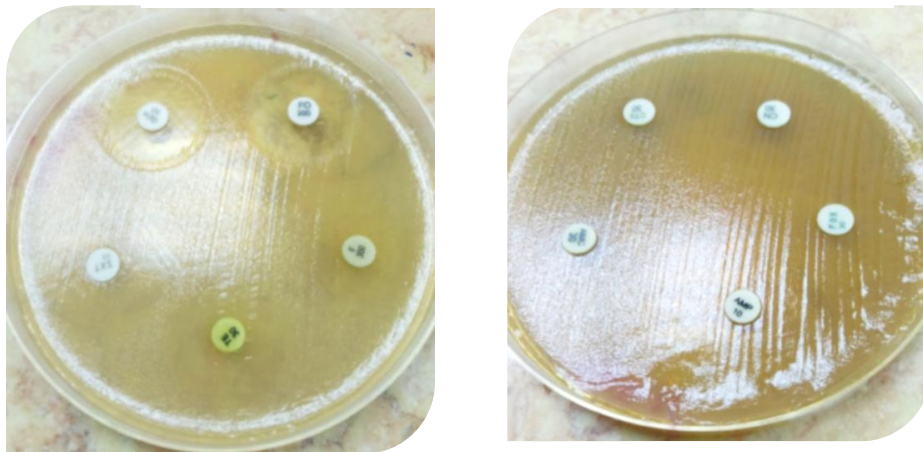


Figure 484 : profil de résistance de *Klebsiella pneumoniae*

On a trouvé 25 souches de bactéries multirésistantes (BMR) qui appartiennent principalement à 8 espèces représentées dans le tableau suivant :

Tableau XX. Récapitulatif des Bactéries multi résistantes (BMR) sélectionnées pour la suite de l'étude

Espèces	Nombre	Profil de résistance
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	05	Résistante à la ceftazidime
	02	Multi résistante
<i>Staphylococcus aureus</i>	04	Résistante à la méthicilline
	03	Multi résistante
<i>Acinetobacter baumannii</i>	02	Multi résistante
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	02	multi résistante
	01	Résistante à la 3 ^{ème} génération de céphalosporine
<i>Escherichia coli</i>	01	multi résistante
	01	Résistante à la 3 ^{ème} génération de céphalosporine
<i>Citrobacter freundii</i>	01	multi résistante
<i>Enterococcus faecalis</i>	01	Résistante à la vancomycine
<i>Enterococcus faecium</i>	01	multi résistante
<i>Proteus mirabilis</i>	01	Résistante à la 3 ^{ème} génération de céphalosporine
Total	25	

4. Identification par MALDI TOF

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a permis une identification plus précise des isolats cliniques par rapport aux techniques d'identification biochimiques (l'erreur est estimé à 5%).

Cette technique nous a permis non seulement une identification rapide et précise des différentes espèces isolées, mais aussi une différenciation entre les différentes souches de la même espèce (Tableau XXI).

Tableau XXI. Identification des souches par MALDI TOF

Identification biochimique	Identification moléculaire
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 3463 DSM</i>
	<i>Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 4910 DSM</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa 19955_1 CHB</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 THL</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa DSM 50071T HAM</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa 8147_2 CHB</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae RV_BA_03_B LBK</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 9295_1 CHB</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli DH5alpha BRL</i>
	<i>Escherichia coli RV412_A1_2010_06a LBK</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis 20247_4 CHB</i>
	<i>Enterococcus faecalis ATCC 7080 THL</i>
	<i>Enterococcus faecalis ATCC 29212 CHB</i>
<i>Morganella morganii</i>	<i>Morganella morganii ssp morganii 15284_1 CHB</i>
	<i>Morganella morganii 9544_1 CHB</i>
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus DSM 20264 DSM</i>
	<i>Staphylococcus haemolyticus 10024 CHB</i>
	<i>Staphylococcus haemolyticus 19 ESL</i>

5. Résultats sur les bactériophages

Après avoir prélevé des échantillons d'eau et de boues liquides et semi liquides de la station de traitement des eaux usées de la ville de Beni Merad mared, à Blida et après filtration, nous obtenons les résultats suivants :

5.1 Isolement des bactériophages

L'isolement des phages a été réalisé dans le Centre de Recherche Analyse Physico-Chimique CRAPC sur des échantillons de la station de traitement des eaux usées de la ville de Beni Mered, en utilisant les isolats de bactéries de l'hôpital du Fares yahia de Kolea.

Les résultats d'isolats après enrichissement (milieu Luria Broth LB concentré dix fois) (Figures 55-56) sont présentés dans les tableaux suivants :

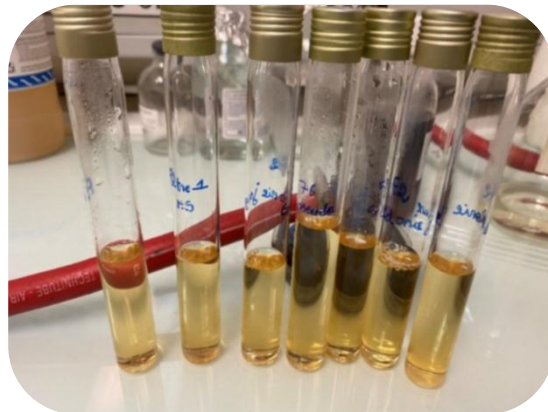


Figure 55 : Absence de trouble dans les 7 tubes du 1er essai après l'étape d'enrichissement

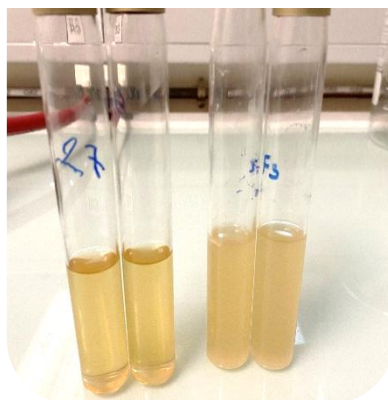


Figure 56 : Différence entre les tubes témoin à droite et les tubes positifs à gauche

L'étape de l'élimination des bactéries du bouillon d'enrichissement qui n'ont pas été lysées par les bactériophages par la technique des seringues de filtration de 0.22 µm de diamètre est illustrée par la figure suivante :

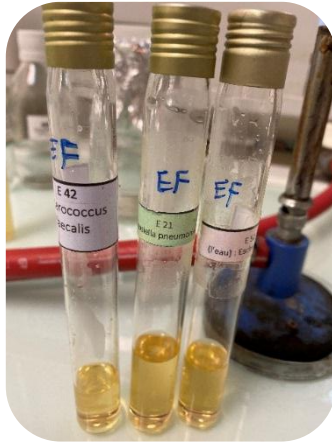


Figure 57 : Résultat de la filtration par seringue des EF

Au total, nous avons obtenu 16 isolats de phages. Le détail du nombre, de la nature des échantillons et des bactéries cibles sont présentés dans les tableaux suivants :

Tableau XXII. Nombre d'isolats de phages par bactérie cible

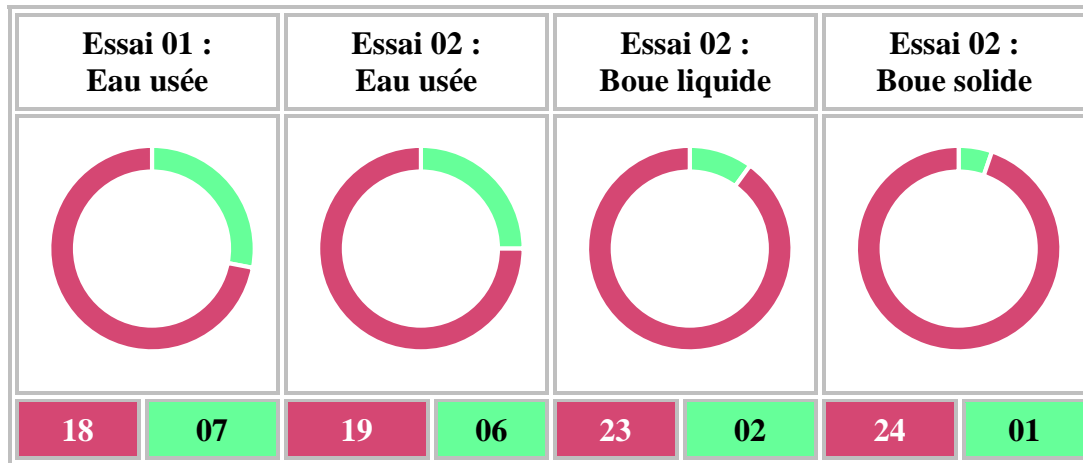
Bactérie cible	Isolats
<i>Pseudomonas aeruginosa (PsA)</i>	02
<i>Staphylococcus aureus (SaA)</i>	03
<i>Klebsiella pneumoniae (KiP)</i>	04
<i>Citrobacter freundii (CiF)</i>	02
<i>Escherichia coli (Ecoli)</i>	04
<i>Enterococcus faecalis (ERV)</i>	01
Total	16

Tableau XXIII. Nombre d'isolats de phages obtenu par échantillons

Essai Bactérie	01 Date : 07/06/2021 Filtration par 0.22 µm	02 Date : 20/06/2021 Filtration par 0.22 µm		
	Eau usée	Eau usée	Boue liquide	Boue –semi solide
SaA	-	-	-	-
SaA	-	-	-	-
SaA	-	-	-	-
SaA	+	+	-	-
SaA	-	-	-	-
SaA	-	-	-	-
SaA	-	+	-	-
PsA	-	-	-	-
PsA	+	-	-	-
PsA	-	-	-	-
PsA	-	-	-	-
PsA	-	-	-	-
PsA	-	-	-	-
PsA	-	+	-	-
ERV	+	-	-	-
ERV	-	-	-	-
KIP	+	+	-	-
KIP	+	-	-	-
KIP	-	+	+	-
Ecoli	+	-	+	+
Ecoli	-	-	-	-
CiF	+	+	-	-
PrM	-	-	-	-
Aci	-	-	-	-
Aci	-	-	-	-
Total	07	06	02	01

SaA ; *Staphylococcus aureus*, PsA ; *Pseudomonas aeruginosa*, ERV ; entérocoques résistante à la vancomycine, KIP ; *klebsiella pneumonie* E..coli ; *Escherichia coli*, CiF ; *Citrobacter freundii*, PrM ; *Proteus mirabilis*, Aci ; *Acinetobacter baumannii*

Tableau XXIV. Nombre d'isolats par rapport aux 25 souches des BMR



■ Nombre d'échantillon, négatif ■ Nombre d'échantillon, positif

5.2 Titration des bactériophages

Le tableau suivant représente le résultat du phagogramme par la technique de double couche d'agar choisi comme test antibactérien des 16 isolats de bactériophages avec leurs bactéries cible (Figure 58,59).

Tableau XXV. Nombre de plage de lyse par espèces

	Spot Phage	F	EF	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	CN
		Essai N°=01 Eau usée	PsA	+	+	+	-	-	-	-
Ecoli	+		+	+	+	-	-	-	-	-
KIP	+		+	-	-	-	-	-	-	-
KIP	+		+	-	-	-	-	-	-	-
CiF	+		+	+	+	+	+	+	+	-
SaA	+		+	-	-	-	-	-	-	-
Essai N°=02 Eau usée	ERV	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	PsA	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	KIP	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	KIP	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	CiF	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	SaA	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Essai N°=02 boue liquide	SaA	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	Ecoli	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Essai N°=02 boue semi- solide	Ecoli	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	Ecoli	+	+	+	+	+	-	-	-	-

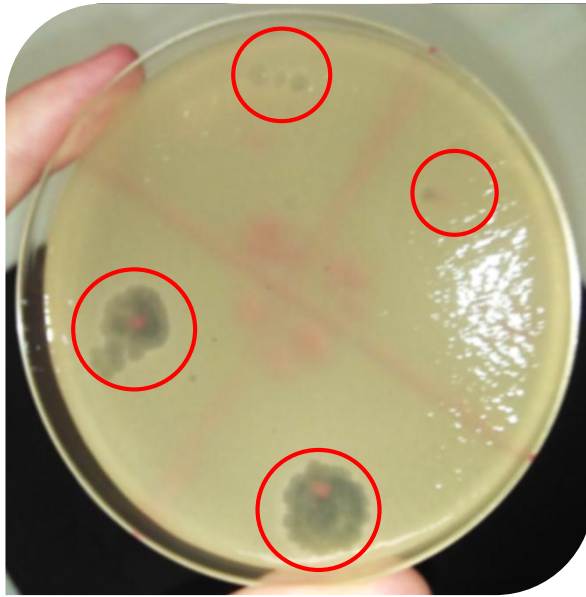


Figure 58 : phagogramme d'*E. coli* dans l'essai 01 :
Présence de 04 plages de lyse



Figure 59 : présence deux plages de lyse
(phagogramme de *pseudomonas aeruginosa*)

Après incubation à 37°C, le lendemain, les plages de lyse sont comptées et la concentration du phage est calculée. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau XXVI. Concentration de bactériophage /ml dans chaque préparations phagiques

Essai	Isolats	Concertation /ml
01 Eau usée	PsA	3200 ufp/ml
	Ecoli	4800 ufp/ml
	KIP	1600 ufp/ml
	KIP	1600 ufp/ml
	CiF	20800 ufp/ml
	SaA	1600 ufp/ml
	ERV	1600 ufp/ml
02 Eau usée	PsA	1600 uf/ml
	KIP	4800 ufp/ml
	KIP	8000 ufp/ml
	CiF	20800 ufp/ml
	SaA	1600 ufp/ml
	SaA	1600 ufp/ml
02 boue liquide	Ecoli	22400 ufp/ml
	Ecoli	11200 ufp/ml
02 boue semi— solide	Ecoli	6400 ufp/ml

5.3 Tests de confirmation des bactériophages

Après apparition de plages de lyses traduisant la multiplication des bactériophages en infectant les bactéries. Les résultats des tests de confirmation sont illustrés par les photos suivantes :

- Après découpage de la gélose de la plage de lyse (Figure 60)

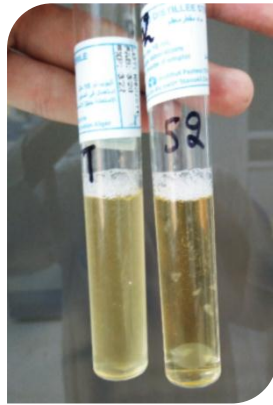


Figure 60 : pour *Escherichia coli* à gauche le témoin positif (LB + bactérie) à droite la coupe de gélose de la plage de lyse sans trouble après incubation 5h

- Après la série des dilutions, le nombre de plage de lyse est en diminution (Figure 61)

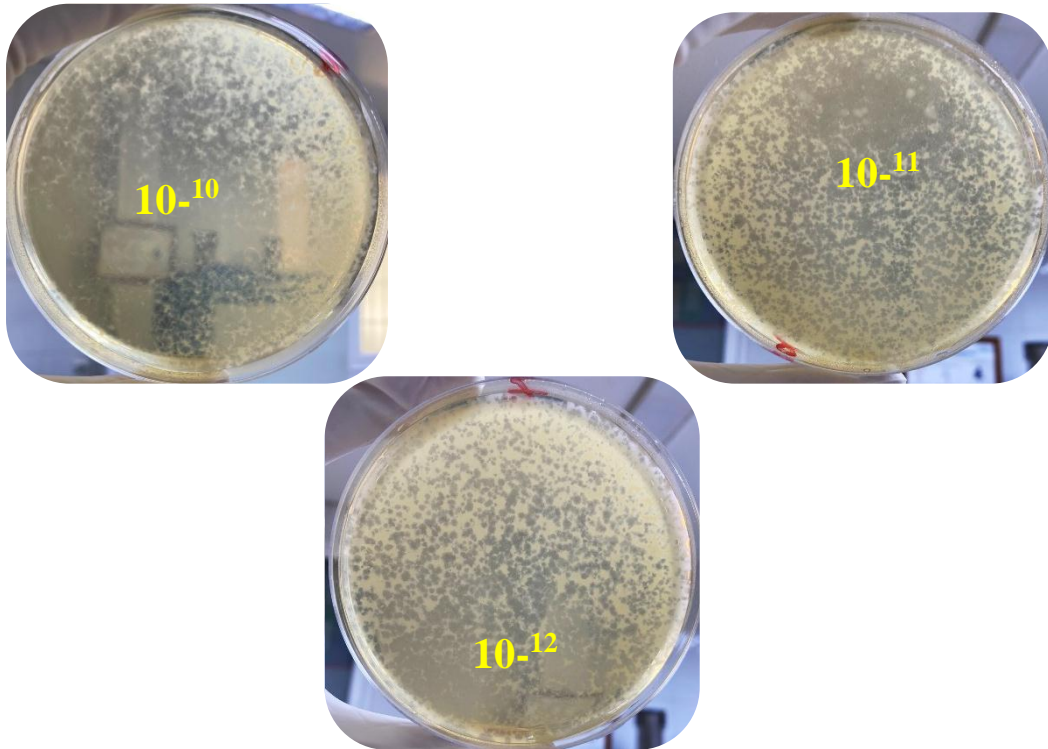


Figure 61 : résultat de culture de 3 dernières dilutions de phage avec *Citrobacter freundii*

5.4 Efficacité in vitro

L'efficacité de lyse in vitro des phages est testée en milieu LB à 37°C et RT (room temperature). Le phage est incubé avec sa bactérie hôte en utilisant un faible MOI (~ 0,001= 1 phage pour 1000 bactéries) et la densité optique est lue à toutes les heures jusqu'à ce que la bactérie prenne le dessus (Figures 62,63).

- Les courbes de croissance des trois bactéries *klebsiella pneumonie* (*Kip*), *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Citrobacter frendii* (*CiF*) avec le milieu d'enrichissement LB à 37 C° sont présentées dans la figure 62. La DO (600nm) augmente chaque heure après la lecture ce qui signifie qu'il y a une croissance bactérienne.

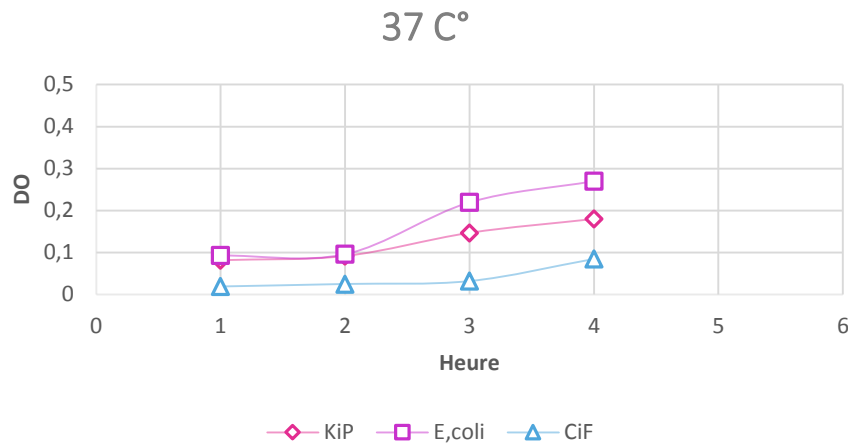


Figure 62 : courbes de croissance des bactéries à 37 C° par heure

Les courbes ci-dessus représentent la lecture de la DO à chaque heure après l'ensemencement des phages avec une faible concentration des bactéries hôtes (*Kip*, *Ecoli*, *CiF*) dans le milieu LB à 37 C°.

Durant les trois 1^{ères} heures, il y a une croissance de ces bactéries. Après, on note que la DO diminue due au potentiel lytique des phages.

Durant la 7^{ème} heure, la DO = 0 pour *Kip*, *Ecoli*, ce qui signifie qu'il y a une disparition totale de ces bactéries et à la 8^{ème} heure pour *Citrobacter frendii* (*CiF*) (Figure 63).

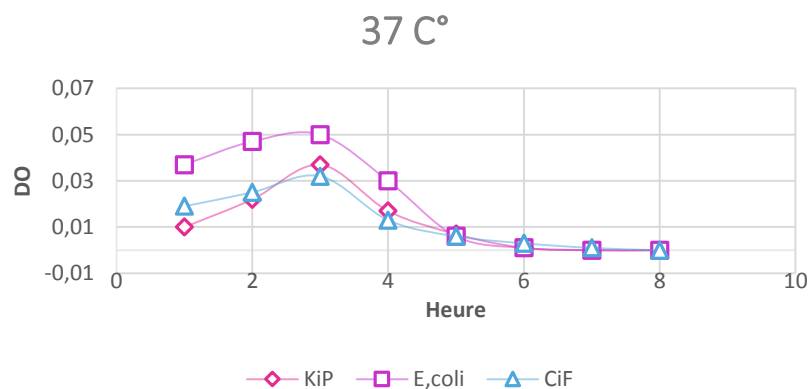


Figure 63: courbes de croissance des bactéries en présence des phages lytiques à 37 C° par heure

La figure suivante représente les courbes de croissance des bactéries hôtes (*Kip*, *E. coli*, *CiF*) en présence de forte concentration des phages lytiques en (*Kip*, *Ecoli*, *CiF*) dans le milieu LB à 27 C°. Durant les trois premières heures, nous avons noté une croissance de ces bactéries. Après, la DO diminue due au potentiel lytique des phages. Dans la 8^{ème} h, la DO = 0 pour *E. coli* et dans la 9^{ème} h pour *Kip* et *CiF*.

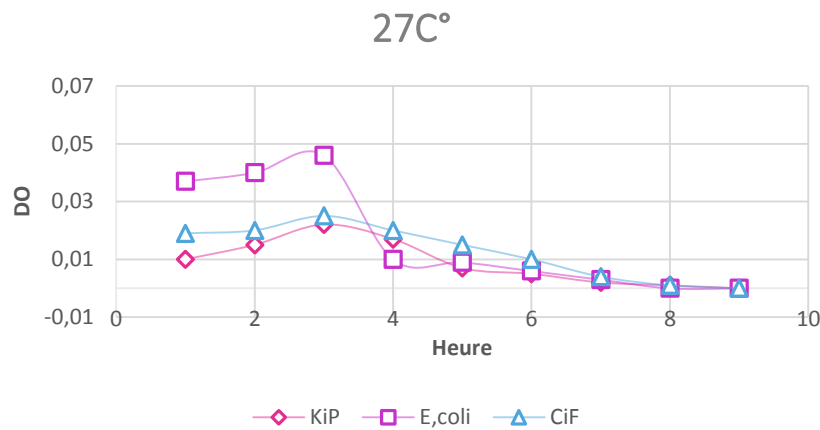


Figure 64 : courbes de croissance des bactéries en présence des phages lytiques à 27 C° par heure

5.5 Combinaison phage-ATB

La synergie entre phage-antibiotique qui est l'augmentation de la plage de lyse en présence d'antibiotiques

Nos résultats démontrent que la taille de plage de lyse est augmentée en présence d'antibiotique céfotaxime et l'amikacine.

Discussion

De nos jours, les maladies infectieuses d'origine bactérienne ne sont pas bien contrôlées par les médicaments actuels dus à la croissance des résistances aux antibiotiques. Pour cela l'OMS a alerté sur le danger de cette menace (Morgane, 2019). Face à ce problème, il serait envisageable de réhabiliter et d'utiliser une thérapie ancienne : la thérapie par bactériophages, une pratique qui peut offrir une alternative de lutte antibactérienne naturelle qui répond spécifiquement à cette problématique (Dublanche et Patey, 2015 et Martineau, 2010).

En premier lieu, cette étude a isolé et identifié des microorganismes responsables des infections nosocomiales à partir de 179 prélèvements effectués dans l'hôpital Fares Yahia à Kolea puis nous avons dressé les profils des bactéries multirésistantes.

A partir des différents tests que nous avons réalisés, nous avons noté que les prélèvements sont souvent poly-microbiens. Nous avons isolé 87 espèces bactériennes dont la majorité appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* qui dominent avec un pourcentage de 37%. Elles sont suivies des streptocoques et entérocoques 25 %, des Staphylocoques avec 24% et en dernier les *Pseudomonas* avec 14%.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques nous a confirmé que parmi les espèces bactériennes isolées, 25 présentent une résistance aux différents antibiotiques utilisés comme *Pseudomonas aeruginosa* résistante à la ceftazidime, *klebsiella pneumonie*, *Eschirichia coli* résistante à la cefotaxime, *Staphylococcus aureus* résistante à la methicilline, *Enterococcus* résistante à la vancomycine. *Acinetobacter baumannii* a présenté une résistance plus élevée.

En général et selon Strateva et al., (2009), les isolats cliniques de *P. aeruginosa* sont moins sensibles que les entérobactéries à la plupart des classes d'antibiotiques, puisque pratiquement tous les mécanismes connus de résistance aux antibiotiques s'y manifestent : dépression de la céphalosporinase AmpC chromosomique ; production de plasmide ou d'integron- b-lactamases médiées de différentes classes moléculaires (carbénillinases et b-lactamases à spectre étendu appartenant à la classe A, oxacillinases de classe D et enzymes hydrolysantes carbapenem de classe B); perméabilité réduite de la membrane extérieure (perte de protéines OprD); surexpression des systèmes d'efflux actifs avec de larges profils de substrat; synthèse des enzymes aminoglycosides-modifiantes (phosphoryltransférases, acétyltransférases et adéyltransférases); et modifications structurelles des topoisomérases II et

IV déterminant la résistance quinolone. Ce qui est inquiétant, c'est que ces mécanismes sont souvent présents simultanément, conférant ainsi des phénotypes multirésistants.

Les β -lactamines constituent une famille d'antibiotiques très largement utilisés en clinique. Ces antibiotiques agissent en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne par fixation aux protéines liant les pénicillines (PLP). La résistance des bactéries productrices de β -lactamases à large spectre (BLSE: β -lactamases à spectre élargi) sont devenus un problème de santé majeur (Yala *et al.*, 2016).

La majorité des BLSEs sont le résultat de mutations génétiques des β -lactamases naturelles. Ils sont très actifs contre les pénicillines et modérément actifs contre les céphalosporines de première génération. Les mutations génétiques à l'origine des BLSEs élargissent le spectre de ces enzymes et affectent également les céphalosporines de troisième génération (ceftazidime, cefotaxime et ceftriaxone, etc.) et les monobactams (aztreonam) (Tiemtoré *et al.*, 2019).

Depuis l'apparition du SARM en 1961, la prévalence de ce type de souches de *S. aureus* a augmenté de façon constante dans le monde entier. Les infections au SARM constituent une préoccupation importante pour les patients des unités de soins intensifs. Comme il a été établi auparavant, le SARM représentait près de 60% de toutes les infections à *S. aureus* contractées aux soins intensifs (Dibah *et al.*, 2014).

S. aureus a développé différents mécanismes de résistance contre les agents anti-staphylococciques. En particulier, les souches hospitalière (et plus récemment communautaires) ont développé une résistance croisée contre les pénicilline M (méthicilline et pareillement) par la production de la protéine PLP2, liant les pénicillines qui possèdent une faible affinité pour ces molécules (Dumitrescu *et al.*, 2010).

La résistance aux glycopeptides notamment la vancomycine est observée principalement chez les entérocoques en particulier *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis*, qui sont responsables d'infections sévères est difficile à traiter particulièrement chez les immunodéprimés (Lesens, 2009). Le mécanisme de résistance des ERV implique une modification de la cible de cette antibiotique (les résidus peptidyl Dala-Dala), le Dala étant remplacé par l'acide D-lactiques (Lesens, 2009). Cette résistance à la vancomycine est codée par le gène VanA. Ce gène est acquis est peut-être transmis à d'autres bactéries cocci à Gram positif comme les streptocoques et le staphylocoque doré (Lesens, 2009).

Acinetobacter baumannii est aussi caractérisée par une grande variété de mécanismes de résistance aux antibiotiques. Ces mécanismes de résistance se divisent généralement en trois grandes catégories : (i) enzymes qui inactivent les agents antibiotiques principalement les bêta-lactamases qui hydrolysent et confèrent une résistance aux pénicillines, aux céphalosporines et aux carbapénèmes. Cette bactérie produit aussi une céphalosporinase de type AmpC également connue sous le nom de céphalosporinases dérivées d'*Acinetobacter* (ADC). (ii) Accès réduit aux bactéries cibles (en raison de la diminution de la perméabilité de la membrane externe causée par la perte ou la réduction de l'expression des porines, de la surexpression des pompes à efflux multimédicamenteuses). (iii) Des mutations qui modifient les cibles ou les fonctions cellulaires (altérations des protéines liant la pénicilline; PLP) (Manchanda et *al.*, 2010).

La 2^{ème} partie de cette étude a pour objectif, d'isoler les bactériophages, de les appliquer sur les bactéries multi résistantes isolées précédemment et les conserver pour screening et génotypage.

16 phages ont été isolés à partir des prélèvements d'eaux usées et des boues de la station d'épuration de Beni Mered. 04 pour *Klebsiella pneumoniae* (KiP), 04 pour *Escherichia coli* (Ecoli), 03 pour *Staphylococcus aureus* (SaA), deux pour *Pseudomonas aeruginosa* (PsA), deux pour *Citrobacter freundii* (CiF), et un seul phage isolé pour *Enterococcus faecalis*. Ces phages ont été obtenus après une filtration sur membrane de 0.22µm et des étapes d'enrichissement et titration pour faire ressortir à la fin le potentiel lytique de chaque phage isolé.

Nos résultats montrent que ce sont les eaux usées qui étaient les plus chargées en phages que les boues, vu que l'extraction de ces virus à partir des boues comporte plusieurs étapes avant la filtration ce qui diminue la concentration des phages dans ces échantillons.

L'utilisation des eaux et des boues comme source pour isoler les bactériophages a été démontrée dans les travaux par plusieurs auteurs, nous citerons ceux de Bendaira and Brik, (2015); Synnott et *al.*, (2009), Martineau (2009) et Khan et *al.*, (2002).

À Tokyo, les eaux usées provenant de la station municipale de traitement des eaux usées ont aussi fait l'objet d'une étude de Synnott et *al.*, (2009) pour isoler les phages qui ont présenté des capacités lytiques contre *Staphylococcus aureus* provenant de lait de vache mastitique.

L'équipe de Cross et *al.*, (2015) a adapté la méthode décrite par Van Twest and Kropinski, (2009) qui consistait à isoler les bactériophages à partir du sol dans un tampon de phage et filtré par un filtre de 0.22µm pour éliminer les bactéries contaminantes. L'extrait filtré

contenant les particules de phage d'Arthrobacter qui est dilué dans un bouillon 2 x LB avec les bactéries spécifiques *Arthrobacter* sp. KY3901 utilisées comme hôte de propagation de phage a donné des résultats prometteurs. Ce qui a été le cas dans cette étude.

Magin (2019) a exploré le potentiel des bactériophages dans le traitement des surfaces en contact avec l'eau, contaminées par un biofilm de *P. aeruginosa*. Cet auteur a réalisé différents prélèvements dans le but d'isoler des phages de l'environnement. Certains échantillons sont issus d'eaux usées sur le site du CSTB (Nantes), d'autres de cours d'eaux, rivières ou encore de récupérateurs d'eaux de pluies et de réserves d'eaux. Il a utilisé dans les méthodes d'isolement et de sélection des phages d'inoculation standardisé en milieu LB, amplification et suivi du titre des phages, méthode « spot test » le phagogramme pour sélectionner les phages infectieux, afin d'obtenir 08 phages bien caractérisés contre *P. aeruginosa*. Dans notre étude, nous avons suivi globalement les mêmes étapes - afin d'obtenir deux phages lytiques dirigés contre *P. aeruginosa*.

De plus, la spécificité reconnue de l'interaction d'un phage avec son hôte bactérien signifie que les chances de succès du traitement peuvent être considérablement augmentées en ayant plusieurs phages avec de fortes capacités lytiques et de larges gammes d'hôte qui complètent celles d'autres phages (Synnott et al., 2009).

Martineau (2010) a isolé des phages à partir des eaux qui ont été sélectionnés selon leur capacité d'amplification, leur profil génomique et leur potentiel lytique envers différentes souches bactériennes cliniques. Il a testé l'efficacité in vitro de ces phages isolés à 37°C et à température ambiante. Les résultats étaient satisfaisants. Certains phages sont très actifs car ils maintiennent un niveau bas de bactérie hôte pendant une longue période (>24h à 37°C particulièrement BP17 qui est efficace pendant 6 jours). Tous les phages testés rencontrent le critère minimum de contrôle du niveau bactérien, soit jusqu'à 6h, autant à 37°C qu'à température ambiante (la plupart des phages laissent la bactérie prendre le dessus en 6h). Les phages BP16 et BP17 présentent une très bonne efficacité de lyse bactérienne à long terme à température ambiante.

Notre étude a démontré que les phages isolés sont plus efficaces et plus actifs à 37°C qu'à 27°C. Les phages dirigés contre les bactéries *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* détruisent toutes les bactéries entre 7h-8h à 37°C et entre 9h -10h à température ambiante. Dans les deux expériences les phages isolés possèdent un bon potentiel lytique dirigé contre ces bactéries hôtes.

D'autre part, les travaux de Trojet en 2011 ont permis de caractériser le phénomène de la Synergie Phage-Antibiotique « effet PAS ». Les phages utilisés pour ces travaux sont extraits à partir d'urine d'enfant atteint d'une infection bactérienne urinaire et ont été testés avec ou sans l'antibiotique de céfotaxime à 30 ng/ml sur un tapis bactérien d'*Escherichia coli* AS19. Les résultats obtenus montrent clairement que la taille des plages est directement liée à une augmentation de la production de phage par la souche AS19 avec un titre d'environ 11 fois.

Nos résultats sont compatibles avec ces derniers, la taille de plage de lyse est augmentée en présence d'antibiotique céfotaxime et l'amikacine.

Il existe très peu de recherches publiées pour la conservation des bactériophages, Alvi et ses collègues en 2018 ont réalisé une enquête sur l'activité de cinq bactériophages à queue JHP, RLP, RSP, SaPL et IttPL isolés de différentes sources d'eaux usées de Lahore au Pakistan après leur stockage à long terme. La nouveauté de leur étude est qu'aucun conservateur spécial n'a été utilisé dans les solutions de phages. Le milieu choisi était le bouillon LB. En comparaison avec d'autres études antérieures, les conditions de la conservation diffèrent selon le type de phage. La température à 4°C s'est avérée être appropriée pour le stockage de ces bactériophages, des résultats similaires décrits par d'autres travaux utilisant des phages à queue sans lipides qui peuvent être stockés pendant plus de 5 à 10 ans dans des conditions identiques (Alvi et al., 2018).

Les résultats de la recherche de l'équipe d'Alvi, (2018) sont similaires à une autre étude de Merabishvili et al., (2009) qui n'a révélé aucun changement du titre des phages appliqués à *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* après un an de stockage à 4°C. En effet, aucun des phages étudiés n'a démontré une viabilité significative après un an de conservation à température ambiante et à 37°C, sauf JHP où une viabilité de 30% a été observée. Ils ont observé aussi une diminution de 25 à 71% et de 45 à 100% du titre de bactériophage, lorsque les phages étaient stockés à -20°C et -80°C, respectivement pendant 1 an (Alvi et al. 2018).

Bien que les phages représentent une grande espérance pour le traitement des infections et leur utilisation strictement clinique dans certains pays européens, l'OMS ne mentionne aucune approche de traitement possible par les phages face aux bactéries multirésistantes et beaucoup de recherches restent à faire sur ce sujet (Bacteriophage.news, 2020b).

Conclusion

CONCLUSION

La progression de l'antibiorésistance parmi les bactéries rencontrées en pathologie infectieuse et le manque criant de nouveaux antibiotiques susceptibles de la combattre rendent indispensable la recherche d'autres approches thérapeutiques. Parmi celles-ci, l'utilisation des bactériophages est une des solutions les plus prometteuses.

Cette étude préliminaire porte sur l'isolement des bactériophages à partir des différents échantillons d'eau usée et des boues liquides et semi-solide prélevés au niveau de la STEP de la wilaya de Blida afin de les appliquer sur les bactéries multirésistantes.

Parmi les 179 prélèvements pathologiques, 87 étaient positifs. Les résultats de l'identification ont permis de caractériser 85 souches.

La résistance aux antibiotiques des germes isolés s'est révélée plus importante pour 25 souches, cela pourrait être liée à la prise en charge des patients impliquant des soins invasifs, à la pression d'antibiotique exercée et à un problème de maîtrise de l'environnement hospitalier.

Cinq souches de *Pseudomonas aeruginosa* étaient résistantes à la ceftazidime et deux souches multirésistantes. Pour *Staphylococcus aureus*, quatre souches étaient résistantes à la méthicilline et trois souches multirésistantes. Pour *Klebsiella pneumoniae*, deux souches sont multirésistantes et une souche résistante à la 3^{ème} génération de céphalosporine.

Pour *Escherichia coli*, une souche était résistante à la 3^{ème} génération de céphalosporine. Pour *Enterococcus faecalis* une souche était résistante à la vancomycine. Pour *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecium*, *Proteus mirabilis* et *Acinetobacter baumannii*, étaient multirésistantes.

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a permis une identification plus précise des isolats cliniques par rapport aux techniques d'identification biochimiques.

Cette étude a permis également d'isoler 16 phages à partir des eaux usées et des boues de consistance variable distribués comme suit : 13 phages isolés à partir des eaux usées et trois phages à partir des boues.

Le nombre d'isolats par bactérie cible était comme suit : Quatre phages contre *klebsiella pneumonie*, quatre contre *Escherichia coli*, trois contre *Staphylococcus aureus*, deux contre

Pseudomonas aeruginosa, deux phages contre *Citrobacter freundii* et un contre *Enterococcus faecium*. Les phages isolés présentaient un bon potentiel lytique contre les bactéries hôtes.

Le monde étant actuellement confronté aux infections nosocomiales difficiles à traiter, les bactériophages représentent un potentiel médicinal naturel offrant une panoplie d'applications relativement peu coûteuses et qui répondent en toute sécurité aux impératifs de cette lutte antibactérienne en milieu hospitalier.

D'après les études précédentes, on peut estimer que l'usage des phages a été mis en évidence malgré la courte période d'étude et le très peu d'essais in vivo. Par conséquent, la recherche sur les bactériophages et leurs applications doit se poursuivre et ne pas s'arrêter là. Cette recherche présente des limites et nécessite beaucoup d'approfondissement afin d'atteindre les objectifs fixés.

Des nouvelles techniques et méthodes pour l'isolement et la caractérisation d'un maximum des phages pourraient être développés.

Comme perspectives :

- ✓ Caractérisation des phages en analysant leurs génomes (ADN ou ARN) avec l'utilisation des techniques de biologie moléculaire.
- ✓ L'étude de la pureté par l'évaluation le dénombrement des endotoxines pour les phages de bactéries Gram négatif et idéalement le séquençage complet du génome du phage.
- ✓ L'étude de la Cinétique d'adsorption, cinétique de répllication et purification des phages
- ✓ Une meilleure visualisation sous microscopie électronique à balayage
- ✓ L'application in vitro et in vivo des phages en vue d'une meilleure compréhension de leurs effets.

Comme l'ont souligné Dufour et Debarbieux en 2017, la phagothérapie n'est pas une arme thérapeutique universelle mais une alliée incontournable pour le futur. Elle doit faire l'objet d'une évaluation approfondie et rigoureuse, unique condition à même d'établir son champ d'activité le plus efficace et le plus sûr. Face à la progression de l'antibiorésistance, il s'agit à ce jour de l'arme thérapeutique la plus prometteuse de par le polymorphisme et le mode d'action de ses agents antibactériens.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

ACCROMBESSY, S.D.C., DOUSSOH, G.V.Y.B., BANKOLE, H.S., DOUGNON, V.T., OREKAN, J., AFFOLABI, D., FASSINO, L., 2014. Apport du BacT/ALERT 3D dans les hémocultures au Centre National Hospitalier Universitaire-Hubert Koutoukou Maga de Cotonou. EPAC/UAC.

Ansaldi, M., Boulanger, P., Brives, C., Debarbieux, L., Dufour, N., Froissart, R., Gandon, S., Le Hénaff, C., Petit, M.-A., Rocha, E., Torres-Barceló, C., 2018. Antibacterial applications of bacteriophages. *Virologie* 24, 23–36.

Alvi, I.A., Asif, M., Tabassum, R., Abbas, Z., Rehman, S. ur, 2018. Storage of Bacteriophages at 4°C Leads to no Loss in Their Titer after One Year. *Pak. J. Zool.* 50.

Barrette, G., 2015. Évaluation de l'utilisation des bactériophages anti-staphylococcus aureus pour l'assainissement de surfaces (masters). École Polytechnique de Montréal.

Bacteriophage.news, 2020b. Bacteriophages & Covid-19. Bacteriophage.news. URL <https://www.bacteriophage.news/bacteriophages-and-covid-19/> (accessed 5.12.20)

Belhamal, C., Boudjemaa, I., Kaouache, S., 2020. Contribution à l'étude des infections l'environnement hospitalier l'environnement hospitalier.

Bernhardt, T.G., Wang, I.-N., Struck, D.K., Young, R., 2002. Breaking free: "Protein antibiotics" and phage lysis. *Res. Microbiol.* 153, 493–501.

Bernhardt, T.G., Wang, I.-N., Struck, D.K., Young, R., 2001. A Protein Antibiotic in the Phage Q β Virion: Diversity in Lysis Targets. *Science* 292, 2326–2329. .

Bourema, M., Halimi, D., Boubekri, K., 2014. Isolement de bactériophages à partir des eaux usées et identification de leurs bactéries hôtes. Université Frères Mentouri Constantine, CONSTANTINE.

Catalão, M.J., Gil, F., Moniz-Pereira, J., São-José, C., Pimentel, M., 2013. Diversity in bacterial lysis systems: bacteriophages show the way. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 554–571.

Cattoen, C., 2015. Persistance du portage de bactéries multirésistantes après la réanimation. *Réanimation* 24, 249–255.

Courtault, J.-R., 2014. Place de la phagothérapie dans le traitement des infections humaines bactériennes: intérêts, enjeux et limites 229.

Cross, T., Schoff, C., Chudoff, D., Graves, Li., Broomell, H., Terry, K., Farina, J., Correa, A., Shade, D., Dunbar, D., 2015. An Optimized Enrichment Technique for the Isolation of *Arthrobacter* Bacteriophage Species from Soil Sample Isolates. *J. Vis. Exp.* 52781.

- Denis, F., Cattoir, V., Martin, C., Ploy, M.-C., Poyart, C., 2016.** Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Masson.
- Dennesen, P.J.W., Bonten, M.J.M., Weinstein, R.A., 1998.** Multiresistant bacteria as a hospital epidemic problem. *Ann. Med.* 30, 176–185.
- Dublanchet, A., 2017.** La phagothérapie en 2017, état des lieux. *Hegel* N° 2, 142–143.
- Dublanchet, A., 2014.** Qu'est-ce que la phagothérapie ? *Hegel* N° 4, 354.
- Dublanchet, A., 2008.** La phagothérapie au XXI^e siècle. Première partie : que pourrait-elle apporter aujourd'hui ? *Antibiotiques* 10, 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.antib.2008.08.002>
- Dublanchet, A., Fruciano, E., 2008.** Brève histoire de la phagothérapie. *Médecine Mal. Infect.* 38, 415–420.
- Dublanchet, A., Patey, O., 2015.** Nouveaux regards sur la phagothérapie 2^e partie. *Feuill. Biol.* 35–46.
- Dublanchet Alain, 2017.** La phagothérapie: des virus pour combattre les infections : renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques / Docteur Alain Dublanchet ; [préfaces de Dr Christian Lafaix], [Nouvelle édition augmentée et mise à jour]. ed. Éditions Favre, Lausanne.
- Dufour, N. et Laurent Debarbieux, L. (2017).** La phagothérapie Une arme crédible face à l'antibiorésistance. *Med Sci (Paris)*. 33 (4) : 410–416
- Dia, N.M., Ka, R., Dieng, C., Diagne, R., Dia, M.L., Fortes, L., Diop, B.M., Sow, A.I., Sow, P.S., 2008.** Résultats de l'enquête de prévalence des infections nosocomiales au CHNU de Fann (Dakar, Sénégal). *Médecine Mal. Infect.* 38, 270–274.
- Dibah, S., Arzanlou, M., Jannati, E., & Shapouri, R. (2014).** Prevalence and antimicrobial resistance pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens in Ardabil, Iran. *Iranian journal of microbiology*, 6(3), 163.
- Droguet, 2021.** URL : <http://droguet-sebastien.e-monsite.com/pages/activites-technologiques-terminale-2014-2015/at26-bacteriophages.html>
- Errafyg, A., 2016.** Rôle de la phagothérapie dans le traitement des infections bactériennes . Thèse de Doctorat. Université Mohammed V-Rabat. 151p.
- Essoh, C.Y., 2013.** Étude épidémiologique de souches de *Pseudomonas aeruginosa* responsables d'infections et de leurs bactériophages pour une approche thérapeutique (phdthesis). Université Paris Sud - Paris XI ; Université de Cocody (Abidjan, Côte d'Ivoire).
- Fokine, A., Rossmann, M.G., 2014.** Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage* 4 : 1-22.
- Fruciano, E., 2011.** La phagothérapie : émergence d'une idée controversée et logique d'un échec (1917-1949) (These de doctorat). Paris, EHESS.

- Godin, C., 2012.** Evaluation de l'utilisation de l'outil e-SIN dans la gestion du signalement externe des infections nosocomiales 51.
- Golec, P., Dąbrowski, K., Hejnowicz, M.S., Gozdek, A., Loś, J.M., Węgrzyn, G., Lobočka, M.B., Loś, M., 2011.** A reliable method for storage of tailed phages. *J. Microbiol. Methods* 84, 486–489.
- Guttman, B., Raya, R.R., Kutter, E., 2005.** Basic phage biology, *Bacteriophages: biology and applications*. Crc Press-taylor & Francis Group.
- Hamzeh, Z., 2014.** Étude sur l'utilisation de cocktail de bactériophages pour l'élaboration de surfaces antibactériennes (masters). Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières.
- Jacquet, S., Miki, T., Noble, R., Peduzzi, P., Wilhelm, S., 2010.** Viruses in aquatic ecosystems: important advancements of the last 20 years and prospects for the future in the field of microbial oceanography and limnology. *Adv. Oceanogr. Limnol.* 1, 97–141.
- Jenkins, D.R., 2017.** Nosocomial infections and infection control. *Medicine (Baltimore)* 45, 629–633.
- Johnson, E.N., Burns, T.C., Hayda, R.A., Hospenthal, D.R., Murray, C.K., 2007.** Infectious complications of open type III tibial fractures among combat casualties. *Clin. Infect. Dis.* 45, 409–415.
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., Górski, A., 2011.** The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiol. (Praha)* 56, 191–200.
- Kebriaei, R., Lev, K., Morrisette, T., Stamper, K.C., Abdul-Mutakabbir, J.C., Lehman, S.M., Morales, S., Rybak, M.J., 2020.** Bacteriophage-Antibiotic Combination Strategy: an Alternative against Methicillin-Resistant Phenotypes of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 64, e00461-20.
- Kim, M., Jo, Y., Hwang, Y.J., Hong, H.W., Hong, S.S., Park, K., Myung, H., 2018.** Phage-Antibiotic Synergy via Delayed Lysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e02085-18.
- Kolenda, C., Josse, J., Medina, M., Fevre, C., Lustig, S., Ferry, T., Laurent, F., 2020.** Evaluation of the Activity of a Combination of Three Bacteriophages Alone or in Association with Antibiotics on *Staphylococcus aureus* Embedded in Biofilm or Internalized in Osteoblasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 64.
- Kutter, E., Sulakvelidze, A., 2004.** *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press.
- Lakikza, A.M., Slimani, Z., BENHAMDI, A., 2018.** Les infections nosocomiales dans le service de dermatologie du CHU de Constantine. Université Frères Mentouri Constantine, CONSTANTINE.
- Lesens, O. (2009).** L'Entérocoque résistant à la vancomycine (ERV). *Néphrologie & thérapeutique*, 5, S261-S264

Madigan, M.T., Brock, T.D., Martinko, J.M., 2007. Biologie des micro-organismes. Pearson Education France.

Magin, V., 2019. Exploitation du potentiel des bactériophages dans le traitement des surfaces en contact avec l'eau, contaminées par un biofilm de *P. aeruginosa* (These de doctorat). Ecole nationale supérieure Mines-Télécom Atlantique Bretagne Pays de la Loire.

Manchanda, V., Sanchaita, S., & Singh, N. P. (2010). Multidrug resistant acinetobacter. *Journal of global infectious diseases*, 2(3), 291.

Martineau, A., n.d. Isolement et caractérisation de bactériophages comme moyen de lutte naturel contre les infections nosocomiales 113.

Massali, F.Z., Bouaninba, S., Boubekri, K., 2016. Etudes sur les bactériophages du sol et leurs méthodes d'isolement. Université Frères Mentouri Constantine, CONSTANTINE.

Merabishvili, M., Pirnay, J.-P., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., Lashkhi, N., Glonti, T., Krylov, V., Mast, J., Parys, L.V., Lavigne, R., Volckaert, G., Mattheus, W., Verween, G., Corte, P.D., Rose, T., Jennes, S., Zizi, M., Vos, D.D., Vaneechoutte, M., 2009. Quality-Controlled Small-Scale Production of a Well-Defined Bacteriophage Cocktail for Use in Human Clinical Trials. *PLOS ONE* 4, e4944.

Morgane, A., 2019. Intérêt de la phagothérapie dans le traitement et la prévention des maladies du tube digestif (phdthesis). Université de Lille, France

Neurohr, S., 2016. La phagothérapie: des virus au service de la médecine (Thèse d'exercice). Université de Lorraine, France.

Orlova, E.V., 2012. Bacteriophages and Their Structural Organisation, *Bacteriophages*.

Parveau, P., 2011. Bactéries multirésistantes dans l'environnement : recherche dans les effluents de la ville de Toulouse. Limoges.

Pierre-Collet, G., 2010. Rétention de virus en ultrafiltration : protocole de caractérisation (phd). Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier.

Plisson, C., White, H.E., Auzat, I., Zafarani, A., São-José, C., Lhuillier, S., Tavares, P., Orlova, E.V., 2007. Structure of bacteriophage SPP1 tail reveals trigger for DNA ejection. *EMBO J.* 26, 3720–3728.

Poole, K., 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10, 12–26.

Poxleitner, M., Pope, W., Jacobs-Sera, D., Sivanathan, V., Hatfull, G., 2018. Chapter 3: Phage Basics [WWW Document]. SEA-PHAGES Off. Website HHMI Sci. Educ. Alliance-Phage Hunt. *Adv. Genomics Evol. Sci. Program*.

Prescott, L.-M., Harley, J., Klein, D.-A., Bacq-Calberg, C.-M., Dusart, J., 2003. *Microbiologie*, \$ {number}nd édition. ed. De Boeck, Bruxelles.

- Rakhuba, D.V., Kolomiets, E.I., Dey, E., Novik, G.I., 2010.** Bacteriophage Receptors, Mechanisms of Phage Adsorption and Penetration into Host Cell. *Pol. J. Microbiol. Pol. Tow. Mikrobiol. Pol. Soc. Microbiol.* 59, 145–55.
- Ravat, F., Jault, P., Gabard, J., 2015.** Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Ann. Burns Fire Disasters* 28, 13–20.
- Russel, M., 1995.** Moving through the membrane with filamentous phages. *Trends Microbiol.* 3, 223–228. **Samou Fotso, S., 2005.** Les infections nosocomiales dans le service de chirurgie «B» de l'hôpital du Point G. Bamako Thèse Médecine.
- Spinelli, S., Tremblay, D., Moineau, S., Cambillau, C., Goulet, A., 2020.** Structural Insights into Lactococcal Siphophage p2 Baseplate Activation Mechanism. *Viruses* 12, 878.
- St-Pierre-Lemieux, G., 2014.** Papiers bioactifs à base de phages pour emballage alimentaire : études en vue d'une production pilote (masters). Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières.
- Strateva, T., & Yordanov, D. (2009).** Pseudomonas aeruginosa—a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of medical microbiology*, 58(9), 1133-1148.
- Synnott, A.J., Kuang, Y., Kurimoto, M., Yamamichi, K., Iwano, H., Tanji, Y., 2009.** Isolation from Sewage Influent and Characterization of Novel Staphylococcus aureus Bacteriophages with Wide Host Ranges and Potent Lytic Capabilities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4483–4490.
- Tiemtoré, R. Y., Mètuor-Dabiré, A., Zohoncon, T. M., Bangré, Y. A., Sougue, S., Zongo, J., & Simpore, J. (2019).** First Detection of PE-Type Extended-Spectrum β -lactamases at Saint Camille Hospital Center of Ouagadougou, Burkina Faso. *Int. J. Biochem. Biophys. Mol. Biol.* 4(7).
- Trojet, S., 2011.** Etude de la reconnaissance phage-bactérie : analyse fonctionnelle de l'adhésine gp38 des phages de la superfamille de type T4 (These de doctorat). Toulouse 3.
- Van Twest, R., Kropinski, A.M., 2009.** Bacteriophage enrichment from water and soil. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 501, 15–21.
- Yala, J. F., Mabika, R. M., Bisseye, C., Kenguele, H., Kama, E. M., & Dikoumba, A. C. (2016).** Phenotypic and genotypic characterization of extended-spectrum-beta-lactamases producing-Enterobacteriaceae (ESBLE) in patients attending Omar Bongo Ondimba military hospital at Libreville (Gabon). *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 4(6), 944-949
- Ye, M., Sun, M., Huang, D., Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, S., Hu, F., Jiang, X., Jiao, W., 2019.** A review of bacteriophage therapy for pathogenic bacteria inactivation in the soil environment. *Environ. Int.* 129, 488–496.

Annexes

Annexes

Annexe 01 : les autres cycles de multiplication des bactériophages

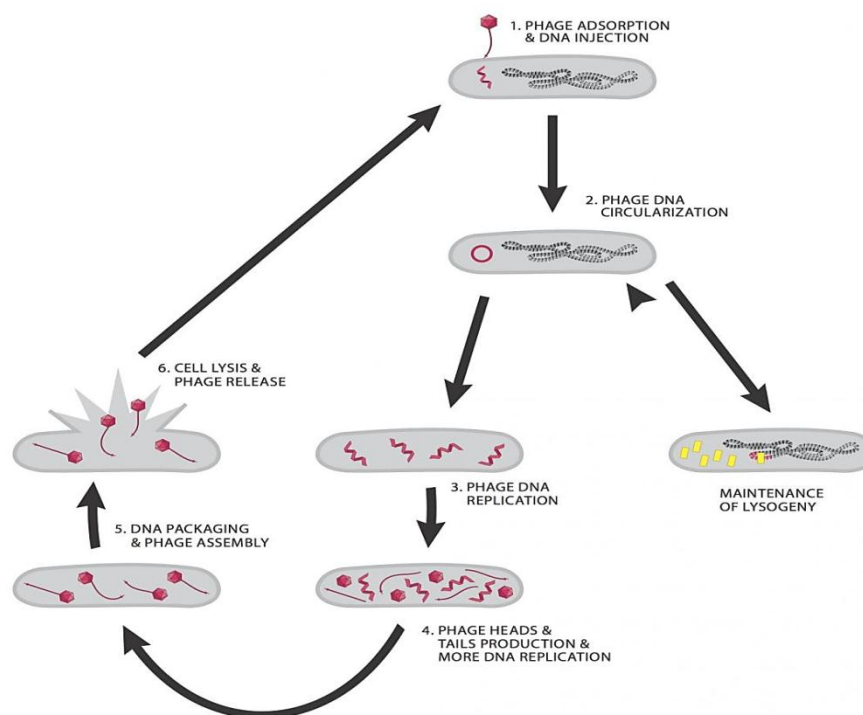
Cycle lysogénique (phage tempéré)

Certains phages ont la possibilité de choisir un cycle de vie différent nommé « cycle lysogène » qui diffère des phages lytiques. Dans ce cas deux issues possibles de l'infection peuvent se produire après l'injection d'ADN (Poxleitner et al., 2018).

Le phage intègre son acide nucléique dans le génome de l'hôte. Le phage est appelé prophage et la bactérie est dite lysogène (Bourema et al., 2014)

Le prophage a la capacité d'intégrer son génome à celui de son hôte (bactérie), de rester ainsi « silencieux » et de se multiplier avec lui. Il est alors transmis à chaque cellule fille produite lors de la division cellulaire jusqu'au moment où, par induction, sous l'influence de certains facteurs environnementaux soit physico-chimiques (les UV, les rayons X, les substances chimiques...etc) soit biologiques ; le génome du phage s'échappe, on dit qu'il s'excise.

Dès lors, le phage libéré entame un cycle complet à l'instar des phages strictement lytiques (Dublanche, 2017).



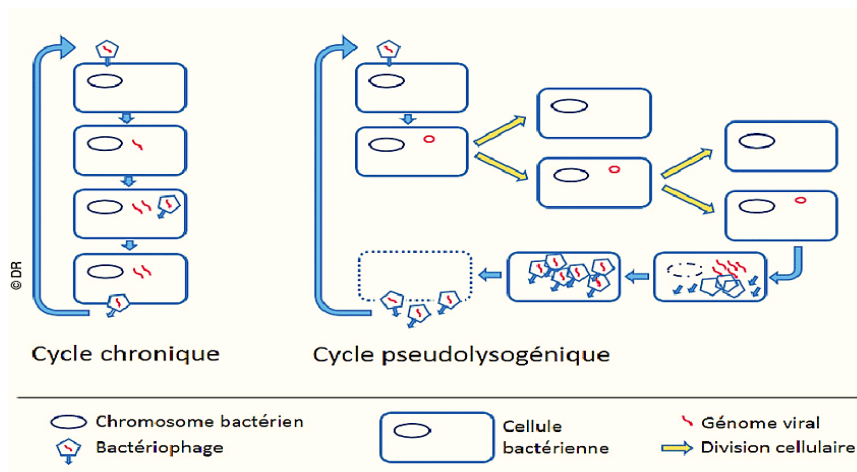
Cycle lysogène (Poxleitner et al., 2018).

❖ Cycle chronique (phages filamenteux)

Le cycle chronique n'a été décrit que pour une espèce de phages, les phages M13 du genre inovirus (Magin, 2019). Ce cycle se fait par des phages de forme filamenteuse à ADNsb qui infectent les bactéries à Gram négatif (Karlsson et al., 2003).

❖ Cycle pseudolysogénique

Un autre état de réplication qui est moins mentionné est connu sous le nom de pseudolysogénie : c'est à dire qu'un bactériophage se trouve dans un état de blocage qui peut être interprété comme un état de non choix entre un cycle lytique et un cycle lysogénique (Dufour et al., 2016).



Cycles chronique et pseudolysogénique d'un bactériophage (Dufour et al.).

Annexe 02 : matériels non biologique

Milieu de culture	<ul style="list-style-type: none"> • Gélose nutritif (GN), Hektoen, Chapman, Gélose au sang frais (GSF), Gélose au sang cuit (GSC), Bile esculine azite (BEA) • Mueller-Hinton (MH), Gélose mole MH à 6g/l, MH liquide • Luria Broth (LB), Luria Broth (LB) X 10 • Gélose conservateur • BGT, BHIB • Gélose DNASE • King A et King B
Réactif	<ul style="list-style-type: none"> • VP 1/VP2, TDA, Kovacs, Zim 1/Zim2, JAMES
Produit chimique	<ul style="list-style-type: none"> • Cacl₂, Mgso₄ • Bleu de toluidine

Appareillage	<ul style="list-style-type: none"> - système de filtration - Pompe à vide - Autoclave - Sécheuse - Incubateur - Vortex - MALDI TOF - microscope optique - microscope électronique à balayage - spectrophotomètre - Bain marie
Verrerie	<ul style="list-style-type: none"> • Fiole • Bicher • Flacon en verre • Tube en verre • Pipette pasteur
Autre matériel	<ul style="list-style-type: none"> • Boite pétri • Micro filtre 0.45um • Micro filtre 0.22um • Filtre seringue .0.22um • Papier wattman • Micropipette 1000ul, 200ul, 100ul, 50ul, 10ul • Cône stérile 200ul, 10ul • Huile de vaseline

Annexe 03 : composition de milieu du culture

Milieux de culture	Composition chimique (pour 1L)	Intérêt d'utilisation
La gélose nutritive	<ul style="list-style-type: none"> - Tryptone 5 g - Extrait de viande 1 g - Extrait de levure 2 g - Chlorure de sodium 5g - Agar agar..... 12g¹ 	La gélose nutritive ou gélose ordinaire est un milieu non-sélectif à usage général qui permet la culture d'un large éventail de microorganismes (bactéries et champignons) qui ne sont pas trop exigeants.
Milieu Chapman	<ul style="list-style-type: none"> - Tryptone.....5 g - Peptone pepsique de viande...5 g - Extrait de viande 1 g - Mannitol10 g - Chlorure de sodium75 g - Rouge de phénol25 mg - Agar agar15 g² 	Le milieu de Chapman est un milieu sélectif, surtout utilisé en microbiologie médicale, permettant la croissance des germes halophiles. Parmi ces germes figurent au premier rang les bactéries du genre <i>Staphylococcus</i> , mais aussi les <i>Micrococcus</i> , les <i>Enterococcus</i> , les <i>Bacillus</i> , et de rares bactéries à Gram négatif.
Milieu Hektoen	<ul style="list-style-type: none"> - Protéose peptone.....12g - Extrait de levure.....3g - Chlorure de sodium.....5g - Thiosulfate de sodium..... 5g - Sels biliaires..... 9g - Citrate de fer ammoniacal... 1,5g - Salicine 2g - Lactose12g - Saccharose12g - Fuchsine acide.....0,1g - Bleu de bromothymol..... 0,065g - Agar 14 g - pH final..... 7,5² 	La gélose Hektoen est un milieu sélectif pour l'isolement et la différenciation des bacilles Gram (-) entéropathogènes, en particulier les <i>Salmonelles</i> sp. et les <i>Shigella</i> sp.
La gélose BEA (bile esculine azide)	<ul style="list-style-type: none"> Tryptone.....17g Peptone pepsique de viande.....3 g Extrait de levure.....5g Bile de bœuf déshydratée..... 10 g Azide de sodium.....0,25 g Esculine.....1g Citrate ferrique ammoniacal... 0,5 g Citrate de sodium.....1g 	La gélose BEA est un milieu d'isolement sélectif, utilisé pour la recherche des <i>Enterococcus</i> et <i>Streptococcus</i> du groupe D.

¹ <https://microbiologie-clinique.com/G%C3%A9lose-nutritive.html>

² <https://microbiologie-clinique.com/HEKTOEN.html>

	Chlorure de sodium.....5g Agar13 g pH = 7,1 ³	
La gélose au sang frais (GSF)	La gélose au sang frais, est constituée d'une base nutritive non sélective à laquelle a été ajoutée 5% de sang frais. La gélose de base au sang et de la composition suivante : - Protéase peptone.....15 g - Extrait de foie.....2,5 g - Extrait de levure.....5 g - Chlorure de sodium.....5 g - Agar.....12 g - pH = 7,4 ± 0,2	Elle convient à la culture de certaines bactéries exigeantes par exemple les Streptococcus Neisseria meningitidis, les corynébactéries et bien sûr toutes les bactéries non exigeantes, et permet de mettre en évidence le pouvoir hémolytique de certaines bactéries (hémolyse alpha et bêta)
La gélose au sang cuit (GSC)	La gélose au sang cuit possède les mêmes éléments cités précédemment pour la gélose au sang frais sauf que les globules rouges sont lysés à cause de chauffage, ce qui apporte au milieu deux facteurs de croissances - Le facteur X ou hémine (apporté par l'hémoglobine). - Le facteur V ou NAD : la coenzyme intracellulaire Nicotinamide adénine dinucléotide. ⁴ ("les milieux de cultures," n.d.)	La gélose GSC est utilisée pour l'isolement d'organismes très fastidieux, tels que Haemophilus influenzae, ainsi que Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis. C'est bactérie poussent très bien sur ce milieu une fois incubé à 30-37° C dans un atmosphère enrichi en CO ₂ à 5%. ⁵ Contrairement à la gélose GSF ce milieu de culture ne permet par la lecture de caractère hémolytique des bactéries.
La gélose Sabouraud	Peptones.....10 g Glucose.....40 g Agar.....15 pH = 5,6 il existe aussi : <ul style="list-style-type: none"> • Sabouraud + chloramphénicol • Sabouraud + chloramphénicol + actidione 	La gélose Sabouraud est une gélose non sélective utilisée pour cultiver les champignons et plus précisément en microbiologie médicale, les levures, les moisissures et les dermatophytes. Pour rendre ce milieu sélectif pour les champignons on ajoute un ou plusieurs antibiotiques à large spectre,

³ <https://microbiologiemedicale.fr/gelose-bea/>

⁴ <https://microbiologie-clinique.com/milieucultures.html#mnss>

⁵ <http://probiologiste.blogspot.com/2018/11/la-gelose-chocolat.html>

		tels le chloramphénicol et la gentamicine. Enfin, on peut aussi ajouter de l'actidione (cycloheximide) pour inhiber les moisissures et certaines espèces de levures et permettre plus facilement d'isoler les dermatophytes. ⁶
La gélose MH (Mueller-Hinton)	Hydrolysate acide de caséine (peptone).....17,5 g Extrait de viande.....2 g Amidon.....1,5 g Calcium.....20 à 25 mg Magnésium.....10 à 12,5 m Agar.....15 g pH = 7,4 +/- 0,2 ⁷	La gélose MH est un milieu standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries peu exigeantes. Pour les bactéries exigeantes, comme, par exemple, les <i>Streptococcus</i> , les <i>Haemophilus</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , on utilise une gélose MH-F, c'est une gélose MH enrichie avec du sang défibriné de cheval et du β -NAD (facteur V des <i>Haemophilus</i>).
Luria broth	Composition (g) pouvant être modifiée pour 1 litre de milieu: Tryptone: 10,0 Extrait de levure: 5,0 Sodium chlorure: 10,0 pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C: 7,0 ± 0,2	Le milieu de culture LB (pour lysogeny broth, bouillon lysogène) est un milieu non sélectif de culture nutritif, servant initialement à la culture bactérienne. Les milieux LB sont devenus un standard dans l'industrie pour la culture d' <i>Escherichia coli</i> . Ils ont été fortement utilisés en microbiologie moléculaire pour la préparation de plasmides d'ADN et de protéines recombinantes. Il reste à ce jour, l'un des milieux les plus utilisés pour le maintien en vie et la

⁶ <https://microbiologiemedicale.fr/gelose-sabouraud/>

⁷ <https://microbiologiemedicale.fr/gelose-mueller-hinton/>

		culture de lignées recombinantes d' <i>Escherichia coli</i> . Il existe diverses compositions de LB.
Tampon SM	137 mM NaCl 8,0 g/L 2,7 mM KCl 0,2 g/L 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,42 g/L 1,76 mM KH ₂ PO ₄ 0,24 g/L	Le tampon phosphate salin (souvent abrégé PBS, de l'anglais phosphate-buffered saline) est une solution tampon couramment utilisée en biochimie. Il s'agit d'un soluté physiologique contenant du chlorure de sodium, du phosphate disodique, du phosphate monopotassique et un peu de chlorure de potassium.

Annexe 04 : PASTOREX™ STAPH-PLUS (BIORAD)

• PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons utilisés avec ce test doivent être purs et frais.

• RÉACTION D'AGGLUTINATION

- Déposer une goutte de réactif latex test dans un des cercles de la carte d'agglutination
- Déposer une goutte de réactif latex témoin négatif sur un autre cercle.
- Prélever 1 à 3 colonies de cocci Gram-positifs catalase + avec une öse ou un bâtonnet en plastique, puis les émulsionner avec une goutte de latex pendant 10 secondes
- Procéder de la même façon pour le réactif latex témoin négatif.
- Homogénéiser en effectuant un mouvement rotatif de la carte. La lecture doit se faire pendant les 30 secondes qui suivent le début des mouvements rotatifs de la carte.

• INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

✚ Réaction positive

- Une réaction est positive lorsqu'il y a formation d'agrégats uniquement avec le latex test, visibles à l'oeil nu sous un éclairage normal, en moins de 30 secondes.

✚ Réaction négative

- Dans le cas d'une réaction négative, la suspension ne présentera pas d'agrégats et gardera son aspect laiteux.

✚ Résultats non interprétables

- L'indication d'un résultat non interprétable est donnée dans le cas d'une agglutination du réactif contrôle négatif. Dans ce cas, rechercher la présence de la coagulase libre et de la DNase thermostable

Annexe 05 : Pastorex™ Strep (BIORAD)

- **Procédure de test**
- **Préparation de l'extraction :**
 - Déposer 300 µl de suspension d'enzyme d'extraction dans un tube à hémolyse pour chaque souche isolée à tester. En utilisant une öse, émulsionner avec précaution 5 à 10 colonies d'une culture fraîche de streptocoques dans la solution enzymatique de manière à obtenir une suspension homogène. Si le diamètre des colonies est inférieur à 0,5 mm, augmenter l'inoculum jusqu'à l'obtention d'un trouble visible à l'œil nu.
 - Incuber soit pendant 15 à 45 minutes à température ambiante (18-30°C), soit 10 à 30 minutes à 37°C.
- **Procédure de groupage à partir d'une gélose au sang :**
 - Déposer 40 µl de solution d'extrait sur chaque cercle de la carte d'agglutination.
 - Agiter lentement les réactifs. En maintenant le flacon compte-gouttes à la verticale, déposer une goutte de chacun des réactifs A, B, C, D, F et G à côté de la suspension, sur la carte d'agglutination.
 - A l'aide d'un bâtonnet mélangeur, mélanger la goutte de latex avec la suspension sur toute la surface du cercle en changeant de bâtonnet entre chaque réactif de latex.
 - Agiter lentement la carte, horizontalement, pendant 1 minute maximum.
 - Observer si une agglutination visible à l'œil nu se forme dans un délai d'1 minute maximum. La taille des agglutinats et la rapidité de leur apparition dépendent de la concentration antigénique de la suspension d'extrait.

Annexe 06 : lecture de galeries API (BioMerieux)

API 20 E

Tableau XXX : lecture de la galerie API 20E

Nom du Micro-tube	caractère recherché	substrat(s) présent(s) dans le microtube	révélateurs présents	réactif(s) à rajouter éventuellement	aspect caractère +	aspect caractère -
ONPG	β -galactosidase	ONPG, β -thiogalactosidase			Jaune	inclore
ADH LDC ODC	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Peptone de levure Pyridoxal phosphate Acide aminé correspondant Glucose ???? Rouge de phénol pH initial acide	Rouge de phénol	-	rouge (orange pour LDC en 24 h)	jaune à orangé (sauf LDC 24 h)
CIT	Utilisation du citrate comme seule source de carbone	Citrate de sodium Bleu de Bromothymol (BBT)	Bleu de Bromothymol (BBT)	-	bleu en surface	vert-jaune
H ₂ S	Production d'H ₂ S à partir de thiosulfate	peptone thiosulfate de sodium fer III	fer III	-	précipité noir	pas de précipité noir
URÉ	Uréase	Urée Rouge de phénol	Rouge de phénol	-	rouge	jaune
TDA	Tryptophane désaminase	Tryptophane		chlorure de fer III	marron	jaune
IND	Production d'indole	Tryptophane		James ou Kovacs	rouge	jaune
VP	Production de butan-dione, 3-hydroxybutanone ou 2,3-dihydroxybutane	peptone pyruvate	napht-1-ol KOH	napht-1-ol KOH	rose	incolore
GÉL	Gélatinase	gélatine agglomérée avec du carbone	carbone		noir	pas de diffusion du carbone noir
GLU MAN INO SOR RHA SAC MÉL AMY ARA	Utilisation des glucides ou dérivés correspondants (glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, méibiose, amygdaline, arabinose)	peptone glucide correspondant Bleu de Bromothymol (BBT) Dans le tube Glucose sont ajoutés des nitrates)	Bleu de Bromothymol (BBT)	-	jaune	bleu
NO ₂	Réduction des nitrates en nitrites dans la cupule GLU	utilisation du tube Glu	-	1-naphtylamine et acide sulfanilique	rouge	jaune
N ₂	Réduction des nitrates en diazote dans la cupule GLU	utilisation du tube Glu après lecture NO ₂		Si NO ₂ – alors poudre de zinc	jaune	rouge

API 20 NE (BioMerieux)

Tableau XXXIX: lecture de la galerie API 20NE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO ₃	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min incolore rose-rouge	
			réduction des Nitrates en azote	Zn / 5 min rose incolore	
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRyptophane)	JAMES / immédiat incolore vert pâle / jaune rose	
<u>GLU</u>	D-glucose	1,92	fermentation (GLUcose)	bleu à vert	jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	jaune	orange / rose / rouge
<u>URE</u>	urée	0,76	UREase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (β-glucosidase) (ESCuline)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-βD- galactopyranoside	0,22	β-galactosidase (Para-NitroPhényl-βD- Galactopyranosidase)	incolore	jaune
<u>GLU</u>	D-glucose	1,56	assimilation (GLUcose)	transparence	trouble
<u>ARA</u>	L-arabinose	1,4	assimilation (ARABinose)	transparence	trouble
<u>MNE</u>	D-mannose	1,4	assimilation (ManNosE)	transparence	trouble
<u>MAN</u>	D-mannitol	1,36	assimilation (MANnitol)	transparence	trouble
<u>NAG</u>	N-acétyl-glucosamine	1,28	assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)	transparence	trouble
<u>MAL</u>	D-maltose	1,4	assimilation (MALtose)	transparence	trouble
<u>GNT</u>	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium GlucoNaTe)	transparence	trouble
<u>CAP</u>	acide caprique	0,78	assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
<u>ADI</u>	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADIrique)	transparence	trouble
<u>MLT</u>	acide malique	1,56	assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
<u>CIT</u>	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodium CITrate)	transparence	trouble
<u>PAC</u>	acide phénylacétique	0,8	assimilation (acide PhénylACétique)	transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

API Staph (BioMerieux)

Tableau XLVIII : lecture de la galerie API Staph

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTAT	
				NEGATIF	POSITIF
0	Aucun		Témoin négatif	rouge	—
GLU	D-glucose	1,56	(Témoin positif) (D-GLUcose)	rouge *	jaune
FRU	D-fructose	1,4	acidification (D-FRUctose)		
MNE	D-mannose	1,4	acidification (D-ManNosE)		
MAL	D-maltose	1,4	acidification (MALtose)		
LAC	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACtose)		
TRE	D-tréhalose	1,32	acidification (D-TREhalose)		
MAN	D-mannitol	1,36	acidification (D-MANnitol)		
XLT	xylitol	1,4	acidification (XyLiTol)		
MEL	D-mélibiose	1,32	acidification (D-MELibiose)		
NIT	nitrate de potassium	0,08	Réduction des NITrates en nitrites	<u>NIT 1 + NIT 2 / 10 min</u> incolore-rose pâle rouge	
PAL	β -naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	<u>ZYM A + ZYM B / 10 min</u> incolore, beige-rosé, violet très pâle Violet	
VP	sodium pyruvate	1,904	production d'acétyl méthyl-carbinol (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u> incolore-rose pâle violet-rose	
RAF	D-raffinose	1,56	acidification (RAFFinose)	rouge	jaune
XYL	D-xylose	1,4	acidification (XYLose)		
SAC	D-saccharose	1,32	acidification (SACcharose)		
MDG	méthyl- α D- glucopyranoside	1,28	acidification (Méthyl- α D- Glucopyranoside)		
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,28	acidification (N-Acétyl-Glucosamine)		
<u>ADH</u>	L-arginine	1,904	Arginine DiHydrolase	jaune	orange-rouge
<u>URE</u>	urée	0,76	UREase	jaune	rouge-violet

API Strep (BioMerieux)

Tableau LVI : lecture de la galerie API Strep

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS			
				NEGATIF		POSITIF	
VP	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / jusqu'à 10 min (3)			
				Incolore		Rose-Rouge	
HIP	acide hippurique	0,4	hydrolyse (acide HIPpurique)	NIN / jusqu'à 10 min			
				Incolore/Bleu pâle Gris-bleuté		Bleu foncé/Violet	
ESC	esculine citrates de fer	1,16 0,152	hydrolyse β -glucosidase (ESCuline)	4 h	24 h	4 h	24 h
				Incolore Jaune pâle	Incolore Jaune pâle Gris clair	Noir Gris	Noir
PYRA	acide pyroglutamique- β -naphthylamide	0,0256	PYRrolidonyl Arylamidase	ZYM A + ZYM B / 10 min (PYRA à LAP) (1) au besoin décoloré par éclaircissement intense			
				Incolore ou Orange très pâle		Orange	
α GAL	6-bromo-2-naphtyl- α D- galactopyranoside	0,0376	α -GALactosidase	Incolore		Violet	
β GUR	acide naphthol-ASBI- glucuronique	0,0537	β -GIUcuRonidase	Incolore		Bleu	
β GAL	2-naphtyl- β D- galactopyranoside	0,0306	β -GALactosidase	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
PAL	2-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
LAP	L-leucine- β -naphthylamide	0,0256	Leucine AminoPeptidase	Incolore		Orange	
<u>ADH</u>	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	Jaune		Rouge	
<u>RIB</u>	D-ribose	1,4	acidification (RIBose)	4 h	24 h	4 h	24 h
				Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>ARA</u>	L-arabinose	1,4	acidification (ARABinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>MAN</u>	D-mannitol	1,36	acidification (MANnitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>SOR</u>	D-sorbitol	1,36	acidification (SORbitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>LAC</u>	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACTose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>TRE</u>	D-tréhalose	1,32	acidification (TREhalose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>INU</u>	inuline	5,12	acidification (INULine)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>RAF</u>	D-raffinose	3,12	acidification (RAFFinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>AMD</u>	amidon (2)	2,56	acidification (AMIDon)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>GLYG</u>	glycogène	1,28	acidification (GLYcoGène)	Rouge ou Orange		Jaune franc	

API NH (BioMerieux)

Tableau LVII : lecture de la galerie API NH

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
1) <u>PEN</u>	potassium benzylpenicilline	1,36	PENicillinase	bleu (absence de pénicillinase)	jaune jaune-vert jaune-bleu (présence de pénicillinase)
2) <u>GLU</u>	D-glucose	0,5	acidification (GLUcose)	rouge rouge-orangé	jaune orange
3) <u>FRU</u>	D-fructose	0,1	acidification (FRUctose)		
4) <u>MAL</u>	D-maltose	0,1	acidification (MALtose)		
5) <u>SAC</u>	D-saccharose	0,5	acidification (SACcharose)		
6) <u>ODC</u>	L-ornithine	0,552	Ornithine DéCarboxylase	jaune-vert gris-vert	bleu
7) <u>URE</u>	urea	0,41	UREase	jaune	rose-violet
8a) <u>LIP</u>	5-bromo-3-indoxyl- caprate	0,033	LIPase	incolore gris pâle	bleu (+ précipité)
9a) <u>PAL</u>	4-nitrophényl-phosphate 2CHA	0,038	Phosphatase ALcaline	incolore jaune pâle	jaune
10a) <u>βGAL</u>	4-nitrophényl-βD- galactopyranoside	0,04	β GALactosidase	incolore	jaune
8b) <u>ProA</u>	L-proline-4-méthoxy- β-naphtylamide	0,056	Proline Arylamidase si LIP est +, ProA est toujours –	<u>ZYM B / 3 min</u> jaune orange pâle (brun si LIP +)	
9b) <u>GGT</u>	γ-glutamyl-4-méthoxy- β-naphtylamide	0,049	Gamma-Glutamyl Transférase	<u>ZYM B / 3 min</u> jaune orange pâle (jaune-orange si PAL +)	
10b) <u>IND</u>	L-tryptophane	0,036	INDole	<u>JAMES / 3 min</u> incolore rose	

Annexe 07 : La liste des antibiotiques à tester selon la bactérie isolée (document CLSI M100 30th ed 2020)

VALEURS CRITIQUES DES DIAMETRES DES ZONES D'INHIBITION ET DES CMI
POUR *Enterococcus spp* et *streptococcus spp*

ANTIBIOTIQUE TESTES	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		
		R	I	S
Ampicilline	10ug	16	-----	17
Tétracycline	30ug	14	15-18	19
Vancomycine	30ug	14	15-16	17
Ticoplanine	30ug	10	11-13	14
Gentamicine	120ug	6	7-9	10
Streptomycine	300ug	6	7-9	10
Ciprofloxacine	5ug	15	16-20	21
Lévofloxacine	5ug	13	14-16	17
Erythromycine	15ug	13	14-22	23
Rifampicine	5ug	16	17-19	20
Fosfomycine	200ug	12	13-15	16
Chloramphénicol	30ug	12	13-17	18

VALEURS CRITIQUES DES DIAMETRES DES ZONES D'INHIBITION ET DES CMI
DE *Staphylococcus spp*

ANTIBIOTIQUE TESTES	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		
		R	I	S
Pénicilline	10ug	28	-----	29
oxacilline	-----	-----	-----	-----
Cefoxitine	30 ug	21	-----	22
Gentamicine	10ug	12	13-14	15
Amikacine	30 ug	16	-----	18
Erythromicine	15ug	13	14-22	23
Clindamycine	2ug	14	15-20	21
Vancomycine	CMI	-----	-----	-----
Ciprofloxacine	5ug	15	16-20	21
Rifampicine	5ug	16	17-19	20
Tetracycline	30ug	14	15-18	19

VALEURS CRITIQUES DES DIAMETRES DES ZONES D'INHIBITION ET DES CMI
DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

ANTIBIOTIQUE TESTES	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		
		R	I	S
Ticarciline	75 ug	15	16-23	24
Ticarcilline+	75/10	15	16-23	24
Ac clavulanique				
pipéracilline	100ug	14	15-20	21
Aztréonam	30ug	15	16-21	22
Amikacine	30ug	14	15-16	17
Gentamicine	10ug	12	13-14	15
Tobramycine	10ug	12	13-14	15
Ciprofloxacine	5ug	18	19-24	25
Lévofloxacine	5ug	14	15-21	22
Fosfomycine	-----	-----	-----	-----

VALEURS CRITIQUES DES DIAMETRES DES ZONES D'INHIBITION ET DES CMI
DES *ENTEROBACTERIES*

ANTIBIOTIQUE TESTES	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		
		R	I	S
Ampicilline	10 ug	13	14-16	17
Amoxicilline+	20-10ug	13	14-17	18
Ac clavulanique				
Céfazoline	30ug	19	20-22	23
Céfoxitine	30ug	14	15-17	18
Céfotaxime	30ug	22	23-25	26
Aztréonam	30ug	17	18-20	21
Amikacine	30ug	14	15-16	17
Gentamycine	10ug	12	13-14	15
Ciprofloxacine	5ug	21	22-25	26
Chloramphicol	30 ug	12	13-17	18
Fosfomycine	200ug	12	13-15	16

