

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret-
Institut des Sciences vétérinaires.



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Docteur
vétérinaire

Thème

Isolement des bactériophages actifs contre le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

Présentée par :

∞ Rebbouh Boutheina.

∞ Rebbouh Kenza.

Encadré par :

∞ Mr.Aggad.H. Pr

Année universitaire:

2018/2019

Remerciements

Avant tout, nous remercions Allah tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir de modeste travail. Merci de nous d'avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous tenons à remercier particulièrement notre encadreur Mr. Aggad.H Professeur à l'institut des sciences vétérinaires de l'Université Ibn Khaldoun- Tiaret, qui a encadré ce travail de puis les premiers instants, sa pédagogie, son écoute, son ouverture d'esprit et sa vision de la recherche scientifique, ont été importants pour nous que ses connaissances et ont largement contribué à l'évolution de cette étude.

Nous adressons également nos vifs remerciements aux techniciens de laboratoire d'Hygiène et Pathologie animale.

Nos remerciements s'adressent à tous ce qui est contribué à l'évaluation de ce travail.

Merci



Dédicaces

Je dédie ce mémoire

A ma très chère mère

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et L'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, à mon âge actuel. .

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon très cher père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma chère sœur, Imen, mon ange gardien et mon fidèle accompagnant dans les moments les plus délicats de cette vie, pour son affection, compréhension et patience.

*A mon frère Aziz qui me comble de joie et de gaieté
Je leur souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.*

Et sa femme Chaima.

*A tous ceux qui sont proches de mon cœur et dont je n'ai pas cité le
nom*

*A tous les membres de ma famille, petits et grands
Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon amour et
affection*

A mon fiancé : Dhia Eddine

*Tu m'as toujours soutenu, t'es et tu resteras toujours ma source
d'encouragement. T'as supporté mes caprices pendant certaines périodes de
ce parcours. Sincère gratitude.*

*A mes très chères copines ; Khadoujti et celles que je n'ai pas cité leurs
noms*

*Aucune dédicace, ne saurait exprimer à sa juste valeur le profond
amour que je vous porte.*

*A ma chère binôme Boutheina pour son soutien moral, sa
compréhension tout au long de ce projet*

Je vous estime énormément

Kenza

Dédicaces

Je dédie ce travail

A toute ma famille, qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Particulièrement à mon cher grand-père hadj Mansour, reçoit ma profonde gratitude pour ton éternel amour, reçoit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir.

A mon cher grand-père Bouchouiref Mohammed Allah yarahimo.

A mes chères grands-mères qui m'ont accompagné avec des prières tout au long de mon parcours.

A ma chère mère,

A mon cher père,

Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.

A ma chère sœur Imane et son mari Lakhdar

A ma chère soeur Sarah et son mari Yacine

A mes petites cher frères : Mohammed, Zinou, Hocine

A ma petite chère sœur: Selma

A l'amour de mon cœur : Mansour, Jomana et Israa.

A ma chère binôme Kenza ,

Pour sa entente et sa sympathie.

A mes chères amies

Pour leurs aides et supports dans les moments difficiles.

Merci

Boutheina.

Sommaire :

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction1

Chapitre I: revue bibliographique

I Bactériophages.....	4
I-1. Définition.....	4
I-2. Historique.....	5
I-3. La Classification des bactériophages.....	6
I-4. La méthode de multiplication des phages.....	8
I-5. Intérêt des phages.....	10
❖ Traitement	10
❖ Antibiorésistant	10
❖ Les avantages et les inconvénients de la thérapie phagique et de l'antibiothérapie.....	11
I-6. Les difficultés rencontrés pour utiliser les phages.....	12
a. Le mode de préparation des bactériophages	12
b. La reconnaissance des bactériophages par le système immunitaire	12
II le <i>Staphylococcus aureus</i> et le <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline	14
II-1. le <i>Staphylococcus aureus</i>	14
II-2. le <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline	14
II-3. Historique de la taxonomie.....	14
II-4. Habitat.....	15

II-5. Caractéristique générale de Staphylococcus aureus.....	16
II-6. Caractéristiques des SARM.....	16
II-7. Mécanismes de la résistance bactérienne.....	17
II-8. Résistance à la méthicilline.....	17
II-8.1. Mécanisme de résistance.....	18
II-8.2. Facteurs influençant l'expression de la méthicillino-résistance.....	19
II-9. Problématique.....	20

Chapitre II : Matériels et méthode

I Objectif du travail.....	23
II Lieu et période de l'étude.....	23
III Matériels et méthodes.....	23
III-1. Matériels.....	23
III-1-1. Appareillages.....	23
III-1-2. Verreries.....	23
III-1-3. Autres matériels.....	23
III-1-4. Milieux de culture.....	24
IV Méthodes.....	24
IV-1. Protocole expérimental.....	24

Chapitre III : Résultats.

Resulats	30
Conclusion.....	32
Références bibliographiques.....	34
Annexe.....	41
Résumé.....	43

Liste des abréviations :

ADN: Acide désoxyribonucléique.

ARN: Acide ribonucléique.

ARNr: Acide ribonucléique ribosomique.

ATCC: American Type Culture Collection.

CMI: Concentration minimale inhibitrice.

FEM: Factors essential for methicillin resistance.

ICTV: International Committee on taxonomy of viruses.

OMS: Organisation Mondiale de Santé.

PBP: Penicillin binding protein.

PLP: Protéines de liaison aux pénicillines.

SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

SCC *mec*: La cassette chromosomique staphylococcique *mec*.

U.R.S.S: Union des Républiques Socialistes Soviétiques.

Liste des figures :

Figure (1): Structure du phage T4.....6

Figure (2): Schéma du cycle lysogénique.....10

Figure (3): Schéma du cycle lytique.....11

Liste des tableaux :

Tableau (1): les principales familles des virus bactériens, d'après, Ackermann (2007) 7

Tableau(2). Les avantages et les inconvénients de la thérapie phagique et de l'antibiothérapie (Dublanche, 2014)11

Introduction

INTRODUCTION:

Les infections bactériennes ont toujours été un problème pour le corps médical. Pendant longtemps, la seule possibilité disponible pour lutter contre les bactéries était d'empêcher l'infection, par l'hygiène et la désinfection. Puis sont apparus les vaccins, complétant ces mesures. Enfin, il a été de plus possible de traiter une infection bactérienne en place, en employant un ou plusieurs antibiotiques. Ces médicaments furent un véritable salut, permettant de diminuer sensiblement la mortalité liée à ces infections. Mais les bactéries, contrairement à ces molécules « fixes », sont capables d'évoluer d'elles-mêmes, lorsque leur milieu devient inhospitalier. C'est ainsi que sont très vite apparues les premières résistances bactériennes aux antibiotiques. Mais les scientifiques ont su pallier à ces résistances en fabriquant d'autres antibiotiques, passant outre les mécanismes de résistances déployés par les bactéries. Cependant, progressivement, ces dernières apprirent à contourner ces nouvelles molécules, et des bactéries résistantes à tous les antibiotiques ont finalement vu le jour, tandis que l'innovation scientifique s'essouffait peu à peu. Aujourd'hui, les problèmes liés à ces bactéries multi résistantes sont réels, et il devient urgent de trouver une alternative thérapeutique à l'emploi massif, inadapté et inapproprié des antibiotiques, cause principale de l'apparition de ces résistances (Encyclopédie Larousse, 2016 ; Dublanche, 2009).

C'est sur ce constat désolant que nombre de scientifiques envisagent de remettre au goût du jour une thérapeutique tombée dans l'oubli en Occident. En effet, les bactéries ont des prédateurs naturels, plusieurs centaines de fois plus petites qu'elles: les virus bactériophages. L'utilisation de ces derniers pour traiter des infections bactériennes date de leur découverte au début du siècle dernier (d'Hérelle, 1917). Malheureusement, l'arrivée des antibiotiques et l'intérêt qu'ils suscitèrent firent oublier cette thérapeutique, du moins dans les pays occidentaux. En effet, dans les pays de l'ex-U.R.S.S., les scientifiques n'ont jamais cessé d'employer ces virus, et la réouverture des échanges entre Est et Ouest a contribué à la redécouverte de ce mode de traitement en Occident. Cependant, bien qu'utilisés dans certains pays, l'arrivée des phages dans le reste du monde ne sera pas chose aisée. En effet, la mise sur le marché d'un nouveau médicament est encadrée par de nombreuses règles, et la difficulté d'octroi de propriété intellectuelle pour de tels médicaments entraîne l'inertie des laboratoires qui ne voient pas l'intérêt de se lancer dans de coûteux développements à la rentabilité douteuse.

Chapitre I :
Revue bibliographique.

Chapitre I: Revue bibliographique

I. Bactériophages.

I-1. Définition.

I-2. Historique.

I-3. La Classification des bactériophages.

I-4. La méthode de multiplication des phages.

I-5. Intérêt des phages.

I-6. Les difficultés rencontrés pour utiliser les phages.

II. le *Staphylococcus aureus* et le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline .

II-1. le *Staphylococcus aureus*

II-2. le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

II-3. Historique de la taxonomie

II-4. Habitat

II-5. Caractéristique générale de *Staphylococcus aureus*

II-6. Caractéristiques des SARM

II-7. Mécanismes de la résistance bactérienne

II-8. Résistance à la méthicilline

II-9. Problématique.

I. Les bactériophages :

I-1. Définition :

Les bactériophages sont présents partout sur la planète et sont reconnus comme étant l'entité vivante la plus abondante sur Terre (voir figure 1). Ils seraient dix fois plus nombreux que les bactéries (Jończyk, Kłak, Międzybrodzki, & Górski, 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. Ils sont définis comme des virus qui infectent les bactéries et tout comme les virus, ils sont reconnus comme étant des parasites absolus. En effet, ils ne possèdent pas la machinerie nécessaire à leur réplication et ont donc besoin d'emprunter celle de leur hôte de manière à pouvoir proliférer librement. Chaque phage contient son génome qui est enveloppé dans une couche de protéines ou de lipoprotéines appelée capsid (Kutter & Sulakvelidze, 2005).

Les bactériophages reconnaissent à la surface de la bactérie des récepteurs spécifiques auxquels ils se lient puis insèrent leur matériel génétique à l'intérieur de la bactérie. Comme les autres virus, leur matériel génétique peut être sous forme d'ARN ou d'ADN simple ou double brins. Suite à l'attachement sur la bactérie et l'injection de leur matériel génomique dans celle-ci, les phages utilisent le métabolisme de la bactérie pour synthétiser leurs composantes virales. La nouvelle génération de bactériophages est assemblée dans la bactérie, libérée dans le micro-environnement, se liera et tuera les bactéries de l'espèce reconnue présente dans cet environnement et le cycle recommence. Pour une bactérie type, chaque cycle de reproduction dure environ 30 minutes et produit de 50 à 100 nouveaux bactériophages (Resh et Meyer, 2002; Kutter et al., 2005).

Il existe deux types de phages : les phages lytiques et les phages tempérés. Les phages lytiques se répliquent comme décrit précédemment. Quant aux phages tempérés, ils peuvent incorporer leur génome à celui de la bactérie en demeurant dans un état quiescent appelé prophage pendant plusieurs cycles de la réplication bactérienne. Suite à un signal, le génome du phage sera excisé de celui de la bactérie pour entamer un cycle lytique. L'excision du génome du phage n'étant pas toujours précise, le phage peut emporter un bout de génome bactérien (pouvant être des gènes de toxine ou de résistance)

et le transférer à une nouvelle bactérie, induisant un transfert génétique d'une bactérie à une autre.

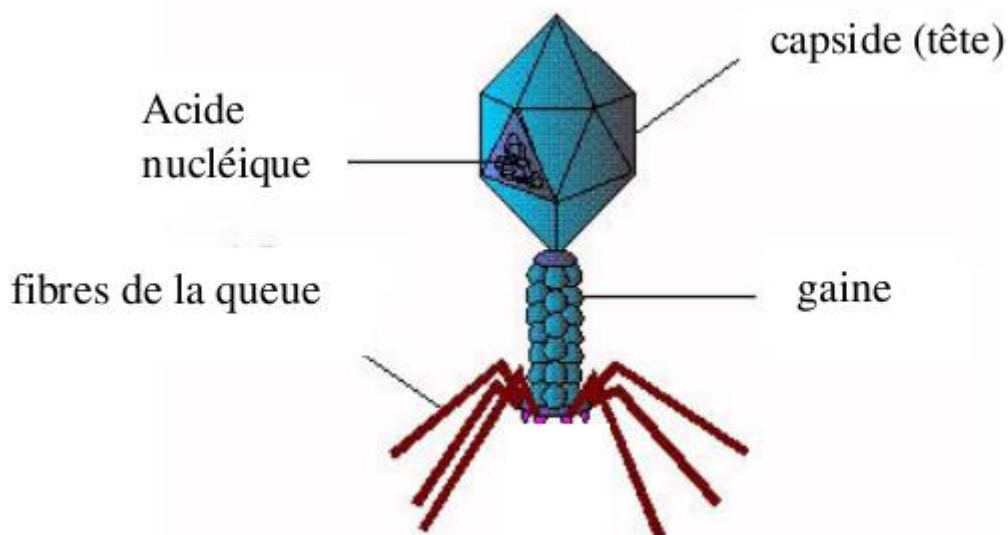


Figure (1). Structure du phage T4

I-2. Historique:

Les bactériophages ont été découverts indépendamment par le bactériologiste anglais Frederick Twort en 1915 et par le biologiste canadien Félix d'Hérelle en 1917 qui les baptisa « bactériophages ». La première application des phages pour traiter des maladies infectieuses remonte à 1921 par Bruynogoe et Maisin qui les ont utilisés avec succès pour traiter des maladies de peau dues au *Staphylococcus* sp. Ils ont aussi été utilisés pour traiter la dysenterie, le choléra et la fièvre typhoïde. Dans les années 1930, plusieurs produits à base de phages qui ont été commercialisés aux États-Unis ont reçu des rapports positifs sur leur efficacité, particulièrement pour les infections dues aux *Staphylococcus* sp. et les maladies intestinales. En Georgie, où les phages sont étudiés depuis 1934, des chercheurs ont rapporté que la thérapie phagique avait un taux de succès de 80% contre les infections d'entérocoques. En Pologne, les médecins ont eu un taux de succès de 90% contre des cas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* (Pirisi, 2000).



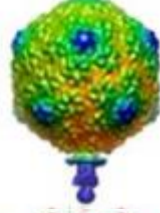


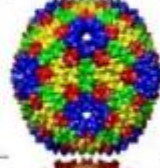

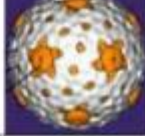
Cependant, l'enthousiasme de départ pour les bactériophages a vite été remplacé par un scepticisme critique suite à des rapports négatifs sur l'inactivité de certaines


préparations commerciales ainsi que la mort de patients traités (Kutter et al., 2005; Duckworth et al., 2002). Les résultats mitigés de la thérapie phagique, l'usage inapproprié des phages, le manque de connaissances sur la nature des bactériophages, le manque de standards de pureté et les études incontrôlées ont fait, qu'avec la découverte des antibiotiques et l'éclatement de la deuxième guerre mondiale, la phagothérapie a été abandonnée dans les pays occidentaux. Toutefois, les phages ont toujours continué à être utilisés comme agents thérapeutiques avec succès en Europe de l'Est et dans l'ex-Union soviétique. Aujourd'hui, le taux alarmant de bactéries résistantes aux antibiotiques, combiné au fait que les nouvelles classes d'antibiotiques pour les affronter se font plus rares, nous obligent à nous tourner vers d'autres alternatives, d'où un regain d'intérêt pour les bactériophages (Sulakvelidze et al., 2001). De nos jours, la technologie biomédicale est bien différente de ce qu'elle était aux premiers temps de la recherche sur la thérapie phagique. Nos connaissances sur les propriétés biologiques des phages et les mécanismes régissant l'interaction phage-bactérie se sont grandement élargies. Ces avancées peuvent maintenant permettre le développement de préparations de phages thérapeutiques sécuritaires ayant une efficacité optimale envers leurs hôtes bactériens spécifiques afin d'intégrer la thérapie phagique à nos méthodes de prévention et de traitement des infections bactériennes.

I-3. La classification des bactériophages :

La classification des bactériophages est réalisée par l'ICTV (pour International Committee on taxonomy of viruses) et dérive du schéma proposé par Bradley en 1967 (Bradley, 1967). Elle dépend principalement des propriétés morphologiques et physico-chimiques du virion, de la nature de l'acide nucléique et est de plus en plus souvent complétée par des données génomiques (Ackermann, 2009). Dans la classification des virus, composée d'ordres, familles, sous-familles, genres et espèces, l'ordre des Caudovirales contient plus de 96 % des bactériophages qui ont été décrits. Les autres bactériophages sont regroupés dans des familles non classifiées à ce jour. L'ordre des Caudovirales est composé de trois familles, les Myoviridae, les Siphoviridae et les Podoviridae (Tableau1). L'étendue de l'arborescence de cette classification ainsi que la liste des nombreuses familles non classifiées témoignent de la grande diversité de ces virus (Ackermann, 2011).

Tableau (1): les principales familles des virus bactériens, d'après, Ackermann (2007)

Forme	Acide nucléique	Famille	Nombre de genres/espèces	Caractéristiques	Exemples	Morphologie
Phages caudés, capsidie icosaédrique (Ordre des <i>Caudovirales</i>)	ADN double brin linéaire	<i>Myoviridae</i>	6/1320	Queue contractile	T4	
		<i>Siphoviridae</i>	7/3229	Queue longue non contractile	λ , T5, HK97, SPP1	
		<i>Podoviridae</i>	4/771	Queue courte	T7, ϕ 29, P22/L, ϕ 6	
Polyédrique	ADN simple brin circulaire	<i>Microviridae</i>	4/40	Capsomères visibles, petite capsidie non enveloppée	ϕ x174	
	ADN double brin circulaire	<i>Corticoviridae</i>	1/3	Capsidie contenant plusieurs couches lipidiques	PM2	
	ADN double brin linéaire	<i>Tectiviridae</i>	1/19	Couche intérieure lipidique	PRD1	
	ARN simple brin linéaire	<i>Leviviridae</i>	2/39	Très petits génomes	Ms2	
	ARN double brin linéaire	<i>Cystoviridae</i>	1/3	Enveloppe lipidique	ϕ 6, ϕ 12	

Filamenteux	ADN simple brin circulaire	<i>Inoviridae</i>	2/67	Filaments longs	M13, fd	
	ADN double brin linéaire	<i>Lipo- thrixviridae</i>	4/7	Tiges longues avec enveloppe lipoprotéique	TTV1	
		<i>Rudiviridae</i>	1/3	Tiges droites sans enveloppe	SIRV-1	
Pléomorphe	ADN double brin circulaire	<i>Fuselloviridae</i>	1/11	Pas de capside, habitat : sources chaudes	SSV1	
		<i>Plasmaviridae</i>	1/5	Pas de capside		

Les exemples de structures sont tirés de: phage T5 (Effantin et al., 2006) ; T7 : (Agirrezabala et al., 2005) ; ϕ x174 (Mckenna et al., 1992) ; PM2 (Abrescia et al., 2008) ; PRD1 : (Abrescia et al., 2004) ; Ms2 (Roshah et al., 1993) ; (Marvin, 1990) ; phage TTV1 (Zillig et al., 1986) ; SIRV-1 (Zillig et al., 1998).

I-4. La méthode de multiplication d'un phage :

Le phage injecte son acide nucléique dans la cellule hôte dont le sort connaît deux issues :

1) Soit le phage intègre son ADN au génome de la bactérie. Le phage est appelé prophage et la bactérie est dite lysogène, elle poursuit son cycle de réplication comme si de rien n'était, et multiplie par la même occasion l'ADN viral; c'est le cycle lysogène (fig.2).

2) Soit la bactérie arrête de se multiplier et procède à la construction des particules virales et les assemble, c'est le cycle lytique. Au bout d'un certain temps, la bactérie éclate et libère de nombreux bactériophages qui peuvent, à leur tour, attaquer d'autres bactéries, c'est la lyse (fig.3).

Le passage du cycle lysogène au cycle lytique est l'induction (fig.3) (Gneagi et al., 1984). De nombreuses discussions ont évoqués l'influence des facteurs

environnementaux tels que les paramètres physicochimiques (pH, radiations solaires, statuts trophiques) et biologiques (activité et abondance de la communauté hôte) dans l'établissement de la lysogénie ou au contraire dans l'induction du cycle lytique à partir d'un lysogène (Weinbauer, 2004). Toutefois, il semblerait que les cycles lytiques prédomineraient sur les cycles lysogéniques dans la majorité des écosystèmes.

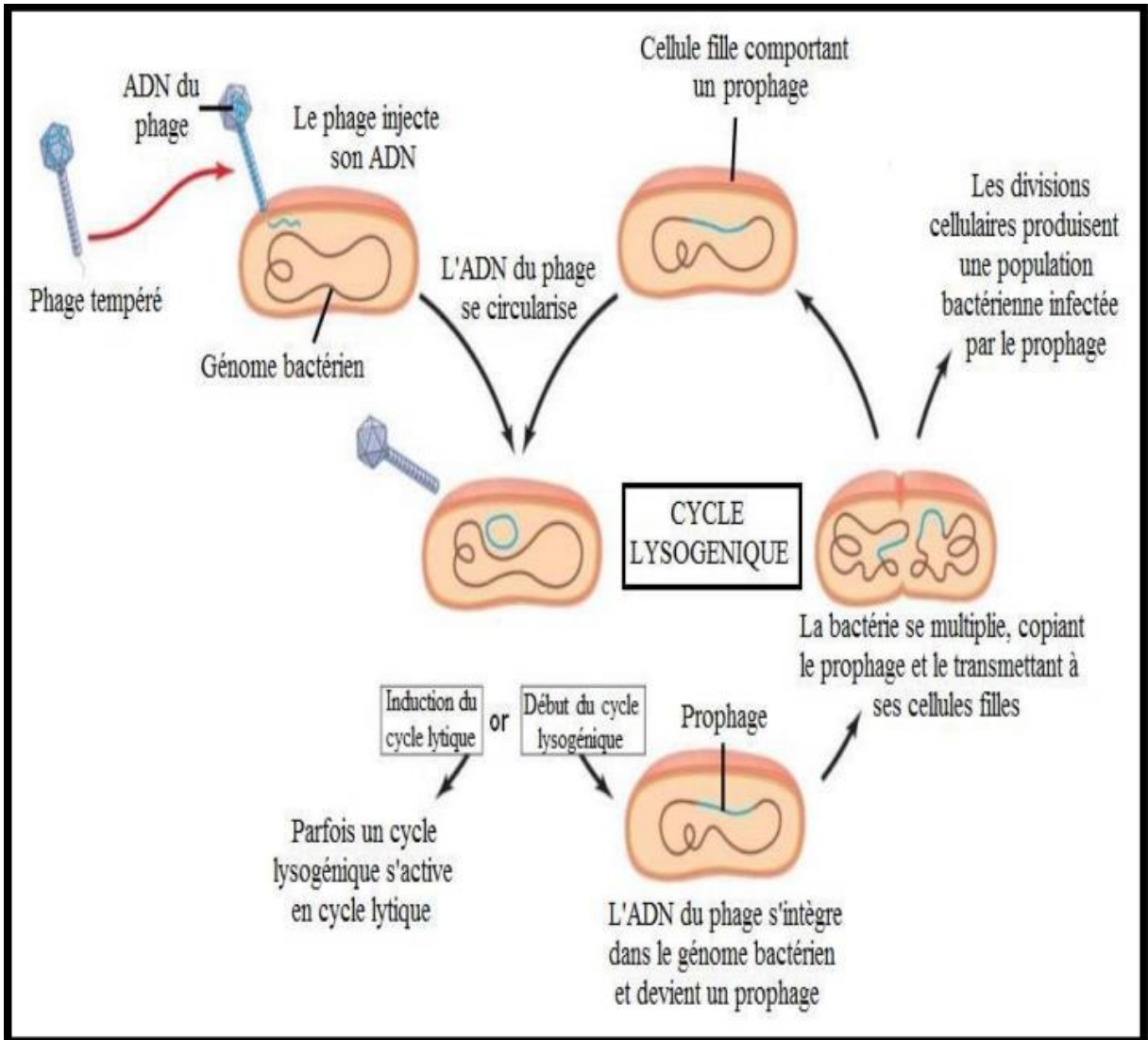


Figure (2): Schéma du cycle lysogénique.

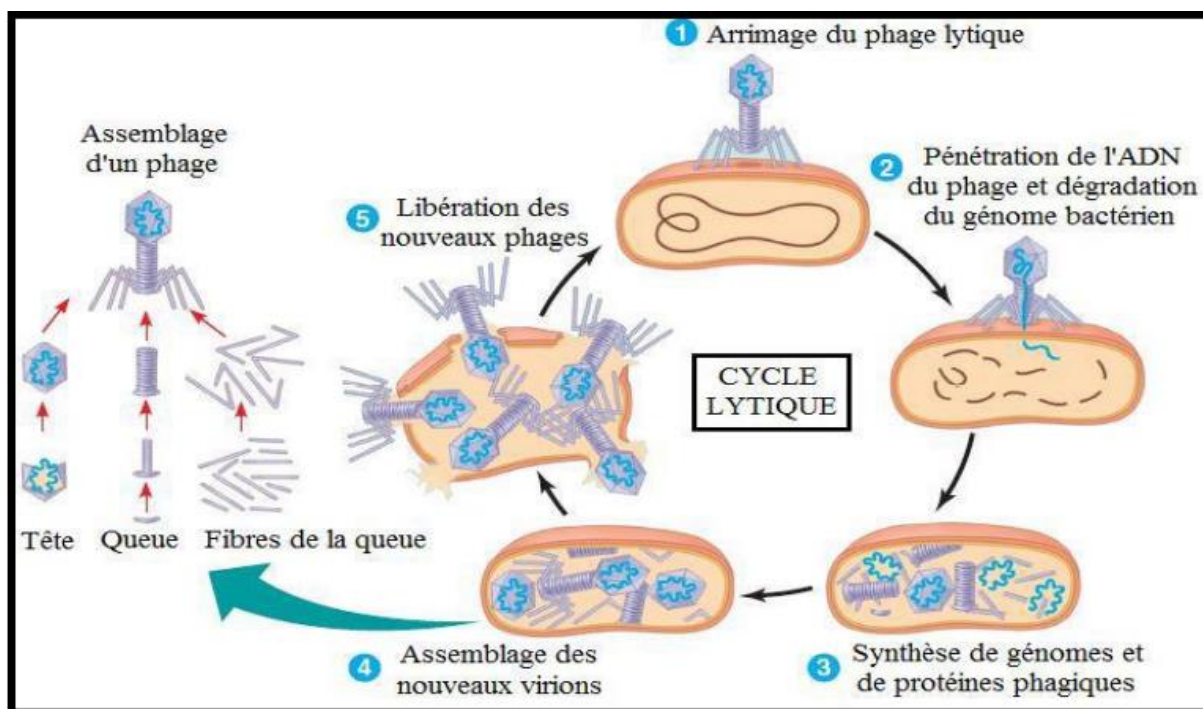


Figure (3): Schéma du cycle lytique.

I-5. Intérêt des phages :

➤ Traitement :

- ✓ Le traitement phagique a une seule dose causé une réduction rapide de nombre des bactéries et a été plus efficace que plusieurs doses d'antibiotiques.
- ✓ le phage a pu prévenir la formation d'abcès et réduire la charge bactérienne ainsi que le poids des abcès (Capparelli et al., 2007).
- ✓ Traiter les brûlures infectées.
- ✓ Traiter les maladies létales et coïncide avec l'apparition du phage dans la circulation qui reste présent jusqu'à l'éradication de la bactérie sans effets secondaires (Matsuzaki et al., 2003).
- ✓ Nettoyage des mains et a entraîné une réduction du taux de SARM sur la peau humaine de 100 fois.

➤ Antibiorésistant :

La résistance croissante des microbes aux antibiotiques, un défi à l'échelle de la planète .En novembre 2015, l'organisation mondiale de la santé

(OMS) a averti que si rien n'était fait pour éviter le mauvais usage des antibiotiques ou trouver de nouvelles molécules.

❖ Les avantages et les inconvénients de la thérapie phagique et de l'antibiothérapie :

Tableau(2). Les avantages et les inconvénients de la thérapie phagique et de l'antibiothérapie (Dublanche, 2014)

	La thérapie phagique	L'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'administrations (dose, rythme, durée) sont précises.
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 des flores commensales (diarrhée, mycoses).
Effets secondaires	Rareté des effets secondaires (fièvre, céphalée) si la suspension phagiques est purifiée.	Nombreux effets secondaires (rénaux, cardiaques, digestifs ,allergiques, neurologiques, tendineux, ...).
Impact environnemental	1. Peu de risque si les phages sont naturels. 2. Risque existant avec des phages modifiés génétiquement.	Risques d'autant plus important que les spectres d'ATB sot larges et leur emploi massif (utilisation dans l'élevage).

Efficacité	<ol style="list-style-type: none"> 1. L'efficacité est prouvée dans de nombreuses études expérimentales Animales . 2. Les études expérimentales humaines récentes rigoureuses rares sont limitées aux phages. 	<ol style="list-style-type: none"> 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 autorisation de mise sur le marché.
Production et coût	<ol style="list-style-type: none"> 1. Les phages naturels sont peu couteux et rapidement utilisables. 2. Avec des phages génétiquement modifiés couts important, possible, délai, disponibilités. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. La mise sur le marché d'un nouvel ATB est très longue et très couteuses. 2. Des intérêts actuels de l'industrie pharmaceutique.

I-6. Les difficultés rencontrés pour utiliser les phages :

a. Le mode de préparation des bactériophages :

L'amplification de bactériophages requiert l'utilisation de culture de bactéries vivantes qui produiront une grande quantité d'endotoxines lors de la lyse. Ces endotoxines doivent être éliminées des préparations afin d'éviter une stimulation excessive du système immunitaire et un choc éventuel. Toutefois, différentes technologies permettent actuellement l'élimination efficace de ces endotoxines (Gill & Hyman, 2010).

b. La reconnaissance des bactériophages par le système immunitaire :

Chaque protéine des bactériophages est potentiellement immunogène et peut induire une réponse humorale, notamment la production d'anticorps neutralisants. Une étude réalisée chez le lapin a rapporté que le titre d'anticorps neutralisants était plus faible lors d'une seule injection ou lors d'une série d'injections rapprochées dans le temps que lors de multiples injections espacées de plusieurs semaines. D'autre part, les anticorps induits lors d'injections rapprochées seraient de type IgM, dont l'activité neutralisante serait faible et facilement réversible, alors que les injections espacées produiraient des anticorps de type IgG. La voie d'administration a également un fort impact sur la production d'anticorps neutralisants, la voie orale semblant être la moins immunogène. Par

ailleurs, probablement en raison de l'omniprésence des bactériophages dans l'environnement, la présence d'anticorps anti-phages préexistant au traitement est observée chez certains patients. En outre, cette réponse dépend des bactériophages et il semblerait que la majorité de ces anticorps soient dirigés contre les protéines de la queue. Les bactériophages présentant une structure plus simple provoqueraient ainsi une réponse moins intense et seraient donc d'un plus grand intérêt thérapeutique. Il est probable que cette réponse humorale soit en partie à l'origine d'une élimination rapide des bactériophages de l'organisme et puisse impacter l'efficacité du traitement (Górski et al., 2012; Sulakvelidze & Kutter, 2004).

II. le *Staphylococcus aureus* et le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline :

II-1. le *Staphylococcus aureus* :

Le staphylocoque doré ou *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est une bactérie, ou un microbe, qui vit normalement sur la peau ou dans le nez de plusieurs personnes. Ces personnes sont habituellement en parfaite santé et ne savent pas qu'elles ont cette bactérie. Elles sont ce qu'on appelle colonisées. Il est normal d'être colonisé par des bactéries dans de nombreuses parties de notre corps. Si *S. aureus* entre « à l'intérieur » du corps, par exemple sous la peau ou dans les poumons, il peut causer une infection. Quand il cause une infection, on traite généralement cette infection au moyen d'antibiotiques.

II-2. le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline ou SARM :

Le traitement habituel des infections au *S. aureus* est un groupe d'antibiotiques reliés à la pénicilline qui comprend la méthicilline, l'oxacilline et la cloxacilline. On appelle SARM certains *S. aureus* que la méthicilline ne réussit plus à tuer. Quand cela se produit, il faut utiliser un différent antibiotique pour traiter l'infection. Les gens peuvent avoir une infection causée par le SARM ou simplement porter les microbes sur leur peau ou dans leur nez.

II-3. Historique de la taxonomie :

Les staphylocoques ont été mis en évidence pour la première fois en 1878 dans le pus d'abcès par Koch en Allemagne. La dénomination de *Staphylococcus* a été introduite en 1883 par Ogston et provient de l'association des termes grecs Staphylê, grappe de raisin et Kokkos, grain. La classification des staphylocoques a connu de nombreux bouleversements; lors de la première édition en 1923 du « Bergey's Manual ® of Determinative Bacteriology », les staphylocoques étaient classés dans la famille des *Streptococcaceae* puis lors de la deuxième édition en 1926 dans la famille des *Micrococcaceae*. En 1948 cette famille comprenait alors le genre *Micrococcus* et *Staphylococcus*. Ce n'est qu'en 1957 que les staphylocoques et les microcoques furent séparés sur la base de leur capacité à utiliser le glucose en anaérobiose. Cependant ce test mena beaucoup de confusion en attribuant certaines espèces du genre *Staphylococcus* au

genre *Micrococcus* (Fauchère et Avril, 2002). En 1974, Baird- Parker sépare définitivement le genre *Staphylococcus* du genre *Micrococcus* grâce à la différence du contenu en guanine et en cytosine de leur ADN, 66- 75% pour *Micrococcus* et 30-39% pour *Staphylococcus*. En 2001, les chercheurs (Garrity et al,2002) ont proposé de radier le genre *Staphylococcus* de la famille des *Micrococcaceae* (genre *Micrococcus* et *Stomatococcus*) grâce l'analyse des séquences de la sous-unité 16S de l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr 16S) ainsi que d'autres analyses génétiques. Actuellement sa position taxonomique est bien définie il s'agit de la famille *Staphylococcaceae* (Garrity et al, 2002). Cette famille comporte les genres *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Salinicoccus*, *Macrococcus*, ainsi que le plus important le genre *Staphylococcus* (Dworkin et al,2006).

Selon la 9 ème édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, les staphylocoques sont classés comme suivant:

Règne : *Bacteria*

Division: *Firmicutes*

Classe : *Bacilli*

Ordre : *Bacillales*

Famille : *Staphylococcaceae*

Genre : *Staphylococcus* (Prescott, 2010).

II-4. Habitat :

Le réservoir naturel des staphylocoques est l'homme et les animaux à sang chaud. Sa niche écologique dominante est la partie antérieure du nez (Kluytmans et al, 1997). Le taux de portage nasal chez les sujets sains varie entre 20% et 55% selon la population étudiée (Nouwen et al, 2001). Trois profils de portage nasal peuvent être distingués : environ 20% des sujets sains sont porteurs permanents, 60% sont des porteurs intermittents, et 20% ne sont pas porteurs (Kluytmans et al, 1997). Ces profils peuvent changer dans le temps.

Ces capacités expliquent que ces bactéries soient aussi des commensaux occasionnels ou permanents de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux qui semblent constituer le principal réservoir de ces germes, secondairement localisés dans la nature, vrai semblablement par les squames et les poils (Eyque et al, 1998).

S.aureus possède des capacités d'adaptation et de résistance au stress importantes et il est capable de survivre dans un large éventail d'habitats environnementaux. La bactérie

peut être isolée de façon sporadique dans le sol, l'eau douce, le sable de la plage, l'eau de mer, la surface des plantes. Concrètement, elle est largement présente dans les poussières dispersées dans l'air et les surfaces (Dworkin et al, 2006).

II-5. Caractéristique générale de *Staphylococcus aureus* :

Les staphylocoques sont des coques à Gram positif qui s'associent en amas ou par deux. On distingue près de 44 espèces différentes, classées par leurs génomes. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), plus communément appelé staphylocoque doré, se différencie des autres staphylocoques par la présence d'une activité coagulase. Cette enzyme induit la coagulation du plasma sanguin, favorisant ainsi P infection. *S. aureus* est un germe très présent dans les infections communautaires et nosocomiales. Chez l'humain, le site de colonisation préférentiel est la muqueuse nasale et la gorge⁵. En effet, près de 30 % des adultes sont porteurs de façon permanente et 50 % le sont de façon intermittente. C'est à partir des sites de portage que *S. aureus* colonise les régions cutanées, plus particulièrement les zones souvent humides telles que les aisselles, le périnée et les mains. La majorité de la transmission des bactéries s'effectue par contact direct. Cependant, il arrive parfois que l'infection se produise par un contact indirect, soit par l'entremise d'un vêtement ou de matériel médical.

II-6. Caractéristiques des SARM:

Pour considérer *S. aureus* comme étant un SARM, il doit posséder plusieurs caractéristiques.

- Premièrement, il doit être Gram positif et capable d'oxyder le mannitol.
- Deuxièmement, il doit posséder une activité catalase et coagulase.
- Finalement, la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'oxacilline doit être supérieure ou égale à 4 mg/L. Cet antibiotique, de la famille des β -lactamines, agit sur l'enzyme PBP (penicillin binding protein) qui permet la biosynthèse du peptidoglycane retrouvé chez les bactéries Gram positif comme *S. aureus*. En agissant sur cette protéine, l'antibiotique inhibe la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne.

La résistance des SARM à cet antibiotique est principalement due au gène *MecA*. Ce dernier code pour la transpeptidase PBP2A {penicillin binding protein 2A}.

Les β -lactamines (ex. : pénicilline M) ont une affinité plus faible pour cette protéine, ce qui permet à la bactérie de synthétiser le peptidoglycane, malgré la présence de l'antibiotique.

II-7. Mécanismes de la résistance bactérienne :

Il existe deux principaux types de résistance aux antibiotiques : naturelle ou acquise. En effet, des antibiotiques sont reconnus pour ne pas avoir d'effet sur certaines souches bactériennes; elles sont naturellement résistantes. À titre d'exemple, les *klebsielles* présentent une résistance naturelle aux aminopénicillines (ampicilline et amoxicilline) et aux carboxypénicillines (ticarcilline). D'autre part, la résistance dite acquise peut être chromosomique ou plasmidique. La résistance chromosomique apparaît après une mutation du bagage génétique. Généralement, elle n'est pas provoquée par l'utilisation d'un antibiotique. Elle est habituellement spontanée et relativement rare. Dans 90 % des cas, la résistance acquise est plasmidique. En effet, elle est transmise par transfert du bagage génétique de plasmides lors de la conjugaison. Fréquemment, la résistance est croisée, c'est-à-dire que la résistance à un antibiotique est également efficace pour d'autres. La résistance bactérienne aux antibiotiques peut être induite par différents mécanismes. Dans certains cas, les bactéries diminuent leur perméabilité membranaire. Par exemple, 10 % des *Pseudomonas aeruginosa* présentent une résistance isolée à l'imipénème. L'antibiotique peut également être inactivé par une modification de sa structure chimique. Par exemple, les pénicillinases sont reconnues pour cliver le cycle β -lactame de la pénicilline, l'empêchant ainsi de se lier à son site d'action. Finalement, elles peuvent tout simplement expulser l'antibiotique grâce à des pompes protéiques transmembranaires, avant même qu'il atteigne le site de fixation.

II-8. Résistance à la méthicilline :

Dans la fin des années 1950 des nouveaux bêta-lactamines semi-synthétiques ont été développés et sont devenus disponibles. Ils sont stables à l'action des pénicillinases. Le groupe comprend la méthicilline, l'oxacilline, nafcilline, flucloxacilline et dicloxacilline, méthicilline étant le prototype (Fisher et al, 2005; Guignard et al, 2005).

II-8.1. Mécanisme de résistance:

La résistance à la méthicilline, qui entraîne une résistance à toutes les β -lactamines, est déterminée par la présence d'un gène chromosomique (*mecA*) qui code pour la PLP2a. Cette PLP additionnelle a moins d'affinité pour les β -lactamines et en particulier pour la méthicilline (De Jonge et al, 1993).

Les PLP, enzymes essentiels qui catalysent la transpeptidation des liens entre les peptidoglycanes de la paroi cellulaire, sont la cible des bêta lactamines chez les souches sensibles de *S. aureus* (Gilmore et al, 2008). La liaison de méthicilline, ou autre β -lactamine, aux PLP inhibe la réaction de transpeptidation de celle-ci, ce qui entraîne un arrêt de la biosynthèse de la paroi conduisant à la mort de la bactérie (Prescott et al, 2000). Chez les SARM la PLP2a est soit constitutionnellement présente ou induite lorsque la bactérie est en présence d'une bêtalactamine. La PLP2a, ayant une faible affinité pour les bêta lactamines, n'est pas affectée par ces antibiotiques et permet ainsi à la bactérie de continuer la biosynthèse de sa paroi (Gilmore et al, 2008).

Cette résistance est située sur un élément mobile de résistance, la cassette *SCCmec* (Deurenberg et al, 2008). La *SCCmec* est une séquence d'ADN de 21 à 67-kb qui est toujours située près de l'origine de répllication du chromosome de la bactérie. Cette séquence contient les complexes de gènes *mec* et *ccr*. Le complexe *ccr* est composé des gènes *ccr* entourés de cadres de lecture ouverts qui n'ont pour la plupart aucune fonction connue (IWG-SCC 2009). Le complexe *mec* contient le gène *mecA* qui code pour la PLP2a (Chambers et al, 1988). L'expression de la PLP2a est contrôlée par deux ensembles de gènes régulateurs qui contrôlent l'expression de *mecA*. Le premier ensemble inclus *mecR1* et *mecI* qui sont situés dans le segment d'ADN *mec* immédiatement avant *mecA*. L'autre ensemble de gènes régulateurs est constitué de *blaR1* et *blaI* et sont situés sur le chromosome. Ils servent également à réguler *blaZ* codant pour une pénicillinase (penicillinase staphylococcique). Les protéines *MecI* et *BlaI* sont deux répresseurs agissant sur *mecA* et *blaZ*. Les protéines *MecR1* et *BlaR1* sont des molécules de type transducteur senseur spécifiques pour leur répresseur correspondant. Ce sont des protéines transmembranaires avec un domaine senseur extracellulaire et un domaine métalloprotéase intracellulaire. En présence de β - lactamine, ces protéines vont respectivement inhiber l'action de *MecI* et *BlaI* permettant ainsi la traduction de *mecA* et la synthèse de PLP2a (Salyers et al, 2002)

L'origine du gène *mecA* est incertaine. L'hypothèse la plus probable est que ce gène proviendrait d'un homologue du gène *mecA* présent chez *Staphylococcus sciuri* qui a 88% de similarité au niveau des acides aminés (Deurenberg et al, 2008). Cet homologue aurait subi des mutations, car *S. sciuri* n'est pas résistant à la méthicilline et l'introduction du gène provenant de cette bactérie dans une souche de *S. aureus* sensible, ne rend pas cette souche résistante (Wu et al, 2001). Les cassettes *mec* sont composées de plusieurs éléments situés dans la région X (*orfX*). Ces cassettes comprennent plusieurs gènes dont le complexe de gènes *mec*, le complexe de gènes *ccr* ainsi qu'une région J (IWG-SCC 2009). Ces complexes et régions, selon leurs arrangements et compositions, servent à différencier les cassettes *mec*.

II-8.2. Facteurs influençant l'expression de la méthicillino-résistance :

Plusieurs autres gènes sont impliqués dans l'expression de la résistance à la méthicilline. Il s'agit des gènes auxiliaires *fem* pour «factors essential for methicillin resistance») nécessaires dans l'expression de la résistance de haut niveau chez les souches présentant une résistance hétérogène à la méthicilline (Berger-Bächi, 1994 et 1995). Leur existence a été initialement suspectée devant l'absence de relation d'une souche à l'autre entre le niveau de résistance et le niveau d'expression de PLP2a. Ces autres gènes de résistance sont trouvés chez toutes les souches de *S. aureus*, indépendamment de la présence du gène *mecA*. Ils ne sont pas responsables à eux seuls de la résistance à la méthicilline, mais peuvent augmenter le niveau de résistance chez une souche SARM. Les protéines *FemA*, *FemB* et *FemX* sont impliquées dans la synthèse du pont pentaglycine qui lie les chaînes glycanes. *FemX* catalyse l'incorporation de la première glycine, *FemA* celle des glycinés 2 et 3, et *FemB* ajoute les glycinés 4 et 5. *FemA* et *FemB* ne sont pas interchangeables. Par conséquent, l'inactivation des gènes codant pour chacune de ces protéines conduit à l'obtention d'une paroi cellulaire déstructurée contenant des ponts mono- ou triglycine respectivement (Ehlert et al, 1997). L'inactivation de *femA* ou *femB* conduit à une large réduction de la résistance à la méthicilline et à une augmentation de la sensibilité à plusieurs antibiotiques. Mais la compensation de l'inactivation par mutations peut restaurer la viabilité cellulaire et la résistance à la méthicilline. Cependant la croissance est sévèrement affectée (Hübscher et al, 2007).

II-9. Problématique :

La résistance bactérienne aux antibiotiques est en perpétuelle évolution, cette résistance est liée essentiellement à un usage excessif des antibiotiques aussi bien en médecine vétérinaire, qu'en médecine humaine ou dans l'alimentation animale. Ce problème crée une menace mondiale pour le traitement des maladies causées par ces bactéries et nous fait penser à des solutions radicales et efficaces. En effet, la meilleure solution actuellement c'est l'utilisation des bactériophages.

Chapitre II :
Matériels et méthodes.

Chapitre II : Matériels et méthodes.

I Objectif du travail.

II Lieu et période de l'étude.

III Matériels et méthodes.

III-1. Matériels.

III-2. Appareillages.

III-3. Verreries.

III-4. Autres matériels.

III-5. Milieux de culture.

IV Méthodes.

IV-1. Protocole expérimental.

I. Objectif du travail :

Notre objectif est l'isolement et l'identification des bactériophages actifs contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

II. Lieu et période de l'étude :

Notre étude a été effectuée au niveau du laboratoire d'hygiène et pathologie animale au niveau de l'EX-ITMA, Université d'Ibn Khaldoun, Tiaret du 06/05/2019 jusqu'au 09/05/2019.

III. Matériels et méthodes :

III-1. Matériels :

III-1-1. Appareillages :

agitateur magnétique

Autoclave

Balance électrique

Centrifugeuse

Etuve

Spectrophotomètre

Vortex

III-1-2. Verreries :

Erlenmayer

Flacon

Tube

Anse

III-1-3. Autres matériels :

Bec bunsen

Bain marie

Boîte à pétri

Portoir

Spatule

III-1-4. Milieux de culture :

Milieu LB bouillon

Milieu LB concentré ($\times 10$)

IV. Méthodes :

IV-1. Protocole expérimental :

NOTE : Afin de faire tenir l'expérience en classe sur deux séances au lieu de trois, les manipulations du jour 1 peuvent être effectuées par l'assistant.

➤ Jour 1 :

1) Prélèvement d'échantillons.

Là où il y a des bactéries, il y a des bactériophages !. Plus le cours d'eau est « sale », plus il y a de chance d'avoir des bactériophages. Un prélèvement en aval de la sortie d'une station d'épuration est également envisageable.

- Plonger un tube 50 ml dans l'eau et le remplir.
- Fermer le tube et noter la provenance de l'échantillon sur le tube.

NOTE: Il est important de récupérer l'eau le jour même ou la veille de l'expérience. Au delà, les résultats ne sont pas garantis.





2) Elimination des bactéries de l'échantillon

Les bactéries ne passent pas à travers les filtres d'une porosité de $0.45 \mu\text{m}$. En revanche les bactériophages, plus petits passent à travers.

- Filtrer environ 20 ml de l'échantillon d'eau dans un nouveau tube 50 ml (noté F). Attention à travailler stérilement.

Pour cela, il est important de retirer le piston avant de mettre le filtre pour ne pas le déchirer. Le filtre est ensuite fixé à l'extrémité de la seringue. Verser les 20 ml d'eau à analyser dans la seringue et insérer délicatement le piston. Appuyer délicatement pour filtrer l'eau. Une pression trop forte risque de décrocher le filtre.



3) Enrichissement en bactériophages :

❖ Souches bactériennes :

∞ *SARM*.

∞ *Staphylococcus aureus ATCC29213*.

- Prélever 9 ml du filtrat (tube F) et les transférer dans un nouveau tube 50 ml (noté E). Le reste peut être utilisé par un autre binôme. Garder le filtrat (tube F) restants à 4°C. Il sera utilisé plus tard.

Les 9 ml ne contiennent plus de bactérie mais peuvent contenir des bactériophages contre staphylocoques .

- Ajouter 1 ml de milieu de culture concentré (LB 10x) aux 9 ml d'eau filtrée.

A l'aide d'une anse stérile prélever un peu d'une culture bactérienne et la resuspendre dans les 10 ml de solution.

- Fermer le tube.
- Incuber le tube à 37°C 24h.

La bactérie va se multiplier grâce au milieu de culture. Si un ou plusieurs phages capables d'infecter la bactérie sont présents dans les 9 ml de l'échantillon d'eau, ils vont l'infecter et s'y multiplier (enrichissement). Après 24h un nombre suffisant de bactériophages pourra être mis en évidence.

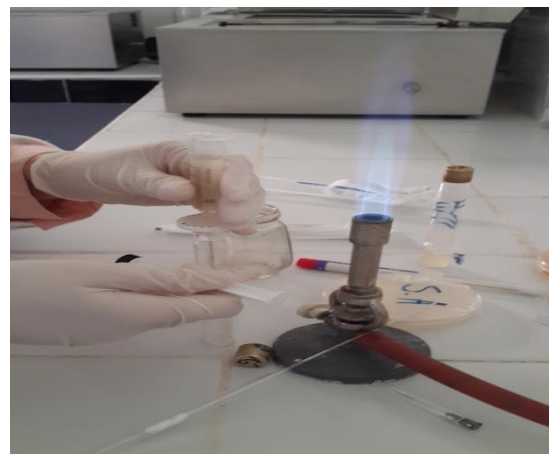
Après cette période d'incubation, le tube peut être gardé 1 semaine à 4°C

➤ Jour 2 :

4) Mise en évidence des bactériophages

- Filtrer le milieu d'enrichissement délicatement comme décrit au point (2) en récupérant le filtrat dans un tube de 15 ml (noté EF).

Le filtrat (tube EF) peut être gardé à 4°C. Les bactériophages sont relativement stables et la préparation peut être conservée au moins une année dans ces conditions.

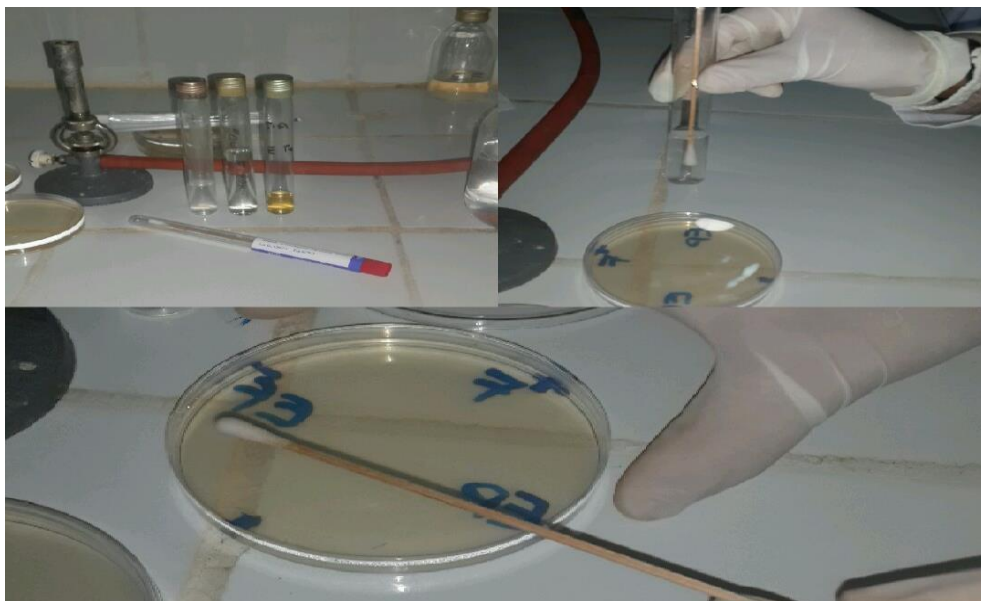


Matériels et méthodes

- Faire une suspension bactérienne (la même souche qu'utilisée pour l'enrichissement des phages (point 3 du protocole) comme effectué au point 2 mais en resuspendant cette fois-ci dans 5 ml d'eau physiologique stérile.



- Imbiber un écouvillon stérile avec la suspension. Essorer légèrement contre la paroi du tube et frotter l'écouvillon sur une boîte de pétri. Il est important d'effectuer des stries serrées afin de déposer des bactéries sur toute la boîte en grande quantité. Répéter l'opération en tournant la boîte d'un tiers pour strier dans une autre direction. Répéter une troisième fois l'opération en tournant encore la boîte d'un tiers.



Cette manipulation est identique à l'étalement effectué pour l'expérience n°15 : les antibiotiques. Il s'agit ici d'obtenir un « gazon » bactérien.

- Laisser sécher la boîte quelques minutes.
- Noter au dos de la boîte les numéros ou noms des échantillons qui vont être déposés.

Concernant SARM :

- Déposer 5 µl de l'enrichissement filtré (tube EF).
- Déposer 5 µl de l'eau filtrée non enrichie (tube F).
- Déposer 5 µl d'eau physiologique stérile (contrôle négatif).

Concernant staphylococcus :

- Déposer 5 µl de l'eau filtrée non enrichie (tube F).

Et Puis :

- Laisser sécher les boîtes quelques minutes sans la secouer. Quand la goutte de 5 µl a complètement disparue, incuber les boîtes à l'envers à 37 °C de 12 à 24 h.
- Les boîtes peuvent être conservées ensuite à 4°C.

➤ **Jour 3 :**

5) Résultat.

Chapitre III :

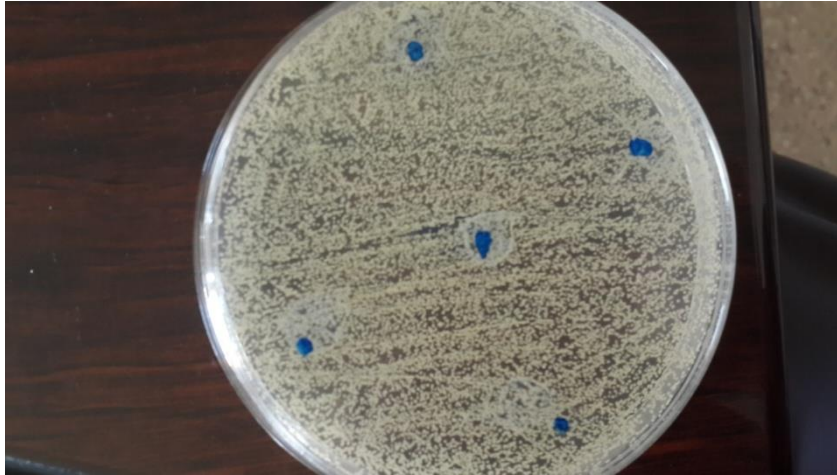
Résultats.

Résultats

- Observer les plages de lyse

∞ Pour *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 :

On observe la présence des plages de lyse.



∞ Pour SARM :

Résultat négatif à cause de leur forte résistance vis-à-vis les bactériophages.



Conclusion.

CONCLUSION :

Ce travail est pour l'objet de l'identification et l'isolement des bactériophages actifs contre staphylococcus aureus résistant à la méthicilline. les phages sont isolés à partir des échantillons des eaux usées.

L'isolat doit être filtré lentement afin d'éliminer les autres éléments qui peuvent faussés les resultats et une quantité de filtrat enrichie dans le milieu de LB concentre pendant 24 heures a 37°c

Vue que la multi résistance du SARM ou l'incapacité des phages de lutter contre des bactéries, on utilise d'autre souche de staphylococcus aureus (ATCC29213) pour comparer et confirmer cette haute résistance.

Par méthode des plages de lyse ,les résultats par vision macroscopique :

- ✓ **SARM:** résultat négatif
- ✓ **Staphylococcus aureus ATCC29213:** l'apparition des plages de lyse autour le filtrat et le filtrat enrichie des phages.

**Références
bibliographiques.**

A

Abrescia. N.G, Nicola. G, Jonathan M. Grimes, Hanna M. Kivelä, Assenberg. R, Geoff C. Sutton, Sarah J. Butcher, Jaana K.H. Bamford, . Bamford. D.H, Stuart. D.I. (2008).

Insights into Virus Evolution and Membrane Biogenesis from the Structure of the Marine Lipid-Containing Bacteriophage PM2.

Ackermann H. (2011). "Bacteriophage taxonomy", *Microbiology Australia*, 32(2) .

Ackermann H.-W. (2007). "5500 Phages examined in the electron microscope", *Archives of virology*, 152(2) : 227–243.

Ackermann H.-W. (2009). "Phage Classification and Characterization". In Clokie, M. R. J., Kropinski, A. M., & Walker, J. M. (eds) *Bacteriophages*, Humana Press, pp. 127–140.

Ackermann. H.W. (2007). "Phage classification and characterization." *Methods in Molecular Biology* .501;p 127-140.

Agirrezabala. X, Velázquez-Muriel. J.A, Gómez-Puertas. P, Scheres. S.H, Carazo. J.M, Carrascosa. J.L. (2007). Quasi-atomic model of bacteriophage t7 procapsid shell: insights into the structure and evolution of a basic fold. *Structure*;15(4);p 461-472.

B

Berger-Bachi B (1994). Expression of resistance to methicillin. *Trends Microbiol.* 2: 389-393.

Berger-Bachi B (1995). Factors affecting methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 6: 21-23.

Bradley D. E. (1967). "Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins", *Bacteriological reviews*, 31(4) : 230–314.

C

Capparelli, R., M. Parlato, G. Borriello, P. Salvatore, D. Iannelli (2007). "Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51(8): 2765-2773.

Chambers HF (1988). Methicillin-resistant staphylococci. *Clin Microbiol Rev.*1:173-186.

D

D'Hérelle F . Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. Comptes – rendus de l' Académie des sciences Paris, 1917, 165, pp. 373-375.

De Jonge BLM and Tomasz A (1993). Abnormal peptidoglycan produced in a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of methicillin : functional role for penicillin binding protein 2a in a cell wall synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* . 37 : 342-346.

Deurenberg RH and Stobberingh EE (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.* 8:747-763

Dublanchet A. Des virus pour combattre les infections – la phagothérapie : renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques. Fave Ed. Paris , France. 2009,237 p.

Dublanchet,A.(2014) . Qu'est ce que la phagothérapie ? *Hegel*, 4(4) : 359

Duckworth, D. H., P. A. Gulig (2002). "Bacteriophages: potential treatments for bacterial infections." *Biodrugs* 16(1): 57-62

Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schkeufer KH , Stackebrandt E (2006). The Prokaryotes: Bacteria:Firmicutes, Cyanobacteria.3 eme éd.Springer,New-York,.Vol 4

E

Ehlert K, Schroder W, Labischinsky H (1997). Specificities of *FemA* and *FemB* for different glycine residues: *Fem B* cannot substitute for *FemA* in staphylococcal peptidoglycan pentaglycin side chain formation. *J. Bacteriol.* 179: 7573-7576.

Effantin. G, Boulanger. P, Neumann. E, Letellier. L, Conway. J.F. (2006). "Bacteriophage T5 structure reveals similarities with HK97 and T4 suggesting evolutionary relationships. *Journal of Molecular Biology*; 361(5);p 993-1002.

Encyclopédie Larousse. Histoire de la médecine. [en ligne] site disponible sur : http://www.larousse.fr/encyclopédie/divers/histoire_de_la_m%C3%A9decine/187065 (page consultée le 23/06/2016).

Eyque MA, Alouf J and Montagnier L (1998). *Traité de Microbiologie Clinique* «Staphylocoques» Nevine EL SOLH. PICCIN NUOVA, Italie. 567-591.



Fauchere JL and Avril JL (2002). *Bactériologie générale et médicale*. ellipses, Paris. 213-217 .

Fisher JF, Meroueh SO and Mobashery S (2005). Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem. Rev.*105: 395-424.



Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia microbiologica*, 56(3), 191-200.



Hübscher J, Jansen A, Otte O, Schofer J, Majcherzck PA, Harris LG, Bierbaum G, Heinemann M et Berger-Bachi B (2007). Living with an imperfect cell wall: compensation of *femAB* inactivation in *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics*. 8:307



(IWG-SCC), I. W. G. o. t. C. o. S. C. C. E. (2009). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother* .53:4961-4967.



Garrity GM, Johnson KL, Bell J and Searles DB (2002). *Bergy's Manual of*

Systematic Bacteriology, second ed. Springer-verlag, New York. 60.

Gill J. J. & Hyman P. (2010). "Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy", *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(1) : 2–14.

Gilmore KS, Gilmore MS and Sahm DF (2008). Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* .291-312. In R. G. Wax, K. Lewis, A. A. Salyers, and H. Taber (ed.), *Bacterial Resistance to Antimicrobials*, Second ed. CRC Press, Boca Raton.

Górski A., Międzybrodzki R., Borysowski J., Dąbrowska K., Wierzbicki P., Ohams M., Korczak-Kowalska G., Olszowska-Zaremba N., Lusiak-Szelachowska M., Kłak M., Jończyk E., Kaniuga E., Gołaś A., Purchla S., Weber-Dąbrowska B., Letkiewicz S., Fortuna W., Szufnarowski K., Pawełczyk Z., Rogóż P. & Kłosowska D. (2012). "Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy", *Advances in virus research*, 83 : 41–71.

Gnaegi. F, Sozzi. T, Cazelles. O, D'aminco. N. (1984). "Connaissances sur les bactériophages de *Leuconostoc oenos* et progrès dans la maîtrise de la fermentation malolactique des vins. *Revue Suisse Viticulture Arboriculture Horticulture*, Vol 16 (2);p 59-65.

Guignard BJ, Entenza M and Moreillon P (2005). Beta-lactams against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:479-489.



Kluytmans J, van Belkum A and H. Verbrugh (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* .10:505-520

Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (2005). *BACTERIOPHAGES Biology and Applications*: CRC Press.



Marvin. D.A. (1990). Model-building studies of Inovirus: genetic variations on a geometric theme. *International Journal of Biological Macromolecules*. 12(2);p 125-138.

Références bibliographiques

Matsuzaki, S., M. Yasuda, H. Nishikawa, M. Kuroda et al. (2003). "Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage \square MR11." *Journal of Infectious Diseases* 187:613-624.

Mckenna. R, Xia. D, Willingmann. P, Ilag. L.L, Krishnaswamy. S, Rossmann. M.G, Olson .N.H, Baker. T.S, Incardona. N.L. (1992). Atomic structure of single-stranded DNA bacteriophage phi X174 and its functional implications. *Nature*; 355(6356); p 137-143.

N

NOUWEN JL, VAN BELKUM A, VERBRUGH HA (2001). Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *The Netherlands J. Med.* 59, 126-33.

P

Pirisi, A. (2000). "Phage therapy - advantages over antibiotics?" *The Lancet* 356 (October 21,2000): 1418.

Prescott JF, Boggot JD and Walker RD (2000). *Antimicrobial Therapy*, Third ed. Iowa State University Press / Ames, Danvers.

Prescott LM, Harley JP, Klein D (2010). *Microbiologie*. 2ème Edition Française. De Boeck Université.

R

Resh et Meyer, 2002; Kutter et al., 2005

Roshah. G, Karin. V, Kerstin. F, Lars. L. (1993). The refined structure of bacteriophage MS2 at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*; 234(3);p 620-639.

S

Salyers AA and Whitt DD (2002). *Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach*, Second Edition ed. ASM Press, Washington, D.C.

Sulakvelidze, A., Z. Alavidze and J.G. Morris Jr. (2001). "Bacteriophage therapy." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45(3): 649-659.

Références bibliographiques

Sulakvelidze A. & Kutter E. (2004). "Bacteriophage therapy in humans". In Kutter, E. & Sulakvelidze, A. (eds) Bacteriophages, CRC Press.

W

Weinbauer. M.G, (2004). Ecology of prokaryotic viruses, FEMS Microbiology Review 28;p 127- 181.

Wu SW, de Lencastre H and Tomasz A (2001). Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 183:2417-2424.

Z

Zillig. W, Hans. P.A, Ingelore. H, Prangishvili. D, Schweier. A, Kenneth. S, She. Q, Hien. P, Garrett. R, Jakob. K. K. (1998). Genetic elements in the extremely thermophilic Archaeon *sulfolobus*. Extremophiles. 2(3); p 131-140.

Annexe

Milieu LB :

Milieu de culture	composition	Quantité
LB	Trypton	10 g
	Extrait de levure	5g
	NaCl (sel de cuisine)	5g
	Agar	20g
	Eau déminéralisée	1l

Milieu LB concentré (x10) :

Milieu de culture	Composition	Quantité
LB concentré	Trypton	10g
	Extrait de levure	5g
	NaCl (sel de cuisine)	5g
	Eau déminéralisée	100ml

Résumé

Résumé:

Les bactériophages sont présents dans l'ensemble de la biosphère. En effet, ils sont présents partout, mais en quantité plus importante dans les excréments, le sol et les eaux usées. Le but de cette étude est d'isoler des phages à partir des eaux usées par filtration et identifier principalement les bactériophages qui ont un effet lytique vis à vis Sarm par filtrat en deux , une partie seulement filtré et une partie filtrée et enrichie dans un milieu LB concentré pendant 24 heures à 37°C.

On a testé les 2 suspensions (filtrat et filtrat enrichie) sur 2 souches de staphylococcus aureus (sarm et ATCC29213).

La sensibilité des souches de staphylococcus aureus (sarm et souche ATCC29213) à la suspension phagique a été testée par la méthode de plaque de lyse. Durant cette recherche,seulement la souche staphylococcus aureus ATCC29213 est révélée sensible au phage.

Mots clés: Bactériophage,SARM, eaux usées, plaque de lyse

ملخص:

توجد بالعات البكتيريا في جميع أنحاء المحيط الحيوي. في الواقع ، فهي موجودة في كل مكان ، ولكن بكمية أكبر في البراز والتربة ومياه الصرف الصحي.

تهدف هذه الدراسة إلى عزل الخلايا الملتهمة من مياه الصرف الصحي عن طريق الترشيح وتحديد البكتيريا التي لها تأثير غليظ ضد السارم عن طريق تقسيم المرشح إلى قسمين ، جزء مرشح فقط وجزء مرشح ومغذى في وسط LB مركز لمدة 24 ساعة عند 37 درجة حرارة

تم اختبار كل من المحلولين (مرشح والمرشح المغذى) على سلالتين من المكورات العنقودية الذهبية (سارم و ATCC29213)

تم اختبار حساسية سلالات المكورات العنقودية الذهبية (sarm و سلالة ATCC29213) بطريقة نطاق التحلل ، خلال هذا التحقيق ، تبين أن سلالة المكورات العنقودية الذهبية ATCC29213 هي الوحيدة التي تعاني من حساسية العدوى.

الكلمات المفتاحية:بالعات البكتيريا ، MRSA ، المياه العادمة ، نطاق التحلل

Abstract:

Bacteriophages are present throughout the biosphere. Indeed, they are present everywhere, but in greater quantity in excrement, soil, and wastewater.

The aim of this study is to isolate phages from wastewater by filtration and mainly identify bacteriophages that have a lytic effect against Sarm by dividing the filtrat in two, only a part filter and a filtered and enrichée part in a medium LB concentrated for 24 hours at 37 °c.

Both suspensions (filtrate and filtrate enrichée) were tested on 2 strains of Staphylococcus aureus (sarm and ATCC29213).

The sensitivity of strains of Staphylococcus aureus (sarm and strain ATCC29213) to phage suspensions was tested by the lysis range method.

During this investigation, only the staphylococcus aureus strain ATCC29213 was shown to be phage sensitive.

Key words: Bacteriophage, MRSA, wastewater, lysis range.