

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة 8 ماي 1945 قالمة  
Université 8 Mai 1945 Guelma  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



## Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature de la Vie  
Filière : Sciences Biologiques  
Département : Biologie  
Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire

Thème :

### Recherche et isolement des bactériophages et leur applications sur les bactéries résistantes aux antibiotiques

Présenté par : BOURAHDOUN Ines  
DOUAKHA Messaouda  
HASNI Imane

Devant le jury composé de :

Président : AYED Hayette	M.C.B.	Université de Guelma
Examineur : TORCHE Esma	M.C.B.	Université de Guelma
Encadreur : KHALLEF Messaouda	M.C.A.	Université de Guelma
Invité : BENOUARETH Djamel Eddine	Pr.	Université de Guelma

Septembre 2020

## **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.*

*Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*Nous voudrions exprimer chaleureusement nos remerciements notre directrice Mme « Khallel Messaouda », pour le choix du thème, pour sa patience, sa disponibilité, son soutien et surtout ses précieux conseils qui ont dirigé vers la bonne voie et n'oublions jamais ces critiques pour nous orienter vers un esprit scientifique.*

*Nos gratitude vont également au Docteur « Ayed Hayette », pour avoir accepté de présider ce jury*

*Nos gratitude vont également au Docteur « Torche Esma », pour avoir accepté de faire partie de ce jury et d'examiner ce modeste travail.*

*Nous adressons également nos sincères remerciements au Professeur « Benouareth Djamel Eddine » d'avoir accepté de nous honorer par sa présence en tant que membre invité du jury de ce mémoire.*

*Nous remercions tout l'équipe pédagogique du département de biologie qui ont contribué à notre formation durant les cinq années de graduation.*

*Enfin, nous n'oublions jamais l'aide, les conseils, surtout les encouragements et le soutien moral de nos familles et de nos précieux amis*

*Merci, à ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur.*

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

*A ma merveilleuse mère « Baghdadia » 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 remercier comme il se doit.*

*A ma petite sœur « Manar » 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 tout les familles « Bourahdoun » et « Boukherouba » notamment « khalti Houria et Khali Ghani » pour leurs encouragements.*

*A mes chères binômes pour les plus beaux souvenirs que je garderai toute ma vie et à toutes ses familles « Hasni et Douakha ».*

*A toi mon adorable chère amie « Messaouda Yesmine » vous êtes bien plus qu'une sœur, ma source d'énergie et de motivation, je te souhaite un avenir plein de joie avec moi bien sûr.*

*A mes amies de toujours : « ZRN : Amira, Imane, Maissa, Jasmine » et « Assila » en souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble ; je vous aime tous et je vous souhaite une carrière pleine de réussite et d'excellence.*

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

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

*Je vous dis Merci*

*« Ines »*

## *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 « Ahcene ».*

*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 « Zohra ».*

*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 ma chère sœur « Zayneb » pour son encouragement et son soutien moral, à son petit poussin « Abdelouadoud », la joie de la famille.*

*A mon adorable frère « Ali », ma force dans la vie.*

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

*A ma 2<sup>ème</sup> famille, mon oncle « Yazid » et ma tante « Sabah » et leur enfants « Hakou et Modjib » pour leurs encouragements et leurs soutien.*

*A les membres de ma famille paternelle et maternelle aussi nombreux et divers que les bactériophages spécialement à « Sofia ».*

*A une sœur d'une autre mère « Ines » pour le courage, le sourire, le bonheur et tous les bons et les mauvais moments qu'on a passé ensemble durant notre parcours scolaire, à sa famille notamment sa sœur « Manar ». Je te souhaite de vivre et revivre que les bons souvenirs avec moi et je te souhaite une vie pleine de réussite et de bonheur.*

*A mes chères copines « Imen, Maissa, Amira, Assila » 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 prés ou de loin.*

*« Messaouda »*

*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 : **AbdElmalek**, 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 : **Salîha**.*

*A mes adorables et chères sœurs : **Meriem, Khawla** et **Khadîdja**, je vous aime.*

*Sans oublier mon trinôme, **Ines** et **Yesmine** pour ses soutient morales, ses patiences et ses compréhensions tout au long de ce projet, je vous aime les filles.*

*A celui qui j'adore beaucoup qui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles, je t'aime **Djihane**.*

*À mes amis de toujours : **ines, yesmine, maïssa** et **amira**, 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.*

*A ma très chère cousine **Soumeya**, tu as toujours été présente pour les bons conseils. Ton affection et ton soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie personnelle et universitaire, veuillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous tes efforts, merci.*

*Et à tous ceux qui m'aiment...*

*« Imane »*

# Table des matières

**Remerciements**

**Dédicace**

**Table des matières**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Liste des abréviations**

Introduction..... 1

**Revue bibliographique**

I.	Généralités sur les bactériophages .....	3
1-	Définition des bactériophages .....	3
2-	Historique .....	3
3-	Structure et morphologie .....	3
4-	Classification .....	4
5-	Habitat .....	7
II.	Cycle de multiplication des bactériophages .....	8
1-	Cycle lytique (phage virulent) .....	8
2-	Cycle lysogénique (phage tempéré) .....	9
3-	Les autres cycles .....	10
3.1-	Cycle chronique (phages filamenteux).....	10
3.2-	Cycle pseudolysogénique .....	10
III.	Applications et utilisations technologiques des bactériophages.....	11
1-	La phagothérapie .....	12
1.1-	Définition de la phagothérapie .....	12
1.2-	Brève histoire de la phagothérapie .....	12
1.3-	Principe d'utilisation de la phagothérapie.....	13
1.4-	Relation phages-antibiotiques .....	13
1.5-	Résistance bactérienne au bactériophage .....	14
1.6-	Phagothérapie vs Antibiothérapie .....	14
1.7-	Phagothérapie pour quelles infections.....	16
2-	Autres applications .....	17
2.1-	Médecine vétérinaire.....	17
2.2-	Destruction des biofilms .....	17

2.3- Biologie moléculaire .....	19
2.4- Typage phagique .....	21
2.5- Agriculture / protection des cultures .....	22
2.6- La sécurité alimentaire .....	23
2.7- Protection des animaux d'élevage et des abeilles.....	24
2.8- Applications environnementales .....	24

## **Matériel et Méthodes**

I. Matériel biologique .....	25
1. Le repiquage des souches .....	25
2. Culture des bactéries.....	26
3. Identification des bactéries par coloration de Gram.....	26
II. Méthodes expérimentales .....	28
1. Prélèvement d'échantillon .....	28
2. Isolement des bactériophages .....	29
2.1- Filtration.....	31
3. Formation d'un tapis bactérien : double couche d'agar .....	33
3.1 Titration des phages .....	33
4. Détermination de l'efficacité antibactérienne.....	34
4.1- Spot test.....	34
4.2- Antibiogramme.....	35
4.3- Combinaison phage-ATB.....	35
III. Conservation des phages .....	35

## **Résultats et Discussion**

I. Résultats .....	38
1. Culture des bactéries.....	38
2. Résultat de filtration .....	39
II. Discussion .....	40
Conclusion.....	42

## **Références bibliographiques**

**Annexe**

**Résumé**

**Abstract**

**المخلص**

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Structure d'un bactériophage.....	4
<b>Figure 2:</b> Principales familles des bactériophages selon ICTV (a-Siphoviridae b-Podoviridae c-Filamentous phage) .....	5
<b>Figure 3:</b> Etapes de cycle lytique d'un bactériophage. ....	9
<b>Figure 4:</b> Cycle lysogène .....	10
<b>Figure 5:</b> Cycles chronique et pseudolysogénique d'un bactériophage .....	11
<b>Figure 6:</b> Phénomène de « Synergie Phages-Antibiotique » : à gauche présence des antibiotiques seulement, à droite présence de couple phages-antibiotiques.....	14
<b>Figure 7:</b> Etapes de la destruction du biofilm par des bactériophages .....	18
<b>Figure 8:</b> Destruction du biofilm par un bactériophage.....	19
<b>Figure 9:</b> Applications des vaccins à base de phages. ....	21
<b>Figure 10:</b> Identification d'une lyse bactérienne par lysotypie.....	21
<b>Figure 11:</b> Souches bactériennes utilisées. ....	25
<b>Figure 12:</b> Réalisation de l'ensemencement. ....	25
<b>Figure 13:</b> Etapes d'une réalisation du frottis. ....	27
<b>Figure 14:</b> Situation de la station d'épuration de Guelma .....	28
<b>Figure 15:</b> Protocole suivi pour l'étude des bactériophages. ....	30
<b>Figure 16:</b> Système de filtration. ....	31
<b>Figure 17:</b> Formation de double couche utilisée. ....	33
<b>Figure 18:</b> Etapes de conservation des phages à basse température avec le glycérol à 15% .....	36
<b>Figure 19:</b> Filtrats obtenus des échantillons. ....	39

## Liste de tableaux

<b>Tableau 1:</b> Classification des virus bactériens selon Ackermann .....	6
<b>Tableau 2:</b> Avantages et inconvénients comparés de la phagothérapie et de l'antibiothérapie .....	15
<b>Tableau 3:</b> Agents pathogènes causant la perte de la production alimentaire lutter par les bactériophages .....	23
<b>Tableau 4:</b> Milieux spécifiques des souches pathogènes étudiées. ....	26
<b>Tableau 5:</b> Examen de coloration de Gram. ....	27
<b>Tableau 6:</b> Trois prélèvements effectués périodiquement.....	29
<b>Tableau 7:</b> Méthodes suivies pour l'obtention des phages isolés. ....	31
<b>Tableau 8:</b> Résultats macroscopie et microscopique des bactéries. ....	38

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**ADNsb** : Acide désoxyribonucléique simple brin.

**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché.

**ARN** : Acide ribonucléique.

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger.

**ATB** : Antibiotique.

**BMR** : Bactérie multirésistante.

**FDA** : Food and Drug Administration.

**GN** : Gélose Nutritive.

**ICTV** : International Committee on Taxonomy of Viruses.

**KLp** : *Klebsiella pneumoniae*.

**LB** : Luria-Bertani

**MH** : Muller-Hinton.

**ng** : nanogramme.

**OMS** : Organisation mondiale de la santé.

**PAS** : Phage-antibiotique synergy.

**R** : Résistance.

**RVB** : Rapport du virus sur bactérie.

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

**SM** : Sodium-Magnésium.

**Tr/min** : Tour, par minute.

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

**UV** :Ultraviolet.



# **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 des antibiotiques en usages cliniques et agricoles au milieu des années 40, 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 raisonnée des antibiotiques sachant que les BMR sont des bactéries résistantes à un ou plusieurs antibiotiques (**Dennessen 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 maladie infectieuse (**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 20ème siècle en France (**Debarbieux, 2008**). Les bactériophages sont présents et actifs dans la nature ce qui les rend facile à isoler et utiliser (**Massali and Bouaninba, 2016**).

En Algérie, il y avait très peu d'études en Constantine sur l'isolement des bactériophages à partir du sol ou des eaux usées; mais au niveau de notre département aucune recherche n'a été réalisée sur les bactériophages ce qui mérite d'avoir plus d'attention vu leur importance.

L'objectif primordial de notre recherche de fin d'étude était d'isoler les bactériophages à partir des eaux usées et des boues, de les appliquer sur des bactéries multirésistantes et

enfin de chercher le meilleur moyen pour assurer leur conservation en vue d'amples études sur leurs propriétés antigéniques et médicales.

Notre travail est structuré en 3 parties : la première partie comporte la recherche bibliographique dans laquelle nous parlerons sur les généralités des bactériophages et leurs applications dans différents domaines. Dans la seconde, nous décrirons les méthodes suivies et le matériel utilisé au cours de la réalisation de ce travail. La troisième partie présentera les principaux résultats et leur discussion.



# **Revue bibliographique**

## I. Généralités sur les bactériophages

### 1- Définition des bactériophages

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, 2017) et les archées (Ye et al., 2019) et n'ont pas d'impact sur les tissus humains (Hamzeh, 2014).

### 2- Historique

Il y a environ 100 ans, l'existence des virus qui infectent et détruisent spécifiquement les bactéries a été découverte et rapportée dans la littérature scientifique. Ces virus sont maintenant connus sous le nom de bactériophages (Vandamme and Mortelmans, 2019).

Les bactériophages ont été découverts deux fois au début du 20<sup>ème</sup> siècle (Ackermann, 2003). Les deux principaux contributeurs à cette découverte ont été Frederick Twort qui décrit en 1915 la transformation vitreuse des colonies de «*Micrococcus*» par un agent transmissible et n'a pas pleinement reconnu la nature des propriétés virales observées. En 1917, la lyse des cultures de «*Shigella*» dans un bouillon a été observée par Félix D'Hérelle contrairement au Twort, a caractérisé la nature particulière des bactériophages en partie grâce au test de plaque qu'il a mis au point, largement utilisé de nos jours (Ackermann, 2003; Poxleitner et al., 2018).

### 3- Structure et morphologie

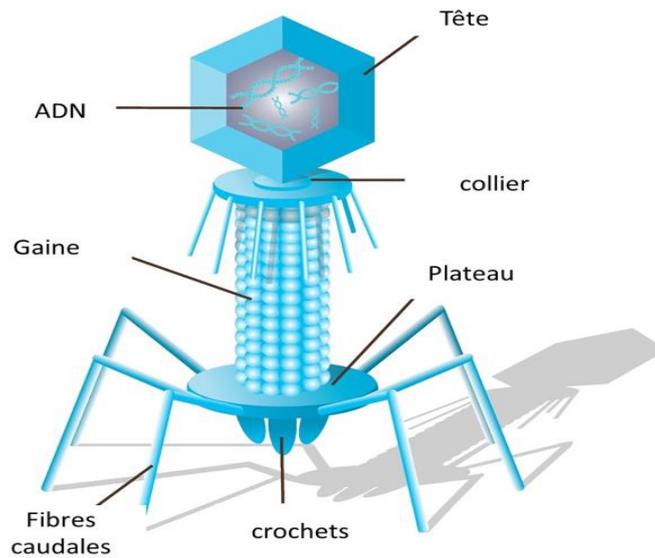
Les bactériophages sont de taille beaucoup plus petite que les bactéries, en générale leur taille varie de 20 à 300 nm. Ce sont des particules visibles uniquement au microscope électronique grâce à l'utilisation de la coloration négative (Massali and Bouaninba, 2016; Bouslamti, 1989).

Les bactériophages possèdent tous la même structure générale (fig. 1) (St-Pierre-Lemieux, 2014) relativement simple composée de protéines (60%) qui encapsulent le génome (40%) (Ye et al., 2019) :

❖ Acide nucléique porteur de l'information génétique sous la forme d'un ADN ou ARN (Magin, 2019). Sachant que les phages à ARN sont plus stables que les phages à ADN (Pierre-Collet, 2010).

❖ Capsule de protéine appelée capside permet au bactériophage de protéger son code génétique contre le milieu et de faciliter l'entrée dans l'hôte (**St-Pierre-Lemieux, 2014**).

❖ 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 and Halimi, 2014**).



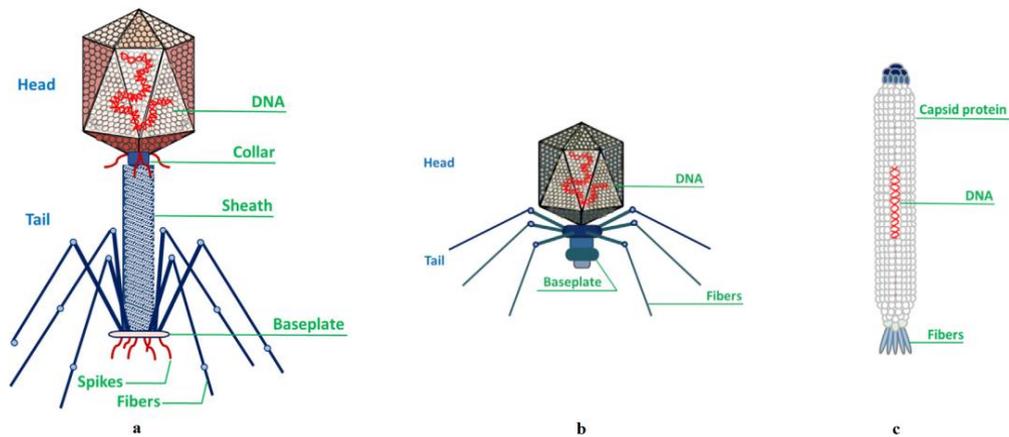
**Figure 1 :** Structure d'un bactériophage (**Morgane, 2019**).

#### 4- Classification

Les bactériophages présentent une grande diversité (**Kolenda, 2019**) dont la classification est basée sur la structure des bactériophages (**Errafyg, 2016**). Les critères de classification sont :

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

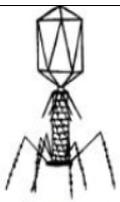
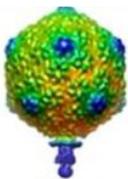
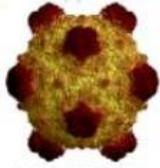
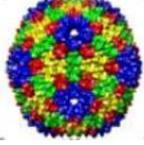
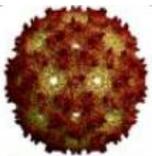
Plus de 5000 bactériophages ont été analysés et ces derniers sont classés (**Barrette, 2015**) en Siphoviridae, Podoviridae, Myoviridae et phages filamenteux selon l'ICTV (« International Committee on Taxonomy of Viruses ») comme le montre la **figure 2** (**Ye et al., 2019**).

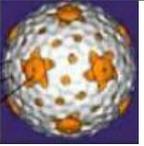


**Figure 2:** Principales familles des bactériophages selon ICTV (a-Siphoviridae b-Podoviridae c-Filamentous phage) (Ye et al., 2019).

On reconnaît un ordre, 13 familles et 31 genres chez les bactériophages. De manière générale, plus de 90% des phages ont un génome composé d'ADN double brin localisé dans une capsid ayant une géométrie icosaédrique et possédant une queue de format variable. Ils font partie de l'ordre des *Caudovirales*. Trois familles découlent des *Caudovirales* et sont définies par le type de fibre caudale (fibres formant la queue) présente sur le phage. Soixante pourcent des phages sont des *Siphoviridae* et possèdent une longue queue flexible, 25% sont des *Myoviridae* avec une queue contractile et 15% sont des *Podoviridae* et possèdent une courte queue. La morphologie et le type de génome (ADN ou ARN) des autres familles de bactériophages (10% restant), varie grandement (Tableau1) (Barrette, 2015).

**Tableau 1:** Classification des virus bactériens selon Ackermann (**Bourema and Halimi, 2014**)

Forme	Acide Nucléique	Famille	Nombre de genres/espèces	caractéristiques	Exemple	morphologie
Phages caudés, Capside 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	$\lambda$ , T5, HK97, SPPI	
		<i>Podoviridae</i>	4/771	Queue courte	T7, $\Phi$ 29, P22/L, Sf6	
Polyédrique	ADN Simple brin circulaire	<i>Microviridae</i>	4/40	Capsomères Visible, petite capside non enveloppée	$\Phi$ x174	
	ADN double brin circulaire	<i>Corticoviridae</i>	1/3	Capside contenant plusieurs couches lipidique	PM2	
	ADN double brin linéaire	<i>Tectiviridae</i>		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	Ø6, Ø12	
Filamenteux	ADN simple brin circulaire	<i>Inoviridae</i>	2/67	Filaments longs	M13,fd	
	ADN double brin linéaire	<i>Lipothrixviridae</i>	4/7	Tiges longues avec enveloppe lipoprotéiques	TTV1	
		<i>Rudiviridae</i>	1/3	Tiges droits 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		

## 5- Habitat

Les bactériophages sont les acteurs de vastes et nombreux écosystèmes dont l'étude est relativement récente. Il a été estimé que les bactériophages sont 10 fois plus nombreux que les bactéries partout où celles-ci sont présentes avec une estimation de  $10^{30}$ - $10^{32}$  phages (Dublanche, 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).

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

## II. 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% (Bergeron, 2006; Errafyg, 2016) et pseudo-lysogénique (Magin, 2019).

### 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. 3);

**1.1- Adsorption :** au cours de laquelle le phage reconnaît la cellule hôte bactérienne et se fixe au surface à l'aide des fibres de la queue (fig. 3, étape1);

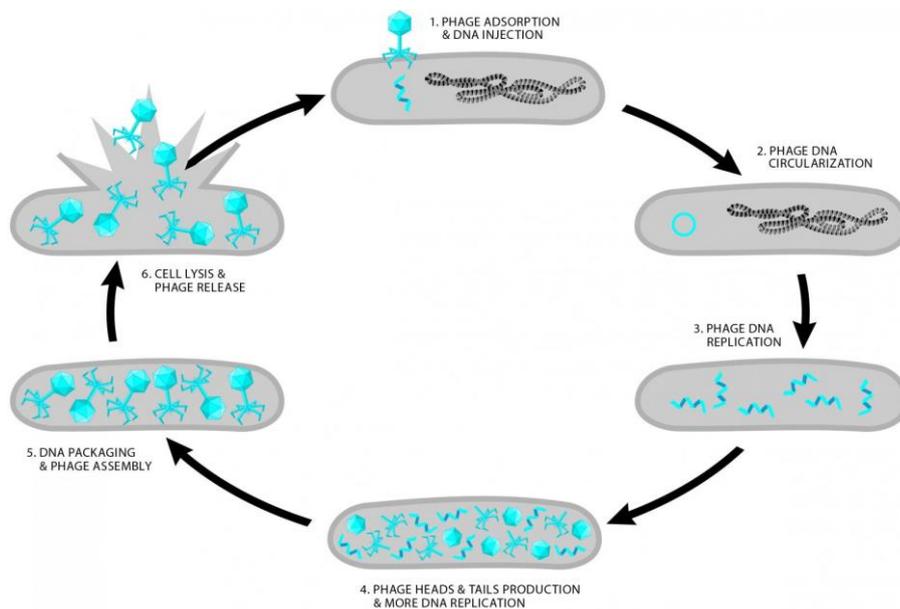
**1.2- Injection :** l'ADN phagique est injecté dans la cellule hôte tandis que la structure protéique du phage (tête et queue) reste attachée à l'extérieur de la cellule. L'ADN du phage passe de la tête à la queue en passant par la paroi cellulaire et la membrane cellulaire de l'hôte jusqu'au cytoplasme (fig. 3, étape1). 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 (fig. 3, étape2);

**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 polymérase 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 (fig. 3, Etapes3et4);

**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. 3, étape5);

**1.5- Lyse cellulaire :** se produit lorsque des enzymes codées par un phage dégradent la paroi cellulaire et la rupture de la membrane cellulaire. Une seule cellule

infectée peut produire 100 particules de phage ou plus lors de la lyse (**fig. 3, étape6**) (**Poxleitner et al., 2018**).



**Figure 3** : Etapes de cycle lytique d'un bactériophage (**Poxleitner et al., 2018**).

## 2- Cycle lysogénique (phage tempéré)

Certains phages ont la possibilité de choisir un cycle de vie différent nommé « cycle lysogène » (**fig. 4**) qui diffèrent 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 and Halimi, 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 (**Dublanchet, 2017**).

Toutefois, il semblerait que les cycles lytiques prédomineraient sur les cycles lysogéniques dans la majorité des écosystèmes (**Bourema and Halimi, 2014**).

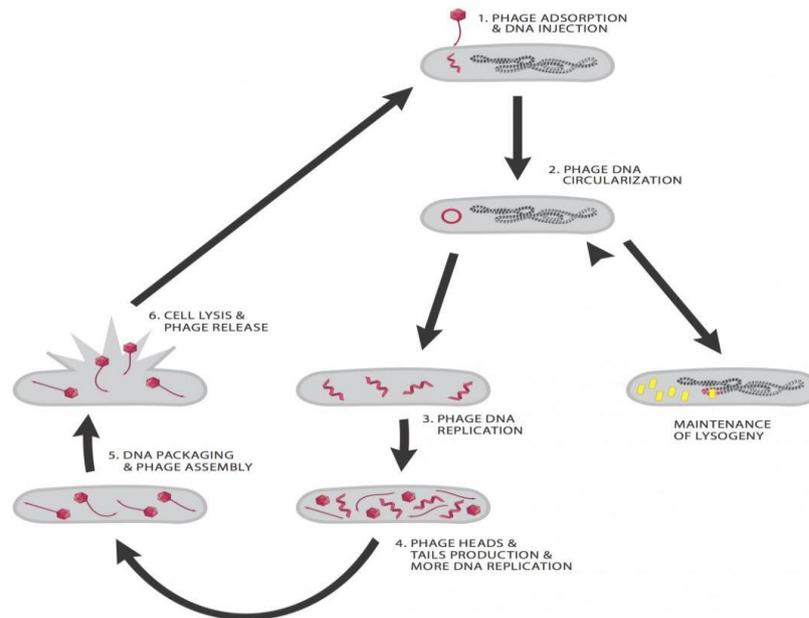


Figure 4: Cycle lysogène (Poxleitner *et al.*, 2018).

### 3- Les autres cycles

#### 3.1- Cycle chronique (phages filamenteux)

Le cycle chronique n'a été décrit que pour une espèce de phages, les phages M13 du genre *inovirus*. La bactérie est alors préservée de la lyse et reste porteuse de façon chronique du génome phagique (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).

Lors de ce cycle, le phage se fixe sur la membrane de la bactérie à partir du pili sexuel bactérien et injecte son ADN à l'intérieur de la cellule hôte. Cet ADN est converti en double brin puis répliqué et transcrit en ARNm dont il est traduit en protéines de la capsid virale (Errafyg, 2016). En effet, la libération de nouveaux virions se fait par bourgeonnement (Magin, 2019) ou extrusion et les cellules infectées continuent de se diviser, transmettant le virus à la descendance (fig. 5) (Dufour *et al.*, 2016).

Cette invasion ne détruit généralement pas les bactéries et n'est donc pas intéressante en ce qui concerne la phagothérapie (Errafyg, 2016).

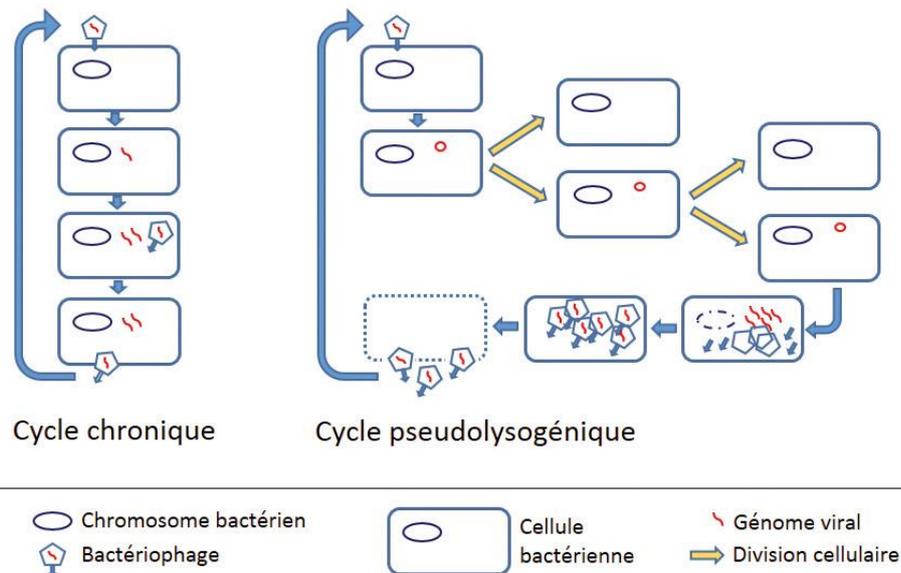
#### 3.2- Cycle pseudolysogénique

Un autre état de répllication 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

(**Bacteriophage.news, 2020a**) qui peut être interprété comme un état de non choix entre un cycle lytique et un cycle lysogénique (**fig. 5**) (**Dufour et al., 2016**).

Après son injection, le matériel génétique viral reste sous forme extrachromosomique libre dans la cellule hôte, à la manière d'un plasmide. Sa transmission à la descendance est en général asymétrique car il n'est pas répliqué : seule une des cellules filles en hérite, dans certains cas elle peut être perdue lors de la division cellulaire (**Dufour et al., 2016**; **Jaomanjaka, 2014**).

Souvent observée lors de conditions de croissance défavorables pour l'hôte, un manque de nutriments ou un stress chimique par exemple, la pseudolysogénie peut s'étendre sur plusieurs générations ou cesser, conduisant soit à l'immobilisation par intégration dans le chromosome bactérien, soit à la dispersion via un cycle lytique (**Dufour et al., 2016**).



**Figure 5:** Cycles chronique et pseudolysogénique d'un bactériophage (**Dufour et al., 2016**).

### III.Applications et utilisations technologiques des bactériophages

La recherche fondamentale qui utilise les nouvelles technologies de la biologie moléculaire concernant les bactériophages a découvert de nouvelles propriétés qui ont à leur tour ouvert la porte à de nombreuses applications pratiques (**Dublanchet, 2017**) comme agent de bio-contrôle, en réponse aux bactéries devenant multirésistantes, nombreuses sont les questions concernant les modalités de leur utilisation, de leur

production et mise sur le marché ainsi que les impacts et risques environnementaux pouvant émergés de ces nouvelles alternatives (**Magin, 2019**).

## **1- La phagothérapie**

Aujourd'hui toutes les maladies infectieuses ne sont pas bien contrôlées par les médicaments actuels en raison de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques et au manque de moyens thérapeutiques qui ont ramené sur le devant de la scène une thérapeutique ancienne (**Morgane, 2019; Ravat et al., 2015**).

C'est pourquoi il y a une réutilisation des bactériophages qui semblent être un moyen prometteur et guérisseur de contrer ce problème (**Morgane, 2019**).

### **1.1- Définition de la phagothérapie**

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 (**Dublanchet, 2017**).

### **1.2- Brève histoire de la phagothérapie**

Au début du XXe siècle, il y avait peu de médicaments capables de combattre les infections bactériennes qui faisaient alors de très nombreuses victimes. Avant que les antibiotiques soient découverts et utilisés pour traiter les infections bactériennes la phagothérapie ait connu un intérêt mondial important. Son histoire s'étend essentiellement sur deux décennies entre les deux grandes guerres mondiales. Malgré que ce traitement ait une importance, il y avait des controverses qui se développèrent. Dans les années 1940, le monde avait connu la naissance d'une nouvelle molécule qu'était la pénicilline et les améliorations de la phagothérapie n'étaient plus d'actualité. Le développement rapide de l'antibiothérapie après sa découverte laissait penser que le contrôle des maladies infectieuses et les progrès de la médecine étaient incontestables. La phagothérapie connu un déclin. Parallèlement, la recherche fondamentale sur les bactériophages se développa de manière exponentielle jusqu'à permettre l'essor d'une discipline autonome, la biologie moléculaire (**Dublanchet and Fruciano, 2008**).

### **1.3- 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).

### **1.4- Relation phages-antibiotiques**

Les bactériophages et les antibiotiques ont une action commune, à savoir le contrôle et/ou l'éradication d'une bactérie pathogène. Leur mode d'action respectif est par contre radicalement différent. Des études récentes proposent la phagothérapie comme alternative à l'antibiothérapie, lorsque celle-ci est devenue inefficace. Certains travaux tendent à montrer que l'association de l'antibiothérapie et de la phagothérapie a d'intérêts cliniques bénéfiques. Dans un premier temps, la phagothérapie agit sur le foyer infectieux actif. Dans un second temps, l'antibiothérapie intervient sur un faible inoculum. Il a été montré que l'addition à des cultures bactériennes de faibles doses d'antibiotiques, qui bloquent la division cellulaire et induisent la formation de filaments augmente significativement la production phagique. Ce phénomène est appelé la « synergie phages-antibiotiques » (PAS) (fig. 6) (Errafyg, 2016).



**Figure 6:** Phénomène de « Synergie Phages-Antibiotique » : à gauche présence des antibiotiques seulement, à droite présence de couple phages-antibiotiques (Errafyg, 2016).

L'administration conjointe de phages et d'antibiotiques a montré une efficacité thérapeutique supérieure à celle de chacun des traitements pris individuellement (Errafyg, 2016).

Dans le cadre de la phagothérapie, des traitements mixtes d'antibiotiques et de phages pourraient permettre une élimination plus efficace des bactéries pathogènes (Errafyg, 2016).

### 1.5- Résistance bactérienne au bactériophage

Comme avec les antibiotiques, les bactéries sont capables de devenir résistantes aux phages (Dufour and 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 (Dublanche, 2014).

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).

### 1.6- Phagothérapie vs Antibiothérapie

Bien qu'il soit de moins en moins justifié de considérer uniquement la phagothérapie comme une simple solution de remplacement de l'antibiothérapie, il est légitime de

comparer leurs avantages et inconvénients puisque ces deux traitements ont la même finalité, combattre les maladies infectieuses bactériennes (**Tableau 2**) (**Dublanchet, 2014**).

**Tableau 2:** Avantages et inconvénients comparés de la phagothérapie et de l'antibiothérapie (**Dublanchet, 2014**).

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

	phages (« cocktail »). 2. Les phages restent actifs sur les bactéries R aux ATB et ne les sélectionnent pas.	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.

### 1.7- Phagothérapie pour quelles infections

La majorité des infections bactériennes quelle soit leur localisation pourraient être traitées par les bactériophages (**Dublanchet, 2017**). Cependant, les phages sont incapables de pénétrer au sein des cellules eucaryotes, il n'existe actuellement aucun recours pour les infections causées par des germes dont le développement est obligatoirement intracellulaire. L'encapsulation des phages dans des liposomes facilite le franchissement de la membrane plasmique et permet de surmonter cette restriction. De même, les infections neuroméningées et les infections plurimicrobiennes ne semblent pas constituer des cibles pertinentes face au problème de la diffusion du virus « bactériophage » vers le système nerveux central et à celui de la couverture simultanée de plusieurs espèces bactériennes. D'autre part, le traitement des infections banales comme les pneumonies, les infections

des voies urinaires supérieures ou inférieures, les infections ostéo-articulaires ainsi que les suppurations superficielles ou profondes ne posent pas de problème conceptuel en ce qui concerne la phagothérapie (**Dufour and Debarbieux, 2017**). Mais malheureusement, les recommandations de l'organisation mondiale de la santé (OMS) concernant les approches possibles sur les bactéries résistantes ou super-bactéries ne contiennent aucune mention des bactériophages (**Bacteriophage.news, 2020b**).

## 2- Autres applications

### 2.1- Médecine vétérinaire

La thérapie phagique est utilisée en science vétérinaire depuis le début du 20<sup>e</sup> siècle. En 1919, les phages ont été utilisés pour la première fois en France contre la fièvre typhoïde des oiseaux (**Gazeev, 2018**).

Des études ont principalement porté sur différents types de pathogènes tels que : *Salmonella* et *E.coli*... (**Saussereau, 2012**)

- L'utilisation des bactériophages isolés à partir du poulet infecté par *Salmonella* a permis de réduire la mortalité et la colonisation intestinale chez le poulet et a montré une efficacité contre ce pathogène ;
- Contre les différentes infections à *E.coli* ; l'administration orale des bactériophages efficaces a permis une élimination plus rapide de la bactérie dans l'intestin ou une réduction du nombre de bactéries présentes dans les fèces et/ ou les intestins chez les souris, moutons et de bovins ;
- Chez les souris ; l'utilisation des bactériophages semble adaptée pour : la guérison des blessures, réduire les lésions pulmonaires et la diminution de la charge bactérienne pulmonaire due aux infections à *Pseudomonas aeruginosa* (**Saussereau, 2012**).

### 2.2- Destruction des biofilms

#### \* Rappel du biofilm

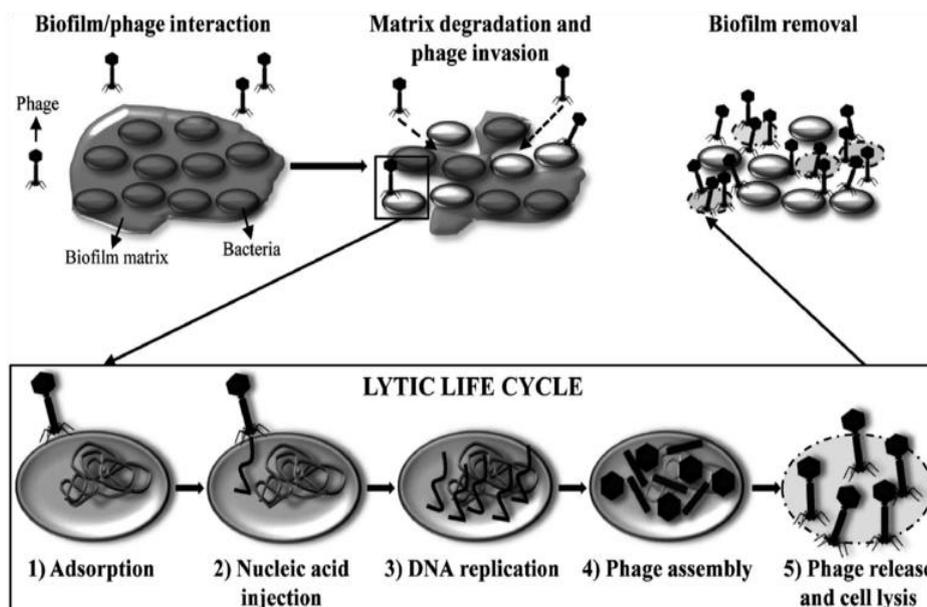
Un biofilm est une communauté de micro-organismes (bactéries, champignons, ...) généralement symbiotiques, ou d'une seule espèce d'un micro-organisme, adhérant à une paroi et protégée du milieu extérieur par la sécrétion d'une matrice polymère (**Berger Savin, 2014**).

Les bactéries qui font partie communiquent entre elles par Quorum Sensing (des signaux moléculaires dits 'auto-inducteurs' pour la communication des bactéries quand un

nombre suffisant est atteint) pour changer de physiologie au moment de leur fixation et devenir plus résistantes aux agressions extérieures (antiseptiques, antibiotiques, UV...) (Dublanche, 2017).

En 1956, deux chercheurs «Adams et Park» ont pour la première fois observé l'efficacité des phages sur les biofilms (Dublanche and Patey, 2011) par leurs enzymes qui ont la capacité de dégrader les exo-polysaccharides des biofilms, les rendant alors plus perméables et empêchant leur développement. Par contre, l'effet des phages sur les biofilms déjà formés est plutôt faible parce que les phages sont très spécifiques quant aux récepteurs bactériens avec lesquels ils interagissent et si ces derniers ont été modifiés en raison de la formation du biofilm, ils ne pourront pas infecter les bactéries présentes dans le biofilm (fig. 7) (Barrette, 2015).

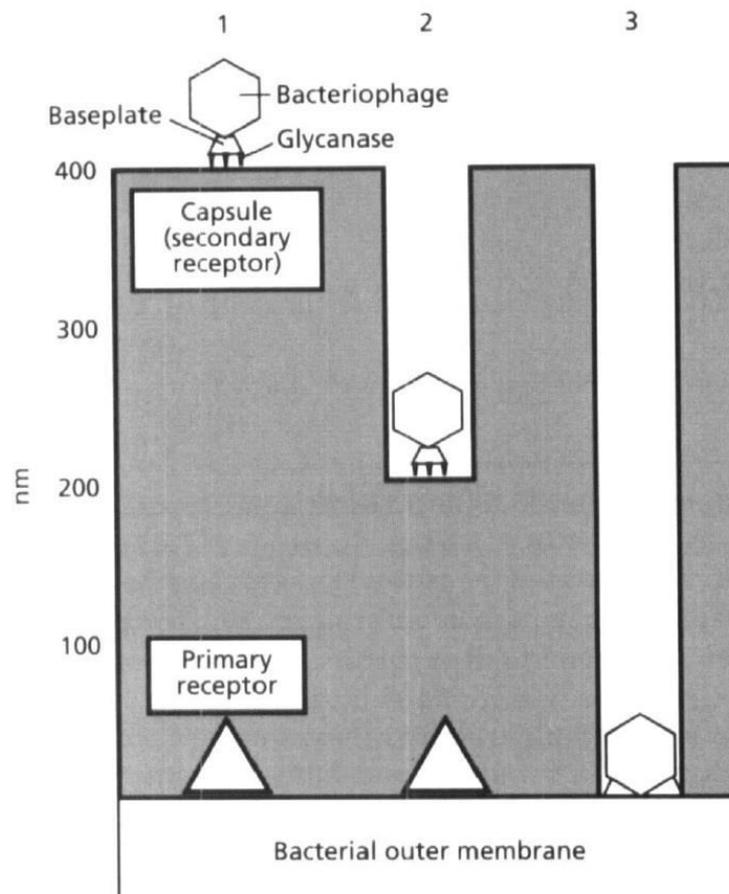
Pour atteindre les bactéries cachées dans un biofilm, certains bactériophages produisent des dépolymérase qui leur permettent, par dissolution de ces biofilms de les lyser (Dublanche, 2017).



**Figure 7:** Etapes de la destruction du biofilm par des bactériophages (Gutiérrez et al., 2016)

D'après l'équipe de Hughes en 1998, un mécanisme (fig. 8) a été remarqué concernant l'accrochage du phage à une molécule située à la surface de la capsule polysaccharidique dite «récepteur secondaire », permettant au phage d'amorcer sa traversée de la capsule mucoïde du biofilm par dégradation de cette capsule grâce à une glycanase et par la suite le

phage atteint la surface de la paroi bactérienne et se lie avec une molécule dite « récepteur primaire » (Hughes *et al.*, 1998).



**Figure 8:** Destruction du biofilm par un bactériophage (Hughes *et al.*, 1998).

### 2.3- Biologie moléculaire

Une technologie par des phages filamenteux « *Phage display* » a joué un rôle clé depuis 1985. C'est une technique où des peptides, des protéines ou des fragments d'anticorps sont exprimés à la surface des particules de phage (Lee *et al.*, 2013; Kiljunen, 2006).

*Phage display* a été largement utilisé, par exemple dans l'identification des récepteurs et de leurs ligands ou protéines qui modulent l'activité des récepteurs et l'isolement des anticorps recombinants. En plus des phages filamenteux, des systèmes d'affichage ont récemment été développés pour d'autres groupes de phages comme  $\lambda$ , MS2 et T7 (Kiljunen, 2006).

Les bactériophages ont joué un rôle primordial dans la biologie moléculaire moderne (**Dublanchet, 2008**) basée sur la recherche de nombreuses enzymes utilisées de nos jours en génie génétique *in vitro* d'origine phagique (**Kiljunen, 2006**).

Des exemples de telles enzymes sont l'ADN polymérase T4, la ligase et la polynucléotide kinase, qui sont vendues par la plupart des sociétés de biotechnologie. Des systèmes d'expression de gènes hétérologues basés sur l'ARN polymérase T7 sont également couramment utilisés. Une application plus récente est la recombinaison, c'est-à-dire l'utilisation de machines enzymatiques pour la recombinaison généralisée codée par des phages lambdaïdes. Ces enzymes catalysent la recombinaison homologue entre des séquences d'ADN ayant des homologies très courtes et fournissent une méthode de clonage moléculaire sans enzymes de restriction ni d'ADN ligase (**Kiljunen, 2006**).

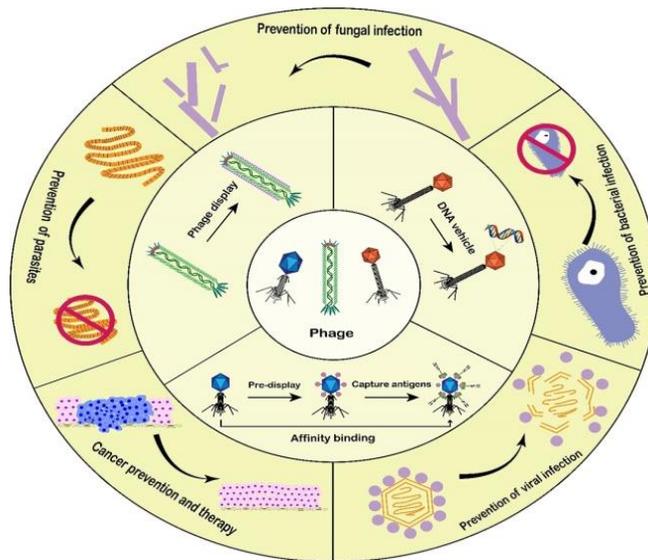
Ces dernières années, de nombreuses études ont été explorées sur l'utilisation des phages comme plateformes de nanomédecine pour développer des vaccins en raison de leurs caractéristiques biologiques uniques (**Bao et al., 2019**).

Les particules de phage entières peuvent être utilisées pour la conception de vaccins sous la forme de vaccins phagiques ou de vaccins à ADN de phage :

✓ Les vaccins phagiques sont les phages avec des antigènes peptidiques ou protéiques affichés génétiquement sur leurs surfaces ainsi que ceux avec des antigènes chimiquement conjugués ou biologiquement liés à leurs surfaces. Les phages peuvent ensuite délivrer les peptides ou les protéines immunogènes aux cellules ou tissus cibles ;

✓ Les vaccins à ADN phagique sont les gènes vaccinaux entraînés par un promoteur eucaryote insérés dans les génomes des phages, qui sont transportés par les phages vers les cellules cibles pour générer des antigènes. Les antigènes, soit en tant que peptides ou protéines immunogènes affichés sur les phages, soit en tant que produits exprimés à partir des gènes du vaccin, peuvent servir de vaccins pour susciter des réponses immunitaires pour la prévention et le traitement des maladies (**Bao et al., 2019**).

Les vaccins phagiques et les vaccins à ADN phagique promettent un brillant avenir pour le développement de vaccins (**fig. 9**) (**Bao et al., 2019**).



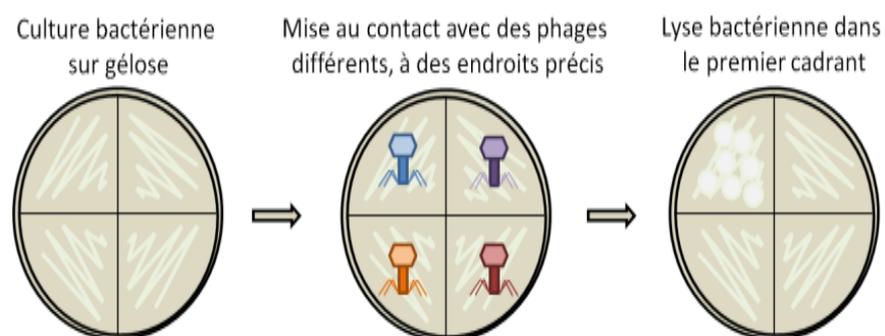
**Figure 9:** Applications des vaccins à base de phages (Bao *et al.*, 2019).

## 2.4- Typage phagique

### 2.4.1- Lysotypie

Terme inventé par Pierre Nicolle en 1950, la lysotypie est la plus ancienne méthode de sous typage permettant la caractérisation de différents bacilles, notamment ceux non agglutinables par la méthode du sérotypage, grâce à la lyse bactériophagique (Dien, 2018).

La sensibilité de la détection serait augmentée si les phages liés aux bactéries étaient détectés par des anticorps spécifiques. Pour la détection d'une souche bactérienne inconnue, sa pelouse est dotée de différents phages, et si la plaque (zones claires) apparaît, cela signifie que le phage a grandi et a lysé la cellule bactérienne, ce qui facilite l'identification de la souche bactérienne spécifique (fig. 10) (Haq *et al.*, 2012).



**Figure 10 :** Identification d'une lyse bactérienne par lysotypie (Dien, 2018).

#### 2.4.2- Autres méthodes du typage

Il existe certaines autres méthodes qui peuvent être employées pour détecter les bactéries pathogènes telles que :

- L'utilisation de phages qui peuvent fournir des gènes rapporteurs spécifiquement ou en utilisant une protéine fluorescente verte, qui s'exprimerait après une infection bactérienne ;
- De même, des phages ayant un colorant fluorescent attaché de manière covalente à leurs couches peuvent être utilisés pour détecter une adsorption spécifique ;
- La détection de certains des composants libérés tels que l'adénylate kinase après la lyse spécifique des bactéries et l'utilisation d'anticorps et de peptides affichés par les phages peuvent également être utilisés, qui se lieront spécifiquement aux toxines et aux agents pathogènes bactériens ;
- La technologie à double phage est une autre application des phages dans la détection des bactéries, dans laquelle les phages sont utilisés pour détecter la liaison d'anticorps à des antigènes spécifiques ;
- Le test d'amplification des phages peut également être utilisé pour détecter les bactéries pathogènes. La technique a été la plus largement utilisée pour la détection des espèces *Mycobacterium tuberculosis*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Listeria* et *Campylobacter* (Haq et al., 2012).

#### 2.5- Agriculture / protection des cultures

Outre les applications médicales / thérapeutiques, le contrôle basé sur les phages est désormais également utilisé dans les secteurs agro-alimentaire et environnemental, pour protéger les aliments (légumes, fruits, viande, poisson), les fleurs et l'eau contre la détérioration bactérienne ou contamination (phyto) pathogène. Les phages peuvent également être exploités dans l'agriculture, l'horticulture et la protection des cultures pour lutter contre les bactéries phytopathogènes telles que *Xanthomonas citri*, *Agrobacterium sp.*, et *Erwinia mylovora* ...etc. Des phages ciblant les phytopathogènes contre les maladies bactériennes en décomposition chez la pomme de terre, le poireau, le chou-fleur et d'autres cultures sont également en cours de développement (Vandamme and Mortelmans, 2019).

## 2.6- La sécurité alimentaire

Les pulvérisations phagiques sont en cours de développement en tant que traitement prophylactique des œufs, de la volaille, de la viande, du poisson, du fromage et des produits alimentaires généraux, et des systèmes d'approvisionnement en eau dans l'industrie alimentaire pour lutter contre la contamination causée par *E. coli*, *Salmonella*, *Shewanella*, *Campylobacter*, *Listeria* et *Legionella*... Ce bio-traitement préventif des phages approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) suscite désormais un intérêt accru de la part des microbiologistes alimentaires, ainsi que des technologues alimentaires (**Vandamme and Mortelmans, 2019**).

Le bio-contrôle médié par les phages a été appliqué avec succès contre de nombreux agents pathogènes qui entraînent des pertes économiques dans la production alimentaire. Les phages infectent les bactéries qui causent des pertes importantes dans tous ces domaines de l'alimentation et de l'agriculture (**Tableau 3**). Ils ont le potentiel d'améliorer la sécurité alimentaire et les rendements agricoles (**Harada et al., 2018**).

**Tableau 3** : Agents pathogènes causant la perte de la production alimentaire lutter par les bactériophages (**Harada et al., 2018**).

Agents pathogènes	Perte de production alimentaire
<i>Aeromonas</i> spp	Poissons.
<i>Paenibacillus</i> larvae	Abeille.
<i>Xanthomonas pruni</i>	Pêches, choux et poivrons.
<i>Xanthomonas Campestris</i>	Tomates.
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	Champignons.
<i>Salmonella</i>	Produits de volaille, aliments transformés (fromage), melon et pomme fraîchement coupés, saucisses de Francfort, bœuf cru et cuit, tomates fraîches, germes de soja et lait au chocolat.
<i>Campylobacter</i>	Produits de volaille et bœuf.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Bœuf, melons, pommes, framboise, fromage à pâte molle, jambon cuit, filet

	de saumon, poisson-chat filets et poulet.
<i>Escherichia coli</i>	Volaille, agneau, mouton, bétail, bœuf viande, tomate, épinards, laitue et cantaloup.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bovins laitiers, lactosérum au lait cru, lait caillé, lait pasteurisé et fromage.
<i>Ralstoniasolanacearum</i>	Pomme de terre, tomate, aubergine, banane, gingembre, tabac, poivron, olive, soja.

### 2.7- Protection des animaux d'élevage et des abeilles

Le contrôle basé sur les phages a également été introduit dans les fermes et les espaces extérieurs de manière préventive pour empêcher les agents pathogènes des animaux de se propager et de provoquer des maladies. Les bactériophages peuvent également aider à contrôler directement ou indirectement les bactéries pathogènes des abeilles, les larves de *Paenibacillus* ou *Melissococcus plutonicus*, responsables de la maladie de la loque américaine ou européenne chez les abeilles, en infectant et tuant leurs larves et en provoquant l'effondrement des ruches entières. Le bio-contrôle indirect des phages est basé sur la formation de toxines bactéricides induites par les phages dans la ruche à l'aide de *Brevibacillus laterosporus* commensal, qui tue ensuite les cellules végétatives du pathogène, mais pas les endospores (Vandamme and Mortelmans, 2019).

### 2.8- Applications environnementales

Un exemple d'application environnementale où les phages pourraient potentiellement être utilisés est de lutter contre le pathogène marin bactérien *Thalassomonas loyana*, l'agent causal du blanchissement des coraux qui est répandu dans les régions océaniques chaudes. D'autres paramètres pour le contrôle par les phages sont le traitement des proliférations cyanobactériennes, la formation de biofilm et l'encrassement biologique des surfaces et des dispositifs médicaux et industriels (Vandamme and Mortelmans, 2019).



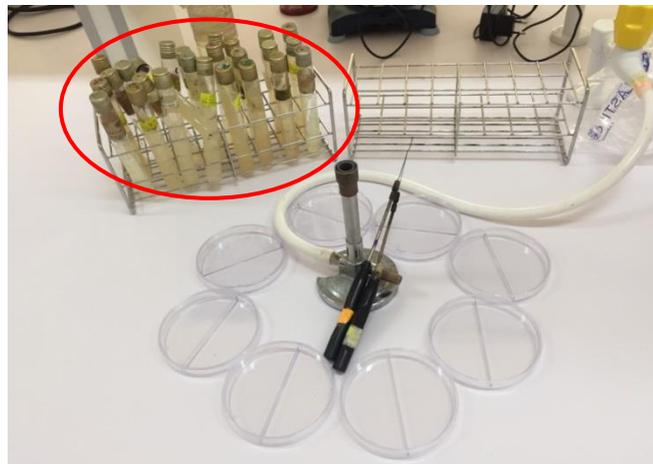
# **Matériel et Méthodes**

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie du département de biologie, université 8 Mai 1945 Guelma.

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 les appliquer sur les bactéries multirésistantes aux antibiotiques.

## **I. Matériel biologique**

Les souches bactériennes utilisées dans ce travail étaient isolées des prélèvements biologiques dans le cadre des projets PFE des années 2017,2018 et 2019 dirigés par Mme Khallef. Ces souches étaient conservées sur des milieux de géloses nutritives inclinés.



**Figure 11:** Souches bactériennes utilisées.

### **1. Le repiquage des souches**

Après la préparation de gélose nutritive (Annexe), les bactéries ont étéensemencées sur la GN par des stries séparées suivies d'une incubation à 37°C pendant 18h à 24h. Après ce temps d'incubation, le repiquage a été effectué pour bien séparer les souches.



**Figure 12:** Réalisation de l'ensemencement.

## 2. Culture des bactéries

Après le repiquage, l'ensemencement des bactéries par des stries larges sur les milieux spécifiques (**Tableau 4**) selon les espèces des souches obtenues a été réalisé.

**Tableau 4:** Milieux spécifiques des souches pathogènes étudiées.

Gram	Germe	Milieu de culture
Gram négatif Entérobactérie	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 16 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 1	Hektoène
	KLp 3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 2	
	<i>Entérobacter</i> 10	
	<i>Entérobacter</i> PPL 372	
	<i>Entérobacter</i> 1	Mac Conkey
	<i>Citrobacter</i>	
Gram négatif Non entérobactérie	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1	King A et King B
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 14	

\*Les chiffres associés correspondent aux indications trouvées sur les flacons de conservation préparés par des étudiants des promotions précédentes.

## 3. Identification des bactéries par coloration de Gram

L'identification morphologique des bactéries utilisées a été effectuée par des examens microscopiques après coloration de Gram (**Tableau 5**) (**Menidjel, 2017**). Avant passer à la coloration, un frottis a été préparé en suivant ces étapes :

- Déposer une goutte d'eau stérile sur une lame propre.

- Faire étaler avec une anse de platine ou une pipette pasteur une colonie bactérienne sur la goutte d'eau de façon circulaire.
- Réaliser le frottis par un doux étalement.
- Sécher et fixer le frottis devant un bec bunsen (Menidjel, 2017).



**Figure 13:** Etapes d'une réalisation du frottis.

**Tableau 5:** Examen de coloration de Gram.

Type d'examen	Méthode de l'examen
Examen direct à la coloration de Gram	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recouvrir le frottis avec le violet de gentiane pendant une minute.</li> <li>• Rincer avec l'eau de robinet</li> <li>• Recouvrir la lame avec du lugol pendant une minute.</li> <li>• Rincer à l'eau de robinet.</li> <li>• Verser l'alcool sur le frottis jusqu'à l'élimination du couleur.</li> <li>• Rincer à l'eau de robinet.</li> <li>• Ajouter la Fuschine pendant une minute</li> <li>• Rincer à l'eau de robinet</li> <li>• Laisser sécher la lame</li> <li>• Observer au microscope optique à l'objectif x 100 à l'aide d'huile à immersion de cèdre.</li> </ul>

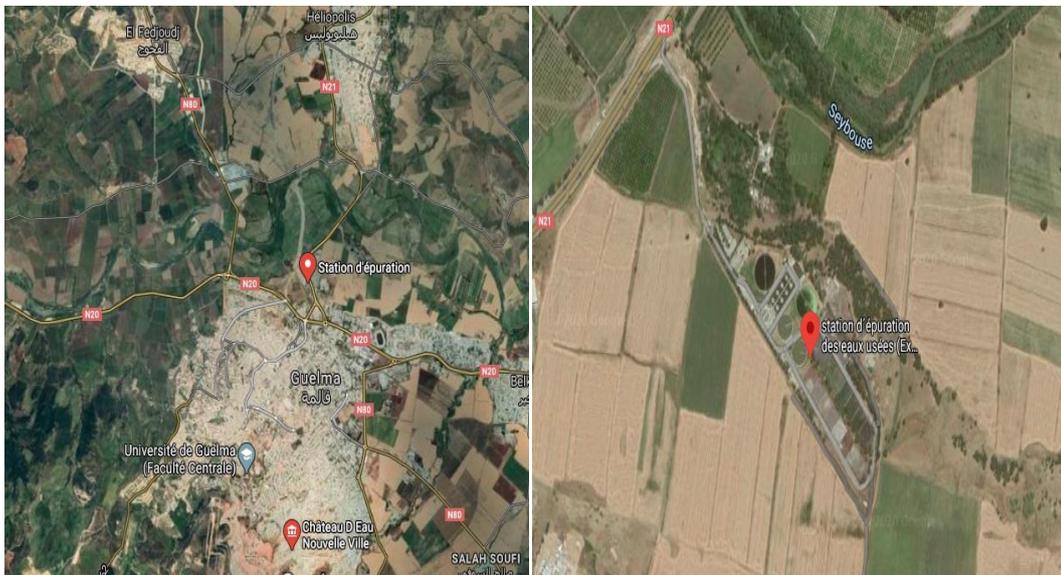
Après l'incubation des souches bactériennes dans leur milieu spécifiques, elles étaient prêtes à être utiliser avec les phages isolés.

## II. Méthodes expérimentales

L'eau et les boues résiduaires sont riches en bactériophages (Poxleitner et al., 2018).

### 1. Prélèvement d'échantillon

Le prélèvement a été effectué au niveau de la station d'épuration des eaux usées de la wilaya de Guelma qu'est fonctionnelle depuis le 28 Février 2008. La station est implantée sur un terrain agricole de 7.8 hectares à 01 kilomètre au nord de la wilaya sur la route nationale N° 21 près d'oued Seybouse (fig. 11) (Azzedine, 2016).



**Figure 14 :** Situation de la station d'épuration de Guelma (Google Earth,2020).

Trois prélèvements ont été réalisés à partir des eaux usées après déshuilage, boue liquide, boue semi-solide dans des conditions du jour (Tableau 5).

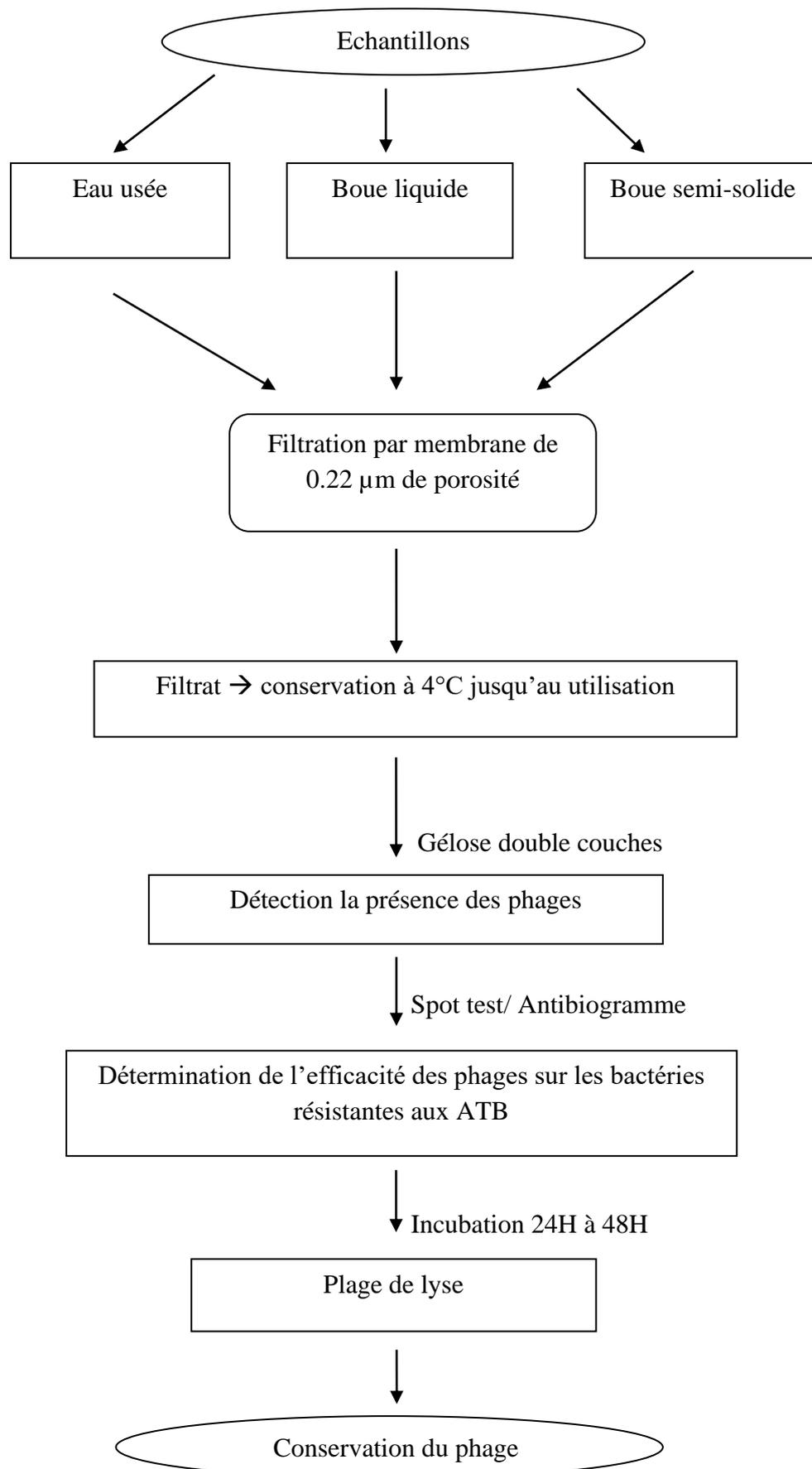
**Tableau 6:** Trois prélèvements effectués périodiquement.

Echantillon	Date	Heure	Température	Lieu de prélèvement
Eau usée	10.3.2020	10 :28	D'eau :14,8°C Du jour : 12°C	
Boue liquide	10.3.2020	11 :01	Du jour :12°C	
Boue semi-solide	10.3.2020	11 :03	Du jour : 12°C	

Notons que ces échantillons sont placés dans des flacons transparents stériles en verre en laissant environ 1/10 du volume total du flacon pour l'air et manipulés le même jour du prélèvement (**Massali and Bouaninba, 2016**).

## 2. Isolement des bactériophages

Dans notre travail, nous nous sommes appuyés sur plusieurs méthodes des études antérieures pour l'inférence d'un protocole modifié à suivre. La plupart des méthodes décrites dans cette section ont été élaborées chez SEA-PHAGES (**Poxleitner et al., 2018**).



**Figure 15 :** Protocole suivi pour l'étude des bactériophages.

## 2.1- 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, muni d'une pompe à vide (**fig. 13**) et en utilisant une membrane filtrante stérile de 0,22  $\mu\text{m}$  dont la taille des pores ne laisse pas passer les bactéries et peut retenir les débris cellulaires mais elle permet le passage des phages (**Massali and Bouaninba, 2016; Poxleitner et al., 2018**).



**Figure 16 :** Système de filtration.

**Tableau 7:** Méthodes suivies pour l'obtention des phages isolés.

Echantillon	Méthodes
Eaux usées	<p><b>Méthode 1 :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 100 ml d'eau usée a été filtrée directement par système de filtration sur membrane de porosité 0,22 <math>\mu\text{m}</math> (<b>Van Twest and Kropinski, 2009</b>).</li> </ul> <p><b>Méthode 2 :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 100 ml d'eau usée a été centrifugée dans des tubes de 15 ml à 4500 tr/min (<b>Bendaira and Brik, 2015</b>) pendant 10 min ;</li> <li>- Le surnageant a été filtré par un papier filtre 0,22 <math>\mu\text{m}</math> (<b>Van Twest and Kropinski, 2009</b>).</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Avant la filtration, l'échantillon devait être sédimenter environ</li> </ul>

Boue liquide	<p>2h.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 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 0,22µm (<b>Poxleitner et al., 2018</b>).</li> </ul>
Boue semi-solide	<p>Pour l'isolement des phages à partir du sol, on a essayé 2 méthodes :</p> <p><b>Méthode 1 :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 100 g de boue semi-solide a été utilisée et mise en suspension dans 200 ml de tampon SM (Annexe) qui était bien mélangée et restait au repos pendant 1-30h à 2h pour la sédimentation. Ensuite, on a récupéré le surnageant et on a fait la filtration de ce dernier en utilisant la membrane 0,22µm (<b>Massali and Bouaninba, 2016; Poxleitner et al., 2018</b>).</li> </ul> <p><b>Méthode 2 :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Une autre méthode a été effectuée à partir de 100g du sol mis dans des tubes coniques de 15 ml sachant que le volume ajouté de tampon SM est 3X de sol et vigoureusement agités dans incubateur à agitation environ 250 Tr/min pendant une nuit à température ambiante pour libérer les bactériophages putatifs du sol (<b>Poxleitner et al., 2018</b>).</li> <li>- Après ce temps les suspensions ont été brièvement centrifugées pendant 10 min à 4500 Tr/min (<b>Bendaira and Brik, 2015</b>) et les surnageants résultants ont été filtrés par la membrane 0,22µm (<b>Poxleitner et al., 2018</b>).</li> </ul>

Tous les filtrats résultants « suspensions phagiques » ont été conservés dans des bouteilles stériles en verre à 4°C jusqu'au moment d'utilisation (**Hamzeh, 2014**).

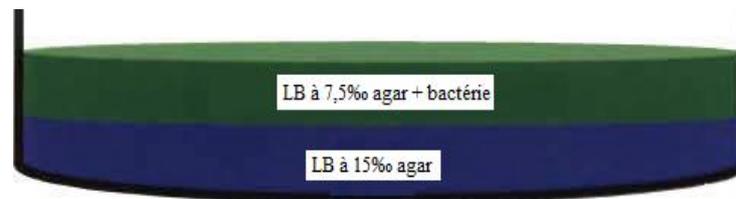
### 3. Formation d'un tapis bactérien : double couche d'agar

Nous avons choisi la technique de la double couche d'agar pour effectuer le test antibactérien avec les phages.

Comme le nom l'indique, la technique présente deux couches distinctes (**fig.14**) :

- ❖ La première couche est une couche nutritive dure de Luria-Bertani (LB) à 15‰ agar (Annexe) ;
- ❖ La deuxième couche est une couche composée de LB à 7.5‰ agar (Annexe) permet la formation d'une solution gélosée demi molle de LB ensuite les bactéries sont mélangées (**Hamzeh, 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 (**Adams, 1959; Hamzeh, 2014**).



**Figure 17** : Formation de double couche utilisée.

#### 3.1 Titration des phages

##### 3.1.1- Série de dilutions

Les phages produits ont une concentration élevée. Pour cela la méthode de dilution est une étape essentielle pour déterminer la concentration des phages, une série de 8 dilutions a été réalisée dans l'eau physiologique NaCl 0.9% ce qui signifie que la concentration de phage dans chaque tube est 8 fois inférieure à celle du tube précédent (**Hamzeh, 2014; Poxleitner et al., 2018**).

##### 3.1.2- Détermination du titre des phages

Pour connaître le titre d'un phage, en mélangeant 100 µl de la culture bactérienne en phase exponentielle tardive ou stationnaire précoce et 100 µl de chaque dilution successive des phages en laissant le mélange inactif 5 à 10 min pour la fixation puis en ajoutant 3 ml

de gélose LB demi molle. Chaque mélange a été coulé doucement mais rapidement sur les boîtes de Pétri contenant LB solide. Après solidification, les boîtes ont été mises dans un incubateur pendant 24 h à 37°C pour permettre l'apparition des plages de lyse en surface (**Martineau, 2010; Hamzeh, 2014; Poxleitner et al., 2018**).

Le lendemain, les plages de lyse ont été comptées, il faut idéalement que leur nombre soit compris entre 15 et 250 UFP/ml. La concentration du phage est calculée par les formules suivantes (**Martineau, 2010; Hamzeh, 2014**):

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

Ou :

$$\frac{\text{Nombre de phages}}{\text{Volume inoculé} \times 10^{-\text{dilution}}} = \text{UFP/ml}$$

#### 4. Détermination de l'efficacité antibactérienne

L'effet antibactérien de phage a été testé sur les bactéries cultivées en milieu solide gélosé en boîte de Pétri (**Hamzeh, 2014**).

Nous avons adopté deux stratégies pour effectuer le test antibactérien :

- ✓ L'ajout directement des phages sur le tapis bactérien ;
- ✓ La comparaison entre les phages et les antibiotiques en utilisant la méthode de diffusion pour ces derniers.

##### 4.1- Spot test

Spot test est un moyen rapide de vérifier si un échantillon de phage peut infecter une bactérie en plaçant une petite goutte ou tâche de phage sur une plaque inoculée avec la bactérie (**Poxleitner et al., 2018**).

Après la préparation de la pelouse bactérienne, 10 µl de chaque échantillon ont été versés. Après l'adsorption de liquide ajouté généralement en 15 min, les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 24h à 48h. Après l'incubation, les boîtes ont été contrôlées par l'apparition ou l'absence des zones claires (**Poxleitner et al., 2018**).

#### 4.2- Antibiogramme

L'antibiogramme est une étape très importante qui permet d'étudier la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes vis-à-vis d'un certain nombre d'antibiotique précis pour chaque type.

La méthode de diffusion classique de disques d'ATB sur gélose Muller Hinton (MH) qui est un milieu standardisé pour toutes les bactéries sauf quelques souches exigeantes a été appliquée (**Diallo and Kanté, 2019**).

Pour ce faire, après la préparation de l'inoculum qui a été ensemencé par écouvillonnage sur la gélose MH. Des disques chargés d'une dose connue d'ATB ont été déposés à la surface du gélose suivis d'une incubation à 37°C environ 18h à 24h. Après ce temps, les boîtes ont été vérifiées par l'apparition ou l'absence des zones d'inhibition (**Diallo and Kanté, 2019**).

#### 4.3- Combinaison phage-ATB

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

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

Pour réaliser cette étape, dans un premier temps la méthode de double couche d'agar déjà décrite ci-dessus à 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. Le lendemain, les boîtes ont été lues (**Comeau et al., 2007**).

### III. Conservation des phages

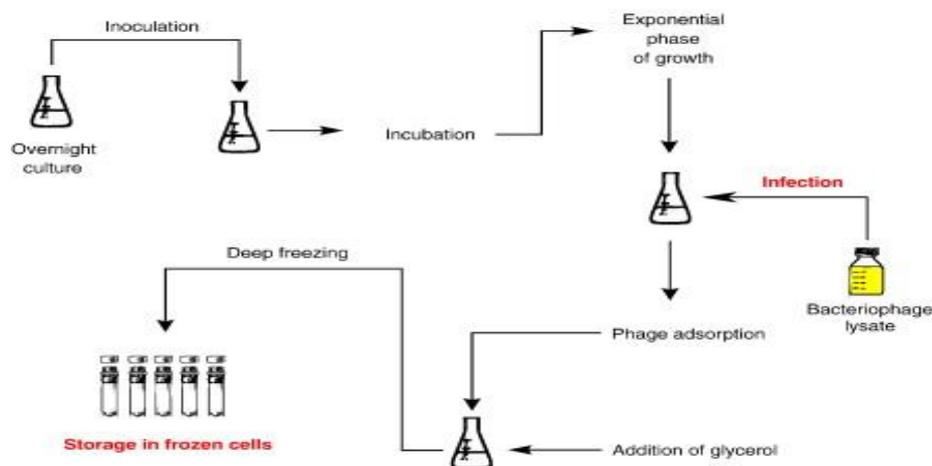
Le stockage des bactériophages est délicat car aucune méthode universelle et idéale n'a encore été décrite et les conditions de stockage peuvent différer d'un phage à l'autre. Les bactériophages sont généralement stockés sous forme de virion libre (**Alvi et al., 2018; Golec et al., 2011**).

L'utilisation extensive des bactériophages nécessite des méthodologies améliorées pour le stockage à long terme ainsi que pour une expédition facile (**González-Menéndez et al., 2018**).

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 l'azote liquide et enfin le stockage des phages séchés ou lyophilisés ont été utilisées dans différents laboratoires (**Golec et al., 2011**).

Parmi ces méthodes, le stockage à basse température (-20°C, -80°C, -196°C) en ajoutant un stabilisant comme le glycérol à 15%, le lait écrémé à 11%, 0,8M de saccharose... Pour réaliser cette méthode, il faut de préférence préparer une culture de nuit, les souches de cette culture devaient être en phase exponentielle tardive ou stationnaire précoce et ont été infectées par des lysats de phage dont ces derniers ont été mélangés avec un stabilisant ici c'était le glycérol à 15%. Les flacons de cryoconservation ont été conservés à une basse température (-20°C) (**González-Menéndez et al., 2018**).

Le schéma ci-dessous résume les étapes de cette méthode.



**Figure 18:** Etapes de conservation des phages à basse température avec le glycérol à 15% (**Golec et al., 2011**).

Dans notre étude, la conservation des bactériophages en bouillon LB (Annexe) à 4°C a été appliquée car le stockage à cette dernière pourrait être le plus efficace à long terme avec le moins d'impact sur l'infectiosité des virions. C'était le moyen le plus simple et le plus rentable (**González-Menéndez et al., 2018**).

Après la détermination du titre phagique déjà décrit ci-dessus, 1 ml de chaque échantillon sans glycérol a été stocké dans des tubes Eppendorf à 4°C pendant 12 mois (**González-Menéndez et al., 2018**).



# **Résultats**

## **Et**

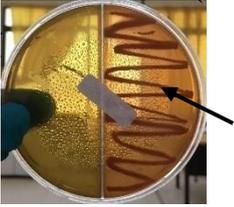
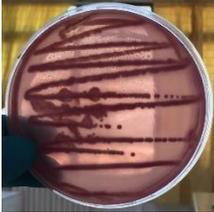
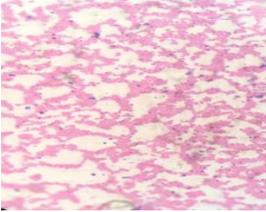
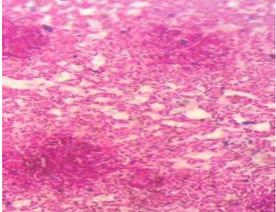
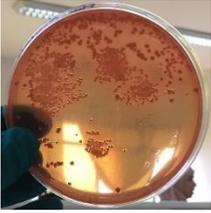
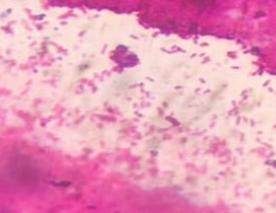
# **Discussion**

## I. Résultats

### 1. Culture des bactéries

Les résultats de la culture bactérienne présentés dans le **tableau 8** ont montré l'aspect macroscopique qui signifie la croissance des bactéries sur les milieux spécifiques et l'identification par la coloration de Gram a présenté la morphologie et le Gram des bactéries, la forme et le regroupement des bactéries étudiées afin de vérifier leur pureté après un long moment de conservation.

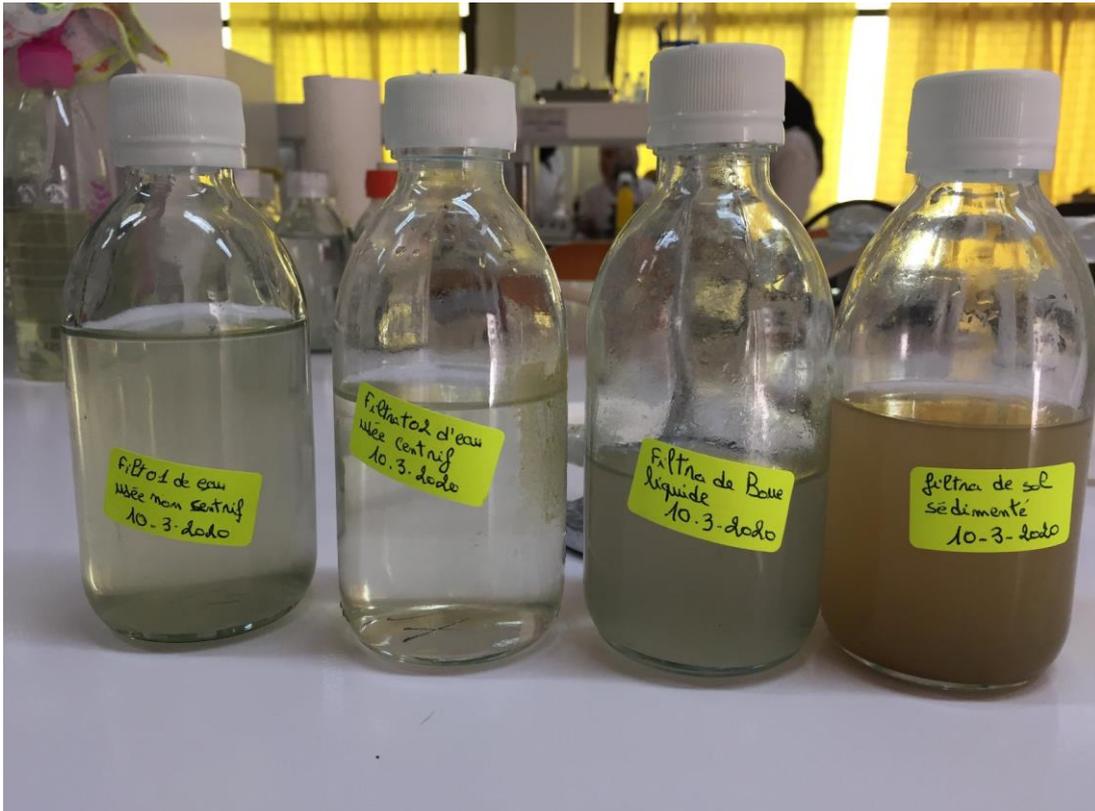
**Tableau 8:** Résultats macroscopique et microscopique des bactéries.

Nom des bactéries	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
<i>Klebsiella sp.</i>		Bacille à Gram négatif 
Entérobactérie		Bacille à Gram négatif 
<i>Pseudomonas sp.</i>		Bacille à Gram négatif 
<i>Citrobacter sp.</i>		Bacille à Gram négatif 

## 2. Résultat de filtration

Après avoir prélever des échantillons de la station de traitement des eaux usées de la ville de Guelma au niveau de différents points de la chaîne de traitement : l'eau usée et la boue, on a procédé à la filtration à vide sur membrane de porosité  $0,22\mu\text{m}$  (fig. 19).

La figure 19 ci-dessous montre les filtrats obtenus.



**Figure 19:** Filtrats obtenus des échantillons.

Les étapes programmées après l'étape de filtration comme ça était mentionné dans la partie matériel et méthodes à savoir l'application sur les bactéries multirésistantes, la synergie avec les antibiotiques ainsi que l'isolement et la conservation des bactériophages ont été malheureusement interrompus par les conditions de confinement à cause de la pandémie COVID-19.

## II. Discussion

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

Cette étude a pour objectif, d'isoler les bactériophages et de les appliquer sur les bactéries multi résistantes.

L'utilisation des eaux et des boues comme source d'isoler les bactériophages a été démontrée par plusieurs publications dont **Martineau, 2010; Bourema and Halimi, 2014; Bendaira and Brik, 2015; Massali and Bouaninba, 2016**.

L'équipe de **Cross et al., 2015** qui 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 *Arthrobactersp.KY3901* utilisées comme hôte de propagation de phage a donné des résultats prometteurs dans cet axe.

Les eaux usées provenant de la station municipale de traitement des eaux usées à Tokyo 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.

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**).

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.

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 se 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 pertinents à une autre étude de **Merabishvili et al., 2009** qui n'a révélé aucun changement du titre des phages appliqué 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 comme la Géorgie où ils reçoivent de nombreux patients, 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

Le monde étant actuellement confronté aux infections bactériennes difficiles à traiter due à l'utilisation non contrôlée des antibiotiques largement consommés qui a favorisé l'émergence des bactéries multirésistantes représentant une source de risque d'infection bactérienne. Cependant, l'intérêt des bactériophages a augmenté en raison de leur utilisation potentielle comme agent de lutte biologique et naturelle offrant un large éventail d'applications relativement peu coûteuses répondant en toute sécurité aux exigences de ce contrôle antibactérien dans les différents domaines.

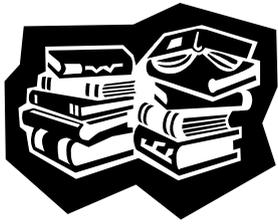
Cette étude préliminaire portée sur l'objectif d'isoler des bactériophages à partir des différents échantillons d'eau usée, boues liquides et semi-solide prélevés au niveau de la wilaya de Guelma afin de les appliquer sur les bactéries multirésistantes mais malheureusement n'était pas atteint au-delà de notre contrôle. Cette recherche présente des limites et nécessite beaucoup d'approfondissement afin d'être satisfaisante et atteindre notre objectif.

D'après les études précédentes, on peut estimer que l'usage des phages a été mis en évidence malgré les très peu des essais *in vivo*. Par conséquent, la recherche sur les bactériophages et leurs applications doit se poursuivre et ne pas s'arrêter là.

Nous encourageons de terminer notre travail qui n'était pas achevé à cause de la situation sanitaire actuelle.

Nous conseillons comme perspective :

- Recherche d'environnement riche en phages.
- Caractérisation des phages en analysant leurs génomes (ADN ou ARN) avec l'utilisation des techniques de biologie moléculaire.
- L'application *in vitro* et *in vivo* des phages en vue d'une meilleur compréhension de leur effets.
- La recherche de moyens de conservation adéquats et non couteux.



**Références**

**Bibliographiques**

## Références bibliographiques

- Ackermann, H.-W., 2003.** Bacteriophage observations and evolution. *Res. Microbiol.* 154, 245–251. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00067-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00067-6)
- Adams, M.H., 1959.** Bacteriophages. New York, Interscience Publishers.
- 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. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2018.50.6.sc8>
- Azzedine, A.K., 2016.** suivi du rendement épuratoire de la station d'épuration des eaux usées de la ville de Guelma (Master). 8 MAI 1945, Guelma.
- Bacteriophage.news, 2020a.** Lysogeny in Temperate Bacteriophages. Bacteriophage.news. URL <https://www.bacteriophage.news/lysogeny-in-temperate-bacteriophages/> (accessed 3.16.20).
- Bacteriophage.news, 2020b.** Bacteriophages & Covid-19. Bacteriophage.news. URL <https://www.bacteriophage.news/bacteriophages-and-covid-19/> (accessed 5.12.20).
- Bao, Q., Li, X., Han, G., Zhu, Y., Mao, C., Yang, M., 2019.** Phage-based vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 145, 40–56. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.013>
- Barrette, G., 2015.** Évaluation de l'utilisation des bactériophages anti-staphylococcus aureus pour l'assainissement de surfaces (masters). École Polytechnique de Montréal, Canada.
- Bendaira, S., Brik, K., 2015.** Recherche de bactériophages lytiques dans les eaux usées et boues. Identification de leurs bactéries hôtes (Master). Frères Mentouri Constantine1, Constantine.
- Berger Savin, M., 2014.** La phagothérapie: historique et potentielle utilisation contre les infections à bactéries multirésistantes (Thèse d'exercice). École nationale vétérinaire d'Alfort, France.
- Bourema, M., Halimi, D., 2014.** Isolement de bactériophages à partir des eaux usées et identification de leurs bactéries hôtes (Master). Frères Mentouri Constantine1, Constantine.
- Bouslamti, R., 1989.** L'absorption des phages chez *Rhizobium meliloti*: rôle des lipopolysaccharides (phdthesis). DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS, France.
- Comeau, A.M., Tétart, F., Trojet, S.N., Prère, M.-F., Krisch, H.M., 2007.** Phage-Antibiotic Synergy (PAS):  $\beta$ -Lactam and Quinolone Antibiotics Stimulate Virulent Phage Growth. *PLoS ONE* 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000799>
- 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. <https://doi.org/10.3791/52781>

- Debarbieux, L., 2008.** La phagothérapie expérimentale à l'aube du xxie siècle. Médecine Mal. Infect. 38, 421–425. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2008.06.014>
- Dennesen, P.J.W., Bonten, M.J.M., Weinstein, R.A., 1998.** Multiresistant bacteria as a hospital epidemic problem. Ann. Med. 30, 176–185. <https://doi.org/10.3109/07853899808999401>
- Diallo, Y., Kanté, S., 2019.** Activité antibactérienne des nanoparticules d'argent (Master en biologie moléculaire et cellulaire). 8 MAI 1945, Guelma.
- Dien, A.T., 2018.** Génomique épidémiologique de Salmonella (phdthesis). Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France.
- Dublanchet, A., 2017.** La phagothérapie: des virus pour combattre les infections : renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques.
- Dublanchet, A., 2014.** Qu'est-ce que la phagothérapie? HEGEL - HEpato-GastroEntérologie Libérale. <https://doi.org/10.4267/2042/54390>
- Dublanchet, A., 2008.** La phagothérapie au XXIe 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., Numéro spécial CEMI 2007 et 2008 38, 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2008.06.016>
- Dublanchet, A., Patey, O., 2015.** La phagothérapie Phage therapy. Lett. Infect., Mise au point Tome XXX, 7.
- Dublanchet, A., Patey, O., 2011.** La phagothérapie : passé et avenir (faits nouveaux et procédure[s] pour une réhabilitation). Immuno-Anal. Biol. Spéc. 26, 165–175. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2011.06.001>
- Dufour, N., Chevallereau, A., Debarbieux, L., 2016.** Les bactériophages: Comment ces virus alliés fonctionnent-ils? 31–34.
- Dufour, N., Debarbieux, L., 2017.** La phagothérapie - Une arme crédible face à l'antibiorésistance. médecine/sciences 33, 410–416. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173304011>
- Errafyg, A., 2016.** Rôle de la phagoterapie dans le traitement des infections bacteriennes (Thesis). MOHAMMED V-RABAT, Maroc.
- Essoh, C. you, 2013.** Étude épidémiologique de souches de Pseudomonas aeruginosa responsables d'infections et de leurs bactériophages pour une approche thérapeutique (thesis). Paris 11, France.

- Gazeev, S., 2018.** Applications of Phage Therapy in Veterinary Medicine. Programme Vét. Proj. Licence Univ. Suédoise Agric. Fac. Médecine Vét. Sci. Anim. 2016 2018:28, 18.
- Golec, P., Dąbrowski, K., Hejnowicz, M.S., Gozdek, A., Łoś, J.M., Węgrzyn, G., Łobocka, M.B., Łoś, M., 2011.** A reliable method for storage of tailed phages. *J. Microbiol. Methods* 84, 486–489. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.007>
- González-Menéndez, E., Fernández, L., Gutiérrez, D., Rodríguez, A., Martínez, B., García, P., 2018.** Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of Staphylococcus phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products. *PLOS ONE* 13, e0205728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205728>
- Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., García, P., 2016.** Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00825>
- 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.
- Haq, I.U., Chaudhry, W.N., Akhtar, M.N., Andleeb, S., Qadri, I., 2012.** Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Viol. J.* 9, 9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-9>
- Harada, L.K., Silva, E.C., Campos, W.F., Del Fiol, F.S., Vila, M., Dąbrowska, K., Krylov, V.N., Balcão, V.M., 2018.** Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiol. Res.* 212–213, 38–58. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.007>
- Hughes, K.A., Sutherland, I.W., Jones, M.V., 1998.** Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiol. Read. Engl.* 144 ( Pt 11), 3039–3047. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-11-3039>
- Jaomanjaka, F., 2014.** Diversité des bactériophages infectant la bactérie lactique *Oenococcus oeni*, responsable de la fermentation malolactique des vins (thesis). Bordeaux, France.
- Karlsson, F., Borrebaeck, C.A.K., Nilsson, N., Malmberg-Hager, A.-C., 2003.** The Mechanism of Bacterial Infection by Filamentous Phages Involves Molecular Interactions between TolA and Phage Protein 3 Domains. *J. Bacteriol.* 185, 2628–2634. <https://doi.org/10.1128/JB.185.8.2628-2634.2003>
- Kiljunen, S., 2006.** Molecular biology, genetics and applications of yersiniophages. University of Turku : Distribution : Turku University Library, Turku.

- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02085-18>
- Kolenda, C., 2019.** Phagothérapie et infections ostéo-articulaires: évaluation de l'activité antibiofilm et antibactérien intracellulaire d'un assemblage et trois bactériophages anti-Staphylococcus aureus (phdthesis). CLAUDE BERNARD – LYON 1, France.
- Lee, K.H., Lee, J.-W., Song, J., Hwang, M., 2013.** Nanoscale bacteriophage biosensors beyond phage display. *Int. J. Nanomedicine* 3917. <https://doi.org/10.2147/IJN.S51894>
- 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* (phdthesis). Ecole nationale supérieure Mines-Télécom Atlantique, France.
- Martineau, A., 2010.** Isolement et caractérisation de bactériophages comme moyen de lutte naturel contre les infections nosocomiales (Maîtrise). Université de Montréal, Canada.
- Massali, F.Z., Bouaninba, S., 2016.** Etudes sur les bactériophages du sol et leurs méthodes d'isolement (Master). Frères Mentouri Constantine1, Constantine.
- Menidjel, N., 2017.** Les infections nosocomiales à bactéries multi- résistantes (Master en biologie moléculaire des procaryotes). SNV.STU, Guelma.
- 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., Vanechoutte, M., 2009.** Quality-Controlled Small-Scale Production of a Well-Defined Bacteriophage Cocktail for Use in Human Clinical Trials. *PLOS ONE* 4, e4944. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004944>
- Morgane, A., 2019.** Intérêt de la phagothérapie dans le traitement et la prévention des maladies du tube digestif (phdthesis). Université de Lille, France.
- MORRISETTE, T., KEBRIAEL, R., MORALES, S., RYBAK, M.J., 2020.** Bacteriophage-Antibiotic Combinations: A Promising Alternative for Refractory Infections? *ContagionLive*.
- Neurohr, S., 2016.** La phagothérapie: des virus au service de la médecine (Thèse d'exercice). Université de Lorraine, France.
- 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.

- Poole, K., 2004.** Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10, 12–26. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00763.x>
- 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. URL <https://seaphagesphagediscoveryguide.helpdocsonline.com/3-0-overview> (accessed 2.20.20).
- 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.
- Saussereau, E., 2012.** Utilisation des bactériophages comme thérapie lors d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* dans le cadre de la mucoviscidose: efficacité et innocuité (phdthesis). Université Pierre et Marie Curie - Paris VI.
- 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.
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02641-08>
- 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. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_2)
- Vandamme, E.J., Mortelmans, K., 2019.** A century of bacteriophage research and applications: impacts on biotechnology, health, ecology and the economy!: A century of bacteriophage research and applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 94, 323–342. <https://doi.org/10.1002/jctb.5810>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.062>

# **Annexe**

## ANNEXE 01 : Composition chimique des milieux et solution utilisés

### 1- Bouillon LB

Tryptone .....	2g
NaCl.....	2g
Extrait de levure .....	1g
Agar.....	3g
Eau distillée.....	200ml
pH = 7,2	

### 2- Gélose Nutritive

Peptone.....	5g
NaCl.....	5g
Extrait de viande de bœuf .....	1g
Extrait de levure.....	2g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml
pH de milieu = 7,4	

### 3- Milieu LB demi molle

Tryptone.....	10g
NaCl.....	10g
Extrait de levure .....	5g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,36g

Agar.....7,5g

Eau distillée.....1000ml

pH= 7,2

#### **4- Milieu LB solide**

Tryptone.....10g

NaCl.....10g

Extrait de levure.....5g

Agar.....15g

CaCl<sub>2</sub>.....0,36g

Eau distillée.....1000ml

pH de milieu = 7,2

#### **5- Tampon phagique SM**

NaCl.....100mM

Tris HCl, Ph=7,4.....1Mm

MgSO<sub>4</sub>.....10Mm

Eau distillée.....1000ml

pH = 7

## Résumé

Après la découverte des antibiotiques au 20<sup>ème</sup> siècle et leur utilisation non raisonnée dans différents domaines a favorisé l'apparition des bactéries multirésistantes, avec l'augmentation de taux de ces dernières ; il serait donc indispensable de prendre les précautions pour éviter leur effets néfastes ce qui a incité les chercheurs du monde entier à la recherche et la réutilisation d'un remède naturel présent partout dans l'ensemble de la biosphère appelé les **bactériophages** qui sont des virus qui peuvent tuer et lyser les bactéries qu'ils infectent. Leur disponibilité les rend à la fois facile à isoler et à utiliser. L'objectif de cette étude était d'isoler les bactériophages à partir des eaux usées et des boues provenant de la station d'épuration du Guelma, et de les appliquer sur les bactéries multirésistantes aux antibiotiques. L'isolement a été effectué par la méthode de filtration sous vide en utilisant un papier filtre de porosité 0.22µm et en appliquant plusieurs méthodes sur des différentes bactéries multirésistantes.

**Mots clé :** Bactériophage, antibiotiques, bactérie multirésistante, isolement, eau usée, boues, filtration.

## **Abstract**

After the discovery of antibiotics in the 20th century and their unreasonable use in different fields favored the emergence of multidrug resistant bacteria, with the increase in the rate of the latter; it would therefore be essential to take precautions to avoid their harmful effects which prompted researchers around the world to find and reuse a natural remedy present all over throughout the biosphere called bacteriophages which are viruses that can kill and lyse the bacteria they infect. Their availability makes them both easy to isolate and to use. The objective of this study was to isolate the bacteriophages from the wastewater and sludge brought from the Guelma wastewater treatment plant, and to apply them to bacteria that are multi-resistant to antibiotics. The isolation was carried out by the vacuum filtration method using 0.22  $\mu\text{m}$  porosity filter paper and applying several methods on different multidrug resistant bacteria.

**Key words:** Bacteriophage, antibiotics, multi-resistant bacteria, isolation, wastewater, sludge, filtration.

## الملخص

بعد اكتشاف المضادات الحيوية في القرن العشرين واستخدامها غير المعقول في مجالات مختلفة أدى إلى ظهور بكتيريا متعددة المقاومة، مع زيادة معدل هذه الأخيرة ؛ لذلك من الضروري اتخاذ الاحتياطات اللازمة لتجنب آثارها الضارة مما دفع الباحثين حول العالم لإيجاد و إعادة استخدام علاج طبيعي موجود في جميع أنحاء البيئة البيولوجية يسمى بالعائيات وهي فيروسات قادرة على قتل البكتيريا التي أُصيبت بهذه الأخيرة. توفرها يجعلها سهلة العزل والاستخدام. الهدف من هذه الدراسة هو عزل هذه العائيات من مياه الصرف الصحي و من الطين المستخرجة من محطة معالجة مياه الصرف الصحي في قالمة, وتطبيقها على البكتيريا ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية, تمت عملية العزل بواسطة طريقة الترشيح الفراغي باستخدام ورق ترشيح مسامي 0.22 ميكرومتر بتطبيق عدة طرق تجريبية على بكتيريا متعددة المقاومة مختلفة.

**الكلمات المفتاحية:** العائيات، مضادات حيوية، بكتيريا متعددة المقاومة، العزل، مياه الصرف الصحي، الطين، الترشيح.