

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة 8 ماي 1945 قالة

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
**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 et de la Vie  
**Filière :** Sciences Biologiques  
**Spécialité/Option :** Biologie moléculaire et cellulaire

**Thème :**

# Isolement et application des bactériophages

**Présenté par :**

- Dafri Wafiya
- Labadlia Sana
- Mili Rayane
- Saidia Leila

**Devant le jury composé de :**

<b>Président :</b> Dr. Djemaa F	<b>MCB</b>	<b>Université de Guelma</b>
<b>Examineur :</b> Dr. Mokhtari A	<b>MCB</b>	<b>Université de Guelma</b>
<b>Encadreur :</b> Dr. Khallelf M	<b>MCA</b>	<b>Université de Guelma</b>

Année universitaire : **2022**

## **Remerciements**

*Avant toute chose, nous remercions " Allah" qui nous donne la patience ,le courage et la volonte de mener à terme ce modeste travail .*

*Nos remerciement s'adressent également à :*

*Mme : Khellaf M, notre promoteur pour avoir accepté d'encadrer ce travail et d'avoir dirigé cette étude par ses conseils, ses encouragements, ses connaissance et ses patience tout au long de notre travail.*

*À notre président de jury Mme : Djemaa F, maître de conférences à l'Université de Guelma, pour d'avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*À notre examinateur Dr : Mokhtari A, maître de conférences à l'Université de Guelma, pour l'intérêt qu'il a porté à notre travail en acceptant d'examiner notre travail.*

*Nous remerciant également toute l'équipe pédagogique de l'Université de Guelma.*

*Finalement, nous remerciant tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire de fin d'étude.*

## *Dédicace*

Je dédié ce travail,  
A ma mère Halima, l'être le plus chère en monde.  
A mon père Torki le plus gentil, Que dieu les protège pour nous.  
A mon frère Mouaid et mes chères sœurs : Zahra, Wided, Bochra, et Yasmine.  
A tous ceux qui ne sont pas mentionnés dans ce modeste mémoire, mais qui son dans notre  
cœur.

★★ Wafiya ★★

Je dédie ce travail,  
A ma mère Nadira, l'être le plus chère au monde.  
A mon père Abd el Baki le plus gentil. Que dieu les protège pour nous  
A mes chers frères : Mourad, Amin  
A mon mari Omar, et à toute ma famille en particulier : ma belle-mère Warda, que Dieu  
lui fasse miséricorde, mon père Ali et tous mes beaux-frères sans exception.  
A tous ceux qui ne sont pas mentionnés dans ce modeste mémoire, mais qui sont dans nos  
cœurs.

★★ Sana ★★

Je dédié ce travail,  
A ma mère Zohra, l'être le plus chère en monde.  
A mon père Brahim le plus gentil, Que dieu les protège pour nous.  
A mes chère frères et sœurs : Adel, Abd El kader, Rachid, Rima, Warda, karima, Amel, et ses  
enfants.  
A mon fiancé Billel et toute ma famille en particulier : ma belle-mère Nadia, mon papa  
Mouhamed, ma tante Arifa et mon petit frère Imad.  
A tous ceux qui ne sont pas mentionnés dans ce modeste mémoire, mais qui son dans notre  
cœur.

★★ Leila ★★

Je dédié ce travail,  
A ma mère Bariza, l'être le plus chère en monde.  
A mon père Nour Eddine, le plus gentil. Que dieu les protège pour nous.  
A mes chère frères et sœurs: Abd el salam et Nada.  
A tous ceux qui ne sont pas mentionnés dans ce modeste mémoire, mais qui son dans notre  
cœur.

★★ Rayane ★★

# Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction ..... 1

## Etude bibliographiques

I. Généralités sur les bactériophages ..... 4

1. Bref historique ..... 4

2. Définition des bactériophages ..... 5

3. Structure et morphologie ..... 5

4. Classification ..... 7

5. Habitat ..... 9

II. Virulence et cycles phagiques ..... 9

1. Cycle lytique (phage virulent) ..... 10

2. Cycle lysogénique (phage tempéré) ..... 11

3. Les autres cycles ..... 12

a- Cycle chronique (phages filamenteux) ..... 12

b- Cycle pseudolysogénique ..... 12

III. Les applications antibactériennes de bactériophages ..... 13

1. La phagothérapie ..... 13

1.1. Définition de la phagothérapie ..... 13

1.2. Principe d'utilisation de la phagothérapie ..... 14

1.3. Résistance bactérienne contre bactériophage ..... 14

1.4. Différences entre bactériophages et antibiotiques ..... 14

1.5. Association synergique des bactériophages avec l'antibiotique ..... 15

2- Autres applications ..... 16

2.1. Bactériophages en médecine humaine ..... 16

2.2. Rôle des phages dans l'immunité ..... 16

2.3. Biologie moléculaire ..... 17

2.4. Les vaccins à base de phages .....	18
2.5. La sécurité alimentaire .....	19
2.6. Agriculture .....	20
2.7. L'application des bactériophages dans l'environnement marin .....	21
2.8. L'élimination des biofilms par des bactériophages .....	21

## **Matriels et méthodes**

<b>I. Matériels et méthodes.....</b>	<b>25</b>
<b>1. Présentation de la zone d'étude (oued Seybouse).....</b>	<b>25</b>
<b>2. Prélèvement d'échantillons .....</b>	<b>25</b>
<b>3. Isolement des bactériophages .....</b>	<b>27</b>
a- Filtration de boue semi-solide .....	27
b- Filtration de boue liquide .....	28
<b>4. Matériel biologique .....</b>	<b>29</b>
4.1. Le repiquage des souches .....	29
4.2. Confirmation des bactéries utilisées .....	29
4.3. Coloration de Gram et explication .....	30
<b>5- L'enrichissement en bactériophages .....</b>	<b>30</b>
<b>6. Elimination des bactéries .....</b>	<b>31</b>
<b>7. Préparation des échantillons à tester .....</b>	<b>31</b>
7.1. Délétion .....	31
<b>8. Préparation de la double couche d'agar .....</b>	<b>31</b>
<b>9. Technique de spots .....</b>	<b>32</b>
<b>10. Numérations des phages .....</b>	<b>32</b>
<b>II. Conservation des phages .....</b>	<b>33</b>

## **résultats et discussion**

<b>I. Résultats .....</b>	<b>35</b>
<b>1. Résultat de la Filtration .....</b>	<b>35</b>
<b>2. Résultat de Coloration de Gram .....</b>	<b>35</b>
<b>3. Résultat de l'enrichissement .....</b>	<b>36</b>
<b>4. Résultat de méthode de spots .....</b>	<b>37</b>
<b>II. Discussion .....</b>	<b>38</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>41</b>

## **Références bibliographique**

## **Annexe**

**Résumé**

**Abstract**

**ملخص**

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Frise chronologique retraçant les grandes phases de la découverte des phages et de leur utilisation en biologie moléculaire et en tant qu'agents antibactériens.....	5
<b>Figure 2:</b> morphologies des bactériophages .....	6
<b>Figure 3:</b> représentation schématique d'un Bactériophage à symétrie binaire (ordre des Caudovirales) .....	6
<b>Figure 4:</b> Schéma du cycle lytique .....	11
<b>Figure 5:</b> Schéma du cycle lysogénique .....	12
<b>Figure 6:</b> cycles chronique et pseudolysogénique des bactériophages .....	13
<b>Figure 7:</b> Illustration de l'effet synergique Entre antibiotiques et bactériophages .....	16
<b>Figure 8:</b> représentation schématique des interactions multiples entre bactériophage, bactérie et cellules de l'immunité innée .....	17
<b>Figure 9:</b> les différentes approches basées sur les phages pour la délivrance d'antigènes .....	19
<b>Figure 10:</b> utilisation des phages en sécurité alimentaire .....	20
<b>Figure 11:</b> les étapes d'élimination d'un biofilm par bactériophages .....	23
<b>Figure 12:</b> Situation de la station d'épuration de Guelma (Google Earth 2022). .....	25
<b>Figure 13:</b> Protocole expérimental. ....	27
<b>Figure 14:</b> Les étapes de filtration de boue semi-solide. ....	28
<b>Figure 15 :</b> Les étapes de filtration de boue liquide.....	28
<b>Figure 16:</b> Repiquage des souches. ....	29
<b>Figure 17:</b> Préparation d'un frottis.....	29
<b>Figure 18:</b> Les étapes de coloration de Gram. ....	30
<b>Figure 19:</b> Filtration du bouillon d'enrichissement par seringue de filtration. ..	31
<b>Figure 20:</b> La série de dilutions.....	31
<b>Figure 21:</b> préparation des milieux de la double couche d'agar. ....	32

<b>Figure 22:</b> Schéma de la procédure opératoire.....	32
<b>Figure 23:</b> Résultat de filtre de boue semi-solide et boue liquide.....	35
<b>Figure 24:</b> Les résultats d'enrichissement.....	36
<b>Figure 25:</b> Les résultats de méthode de spots bactérienne.....	37

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Classification des bactériophages. D'après Virologie humaine, coordonné par Alain Le Faou, éditions Pradel et mis à jour avec la classification de l'ICTV en novembre 2019 .....	7
<b>Tableau 2:</b> Comparaison antibiotiques et bactériophages .....	15
<b>Tableau 3:</b> Représentant les deux prélèvements effectués périodiquement. ....	26
<b>Tableau 4:</b> Les étapes et le but de coloration de Gram.....	30
<b>Tableau 5:</b> Résultats macroscopie et microscopique des bactéries. ....	35
<b>Tableau 6:</b> Diamètre de plage de lyse dans chaque dilution.....	38

## Liste des abréviations

**°C** : degré Celsius

**µm** : Micromètre

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger

**ATB** : Antibiotique

**E. coli** : Escherichia coli

**H** : Heur

**GN** : Gélose Nutritive

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

**LB** : Luria-Bertani

**MH** : Muller-Hinton

**min** : minute

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**PAC Bio** : Pacific Biosciences of California

**R** : Résistance

**RVB** : Rapport du virus sur bactérie

**SM** : Sodium-Magnésium

**Sp** : Super pathogène

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

# Introduction

## Introduction

Considérés comme une des révolutions médicales du XX<sup>ème</sup> siècle, les antibiotiques ont apporté d'énormes avantages à l'humanité, en permettant de soigner de nombreuses infections bactériennes, et en faisant diminuer considérablement la mortalité qui y était associés. Malheureusement, l'utilisation de ces molécules a été rapidement suivie par l'apparition d'une résistance bactérienne aux traitements. Au fil du temps, cette résistance est devenue l'un enjeu de santé publique majeur. En raison de l'émergence de plus en plus de souches bactériennes sont devenues multi-résistantes, ce qui entraîne des difficultés dans le traitement des patients. Elle entraîne une augmentation de la durée des soins et de la morbidité associée à l'infection et peut compromettre le diagnostic vital. De nombreux travaux portent sur la résistance aux antibiotiques, mais peu sont basés sur des données réelles (**Ziai, 2014 ; Opatowski, 2020**).

Le phénomène de la résistance est développé suite à l'utilisation des antibiotiques en élevage. Cependant, les pratiques à risque en matière d'utilisation des antibiotiques provoquent plus de résistances que l'usage approprié. Ces pratiques sont directement incriminées dans l'augmentation des niveaux de résistance aux antibiotiques chez les différents agents pathogènes (**Amairi, 2021**).

Ce phénomène serait responsable de plusieurs dizaines de milliers de morts par an. Couplé au manque du développement de nouveaux antibiotiques, le risque que l'absence de solutions thérapeutiques face à une infection bactérienne puisse devenir une constante grandit de jour en jour. Il est donc devenu nécessaire de mettre en place des moyens afin de minimiser cette problématique (**Ziai, 2014**).

C'est pourquoi on peut se poser la question de savoir s'il existe une alternative à ce problème. C'est là qu'entrent en jeu les bactériophages (ou simplement phages), qui sont les virus naturels des bactéries (littéralement : mangeurs de bactéries), ils reconnaissent, parasitent et tuent spécifiquement, pour la plupart d'entre eux, et pour chaque phage au moins une bactérie. En revanche, ils sont incapables d'infecter les cellules végétales ou animales. L'utilisation des prédateurs naturels des bactéries est venue de l'un de ses découvreurs, Felix d'Hérelle, qui l'a également mise en application en médecine humaine. Il a fallu, pour se faire, mettre au point les préparations phagiques, c'est à dire isoler un phage dirigé contre la bactérie pathogène, le propager, purifier la préparation et contrôler son activité. Pour diverses raisons, la médecine occidentale a délaissé ce traitement antibactérien au profit des antibiotiques. En

revanche, la phagothérapie a été largement exploitée dans l'ex-empire soviétique Le principal (Errafyg, 2016).

En Algérie, il y avait très peu d'études sur l'isolement des phages du sol ou des boues, qui ont été réalisés sur les phages qui méritent plus d'attention en raison de leur importance.

L'objectif principal de notre recherche à la fin de l'étude était d'isoler les phages des boues (semi-solide et liquide), pour une application sur de multiples bactéries résistantes, et enfin, rechercher les meilleurs moyens d'assurer leur conservation en vue de mener des études approfondies sur leurs propriétés antigéniques et médicinales.

Notre recherche est structurée en trois 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 deuxième, nous décrirons les méthodes suivies et le matériel utilisé au cours de la réalisation de ce travail ; et une troisième partie dans laquelle on présente les principaux résultats obtenus et leur discussion.



# **Etude bibliographique**

# I. Généralités sur les bactériophages

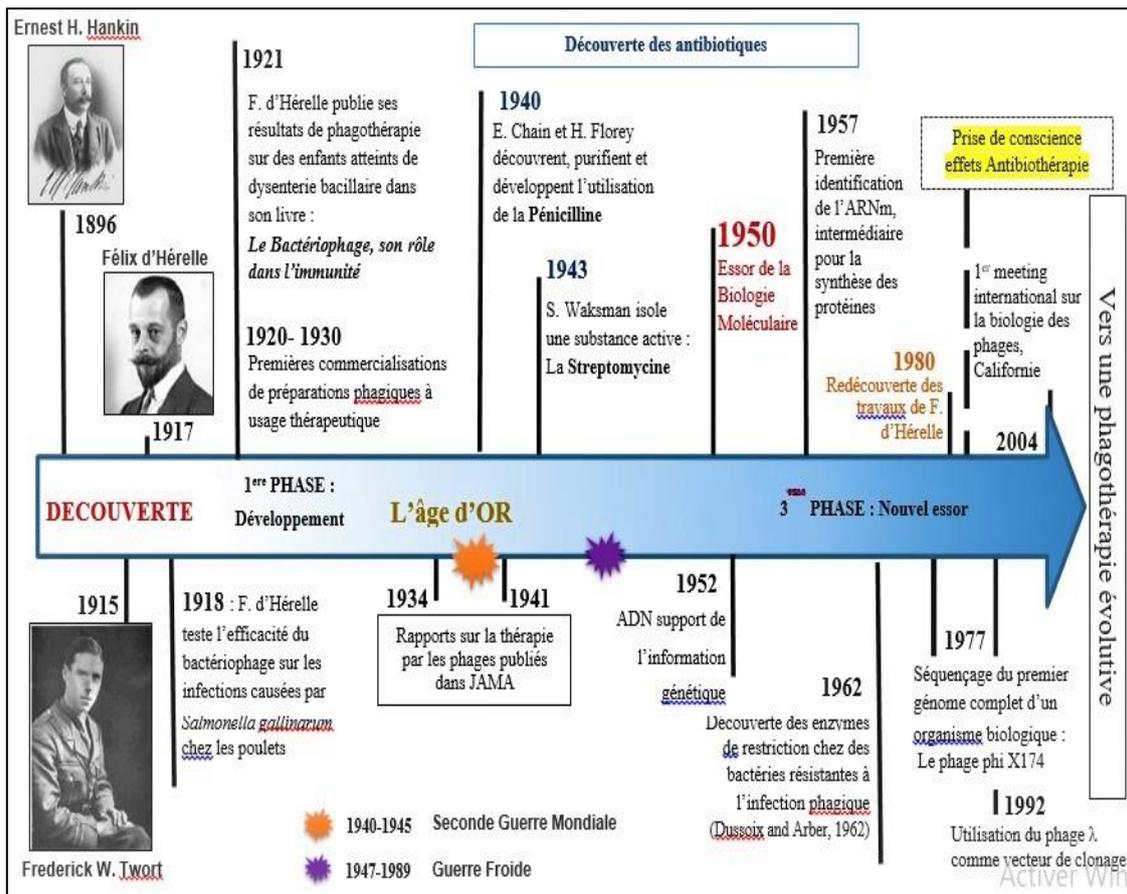
## 1. Bref historique

L'historique de ces virus de bactéries à 90 ans. Aujourd'hui, il est admis que la découverte du bactériophage appartient conjointement à deux microbiologistes, l'un anglais, Twort (1915) et l'autre franco-canadien, d'Hérelle (1917) (**Dublanchet, 2008 ; Dublanchet, 2017**).

En 1914, Frederick Twort, observe au microscope des zones vitreuses dans ses colonies de bactéries. Après s'être rendu compte que ces zones étaient le résultat de la destruction des cellules bactériennes, il les a ensuite prélevées et transmises d'une colonie à l'autre. Son étude, publiée en 1915 dans *The Lancet* (Twort 1915), décrit donc un agent doté de propriétés antibactériennes, mais ne précise pas sa nature (**Preux, 2013**).

Sur une période de quelques mois, d'Hérelle isole des bactériophages actifs contre différents espèces de bacilles (*Shigella, E. coli, Proteus, Salmonella*). Il démontre avec beaucoup d'assurance qu'il s'agit d'un «microbe» et non pas d'une «diastase». Mais il pense alors qu'il s'agit d'un seul et unique microbe tout en précisant n'avoir jamais isolé deux bactériophages identiques. Il le nomme Bacterophagum intestinale (un seul genre et une seule espèce) et affirme que ce microbe, dont l'expression est variable d'un isolat à l'autre (en tant que spectre et virulence), est capable d'acquérir une spécificité au contact de telle ou telle espèce bactérienne (**Dublanchet, 2017**).

Après leur découverte au début du XXe siècle, les bactériophages ont fait l'objet de nombreux débats quant à leur nature. Certains scientifiques pensaient qu'il s'agissait d'enzymes bactériennes autolytiques induites par des facteurs extérieurs alors que d'Hérelle soutenait que les bactériophages étaient des particules indépendantes proches des virus. C'est finalement avec l'avènement de la microscopie électronique que les bactériophages particuliers ont alors été avérée, mettant ainsi fin au débat (**Vernhes, 2016**).



**Figure 1:** Frise chronologique retraçant les grandes phases de la découverte des phages et de leur utilisation en biologie moléculaire et en tant qu'agents antibactériens (Magin, 2019).

## 2. Définition des bactériophages

Les bactériophages ou phage, littéralement « mangeurs des bactéries », sont des virus infectent les bactéries (prédateur naturel des bactéries) (Debarbieux, 2021 ; Hamzeh, 2014).

Comme tous les virus, ils ne possèdent pas d'activité métabolique propre et utilise la machinerie biosynthétique de la cellule qu'ils infectent pour leurs propre réplication, cette dernière est appelé « bactérie hôte » (Preux, 2013 ; Breton, 2019).

Certains bactériophages ont la capacité de détruire les bactéries par lyse, tout en étant inoffensifs pour les cellules humaines, animales et végétales (cellules eucaryote) d'autre s'intègrent au chromosome bactérien (Breton, 2019).

## 3. Structure et morphologie

Les bactériophages sont extrêmement hétérogènes, ils peuvent être polyédriques, cubiques, filamenteux ou encore pléomorphes (Allard, 2020).

Les bactériophages comme tous les virus possèdent une taille de 25 à 200 nm, constituées d'une capsidie protéique protégeant leur génome (Dufour, 2017).

Le génome capable d'exister sous forme d'ADN ou d'ARN (figure 2). L'acide nucléique associé de la capsidie forme la nucléocapsidie que l'on appelle aussi la tête, et le plus souvent d'une queue rigide ou flexible de longueur variable pour transport l'acide nucléique. Cette dernière qui permet aux bactériophages de se fixer aux bactéries (figure 3) (Bourema and Halimi, 2014 ; Magin, 2019 ; Allard, 2020).

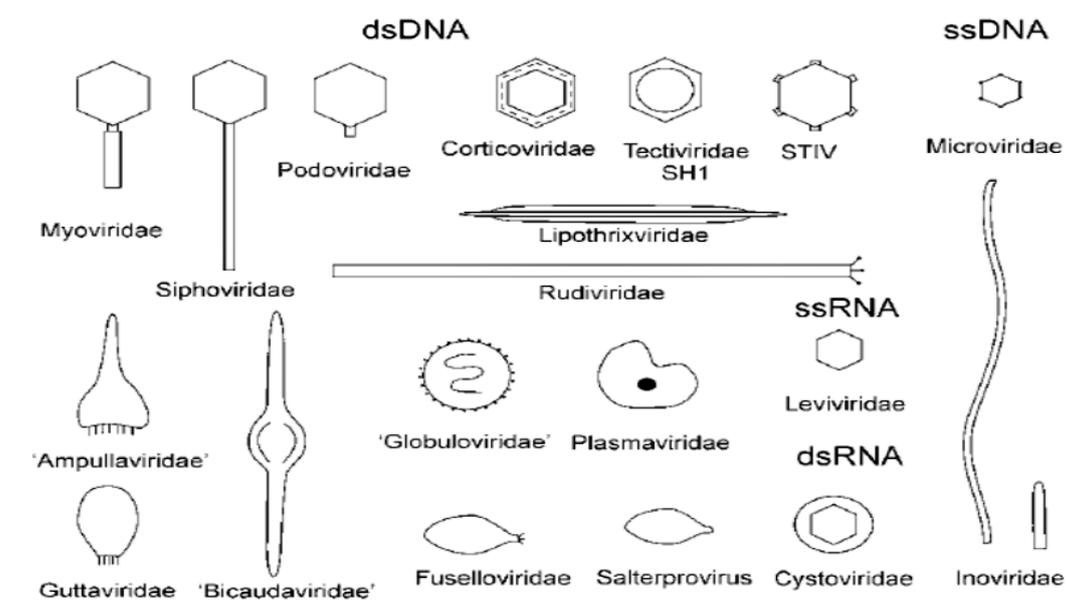


Figure 2: morphologies des bactériophages (Ackermann, 2007).

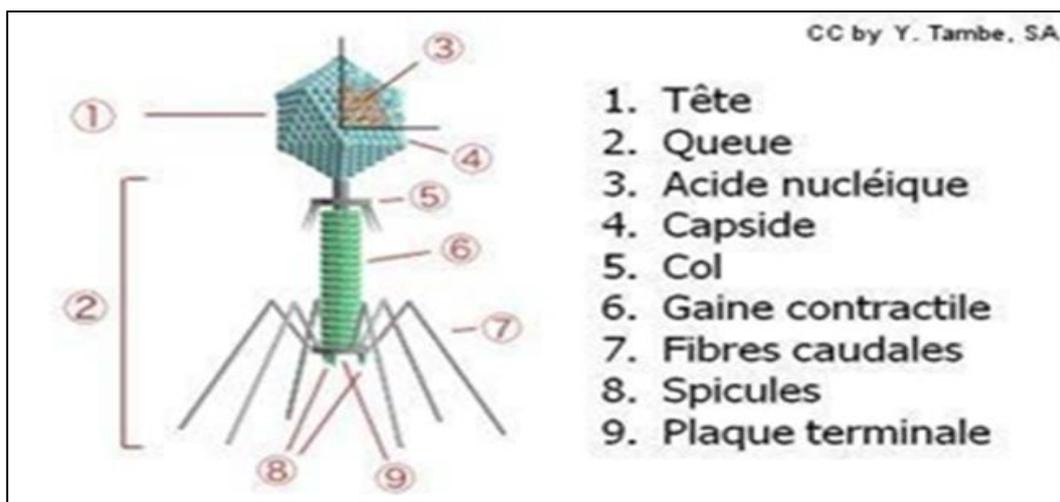


Figure 3: représentation schématique d'un Bactériophage à symétrie binaire (ordre des Caudovirales) (Guillaume, 2020).

#### 4. Classification

Les phages sont classés en fonction de la nature de leur acide Nucléique et de leur structure (Hamzeh, 2014).

Cette classification est fondée principalement sur :

- leur morphologie (symétrie de la capsid (icosaédrique, hélicoïdale), présence d'une queue ou non, enveloppe de lipides entourant la capsid ;
- la nature de leur génome : virus à ADN ou à ARN, acide nucléique linéaire ou circulaire, double ou simple brin ;
- les analogies de structure tridimensionnelle entre les protéines qui constituent la particule virale ;
- d'autres propriétés, comme le mode d'assemblage, ou le site de fixation sur la bactérie (Preux, 2013).

Les phages virulents appartenant aux familles des *Myoviridae*, *Siphoviridae* et *Podoviridae* font partie de l'ordre des *Caudovirales* (Tableau 01) ;

L'ordre des *Caudovirales* est de loin le plus grand et le plus prédominant groupe de bactériophages. Les virions de l'ordre des *Caudovirales* comportent une capsid protéique, entourant un ADN double brin linéaire et Possédant une symétrie binaire (tête et queue) puisque leur tête a une symétrie cubique et Leur queue une symétrie hélicoïdale (Allard, 2020).

**Tableau 1:** Classification des bactériophages. D'après Virologie humaine, coordonné par Alain Le Faou, éditions Pradel et mis à jour avec la classification de l'ICTV en novembre 2019 (Guillaume, 2020).

Ordre	Famille	Genres (nombre de genre)	Bactérie hôte (exemple de phage)	Particulaires
<b>ADN double Brin</b>				
<i>Caudovirales</i>	<i>Myoviridae</i>	<i>T4-like viruses</i> (87)	<i>E. coli</i> (T4)	Queue contractile
	<i>siphoviridae</i>	<i>P2-like viruses</i> <i>λ-like viruses</i> (210)	Entérobactéries (P2) <i>E. coli</i> (λ)	Queue longue et non contractile

	<i>Podoviridae</i>	<i>T7-like viruses</i> (48)	<i>E. coli</i> (T7)	Queue courte
	<i>Ackermannviridae</i>	<i>Agtrevirus, Limestonevirus, Kuttervirus</i>	<i>Salmonella, Shigella, Klebsiella, Serratia</i>	-
	<i>Herelleviridae</i>	<i>Agatevirus</i> (15)	<i>Bacillus</i>	-
<i>ligamenvirales</i>	<i>Rudiviridae</i>	<i>Rudivirus</i>	<i>Sulfolobus</i>	-
	<i>Lipothrixviridae</i>	<i>Lipothrixvirus</i> (3)	<i>Thermoproteus</i>	Enveloppe lipidique
-	<i>Tectiviridae</i>	<i>Tectivirus</i> (3)	<i>Bacillus, Pseudomonas</i>	Vésicule interne (lipoprotéine)
-	<i>Corticoviridae</i>	<i>Corticovirus</i>	<i>Alteromonas</i>	Capside complexe, lipidique
-	<i>Plasmaviridae</i>	<i>Plasmavirus</i>	<i>Acholeplasma</i>	Enveloppe lipidique, pas de capsid
-	<i>Fuselloviridae</i>	<i>Fusellovirus</i> (2)	<i>Sulfolobus</i>	Fusiforme, pas de Capsid
<b>ADN simple brin</b>				
-	<i>Inoviridae</i>	<i>Inovirus</i> (7)	<i>E. coli</i>	Filamenteux ou allongés
-	<i>Microviridae</i>	<i>Microvirus</i> (6)	<i>E. coli</i>	-
<b>ARN double brin</b>				
-	<i>Cystoviridae</i>	<i>Cystovirus</i>	<i>Pseudomonas</i>	Enveloppe lipidique

ARN simple brin				
-	<i>Leviviridae</i>	<i>Levivirus,</i> <i>Allolevivirus</i>	<i>E. coli</i>	-

## 5. Habitat

Les bactériophages sont extrêmement nombreux et sont présents dans tous les environnements présentant des bactéries, notamment sur le sol, dans les eaux salées ou douce, sur les surfaces cutanées et muqueuses des êtres vivants (et entre autres dans l'appareil digestif). Dans un milieu donné, leur nombre est en général dix, voire cent fois plus élevé que la quantité de bactéries présentes (**Breton, 2019**).

Les phages sont les entités biologiques les plus répandues sur Terre : leur nombre est estimé à  $10^{30} - 10^{32}$  (**Vernehs, 2016**).

Dans les premières recherches de d'Hérelle, le bactériophage qu'il étudiait pouvait survivre jusqu'à une température de 65°C, température létale pour la majorité des bactéries non sporulées, et ce bactériophage était assez difficilement détruit par des agents physiques (chaleur ou rayons ultra-violet par exemple) et chimique (antiseptiques par exemple) (**Breton, 2019**).

Les phages sont responsables d'une part importante du recyclage de la matière organique et influent donc largement sur les cycles biogéochimiques (**Vernehs, 2016**).

## II. Virulence et cycles phagiques

Au sein des virus, les bactériophages se caractérisent par des cycles de vie en Interaction directe et obligatoire avec les bactéries qu'ils infectent (**Cavalié Michel, 2010**).

Selon leur cycle biologique, on distingue 2 types de bactériophages : les phages lytiques et les phages tempérés (**Ravat et al., 2015**).

**Les phages lytiques (virulents) :** Comme leur nom l'indique, détruisent la bactérie. Ils détournent la machinerie bactérienne à leur profit pour se reproduire et se multiplier. Au terme du processus appelé cycle lytique (**Ravat et al., 2015**).

**Les phages tempérés (Lysogènes) :** Sont requis de la propriété d'intégrer leur génome au chromosome bactérien. Ce phénomène est appelé transduction et le cycle phagique est appelé cycle lysogénique. Ces phages tempérés ne sont pas utilisés en thérapeutique, lors de la production de bactériophages à usage thérapeutique on doit même s'assurer de l'absence de phage tempéré dans la préparation, car ils sont de potentiels vecteurs de gènes dangereux pour le malade (**Ravat et al., 2015**).

### **1. Cycle lytique (phage virulent)**

Il conduit à la mort obligatoire de la bactérie par sa lyse et à la libération dans le milieu de particules virales. Il présente plusieurs étapes qui sont détaillées ci-dessous (**Saussereau, 2012**).

- **Arrimage :** la rencontre d'un bactériophage et d'une bactérie est un phénomène aléatoire. La probabilité que les fibres de queue d'un phage rencontrent leur récepteur sur leur bactérie cible est donc dépendante de la proportion de phages et de bactéries dans le milieu. Cette étape est primordiale car d'elle dépend toute la suite de l'action des bactériophages. Et la liaison entre les fibres de la queue du phage et les récepteurs bactériens est une liaison forte qui va permettre au phage de mettre en contact sa plaque terminale avec la paroi de la bactérie ;

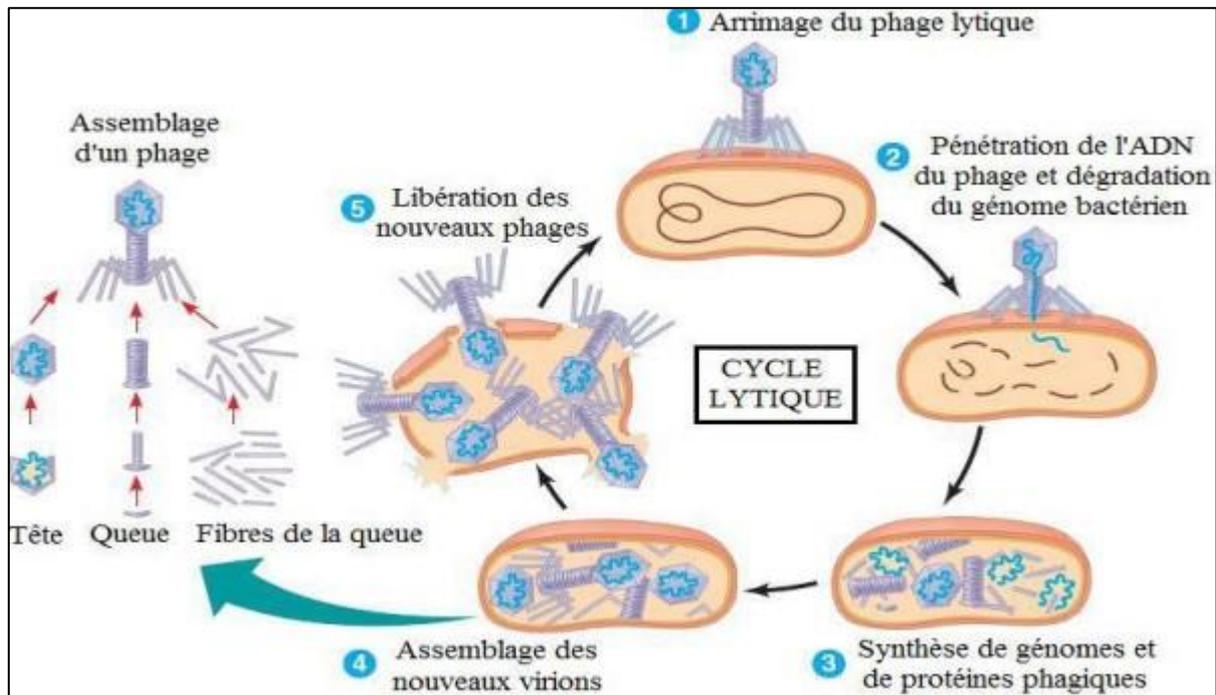
- **Pénétration :** Une fois solidement arrimé, une enzyme virale (endolysine) perce un trou dans la paroi cellulaire de l'hôte et la base de la queue du virus entre en contact avec la membrane cytoplasmique bactérienne, Il en résulte la perforation d'orifices dans la membrane suivie d'une contraction de la queue qui va permettre l'introduction dans le cytoplasme bactérien du génome viral ;

- **Expulsion du matériel génétique :** Il y a alors immédiatement exportation de l'acide nucléique empaqueté dans la capsid du phage vers le cytoplasme de la bactérie. Vidée et sans objet, la capsid virale reste à l'extérieur de la bactérie ;

- **Réplication :** Une fois à l'intérieur, le génome viral détourne le métabolisme cellulaire à son service. En premier lieu, une nucléase fragmente l'ADN bactérien en segments inutiles. Toute la machinerie cellulaire de la bactérie est détournée au profit de la néosynthèse virale : l'acide nucléique phagique est transcrit en ARNm puis traduit en protéines (enzymatiques et structurelles) servant à la fabrication de nouvelles particules virales ;

- **Assemblage :** C'est alors que se produit dans la bactérie infectée une maturation et l'assemblage des différents composants du phage. Ces derniers, produits en grand nombre, s'assemblent spontanément selon un modèle prédéterminé, identiques au phage infectant ;

- **Libération** : Quand la bactérie a accumulé entre 100 à 200 virions, il y a activation d'une endolysine phagique qui a pour rôle de détruire la membrane bactérienne et de faire éclater la cellule, libérant de ce fait simultanément tous les virus produits qui, dispersés à proximité, sont disponibles pour attaquer les bactéries voisines (figure 4) (Neurohr, 2016).

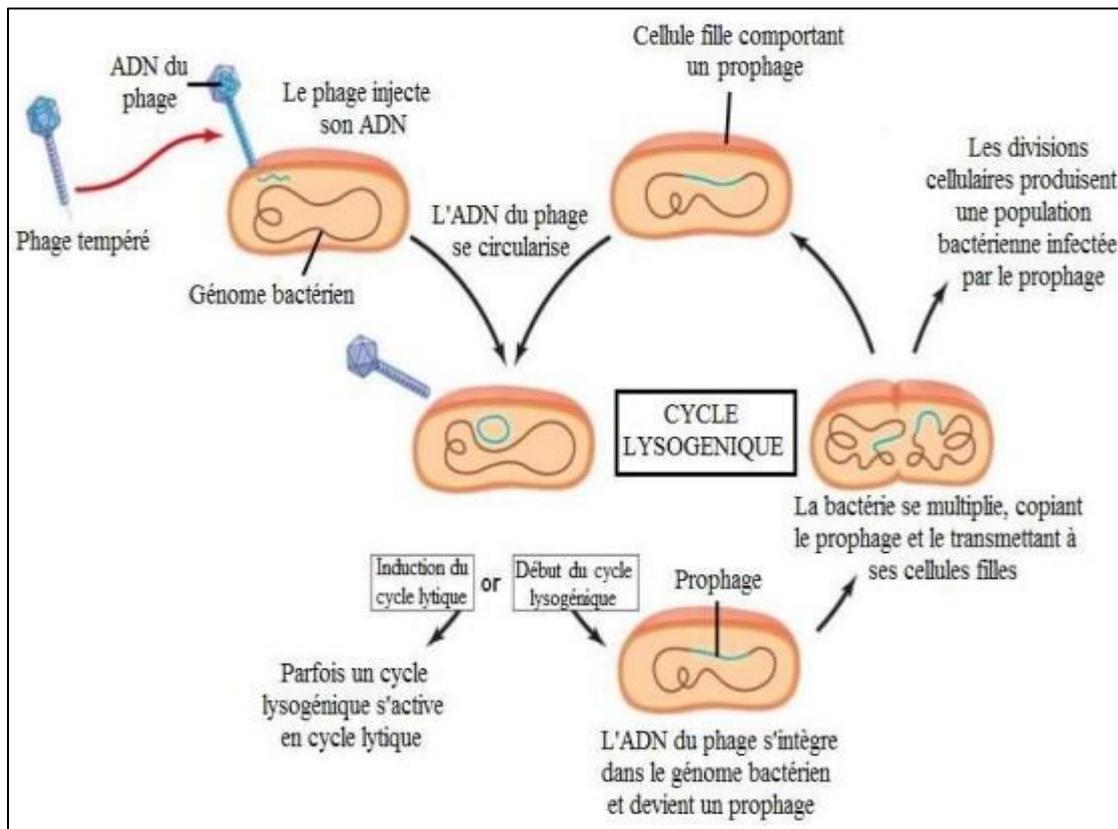


**Figure 4:** Schéma du cycle lytique (Bourema et Halimi, 2014).

## 2. Cycle lysogénique (phage tempéré)

Ce cycle débute de la même manière que le cycle lytique. Ensuite, le passage à la lysogénie plutôt qu'à un cycle lytique va dépendre d'interactions complexes entre les facteurs bactériens et viraux (Saussereau, 2012).

Le cycle lysogénique où le matériel viral est intégré dans le génome de l'hôte ou prend une forme de plasmide, on parle dans les deux cas de prophage. Pendant ce cycle, les gènes de production et de lyse ne sont pas exprimés avant l'induction, c'est-à-dire l'entrée dans un cycle lytique en réponse à un signal (facteur de l'environnement, état métabolique de la cellule) (figure 5) (Arnaud, 2017).



**Figure 5:** Schéma du cycle lysogénique (Bourema et Halimi, 2014).

### 3. Les autres cycles

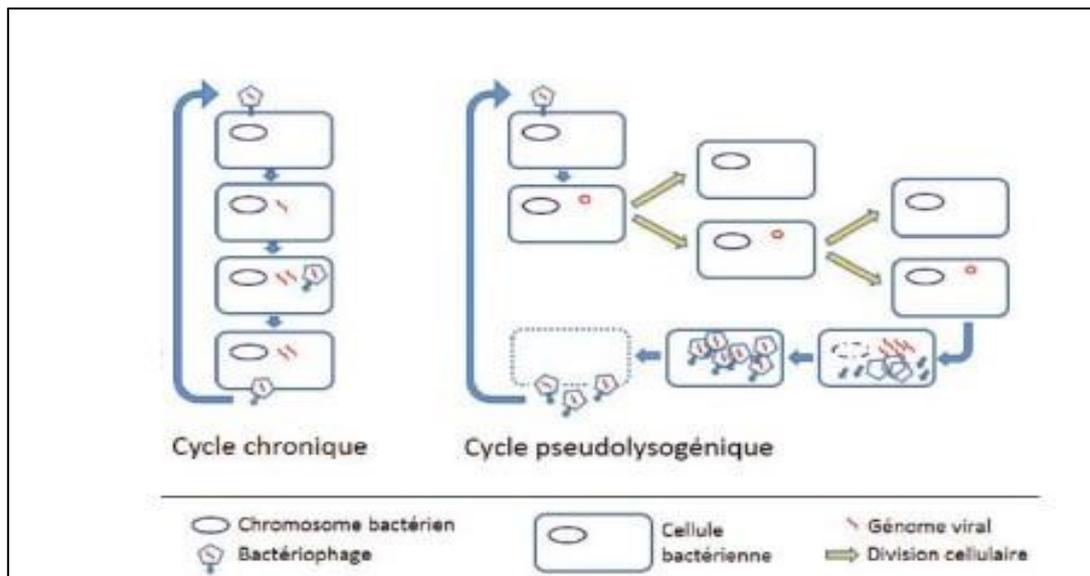
#### a- Cycle chronique (phages filamenteux)

Le cycle chronique n'a été décrit que pour une espèce de phages, les phages M13 du genre inovirus. En effet, dans leur cas, la libération de nouveaux virions se fait par bourgeonnement. La bactérie est alors préservée de la lyse et reste porteuse de façon chronique du génome phagique. Cette invasion ne détruit généralement pas les bactéries et n'est donc pas intéressante en ce qui concerne la phagothérapie (Magin, 2019 ; Ibnourras, 2017).

#### b- Cycle pseudolysogénique

Le cycle pseudolysogénique ou pseudolysogénie est un état particulier, entre le cycle lytique et lysogénique. Dans ce cas, le matériel génétique du phage est injecté dans la bactérie puis reste quiescent dans la cellule comme un plasmide. Cette dernière n'est pas répliquée et n'est pas réparti de manière égale au moment de la division cellulaire (Guillaume, 2020 ; Auguet, 2005).

Le génome peut être transmis ainsi pendant plusieurs générations puis le phage peut finir par entrer en cycle lysogène ou lytique (Guillaume, 2020).



**Figure 6:** cycles chronique et pseudolysogénique des bactériophages (Dufour et al., 2016).

### III. Les applications antibactériennes de bactériophages

La phagothérapie a montré un potentiel important, comme le soulignent diverses études *in vitro* et *in vivo* réalisées dans le passé contre une gamme d'infections bactériennes. Les résultats indiquent que cette thérapie a un immense potentiel avec des applications en médecine humaine ainsi qu'en sciences vétérinaires, en agriculture et dans le secteur alimentaire (Kaur et al., 2021).

#### 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, comme son nom l'indique, consiste à utiliser les bactériophages pour tuer les bactéries pathogènes (Raynaud, 2020).

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

La fut découverte par Félix d'Hérelle et appliquée pour la première fois à l'Hôpital Necker, en 1919 (**Lucile, 2020**).

### **1.2. Principe d'utilisation de la phagothérapie**

La phagothérapie, ou thérapie phagique, repose sur le principe de bactéricidie, c'est-à-dire la mort des bactéries, entraînée par le mode de reproduction des bactériophages ;

En effet, comme tous les virus, les phages sont des parasites obligatoires, ils sont donc utiliser la machinerie de la cellule hôte pour la synthèse de leurs constituants, la libération des nouveaux virus entraîne la destruction de la bactérie hôte. C'est cette propriété des phages lytiques qui est utilisée en phagothérapie ;

L'action bactéricide des phages présente quelques spécificités dues à la nature virale de ces entités ;

→ Spécificité d'action : chaque bactériophage étant spécifique d'une espèce bactérienne cela entraîne un spectre d'action étroit avec une action ciblée sur telle ou telle bactérie ;

→ Rapidité d'action : un cycle phagique étant plus rapide que celui des bactéries (en moyenne 30 minutes contre une heure pour les bactéries) ;

→ Croissance exponentielle : Chaque cycle de multiplication donne lieu à la synthèse de 30 à 300 phages par bactérie jusqu'à disparition de toute bactérie ;

L'objectif final est de créer un traitement « sur mesure » en entraînant les phages contre une bactérie précisément responsable de l'infection d'un patient, de rendre sa résistance plus difficile et d'améliorer l'efficacité du traitement (**Guillaume, 2020**).

### **1.3. Résistance bactérienne contre bactériophage**

Une bactérie résiste à un phage quand elle n'est pas reconnue par ce phage, ou qu'elle bloque une étape de son infection. La résistance est partielle quand la productivité du phage est seulement diminuée et elle est totale quand aucun virus de deuxième génération n'est produit. Ce phénotype de résistance peut être contournable ou absolu, si un bactériophage pouvant infecter cette souche a été isolé ou non (**Cavalié Michel, 2010**).

### **1.4. Différences entre bactériophages et antibiotiques**

Les bactériophages sont une alternative thérapeutique intéressante par apport à l'antibiotique grâce à plusieurs avantages dont (**kolenda, 2019**).

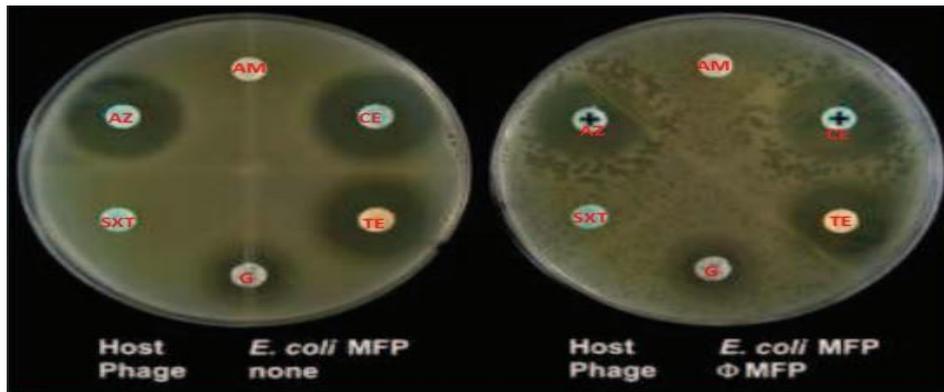
Le tableau ci-dessous permet d'illustrer les principales différences entre bactériophages et antibiotiques. (**Lucile, 2020**).

**Tableau 2 : Comparaison antibiotiques et bactériophages (Lucile, 2020).**

<b>Antibiotiques</b>	<b>Bactériophages</b>
Non vivant	Apparenté au vivant
Synthétique	Naturel
Production industrielle standardisable	Production plus artisanale, difficilement Standardisable
Stockage facile	Nécessité de l'entretien des cultures
Coût de production peu élevé	Coût de production élevé
Plus ou moins spécifique en fonction du spectre	Très spécifique d'une bactérie
Traitement standardisable	Traitement personnalisé de l'individu et de ses Bactéries
Facilité de la réalisation d'essais thérapeutiques	Difficulté de réalisation des essais Thérapeutiques
Pharmacocinétique et pharmacodynamie Connues	Pharmacocinétique et pharmacodynamie encore mal connues
Dégradation par l'organisme, concentration décroissante dans le temps	Multiplication dans l'organisme, concentration exponentielle au sein du site infecté
Favorise l'antibiorésistance	Ne favorise pas l'antibiorésistance

### **1.5. Association synergique des bactériophages avec l'antibiotique**

L'effet synergique de l'association entre bactériophages et antibiotique est supérieur à la somme des effets des deux agents utilisés séparément, a été démontré dans de nombreuses études in vitro pour différentes classes d'antibiotiques cette synergie est expliquée par le fait que des concentrations subinhibitrices d'antibiotique peuvent stimuler la production de bactériophages par la bactérie infectée. Ont montré qu'un retard de la lyse des bactéries infectées par des bactériophages était observé en cas d'utilisation concomitante d'antibiotiques, permettant un allongement du temps pendant lequel de nouveaux virions pouvaient être assemblés au sein de la bactérie (Kolenda, 2019).



**Figure 7:** Illustration de l'effet synergique Entre antibiotiques et bactériophages (Kolenda, 2019).

## 2- Autres applications

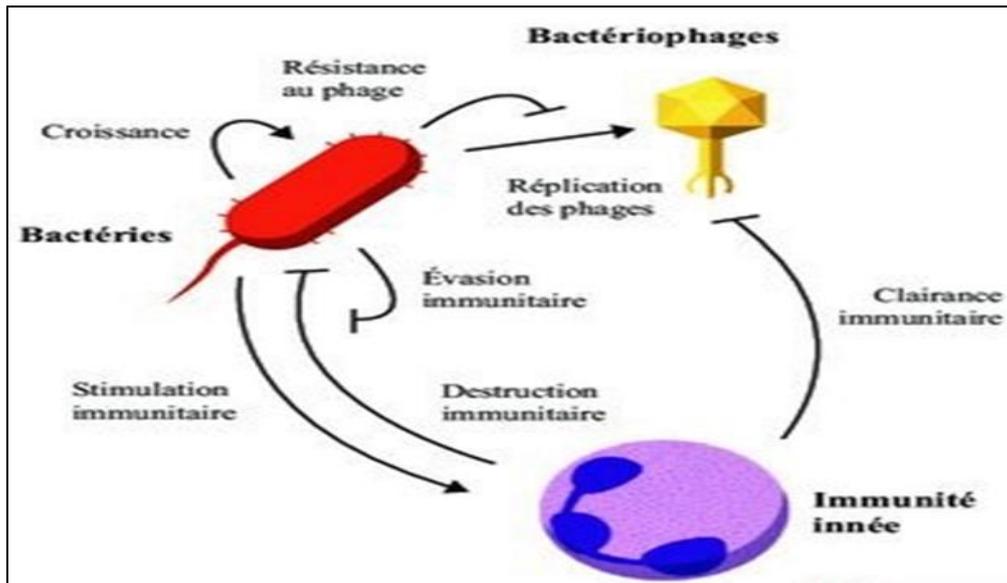
### 2.1. Bactériophages en médecine humaine

Actuellement, la prévalence croissante des infections causées par des bactéries multirésistantes est inquiétante. Il est ainsi devenu urgent de développer de nouvelles stratégies anti-infectieuses. Si l'utilisation des bactériophages comme agents antibactériens n'est pas une solution universelle, elle est réaliste tant en termes économiques que temporels. À la lumière des connaissances fondamentales obtenues au cours de plus de 100 années de recherche, des approches médicales et scientifiques rigoureuses se mettent aujourd'hui en place pour lever les derniers obstacles à la réintroduction de la phagothérapie en médecine humaine dans les pays ayant oublié ou négligé cette approche thérapeutique (Ansaldi et al., 2020).

### 2.2. Rôle des phages dans l'immunité

L'immunité au sens médical et l'infection du terme caractérisent un état dans lequel des personnes résistantes, sans exposition à des troubles pathologiques, bénéficient d'un agent pathogène (bactéries, virus, parasites). Les bactériophages ont un rôle direct et indirect dans l'immunité, c'est-à-dire dans le traitement de certaines maladies antibactériennes : Les bactériophages sont l'agent direct de l'immunité antimicrobienne chez un animal sensible (Dublanchaet, 2009).

Les phages sont capables stimuler à la fois l'immunité cellulaire et humorale (González-Mora et al., 2020).



**Figure 8:** Représentation schématique des interactions multiples entre bactériophage, bactérie et cellules de l'immunité innée (Ansaldo et al., 2020).

L'administration parentérale du phage aide à surmonter les barrières de défense innées de l'organisme, permettant au phage d'atteindre rapidement la circulation systémique et de montrer un effet thérapeutique plus élevé, en particulier lors du traitement de conditions urgentes telles que la bactériémie ou la septicémie (Kaur et al., 2021).

### 2.3. Biologie moléculaire

La biologie moléculaire on estime que les virus bactériens, ou bactériophages, sont les entités les plus répandues et les plus diverses de la biosphère. De la recherche initiale définissant la nature des virus, au déchiffrement des principes fondamentaux de la vie, au développement de la science de la biologie moléculaire, les phages ont été des «organismes modèles» pour sonder la chimie de base de la vie. Avec les progrès technologiques les plus récents, notamment la capacité d'élucider les séquences génomiques des phages et de leurs hôtes bactériens, il y a eu un regain d'intérêt pour les phages à mesure que davantage d'informations sont générées concernant leur biologie, leur écologie et leur nature diversifiée (Mc Grath et Van Sinderen, 2007).

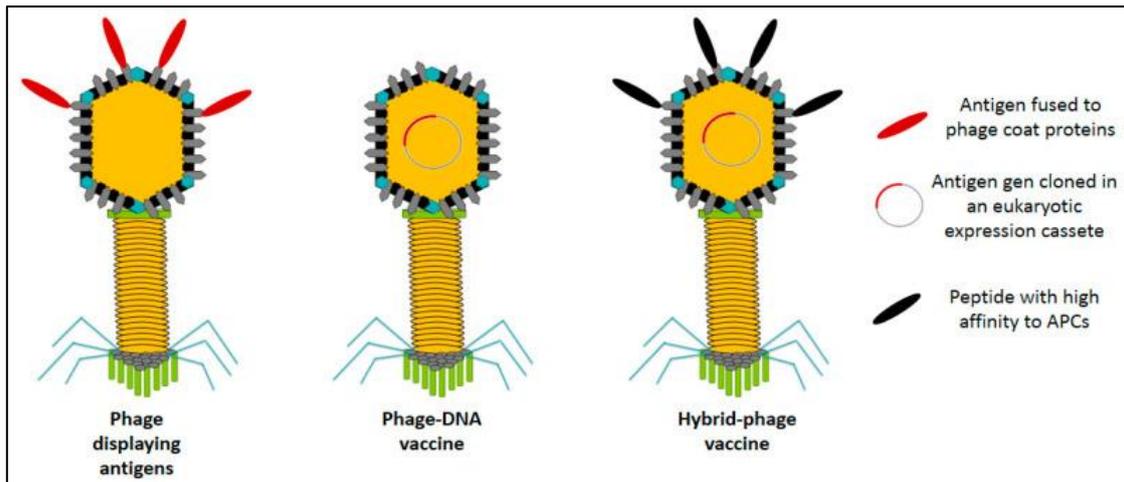
Les contributions de l'étude des phages à la biologie moléculaire moderne sont très importantes et utilisées quotidiennement sans que l'on se rappelle parfois l'origine de ces techniques, qu'il s'agisse des systèmes de transcription *in vitro* utilisant la polymérase du bactériophage T7 ou des systèmes de clonage par recombinaison site-spécifique de type Cre-lox, ou C31, qui permettent le clonage à haut débit et sans cicatrice (Ansaldo et al., 2020).

À l'heure actuelle, l'une des dernières technologies de séquençage à haut débit (PAC Bio) utilise les propriétés de l'ADN polymérase du bactériophage 29 dont la récessivité très importante permet le séquençage de longs fragments d'ADN, en particulier, les applications spectaculaires des systèmes anti bactériophages, mieux connus sous les noms de ciseaux moléculaires ou CRISPR-Cas9, les bactériophages vont continuer à jouer un rôle majeur dans les développements futurs de la biologie moléculaire (**Ansaldi et al., 2020**).

#### **2.4. Les vaccins à base de phages**

Les vaccins à base de germes sont une alternative puissante pour surmonter les limites des vaccins conventionnels. Cette approche tire parti des propriétés inhérentes aux phages pour améliorer la stabilité et l'immunité des antigènes présentés. Les vaccins à base de phages peuvent être développés avec des outils moléculaires améliorés qui permettent la manipulation des génomes des phages grâce à la technologie de présentation des phages, en tirant parti des domaines améliorés de la microbiologie, de la physiologie et de l'immunologie. Bien que de nombreux vaccins à base de phages aient été développés pour des applications humaines, les méthodes vétérinaires ont gagné en importance sur ce marché car les réglementations sont plus flexibles. À cet égard, la technique des phages recombinants représente une solution possible pour surmonter les limites des vaccins actuels. De plus, la demande croissante de nouveaux vaccins contre les agents pathogènes émergents peut être satisfaite grâce à l'approche du vaccin phagique. Actuellement, il existe deux principaux types de vaccins phagiques qui sont largement reconnus :

- (1) Vaccins à affichage sur phage ;
- (2) Vaccins à ADN phage. La combinaison de ces deux stratégies a conduit au développement d'une troisième stratégie,
- (3) Vaccin à phage hybride (**Gonzalez Mora et al., 2020**).



**Figure 9:** Les différentes approches basées sur les phages pour la délivrance d'antigènes (González-Mora et al., 2020).

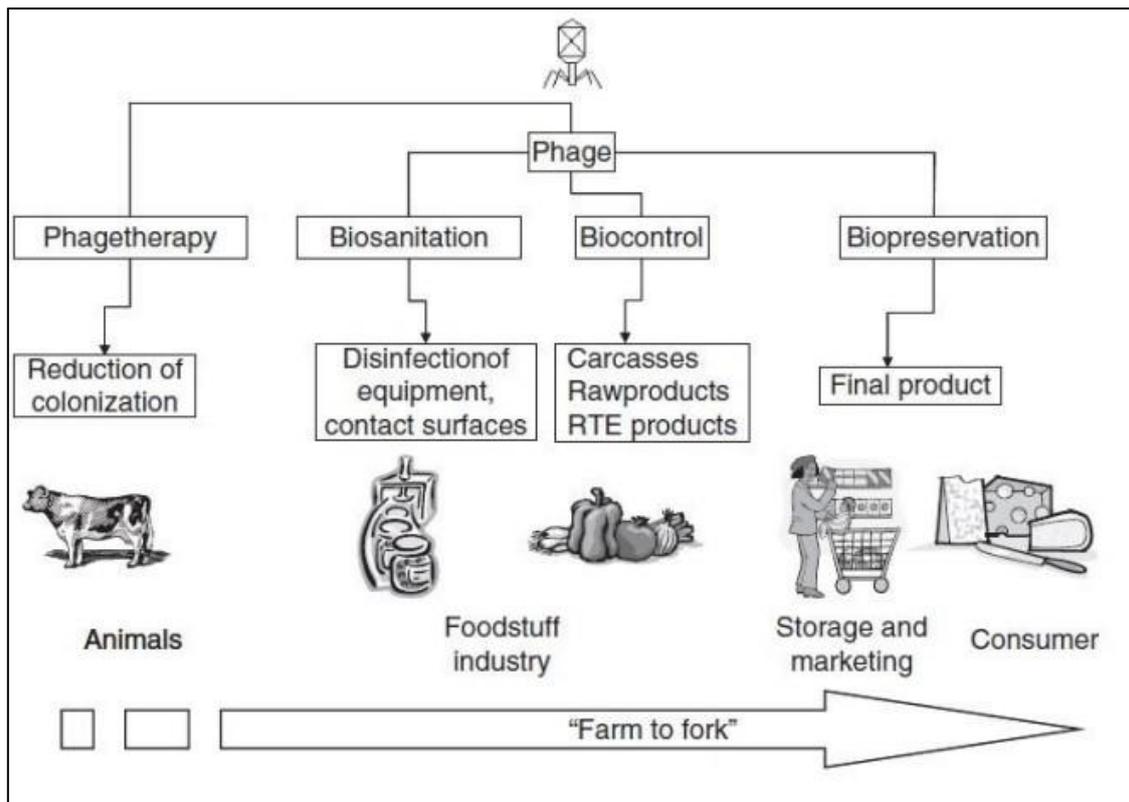
## 2.5. La sécurité alimentaire

La phagothérapie est une approche qui participe à la prévention vis-à-vis des bactéries pathogènes tout au long de la chaîne alimentaire, des matières premières aux produits finis. Différents critères sont préconisés. L'utilisation de cocktails de phages virulents (burst size élevé et phase de latence courte) (Jaomanjaka, 2014).

Les aliments souvent contaminés par une bactérie appelée *Listeria monocytogenes*, Si, pour de multiples raisons, la commercialisation des bactériophages thérapeutiques à usage médical semble encore loin d'être opérationnelle, l'intérêt d'utiliser des phages dans d'autres domaines n'a pas échappé à l'attention de deux sociétés, l'une en Europe, l'autre aux États - Unis.

Ces sociétés ont imaginé de disperser des phages spécifiques sur certains aliments frais (< ready - to - eat >) comme la viande de volailles, les fromages, ... avant leur emballage. C'est la première application contre le risque de contamination bactérienne de produits alimentaires destinés à la consommation humaine (Dublanche, 2009).

Les agents responsables les plus fréquents sont l'entérotoxine *staphylococcique* (29 %), *Bacillus cereus* (21 %) et *Salmonella* (19 %). Ces bactéries sont des pathogènes environnementaux, qui peuvent contaminer les aliments au cours de leur production, ou peuvent déjà être présentes naturellement au sein de la flore intestinale des animaux (Jaomanjaka, 2014).



**Figure 10:** utilisation des phages en sécurité alimentaire (Jaomanjaka, 2014).

## 2.6. Agriculture

Les phages sont apparus au début du XX<sup>ème</sup> siècle comme des agents antibactériens prometteurs pour le traitement des maladies des plantes en raison de sa grande spécificité, Il n'y a pas aucun impact négatif sur les humains ou les animaux, et aucun pollution environnementale ou résidus, l'assainissement des phages est l'un des moyens les plus pratiques de remplacer les contrôles chimiques dans l'agriculture (Korniienko et al., 2022).

Il existe une variété de protocoles d'application de phage, Comprend les étapes suivantes :

- (1) isolement du phage de l'environnement naturel, probablement du matériau où la bactérie hôte se développe activement, (c'est-à-dire, légumes pourris ou eaux usées) ;
- (2) Caractérisation des phages (morphologie, propriétés biochimiques...etc) ;
- (3) Des tests antibactériens sont effectués en laboratoire et in vivo ;
- (4) Améliorer le cocktail de phages Pour la lutte biologique ;
- (5) La majorité des études se déroulent en laboratoire ou conditions de serre ;

Le traitement a été utilisé soit comme enrobage de semences, soit ajouté à une suspension de sol, soit pulvérisé sur des plantes végétatives sous forme de pulvérisation. Une demande croissante de produits de "qualité biologique" ainsi que des limitations strictes de l'édition du

génomique dans la production alimentaire rendent le traitement des plantes Les maladies un défi non négligeable (**Korniienko et al., 2022**).

### **2.7. L'application des bactériophages dans l'environnement marin**

Le rejet des eaux usées dans le milieu marin entraîne de graves problèmes de santé, parce que les méthodes de traitement des eaux usées n'éliminent que les solides en suspension avec un degré d'élimination des agents pathogènes. L'énumération rapide, facile et rentable, la détection de bactériophages et leur persistance dans l'eau en plus de leur forte concentration existent dans des zones contaminées par des restes fécaux encouragés leur utilisation comme indicateurs de la qualité de l'eau (**Hassan et al., 2020**).

Ont suggéré l'utilisation de phages somatiques comme indicateur de virus entérique pathogènes que les coliformes fécaux actuels et que ces phages joueront un rôle vital dans la planification future des soins de santé (**Hassan et al., 2020**).

### **2.8. L'élimination des biofilms par des bactériophages**

Les biofilms sont des amas de bactéries qui vivent en association avec les surfaces. Leur principale caractéristique est que les bactéries à l'intérieur des biofilms sont fixées à d'autres cellules bactériennes et à la surface par une matrice polymérique extracellulaire. Les biofilms sont capables d'adhérer à une grande variété de surfaces, à la fois biotiques et abiotiques, y compris les tissus humains, les dispositifs médicaux et d'autres matériaux. Sur ces surfaces, les biofilms représentent une menace majeure causant des maladies infectieuses et des pertes économiques (**Ferriol-Gonzaláz and Domingo-Calap, 2020**).

La formation de biofilms bactériens est souvent considérée comme un facteur de virulence. Les antibiotiques ne conviennent pas pour éliminer les biofilms, principalement en raison de la tolérance aux antibiotiques des bactéries présentes dans les biofilms. Compte tenu du rôle que jouent les biofilms dans la tolérance et la résistance aux antibiotiques, de nouveaux traitements visant à les éliminer sont nécessaires, et les bactériophages pourraient constituer une alternative intéressante. Cependant, l'utilisation commerciale des phages est encore naissante en raison de plusieurs préoccupations. D'une part, il n'y a pas de lois pour leur licence, vente et distribution spécifiques. En revanche, du fait de l'absence de réglementation de leur utilisation chez l'homme, les essais cliniques sont sous-représentés (**Ferriol-Gonzaláz et Domingo-Calap, 2020**).

Les bactériophages agissent différemment sur les bactéries contenues dans les biofilms que les antibiotiques chimiques ou les biocides. En effet, on peut faire valoir que les phages ont

co-évolué avec les biofilms bactériens, et donc, leur infection des populations bactériennes adhérentes serait attendue. Il existe au moins quatre mécanismes sous-jacents à cette différence :

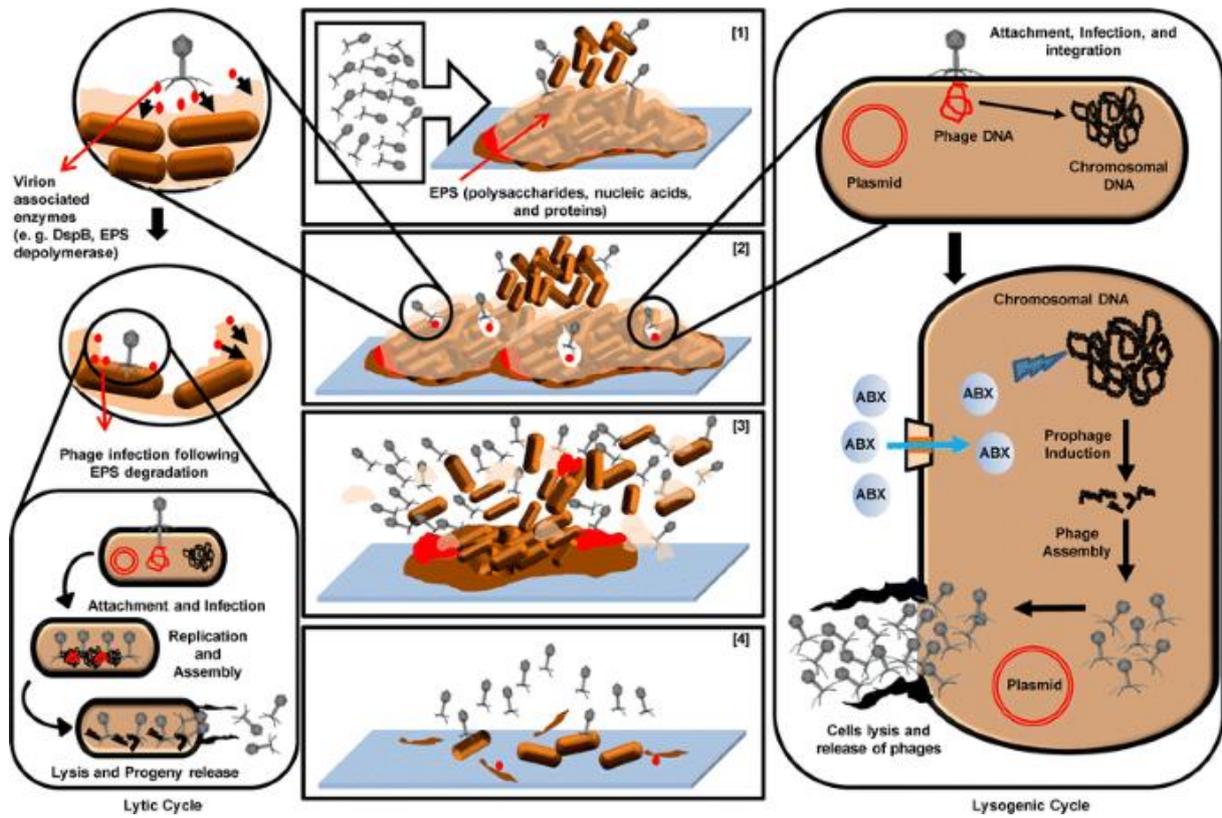
1- Les bactériophages se répliquent dans leurs cellules hôtes, ce qui entraîne une augmentation localisée du nombre de bactériophages (amplification). Cela libère un nombre croissant de bactériophages de progéniture infectieuse dans le biofilm. En se propageant à travers le biofilm, en éliminant les bactéries produisant le matériau EPS, les bactériophages peuvent progressivement éliminer le biofilm et réduire le potentiel de régénération ;

2- Les bactériophages peuvent transporter ou exprimer des enzymes dépolymérisantes qui dégradent l'EPS ;

3- Les bactériophages peuvent induire des enzymes dépolymérisantes qui dégradent l'EPS à partir du génome de l'hôte ;

4- Les cellules persistantes peuvent être infectées par des bactériophages ; bien que les bactériophages ne puissent pas se répliquer dans les cellules inactives et les détruire, ils peuvent rester dans ces bactéries jusqu'à ce qu'ils se réactivent, puis commencent une infection productive, qui détruit ensuite les cellules (**Harper et al., 2014**).

Les phages ont également la particularité de s'attaquer au biofilm bactérien qui se forme sur des surfaces, et qui résiste aux agents antimicrobiens classiques comme les antibiotiques. L'utilisation de phages sur du biofilm bactérien peut ensuite rendre plus efficace un traitement antibiotique. Un traitement par phages et un traitement antibiotique peuvent ainsi se combiner. Bien que les phages aient été proposés comme moyen de détruire ou de contrôler les biofilms, la technologie pour cela n'a pas encore été développée avec succès (**Procaccia, 2021 ; Sutherland et al., 2004**).



**Figure 11:** Les étapes d'élimination d'un biofilm par bactériophages (Mohagheh Motlagh et al., 2016).



# **Matériels et Méthodes**

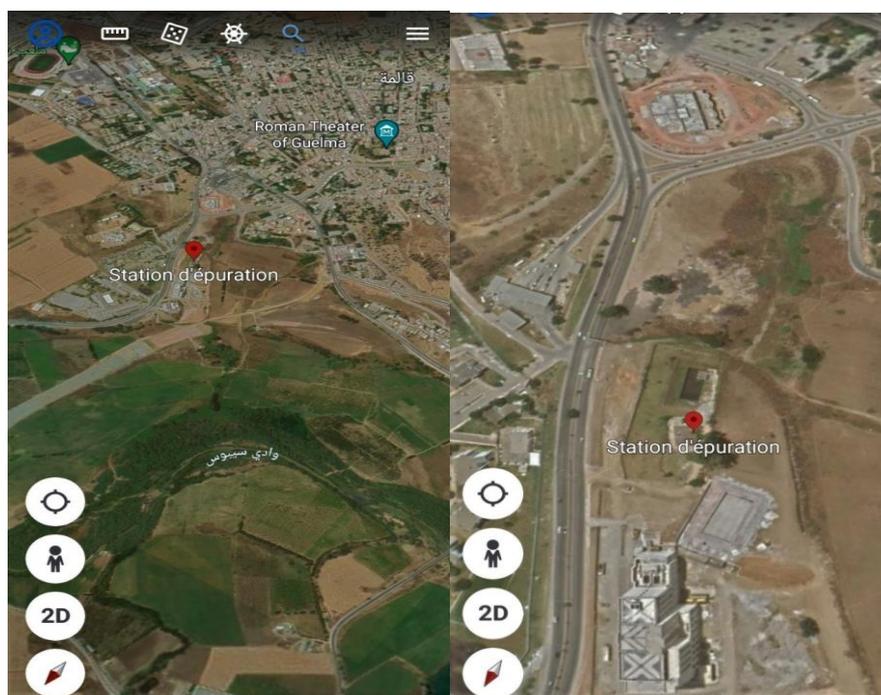
Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie du département de biologie, université 8 Mai 1945 Guelma.

Rappelons que notre étude a pour but d'isoler les bactériophages à partir de deux types de boues (semi-solide et liquide) et les appliquer sur les bactéries multirésistantes aux antibiotiques.

## I. Matériels et méthodes

### 1. Présentation de la zone d'étude (oued Seybouse)

Les différents prélèvements d'échantillons ont été effectués durant la période du stage effectué du 12 avril 2022 au 12 mai 2022 au niveau de la station d'épuration des eaux usées de Guelma qui est implantée sur un terrain agricole de 7,8 hectares à 1km environ au nord de la ville de Guelma (Mameri, 2017).



**Figure 12:** Situation de la station d'épuration de Guelma (Google Earth 2022).

### 2. Prélèvement d'échantillons

Nous avons prélevé deux échantillons de boue semi-solide et de boue liquide dans les conditions du jour.

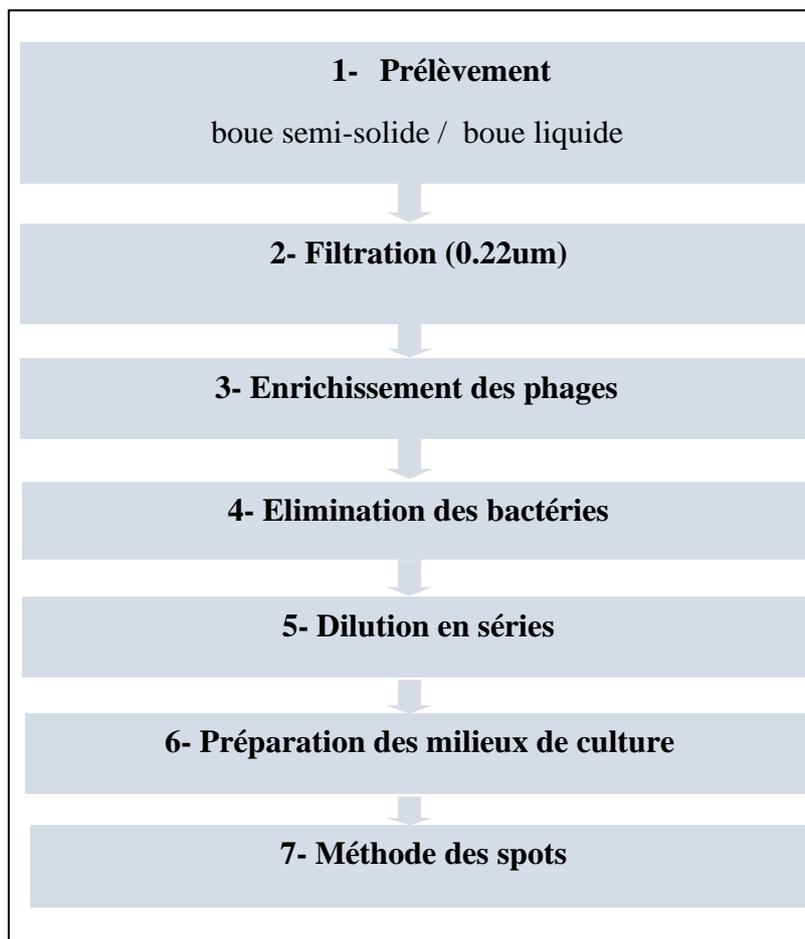
Les échantillons sont collectés dans des flacons stériles en verre de 500ml en laissant 1/10 du volume du flacon vide puis on les a transportées directement vers le laboratoire d'analyse (Droguet, 2021).

**Tableau 3:** Représentant les deux prélèvements effectués périodiquement.

Echantillons	Date	Heure	Température	Lieu du prélèvement
<b>Boue semi-solide</b>	18.04.2022	10 : 32	13°C	
<b>Boue liquide</b>	10.05.2022	9 : 55	14°C	

Dans notre travail, on a recherché la présence dans un échantillon de boue semi-solide et boue liquide de bacteriophages capables d'infecter différentes espèces de bactéries multirésistantes, de mettre en évidence leur effet antibactérien naturel et en faisant une comparaison avec l'activité des antibiotiques.

A partir de là nous avons adopté le protocole suivant :



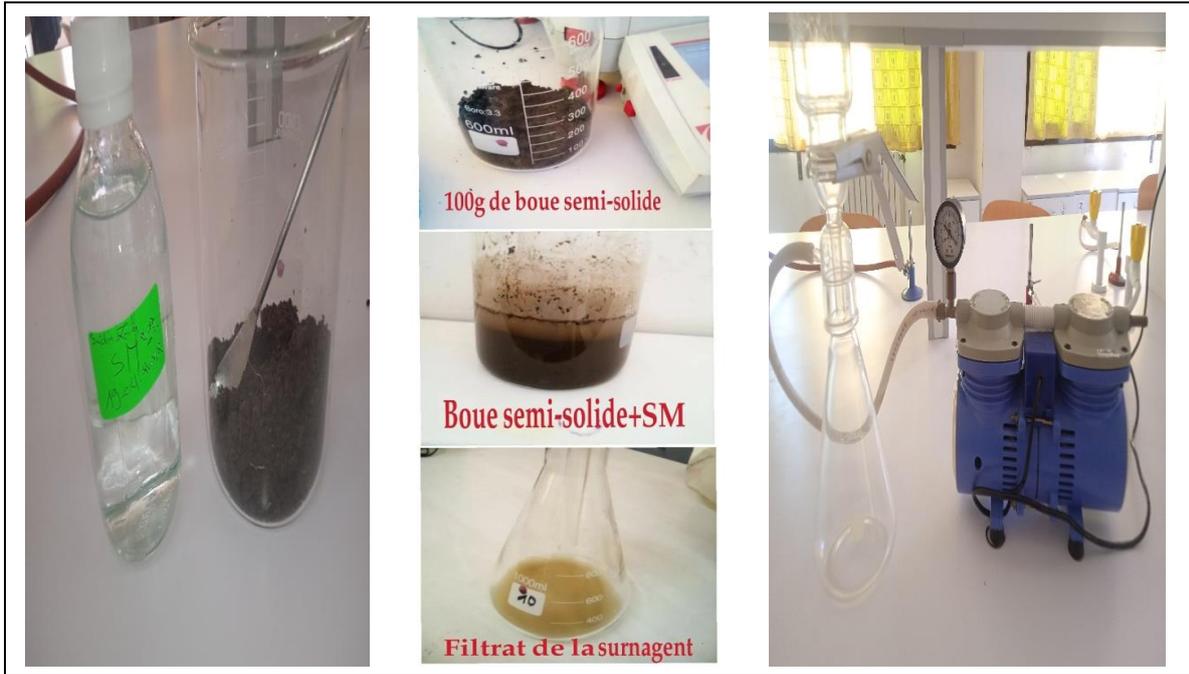
**Figure 13:** Protocole expérimental.

### 3. Isolement des bactériophages

Les bactéries ne passent pas à travers les filtres d'une porosité de 0.22 $\mu$ m. En revanche les bactériophages, plus petits passent à travers.

#### a- Filtration de boue semi-solide

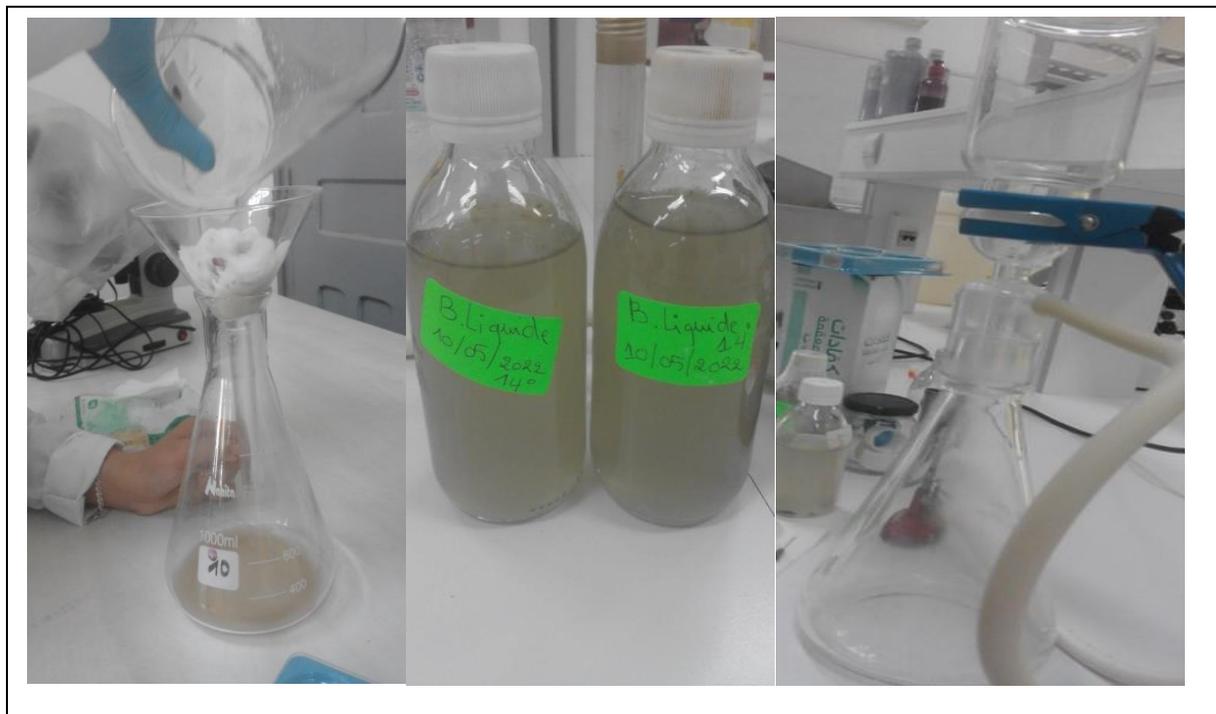
Dans le cas de ce type d'échantillon, on a suspendu 100g de boue semi-solide dans 200ml de tampon phagique SM (solution mère). Une sédimentation de 2h a été réalisée, 100ml du surnageant obtenu est filtré par la pompe à vide en utilisant une membrane de 0.22 $\mu$ m. le filtrat est conservé à 4°C jusqu'à l'utilisation (Massali and Bouaninba, 2016 ; Poxleitner et al., 2018).



**Figure 14:** Les étapes de filtration de boue semi-solide.

#### **b- Filtration de boue liquide**

Dans le cas de boue liquide on a réalisé une sédimentation pendant 2h suivie par une filtration dans un entonnoir par papier wattman de 100ml du surnageant. Une deuxième filtration par une pompe à vide en utilisant une membrane 0.22 $\mu$ m est aussi réalisée (**Poxleitner et al., 2018**).



**Figure 15:** Les étapes de filtration de boue liquide.

#### 4. Matériel biologique

Les souches bactériennes utilisées dans ce travail (*staphylococcus*, *E. coli* et *Klebsiella*) ont été prélevés au laboratoire d'analyses médicales du Dr Khalifa Bilal le 12 avril 2022, Ces souches étaient conservées sur des milieux de gélose nutritive.

##### 4.1. Le repiquage des souches

Nous avons d'abord préparé une suspension bactérienne (bouillon nutritif + bactérie) à partir de la souche conservée. Pour assurer la pureté et pour bien séparer les souches, en aensemencées les bactéries sur une gélose nutritive par des stries séparées à l'aide d'une anse suivie d'une incubation à 37°C pendant 24h.



**Figure 16:** Repiquage des souches.

##### 4.2. Confirmation des bactéries utilisées

Pour confirmer les souches avant leur utilisation on a effectué une coloration de Gram et un antibiogramme.



**Figure 17:** Préparation d'un frottis.

### 4.3. Coloration de Gram et explication

**Tableau 4:** Les étapes et le but de coloration de Gram.

Les étapes	Le but de coloration
Verser quelques gouttes de violet de gentiane sur le frottis, attendre 1 minute éliminer l'excès de violet de gentiane puis avec un peu d'eau sans insister.	Permet l'étude microscopique des bactéries mortes après fixation et coloration.
plonger la lame 1 minute dans le lugol, rincer abondamment à l'eau.	Permet de différencier des bactéries dites Gram positive de bactéries dites Gram négative.
rincer à l'éthanol des deux côtés de la lame, rincer abondamment à l'eau.	Permet d'observer :
plonger la lame 1 minute dans la fushnine, rincer abondamment à l'eau.	-la morphologie des bactéries
sécher la lame à la flamme.	-le mode de groupement
Observer au microscope optique à l'objectif $\times 100$ à l'aide d'huile à immersion de cèdre.	-la couleur : gram + ou gram-.



**Figure 18:** Les étapes de coloration de Gram.

### 5- L'enrichissement en bactériophages

On a prélevé 9 ml du filtrat « F » obtenu de chacun des prélèvements et on les a transférés dans un tube à essai stérile noté E (pour "enrichissement) auquel on a ajouté 1ml de milieu Luria Broth LB 10x (concentré dix fois). Le volume restant du filtrat a été conservé à 4 °C pour une utilisation ultérieure. À l'aide d'une anse stérile, on a prélevé un peu d'une culture bactérienne (bactéries multirésistantes) pour la resuspendre dans les 10ml de solution du tube E. Le mélange obtenu est enfin Incubé pendant 24 h à 37 °C (**Droguet, 2021**).

## 6. Elimination des bactéries

On a filtré 5 ml du milieu d'enrichissement avec une seringue à filtration stérile, dont les pores peuvent retenir les cellules bactériennes morts laissant passer les phages, après on a récupéré le filtrat dans un tube à hémolyse stérile notons EF et on l'a gardé à 4°C. Cette préparation peut être conservée au moins une année dans ces conditions (Droguet, 2021).



**Figure 19 :** Filtration du bouillon d'enrichissement par seringue de filtration.

## 7. Préparation des échantillons à tester

### 7.1. Délétion

Dans cette étape, on a effectué une série des dilutions de filtrat EF jusqu'à  $10^{-6}$ , en ajoutant 20 $\mu$ L de filtrat EF à 80 $\mu$ L de diluant (Annexe), sous un volume final égale à 100 $\mu$ L dans tubes Eppendorf stérile (Droguet, 2021).



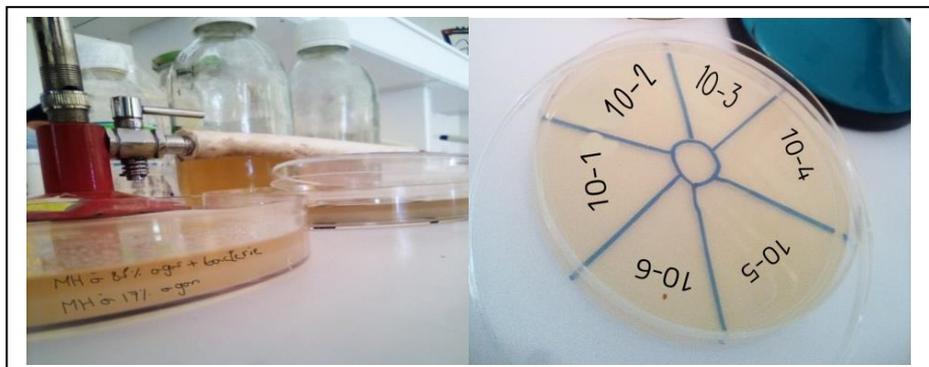
**Figure 20:** La série de dilutions.

## 8. Préparation de la double couche d'agar

On a coulé 15 ml d'agar Mueller-Hinton au fond d'une boîte de pétri stérile divisée en six parties égales, avec un cercle central de 1 cm de diamètre, et on laisse solidifier. Ensuite, nous avons préparé le bouillon de 2 heures (inoculum) en utilisant les mêmes bactéries utilisées dans l'étape d'enrichissement Après deux heures d'incubation de la suspension dans un bain-marie

agitateur à 37°C, nous en prélevons 0,2 ml par micropipette, l'ajoutons à 15 ml de MH molle à environ 45°C, puis mélangeons rapidement le contenu du tube (vortex). Ensuite on le coule immédiatement sur la première couche. Puis on la laisse refroidir.

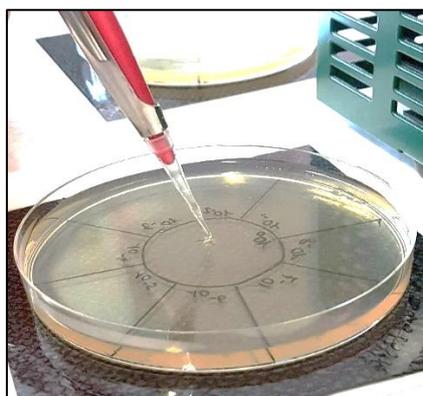
(Droguet, 2021).



**Figure 21:** Préparation des milieux de la double couche d'agar.

## 9. Technique de spots

Dans cette dernière étape à l'aide d'une micropipette nous avons ajouté lentement 5  $\mu$ l d'eau physiologique stérile au centre, puis nous avons également ajouté lentement dans chaque secteur restant 5ul du filtrat EF de la dilution la plus élevée (10-6) à la dilution la plus faible (10- 1), puis laisser sécher Sur la gélose, Quand la goutte de 5  $\mu$ L complètement disparue, On met la boîte à l'envers dans l'incubateur à 37°C pendant 24h (Droguet, 2021).



**Figure 22:** Schéma de la procédure opératoire (Droguet, 2021).

## 10. Numérations des phages

Après l'isolement et la purification, convient de s'assurer que les bactériophages ont un pouvoir de lyse qui est conditionné par un titre (nombre de PFU/ml) important (supérieur ou égal à 107).

Le lendemain, les plages de lyse ont été calculées, la concentration des phages est calculée par la formule suivante :

PFU par ml = plaques par plaque × volume étalé en ml × facteur de dilution  
(Bonilla et al., 2016).

## **II. Conservation des phages**

Un point important à considérer est la conservation de l'agent de biocontrôle et le maintien de sa concentration élevée dans l'aliment ciblé. Certains phages sont sensibles aux changements environnementaux. Le maintien de la concentration de ceux-ci en milieu liquide à 4 °C ne dépasse pas une année. Il existe aussi des phages qui ne tolèrent pas un stockage à 4°C et qui voient leur concentration chute de 70 % après un an (Bonilla et al., 2016).

# Résultats et Discussion

## I. Résultats

### 1. Résultat de la Filtration

Les résultats de filtration avec une pompe à vide stérile sur membrane de porosité  $0,22\mu\text{m}$  sont montrés dans la figure 23.

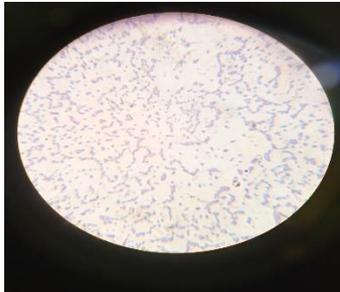


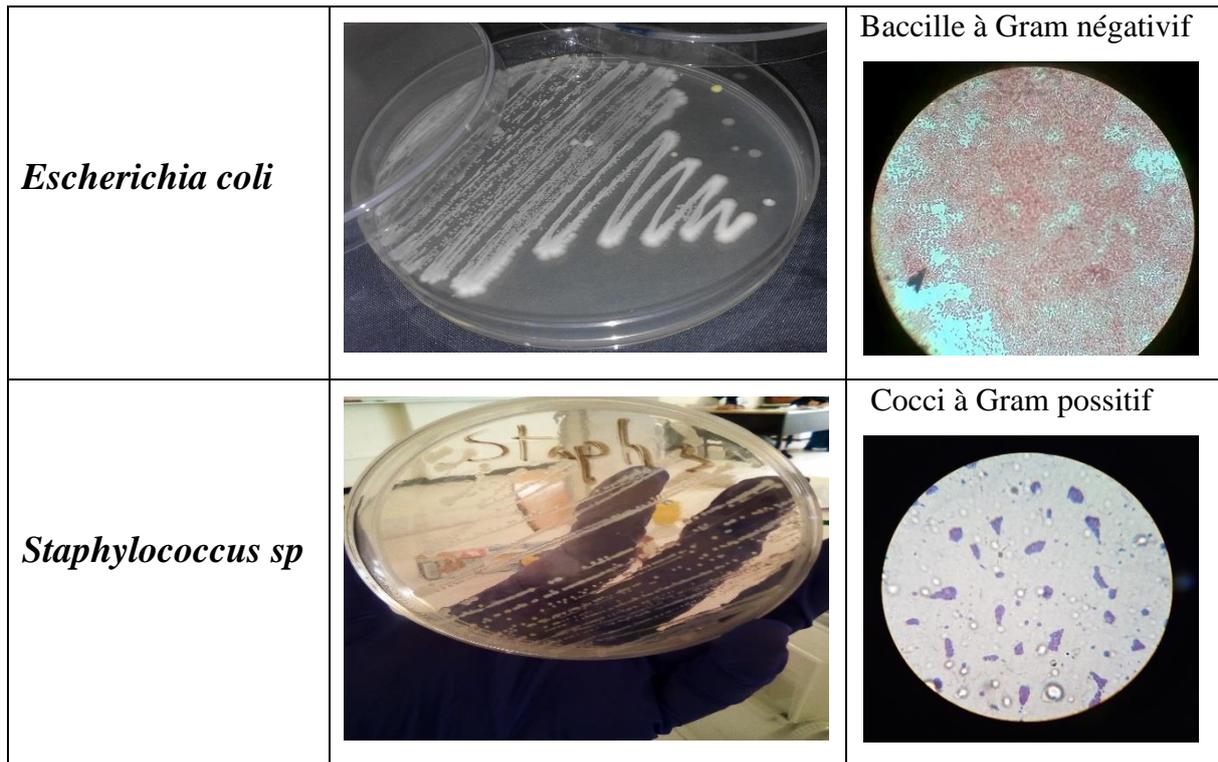
Figure 23: Résultat de filtre de boue semi-solide et boue liquide.

### 2. Résultat de Coloration de Gram

L'étude macroscopique des bactéries à étudier et la coloration de Gram réalisée sont présentés dans le tableau 5.

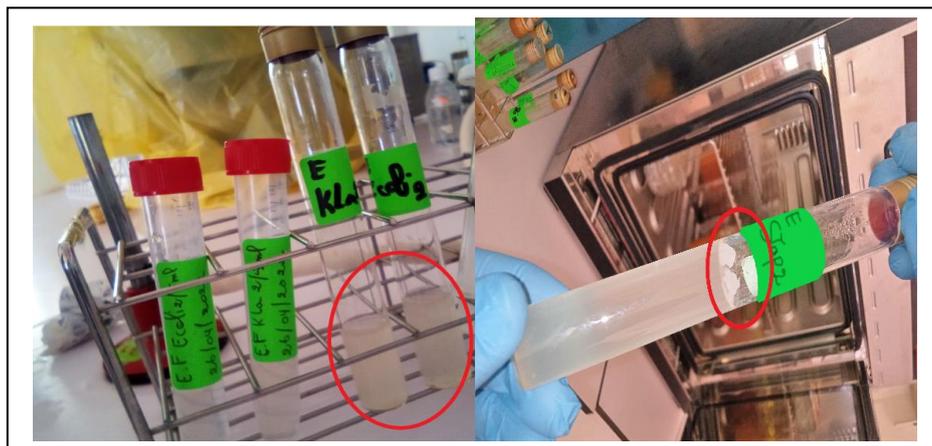
Tableau 5: Résultats macroscopie et microscopique des bactéries.

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



### 3. Résultat de l'enrichissement

Après avoir éliminé les bactéries dans les échantillons par filtration, nous avons effectué un processus d'enrichissement en ajoutant un échantillon de bactéries au filtre et en le laissant incuber pendant la nuit pour augmenter le nombre de phage éventuellement présents dans nos échantillons de boue, le résultat est illustré dans la figure 24.



**Figure 24:** Les résultats d'enrichissement.

Nous avons observé une masse (comme un nuage) dans le tube auquel nous avons ajouté des bactéries *Staphylococcus*, ce qui indique que les bactéries étaient lysés. Par conséquent nous disons que le filtre contient des phages.

#### 4. Résultat de méthode de spots

Après le processus d'enrichissement, nous avons préparé trois boîtes de pétri de doubles couches d'agar pour effectuer le test des spots.

Après la période d'incubation de 24h à 37 °C, on remarque l'apparition des zones sans bactéries autour des zones auxquelles on ajoute une goutte du filtre d'enrichissement dilué, c'est ce qu'on appelle la plage de lyse ou la zone d'inhibition bactérienne, ce n'est que pour les *Staphylococcus*, mais pour *E. coli* et *Klebsiella* aucun résultat observé, on dit donc que les phages isolés par notre méthode ne sont actifs que sur les *staphylococcus sp.* De manière spécifique.



**Figure 25:** Les résultats de méthode de spots bactérienne.

Nous avons également observé des changements dans le diamètre de la plage de lyse à chaque dilution.

**Tableau 6:** Diamètre de plage de lyse dans chaque dilution.

Dilution	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
Diamètre de plage de lyse (mm)	25	17	17	15	14	10

## II. Discussion

Les infections bactériennes ont toujours été un problème pour le corps médical. Pendant longtemps, la seule possibilité disponible pour lutter contre les bactéries était d'empêcher l'infection, par l'hygiène et la désinfection. Puis sont apparus les vaccins, complétant ces mesures. Enfin, il a été de plus possible de traiter une infection bactérienne en place, en employant un ou plusieurs antibiotiques. Ces médicaments furent un véritable salut, permettant de diminuer sensiblement la mortalité liée aux infections. Contrairement aux antibiotiques, les bactéries sont capables d'évoluer d'elles-mêmes. Mais les bactéries, contrairement à ces molécules « fixes », sont capables d'évoluer d'elles-mêmes. C'est ainsi que sont très vite apparues les premières résistances bactériennes aux antibiotiques. Mais les scientifiques ont su pallier à ces résistances en fabriquant d'autres antibiotiques, passant outre les mécanismes de résistances déployés par les bactéries. Cependant, progressivement, ces dernières apprirent à contourner ces nouvelles molécules, et des bactéries résistantes à tous les antibiotiques ont finalement vues le jour, tandis que l'innovation scientifique s'essouffait peu à peu. Aujourd'hui, les problèmes liés à ces bactéries multirésistantes sont réels, et il devient urgent de trouver une alternative thérapeutique à l'emploi massif, inadapté et inappropriés, cause principale de l'apparition de cette résistance. Pour faire face à ce problème, l'inventaire des solutions envisageables indique que les phages pourraient constituer une réponse, d'autant que des travaux récents, soutenus par la biologie moléculaire, ont révélé des aptitudes jusque-là insoupçonnées de certains d'entre eux. Mais l'utilisation des phages de nature biologique comme médicaments impose une approche appropriée, tant d'un point de vue expérimental que réglementaire (Neurohr, 2016 ; Dublanche et Patey, 2015).

Le premier objectif de cette étude était d'isoler des phages à partir d'échantillons de boues semi-solides et de boues liquides à l'aide de deux méthodes, puis de les appliquer à des

bactéries multi résistantes aux antibiotiques. Notre deuxième objectif était d'appliquer les phages isolés sur les bactéries multi résistantes et de les comparer aux d'antibiotiques en termes d'efficacité de chacun, et d'étudier la possibilité de faire du traitement par phage une alternative à celui-ci.

La filtration appliquée à l'aide d'une membrane de 0,22 µm ne permet que le passage des phages, considérée comme plus sûre que l'utilisation d'autre membrane de plus grand porosité.

L'apparition d'une masse blanche uniquement dans le filtre d'enrichissement contenant *staphylococcus sp*, alors que les autres bactéries (*E. coli*, *klebsiella*) n'y donnent pas le même résultat. Ce résultat est la conséquence de l'effet spécifique des bactériophages.

Au test des spots : les résultats ont montré la présence de zones inhibitrices (25 mm à la concentration 10<sup>-1</sup>) dans la boîte de Pétri contenant uniquement *Staphylococcus sp*, alors qu'elles n'ont pas été observées dans le reste des boîtes (*d'E. coli et Klebsiella*).

Au test antibiogramme de *Staphylococcus sp*. Réalisé au laboratoire médicale d'analyses où s'effectué l'isolement de la souche d'étude à partir d'un prélèvement pathologique, le résultat a montré des zones inhibitrices (20 mm pour la tétracycline). A travers ces résultats et en les comparants entre eux, on peut dire que les bactériophages ont un effet plus important que l'effet de certains antibiotiques dans l'élimination des bactéries multirésistantes.

Cette étude n'était pas la première à utiliser et isoler des phages, une recherche précédente de **Massali et Bouaninaba en 2016** portant sur l'isolement des phages à partir d'un échantillon de sol et les filtrés à l'aide d'une membrane de 0,22 µm, mais les résultats étaient négatifs comme ils l'ont mentionné, sauf dans un seul isolat. Ce travail est semblable à notre recherche.

Dans une autre recherche menée par **Benbouaziz et Satour en 2014**, qui ont également isolé des phages des eaux usées et des boues mixtes et les ont filtrés à travers une membrane de 0,22 µm, puis les ont appliqués sur deux souches bactériennes *E. coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas* ATCC 27853 mais cette étude n'a pas donné de résultats positifs.

La phagothérapie peut être une solution alternative pour lutter contre cette menace, Mais la communauté scientifique n'a pas été en mesure de développer la phagothérapie par crainte d'effets indésirables sur la santé humaine. Cependant, la possibilité d'une utilisation combinée de différents types de phagothérapie avec d'autres thérapies plus classique comme l'antibiothérapie, la phagothérapie est autorisée à s'installer un traitement prometteur est en cours de développement au cours des prochaines années (**Breton, 2019**).

# Conclusion

## Conclusion

Depuis la découverte des antibiotiques, ils sont approuvés comme la seule solution pour éliminer diverses bactéries pathogènes, mais en raison de cette utilisation excessive, des bactéries résistantes sont apparues. Par conséquent, le voyage de recherche a commencé par les scientifiques pour trouver de nouvelles solutions à ce problème, et il a été constaté qu'il est préférable d'utiliser des méthodes naturelles, qui sont des phages, comme alternative aux antibiotiques, ces derniers étant des virus qui tuent et détruisent les bactéries cibles. Dans cette recherche, nous avons effectuée l'isolement des phages à partir de différents échantillons (boues liquides et boues semi-solides) qui ont été prélevés de la station d'épuration de Wilaya de Guelma, dans le but de les extraire et de les appliquer aux bactéries multi résistantes.

Les résultats que nous avons obtenus par le test des spots et les avoir incubés, ont clairement montré que les phages isolés interagissent de manière spécifique sur les bactéries où nous avons remarqué la présence des plages de lyse uniquement sur *Staphylococcus sp.* Mais il n'y a pas de résultats significatifs avec les souches bactériennes *E. coli* et *Klebsiella*. Selon des études précédentes, on peut dire que la recherche sur les phages est encore en développement malgré les très peu d'essais *in vivo*. C'est pourquoi nous encourageons de poursuivre ce type de travaux. Nous conseillons comme perspectives :

- Procéder aux techniques de dénombrement des phages.
- Chercher des méthodes de conservation des phages dans des conditions optimales en suivant différentes méthodes pour s'assurer que leur qualité reste le plus longtemps possible.
- Utilisation des techniques avancées de biologie moléculaire, telles que les séquençages génomiques par RT-PCR.



# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

- Allard, L., 2020.** Phagothérapie, production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques par “ Phage display ” et utilisation diagnostique en tant que détecteur de bactéries (thèse). Université de Bordeaux.
- Amairi, T., 2021.** Résistance aux antibiotiques des Escherichia coli isolés des abattoirs et élevages de poulet de chair au Nord-Est d'Algérie (thèse). Université Biskra.
- Ansaldi, M., Boulanger, P., Brives, ch., Debarbieux, L., Dufour, N., Froissart, R., Gandon, S., Le Hénaff, C., Petit, M-A., Rocha, E., et al, 2020.** Les applications antibactériennes des bactériophages. 24, pp.23-36.<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02530998>
- Ansaldi, M., Boulanger, P., Brives, Ch., Dufour, N., Le Hénaff, C., Froissart, R., Gandon, S., Petit, M-A., Rocha, E., Torres-Barceló, C., 2020.** Un siècle de recherche sur les bactériophages., 24(1), pp.9-22.<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02530997>
- Arnaud, C.A., 2017.** Structure de la queue du phage T5 et mécanisme de perforation de l'enveloppe bactérienne par les siphoviridae. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes, France.
- Auguet, J.C., 2005.** Les communautés virales de l'estuaire de la Charente : Étude Des dynamiques, Université de La Rochelle, France.
- Benbouaziz, A., Satour, A., 2014.** Étude sur les Bactériophages et leur isolement à partir des eaux usées de la station d'épuration de Chelghoum El-Aid (Master). Université de Constantine1, Constantine.
- Bonilla, N., Rojas, MI., Cruz, GNF., Hung, SH., Rohwer, F., Barr, JJ., 2016.** Phage on tap\_a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks. PeerJ. <https://doi:10.7717/peerj.2261>
- Bourema, M., Halimi, D., 2014.** Isolement de bactériophages à partir des eaux usées et identification de leurs bactéries hôtes (Master). Frères Mentouri Constantine1, Constantine.
- Breton, A., 2019.** La phagothérapie orale. Science du vivant [q-bio], Dumas.
- Cavalié-Michel, A., 2010.** La coévolution antagoniste bactérie-bactériophage : contraintes génétiques appliquées au modèle expérimental Escherichia coli - PhiX 174. Microbiologie et parasitologie. Université Pierre et Marie curie - Paris VI, France.
- Debarbieux, L., 2021.** Bactériophage, à table ! Radio France.<https://www.radiofrance.fr/franceculture/podcasts/la-methode-scientifique/bacteriophage-a-table-8093875>

- Droguet, S., 2021.** Recherche de bactériophages. Biotechnologies au lycée. <http://droguet-sebastien.e-monsite.com/pages/activites-technologiques-terminale-2014-2015/at26-bacteriophages.html>
- Dublanchet, A., 2008.** La phagothérapie au XXI<sup>e</sup> 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., 2009.** Des virus pour combattre les infections.
- Dublanchet, A., 2017.** La phagothérapie : des virus pour combattre les infections : renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques.
- 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, 4.
- 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>
- El Haddad, L., 2014.** Utilisation des bactériophages pour le contrôle de Staphylococcus aureus dans les produits laitiers. Université de Laval - Québec, Canada.
- Errafyg, A., 2016.** Rôle de la phagothérapie dans le Traitement des infections bactérienne. Université Mohammed V–RABAT.
- Ferriol-González, C., Domingo-Calap, P., 2020.** Phages for biofilm removal. Antibiotics (Basel). <https://doi.10.3390/antibiotics9050028>
- González-Mora, A., Hernández-Pérez, J., Iqbal, H.M., Rito-Palomares, M., Benavides, J., 2020.** Vaccins à base de bactériophages : une approche puissante pour l'administration d'antigènes.
- Guillaume, F., 2020.** La phagothérapie : Une thérapeutique d'espoir face à l'antibiorésistance ? (Thèse d'exercice). Université de Limoges.
- Hamzeh, Z., 2014.** Comme exigence partielle de la maîtrise en sciences e génie des matériaux lignocellulosi(Master).Université du Québec à Trois-Rivières.

- Harper, DR., Parracho, HM., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., Lehman, S., Morales, S., 2014.** Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics* (Basel). <https://doi.10:3390/antibiotics3030270>
- Hassan, S.W.M., Abd.Elnaby, H., Abou.Elela, G.M., Abouelwafa, A.E et El-Sersy, N.A., 2020.** Bacteriophages : Ecological role in the marine environment and potential applications. Vol. 24(7) : 93 – 117
- Ibnourras, S., 2017.** Etude de la perception de la larvotherapie et phagothérapie chez les patients et les prescripteurs au maroc (thèse). Université Mohammed V-RABAT.
- Jaomanjaka, F., 2014.** Diversité des bactériophages infectant la bactérie lactique *Oenococcus oeni*, responsable de la fermentation malolactique des vins (thesis). Bordeaux, France.
- Kaur, S., Kumari, A., Kumari.Negi, A., Galav, V., Thakur, S., Agrwal, M., Sharma, V., 2021.** Nanotechnology based approaches in phage therapy: Over coming the pharmacological barriers. *Front. Pharmacol.* <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.699054>
- Kolenda, C., 2019.** Phagothérapie et infections ostéo-articulaires : évaluation de l'activité antibiofilm et antibactérienne intracellulaire d'un assemblage de trois bactériophages anti-*Staphylococcus aureus*. Université Claude Bernard, Lyon.
- Korniienko, N., Kharina, A., Budzanivska, I., Burketová, L., Kalachova, T., 2022.** Phages of phytopathogenic bacteria: High potential, but challenging application. 58,81–91.
- Lucile, G., 2020.** Histoire de phagothérapie à Lyon (Thèse d'exercice). Université de Claude Bernard–lyon 1.
- 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.
- Mameri, S., 2017.** Bactéries multirésistantes dans l'environnement : recherche dans les eaux usées de la ville de bouira.
- Massali, F.Z., Bouaninba, S., 2016.** Études sur les bactériophages du sol et leurs méthodes d'isolement (Master). Frères Mentouri Constantine1, Constantine.
- Mc Grath, S., Van sindern, D., 2007.** Bacteriophage: Genetics and molecular biology. Caister Academic Press. <https://doi.org/10.21775/9781910190753>
- Mohaghegh Motlagh, A., Shankar Bhattacharjee, A., Goel, R., 2016.** Biofilm control with natural and genetically-modified phages.
- Morgane, A., 2019.** Intérêt de la phagothérapie dans le traitement et la prévention des maladies du tube digestif (phdthesis). Université de Lille, France.

- Neurohr, S., 2016.** La phagothérapie : des virus au service de la médecine (Thèse d'exercice). Université de Lorraine, France.
- Opatowski, M., 2020.** Résistance bactérienne aux antibiotiques, apport du système national des données de santé (Thèse). Université Paris–Saclay, France.
- 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>
- Preux, O., 2013.** Assemblage et maturation de la capsidie du bactériophage T5 : analyse des processus d'expansion et de décoration (thèse). Université PARIS-SUD 11.
- Procaccia, C., 2021.** La phagothérapie : médecine d'hier et de demain. Les notes Scientifiques de l'Office, 24. <http://www.senat.fr/opecst>
- Ravat, F., Jault, P., Gabard, J., 2015.** Bactériophages et phagothérapie : utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. Ann. Burns Fire Disaster 28, 13–20
- Raynaud, S., 2020.** Étude fonctionnelle et cibles d'un ARN régulateur exprimé par le pathogène humain *Staphylococcus aureus* et impliqué dans l'internalisation des bactéries par les cellules humaines. université de Rennes 1.
- 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.
- Sutherland, LW., Hughes, KA., Skillman, LC., Tait, K., 2004.** The interaction of phage and biofilms. FEMS Microbiology Letters, Volume 232, Issue 1, Pages 1–6. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(04\)0004do](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(04)0004do)
- Vernhes, E., 2016.** Maturation de la capsidie du bactériophage T5 : étude structurale et fonctionnelle de la protéine de décoration pb10. Université PARIS–SACLZ.
- Ziai, S., 2014.** La résistance bactérienne aux antibiotiques : Apparition et stratégies de lutte (Thèse). Université de Limoges.



# Annexes

**ANNEXE 01 : Les Compositions des milieux et les solutions utilisées**

Les solutions	Les milieux
<p><b>Bouillon nutritif (BN) 1L :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Peptones : 10g</li> <li>○ Extrait de bœuf : 1g</li> <li>○ Extrait de levure : 2g</li> <li>○ Chlorure de sodium : 5g</li> <li>○ pH final 6,8 +/- 0,2 à 25°C</li> </ul>	<p><b>Milieu LB-Miller 200ml :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Peptones : 2g</li> <li>○ Extrait de levures : 1g</li> <li>○ chlorure de sodium (Na CL) : 2g</li> </ul>
<p><b>Tampon phagique (SM) : 200g</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Chlorure de sodium : 1,17g</li> <li>○ MgSo4 : 0,26g</li> <li>○ Tris : 0,0242g</li> <li>○ HCl jusqu'à pH : 7,4</li> </ul>	<p><b>Gélose Muller-Hinton 500ml :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Peptone : 8,75g</li> <li>○ Amidon : 0,75g</li> <li>○ Extrait de viande : 1,5g</li> <li>○ Agar : 8,5g</li> <li>○ pH : 7,3</li> </ul>
<p><b>Diluant 200ml :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Eau distillée stérile</li> <li>○ CaCl2 : 2,28g</li> </ul>	<p><b>Gélose molle Mueller-Hinton :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Peptone : 8,75g</li> <li>○ Amidon : 0,75g</li> <li>○ Extrait de viande : 1,5g</li> <li>○ Agar : 4,25g</li> </ul>



**ANNEXE 02 : L'Antibiogramme de *Staphylococcus sp***

<b>L'antibiotique</b>	<b>Diamètre d'inhibition</b>	<b>Diamètre critique</b>	<b>Interprétation</b>
<b>Oxacilline</b>	6	10-13	R
<b>Pénicilline</b>	6	28-29	R
<b>Amikacine</b>	18	14-17	S
<b>Gentamycine</b>	6	12-15	R
<b>Erythromycine</b>	6	13-23	R
<b>Tétracycline</b>	20	14-19	S
<b>Triméthoprim+ Sulfaméthoxazol</b>	6	12-16	R
<b>Ciprofloxacine</b>	6	14-18	R
<b>Vancomycine</b>	S		
<b>Acide fucidique</b>	R		

## Résumé

L'utilisation excessive des antibiotiques dans le monde a conduit à la propagation et à l'émergence de la résistance aux antimicrobiens. Alors que nous approchons de l'ère post-antibiotique, l'organisation mondiale de la santé a déclaré que les agents antimicrobiens figurent parmi les dix principales menaces mondiales pour la santé publique auxquelles l'humanité est confrontée c'est pourquoi la communauté scientifique devrait s'efforcer à développer des solutions alternatives, à savoir la "phagothérapie". On estime que cette dernière est l'entité la plus répandue et la plus diversifiée dans la biosphère, où il nous est facile d'isoler, C'est le but de notre étude, où nous avons isolé des phages à partir d'échantillons de boue semi-solide et boue liquide extraite de station d'épuration de Guelma, à l'aide d'une membrane à filtre poreux de 0,22  $\mu\text{m}$  puis appliquées sur trois souches des bactéries multirésistantes en suivant la méthode des spots, les résultats ont montré un effet antibactérien spécifique sur la bactérie multirésistante d'origine pathogène *Staphylococcus sp.* Dues aux bactériophages présents dans nos échantillons et l'absence de la telle activité sur les autres souches *Escherichia coli* et *Klebsiella* à cause de la spécificité d'infection des phages.

**Mots clés :** antibiotique, bactériophage, boue, isolement, filtration, bactéries multirésistantes.

## **Abstract**

The overuse of antibiotics around the world has led to the spread and emergence of antimicrobial resistance. As we approach the post-antibiotic era, the World Health Organization has declared that antimicrobial agents are among the top ten global public health threats facing humanity, which is why the scientific community should strive to develop alternative solutions, namely "phage therapy". It is estimated that the latter is the most widespread and diverse entity in the biosphere, where it is easy for us to isolate, This is the goal of our study, where we isolated phages from samples of semi-solid sludge and liquid sludge extracted from the Guelma wastewater treatment plant, using a 0.22  $\mu\text{m}$  porous filter membrane then applied to three strains of multi-resistant bacteria using the spot method, the results showed showed a specific antibacterial effect on the multiresistant bacterium of pathogenic origin *Staphylococcus sp.* Due to bacteriophages present in our samples and the absence of such activity on other *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains due to the specificity of phage infection.

**Keywords :** antibiotic, bacteriophage, sludge, isolation, filtration, multi-resistant bacteria.

## ملخص

أدى الإفراط في استخدام المضادات الحيوية في جميع أنحاء العالم إلى انتشار وظهور مقاومة مضادات الميكروبات. ومع اقترابنا من عصر ما بعد المضادات الحيوية، أعلنت منظمة الصحة العالمية أن مضادات الميكروبات هي من بين أكبر عشرة تهديدات عالمية للصحة العامة تواجه البشرية، وهذا يدعو المجتمع العلمي للسعي لتطوير حلول بديلة، وهي "العلاج بالعائيات". تشير التقديرات إلى أن الأخير هو الكيان الأكثر انتشارًا وتوعًا في المحيط الحيوي، حيث يسهل علينا عزله، وهذا هو الهدف من دراستنا، حيث قمنا بعزل العائيات من عينات الحمأة شبه الصلبة والحمأة السائلة المستخرجة من محطة معالجة مياه الصرف الصحي قالمة، باستخدام غشاء مرشح مسامي 0.22 ميكرومتر ثم تم تطبيقه على ثلاث سلالات من البكتيريا متعددة المقاومة باستخدام طريقة البقعة، وأظهرت النتائج تأثيرًا محددًا لمضادًا للبكتيريا على البكتيريا متعددة المقاومة من مسببات الأمراض *Staphylococcus sp.* بسبب العائيات الموجودة في عيناتنا وغياب مثل هذا النشاط على سلالات الإشريكية القولونية والكلبيسيلا الأخرى بسبب خصوصية عدوى العائيات.

**الكلمات المفتاحية:** مضاد حيوي، العائية، حمأة، عزل، ترشيح، بكتيريا متعددة المقاومة.