

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث 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 et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire

Département : Biologie

Thème

Isolement et application des bactériophages

Présenté par :

- BOURAGHDA chahra.
- MEBARKI chahinez.
- MERDACI lina.

Devant le jury composé de :

Président :	BENOUARETH Djamel Eddine (Prof)	Université de Guelma
Examineur :	HEMICI Ahmed (MCB)	Université de Guelma
Encadreur :	KHALLEF Messaouda (MCA)	Université de Guelma

Juin 2023

Remerciements

Nos premiers remerciements s'adressent à Dieu le tout puissant, qui nous a donné la force et le courage afin d'élaborer ce mémoire.

Remercions profondément, notre encadreur Madame {KHALLEF messaouda} pour avoir accepté la charge de ce mémoire, nous la remercions pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'elle a consenti durant la réalisation de ce mémoire. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.

Nos gratitudes vont également au Docteur « BENOUARETH Djamel Eddine », pour avoir accepté de présider ce jury.

Nos remerciements s'adressent aussi au Docteur « HEMICI Ahmed », pour l'intérêt qu'il a porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par ses propositions importantes.

Merci à tous les ingénieurs des laboratoires de microbiologie, pour leur aide, patience et générosité.

Nous remercions le propriétaire de la station d'épuration des eaux usées de Guelma, qui nous a permis de prélever les échantillons nécessaires pour notre étude. Nous le remercions pour son humilité et pour son chaleureux accueil. Ainsi que tous ceux qui ont participé, de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Merci à vous

Dédicaces

Nous tenons à dédier ce mémoire :

A nos parents, en gratitude de leur dévouement, de leur soutien permanent durant toutes nos années d'études, leurs sacrifices illimités, leur réconfort moral, eux qui ont fait tant d'effort pour notre éducation, pour nous voir enfin atteindre ce but, pour tout cela et pour ce qui dépasse que de simples mots peuvent exprimer, notre affection sans limite et immense gratitude.

A nos frères et sœurs, nos cousins et tous les personnes qui sont très chères à nos cœurs.

SOMMAIRE

<i>Remerciements</i>	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	2
CHAPITRE 01 : GENERALITES SUR LES BACTERIOPHAGE	3
1. Définition des bactériophages :	4
2. Historique :	4
3. Structure et morphologie :	4
4. Classification :	5
5. Habitat :	8
CHAPITRE 2 : CYCLE DE MULTIPLICATION DES BACTERIOPHAGES	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 :	13
CHAPITRE 3 : LES APPLICATIONS DES BACTERIOPHAGES	14
1. La phagothérapie :	15
A. Définition de la phagothérapie :	15
B. Brève histoire de la phagothérapie :	15
C. Principe d'utilisation de la phagothérapie :	15
D. Relation phages-antibiotiques :	16
E. Résistance bactérienne au bactériophage :	17
F. Phagothérapie vs Antibiothérapie :	18
G. Phagothérapie pour quelles infections :	19
2. Autres applications :	20
A. Traitement des cancers :	20

B. Médecine vétérinaire :	21
C. Destruction des biofilms :	22
D. Biologie moléculaire :	23
E. Typage phagique :	25
F. Agriculture / protection des cultures :	26
G. La sécurité alimentaire :	27
H. Applications environnementales :	29
ETUDE EXPERIMENTALE.....	30
Matériel et Méthodes	31
1. Matériel biologique :	32
A. Le repiquage des souches :	32
B. Identification des bactéries par coloration de Gram :	33
2. Méthodes expérimentales :	34
A. Prélèvement d'échantillon :	34
B. Isolement des bactériophages :	35
C. La culture en double couche d'agar :	37
D. Détermination de l'efficacité antibactérienne :	37
3. Conservation des phages :	39
Résultats et Discussion	40
1. Résultats :	41
A. Culture des bactéries :	41
B. Filtration :	42
C. Titration des phages :	43
D. Méthode de spots :	44
E. Méthode de l'antibiogramme :	45
2. Discussion :	46
CONCLUSION.....	49
Références Bibliographiques :.....	50
Annexes	55

Résumé

La découverte d'antibiotiques et leur utilisation imprudente dans divers domaines ayant favorisé l'émergence de bactéries multirésistantes et augmenté la prévalence de ces dernières, il serait essentiel de prendre des précautions pour prévenir leurs effets indésirables, ce qui a motivé les chercheurs du monde entier à rechercher et à utiliser un remède naturel présent dans toute la biosphère « Les bactériophages » qui sont des virus qui peuvent tuer et lyser les bactéries qu'ils infectent. La disponibilité des bactériophages dans divers milieux naturels les rend à la fois facile à isoler et à utiliser. L'objectif de cette étude était d'isoler des phages à partir de deux échantillons, l'eau usée et de la boue liquide, puis de les appliquer à des bactéries multirésistantes aux antibiotiques afin de comparer l'efficacité des phages isolés à celle des antibiotiques. L'isolement a permis d'obtenir un titre phagique qui varié de 30 à 300 UFP. Bien que le titre phagique obtenu en utilisant les souches de référence est considéré idéale, l'application des phages isolés sur des souches pathogènes n'a pas donné de bon résultats et montre leur inefficacité.

Mots clé : Bactériophage, isolat, antibiotique, bactérie.

Abstract

As the discovery of antibiotics and their careless use in various fields has favored the emergence of multi-resistant bacteria and increased the prevalence of the latter, it would be essential to take precautions to prevent their adverse effects, which has motivated researchers around the world to research and use a natural remedy present throughout the biosphere “Bacteriophages” which are viruses that can kill and lyse the bacteria they infect the availability of bacteriophages in various natural environments makes them both easy to isolate and to use. The objective of this study was to isolate phages from two samples, wastewater and liquid sludge, and then apply them to multidrug-resistant bacteria to compare the efficiency of the isolated phages with that of the antibiotics. Isolation a makes it possible to obtain a phage titer which varies from 30 to 300 PFU. Although the phage titer obtained using the reference strains is considered ideal, the application of isolated phages on pathogenic strains has not given good results and shows their inefficiency.

Key words: Bacteriophage, isolate, antibiotic, bacterium.

ملخص

نظرًا لأن اكتشاف المضادات الحيوية واستخدامها بإهمال في مختلف المجالات قد أدى إلى ظهور بكتيريا متعددة المقاومة وزيادة انتشار هذا الأخير ، سيكون من الضروري اتخاذ الاحتياطات اللازمة لمنع آثارها الضارة ، الأمر الذي حفز الباحثين في جميع أنحاء العالم. للبحث عن علاج طبيعي موجود في جميع أنحاء المحيط الحيوي "العائيات" وهي فيروسات يمكنها قتل البكتيريا التي تصيبها. إن توفر العائيات في البيئات الطبيعية المختلفة يجعلها سهلة العزل والاستخدام. الهدف من هذه الدراسة هو عزل العائيات من عينتين ، مياه الصرف الصحي والحمام السائلة ، ثم تطبيقها على البكتيريا المقاومة للأدوية المتعددة لمقارنة كفاءة العائيات المعزولة مع كفاءة المضادات الحيوية.

يتيح العزل امكانية الحصول على عيار يتراوح من 30 إلى 300 PFU ملتهمة. على الرغم من أن عيار الملتهمة الذي تم الحصول عليه باستخدام السلالات المرجعية يعتبر مثاليًا ، إلا أن تطبيق العائيات المعزولة على السلالات المسببة للأمراض لم يعطي نتائج جيدة ويظهر عدم كفاءتها.

الكلمات المفتاحية: جرثومة ، عزل ، مضاد حيوي ، بكتيريا.

Liste des figures

Figure 1 : Structure d'un bactériophage	5
Figure 2 : Diversité des bactériophages	6
Figure 3 : Schéma du cycle lytique	11
Figure 4 : Schéma du cycle lysogénique.....	11
Figure 5 : Déclenchement du cycle lytique à partir d'un prophage actif	12
Figure 6 : cycle chronique et pseudolysogénique d'un bactériophage	13
Figure 7 : Le phénomène de « synergie phages-antibiotiques » (PAS) dans l'environnement (A) et en phagothérapie (B).....	16
Figure 8 : Illustration schématique du système hybride bio/abiotique à base de phages (M13@Ag) pour réguler les microbes intestinaux pour une thérapie immunitaire spécifique au cancer.....	21
Figure 9 : Destruction d'un biofilm par les bactériophages.....	23
Figure 10 : Représentation de trois types différents de vaccins à base de phage.....	24
Figure 11 : Méthode de typage d'un bactériophage.....	25
Figure 12 : sensibilité d'une souche bactérienne aux phages.....	25
Figure 13 : Traitement des plantes avec des phages contre les phytopathogènes	27
Figure 14 : Bactériophages en environnement naturel et artificiel.....	29
Figure 15 : l'ensemencement des souches à utiliser.....	32
Figure 16 : coloration de gram	33
Figure 17 : Situation Géographique de la station d'épuration de Guelma.....	34
Figure 18 : protocole suivie pour l'études des bactériophages.....	35
Figure 19 : Système de filtration.....	36
Figure 20 : préparation du spot test.....	38
Figure 21 : préparation d'antibiogramme-Hinton (MH).....	38
Figure 22 : Les filtrats obtenus des échantillons.....	42
Figure 23 : Résultats sur <i>E.coli</i> eau usée.....	43
Figure 24 : Résultats sur <i>E.coli</i> eau Boue liquide.....	43
Figure 25 : Spot test sur <i>Staphylococcus</i> boeu liquide.....	44
Figure 26 : Spot test sur <i>E.Coli</i> boue liquide.....	44
Figure 27 : résultat obtenu avec <i>E.coli</i>	45
Figure 28 : résultat obtenu avec <i>Staphylococcus</i>	45
Figure 29 : L'apparition des zones d'inhibitions autour disque d'antibiotique sur <i>E.coli</i>	46

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des virus bactériens d'après Ackermann,2007	7
Tableau 2 : Comparaison des caractéristiques des antibiotiques et de la phagothérapie	18
Tableau 3 : Biocontrôle bactériophage des pathogènes d'origine alimentaire	28
Tableau 4 : Les procédures utilisées pour obtenir des phages isolés.	36
Tableau 5 : Résultats de l'examen microscopique des bactéries.	41

Liste des abréviations

Abréviation	Terme
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATB	antibiotique
ATM	antibiotique aztréonam
AgNP	nanoparticules d'argents
CRISP-Cas	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
<i>E.Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPS	polystyrene expansé
g	gramme
GN	Gélose Nutritive
H	Heur
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IPM	antibiotique Imipénème
KMN	antibiotique Kanamycine
LB	Luria-Bertani
MH	Muller-Hinton
Min	Minute
ml	millilitre.
M13	Enterobacteria phage
NIT	antibiotique tétilmicine
PFU/min	prélèvement forfaitaire unique, par minute
PH	potentiel hydrogène
Tr/min	tour, par minute
TOB	antibiotique tobramycine
UFP/ml	Unité formatrice de plages de lyse, par millilitre.
SEA-PHAGES	Science Education Alliance-Phage Hunters Advancing Genomics and Evolutionary Science.
UV	Ultraviolet.
ATCC	American type culture collection.
GN	Gélose nutritive.

Introduction

La résistance aux antibiotiques chez les bactéries est un sujet qui fait souvent l'actualité. Si des traitements alternatifs rapides ne sont pas fournis pour le traiter, il continuera d'être entier et courra le risque de s'aggraver.

La résistance aux antibiotiques des animaux d'élevage est depuis longtemps une source de préoccupation. En effet, en plus d'être à l'origine d'échecs thérapeutiques en médecine vétérinaire, il peut également constituer un risque de santé publique du fait de son potentiel à propager cette résistance à l'homme. L'absence de barrière entre les populations bactériennes de l'homme et de l'animal, ainsi que la similitude entre la majorité des familles d'antibiotiques utilisés aussi bien en thérapeutique humaine que vétérinaire, permettent cette transmission (**AFSSA, 2006**).

La station d'épuration et station d'épuration (STEP) peut, d'une part, être un lieu privilégié pour la transmission de gènes de résistance et la formation de bactéries résistantes car elle est réceptrice de bactéries et d'antibiotiques (**Tafoukt, 2011**). De plus, comme il sert de lien entre l'activité humaine et l'environnement immédiat, il sert de défense ultime contre le rejet des bactéries résistantes dans l'environnement. Il est donc crucial, voire nécessaire, de maîtriser les paramètres et autres antécédents de la résistance bactérienne.

Les antibiotiques ont de nombreuses applications. Outre le traitement des maladies et la promotion de la croissance animale et de la production alimentaire, il s'occupe également des soins préventifs des plantes et du domaine thérapeutique pour l'homme. En raison de leurs effets étendus qui vont bien au-delà de leur utilisation prévue, les antibiotiques peuvent flotter dans l'air et s'infiltrer dans les eaux usées et les eaux souterraines (**Allen et al., 2010**).

Peu d'études sur l'isolement des phages des eaux usées ou des boues ont été menées en Algérie, et celles qui ont été menées sur les phages méritent plus d'attention en raison de leur importance.

À la fin de l'étude, notre objectif principal était de séparer les phages des boues liquides et des eaux usées pour les utiliser contre de nombreuses bactéries résistantes. Nous avons également recherché les meilleurs moyens d'assurer leur conservation afin d'assurer le bon déroulement de futures recherches sur leurs propriétés antigéniques et médicinales.

Notre étude est divisée en trois sections : la bibliographie de recherche ; une description des méthodes et des matériaux utilisés pour la réalisation de ces travaux ; et une présentation des principaux résultats et de leur analyse.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 01 : GENERALITES SUR LES BACTERIOPHAGE

1. Définition des bactériophages :

Les bactériophages sont des virus qui attaquent les cellules de leurs hôtes bactériennes. On les trouve partout où il y a des bactéries et sont considérés comme les prédateurs naturels des bactéries (**Abdelsattar et al,2021**).

Ils sont de véritables parasites, comme tous les virus. Même s'ils ont toutes les connaissances nécessaires pour diriger leur reproduction vers un hôte particulier, ils manquent de la machinerie et des ribosomes nécessaires pour produire des protéines. Par conséquent, leur capacité à se multiplier dépend uniquement de la présence de leur hôte bactérien (**Kutter et al., 2005**).

Cependant, l'isolement de bactériophages d'intérêt (capables de lyser une ou plusieurs souches bactériennes données) peut s'avérer difficile malgré leur abondance (**Abdelsattar et al,2021**).

2. Historique :

Comme c'est typique dans l'histoire des sciences, la découverte des « bactériophages », ou « virus mangeurs de bactéries », s'est déroulée sur plusieurs années au cours des premiers stades de la virologie. Tout a commencé lorsque le bactériologiste britannique Ernest Hankin a découvert en 1896 que l'activité de lutte contre *Vibrio cholerae* existait dans les eaux des fleuves Gange et Jumna en Inde, qui était causée par une source (qui passait à travers des filtres en porcelaine fine et était thermolabile) et était responsable de l'éradication des épidémies de choléra (**Kirby, 2012**).

Deux ans plus tard, alors qu'il travaillait sur *Bacillus subtilis*, le bactériologiste russe Gamaleya a remarqué un phénomène similaire (**Marza et al, 2006**).

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 (**Madigan et Martinko, 2007**).

La structure des virus varie selon les familles auxquelles ils appartiennent. Ils sont structurellement composés :

- D'acides nucléiques qui véhiculent des données génétiques sous forme d'ADN ou d'ARN (**Guttman et al, 2005**).
- Une capsid c'est une boîte protéique qui entoure l'acide nucléique et résiste aux enzymes protéolytiques, permet de protéger l'information génétique (**Sozzi et al,1982**).

- Une queue est un tube régulièrement strié, composé d'un empilement d'anneaux ayant une disposition hélicoïdale autour d'un axe creux. Elle constitue l'organe d'injection de l'acide nucléique dans la cellule infectée (Sozzi et al, 1982 ; Madigan Et Martinko, 2007) comme le montre la figure

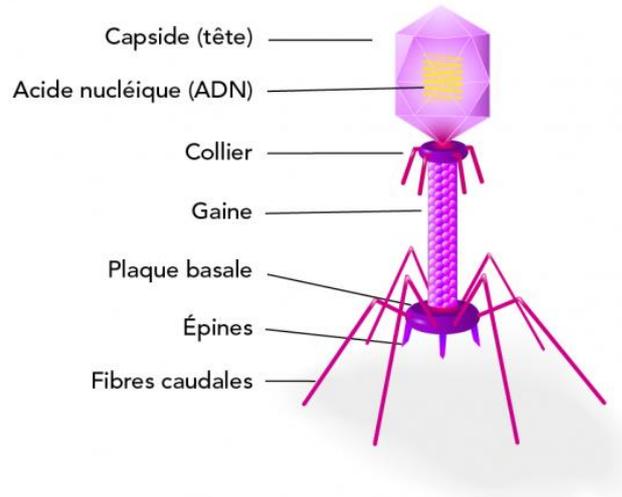


Figure 1 : Structure d'un bactériophage (iStock, 2014).

4. Classification :

Comme tous les virus, les phages sont classés en fonction de :

- La nature de l'acide nucléique (ADN ou ARN)
- La structure et la symétrie de la capsid - isométrique (polyédrique) et hélicoïdale (spirale)
- Présence ou absence d'une enveloppe

Les phages se distinguent également par leur taille – petite, moyenne ou grande ; forme - filiforme ou sphérique et la présence ou l'absence d'une tête et/ou d'une queue (Urban-Chmiel et al,2015).

- Les phages à queue sont un grand groupe de virus qui représentent 96% des phages. Ils sont regroupés en trois familles : *Myoviridae*, *Siphoviridae* et *Podoviridae* (Wernicki et al,2017).

Actuellement, au minimum 5500 bactériophages ont été examinés au microscope électronique et présentent des morphologies très diverses (fig 2) (Lavigne et al, 2008, 2009).

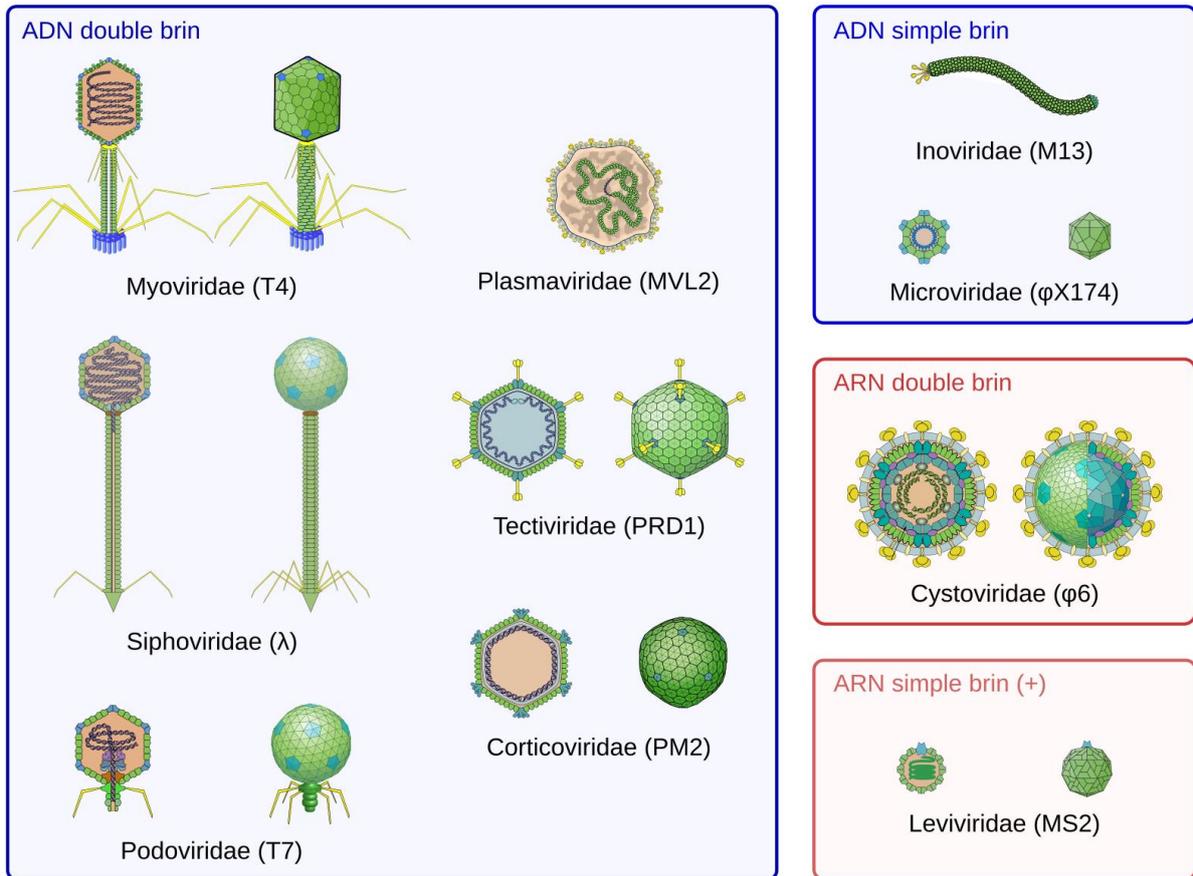


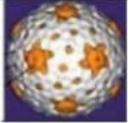
Figure 2 : Diversité des bactériophages (familles des bactériophages) (Gontier,2021)

Au cours des dernières décennies, la Comité International sur Virus Taxonomie (ICTV) a développé un système de catégorisation des phages.

L'ICTV a donc établi 1 ordre, 18 familles, 3 sous-familles et 51 genres pour classer la majorité des diverses espèces de virus bactériens connus à ce jour (Tableau 1) (Trojet, 2011)

Tableau 1 : Classification des virus bactériens d'après Ackermann,2007.

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	λ , T5, HK97, SPPI	
		<i>Podoviridae</i>	4/771	Queue courte	T7, ϕ 29, P22/L, Sf6	
Polyédrique	ADN Simple brin circulaire	<i>Microviridae</i>	4/40	Capsomères Visible, petite capside non enveloppée	ϕ 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 capsid, habitat : sources chaudes	SSV1	
		<i>Plasmaviridae</i>	1/5	Pas de capsid		

5. Habitat :

Les phages peuvent être trouvés dans n'importe quel réservoir contenant des hôtes bactériens, y compris l'eau de mer et les intestins d'animaux (**Tan et al, 2008**). Mais en quantité plus importante dans les excréments, le sol, les boues d'épuration et les eaux d'égout (**Vonlanthen, 2011**).

L'équilibre entre phages et bactéries est stable, et leurs stratégies évolutives sont coordonnées. Les phages peuvent également être isolés à partir de lait cru, de lait pasteurisé, de ferments lactogènes et de diverses émulsions environnementales (**Mullan, 2001**).

Une estimation de $10^{30} - 10^{32}$ de phages existant dans la biosphère (**Sulakvelidze, 2011**), Alors que les phages effacent environ 50% des bactéries du monde toutes les 48 heures. Quel que soit l'habitat, il existe des phages uniques de bactéries indigènes et des phages d'autres environnements. Les environnements de phages les plus populaires comprennent les sédiments, les eaux douces, l'eau salée et les tubes digestifs (**Abedon, 2009 ; Rohwer et al, 2009**).

CHAPITRE 2 : CYCLE DE MULTIPLICATION DES BACTERIOPHAGES

Comme d'autres virus, les bactériophages ont besoin d'une cellule hôte infectée pour se reproduire. Les différentes étapes du processus d'infection constituent le cycle de vie du phage.

Selon le type d'infection qu'ils provoquent en parasitant leur hôte, tous les phages connus peuvent être divisés en deux grands groupes. L'un est représenté par un cycle lytique, qui signifie « les phages virulents ou lytiques », et l'autre est un cycle lysogène, qui signifie « les phages tempérés ou endogènes » (**Kutter E. et al, 2005**).

1. Cycle lytique (phage virulent) :

Lors d'un cycle lytique, le phage agit comme un virus classique : il s'empare de la cellule hôte et utilise ses ressources pour produire beaucoup de nouveaux phages, ce qui entraîne la lyse (éclatement) et donc la mort de la cellule.

Les étapes du cycle lytique comprennent :

- **L'attachement** : les protéines de la "queue" du phage se lient à un récepteur spécifique (dans ce cas-ci, un transporteur de sucre) situé à la surface de la bactérie.
- **L'entrée** : le phage injecte son génome d'ADN double-brin dans le cytoplasme de la bactérie
- **A répllication de l'ADN et synthèse de protéines** : l'ADN du phage est copié, et les gènes de phage sont exprimés pour fabriquer des protéines, telles que les protéines de capsid.
- **L'assemblage du nouveau phage** : les capsides s'assemblent à partir des protéines capsides et sont remplies d'ADN pour générer beaucoup de nouvelles particules virales.
- **La lyse** : plus tard dans le cycle lytique, le phage exprime les gènes codant les protéines qui créent des trous dans la membrane plasmique et dans la paroi cellulaire. Ces trous permettent l'entrée d'eau, qui fait gonfler et éclater la cellule comme un ballon surchargé d'eau (**Alberts et al,2002**).

L'éclatement ou lyse de la cellule libère des centaines de nouveaux phages, qui peuvent ensuite trouver et infecter d'autres cellules hôtes à proximité. Ainsi, quelques cycles lytiques d'infection suffisent au phage pour se propager, tel un feu de forêt, au sein de la population bactérienne (**Alberts et al,2002**).

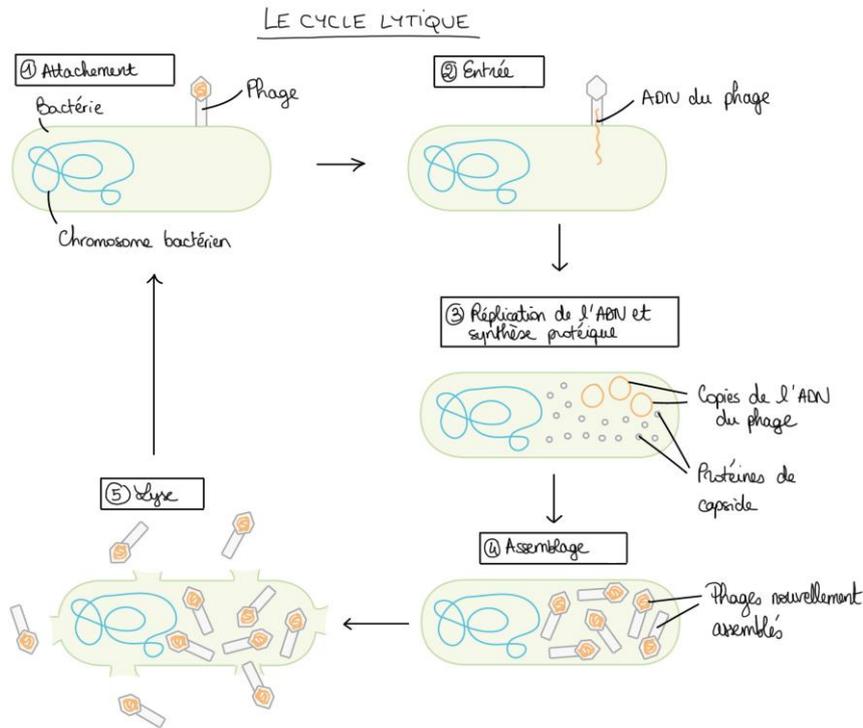


Figure 3 : Schéma du cycle lytique (Alberts et al,2002).

2. Cycle lysogénique (phage tempéré) :

Dans le cycle lysogénique, les deux premières étapes (attachement et injection d'ADN) se produisent de la même façon que pour le cycle lytique. Cependant, une fois à l'intérieur de la cellule, l'ADN du phage n'est pas immédiatement copié ou exprimé pour fabriquer des protéines. Au contraire, l'ADN viral se recombine avec une région particulière du chromosome bactérien et s'y intègre (Alberts et al,2002).

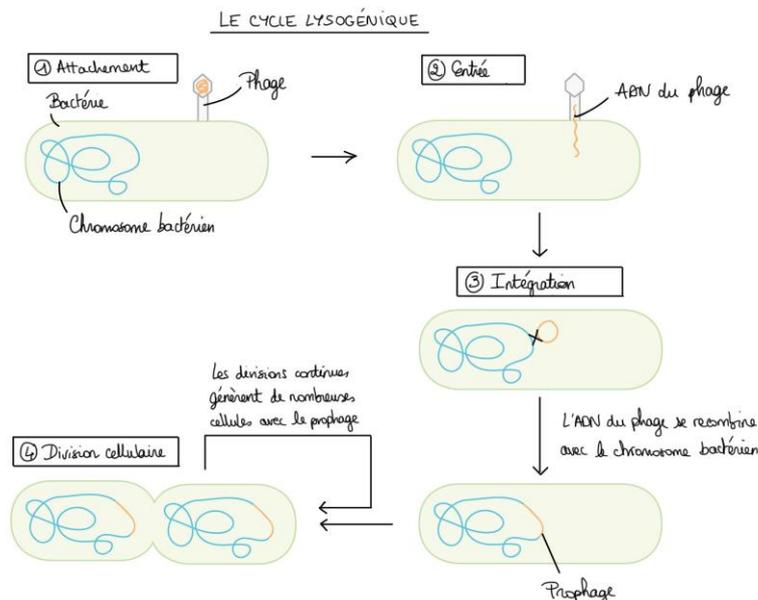


Figure 4 : Schéma du cycle lysogénique (Alberts et al,2002).

L'ADN intégré du phage, appelé prophage, n'est pas actif : ses gènes ne sont pas exprimés, et il n'induit pas la production de nouveaux phages. Cependant, à chaque division de la cellule hôte, le prophage est copié avec l'ADN de l'hôte et se propage ainsi.

Dans les bonnes conditions, le prophage peut devenir actif et sortir du chromosome bactérien, ce qui déclenche les étapes suivantes du cycle lytique (copie de l'ADN et synthèse de protéines, assemblage des phages et lyse). Fig (5)

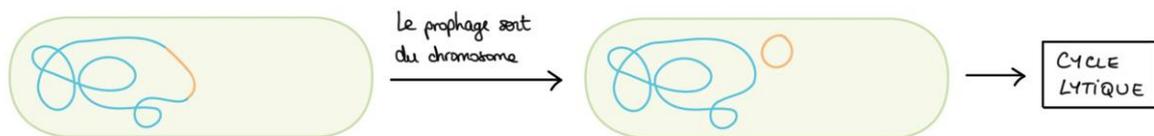


Figure 5 : Déclenchement du cycle lytique à partir d'un prophage actif (Alberts et al,2002).

3. Les autres cycles :

A. Cycle chronique (phages filamenteux) :

Il existe un nombre très restreint de bactériophages qui présentent un cycle de type « intermédiaire » dit chronique fait par des phages de forme filamenteux infectant des bactéries Gram- (**Dublanchet A, 2017**).

Une seule espèce de phage, le phage M13 (phage filamenteux), a eu le cycle chronique décrit. La bactérie est alors protégée de la lyse et continue à fonctionner comme un porteur chronique du génome phagique (**Magin, 2019**).

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**).

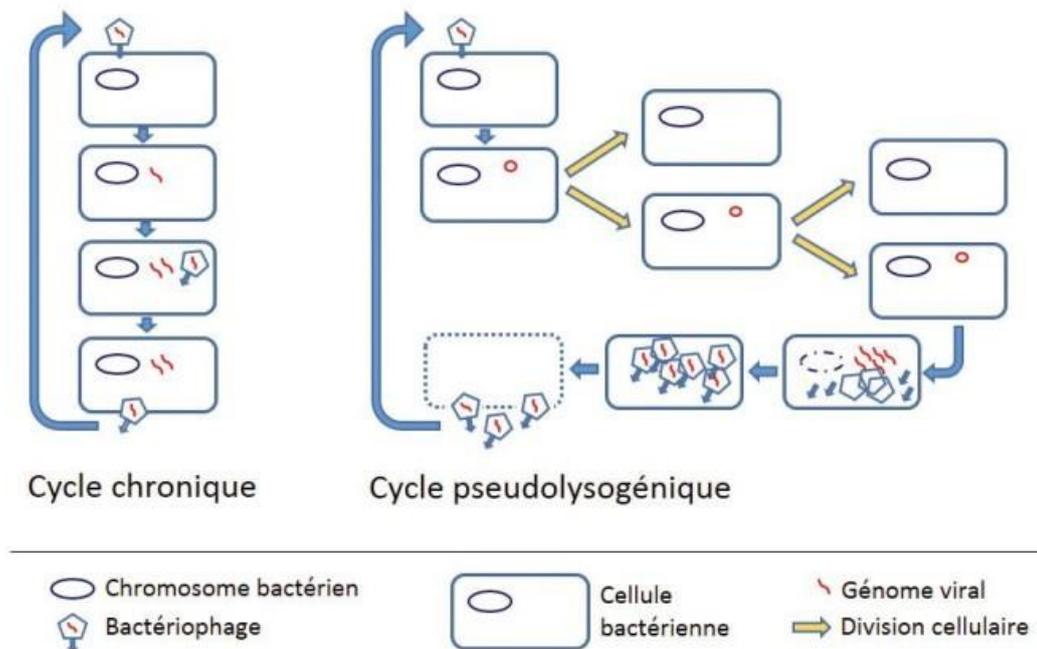
Les particules virales produites à faible débit sont, en effet, excrétées par bourgeonnement ou extrusion et les cellules infectées continuent de se diviser, transmettant le virus à la descendance (**Dufour et al, 2016**).

B. Cycle pseudolysogénique :

Il existe un quatrième type de cycle de reproduction, nommé « pseudo-lysogénie ». Ce cycle reste encore mal compris. Il s'agit d'un intermédiaire entre les cycles lytiques et lysogéniques (**Grossi O, 2006**).

Le phage injecte son génome dans la cellule hôte mais celui-ci ne s'intègre pas et reste latent dans le cytoplasme. Après son injection, le matériel génétique viral reste quiescent sous forme extra chromosomique 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 (**Dufour et al, 2016**).

Ce cycle ne possédant pas assez d'énergie disponible pour le phage, cela lui permettrait ainsi de survivre dans des environnements défavorables en attendant des conditions plus propices pour mettre en place un cycle lytique ou un cycle lysogénique (**Ripp and Miller, 1997**).



and Miller, 1997).

Figure 6 : cycle chronique et pseudolysogénique d'un bactériophage (Dufour et al, 2016).

CHAPITRE 3 : LES APPLICATIONS DES BACTERIOPHAGES

La recherche sur les phages bactériens utilisant une technologie de biologie moléculaire de pointe a révélé de nouvelles caractéristiques qui, à leur tour, ont ouvert la porte à un large éventail d'applications pratiques (**Dublanchet, 2017**).

1. La phagothérapie :

Chaque année, 25.000 personnes meurent en Europe d'infections dues à des bactéries que les antibiotiques n'arrivent plus à combattre. Et si les phages, ces virus «mangeurs» de bactéries, qui se trouvent partout dans notre environnement étaient la solution ? Cela fait près d'un siècle que la phagothérapie est connue et se révèle parfois beaucoup plus efficace que les traitements classiques (**Rivasi, 2013**).

A. Définition de la phagothérapie :

La phagothérapie est l'utilisation de bactériophages lytiques afin de traiter certaines maladies infectieuses d'origine bactérienne. Cette propriété a permis d'isoler et de purifier des phages, puis de traiter des infections bactériennes. Certains experts contemporains affirment que la phagothérapie peut être plus efficace que les antibiotiques dans certaines conditions cliniques : de ce fait, elle se voudrait une solution à l'antibio-résistance (**Dublanchet, 2009**).

Aujourd'hui, des applications sont envisagées non seulement dans le domaine médical mais aussi dentaire, vétérinaire, agricole ou environnemental (**Dublanchet, 2009**).

B. Brève histoire de la phagothérapie :

Historiquement, la phagothérapie a existé avant la découverte des antibiotiques. Le concept repose sur les travaux du microbiologiste Félix d'Hérelle (1873-1949), à l'Institut Pasteur de Paris, qui, dans les années 1920, isola des phages à partir des selles de patients ayant guéri de shigellose (une diarrhée infectieuse due à *Shigella spp*), avec lesquels il traita, par voie orale, des patients souffrant de cette infection bactérienne digestive. Il avait alors décrit le bactériophage comme un agent « d'immunité », infectant la bactérie et permettant la guérison de l'infection. Un de ses disciples, le microbiologiste soviétique George Eliava (1892-1937), fonda à Tbilissi l'institut du bactériophage ; la phagothérapie se développera ensuite particulièrement en Union soviétique (URSS) et en Pologne. En France, après avoir été développée à l'Institut Pasteur de Lyon dans les années 1960-1970, la phagothérapie fut abandonnée, en raison de la mise à disposition de divers antibiotiques à large spectre, administrables par voie intraveineuse ou par voie orale (**Ferry T et al, 2018**).

C. Principe d'utilisation de la phagothérapie :

La base de la phagothérapie est le concept de bactéricidie, ou la mort des bactéries induite par le mécanisme de reproduction des bactériophages (**Guillaume, 2020**).

En raison de la nature virale de ces entités, l'action bactéricide des phages présente des caractéristiques uniques.

→ Spécificité d'action

→ Rapidité d'action

→ Croissance exponentielle

Cette méthode vise à utiliser les propriétés prédatrices bactériennes naturelles des phages pour éradiquer les populations bactériennes pathogènes en les plaçant le plus près possible des sites d'infection ou en contact direct avec eux (**Dublanchet ,2017**).

L'objectif ultime est de développer un traitement "sur mesure" en utilisant des phages contre les bactéries spécifiques qui ont causé l'infection d'un patient afin d'augmenter l'efficacité du traitement et de rendre le patient plus résistant (**Guillaume, 2020**).

D. Relation phages-antibiotiques :

L'association de certains antibiotiques avec certains phages est éventuellement synergique (Synergie entre antibiothérapie et production de phages) (**Neter , Clark,1944**). La génération de phages est significativement augmentée par l'exposition de cultures bactériennes à de faibles doses d'antibiotiques qui inhibent la division cellulaire et favorisent la création de filaments, comme les céphalosporines (**Comeau A. M et al,2008**).

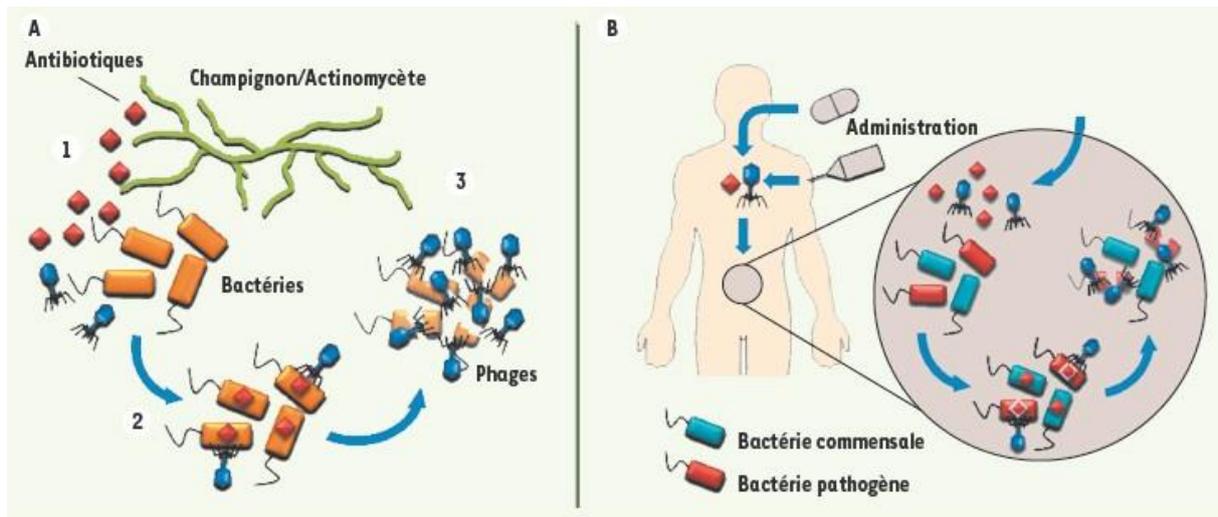


Figure 7 : Le phénomène de « synergie phages-antibiotiques » (PAS) dans l'environnement (A) et en phagothérapie (B) (Comeau A. M et al,2008).

- 1- Certains champignons et bactéries (exemple : actinomycètes) produisent des antibiotiques contre d'autres bactéries en compétition pour les mêmes ressources.
- 2- Les phages utilisent les bactéries « stressées » par ces antibiotiques pour infecter plus efficacement et se propager plus rapidement.
- 3- Ce scénario représente une sorte de mutualisme entre les phages et les producteurs d'antibiotiques pour éliminer leurs compétiteurs bactériens.

Du fait des caractéristiques très spécifiques des phages, les traitements de phagothérapie associant antibiotiques et phages devraient permettre une élimination plus efficace des bactéries pathogènes tout en limitant l'agression de la flore commensale (Errafyg,2016).

Il a été démontré récemment que les antibiotiques ont la capacité de mobiliser les phages lysogènes (prophages) portés par les souches *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Certaines bactéries sont capables de se mobiliser en induisant des prophages en présence de certains antibiotiques ainsi que dans d'autres situations de stress auxquelles elles sont exposées, favorisant la propagation de gènes exprimant des facteurs pathogènes indésirables (Comeau A. M et al,2008).

E. Résistance bactérienne au bactériophage :

Comme les antibiotiques, les bactéries peuvent développer une résistance aux bactériophages (Dufour N, Debarbieux L, 2017).

Par conséquent, les bactéries ont développé des mécanismes de résistance qu'elles peuvent utiliser à chaque étape de l'infection par les phages. Une bactérie développe une résistance aux phages lorsqu'elle empêche un phage de la reconnaître ou bloque une étape du processus d'infection.

Les principaux mécanismes de résistance sont notamment :

- L'inhibition de l'adsorption virale. Par mutation, masquage ou non expression des récepteurs bactériens des phages, la bactérie empêche le virus de la reconnaître et de s'y arrimer.
- Le blocage de l'injection de l'ADN viral ce qui stoppe la poursuite du cycle phagique.
- La variation de phase qui permet à la bactérie de s'adapter à des variations de conditions environnementales.

- L'infection abortive, qui entraîne le suicide de l'hôte et enraye la multiplication virale, ou un système toxine / antitoxine.
- La dégradation du génome viral par des nucléases bactériennes (système CRISP-Cas, qui constitue une mémoire héréditaire des bactéries entraînant des réponses de type immunitaire contre de l'ADN étranger) (Dufour N, Debarbieux L, 2017).

F. Phagothérapie vs Antibiothérapie :

Il serait avantageux d'utiliser simultanément des phages et des antibiotiques puisque le bactériophage réduit l'inoculum bactérien, permettant à l'antibiotique de fonctionner plus efficacement et probablement avec une pression de sélection réduite (Ravat. F et al, 2015).

L'utilisation des antibiotiques qui fait le lit des résistances bactériennes, l'utilisation de la phagothérapie doit permettre de réduire les résistances bactériennes aux antibiotiques. On le voit, il y a un bénéfice à utiliser antibiotiques et bactériophages non seulement pour leur effet synergique mais aussi parce que tant les antibiotiques que les bactériophages sont irremplaçables dans certaines situations (Ravat. F et al, 2015).

Le mode d'action, la spécificité, la pharmacologie ou les effets secondaires sont les principales différences entre phages et antibiotiques. C'est aussi ce qui permet de les associer et de les utiliser de façon complémentaire. Le Tableau 2 synthétise ces principales différences (Dublanquet. A , Patey. O ,2015).

Tableau 2 : Comparaison des caractéristiques des antibiotiques et de la phagothérapie (Dublanquet. A , Patey. O ,2015).

	ANTIBIOTIQUES	BACTÉRIOPHAGES
MODE D'ACTION	Bactériostatique ou bactéricide (selon site d'action)	Bactéricide (cycle lytique)
PHARMACOLOGIE	Métabolisés in vivo, pharmacocinétique connue modalités d'administration bien définies	Autoréplication et autolimitation au site de l'infection Pharmacocinétique et pharmacodynamie mal connues
SPÉCIFICITÉ D'ACTION	Peu spécifiques (action sur la flore commensale)	Très spécifiques → spectre d'activité étroit

CIBLE	Selon le mode d'action Traitement probabiliste ou documenté	Une espèce bactérienne /quelques souches Bactérie connue ou supposée, le diagnostic bactériologique doit être établi
FABRICATION	Développement industriel long et très coûteux	Procédé industriel rapide et peu coûteux (phages naturels)
RÉGLEMENTATION	Réglementation adaptée et médicaments autorisés	Phages absents des textes
EFFETS SECONDAIRES	Nombreux et variés	Très rares, minimales
LIMITES	<ul style="list-style-type: none"> • Tolérance et effets secondaires • Antibiorésistance 	<ul style="list-style-type: none"> • Bactéries intracellulaires • Infections parenchymateuses et à germes multiples

G. Phagothérapie pour quelles infections :

Toute infection bactérienne, peu importe où elle se trouve, peut bénéficier de la phagothérapie (**Dublanchet, 2017**).

La majorité des infections bactériennes semblent pouvoir être traitées par phagothérapie. Cependant, les phages étant incapables de pénétrer dans les cellules eucaryotes, ils sont actuellement sans moyen de traitement des infections provoquées par des micro-organismes dont la croissance est strictement intracellulaire. Cette contrainte pourrait être surmontée en enfermant les phages dans des liposomes, ce qui facilitera le passage de la membrane plasmique. De plus, du moins pour le moment, il ne semble pas que la neuro-méningite et les infections multimicrobiennes soient des cibles appropriées pour les problèmes de contamination simultanée des espèces bactériennes et de propagation du virus au système nerveux central, respectivement (**Dufour and Debarbieux, 2017**).

Cependant, le traitement des infections « courantes » comme les pneumonies, les infections urinaires hautes ou basses, les infections ostéoarticulaires, et les suppurations

superficielles (furoncles infectés, furunculoses) ou profondes (empyèmes pleuraux⁵, collections intra-abdominales localisées, abcès, etc.) ne posent aucun problème conceptuel pour le traitement par phagothérapie (**Dufour and Debarbieux, 2017**).

2. Autres applications :

A. Traitement des cancers :

Les phages ayant une forte affinité pour une cible d'intérêt donnée peuvent être criblé par la technologie de phage display. Par ailleurs, les phages tempérés incapables de se répliquer par rapport aux phages lytiques sont actuellement utilisés pour la technologie de phage display, représentant une option thérapeutique sûre. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse d'un choix rationnel reposant sur le ciblage précis caractéristiques des phages et la capacité de tuer les bactéries assistées par des nanomatériaux inorganiques pour optimiser le défaut des traitements traditionnels (**Dong et al,2020**).

Ici, nous proposons une hybridation bioinorganique basée sur les phages système qui pourrait reconstruire un microenvironnement immunisé contre les tumeurs via manipulation du microbiote intestinal pour la suppression du CCR (Fig. 1). Nous utilisé une bibliothèque de présentation de phages filamenteux M13 pour cribler un Souche de phage liant *Fusobacterium nucleatum* (Fn) in vitro. Ensuite, les AgNP ont été électrostatiquement assemblés à la surface de phages antibactériens (M13@Ag). Après accumulation de M13@Ag dans le TME (Microenvironnement tumoral), AgNP tue sélectivement Fn protumorale avec le mécanisme de reconnaissance exquis des phages et blocage du recrutement des cellules immunosuppressives. De plus, les phages sont hautement immunogènes et peuvent stimuler directement le système immunitaire de l'hôte système avec leurs protéines d'enveloppe naïves, qui induisent la cellule dendritique (DC) maturation et favoriser l'activation du phénotype M1 macrophages associés aux tumeurs (TAM) (**Dong et al,2020**).

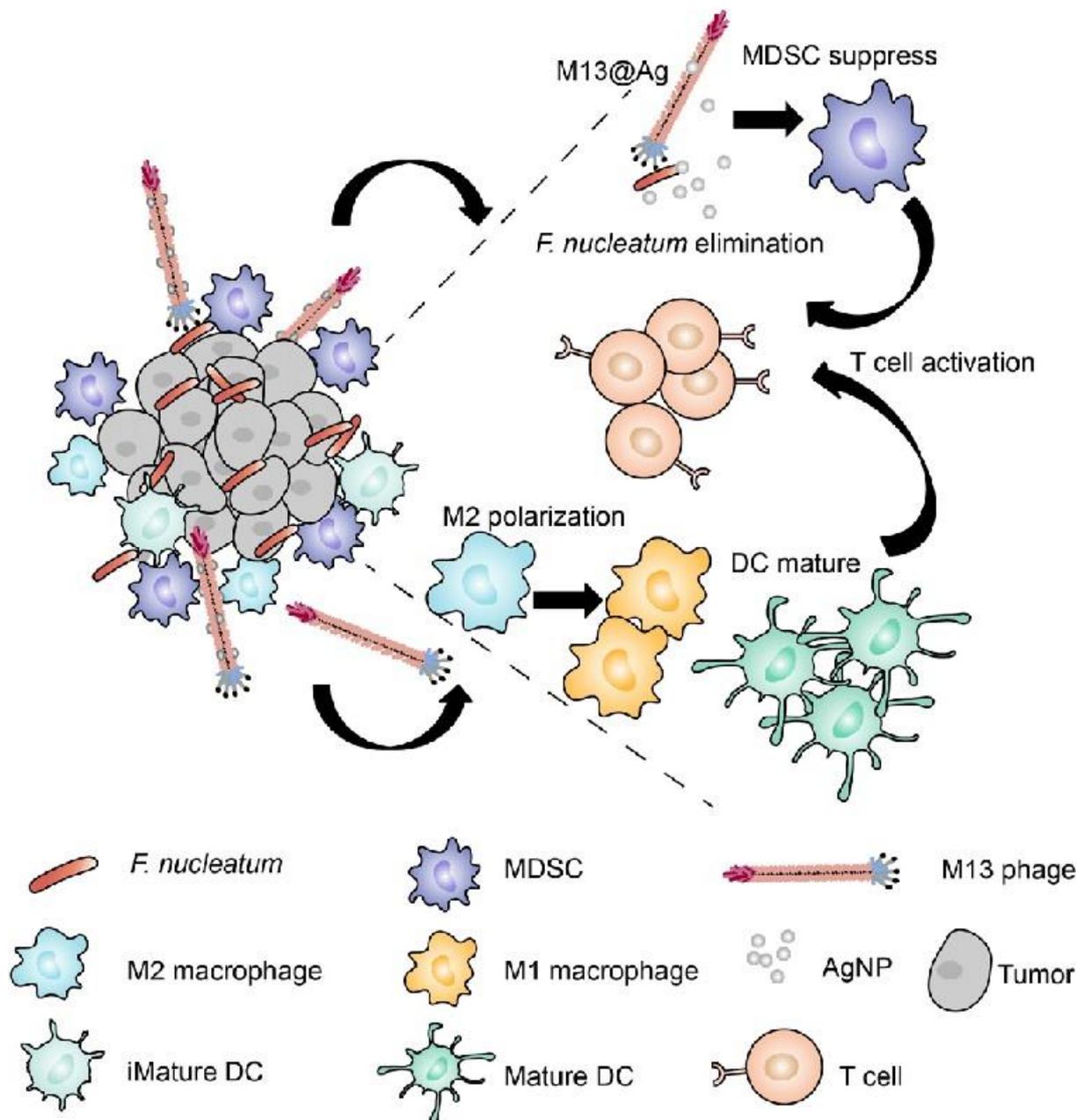


Figure 8 : Illustration schématique du système hybride bio/abiotique à base de phages (M13@Ag) pour réguler les microbes intestinaux pour une thérapie immunitaire spécifique au cancer (Dong et al,2020).

B. Médecine vétérinaire :

La phagothérapie est utilisée en médecine vétérinaire depuis le début du XXe siècle. La première fois que des phages ont été utilisés en France pour lutter contre la grippe aviaire, c'était en 1919 (Gazeev, 2018).

Contrairement aux animaux de ferme, où les bénéfices potentiels de la phagothérapie ont été largement étudiés à la fois in vitro et in vivo, en particulier pour les zoonoses et les maladies associées à des pertes monétaires (comme le mammitus), les études sur les animaux de compagnie sont encore rares et relativement nouvelles (Loponte. R et al,2021).

L'utilisation des bactériophages dans le domaine vétérinaire ont été réalisées sur des animaux de laboratoires, surtout des souris, mais aussi sur des animaux d'élevage (**Loponte. R et al,2021**).

Chez la souris, l'utilisation de bactériophages apparaît appropriée pour la cicatrisation des plaies, la réduction des lésions pulmonaires et la réduction de la charge bactérienne pulmonaire induite par les infections à *Pseudomonas aeruginosa*.

L'utilisation de bactériophages isolés de volailles infectées par *Salmonella* a permis de réduire la mortalité et la colonisation intestinale des volailles et a montré une efficacité contre ce pathogène (**Saussereau,2012**).

C. Destruction des biofilms :

- **Biofilms :**

Les biofilms sont des agrégations de cellules, qui peuvent être de nature eucaryote ou procaryote, entourées d'une matrice de substance polymérique extracellulaire (EPS) produite, au moins en partie, par les cellules du biofilm. Les bactéries présentes dans un biofilm peuvent présenter des niveaux élevés de résistance aux agents, tels que les biocides et les antibiotiques (**Harper D. R et al,2014**).

La détection du quorum, où les cellules communiquent en libérant de petites molécules chimiques comme processus de signalisation à d'autres cellules, fait que le biofilm agit à bien des égards comme une communauté plutôt que simplement un groupe de cellules indépendantes (**Harper D. R et al,2014**).

- **Bactériophage et leurs effets sur les biofilms :**

Les bactériophages ne sont pas affectés par la résistance aux antibiotiques et (contrairement à de nombreux antibiotiques) sont capables de cibler les bactéries dans les biofilms. Ils peuvent soit coexister avec leur hôte en s'insérant dans le génome bactérien (bactériophages lysogènes), soit le détruire (bactériophages lytiques).

Il a souvent été supposé que les biofilms confèrent une résistance aux bactériophages, en raison de l'imperméabilité de la matrice du biofilm.

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 y a au moins quatre 'mécanismes sous-jacents à cette différence (**Harper D. R et al,2014**).

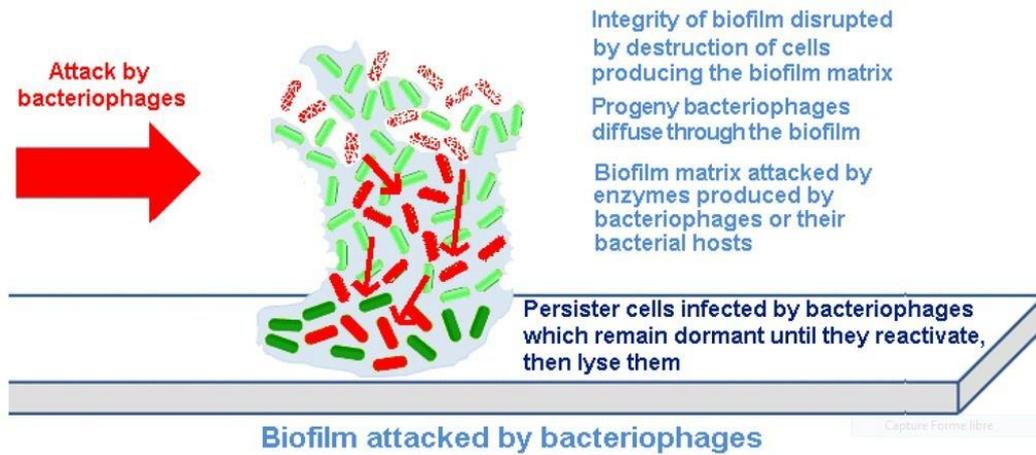


Figure 9 : Destruction d'un biofilm par les bactériophages (Harper D. R et al,2014).

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 D. R et al,2014).

D. Biologie moléculaire :

Les bactériophages ont joué et continuent de jouer un rôle clé dans la génétique bactérienne et dans des expériences de biologie moléculaire, par exemple comme vecteurs de clonage (Gontier,2021).

Historiquement, ils ont été utilisés pour définir la structure des gènes et la régulation des gènes. De plus, le premier génome à être séquencé était un bactériophage (Grath et al, 2007).

Les facteurs qui provoquent l'injection massive d'ADN lors d'une infection par des phages producteurs d'ADN ont longtemps échappé à la détection directe. D'autres progrès ont été réalisés en utilisant des phages comme T7 qui injectent lentement leur ADN. La première étape est l'injection de protéines T7 dérivées de particules de phage pour ouvrir un canal dans

la membrane cellulaire qui transporte l'ADN dans la cellule via un mécanisme enzymatique apparent¹⁷. Ensuite, l'ADN est aspiré dans la cellule par transcription à l'aide d'une ARN polymérase effectivement stationnaire, qui encercle l'ADN à elle seule. L'enzyme de restriction de type I Eco KI peut être utilisée à la place de l'ARN polymérase pour cliver l'ADN (Campbell. A, 2003).

Ces dernières années, de nombreuses études se sont concentrées sur l'utilisation des phages comme plateformes de nanomédecine pour créer des vaccins en raison de leurs caractéristiques biologiques distinctives (Bao et al, 2019).

De nos jours, deux principaux types de vaccins à base de phages sont largement reconnus, les vaccins à ADN phagique et les vaccins phagiques (González-Mora et al, 2020)

- Les vaccins à ADN phagique sont préparés par l'incorporation d'une cassette d'expression eucaryote avec le gène codant pour un antigène ou en mimant l'épitope du génome du phage.
- Les vaccins présentés sur phage délivrent des peptides ou des protéines, en particulier des protéines immunogènes, aux cellules ou tissus cibles. Ces peptides, protéines et antigènes chimiquement conjugués immunogènes sont présentés sur les surfaces des phages.
- Les vaccins présentés sur les phages et les vaccins à ADN de phage sont combinés pour préparer des vaccins hybrides (González-Mora et al, 2020) (Fig 10)

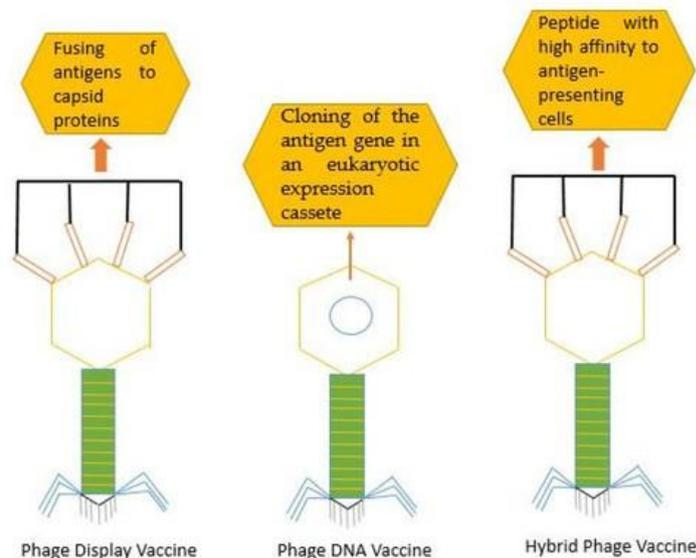


Figure 10 : Représentation de trois types différents de vaccins à base de phage (Haq et al, 2023)

E. Typage phagique :

- **Lysotypie :**

Lors du lysotypage, un panel de phages lytiques est inoculé sur un inoculum de pelouse de la bactérie étudiée. Les phages capables de mettre en place une infection lytique dans cet isolat produisent une zone claire. Comme la capacité à être infecté (et lysé) par différents phages varie entre différentes souches de bactéries, le schéma de lyse Fig (10) constitue la base du lysotypage (Tankeshwar, 2022).

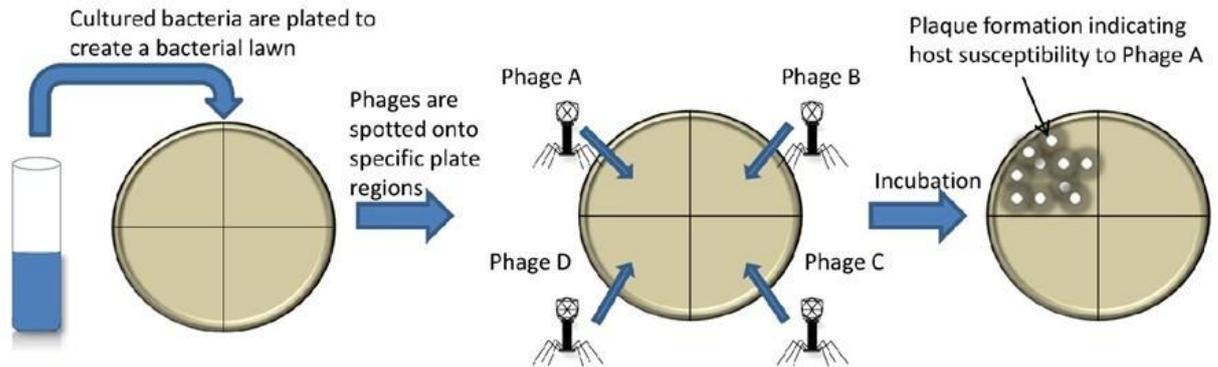


Figure 11 : Méthode de typage d'un bactériophage (Tankeshwar, 2022).

Les souches bactériennes sont cultivées sur un milieu de culture approprié puis soumises à une attaque par une série de différents phages connus.

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 pourvue de différents phages, et si la plaque (zones claires) apparaît, cela signifie que le phage a grandi et lysé la cellule bactérienne, ce qui facilite l'identification de la souche bactérienne spécifique (Haq et al, 2012).

Phage typing of bacteria

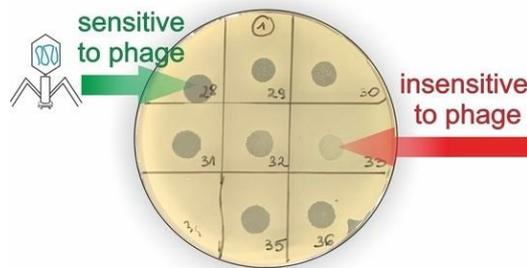


Figure 12 : sensibilité d'une souche bactérienne aux phages (Szaleniec et al,2019)

- **Autres méthodes du typage :**

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

- L'utilisation de phages pouvant fournir des gènes rapporteurs spécifiques ou l'utilisation d'une protéine fluorescente verte qui s'exprimerait lors d'une infection bactérienne
- De plus, des phages de couleur fluorescente attachés de manière covalente à leurs surfaces peuvent être utilisés pour détecter un type particulier d'adsorption.
- Il est également possible d'utiliser des anticorps et des peptides affichés par les phages, qui vont se lier spécifiquement aux toxines et aux pathogènes bactériens, ainsi que la détection de certains des composants libérés, comme l'adénylate kinase après une lyse bactérienne particulière.
- Une autre utilisation des phages dans la détection des bactéries est la technologie des "doubles phages", qui les emploie pour trouver la liaison d'antigènes particuliers à des anticorps spécifiques.
- Il est également possible de détecter des bactéries pathogènes grâce au test d'amplification phagique (**Haq et al, 2012**).

F. Agriculture / protection des cultures :

L'application des bactériophages dans en agriculture et en agroalimentaire est particulièrement complexe. En effet, ces différents environnements recèlent des substances telles que les matrices des aliments ou les particules du sol, qui peuvent inhiber l'attachement des bactériophages à ses bactéries hôtes. Également, en plein champ, les radiations UV ou le pH extrême de certains sols sont des facteurs limitants, qui cependant peuvent être contournés ou dont l'impact peut être réduit (**Ansaldi M et al,2020**).

Dans le contexte agricole, des préparations de bactériophages contre les bactéries pathogènes de plantes ont été utilisées et représentaient des agents de biocontrôle pionniers. Des essais en serre et sur le terrain contre les principaux phytopathogènes tels que *Xanthomonas spp* , *Erwinia amylovora*, *Streptomyces scabies* ou *Ralstonia solanacearum* ont été concluants (**Ansaldi M et al,2020**).

Une fois qu'une sélection de phages spécifiques aux phytopathogènes est obtenue et que la caractérisation initiale a indiqué leur potentiel pour le biocontrôle, l'étape suivante consiste à tester leur efficacité par rapport aux maladies des plantes et mode de vie des phages (**Chamikara, Pasindu ,2016**).

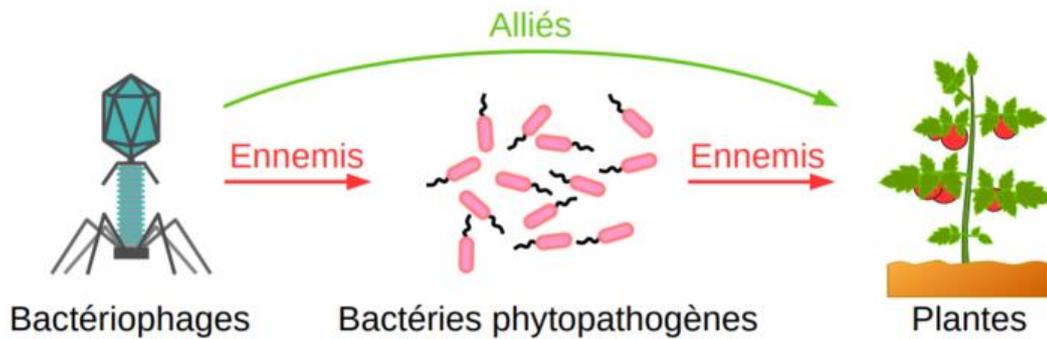


Figure 13 : Traitement des plantes avec des phages contre les phytopathogènes (Pinheiro et al,2019).

G. La sécurité alimentaire :

A l'ère du développement des aliments biologiques, les mesures non chimiques de protection des aliments deviennent de plus en plus populaires. Les cocktails de phages ont reconnu comme une technologie verte de lutte contre les bactéries pathogènes et d'altération d'origine alimentaire (Polaska and Sokolowska , 2019).

Les bactériophages sont principalement utilisés dans trois secteurs de l'industrie alimentaire pour assurer la sécurité alimentaire : la production primaire, la bioconservation et la biosanitisation.

- Dans la production primaire, la phagothérapie est utilisée par l'ajout de phages au stade de la production avant la récolte pendant la croissance des plantes pour éliminer la probabilité de maladie végétale. Les phages peuvent également être appliqués au stade post-récolte lors de la transformation et de l'emballage des aliments pour contrôler la contamination par des agents pathogènes potentiels.
- Dans la biosanitisation, des phages sont appliqués pour prévenir et réduire les biofilms à la surface des équipements.
- En bioconservation, les bactériophages sont directement ajoutés aux produits alimentaires pour prolonger la date de péremption des aliments (Polaska and Sokolowska , 2019).

L'utilisation de bactériophages lytiques pour cibler des bactéries d'origine alimentaire spécifiques dans les aliments, sans nuire à leur microflore normale et souvent bénéfique. Cette approche est appelée « bactériophage ou biocontrol des phages ». Le tableau 3 résume la liste

des études sur la lutte biologique contre les bactériophages des principaux agents pathogènes d'origine alimentaire (Polaska and Sokolowska , 2019).

Tableau 3 : Biocontrôle bactériophage des pathogènes d'origine alimentaire (Polaska and Sokolowska , 2019).

Agent pathogène cible	Genre de nourriture
<i>Listeria monocytogenes</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Fruits frais coupés -Fromage à pâte molle rouge affiné en surface -Jambon cuit -Surface crue de filets de poisson-chat -Fromage Quesofresco -Rôti de bœuf et dinde
<i>Escherichia coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Viande -Légumes (tomates, brocoli, épinards) -Laitue et cantaloup -Légumes-feuilles -Légumes (laitue, épinards) -Lame d'épinards
<i>Campylobacter</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Peau de poulet -Boeuf cru et cuit -Viande de poulet crue
<i>Salmonella</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Fruits frais coupés -Fromage cheddar -Fruit de mer -Poitrines de poulet -Oeufs frais -Saucisses de Francfort au poulet -Boeuf cru et cuit -Charcuterie de dinde -Lait au chocolat -Les hot-dogs

H. Applications environnementales :

L'importance des phages dans les environnements naturels réside dans leur capacité à se répliquer au sein de leur hôte, impactant ainsi la diversité des communautés bactériennes. Dans le corps humain, les phages ont pour fonction de protéger contre les bactéries pathogènes. Les eaux océaniques contiennent 4×10^{30} virus, ce qui en fait le plus grand réservoir de phages. Les phages du sol influencent les capacités de cycle des nutriments et les symbioses entre les racines des plantes et les bactéries (Batinovic.S et al,2019).

Dans les environnements artificiels, la capacité des phages à médier la croissance bactérienne peut être exploitée pour une gamme d'utilisations, en raison de leur spécificité et de la facilité avec laquelle ils peuvent être génétiquement modifiés. Dans le traitement des eaux usées, les phages peuvent être utilisés pour impacter les communautés bactériennes présentes, augmentant ainsi l'efficacité de ce processus. Les applications industrielles des phages comprennent le contrôle des agents pathogènes d'origine alimentaire et la diminution du nombre de bactéries problématiques dans l'industrie pétrolière. Les utilisations pharmaceutiques des phages sont actuellement limitées, mais cela est susceptible de changer à mesure que l'efficacité des antibiotiques diminue et que l'efficacité et la spécificité des phages sont améliorées en laboratoire (Batinovic.S et al,2019).

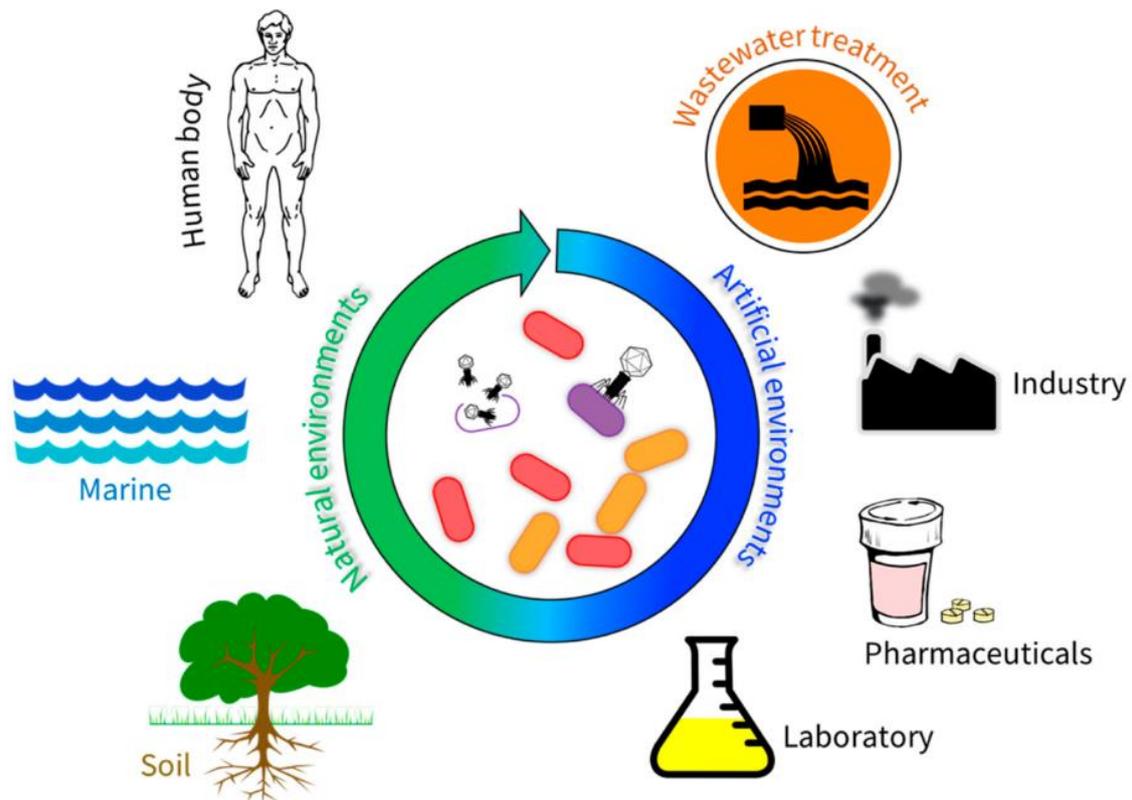


Figure 14 : Bactériophages en environnement naturel et artificiel (Batinovic.S et al,2019).

ETUDE EXPERIMENTALE

Matériel et Méthodes

Ce travail a été effectué au sein de deux laboratoires. La partie de recherche et d'isolement des bactériophages à partir des prélèvements a été réalisé au laboratoire de microbiologie au niveau du département de Biologie, université 8 Mai 1945 Guelma et la partie de la réalisation de l'antibiogramme a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie à l'hôpital IBN ZOHR.

1. Matériel biologique :

Dans ce travail, on a utilisé des souches de références non pathogènes dans la partie d'isolement des phages au niveau du laboratoire de l'université et aussi des souches bactériennes isolées des prélèvements biologiques des patients hospitalisés dans l'hôpital IBN ZOHR, dans la deuxième partie réalisée à l'hôpital.

Ces souches étaient conservées sur des milieux de géloses nutritives dans des boîtes de pétri.

A. Le repiquage des souches :

Les souches bactériennes de référence utilisés *Escherichia coli* (ATCC 22) *Staphylococcus* (ATCC 23) *Pseudomonas* (ATCC 53) ont été ensemencées sur la Gélose Nutritive par stries distinctes suite à la préparation de la gélose nutritionnelle, puis elles ont été incubées à 37°C allant de 18 à 24 heures. Une sous-culture a été effectuée pour différencier



Figure 15 : l'ensemencement des souches à utiliser.

B. Identification des bactéries par coloration de Gram :

Suite à la coloration de Gram, des examens microscopiques ont été réalisés pour procéder à l'identification morphologique des bactéries utilisées. Les étapes de préparation d'un frottis avant coloration étaient les suivantes :

- Sur une lame sans tache, déposez un échantillon d'eau stérile.
- Étalez une colonie de bactéries sur la goutte d'eau selon un motif circulaire à l'aide d'une anse en platine ou d'une pipette Pasteur.
- Étalez légèrement le matériau pour créer le frottis.
- Devant un bec Bunsen, sécher et fixer le frottis



Figure 16 : coloration de gram

Méthode :

- Pendant une minute, tamponnez la gentiane violette sur le frottis.
- Rincer avec l'eau de robinet.
- Pendant une minute, recouvrir la lame de Lugol.
- Utilisez de l'eau du robinet pour rincer.
- Versez de l'alcool sur le frottis jusqu'à ce que la couleur ait disparu.
- Utilisez de l'eau du robinet pour rincer.
- Incorporer la Fuschine pendant une minute.
- Rincer avec l'eau de robinet.
- Disposez la lame.
- Observer au microscope optique à l'objectif x 100 à l'aide d'huile à immersion de cèdre.

Les phages obtenus peuvent être utilisés avec les souches bactériennes après qu'elles aient été incubées dans leur milieu particulier.

2. Méthodes expérimentales :

Les bactériophages sont répandus dans l'eau et les boues d'épuration (**Poxleitner et al, 2018**).

A. Prélèvement d'échantillon :

L'échantillon a été obtenu de la station d'épuration des eaux usées de la wilaya de Guelma, qui est opérationnelle depuis le 28 février 2008. La station est située sur 7,8 hectares de terrain agricoles à 1 kilomètre au nord de la wilaya sur la nationale N° 21 à proximité de l'Oued Seybouse (**Azzedine, 2016**).

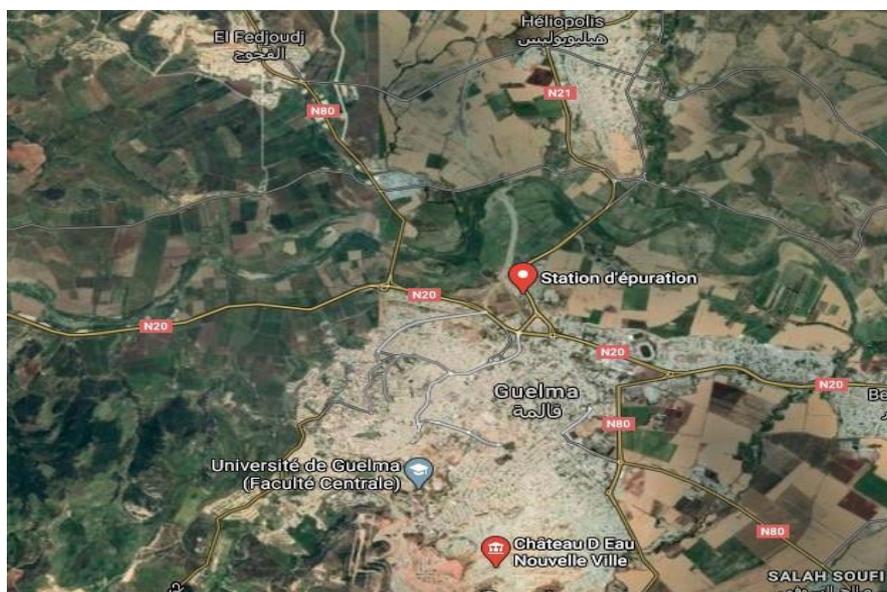


Figure 17 : Situation Géographique de la station d'épuration de Guelma (google earth 2023)

Nous avons prélevé deux échantillons des eaux usées filtrée avant traitement et l'autre de boue liquide dans les conditions du jour.

Dans des flacons en verre stériles de 250 ml, les échantillons sont prélevés en laissant vide 1/10 de la capacité du flacon, puis ils sont immédiatement transportés vers le centre d'analyse (**Droguet, 2021**).

Dans notre recherche, nous avons recherché des bactériophages susceptibles d'infecter plusieurs types de bactéries multi résistantes dans un échantillon des eaux usées et de boues liquides afin de souligner leurs propriétés antibactériennes inhérentes et de comparer leur efficacité à celle des antibiotiques.

B. Isolement des bactériophages :

Dans le but d'isoler des bactériophages, nous avons utilisé un protocole modifié crée chez SEA-PHAGES (Poxleitner *et al*, 2018).

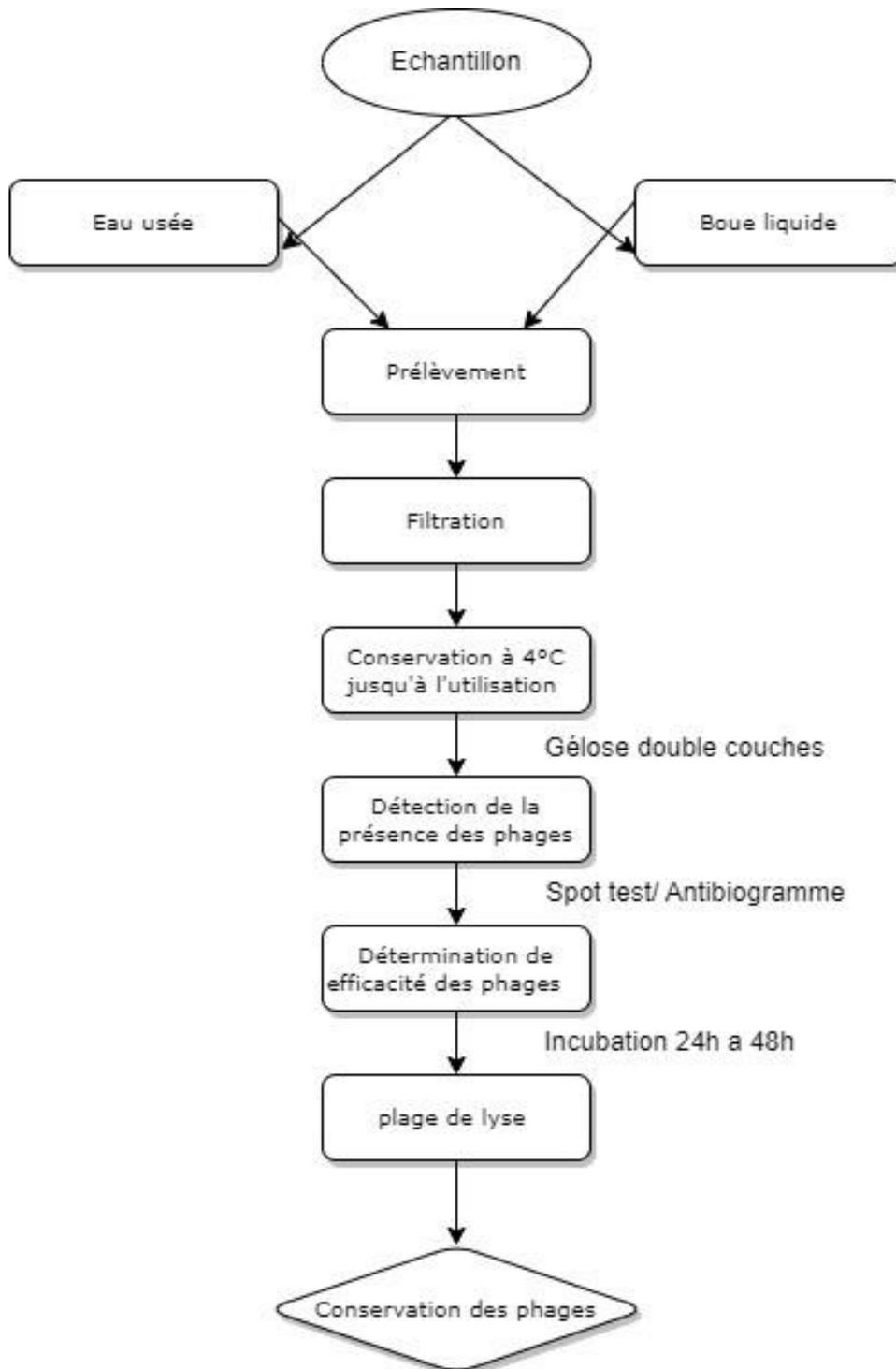


Figure 18 : protocole suivie pour l'études des bactériophages

a. Filtration :

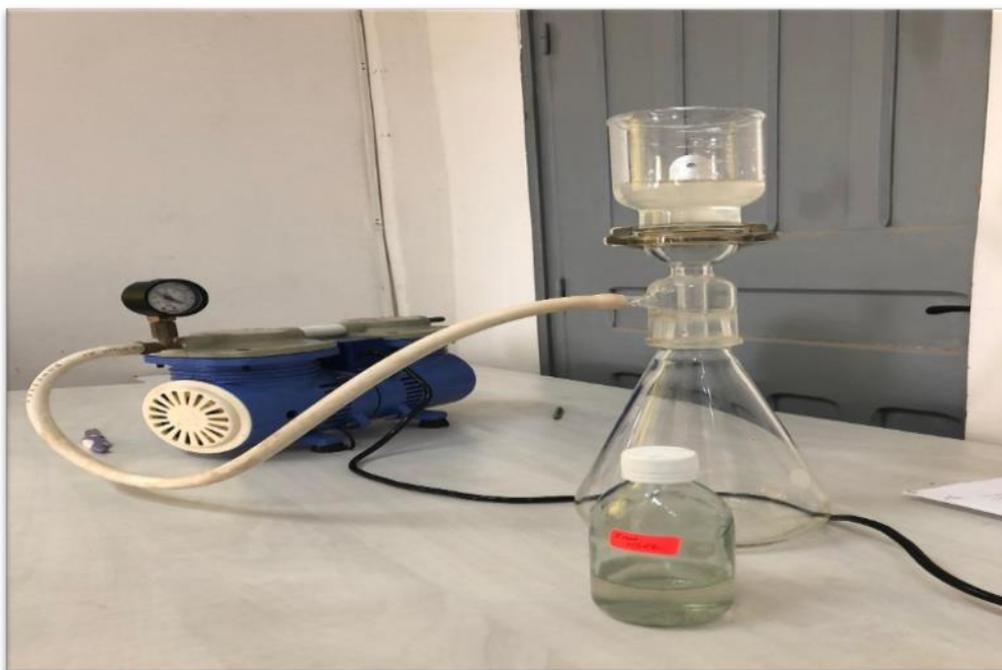


Figure 19 : Système de filtration.

Avant la phase d’isolement, les échantillons ont été filtrés à l'aide d'un filtre à membrane stérile de 0,47 µm dans un système de filtration avec une pompe à vide (**Massali and Bouaninba, 2016 ; Poxleitner et al, 2018**).

Tableau 4 : Les procédures utilisées pour obtenir des phages isolés.

	Eau usée	Boue liquide
Méthodes	- 100 ml d'eaux usées ont été passés directement à travers un filtre à membrane d'une porosité de 0,47 micromètre dans une pompe à vide (Van Twest and Kropinski, 2009).	- Dans des tubes de 15 ml, 100 ml de boue liquide ont été centrifugés à 4500 rpm pendant 10 min (Bendaira and Brik, 2015) - A travers un papier filtre de 0,47 micromètre le surnageant a été filtré avec une pompe à vide (Van Twest and Kropinski, 2009).

Avant utilisation, tous les filtrats ou "suspensions de phages" ont été conservés dans des flacons en verre stériles à 4°C (**Hamzeh, 2014**).

C. La culture en double couche d'agar :

Pour estimer le nombre probable de phages présents dans notre prélèvement, nous avons opté pour la méthode de la double couche de gélose.

La technique comporte deux couches distinctes, comme son nom l'indique:

- La première couche est une couche de nutrition rigide Luria-Bertani (LB) composée de 15 % de gélose (Annexe)
- La deuxième couche est une couche LB composée de 7,5% de gélose (Annexe), qui permet la création d'une solution de gélose LB semi-molle avant que les bactéries ne soient combinées (**Hamzeh, 2014**).

Cette technique produit une dispersion bactérienne homogène plus rapidement que le frottis tout en accélérant la diffusion des particules de phage et la formation de plages de lyse. Par conséquent, les modifications de la forme de la plaque peuvent être plus faciles à étudier (**Adams, 1959; Hamzeh, 2014**).

En combinant 100 ul de la culture bactérienne en phase exponentielle avec 100 ul de chaque filtrat, en gardant la combinaison inerte pendant 5 à 10 minutes pour la fixation, puis en ajoutant 3 ml de gélose LB semi-molle, on peut déterminer la concentration des phages.

Chaque mélange a été appliqué rapidement mais progressivement sur les boîtes de Petri remplies de LB solide. Les boîtes solidifiées ont été conservées dans un incubateur pendant 24 heures à 37°C pour favoriser le développement des plaques de lyse en surface (**Martineau, 2010; Hamzeh, 2014; Poxleitner et al, 2018**).

Les plages de lyse ont été comptées le lendemain. Les formules suivantes sont utilisées pour calculer la concentration en phages (**Martineau, 2010; Hamzeh, 2014**):

$$\text{Nombre de plage de lyse} \times 10 = \text{UFP/ml.}$$

D. Détermination de l'efficacité antibactérienne :

Après avoir réalisé le comptage du titre phagique sur les différentes souches utilisées, on a procédé à la détermination des propriétés antibactériennes du phage par la méthode du spot test sur les deux souches de référence qui ont montré des plages de lyses dans la culture en double couches en utilisant de la gélose en milieu solide LB (**Hamzeh, 2014**).

a. Spot test :

La méthode du Spot test consiste à déposer 10µl du prélèvement sur un disque de papier wattman dans des boites de pétri déjàensemencé par la souche de référence en utilisant

la méthode d'écouvillonnage sur un milieu LB Solide. Le test ponctuel est une approche rapide pour déterminer si un échantillon de phage peut infecter une bactérie (Poxleitner et al, 2018).

Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures. Après incubation, les boîtes ont été contrôlées pour confirmer la présence ou l'absence de zones claires (Poxleitner et al, 2018).

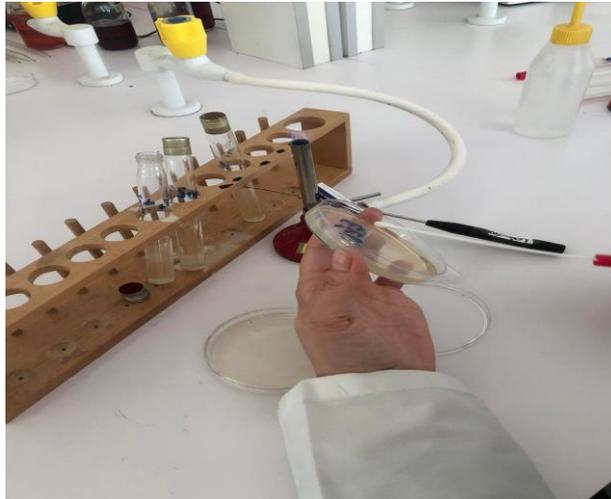


Figure 20 : préparation du spot test

b. Antibiogramme :

Cette méthode a été effectuée au sein du laboratoire de microbiologie au niveau de l'hôpital IBN ZOHR

On a plongé l'écouvillon dans l'innoculum et en éliminant l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube, avec frottement sur la surface entière de la boîte de gélose Mueller.



Figure 21 : préparation d'antibiogramme-Hinton (MH).

Des disques de papier wattman imprégnés avec 10µl des phages conservés sont placés sur la gélose. Après une nuit d'incubation, le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré autour de chaque disque.

3. Conservation des phages :

Le problème avec le stockage des bactériophages est qu'il n'y a pas une seule façon parfaite de le faire, et différents phages peuvent nécessiter des conditions de stockage différentes.

En règle générale, les bactériophages sont conservés sous forme de virion libre (**Alvi et al, 2018; Golec et al, 2011**).

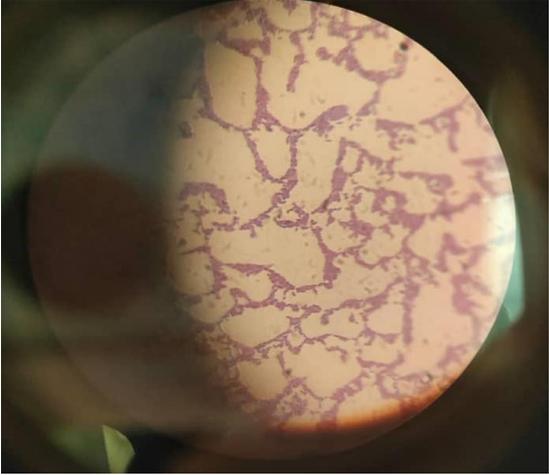
Après la détermination du titre phagique, nous avons mélangé 1ml du prélèvement avec 1ml du bouillon nutritif (BN) stocké dans des tubes Eppendorf à 4°C jusqu'à utilisation.

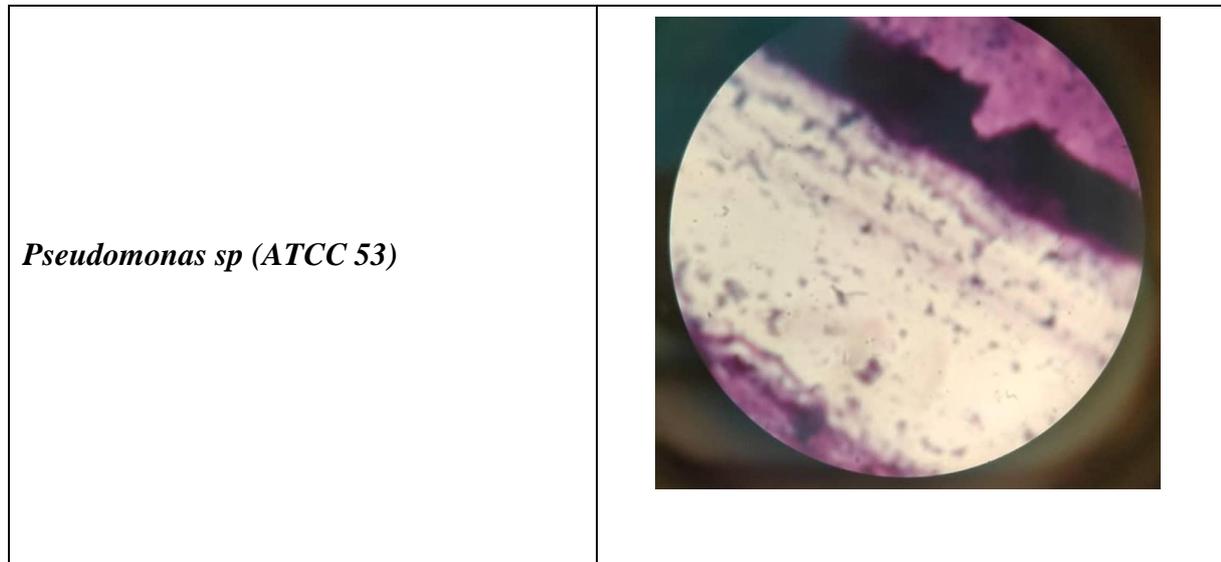
Résultats et Discussion

1. Résultats :**A. Culture des bactéries :**

Les résultats de la culture bactérienne ont démontré l'aspect macroscopique, qui dénote le développement de bactéries sur un milieu particulier et l'identification par coloration de Gram a présenté la morphologie et Gram des bactéries. La forme et le groupement des bactéries ont également été étudiés afin de confirmer leur pureté après une longue période de stockage.

Tableau 5 : Résultats de l'examen microscopique des bactéries.

Nom des bactéries	Aspect microscopique
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 22)	
<i>Staphylococcus sp</i> (ATCC 23)	



B. Filtration :

Les résultats de la filtration obtenus à partir des échantillons d'eau usée et de boue liquide de la station d'épuration de la ville de Guelma sont présentés dans la figure (22) ci-dessous.

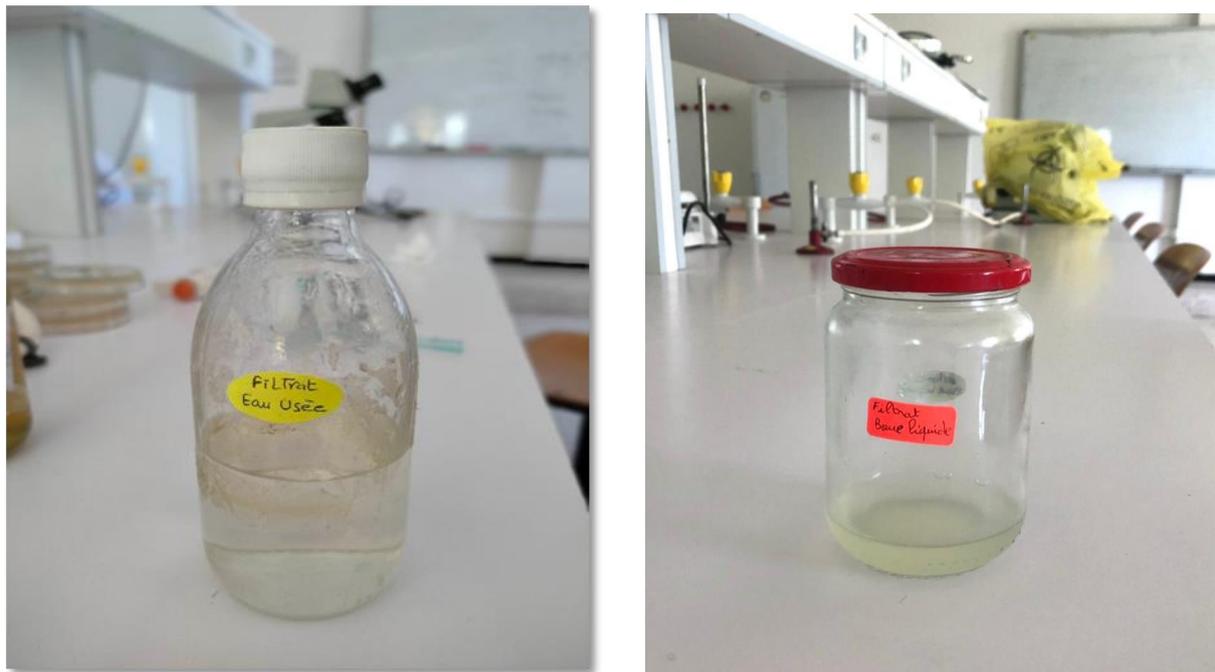


Figure 22 : Les filtrats obtenus des échantillons.

Les étapes prévues pour suivre la phase de filtration telles que décrites dans la partie matériel et techniques, à savoir application aux bactéries multirésistantes, synergie antibiotique, et identification et conservation des bactériophages.

C. Titration des phages :

La technique de culture en double couche pendant 24h à 37°C, nous a permis d'observer et de visualiser des plages de lyses dans les boîtes contenant la souche *E.coli* ATCC22 et *Staphylococcus* sp ATCC23 les résultats obtenus sont présentés dans les figures (23) et (24).

Le titre phagique dans les boîtes avec la souche *E.coli* était de l'ordre de 300 PFU/ml de l'échantillon d'eau usée, et de 30 PFU/ml de l'échantillon de boue liquide. Ce résultat montre bien la grande richesse de l'eau usée en bactériophages qui est 10 fois supérieur au nombre de phages obtenu de la boue liquide.



Figure 23: Résultats sur *E.coli* eau usée.



Figure 24: Résultats sur *E.coli* eau Boue liquide.

D. Méthode de spots :

Afin de valider les résultats du titre phagique déterminé par la méthode on a procédé à la méthode du spot test.

Après la période d'incubation de 24h à 37 °C, on a remarqué l'apparition des zones claires autour des disques auxquels on a ajouté 10 µl du filtrat pour la souche *Staphylococcus* et *E. coli*, mais aucun effet sur *Pseudomonas*.

Les résultats obtenus sont montrés dans les figures (25) et (26).



Figure 25: Spot test sur *Staphylococcus* boue liquide

Figure 26: Spot test sur *E. coli* boue liquide.

Les diamètres obtenus :

Nom des bactéries	Boue liquide
<i>E.coli</i>	23mm
<i>Staphylococcus</i>	22mm

Ce résultat montre un effet moyen (efficacité intermédiaire) des phages isolés sur les souches de références utilisées

E. Méthode de l'antibiogramme :

Les résultats obtenus par l'antibiogramme réalisé par les phages conservés dans le LB liquide ont montré que les bactéries pathogènes sont résistantes aux phages isolés de la S

Les résultats obtenus sont montrés dans les figures (27) et (28)

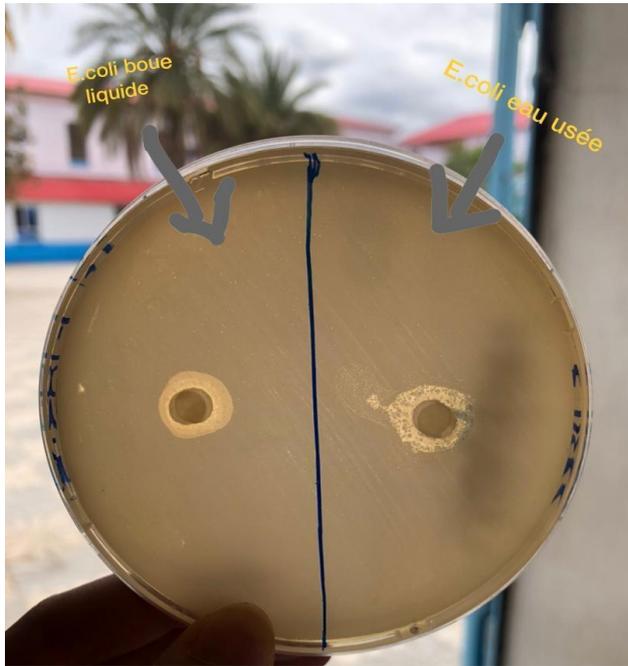


Figure 27 : résultat obtenu avec *E.coli*

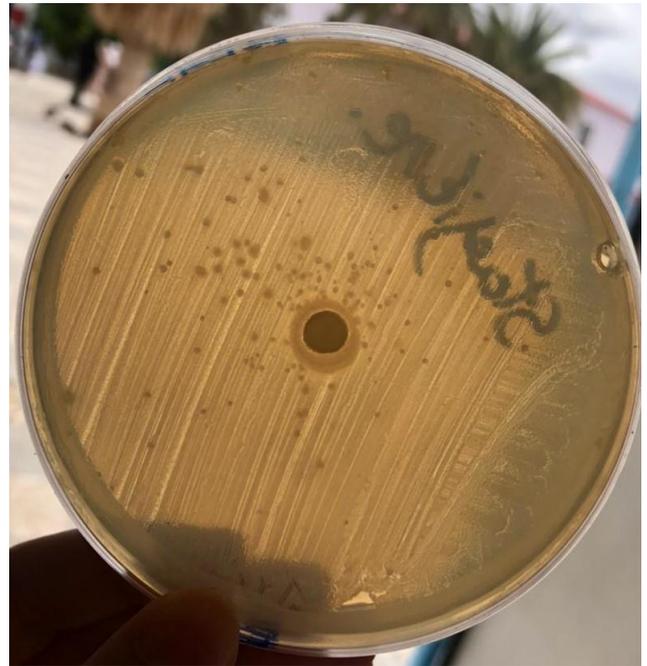


Figure 28 : résultat obtenu avec *Staphylococcus*

Les diamètres obtenus :

Nom des bactéries	Boue liquide	Eau usée
<i>E.coli</i>	12mm	14mm
<i>Staphylococcus</i>	0 mm	0 mm

A partir de ces résultats on dit que les bactéries sont résistantes aux phages



Figure 29 : L'apparition des zones d'inhibitions autour disque d'antibiotique sur *E.coli*

Type d'antibiotique	Diamètre
IPM	33mm
ATM	16mm
NIT	20mm
KMN	18mm
TOB	22mm

L'utilisation des phages conservés n'a pas donné un résultat important comparé aux antibiotiques utilisés à l'hôpital

En comparant les résultats exprimés en mm du diamètre des antibiotiques et celui des phages on dit que c'est faible par rapport aux ATBs donc on dit que les bactéries pathogènes testés sont résistantes aux phages isolés.

2. Discussion :

Les phages sont des virus qui possèdent la particularité de n'infecter que les bactéries. Beaucoup d'entre eux sont capables de détruire spécifiquement les bactéries pathogènes, tout en étant inoffensifs pour nos bactéries amies et les cellules humaines. Présents dans la nature, ils sont à notre portée. En effet, un phage peut être entraîné in vitro pour que sa virulence vis-

à-vis de la bactérie pathogène ciblée soit exaltée. Qu'un traitement puisse être préparé « sur mesure » rend opportun de proposer un nouveau paradigme pour son utilisation **(Dublanche, 2016)**.

Le premier objectif de cette étude était d'isoler des phages par deux méthodes à partir d'échantillons d'eau usée et boue liquide, puis de les appliquer à des bactéries multirésistantes aux antibiotiques.

Les résultats du test des spots ont montré la présence de zones inhibitrices dans les boîtes de Pétri contenant *E. coli* (25mm) et *Staphylococcus* (22mm), alors qu'elles n'ont pas été observées dans la boîte contenant *Pseudomonas*.

Au test d'antibiogramme *E. coli* les résultats de l'analyse du laboratoire médical, qui consistait à isoler l'échantillon d'étude à l'aide d'un prélèvement pathologique, ont montré des zones inhibitrices (12mm pour boue liquide) (14mm pour eau usée). Ces résultats et leurs comparaisons entre eux suggèrent que les antibiotiques ont un impact plus important que les phages isolés.

Les bactéries peuvent constituer une barrière à l'adsorption des phages en diminuant la disponibilité des récepteurs auxquels les phages se lient. L'acquisition de mutations ponctuelles dans leur génome est probablement le moyen le plus simple par lequel les bactéries peuvent devenir totalement résistantes à phages **(Egido et al, 2021)**.

Les bactéries ont développé des systèmes de défense dédiés à la défense contre les éléments génétiques mobiles tels que les phages. Beaucoup d'entre eux sont regroupés dans des régions du génome appelées îlots de défense offrant une opportunité pour découvrir de nouveaux systèmes de défense. Cette stratégie s'est traduite par une expansion importante et rapide de ces bactéries d'arsenal connues utilisées pour se défendre contre l'infection par les phages **(Egido et al, 2021)**.

La coévolution phage-bactérie peut être définie comme un processus d'adaptation et de contre-adaptation réciproques entre le phage et son hôte bactérien. Les interactions phage-bactérie sont d'abord médiées par les phages utilisant leurs fibres de queue pour s'adsorber sur la surface bactérienne, via un mécanisme de verrouillage **(Oechslin, 2018)**.

Le comptage des plaques est considéré comme l'étalon-or pour le dénombrement des phages. Le test de double couche de gélose (DLA) permet un contact localisé phage-hôte dans un environnement confiné (boîte de Pétri) contenant deux couches de gélose superposées **(Ács Norbert et al, 2020)**.

Les bactéries peuvent résister à l'attaque des phages par différents mécanismes, y compris les mutations spontanées, les systèmes de modification de restriction et l'immunité adaptative via le système CRISPR-Cas. Les mutations spontanées sont les principaux

mécanismes à l'origine de la résistance aux phages et de la coévolution phage-bactérie **(Oechslin ,2018)**.

Cependant, la communauté scientifique n'a pas été en mesure de faire progresser la phagothérapie en raison de préoccupations concernant les effets défavorables sur la santé humaine. La phagothérapie peut être une stratégie alternative pour lutter contre cette menace. Cependant, la recherche sur la possibilité de combiner diverses formes de phagothérapie avec des thérapies plus traditionnelles comme l'antibiothérapie est en cours et aura probablement lieu dans les prochaines années. La phagothérapie est actuellement approuvée pour être utilisée comme traitement avancé **(Breton, 2019)**.

CONCLUSION

Depuis leur découverte, les antibiotiques ont été acceptés comme la seule réponse pour éliminer de nombreuses bactéries pathogènes ; néanmoins, du fait de leur large utilisation, des bactéries résistantes sont apparues. En conséquence, les scientifiques travaillent pour trouver de nouvelles réponses à ce problème, et il a été découvert que l'utilisation de méthodes naturelles, telles que les phages, comme alternative aux antibiotiques, qui sont des virus qui mangent et détruisent les bactéries cibles, est préférable.

Dans cette étude, nous avons isolé des phages de divers échantillons (boue liquides et eau usée) préparés à la station des traitements des eaux usées de la Wilaya de Guelma afin de les utiliser contre les bactéries multirésistantes aux antibiotiques.

Les résultats du spot test et l'inclusion des phages ont clairement montré que les phages isolés interagissaient de manière spécifique sur les bactéries, avec la présence de plages de lyse sur *Staphylococcus* et *E.coli*. Cependant, il n'y a pas de résultats significatifs avec la *Psuedomonas*.

Selon des études précédentes, l'utilisation des phages a été établie malgré la rareté des expériences in vivo. Par conséquent, la recherche sur les bactéries et leurs applications doit se poursuivre et ne pas s'arrêter.

Références Bibliographiques :

Abdelsattar, A, Dawoud A , Makky ,S , Nofal, R , Aziz, R , El-Shibiny, A, 2021. Bacteriophages: from Isolation to Application. Current pharmaceutical biotechnology. 22.10.2174/1389201022666210426092002.

Abedon, ST, 2009. Phage evolution and ecology. Advances in Applied Microbiology DOI: 10.1016/S0065-2164(08)01001-0

Ács Norbert, Gambino Michela and Brøndsted Lone 2020 Bacteriophage Enumeration and Detection Methods Sec. Virology Volume 11 - 2020 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.594868>

Adams, M.H, 1959. Bacteriophages. New York, Interscience Publishers.

AFSSA, 2006. Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. Maisons-Alfort : AFSSA, 214 pages. Disponible en ligne sur : <https://www.anses.fr/Documents/SANT-Ra-ABR.pdf>

Alberts, B, Johnson, A, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K. et Walter, P,2002 . The life cycle of bacteriophage lambda." Dans Molecular biology of the cell (4th ed.). New York, NY: Garland Science. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26845/figure/A893/?report=objectonly>.

ALLEN H.K., DONATO J., HANDELSMAN J. et al.2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. Nature Reviews Microbiology. vol 8, n°04, PP251-259

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>

Ansaldi M, Boulanger P, Brives Ch, Debarbieux L, Dufour N, et al, 2020. Les applications antibactériennes des bactériophages. Virologie, 24 (1), pp.23-36. ff10.1684/vir.2019.0805ff. fhal-02530998

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.

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>

Batinovic.S , Wassef F , Knowler S A. , T.F.D. Rice , Stanton C R. , Rose J , Tucci J , Nittami T , Vinh A , Drummond G R. , Sobey C G. , Chan Hiu Tat , Seviour R J. , Petrovski S and Franks A E,2019. Bacteriophages in Natural and Artificial Environments , 8(3), 100; <https://doi.org/10.3390/pathogens8030100>

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.

- Breton, A, 2019.** La phagothérapie orale. Science du vivant [q-bio], Dumas. Canada.
- Campbell, A ,2003.** The future of bacteriophage biology. Nat Rev Genet 4, 471–477. <https://doi.org/10.1038/nrg1089>
- Chamikara, Pasindu. ,2016.** Use of Bacteriophages in Agriculture. 10.13140/RG.2.2.24309.47845.
- Comeau A. M, Tétart,F ,Trojet S N , Prère M.F et Krisch M. H 2008.** La « synergie phages-antibiotiques »Un enjeu pour la phagothérapie 449 – 451 <https://doi.org/10.1051/medsci/2008245449>
- Dong Xue, Pei Pan, Di-Wei Zheng, Peng Bao, Xuan Zeng, Xian-Zheng Zhang , 2020.** Bioinorganic hybrid bacteriophage for modulation of intestinal microbiota to remodel tumor-immune microenvironment against colorectal cancer
- Dublanchet Alain, 2016** Une solution à l’antibiorésistance : la phagothérapie Dans Hegel 2016/2 (N° 2), pages 212 à 213
- Dublanchet, A, 2017.** La phagothérapie: des virus pour combattre les infections : renouveau d’un traitement au secours des antibiotiques. 248 pages, parution le 27/04/2017 (2eme édition).
- Dublanchet. A , Patey. O ,2015.** La phagothérapie. La lettre de l’infectiologue.
- Dublanchet. A. ,2009.** Des virus pour combattre les infections - la phagothérapie : renouveau d’un traitement au secours des antibiotiques. Editions FAVRE, Lausanne (Suisse), 247 pages
- 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>
- Educ. Alliance-Phage Hunt. Adv. Genomics Evol. Sci. Program. URL <https://seaphagesphagediscoveryguide.helpdocsonline.com/3-0-overview> (accessed 2.20.20).
- Egido Julia E, Costa Ana Rita, Aparicio-Maldonado Cristian,Haas1Pieter-Jan and Brouns Stan J. J. 2021** Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance , Department of Bionanoscience, Delft University of Technology, van der Maasweg 9, 2629 HZ Delft, Netherlands.
- Errafyg, A, 2016.** Rôle de la phagoterapie dans le traitement des infections bacteriennes (Thesis). MOHAMMED V-RABAT, Maroc
- Ferry T, Kolenda C, Gustave CA et al. ,2018.** Phage therapy in bone and joint infection : history, scientific basis, feasibility and perspectives in France. Virologie (Montrouge). 2020 Feb 1;24(1):4-11. doi: 10.1684/vir.2020.0810.
- García, P, 2018.** Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of *Staphylococcus* phages aimed for the industrial development of phagebased antimicrobial products. PLOS ONE 13, e0205728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205728>

- 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, Gontier Marie ,2021.** Les bactériophages, de leur découverte à leurs utilisations <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/microbiologie/virologie/les-bacteriophages-de-leur-decouverte-a-leurs-utilisations>
- González-Menéndez, E, Fernández, L, Gutiérrez, D, Rodríguez, A, Martínez, B, González-Mora A, Hernández-Pérez Jesús, Iqbal Hafiz M. N, Rito-Palomares Marco and Benavides J, 2020.** Bacteriophage-Based Vaccines: A Potent Approach for Antigen Delivery 8(3), 504; <https://doi.org/10.3390/vaccines8030504>
- Grath Mc S and Sinderen V.D, 2007.** Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology Department of Microbiology, and Alimentary Pharmabiotic Centre, University College Cork, Ireland <https://doi.org/10.21775/9781910190159>
- Grossi O, 2006.** Evaluation de l'efficacité d'une suspension de bactériophages antistaphylococciques. Corrélation in vivo- in vitro. Université de Nantes <https://archive.bu.univ-nantes.fr/pollux/show/show?id=5925ee3e-be11-4319-88b1-9c7e99f1ab32>
- Guillaume, F, 2020.** La phagothérapie : Une thérapeutique d'espoir face à l'antibiorésistance ? (Thèse d'exercice). Université de Limoges
- Guttman, B, Raya, R, Kutter, E, 2005.** Basic Phage Biology, in: Kutter E, Sulakvelidze A, eds (Ed.),. pp
- 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 Ul Ihtisham , Krukiewicz K , Yahya G, Haq Ul M , Maryam S, Mosbah A R ,Sameh Saber and Alrouji M, 2023.** The Breadth of Bacteriophages Contributing to the Development of the Phage-Based Vaccines for COVID-19: An Ideal Platform to Design the Multiplex Vaccine 24(2), 1536; <https://doi.org/10.3390/ijms24021536>
- Haq, I.U, Chaudhry, W.N, Akhtar, M.N, Andleeb, S, Qadri, I, 2012.** Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. Virol. J. 9, 9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-9>
- Harper D. R, Parracho Helena M. R. T, Walker J , Sharp R , Hughes G , Werthén M , Lehman S and Morales S, 2014.** Bacteriophages and Biofilms 3(3), 270-284; 10.3390/antibiotics3030270.
- iStock ,2014.** Structure of virus Bacteriophage stock illustration July 03, 2014 ID:500277705
- Kirby, A.E, 2012.** Synergistic action of gentamicin and bacteriophage in a continuous culture population of *Staphylococcus aureus*. PLOS One, 7(11): 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051017>
- Kutter E, Raya P, Carlson K, 2005.** Molecular mechanism of phage infection, in: Bacteriophages: Biology and Applications. Elizabeth

- Kutter, E, A. Sulakvelidze 2005.** Bacteriophages Biology and applications. Boca Raton. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/509419>
- 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>
- Loponte. R , Pagnini U, Iovane G , Pisanelli.G , 2021.** Phage Therapy in Veterinary Medicine <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040421>
- Madigan et Martinko, 2007.** Brock Biologie des micro-organismes. 11^{ème} édition. France : Pearson Education .Université de Carbondale de l'Illinois du Sud. Traduction française coordonnée par Daniel Prieur et publiée par Pearson Education France.
- Magin, V, 2019.** Exploitation du potentiel des bactériophages dans le traitement des surfaces en contact avec l'eau, contaminées par un biofilm de *P. aeruginosa* (phdthesis). Ecole nationale supérieure Mines-Télécom Atlantique, France. <https://theses.hal.science/tel-02391184>
- Marza, J.A.; Soothill, J.S.; Boydell, P. and Collyns, T.A. 2006.** Multiplication of therapeutically administered bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa* infected patients. Burns, 32: 644–646.
- Massali, F.Z, Bouaninba, S, 2016.** Etudes sur les bactériophages du sol et leurs Méthodes d'isolement (Master). Frères Mentouri Constantine1, Constantine.
- Mullan, WMA , 2001.** Isolation and purification of bacteriophages. Dairy science food
- Neter, E, Clark, P ,1944.** The effects of penicillin on *Staphylococcus* bacteriophage. Journal of Bacteriology
- Oechslin Frank, 2018** Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy Department of Fundamental Microbiology (DMF), University of Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland.
- Pinheiro, L. A. M, Pereira, C, Frazão, C, Balcão, V. M, & Almeida, A ,2019.** Efficiency of phage $\phi 6$ for bio-control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* : An in vitro pre-liminary study. Microorganisms, 7(9), 286. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090286>
- Polaska M and Sokolowska B 2019 .** Bacteriophages—a new hope or a huge problem in the food industry 2019; 5(4): 324–346 [10.3934/microbiol.2019.4.324](https://doi.org/10.3934/microbiol.2019.4.324) <https://doi.org/10.3934/microbiol.2019.4.324>
- Poxleitner, M, Pope, W, Jacobs-Sera, D, Sivanathan, V, Hatfull, G, 2018.** Chapter 3: Phage Basics [WWW Document]. SEA-PHAGES Off. Website HHMI Sci.
- Ravat. F , Jault. P , Gabard. J ,2015.** Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes Ann Burns Fire Disasters.
- Ripp, Steven, Miller, Robert V, 1997.** The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment. Microbiology 143, 2065–2070. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-6-2065>

Rivasi, M ,2013. La phagothérapie une solution complémentaire aux antibiotiques. Députée européenne Europe Écologie Les Verts du grand Sud-Est

Rohwer, F, Prangishvili, D. & Lindell, D ,2009. Roles of viruses in the environment. Environmental Microbiology <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02101.x>

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.

Sozzi, T, Gnaegi, F, D'aminco, N, Hose, H , 1982. Difficultés de fermentation malolactique du vin dues à des bactériophages de *Leuconostoc oenos*. Revue Suisse de viticulture arboriculture et horticulture Vol. 14(1);p 17-23.

Sulakvelidze, A , 2011. Safety by nature: potential bacteriophage applications. Microbe Magazine 6. 122-126. 10.1128/microbe.6.122.1.

Szaleniec J , Gibala A , Pobiega M , Parasion S , Składzień J , Stręk P , Gosiewski T and Szaleniec M,2019. Exacerbations of Chronic Rhinosinusitis—Microbiology and Perspectives of Phage Therapy 8(4), 175; <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040175>

TAFUKT R. 2011.Caractérisation phénotypique des mécanismes de résistance aux antibiotiques des souches d'E.coli isolées de la station d'épuration d'Aokas-Béjaia. Thèse de Magister. Microbiologie Appliquée aux Substances Antimicrobiennes. Béjaia: Université Abderrahmane Mira. 69p.

Tan, GH,Nordin, MS. & Napsiah, AB ,2008. Isolation and characterization of lytic bacteriophages from sewage water (Pengasin gandan pencirian bakteriofaj daripada air kumbahan. Journal of Tropical Agriculture and Food Science.

Tankeshwar Acharya ,2022. phage Typing Method: Principle, Procedure, Results

Trojet, 2011. Étude de la reconnaissance Phage-Bactérie: Analyse fonctionnelle de l'adhésine gp38 des phages de la superfamille de Type T4. Microbiologie et Génétique Moléculaire. Université Toulouse III <https://www.theses.fr/2011TOU30130>

Urban-Chmiel, R, Wernicki, A, Stęgierska, D, Dec, M, Dudzic, A and Puchalski, A , 2015. Isolation and characterization of lytic properties of bacteriophages specific for *M. haemolytica* strains. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140140>

Vonlanthen, A,2011. Dossier – Bactériophages (phages) : le futur des antibiotiques?In Dossiers, Podcast Science. [URL:http://www.podcastscience.fm/dossiers/2011/03/11/dossierbacteriophages-phages-le-futur-des-antibiotiques/](http://www.podcastscience.fm/dossiers/2011/03/11/dossierbacteriophages-phages-le-futur-des-antibiotiques/)

Wernicki, A, Nowaczek, A and Urban-Chmiel, R , 2017. Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry. Virology Journal 14, 179 (2017) <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0849-7>

Annexes

ANNEXE 01 : Composition chimique des milieux et solution utilisés :**1- Bouillon LB (200ml)**

Tryptone	2g
NaCl.....	2g
Extrait de levure	1g
Agar.....	3g

2- Gélose Nutritive (1L)

Peptone.....	5g
NaCl.....	5g
Extrait de viande de bœuf	1g
Extrait de levure.....	2g
Agar.....	15g

pH de milieu = 7,4

3- Milieu LB demi molle (1L)

Tryptone.....	10g
NaCl.....	10g
Extrait de levure	5g
CaCl ₂	0,36g
Agar.....	7,5g

4- Milieu LB solide (1L)

Tryptone.....	10g
NaCl.....	10g
Extrait de levure.....	5g
Agar.....	15g
CaCl ₂	0,36g

pHde milieu = 7,2