



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département : Microbiologie**

**قسم: الميكروبيولوجيا**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie**

**Moléculaire des Microorganismes**

Intitulé :

---

## **Recherche de bactériophages lytiques dans les eaux usées et boues. Identification de leurs bactéries hôtes**

---

**Présenté et soutenu par : Bendaira Selma et Brik Kaouther**

**Le : 06/07/2015**

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** Mme. Bouzeraib Latifa (MAA- UFM Constantine).

**Rapporteur :** Dr. Boubekri Karima (MCA- UFM Constantine).

**Examinatrice :** Mme. Guergouri Ibtissem (MAA- UFM Constantine).

*Année universitaire  
2014 - 2015*

## *Remerciements*

*Ce mémoire était le fruit d'un travail fiable, réalisé au niveau du laboratoire de la biologie moléculaire de l'université Mentouri de Constantine en collaboration avec le laboratoire de contrôle qualité et la répression des fraudes (QUAQE) de Sidi Mabrouk, n'aurait pu être accompli sans un cadre de travail favorable.*

*Le grand Merci nous le réservons à Dieu, sans qui tout cela n'aurait pas été possible, pour avoir créé les phages, pour cette vie, « chokr li Allah » pour TOUT*

*Nous remercions sincèrement toutes les personnes qui nous ont communiquées la confiance nécessaires et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail de recherche et à l'élaboration de ce manuscrit.*

*Nous remercions le Chef de département du laboratoire de Contrôle qualité et la répression des fraudes (QUAQE), Monsieur Belmounas Hammoudi qui nous a chaleureusement accueilli pour débiter notre travail de recherche. Merci pour nous avoir donné la chance et le privilège de réaliser la partie la plus sensible de notre travail pratique (isolement et purification des souches) au niveau de vos paillasses. Merci pour votre soutient et toute l'attention que vous avez porté à notre travail de recherche.*

*Nous remercions profondément Madame Boubekri Karima notre encadreur de mémoire et maître de Conférences à l'université des frères Mentouri, pour l'enthousiasme avec lequel elle a encadré ce travail. Merci pour les précieux conseils que vous nous avez apporté au fil de ces cinq mois ainsi que pour nous avoir fait partager votre expérience enrichissante et votre curiosité scientifique. Merci pour votre aide.*

*Nous tenons à remercier également notre présidente de jury Madame Bouzraieb Latifa maître assistante à l'université Mentouri de Constantine ainsi que notre examinatrice Madame Guergouri Ibtissem maître assistante à l'université Mentouri de Constantine pour l'intérêt qu'elles témoignent envers ce travail en acceptant de lire et d'évaluer ce manuscrit. Qu'elles trouvent ici le témoignage de notre profond respect.*

*Nous aimerions aussi remercier les responsables du laboratoire de la biologie moléculaire de l'Université Mentouri de Constantine du Sacré-Cœur, particulièrement à Madame Nabila et Monsieur le Doyen de la faculté des sciences Dhimet Laid, qui nous ont*

donné tout le soutien, afin d'accomplir la partie pratique de notre travail de recherche. Ainsi qu'à toute l'équipe des ingénieurs de laboratoires de la Faculté, Nous précisons, nos dames Samia, Nadia et Fouzia, pour leurs idées, leur temps et leur implication motivante et encourageante. Merci de nous avoir guidés et accueilli.

Nous remercions également Madame Salima, Monsieur Choufi Salah, Monsieur Tifour Elyes et Monsieur Boulakroune Zaher pour leur générosité et pour leur contribution précieuse.

Merci à tous nos enseignants pour leurs efforts puissants au cours de toutes ces années. Nous remercions à leur tête Monsieur le professeur Heddi et nous lui exprimons toute notre gratitude pour son aide. Nous saluons également toutes ses qualités humaines si rares de nos jours.

Nous adressons également un profond remerciement à notre professeur Madame Guergouri Ibtissem, pour ses encouragements, son support et ses conseils tout au long de notre stage. Merci pour la richesse de nos échanges et toute l'aide précieuse que vous nous avez apporté.

Nous tenons à exprimer nos remerciements à tous les membres du Service générale du Centre Hospitalo-universitaire (CHU) de Constantine à leur tête Monsieur Shili Fateh qui nous a énormément aidé. Merci pour votre noblesse.

A Mr Bounouare Farid, et Monsieur Larraba Djamel, merci pour votre générosité et votre disponibilité.

Nous tenons à remercier de tout cœur celles qui nous ont consacré une partie de leur temps, qui ont partagé avec nous leurs savoir faire et leur amitié, nous spécifions nos chères Souad, Laila et Sara ainsi que toute l'équipe du laboratoire de Contrôle qualité de Sidi mabrouk de Constantine. Vous resterez notre meilleur souvenir.

Un merci chaleureux pour tous nos collègues. Nous avons partagé ensemble nos doutes et nos craintes, nous n'oublierons jamais tous les moments que l'on a partagés ensemble.

Nous finirons par les VIP, les membres de nos familles aussi nombreux et divers que les bactériophages et qui sont toujours fiers de nous. Merci à vous pour tous vos sacrifices.

## *Dédicace*

*Je dédie cette réussite scientifique, en particulier à mon papa unique dans son genre Rabah et à ma chère maman Ouassila qui me soutiennent depuis toujours. C'est grâce à eux qu'aujourd'hui je suis arrivée jusqu'ici. J'espère que je resterai toujours la source de votre fierté. Que Dieu vous récompense et vous garde auprès de moi ici et dans l'au-delà.*

*Mes pensées vont ensuite vers mes sœurs Lamia, Yasmine et Lina je leur remercie du fond du cœur pour leurs encouragements leur soutien et surtout leur tendresse. Que Dieu vous bénisse.*

*Je remercie tous mes amis proches Kaouther, Imen, Khaoula, Chouaib, Bilal et Racim pour leur amitié sincère, leur disponibilité, leur gentillesse sans borne, sans jamais rien demander en retour.*

*Selma*



---

## TABLE DES MATIERES

<b>Liste des abréviations</b> .....	iii
<b>Liste des figures</b> .....	v
<b>Liste des tableaux</b> .....	vii
<b>Introduction</b> .....	1
<b>Recherche bibliographique</b> .....	3
1. La biologie des bactériophages .....	3
1. 1. Définition d'un bactériophage .....	3
1. 2. Structure et morphologie des bactériophages .....	3
1. 3. La relation phage-cellule hôte .....	4
1. 4. La reproduction des bactériophages .....	5
1.5. La défense de l'hôte bactérien .....	9
1. 6. Le spectre d'hôte d'un bactériophage .....	12
1. 7. Classification des bactériophages .....	12
1. 8. Ecologie des bactériophages .....	14
a) Habitats .....	14
b) Inactivation en milieu naturel.....	15
c) Rôle écologique .....	16
1. 9. Les domaines d'application des bactériophages .....	16
2. La phagothérapie .....	19
2.1 Définition de la phagothérapie.....	19
2.2 La notion de la phagoprophylaxie .....	19
2.3 Histoire de la phagothérapie.....	20
2.4 Des exemples sur les essais cliniques de la phagothérapie .....	20
a) Chez l'animal .....	20
b) Chez l'homme .....	20

2.5 L'innocuité de la phagothérapie chez l'homme et l'animal .....	21
2.6 La réponse immunitaire de l'organisme humain .....	22
2.7 La notion du cocktail phagique .....	23
2.8 Le cadre réglementaire de la phagothérapie .....	23
2.9 Résistance aux antibiotiques et infections nosocomiales.....	24
2.10 L'industrie pharmacologique en service de la phagothérapie.....	24
2.11 Avantages et inconvénients de la phagothérapie en comparaison avec l'antibiothérapie .....	25
 <b>Matériel et méthodes</b> .....	 28
1. L'échantillonnage .....	28
2. La filtration .....	28
3. Le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile FTAM .....	29
4. La purification et la conservation des souches isolées .....	29
5. La Technique de spot test.....	30
6. La technique des plages de lyse .....	30
7. La méthode de conservation des phages .....	31
8. L'identification phénotypique des isolats .....	31
 <b>Résultats et discussion</b> .....	 35
<b>Conclusion</b> .....	57
<b>Références bibliographiques</b> .....	58
<b>Annexes</b> .....	70
<b>Résumés</b> .....	73

## LISTE DES ABREVIATIONS

- ADH:** Arginine Dihydrolase
- AMM:** Autorisation de Mise sur le Marché
- AMX:** Amoxicilline
- AMY:** Amygdaline
- ARA:** Arabinose
- Cas:** CRISPR-associated
- CHU:** Centre Hospitalo-universitaire
- CIT:** Citrate
- CRISPR:** Clusters of Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
- CTX:** Cefotaxime
- DMS:** Sulfure de Diméthyle
- DNR:** Drogue Nouvelle de Recherche
- DSB:** Double Strand Breaks
- E:** Erythromycine
- EcoShield<sup>TM</sup>:** Préparation de phages d'action spécifique contre *Escherichia coli* O157: H7
- EFP:** Efficacité à Former des Plages de lyses
- EPA:** US Environmental Protection Agency
- FDA:** Food and Drug Administration
- Gel:** Gelatin
- GLU:** Glucose
- GRAS:** Generally Recognized As Safe
- H<sub>2</sub>S:** Sulfate d'Hydrogène
- ICTV:** International Committee on Taxonomy of Viruses
- IND:** Indole
- IND:** Investigational New Drug Application
- INO:** Inositol
- IPM:** Imipiném
- K:** Kanamycine
- LB:** Luria Bertani
- LDC:** Lysine Décarboxylase

**Listex™ P100:** Préparation de phages d'action spécifique contre *Listeria monocytogenes*

**ListShield™ (LMP 102):** Préparation de phages d'action spécifique contre la bactérie

**LPS:** Lipopolysaccharides

**MAN:** Mannitol

**MEL:** Mélobiose

**ODC:** Ornithine Décarboxylase

**ONPG:** Ortho-NitroPhényl- $\beta$ -Galactoside

**PAM:** Protospacer Adaptor Motif

**PIP:** Piperaciline

**RA:** Rifampicine

**RHA:** Rhamnose

**RM:** Rouge de Méthyle

**SAC:** Saccharose

**SalmoFresh™:** Préparation de phages d'action spécifique contre *Salmonella spp.*

**SM:** Sodium-Magnésium

**SOR:** Sorbitol

**TDA:** Tryptophane Désaminase

**tracrRNA:** ARN trans-activateur

**TSST- 1:** Toxic Shock Syndrome Toxin-1

**URE:** Urée

**USDA:** United States Department of Agriculture

**VP:** Voges-Proskauer

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 01</b> : morphologie schématique des 3 familles des Caudovirales .....	4
<b>Figure 02</b> : adsorption des bactériophages T4 sur la surface bactérienne d' <i>Escherchia coli</i> .....	5
<b>Figure 03</b> : le cycle lytique du bactériophage T4 dans la bactérie <i>E.coli</i> .....	6
<b>Figure 04</b> : positionnement des principaux sites de clivage des endolysines au niveau du peptidoglycane des bactéries à Gram positif.....	7
<b>Figure 05</b> : la structure de base des endolysines phagiques.....	7
<b>Figure 06</b> : un aperçu du système CRISPR-Cas type II.....	11
<b>Figure 07</b> : les principaux morphotypes de bactériophages infectant les procaryotes.....	14
<b>Figure 08</b> : action locale d'un polymère biodégradable imprimé de bactériophages sous le nom «phagobioder» .....	21
<b>Figure 09</b> : système de filtration (Wheaton, USA).....	29
<b>Figure 10</b> : la technique des cadrans.....	30
<b>Figure 11</b> : la suspension phagique mise en contact avec la bactérie à tester.....	31
<b>Figure 12</b> : la comparaison des couleurs sur la bandelette de PH avec le code colorimétrique.....	39
<b>Figure 13</b> : l'apparition de plages de lyse sur la culture bactérienne de la souche sensible BKSHX.....	39
<b>Figure 14</b> : la technique de récupération des plages pour leur conservation.....	39
<b>Figure 15</b> : l'observation microscopique (X1000) après coloration de Gram de la souche <i>Serratia lequefasciens</i> BKSH 09.....	43
<b>Figure 16</b> : résultat de l'identification de l'isolat BKSH19 par la galerie API 20 E.....	43
<b>Figure 17</b> : la pousse de la souche <i>Serratia lequefasciens</i> BKSH 09 sur milieu Mac Conkey .....	43
<b>Figure 18</b> : l'observation microscopique (X1000) après coloration de Gram de la souche BKSH14.....	44
<b>Figure 19</b> : résultats de l'identification de l'isolat BKSH14 par la galerie API 20 E.....	44
<b>Figure 20</b> : l'isolement de la souche BKSH 14 sur milieu TSI l'observation microscopique (G*100) après coloration de Gram de la souche BKSH 18.....	45
<b>Figure 21</b> : résultat de l'identification de l'isolat BKSH 18 par la galerie API 20 E.....	45
<b>Figure 22</b> : les colonies roses caractéristiques de la dégradation du lactose de	

---

la souche BKSH 18 sur milieu Mac Conkey.....	45
<b>Figure 23:</b> la culture de la souche BKSH 16 sur GN et sur TSI.....	48
<b>Figure 24 :</b> les observations microscopiques (X1000) après coloration de Gram des souches BKSH03, BKSH06 et BKSH11 respectivement.....	49
<b>Figure 25 :</b> les catégories cliniques S, I, R selon les valeurs critiques .....	53
<b>Figure 26 :</b> antibiogramme de la souche <i>Enterobacter cloacae</i> BKSH11.....	54
<b>Figure 27 :</b> antibiogramme de la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BKSH01' .....	54
<b>Figure 28 :</b> antibiogramme de la souche <i>Aeromonas hydrophila</i> BKSH02.....	55
<b>Figure 29 :</b> antibiogramme de la souche <i>Serratia liquefaciens</i> BKSH09.....	55
<b>Figure 30 :</b> antibiogramme de la souche <i>Klebsiella oxytoca</i> BKSH18.....	56
<b>Figure 31 :</b> antibiogramme de la souche <i>Aeromonas hydrophila</i> BKSH 15 multirésistante .....	56

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 01</b> : les facteurs de virulences codés par les bactériophages.....	<b>9</b>
<b>Tableau 02</b> : résistance bactérienne en fonction des étapes du cycle répliatif viral et adaptation en retour des bactériophages.....	<b>10</b>
<b>Tableau 03</b> : la classification des bactériophages selon l'ICTV.....	<b>13</b>
<b>Tableau 04</b> : les avantages et les inconvénients de la thérapie phagique et de l'antibiothérapie.....	<b>26</b>
<b>Tableau 05</b> : Le calendrier des prélèvements effectués.....	<b>28</b>
<b>Tableau 06</b> : les résultats du dénombrement de la FTAM.....	<b>35</b>
<b>Tableau 07</b> : les résultats du dénombrement des plages de lyses.....	<b>38</b>
<b>Tableau 08</b> : les résultats de l'étude morphologique des souches isolées.....	<b>40</b>
<b>Tableau 09</b> : les résultats des tests biochimiques sur les souches faisant partie des <i>Enterobacteriaceae</i> .....	<b>42</b>
<b>Tableau 10</b> : les résultats des cultures obtenus sur milieux sélectifs.....	<b>42</b>
<b>Tableau 11</b> : la lecture de la galerie API 20 E pour les autres souches bactériennes à Gram négatif.....	<b>47</b>
<b>Tableau 12</b> : les résultats des autres cultures obtenus sur milieux sélectifs.....	<b>47</b>
<b>Tableau 13</b> : les résultats d'identification des autres souches à Gram négatif.....	<b>48</b>
<b>Tableau 14</b> : les résultats des cultures à Gram positif sur milieux sélectifs.....	<b>49</b>
<b>Tableau 15</b> : les résultats de la galerie API20E des souches à Gram positif.....	<b>50</b>
<b>Tableau 16</b> : les résultats de lecture d'antibiogramme des souches isolées.....	<b>51</b>
<b>Tableau 17</b> : les profils de résistance des souches caractérisées.....	<b>52</b>

# *Introduction*

## INTRODUCTION

Les bactériophages sont des virus qui infectent les bactéries. En revanche, ils sont incapables d'infecter les cellules végétales ou animales (Dublanche & Patey, 2011). Ces parasites intracellulaires obligatoires et absolus ont été découverts indépendamment par Frederick W. Twort et Felix d'Hérelle en 1915 et 1917 respectivement. Le terme bactériophage a été inventé par d'Hérelle et qui signifie étymologiquement «mangeur de bactéries » (Twort, 1915; d'Herelle, 1917).

Les bactériophages sont omniprésents et constituent l'entité biologique la plus nombreuse de la planète (Wommack & Colwell, 2000). Ces particules disposent d'un matériel génétique (ADN ou ARN), ce qui commande la machinerie cellulaire de hôte, et par le biais de mutations ils sont capables d'attaquer et lyser les bactéries (El Moukhli, 2011). Ils constituent donc des agents de biocontrôle potentiels, où ils lysent environ 50 % des bactéries produites chaque jour (Breitbart & Rohwer, 2005).

Devant l'évolution inexorable des infections nosocomiales à bactéries multi-résistantes, l'absence de nouvelles molécules antibiotiques efficaces, ainsi que la montée en gravité des infections profondes, osseuses, et de manière générale mal drainées par le système circulatoire, quelques praticiens ont eu l'idée de revenir à des bactériophages précis pour lutter contre ces maladies devant lesquelles l'antibiothérapie traditionnelle avait rendu les armes (Fruciano, 2011).

La thérapie phagique a été utilisée bien avant l'invention des antibiotiques (Khenkine, 2009) dans les pays d'Europe de l'Est: en Belgique, en Allemagne, en Géorgie, en Pologne et surtout en Union Soviétique qui a investi massivement dans l'utilisation des bactériophages (Reardon, 2014). En dehors de ces pays les antibiotiques ont été préconisés car les scientifiques maîtrisent idéalement les méthodes de leur préparation contrairement aux bactériophages qui sont connus comme des préparations imprécises. Mais cette fois-ci, les expériences sont armées avec des outils de biologie moléculaire pour mieux comprendre et contrôler ces phages.

L'application la plus importante des phages est en médecine humaine, où ils ont été utilisés avec succès pour le traitement des infections causées par les genres : *Enterococcus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Streptococcus* ainsi que des infections

graves causées par le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM). Mais ils contribuent aussi à la médecine vétérinaire, l'agriculture, la biologie moléculaire, la génétique, l'aquaculture et à la défense contre le bioterrorisme (Eliava Phage Therapy Center, 2009).

Des faits récents apportent des arguments nouveaux qui devraient pousser à mettre en valeur la phagothérapie et la revoir comme complément à l'antibiothérapie une telle association doit être envisagée (El Moukhlis, 2011).

En Algérie, très peu d'études scientifiques sont menés sur les bactériophages et tout reste à faire à commencer d'abord par un plan fondamental.

Les objectifs de cette étude étaient de prendre connaissance des résultats de recherches récentes sur les bactériophages, d'isoler des bactériophages virulents ainsi que leurs bactéries hôtes à partir des eaux d'égouts de différents endroits dont le Centre Hospitalo-universitaire (CHU) Ibn Badis de Constantine. Ainsi d'évaluer l'activité antibactérienne des phages lytiques sur les bactéries isolées en utilisant la méthode de plages de lyse et finalement identifier les différents isolats par des tests simples et rapides en s'appuyant sur leur caractérisation phénotypique.

*Recherche*

*Bibliographique*

## RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. La biologie des bactériophages

#### 1.1. Définition d'un bactériophage

Un bactériophage (ou phage en abrégé; du grec *phagein*, signifiant «manger») est un virus n'infectant que la cellule bactérienne. Sa forme extracellulaire est dite virion qui lui permet d'exister à l'extérieur de l'hôte ce qui facilite sa transmission d'un hôte à un autre pour se multiplier en exploitant la machinerie métabolique de la cellule infectée (Madigan & Martinko, 2007). La persistance des phages en dehors d'un hôte, peut dépasser le mois, ce qui est exceptionnellement long pour un parasite absolu (Haslay & Leclerc, 1993).

#### 1.2. Structure et morphologie des bactériophages

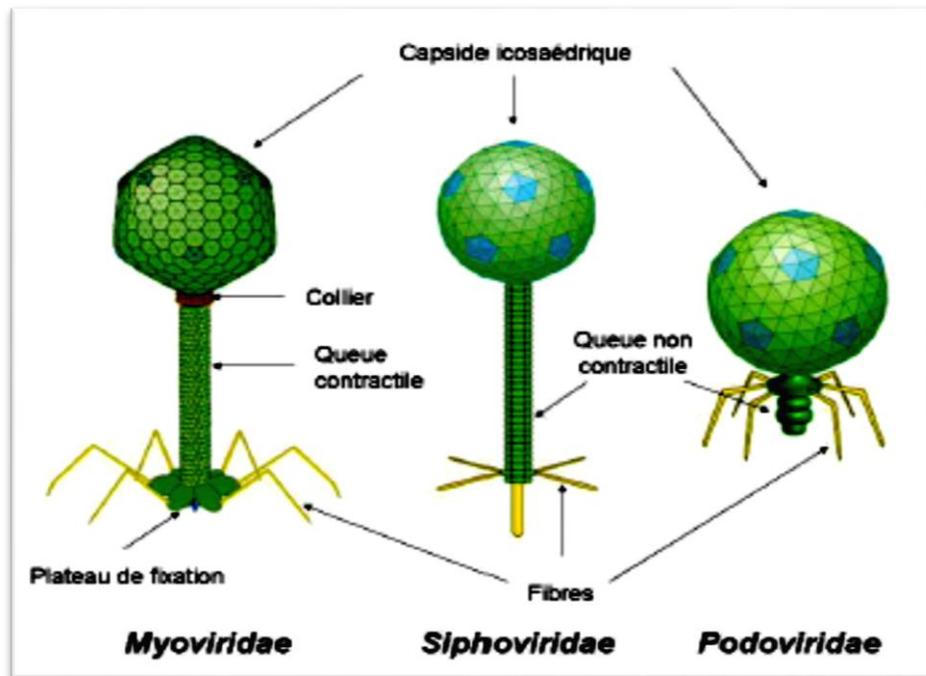
Les tailles et les morphologies de particules phagiques sont assez diversifiées. En générale leur taille varie de 20 à 300 nm (Madigan & Martinko, 2007). Ils présentent une architecture analogue aux virus, où ils sont constitués d'unités de structure protéiques, entourant et protégeant un acide nucléique ; l'ensemble constitue la nucléocapside (Haslay & Leclerc, 1993). Pour la majeure partie des phages connus, le matériel génétique est une molécule d'ADN double-brin (Madigan & Martinko, 2007).

La capsid du phage ainsi que sa queue sont de nature protéique. Une fois soumises à un choc osmotique, les têtes des particules phagiques éclatent et libèrent leur contenu d'ADN. Ces têtes vides sont appelées fantômes (ghosts). Elles sont constituées de plus de 80% de protéines organisées en unités ou monomères, identiques entre elles. La symétrie des phages de ce type est double : cubique pour la tête, hélicoïdale pour la queue, pour cela elle est qualifiée binaire (Haslay & Leclerc, 1993). Les queues des bactériophages T2, T4 et Mu sont contractiles et sont impliquées dans la pénétration de l'acide nucléique dans l'hôte. Alors que la queue du phage lambda est non contractile (Madigan & Martinko, 2007).

La structure typique des phages a été caractérisée suite à leur observation au microscope électronique, ils peuvent avoir les formes : polyédrique, hélicoïdale ou complexe (figure 01). Mais il existe aussi des phages filamenteux (Bousseboua, 2003).

Les génomes de phages ont une organisation en mosaïque avec des blocs courts de gènes partagés en différentes combinaisons. La nature en mosaïque de ces génomes suggère que des

transferts latéraux de gènes et des recombinaisons non homologues ont contribué à l'évolution des phages (Prescott *et al.*, 2010).



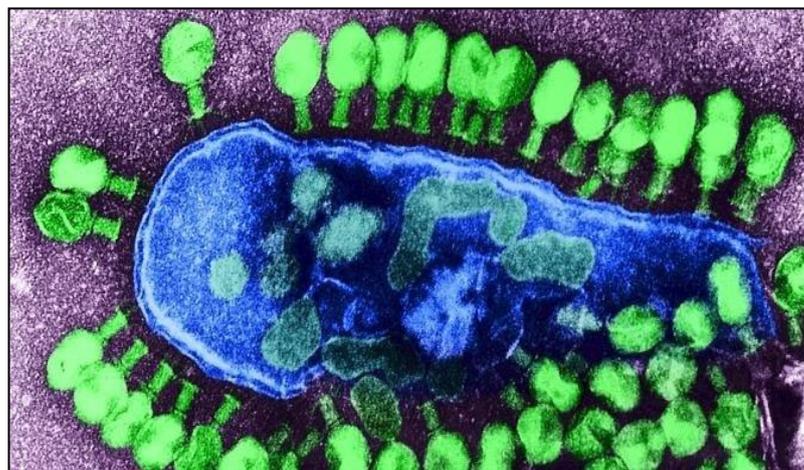
**Figure 01** : morphologie schématique des trois familles des Caudovirales (d'après <http://viralzone.expasy.org>)

### 1.3. La relation phage/cellule hôte

Les phages sont généralement appelés en faisant référence à leur hôte. Ainsi, le phage qui attaque la bactérie *Staphylococcus* est appelée staphylophage et celui qui attaque *E.coli* est dit coliphage. La spécificité de l'hôte est tributaire de l'évolution du système de reconnaissance des virus, basé sur la théorie "serrure-clé" (Kutter & Sulakvelidze, 2005) ce qui assure l'adsorption des particules phagiques à la surface colonisée (figure 02). Les récepteurs sur l'hôte bactérien sont reconnus par une protéine sur le phage (Nester *et al.*, 2004) et selon la nature des phages, l'attachement peut se faire au niveau des lipopolysaccharides bactériens (LPS), des acides téichoïques, des protéines de la paroi, des flagelles ou au niveau des pili (Courtault, 2014). Par exemple, le récepteur du bactériophage T1 est une protéine impliquée dans l'entrée du Fer alors que pour le phage T4 le phénomène de la reconnaissance repose sur l'interaction spécifique entre les fibres caudales du phage et les polysaccharides qui

composent la couche externe de la paroi des bactéries à Gram négatif (Madigan & Martinko, 2007).

Une étude faite par Kaneko et ses collaborateurs (2009) a pu identifier un constituant de la structure du bout de la queue du phage staphylococcique, c'est la protéine phi SLT de classe II, groupe 4 (ORF636). Celui-ci pourrait être à l'origine de la reconnaissance et de l'adhésion du phage à la chaîne de l'acide lipotéichoïque présent à la surface de *S. aureus*. Ce composant semble se lier spécifiquement à *S. aureus* et ne peut se lier à aucune autre espèce de staphylocoque ou de bactérie à Gram positif (Kaneko *et al.*, 2009).



**Figure 02** : adsorption des bactériophages T4 (en vert) sur la surface bactérienne d'*Escherichia coli* (en bleu) (Getty Images/Photo Researchers RM).

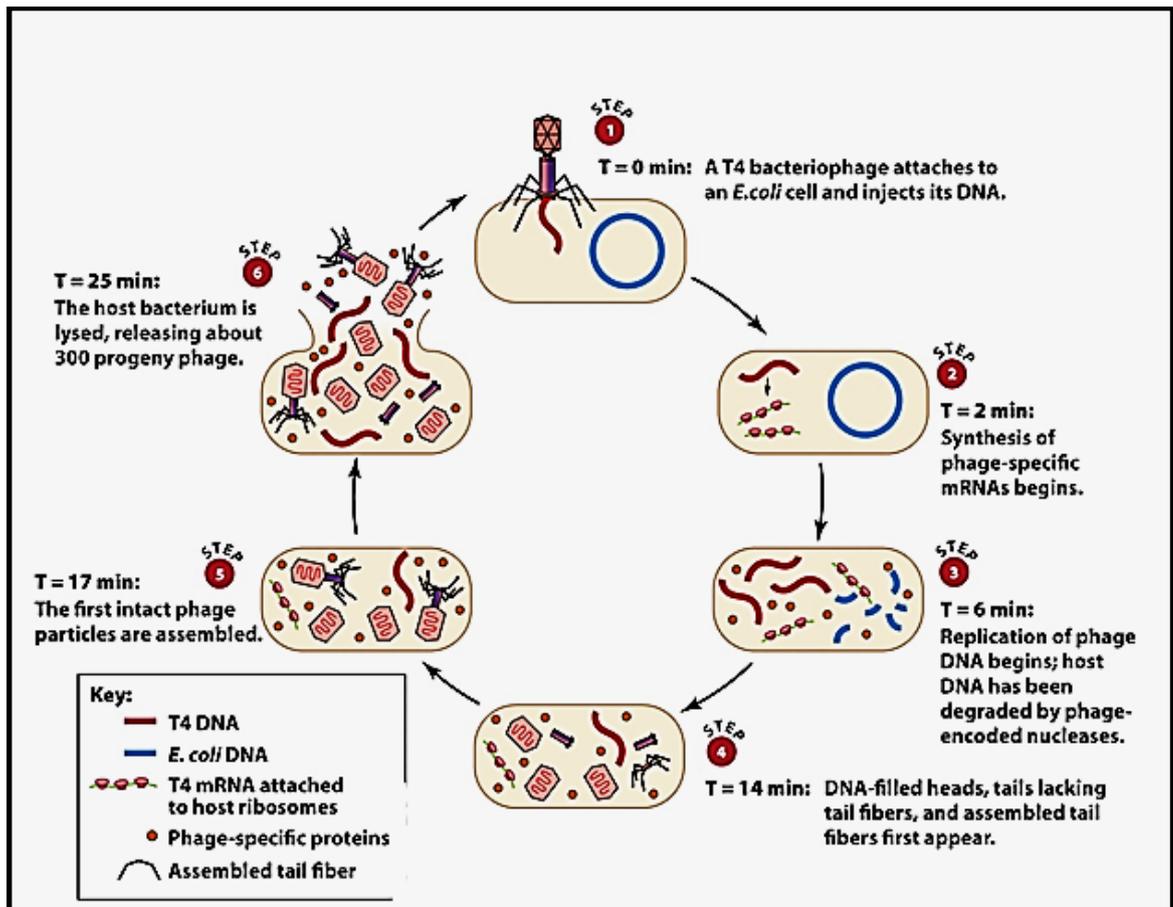
#### 1.4. La reproduction des bactériophages

L'infection de la bactérie hôte par un phage peut avoir 2 aspects :

**A)** Le bactériophage se reproduit au dépens de la bactérie et la détruit: c'est l'infection lytique dans ce cas le phage est qualifié virulent (figure 03).

**B)** L'acide nucléique injecté par le phage, au lieu de se répliquer d'une façon autonome, il s'intègre au chromosome et se comporte comme un gène bactérien en se répliquant en parfaite harmonie avec le génome. Le phage à cet état est dit prophage. Alors que la relation établie entre le phage et la cellule hôte est appelée lysogénie. Les phages responsables sont dits tempérés. Les bactéries qui portent un prophage et le perpétuent dans leur descendance sont des bactéries lysogènes immunisées à la surinfection par le même phage (Haslay & Leclerc, 1993).

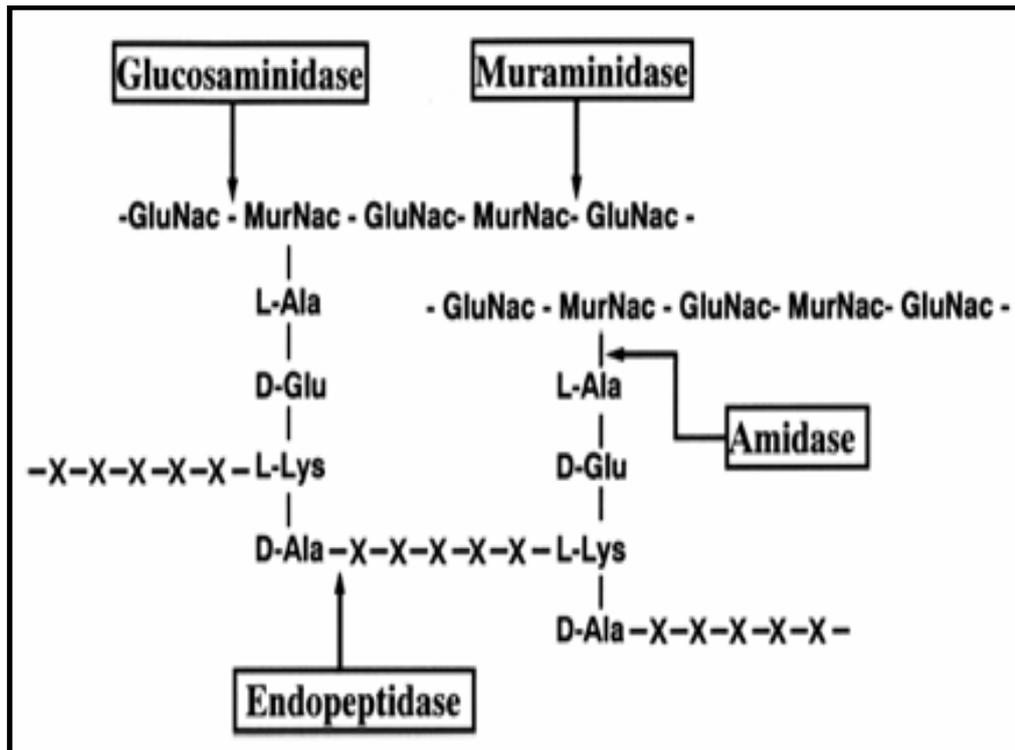
La lyse par les phages fait intervenir deux protéines distinctes: la holine, qui est une protéine transmembranaire créant des pores sur la membrane bactérienne interne et servant de transporteur pour la deuxième protéine, la lysine qui pénètrent dans les orifices créés par les holines et a pour cible la couche de peptidoglycane. Cela finit par l'éclatement de la cellule et la libération de centaines de phages (Nelson *et al.*, 2001).



**Figure 03** : le cycle lytique du bactériophage T4 dans la bactérie *E. coli*

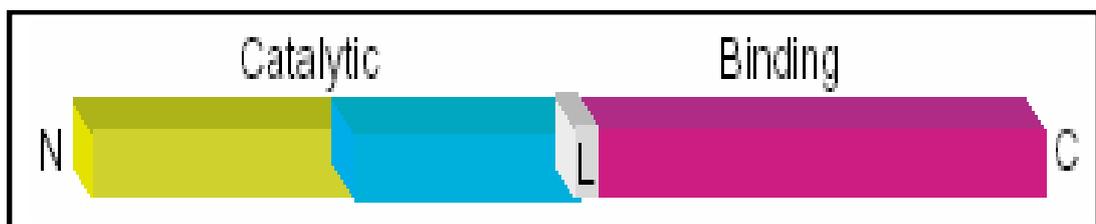
(www.studyblue.com)

L'endolysine est une enzyme muralytique soluble qui hydrolyse les liaisons covalentes au niveau du peptidoglycane. Quatre types d'activité muralytique sont détectés: glucosaminidase, muraminidase, endopeptidase et amidase (figure 04). Elles sont dirigées contre les trois principaux liens retrouvés dans le peptidoglycane (Young *et al.*, 2000). Les deux premiers types d'activité permettent le clivage au niveau des sucres. Les endopeptidases clivent au niveau des peptides, tandis que les amidases hydrolysent le lien amide entre les unités de glycans et les groupements peptidiques (Matsuzaki *et al.*, 2005).



**Figure 04 :** positionnement des principaux sites de clivage des endolysines au niveau du peptidoglycane des bactéries à Gram positif (theses.ulaval.ca)

Après la liaison du domaine C-terminal à un substrat spécifique retrouvé dans le peptidoglycane de la bactérie hôte, le domaine catalytique clive le peptidoglycane. La comparaison des séquences d'endolysines (figure 05) de mêmes familles démontre une grande similarité de séquence pour le domaine catalytique et une faible similarité pour le domaine de liaison (Fischetti, 2005).



**Figure 05 :** la structure de base des endolysines phagiques. L'endolysine peut contenir jusqu'à deux domaines catalytiques en N-terminal (jaune et bleu) relié à un domaine de liaison en C-terminal (rose)  
(www.theses.ulaval.ca)

Pour la majorité des endolysines, la membrane cytoplasmique est une barrière, où le phage doit produire une petite protéine membranaire, la holine, dont l'activité est programmée dans le temps par une autre protéine, l'anti-holine qui la bloque jusqu'au moment opportun (Young *et al.*, 2000; Wang, 2006). Les anti-holines sont codées par des gènes appartenant à au moins 35 familles différentes (Grundling *et al.*, 2001).

Contrairement aux bactéries à Gram négatif, les travaux effectués montrent une excellente efficacité des lysines contre les bactéries à Gram positif dont le peptidoglycane est directement accessible du milieu extérieur (Fischetti, 2005).

En effet, la lysine phagique constitue un produit totalement identifié et bien caractérisé dont la production peut être facilement standardisée (Trojet, 2011).

### - L'induction

Dans le cas du phage lambda, l'état lysogène est maintenu par la synthèse d'un répresseur protéique codé par le phage, où sa disparition aboutit à une induction spontanée du cycle lytique (si l'hôte est incapable de survivre). Cependant l'induction est généralement une réponse à des facteurs d'environnement comme la lumière ultraviolette UV ou des agents mutagènes chimiques endommageant l'ADN de l'hôte (la mitomycine C par exemple) cela pousse la protéine *RecA* (Recombinase A) impliquée normalement dans la recombinaison génétique, à jouer indirectement le rôle d'une protéase en se fixant sur le répresseur et le stimuler à s'autocliner. Cela exige que le prophage soit excisé par la protéine excisionnase codée par le gène *xis* du phage, et qui par fixation à l'intégrase, rends celle-ci capable d'inverser le processus d'intégration et de libérer le prophage. Le cycle lytique se déroule alors normalement (Prescott *et al.*, 2002).

#### – La conversion lysogénique

Les éléments génétiques mobiles, bactériophages, plasmides et transposons favorisent la plasticité génomique. Lorsque ces gènes accessoires codent des facteurs de virulence, la bactérie infectée reçoit un pouvoir pathogène supplémentaire (tableau 01) via le phénomène de « **conversion lysogénique** », et par conséquent l'émergence de nouvelles épidémies. C'est l'exemple de certaines souches de *Streptococcus pyogenes* où lorsqu'elles sont infectées par un bactériophage tempéré porteur de gènes codant la production d'exotoxines pyogènes, ces souches seront responsables de la scarlatine et de la plupart des syndromes du choc toxique

streptococcique. L'exotoxine A est un superantigène qui agit par recrutement massif des cellules T au niveau des tissus infectés. Les lymphocytes T vont sécréter des cytotoxines, lesquelles activent un grand nombre de cellules effectrices, ce qui aboutit à une inflammation systémique et une destruction tissulaire (Madigan & Martinko, 2007).

**Tableau 01** : les facteurs de virulences codés par les bactériophages  
(Madigan & Martinko, 2007)

BACTERIES	FACTEURS DE VIRULENCE
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Toxine érythrogyène
<i>Escherichia coli</i>	Toxine Shiga-like
<i>Staphylococcus aureus</i>	Entérotoxines A, D, E, staphylokinase, toxine-1 du syndrome de choc toxique (TSST-1)*.
<i>Clostridium botulinum</i>	Neurotoxines C, D, E
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Toxine diphtérique

\*TSST- 1 : Toxic shock syndrome toxin

### 1.5. La défense de l'hôte bactérien

En réponse de l'invasion phagique et en fonction des différentes étapes du cycle productif, la cellule hôte essaye de développer une résistance pour combattre l'ennemie (tableau 02). Parmi les systèmes de défense récemment découverte, le système immunitaire adaptatif bactérien CRISPR/Cas. Les CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), un acronyme anglais pour « courtes répétitions en palindrome regroupées et régulièrement espacées ». Ce sont des familles de séquences répétées caractéristiques chez les procaryotes, comprenant des séries de répétitions directes, courtes (de 21 à 37 paires de bases), régulièrement espacées par des séquences, généralement uniques, de 20 à 40 paires de bases. En 2005, des bio-informaticiens découvrent que les morceaux d'ADN intercalés entre ces palindromes sont souvent des séquences d'ADN viral. Deux années plus tard (2007), des chercheurs de l'industriel laitier danois Danisco découvrent que lorsque les bactéries qu'ils

utilisent pour fabriquer des yaourts et des fromages, ayant ces séquences CRISPR, elles survivent mieux aux infections phagiques (Braly, 2015).

**Tableau 02** : résistance bactérienne en fonction des étapes du cycle réplcatif viral et adaptation en retour des bactériophages (Saussereau, 2012).

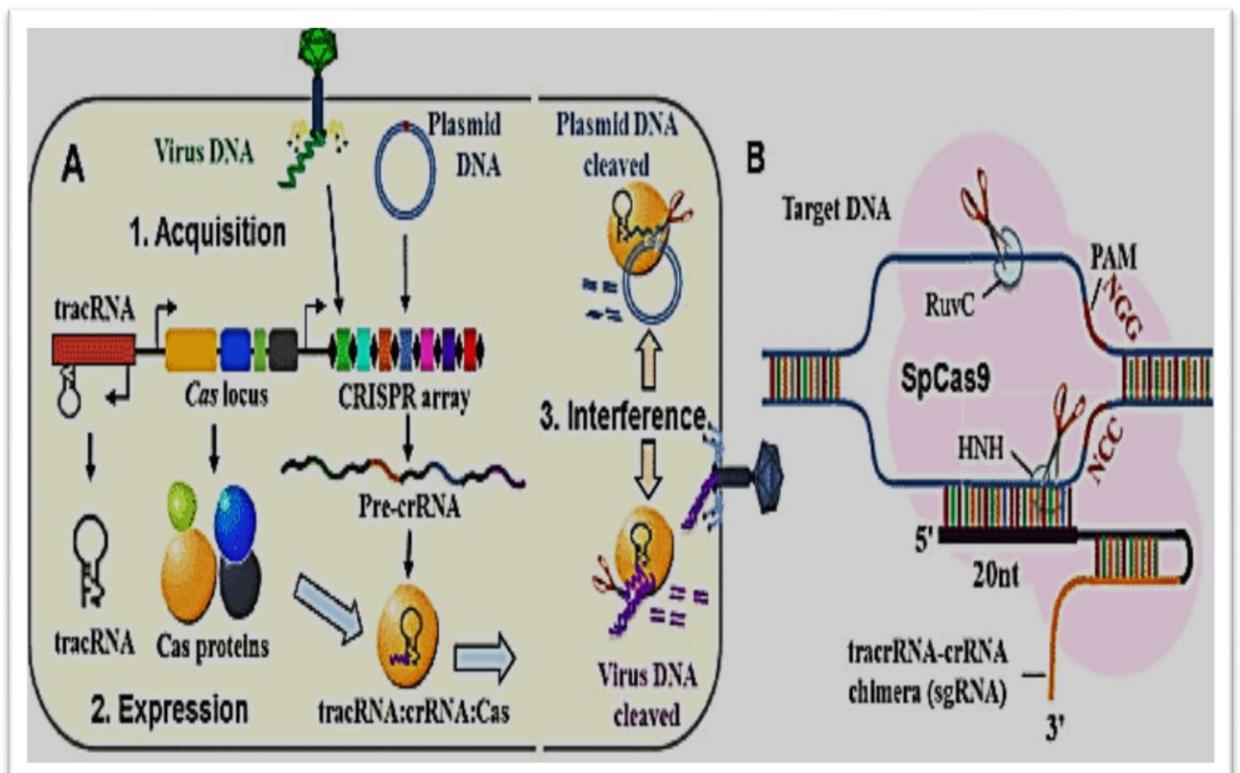
	<b>Mécanisme de résistance de la bactérie</b>	<b>Mécanisme de contournement du bactériophage</b>
<b>Absorption</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- production d'inhibiteurs compétitifs s'attachant aux adhésines de bactériophage</li> <li>- modification de la structure des récepteurs de surface</li> <li>- production de protéines masquant les récepteurs bactériens</li> <li>- synthèse d'une matrice extracellulaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- diversification des adhésines présentes sur les fibres du bactériophage</li> <li>- production de lyase ou hydrolase dégradant les exopolysaccharides</li> </ul>
<b>Pénétration</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- dégradation de l'ADN viral (enzymatique, CRISPR-Cas)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- absence des sites de reconnaissance des endonucléases</li> <li>- production d'enzymes permettant la Méthylation de l'ADN viral ainsi non reconnu</li> <li>- mutation des motifs conservés reconnus par les systèmes CRISPR-Cas</li> </ul>
<b>Réplication</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- clivage des ARNt ou facteurs d'élongation protéique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- système de réparation</li> </ul>
<b>Assemblage/ Libération</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- infection « abortive »</li> <li>- lyse prématurée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- production d'inhibiteur d'enzymes bactériennes</li> </ul>

Les petits fragments d'ADN exogènes provenant de phages ou de plasmides, appelés protospacers (figure 06), sont intégrés dans le génome entre les séquences répétées et servent de mémoire aux bactéries :

**1.** Coupure des segments d'ADN étranger et leur intégration à des endroits bien précis dans le matériel génétique de la bactérie.

**2.** Transcription des séquences CRISPR en petits ARN (CRISPR RNA ou crRNA). La maturation de ces crARN dépend d'un ARN trans-activateur (tracrRNA) qui possède une séquence complémentaire à la répétition palindromique. L'ensemble crRNA /tracrRNA constitue un ARN guide (ARNg).

3. Ces petits ARNg pourront alors guider l'endonucléase Cas (CRISPR-associated) vers les ADN étrangers. Ils peuvent se lier aux deux brins de l'ADN et l'enzyme Cas9 va ainsi induire une coupure double brin. Après coupure de l'ADN double brin au niveau de la région cible (DSB= double strand breaks), il y a alors activation des mécanismes de réparation de l'ADN. Si la réparation aboutit à des insertions ou des délétions de nucléotides qui modifient le cadre de lecture, l'expression de la protéine correspondante peut être inhibée (www.labcluster.com).



**Figure 06 :** un aperçu du système CRISPR-Cas type II. **A.** Fonctions du CRISPR-Cas, comme un système immunitaire adaptatif dans les bactéries et les archées. De courts fragments d'ADN étranger, appelées espaceurs, provenant de phages ou de plasmides envahissants, sont incorporés dans le génome entre les répétitions CRISPR, qui sert de mémoire "des expositions antérieures". La transcription des composants du locus CRISPR produit le tracrRNA, le crRNA et la protéine Cas nucléase, qui à son tour forme un complexe tracrRNA/Cas/crRNA. Chaque complexe de tracrRNA/crRNA/Cas cherche la séquence d'ADN complémentaire du crRNA. Après la liaison du complexe, la Cas nucléase clive les deux brins d'ADN et donc interférer avec l'invasion de phages ou de plasmides. **B.** Schéma du SpCas9 avec le tracrRNA et le crRNA clivant l'ADN cible. La Séquence PAM (*Protospacer Adaptor*

*Motif*) est nécessaire pour la liaison et le clivage du crRNA par la nucléase Cas9 (www.omicsgroup.org).

### **1.6. Le spectre d'hôte d'un bactériophage**

Il existe deux types de gamme d'hôtes phagiques, monovalent «à spectre restreint» et polyvalent «à large spectre». Les phages polyvalents sont en mesure d'attaquer deux ou plusieurs espèces bactériennes, tandis que les phages monovalents sont spécifiques à un seul type (Kalmansom & Bronfenbrenner, 1942).

La grande majorité des phages polyvalents appartiennent à la famille des *Myoviridae* (classe III). On note les phages K et ISP (Han *et al.*, 2013; Hsieh *et al.*, 2011; O'Flaherty *et al.*, 2005; Pantucek *et al.*, 1998; Vandersteegen *et al.*, 2011). Les phages K infectent de multiples espèces staphylococciques à coagulase positive et négative dont *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline (SARM) (O'Flaherty *et al.*, 2005; Pantucek *et al.*, 1998). Le phage ISP est « monovalents » vu qu'il ne lyse que des souches de *S. aureus*. Toutefois, son spectre d'action est large puisqu'il infecte plusieurs souches de *S. aureus* de différentes sources dont celles résistantes et sensibles à la pénicilline (Han *et al.*, 2013; Hsieh *et al.*, 2011; Vandersteegen *et al.*, 2011).

### **1.7. Classification des bactériophages**

La classification des bactériophages est réalisée par l'ICTV (International Committee on taxonomy of viruses). Elle dépend des propriétés morphologiques et physicochimiques du virion, de la nature de son acide nucléique et plus souvent complétée par des données génomiques (Ackermann, 2009). L'ordre des *Caudovirales* (ou phages à queue) contient plus de 96 % des bactériophages qui ont été décrits. Cet ordre est composé de trois familles, les *Myoviridae*, les *Siphoviridae* et les *Podoviridae* (Ackermann, 2011). L'ICTV a donc établi 1 ordre, 18 familles, 3 sous-familles et 51 genres pour classer la majorité des diverses espèces phagiques connus à ce jour (tableau 03) (Torjet, 2011).

Le choix des noms de ces trois familles provient des propriétés de leurs queues. Les *Myoviridae* ont une longue queue contractile et constituent 25% des phages caudés. Les *Siphoviridae*, regroupant 61% des phages, ont une longue queue creuse et non contractile. Enfin les *Podoviridae* qui ont une queue courte non contractile, constituent 14% des *Caudovirales*. Contrairement aux phages caudés, les virus cubiques, filamenteux ou

pléomorphiques sont plus rares et constituent moins de 3,7% des bactériophages (Torjet, 2011).

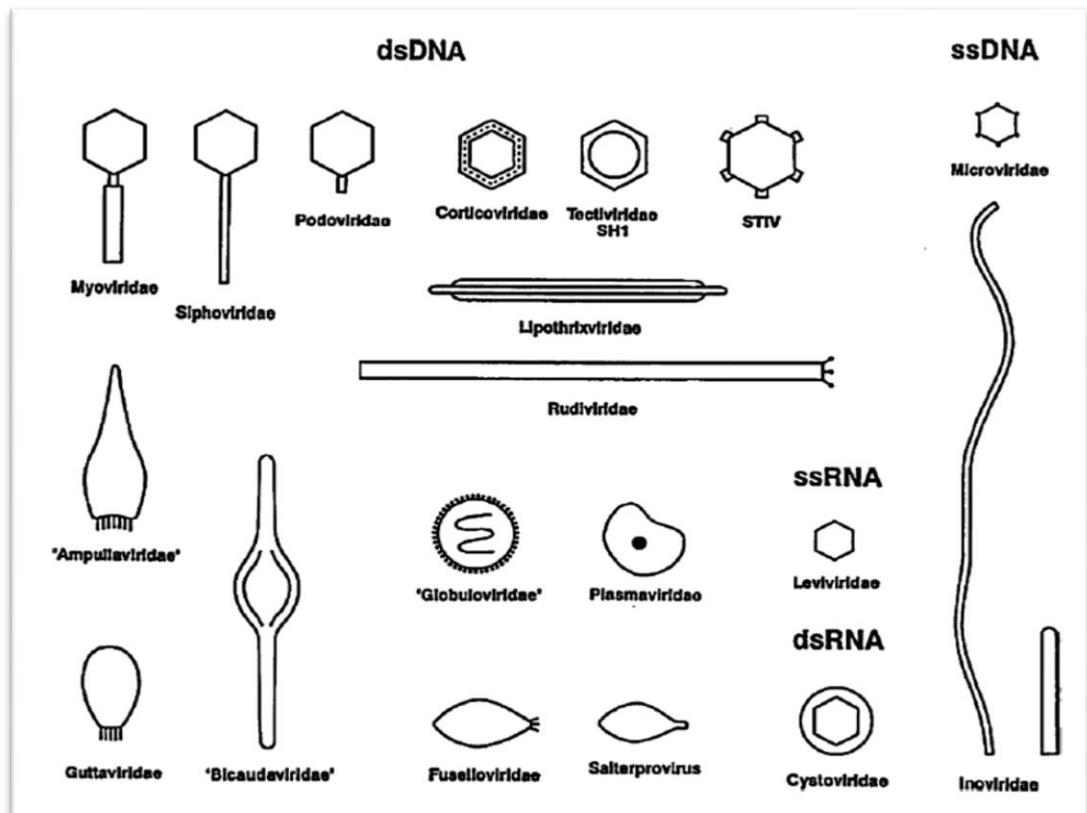
**Tableau 03 :** la classification des bactériophages selon l'ICTV (Ackermann, 2009).

Forme	Acide Nucléique	Famille	Genre	Particularités	Exemples
Caudée	ADN db L	<i>Myoviridae</i>	6	Queue contractile (tube + gaine)	T4
		<i>Siphoviridae</i>	7	Queue longue flexible et non contractile	$\lambda$
		<i>Podoviridae</i>	4	Queue courte	T7
Polyédrique	ADN sb C	<i>Microviridae</i>	4	Grands capsomères	$\phi$ X174
	ADN db C, S	<i>Corticoviridae</i>	1	Capside complexe, lipides	PM2
	ADN db L	<i>Tectiviridae</i>	1	Double capside, lipides et pseudo-queue	PRD1
	ADN db L	SH1*		Double capside, lipides	SH1
	ADN db L	STIV*		Protubérance en forme de tourelle	STIV
	ARN sb L	<i>Leviviridae</i>	2	Poliovirus-like	MS2
	ARN db L, M	<i>Cystoviridae</i>	1	Enveloppe, lipides	$\phi$ 6
Filamenteuse	ADN sb C	<i>Inoviridae</i>	2	Filaments longs, courte tige	M13
	ADN db L	<i>Lipothrixviridae</i>	4	Enveloppe, lipides	TTV1
	ADN db L	<i>Rudiviridae</i>	1	Tige raide	SIRV-1
Pléomorphique	ADN db C, S	<i>Plasmaviridae</i>	1	Enveloppe, pas de capside, lipides	L2
	ADN db C, S	<i>Fuselloviridae</i>	1	Forme de citron, enveloppe, lipides ?	SSV1
	ADN db L, S	—	1**	Forme de citron, enveloppe	His1
	ADN db C, S	<i>Guttaviridae</i>	1	Forme de gouttelette	SNDV
	ADN db L	<i>Ampullaviridae</i> *		Forme de bouteille, NC hélicoïdale	ABV
	ADN db C	<i>Bicaudaviridae</i> *		Double queue développée hors hôte, NC hélicoïdale	ATV
	ADN db L	<i>Globuloviridae</i> *		Enveloppe, sphérique, lipides, NC hélicoïdale	PSV

C: circulaire; L: linéaire; M: multipartite; N: nucléo-capside; S: superenroulé; — sans nom; \*: non classé; \*\*: le genre *Salterprovirus*.

Dans le milieu hydrique, trois catégories de bactériophages fécaux ont été proposées en tant qu'indicateurs alternatifs de pollution fécale: il s'agit des coliphages somatiques, des phages de *Bacteroides fragilis* et des bactériophages à ARN F-spécifiques ou à ADN F-spécifiques. Ces phages infectent spécifiquement les bactéries du tractus intestinal. Les

coliphages ARN F-spécifiques et ADN F-spécifiques regroupent les phages provenant respectivement des familles *Leviviridae* et *Inoviridae* (figure 07). Ces phages se fixent sur les pili sexuels de la souche mâle d'*E.coli* (Schwartzbrod, 1991).



**Figure 07 :** les principaux morphotypes de bactériophages infectant les procaryotes (Ackermann, 2007).

## 1.8. Ecologie des bactériophages

### a) Habitats

Les phages se trouvent dans tous les réservoirs peuplés d'hôtes bactériens, tels que l'eau de mer et l'intestin des 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 phages/bactéries est stable et leurs stratégies d'évolution sont synchronisées. Les phages peuvent aussi être isolés à partir du lait cru, lait pasteurisé, ferments lactiques, et une variété d'échantillons environnementaux (Mullan, 2001).

Une estimation de  $10^{30} - 10^{32}$  de phages existant dans la biosphère (Sulakvelidze, 2011), où chaque 48 heures, les phages détruisent environ la moitié de bactéries dans le monde (Abedon, 2009 ; Rohwer *et al.*, 2009).

Quelque soit l'habitat, il existe des phages spécifiques des bactéries autochtones et des phages provenant d'autres milieux. Les habitats les plus communs de phages sont :

- Le tube digestif : où la concentration de coliphages dans les selles humaines analysées est variable mais toujours inférieure à  $10^5$  phages/gramme de selles (Kai *et al.*, 1985).
- L'eau douce : il a été trouvé plus de  $10^3$  phages/litre d'eau douce et qui sont capables d'infecter des espèces autochtones comme *Aeromonas hydrophila* et des entérobactéries comme *Klebsiella pneumoniae* (Logan *et al.*, 1980; Primrose & Day, 1977). De même, des phages spécifiques des bactéries pathogènes pour les poissons salmonidés telles que *Aeromonas salmonicida* ont été retrouvés dans l'eau (Logan *et al.*, 1980).
- L'eau de mer : dans la zone côtière, sont présents des phages spécifiques des bactéries telluriques telles que *Achromobacter*, *Vibrio* et *Flavobacterium* (Chaina, 1965; Hidaka, 1973; Baross *et al.*, 1978).
- Les sédiments: Dans les sédiments d'eau douce ou marine, les bactériophages ont tendance à s'accumuler et leur concentration y est plus grande que dans la colonne d'eau surnageant. Cela est dû à l'adsorption des phages sur des particules solides pour se protéger des agressions (Gerba & Schaiberger, 1975).

### **b) Inactivation en milieu naturel**

L'inactivation virale signifie la perte d'infectivité du virus dans une suspension. Clairement, l'inactivation est « la destruction du pouvoir pathogène d'une substance ou d'un microorganisme ». Dans le cas de virus, l'inactivation est le résultat d'une altération de la capsid virale. Un tel processus exige que le virus ne soit plus infectieux, mais ceci n'implique pas nécessairement une altération de son génome (ARN présent à l'intérieur de la capsid, quantifiable par RT-PCR). Au contraire, une altération du génome implique obligatoirement une altération de la capsid virale (Gwenaëlle, 2010).

D'après Gassilloud et ses collaborateurs l'inactivation des particules virales infectieuses suit une cinétique d'ordre 1 classique selon l'équation :

$$\text{Log} \left( \frac{C_x}{C_0} \right) = -a_i t$$

( $a_i$ ) étant le coefficient d'inactivation, ( $C_x$ ) la concentration (en ARN viraux totaux ou en particules infectieuses) au temps  $x$  et ( $C_0$ ) la concentration (en ARN viraux totaux ou en particules infectieuses) au temps  $0$ . Ceci permet de calculer le T90, temps (minutes) pour lequel le titre viral a diminué de 90% (Gassilloud *et al.*, 2003).

Les données disponibles sur l'inactivation des phages dans l'environnement sont assez contradictoires. Parfois elles rapportent des valeurs T99 (temps nécessaire pour l'inactivation de 99% de la population phagique) variables, selon la nature des phages ainsi que leur milieu naturel. Le T99 dans les eaux superficielles, varie de 31 jours pour le phage T7 à 10 jours pour le phage MS2 (Niemi, 1976; Scheuermann *et al.*, 1987), dans l'eau de mer de 5 jours pour le phage f2 à 20 jours pour le phage MS2 (Ayres, 1977; Jofre *et al.*, 1986).

Comme pour les virus d'animaux, la durée de survie des phages dépend de leur association à des particules solides, de leur exposition aux rayons ultra-violet, de la température, du pH, de la composition ionique du milieu et de l'activité métabolique des microorganismes autochtones (Schwartzbrod, 1991).

### c) Rôle écologique

La lyse phagique induit la dispersion de débris cellulaires dans le milieu marin, ce qui participe à la circulation des nutriments dans la chaîne alimentaire. Par exemple, la lyse par les phages conduit à la libération de sulfure de diméthyle (DMS). Ce composé a une influence significative sur le climat terrestre. En plus de ses propriétés odorantes (il est responsable de l'odeur caractéristique de l'air marin), il exerce un effet refroidissant sur le climat. Une fois oxydées dans l'atmosphère, les molécules de DMS forment un brouillard d'aérosols et participent à la formation de nuages. Ceux-ci diminuent la dose de radiation solaire reçue au niveau des surfaces terrestres et océaniques et limitent ainsi le réchauffement de la planète (Courtault, 2014).

## 1.9. Les domaines d'application des bactériophages

### – La détection des bactéries pathogènes

Les bactériophages sont utilisés comme biosenseurs suite à la simple détection de l'amplification des phages. D'autres systèmes consistent à immobiliser les phages, sur des

particules de silice ou des nanofibres, puis d'évaluer quantitativement la lyse bactérienne, grâce à des tests bioluminescent-ATP-dépendant par exemple, qui permettent de déterminer les quantités d'ATP libérée lors de la lyse de la bactérie (Minikh *et al.*, 2010; Smartt *et al.*, 2012).

– **En médecine humaine et vétérinaire**

L'étude des phages a des implications importantes en médecine et en génétique, surtout pour la compréhension des infections virales, des anomalies génétiques et de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Les phages sont aussi utilisés dans le traitement vétérinaire de différentes maladies animales, y compris les infections oculaires d'origine bactérienne (Eliava Phage Therapy Center, 2009).

– **En génie génétique et en biotechnologie**

Les phages sont utilisés comme vecteurs de clonage (supporte jusqu'à 100 Kb dans le cas du phage P1) pour amplifier les gènes d'intérêt. Cela permet l'obtention de banques d'ADN, aisément conservés.

La méthode du phage display qui permet la sélection d'un peptide ou d'un répertoire protéique grâce à sa présentation sur la surface de phages, en fusion avec le domaine NH<sub>2</sub> – terminal d'une des protéines de surface (Smith, 1985 ; Souriau *et al.*, 1998). La fixation de ces peptides peut soit inhiber l'entrée du virus soit interférer avec la fonction d'une protéine virale intracellulaire (Brissette & Goldstein, 2007).

– **En agriculture**

Des études ont montré que les phages peuvent contrôler *Ralstonia solanacearum* dans le tabac (Tanaka *et al.*, 1990) et la pourriture molle associée à *Erwinia spp* (Eayre *et al.*, 1990). Cela approuve le rôle intéressant des phages dans la lutte biologique contre les agents pathogènes de plantes.

– **En tant qu'agents contre le bioterrorisme**

Les agressions récentes de terrorisme international a rendu plus d'une nécessité de se préparer contre des attaques bioterroristes possibles. L'Institut d'Eliava (Tbilissi, Géorgie) travaille activement à développer les phages pour le traitement de masse d'anthrax, de brucellose et d'autres attaques bioterroristes potentiels (Institut Eliava, 2009).

Schuch et ses collaborateurs (2002) ont isolé la lysine phagiques qui détruit directement la bactérie *Bacillus anthracis* mais aussi la spore qui est la forme du germe dans son usage en tant qu'arme biologique.

– **En hygiène alimentaire**

Selon les estimations des "Centers for Disease Control and Prevention" 9,4 millions de cas de maladies d'origine alimentaire, presque 56 000 hospitalisations et plus de 1 350 décès sont rencontrées chaque année aux États-Unis seulement (Scallan *et al.*, 2011). Les sociétés Intralytix et EBI Food Safety ont reçu l'autorisation de la FDA pour utiliser des solutions phagiques comme additifs alimentaires. Ces produits (LISTEX P100™ et ListShield™) ciblent *Listeria monocytogenes*, contaminant potentiel de viande, de volaille, de produits laitiers et de légumes crus et pousse même dans les aliments réfrigérés en provoquant après ingestion une infection grave appelée listériose. D'autres produits ciblant *Salmonella sp.* (SalmoFresh™ et SALMONELEX™) et *E. coli* O157:H7 (EcoShield™) sont en instance d'autorisation. D'une autre part les endolysines phagiques, seules ou en synergie avec un agent de biopréservation alimentaire, semblent être efficaces pour éliminer les bactéries pathogènes tout en agissant comme conservateur pour la salubrité des aliments (García *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012).

– **Le traitement des eaux**

Au cours du traitement des eaux usées par les boues activées ces dernières s'installent dans les réservoirs, et le surnageant est évacuée pour davantage de purification. Mais ce processus est déjoué par des microorganismes filamenteux comme *Sphaerotilus natans*, qui poussent de longs tentacules qui suspend les boues et diminuer la décantation. Un traitement par les phages d'eaux usées troubles contaminées par *S. natans* a réduit leur volume et le surnageant s'éclaircie après 12 heures, les phages ont resté stables et actifs depuis plus de 9 mois (Choi *et al.*, 2011). Des phages isolés a partir d'eaux usées ont été testés contre le chlore : le traitement standard par le chlore, a retiré 40 % de biofilms de *Pseudomona aeruginosa*. Les phages appliqués seuls ont tué 89 %. Alors que les phages suivis de chlore ont éliminé 97 % des biofilms (Zhang & Hu, 2013).

– **La désinfection des surfaces inertes**

Les phages sont applicables pour l'assainissement efficace des surfaces inertes retrouvées dans les usines de transformation alimentaire comme sur les murs, le sol, les drains, le verre,

l'acier inoxydable, les équipements industriels, etc. Ainsi que dans les hôpitaux comme sur les cathéters. Contrairement aux phages, les désinfectants chimiques peuvent causer la corrosion des équipements, tuer les bactéries commensales bénéfiques, avoir des effets toxiques en cas de contact direct avec l'aliment et endommager les propriétés organoleptiques de celui-ci (Sulakvelidze, 2013).

#### – **L'industrie laitière**

L'utilisation des phages comme agents de biocontrôle a été testée dans les produits laitiers. Des études ont analysé le potentiel lytique des phages contre *S. aureus* dans le lait traité à la chaleur, le lait cru ainsi que dans le lactosérum (Gill *et al.*, 2006; O'Flaherty *et al.*, 2005).

Les auteurs ont constaté que l'infection par le phage K, un phage polyvalent à large spectre lytique (Hagens & Offerhaus, 2008), est fortement inhibée dans le lait cru entier. Gill et ses collaborateurs (2006) ont déduit que le composé inhibiteur serait une protéine ou un groupe de protéines qui s'attachent à la surface de *S. aureus* ou modifient cette dernière de manière à empêcher les phages de s'y adsorber (inhiber son activité sans le dégrader).

En 2005, O'Flaherty et ses collaborateurs ont montré aussi que l'adsorption du phage K est inhibée dans le lait cru comparé au lait chauffé où l'adsorption phagique est restaurée. L'agglutination des cellules bactériennes dans le lait cru semblerait masquer la surface des cellules de *S. aureus* la rendant inaccessible aux phages. Le composé causant cette agrégation est thermosensible et pourrait être une agglutinine ou appartiendrait à la famille des immunoglobulines (Korhonen *et al.*, 2000; Loimaranta *et al.*, 1998).

## **2. La phagothérapie**

### **2.1 Définition de la phagothérapie**

En médecine, la phagothérapie est le traitement de certaines infections bactériennes, y compris la fièvre typhoïde, la dysenterie et le choléra, par le biais de bactériophages spécifiques, en s'appuyant sur leur aptitude lytique (Adams, 1961).

### **2.2 La notion de la phagoprophylaxie**

Le mot phagoprophylaxie est formé par le préfixe grec « pro » (qui peut signifier avant ou devant) et par le suffixe « phulaxis » (protection). La prophylaxie désigne toute méthode destinée à protéger un individu, ou une collectivité, d'une maladie en d'autre terme c'est la

prévention. La phagoprophylaxie est donc, par analogie à l'antibioprophylaxie (qui était également qualifiée d'antibiothérapie de « couverture ») l'utilisation des bactériophages pour prévenir les maladies d'origine bactériennes (Courtault, 2014).

### **2.3 Histoire de la phagothérapie**

La découverte des bactériophages et la naissance de la phagothérapie sont indissolublement liées. Dès ses premières observations sur des malades vers la fin des années 1910, d'Hérelle constata que la présence de bactériophages virulents chez les patients atteints de dysenterie bacillaire était associée à leur convalescence. Il en déduisit que ces virus étaient les agents de la guérison naturelle (Fruciano, 2011).

Dans les années 1920, le chercheur Georgyi Eliava, visita Félix d'Herelle à l'Institut Pasteur de Paris et repartit convaincu de l'utilisation médicale des bactériophages. Quelques années plus tard il fût à l'origine de la construction à Tbilissi d'un institut dédié à la recherche et à l'application médicale des bactériophages. Cet institut dénommé aujourd'hui "*Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology & Virology*" a maintenu son activité de recherche et de traitement pendant toutes ces années. Actuellement, seul un autre centre de recherches et de traitement localisé à Wroclaw en Pologne propose des traitements à base de bactériophages (Institut Pasteur, 2014).

### **2.4 Des exemples sur les essais cliniques de la phagothérapie**

#### **A. Chez l'animal**

Face aux infections pulmonaires, l'utilisation de bactériophages se révèle efficace tant que le traitement est réalisé dans les 2 h qui suivent l'infection létale d'une population de souris par *P. aeruginosa*. Cela assure la survie de 100 % de la population. Ces résultats semblent promoteurs pour traiter la mucoviscidose due aux infections chroniques à *P. aeruginosa* (Alemayehu *et al.*, 2012; Morello *et al.*, 2011). Une diminution de la charge bactérienne ainsi qu'une régression de lésions pulmonaires ont été caractérisées (Debarbieux *et al.*, 2010; Morello *et al.*, 2011).

#### **B. Chez l'homme**

Le seul essai clinique, évaluant l'efficacité de la phagothérapie et réalisé conformément aux réglementations européennes actuelles, a été mené au Royaume-Uni, sur 24 patients souffrant d'otite chronique unilatérale à *P. aeruginosa* (Wright *et al.*, 2009). Ces patients ont

été traités avec une dose unique de  $6 \times 10^5$  PFU d'un cocktail de six phages, administrés par voie topique. Le traitement a réduit l'intensité des symptômes jusqu'à 80% (Hawkins *et al.*, 2010).

Une équipe de chercheurs de l'Université hébraïque de Jérusalem, ont pu éradiquer les biofilms de la souche V583 d'*Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine par le phage EFDG1 (la famille des Myoviridae, la sous-famille des Spounavirinae) isolé des eaux usées. Pour confirmer la sûreté du phage EFDG1 dans la lutte contre les infections chez l'homme, les chercheurs ont constaté après le séquençage entier que son génome ne contient aucun gène de virulence (Khalifa *et al.*, 2015). Dans les applications locales comme le traitement des brûlures, le contact avec la bactérie pathogène est immédiat et la guérison est rapidement obtenue (figure 08) donc il est rarement observé des réactions indésirables.



**Figure 08** : action locale d'un polymère biodégradable imprimé de bactériophages sous le nom « phagobioderm » (<http://invision.me.free.fr/>)

Dans le cadre des infections digestives, peu de bactériophages ayant une spécificité pour *Helicobacter pylori* (Lehours *et al.*, 2011) sont étudiés à ce jour. L'un d'entre eux, stable pour une large gamme de pH (2,5 à 10), confirme qu'il est adapté à l'acidité de l'estomac humain. Il est lytique pour 63,6 % des souches d'*H. pylori* et ne semble pas pouvoir être associé à une catégorie de virus existants (Uchiyama *et al.*, 2013).

## 2.5 L'innocuité de la phagothérapie chez l'homme et l'animal

Des études réalisées chez le cobaye, pour des préparations de phages anti-*Klebsiella*, n'ont montré aucun signe de toxicité ni d'allergie, aucun choc ni aucun changement histologique observable (Sulakvelidze & Kutter, 2004).

Lors du colloque à l'Institut Pasteur de Paris en Novembre 2007, une équipe de Nestlé® a exposé son travail sur l'utilisation des phages lytiques de la superfamille du Type-T4 dans le traitement des diarrhées infantiles causées par des *E. coli* entéropathogènes. Il est exposé qu'*in-vitro* un cocktail de ces phages, isolés à partir de selles diarrhéique infectées, est capable de lyser plus de 80% des souches entéropathogènes d'*E. coli*. Des observations *in-vivo* sont ensuite obtenues chez l'homme. Des phages de Type-T4 administrés dans de l'eau de boisson, passent dans l'estomac puis l'intestin sans affecter les bactéries commensales, aucun symptôme n'est noté, aucune trace de phage n'est retrouvée dans le sang et aucune réponse immunitaire n'est détectée (Bruttin & Brussow 2005).

## **2.6 La réponse immunitaire de l'organisme humain**

Les particules de nature protéique, notamment les capsides phagiques peuvent être fortement immunogènes pour le système immunitaire lorsqu'elles sont introduites dans l'organisme. Les premières études de pharmacologie ont montré que les phages ont été principalement éliminés par le système réticulo-endothélial, en précision par les macrophages du foie nommés cellules de Küpffer. Parmi les autres cellules du système immunitaire inné, les granulocytes, qui une fois activés, seraient capables d'inhiber les bactériophages en libérant l'acide hypochloreux (Gorski *et al.*, 2012). Il a été démontré aussi par microscopie électronique que les cellules dendritiques phagocytent rapidement les bactériophages (Barfoot *et al.*, 1989).

Dans le cas de la réponse immunitaire adaptative (à médiation humorale), les anticorps antiviraux peuvent avoir différentes actions effectrices: la neutralisation virale, la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou la phagocytose.

Les anticorps d'immunologie phagique sont de type neutralisant via leur paratopes qui se lient aux épitopes phagiques (la queue) en empêchent généralement l'infection de la bactérie hôte par le phage à condition qu'ils se lient à des protéines virales indispensables à l'infection.

Lors de l'interprétation des résultats des études sur les anticorps anti-phagiques, il faut prendre en considération que la production de ces anticorps peut être stimulée par les débris des cellules bactériennes lysées présents dans les préparations phagiques, tels que les (LPS) (Michael & Kuwatch, 1969).

## **2.7 La notion du cocktail phagique**

Afin de ralentir l'apparition de la résistance bactérienne à un phage donné, un autre phage appartenant préférentiellement à une autre famille pourrait être utilisé en concomitance avec le premier. En effet, il semblerait qu'un cocktail phagique a une plus grande efficacité sur l'inhibition des souches bactériennes que l'action d'un seul phage. Il est capable de couvrir une gamme d'hôtes plus large, réduisant la fréquence de l'apparition de résistance bactérienne (Lu & Koeris, 2011).

## **2.8 Le cadre réglementaire de la phagothérapie**

L'utilisation des phages dans le domaine médicale constitue un intérêt prometteur. Cependant il reste beaucoup d'obstacles au niveau de la réglementation pharmacologique. En effet un phage n'est pas un médicament mais une entité biologique qui agit sur l'infection. Ainsi, la réglementation actuelle ne prévoit pas une éventuelle utilisation de phages comme traitement thérapeutique (Trojet, 2011).

Les thérapies phagiques chez l'humain sont réglementées comme des produits en exigeant une demande de drogue nouvelle de recherche (DNR) ou "Investigational New Drug (IND) Application" pour les tests chez les personnes. L'approbation de la FDA (Food and Drug Administration) exige que chaque composante d'une combinaison de médicament traditionnel soit prouvée, sûre et efficace, individuellement et en association, ce qui exige que l'activité, la puissance et la stabilité de chaque phage doivent être démontrés (Sulakvelidze, 2011).

Le séquençage de l'ADN, l'analyse protéomique, les tests de cytotoxicité et la microscopie électronique à transmission aident à caractériser les préparations phagiques humaines. Ces outils assurent le processus lytique désiré et l'absence de toxines et impuretés et aident à établir des normes de bonnes pratiques de fabrication pour les essais cliniques (Merabishvili, 2009).

- **Une phagothérapie qui manque d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM)**

Une nouvelle AMM pour les bactériophages est désormais nécessaire et doit répondre aux critères actuels de sécurité sanitaire. La mise à jour régulière de la composition en phages d'une préparation, souhaitable d'un point de vue thérapeutique, n'est pas possible selon les réglementations mondiales actuelles (Dublanche & Patey, 2011).

Différentes procédures seraient envisageables pour mettre en place la phagothérapie sans AMM. Cependant, elles affichent toutes un certain nombre de limites. Une de ces procédures semble la plus fiable où elle repose sur l'application du paragraphe 35 du chapitre C de la Déclaration d'Helsinki, indiquant que :« dans le cadre du traitement d'un patient, faute d'interventions avérées ou faute d'efficacité de ces interventions, le médecin, après avoir sollicité les conseils d'experts et avec le consentement éclairé du patient ou de son représentant légal, peut recourir à une intervention non avérée si, selon son appréciation professionnelle, elle offre une chance de sauver la vie, rétablir la santé ou alléger les souffrances du patient. Dans toute la mesure du possible, cette intervention devra faire l'objet d'une recherche pour en évaluer la sécurité et l'efficacité ». C'est sur ce paragraphe que s'appuie l'Institut Ludwik Hirszfild en Pologne. Dans ce cas, la phagothérapie ne peut être qu'un recours de dernière intention, utilisé une fois que toutes les autres options thérapeutiques ont été épuisées (Courtault, 2014).

Il faut savoir que la déclaration d'Helsinki est un document officiel adoptée en 1964 à Helsinki (Finlande) et élaborée par l'Association Médicale Mondiale, représentante des médecins dans le monde.

## **2.9 Résistance aux antibiotiques et infections nosocomiales**

Les infections nosocomiales sont des infections secondaires, causées par des agents infectieux persistants dans l'environnement hospitaliers et contractés par les patients durant leur hospitalisation. Elles touchent environ 5% de l'ensemble des patients surtout ceux dont le système immunitaire est déficient ou supprimé: malades au SIDA, cancéreux et patients transplantés. Les germes responsables sont souvent multirésistants aux antibiotiques et sont sélectionnés et maintenus en milieu hospitalier, où ils provoquent des infections additives qui se manifestent par: une bactériémie, des infections de plaies et de brûlures, des infections urinaires, des infections cutanées et oculaires et des infections d'implants chirurgicaux (Bousseboua, 2003).

## **2.10 L'industrie pharmacologique en service de la phagothérapie**

Aujourd'hui, la compagnie Intralytix (Baltimore, Maryland, USA) vend des produits de phages approuvés par l'US Food Drug Administration (FDA) et l'US Department of Agriculture (USDA). Chaque produit contient un « cocktail » de phages qui tuent sélectivement la bactérie cible (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Des chercheurs de l'USDA à Beltsville, Maryland, ont testé EcoShield™ (un produit d'Intralytix) sur la laitue expérimentalement contaminés par les biofilms d'*E. coli* O157: H7, persistants sur les lames utilisées pour la récolte des cultures. Dans ce cas une désinfection avec le chlore est insuffisante. EcoShield™ pulvérisé a réduit les concentrations d'agents pathogènes par 2 unités de log10 (100 fois) dans une journée (Sharma *et al.*, 2009).

Le produit PhagoBioDerm®, développé en 2000 en association entre les chercheurs de l'EIBMV et le « Center for Medical Polymers and Biomaterials » est un « pansement » innovant à utiliser sur les brûlures cutanées qui consiste en un polymère non toxique, biodégradable, perforé et imbibé d'un mélange de phages lytiques (de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus* et *Proteus*), un antibiotique (Ciprofloxacine) et un analgésique (benzocaïne) (Sulakvelidze & Kutter, 2004).

PhagoBioDerm a été testé pendant 90 jours sur des patients ayant des plaies infectées et a réussi à guérir complètement 70 % de ceux-ci (96 patients) (Markoishvili *et al.*, 2002).

En 2002, l'EPA (US Environmental Protection Agency) a autorisé l'utilisation d'un pesticide biologique composé de deux phages développé par Omnilytics™. Ce produit est appliqué sur la surface des tomates et des poivrons pour éliminer les taches causées par les pathogènes de plantes *Xanthomonas campestris* subsp. *vesicatoria* et *Pseudomonas syringae* (Goodridge & Bisha, 2011).

Un dernier produit approuvé par la FDA en 2013 est nommé SalmoFresh™. Celui-ci est constitué de six phages et est efficace pour réduire la concentration de plusieurs espèces pathogènes de *Salmonella* à la surface de viandes de volailles avant leur envoi à l'étape du hachage (Carol, 2013).

### **2.11 Avantages et inconvénients de la phagothérapie en comparaison avec l'antibiothérapie**

Les antibiotiques sont des produits synthétiques ou semi-synthétiques à large spectre d'action. Leur utilisation de façon intense, déclenche des effets secondaires sévères chez le patient. De plus, les antibiotiques ne s'autorépliquent pas et ne s'autorégulent pas (tableau 04). En effet, une fois introduits dans l'organisme, leur concentration diminue naturellement avec le temps. Les phages, eux, continuent à s'amplifier au site d'infection bactérien, à condition que les hôtes bactériens y restent sensibles (Housby & Mann, 2009). Il est aussi intéressant de

noter que la fréquence d'apparition de bactéries résistantes aux phages serait de  $10^{-7}$  à  $10^{-8}$  et donc significativement moindre que celle de la résistance aux antibiotiques (environ  $10^{-5}$ ) (Merril *et al.*, 2006). Des découvertes récentes devraient faire envisager la phagothérapie comme un complément de l'antibiothérapie et non seulement comme une simple «alternative».

**Tableau 04 :** les avantages et les inconvénients de la thérapie phagique et de l'antibiothérapie (Dublanche, 2014)

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

**Suite du tableau 04**

<b>Production et coût</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Les phages naturels sont peu couteux et rapidement utilisables</li> <li>2. Avec des phages génétiquement modifiés → couts important, brevet possible, délai, disponibilités ?</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. La mise sur le marché d'un nouvel ATB est très longue et très couteuses →</li> <li>2. Des intérêts actuels de l'industrie pharmaceutique</li> </ol>
<b>Efficacité</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. L'efficacité est prouvée dans de nombreuses études expérimentales animales</li> <li>2. Les études expérimentales humaines récentes rigoureuses rares sont limitées aux phages</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. L'efficacité est reconnue si les indications sont bien posées</li> <li>2. Echec si la bactérie est méconnue et/ou R</li> <li>3. Les études expérimentales rigoureuses sont nombreuses avec AMM</li> </ol>
<b>Indications</b>	Les indications sont mal définies est n'existe aucune standardisation pour l'utilisation thérapeutique des phages	La prescription des ATB est standardisée, les normes et indications bien établies (référentiels)
<b>Règlementation</b>	Les phages tant que bio médicaments sont absents des textes de la santé publique (France et UE)	Les règlements sont bien adaptés à toutes les étapes de la fabrication comme à l'utilisation des ATB

*Matériel*

*Et*

*Méthodes*

## MATERIEL ET METHODES

### 1. L'échantillonnage

Trois échantillons ont été collectés sur des périodes chronologiquement espacées. Selon le calendrier ci-dessous (tableau 05).

**Tableau 05** : Le calendrier des prélèvements effectués

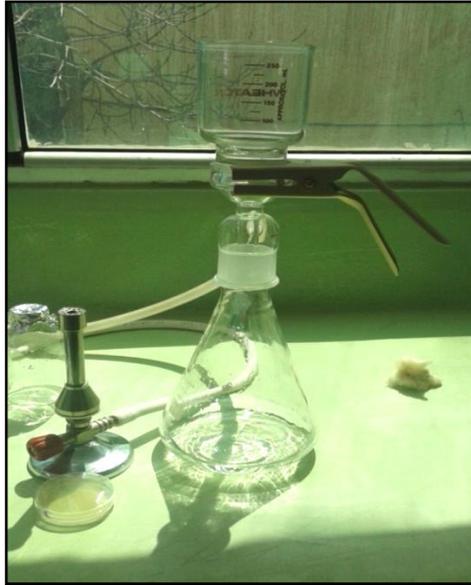
L'échantillon	Nature de l'échantillon	Date du prélèvement	Heure du prélèvement	Température de la journée du prélèvement	Lieu du prélèvement
1	Eau usée	30/03/2015	7h40	19°C	Un égout devant le service d'épidémiologie du CHU de Constantine
2	Boue mixte et eaux usées	18/05/2015	14h	23°C	Un égout sortant d'un tissu urbain de la ville de Constantine
3	Boue mixte et eaux usées	26/05/2015	11h	11°C	Un égout sortant d'un tissu urbain de la ville de Constantine

Chaque échantillon a été distribué dans des flacons en verre stériles de 500 ml, en laissant un volume d'air représentant environ 1/10 du volume du flacon. L'échantillon a été transporté par la suite vers le laboratoire dans des conditions isothermes de 4°C et manipulé le même jour du prélèvement.

### 2. La filtration

A l'exception des deux échantillons de la boue mixte qui ont été broyés par un broyeur électrique (IKA® T18 basic, Germany) pendant 10 min avant leur centrifugation. Le procédé était le même pour l'ensemble des échantillons, où le contenu des flacons a été directement et équitablement distribué dans des tubes à bouchon en plastique de 45 ml convenables à la centrifugeuse (model EBA 12 de Hettich, Germany) utilisée. L'échantillon a été centrifugé pendant 10 minutes à 4500 rpm et un volume de 100 ml du surnageant a été filtré par un système de filtration stérile de 1 litre (Wheaton, USA) (figure 09) muni d'une pompe à vide et

en utilisant des membranes filtrantes stériles de 0,45µm (filtre stérile, Wattman, Germany). Avant la filtration, le pH du surnageant a été évalué par une bandelette. Le filtrat par la suite (la suspension phagique) a été conservé à 4°C dans des flacons stériles de 100 ml après l'ajout de quelques gouttes de chloroforme.



**Figure 9:** Système de filtration (Wheaton, USA)

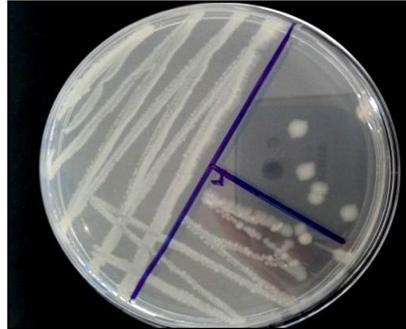
### **3. Le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM)**

Pour évaluer la charge microbienne du premier échantillon, la membrane filtrante de 0,45µm qui a été utilisée pour sa filtration a été immédiatement et aseptiquement déposée sur le milieu gélosé PCA (Plate Count Agar, Institut Pasteur Algérie) (annexe1) coulé et solidifié au préalable dans des boîtes de Pétri à diamètre réduit, ensuite incubé à 30°C pendant 48 à 72h. La deuxième méthode consiste à préparer une série de dilutions décimales à partir de la suspension mère (SM). Cent microlitre de chaque dilution décimale ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ ) ont été étalés sur le milieu PCA. Les boîtes sont directement incubées à 30°C pendant 48h.

### **4. La purification et la conservation des souches isolées**

La technique d'isolement classique des cadrans (figure 10) a été appliquée, où elle repose sur un épuisement par stries de l'inoculum correspondant à un aspect sélectionné à partir de la boîte d'origine (du dénombrement). Le milieu préconisé est la gélose nutritive (Institut Pasteur, Algérie). Les colonies poussées après 24 heures d'incubation à 37°C ont été purifiées par repiquages successifs sur le même milieu d'isolement. Une mise en culture en

milieu liquide (bouillon nutritif) a été effectuée pour entamer le contrôle de pureté de la souche et qui consiste à des observations macroscopiques à l'œil nu et microscopiques après coloration de Gram. Une fois un aspect microscopique homogène est obtenu, la souche est considérée pure. Les souches bactériennes ont été conservées sur gélose inclinée à 4°C.



**Figure 10** : la technique des cadrans

### **5. La technique de spot test**

La technique des « spots » a été réalisée où 100µl d'une culture bactérienne ont été étalés sur une gélose Luria Bertani ou LB solide (Annexe 1), laissés séchés. Une aliquote de 50µl de la suspension phagique a été déposée sur la culture bactérienne (exactement dans le centre de la gélose). Cette expérience a été répétée au moins deux fois pour confirmer les résultats obtenus. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 °C pendant 24h, la présence d'un spot clair indique la présence d'une activité lytique. Les résultats positifs ont été confirmés par la technique des plages de lyse.

### **6. La technique des plages de lyse**

Un volume (X1) de chaque culture bactérienne jeune a été mélangé avec un volume (X2) de la suspension phagique le tous a été additionné au bouillon Lauria Bertani (Annexe 1) dans des Erlenmeyer (figure 11). Le mélange a été incubé à 37°C sous agitation dans un incubateur-agitateur pendant 16 h.

Après l'incubation, le mélange récupéré a été distribué dans des tubes Eppendorf et centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min (centrifugeuse 5415R, Germany). Cent microlitre du surnageant a été transféré dans des tubes à essai contenant 4ml de la gélose LB semi-molle (0.7% agar) conservée en surfusion à 45°C, ensuite le mélange est versé sur des boîtes pré-

coulées contenant la gélose LB solidifiée. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h. L'apparition ou l'absence des plages de lyse claire sur la pelouse bactérienne a été observée.



**Figure 11 :** la suspension phagique mise en contact avec la bactérie à tester

Un test confirmatif (au cours duquel la suspension phagique a été complètement remplacée par différentes concentrations du chloroforme) a été réalisé en parallèle pour s'assurer en cas de l'apparition de zones claires que l'effet inhibiteur a été du à l'action d'un phage et non pas au chloroforme.

### **7. La méthode de conservation des phages**

À partir de la boîte présentant des plages de lyse, un dénombrement des plages formées a été réalisé, le nombre obtenu a été traduit en UFP/100 ml pour Unités Formant Plages. Par la suite, les plages ont été découpées soigneusement en perçant la gélose tout au tour de la zone d'inhibition avec la grande extrémité de la pipette Pasteur. Ensuite, ces bouchons d'agar ont été déposés dans des tubes Eppendorf contenant 1 ml du tampon SM stérile (annexe1) à pH 7. Les tubes ont été conservés au réfrigérateur à 4°C.

### **8. L'identification phénotypique des isolats**

La souche *E. coli* ATCC 25922 a été utilisée comme souche de référence. Les vingt isolats obtenus à partir de l'échantillon d'eaux d'égouts prélevé au niveau du (CHU) de Constantine ont été identifiés en s'appuyant sur l'étude de leurs caractères phénotypiques :

morphologiques et biochimiques et sur la détermination de leur profil de résistance (antibiogramme).

➤ **Les tests analysant la morphologie**

Les examens microscopiques après coloration de Gram ont été effectués en utilisant le microscope optique (Optec) avec caméra intégré (Canon). Le test de la mobilité a été effectué sur milieu mannitol-mobilité (Biomerieux, SA., Marcy-L'Étoile, France). Les cultures ont été incubées à 37°C pendant 24h.

➤ **Les tests biochimiques**

**Test de catalase :**

Sur une lame stérile, une goutte d'eau oxygénée a été déposée et dans laquelle une colonie bien isolée a été diluée. Un dégagement de bulles de gaz signifie que la bactérie possède l'enzyme catalase.

**Test de l'oxydase :**

Sur une lame bien propre, un disque d'oxydase a été déposé avec précaution, sur celui-ci une colonie bactérienne a été déposée en utilisant une pipette Pasteur stérilisée au préalable. L'apparition d'une coloration violette au bout de 30 secondes indique que la bactérie est pourvue d'un cytochrome oxydase. L'absence de la coloration violette est due à l'absence de l'enzyme recherchée, cela indique que la bactérie est dépourvue de cette enzyme respiratoire.

**Test mannitol-mobilité :**

Le milieu mannitol-mobilité ensemencé révèle après incubation un virage de l'indicateur rouge de phénol vers le jaune si la bactérie fermente le sucre mannitol.

**Test TSI et les milieux sélectifs :**

Trois milieux sélectifs ont été ensemencés et incubés à 37°C pendant 24h. Le milieu MacConkey (Institut Pasteur, Algérie) pour la mise en évidence de la fermentation du lactose. Les colonies qui prennent une coloration rose intense sont considérées comme lactose positif (pourvue de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase). L'absence de pousse sur ce milieu signifie que les bactéries font partie des Gram positif. Le milieu TSI (Triple Sugar Iron Agar, Institut Pasteur Algérie) a été ensemencé par des stries sur la pente et par une pique centrale dans le culot.

La gélose King B (Institut Pasteur, Algérie) semi-inclinée en tube a été ensemencée par des stries pour quelques isolats ayant présentées une pigmentation verte sur gélose nutritive pour s'assurer si elles appartiennent au genre *Pseudomonas*.

#### **La Galerie API 20E:**

Les vingt isolats ont été identifiés par la galerie API 20E (Biomerieux, SA., Marcy-L'étoile, France), cette dernière renferme 20 microtubes prêts à l'emploi permettant de réaliser 23 tests biochimiques afin d'identifier les bacilles Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*.

Les galeries doivent être ensemencées en suivant les instructions de Biomerieux, où chaque suspension bactérienne préparée doit avoir un trouble qui répond à une valeur de 0,5 Mc Farland, cela est obtenu par la dissolution d'une à 4 colonies dans une solution de 5ml de NaCl (0,8%). Afin d'ensemencer la galerie API 20E, la suspension bactérienne préparée a été introduite dans chaque microtube à l'aide d'une micropipette où la pointe de l'embout est appuyée sur le côté intérieur pour éviter la formation de bulles. Les microtubes des tests CIT, VP et GEL ont été remplis par l'inoculum jusqu'à la cupule alors que les microtubes correspondant aux tests : ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S et URE ont été remplis par la suspension bactérienne et recouverts par une couche d'huile de vaseline pour assurer la condition d'anaérobiose. Les réactions produites après une incubation de 48h à 37°C se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Annexe 1).

Les résultats des réactions obtenues sont notés sur une fiche de résultats standards. La lecture des résultats obtenus fait référence au tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20E. Le tableau de lecture (Annexe 2) permet donc de déterminer les résultats positifs ou négatifs de tous les tests et par conséquent de déterminer le code de la bactérie étudiée. Les tests sont, d'ailleurs, regroupés en groupe de 3, et une des valeurs (1,2 ou 3) est donnée pour chaque résultat positif au sein des trois tests regroupés respectivement. Les chiffres obtenus pour chaque groupe des trois tests sont rassemblés pour avoir un seul chiffre.

L'enchaînement des chiffres obtenus après chaque rassemblement constitue un code de sept chiffres qui servira par la suite à l'identification de la souche en question, en faisant usage à un catalogue analytique spécifique de la galerie API 20E.

#### **➤ Le profil de résistance des souches étudiées :**

Un antibiogramme a été réalisé afin de tester la sensibilité ou la résistance des 20 isolats ainsi que la souche de référence *E. coli* vis-à-vis de quelques types d'antibiotiques connus. Le

principe consiste à placer plusieurs pastilles imbibées d'antibiotiques (disques) sur la culture bactérienne de la souche à tester préalablement ensemencée par des écouvillons stériles sur milieu Mueller-Hinton en boîte de Pétri. L'ensemencement a été effectué par des stries extrêmement serrées. Après incubation à 37°C pendant 24h, trois types d'interprétations peuvent être tirées selon le diamètre de l'auréole formée autour du disque d'antibiotique (la zone d'inhibition) : bactérie sensible, intermédiaire ou résistante.

*Résultats*

*Et*

*Discussion*

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les eaux d'égouts sont en fait des effluents liquides contaminés par des matières fécales humaines ou animales. Elles contiennent fréquemment des composés inorganiques et organiques nocifs, ainsi que des microorganismes pathogènes. C'est la raison pour laquelle des techniques microbiologiques normalisées sont employées pour déterminer la qualité de l'eau. Ces eaux usées ne peuvent être rejetées sans traitement dans les lacs, les rivières ou la mer pour des raisons de santé publique, d'économie, d'environnement et d'esthétique.

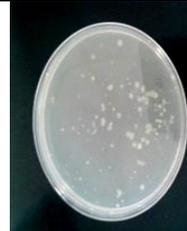
La mortalité est due à l'émergence des épidémies mortelle comme le choléra, la fièvre typhoïde, l'amibiase intestinale aigüe (dysenterie et inflammation colique), la légionellose (infection respiratoire) causée par *Legionella pneumophila*, ainsi que la transmission des épidémies virales comme la poliomyélite (Madigan & Martinko, 2007).

L'ubiquité de certains bactériophages, tels que les coliphages dans les selles de l'homme et des homéothermes, suggère que ces organismes pourraient constituer de bons indicateurs de contamination fécales du milieu hydrique et servent aussi comme indicateurs d'efficacité des procédés d'épuration et de désinfection des eaux (Schwartzbrod,1991).

L'analyse bactériologique de l'échantillon prélevé à partir de l'eau d'égout du CHU a porté principalement sur le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM).

Les résultats du dénombrement sur membrane filtrante et après dilutions décimales sont résumés (tableau 06).

**Tableau 06** : les résultats du dénombrement de la FTAM

La membrane filtrante	Les boîtes ensemencées par les dilutions décimales		
$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$
IND	IND	274	117
			

**IND** : indénombrable



testées avec les trois suspensions phagiques recueillis ont montrées après incubation des sensibilités variables vis-à-vis l'aliquote déposée, les résultats positifs se traduisent par l'apparition d'une zone claire d'inhibition comparable à celle obtenue suite à l'application d'un antibiotique. L'avantage de ce test c'est d'éviter le gaspillage de la suspension phagique ainsi d'avoir une vue présomptive sur la présence ou l'absence de phages lytiques.

L'apparition des plages de lyse après la mise en contact de tous les 20 isolats ainsi que la souche de référence *E.coli* avec la suspension phagique issue de la filtration de l'échantillon d'eaux d'égout du CHU s'est révélée négative. Cela conduit à la fondation de certaines théories. La première c'est que les bactéries isolées sont toutes résistantes à tout type de phages présent dans l'échantillon, soit en développant une immunité via le système CRISPR/Cas décrit précédemment ou par le système restriction/modification qui génère des coupures ciblant l'ADN phagique double brin. L'absence de récepteurs spécifiques sur l'hôte ou leur altération est aussi une probabilité qui exige l'absence d'infection. La troisième proposition parle de la possibilité de la présence des particules phagiques spécifiques mais dans un état d'inactivation sous l'effet de certaines conditions environnemental. La température semble être le facteur le plus important. En eau souterraine Yahya *et al.* (1993) montrent qu'après 80 jours à 7°C, il n'y a pas d'inactivation significative du phage MS2. Par contre à 23°C en 10 jours l'abattement est de 5 logs.

La catégorie de l'eau présente aussi un facteur limitant cela est en relation avec sa teneur en matière en suspension et en microorganismes. Dans l'eau de mer Chung & Sobsey (1993) constatent que les phages MS2 à 25°C subissent une très forte inactivation.

La lumière solaire présente un effet sur l'inactivation phagique dont l'importance varie selon la turbidité de l'eau et la profondeur. L'action de la lumière peut être directement exercée sur la particule virale ou par la stimulation du développement de la microfaune. L'inactivation virale se produit pour une longueur d'onde inférieure à 370 nm (Cubbage *et al.*, 1979).

Cette action solaire a été bien montrée par Hurst (1988) qui rapporte qu'en l'absence de lumière solaire, le taux d'inactivation varie de 0,71 à 0,80 log par jour alors qu'en présence de lumière solaire ce taux varie de 1,33 log dans une eau très turbide à 2,38 log par jour dans une eau de faible turbidité. D'autres facteurs ont certainement un effet inhibiteur sur les bactériophages tel que le pH, les cations, ainsi que des facteurs biologiques ayant une activité

virucide potentielle. Hall & Sobsey (1993) travaillant sur le phage MS2 hautement purifié, constatent que des doses d'ozone aussi faibles que 0,4 mg/l inactivent le phage MS2 à un pH de 6 à 8.

Tous ces résultats et toutes ces valeurs concernant la survie ou l'inactivation des virus dans les eaux reposent sur la détermination d'un maintien ou d'une perte de leur infectiosité sur des cultures cellulaires.

Le test des plages de lyse a été appliqué aussi pour tous les isolats avec la deuxième suspension phagique correspondante au deuxième échantillon de la boue mixte prélevé le 18/05/2015. Malheureusement, les résultats se sont révélés négatifs et aucune sensibilité des souches vis-à-vis la suspension phagique n'a été détectée, malgré que le prélèvement de cette journée ait été normalement parfait pour isoler un bactériophage du faite que l'échantillonnage a été réalisé après une période de pluie. Cette condition a été respectée, car la majorité des études expérimentales affirment que le titre de phage dans l'eau augmente en temps de pluie. En 1931, Gildemeister & Watanabe ont trouvé les bactériophages actifs sur le *Bacterium coli* dans le canal de Berlin. Le canal, plus pollué, contient davantage de bactériophage. La quantité augmente pendant les pluies et la crue.

La dernière expérience des plages de lyse a été réalisée en testant la suspension phagique appartenant au troisième échantillon sur tous les isolats obtenus. Cette fois-ci l'action d'un bactériophage (X) a été détectée avec la souche BKSHX où des zones d'inhibition (plages de lyse) dispersées sur toute la surface du tapis bactérien ont été caractérisées et dénombrées (Figure 13). Après deux autres répétitions pour le même test, la présence des plages de lyse a été toujours marquée mais avec des valeurs différentes (tableau 07).

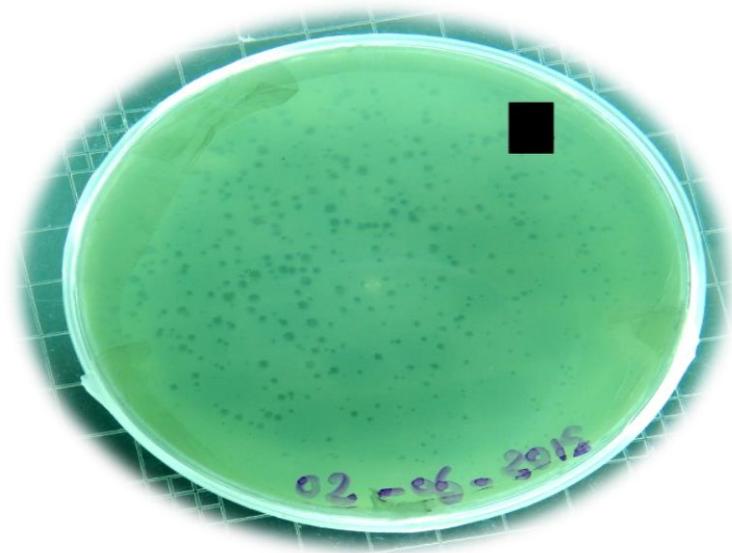
Il a été mentionné aussi qu'une prise du pH de surnageant de l'échantillon d'eau d'égout avant sa filtration a été effectuée en se basant sur une mesure colorimétrique via une bandelette (figure 12) la comparaison montre que le pH est basique entre 7 et 8.

**Tableau 07** : les résultats du dénombrement des plages de lyse pour la souche BKSHX pour les trois répétitions

Répétitions	R 01	R02	R03
PFU/ml	130	616	402



**Figure 12 :** la comparaison des couleurs sur la bandelette de pH (en haut) avec le code colorimétrique (en bas).



**Figure 13 :** l'apparition de plages de lyse sur la culture bactérienne de la souche sensible

Ces résultats confirment alors la présence de bactériophages lytiques dans les eaux d'égout et leur capacité d'éliminer les germes provenant d'une source différente.

Les plages de lyse ont été découpées soigneusement et conservées dans le tampon SM stérile qui réserve par sa composition d'une stabilité pour les particules phagiques conservées à 4°C.



**Figure 14:** la technique de récupération des plages pour leur conservation

Afin d'arriver à la caractérisation phénotypique des souches bactériennes isolées, le passage par une variété de tests a été indispensable, commençant d'abord par les tests définissant les caractères morphologiques (Tableau 08).

**Tableau 08** : les résultats de l'étude morphologique des souches isolées

souches	BKSH X	BKSH 01*	BKSH 02	BKSH 03	BKSH 04	BKSH 05	BKSH 06
Gram	-	-	-	+	-	+	+
Mobilité	+	+	+	+	+	+	+
Aspect et mode de regroupement	Cocci isolés ou en amas	Cocci en paire (diplocoques)	Bâtonnet en paire (dipto)	Bacilles isolés	Bâtonnet en paire	Coccobacille	Cocci en amas
souches	BKSH 07	BKSH 08	BKSH 09	BKSH 10	BKSH 11	BKSH 12	BKSH 13
Gram	-	+	-	-	+	-	-
Mobilité	+	-	-	-	-	-	-
Aspect et mode de regroupement	Diplocoque en amas	Bacille en paire	Coccobacille en amas	Diplo-coccobacille	Diplo-coccobacille	Coccobacille en paire	Bacille isolées
souches	BKSH 14	BKSH 15	BKSH 16	BKSH 17	BKSH 18	BKSH 19	E.coli
Gram	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	-	-	-	-	-	+	+
Aspect et mode de regroupement	Cocci en amas	Coccobacilles isolés	Cocci en chaînette	Cocci en paire	Cocci en amas	Coccobacille en amas	Cocci en amas

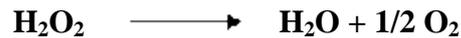
**NB** : Dans ce tableau ainsi que dans tous les tableaux suivants le signe (+) signifie un résultat positif alors qu'un signe (-) signifie un résultat négatif.

La majorité des souches isolées sont des cocci ou des coccobacilles, mobiles ou immobiles à Gram négatif. Seulement cinq souches sont révélées de Gram positif (BKSH : 03, 05, 06, 08 et 11). Ces bactéries ne font pas partie donc de la famille des *Enterobacteriaceae* qui sont des bacilles ou des coccobacilles à Gram négatif, mobiles ou immobiles, anaérobies facultatifs, oxydase négatif, catalase positif (à l'exception de *Shigella dysenteriae*) et asporulées.

Parmi les autres tests biochimiques importants qui ont été effectués, le test d'oxydase et le test de catalase. Ils jouent ainsi un rôle distinctif et permettent de différencier les souches

appartenant au groupe des *Enterobacteriaceae* des autres souches appartenant à d'autres familles.

Pour le test de catalase, la réaction a été considérée positive suite à la détection de bulles due à un dégagement gazeux, la catalase est une enzyme qui joue un rôle primordial dans la catalyse de dégradation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en  $H_2O$  et  $1/2 O_2$ , selon la réaction suivante :



Pour le test d'oxydase, la réaction a été considérée positive après la détection d'un virage rapide de l'incolore vers le violet en présence d'oxygène (enzyme de la chaîne respiratoire bactérienne). Le cytochrome oxydase catalyse des réactions d'oxydation du type :



Substrat réduit incolore  $\longrightarrow$  Produit oxydé coloré

L'un des substrats qui peut constituer le réactif d'oxydase peut être l'oxalate de N-tétraméthyl paraphénylène diamine.

D'après les résultats obtenus des tests de catalase et d'oxydase, en plus de la souche *E. coli* de référence, les bactéries qui font partie de la famille des *Enterobacteriaceae* sont les souches : BKSH 9, BKSH 14, BKSH 18 et BKSH 19. Cela a permis leur identification par la galerie API 20E (tableau 09). Les résultats des mêmes souches obtenus sur les milieux sélectifs TSI et Mac Conkey ont été pris en considération (tableau 10).

Revenant au résultat de la coloration de Gram des souches en question (figure 15) et en consultant le catalogue d'identification des API 20 E (figure 16) et selon les résultats des tests biochimiques et morphologiques préalablement obtenus, les souches BKSH09 et BKSH19 ont été identifiées comme *Serratia liquefaciens*.

Sur le milieu sélectif TSI la croissance des isolats BKSH09 et BKSH19 entraîne un changement de la couleur de l'indicateur coloré du milieu du rouge-brun vers le jaune cela est dû à une baisse de pH suite à la production d'acide. Les bactéries sont donc saccharose + et/ou Lactose +, Glucose+, une absence de noircissement signifie la non production d' $H_2S$ , ainsi qu'une déformation de la gélose affirme la production de gaz. Sur le milieu Mac conkey les

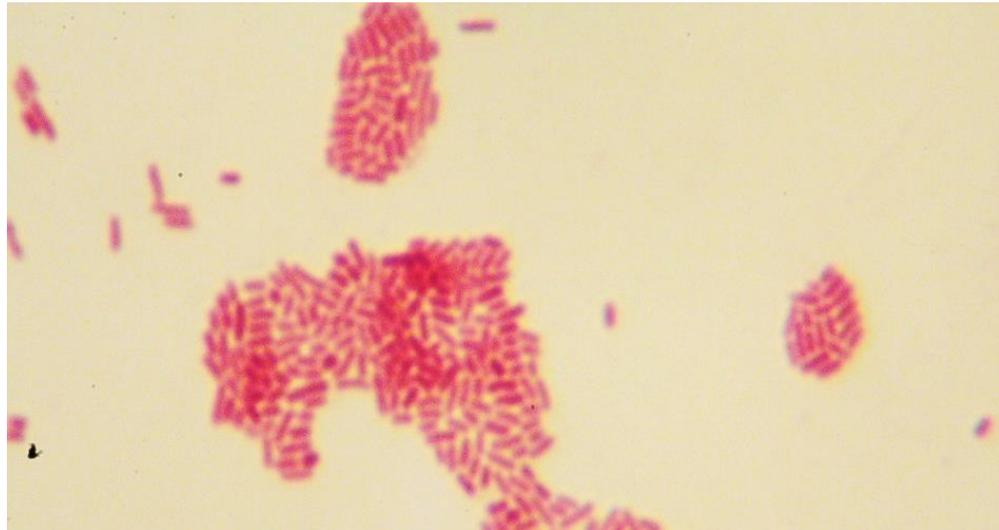
colonies ne prennent pas la couleur rose caractéristique due à la fermentation du lactose, cela indique que ces bactéries n'ont pas la capacité de fermenter ce sucre (figure 17).

**Tableau 09** : les résultats des tests biochimiques sur les souches faisant partie des *Enterobacteriaceae*

Souches	BKSH09	BKSH14	BKSH18	BKSH19
oxydase	–	–	–	–
catalase	+	+	+	+
ONPG	+	–	+	+
ADH	+	–	–	+
LDC	+	–	+	+
ODC	+	–	–	+
CIT	+	–	–	+
H <sub>2</sub> S	–	–	–	–
URE	–	–	–	–
TDA	+	–	+	–
IND	–	–	+	–
VP	–	–	–	–
GEL	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+
INO	+	+	+	+
SOR	+	+	+	+
RHA	+	+	+	+
SAC	+	+	+	+
MEL	+	+	+	+
AMY	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+
NO <sub>2</sub>	–	–	+	+
N <sub>2</sub>	+	–	–	–

**Tableau 10** : les résultats des cultures obtenus sur milieux sélectifs

souches	Glucose	Lactose/Saccharose	H <sub>2</sub> S	Gaz	Mac Conkey	lactose
<b>BKSH 09</b>	+	+	–	+	+	–
<b>BKSH 14</b>	+	+	–	+	+	–
<b>BKSH 18</b>	+	+	–	+	+	+
<b>BKSH 19</b>	+	+	–	+	+	–



**Figure 15 :** l'observation microscopique (1000X à immersion) après coloration de Gram de la souche *Serratia liquefaciens* BKSH09, bacilles à Gram (-) regroupés en amas.

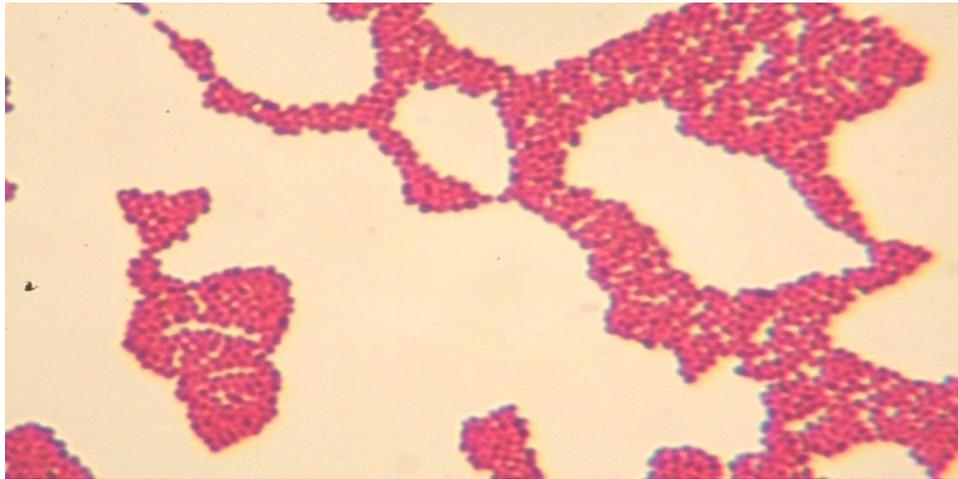


**Figure 16 :** résultat de l'identification de l'isolat BKSH19 par la galerie API 20E.



**Figure 17 :** la croissance de la souche *Serratia liquefaciens* BKSH09 sur milieu Mac Conkey

En revenant au résultat de la coloration de Gram de la souche BKSH14 (figure 18) et la souche BKSH18 (figure 20 à droite), en consultant le catalogue d'identification des API 20E et selon les résultats des tests biochimiques et morphologiques préalablement obtenus les souches BKSH14 (figure 19) et BKSH18 (figure 21) ont été identifiées comme *Acinetobacter calcoaceticus* et *Klebsiella oxytoca* respectivement.

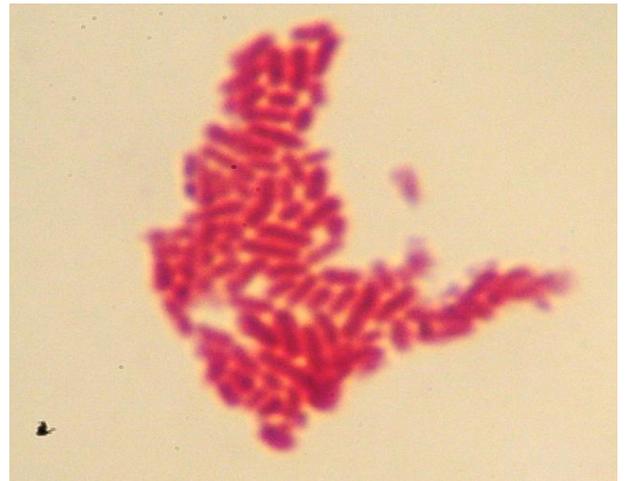


**Figure 18** : l'observation microscopique (1000X à immersion) après coloration de Gram de la souche BKSH14, Gram (-) coccobacilles en amas



**Figure 19** : résultats de l'identification de l'isolat BKSH14 par la galerie API 20E.

Sur le milieu sélectif TSI la croissance de la souche BKSH14 (figure 20 à gauche) entraîne un changement de la couleur de l'indicateur coloré du milieu du rouge-brun vers le jaune cela est dû à une baisse de pH suite à la production d'acide. Les bactéries sont donc saccharose et/ou Lactose +, Glucose+, une absence de noircissement signifie le non production d'H<sub>2</sub>S, ainsi qu'une déformation de la gélose affirme la production de gaz. Sur le milieu Mac Conkey les colonies sont de couleur blanche, cela indique que ces bactéries n'ont pas la capacité de fermenter le lactose.



**Figure 20 (à gauche) :** l'isolement de la souche BKSH14 sur milieu TSI  
**(à droite):** l'observation microscopique (1000X, a immersion) après coloration de Gram de la souche BKSH18



**Figure 21 :** résultat de l'identification de l'isolat BKSH18 par la galerie API 20 E.



**Figure 22 :** les colonies roses caractéristiques de la dégradation du lactose de la souche BKSH18 sur milieu Mac-Conkey

Les études réalisées sur ces trois souches identifiées parmi les *Enterobacteriaceae* montrent d'abord que la souche *Serratia liquefaciens* est largement répandue dans la nature, y compris l'eau de rivière (Merch-Sundermann & Wundt, 1987) et les eaux usées domestiques (Sallal, 1987). Chez l'homme, elle a rarement été signalée comme cause d'infections nosocomiales comme les infections urinaires (Serruys-Schoutens *et al.*, 1984) la pneumonie (Matsui & Nakazawa, 1994) et d'autres maladies. Quelques rapports de *S. liquefaciens* provoquant des infections acquises dans la collectivité comprennent l'arthrite septique (Harden *et al.*, 1980) et les infections oculaires résultant de la contamination des étuis à lentilles de contact (Midelfart *et al.*, 1996).

Concernant la bactérie *Acinetobacter calcoaceticus* elle est Gram négatif, coccobacille, non mobile, aérobie, catalase +, oxydase-. Des résultats qui sont exactement compatibles avec les résultats obtenus suite à l'identification. Cette bactérie peut être pathogène et agent opportuniste d'infections nosocomiales causant des septicémies surtout chez les patients immunodéprimés et souvent associées aux cathéters à demeure (Rolston *et al.*, 1985).

La bactérie *Klebsiella oxytoca* est également un germe à Gram négatif où contrairement à la plupart des Entérobactéries, elle se caractérise par son immobilité. *K. oxytoca* est retrouvée en petite quantité au niveau du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud ; sa présence dans l'eau peut signifier une contamination fécale.

Le pouvoir pathogène de cette bactérie est similaire à celui de *Klebsiella pneumoniae* en provoquant des infections urinaires, des broncho-pneumopathies, de bactériémies et infections intra-abdominales. La bactérie est AFF, lactose +, nitrate-réductase+, LDC+ et fermente de très nombreux sucres. *K. oxytoca* se différencie de *K. pneumoniae* par le caractère indol +. *K. oxytoca* présente une résistance naturelle à l'ampicilline et à la ticarcilline par production d'une pénicillinase. Par comparaison aux résultats obtenus, l'identification en s'appuyant sur les tests biochimiques de la galerie API 20E semble toujours fiable.

Les résultats des tests biochimiques obtenus avec les autres souches qui n'appartiennent pas aux *Enterobacteriaceae* ont été regroupés ensemble (tableau 11) mais en séparant toujours les Gram négatif des Gram positif.

**Tableau 11** : la lecture de la galerie API 20 E pour les autres souches bactériennes à Gram négatif

souches	BKSH 01'	BKSH 02	BKSH 04	BKSH 07	BKSH 10	BKSH 12	BKSH 13	BKSH 15	BKSH 16	BKSH 17
oxydase	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
catalase	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
ONPG	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
LDC	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-
ODC	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
CIT	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
URE	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
IND	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RHA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMY	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OX	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
NO2	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
N2	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-

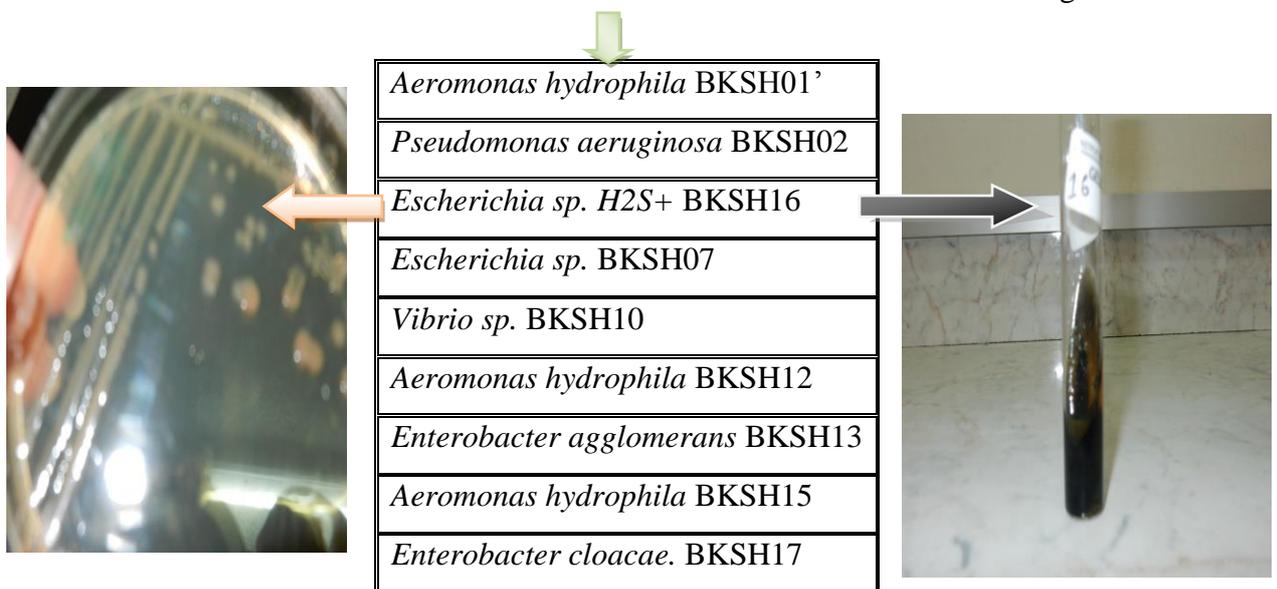
Les résultats de ces mêmes souches obtenus sur les milieux sélectifs TSI et Mac-Conkey ont été pris en considération (tableau 12).

**Tableau 12** : les résultats des autres cultures à Gram négatif obtenus sur milieux sélectifs

souches	Glucose	Lactose/Saccharose	H2S	Gaz	Mac-Conkey	lactose
BKSH01'	-	-	-	-	+	-
BKSH02	-	-	-	-	+	-
BKSH04	+	+	-	+	+	-
BKSH07	+	+	-	+	+	+
BKSH10	+	+	-	+	+	-
BKSH12	+	+	-	-	+	+
BKSH13	+	+	-	+	+	-
BKSH15	+	+	-	+	+	-
BKSH16	+	+	+	-	+	-
BKSH17	+	+	-	-	+	+

La lecture des résultats sur milieu mannitol-mobilité a montré que les souches BKSH : 01', 02 et 16 n'ont pas la capacité de fermenter le sucre mannitol alors que les souches BKSH : 04, 07, 10, 12, 13, 15, et 17 ont la capacité de fermenter le sucre mannitol à 37°C, cela se traduit par le virage de l'indicateur coloré (rouge de phénol) du rouge vers le jaune due à production d'acides. En consultant le catalogue d'identification des API 20E et selon les résultats des tests biochimiques et morphologiques préalablement obtenus, les souches à Gram négatif qui ne font pas partie des *Enterobacteriaceae* ont été identifiées approximativement (tableau 13).

**Tableau 13** : les résultats d'identification des autres souches à Gram négatif



**Figure 23** : (à gauche) la culture de la souche BKSH16 présumée *Escherichia sp. H<sub>2</sub>S+* sur gélose nutritive (GN), (à droite) la culture de la même souche sur milieu TSI montre une forte production d'H<sub>2</sub>S.

D'après les résultats obtenus trois souches ont été identifiées comme *Aeromonas hydrophila* cette bactérie à Gram négatif a été toujours connue par sensibilité aux phages lytiques. En 1983 elle a connu l'identification de deux bactériophages lytiques appelés Aeh1 et Aeh2 isolés à partir des eaux usées. Les dimensions des deux phages sont différentes des autres phages d'*Aeromonas hydrophila*. Aeh1 forme des petites plages claires, alors que le phage Aeh2 forme des plages turbides avec un centre clair. Les deux phages ont été sensibles à un traitement au chloroforme et deviennent totalement inactivées après un traitement de 1h à 60°C, à un pH 3 et à un pH 11. La souche *A. hydrophila* est très toxique pour l'organisme hôte où elle produit une aérolysine cytotoxique qui peut altérer les tissus. Elle cause ainsi des

infections de plaies, de diarrhées aiguës et de septicémies chez les immunodéficients (Mitchell & Rouf, 1983). Chez *Aeromonas*, on observe généralement la production de trois beta-lactamases : une céphalosporinase de classe C ; une oxacillinase de classe D et une imipénèmase de classe B.

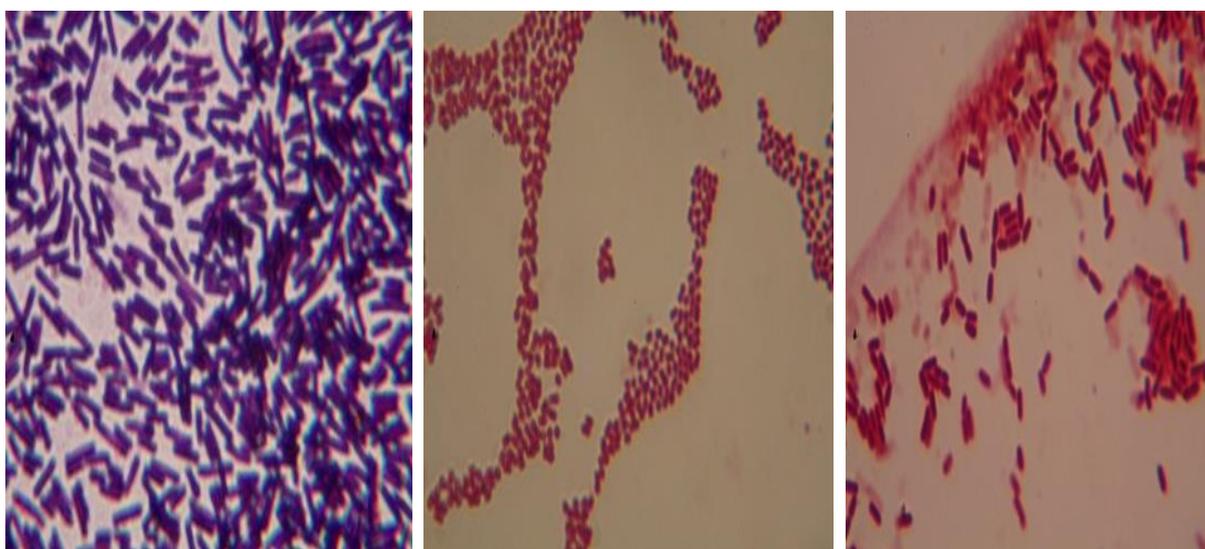
Les espèces du genre *Enterobacter* sont souvent rencontrées dans les unités de soins intensifs et sont à l'origine de 8,6 % des infections nosocomiales, selon les Centers for Disease Control and Prevention (CDC) des Etats-Unis (Boyce *et al.*, 2004).

Les résultats des autres souches à Gram positif ont été regroupés ensemble (tableau 14).

**Tableau 14** : les résultats des cultures à Gram positif sur milieux sélectifs

souches	Glucose	Lactose/Saccharose	H2S	Gaz	Mac Conkey	lactose
<b>BKSH03</b>	+	+	-	+	-	-
<b>BKSH05</b>	+	+	-	-	-	-
<b>BKSH06</b>	+	+	-	+	-	-
<b>BKSH08</b>	-	-	-	-	-	-
<b>BKSH11</b>	+	+	-	-	-	-

Les bactéries à Gram positif n'ont pas la capacité de pousser sur le milieu Mac Conkey. Cela a été confirmé par l'observation microscopique des isolats (figure 24).



**Figure 24** : les observations microscopiques (X1000) après coloration de Gram des souches BKSH03, BKSH06 et BKSH11 de gauche à droite respectivement.

Ces souches à Gram positif n'ont pas pu être identifiées par la galerie biochimique API20E destinée principalement à l'identification des bacilles à Gram négatif, mais leurs résultats

biochimiques obtenus à partir de l'ensemencement de la galerie API20E ont été pris en considération (Tableau 15).

**Tableau 15** : les résultats de la galerie API20E des souches à Gram positif

souches	BKSH 03	BKSH 05	BKSH 06	BKSH 08	BKSH 11
oxydase	+	+	-	-	-
catalase	+	+	-	+	+
ONPG	-	+	+	-	-
ADH	-	-	+	-	-
LDC	-	+	+	-	-
ODC	-	-	-	-	-
CIT	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-
TDA	-	-	+	-	-
IND	-	-	+	-	-
VP	-	-	-	-	-
GEL	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	-	+
MAN	+	+	+	+	+
INO	+	+	+	+	+
SOR	+	+	+	+	+
RHA	+	+	+	+	+
SAC	-	+	+	+	+
MEL	-	+	+	+	+
AMY	-	+	-	-	+
ARA	-	+	+	-	+
NO <sub>2</sub>	-	+	+	-	+
N <sub>2</sub>	+	-	-	-	-

Il y a une possibilité de prédire les genres auxquels appartiennent ces souches à Gram positif en s'appuyant sur des diagrammes de Bergey's manual.

- La souche BKSH06 représente des coques en amas catalase négative, oxydase négative, des critères applicables au genre *Streptococcus*.
- La souche BKSH05 représente des coccobacilles, catalase positive, oxydase positive, ces critères s'appliquent sur les coques appartenant au genre *Micrococcus*.
- La souche BKSH03 représente de gros bacilles, catalase positive, oxydase positive, où elle peut faire partie du genre *Bacillus*.

- La souche BKSH08 représente des bacilles, catalase positive, oxydase négative, ces critères s’appliquent à l’un des deux genres soient *Rhodococcus*, soit *Corynebacterium*.
- La souche BKSH11 représente des coccobacilles en paires, catalase positive, oxydase positive au genre *Micrococcus*.

La classification ne peut pas être effectuée jusqu’à l’espèce, cela nécessite des galeries biochimiques destinées aux bactéries à Gram positif ainsi que des tests génomiques qui doivent être effectués.

### **L’antibiogramme**

Un antibiogramme permet d’orienter le choix thérapeutique. Pour réaliser l’antibiogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne estensemencée à la surface d’une gélose Mueller-Hinton. Des disques pré-imprégnés d’une dose connue d’antibiotique sont déposés à la surface de la gélose. L’antibiotique diffuse à partir du disque en créant une zone d’inhibition. Les différents diamètres d’inhibition en les comparants avec les valeurs de références permettent de définir la catégorie de la souche étudiée. En s’appuyant sur ce principe la mesure de diamètre de chaque zone d’inhibition autour de chaque disque d’antibiotique a été évaluée par mm (tableau 16).

**Tableau 16** : les résultats de lecture d’antibiogramme des souches isolées

<b>Souche/ATB</b>	<b>AMX</b>	<b>PiP</b>	<b>CTX</b>	<b>P</b>	<b>IPM</b>	<b>AN</b>	<b>E</b>	<b>K</b>
<b>BKSH01'</b>	abs	/	/	/	21	21	abs	/
<b>BKSH02</b>	abs	15	abs	abs	21	18	abs	abs
<b>BKSH03</b>	Hs	Hs	Hs	abs	25	Hs	15	Hs
<b>BKSH04</b>	abs	/	abs	abs	28	22	abs	abs
<b>BKSH05</b>	19	Hs	11	abs	Hs	25	29	29
<b>BKSH06</b>	Hs	Hs	Hs	abs	24	Hs	19	/
<b>BKSH07</b>	17	abs	21	abs	25	22	abs	18
<b>BKSH08</b>	Hs	Hs	Hs	abs	Hs	Hs	abs	/
<b>BKSH09</b>	abs	15	22	abs	19	21	abs	19
<b>BKSH10</b>	abs	15	18	/	29	15	abs	18
<b>BKSH11</b>	19	13	2	abs	23	23	21	22

Souche/ATB	AMX	PiP	CTX	P	IPM	AN	E	K
<b>BKSH12</b>	abs	19	21	abs	29	21	13	19
<b>BKSH13</b>	15	17	21	/	22	14	abs	15
<b>BKSH14</b>	abs	abs	abs	abs	17	16	abs	abs
<b>BKSH15</b>	abs	abs	abs	abs	2	17	abs	abs
<b>BKSH16</b>	abs	2	abs	abs	28	24	abs	abs
<b>BKSH17</b>	abs	14	16	abs	24	16	abs	abs
<b>BKSH18</b>	abs	abs	2 3	abs	26	2	abs	18
<b>BKSH19</b>	abs	18	21	/	2	21	abs	16

**abs** : absence d'une zone inhibitrice / : l'antibiotique n'a pas été appliqué

**Hs** : hautement sensible

D'après les résultats obtenus et en comparant les valeurs mesurées avec les diamètres critiques (figure 21), on peut classer les souches bactériennes selon leurs diamètres d'inhibition pour chaque antibiotique en trois catégories bien définies (tableau 17).

**Tableau 17** : les profils de résistance des souches caractérisées

Souche/ATB	AMX	PIP	CTX	P	IPM	AN	E	K
<b>BKSH01'</b>	R	I	R	R	I	I	R	R
<b>BKSH02</b>	R	I	R	R	I	I	R	R
<b>BKSH03</b>	R	R	R	R	S	R	I	R
<b>BKSH04</b>	R	/	R	R	S	I	R	R
<b>BKSH05</b>	I	/	I	R	S	S	S	S
<b>BKSH06</b>	I	I	/	R	I	/	I	/
<b>BKSH07</b>	I	R	/	R	S	I	R	I
<b>BKSH08</b>	/	/	/	R	/	/	R	/
<b>BKSH09</b>	R	I	I	R	I	I	R	I
<b>BKSH10</b>	R	I	I	/	S	I	R	I
<b>BKSH11</b>	I	I	R	R	I	I	I	I
<b>BKSH12</b>	R	I	I	R	S	I	I	I
<b>BKSH13</b>	I	I	I	/	I	I	R	I
<b>BKSH14</b>	R	R	R	R	I	I	R	R

Souche/ATB	AMX	PIP	CTX	P	IPM	AN	E	K
BKSH15	R	R	R	R	R	I	R	R
BKSH16	R	R	R	R	S	I	R	R
BKSH17	R	I	I	R	I	I	R	R
BKSH18	R	R	I	R	S	R	R	I
BKSH18	R	I	I	/	R	I	R	I

R : la souche est Résistante S : la souche est Sensible I : la souche est Intermédiaire

/ : L'antibiotique n'a pas été appliqué

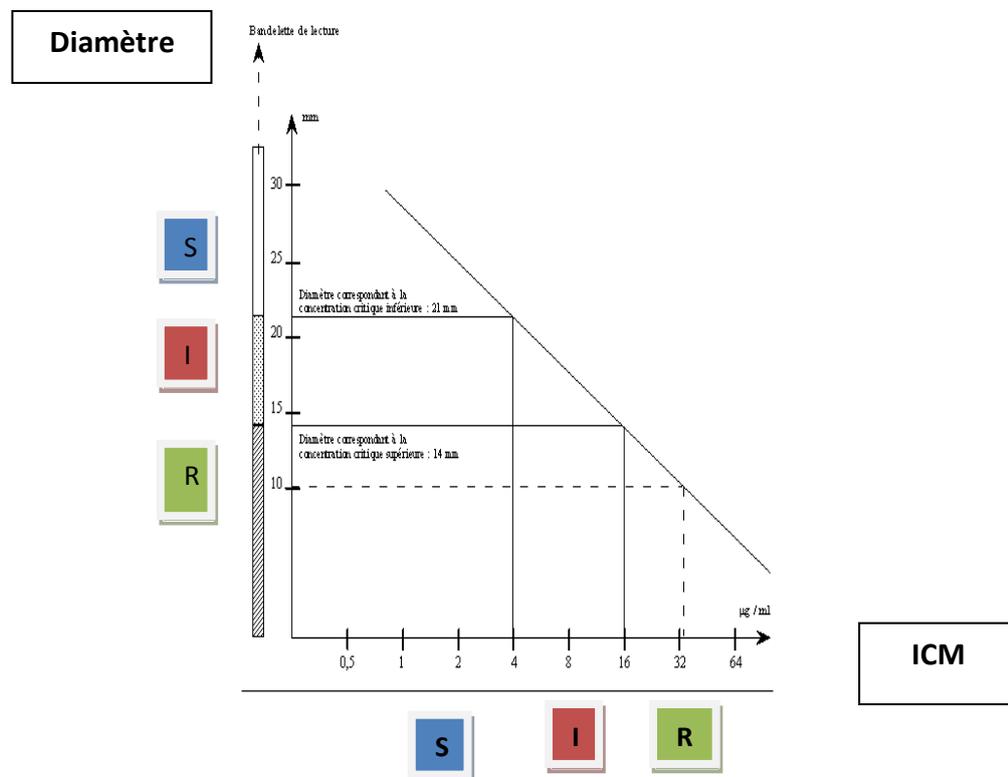


Figure 25: les catégories cliniques S, I, R selon les valeurs critiques  
(Vincent Jarlier DIU Mal Inf)

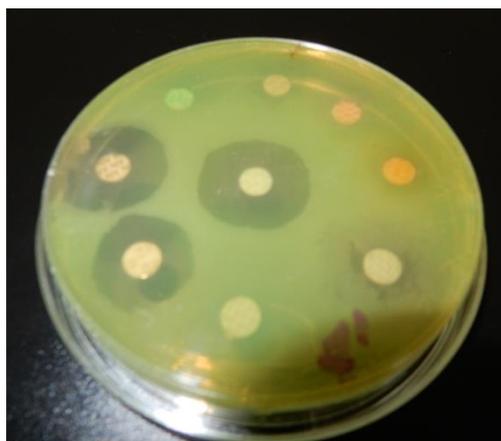
Trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité in vitro : Sensible (S), Résistante (R) et Intermédiaire (I).

Les souches catégorisées S sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte, c'est l'exemple de la souche BKSH17 qui a été identifiée comme *Enterobacter cloacae* qui selon les références s'est révélée sensible à l'amoxiciline (Figure 26), en plus d'autres souches du même genre comme *Enterobacter aerogene* qui est sensible aux aminopénicillines et/ou aux céphalosporines de première génération.



**Figure 26:** l'antibiogramme de la souche *Enterobacter cloacae* (BKSH17)

Les souches catégorisées R sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée prenant l'exemple de la souche BKSH01' qu'est identifiée comme *Pseudomonas aeruginosa*, une des bactéries opportunistes les plus résistantes aux antibiotiques a été décrite dans cette étude (Figure 27).

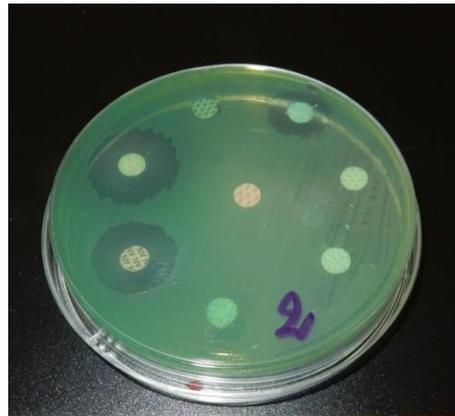


**Figure 27 :** antibiogramme de la souche *Pseudomonas aeruginosa* BKSH01'

D'après Berche et ses collaborateurs (1996), Cette espèce est naturellement résistante aux aminosides, colistine, pénicillines du groupe A (ampicilline et dérivés) et les céphalosporines de 1 ère et 2<sup>ème</sup> génération.

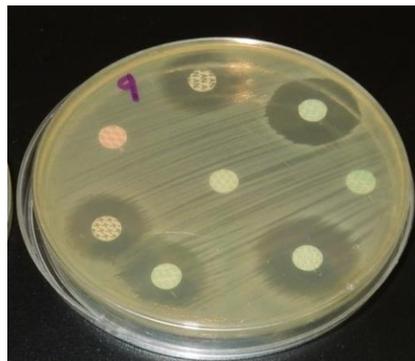
La souche BKSH02 qu'est identifiée comme *Aeromonas hydrophila* a présenté une résistance à l'amoxicilline (Figure 28). Plusieurs travaux antérieurs faits en Tunisie ont noté qu'*Aeromonas hydrophila* espèce ubiquiste, est parmi les genres n'appartenant pas aux entérobactéries les plus fréquents aussi bien en eaux marines qu'en eaux douces. *Aeromonas hydrophila* espèce aérobie prédominante a une résistance aux aminosides, aux céphalosporines, néomycines, oléandomycines. 90% des souches sont résistantes aux

céfoxitine. Les travaux de Lakhal (2003) et Dellali (2001) montrent que les souches d'*Aeromonas* isolées des: eaux, sédiments et bivalves, sont résistantes aux: aminosides, aux céphalosporines de deuxième génération et aux cyclines, 80% des souches sont résistantes au céfoxitine. Pour ces germes d'*Aeromonas*, la résistance aux bêta-lactamines est caractérisée par une grande hétérogénéité inter et intra spécifique (Freney *et al.*, 2000 ; Burgos *et al.*, 1990 ; Koehler *et al.*, 1993).



**Figure 28** : antibiogramme de la souche *Aeromonas hydrophila* BKSH02

Les souches catégorisées **I** sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. C'est l'exemple de la souche BKSH09 qui a été identifiée comme *Serratia liquefaciens*, elle a une certaine sensibilité aux bêta-lactamines : amoxiciline, pénicilline, cefotaxine mais plus ou moins légère.



**Figure 29** : antibiogramme de la souche *Serratia liquefacien* BKSH09

Les souches qui interviennent dans la catégorie **I** forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique. Parmi 10 antibiotiques testés sur *Pseudomonas Aeruginosa*, une sensibilité intermédiaire a été détectée avec la kanamycine, l'érythromycine, la gentamicine et le Sulphomethoxazole.

La souche BKSH18 qui a été identifiée comme *Klebsiella oxytoca* a montré aussi une sensibilité intermédiaire vis-à-vis les antibiotiques céphotaxime et la kanamycine.



**Figure 30 :** antibiogramme de la souche *Klebsiella oxytoca* BKSH18

Une étude multicentrique de la sensibilité de ces entérobactéries à la formulation amoxicilline-acide clavulanique a été réalisée en 1994 dans 59 établissements hospitaliers français. Les antibiotiques testés ont été les suivants : amoxicilline, céfalotine, ticarcilline, association amoxicilline-acide clavulanique, association ticarcilline-acide clavulanique, céfoxitine, céfotaxime et ceftazidime. Les résultats montrent une sensibilité à l'amoxicilline-acide clavulanique. En revanche, *K. oxytoca* a une résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération. (Elsevier Masson SAS, 1995).

Un cas particulier d'une multirésistance aux antibiotiques a été marqué avec la souche présumée *Aeromonas hydrophila* BKSH15 (figure 31).

**Figure 31 :** l'antibiogramme de la souche *Aeromonas hydrophila* BKSH15 multirésistante



*Conclusion*

*Et*

*Perspectives*

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude préliminaire portée sur la recherche des bactériophages lytiques à partir de différents échantillons d'eaux usées et boues mixtes a permis d'isoler 20 souches bactériennes prélevées de l'eau d'égout du CHU de Constantine. Ces bactéries ont été purifiées par plusieurs repiquages et utilisées par la suite pour le criblage de bactériophages. Une seule souche s'est révélée sensible à un phage suite à l'application du spot test et la technique des plages de lyse.

Selon les tests phénotypiques classiques qui se caractérisent par leur faible pouvoir de discrimination, la souche sensible au phage a été identifiée comme *Aeromonas hydrophila*. BKSHX. Une telle identification doit être accomplie par des tests génotypiques qui sont indisponibles dans les laboratoires de routine. Aussi l'identification du bactériophage lytique nécessite d'autres techniques à haute performance comme la microscopie électronique et le séquençage génomiques par RT-PCR.

Les résultats de cette étude révèlent d'abord la diversité des espèces bactériennes isolées et qui ont été identifiées approximativement : deux souches de *Serratia liquefaciens* BKSH09 et BKSH19, *Acinetobacter calcoaceticus* BKSH14, *Klebsiella oxytoca* BKSH18, trois autres souches d'*Aeromonas hydrophila* BKSH02, BKSH12, BKSH15, une souche de *Vibrio sp.* BKSH10, une souche d'*Enterobacter agglomerans* connu dans la classification actuelle par *Pantoea agglomerans*, et deux genre *Escherichia sp.* Le reste des souches a Gram positif non pas été identifiées jusqu'à l'espèce, cela exige des techniques particulières comme les galeries API spécifiques aux Gram positif.

La sensibilité vis-à-vis certains types d'antibiotiques a été démontrée par l'application d'un antibiogramme qui permet de définir le profil de résistance de la souche étudiée et selon lequel les bactéries ont été divisées en trois catégories différentes : résistantes, intermédiaires ou sensibles. Pour connaître le profil complet de chaque souche, autres antibiotiques de nouvelle génération doivent être testés sur chaque isolat.

Des études ultérieures vont être suivies où ces isolats vont être utilisés comme souches de criblage de bactériophages à partir d'autres prélèvements d'eaux usées et boues de différents endroits.

*Références*

*Bibliographiques*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abedon, ST. (2009).** Phage evolution and ecology. *Advances in Applied Microbiology* 67:1–45.
- Ackermann, H-W. (2007).** 5500 phages examined in the electron microscope, *Archive of Virology*. 152(2):227-43
- Ackermann, HW. (2009).** Phage Classification and Characterization. In Clokie, M. R. J., Kropinski, AM., & Walker. JM. (eds) *Bacteriophages*, Humana Press, 127–140.
- Ackermann, HW. (2011).** Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*, 32(2).
- Adams, M. (1961).** *Bakteriophage* (Contains a bibliography). Moscow, (Translated from English).
- Alemayehu, D., Casey P.G., Mc Auliffe O., Guinane, C.M., Martin J.G., Shanahan, F., Coffey, A., Ross, R.P. & Hill, C. (2012).** Bacteriophages MR299-2 and NH-4 Can Eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the Murine Lung and on Cystic Fibrosis Lung Airway Cells, *mBio Journal*, 3 (2).
- Ayres, PA. (1977).** Coliphages in sewage and the marine environment. In Skinner. FA. & Shewan. JM.eds. *Aquatic Microbiology*. Academic Press, New York. 275-298.
- Barfoot, R., Denham, S., Gyure, L.A., Hall, J.G., Hobbs, S.M. & Jackson, L.E. (1989).** « Some properties of dendritic macrophages from peripheral lymph ». *Immunology*, (68) 233–239.
- Baross, JA., Liston, J. & Morita, RY. (1978).** Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* and other *Vibrio* bacteriophages in marine samples. *Applied Environmental Microbiology*, 36: 492-499
- Baumont, S., Camard, J-P., Lefranc, A. & Franconi, A. (2004).** *Réutilisation des eaux usées: risques sanitaires et faisabilité en Île-de-France*. Rapport ORS, 220p.
- Bousseboua, H. (2003).** Cours de Microbiologie Générale, Université Mentouri, Constantine (Algérie).

- Boyce, T. G., Gruber, W. C., & Fisher, R. G. (2004).** Enterobacter. In R. D. Feigin, Cherry, Demmler & Kaplan (Eds.), *Textbook of pediatric infectious diseases* (5th edition, pp. 1427-1431). PA, USA: Saunders.
- Braly, J-P. (2015).** Technologie. In mensuel n°495, la page 60.
- Breitbart, M. & Rohwer, F. (2005).** Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in Microbiology*. 13:278-284.
- Brissette, R. & Goldstein, NI. (2007).** The use of phage display peptide libraries for basic and translational research. *Methods in Molecular Biology*, 383: 203-13.
- Bruttin, A. & Brüßow, H. (2005).** Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7): 2874–2878.
- Carol, P. (2013).** Phage renaissance: new hope against antibiotic resistance. *Environmental Health Perspectives*. 121:A49-A53.
- Chaina, PN. (1965).** Some recent studies of marine bacteriophages. *General Microbiology* 41: XXV
- Choi, J., MeherKotay, S. & Goel, R. (2011).** Bacteriophage-based biocontrol of biological sludge bulking in waste water. *Bioengineered Bugs* 2(4): 214–217.
- Chung & Sobsey M.D. (1993).** Comparative survival of indicator viruses and enteric viruses in sea water and sediment. *Water Science and Technology*, 27, 425-429.
- Courtault, JR. (2014).** Place de la phagothérapie dans le traitement des infections humaines bactériennes : intérêt, enjeux et limites. *Pharmaceutical sciences*. <dumas-01020724>
- Cubbage, C.P., Gannon, J.J., Cochran, K.W. & Williams, G.W. (1979).** Loss of infectivity of *Poliovirus* I in river water under simulated field conditions. *Water Reserch*, 13,1091-1099.

- D'Herelle, F. (1917).** Sur un microbe invisible antagonistic des bacilles dysenterique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. Paris 165 : 373-375.
- Debarbieux, L., Leduc, D., Maura, D., Morello, E., Criscuolo, A., Grossi, O., Balloy, V. & Touqui, L. (2010).** "Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections", *The journal of infectious diseases*, 201(7): 1096–1104.
- Dublanchet, A. & Patey, O.(2011).** La phagothérapie : passé et avenir (faits nouveaux et procédure(s) pour une réhabilitation). *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée*. In *mBio journal*.
- Eayre, CG., Concelmo, DE. & Bartz, JA. (1990).** Control of soft root *Erwiniawith* bacteriophages. *Phytopathology* 80:994–999.
- El Moukhlis, A. (2011).** Phagothérapie passé et avenir [Nouveaux faits et procédures pour une réhabilitation]. Thèses de pharmacie: D3. © Université Mohammed V- Rabat 2014 DSpace software.
- Eliava Phage Therapy Center. (2009).**URL: <http://www.mrsaphages.com/phage-applications/>. Privacy Policy. Georgia Eliava Phages 3, Gotua Street, Tbilisi 0160, Republic of Georgia. (Consulté en Avril 2015)
- Fischetti, V. A. (2005).** Bacteriophagelytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends in Microbiology*, 13 (10): 491-6.
- Fruciano, E. (2011).** Phagothérapie : *EncyclopædiaUniversalis*[en ligne]. URL : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/phagotherapie/> (Consulté le 5 juin 2015).
- García, P., Martínez, B., Rodríguez, L. & Rodríguez, A. (2010).** Synergy between the phageendolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk.*International Journal of Food Microbiology*, Issue 3, Pages 151-155.
- Gassilloud, B., Schwartzbrod, L. & Gantzer, C. (2003).** Presence of Viral Genomes in Mineral Water: a Sufficient Condition to Assume Infectious Risk? *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7):3965-3969.

- Gerba, CP. & Schaiberger, GE. (1975).** Aggregation as a factor in loss of viral titer in seawater. *Water Research*, 9:567-571.
- Gildemeister, E. M. & Watanabe, K. (1931).** *Zentralblatt fur Bakteriologie*, Orig. I, t. 122, p. 556
- Gill, JJ. & Hyman, P. (2010).** Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11:2-14.
- Gill, JJ., Sabour, PM., Leslie, KE. & Griffiths, MW. (2006).** Bovine whey proteins inhibit the interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K. *Journal of Applied Microbiology*, 101:377-386.
- Golzar, H., Sukumar, S., Mojibur Rahman, M., Joydev, K.S. & Al Mamun, A. (2013).** Isolation, Identification and Antibiogram Study of *Pseudomonas Aeruginosa* from Cattle in Bangladesh. *Journal of Veterinary Advances*, 180-185
- Goodridge, L.D. & Bisha, B. (2011).** Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods, *Bacteriophage*, 1, 130–137.
- Górski, A., Miedzybrodzki, R., Borysowski, J., Dabrowska, K., Wierzbicki, P. & Ohams, M. (2012).** « Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy », *Advances in virus research*, 83, 41–71.
- Grundling, A., Manson, MD. & Young R. (2001).** Holins kill without warning. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 98 (16): 9348-52.
- Gwenaëlle, P-C. (2010).** Rétention de virus en ultrafiltration: protocole de caractérisation. Génie des procédés et de l'environnement. L'Université de Toulouse III - Paul Sabatier.
- Hagens, S. & Offerhaus, ML. (2008).** Bacteriophages - new weapons for food safety. *Food Technology*, 62:46-54.
- Hall, R.M. & Sobsey, M.D. (1993).** Inactivation of Hepatitis A virus and MS2 by ozone and ozone-hydrogen peroxyde in buffered water. *Water Science and Technology*, 27, 371-378.

**Han, JE., Kim, JH., Hwang, SY., Choresca, CH Jr., Shin, SP., Jun, JW., Chai, JY., Park, YH. & Park, SC. (2013).** Isolation and characterization of a *Myoviridae* bacteriophage against *Staphylococcus aureus* isolated from dairy cows with mastitis. *Research in Veterinary Science*. 95:758-763.

**Haslay, C. & Leclerc, H. (1993).** *Microbiologie des eaux d'alimentation*. Editeur : éditions Technique et Documentation – Lavoisier.

**Hawkins, C., Harper, D., Burch, D., Anggard, E. & Soothill, J. (2010).** Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: a before/after clinical trial, *Veterinary microbiology*, 146 (3-4): 309–313.

**Hidaka, T. (1973).** Characterization of marine bacteriophages newly isolated. *Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University*, 22 (1), 47-61.

**Housby, J. N. & Mann, N. H. (2009).** Phage therapy. *Drug Discovery Today*, 14:536-540.

**Hsieh, SE., Lo, HH., Chen, ST., Lee, MC. & Tseng, YH. (2011).** Wide host range and strong lytic activity of *Staphylococcus aureus* lytic phage Stau2. *Applied and Environmental Microbiology*. 77:756-761.

**Institut Pasteur. (2014).** Brève histoire de la phagothérapie. [www.pasteur.fr/fr/recherche/microbiologie](http://www.pasteur.fr/fr/recherche/microbiologie)

**Jofre, J., Bosch, A., Lucena, F., Girones, R. & Tartera, C. (1986).** Evaluation of *Bacteroides fragilis* as indicators of the virological quality of water. *Water Science & Technology*, (18)167-173.

**Kai, S., Watanabe, S., Furuse, K. & Osawa, A. (1985).** Bacteroides bacteriophages isolated from human faeces. *Microbiology and Immunology*, 29:895-899.

**Kalmansom, G. & Bronfenbrenner, J. (1942).** Evidence of serological heterogeneity of polyvalent pure line bacteriophages. *Immunology* 45:13–15

**Kalmansom, G. & Bronfenbrenner, J. (1942).** Evidence of serological heterogeneity of polyvalent pure line bacteriophages. *Journal of Immunology*, 45: 13–15

**Kaneko, J., Narita-Yamada, S., Wakabayashi, Y. & Kamio, Y. (2009).** Identification of ORF636 in phage phiSLT carrying Panton-Valentine leukocidin genes, acting as an adhesion protein for a poly (glycerophosphate) chain of lipoteichoic acid on the cell surface of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 191:4674-4680.

**Khalifa, L., Brosh, Y., Gelman, D., Copenhagen-Glazer, S., Beyth, S., Poradosu-Cohen, R., Que, Y-A., Beyth, N. & Hazan, R. (2015).** Targeting *Enterococcus faecalis* biofilms with phage therapy. *Applied and Environmental Microbiology*, 81:2696–2705.

**Khenkine, J. (2009).** La phagothérapie: virus contre bactéries. URL: [http://www.allodocteurs.fr/actualite-sante-la-phagothérapie-virus-contre-bacteries\\_1168.html](http://www.allodocteurs.fr/actualite-sante-la-phagothérapie-virus-contre-bacteries_1168.html). (Consulté en Avril 2015).

**Korhonen, H., Marnila, P. & Gill, HS. (2000).** Milk immunoglobulins and complement factors. *British Journal of Nutrition*, 84:75-80.

**Kutter, E. & Sulakvelidze, A. (2005).** Phage therapy in humans. *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press, 381-436

**Lehours, P., Vale, F.F., Bjursell M.K., Melefors, O., Advani, R., Glavas, S., Guegueniat, J., Gontier, E., Lacomme, S., Alves Matos, A., Ménard, A., Mégraud, F., Engstrand, L. & Andersson, A.F. (2011).** Genome sequencing reveals a phage in *Helicobacter pylori*. *MBio Journal*, 2: e00239-11.

**Logan, K.B., Rees, GE., Seeley, ND. & Primrose, SB. (1980).** Rapid concentration of bacteriophages from large volumes of fresh water: Evaluation of positively charged, microporous filters. *Virological Methods*, 1: 87–97.

**Loimarante, V., Carlén, A., Olsson, J., Tenovuo, J., Syväoja, EL. & Korhonen, H. (1998).** Concentrated bovine colostrum whey proteins from *Streptococcus mutants/Strep. sobrinus* immunized cows inhibit the adherence of *Streptococcus mutants* and promote the aggregation of mutants streptococci. *Journal of Dairy Research*, 65 (4): 599-607.

**Lu, T. K. & Koeris M. S. (2011).** The next generation of bacteriophage therapy. *Current Opinion in Microbiology*, 14:524-531.

**Madigan, MT. & Martinko, JM. (2007).** *Brock Biologie des micro-organismes*. Onzième édition. Université de Carbondale de l'Illinois du Sud. Traduction française coordonnée par Daniel Prieur et publiée par Pearson Education France.

**Markoishvili, K., Tsitlanadze, G., Katsarava, R., Morris, J. G., Jr. & Sulakvelidze, A. (2002).** A novel sustained-release matrix based on biodegradable polyester amides and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. *International Journal of Dermatology*, 41:453–458.

**Matsui, S. & Nakazawa, T. (1994).** Clinical bacteriology and empiric therapy for hospital-acquired pneumonia in the elderly at a national leprosarium. *Japan Journal Thorax Disease*; 32: 851–5.

**Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., Wakiguchi, H. & Imai, S. (2005).** Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *Infection and Chemotherapy*, 11 (5): 211-9.

**Merabishvili, M., Pirnay, J-P., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M. & Lashkhi, N. (2009).** Quality-Controlled Small-Scale Production of a Well-Defined Bacteriophage Cocktail for Use in Human Clinical Trials. *PLoS ONE* 4(3): 4944.

**Merch-Sundermann, V. & Wundt, W. (1987).** Bacteriologic quality of water from the Rhine and its tributaries in the Rhine-Neckar region. I. Bacterial count and Enterobacteriaceae of the current status of pollution. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene—Series B, Umwelthygiene, Krankenhaushygiene, Arbeitshygiene, Preventive*, 184: 459–69.

**Merril, C, R., Scholl, D. & Adhya, S. (2006).** Phage therapy. The bacteriophages. *Oxford University Press, USA*. p. 725-74.

**Michael, J.G & Kuwata, C.J. (1969).** « Contribution of endotoxin to antibody formation against T2 phage », *Nature*, 222:684-685.

**Midelfart, J., Midelfart, A & Bevanger, L. (1996).** Microbial contamination of contact lens cases among medical students. *Contact Lens Association of Ophthalmologists*; 22: 21–4.

- Minikh O., Tolba M., Brovko L. Y. & Griffiths M. W. (2010).** "Bacteriophage-based biosorbents coupled with bioluminescent ATP assay for rapid concentration and detection of *Escherichia coli*", *Journal of microbiological methods*, 82(2) : 177–183.
- Mitchell, S. Chow & Rouf, M. A. (1983).** Isolation and Partial Characterization of Two *Aeromonashydrophila* Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(5): 1670–1676.
- Morello, E., Sausseureau, E., Maura, D., Huerre, M., Touqui, L. & Debarbieux, L. (2011).** "Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention", *PLoS ONE*, 6(2).
- Mullan, WMA. (2001).** Isolation and purification of bacteriophages. *Dairy science food technology*. Available from: <http://www.dairyscience.info/index.php/isolation-and-purification-of-bacteriophages.html>. (Consulté en Mai 2015)
- Nelson, D., Loomis, L. & Fischetti, VA. (2001).** Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (7): P 4107-4112
- Nester, EW., Anderson, DG., Robert, CE., Pearsall, NN. & Hurley, D. (2004).** A human prospective of microbiology. New York: McGraw Hill Book Companies. New York.
- Niemi, M. (1976).** Survival of *Escherichia coli* phage T7 in different water types. *Water Research*. 10: 751-755.
- O'Flaherty, S., Coffey, A., Meaney, WJ., Fitzgerald, GF. & Ross, RP. (2005).** Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 274-279.
- O'Flaherty, S., Ross, RP., Meaney, W., Fitzgerald, GF., Elbreki, MF. & Coffey, A. (2005).** Potential of the polyvalent anti-*Staphylococcus* bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:1836-1842.

- Pantucek, R., Rosypalova, A., Doskar, J., Kailerova, J., Ruzickova, V., Borecka, P., Snopkova S., Horvath, R., Gotz, F. & Rosypal, S. (1998).** The polyvalent staphylococcal phage phi812: its host-range mutants and related phages. *Virology*. 246: 241-252.
- Prescott, L.M., Sherwood, L.M. & Woolverton, C.J. (2010).** *Microbiologie*. 3<sup>ème</sup> édition. De Boeck. Page 446.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. (2002).** *Microbiology*. 5<sup>th</sup> édition. McGraw-Hill Higher Education.
- Primrose, S.B. & Day, M. (1977).** Rapid concentration of bacteriophages from aquatic habitats. *Applied Bacteriology*, 42:417-421.
- Reardon, S. (2014).** Phage therapy gets revitalized: The rise of antibiotic resistance rekindles interest in a century-old virus treatment. *Nature*, 510: 15-16, doi: 10.1038/510015a
- Rodier J, (2009).** *L'analyse de l'eau*, 9<sup>ème</sup> édition, Dunond, Paris.
- Rohwer, F., Prangishvili, D. & Lindell, D. (2009).** Roles of viruses in the environment. *Environmental Microbiology*, 11(11): 2771–2774.
- Rolston, K., Guan, Z., Bodey, G.P. & Elting, L. (1985).** *Acinetobacter calcoaceticus* septicemia in patients with cancer. *Southern Medical*, 78 (6):647-51
- Sallal, A.K. (1987).** Enumeration of pathogenic bacteria from sewage sludge in Kuwait. *Microbios*, 52: 7–16.
- Saussereau, E. (2012).** Utilisation des bactériophages comme thérapie lors d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* dans le cadre de la mucoviscidose : efficacité et innocuité. *Pulmonology and respiratory tract*. Université Pierre et Marie Curie - Paris V.
- Scallan, E., M-Hoekstra, R., J-Angulo, F., V-Tauxe, R., Widdowson, M-A., L-Roy, S., L-Jones, J. & M-Griffin, P. (2011).** Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1):7–17.
- Scheuerman, P.R., Farrah, S.R. & Bitton, G. (1987).** Reduction of microbiological indicators and viruses in a cypress strand. *Water Science and Technology*, (19):539-546.

- Schuch, R., Nelson, D. & Fischetti, VA. (2002).** A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature Biotechnology*, 418: 884-8.
- Schwartzbrod, L. (1991).** Virologie des milieux hydriques. Edition Lavoisier, Paris.
- Serruys-Schoutens, E., Rost, F. & Depre, G. A. (1984).** Nosocomial epidemic of *Serratia liquefaciens* urinary tract infection after cytometry. *Clinical Microbiology*, 3: 316-7.
- Sharma, M., Patel, JR., Conway, WS., Ferguson, S. & Sulakvelidze, A. (2009).** Effectiveness of bacteriophages in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut cantaloupes and lettuce. *Food Protection*, 72(7):1481-1485.
- Smartt, AE., Xu, T., Jegier, P., Carswell, JJ., Blount, SA., Sayler, GS. & Ripp, S. (2012).** Pathogen detection using engineered bacteriophages. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, volume 402, issue 10, pp 3127-3146.
- Smith, GP. (1985).** Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228 : 1315-7.
- Souriau, C., Hua, T., Lefranc, M. & Weill, M. (1998).** Présentation à la surface de phages filamenteux : Les multiples applications du phage display. *Medicine/sciences*, 14: 300-9.
- Sulakvelidze, A. & Kutter, E. (2004).** "Bacteriophage therapy in humans". In Kutter, E. & Sulakvelidze, A. (eds) *Bacteriophages*, CRC Press.
- Sulakvelidze, A. (2011).** Safety by nature: potential bacteriophage applications. *Microbe* 6(3):122-126 Available: <http://goo.gl/mGmC3> (Consulté en juin 2015).
- Sulakvelidze, A. (2011).** Safety by nature: potential bacteriophage applications. *Microbe*, 6(3):122-126.
- Sulakvelidze, A. (2013).** Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93: 3137-3146.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. & J. Glenn Morris Jr. (2001).** Minireview: bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3):649-659.

- 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*. 36(2): 000–000
- Tanaka, H., Negishi, H., & Maeda, H. (1990).** Control of tobacco bacterial wilt by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* M4S and its bacteriophage. *Phytopathological Society Journal Japan*, 56:243-246.
- Trojet, S. (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, 178;p 11-12-35.
- Twort, F.W. (1915).** An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet* 2: 1241-1243.
- Uchiyama, J., Takeuchi, H., Kato, S., Gamoh, K., Takemura-Uchiyama, I., Ujihara, T., Daibata, M. & Matsuzaki, S. (2013).** Characterization of *Helicobacter pylori* bacteriophage KHP30. *Applied and Environmental Microbiology*; 79: 3176-84.
- Vandersteegen, K., Mattheus, W., Ceysens, P.-J., Bilocq, F., De Vos, D., Pirnay, J.-P., Noben, J.-P., Merabishvili, M., Lipinska, U., Hermans, K. & Lavigne, R. (2011).** Microbiological and molecular assessment of bacteriophage ISP for the control of *Staphylococcus aureus*. *Public Library of Science ONE*. 6: e24418.
- Vonlanthen, A. (2011).** Dossier – Bactériophages (phages) : le futur des antibiotiques? *In* Dossiers, Podcast Science. URL : <http://www.podcastscience.fm/dossiers/2011/03/11/dossier-bacteriophages-phages-le-futur-des-antibiotiques/>. (Consulté en Mai 2015)
- Wang, I. N. (2006).** Lysis timing and bacteriophage fitness. *Genetics*, 172 (1): 17-26.
- Wommack, K.E., Colwell, R.R. (2000).** Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. (64); p 69-114.
- Wright, A., Hawkins, C.H., Anggard E.E. & Harper, D.R. (2009).** A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant

*Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences* ; 34; 349–57.

**Yahyam, T., Galsomies, L., Gerba, C.P. & Bales, R.C. (1993).** Survival of bacteriophages MS2 and PRD1 in ground water. *Water Science and Technology*, 27, 409-412.

**Young, I., Wang, I. & Roof, WD. (2000).** Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends in Microbiology*, 8 (3): 120-8.

**Zhang, H., Bao, H., Billington, C., Hudson, JA. & Wang, R. (2012).** Isolation and lytic activity of the *Listeria* bacteriophage endolysin LysZ5 against *Listeria monocytogenes* in soya milk. *Food microbiology*, 31(1): 133–136.

**Zhang, Y. & Hu, Z. (2013).** Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with bacteriophages and chlorine. *Biotechnology and Bioengineering*, 110 (1):286–295.

*Annexes*

## ANNEXE 1

## 1. MILIEUX DE CULTURE (g/L)

**Bouillon Nutritif**

Tryptone .....	10g
Extrait de viande .....	5g
Chlorure de sodium.....	5g

pH : 7,2

**Gélose Nutritive**

Extrait de viande.....	1g
Extrait de levure.....	1g
Peptone .....	5g
Agar.....	15g

pH : 7,4

**Luria Bertani Solide**

Peptone (tryptone).....	10g
Extrait de levure .....	5g
NaCl.....	5g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,36g
Agar .....	15g

pH : 7,2

**Luria (bouillon)**

Peptone .....	10g
Extrait de levure .....	5g
NaCl.....	5g
CaCl <sub>2</sub> .....	0.36g

pH : 7,2

**Mueller-Hinton**

Infusion de viande de bœuf .....	300ml
Peptone de caséine.....	17,5g
Amidon de maïs.....	15g
Agar.....	15g

pH : 7,4

**Mac Conkey**

Peptone.....	20g
Lactose.....	10g
Sel biliaire.....	1,5g
Cristal violet.....	0,001g
Rouge neutre.....	0,05g
Chlorure de sodium .....	5,0g
Agar.....	15g

pH : 7,2

## 2. TAMPON

**Tampon SM**

5M NaCl .....	20 ml
1M MgSO <sub>4</sub> .....	8,5 ml
1M Tris HCl pH7.4.....	50 ml
2% gélatine.....	5 ml
Eau distillée.....	1L

pH : 7,0

## 3. REACTIFS

• **TDA**

Perchlorure de fer .....	3.4g
H <sub>2</sub> O.....	100ml

• **James**

R1: HCl 1N .....	100 ml
R2: Compound J 2183.....	0,66 g

**Nitrate réductase (NR)**

• **Nit 1**

Acide sulfanilique.....0,4 g  
 Acidacétique.....30g  
 H<sub>2</sub>O.....70ml

• **Nit 2**

AN,N-dimethyl-1-naphthylamine..... 0,6g  
 Acidacétique.....30g  
 H<sub>2</sub>O.....70ml

**Voges-Proskauer**

• **VP1**

Hydroxydede potassium .....40 g

H<sub>2</sub>O .....100ml

• **VP2**

α-Naphtol.....6 g  
 Ethanol .....100ml

• **Kovacs**

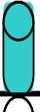
p-dimethyl aminobenzaldéhyde.....7g  
 Alcool amylique.....75ml  
 Acide chlorhydrique concentré.....20ml

• **Solution de l'eau oxygénée à 10%**

Eau oxygénée à 110 volumes.....0,5ml  
 Eau distillée.....14,5ml

## ANNEXE 2

## Tableau de lecture de la galerie Api 20E

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E						
Microtube	Substrat :	Caractère recherché	Révéléateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Béta galactosidase		Lecture directe		
<u>ADH</u> <u>LDC</u> <u>ODC</u>	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Ornithine Décarboxylase	Rouge de phénol	Lecture directe		
<u>CIT</u>	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe		
<u>H<sub>2</sub>S</u>	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Fe III	Lecture directe		
<u>URÉ</u>	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe		 
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase		Lecture indirecte		
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		Lecture indirecte	 	 
<u>VP</u>	Pyruvate de sodium	production d'acétoïne (3-hydroxybutanone)		Lecture indirecte		 
<u>GEL</u>	Gélatine	gélatinase	Particules de charbon	Lecture directe		
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> / N <sub>2</sub>	Nitrates (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	Nitrate réductase		Lecture indirecte		

*Résumés*

## ملخص

العائيات أو كما تسمى الفيروسات البكتيرية، من أكثر الكائنات شيوعا في الارض. خاصة في الأماكن التي تحتوي على عائل بكتيري كالتربة و مياه الصرف الصحية.

الهدف من هذه الدراسة هو عزل العائيات و تحديد البكتيريا العائلة لها انطلاقا من عينات مياه ملوثة متعددة المصدر. من أجل اختبار حساسية عشرون عزلة بكتيرية لمعلق العائيات اعتمدنا على تقنيتين: اختبار النقطة و اختبار المناطق الرائقة و كذا تم تشخيص هذه العزلات بالاعتماد على الاختبارات الايضية و المظهرية (API20E) وكذلك اختبار حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية (antibiogramme).

من خلال النتائج المتحصل عليها هناك مزرعة بكتيرية وحيدة عائلة للفاج المعزول، وقد شخصت مبدئيا على أنها *Aeromonas sp. BKSHX* حيث قدر عدد المناطق الرائقة على طبق بتري بـ 130 إلى 616 PFU/ml. و قد تم تقطيع المناطق الرائقة و حفظها في محلول SM الفيزيولوجي عند 4°م.

بينت النتائج أن 75% من العزلات البكتيرية سالبة الغرام حيث تم تشخيصها كما يلي *BKSH09* و *BKSH19* على أنها *Serratia liquefaciens*، *BKSH14* على أنها *Acenitobacter calcoaceticus* و *BKSH18* على أنها *Klebsiella oxytoca* هذه المجموعة تنتمي إلى عائلة *Enterobacteriaceae*

تم تشخيص بقية العزلات البكتيرية كالتالي ' *BKSH01* ، *BKSH12* ، *BKSH15* على أنها *Aeromonas hydrophila* و *BKSH02* على أنها *Pseudomonas aeruginosa* ، *BKSH16* على أنها *Escherichia sp. H2S+*، على أنها *BKSH07* ، *Escherichia* ، *BKSH10* على أنها *Vibrio sp.* ، *BKSH13* على أنها *Enterobacter agglomerans* و *BKSH17* على أنها *Enterobacter cloacae*

بالإضافة اختبار حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية سمح لنا بفصل العزلات , من ذات المقاومة العالية ضد المضادات الحيوية مثل *BKSH15* *Aeromonashydrophila* و أخرى ذات حساسية المفرطة مثل *BKSH05* إلى ذات الحساسية المتوسطة مثل *BKSH09* *Serratia liquefaciens*

هذه التقنيات يجب ان ترفق بأخرى مثل استعمال المجهر الإلكتروني و تقنيات البيولوجيا الجزيئية من اجل الكشف عن البكتريوفاج و كذا معيله البكتيري بدقة

**الكلمات المفتاحية :** البكتريوفاج ، مياه الصرف الصحي ، مستشفى قسنطينة ، الوحل ، اختبار النقطة ، المناطق الرائقة ، *Serratia* ، *Klebsiella oxytoca* ، *Aeromonas hydrophila* ، *Antibiogramme* ، *API20E* ، *galerie* ، *liquefaciens*

---

## RESUME

Les phages, représentent les organismes les plus nombreux de la planète et se concentrent dans le sol et les eaux usées.

L'objectif de cette étude était l'isolement de bactériophages et leurs bactéries hôtes à partir des eaux d'égouts. La sensibilité des vingt isolats à la suspension phagique a été testée par deux techniques : le spot test et les plages de lyse, ainsi que leur identification a portée sur une caractérisation phénotypique (API 20E et milieux sélectifs, résistance aux ATB).

D'après les résultats obtenus, une seule souche BKSHX présumée *Aeromonas* sp. s'est révélée sensible au phage. Le nombre de plage de lyse était de 130 à 616 UFP/ml. Les plages ont été découpées et conservées dans le tampon SM à 4°C.

Les résultats des tests phénotypiques montrent que 75% des isolats sont des Gram négatif, identifiés comme : *Serratia liquefaciens* pour BKSH09 et BKSH19, *Acinetobacter calcoaceticus* pour BKSH14 et *Klebsiella oxytoca* pour BKSH18 qui font partie des *Enterobacteriaceae*. Les autres souches à Gram négatif ont été identifiées comme : *Aeromonas hydrophila* pour BKSH01', BKSH12, BKSH15, *Pseudomonas aeruginosa* BKSH02, *Escherichia sp. H2S+* BKSH16, *Escherichia sp.* BKSH07, *Vibrio sp.* BKSH10, *Enterobacter agglomerans* BKSH13 et *Enterobacter cloacae*. BKSH17. Selon les résultats de l'antibiogramme des souches hautement résistantes ont été mises en évidence comme la souche *Aeromonas hydrophila* BKSH15 d'autres souches ont été sensibles aux ATB comme la souche BKSH05. Des souches ont une sensibilité intermédiaire aux ATB notamment la souche *Serratia liquefaciens* BKSH09.

Toutes ces techniques doivent être couplées par d'autres méthodes comme la microscopie électronique et les techniques de la biologie moléculaire pour identifier le bactériophage ainsi que leur bactérie hôte avec précision.

**Les mots clés :** Bactériophage, eaux d'égout, CHU, spot test, plages de lyse, galerie API20E, antibiogramme, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella oxytoca*.

## ABSTRACT

Phages represent the most numerous organisms on the planet and are concentrated in the soil and wastewater.

The objective of this study was the isolation of bacteriophages and their bacterial hosts from sewage. The sensitivity of the twenty isolates to the phage suspension was tested by two techniques: the spot test and the plaque assay, as well as their identification was related to a phenotypical characterization (API 20E and selective media, resistance to the ATB).

According the results achieved, a single strain BKSHX identified as *Aeromonas* sp. proved sensitive to phage. The number of plaques of lysis was 130 to 616 PFU/ml. The plaques have been cut and kept in SM buffer at 4 ° C.

Phenotypic test results show that 75% of isolates are gram-negative, identified as: *Serratia liquefaciens* for BKSH09 and BKSH19, *Acinetobacter calcoaceticus* for BKSH14 and *Klebsiella oxytoca* for BKSH18 belonging to the *Enterobacteriaceae* family. Other gram-negative strains were identified as: *Aeromonas hydrophila* for BKSH01', BKSH12, BKSH15, *Pseudomonas aeruginosa* BKSH02, *Escherichia sp. H2S +* BKSH16, *Escherichia sp.* BKSH07, *Vibrio sp.* BKSH10, *Enterobacter agglomerans* BKSH13 and *Enterobacter cloacae* BKSH17.

According to the results of the results of the antibiogramme of the highly resistant strains have been highlighted as strain *Aeromonas hydrophila* BKSH15 of other strains were sensitive to the ATB as the BKSH05 strain. Strains have intermediate sensitivity to the particular strain ATB *Serratia liquefaciens* BKSH09.

All of these techniques should be coupled by other methods such as electron microscopy and molecular biology techniques to identify the bacteriophage, as well as their host accurately bacterium.

**Key words:** Bacteriophage, sewage, CHU, spot test, plaque essay, Gallery API20E, sensitivity, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella oxytoca*.

**Thème** : Recherche de bactériophages lytiques dans les eaux usées et boues. Identification de leurs bactéries hôtes

**Nature du diplôme** : Master

**Domaine** : Science de la Nature et de la Vie

**Filière** : Science Biologiques

**Spécialité** : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

### Résumé

Les phages, représentent les organismes les plus nombreux de la planète où ils se concentrent dans le sol et les eaux usées.

L'objectif de cette étude était l'isolement de bactériophages et leurs bactéries hôtes à partir des eaux d'égouts. La sensibilité des vingt isolats à la suspension phagique a été testée par deux techniques : le spot test et les plages de lyse, ainsi que leur identification a porté sur une caractérisation phénotypique (API 20E et milieux sélectifs, résistance aux ATB).

D'après les résultats obtenus, une seule souche BKSHX présumée *Aeromonas* sp. s'est révélée sensible au phage. Le nombre de plage de lyse était de 130 à 616 UFP/ml. Les plages ont été découpées et conservées dans le tampon SM à 4°C.

Les résultats des tests phénotypiques montrent que 75% des isolats sont des Gram négatif, identifiés comme : *Serratia liquefaciens* pour BKSH09 et BKSH19, *Acinetobacter calcoaceticus* pour BKSH14 et *Klebsiella oxytoca* pour BKSH18 qui font partie des *Enterobacteriaceae*. Les autres souches à Gram négatif ont été identifiées comme : *Aeromonas hydrophila* pour BKSH01', BKSH12, BKSH15, *Pseudomonas aeruginosa* BKSH02, *Escherichia sp. H2S+* BKSH16, *Escherichia sp.* BKSH07, *Vibrio sp.* BKSH10, *Enterobacter agglomerans* BKSH13 et *Enterobacter cloacae*. BKSH17. Selon les résultats de l'antibiogramme des souches hautement résistantes ont été mises en évidence comme la souche *Aeromonas hydrophila* BKSH15 d'autres souches ont été sensibles aux ATB comme la souche BKSH05. Des souches ont une sensibilité intermédiaire aux ATB notamment la souche *Serratia liquefaciens* BKSH09.

Toutes ces techniques doivent être couplées par d'autres méthodes comme la microscopie électronique et les techniques de la biologie moléculaire pour identifier le bactériophage ainsi que leurs hôtes avec précision.

**Mots clés** : Bactériophage, eaux d'égout, CHU, spot test, plages de lyse, galerie API20E, antibiogramme, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella oxytoca*

**Lieu de travail** : Laboratoire de Biologie Moléculaire, FSNV, UFM Constantine

Laboratoire Régional du Control de la Qualité et la Répression

des Fraudes (CACQE), de Constantine

### Jury d'évaluation :

**Président du jury** : Mme. Bouzeraib Latifa (MAA- UFM Constantine).

**Rapporteur** : Dr. Boubekri Karima (MCA- UFM Constantine).

**Examinatrice** : Mme. Guergouri Ibtissem (MAA- UFM Constantine).