

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Constantine 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Générale
Option: Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

Isolement de bactériophages à partir des eaux usées et identification de leurs bactéries hôtes

Présenté par:

Bourema Mouna

Halimi Djihad

Soutenu le 1 juill 2014

Jury de soutenance:

Président : Sekhri-Arafat N.	Maitre de Conférences	Université de Constantine 1
Encadreur: Boubekri K.	Maitre de Conférences	Université de Constantine 1
Examinatrice: Bouzeraib L.	Maitre Assistante	Université de Constantine 1

Année Universitaire

2013-2014

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Biologie Moléculaire du département de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université-Constantine1.

Avant tout nous remercions Dieu le tout puissant pour le courage et la volonté qu'il nous a accordé pour mener à bien notre travail.

Ensuite, nous remercions profondément notre encadreur madame Boubekri. K (Maître de conférences à l'université de Constantine 1), pour son soutien et les efforts fournis pour nous diriger vers la bonne voie et n'oublions jamais ses critiques bénéfiques pour nous diriger vers un esprit scientifique.

Merci à Madame Nabila la responsable du laboratoire de Biologie Moléculaire qui nous a beaucoup aidé tout au long de notre stage ainsi que tout les ingénieurs du laboratoire et les techniciennes.

Nous remercions également les membres du jury qui nous ont fait un grand honneur en acceptant de participer à l'évolution de notre travail de mémoire.

Nous tenons aussi à remercier, le directeur de la station d'épuration Ibn Ziad, pour nous avoir accordé l'accès à la station d'épuration, ainsi que toute l'équipe de la station.

Finalement, nous exprimons notre gratitude à toutes les personnes qui nous ont apporté leur aide de près ou de loin.

Dédicace

*A mes très chers parents, que Dieu me les gardent et
protègent.*

A mes sœurs Sihem, Malak et Amina.

A toute ma famille

A tous mes amis sans citer les noms

Je dédie ce travail

Mouna

*Je dédie ce travail tout d'abord à mes parents qui m'ont
donné le droit d'être dans ce monde.*

A mes frères Mohamed, Aymen

A toute ma famille.

A mes amies les plus proches.

Djihad

Table des matières

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION	01
---------------------------	----

I- LES BACTERIOPHAGES

1-Définition.....	03
2-Bref historique.....	03
3-Structure générale des bactériophages.....	03
4-Classification.....	04
5 -Méthode de multiplication d'un phage	07
6-Importance écologique de bactériophage	09
6.1 Rôle des bactériophages dans le milieu aquatique.....	09
7- Impotence économique	10
8- Relation phage-cellule hôte.....	11
8.1 Résistance microbienne aux phages.....	11
8.2 Compétition entre parasites pour un même hôte.....	12

II- LA PHAGOTHERAPIE

1.Définition.....	12
2.Historique	13
3.Avantages et désavantages de la thérapie phagique.....	14
4.Domaines d'utilisation de la phagothérapie.....	15
4.1.Utilisation en médecine.....	15
4.2.Utilisation dans le traitement des infections à biofilm.....	15
4.3.Utilisation en agro-alimentaire.....	16
4.4.Désinfection des surfaces inertes.....	16

III- MATERIEL ET METHODES

1.Description de la station d'épuration d'Ibn Ziad.....	18
2.Prélevement des échantillons.....	18
3.Flore totale aerobie mesophile.....	19
4.Technique de plage de lyse.....	19
5.Méthode de conservation de bactériophage.....	19
6.Identification phénotypique des isolats.....	20

IV- RESULTATS ET DISCUSSION

CONCLUSION.....36

REFERENCES BIBLIOGRAHIQUES

ANNEXES

Liste des abréviations

CRISPR: Clusters of Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

EcoShield™: Préparation de phages d'action spécifique contre *Escherichia coli* O157 :H7 pour la viande rouge

EFP: Efficacité à Former des Plages de lyses

FDA: Food and Drug Administration

GRAS: Generally Recognized As Safe

ICTV: International Committee on *Taxonomy* of Viruses

Listex™ P100: Préparation de phages d'action spécifique contre *Listeria monocytogenes* pour la viande, le fromage, le poisson et les fruits et légumes

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

SalmoFresh™: Préparation de phages d'action spécifique contre *Salmonella spp.* pour la volaille, les poissons, les coquillages, les fruits et les légumes

SM: Sodium-Magnésium

Liste des figures

Figure (1): Structure générale des bactériophages.....	4
Figure (2): Structure des principales familles de phages.....	5
Figure (3): Schéma du cycle lysogénique.....	8
Figure (4): Schéma du cycle lytique.....	9
Figure (5): Lieu de prélèvement de la boue mixte au niveau de la station d'épuration d'Ibn-Ziad.....	18
Figure (6): Système de filtration (Wheaton, USA).....	20
Figure (7): Plages de lyse après l'utilisation de la technique de la double couche ...	25
Figure (8): Coloration de Gram d' <i>Aeromonas hydrophila</i> (1CNTS).....	29
Figure (9): Résultat de l'identification de l'isolat <i>Aeromonas hydrophila</i> par la galerie API E.....	29
Figure (10): Isolement d' <i>Aeromonas hydrophila</i> sur les milieux selectifs.....	29
Figure (11): Coloration de Gram d' <i>Aeromonas hydrophila</i> (20BM).....	30
Figure (12): Résultat de l'identification de l'isolat <i>Aeromonas hydrophila</i> par la galerie API 20 E	30
Figure (13): Coloration de Gram d' <i>Enterobacter cloacae</i> (1NTS).....	31
Figure (14): Résultat de l'identification de l'isolat <i>Enterobacter cloacae</i> par la galerie API 20 E.....	31
Figure (15): Isolement d' <i>Enterobacter cloacae</i> sur les milieux sélectifs.....	32
Figure (16): Coloration de Gram de <i>Vibrio fluvialis</i> (20 PBM).....	33
Figure (17): Résultat de l'identification de l'isolat <i>Vibrio fluvialis</i> par la galerie API 20 E.....	33
Figure (18): Isolement de <i>Vibrio fluvialis</i> sur les milieux sélectifs.....	33
Figure (19): La coloration de Gram de <i>Serratia rubidaea</i> (4BM).....	34
Figure (20): Résultat de l'identification de l'isolat <i>Serratia rubidaea</i> par la galerie API 20 E.....	34
Figure (21): Isolement de <i>Serratia rubidaea</i> sur les milieux selectifs.....	35
Figure (22): Résultat de l'identification des souches références <i>Escherichia coli</i> 25922 et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853 par la galerie API 20 E.....	35

Liste des tableaux

Tableau (1): Principales familles des virus bactériens.....	6
Tableau (2): Avantages et désavantages de la phagothérapie.....	14
Tableau (3): Lecture de la galerie miniaturisée API20E.....	22
Tableau (4): Dénombrement de la flore totale.....	24
Tableau (5): Résultat du dénombrement des plages de lyse.....	25
Tableau (6): Résultats d'identification des isolats.....	26
Tableau (7): Résultats de la morphologie des isolats.....	27
Tableau (8): Résultats d'identification des isolats non identifiés.....	37

Introduction générale

Introduction

Les bactériophages ou phages sont des virus infectant les bactéries. Ils sont omniprésents dans La biosphère et constituent l'entité biologique la plus nombreuse de la planète (Wommack et Colwell, 2000). Ils se présentent comme des virus ayant une taille comprise entre environ 24 à 200 nm.

Depuis leurs découvertes, les bactériophages ont eu diverses utilités; du fait de leurs simplicités structurales et biologiques, ils ont été utilisés comme organisme modèle dans la recherche fondamentale (Trojet, 2011).

Les phages interviennent dans de nombreux processus écologiques et biogéochimiques, tels que le recyclage des nutriments, la mortalité bactérienne et algale, et affectent également la diversité de l'ensemble du compartiment microbien de manière directe ou indirecte (Personnic *et al.*, 2006).

La recherche systématique des bactériophages dans les eaux d'alimentation a été surtout développée en France à la suite des travaux de Guelin puis sous l'impulsion de Buttiaux. Pour Buttiaux en effet, la présence de bactériophages du groupe "Colityphi-dysenteriae" en même temps que celle d'*E. coli* confirme la souillure fécale (Leclerc et Mossel, 1989)

Comme tout bactériophage qui se respecte, le phage Dp-1 spécifique de *Streptococcus pneumoniae* possède un système lui permettant de " s'échapper " de la bactérie en temps voulu.

Le bactériophage T4, par exemple, est un bactériophage qui infecte la bactérie *Escherichia coli*, son cycle lytique dure environ 30 minutes à 37 °C.

Le cas des bactériophages filamenteux de type M13 ou f1 d'*Escherichia coli*, qui sont utilisés dans les techniques bien connues de « phage display ». La bactérie infectée survit à l'infection et produit des bactériophages de manière continue (Yoichi *et al.*, 2005).

La spécificité d'hôte des virus offrent une technologie attrayante pour la lutte contre les infections causées par bactéries ou pour le traitement des milieux contaminés par des bactéries pathogènes. La recherche sur les utilisations potentielle de la thérapie virale est limitée, mais des études ont montrés le succès en utilisant cette technologie pour traiter les infections des animaux d'élevage, les plantes, les poissons d'aqua-culture et les humains (Sulakvelidze et Kutter, 2005).

Aujourd'hui, face à l'apparition de souches bactériennes multi-résistantes aux antibiotiques et aux difficultés rencontrées par la communauté scientifique pour mettre au point de nouveaux antibiotiques, les bactériophages connaissent toutefois un regain d'intérêt, notamment en vue de lutter contre les contaminations nosocomiales (Thiel, 2004).

Des chercheurs américains ont réussi à protéger des souris de la colonisation par le streptocoque A ou à éliminer une infection par ce même pathogène en utilisant une enzyme produite par un bactériophage. L'enzyme utilisée était spécifique des germes virulents ciblés, ne perturbant pas ainsi la microflore commensale (PNAS, 2001).

Au cours de ce projet d'initiation à la recherche sur les prédateurs naturels de bactéries, les objectifs étaient d'approfondir les connaissances sur les bactériophages, d'isoler des phages et identifier leurs bactéries hôtes à partir d'affluent d'un raccordement défectueux d'une canalisation située à Mahjaret Ain Smara, à la wilaya de Constantine et aussi d'isoler d'autres souches bactériennes à partir des boues de la station d'épuration de Ibn-Ziad, tester leurs sensibilités à la suspension phagique et identifier leurs profils morphologiques et biochimiques.

Revue bibliographique

I. Les bactériophages

1- Définition

Les bactéries peuvent être infectées par des virus qu'on appelle bactériophages ou phages (Leclerc *et al.*, 1995).

Chaque bactérie est l'hôte d'un phage donné, mais elle peut être infectée par différents phages qui lui sont alors tous spécifiques (Bousseboua, 2003).

Les Bactériophages comme tous les virus, ne possèdent pas d'activité métabolique propre et utilisent la machinerie biosynthétique de la cellule qu'ils infectent pour leur propre réplication. Ils sont présents partout où des bactéries sont présentes, c'est-à-dire dans tous les milieux terrestres et aquatiques, ainsi que dans toutes les espèces animales et végétales (Preux, 2013).

2- Bref Historique

Le bactériophage a été révélé par Twort, 1915 qui décrit la transformation vitreuse de certaines colonies de Microcoques, la maladie pouvant être transmise par simple contact de colonie à colonie. Presque simultanément, d'Hérelle, 1917, à l'institut Pasteur de Paris, découvre dans les selles de convalescents de dysenteries, un agent infectieux de même types, capable de détruire spécifiquement des cultures de *Shigella dysenterie*. D'Hérelle a proposé que l'agent responsable de cette lyse transmissible soit appelé bactériophage. Les bactériophages furent ensuite l'objet de multiples et retentissantes découvertes. Lwoff, 1949 introduit la notion de prophage et de lysogénie. Delbrück, Luria et Hershey, 1964 obtiennent le prix Nobel après avoir montré que le principe infectieux des phages était sous la seule dépendance de l'ADN (Leclerc *et al.*, 1995).

3- La structure générale des bactériophages

Les bactériophages sont constitués d'une tête et d'une queue, la tête souvent polyédrique se compose d'une coque de protéines ou capsid qui protège l'acide nucléique porteur de l'information génétique. La queue rigide ou flexible et de longueur variable, peut être contractile ou non, elle constitue un tube creux, recouvert d'une gaine protéique portant également quelques enzymes (lysozymes) pour percer la paroi bactérienne (fig.1) (Sozzi *et al.*, 1982).

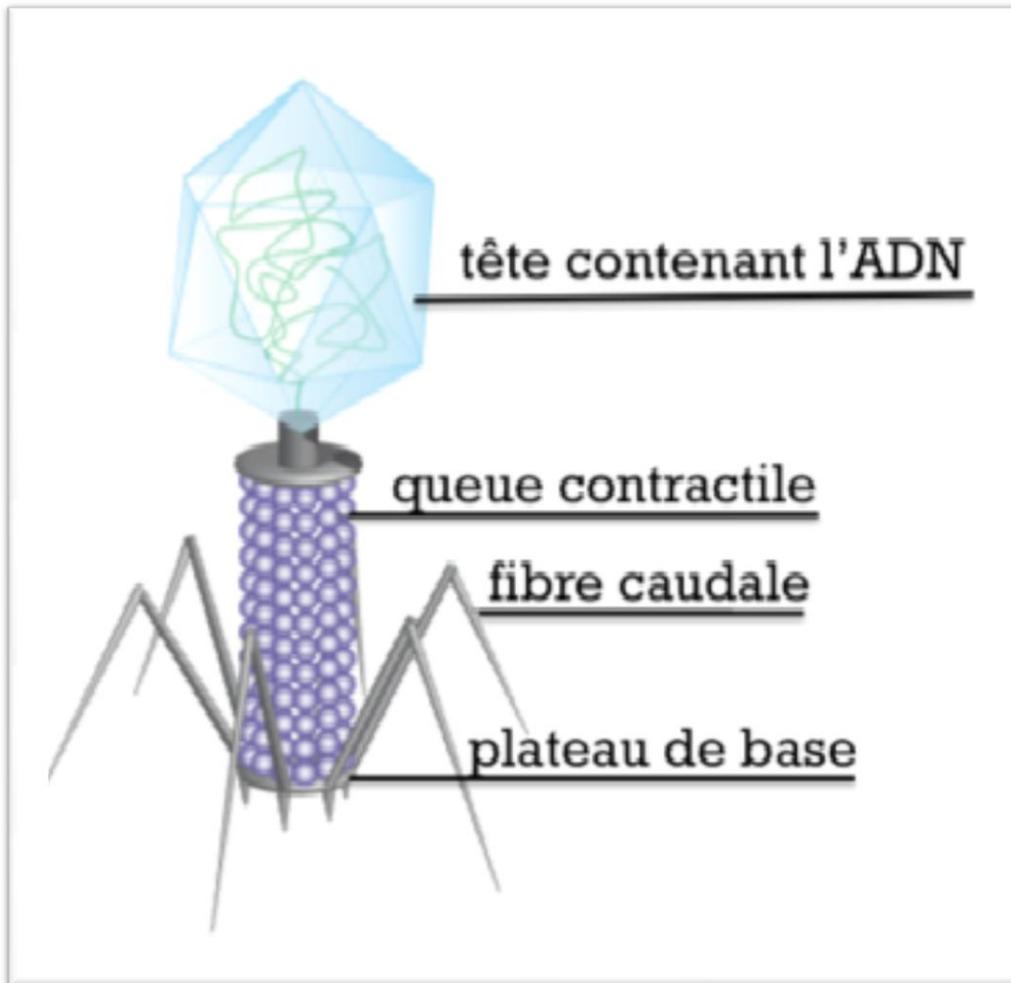


Figure (1): la structure générale des bactériophages

Source : UCL louvain and Phage Biotech LTD

4- Classification

Actuellement, au minimum 5500 bactériophages ont été examinés au microscope électronique et présentent des morphologies très diverses (fig.2). La classification classique des

bactériophages prend en compte essentiellement la nature de l'acide nucléique et la morphologie du virion.

Ainsi, la création de familles a permis de classer dans celle-ci des virions caudés, cubiques, filamenteux ou pléomorphiques et pouvant posséder un ADN ou un ARN, simple ou double brin .

D'autres ensembles, tel que l'ordre et le genre ont aussi été déterminés par L'ICTV (le Comité International de Taxonomie Virale) pour classer chaque espèce virale. Puis

récemment, grâce à des travaux de génomiques et de protéomiques comparatives la classification phylogénétique classique a pu être affinée. Par exemple, Lavigne et ses collaborateurs (Lavigne *et al.*, 2008, 2009) , ont proposé d'unifier les classifications classique et génomique des bactériophages en exploitant les données protéomiques.

Ces nouvelles approches ont ainsi permis de faire évoluer la classification avec, par exemple comme conséquence, la création de sous-familles dans la famille des Podoviridae.

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

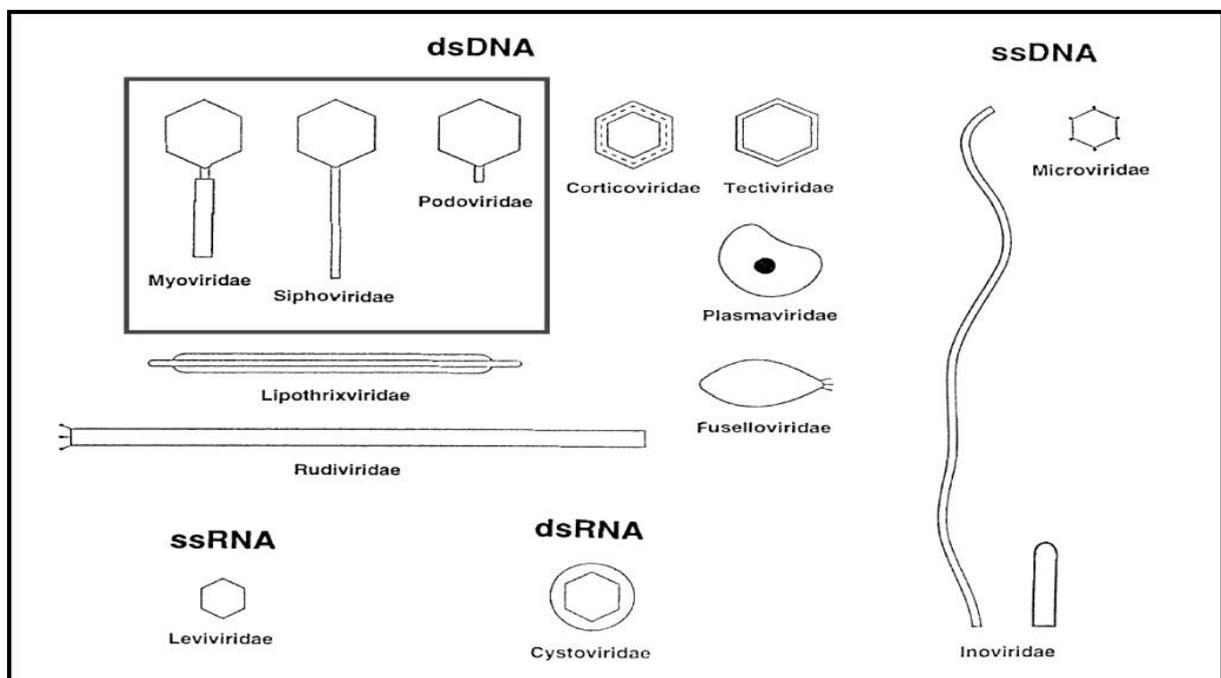


Figure (2): Structure des principales familles de phage, d'après Ackermann (2003).

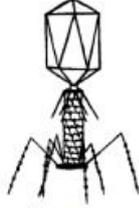
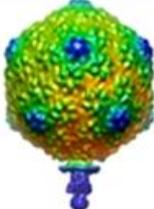
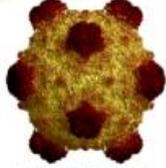
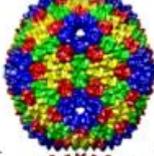
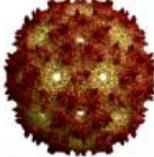
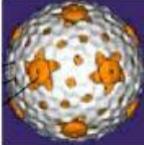
dsDNA: Double Stranded Deoxyribonucleic Acid .

ssRNA : Single- Stranded Ribonucleic Acid.

dsRNA: Double Stranded Ribonucleic Acid .

ssDNA: Single- Stranded Deoxyribonucleic Acid .

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

Forme	Acide nucléique	Famille	Nombre de genres/espèces	Caractéristiques	Exemples	Morphologie
Phages caudés, capsidie icosaédrique (Ordre des Caudovirales)	ADN double brin linéaire	<i>Myoviridae</i>	6/1320	Queue contractile	T4	
		<i>Siphoviridae</i>	7/3229	Queue longue non contractile	λ , T5, HK97, SPP1	
		<i>Podoviridae</i>	4/771	Queue courte	T7, ϕ 29, P22/L, sf6	
Polyédrique	ADN simple brin circulaire	<i>Microviridae</i>	4/40	Capsomères visibles, petite capsidie non enveloppée	ϕ x174	
	ADN double brin circulaire	<i>Corticoviridae</i>	1/3	Capsidie contenant plusieurs couches lipidiques	PM2	
	ADN double brin linéaire	<i>Tectiviridae</i>	1/19	Couche intérieure lipidique	PRD1	
	ARN simple brin linéaire	<i>Leviviridae</i>	2/39	Très petits génomes	Ms2	
	ARN double brin linéaire	<i>Cystoviridae</i>	1/3	Enveloppe lipidique	ϕ 6, ϕ 12	

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

Les exemples de structures sont tirés de: **phage T5** (Effantin *et al.*, 2006) ; **T7** : (Agirrezabala *et al.*, 2005) ; **φx174** (Mckenna *et al.*, 1992) ; **PM2** (Abrescia *et al.*, 2008) ; **PRD1** : (Abrescia *et al.*, 2004) ; **Ms2** (Roshah *et al.*, 1993) ; (Marvin, 1990) ; **phage TTV1** (Zillig *et al.*, 1986) ; **SIRV-1** (Zillig *et al.*, 1998).

5- La méthode de multiplication d'un phage

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

1) soit le phage intègre son ADN au génome de la bactérie. Le phage est appelé prophage et la bactérie est dite lysogène, elle poursuit son cycle de réplication comme si de rien n'était, et multiplie par la même occasion l'ADN viral; c'est le cycle lysogène (fig.3).

2) soit la bactérie arrête de se multiplier et procède à la construction des particules virales et les assemble, c'est le cycle lytique. Au bout d'un certain temps, la bactérie éclate et libère de nombreux bactériophages qui peuvent, à leur tour, attaquer d'autres bactéries, c'est la lyse (fig.4).

Le passage du cycle lysogène au cycle lytique est l'induction (fig.3) (Gneagi *et al.*, 1984).

De nombreuses discussions ont évoqués l'influence des facteurs environnementaux tels que les paramètres physicochimiques (pH, radiations solaires, statuts trophiques) et biologiques (activité et abondance de la communauté hôte) dans l'établissement de la lysogénie ou au

contraire dans l'induction du cycle lytique à partir d'un lysogène (Weinbauer, 2004). Toutefois, il semblerait que les cycles lytiques prédomineraient sur les cycles lysogéniques dans la majorité des écosystèmes.

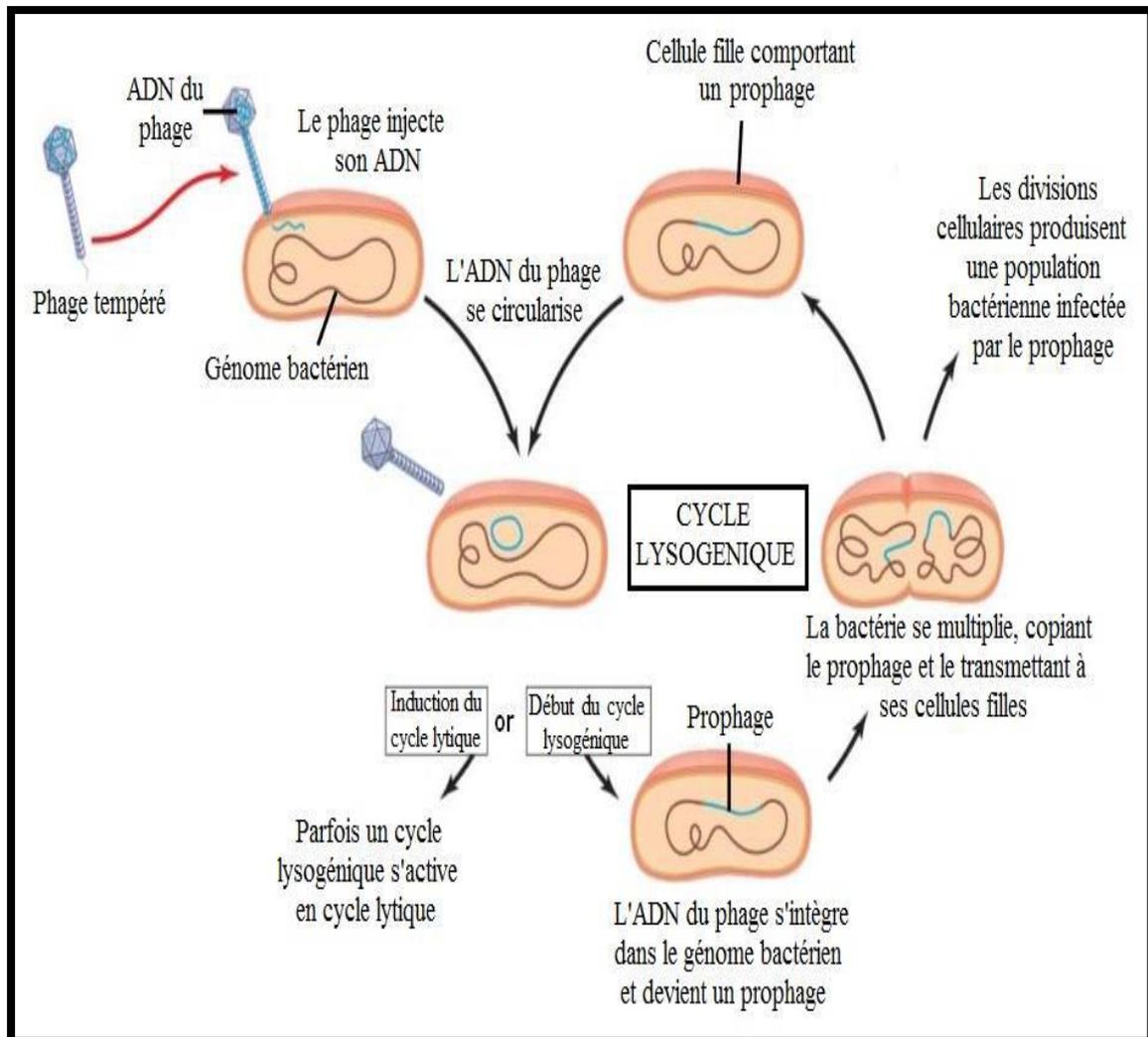


Figure (3): Schéma du cycle lysogénique

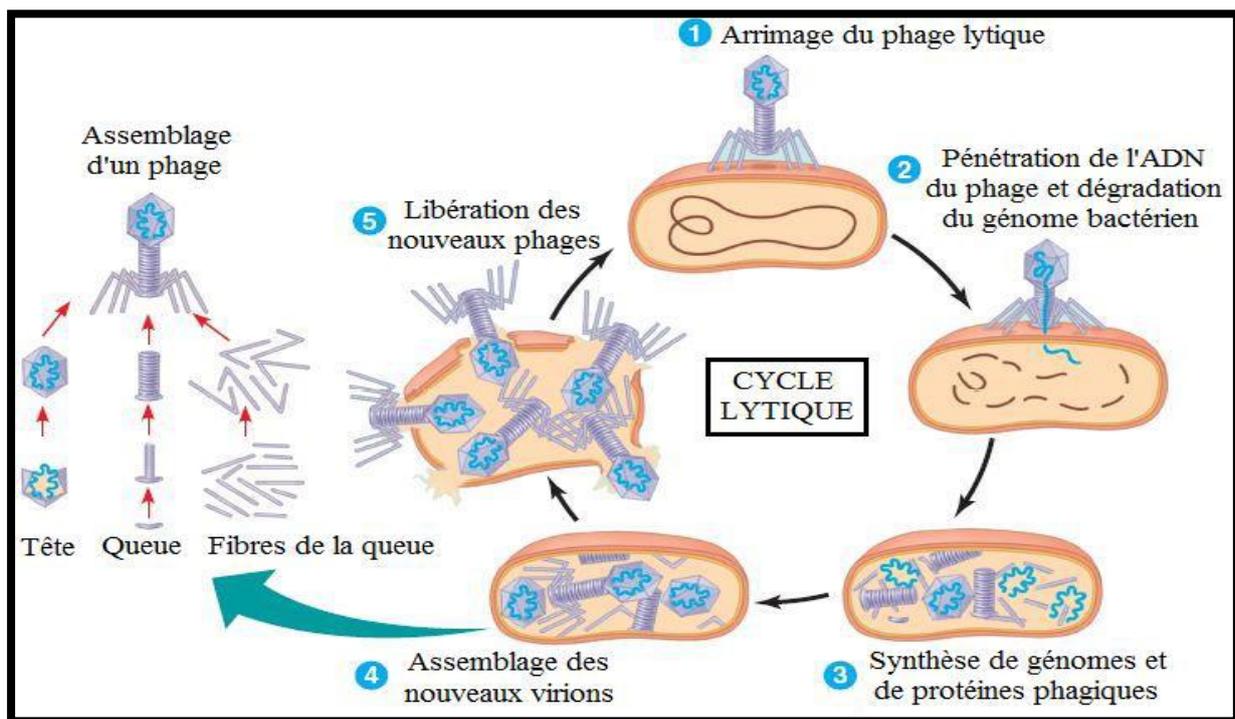


Figure (4): Schéma du cycle lytique

6- L'importance écologique de bactériophages

Les bactériophages sont considérés comme étant plus nombreux dans la biosphère que n'importe quel autre groupe d'organismes, procaryotes inclus. Ils sont présents dans tous les types d'écosystèmes. (Wommack et Colwell, 2000).

Les bactériophages jouent probablement un rôle important de régulateurs dans les écosystèmes; une hypothèse suggère que les bactériophages se multiplient lors des épidémies de choléra dans le Gange au Bangladesh et contribuent ainsi - ou seraient même responsables du déclin des épidémies. Plus tard, d'autres épidémies peuvent arriver avec d'autres souches, pas sensibles aux premiers bactériophages, mais qui seront sensibles à la prochaine vague de bactériophages (Belin et Forterre, 2011).

6.1 Le rôle des bactériophages dans le milieu aquatique

Les virus sont une composante omniprésente des réseaux trophiques microbiens dans les deux systèmes d'eau douce et marine. L'abondance des virus dans les systèmes aquatiques semble être indépendante de la salinité, mais liés à la biomasse et aux effets saisonniers.

Au début des années 1990, l'estimation réelle, rapide et directe des virus aquatique a été réalisée en utilisant des technologies nouvelles ; la Microscopie à Épifluorescence et la Symétrie en Flux.

Les résultats ont montrés une abondance virale de 10^4 à 10^8 particules/ml (Wilhelm et Matters, 2008).

De nombreuses revues de Borsheim, 1993 et Proctor, 1997 ont révélé une dominance de phages Caudovirales de l'ensemble des virus isolés de systèmes aquatiques. Ce principal agent de mortalité bactérienne jouait un rôle actif, voir prépondérant dans l'épuration des eaux et surtout dans la diminution puis la disparition des bactéries.

Plusieurs études ont montré que les bactériophages peuvent affecter la composition de la communauté bactérienne selon le modèle du «phage qui tue le meilleur» «killing the winner » (Thingstad et Lignell, 1997), en contrôlant les effectifs des groupes les plus abondants. Les groupes minoritaires, les moins compétitifs, pouvant en effet à leur tour profiter des ressources ambiantes pour croître. Mais par contre, Bouvier et Del Giorgio (2007), ont suggéré que la faible abondance de certains groupes bactériens minoritaires puisse être en fait liée à l'action de la lyse virale.

L'importance quantitative de la lyse virale dans le transfert du carbone a été estimée pour la première fois à partir du modèle de prédiction de Fuhrman qui a montré que l'activité lytique induisait une augmentation de 27% de la production bactérienne, une baisse de 37 % de l'export du carbone bactérien vers le nanozooplankton et de 7 % vers le macrozooplankton.

La lyse virale peut affecter significativement le cycle du carbone et de différents éléments nutritifs au sein des écosystèmes aquatiques. En effet, au cours de la lyse virale, la libération de nouveaux virions s'accompagne d'un enrichissement du milieu en matière organique dissoute qui est appelée « lysat » regroupe l'ensemble des débris cellulaires produits au cours de la lyse virale (matériels cytoplasmique et structurel de la cellule lysée) (Berdjeb et Jacquet, 2009).

7- Importance économique

Leur importance économique peut être appréciée au sein des industries de produits laitiers. Effectivement, ces dernières ont à faire face à des contaminations de bactériophages lytiques de *Lactobacillus* qui entraînent des arrêts de fermentations (Brüssow, 2001).

L'accroissement considérable de la production de fromage au début du 19ème siècle a engendré l'apparition de nombreuses difficultés dans les usines fromagères.

La contamination par les phages demeure cependant le problème majeur pour cette industrie. Il a été démontré qu'un virus bactérien était le principal responsable de l'absence d'activité métabolique d'un ferment durant la production fromagère. Cet échec de la fermentation

lactique a été observé pour la première fois en 1935 en Nouvelle-Zélande par Whitehead et Cox (Waes et Bossuyt, 1984).

En résumé, le processus de la fermentation du lait à lieu dans des conditions non stériles et cet environnement est propice à la contamination phagique.

8- Relation phage-cellule hôte

Deux types de relations ont été décrits :

1-le prophage est un plasmide à faible nombre de copies qui se réplique indépendamment du chromosome de la bactérie.

2-le prophage s'intègre sur le chromosome par crossing-over et se réplique passivement avec le chromosome (Leclerc *et al.*, 1995). Principalement, L'étape de reconnaissance du récepteur bactérien constitue la première étape de l'infection.

Ce processus dépend d'interactions spécifiques entre des structures protéiques du phage et des molécules présentes à la surface de l'hôte appelées « récepteurs ».

Ainsi, pour sa survie il est indispensable que le phage discerne d'une part l'hôte approprié et d'autre part le récepteur bactérien spécifique au milieu d'autre récepteur non spécifique.

Mais la spécificité d'adsorption dépend aussi de la nature, de la structure, de la localisation et de la densité du récepteur à la surface bactérienne. La réussite de cette étape lui permettra alors de poursuivre son cycle d'infection afin de produire et libérer de nouveaux virions (Trojet, 2011).

8.1 Résistance microbienne aux phages

De nombreuses études ont montré que la lyse virale n'induisait en moyenne qu'entre 10 % et 20 % de mortalité bactérienne.

Ces faibles valeurs suggèrent le développement de mécanismes de défense des bactéries face aux infections virales. Ces mécanismes peuvent se traduire par :

- a- une mutation de la structure des récepteurs membranaires empêchant la fixation des virus.
- b- la production d'ectoenzymes détruisant les protéines de la capsid des virus libres bien que la spécificité de cette production contre les virus ne soit pas prouvée.
- c- la délétion spontanée d'une partie du génome bactérien.

Récemment, un nouveau mécanisme de résistance bactérienne a été révélé au cours de l'étude d'Andersson et Banfield. D'après ces auteurs, les bactéries ont la capacité d'intégrer des éléments génétiques particuliers provenant de séquences génomiques virales au niveau de

locus appelés « regroupements de répétitions de courts palindromes régulièrement espacés » ou CRISPR (clusters of regularly interspaced short palindromic repeats), ce qui leur confère une résistance aux phages. (Berdjeb et Jacquet, 2009).

8.2 La compétition entre parasites pour un même hôte

S'il y a une compétition entre les hôtes sensibles et résistants, il peut aussi y avoir une compétition entre les parasites, à la fois à l'extérieur de la cellule bactérienne, et à l'intérieur de l'hôte. Un phage peut infecter une bactérie déjà parasitée (superinfection); on considère alors que les différents bactériophages présents à l'intérieur de l'hôte sont en compétition puisqu'il faut qu'ils détournent l'un et l'autre la machinerie cellulaire pour assurer leur multiplication (Turner *et al.*, 1999).

II. La phagothérapie

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

1- Définition

Il s'agit d'une thérapie fondée sur l'utilisation du bactériophage, virus parasite exclusif des bactéries. Ses caractéristiques biologiques en font un agent idéal pour le traitement des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Certains experts contemporains affirment que la phagothérapie peut être plus efficace que les antibiotiques dans certaines conditions cliniques : de ce fait, elle se voudrait une solution à l'antibio-résistance (Fruciano , 2011).

L'utilisation des bactériophages est reconsidérée dans de nombreux pays devant le double constat du développement inquiétant des infections nosocomiales à bactéries multirésistantes et de l'absence de nouveaux antibiotiques efficaces. Aujourd'hui, des applications sont envisagées non seulement dans le domaine médical mais aussi dentaire, vétérinaire, agricole ou environnemental (Dublanchet, 2009).

2- Historique

Aujourd'hui, les praticiens médicaux s'intéressent peu à la découverte des bactériophages. Mais, de 1920 à 1940, la phagothérapie a été utilisée pour traiter différentes maladies infectieuses. En 1915, Félix d'Herelle a suivi des cas de dysenterie bacillaire. Il a observé des taches claires sur des cultures bactériennes à la surface de la gélose. En 1917, une note a été présentée à l'Académie des Sciences: « sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques ». D'Herelle appela ce microbe : « bactériophage ». En 1919, une importante épidémie de choléra des poules faisait rage en France. Pour d'Herelle, ce fut l'opportunité d'étudier le comportement du phage. Il a formulé l'hypothèse qu'il fallait être infecté par le bactériophage pour guérir. La première administration humaine de phage a été réalisée en 1921 à l'hôpital des Enfants-Malades. Des patients atteints de dysenterie ont guéri rapidement. À partir de ce moment, des préparations variées de phage ont été produites et commercialisées. « Le laboratoire du bactériophage » a produit énormément de phages dirigés contre des maladies infectieuses courantes. Mais, en 1945, les antibiotiques sont apparus. Abandonnée dans le monde occidental, la phagothérapie a continué d'être utilisée à grande échelle dans les pays de l'Est (Dublanche et Fruciano, 2008).

En France, les Instituts Pasteur de Lyon et de Paris fournissaient des préparations sur mesure, préparées après la recherche dans leur « phagothèque » de la meilleure composition active sur une infection documentée. Depuis le début des années 1990 aucune source officielle de bactériophages thérapeutiques n'est plus disponible en France.

L'institut Géorgien, légitimement appelé depuis quelques années « Institut Eliava », possède une collection très complète de bactériophages thérapeutiques, un centre de recherche et un savoir-faire très convoités par les pays occidentaux (Kutateladze et Admia, 2008).

En Pologne, un Institut d'immunologie et de thérapie expérimentale a aussi poursuivi jusqu'à nos jours l'utilisation de la phagothérapie. Moins ouvert sur le monde extérieur que l'Institut Eliava (Miedzybrodzki *et al.*, 2007).

3- Avantages et désavantages de la thérapie phagique

Tableau (2): Les avantages et désavantages de la phagothérapie.

Caractéristiques phagiques	Avantages	Désavantages
Les phages sont très spécifiques de leur bactérie hôte	Risque de dysbiose ou de développement d'infections secondaires limités	Nécessité d'isoler la souche responsable de l'infection pour traiter avec des phages actifs contre celle-ci
Les phages se répliquent au site d'infection	Administrations de suspension phagique moins fréquente que des antibiotiques	
Les phages sont des organismes «vivants »	Les phages sont capables de muter ou de recombiner avec d'autres phages afin de résister aux mécanismes de résistance des bactéries	Les bactéries sont capables de développer ou d'acquérir des mécanismes de résistance envers les phages
Les phages sont des organismes simples (protéines et acides nucléiques)	Potentiellement peu toxique	Pourrait interagir avec le système immunitaire de l'hôte
Les phages possèdent de grandes capacités répliquatrices	Relativement facile à produire in-vitro et à bas coût	Nécessité de bien purifier les suspensions phagiques afin d'éliminer tout contaminant bactérien
Les phages sont très divers	A priori chaque bactérie à au moins un phage qui peut l'infecter	Nécessité de caractériser les phages avant inoculation pour ne pas utiliser des phages lysogènes

Inal, 2003 ; Loc-carrillo et Abdon, 2011 et Sulakvelidze *et al.*, 2001.

4- Domaines d'utilisation de la phagothérapie

Si les bactériophages peuvent conférer leur virulence à certaines bactéries, ils pourraient également être utilisés comme «arme» contre celles-ci (Grégory et Meyer, 2002).

4.1 Utilisation en médecine:

Une étude publiée en janvier 2002 a montré qu'une injection de bactériophages peut sauver 100% des souris infectées par des *Enterococcus faecium* résistants à la vancomycine (Biswas *et al.*, 2002).

Une nouvelle approche est depuis peu utilisée et a connu de récents succès. En effet, une étude a montré qu'une enzyme lytique, la lysine, purifiée à partir du bactériophage C1, était capable d'éradiquer une infection causée par des bactéries gram-positives, *Streptococcus pyogenes*, sans détruire la microflore normale (Nelson *et al.*, 2001).

De plus, une seconde étude a montré que cette approche est efficace pour lutter contre l'un des pathogènes les plus préoccupants de l'espèce humaine, *Streptococcus pneumoniae* (Loeffler *et al.*, 2001).

Une telle stratégie, pourrait-elle se montrer également efficace dans le traitement de certaines parodontites dont l'un des principaux agents étiologiques a été reconnu comme étant une bactérie gram-négative, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Grégory et Meyer, 2002).

4.2 Utilisation dans le traitement des infections à biofilm

Les infections à biofilm sont une plaie dans le domaine médical actuel. Actuellement, 65% des infections recensées chez l'homme dans les pays développés sont causées ou entretenues par des biofilms. Plus de 80 % des infections bactériennes sont chroniques à cause de ces biofilms. Parmi ces infections, les plus courantes sont les infections dentaires, pulmonaires et urinaires, ainsi que de nombreuses maladies nosocomiales liées à l'usage de matériel médical contaminé par des biofilms (cathéters, prothèses cardiaques, matériel orthopédique) (Høiby *et al.*, 2010).

Dès lors qu'un biofilm est installé, les bactéries qu'il héberge échappent aux défenses immunitaires de l'hôte et aux thérapeutiques antimicrobiennes, et notamment antibiotiques. Les antibiotiques vont détruire les bactéries circulantes, supprimant ainsi les symptômes, mais ne pourront pas atteindre celles enchâssées dans le biofilm. Sans traitement efficace, le biofilm va alors servir de nid à partir duquel les infections vont récidiver. La seule thérapeutique actuellement efficace est le retrait chirurgical de la zone de biofilm (Høiby *et al.*, 2010).

Comme vu auparavant, l'utilisation des bactériophages semble indiquée lors de présence de biofilms, puisqu'ils seraient capables d'en détruire la matrice. Une fois ce biofilm éliminé, les bactéries qui s'y protégeaient sont de nouveau exposées aux antimicrobiens et peuvent alors être détruites par les phages (Magali *et al.*, 2014).

4.3 Utilisation en agro-alimentaire

L'intérêt des phages dans l'industrie agro-alimentaire est de détruire certaines bactéries (principalement *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* et *Escherichia coli* susceptibles de contaminer les produits alimentaires frais (Magali *et al.*, 2014).

Aux États-Unis d'Amérique, la FDA (Food and Drug Administration) a récemment émis des directives pour lutter contre l'expansion des antibiorésistances. Pour mieux lutter contre les antibiorésistances, elle a autorisé en 2006 la pulvérisation sur la viande d'un cocktail de

six phages anti-*Listeria monocytogenes* nommé ListShield™ (anciennement LMP 102), fabriqué et conditionné par la société Intralytix (FDA, 2013).

Depuis, d'autres produits du même type ont rejoint l'arsenal (annexe 2) et sont classés sous le concept Generally Recognized as Safe (GRAS), qui indique l'approbation par la FDA après reconnaissance de la non dangerosité du produit par des experts, et qui permet de contourner l'habituelle loi fédérale d'autorisation des additifs pour les aliments. C'est le cas du Listex™ P100 (contre *Listeria monocytogenes* pour la viande, le fromage, le poisson et les fruits et légumes) produit par la firme Microcos Food Safety ainsi que d'autres produits provenant d'Intralytix tels que l'EcoShield™ (contre *Escherichia coli* O157:H7 pour la viande rouge) et le SalmoFresh™ (contre *Salmonella spp.* pour la volaille, les poissons, les coquillages, les fruits et les légumes (Housby et Mann, 2009).

4.4 Désinfection des surfaces inertes

Les phages se sont avérés efficaces en application sur des surfaces inertes pour les débarrasser des bactéries ou des biofilms. Leur usage serait particulièrement indiqué pour traiter l'intérieur des réseaux hydrauliques, comme par exemple les tuyaux de circulation d'eau de boisson pour les volailles, qui regorgent généralement de bactéries (surtout des bactéries générant des infections entériques, comme *Campylobacter spp.*) et de biofilms (Inal, 2003).

C'est ce qu'ont tenté in vitro certains scientifiques. Les bactériophages appliqués sur les surfaces contre *Campylobacter jejuni* et contre les biofilms associés se sont révélés très efficaces, en particulier les phages CP8 et CP 30 (Scott *et al.*, 2007; Siringan *et al.*, 2011). L'action des bactériophages pourrait également s'appliquer à l'aseptisation du matériel

médical et des surfaces en milieu hospitalier, comme le démontre l'équipe de Carson dans une étude sur l'élimination des biofilms présents sur le matériel médical (Carson *et al*, 2010).

Matériel et Méthodes

III. Matériel et Méthodes

1-Description de la station d'épuration d'Ibn Ziad

La station d'épuration d'Ibn Ziad a été conçue en 1978 par des Yougoslaves, pour traiter un débit moyen de 150 l/s avec une capacité maximum de 800 à 1000 l/s.

C'est une station d'épuration à boues Activées, prévue pour 450.000 habitants équivalents.

Elle a été mise à l'essai le 15/05/1997, et en service réel le 15/09/1997 ; elle traite aujourd'hui une partie des rejets d'eaux usées déversées par la ville de Constantine.

2- Prélèvement des échantillons

En premier lieu, le prélèvement (fig.5) de la boue mixte a été effectué par agitation le 16/03/2014 à 11h où la température de cette journée était de 11°C dans des bouteilles en verre stériles de 1L, en laissant un volume d'air d'environ 1/10 du volume du flacon. L'échantillon a été transporté dans des conditions isothermes de 4°C et manipulé le même jour de prélèvement.

Un autre échantillon d'eau usée a été prélevé le 06/04/2014 à 11:23h à partir d'affluent d'un raccordement défectueux d'une canalisation à "Mahdjarat el Smara", à Constantine dans des flacons stériles en verre de 1L et dans les mêmes conditions de prélèvement du premier échantillon.

Les dilutions décimales de chaque échantillon ont été réalisées en eau peptonée.



Figure (5): Lieu de prélèvement de la boue mixte au niveau de la station d'épuration d'Ibn-Ziad

3- La flore totale aérobie mésophile

Cent millilitre de trois *dilutions décimales* successives ont été étalés en duplicata sur la Gélose Nutritive (annexe1). Les boites sont directement incubées à 37°C pendant 24 h. Le nombre de colonies observables est compté sur les boites "interprétables" contenant entre 30 et 300 colonies. Ce nombre traduit alors le nombre de bactéries présentes initialement dans l'inoculum déposé en termes d'unités formatrices de colonies (UFC/ml).

Les 20 souches isolées ont été purifiées par repiquage successif sur le même milieu d'isolement. Chaque colonie pure a été ensemencée sur un bouillon nutritif puis incubé à 37°C pendant 4h pour effectuer la technique des plages de lyse; méthode de la double couche, qui est la seule technique utilisée dans cette recherche.

4- La technique de plage de lyse

Cent millilitre de l'échantillon des eaux usées de Ain Smara ont été centrifugé dans des tubes de 20ml à 2000rpm pendant 15min en utilisant une centrifugeuse de model EBA 12 de Hettich, Germany ; le surnageant a été filtré par la méthode de filtration sur membrane à l'aide d'un système de filtration de 1L (Wheaton, USA) ; (fig.6), en utilisant une membrane filtrante de 0.45um (filtre stérile, Wattman, Germany) dont les pores peuvent retenir les cellules bactériennes et les débris cellulaires et laissent passer les phages.

La suspension phagique a été conservée à 4°C dans des bouteilles stériles de 100ml.

Cinquante microlitre de chaque culture bactérienne en phase de croissance exponentielle ont été mélangés avec 100ul de la suspension phagique (solution mère ou solution obtenue après dilutions décimales) dans des tubes Eppendorf et incubé à 37°C pendant 15min, après incubation, cette suspension a été mélangée avec 3ml de la gélose semi-molle (0.7% agar) conservée en surfusion à 45°C. Ce mélange a été homogénéisé avec précaution et couler rapidement sur un milieu gélose (GN) pour former une mince couche supérieure.

Après solidification, les boites retournées ont été incubées à 37°C pendant 24h. L'apparition ou l'absence des plages de lyse claire dans le tapis (UFP) a été observée.

5-Méthode de conservation de bactériophage

Après le dénombrement des plages de lyse à partir de la boite positive, les plages ont été découpées soigneusement en perçant la gélose au tour de la plaque avec la grande extrémité de la pipette Pasteur. Ensuite, ces bouchons d'agar ont été déposés dans des tubes eppendorf contenant 1 ml de tampon SM stérile (annexe1) à pH 7.4, et les tubes ont été conservés au réfrigérateur entre 4-10°C



Figure (6): Système de filtration (Wheaton, USA)

6- Identification phénotypique des isolats

Deux souches, *E. coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ont été utilisées comme souches de références.

dix isolats ont été sélectionnés de façon aléatoire pour analyse phénotypique. Les souches ont été désignées par le code suivant :

- 1CNTS, 1NTS et 2CNTS: isolats prélevés à partir de l'échantillon d'eau usée de Ain Smara
- 20BM, 4BM, 20PBM, 7BM, 8BM, 19BM et 10BM: isolats prélevés à partir de la boue mixte de l'échantillon de la station d'Ibn Ziad

L'identification été basée sur la détermination des caractères morphologiques et biochimiques.

La composition des milieux de culture utilisés dans cette étude est mentionnée en annexe1.

a. Examen microscopique: Il a été effectué sur un frottis bactérien, préparé à partir des isolats en cultures pures, puis fixé et coloré par la méthode de Gram.

b. Test Biochimiques:

Test de catalase : Pour mettre en évidence cette enzyme, une partie de la colonie suspecte est diluée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame stérile. Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase.

Test d'oxydase: Le test a été réalisé en utilisant des disques d'oxydase (Himedia laboratoires, Mumbai, India). Un de ces disques a été placé sur une lame et une colonie y est déposée avec une pipette pasteur. S'il y a apparition d'une tache violette au bout de 30 secondes, la bactérie est oxydase positive et elle possède la cytochrome oxydase. Et rien n'apparaît, cela signifie que la bactérie est oxydase négative et qu'elle ne possède pas l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase).

Le test de mobilité: la Gélose mobilité (Biomerieux, SA., Marcy-L'étoile, France), a étéensemencée par piqûre centrale. Les germes immobiles ne poussent qu'au niveau de la piqûre central alors que les germes mobiles diffusent dans la gélose.

Le test d'hémolyse : Ce test a été réalisé sur la gélose Columbia (Institut Pasteur, Algérie) au sang humain (5%).

Milieux sélectifs: Les milieux sélectifs ont étéensemencés par la technique de stries et la lecture a été effectuée après 24h d'incubation à 37°C. Le milieu Mac conkey (Institut Pasteur, Algérie) a été utilisé pour détecter la fermentation du lactose. Le milieu Hektoen (Institut Pasteur, Algérie) a été utilisé pour l'isolement de *Salmonella* et *Schigella*. Le milieu TSI (Institut Pasteur, Algérie) a été utilisé pour la fermentation de trois sucres ; lactose, glucose et saccharose ainsi la production de gaz et production de l'H₂S, Le milieu EMB(gélose éosine bleu de méthylène) (Institut Pasteur, Algérie) a été utilisé pour l'isolement d'*Escherichia coli* et *Enterobacter* ainsi que les bacilles à Gram négatif.

La Galerie API 20E

Les dix isolats ont été identifiés par la galerie API 20E (Biomerieux, SA., Marcy-L'étoile, France). Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les galeries ont été préparés selon les instructions de Biomerieux. Les microtubes ont été inoculés avec une suspension bactérienne (trouble correspondant au tube 0,5 de l'échelle McFarland) qui

reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période de 24 h d'incubation à 37°C se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (annexe 1).

Les résultats de ces réactions sont marqués sur une fiche de résultats standards. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du (Tableau 3) de lecture et l'identification est obtenue à l'aide d'un catalogue analytique.

Le tableau de lecture 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 valeur (1, 2 ou 4) est indiquée pour chacun. Les nombres correspondants aux tests positifs sont additionnés à l'intérieur de chaque groupe. Puis, un nombre de 7 chiffres qui sert de code d'identification est obtenue.

Le code de la bactérie, composé des 7 chiffres, est déterminé à l'aide du tableau d'identification ou de lecture (Tableau 3).

Tableau (3) : lecture de la galerie miniaturisée API20

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétone	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

Résultats et discussion

Résultats et Discussion

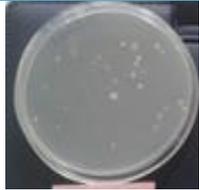
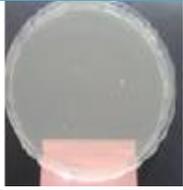
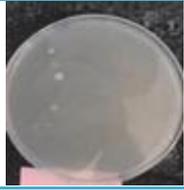
Les eaux usées renferment toutes une flore très diversifiée qui peut provenir de la flore intestinale ou qui se développent notamment grâce à l'excès de matières organiques contenues dans ces eaux. Les types de microorganismes comprennent principalement, par ordre croissant de taille: les virus, les bactéries, les protozoaires et les helminthes. Ils ont des effets divers sur la santé. Ils sont la cause d'infections bénignes comme la gastro-entérite mais aussi de maladies mortelles comme le choléra.

Cependant le dénombrement de la flore total aérobies mésophiles donne une idée sur la charge des eaux usées en microorganismes, il est utilisé aussi comme indicateur d'efficacité de traitement.

Pour l'analyse de la flore totale, le milieu de culture préconisé est la GN, ce milieu nutritif permet une croissance des micro-organismes revivifiables et cultivables sans exercer de pression de sélection. On considère que les colonies sont dénombrables si leur nombre est compris entre 30 et 300 UFC/ml.

A la lecture du (tableau 4), il s'est révélé qu'au cours de 24h d'incubation à 37C°, la flore totale aérobie mésophile d'eaux non traitées a des moyennes de 37×10^4 UFC/ml par contre celle de la boue mixte est de 12×10^5 UFC/ml. La boue mixte est constituée d'un mélange de boues primaires (récupérés par une simple décantation des eaux usées) et biologiques (boues activées), cela reflète le taux élevée de la flore total dans la boue mixte par rapport à l'eau usée.

Tableau (4): Dénombrement de la flore totale

Dilutions	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Nombre de colonies UFC/ml	37×10 ⁴ UFC/ml	<30	<30
ENT			
Nombre de colonies UFC/ml	12×10 ⁵ UFC/ml	<30	<30
BM			

BM: boue mixte

ENT: eau non traitée

L'utilisation des eaux usées et boues comme source de bactériophages a été démontrée par plusieurs publications (Khan *et al.*, 2002; Martineau, 2009).

Dans cette étude, le phage visible au microscope électronique, ne peut être décelé que par son action sur l'hôte. Cette action s'est manifestée par l'apparition des plages de lyses (troues) dans le gazon bactérien d'une souche non identifiée, sur la double couches de deux boites de pétri (fig.7). La suspension phagique (solution mère) a été préparée à partir de l'échantillon des eaux usées domestique d'Ain Smara, mais la souche a été isolée de la boue mixte. Les autres 19 isolats testés ne sont malheureusement pas sensibles au phage. Erwert et Paynter (1980) ont observés une sensibilité aux phages dans seulement trois des 48 isolats bactériens (non identifiés) dominant à partir des eaux usées, par contre Hantula *et al.* (1991) ont observés environ 15% des isolats de boues activées sensibles aux bacteriophages.

Durant cette recherche, une seule souche s'est révélée sensible au phage, et le nombre de plage de lyse était de 90 UFP/ml (tableau 5), ces plages ont été découpés et conservés dans des tubes éppendorf contenant le tampon SM. Cette activité lytique a disparu après le test de confirmation par repiquage répété, ou bien une souche résistante a prie le dessus et a fait disparaître ou a inactivé le principe lytique du phage.

Il faut reconnaître que les phages ne sont pas cultivables de la même façon que les bactéries ou les cellules eucaryotes, les bactéries développent des résistances aux bactériophages. Elles s'adaptent aux prédateurs et elles modifient naturellement leur code génétique pour survivre.

L'absence de bactériophages peut être expliquée par la présence des phages non lytiques, évidemment l'absence de lysats. L'obtention de tels bactériophages, ayant un spectre élargi ou différent de celui de leur bactérie hôte, représentait un défi, car lorsque les protéines de ciblage d'un bactériophage sont modifiées, celui-ci peut perdre la faculté de reconnaître son hôte. Il en résulte qu'il ne peut être reproduit, ni maintenu dans son hôte (Thiel, 2004).

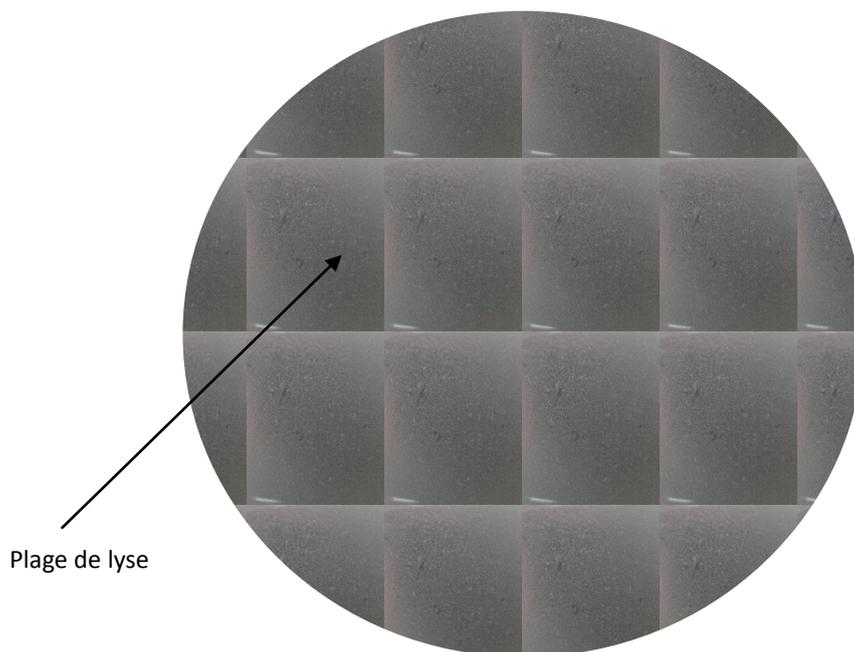


Figure (7): Plages de lyse après l'utilisation de la technique de la double couche

Tableau (5): Résultat du dénombrement des plages de lyse

Nombre des plages de lyse	90 UFP/ml
---------------------------	-----------

Les résultats d'identification par la galerie API 20 E des souches (1CNTS, 20BM, 1NTS, 4BM et 20PBM) sont représentés dans le (tableau 6).

Tableau (6): Résultats d'identification des isolats 1CNTS, 20BM, 1NTS, 4BM et 20PBM

Tests	1CNTS	20BM	1NTS	4BM	20PBM
ONPG	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	-	+
LDC	+	-	-	-	-
ODC	-	-	+	-	-
CIT	+	-	+	-	-
H2S	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-
VP	-	-	+	-	-
GEL	+	+	-	-	+
GLU	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+
INO	-	-	-	-	-
SOR	-	-	+	-	-
RHA	-	-	+	-	-
SAC	+	+	+	+	+
MEL	-	-	+	-	-
AMY	-	+	+	+	+

ARA	-	+	+	+	+
NO2	+	+	+	+	+
N2	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	-	+
Oxydase	-	+	+	-	+
Hémolyse	α	α	α	α	α

α : pas d'hémolyse complète

Les résultats morphologiques des souches (1CNTS, 20BM, 1NTS, 4BM 20PBM) sont représentés dans le (tableau 7).

Tableau (7): Résultats de la morphologie des isolats

caractères	1CNTS	20BM	1NTS	4BM	20PBM
Gram	-	-	-	-	-
Aspect	coccobacilles	coccobacilles	Bacilles	bacilles	bacilles
Mobilité	+	NF	+	NF	+

NF:non fait

Selon les tests biochimiques et morphologiques les souches 1CNTS et 20BM ont été identifiées comme *Aeromonas hydrophila* 1CNTS/20BM en consultant le catalogue d'identification des API 20 E.

La bactérie 1CNTS (fig.8 et 9) est coccobacille à Gram-, mobilité+, oxydase+, LDC+, ODC-, ONPG+, IND-, GEL+,VP-, Saccharose+.

La bactérie 20BM (fig.11 et 12) est coccobacille à Gram- , mobilité+, oxydase+, LDC-, ODC-, ONPG+, IND-, GEL+,VP-, Saccharose+.

Sur le milieu sélectif TSI la croissance des l'isolats 1CNTS/20BM entrainent un changement de la couleur du milieu vers le jaune indiquant ainsi la production d'acide sur la pente et dans le culot; les bactéries sont donc saccharose+, Glucose+, Lactose+, avec production de gaz

(hydrogène, dioxyde de carbone), l'absence de noircissement dans le culot signifie que le H₂S est négatif.

Sur le milieu Mac conkey les colonies sont de couleur rose, donc ces bactérie fermentent le lactose en produisant des acides: Lactose +.

Sur le milieu Hektoen, les Colonies sont de couleur saumon, donc ces bactérie fermentent le lactose et/ou le saccharose, et/ou la salicine. Par contre, sur le milieu EMB, les colonies apparaissent violet foncé, elles sont donc donc Lactose + ; les bactéries fermentent le lactose en produisant des acides. Les isolats 1CNTS et 20BM poussent sur le milieu Columbia additionné au sang humain, les colonies apparaissent grisâtre, donc l'hémolyse est incomplète (hémolyse alpha) (fig.10).

Pour le test de catalase, la réaction est positive qui se traduit par un dégagement gazeux, la catalase est une enzyme importante elle joue un rôle majeur dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène.

Pour l'oxydase, la réaction est positive et ça se traduit par un virage rapide du réactif de l'incolore au violet cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testé a oxydé la forme réduite incolore de dérivé N-méthylé du paraphénylène diamine en leurs forme oxydé semi-quinoniques rose violacé.

Clave a aussi isolé en 1973 une souche d'*Aromonas hydrophila* oxydase+, cette bactérie peut contaminée l'homme, elle est très répandue dans l'environnement, et le milieu aquatiques.

Depuis quelques années, le secteur de la santé publique reconnaît *A. hydrophila* comme un agent pathogène opportuniste; on l'a incriminé comme agent pathogène possible de la gastroentérite de la septicémie, de la cellulite, de la colite et de la méningite, et cette bactérie est isolée souvent dans des infections de plaies subies en milieu aquatique (Krovacek *et al.*, 1992 ; Gavriel *et al.*, 1998). On l'a aussi incriminé récemment dans des infections respiratoires (Janda et Abbott, 1998).

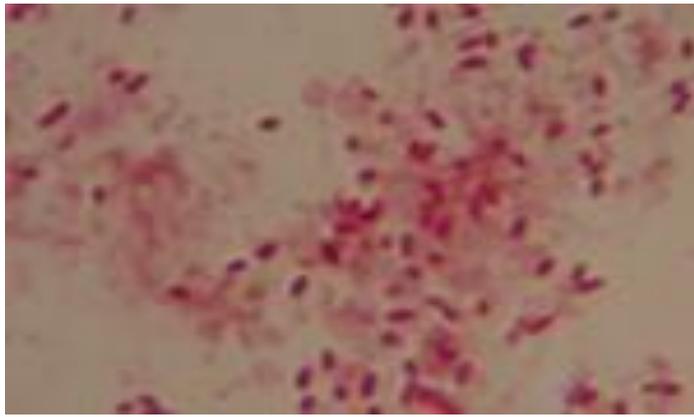


Figure (8): La coloration de Gram d'*Aeromonas hydrophila* (1CNTS).



Figure (9): Résultat de l'identification de l'isolat *Aeromonas hydrophila* par la galerie API 20 E.

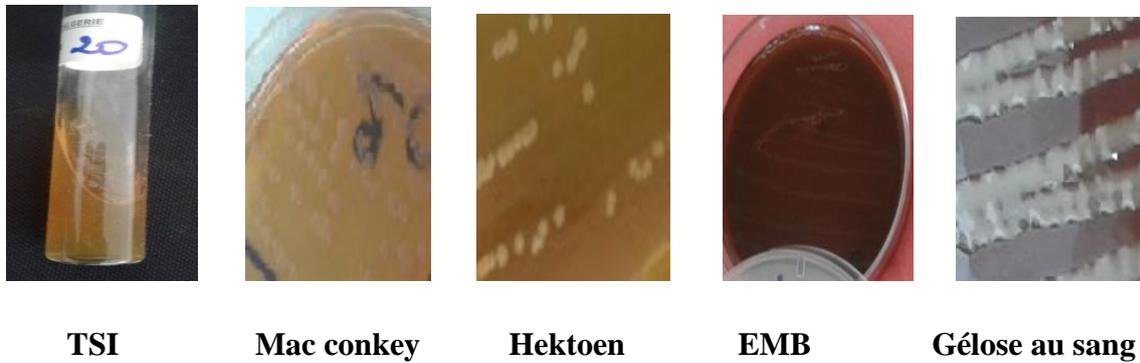


Figure (10): Isolement d'*Aeromonas hydrophila* sur les milieux sélectifs

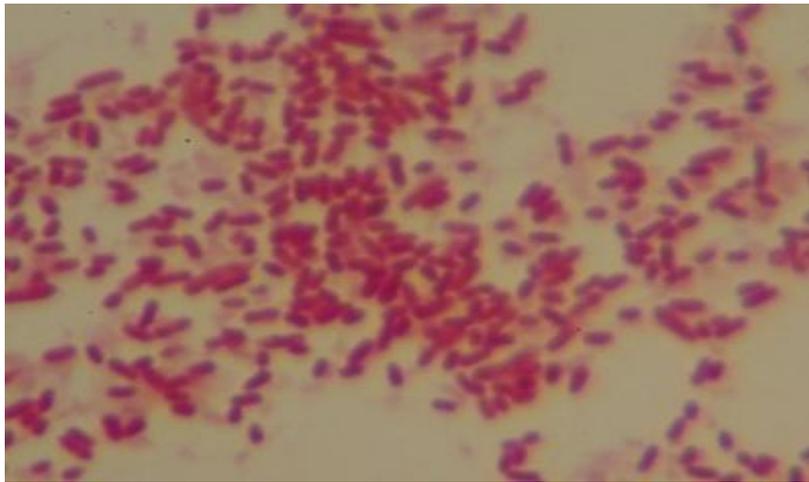


Figure (11): La coloration de Gram d'*Aeromonas hydrophila* (20BM).



Figure (12): Résultat de l'identification de l'isolat *Aeromonas hydrophila* par la galerie API 20 E.

Selon les tests biochimiques et morphologiques, la souche 1NTS a été identifiée comme *Enterobacter cloacae* 1NTS en consultant le catalogue d'identification des API 20 E.

Dans le milieu sélectif TSI virage de couleur du milieu vers le jaune a été remarqué pour l'isolat 1CNTS; donc saccharose+, Glucose+, Lactose+ indique la production d'acide sur la pente et dans le culot, avec production de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone) résultant des fermentations sucrées se traduit par l'apparition des bulles ou bien par la fragmentation de la gélose, et H₂S négatif, absence de noircissement dans le culot.

La bactéries 1NTS (fig.13 et 14) est cocobacille à Gram -, mobilité+, oxydase-, LDC-, ODC+, ONPG+, IND-, GEL-, VP+, Saccharose+.

sur milieu Mac conkey les colonies représentent sous forme de colonies rose et

Sur milieu Hektoen les Colonies sont de couleur saumon, Sur milieu EMB les Colonies sont verte foncé et Sur milieu Columbia additionné au sang humain, les colonies sont apparus grisâtre (hémolyse alpha) (fig.15).

Les bactéries de la famille *Enterobacter* se rencontrent souvent dans le sol et dans l'eau; *E. cloacae* peut se loger dans les intestins d'humains et d'animaux et peut aussi se trouver dans les eaux usées (Hart et Hawkey, 2006)

Enterobacter cloacae peut causer de nombreux types d'infections, y compris abcès cérébraux, pneumonie, méningite, septicémie et infection de plaies, infection des voies urinaires et des infections de la cavité abdominale ou des intestins (Farmer et al., 2007).

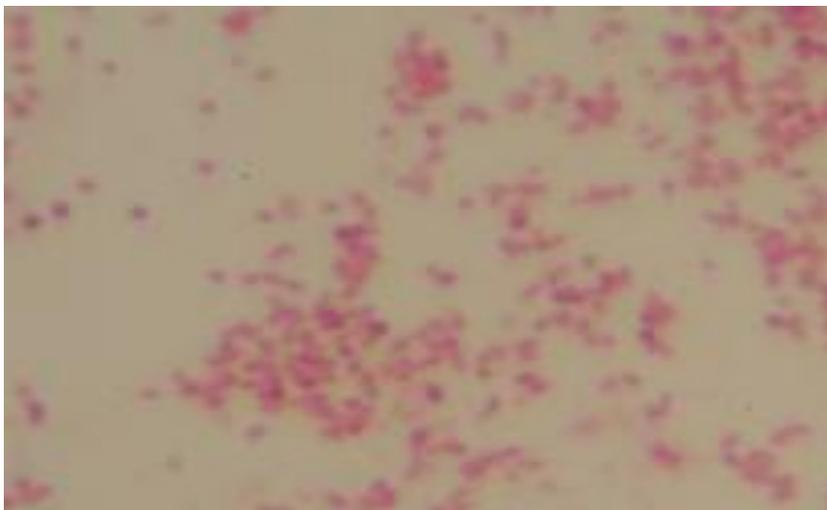


Figure (13): La coloration de Gram d'*Enterobacter cloacae* (1NTS).



Figure (14): Résultat de l'identification de l'isolat *Enterobacter cloacae* par la galerie API 20E



TSI



Mac conkey



Hektoen



EMB



Gélose au sang

Figure (15): Isolement de *Enterobacter cloacae* sur les milieux sélectifs

Selon les tests biochimiques et morphologiques la souche 20PBM a été identifiée comme *Vibrio fluvialis* 20PBM en consultant le catalogue d'identification des API20E.

La bactérie 20PBM est coccobacille à Gram- (fig.16 et 17), mobilité+, oxydase+, LDC-, ODC-, ONPG+, IND-, GEL+, VP-, Saccharose+.

Dans le milieu sélectif TSI virage de couleur du milieu vers le jaune a été remarqué pour l'isolat 1CNTS; donc saccharose+, Glucose+, Lactose+ indique la production d'acide sur la pente et dans le culot, avec production de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone) résultant des fermentations sucrées se traduit par l'apparition des bulles ou bien par la fragmentation de la gélose, et H₂S négatif, absence de noircissement dans le culot.

sur le milieu MacConkey les colonies sont de couleur rose et sur le milieu Hektoen les colonies sont de couleur saumon, Sur le milieu EMB les colonies sont vertes foncées; Sur le milieu Columbia additionné au sang humain, les colonies sont apparues grisâtres (hémolyse alpha) (fig.18).

Le genre *Vibrio* appartient à la famille des *Vibrionaceae*; quelques espèces possèdent un pouvoir pathogène, les unes contre les hommes, les autres contre les animaux aquatiques comme les poissons ou les batraciens.

Vibrio fluvialis provoque des infections digestives à la suite de consommation de coquillages (huîtres), crustacés, poissons d'eau salée crus ou insuffisamment cuits, cette bactérie est responsable de nombreuses toxi-infections au Japon où la consommation de poissons crus est très courante.

Ainsi les *Vibrio* pathogènes possèdent plus spécifiquement un « pouvoir toxique » : capacité de la bactérie à sécréter une toxine responsable de trouble dans le fonctionnement d'un organisme supérieur.

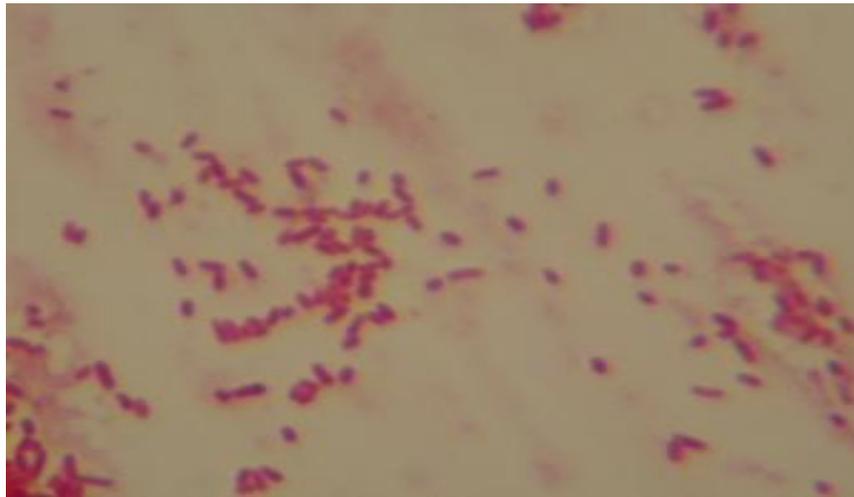
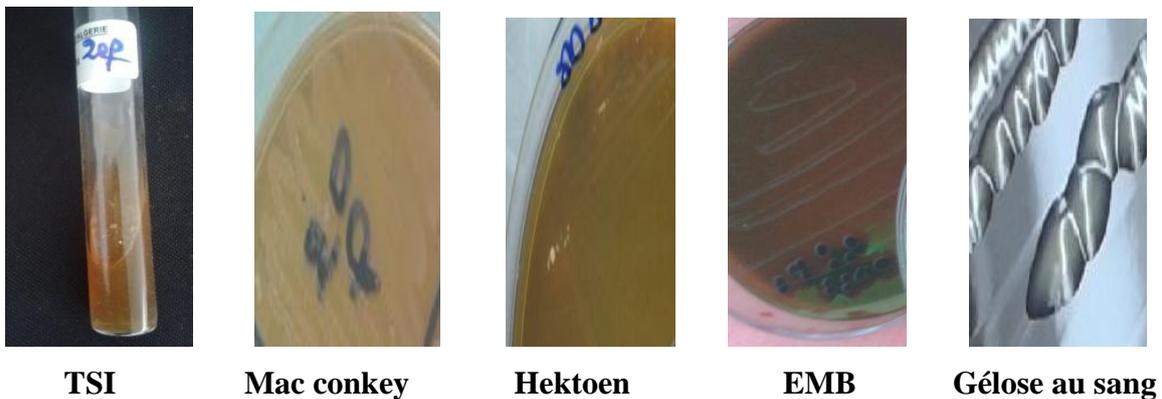


Figure (16): La coloration de Gram de *Vibrio fluvialis* (20 PBM).



Figure (17): Résultat de l'identification de l'isolat *Vibrio fluvialis* par la galerie API 20 E.



TSI **Mac conkey** **Hektoen** **EMB** **Gélose au sang**

Figure (18): Isolement de *Vibrio fluvialis* sur les milieux sélectifs

Selon les tests biochimiques et morphologiques la souche 4BM a été identifiée comme *Serratia rubidaea* en consultant le catalogue d'identification des API 20 E.

La bactéries 1NTS (fig.19 et 20) est à bacilles Gram -, mobilité+, oxydase-, LDC-, ODC-, ONPG+, IND-, GEL-, VP-, Saccharose+.Catalase+.

Dans le milieu sélectif TSI virage de couleur du milieu vers le jaune a été remarqué pour l'isolat 1CNTS; donc saccharose+,Glucose+,Lactose+ indique la production d'acide sur la pente et dans le culot, avec production de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone) résultant des fermentations sucrées se traduit par l'apparition des bulles ou bien par la fragmentation de la gélose, et H₂S négatif, absence de noircissement dans le culot.

sur milieu Mac conkey les colonies représentent sous forme de colonies rose et Sur milieu Hektoen les Colonies sont de couleur saumon, Sur milieu EMB les Colonies sont violet foncé et Sur milieu Columbia additionné au sang humain, les colonies sont apparus grisâtre (hémolyse alpha) (fig. 21). D'une manière générale, les espèces du genre *Serratia* sont isolées des plantes (légumes, champignons, mousses), du tube digestif des rongeurs, des insectes, de l'eau et du sol.

Cette bactérie est rarement pathogène, mais elle est fréquemment présente dans l'environnement hospitalier et certaines souches sont responsables d'infections nosocomiales (infections urinaires, suppurations diverses, septicémies, endocardites...).

Chez l'homme, elle est responsable :d'infections urinaires, d'infections respiratoires, de contaminations des plaies.

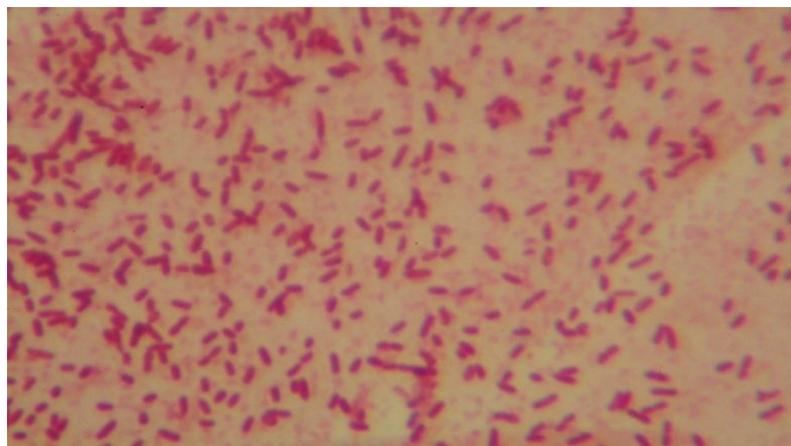


Figure (19): La coloration de Gram de *Serratia rubidaea* (4BM)



Figure (20): Résultat de l'identification de l'isolat *Serratia rubidaea* par la galerie API 20 E.

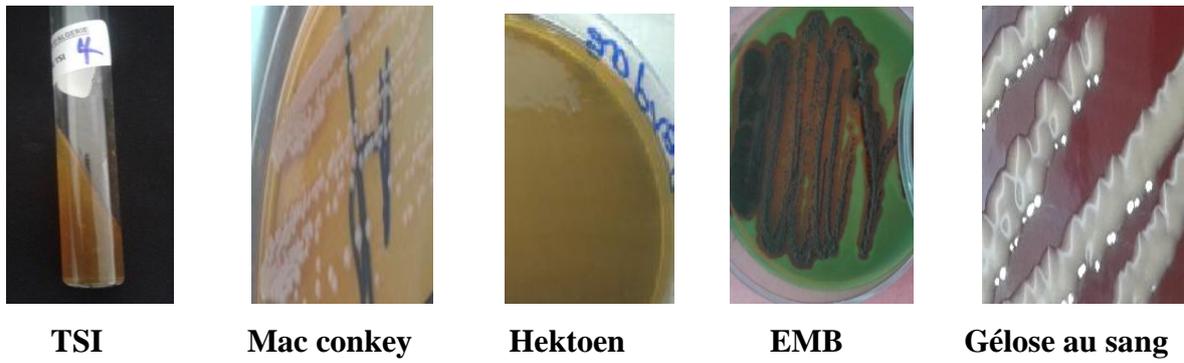


Figure (21): Isolement de *Serratia rubidaea* sur les milieux selectifs



Figure (22): Résultat de l'identification des souches références *Escherichia coli* 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* 27853 par la galerie API 20 E

Les résultats d'identification par la galerie API 20 E des souches inconnues (2CNTS, 7BM, 8BM , 19BM, 10BM) sont représentés dans le (tableau7).

Pour tous les isolats non identifiés, d'autre tests sont indispensables pour la désignation taxonomique qui doit être fondée sur une approche polyphasique complémentaire qui permette l'identification des microorganismes.

Tableau (7): Résultats d'identification des isolats non identifiés

Tests	2CNTS	7BM	8BM	19BM	10BM
ONPG	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	-	+
LDC	+	+	-	-	+
ODC	+	+	+	-	+
CIT	-	-	+	-	-
H2S	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-
VP	-	-	+	-	-
GEL	-	-	-	-	+
GLU	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+
INO	-	-	-	-	-
SOR	+	+	+	-	+
RHA	+	+	+	-	+
SAC	+	+	+	+	+
MEL	+	+	+	-	-
AMY	-	-	-	+	-

NO₂	+	+	+	+	+
N₂	-	-	-	-	-
Catalase	-	+	+	-	+
Oxydase	-	+	-	+	-
Hémolyse	α	α	α	α	α



**Conclusion et
Perspective**

Conclusion et Perspectives

Cette recherche restreinte sur les bactériophages a permis d'isoler à partir d'un échantillon d'eau usée de Mahjaret Ain smara, un phage sensible à une souche « non identifiée » isolée de l'échantillon de boue mixte prélevé de la station d'Ibn Ziad. Les trous dans le tapis bactérien opaque (plage de lyse) ont bien été visibles. Vu que la bactérie hôte de ce bactériophage a été perdue par repiquage répété, ou bien une souche résistante a prit le dessus et a fait disparaître ou a inactivé le principe lytique du phage, le seul moyen pour confirmer la présence du phage conservé est l'observation directe en microscopie électronique (la cryométrie de flux).

La méthode de plage de lyse peut être améliorée en effectuant d'autres techniques préalables comme :

- Les prélèvements doivent être effectués en plusieurs endroits et de façon mensuelle.
- Les suspensions phagiques doivent être concentrées en utilisant d'autres méthodes de filtration.
- Le criblage des bactériophages doit être effectué par un grand nombre d'isolats.
- Une recherche plus approfondie en utilisant des souches de références sensibles aux phages comme *Escherichia coli ATCC 11303* est nécessaire pour le criblage des bactériophages à partir des eaux usées et boues.

Les résultats de cette étude révèlent d'abord une certaine diversité des espèces bactériennes identifiées. Au total, 10 isolats ont été isolés à partir de deux sources différents (boue mixte, eau non traitée), cinq souches sont identifiées comme; *Aeromonas hydrophila* (1CNTS et 20BM); *Serratia rubidaea* (4BM); *Vibrio fluvialis* (20PBM) et *Enterobacter cloacae* (1NTS). Le reste des isolats sont des souches inconnues.

- Autres tests sont nécessaires pour confirmer les résultats d'identification, car la désignation taxonomique doit être fondée sur une approche polyphasique (phénotypique et génotypique) complémentaire qui permet l'identification du microorganisme jusqu'au niveau de l'espèce. L'identification doit être systématiquement couplée à un antibiogramme.

**Références
bibliographiques**

Références bibliographiques

Abrescia. N.G, Cockburn. J.J, Grimes. J.M, Sutton. G.C, Diprose. J.M, Butcher. S.J, Fuller .S.D, San Martín. C, Burnett. R.M, Stuart. D.I, Bamford. D.H, Bamford. J.K. (2004). Insights into assembly from structural analysis of bacteriophage PRD1. *Nature*; 432(7013); p 68-74.

Abrescia. N.G, Nicola. G, Jonathan M. Grimes, Hanna M. Kivelä, Assenberg. R, Geoff C. Sutton, Sarah J. Butcher, Jaana K.H. Bamford, . Bamford. D.H, Stuart. D.I. (2008). Insights into Virus Evolution and Membrane Biogenesis from the Structure of the Marine Lipid-Containing Bacteriophage PM2.

Ackermann. H. (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*. (154);p 245-251.

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

Agirrezabala. X, Velázquez-Muriel. J.A, Gómez-Puertas. P, Scheres. S.H, Carazo. J.M, Carrascosa. J.L. (2007). Quasi-atomic model of bacteriophage $\tau 7$ procapsid shell: insights into the structure and evolution of a basic fold. *Structure*;15(4);p 461-472.

Belin. D et Forterre, P. (2011). Les microbes menace ou espoir, 4èmes journées de Microbiologie de l'Université de Genève;p 26.

Berdjeb. L, jacquet. S. (2009). La viriosphère: quelle place dans le fonctionnement et l'évolution des écosystèmes aquatiques (partie 2) ; *Virologie*. Volume 13, Numéro 4;P 99-189.

Biswas. B, Adhya. S, Washart. P, Paul. B, Trostel. A.N, Powell. B, Carlton. R, Merrill. C.R. (2002). Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*; *Infection and Immunity*. (70);P 204–210.

Bousseboua, H. (2003). Cours de microbiologie générale: Université Mentouri, Constantine (Algérie) ;p 28.

Brüssow. H. (2001): Phages of dairy bacteria. *Annual Review of Microbiology*, (55);P 283–303.

Carson. L, Gorman. SP, Gilmore. B.F. (2010). The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. FEMS Immunology and Medical Microbiology. (59);P 447–455.

Dublanchet. A, Fruciano. E. (2008). Brève histoire de la phagothérapie. rue Céline-Robert, 94300 Vincennes. École des hautes études en science sociales, Paris, France; P 46–54.

Dublanchet. A. (2009). Des virus pour combattre les infections - la phagothérapie : renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques. Favre;P240.

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

Farmer. J. J, Boatwright, K. D., and Janda, J. M. (2007). Enterobacteriaceae: Introduction and identification. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical microbiology*;P 649-669, Washington, DC, USA: ASM press.

FDA (Food additives permitted for direct addition to food for human consumption): Listeria-specific bacteriophage preparation In: U.S. Food and Drug Administration [en ligne]. [<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=172.785>] Consulté le 25/11/13).

Fruciano. E. (2011). La phagothérapie: émergence d'une idée controversée et logique d'un échec (1917-1949). *L'Atelier du Centre de recherches historiques* [En ligne], mis en ligne le 05 décembre 2012. URL : <http://acrh.revues.org/4805> ; DOI : 10.4000/acrh.4805. article. Consulté le 27 mars 2014.

Gavriel. A.A, Landre. J.P.B et Lamb. A.J. (1998). Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland, journal applied microbiology, 84;p 383-392.

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

Grégory. R, Meyer. J. (2002). Bactériophages, nouvelle perspective dans le traitement des maladies infectieuses? Institut de Médecine Dentaire Préventive et de Microbiologie Buccale, Université de Bâle. revue mensuelle suisse d'odonto stomatologie, Vol 112;P 643-644.

Hantula J. Kurki A, Vuoriranta P and Bamford D. (1991). Ecology of bacteriophages infecting activated sludge bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57; p 2147-2151.

Hart, C. A. (2006). *Klebsiell, Citrobacter, Enterobacter* and *Serratia* spp. In S. H. Gillespie et Hawkey P. M (Eds.), *Principles and practice of Clinical Bacteriology*;P 377- 386. England, UK: John Wiley and Sons Ltd.

Høiby. N, Bjarnsholt. T, Givskov. M, Molin. S, Ciofu. O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*. (35);P 322–332.

Housby. J.N, Mann. N.H. (2009). Phage therapy. *Drug discovery today*, (14); p 536–540.

Inal. J.M. (2003). Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. (51);P 237–244.

Janda. J.M. et Abbott. S.L. (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clinical Infectious Disease*, 27;P 332-344.

Khan. M.A, Satoh. H, Mino. T, Katayama. H, Kurisu. F and Matsuo. T. (2002). Bacteriophages isolated from activated sludge processes and their polyvalency. *Water Science Technology*, 46(1-2);p 39-43.

Krovacek. K, Faris. A, Baloda. S.J, Lindberg. T, Peterz. M et Mansson. I. (1992). Isolation and virulence profiles of *Aeromonas* spp. from different municipal drinking water supplies in Sweden. *Journal of Food Microbiology*, 9(3);p 215-222.

Kutateladze. M, Adamia. R. (2008). Phage therapy experience at the "Eliava Institute". *Médecine et Maladies Infectieuses*. n° 8, vol. 38;P 426-430.

Leclerc. H et Mossel D. A. A. (1989). **Microbiologie**, le tube digestif l'eau et les aliments, Paris: Doin éditeurs.

Leclere. H, Gaillard. J.L, Simonet. M (1995). *Microbiologie générale: la bactérie et le monde bactérien*, Edition DOIN éditeurs, Paris;p 29-39

Loeffler. J.M, Nelson. D, Fischetti. V.A. (2001). Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science*. (294);p 2170–2172.

Magali. C, Elisabeth. B.S. (2014). La phagothérapie: historique et potentielle utilisation contre les infections à bactéries multirésistantes;P 122-123.

Martineau. A (2009). Isolement et caractérisation de bactériophages comme moyen de lutte naturel contre les infections nosocomiales, Université de Montréal, Faculté des études supérieures. Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine.

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

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

Miedzybrodzki. R, Wojciech. F, Weber-Dabrowska. B, Andrzej. G. (2007). *Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment*, *Postępy Higieny I Medycyny Doświadczalnej* (Online). vol. 61;P 461-465.

Nelson. D,Loomis. L, and Fischetti. V. A. (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; published ahead of print March 20, 2001, doi:10.1073/pnas.061038398.

Personnic. S, Duhamel. S, Bettarel. Y, Sime-Ngando. T, Jacquet. S. (2006). Les virus planctoniques: un compartiment biologique clé des milieux aquatiques, *Courrier de l'environnement de l'INRA* n°53, Université Blaise Pascal, Marseille;p 19.

PNAS: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (2001), 98(7);P 4107-4112

Preux. O. (2013). Assemblage et maturation de la capsid du bactériophage T5 : analyse des processus d'expansion et de décoration, structure, fonction et ingénierie des protéines, paris-sud; p 10-193.

- Rivasi. M. (2013). La phagothérapie une solution complémentaire aux antibiotiques. Députée européenne Europe Écologie Les Verts du grand Sud-Est;P 8.
- Roshah. G, Karin. V, Kerstin. F, Lars. L. (1993).The refined structure of bacteriophage MS2 at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*; 234(3);p 620-639.
- Scott. A.E, Timms. A.R, Connerton. P.L, Carrillo. C.L, Radzum. K.A, Connerton. I.F. (2007). Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. *Plos pathogens*. (3);P 119.
- Sekhsokh. Y, Arsalane. L, El Ouenass. M, Doublali. T, Bajjou. T, Lahlou. I. A, Bactériémie à *Serratia rubidaea*, *Médecine et maladies infectieuses*; p 3.
- Sozzi. T, Gnaegi. F, D'aminco. N, Hose. H. (1982). Difficultés de fermentation malolactique du vin dues à des bactériophages de *Leuconostoc oenos*. *Revue Suisse de viticulture arboriculture et horticulture*. Vol. 14(1);p 17-23.
- Thiel. K. (2004). *Nature Biotechnologie*, c'est-à-dire à l'encontre de bactéries ciblées, multi-résistantes ou émergentes, Vol. 22;p 31- 36.
- Thingstad, T. and Lignell, R. (1997). Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand, *aquatic microbial ecology*, (13);P 19–27.
- 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.
- Turner. P.E, Chao. L. (1999). Prisoner's dilemma in an rna virus. *Letter to nature*. (398);P 441-443. *Virology*, (152);P 227-243.
- Waes. G.M, Bossuyt. R.G. (1984). Impedance measurements to detect bacteriophage problems in Cheddar cheese-making. *Journal of Food Protect*. (47);P 349–351.
- Weinbauer. M.G, (2004). Ecology of prokaryotic viruses, *FEMS Microbiology Review* 28;p 127-181.
- Wilhelm, S. W. and Matters. (2008). Freshwater and marine viroplankton: a brief overview of commonalities and differences, *Freshwater Biology*, (53);P 1076–1089.

Wommack. K.E, Colwell. R.R. (2000). Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. (64);p 69-114.

Yoichi. M, Abe. M, Miyanaga. K, Unno. H, Tanji. Y. (2005). Alteration of tail fiber protein gp38 enables T2 phage to infect *Escherichia coli* O157:H7 *Journal of Biotechnology*; 115(1);p 101-107.

Zillig. W, Gropp. F. (1986). Archaeobacterial Virus Host Systems. *Systematic and Applied Microbiology*. 7(1); p 58-66.

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

Annexes

Annexe1

1- Bouillon nutritif

Tryptone	10g
Extrait de viande	5g
Chlorure de sodum	5g
Eau distillée.....	1L
PH.....	7.2

2- Eau Peptonée

Peptone exempte d'indole.....	10g
Chlorure de sodum.....	500g
Eau distillée.....	1L
PH.....	7.2

3- EMB

Peptone de viande ou de gélatine.....	10 g
Lactose.....	10 g
Phosphate dipotassique.....	2 g
Eosine jaunâtre.....	0,4 g
Bleu de méthylène.....	0,067 g
Agar (gélose).....	13,5 g

4- Gélose au sang frais

Mélange spécial de peptones.....	23g
amidon	1g
chlorure de sodium.....	5 g
agar.....	10 g
sang	50 mL
PH.....	7,3

5- Gélose Nutritive

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

Agar.....	15g
Eau distillée.....	1L
PH.....	7.2

6- Hecktoen (géluse)

Protéase. Peptone.....	12g
Extrait de levure.....	3g
Lactose.....	12g
Saccharose.....	12g
Salicine.....	2g
Citrate de fer et d'ammonium.....	1.5g
Sels biliaires.....	9g
Fuschine acide.....	0.1g
Bleu de Bromothymol.....	10.056g
Chlorure de sodium.....	5g
Thiosulfate de sodium.....	5g
Agar.....	13g
PH.....	7g

7- Mac conkey

Peptone.....	20,0 g
lactose	10,0 g
sel biliaire.....	1,5 g
crystal violet.....	0,001 g
rouge neutre.....	0,05 g
chlorure de sodium	5,0 g
Agar.....	15,0 g

8- Tampon SM

NaCl	5.8 g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	2.0 g
1M Tris HCl pH7.4.....	50 ml
2% gelatin.....	5 ml
Eau distillée.....	1L

Réactifs:

TDA

James

VP1+VP2

NIT1+NIT2

Zinc

Huile de paraffine

RM

Kovax

Annexe 2

Principales entreprises élaborant (ou en cours d'élaboration) des suspensions commercialisables à base de bactériophages (Housby et Mann, 2009).

Company	Primary location	Primary product area	Phage technology	Stage of development
BigDNA (http://www.bigdna.com/)	Edinburgh, UK	Bacteriophage DNA vaccination via phage encoded DNA delivered intravenously or orally	Bacteriophage DNA vaccines	R&D
Blaze Venture Technologies (http://www.blaze-vt.com/)	Hertfordshire, UK	Phage immobilisation technology, MRSA, licensing	Immobilisation onto solid supports	Licensing
JSC Biochimpharm (http://www.biochimpharm.ge/)	Tbilisi, Republic of Georgia	Various phage lysates are mixed and used for intestinal problems, for example, Dysentery, salmonellosis, dyspepsia, colitis and enterocolitis and for bacterial infections.	Whole phage	Phage tablet or liquid production facility
Biopharm L Limited (http://www.biopharm.ge/) that owns Advanced Biophage Technologies (http://advancedbiophagetechnologies.com/)	Tbilisi, Republic of Georgia	Products include Pyobacteriophage and Intesti-bacteriophage that are mixtures of phage lysates for bacterial intestinal and infection control—sold to pharmacies as Over The Counter drugs.	Whole Phage, patented and licensed.	Liquid and tablet phage products
BioControl (http://www.biocontrol-ltd.com/)	Southampton, UK	<i>Pseudomonas</i> infections of the ear	Whole Phage	Phase II trial completed
Biophage Pharma Inc. (http://www.biophagepharma.net/)	Montreal, Canada	Environmental therapies and diagnostics, phage products geared towards antibacterial resistance problems and as a weapon against bioterrorism	Whole phage	Research and development
EBI Food Safety (http://www.ebifoodsafety.com/)	Wageningen, Netherlands	Food Safety. A cocktail of phage against <i>Listeria</i>	Whole Phage	LISTEX P100™, product available
Gangagen (http://www.gangagen.com/)	Bangalore, India and Palo Alto, California, USA	<i>Staphylococcus aureus</i>	Whole Phage	Pre-clinical
Innophage (http://www.innophage.com/)	Porto, Portugal	Environment, Cosmetic and Medical bacteria infections	Unknown	Unknown
Intralix (http://www.intralix.com/)	Baltimore, USA	Food safety, <i>Listeria</i>	Whole Phage	FDA and EMEA approval on ready to eat meats and cheeses
Neurophage Pharmaceuticals (http://www.neurophage.com/)	Cambridge, Massachusetts USA	Brain changes, for example Alzheimers	Unknown	Start up company
Novolytics (http://www.novolytics.co.uk)	Coventry, UK	Prevention and treatment of MRSA infection	Whole Phage	Pre-clinical
Omnilytics (http://www.omnilytics.com/)	Salt Lake City, Utah, USA	AgriPhage is a natural, safe, effective treatment that prevents and controls harmful bacteria on tomato and pepper plants	Unknown	Product available
Phage-Biotech (http://www.phage-biotech.com/)	Rehovot, Israel	Anti- <i>Pseudomonas</i> infectives	Whole Phage	R&D
Phico Therapeutics (http://www.phicotherapeutics.co.uk/)	Cambridge, UK	Anti MRSA products	Genetically Modified Organism used as a delivery vehicle	Pre-clinical
Phage International (http://www.phageinternational.com/)	San Ramon, California, USA; Trinidad, West Indies and Tbilisi, Republic of Georgia	Phage treatment centre	Whole Phage	Distributor
Special Phage Holdings Pty Ltd (http://www.specialphageservices.com.au/)	Brookvale, NSW, Australia	R&D	Whole phage	Prototype products, some entering clinical trials
Targanta Therapeutics (http://www.targanta.com/)	Cambridge, Massachusetts, USA	Antibiotics	Phage peptides	R&D
Viridax (http://www.viridax.com/)	Boca Raton, Florida, USA	<i>Staphylococcal aureus</i> —respiratory, systemic, topical, wound care	Whole Phage	Pre-clinical

Résumé

ملخص:

الفيروسات البكتيرية موجودة في جميع أنحاء المحيط الحيوي. في الواقع، فهي في كل مكان، ولكن بكميات أكبر في البراز والتربة ومياه الصرف الصحي.

الغرض من هذه الدراسة هو عزل فاجات وتحديد البكتيريا العائل لها من عينة مجاري مياه اخدت من خط انبوب متحطم لمياه الصرف الصحي، والمتواجد بمحجرة عين السمارة في ولاية قسنطينة، وعينة اخرى اخدت من وحل محطة معالجة مياه الصرف الصحي بابين زياد. استعمل إختبار المناطق الرائقة لتقدير حساسية العزلات البكتيرية لمعلق الفاج. عشرة (و البيئات الانتقائية) API 20E مستعمرات تم تشخيصها بإختبارات الايضية و المظهرية (دراسة نظام

خلال هذا البحث، وجد ان هناك كانت سلالة واحدة غير مشخصة عائل للفاج المعزول، و قدر عدد المناطق الرائقة على عند 4م. إختفى هذا SM / مل. قطعت المناطق الرائقة وتم حضنها في المحلول الفزيولوجي PFU طبق بتري بـ 90 النشاط التحللي بعد التتمية المتكررة للعزلات البكتيرية.

وأشارت نتائج الاختبارات المظهرية أن غالبية العزلات هي عصيات أو عصورات سالبة الجرام، وشخصت على انها

Aeromonas hydrophila (1CNTS and 20BM), *Serratia rubitaea* (4BM)

Vibrio fluvialis (20PBM) و *Enterobacter cloaceae* (1NTS).

كسلالة مرجعية حساسة لغريلة الفاجات من عينات *E. coli* ATCC 11303 مزيد من البحوث ضروري باستخدام اخرى من مياه الصرف الصحي والوحل. يتطلب الكشف عن البكتريوفاج المعزول استعمال المجهر الإلكتروني.

الكلمات الرئيسية: البكتريوفاج مياه الصرف الصحي، الوحل، محطة معالجة مياه الصرف الصحي ابن زياد، المناطق

، *Aeromonas hydrophila* ، *Serratia rubitaea*، الرائقة، محجرة عين السمارة،

Vibrio fluvialis و *Enterobacter cloaceae*

Abstract:

Bacteriophages are present throughout the biosphere. Indeed, they are everywhere, but in larger amounts in feces, soil and sewage.

The purpose of this study is to isolate phages and identify their host bacteria from influent of a defective connection of a pipeline located at Mahjaret Ain-Smara in the wilaya of Constantine and from sludge sample collected from wastewater treatment plant of Ibn Ziad. The sensitivity of isolates to phage suspension was tested by the method of plaque assay and ten strains were identified according to their morphological and biochemical profiles (API 20E and selective media).

During this research, one unidentified strain was sensitive to phage. The number of plaque assay was 90 PFU / ml. The isolated plaques were cut and stored in SM buffer at 4°C. This lytic activity disappeared after the confirmation test by repeated subculture.

The results of phenotypic tests indicated that the majority of the isolates were Gram negative bacilli or coccobacilli identified as *Aeromonas hydrophila* (1CNTS and 20BM), *Serratia rubitaea* (4BM), *Vibrio fluvialis* (20PBM) and *Enterobacter cloacae* (1NTS).

Further research using *E. coli* ATCC 11303 as type strain sensitive to phages is necessary for screening bacteriophages from sewage and sludge samples. The visualization of the isolated phage requires obviously electronic microscope.

Keywords: Bacteriophage, wastewater, sludge, wastewater treatment plant of Ibn-Ziad, plaque assay, Marjaret Ain-Smara, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia rubitaea*, *Vibrio fluvialis*, *Enterobacter cloacae*

Résumé

Les bactériophages sont présents dans l'ensemble de la biosphère. En effet, ils sont présents partout, mais en quantité plus importante dans les excréments, le sol et les eaux d'égout.

Le but de cette étude est d'isoler des phages et identifier leurs bactéries hôtes à partir d'affluent d'un raccordement défectueux d'une canalisation située à Mahjaret Ain Smara, à la wilaya de Constantine et à partir de boues de la station d'épuration d'Ibn-Ziad. La sensibilité des isolats à la suspension phagique a été testée par la méthode de plage de lyse, et dix souches ont été identifiées selon leurs profils morphologiques et biochimiques (API 20^E et milieux sélectifs).

Durant cette recherche, une seule souche non identifiée s'est révélée sensible au phage. Le nombre de plage de lyse était de 90 UFP/ml. Les plages ont été découpées et conservées dans le tampon SM à 4°C. Cette activité lytique a disparu après le test de confirmation par repiquage répété.

Les résultats des tests phénotypiques indiquent que la majorité des isolats sont des bacilles ou coccobacilles Gram négative, identifiés comme *Aeromonas hydrophila* (1CNTS et 20BM), *Serratia rubitaea* (4BM), *Vibrio fluvialis* (20PBM), *Enterobacter cloacae* (1NTS).

Une recherche plus approfondie utilisant *E. coli* ATCC 11303 comme souche de référence sensible aux phages est nécessaire pour le criblage des bactériophages à partir des eaux usées et boues. La visualisation du phage isolé impose évidemment le microscope électronique.

Mots clés: Bactériophage, eaux usées, boue, station d'épuration d'Ibn-Ziad, plage de lyse. *Aeromonas hydrophila*, *Serratia rubitaea*, *Vibrio fluvialis*, *Enterobacter cloacae*.

Thème : Isolement de bactériophages à partir des eaux usées et identification de leurs bactéries hôtes

Nature du diplôme: Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

Résumé:

Les bactériophages sont présents dans l'ensemble de la biosphère. En effet, ils sont présents partout, mais en quantité plus importante dans les excréments, le sol et les eaux d'égout.

Le but de cette étude est d'isoler des phages et identifier leurs bactéries hôtes à partir d'affluent d'un raccordement défectueux d'une canalisation située à Mahjaret Ain Smara, à la wilaya de Constantine et à partir de boues de la station d'épuration d'Ibn-Ziad. La sensibilité des isolats à la suspension phagique a été testé par la méthode de plage de lyse, et dix souches ont été identifiées selon leurs profils morphologiques et biochimiques (API 20^E et milieux sélectifs).

Durant cette recherche, une seule souche non identifiée s'est révélée sensible au phage. Le nombre de plage de lyse était de 90 UFP/ml. Les plages ont été découpées et conserver dans le tampon SM à 4°C. Cette activité lytique a disparu après le test de confirmation par repiquage répété.

Les résultats des tests phénotypiques indiquent que la majorité des isolats sont des bacilles ou coccobacilles Gram négative, identifiés comme *Aeromonas hydrophila* (1CNTS et 20BM), *Serratia rubitaea* (4BM), *Vibrio fluvialis* (20PBM), *Enterobacter cloaceae* (1NTS).

Une recherche plus approfondie utilisant *E. coli* ATCC 11303 comme souche de référence sensible aux phages est nécessaire pour le criblage des bactériophages à partir des eaux usées et boues. La visualisation du phage isolé impose évidemment le microscope électronique.

Mots clés: Bactériophage, eaux usées, boue, station d'épuration d'Ibn-Ziad, plage de lyse. *Aeromonas hydrophila*, *Serratia rubitaea*, *Vibrio fluvialis*, *Enterobacter cloaceae*

Lieu de travail : Laboratoire de Biologie Moléculaire 'Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie'

Membre de jury:

Président: Sekhri-Arafat N.

Maitre de conférences

Université de Constantine1

Encadreur: Boubekri K.

Maitre de conférences

Université de Constantine1

Examinatrice: Bouzeraib L.

Maitre Assistante

Université de Constantine1