



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



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 :

Etudes sur les bactériophages du sol et leurs méthodes d'isolement

Présenté et soutenu par : *MASSALI Fatima Zahra*

Le : **04/07/2016**

BOUANINBA Samia

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).

Tutrice : TIR Radja.

*Année universitaire
2015 - 2016*

Remerciements

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

Ce travail a été réalisé, au niveau du laboratoire de la biologie moléculaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des frères Mentouri-Constantine».

remercions profondément, notre encadreur Madame Boubekr iKarima maître de Conférences à l'université de Constantine pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ce mémoire, nous la remercions pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'elle a consenti durant la réalisation de ce mémoire. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.

Nous tenons à remercier également notre présidente de jury Madame Bouzraieb Latifa maître assistante à l'université Mentouri de Constantine. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect.

Nos remerciements s'adressent aussi à Madame Guergouri Ibtissem maître assistante à l'université Mentouri de Constantine pour l'intérêt qu'elle a porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par ses propositions importantes.

Nous adressons également un profond remerciement à notre doctorante Tir Radja, 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.

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

Nous remercions sincèrement Mr Haddi, Mr benhaizia de nous avoir accueillies dans leur laboratoire et d'avoir mis à notre disposition tous les moyens techniques et scientifiques afin de pouvoir réaliser nos expérimentations.

Nous exprimons notre sincère gratitude, à tous les doctorantes du laboratoire de biologie moléculaire et biotechnologie qui à un moment ou un autre nous ont conseillées et nous ont aidées: Meriane Ilhem, Laila vous étiez toujours présents à répondre à nos besoins et à nous aider du mieux que vous le pouviez et sans attendre de nous le moindre merci.

Merci à tous les ingénieurs des laboratoires de Biologie moléculaire, microbiologie et biochimie, pour leur aide, patience et générosité, merci à vous ; Samia, Nadia, Nabila, Nadjet et sadak, Amar, Nabil.

Nous remercions le propriétaire du verger de El-melliya, qui nous a permis de prélever les échantillons nécessaires pour notre étude. Nous le remercions pour son humilité et pour son chaleureux accueil.

Ainsi que tous ceux qui ont participé, de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Merci à vous

Dédicaces

Je dédie ce travail

A ma mère Nacira, l'être le plus chère en ce monde que je porte ou que j'aime.

A mon père Kamel le plus gentil. Que Dieu vous récompense et vous garde auprès de moi ici et dans l'au-delà.

A mes chers frères et sœurs : Djalol, Zino, Hossam, Youssef, Nassima, Nadjoi, Laila, Widad, Omaima

A mon fiancé Fareset toute ma famille en particulier : mon oncle Brahim, ma tante Saïda, Kawtar, Rayhan, AbdRaouf.

A toutes les personnes qui sont très chères à mon cœur et mes amies avec les quels j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur Pour leurs encouragements et leurs soutiens. A tous ceux qui ne sont pas mentionnés dans ce modeste mémoire, mais qui sont dans notre cœur.

Fatima. z

Dédicaces

Je dédie ce travail

*A mon père unique dans son genre Hocine et à ma
chère maman Fatiha que Dieu me les gardent
et Protègent.*

A mes sœurs : Hanen, Kenza, Houda et Khawla.

*Je remercie tous mes amis proches : Selma, Amel,
Ahmed, Aycha, Zouhir, Afafpour leur amitié sincère,
leur disponibilité, leur gentillesse sans bornes.*

A toute ma famille

Samia

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	iii
Liste des figures	v
Liste des tableaux	vii
Introduction	01
Recherche bibliographique	03
1. La biologie des bactériophages	03
1.1. Définition d'un bactériophage	03
1.2. Structure et morphologie des bactériophages	03
1.3. Classification des bactériophages	04
1.4. La relation phage-cellule hôte	11
1.5. Les mécanismes de défense de la cellule hôte et la réponse du phage.....	12
1.5.1. Prévention de l'adsorption	12
1.5.2. L'antirestriction	12
1.5.3. Systèmes d'infection ratée	13
1.5.4. Le mécanisme de défense moléculaire bactérie	13
a- La biologie du systèmeCRISPR/Cas	13
b- Le fonctionnement des systèmesCRISPR.....	14
c- L'intérêt du système CRISPR	16
1.6. Stabilité des bactériophages face aux conditions physico-chimiques du milieu...	18
1.7. Cycle de vie des bactériophages	18
1.7.1. L'infection lytique des phages virulents.....	19
1.7.2 L'infection lysogéniques et les phages tempérés	21
1.8. Ecologie des bactériophages	23
a- Habitats	23
b- Impact de la lyse par les bactériophages sur l'écologie bactérienne ...	23
1. 9. Les domaines d'application des bactériophages	24
2. La phagothérapie	27
2.1. Définition de la phagothérapie	27
2.2. Histoire de la phagothérapie	27
2.3. Relation phage –antibiotique	28
2.4. Les avantages et les inconvénients de la thérapie phagique et d l'antibiothérapie	29

Matériel et Méthodes	31
1. L'échantillonnage	31
2. La filtration	32
3. Le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile FTAM	33
4. La purification et la conservation des souches isolées	33
5. La Technique de spot test	34
6. La technique des plages de lyse	34
7. L'identification phénotypique des isolats	35
Résultats et discussion	39
Conclusion et Perspectives	54
Références bibliographiques	55
Annexes	65
Résumés	67

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADH:** Arginine Dihydrolase
- ADN :** Acide Disoxiribonuclique
- ADNdb :** Phages à ADN double-brin
- ADNsb :** Phages ADN simple-brin
- AMC :** Amoxicilin+Clavulanic Acid
- AMX:** Amoxicilline
- AMY:** Amygdaline
- AN :** Amikacine
- ARA:** Arabinose
- ARN :** Acide Ribonuclique
- ARNdb :** Phages à ARN double-brin
- ARNsb :** Phages à ARN simple-brin
- ARNt :** Acide Ribonuclique de transfert
- ATB :** Antibiotique
- C :** Chloramphénicol
- CAS 9 :** CRISPR-Associated proteinnuclease 9
- CAS :** CRISPR-Associated genes
- CIT:** Citrate
- CMI:** Concentration Minimaled'Inhibition
- CRISPR :** Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
- CrRNA :** CRISPR ARN
- CS :** Colistine
- CTX:** Cefotaxime
- DMS :** Sulfure de dimethyle

DSB :Double Strand Breaks
FTAM : Flore Totale Aérobie Mésophile
GEL: Gelatin
GLU: Glucose
H₂S: Sulfate d'Hydrogène
ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses
IND: Indole
INO: Inositol
IPM: Imipénèm
K: Kanamycine
LB: LuriaBertani
LDC: Lysine Décarboxylase
LPS: Lipopolysaccharides
MAN: Mannitol
MEL: Mélobiose
Mtase :Méthyltransféras
NCBI :Natal Center for Biotechnology Information
Nit 1:Nitrate 1
Nit 2:Nitrate 2
Nts :Nucleiotides
ODC: Ornithine Décarboxylase
ONPG: Ortho-NitroPhényl-β-Galactoside
PAM :protospacerAssociated Motif
PAS :Phage-Antibiotic-Synergy
PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis
PIP: Pipéracilline
PLR :Prtiens de Liaison au Recepteur
PT : Pristinamycine

RA : Rifampicine

RHA: Rhamnose

R-M :Restriction-Modification

SAC: Saccharose

SM : Solution Mère

SOR: Sorbitol

SP :Spiramycine

SPT :Spectinomycine

TDA: Tryptophane Désaminase

tracrRNA : ARN trans-activateur

TSI: **Triple** Sugar Iron Bio-rad

US : Unités de Structure

UVC : Ultraviolet de groupe c

VP: Voges-Proskauer

LISTE DES FIGURES

Figure 01 :	Lebactériophage et ses principales composantes	04
Figure 02 :	Familles de bactériophages.....	05
Figure 03 :	Morphologie des 3 familles de <i>Caudovirales</i>	06
Figure 04 :	Les phages T4 adsorbés à la surface d' <i>Escherichia coli</i> , vus au microscope électronique.....	11
Figure 05 :	Caractéristiques du locus CRISPR dans l'organisme procaryote	14
Figure 06 :	Le mécanisme de CRISPER-Cas type II chez <i>Streptococcus pyogenes</i>	15
Figure 07 :	Le mécanisme de CRISPER-cas9	16
Figure 08 :	Cycle de réplication d'un bactériophage	21
Figure 09 :	Schéma général du cycle de vie du bactériophage tempéré λ	22
Figure 10 :	Tamisage du sol	31
Figure 11 :	Les étapes de préparation de l'échantillon avec la filtration par le système de filtration, (Wheaton, USA)	32
Figure 12 :	La technique des cadrans	33
Figure 13 :	La technique de spot test	34
Figure 14 :	La suspension phagique mise en contact avec la bactérie S4 tester	35
Figure 15 :	L'apparition de petit zoned'inhibition sur le spot (S4).....	41
Figure 16 :	Réaction catalasepositive	43
Figure 17 :	Réaction oxydasepositive	43
Figure 18 :	L'observation microscopique (1000X à immersion) après coloration de Gram de la souche S1, Gram (+) filamenteus	46
Figure 19 :	Résultat de l'identification de l'isolat S1 par la galerie API 20E.....	46
Figure 20 :	L'observation microscopique (1000X à immersion) après coloration de Gram de la souche S3, Gram (+) bacilles	47
Figure 21 :	Résultat de l'identification de l'isolat S3 par la galerie API 20E	47
Figure 22 :	L'observation microscopique (1000X à immersion) après coloration de Gram de la souche S4, Gram (-) cocci en amas	48
Figure 23 :	Résultat de l'identification de l'isolat S4 par la galerie API 20E	48

Figure 24 :	L'observation microscopique (1000X à immersion) après coloration de Gram de la souche S5, Gram (-) bacilles fins	49
Figure 25 :	Résultat de l'identification de l'isolat S5 par la galerie API 20E	49
Figure 26 :	Les catégories cliniques S, I, R selon les valeurs critiques (Vincent Jarlier DIU Mal Inf)	51
Figure 27 :	L'antibiogramme de la souche <i>Nocardia</i> (S1)	52
Figure 28 :	L'antibiogramme de la souche <i>Staphylococcus</i> (S4)	53
Figure 29 :	L'antibiogramme de la souche <i>Micobactérium</i> (S5)	53

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 :	Propositions de taxonomie décrivant de nouveaux taxons (genres, sous-familles, familles) soumis à l'ICTV	07
Tableau 02:	La résistance bactérienne en fonction des étapes du cycle répliatif viral et L'adaptation des bactériophages en revanche	17
Tableau 03:	Les avantages et les inconvénients de la thérapie phagique et de l'antibiothérapie	29
Tableau 04:	Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM)	40
Tableau 05:	Les résultats de l'étude morphologique des souches isolées	42
Tableau 06:	Résultats des tests biochimiques	44
Tableau 07:	Les résultats de la galerie API20E les souches à Gram positif	44
Tableau 08:	Les résultats de lecture d'antibiogramme des souches isolées	50
Tableau 09:	Les profils de résistance des souches caractérisées	51

Introduction

INTRODUCTION

Les phages sont définis comme des parasites intracellulaires obligatoires et absolus qui infectent les bactéries (Twort, 1915;d'Herelle, 1917). Ils ont été découverts successivement par Frederick W. Tworten 1915 qui observe la transformation vitreuse de certaines colonies de *Micrococcus* par un agent transmissible (Ackermann, 2003) et par Félix d'Hérelle en 1917 qui rapporta la lyse d'une culture liquide de *Shigella* à un microbe antagoniste à la bactérie étudiée (d'Hérelle, 1917). La nature de ce microbe était définitivement virale, n'a toutefois été confirmée qu'en 1940, après l'invention du microscope électronique (Pfankuch et Kausche, 1940).

Les bactériophages sont présents partout sur la planète et sont reconnus comme étant l'entité acellulaire la plus abondante sur terre, ils seraient dix fois plus nombreux que les bactéries (Jończyk et al., 2011).

Les bactériophages sont plus répandus dans l'eau de mer et l'intestin des animaux, mais en quantité plus importante dans les excréments, les boues, les eaux d'égout et le sol (Vonlanthen, 2011). Ce dernier représente une estimation de 10^{10} à 10^{11} bactéries par gramme (Devine et al., 2003), et de $80-390 \times 10^7$ virus par gramme (Williamson et al., 2005).

Puisque les phages sont des virus facilement manipulables, leur usage potentiel pour des applications biotechnologiques et thérapeutiques a fait l'objet de nombreux travaux de recherche dans les dernières années. Ceux-ci incluent le contrôle des pathogènes en tant que conservateurs alimentaires (Coffey et al., 2010), le traitement de certaines maladies infectieuses humaines et animales dans le cadre d'une phagothérapie (Atterbury, 2009; Fischetti, 2008; Kutateladze et Adamia, 2010) et le traitement des eaux usées (Withey et al., 2005).

Dans le cadre expérimental, une panoplie de méthodes a été appliquée pour isoler des bactériophages et leurs bactéries hôtes à partir du sol.

Un article scientifique réalisé par Anna Krasowska et ses collaborateurs et publié en 2015 sur la base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information) montre comment ce groupe de chercheurs a pu isoler les bactériophages : SUB ω ; SPO σ ; SIO Φ ; AR π

spécifiques de différentes souches de la bactérie tellurique *Bacillus subtilis* en utilisant la technique de double-agar. Par la suite une étude comparative en utilisant la microscopie électronique, la PFGE et la SDS-PAGE ont été pris en considération pour les phages isolés ainsi que pour leurs hôtes.

En Algérie, et surtout au niveau du département de microbiologie de l'université des Frères Mentouri de Constantine, aucune recherche n'a été réalisée sur l'isolement des bactériophages à partir du sol.

L'objectif primordial de cette recherche était d'améliorer les techniques de détection ainsi que d'approfondir les connaissances sur les bactériophages. Les objectifs secondaires étaient l'isolement des phages virulents et l'identification de leurs bactéries hôtes à partir d'un échantillon de sol prélevé au niveau de la wilaya de Jijel, en s'appuyant sur la méthode des plages de lyse qui vise à évaluer le pouvoir bactéricide des phages sur les bactéries isolées. Finalement, l'identification des isolats sensibles ou résistants à la suspension phagique par des tests simples en jouant sur leurs caractères phénotypiques : morphologiques et biochimiques.

Recherche
Bibliographique

RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LA BIOLOGIE DES BACTERIOPHAGES

1.1. Définition d'un bactériophage

Un bactériophage (ou phage en abrégé; du grec *phagein*, signifiant «manger») est un virus infectant que la cellule bactérienne (Madigan et Martinko, 2007). Les bactériophages, comme tous les virus, sont des parasites absolus. Même s'ils possèdent toute l'information pour diriger leur reproduction dans un hôte spécifique, ils n'ont pas de machinerie pour générer de l'énergie, ni de ribosomes pour produire des protéines. Leur multiplication dépend donc entièrement de la présence de leur hôte bactérien (Kutter et al., 2005).

1.2 Structure et morphologie des bactériophages

Les bactériophages sont de taille beaucoup plus petite que les bactéries, en générale leur taille varie de 20 à 300 nm (Madigan et Martinko, 2007).

La structure des virus varie selon les familles auxquelles ils appartiennent. Ils sont structurellement composés d' (figure 01) :

- Un génome : un virus comporte toujours un génome qui est de l'ADN ou de l'ARN.

Il peut être monocaténaire (simple brin), bicaténaire (double brin) voire partiellement bicaténaire contenant l'information génétique du virus. L'acide nucléique du bactériophage est très fortement replié à l'intérieur de la capsid.

- Une capsid: c'est une boîte protéique qui entoure l'acide nucléique et résiste aux enzymes protéolytiques. Elle est constituée par l'assemblage, par répétition, d'une ou quelques molécules protéiques appelés unités de structure (US). Ce polymère de nature protéique permet de protéger le génome.

Tous les phages possèdent une capsid qui peut varier en taille et en forme. Certaines sont icosaédrales (20 faces), d'autres sont filamenteuses (Kutter et al., 2005).

- Une queue (de longueur totale de 100 nm et 8 nm de diamètre pour le phage T4): est un tube régulièrement strié, composé d'un empilement d'anneaux ayant une disposition hélicoïdale autour d'un axe creux. Elle constitue l'organe d'injection de l'acide nucléique dans la cellule infectée.

Les queues des bactériophages sont rigides ou flexibles de longueur variable peuvent être contractiles (T2, T4 et Mu) ou non contractiles (phage lambda) (Sozzi et al., 1982 ;Madigan etMartinko, 2007).

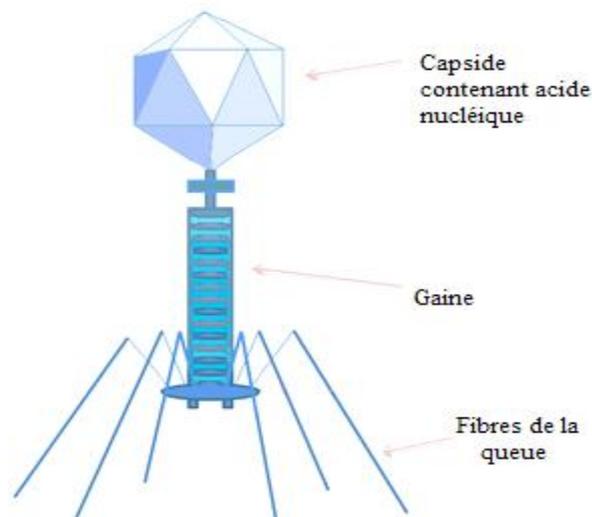


Figure 01 : Le bactériophage et ses principales composantes, © Ecolyseinc, 2015.

1.3. Classification des bactériophages

« International Committee on Taxonomy of Viruses », ou ICTV est un comité établi depuis 1966, qui travaille sur un système de classification et une nomenclature virale reconnues à l'échelle internationale. La classification repose sur des critères physico-chimiques : la nature du génome (ADN ou ARN, simple ou double brin), la présence ou l'absence d'une enveloppe, la symétrie et les particularités de la capsid (figure02).

L'ordre des *Caudovirales* (phages d'ADN double brins de 5 à 650 kpb à queue avec une capsid) contient plus de 95 % des bactériophages qui ont été décrits (Kutter et al., 2005). Trois familles découlent des *Caudovirales* et sont définies par le type de fibre caudale (fibres formant la queue) présente sur le phage (figure 3). 60% des phages sont des *Siphoviridae* et possèdent une longue queue flexible, 25 % sont des *Myoviridae* avec une queue contractile et 15 % sont des *Podoviridae* et possèdent une courte queue (Sharp, 2001).

Donc L'ICTV établit 1 ordre, 3 familles, 7 sous-familles et 18 genres et 36 espèce (tableau 01) pour classer la majorité des diverses espèces de virus bactériens connus à ce jour (Krupovic et al., 2015).

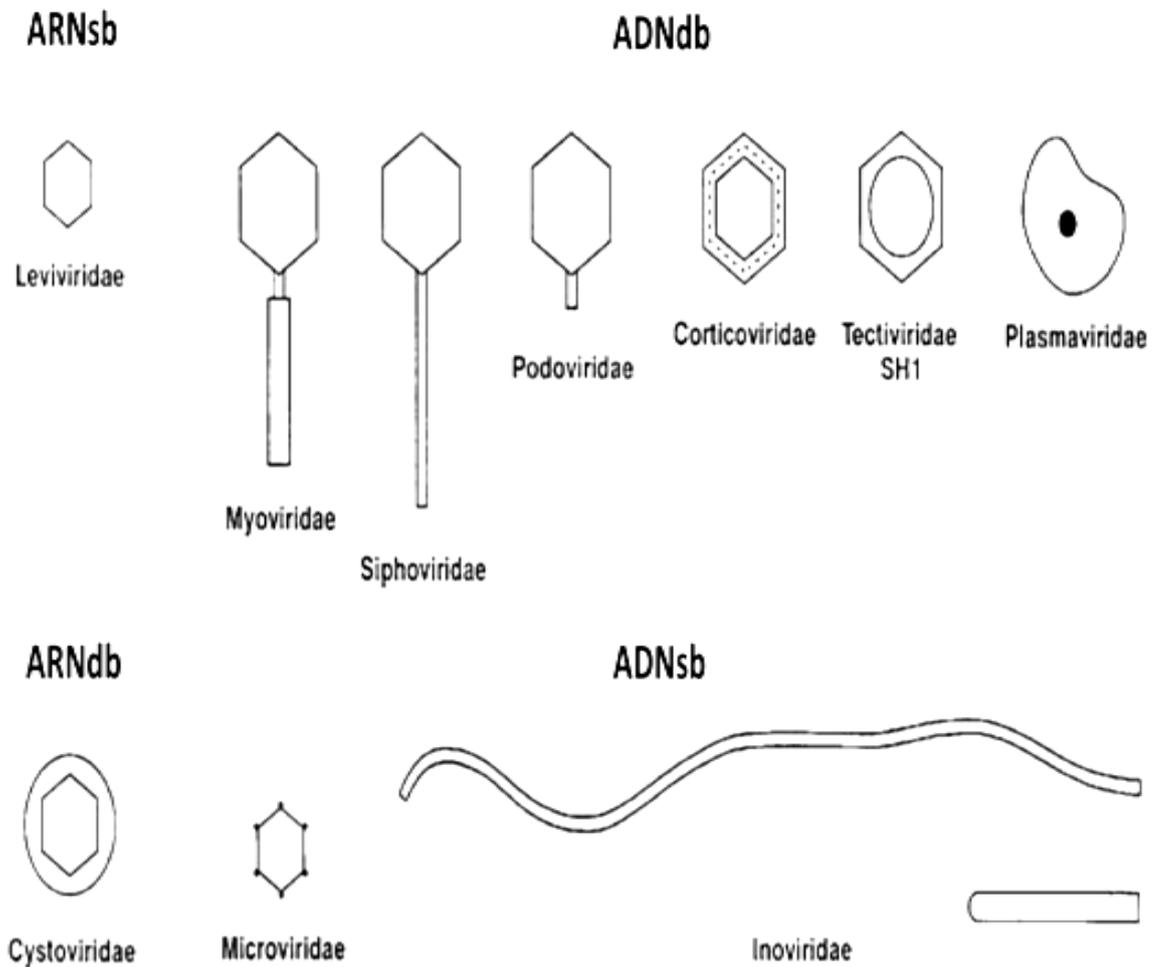


Figure 02 :familles de bactériophages, Ackermann (2009).

ADNsb : phages à ADN simple-brin

ADNdb : phages à ADN double-brin

ARNsb : phages à ARN simple-brin

ARNdb : phages à ARN double-brin

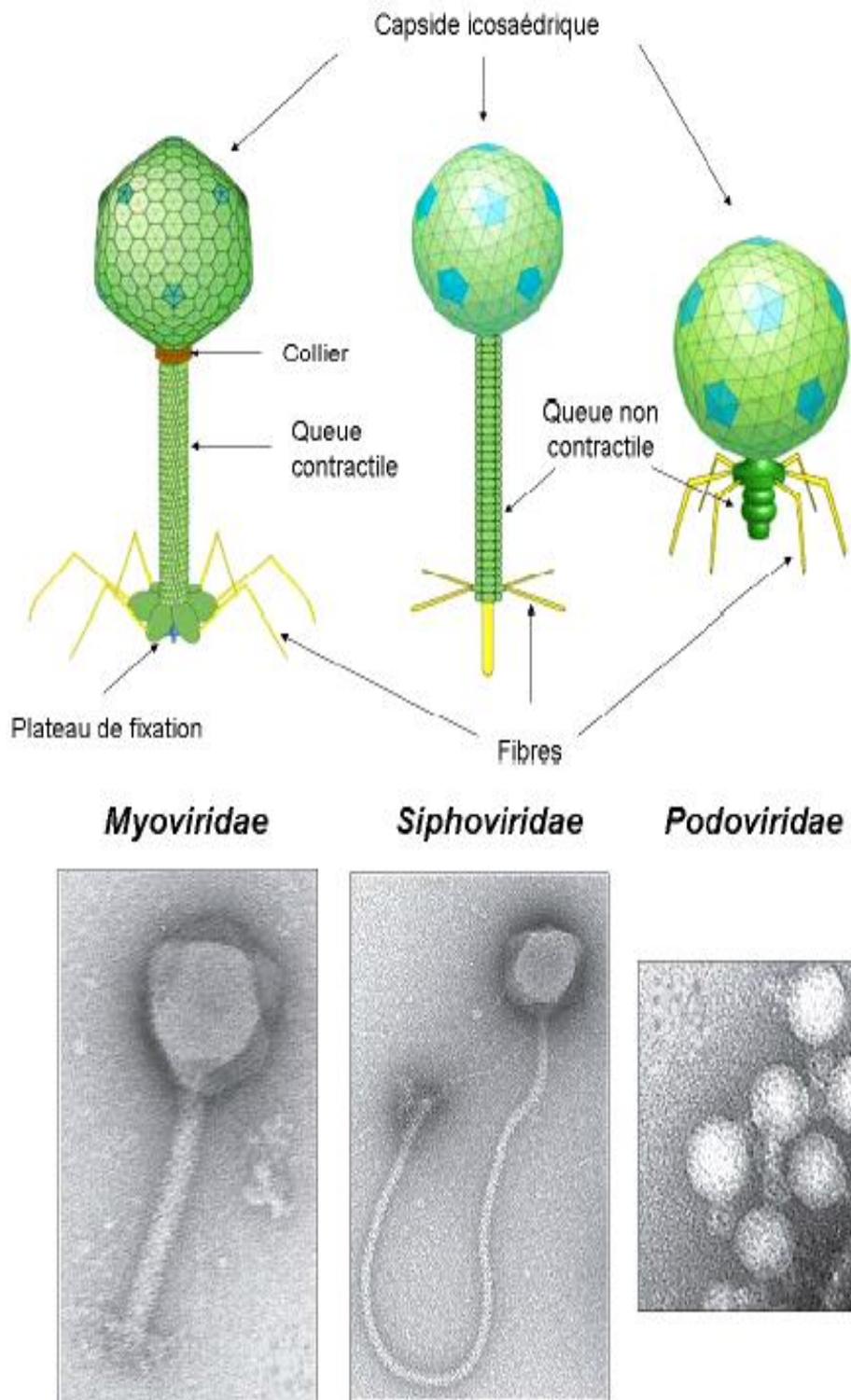


Figure 03 : Morphologie des 3 familles de *Caudovirales*, Clokie et al (2011).

Haut : Morphologie schématique adaptée.

Bas : Morphologie observée en microscopie électronique.

Tableau 01 : propositions de taxonomie décrivant de nouveaux taxons (genres, sous-familles, familles)

soumis à l'ICTV, Krupovic et al (2015).

New /genus	Family	Subfamily	Type /species	Number of genus-included species
<i>Ap22virus</i>	<i>Myoviridae</i>		<i>Acinetobacter virus AP22</i>	4
<i>Secunda5virus</i>	<i>Myoviridae</i>		<i>Aeromonas virus 25</i>	5
<i>Biquartavirus</i>	<i>Myoviridae</i>		<i>Aeromonas virus 44RR2</i>	1
<i>Agatevirus</i>	<i>Myoviridae</i>		<i>Bacillus virus Agate</i>	3
<i>B4virus</i>	<i>Myoviridae</i>		<i>Bacillus virus B4</i>	5
<i>Bastillevirus</i>	<i>Myoviridae</i>		<i>Bacillus virus Bastille</i>	2
<i>Bv431virus</i>	<i>Myoviridae</i>		<i>Bacillus virus Bc431</i>	4
<i>Cp51virus</i>	<i>Myoviridae</i>		<i>Bacillus virus CP51</i>	3
<i>Nit1virus</i>	<i>Myoviridae</i>		<i>Bacillus virus NIT1</i>	3
<i>Wphvirus</i>	<i>Myoviridae</i>		<i>Bacillus virus WPh</i>	1
<i>Cvm10virus</i>	<i>Myoviridae</i>		<i>Escherichia virus CVM10</i>	2
<i>Kpp10virus</i>	<i>Myoviridae</i>		<i>Pseudomonas virus KPP10</i>	3
<i>Pakpunavirus</i>	<i>Myoviridae</i>		<i>Pseudomonas virus PAKP1</i>	6
<i>Rheph4virus</i>	<i>Myoviridae</i>		<i>Rhizobium virus RHEph4</i>	1
<i>Vhmlvirus</i>	<i>Myoviridae</i>		<i>Vibrio virus VHML</i>	3

Recherche Bibliographique

<i>Tg1virus</i>	<i>Myoviridae</i>		<i>Yersinia virus TG1</i>	2
<i>P100virus</i>	<i>Myoviridae</i>	<i>Spounavirina</i>	<i>Listeria virus P100</i>	1
<i>Kayvirus</i>	<i>Myoviridae</i>	<i>Spounavirina</i>	<i>Staphylococcus virus K</i>	7
<i>Silviavirus</i>	<i>Myoviridae</i>	<i>Spounavirina</i>	<i>Staphylococcus virus Remus</i>	2
<i>Rb49virus</i>	<i>Myoviridae</i>	<i>Tevenvirinae</i>	<i>Escherichia virus RB49</i>	3
<i>Rb69virus</i>	<i>Myoviridae</i>	<i>Tevenvirinae</i>	<i>Escherichia virus RB69</i>	4
<i>Js98virus</i>	<i>Myoviridae</i>	<i>Tevenvirinae</i>	<i>Escherichia virus JS98</i>	5
<i>Sp18virus</i>	<i>Myoviridae</i>	<i>Tevenvirinae</i>	<i>Shigella virus SP18</i>	5
<i>S16virus</i>	<i>Myoviridae</i>	<i>Tevenvirinae</i>	<i>Salmonella virus S16</i>	2
<i>Cc31virus</i>	<i>Myoviridae</i>	<i>Tevenvirinae</i>	<i>Enterobacter virus CC31</i>	2
<i>Cr3virus</i>	<i>Myoviridae</i>	<i>Vequintavirinae (new)</i>	<i>Cronobacter virus CR3</i>	3
<i>V5virus</i>	<i>Myoviridae</i>	<i>Vequintavirinae (new)</i>	<i>Escherichia virus V5</i>	4
<i>Se1virus</i>	<i>Myoviridae</i>	<i>Vequintavirinae (new)</i>	<i>Salmonella virus SE1</i>	4
<i>Pagevirus</i>	<i>Podoviridae</i>		<i>Bacillus virus Page</i>	5
<i>Cba41virus</i>	<i>Podoviridae</i>		<i>Cellulophaga virus Cba41</i>	2
<i>G7cvirus</i>	<i>Podoviridae</i>		<i>Escherichia virus G7C</i>	8
<i>Lit1virus</i>	<i>Podoviridae</i>		<i>Pseudomonas virus LIT1</i>	3
<i>Vp5virus</i>	<i>Podoviridae</i>		<i>Vibrio virus VP5</i>	3
<i>Kp34virus</i>	<i>Podoviridae</i>	<i>Autographivirina</i>	<i>Klebsiella virus KP34</i>	5

Recherche Bibliographique

<i>Slashvirus</i>	<i>Siphoviridae</i>		<i>Bacillus virus Slash</i>	4
<i>Cba181virus</i>	<i>Siphoviridae</i>		<i>Cellulophaga virus Cba18</i>	3
<i>Cbastvirus</i>	<i>Siphoviridae</i>		<i>Cellulophaga virus ST</i>	1
<i>Nonagvirus</i>	<i>Siphoviridae</i>		<i>Escherichia virus 9g</i>	4
<i>Seuratvirus</i>	<i>Siphoviridae</i>		<i>Escherichia virus Seurat</i>	2
<i>P70virus</i>	<i>Siphoviridae</i>		<i>Listeria virus P70</i>	5
<i>Psavirus</i>	<i>Siphoviridae</i>		<i>Listeria virus PSA</i>	2
<i>Ff47virus</i>	<i>Siphoviridae</i>		<i>Mycobacterium virusFf47</i>	2
<i>Sitaravirus</i>	<i>Siphoviridae</i>		<i>Paenibacillus virus Diva</i>	5
<i>Septima3virus</i>	<i>Siphoviridae</i>		<i>Pseudomonas virus 73</i>	5
<i>Nonanavirus</i>	<i>Siphoviridae</i>		<i>Salmonella virus 9NA</i>	2
<i>Sextaecvirus</i>	<i>Siphoviridae</i>		<i>Staphylococcus virus 6ec</i>	2
<i>Ssp2virus</i>	<i>Siphoviridae</i>		<i>Vibrio virus SSP002</i>	2
<i>K1gvirus</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Guernseyvirinae (new)</i>	<i>Escherichia virus K1G</i>	4
<i>Jerseyviru (existing)</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Guernseyvirinae (new)</i>	<i>Salmonella virus Jersey</i>	6
<i>Sp31virus</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Guernseyvirinae (new)</i>	<i>Salmonella virus SP31</i>	1
<i>T1virus (existing)</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Tunavirinae (new)</i>	<i>Escherichia virus T1</i>	4
<i>Tlsvirus</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Tunavirinae (new)</i>	<i>Escherichia virus TLS</i>	3
<i>Rtpvirus</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Tunavirinae (new)</i>	<i>Escherichia virus Rtp</i>	2

Recherche Bibliographique

<i>Kp36virus</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Tunavirinae (new)</i>	<i>Klebsiella virus KP36</i>	3
<i>Rogue1virus</i>	<i>Microviridae</i>	<i>Tunavirinae (new)</i>	<i>Escherichia virus Rogue1</i>	8
<i>Alpha3microvirus</i>	<i>Microviridae</i>	<i>Bullavirinae (new)</i>	<i>Escherichia virus alpha3</i>	8
<i>G4microvirus</i>	<i>Microviridae</i>	<i>Bullavirinae (new)</i>	<i>Escherichia virus G4</i>	3
<i>Phix174microvirus</i>	<i>Microviridae</i>	<i>Bullavirinae (new)</i>	<i>Escherichia virus phiX174</i>	1
<i>Alphapleolipovirus</i>	<i>Pleolipoviridae (new)</i>		<i>Halorubrum virus HRPV-1</i>	5
<i>Betapleolipovirus</i>	<i>Pleolipoviridae (new)</i>		<i>Halorubrum virus HRPV-3</i>	2
<i>Gammapleolipovirus</i>	<i>Pleolipoviridae (new)</i>		<i>Haloarcula virus His2</i>	1

1.4. La relation phage/cellule hôte

Les bactériophages reconnaissent à la surface de la bactérie des récepteurs spécifiques auxquels ils se lient puis injectent leur matériel génétique à l'intérieur de la bactérie, son matériel génétique utilise le métabolisme de la bactérie afin de synthétiser les éléments viraux nécessaires à la réplication des phages (Resh et Meyer, 2002; Kutter, 2005). Tout d'abord, l'adsorption du phage à son hôte se fait généralement par l'interaction entre une protéine ou un complexe protéique retrouvé sur le phage et un récepteur spécifique à la surface bactérienne. L'attachement peut se faire au niveau des lipopolysaccharides, des protéines de la paroi cellulaire, des acides téichoïques, des flagelles ou des pilis (Prescott et al., 2003). Par exemple chez les lactophages du groupe 936 (qui infectent *Lactococcus lactis*) l'adsorption se fait par un complexe protéique situé à l'extrémité de leur queue composé d'une protéine de liaison au récepteur (PLR) et d'une plaque basale (Dupont et al., 2004; Sciarra et al., 2010; Spinelli et al., 2006; Tremblay et al., 2006), par contre, chez le phage T4 (figure 04) 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 et Martinko, 2007).



Figure 04: Les phages T4 adsorbés à la surface d'*Escherichia coli*, vus au microscope électronique, Baguelin (2003).

1.5. Les mécanismes de défense de la cellule hôte et la réponse du phage

Lorsque les bactéries sont en contact avec des bactériophages pour une certaine période de temps, elles peuvent développer des mécanismes de résistance pour survivre à l'infection par les phages. La résistance bactérienne développée contre les phages est 10 fois plus lente à celle développée contre les antibiotiques. Lorsqu'une résistance contre un antibiotique est développée, il devient alors difficile de la contrôler, compte tenu que les molécules antibiotiques sont statiques. Par contre, avec les phages, lorsqu'une résistance est créée, les phages peuvent eux aussi développer des mécanismes de défense pour s'adapter à la résistance bactérienne (Samson et al., 2013). La diversité des bactériophages est déterminée donc par leur adaptation dynamique aux changements, dont la résistance bactérienne.

1.5.1. Prévention de l'adsorption

La première étape de l'infection par le phage est l'adsorption à la bactérie. Cette étape se fait lorsque les récepteurs présents sur le phage s'attachent à leurs protéines spécifiques sur la bactérie. Les bactéries peuvent résister à l'infection en changeant la disponibilité des protéines présentes sur leur surface, empêchant ainsi la liaison spécifique nécessaire pour l'adhésion. Par contre, les phages peuvent aussi modifier leurs récepteurs pour pouvoir reconnaître un autre type de protéines. Les bactéries peuvent faire subir une mutation aux protéines qu'elles expriment de manière à empêcher encore une fois l'adsorption. Par contre, les phages ont la capacité d'évoluer de manière à reconnaître la forme altérée de la protéine cible (Labrie et al., 2010; Samson et al., 2013).

1.5.2. L'antirestriction

Quand le génome du phage réussit à entrer à l'intérieur de la cellule bactérienne, il fait face à une multitude de barrières antivirales. Les systèmes de restriction-modification (R-M), sont très répandus chez les bactéries. Ce système utilise une enzyme de restriction (endonucléase) qui coupe l'ADN étranger à des sites spécifiques. La modification des sites de reconnaissance sur l'ADN bactérien par les méthyltransférases (Mtase) prévient l'attaque par ses propres enzymes (endonucléase). Pour échapper au système de restriction-modification, l'ADN du phage est protégé après l'invasion dans le cas où la MTase agit rapidement et modifie l'ADN phagique avant de reconnaissance par l'endonucléase bactérienne, le génome du phage modifié peut se répliquer dans la cellule hôte et peut également se propager dans

d'autres cellules qui expriment le même système R-M, par contre si le système R-M est différent, l'ADN phagique sera donc clivé par une autre endonucléase. Cette stratégie s'appelle « l'antirestriction » (Samson et al., 2013).

1. 5.3.Le Systèmes d'infection ratée

Le système d'infection ratée inhibe plusieurs étapes de la réplication du génome du phage et contrairement aux autres systèmes, il peut provoquer la mort de la cellule hôte. Il existe plusieurs systèmes d'infection ratée, le système toxine-antitoxine fait partie de la grande famille des systèmes des infections ratées. Ce système provoque la mort de la cellule hôte (ou sa dormance) et est activé après l'infection par le phage. Le système est composé d'une toxine et d'une antitoxine neutralisante qui rend la toxine inefficace lors de la croissance bactérienne normale. Lorsque la bactérie subit un stress (comme l'infection par un phage), l'antitoxine est dégradée et la toxine peut induire le cycle de dormance ou la mort cellulaire. Certains phages ont la capacité de répliquer l'antitoxine de manière à empêcher l'activation de la toxine et donc empêcher la dormance ou la mort bactérienne (Samson et al., 2013).

1.5.4-Le mécanisme de défense moléculaire bactérien

a- La biologie du système CRISPR/Cas

Le système de défense bactérien CRISPR/Cas a été découvert pour la première fois par Ishino et ses collègues en 1987. C'est une équipe japonaise qui travaillait sur la bactérie *Escherichia coli*.

Le système CRISPR-Cas est un mécanisme de défense contre les phages et les plasmides invasifs, en intégrant des fragments de gènes étrangers au sein de chromosomes archées ou bactériens, il confère une résistance aux phages et aux plasmides. Il s'agit donc d'une forme de système immunitaire héritable par transmission aux cellules filles, permettant aux archées et aux bactéries de faire face au changement rapide des phages et des plasmides, mais leur fonction n'a pas été confirmée jusqu'en 2007 par Barrangou et ses collègues, qui ont démontré que *Streptococcus thermophilus* peut acquérir une résistance contre un bactériophage en intégrant un fragment génomique d'un virus infectieux dans son locus CRISPR (Barrangou et al., 2007).

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. Les séquences nucléotidiques et la longueur des locus CRISPR sont conservées pour une même espèce, mais varient d'une espèce à l'autre. Une telle famille se caractérise par des séries de répétitions directes, courtes (de 21 à 37 paires de bases), régulièrement espacées par des séquences appelées « *spacer* », généralement uniques, de 20 à 40 paires de bases (Mojica et al., 2005). Les chercheurs rapportent que les spacers proviennent vraisemblablement d'éléments génétiques étrangers qui ne sont pas faites d'ADN d'origine bactérienne. Les locus CRISPR sont généralement adjacents aux gènes *cas* (pour « *CRISPR associated* ») (John et al., 2014), ils sont séparés par une séquence de 300 à 500 paires de bases, appelée séquence « *leader* » (figure 05).

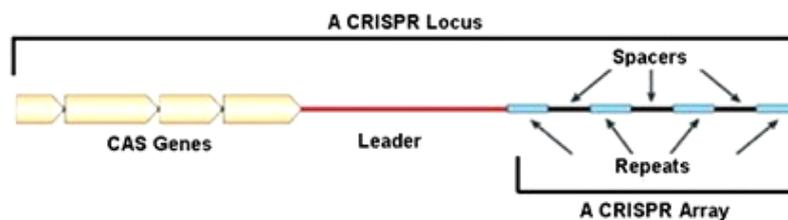


Figure 05: Caractéristiques du locus CRISPR dans l'organisme procaryote, Bangalore (2014).

b- Le fonctionnement des systèmes CRISPR

Les systèmes CRISPR utilisent les gènes *cas1* et *cas2* qui sont impliqués dans l'intégration, en tant que *spacer*, de fragments de gènes étrangers dans le CRISPR.

Trois types de mécanismes du système CRISPR ont été identifiés, dont le type II est le plus étudié. Dans ce cas, l'ADN de virus ou de plasmides envahissant est coupé en petits fragments et incorporé à des endroits bien précis dans un locus CRISPR au milieu d'une série de courtes répétitions (d'environ 20 pb). Les loci sont transcrits et les transcriptions sont ensuite traitées pour produire des petits ARN (crRNA - CRISPR ARN), dont la maturation de ces crARN dépend d'un ARN trans-activateur (tracrRNA). Les crARNs seront utilisés pour guider les

endonucléases effectrices qui ciblent l'invasion d'ADN suit à une complémentarité des séquences (figure 06).

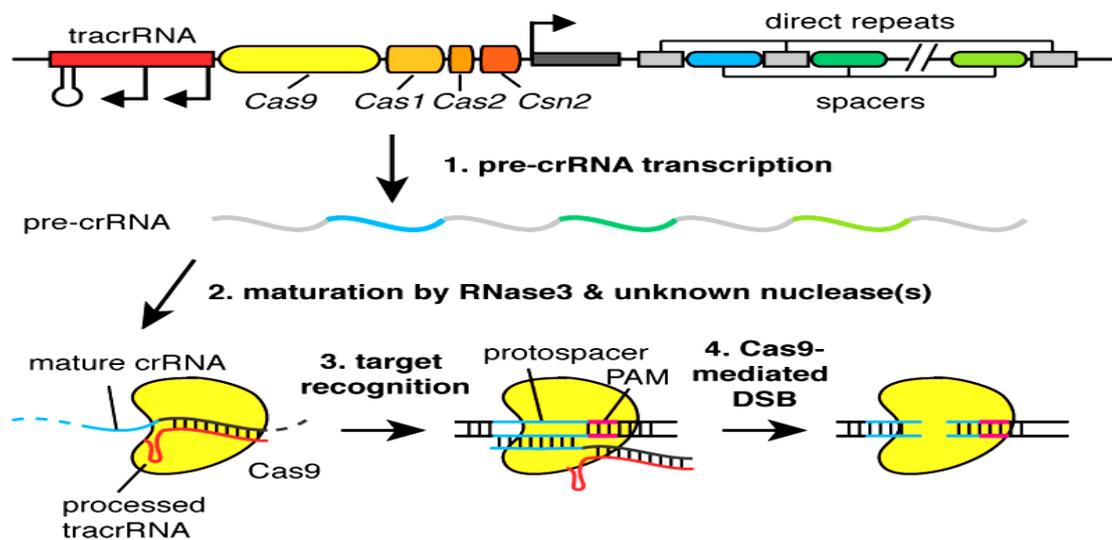


Figure 06 : Le mécanisme de CRISPER-Cas type II chez *Streptococcus pyogenes*.

© 2013 Broad Institut

Une protéine cas9 (également connu sous le nom Csn1), a été montrée par plusieurs expériences d'être un acteur clé dans certains systèmes CRISPR (en particulier les systèmes CRISPR de type II). Le mécanisme CRISPR de type II comparé à d'autres systèmes de CRISPR reconnaît lacas9 comme la seule protéine nécessaire pour le silençage génique. Dans les systèmes de type II, cas9 participe au traitement des crRNAs (Deltcheva et al., 2011), et elle est responsable de la destruction de l'ADN cible (Jinek et al., 2012).

Pour obtenir la reconnaissance et le clivage d'ADN spécifique de site, cas9 doit être à la fois complexée avec une crRNA et séparée de l'activation du trans-crRNA (*tracrRNA* ou *trRNA*), qui est partiellement complémentaire à la crRNA (Jinek et al., 2012). Le *tracrRNA* est nécessaire pour la maturation des crRNA à partir d'un transcrit primaire codant pour plusieurs pré-crRNAs. Cela se produit en présence de RNase III et cas9 (Deltcheva et al., 2011).

La destruction de l'ADN cible double brin s'effectue au niveau des sites définis par une séquence cible de 20 nucléotides (DSB= double strand breaks) à l'intérieur d'un transcrit crRNA associé (Jinek et al., 2012).

L'activité endonucléase double brin de la protéine cas9 exige également une courte séquence conservée, (2-5) connue sous le nom Proto spacer Associated Motif (PAM) (des petits fragments d'ADN exogènes provenant de phages ou de plasmides intégrés dans le génome entre les séquences répétées et servent de mémoire aux bactéries).

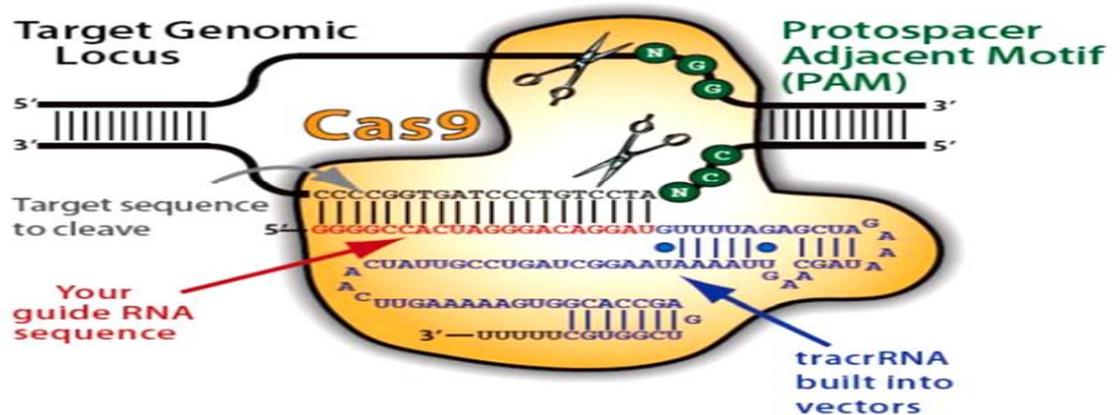


Figure 07 : Le mécanisme de CRISPER-cas9.© 2016 System Biosciences

c-L'intérêt du système CRISPR

En 2007, des chercheurs du laitier industriel danois Danisco découvrent que lorsque les bactéries qu'ils utilisent pour fabriquer des yaourts et des fromages ont des séquences CRISPR, elles survivent mieux aux infections virales.

Depuis l'an 2010, Le système CRISPR-Cas9 est devenu un outil de génie génétique révolutionnaire permettant de modifier plus facilement et plus précisément les séquences d'ADN. Si cela peut à terme permettre d'éliminer certaines maladies, deux ans plus tard, des équipes du monde entier se sont approprié CRISPR-Cas9 pour modifier le génome de nombreux types de cellules, tant chez les bactéries que chez les plantes ou chez les animaux, cet outil qui peut également s'appliquer sur des cellules héréditaires.

En 2014, cette technologie a franchi deux nouvelles étapes importantes. D'abord, elle s'est révélée utilisable sur des primates. En suite elle a permis de corriger des maladies génétiques *in vivo* sur des souris.

Le système CRISPER-cas est caractérisée par sa simplicité et sa rapidité :En effet, pour se lier à l'ADN cible, ses nucléases concurrentes nécessitent la fabrication de fragments

protéiques sur mesure pour chaque gène ciblé, une opération très complexe, notamment à cause de la longueur des fragments protéiques à créer, avec une période longue. Tandis qu'avec CRISPR-Cas9, il suffit de fabriquer de petits ARN, une technique déjà utilisée en routine dans certains laboratoires de recherche pour faire synthétiser telle ou telle protéine dans une cellule, ou pour perturber le fonctionnement de gènes. Et en utilisant plusieurs ARN guides, diverses équipes ont très facilement réussi à cibler plusieurs gènes à la fois, y compris des gènes appartenant à des cellules humaines (Braly, 2015).

Le tableau 02 résume les mécanismes de défense développés par les bactériophages d'un côté et par la cellule hôte d'un autre côté.

Tableau 02 : La résistance bactérienne en fonction des étapes du cycle réplcatif viral et L'adaptation des bactériophages en revanche (Saussereau, 2012).

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

1.6. Stabilité des bactériophages face aux conditions physico-chimiques du milieu

La stabilité des phages et leur survie peuvent être influencées par plusieurs facteurs, qu'ils soient chimiques ou physiques. Certains scientifiques proposent aussi un lien entre la morphologie de certains phages et leur capacité de survie dans différentes conditions. Ils ont démontré que les phages avec une plus grosse capsid (100 nm) ont une meilleure capacité d'adaptation à différents milieux que ceux ayant une capsid plus petite (60 nm) (Jonczyk et al., 2011).

La température joue un rôle fondamental pour l'attachement du phage à la bactérie, la pénétration, la multiplication et peut influencer la durée du cycle latent (lysogénie) des phages. De manière générale, des températures plus basses que les températures optimales peuvent diminuer la quantité de matériel génétique qui est injecté dans les bactéries alors que des températures plus élevées rallongent le cycle de latence (Jonczyk et al., 2011).

Les phages sont stables, dans la plupart des cas à un pH de 5 à 8. On rapporte certaines espèces qui survivent à un pH de 3 ou 4. Généralement, la concentration du phage va décroître lentement en même temps que le pH. Par exemple, le phage du *S. aureus* a été diminué de deux logs entre 4 et 6 heures de temps lorsque le pH passait de 6,19 à 5,38. La prolifération de plusieurs phages est altérée lorsque le pH est inférieur à 4,5. Le phage T4 est instable à un pH plus bas que 5 alors que le phage PM2 perd complètement son activité après une heure dans une solution à un pH de 5 à 37 °C (Ly-Chatain, 2014).

Les phages sont aussi sensibles aux agents dénaturants les protéines comme l'urée et l'uréthane, mais le degré d'inactivation du phage dépend aussi de la concentration et de la température de ces agents (Kutter et Sulakvelidze, 2005).

De manière générale, tous les phages sont sensibles aux rayons UV, spécifiquement ceux de la gamme du 260 nm (UVC) ainsi que les ultraviolets lointains (122- 200nm). En plus des rayons solaires, les agents mutagènes, comme l'acide nitrique et les UV inactivent les phages et peuvent induire le cycle lytique chez les phages lysogènes (Kutter et Sulakvelidze, 2005).

1.7 Cycle de vie des bactériophages

Les bactériophages se caractérisent par une interaction directe et obligatoire avec les bactéries qu'ils infectent, il existe deux types de phages nommés selon leur type de cycle d'infection: les phages lytiques et les phages lysogéniques. Chaque type de reproduction dure

environ 30 minutes et produit de 50 à 1000 nouveaux bactériophages (Resh et Meyer, 2002; Kutter et al., 2005).

1.7.1. L'infection lytique des phages virulents

Le processus infectieux d'un bactériophage lytique débute par sa fixation sur un motif (cible) spécifique situé à la surface de la bactérie hôte (Figure 08). On reconnaît un certain nombre d'étapes :

a- L'adsorption spécifique

La rencontre d'un phage et d'une bactérie se fait au hasard et sa probabilité dépend du nombre de bactéries et de phages. Le phage se fixe sur des récepteurs spécifiques de la bactérie présents soit sur la paroi (lipo-polysaccharide, protéines, acides téchoïques), sur la membrane cellulaire, sur les flagelles, ou sur les pilis communs ou sexuels, très rapidement les autres fibres se fixent sur le récepteur ce qui arrime solidement le phage à la bactérie et permet la mise en contact de la plaque terminale avec la paroi bactérienne. Pour que l'adsorption soit possible, il faut que les récepteurs phagiques et bactériens présentent une étroite spécificité l'un envers l'autre. Une bactérie n'est donc sensible qu'à un nombre limité de phages et un phage n'est capable d'infecter qu'un nombre restreint de bactéries (Drouji,2009).

b-Pénétration du génome phagique dans la bactérie

La pénétration est variable selon les phages. Certains d'entre eux pénètrent en totalité dans la bactérie et l'acide nucléique n'est libéré qu'après son désintégration de la capsid. Pour d'autres bactériophages, seul l'acide nucléique pénètre dans la cellule.

Dans le cas des *Myoviridae*, le lysozyme présent au niveau de la plaque terminale provoque une destruction du peptidoglycane et une perforation de la paroi. De manière concomitante, le contact entre la plaque terminale et la paroi provoque la contraction des anneaux protéiques de la gaine contractile ce qui conduit à une pénétration du canal central dans la bactérie. L'ADN double brin présent dans la tête du phage transite dans le tube central creux et il est injecté dans le cytoplasme bactérien (Drouji,2009).

c -L'expression du génome viral

La multiplication nécessite l'expression du génome injecté qui va détourner la machinerie de biosynthèse de la cellule hôte pour la synthèse des acides nucléiques viraux et de protéines

nécessaires pour assembler les progénitures virales.

Les phages avec des génomes de petit ADN (ont la capacité limitée de codage) utilisent L'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte pour la réplication et la transcription de l'ADN, alors que les phages avec génomes de large ADN (et, par conséquent, une plus grande capacité de codage), généralement encodent L'ADN et l'ARN Polymérase de phage.

Les phages à ARN encodent l'ARN-polymérase par un ARN-dépendent (aussi appelé répliqueuse ou transcriptase) pour la réplication et la transcription d'ARN du phage.

Il n'y a pas de régulation temporelle de l'expression des gènes pour les phages de petits génomes: la quasi-totalité des gènes du phage commence à être transcrite et traduite peu après l'injection, ces gènes continuent à être exprimés tout au long de l'infection.

En revanche, la multiplication des phages ayant les génomes de large ADN exige la régulation temporelle de la synthèse de macromolécules du phage qui sont produites habituellement pendant les trois phases: la synthèse des produits précoces, la synthèse de la progéniture d'ADN du virus et enfin la synthèse des produits tardifs.

Les produits précoces codent l'ADN, l'ARN et les protéines de synthèse de l'hôte et adaptent un mécanisme cellulaire de biosynthèse de phages qui commence par la réplication de l'ADN phagiques. Les produits des gènes tardifs codent pour des produits nécessaires pour l'assemblage des progénitures du phage (Drouji, 2009).

d- L'Assemblage des progénitures du phage

L'assemblage est un phénomène complexe, il existe trois "chaînes de montage" spécialisées dans l'assemblage de la tête, la queue et les fibres (Drouji,2009).

e- La lyse de la bactérie

La plupart des phages néoformés nécessite la lyse bactérienne. Dans ces cas, un produit de gène de virus est produit et hydrolyse progressivement le peptidoglycane de la cellule hôte, affaiblissant ainsi suffisamment la cellule et une pression osmotique interne peut éventuellement provoquer la lyse cellulaire.

L'exception de libération par ce mécanisme est les phages filamenteux, qui sont libérés par extrusion à travers les membranes cellulaires, et les phages mycoplasmaïques, qui sont libérés par bourgeonnement à travers les cellules de l'hôte. Les infections productives conduisent à la

libération de 20 à 1000 phages par cellule infectée, en fonction des conditions de la croissance cellulaire (Drouji, 2009).

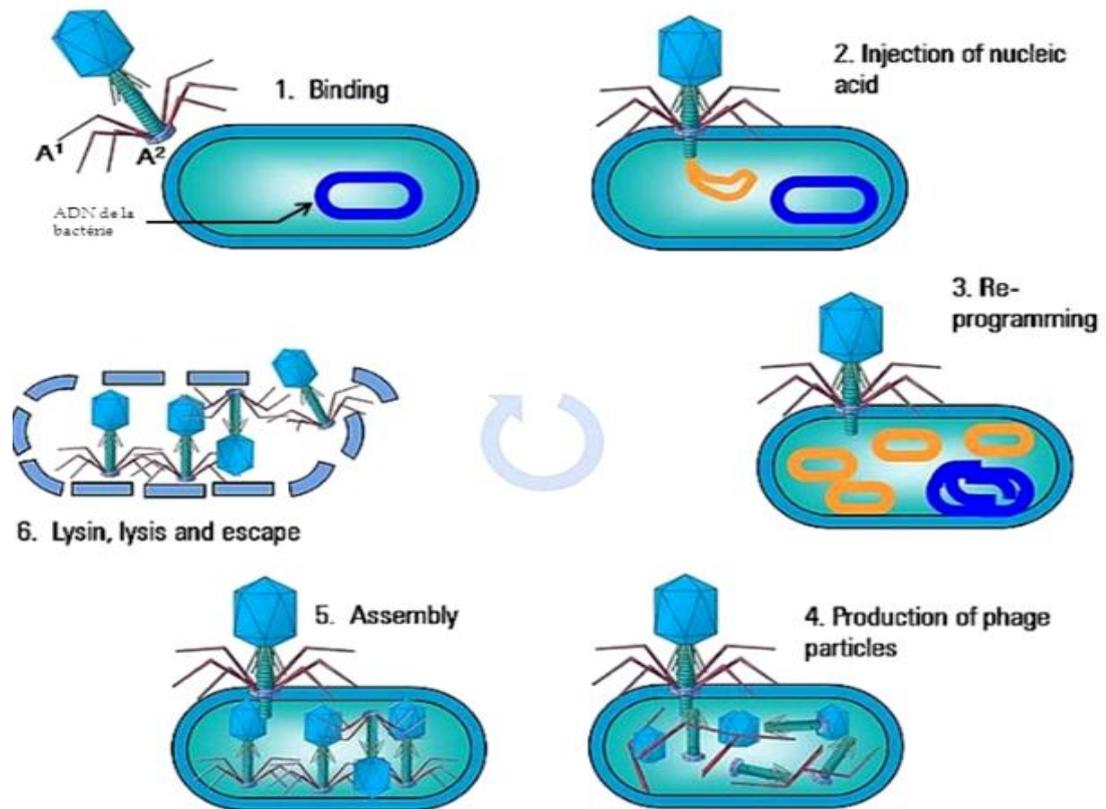


Figure 08 : Cycle de réplication d'un bactériophage, Caron (1990).

1.7.2 L'infection lysogéniques et les phages tempérés

La différence majeure entre un phage tempéré et un phage lytique réside dans le fait que le phage tempéré a la capacité d'intégrer son génome à celui de son hôte, de rester ainsi «silencieux»et de se multiplier avec lui (cycle lysogéniques) (figure 09).

Ces phages tempérés, encore appelés « prophages », sont copiés à chaque division cellulaire avec l'ensemble de l'ADN appartenant à la bactérie hôte, jusqu'au moment où, sous l'influence de certains stimuli (comme les UV, par exemple), le génome du phage s'excise. Dès lors, le phage « libéré » entame un cycle complet à l'instar des phages strictement lytiques, c'est au moment de cette excision que le phage tempéré est capable «d'emprunter » de manière aléatoire une partie du génome de son hôte pour infecter des hôtes phylogénétiquement proches.

L'analyse (par séquençage) des génomes bactériens permet d'observer l'importance de l'impact des bactériophages tempérés dans la nature sur l'évolution bactérienne.

Les phages tempérés ne représentent qu'une faible partie (environ 10%) des phages actuellement connus présents dans la nature (Dublanchet, 2008).

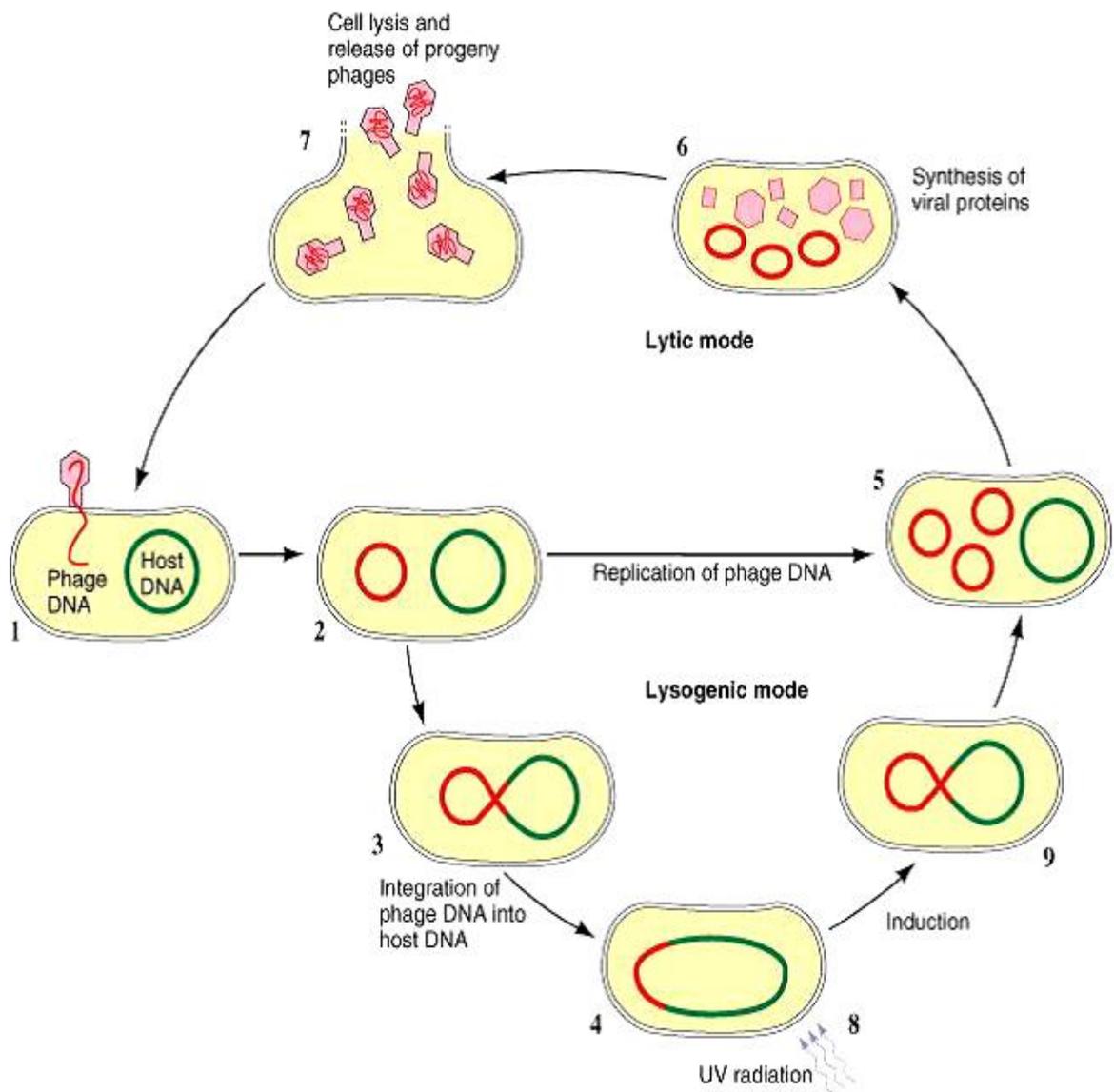


Figure 09 : Schéma général du cycle de vie du bactériophage tempéré λ
<http://structuralbiology.bio.uniroma2.it/sites/default/files/dna-prot.pdf>

1.8. Ecologie des bactériophages

a- Habitats

Les virus en général et les bactériophages (virus de bactéries) en particulier constituent l'un des groupes d'organismes les plus abondants en nombre d'individus dans la biosphère (Berghet al., 1989 ; Wommack et Colwell, 2000) avec une estimation de 10^{30} - 10^{32} phages (Sulakvelidze, 2011).

Dans l'eau de mer et d'eau douce, ils se produisent à des densités allant jusqu'à $2,5 \times 10^8$ phages/ml et sont en moyenne 10 fois plus abondant que leurs hôtes bactériens (Ashelford et al., 2003). On estime que le nombre de phages infectant des bactéries dans des environnements aquatiques approche de 10 millions particules par ml, soit au moins 10 fois plus que les cellules bactérienne (Berghet al., 1989; Wommack et Colwell, 2000). Dans les sédiments le nombre de virus bactériens est plus élevé que dans l'eau et des chiffres de 2×10^9 ml⁻¹ ont été enregistrés (Borsheim, 1993).

Les phages sont des commensaux normaux de l'humain que l'on retrouve fréquemment dans le tractus gastro-intestinal, l'intestin des animaux, sur la peau, dans les urines et dans la bouche. Ce sont les prédateurs naturels des bactéries. Mais en quantité plus importante dans les excréments, les boues, les eaux d'égout et le sol (environ 10^8 phages/g de sol) (Vonlanthen, 2011).

Les bactériophages jouent donc un rôle primordial dans la balance microbienne de tous les écosystèmes (Kutter et al., 2005).

b-Impact des cycles lytiques

La lyse des bactéries par les bactériophages est massive : les bactériophages seraient responsables de 10 à 50% de la mortalité des bactéries des systèmes aquatiques (Fuhrman et al., 2003). Compte tenu de l'importance numérique des populations bactériennes, cette prédation a un effet capital sur les communautés microscopiques et macroscopiques.

La lyse induit la dispersion des débris cellulaires dans le milieu marin, ce qui participe à la circulation des nutriments dans la chaîne alimentaire. Cela a aussi un impact sur la géochimie locale, suite aux propriétés chimiques et physiques des éléments dispersés. Par exemple, la lyse par les virus conduit à la libération de sulfure de diméthyle (DMS), ce qui pourrait avoir une influence significative sur le climat. Le DMS est à l'origine de l'odeur caractéristique de

l'air marin, mais au-delà de ses propriétés aromatiques, il exerce également 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 agissent comme de véritables ombrelles en empêchant la pénétration d'une partie des rayons du soleil, limitant ainsi le réchauffement du globe. Pour résumer, les bactériophages par leur cycle lytique, modifient la dynamique des populations bactériennes en libérant de nombreux nutriments dans l'environnement, en induisant de forts goulots d'étranglements, et en contribuant à la génération et au maintien d'une importante diversité d'espèces (Fuhrman, 1999).

1.9. Les domaines d'application des bactériophages

Les phages sont déjà présents et actifs dans la nature, ils sont donc relativement faciles à isoler, leur production est simple, rapide et peu coûteuse. Ils ont été découverts il y a près de 100 ans et la problématique de la résistance bactérienne aux antibiotiques est venue raviver l'intérêt de la communauté scientifique pour ces dernières années, que ce soit dans le domaine agroalimentaire, vétérinaire ou sanitaire.

-En médecine humaine

Les bactériophages ont été largement utilisés dans le passé pour lutter contre les bactéries pathogènes dans de très nombreuses infections bactériennes. Ils ont été utilisés avec succès pour traiter des maladies de peau dues au *Staphylococcus sp.* et aussi pour traiter la dysenterie bacillaire, le choléra, la fièvre typhoïde et les autres salmonelloses.

Dans les années 1930, plusieurs produits à base de phages qui ont été commercialisés aux États-Unis ont reçu des rapports positifs sur leur efficacité, particulièrement pour les infections dues aux *Staphylococcus sp.* et les maladies intestinales. En Géorgie, où les phages sont étudiés depuis 1934, des chercheurs ont rapporté que la thérapie phagique avait un taux de succès de 80% contre les infections d'entérocoques. En Pologne, les médecins ont eu un taux de succès de 90% contre des cas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* (Pirisi, 2000).

- Application vétérinaires

L'utilisation des phages contre les infections animales ainsi que pour prévenir la transmission des pathogènes des animaux au système agroalimentaire est une autre sphère importante dans la recherche sur les phages (Adhya et al., 2014). Une expérience faite par

Smith et Huggins dans les années 80 a démontré l'efficacité d'une suspension de phage administrée de manière intramusculaire à des souris qui avait été infectées par *E.coli*. L'administration d'une seule dose de suspension de phage a été plus efficace que les multiples administrations d'antibiotiques qui avaient été donnés aux souris. Ce même groupe de recherche a utilisé les phages pour prévenir la diarrhée causée par *E.coli* chez des veaux, des porcelets et des agneaux (Witteboleet al., 2014).

- Utilisation en génie génétique

Les phages sont utilisés de multiples manières en biologie moléculaire. Ils sont utilisés comme vecteurs de clonage pour insérer de l'ADN dans les bactéries. La méthode du *phage display* est une méthode qui permet la sélection d'un peptide grâce à sa présentation sur la surface de phages. Le *phage display* est une technique permettant la construction de banques d'ADN ou d'ADN complémentaire. Les deux principaux phages utilisés dans cette technique sont les phages M13 (phage filamenteux) et lambda qui infectent tous les deux *E. Coli*.(Smith, 1985 ; Souriau et al.,1998).

- Utilisation de l'enzyme lytique comme agent thérapeutique

L'enzyme lytique est utilisée par les bactériophages pour décomposer la paroi cellulaire des bactéries lors de son cycle d'infection et pourrait avoir le potentiel d'être utilisé comme agent thérapeutique (O' Flaherty et al.,2009). Le mécanisme d'action de l'enzyme lytique est l'hydrolyse des quatre plus importants liens chimiques du peptidoglycane, créant ainsi des trous dans la membrane, qui sont mortels pour la bactérie (Gandham, 2015). Au niveau expérimental, les enzymes lytiques des bactériophages sont aussi étudiées contre *Enterococcusfaecalis* et les autres espèces d'entérocoques. EC300 est une enzyme qui a été développé pour éliminer les bactéries *E. faecalis* dans des conditions idéales de croissance. Les résultats démontrent une efficacité de l'enzyme EC300 contre une variété de souches d'*E. faecalis*, incluant des souches résistantes aux antibiotiques (Proençaet al.,2015). L'utilisation des enzymes lytiques comme agent thérapeutique est de plus en plus étudiée et des résultats concluants semblent ressortir de ces études.

- En agroalimentaire

Le contrôle des pathogènes qui sont présents sur les fruits et les légumes est d'un grand intérêt, car ces aliments ne sont habituellement pas transformés de manière à tuer ces

pathogènes. Plusieurs études ont démontré l'efficacité des phages pour l'élimination des pathogènes sur les aliments prêts à être consommés. Citons comme exemple l'utilisation de phage contre *Campylobacter jejuni* sur la peau de poulets conservés à 4 °C et à -20 °C. Une diminution d'un facteur de 10 a été observée chez les poulets à 4 °C et une diminution de 2,5 log a été mesurée chez les poulets à -20 °C (Atterbury et al., 2003). Un autre aspect important dans le domaine agroalimentaire est la durée de conservation des aliments. L'utilisation des phages a aussi été étudiée dans ce contexte. Greer et Dilts (2002) ont su faire augmenter la durée de conservation du porc de 4 à 8 jours en utilisant des phages anti-*Brochothrix thermosphacta*. Dans une autre étude, l'utilisation d'un cocktail de coliphages a su diminuer, voir éliminer, les bactéries *E. coli* O157:H7 sur les viandes (Tomat et al., 2013). Le « Center for Disease Control and Prévention » aux États-Unis a décrété que *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* et *Campylobacter jejuni* sont les principaux pathogènes responsables des décès d'origine alimentaire (Mahony et al., 2011).

- Utilisation pour le contrôle des biofilms

Les bactériophages ont été considérés comme des agents de contrôle des biofilms. Les enzymes présents sur les phages ont la capacité de dégrader les exopolysaccharides des biofilms, les rendant alors plus perméables et empêchant alors leur développement. Par contre, l'effet des phages sur les biofilms déjà formés est plutôt faible. Cela est dû au fait que les phages sont très spécifiques quant aux récepteurs bactériens avec lesquels ils interagissent et si ces derniers ont été modifiés en raison de la formation du biofilm, ils ne pourront infecter les bactéries présentes dans ces biofilms (Azizian et al., 2013). Dans une étude de Sillankorva et al (2004), une diminution de 85 % de la masse du biofilm composé de *P. fluorescens* a été étudiée après un traitement avec le phage Φ S1 (O'Flaherty et al., 2009). Les bactériophages appliqués 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).

- Les bactériophages pour une décontamination sélective

Les bactériophages utilisés comme « désinfectants » spécifiques naturels, par leur action ciblée, pourraient réduire la transmission des infections nosocomiales tout en limitant l'impact sur les surfaces de travail, les instruments ainsi que sur les patients et le personnel hospitalier.

2. LA PHAGOTHERAPIE

2.1. Définition de la phagothérapie

La phagothérapie est l'utilisation de bactériophages lytiques afin de traiter certaines maladies infectieuses d'origine bactérienne. Ce traitement a été largement utilisé dans le monde avant la découverte des antibiotiques. Si elle a été progressivement abandonnée par les pays occidentaux séduits par les avantages de l'antibiothérapie, la phagothérapie traditionnelle est toujours employée et développée dans les pays de l'ancienne Union Soviétique (Dublanche, 2009).

2.2. Histoire de la phagothérapie

La naissance de la phagothérapie est indissolublement liée à la découverte des bactériophages. En 1915, Félix d'Hérelle 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'Hérelle appela ce microbe : « bactériophage » (Dublanche et Fruciano, 2008). En 1921 une première administration humaine de phage a été réalisée à l'hôpital des Enfants-Malades de Paris, chez des patients atteints de dysenterie (*Shigella*). Leur état s'améliora dès 24h après le traitement. En 1927, Félix d'Hérelle traita 74 malades de cholera asiatiques, et obtient un taux de mortalité de 8% (contre 63% de mortalité chez les patients contrôlés par des anti-biotiques) (Summers , 1999).

À Paris « le laboratoire du bactériophage », ainsi que d'autres instituts dans le monde (Inde, Géorgie) dans les années 30 ont été créés pour commercialiser des préparations de phages dirigées contre les maladies infectieuses courantes (sinusites, infections de blessures, et infections intestinales). On constate cependant que de très nombreuses solutions de phages manquent d'efficacité (Dublanche, 2007).

A l'hôpital d'état de Tbilissi en Géorgie, on a traité et on traite encore des patients à l'aide de la phagothérapie, non seulement pour soigner les maladies bénignes de l'enfant (otite, angine...), mais aussi pour soulager des malades porteur d'infections locales sévères (grands brûlés, infections aux staphylocoques au niveau d'une plaie de jambe, plaies à l'estomac...) induites par des bactéries parfois multirésistantes. Dans ces derniers cas, il

semblerait que la phagothérapie soit le traitement de dernier recours, quand toutes les antibiothérapies ont échouées (Lindalee, 2005).

2.3. Relation phage-antibiotique

L'association de certains antibiotiques avec certains phages est éventuellement synergique. La synergie entre un phage et un antibiotique en l'occurrence entre bactériophage- pénicilline sur le *Staphylococcus aureus* ont été soulignés par une communication de Neter dès 1944 (Neter , Clark,1944) et confirmés par Himmelweit l'année suivante (Himmelweit, 1945). Et constatée par de nombreux articles publiés en français jusque dans les années 60 à l'Institut Pasteur de Paris (série de 8 articles parus entre 1947 et 1951 sous le titre général : Antibiotiques et lyse bactériophagique) et en Roumanie ou encore en Russie, heureusement maintenant traduits (Kutateladze, Adamia, 2010). Devant les résultats encourageants, MacNeal a analysé cette combinaison non seulement sur des staphylocoques mais aussi sur des streptocoques et le colibacille tant in vitro qu'in vivo. Tous ces travaux décrivaient des synergies plus ou moins importantes. Mais précisons que cette synergie est propre à chaque couple phage-antibiotique.

En 2008, une équipe française a présenté une observation fortuite qui a été faite sur les boîtes d'un antibiogramme pratiqué directement à partir de l'urine d'un patient infecté par *Escherichia coli*, des images de lyse (plages claires) sont apparues en périphérie de certains disques d'antibiotique. En présence de différents bactériophages lytiques pour la même souche bactérienne, une synergie (*baptisée PAS, pour Phage-Antibiotic-Synergy*) a été observée avec des bêta-lactamines (aztréoname et céfixime) et des quinolones, mais pas avec la gentamycine ni la tétracycline (Comeau et al.,2008).

Il vient d'être montré que des antibiotiques eux mêmes sont capables de mobiliser les phages lysogènes (prophages) portés par des souches de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa*. En présence de certains antibiotiques (acide fusidic, tobramycine, ciprofloxacine, cotrimoxazole, erythromycine, rifampicine et imipenem) mais aussi dans d'autres conditions de stress auxquelles elles sont soumises, des bactéries sont capables de mobiliser par induction des prophages et par conséquent de favoriser la transmission de gènes exprimant des facteurs pathogènes indésirables (toxine, virulence, résistance) (Rolain et al., 2009).

2.4. Les avantages et les inconvénients de la thérapie phagique et de l'antibiothérapie

Tableau 03 : Les avantages et les inconvénients de la thérapie phagique et de l'antibiothérapie
(Dublanquet, 2014)

	PHAGOTHÉRAPIE	ANTIBIOTHÉRAPIE
Mode d'action et pharmacologie	<p>Les phages se multiplient au foyer infectieux, disparaissent avec les bactéries. Une dose unique est théoriquement suffisante.</p> <p>Le cycle de reproduction est variable selon le phage, la pharmacocinétique est mal connue. Les administrations limitées aux foyers accessibles localisés (plaies).</p>	<p>Les antibiotiques (ATB) sont métabolisés in vivo et ont une diffusion variable selon les tissus</p> <p>La pharmacocinétique est bien connue. Pour les ATB les modes d'administrations (dose, rythme, durée) sont précises.</p>
Spécificité	<p>Un phage ne s'attaque qu'à l'espèce bactérienne pathogène ciblée. Respect des flores commensales.</p>	<p>Un antibiotique à large spectre est actif sur plusieurs espèces bactériennes. Non respect des flores commensales (diarrhée, mycoses).</p>
Effets secondaires	<p>Rareté des effets secondaires (fièvre, céphalée) si la suspension phagique est purifiée.</p>	<p>Nombreux effets secondaires (rénaux, cardiaques, digestifs, allergiques, neurologiques, tendineux, ...).</p>
Impact environnemental	<p>1. Peu de risque si les phages sont naturels.</p> <p>2. Risque existant avec des phages modifiés génétiquement.</p>	<p>Risques d'autant plus importants que les spectres d'ATB sont larges et leur emploi massif (utilisation dans l'élevage).</p>
Efficacité	<p>1. L'efficacité est prouvée dans de nombreuses études expérimentales animales.</p> <p>2. Les études expérimentales humaines récentes rigoureuses rares</p>	<p>1. L'efficacité est reconnue si les indications sont bien posées.</p> <p>2. Echec si la bactérie est méconnue et/ou résistante.</p> <p>3. Les études expérimentales.</p>

	sont limitées aux phages.	rigoureuses sont nombreuses avec autorisation de mise sur le marché.
Production et coût	<ol style="list-style-type: none">1. Les phages naturels sont peu coûteux et rapidement utilisables.2. Avec des phages génétiquement modifiés ➡ coûts important, possible, délai, disponibilités.	<ol style="list-style-type: none">1. La mise sur le marché d'un nouvel ATB est très longue et très coûteuses.2. Des intérêts actuels de l'industrie pharmaceutique.

Matériel
Et
Méthodes

MATERIEL ET METHODES

1- l'échantillonnage

➤ Le prélèvement d'échantillons du sol

Le prélèvement à été réalisé au niveau de la willaya de Jijel, l' échantillon ont été prélevés le 16/04/2016 à 10h55 à une température du 29°C.

Avant le prélèvement les cinq premiers centimètresde la couche superficielle du sol ont été écartés ainsi que les gros débris (pierres,racines, etc.). On été prélevéà l'aide d'une petite spatule stérile dans la couche sous-jacente (entre 5 et 15 cm de profondeur) 400 à 500 g de terre,(Pochon et Tardieux, 1962).

L'échantillon à été distribué dans des flacons en verre transparents stériles, en laissant un volume d'air d'environ 1/10 du volume du flacon et transportés le plus rapidement possible au laboratoire dans des conditions isothermes de 4°C et manipulé le même jour du prélèvement.

Avant l'utilisation les échantillons un tamisage a été effectué pour homogénéiser l' échantillon (figure10).



Figure10 : Tamisage du sol (sec).

2. La filtration

Dans un bécher, 200g sont déposés de sol et un volume de 400 ml de tampons SM (annexe1) a été ajouté, mélanger bien et laisse au repos pendant 1h pour la sédimentation de sol (figure11). La suspension a été filtrée par la méthode de filtration sur membrane à l'aide d'un système de filtration de 1 litre (Wheaton, USA), muni d'une pompe à vide (figure11) et en utilisant une membrane filtrante stérile de $0,45\mu\text{m}$ (filtre stérile, Wattman, Germany), dont les pores peuvent retenir les cellules bactériennes et les débris cellulaires et laissant passer les phages. La suspension phagique (le filtrat) a été conservée à 4°C dans des bouteilles stériles de 100 ml.



Figure 11 : Les étapes de préparation de l'échantillon avec la filtration par le système de filtration. (Wheaton. USA)

3. 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 LB (LauriaBertani) (annexe1) coulé et solidifié au préalable dans des boites de Pétri à diamètre réduit, ensuite incubé à 30°C pendant 48 à 72h.

La deuxième méthode consiste à préparer une suspension mère (SM) à partir de 1g de sol mélangé avec 9 ml d'eau distillée stérile. La suspension subit une agitation par un vortex. Une série de dilution décimale de 10^{-1} jusqu'à 10^{-4} on été réalisé à partir de cette suspension mère. Un volume de 100 µl de chaque dilution décimale successive a été étale en duplicata à la surface de milieu gélosé LB. Pour chaque dilution deux répétitions ont été effectuées, les boites sont directement incubées à 37°C pendant 24h.

4. La purification et la conservation des souches isolées

Afin d'obtenir des souches pures, les différentes colonies sont repiquées et ensemercer par stries en appliquant la méthode d'isolement classique des trois cadrans (figure 12) sur gélose LB, puis incubée pendant 24 h à 37°C. La pureté des souches est contrôlée par des examens microscopiques directs après chaque repiquage, les colonies purifiées sont conservées sur gélose inclinée. Les tubes sont en suit placés dans le réfrigérateur à 4°C.

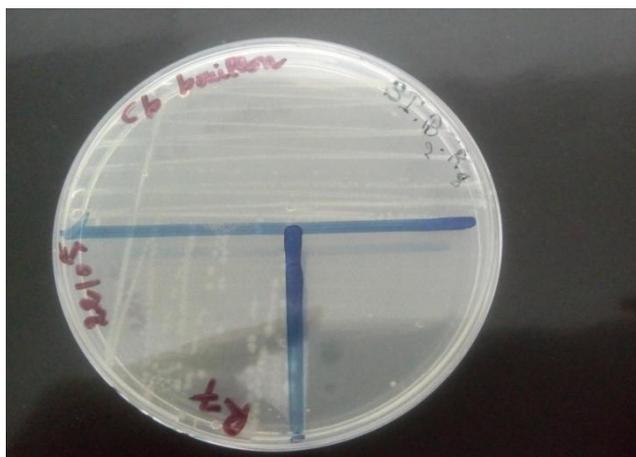


Figure 12 : La technique des cadrans

5. La technique de spot test

Cette technique a été réalisée à partir de 100 µl d'une culture bactérienne pure étalés sur une gélose LB, et laissés séchés. Une quantité de 100 µl de la suspension phagique a été filtrée par des filtre stérile (0,22µm) avant d'être déposée sur la culture bactérienne dans le centre de la gélose (Figure 13). L'incubation se fait pendant 24 h à 37°C. La présence d'un spot clair indique la présence d'une activité lytique. Cette technique a été répétée au moins deux fois pour confirmer les résultats obtenus. Les résultats positifs ont été confirmés par la technique des plages de lyse (Shirling et Speer., 1967).



Figure 13 : La technique de spot test

6. La technique des plages de lyse

Un volume (X1) de culture bactérienne (S4) en phase de croissance exponentielle a été mélangé avec un volume (X2) de la suspension phagique et un volume (X3) de chlorure de calcium a été ajouté le tous a été additionné au bouillon Lauria Bertani (Annexe 1) dans des Erlenmeyer (figure 14). L'incubation se fait à 37°C pendant 16 h sous agitation dans un incubateur-agitateur à 220 rpm.

Après l'incubation, le mélange récupéré a été distribué dans des tubes Eppendorf et centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min (centrifugeuse 5415R, Germany). Après la

centrifugation, sont transférés 100 µl du surnageant dans des tubes à essai contenant 4 ml de la gélose LB semi-molle (0.7% agar) conservée en surfusion à 45°C. Ce mélange a été homogénéisé avec précaution et coulé rapidement sur un gélose LB solidifiée pour former une mince couche supérieure.

Après solidification, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h. L'apparition ou l'absence de plages de lyse claire dans le tapis bactérienne a été observé. (Marthar et al., 2009)



Figure 14 : La suspension phagique mise en contact avec la bactérie testée

7. L'identification phénotypique des isolats

Les quatre isolats obtenus à partir de l'échantillon de sol prélevé au niveau de la willaya de Jijel ont été identifiés en s'appuyant sur l'étude de leurs caractères phénotypiques : morphologiques et biochimiques.

7.1. Les tests morphologiques

Il a été effectué par des examens microscopiques après coloration de Gramen utilisant le microscope optique (Optec) avec caméra intégrée (Canon).

7.2. Les tests biochimiques

➤ **Test de catalase :**

Une goutte d'eau oxygénée a été déposée sur une lame stérile, et une colonie bien isolée a été diluée. Le dégagement de bulles de gaz signifie la présence de la catalase.

➤ **Test de l'oxydase :**

Un disque d'oxydase a été placé sur une lame bien propre et une colonie bactérienne a été déposée avec une pipette pasteurisée au préalable. Au bout de 30 secondes l'apparition d'une coloration violette signifie que la bactérie est pourvue d'un cytochrome oxydase. L'absence de la coloration violette signifie que la bactérie est dépourvue de cette enzyme respiratoire.

➤ **Milieu mannitol-mobilité :**

Ce milieu permet de rechercher simultanément la mobilité, et l'utilisation du mannitol. L'ensemencement se fait par piqure centrale après incubation à 37°C pendant 24h. Un virage de l'indicateur rouge de phénol vers le jaune signifie que la bactérie fermente le sucre mannitol, et la formation de voile au niveau de la piqure central démontre que cette souche diffuse dans tout le milieu donc elle est mobile.

➤ **Milieu TSI :**

Le milieu TSI (Triple Sugar Iron Agar, 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 TSI a été ensemencé par des stries sur la pente et par une piqure centrale dans le culot et incubé à 37°C pendant 24h. Le résultat positif se manifeste par un virage de couleur de rouge brun vers le jaune, et des bulles d'air à l'intérieur de la gélose, et noircissement.

➤ **Milieu bouillon nitraté :**

Le milieu a été ensemencé par quelques gouttes de suspension bactérienne et incubé à 37°C pendant 24h. Après l'incubation le réactif nitrate de réductase 01 et 02 a été ajouté (la nitrate réductase est une enzyme qui catalyse la réaction de réduction des nitrates en nitrites). Si il y a un changement de couleur jaune vers le rouge indique que la bactérie possède une nitrate-réductase qui est capable de réduire les nitrates jusqu'au stade nitrites. L'absence de coloration rouge ne signifie pas obligatoirement que la bactérie testée ne possède pas de nitrate-réductase en ajoutant la poudre de zinc qui est un composé capable de réduire les ions nitrates en ions nitrites. L'apparition d'une teinte rouge indique la formation d'ions nitrites par l'action du zinc.

➤ **Test de KOH :**

Le but de cette méthode est de déterminer rapidement si une bactérie est gram positive ou négative sans passer par les étapes de coloration habituelles et sans utiliser un microscope. Il suffit de mettre en contact (sur une lame pour microscope) une colonie isolée avec une goutte d'une solution de KOH 3 % et mélanger à l'aide d'une pipette pasteur. Le mélange a été tiré vers le haut, si un filament se forme entre la pipette et la lame, la colonie isolée est alors constituée de bactéries gram négatives. Si rien n'est entraîné par la pipette, les bactéries sont gram positives (Buck 1, 1982).

➤ **La Galerie API 20E:**

La Galerie API 20E est un système pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres *bacilles* à Gram négatif, comprenant 20 tests biochimiques. Les quatre isolats ont été identifiés par la galerie API 20E (Biomérieux, SA., Marcy-L'étoile, France). La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

Les galeries ont été préparées selon les instructions de Biomérieux. Les microtubes ont été inoculés avec une suspension bactérienne (trouble correspondant au tube 0,5 de l'échelle McFarland) qui reconstitue les tests.

Ensemencement de la suspension bactérienne 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 ADH, LDC, ODC, H₂S et URE ont été remplis

par la suspension puis recouvrir d'huile de paraffine alors que les microtubes CIT, VP et GEL ont été remplis par l'inoculum jusqu'à la cupule.

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. 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 (annexe2).

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 sept chiffres qui sert de code d'identification est obtenue.

Le code de la bactérie, composé des sept chiffres, est déterminé à l'aide du tableau d'identification ou de lecture.

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

Un antibiogramme a été réalisé afin de tester la sensibilité ou la résistance des isolats vis-à-vis de plusieurs types d'antibiotiques connus. Une culture bactérienne a été ensemencée à la surface d'une gélose LB. Les pastilles imbibées d'antibiotiques (disques) sont déposés à la surface de la gélose. Après incubation à 37°C pendant 24h, trois types d'interprétations peuvent être créé selon le diamètre de la zone d'inhibition.

Résultats

Et

Discussion

RESULTATS ET DISCUSSION

Le sol est un ensemble complexe de composants minéraux et organique (humus). C'est également un écosystème où vivent des communautés hétérogènes d'organismes vivants qui sont devenus menacés par la pollution.

La pollution du sol peut être d'origine industrielle (le pétrole et ses dérivés) ou agricole (engrais, insecticides et pesticides) ce qui entraîne la présence de nombreuses molécules xénobiotiques qui peuvent affecter la flore microbienne du sol (Van der Perk, 2006).

Le sol peut être l'origine de différentes infections bactériennes ou virales comme les *Bacillus anthracis* ; une affection qui touche aussi bien l'animal que l'homme. En effet, *Bacillus anthracis* dépendrait entièrement de la sporulation pour sa vie dans le milieu extérieure. Toutefois, la forme végétative de cette bactéries serait capable pour certain de se multiplier dans le sol (Dromigny, 2009).

L'isolement de bactériophages spécifiques à ces bactéries pathogènes à partir du sol peut constituer le premier pas dans le traitement de ces infections via une phagothérapie.

Les virus dont les bactériophages adhèrent aux particules du sol. Dans la plupart des environnements, plus de 90% des virus sont adsorbés à la matrice tellurique, les facteurs influençant le degré d'adsorption comprennent : la force ionique, la composition du sol, le pH, la teneur en matières organiques, la teneur en eau et les caractéristiques physiques du virus (Lee, 2008).

Il y a peu de connaissances et de recherches qui décrivent la façon par laquelle la matrice du sol affecte l'interaction phage / hôte ainsi que sa relation avec la quantité et l'activité du bactériophage dans le sol (Lee, 2008).

L'analyse de la flore totale aérobie mésophile de l'échantillon prélevé à partir du sol qui a été réalisé au niveau de wilaya de jijel a été basée principalement sur le dénombrement. Les résultats du dénombrement après la série des dilutions décimales sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 04: Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM)

Dilutions	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Nombre de colonies UFC/g	IND	IND	83 UFC/g	
dilution				

IND :indénombrable

D'après les résultats du dénombrement on trouve que la charge microbienne diminue en fonction de l'augmentation de la dilution. Pour une dilution de 10^{-2} les germes étaient indénombrables mais au-delà de cette dilution on a trouvé une charge de 83 UFC/g correspondante à la dilution 10^{-3} . Donc le dénombrement était possible. On considère que les colonies sont dénombrables si leur nombre est compris entre 30 et 300 UFC/g.

Après l'isolement et la purification des quatre souches à partir de l'échantillon du sol. ainsi que la filtration de la suspension phagique, par des filtre stérile ($0,22\mu\text{m}$), la détection des phages a été réalisée par un « Spot-test ». Les résultats étaient négatifs, sauf pour l'isolat numéro quatre qui été sensible par l'apparition de petit zone d'inhibition sur le spot (figure15).

Pour confirmer le résultat, la présence d'un phage lytique, le test de plage de lyse à été effectué en utilisant le souche numéro quatre comme bactérie hôte.

L'apparition des plages de lyse après la mise en contact de la souche quatre isolats avec la suspension phagique issue de la filtration de l'échantillon du sol s'est révélée négative.

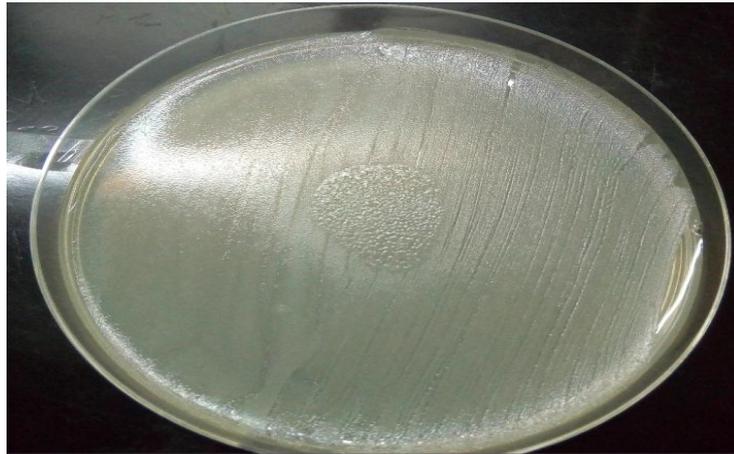


Figure15: L'apparition de petite zone d'inhibition sur le spot (S4)

On peut se référer aux points suivants pour justifier cet échec dans la détection du bactériophage :

- Ashelford et ses collaborateurs ont démontré que le comptage direct des bactériophages réalisé avec microscopie électronique à épifluorescence est très élevé et que les phages sont très abondants dans l'eau de mer et l'eau douce. Ils se produisent à des densités allant jusqu'à $2,5 \times 10^8$ ml⁻¹, par rapport à la densité phagique dans les sédiments qui est plus élevée par rapport à l'eau, et compte jusqu'à 2×10^9 ml⁻¹ mais difficile à détecter.
- Ashelford et al. (2003) a indiqué que les antibiotiques en particulier les antibiotiques bêta-lactamines peuvent augmenter la production de phage.
- La suspension phagique ne contient pas de phage à cycle lytique.
- Le temps d'incubation de la suspension phagique + la culture bactérienne n'est pas suffisant pour qu'il y ait une adsorption du phage sur la paroi cellulaire de ces bactéries (l'absence de récepteurs spécifiques sur l'hôte).
- Les souches ne sont pas sensibles au bactériophage.
- Certaines souches isolées développent 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.

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 des souches (S1-S3-S4-S5) sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 05: Les résultats de l'étude morphologique des souches isolées.

Souches	S1	S3	S4	S5
Gram	+	+	+	+
KOH	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	+
mobilité	-	-	-	+
Aspect et mode de regroupement	Filamenteuse	Bacilles	Cocci en amas	Bacille fins

(+) : résultat positif

(-) : résultat négatif.

Les quatre souches isolées sont dans leur majorité des bacilles et une seule souche filamenteuse, mobiles et immobiles à Gram positif. Ces souches ne font pas partie de la famille des *Enterobacteriaceae* qui sont des bacilles ou des coccobacilles à Gram négatif, mobiles ou immobiles, anaérobies facultatifs, oxydase négatif, catalase positif et asporulées.

La lecture des résultats sur milieu mannitol-mobilité a montré que les souches **1, 3, et 4** n'ont pas la capacité de fermenter le sucre mannitol alors que la souche **5** a 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 la production d'acides, la formation de voile au niveau de la pique central démontre que cette souche est diffusée dans tout le milieu elle est mobile.

La recherche de catalase et de l'oxydase sont des critères plus discriminatifs et plus employés pour l'identification des souches isolées (tableau 06).

Pour le test de catalase, la réaction a été considérée positive si elle se traduit par un dégagement gazeux (figure 16). La fonction principale de cette enzyme dans les cellules est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) formé

comme sous produit de processus métaboliques. Elle catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui se dégage selon :

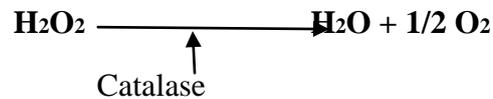


Figure16 : Réaction catalase positive

Pour le test d'oxydase, la réaction a été considérée positive (figure 17) après la détection d'un virage rapide de l'incoloré vers le violet. Cette enzyme est présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semi quinonique rose violacé.



Figure 17 : Réaction oxydase positive (S5).

Sur le milieu sélectif TSI pas de croissance des souches 1, 3, 4, et 5 donc il n'y a pas d'un changement de la couleur de l'indicateur coloré du milieu du rouge-brun vers le jaune cela est

du 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'H₂S, ainsi qu'une déformation de la gélose affirme la production de gaz.

Tableau 06: Résultats des tests biochimiques.

Tests/Souches	S1	S3	S4	S5
Catalase	+	+	+	+
Oxydase	-	+	-	+
TSI	-	-	-	-

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 des milieux hydratés ont été pris en considération dans le tableau suivant :

Tableau 07: Les résultats des milieux hydratés les souches à Gram positif.

Souches	S1	S3	S4	S5
ONPG	-	+	+	+
ADH	-	-	-	-
LDC	-	-	-	+
ODC	-	-	-	-
CIT	-	+	-	-
H ₂ S	-	-	-	-
URE	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-
IND	-	-	-	-

VP	-	-	+	+
GEL	+	+	+	+
GLU	+	+	-	+
MAN	-	-	-	-
INO	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-
RHA	-	-	+	-
SAC	-	-	-	+
MEL	-	-	-	-
AMY	-	+	+	+
ARA	-	-	+	-
NO₂	+	+	+	-
N₂	-	-	-	+
MOB	-	-	-	+
McC	/	/	/	/

(+) : présence du caractère étudié (-) : absence du caractère étudié

/ :test non fait

En revenant au résultat de la coloration de Gram de la souche **S1** (figure 18) et selon les résultats des tests biochimiques (catalase positive, oxydase négative), et selon les résultats positifs des tests GEL, GLU, NO₂ (figure19), et morphologiques (filamenteuse) ont été identifiées comme genre *Nocardia*.

Le genre *Nocardia* est distribué partout dans le monde, il est présent dans l'environnement : l'eau douce et salée, les plantes et les tissus animaux et sol, sont des réservoirs de cette bactérie (Inamadar et Palit, 2003). Les infections nocardiales chez l'humain se manifestent principalement: par la forme pulmonaire est causée par l'inhalation de la bactérie dans la poussière (Ryan et al, 2004 Murray et al, 2007).

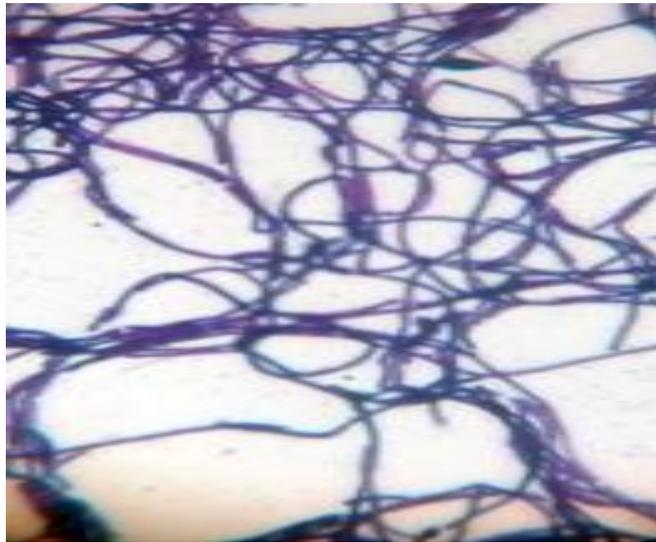


Figure 18: L'observation microscopique (X100) après coloration de Gram de la souche S1, Gram (+) filamenteuse.



Figure 19:Résultat de l'identification de l'isolat S1 .

La souche S3à Gram positif (figure 20) sous forme bacillaire, avec catalase positive, oxydase positive, et selon les résultats positifs des tests OPNG, CIT, GEL, GLU, NO₂ (figure 21) et critères s'appliquent au genre *Bacillus*.

Les *Bacillus* sont des genre hétérotrophes, saprophytes et ubiquitaires. Elles sont fréquemment retrouvées dans le sol où certaines espèces ont un rôle dans le cycle du carbone et de l'azote (Jacobsen et al, 2014). On peut trouver des *Bacillus* dans des denrées alimentaires. Certains types de *genre Bacillus* sont nocives pour les humains, de plantes ou d'autres organismes. Par exemple, *B. cereus* provoque parfois la détérioration des aliments en conserve et une intoxication alimentaire, et pour les humains *B. anthracis* provoquant la maladie du charbon (Pathol,2003). Ces bactéries sont capables de produire des endospores

leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables. Le bactérium est aussi sensible aux antibiotiques telle que la pénicilline G en particulier. Mais peut être lysé par le phage gamma (Dromigny, 2009).

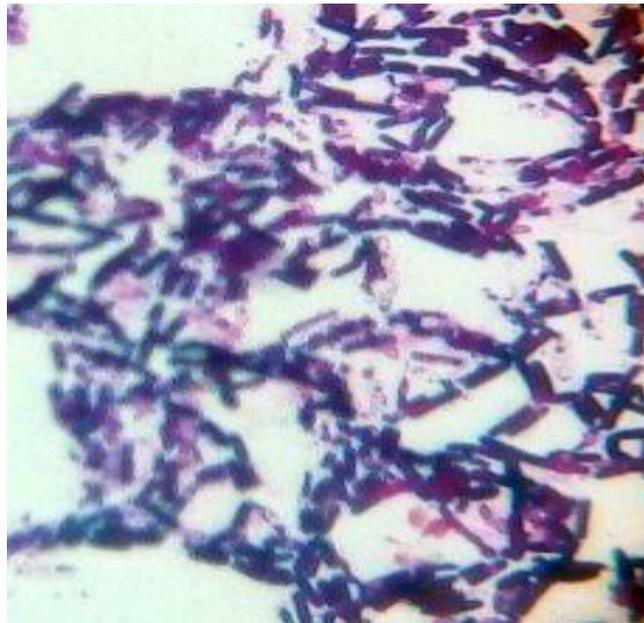


Figure 20: L'observation microscopique (X100) après coloration de Gram de la souche S3, Gram (+) bacilles.



Figure 21: Résultat de l'identification de l'isolat S3.

La souche S4 représente des cocci en amas à Gram positif (figure 22), catalase positive, oxydase négative, et selon les résultats positifs des tests OPNG, VP, GEL, NO₂ (figure 23) et des critères applicables au genre *Staphylococcus*.

Staphylococcus sont considérés comme des agents pathogènes de l'homme et d'autres mammifères (Michael Otto, 2009), responsable d'un grand nombre d'infections nosocomiales,

sont fréquemment retrouvées dans l'environnement (eaux non-traitées, sols, objets souillés). Ce genre résiste à de multiples antibiotiques (Baron, 1996).

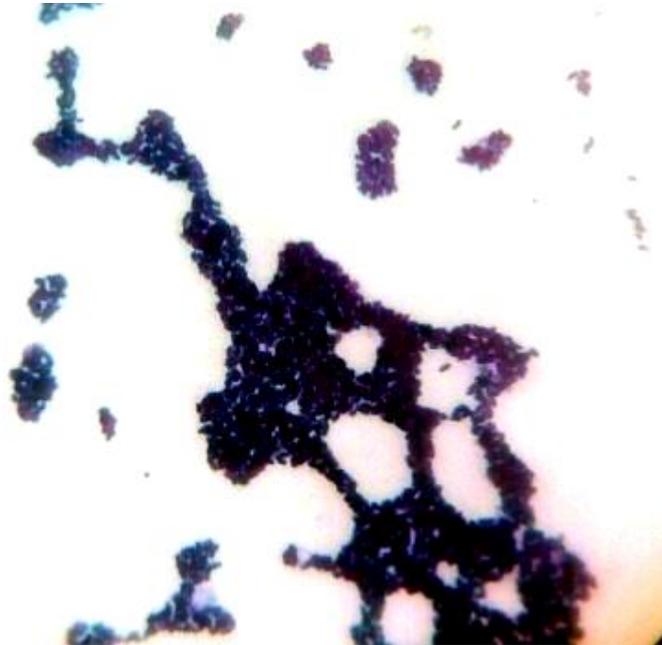


Figure 22: L'observation microscopique (X100) après coloration de Gram de la souche S4, Gram (-) cocci en amas.



Figure 23: Résultat de l'identification de l'isolat S4.

La souche S5 représente des bacilles fins à Gram positif (figure 24), avec catalase positive, oxydase positive, et selon les résultats positifs des tests OPNG, VP, GEL, GLU, N₂ (figure 25) ces critères s'appliquent à l'un du genre *Mycobacterium*.

Le genre *Mycobacterium* se trouve dans la nature où elle vie en saprophytes, elles se comportent soit en commensales soit en pathogène sont chez l'homme et les animaux. Cette genre sont lysée par le phages (L5-like viruses) (Lucas et al, 2008).



Figure 24: L'observation microscopique (X100) après coloration de Gram de la souche S5, Gram (-) bacilles fins.



Figure 25 : Résultat de l'identification de l'isolat S5 .

L'antibiogramme

Un antibiogramme est une méthode d'analyse qui détermine la concentration minimale d'inhibition (CMI) de la croissance bactérienne face à un ou plusieurs antibiotiques (sont des molécules possédant la propriété de tuer ou de limiter la propagation des bactéries).

Le principe de l'antibiogramme consiste à placer plusieurs pastilles imbibées d'antibiotiques (disques d'une dose connue) sur une culture bactérienne qui a été ensemencée à la surface d'une gélose Luria Bertani. Après l'incubation en créant une zone d'inhibition. Les différents diamètres d'inhibition en les comparant 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, a été pris en considération dans le tableau suivant :

Tableau08: Les résultats de lecture d'antibiogramme des souches isolées.

Souches/ATB	S1	S3	S4	S5
AMX	19	18	Ab	20
PiP	20	15	Ab	20
CTX	16	Ab	Ab	11
IPM	38	28	Ab	31
AN	13	20	Ab	13
PT	24	25	Ab	26
C	24	20	Ab	21
AMC	20	16	Ab	19
SP	29	20	Ab	15
CS	10	Ab	Ab	9
SPT	14	13	Ab	14
RA	15	12	Ab	15
K	22	30	Ab	23

abs : absence d'une zone inhibitrice

D'après les résultats obtenus et en comparant les valeurs mesurées avec les diamètres critiques, on peut classer les souches bactériennes selon leurs diamètres d'inhibition (figure 26) pour chaque antibiotique en trois catégories bien définies (tableau 09).

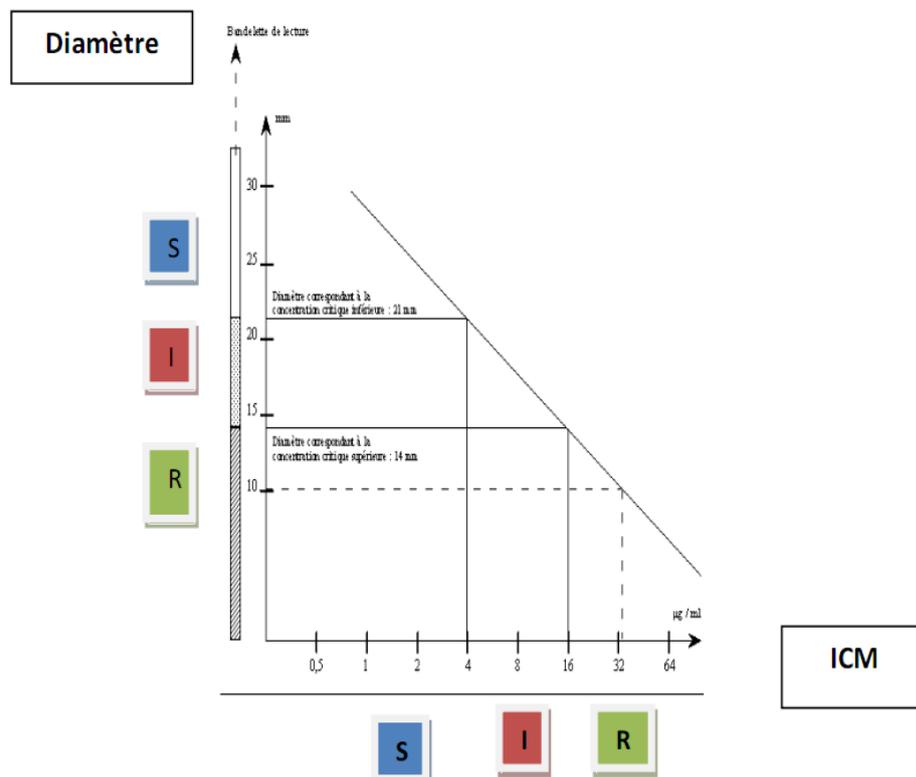


Figure 26: Les catégories cliniques S, I, R selon les valeurs critiques
(Vincent Jarlier DIU Mal Inf)

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

Tableau09: Les profils de résistance des souches caractérisées.

Souches/ATB	S1	S3	S4	S5
AMX	I	I	R	I
PiP	I	I	R	I
CTX	I	R	R	R
IPM	S	S	R	S
AN	R	S	R	R
PT	S	S	R	S
C	S	I	R	I
AMC	I	I	R	I
SP	S	I	R	I
CS	R	R	R	R

SPT	R	R	R	R
RA	I	R	R	I
K	S	S	R	S

R : la souche est **R**ésistante **S** : la souche est **S**ensible **I** : la souche est **I**ntermédiaire

Les souches catégorisées **R** sont celles pour Les quelles la probabilité de succès thérapeutique est forte, c'est l'exemple de la souche **S1** qui a été identifiée comme qui selon les références s'est révélée sensible à Imipinem (figure 27).

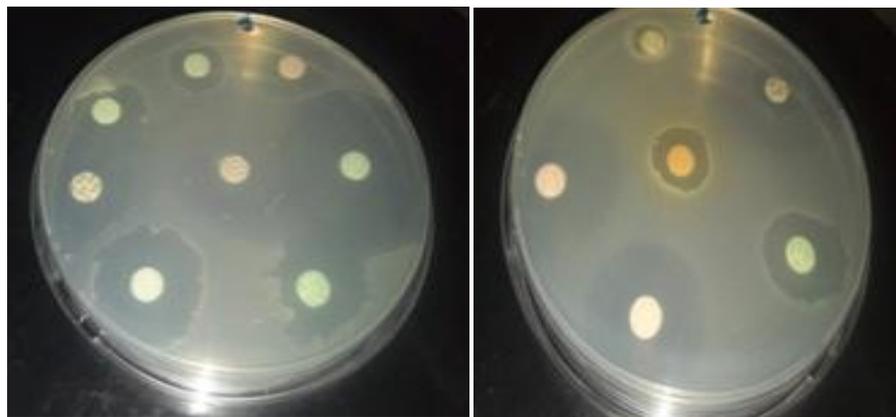


Figure 27:L'antibiogramme de la souche *Nocardia* (S1).

Les souches catégorisées **S** sont celles pour les quelles 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 **S4** qu'est identifiée comme *Staphylococcus.*, une des bactéries opportunistes les plus résistantes aux tous les antibiotiques a été décrite dans cette étude (figure 28).

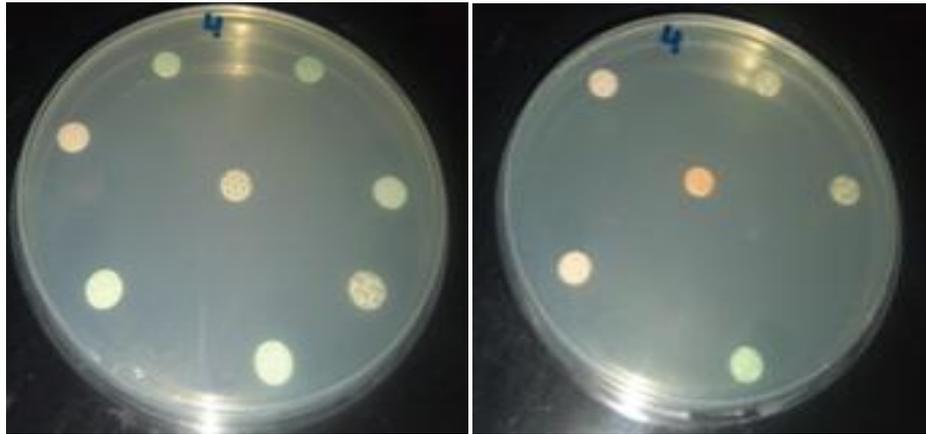


Figure 28:L'antibiogramme de la souche *Staphylococcus* (S4).

Les souches catégorisées **I** sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. C'est l'exemple de la souche **S5** qui a été identifiée comme, elle a une certaine sensibilité aux imipénèm, pristinamycine, kanamycine (figure 29).

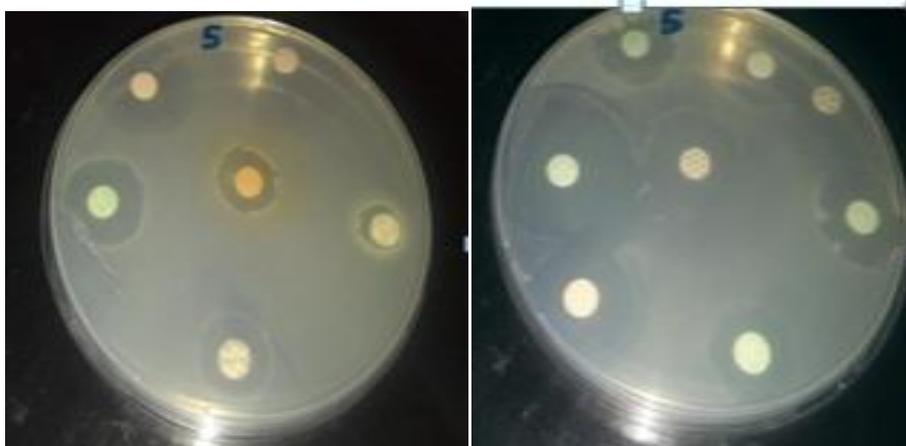


Figure 29:L'antibiogramme de la souche *Mycobactérium* (S5).

Conclusion

Et

Perspectives

Conclusion et Perspectives

Cette étude préliminaire portée sur la recherche des bactériophages a permis d'isoler des souches bactériennes à partir d'un échantillon du sol prélevé au niveau de la wilaya de jijel. Plusieurs repiquages ont été appliqués pour purifier ces bactéries et les utiliser, par la suite pour le criblage de bactériophages.

Les souches testées ne sont pas sensibles aux bactériophages suite à l'application du spot test et la technique des plages de lyse.

Pour détecter les phages à partir du sol, la technique de plage de lyse doit être amélioré en jouant sur la composition du milieu de culture ; remplacer l'agar par l'agarose (car l'agar peut inhiber la formation des plages), et aussi en prenant en considération la température et le pH du milieu réactionnel. Répéter la technique plusieurs fois en effectuant des échantillonnages qui s'étalent pendant toute l'année.

Des techniques avancées comme la microscopie électronique, la PFGE, la SDS-PAGE et le séquençage génomique par RT-PCR devraient être utilisées afin de détecter et dénombrer les phages directement à partir du sol, et aussi les identifier.

Les résultats de cette étude révèlent d'abord la diversité des souches à Gram positif qui n'ont pas été identifiées jusqu'à l'espèce, cela exige des techniques particulières comme les galeries API spécifiques aux Gram positif et les techniques d'identification génotypiques comme le séquençage de l'ADNr 16S.

L'application d'un antibiogramme a été réalisée pour tester la sensibilité ou la résistance des isolats vis-à-vis de plusieurs types d'antibiotiques 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 la nouvelle génération doivent être testés sur chaque isolat.

Références
Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ackermann, H. W. (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology Journal*, 154(4):245-251.

Ackermann, H. W. (2009). Phage classification and characterization. *Methods in Molecular Biology*, 501:127-140.

Ashelford, K.E., Day, M.J et Fry, J.C. (2003). Elevated Abundance of Bacteriophage Infecting Bacteria in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(01):285–289.

Atterbury, R. J. (2009). Bacteriophage biocontrol in animals and meat products. *Microbial Biotechnology*, 2:601-612.

Atterbury, R. J., Connerton, P. L., Dodd, C. E., Rees, C. E. et Connerton, I. F. (2003). Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10):6302-6306.

Azizian, R., Nasab, S. D. M. et Ahmadi, N. A. (2013). Bacteriophage as a Novel Antibacterial Agent in Industry and Medicine. *Journal of Paramedical Sciences*, 4(4) :93-101.

Baguelin, M. Modélisation de Systèmes Complexes Par Métadynamiques: application à La Modélisation de Populations en co-évolution. Thèse de Automatique et Informatique Industrielle, Lille. France : L'université des Sciences et Technologies, (2003).

Baron, S. Medical Microbiology. 4th edition. USA. Galveston, Texas: University of Texas Medical Branch. (1996).

Barrangou, R. et Pijkeren J.P.V. (2016).Exploiting CRISPR–Cas immune systems for genome editing in bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*,37:61–68.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H , Richards M, Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A. et Horvath, P.(2007).CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*,315(5819) : 1709-1712.

Bergh, O., Borsheim, K.Y., Bratbak, G. et Heldal, M. (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 340(6233):467-468.

Borsheim, K.Y.(1993). Native marine bacteriophages. *FEMS Microbiology Ecology Journal*,102:141-159.

Bougeois, C. M et Leveau, J. Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. France-Paris: Lavoisier. (1996). 331

Braly, J.P. (2015).La modification de l'ADN à la portée de tous . *Technologie*, 495 : 60.

Buck , J .D. (1967) .Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Applied Microbiology*, 15(2): 456–457.

Clokie, M.R., Millard A. D., Letarov A. V. et Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1) : 31–45.

Clokie , Martha R.J. et Kropinski (2009) . Bacteriophages:Methods and Protocols. *Applied Environmental Microbiology*, 44(4): 992–993.

Coffey, B., Mills, S., Coffey, A., McAuliffe, O. et Ross R. P. (2010). Phage and their lysins as biocontrol agents for food safety applications. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1:449-468.

Comeau, AM., Tetart, F., Trojet, SN., Prere, MF. et Krisch, HM. (2008). La synergie phages-antibiotiques : un enjeu pour la phagothérapie. *Médecine/Sciences* ,24 :449-451.

Daou, N. Identification de nouveaux facteurs hôtes-dépendants chez *Bacillus cereus* Caractérisation moléculaire et fonctionnelle d'IlsA, une protéine de surface essentielle pour l'acquisition du fer au cours de l'infection. Thèse de Doctorat en Microbiologie, Paris-France : L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), (2008) ,9.

Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M.R., Vogel, J. et Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* , 471(7340) : 602-607.

D'Hérelle. F. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Séries D*, 165 :373–375.

Dhya, S., Merrill, C. R. et Biswas, B. (2014). Therapeutic and prophylactic applications of bacteriophage components in modern medicine. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(1), a012518.

Drouji, S. Mise au point des bactériophages : caractéristiques et applications. Thèse de pharmacie, Rabat : Faculté de Médecine et de pharmacie, (2009), N°: 69.

Dublanchet, A. (2008). La phagothérapie au XXI^e siècle. Première partie :que pourrait-elle apporter aujourd'hui ? *Antibiotiques* ,10(4): 218-209.

Dublanchet, A. Des virus pour combattre les infections .Lausanne :Editions Favre , (2009) , 240.

Dublanchet, A. (2007). The epic of phage therapy. *Can j infect dis Med Microbial*, 18:15-18.

Dublanchet, A., Fruciano, E. (2008). Brève histoire de la phagothérapie. *Médecine et maladies infectieuses*,38(8) : 415-420.

Dublanchet, A.(2014) .Qu'est-ce que la phagothérapie ? *Hegel*, 4(4) : 359.

Dupont, K., Vogensen, F. K., Neve, H., Bresciani, J. et Josephsen, J.(2004). Identification of the receptor-binding protein in 936-species lactococcal bacteriophages. *Appl. Applied and Environmental Microbiology*,70:5818-5824.

Dromigny, É.Bacillus anthracis. Editions Tec et Doc. France-Paris: Lavoisier. (2009).

Fischetti, V. A.(2008). Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Current Opin in Microbiology*,11:393-400.

Fuhrman, J. A.(1999). Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* , 399:541- 548.

Fuhrman, J. A. et Schwalbach .M. (2003). Viral influence on aquatic bacterial communities. *The Biological Bulletin*, 204:192-195.

Gandham, P. (2015). Bacteriophages: their use in the treatment of infections in the future.*International Journal of Current Microbiology and Applied*, 4(2):867-879.

Himmelweit, F(1945). Combined action of penicillin and bacteriophage on staphylococci.*The Lancet Journal*, 246(6361):104-105.

Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith, V.H. et Bohannon, B.J.M. (2003). Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters*, 6(7):613-622.

- Inamadar, A. C et Palit, A. (2003).**Primary cutaneous nocardiosis: a case study and review. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 69 (6), 386-391.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino,K., Amemura, M. et Nakata, A. (1987).** Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*,169(12) : 5429–5433.
- Jacobsen, B. J., Ockey, S.C., Highland, H. B., Dimock, M. B.(2014).**« Use of *Bacillus mycoides* isolate J induced resistance in IPM programs», In: The American Phytopathological Society,URL://www.apsnet.org/meetings/Documents/2014_meeting_abstracts/aps2014abO153.htm. (Consulté en Mai 2016).
- Jessamond Caron.(1990).**les systèmes vivants présentent une organisation particulière de la matière ,p :1-20.
- Jinek ,M ., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E. (2012).** A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337: 816-821.
- Oost, J.V.D., Westra, E. R., Jackson .R.N. et Wiedenheft ,B.(2014).** Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems , *Nature Reviews Microbiology*,12: 479-492.
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R et Górski, A. (2011).** The influence of external factors on bacteriophages-review. *Folia Microbiologica*,56(3): 191-200.
- Kutateladze, M. et Adamia, R. (2010).**Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology*,28(12):591-595.
- Kutter, E. et Sulakvelidze, A. BACTERIOPHAGES: Biology and Applications.**1st Edition. United States of America: CRC Press.(2005).

Labrie, S. J., Samson, J. E. et Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*,8(5), 317-327.

Lee, J. (2008).The phage in the dirt: Studies in the ecology of terrestrial bacteriophages.*Marine Biological Laboratory.Microbial Diversity*, 1-20

Lucas, F., Radomski, N., Moulin, L., Haenn, S., Betelli, L et Cambau, E. « Détection des mycobactéries non tuberculeuses dans l'eau »,l'Institut de veille sanitaire, In : Journée de veille sanitaire INVS, Paris, France, (2008).

Ly-Chatain, M. H. (2014). The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in Microbiology*,5:51.

Madigan, M.T. et Martinko, J.M.BrockBiologie des micro-organismes. 11^{ème} édition. France : Pearson Education .Université de Carbondale de l'Illinois du Sud.(2007). Traduction française coordonnée par Daniel Prieur et publiée par Pearson Education France.

Mahony, J., McAuliffe, O., Ross, R. P.Van et Sinderen, D. (2011). Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 157-163.

Michael Otto , Ph.D. (2009). Staphylococcus epidermidis- l'agent pathogène "accidentelle".*Nature Reviews Microbiology*, 7 (8): 555-567.

Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L et Pfaller, M. A. Manual of Clinical Microbiology. 9th Edition. Washington-U.S.A: ASM Press.(2007).

Krupovic, M., Dutilh, B.E., Adriaenssens, E. M., Wittmann, J., Vogensen, F. K., Sullivan M.B., Rummieks J., Prangishvili, D., Lavigne, R., Kropinski, A.M., Klumpp,J ., Gillis, A., Enault, F., Edwards, R. A., Duffy, S., Clokie, M. R. C., Barylski, J ., Ackermann, H.W. et Kuhn, J.E. H. (2015).Taxonomy of prokaryotic viruses: update from the ICTV. *Archives of Virology*, (2016) 161:1095–1099.

Mojica, F.J, Díez-Villaseñor C, García-Martínez, J. et Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 60 (2): 174-182.

Heuclin-Reffait, Morgane, (2015) , « Avec «Crispr/Cas9», modifier un ADN devient presque aussi simple qu'un copier-coller », sur : *Libération Sciences*, URL :http://www.liberation.fr/sciences/2015/07/24/crisprcas9-une-methode-de-modification-genetique-a-la-fois-prometteuse-et-inquietante_1352779(consulté le 26 août 2015).

Neter, E., Clark, P. (1944). The effects of penicillin on Staphylococcus bacteriophage. *Journal of Bacteriology*, 48:261.

O'Flaherty, S., Ross, R. P. et Coffey, A. (2009). Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4): 801-819.

Pfankuch, E. et Kausche, G. A.(1940). Isolation and supra-microscopic representation of a bacteriophage. *Naturwissenschaften*, 28:46.

Pirisi, A. (2000). Phage therapy - advantages over antibiotics? *The Lancet*. 356:(9239):1418.

Prescott, L. M., Harley, J. P. et Klein, D. A. Microbiologie, 2^e édition française. Bruxelles, Belgique : Éditions De Boeck Université.(2003).1137.

Pochon, J. et Tardieux, P. (1962) .Techniques d'analyse microbiologie du sol , Saint-Mandé, Éditions de la Tourelle .

Proença, D., Leandro, C., Garcia, M., Pimentel, M. et São-José, C. (2015). EC300: a phage-based, bacteriolysin-like protein with enhanced antibacterial activity against *Enterococcus faecalis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(12): 5137-5149.

- Resch, G. A. J. M. (2002).** Les bactériophages, nouvelle perspective dans le traitement des maladies infectieuses? *Rev Mens Suisse Odontostomatol*, 112(6): 643-644.
- Rolain, J.M., Francois, P., Hernandez, D., Bittar, F., Richet, H., Fournous, G., Mattenberger, Y., Bosdure, E., Stremler, N., Dubus, J.C., Sarles, J., Reynaud-Gaubert, M., Boniface, S., Schrenzel, J. et Raoult, D. (2009).** Genomic analysis of an emerging multiresistant *Staphylococcus aureus* strain rapidly spreading in cystic fibrosis patients revealed the presence of an antibiotic inducible bacteriophage. *Biology Direct*, 4 : 1.
- Ryan, K. J et Ray, C. G.** Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Disease. Fourth Edition. U.S.A: McGraw-Hill. (2004).
- Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M. et Moineau, S. (2013).** Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10): 675-687.
- Saussereau, E. (2012).** Utilisation des bactériophages comme thérapie lors d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* dans le cadre de la mucoviscidose : efficacité et innocuité. pneumologie et système respiratoire. Université Pierre et Marie Curie-Paris V. France.
- Sciara, G., Bebeacua, C., Bron, P., Tremblay, D., Ortiz-Lombardia, M., Lichière, J., van Heel, M., Campanacci, V., Moineau, S. et Cambillau, C. (2010).** Structure of lactococcal phage p2 baseplate and its mechanism of activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A*, 107(15):6852- 6857.
- Scott, A E., Timms, A. R., Connerton, Ph. L., Carrillo, C. L., Radzum, Kh. A. et Connerton, I. F. (2007).** Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. *PLOS Pathogens*, 3(8): 119.
- Sharp, R. (2001).** Bacteriophages: biology and history. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(7):667–672.

Shirling, E.B. et Speer, M. (1967). Spot test method for rapid serological grouping of streptomycete bacteriophages. *Applied Microbiology*, 15(2): 456–457.

Souriau, Ch., Hua, The D., Lefranc, M.P. et Weill, M. (1998). Présentation à la surface de phages filamenteux : les multiples applications de phage display. *Médecine/Science*, 14 : 300-309.

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*, 14(1) :17-23.

Spinelli, S., Desmyter, A., Verrips, C. T., de Haard H. J., Moineau, S. et Cambillau, C.(2006). Lactococcal bacteriophage p2 receptor-binding protein structure suggests a common ancestor gene with bacterial and mammalian viruses. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13:85-89.

Sulakvelidze, A. (2011). Safety by nature: potential bacteriophage applications. *Microbe*, 6(3):122–126.

Summers, W. C. *félix d'hérelle and the origins of molecular biology.* New Haven.U.S.A: Yale University Press,1999.

Tomat, D., Migliore, L., Aquili, V., Quiberoni, A. et Balagué, C. (2013). Phage biocontrol of enteropathogenic and shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat products. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(3):20.

Tremblay, D. M., M. Tegoni, S., Spinelli, V., Campanacci, S., Blangy, C., Huyghe, A., Desmyter, S., Labrie, S., Moineau, S. et C. Cambillau. (2006). Receptor-binding protein of *Lactococcus lactis* phages: identification and characterization of the saccharide receptor-binding site. *Journal of Bacteriology*, 188:2400-2410.

Twort, F.W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*. 186(4814):1241-1243.

Vonlanthen, A. (2011). « Dossier – Bactériophages (phages) : le futur des antibiotiques? »,
In : Dossiers, Podcast-Sciences,
URL ://www.podcastscience.fm/dossiers/2011/03/11/bacteriophages-phages-le-futur-des-
antibiotiques/. (Consulté en Mai 2015)

Williamson, K. E., Radosevich, M. et Wommack, K. E. (2005). Abundance and Diversity of Viruses in Six Delaware Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6):3119-3125.

Wittebole, X., De Roock, S., et Opal, S. M. (2014). A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 5(1) : 226-235.

Withey, S., Cartmell, E., Avery, L. M. et Stephenson, T. (2005). Bacteriophages - potential for application in wastewater treatment processes. *Science of the Total Environment*, 339(1-3):1-18.

Wormmack, K.E. et Colwell, R.R. (2000). Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64:69-114.

Annexes

ANNEXES 1
1. MILIEUX DE CULTURE (g/L) 2. TAMPON

Luria (bouillon)	Tampon SM
Peptone.....10g	100 mM NaCl
Extrait de levure.....5g	10 mM Tris HCl, pH : 7.4
NaCl.....5g	10 mM MgSO ₄
CaCl ₂0.36g	Eau distillée1L
pH : 7,2	pH : 7,0

Luria Bertani Solide**3. REACTIFS**

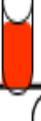
Peptone (tryptone).....10g	Nitrate réductase (NR)
Extrait de levure5g	Nit 1 ; Nit 2
NaCl.....5g	- Voges-Proskauer
CaCl ₂0,36g	VP1 ; VP2
Agar15g	- Kovacs
pH: 7,2	

Luria Bertani demi-molle

Peptone (tryptone).....10g
Extrait de levure5g
NaCl.....5g
CaCl ₂0,36g
Agar7,5g
pH : 7,2

ANNEXE 2

Tableau de lecture de la galerie Api 20E

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E						
Microtube	Substrat :	Caractère recherché :	Révélateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Beta galactosidase		Lecture directe		
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Ornithine Décarboxylase	Rouge de Phénol	Lecture directe		
[CIT]	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S		Lecture directe		
URÉ	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe		 
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase		Lecture indirecte Ajouter une goutte de réactif chlorure de fer III		
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		Lecture indirecte Ajouter une goutte de réactif Kovacs	 	 
[VP]	Pyruvate de sodium	production d'acétoïne (3-hydroxybutanone)		Lecture indirecte Ajouter 1 goutte de VP1 et VP2 Attendre 10 minutes		 
[GEL]	Gélatine	gélatinase		Lecture directe		
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		
NO ₂ ⁻ / N ₂	Nitrates (NO ₃ ⁻)	Nitrate réductase		Lecture indirecte Ajouter 1 goutte de NIT1 et NIT2 et zinc éventuellement		

Résumés

ملخص

العائيات أو الفيروسات البكتيرية موجودة في كل مكان على هذا الكوكب، وهي م تواجدة بكميات أكبر خاصة في البراز، و الحمأة و الصرف الصحي والتربة.

الهدف من هذه الدراسة هو عزل العائيات، و تحديد البكتيريا العائلة لها، من عينة تربة تم الحصول عليها من ولاية جيجل . من أجل اختبار حساسية العزلات البكتيرية لمعلق العائيات تم عزل أربع سلالات بكتيرية، اعتمدنا على تقنيتين: اختبار النقطة و اختبار المناطق الراقئة.

بالاعتماد على الاختبارات الأولية للبحث، و من خلال النتائج المتحصل عليها، لم يتم إثبات أن السلالة كانت عائلة أو عرضة للفاج.

تظهر نتائج الاختبارات المظهرية للمزارع البكتيرية أن جميع العزلات موجبة الغرام، حيث تم تشخيصها كما يلي:

Nocardia على أنها S1، *Bacillus* على أنها S3، *Staphylococcus* على أنها S4، *Mycobactérium* على أنها S5.

وفقا لاختبار حساسية العزلات البكتيرية (l'antibiogramme)، قد تم تحديد سلالات شديدة المقاومة ضد المضادات الحيوية مثل السلالة S4، و أخرى ذات حساسية مفرطة مثل S1، إلى ذات الحساسية المتوسطة مثل S5.

وهناك حاجة إلى تقنيات المجهر الالكتروني، و تقنيات البيولوجيا الجزيئية، مع كل هذه التقنيات (اختبار النقطة و اختبار المناطق الراقئة)، للتعرف على الجراثيم و البكتيريا التي تعولهم.

الكلمات المفتاحية : العائيات، التربة، ولاية جيجل، اختبار النقطة، اختبار المناطق الراقئة، وقابلية، المضادات

الحيوية، *Mycobactérium*، *Staphylococcus*، *Bacillus*، *Nocardia*.

RESUME

Les phages sont présents partout sur la planète et sont plus répandus en quantité plus importante dans les excréments, les boues, les eaux d'égout et le sol.

L'objectif de cette étude était l'isolement des bactériophages et l'identification de leurs bactéries hôtes à partir d'un échantillon de sol qui a été réalisé au niveau de wilaya de Jijel. La sensibilité des isolats à la suspension phagique a été testée par : la technique de spot test et les plages de lyse.

A partir de cette recherche, et d'après les résultats obtenus, aucune souche ne s'est révélée sensible à un phage.

Les résultats des tests phénotypiques montrent que tous les isolats sont des Gram positifs, identifiés comme : *Nocardia* pour S1, *Bacillus* pour S3, *Staphylococcus* pour S4, *Mycobactérium* pour S5. Selon les résultats de l'antibiogramme des souches hautement résistantes ont été mises en évidence comme la souche S4 d'autres souches ont été sensibles aux ATB comme la souche S1. Des souches ont une sensibilité intermédiaire aux ATB notamment la souche S5.

Les techniques de la microscopie électronique et les techniques de la biologie moléculaire avec toutes ces techniques (spot test, plage de lyse) est nécessaire pour identifier le bactériophage ainsi que leur bactérie hôte.

Les mots clés : Bactériophage, sol, wilaya de Jijel, spot test, plages de lyse, antibiogramme, *Nocardia*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Mycobactérium*.

ABSTRACT

Phages are present throughout on the planet and are more prevalent in larger amounts in the feces, sludge, sewage and soil.

The objective of this study was the isolation of bacteriophages and identifying their host bacteria from a sample of soil was achieved at wilaya of Jijel. The sensitivity of the isolates to the phage suspension was tested by the technique of spot test and the lysis plaques.

From this research, and the results obtained, no strain was susceptible to phage.

The results of the phenotypic tests show that all isolates are gram positive, identified as: *Nocardia* for S1, S3 *Bacillus*, *Staphylococcus* to S4, S5 to *Mycobacterium*. According to the results of the susceptibility of highly resistant strains have been identified as the S4 strain with other strains were susceptible to ATB as the strain S1. Strains have an intermediate sensitivity to ATB particular strain S5.

Electron microscopy techniques and molecular biology techniques with all of these techniques (spot test, lysis range) is needed to identify the bacteriophage and their host bacterium.

Keywords: bacteriophage, ground, wilaya of Jijel, spot test, lysis plaque, susceptibility, *Nocardia*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*.

Thème

Etudes sur les bactériophages du sol et leurs méthodes d'isolement

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en
MICROBIOLOGIE GENERALE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE DES MICROORGANISMES

Résumé

Les phages sont présents partout sur la planète et sont plus répandus en quantité plus importante dans les excréments, les boues, les eaux d'égout et le sol.

L'objectif de cette étude était l'isolement des bactériophages et l'identification de leurs bactéries hôtes à partir d'un échantillon de sol qui a été réalisé au niveau de wilaya de Jijel. La sensibilité des isolats à la suspension phagique a été testée par : la technique de spot test et les plages de lyse.

A partir de cette recherche, et d'après les résultats obtenus, aucune souche ne s'est révélée sensible à un phage.

Les résultats des tests phénotypiques montrent que tous les isolats sont des Gram positifs, identifiés comme : *Nocardia* pour S1, *Bacillus* pour S3, *Staphylococcus* pour S4, *Mycobactérium* pour S5. Selon les résultats de l'antibiogramme des souches hautement résistantes ont été mises en évidence comme la souche S4 d'autres souches ont été sensibles aux ATB comme la souche S1. Des souches ont une sensibilité intermédiaire aux ATB notamment la souche S5.

Les techniques de la microscopie électronique et les techniques de la biologie moléculaire avec toutes ces techniques (spot test, plage de lyse) est nécessaire pour identifier le bactériophage ainsi que leur bactérie hôte.

Mots clés :

Bactériophage, sol, wilaya de Jijel, spot test, plages de lyse, antibiogramme, *Nocardia*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Mycobactérium*.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biologie Moléculaire, FSNV, UFM Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury : . BOUZERAIB Latifa (MAA- UFM Constantine).

Encadreur : Dr. BOUBEKRI Karima (MCA- UFM Constantine).

Examinatrice : Mme. GUERGOURI Ibtissem (MAA- UFM Constantine).

Tutrice : TIR Radja.

Date de soutenance : 04/07/2016

