

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

# Mémoire

**De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master**

**Domaine** : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)

**Filière** : Sciences biologiques

**Spécialité** : Biotechnologie microbienne

Intitulé du thème :

Isolement des bactériophages à partir des écosystèmes  
aquatiques « Barrage Sarno à Wilaya de Sidi Bel Abbes »  
« Barrage Sidi Abdelli et El Mafrouche à Wilaya de  
Tlemcen »

**Présenté par** : Melle Mebarki Insaf

**Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :**

**Président** : Mr Abbouni. B (Professeur, Univ\_UDL\_SBA)

**Examineur** : Mr Benine. M (MCA, Univ\_UDL\_SBA)

**Examinatrice** : Mme Khaldi. A (MCB, Univ\_UDL\_SBA)

**Encadreur** : Mme Ghalem. M (MCB, Univ\_UDL\_SBA)

**Année universitaire 2020 – 2021**

**Session** : « Juin »

## Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le Tout Puissant de m'avoir donné santé, patience et courage pour réaliser ce modeste travail.*

*Mes sincères remerciements, ma reconnaissance, ma gratitude et mon profond respect à Mon encadreur **Mme GHALEM Mimouna** (maîtres de conférences à l'Université de Djilali Liabes à Sidi Bel Abbès) qui m'a introduit dans le domaine de microbiologie et pour le temps, la patience et la confiance qu'elle m'a accordée.*

*J'exprime tous mes remerciements à **Mr ABBOUNI B.** (Professeur à l'université de Djilali Liabes à Sidi Bel Abbès) pour l'honneur qu'il m'a fait d'assurer la présidence de ce mémoire. Je lui adresse également toute ma reconnaissance pour l'intérêt accordé à mon travail.*

*Mes sincères remerciements au membre de jury : **Mme KHALDI Amina** et **Mr BENINE Mohamed El Amine** (maîtres de conférences à l'Université de Djilali Liabes à Sidi Bel Abbès) d'avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteurs.*

*Je tiens à remercier aussi **Melle BOUYAKOUB.N** et **Mme BOUCHOUICHA.S** pour leurs aides et surtout pour leur soutien moral.*

*Je remercie du fond du cœur **Mr SELOUANI Moustafa** (ingénieur au laboratoire de microbiologie générale) et **Melle BRENISSET Jouhaina**, **Mme GHARBI Nawel** et **Mme Samira** (les ingénieurs du laboratoire de microbiologie appliquée) pour leurs aides et leur soutien le long de mon travail.*

*Je remercie enfin toute personne ayant participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.*

*Mebarki Insaf*

## *Dédicaces*

*C'est avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie que, Je dédie ce modeste travail à mes deux bougies qui brûlent pour m'éclairer le chemin, à la personne qui m'est la plus chère au monde, ma mère qui m'a élevé, éduqué et a sacrifié toutes les belles années de sa vie pour moi, et à mon père qui n'a jamais cessé de combattre pour me voir réussir un jour. Je les remercie pour leur amour et leur soutien émotionnel et inconditionnel qui m'ont permis d'aller jusqu'au bout de mes études. Que dieu les protège pour nous. J'espère que vous soyez*

*fiers de moi*

*A mes grands-parents*

*Qui sont mon modèle de force et d'amour. Que dieu vous garde et vous protège pour moi.*

*A ma grand-mère, qui nous a quitté pour un monde meilleur. Laissant dans notre vie un vide immense, merci de m'avoir donné des souvenirs me permettant de conserver mon âme d'enfant.*

*A mon cher frère : Mohammed*

*A mes chères sœurs : Ilhem et Israa*

*A toute la famille Mebarkî et Sennour*

*A mes chers amis*

*Farida, Sabrina, Imène, Waffa, Younes, Adel et Imad ; Merci d'avoir su me changer les idées et m'inspirer la force et le courage nécessaire à la poursuite.*

*Mebarkî Insaf*

## Résumé

Les phages sont des virus qui infectent de manière spécifique les bactéries. Le dicton « Les ennemis de nos ennemis sont nos amis » s'applique à l'utilisation de la phagothérapie contre les bactéries résistantes aux antibiotiques.

L'objectif de notre travail est l'isolement des bactériophages à partir de trois milieux aquatiques et de mettre en évidence leur effet antibactérien naturel sur les souches ATCC d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* en s'appuyant sur la méthode des plages de lyse.

Les résultats obtenus montrent la présence des lyse phagique dans la majorité des échantillons pour *S.aureus*, et par rapport au *E.coli* l'absence de ces plages de lyses dans l'échantillon de Sidi Abdelli peut-être à cause du manque de sensibilité des souches testées ou bien au caractère lysogéniques des phages de cet échantillon.

**Mots clés :** Bactériophages, Phagothérapie, Souche ATCC, Lyse phagique, Plages de lyse, Isolement.

## Abstract

Phages are viruses that specifically infect bacteria. The saying "The enemies of our enemies are our friends" applies to the use of phage therapy against antibiotic resistant bacteria.

The objective of our work is to isolate bacteriophages from three aquatic environments and to demonstrate their natural antibacterial effect on the ATCC strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* using the plaque lysis method.

The results obtained show the presence of phage lysis in the majority of samples for *S. aureus*, whereas, no phage lysis has been detected for *E.coli* in the sample of Sidi Abdelli. This fact may be explained by the lack of sensitivity of the tested strains or by the lysogenic character of the phages present in this sample.

**Keywords** : Bacteriophages, Phagotherapy, ATCC strain, Phage lysis, Lysis ranges, Isolation.

## ملخص

العائيات هي فيروسات تصيب البكتيريا على وجه التحديد. تنطبق مقولة "أعداء أعدائنا أصدقاءنا" على الاستخدامات العلاجية للعائيات ضد البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية.

الهدف من عملنا هو عزل العائيات من ثلاث بيئات مائية وإثبات تأثيرها الطبيعي المضاد للبكتيريا على سلالات من *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* من مجموعة الـ ATCC باستخدام طريقة Plaque de lyse

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها وجود تحلل الملتهمة في غالبية عينات بكتريا *S. aureus*، وبالمقارنة مع *Escherichia coli* فإن عدم وجود هذه المناطق من التحلل في عينة سيدي عبدلي لي هذه الأخيرة قد يعود ربما لعدم حساسية السلالات المختبرة. أو الطابع اللايسوجيني للعائيات في هذه العينة.

**الكلمات المفتاحية:** العائيات، العلاج بالعائيات، سلالة ATCC، تحلل العائيات، نطاقات التحلل، العزلة.

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Sommaire	
Liste d'abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
INTRODUCTION .....	16
<b>CHAPITRE I.....</b>	<b>19</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>19</b>
I. Les bactériophages.....	20
1. Définition .....	20
2. Historique .....	21
2.1. La découverte du bactériophage .....	21
2.2. Le rôle des bactériophages dans la naissance de la biologie moléculaire .....	23
3. Structure.....	25
4. Classification .....	27
4.1. Les phages à queue (caudés) .....	33
4.2. Phages à petites capsides icosaédriques ou à morphologie filamenteuse .....	35
4.3. Phages contenant une membrane.....	35
5. Relation phage-cellule hôte.....	36
6. Mécanisme d'action des bactériophages .....	36
6.1. Les mécanismes de défense de la cellule hôte et la réponse du phage .....	36
6.2. Processus d'infection.....	37
6.2.1. Adsorption .....	37
6.2.2. Injection de l'ADN viral .....	37
6.2.3. Réplication de l'ADN viral .....	38
6.2.4. Transcription et Traduction.....	38
6.2.5. Assemblage des nouveaux virions.....	39
6.2.6. Lyse de l'hôte cellulaire .....	39
6.3. Les cycles de réplifications .....	41
6.3.1. Cycle lytique « phages virulents ».....	41
6.3.2. Cycle lysogénique « phages tempérés » .....	42
6.3.3. Le cycle pseudo-lysogénique .....	42
6.3.4. Le cycle chronique « phages filamenteux » .....	43

6.4.	Enzymes phagiques .....	44
6.4.1.	Holines .....	44
6.4.2.	Endolysines .....	45
6.4.3.	Enzymes dépolymérasés .....	45
7.	Similarités entre les virus procaryotes et eucaryote.....	45
8.	Stabilité des bactériophages face aux conditions physico-chimiques du milieu .....	46
9.	Résistance microbienne aux phages .....	47
II.	Phagothérapie .....	48
1.	Généralité.....	48
2.	Approches alternatives aux ATB .....	49
3.	Domaines d'application des bactériophages.....	50
3.1.	Utilisation en génie génétique .....	50
3.2.	Utilisation en médecine humaine.....	50
3.3.	Utilisation dans le domaine vétérinaires .....	51
3.4.	Utilisation de l'enzyme lytique comme agent thérapeutique .....	51
3.5.	Utilisation en agroalimentaire .....	51
3.6.	Utilisation pour le contrôle des biofilms.....	52
3.7.	Les bactériophages pour une décontamination sélective .....	53
4.	Avantages et inconvénients.....	54
5.	Traitement des infections à <i>Escherichia coli</i> .....	55
6.	Traitement des infections à <i>S. aureus</i> .....	56
	<b>CHAPITRE II.....</b>	<b>57</b>
	<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>57</b>
I.	Objectif du travail .....	58
1.	Cultures bactériennes .....	58
2.	Cultures phagiques.....	58
3.	Présentation des sites de prélèvement .....	58
3.1.	Stratégie d'échantillonnage .....	58
3.2.	Barrage Sarno .....	59
3.3.	Barrage Sidi Abdelli.....	60
3.4.	Barrage El Mafrouche .....	61
III.	Méthodes.....	62
1.	Purification et vérification de la pureté des souches ATCC .....	62
1.1.	Isolement et caractérisation des souches.....	62
1.2.	Examen microscopique .....	63
1.2.1.	Examen microscopique à l'état frais .....	63
1.2.2.	Coloration de Gram et observation microscopique .....	63

1.3.	Test catalase .....	64
1.4.	Identification des souches « confirmation de l'identité des souches » par API.....	65
1.5.	Conservation des souches .....	65
1.5.1.	Conservation courte durée.....	66
1.5.2.	Conservation longue durée.....	66
2.	Détection des bactériophages .....	66
2.1.	Préparation des échantillons et enrichissement.....	66
2.2.	Mise en évidence des phages.....	66
3.	Isolement des phages .....	67
3.1.	Élution et enrichissement des phages .....	67
3.2.	Isolement des bactériophages .....	68
4.	Purification des bactériophages.....	68
5.	Conservation des phages .....	69
	<b>CHAPITRE III.....</b>	<b>70</b>
	<b>RESULTATS .....</b>	<b>70</b>
	<b>CHAPITRE IV.....</b>	<b>81</b>
	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>81</b>
	CONCLUSION.....	85
	ANNEXES .....	100

## Liste des Abréviations

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>nm</b>	Nanomètre
<b>ATCC</b>	American type culture collection
<b>pH</b>	Potentiel d'Hydrogène
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>NCBI</b>	National Center For Biotechnology Information
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>ICTV</b>	International Committee on Taxonomy of Virus
<b>PFP</b>	Polyèdre, Filamenteux, Pléomorphe
<b>ADNds</b>	Acide désoxyribonucléique double brin
<b>ADNss</b>	Acide désoxyribonucléique simple brin
<b>ARNds</b>	Acide ribonucléique double brin
<b>ARNss</b>	Acide ribonucléique simple brin
<b>RBP</b>	Retinol Binding Protein
<b>ARNt</b>	Acide ribonucléique de transfert
<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>%</b>	Pourcentage
<b>STIV</b>	Sulfolobus Turreted Icosahedral Virus
<b>°C</b>	Degré Celsius
<b>UV</b>	Ultraviolet

<b>UVC</b>	Ultraviolet de courte longueur d'onde
<b>ATB</b>	Antibiotique
<b>E.coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>S.aureus</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>P.aeruginosa</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>PAS</b>	Phage Antibiotic Synergy
<b>EC</b>	Enzyme Commission numbers
<b>SA</b>	Sidi Abdelli
<b>TLM</b>	Barrage Mafrouche à Wilaya de Tlemcen
<b>BN</b>	Bouillon Nutritif
<b>TDA</b>	Tryptophane désaminase
<b>API</b>	Appareillage et Procédé d'Identification
<b>IND</b>	Test Indole
<b>VP</b>	Test Voges-Proskauer
<b>VRBL</b>	Violet Red Bile Lactose Agar
<b>Tm</b>	Température
<b>mL</b>	Millilitre
<b>µl</b>	Microlitre
<b>µm</b>	Micromètre
<b>rpm</b>	Rotations par minute
<b>GN</b>	Gélose Nutritive
<b>BN</b>	Bouillon Nutritif dix fois concentré
<b>L. monocytogenes</b>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<b>DspB</b>	DispersinB

<b>V</b>	Volume
<b>min</b>	Minutes
<b>EHEC</b>	<i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques
<b>mm</b>	Millimètres
<b>Gx100</b>	Grossissement cents
<b>PFU</b>	Plaque Forming Unit

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Classification des bactériophages (Anonyme 4). .....	29
<b>Tableau 2 :</b> Propositions de taxonomie décrivant de nouveaux taxons (genres, sous-familles, familles) soumis à l'ICTV, pour quelque genre des phages (Krupovic et al., 2015). .....	31
<b>Tableau 3 :</b> Les principales familles des virus bactériens, d'après, Ackermann, (2007). .....	32
<b>Tableau 4 :</b> La résistance bactérienne en fonction des étapes du cycle réplicatif viral et l'adaptation des bactériophages en revanche (Saussereau, 2012). .....	40
<b>Tableau 5 :</b> Les différents cycles d'infections et les caractéristiques à prendre en compte pour une utilisation en biotechnologie (Anonyme7). .....	43
<b>Tableau 6 :</b> Les avantages et les inconvénients de la thérapie phagique. ....	54
<b>Tableau 7 :</b> Les caractères biochimiques d'Escherichia coli. ....	76

## Liste des Figures

<b>Figure 1</b> : Les grandes étapes des cent premières années de recherche sur les bactériophages. .....	25
<b>Figure 2</b> : A : Virus icosaédriques ; B : Virus hélicoïdaux ; C : Virus enveloppés ; D : Virus complexe (Anonyme2).....	26
<b>Figure 3</b> : Structure générale d'un phage (Anonyme 3). .....	27
<b>Figure 4</b> : Représentation schématique des principaux groupes de bactériophages (Ackermann, 2007). Légende : dsDNA = ADN double brin ; ssDNA = ADN simple brin ; ssRNA = ARN simple brin ; dsRNA = ARN double brin. ....	29
<b>Figure 5</b> : Morphologie des 3 familles de Caudovirales (Clokie et al., 2011).....	30
<b>Figure 6</b> : A, B, C. Schémas illustrant la morphologie et les différentes protéines structurales composant respectivement le phage T4 (Myoviridae, queue contractile), T7 (Podoviridae, queue courte) et SPP1 (Siphoviridae, queue non contractile). D. Image prise en coloration négative du phage $\lambda$ (Siphoviridae, queue non contractile) illustrant les différentes parties le constituant notamment sa queue ( <b>Anonyme5</b> ). ....	34
<b>Figure 7</b> : Mode d'infection des phages (Anonyme 6). ....	41
<b>Figure 8</b> : Différents cycles de répllication des phages (Fortier & Sekulovic, 2013).....	44
<b>Figure 9</b> : Pyobactériophagum produit en Géorgie (nature, 2014). ....	49
<b>Figure 10</b> : Utilisation des phages en sécurité alimentaire. Tout au long du process de production alimentaire, les phages sont utilisables : (i) la phagothérapie animale peut être utilisée afin de réduire ou éliminer le pathogène chez l'animal ; (ii) l'élimination directe des pathogènes ou bactéries d'altération est possible par l'application de suspensions de phages ; (iii) les cocktails phagiques sont également utilisés comme additifs alimentaires pour la stabilité microbiologique des produits (García et al., 2008). ....	52
<b>Figure 11</b> : Photographie au microscope électronique d'un biofilm de S.aureus (Cunningham et al., 2010). ....	53
<b>Figure 12</b> : Situation géographique de Barrage Sarno (Google Maps, 2017).....	59
<b>Figure 13</b> : Présentation du site de prélèvement « Barrage Sarno ». ....	60
<b>Figure 14</b> : Situation géographique de Barrage Sidi Abdelli (Google Maps,2017). ....	60
<b>Figure 15</b> : Présentation du prélèvement « Sidi Abdelli ». ....	61
<b>Figure 16</b> : Situation géographique de Barrage El Mafrouche (Google Maps,2017). ....	61
<b>Figure 17</b> : Présentation du site de prélèvement « Barrage El Mafrouche ». ....	62

<b>Figure 18</b> : Étape d'isolement des souches ATCC. ....	62
<b>Figure 19</b> : Coloration de Gram (Anonyme 9). ....	64
<b>Figure 20</b> : Centrifugation des enrichissements.....	67
<b>Figure 21</b> : Détection des phages. ....	67
<b>Figure 22</b> : Isolement des phages.....	68
<b>Figure 23</b> : Aspect de la souche E. coli ATCC 25922 sur le milieu Héктоen. ....	71
<b>Figure 24</b> : Aspect de la souche E.coli ATCC 25922 sur VRBL. ....	72
<b>Figure 25</b> : Aspect de la souche S. aureus ATCC 25923 sur Chapman. ....	73
<b>Figure 26</b> : Observation microscopique de la souche E.coli ATCC 25922 à l'état frais.....	73
<b>Figure 27</b> : Observation microscopique de la souche E.coli ATCC 25922 après coloration de Gram (Gx100).....	74
<b>Figure 28</b> : Observation microscopique de la souche S. aureus ATCC 25923 après coloration de Gram (Gx100). ....	74
<b>Figure 29</b> : Résultats du test catalase pour les deux souches ATCC. ....	75
<b>Figure 30</b> : Résultats de l'identification de la souche E.coli ATCC 25922 par Galerie API 20E.....	76
<b>Figure 31</b> : Résultats de l'identification par le logiciel identax.....	77
<b>Figure 32</b> : Résultats d'enrichissements. ....	78
<b>Figure 33</b> : Résultats de la détection des phages. ....	79
<b>Figure 34</b> : Résultats d'isollements des coliphages à partir des échantillons de « Sarno et Tlm ».....	80
<b>Figure 35</b> : Résultat d'isolement des phages de S.aureus à partir de l'échantillon « Tlm ». ...	80

# INTRODUCTION

---

La virologie est la science dédiée à l'étude des virus et des agents associés infectieux caractérisée par la recherche de la structure de ces derniers, leur évolution, et leur mécanisme d'infection pour se reproduire, afin de les classer. Elle concerne également les maladies causées par les virus, les techniques pour les isoler et les cultiver, et leur usage en recherche et en thérapie.

Les phages sont des virus de bactéries, tous comme celles-ci ils sont impliqués dans de nombreux processus écologiques, et ils ont un impact majeur sur eux. En effet, ils constituent le principal facteur limitant de la population bactérienne. A titre d'exemple, les bactériophages lysent quotidiennement 10 à 20% des bactéries aquatiques (**Suttle 1994**).

Les bactériophages sont plus fréquents 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 renferme de  $10^{10}$  à  $10^{11}$  bactéries par gramme (**Devine et al., 2003**), et de  $80-90 \times 10^7$  virus par gramme (**Williamson et al., 2005**).

L'étude de la structure et de la fonction des virus, tels les bactériophages, a conduit à une compréhension fondamentale de leur biologie et a contribué aux développements technologiques en biophysique et en biologie moléculaire, ils ont été utilisés comme organisme modèle dans la recherche fondamentale (**Wommack et Colwell, 2000**). Du fait, entre autres, de la mise au point de méthodes de manipulation génétiques robustes, de nombreux aspects du cycle de vie des bactériophages ont été et sont toujours étudiés. Les recherches sur les bactériophages ont contribué à la mise en évidence de certaines caractéristiques fondamentales, et élémentaires, sur le fonctionnement des cellules comme la nature des gènes et la découverte des ARN messagers portant l'information de l'ADN aux ribosomes. Depuis leur découverte, les bactériophages se sont, petit à petit, montrés comme d'excellents systèmes modèles dans la compréhension de virus plus complexes et de fonctions cellulaires fondamentales. Une cellule peut être vue comme une « collection de machines moléculaires » (**Alberts, 1998**). Enfin, les bactériophages étant capables d'infecter et de lyser des bactéries pathogènes, leur utilisation en thérapie offre des possibilités intéressantes.

La spécificité d'hôte des phages offre une technologie attrayante pour la lutte contre les infections causées par bactéries ou pour le traitement des milieux contaminés par des bactéries pathogènes. La recherche sur les utilisations potentielles de la thérapie virale est limitée, mais des études ont montrés le succès de cette technologie pour traiter les infections des animaux d'élevage, les plantes, les poissons d'aqua-culture et les humains (**Sulakvelidze et Kutter, 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 (**Fischetti, 2008; Atterbury, 2009; Kutateladze et Adamia, 2010**) et le traitement des eaux usées (**Withey et al., 2005**).

L'objectif de ce présent travail est l'isolement des bactériophages à partir des échantillons aquatiques et de mettre en évidence leur effet antibactérien naturel sur les souches d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* provenant de l'hôpital en s'appuyant sur la méthode des plages de lyse. Le manuscrit est organisé en trois parties principales :

- La première partie c'est une étude bibliographique qui décrit les bactériophages et leurs grandes histoires.
- La deuxième partie décrit les méthodes mise en œuvre au cours de mon travail concernant l'isolement.
- Une troisième partie expose les résultats obtenus et leur discussion.
- Enfin, le manuscrit s'achève par une conclusion qui regroupant les principaux résultats et les perspectives d'avenirs.

# **CHAPITRE I**

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

## I. Les bactériophages

### 1. Définition

Les bactéries peuvent être infectées par des virus qu'on appelle bactériophages ou phages (**Leclerc *et al.*, 1995**). Chaque bactérie est l'hôte d'un phage donné, mais elle peut être infectée par différents bactériophages qui lui sont alors tous spécifiques (**Bousseboua, 2003**).

Les bactériophages comme tous les virus ce sont des parasites absolus qui représentent l'entité biologique la plus abondante et diversifiée sur la planète, Il y en aurait dix à cents fois plus qu'il y a de bactéries, leur nombre étant estimé entre  $10^{30}$  et  $10^{31}$  dans la biosphère (**Brüssow et Hendrix, 2002**) et ils sont retrouvés dans tous les écosystèmes où des bactéries sont présentes, c'est-à-dire ils sont ubiquitaires dans notre monde (océans, sols, eau potable, nourriture, etc.) allant du tractus gastrointestinal humain aux océans, passant par des endroits aussi inusités que le désert (**Prigent *et al.*, 2005**), et on en a même trouvé dans un spécimen de selles fossilisées du Moyen Âge (**Appelt *et al.*, 2014**).

Les phages ont été isolés de vaccins commerciaux disponibles aux États-Unis. Malgré leurs simplicités structurales et biologiques et du fait leurs génomes relativement petits, ils présentent une diversité génomique, structurale et morphologique impressionnante (**Dion *et al.*, 2020**). Ces entités ne disposent d'aucune machinerie cellulaire liée aux processus de traduction, de transcription et à la production d'énergie. Ils sont incapables d'infecter des cellules appartenant aux autres domaines (Eucaryotes et Archées).

Dans le passé, les virus infectant les Archées ont souvent été confondus avec les virus de bactéries (phages) car ils semblaient présenter des morphotypes communs. Toutefois, il a été clairement établi que les virus des « Archées » forment un groupe spécifique et distinct des bactériophages. Chaque type de phages reconnaît une espèce, un bactériophage ne va donc pas infecter et éliminer toutes les bactéries mais uniquement celles qui vont être reconnues par le phage et permettre sa multiplication. De par sa grande spécificité, un bactériophage ne pourra jamais infecter une de nos propres cellules (**Anonyme 01**).

Les bactériophages ont des rôles variés et ayant une importante répercussion dans tous les écosystèmes. Dans les milieux aquatiques, les phages jouent un rôle majeur dans les cycles biogéochimiques (**Suttle, 2005**) ainsi qu'ils sont aussi d'importants modulateurs du microbiote intestinal humain en affectant le métabolisme et la physiologie de leurs hôtes (**Kim et Bae, 2018**), les phages peuvent être bénéfiques, on redoute leur présence dans certaines situations.

En effet, dans l'industrie laitière par exemple, les attaques de phages provoquent souvent des défaillances de la fermentation (Marcó *et al.*, 2012).

## 2. Historique

### 2.1. La découverte du bactériophage

L'histoire des bactériophages à 90 ans a peu près. Comme souvent dans l'histoire des sciences, la découverte des virus mangeurs de bactéries « bactériophages » s'est déroulée en plusieurs phases dans le prolongement des premiers balbutiements de la virologie. En effet, dès 1881, Louis Pasteur (1822-1895) a montré que les agents infectieux de la rage, invisible au microscope peuvent passer librement à travers un filtre Chamberland qui est un filtre en porcelaine poreuse retenant les particules de taille visible au microscope optique (pores de diamètre < 300 nm), et est transmissible (Abedon *et al.*, 2011).

En 1892, Dmitri Ivanovski (1864-1920) découvre le virus de la mosaïque du tabac, la sève des plantes malades filtrée à travers un filtre Chamberland contient un agent invisible capable de causer la maladie lorsqu'il est mis en contact avec une plante saine. Aujourd'hui, On estime que le bactériologiste britannique **H. Hankin (1865-1939)** est considéré comme le premier auteur à avoir mis en évidence l'existence d'un agent bactéricide présent dans l'eau. A l'époque, Ernest Hanbury Hankin s'intéresse aux propriétés bactéricides des deux fleuves d'Inde eaux de la Jumma et du Gange, il a constaté que les colonies de bactéries *Vibrio cholerae* qui ont prospéré dans l'eau du robinet meurent rapidement dans l'eau du Gange. Il a poursuivi son expérience en utilisant l'eau du Gange filtrée ou bouillie (30 min à 115 °C). À sa grande surprise, l'eau filtrée continue à montrer un effet antibactérien, alors que l'eau bouillie n'a plus cette propriété. Ceci indiquait clairement que le facteur responsable de l'action bactéricide de l'eau était thermolabile, mais pas non filtrable avec le filtre Pasteur utilisé dans son expérience. E-H. Hankin publie ces travaux en français dans les annales de l'institut Pasteur (Born *et al.*, 2015 ; Hankin M.E., 1896). Malgré ses observations, il ne détermine ni l'origine ni la nature de cette substance active présente dans les deux fleuves (Hankin E.H., 1896).

Ces découvertes concomitantes sont importantes sur un plan général : elles ont révélé par des expériences l'existence de nouveaux agents infectieux qui s'attaquent à des cellules humaines dans le cas de la rage, à des plantes dans le cas du virus de la mosaïque du tabac ou à des bactéries et dont la taille est inférieure à celle des bactéries puisqu'ils passent à travers des filtres retenant ces dernières (Twort F.W., 1915). Frederick Twort (1877-1950) fut le second bactériologiste à aborder directement les agents antibactériens invisibles. Confirmant

leur caractère ultra-filtrable et leur inactivation thermique et montre également que ces particules ne se développent plus dès lors que l'échantillon est exempt de bactéries comme décrit dans sa publication de 1915 donc Twort a d'abord rapporté l'observation d'étranges colonies de microcoque d'apparence translucide, et a conclu que leur apparition était due à un agent infectieux filtrable qui pouvait se multiplier au profit de la survie de la bactérie (**Twort F.W.,1915**).

Deux ans plus tard, en 1917, le chercheur franco-canadien Félix d'Hérelle (1873-1949) qui travaille à l'Institut Pasteur, pose quelques bases fondamentales de la virologie : il décrit l'isolement et la spécificité de ces agents ultra-filtrable ainsi que la formation de plages de lyse sur un tapis bactérien (**D'Herelle F.,1917**). Il a observé que la matière fécale de sujets convalescents sont douées de propriétés antagonistes vis-à-vis du bacille de la dysenterie. Il utilise pour la première fois le terme "bactériophage obligatoire" du grec ancien bakterion (petit bâton) et phágos (mangeur), pour qualifier ce microbe invisible, capable de lyser des cultures bactériennes et sera le premier à les utiliser dans une optique thérapeutique, notamment dans le contexte de la lutte contre les dysenteries bacillaires provoquées par *Shigella*, donnant ainsi naissance à la phagothérapie. Il a proposé déjà l'idée que le phénomène ne se limiterait pas à la dysenterie, mais ils existeraient chez d'autres bactéries (**D'Herelle F.,1919**).

Pour d'Hérelle, la nature biologique des bactériophages est indiscutable, alors que d'autres auteurs proposent à l'époque une nature plutôt biochimique (**Duckworth, 1976**). La première application des phages pour traiter des maladies infectieuses remonte à 1921.

Ensuite les propriétés biologiques des bactériophages n'ont été cohérentes qu'à partir de 1942, grâce à la microscopie électronique qui permis d'observer les particules virales (**Luria & Anderson,1942**), par Bruynogue et Maisin qui les ont utilisés avec succès pour traiter des maladies de peau causées par *Staphylococcus sp*. Ils ont aussi été utilisés pour traiter la dysenterie, le choléra et la fièvre typhoïde.

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 Georgie, 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**).

Aujourd'hui, aucune classe d'antibiotiques n'a échappé à un mécanisme de résistance bactérienne (Levy and Marshall, 2004). Face à l'émergence rapide de ce phénomène, et au nombre limité de nouvelles molécules, les pays occidentaux et d'autres lieux ont renouvelé l'intérêt pour la phagothérapie (Merril *et al.*, 2003 ; Reardon, 2014 ; Vandamme, 2014). Un grand projet européen nommé Phagoburn (<http://www.phagoburn.eu/>) a vu le jour en juin 2013. Il intègre la réalisation d'essais cliniques dans le but de tester l'efficacité thérapeutique, l'innocuité et la pharmacodynamique de deux cocktails de bactériophages (Ackermann, 2003). Ces cocktails sont destinés à traiter des patients brûlés dont les plaies sont surinfectées par des germes résistants appartenant aux espèces *Escherichia coli*, ou *Pseudomona aeruginosa*.

Le NIAID américain (National Institute of Allergy and Infectious Diseases) dans son rapport prospectif 2014 considère la phagothérapie comme une alternative face à la résistance aux antibiotiques (Reardon, 2014).

De nos jours, les connaissances sur les propriétés biologiques des bactériophages et les mécanismes régissant l'interaction phage-bactérie se sont considérablement élargies. Ces avancées peuvent maintenant permettre le développement de préparations de phages thérapeutiques sécuritaires ayant une efficacité optimale envers leurs hôtes bactériens spécifiques afin d'intégrer la thérapie phagique à nos méthodes de prévention et de traitement des infections bactériennes (Ackermann, 2003).

## **2.2. Le rôle des bactériophages dans la naissance de la biologie moléculaire**

Dans la deuxième moitié des années 1930 que le physicien allemand Max Delbrück (1906-1981) rejoint California Institute of Technology pour y débiter des travaux permettant de faire un lien entre physique et biologie, à une époque où des termes tels que gènes ou protéines étaient encore mal compris. Au contact d'Emory L. Ellis (1906-2003) qu'il s'initie à la biologie des bactériophages (Ellis *et al.*, 1939). Puis, en collaboration avec Salvador Luria (1912-1991) et Alfred D. Hershey (1908-1997), il a posé les bases du « phage group » qui sera à l'origine de nombreuses recherches sur les bactériophages, sur lesquelles reposent les fondations de la biologie moléculaire (Summer W.C., 1993).

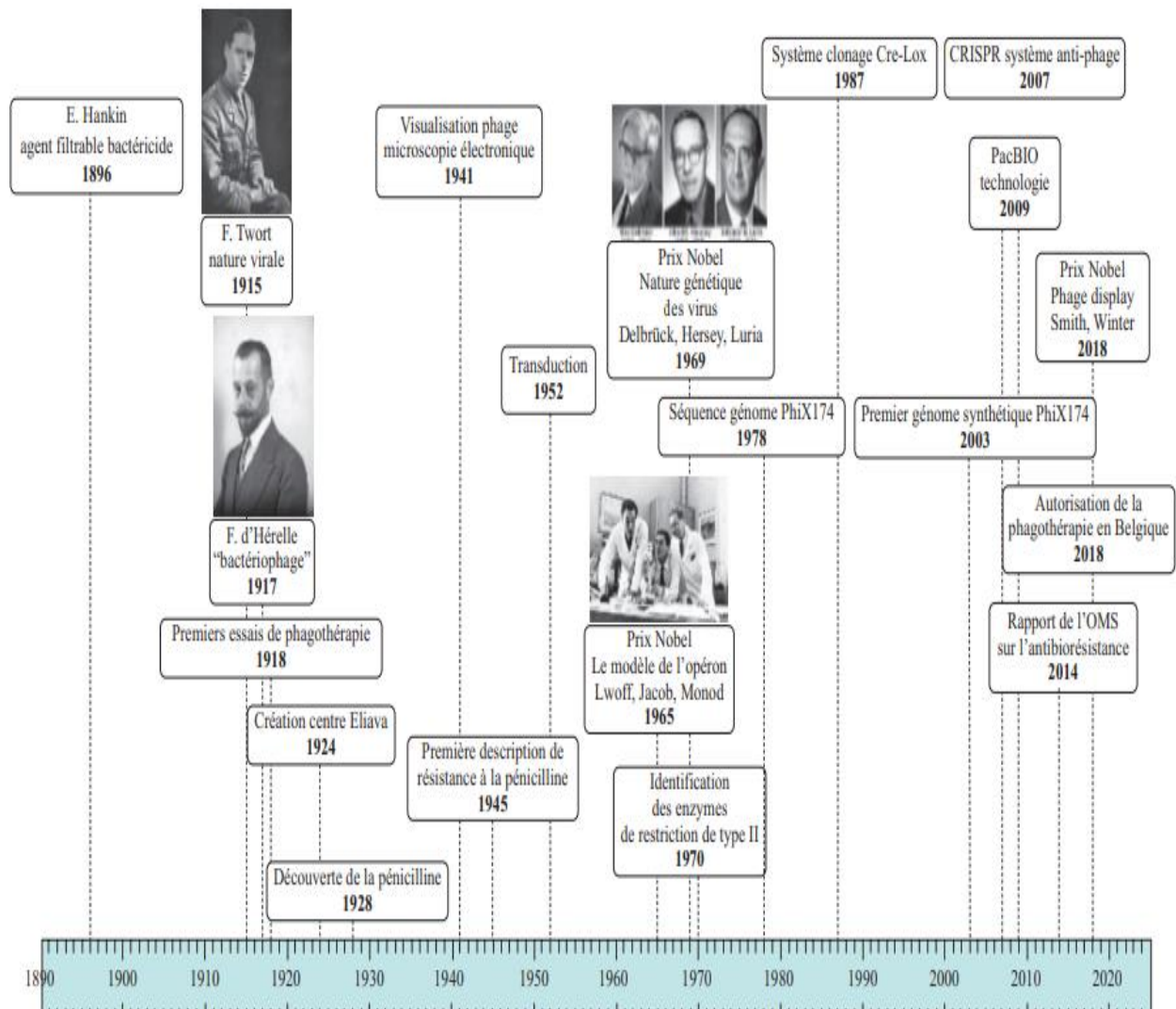
Bien entendu, l'avènement de la biologie moléculaire et la possibilité d'étudier les gènes d'organisme plus complexe notamment eucaryote bouleverse profondément la recherche en biologie et sur les bactériophages. En particulier, de plus en plus de génomes de bactéries ont

été séquencés, et cela a clairement révélé de manière évidente les liens très forts unissant les prophages à leur bactérie hôte. Ainsi, en 2003, sur les 82 génomes complets de bactéries, 51 contiennent des prophages. Au total, 230 prophages putatifs ont été identifiés (**Greogory F.,2005**).

Les prophages peuvent constituer 10 à 20 % de l'ensemble du génome bactérien et avoir un impact significatif sur les différences observées entre les bactéries d'une même espèce (**Casjens, 2003**). Pour cela l'étude des bactériophages a permis la biologie moléculaire de s'épanouir, car leur simplicité structurale et biologique en fait un organisme modèle et un outil d'étude des processus fondamentaux du vivant. La relation phage/hôte indissociable signifie que toutes les connaissances de la biologie des phages sont informatives de celles de son hôte, et est généralement liée à des faits plus généraux. L'étude des phages est à l'origine de nombreuses découvertes, notamment le rôle de l'ADN en tant que vecteur de l'information génétique, la présence d'un intermédiaire ARN dans la synthèse protéique et la découverte des systèmes de restriction/modification ou R/M (**Hershey & Chase, 1952 ; Volkin & Astrachan, 1956 ; Arber, 1966**). La première identification de l'ARN (ARNm), comme intermédiaire lors de la synthèse des protéines, est accomplie par Volkin et Astrachan à la fin des années 50 (**Volkin et Astrachan, 1956**), à l'aide de l'étude de l'infection d'*E. coli* par le bactériophage T2. De même, les travaux de Dussoix et Arber (**Dussoix and Arber, 1962**) qui essaient de comprendre les mécanismes bactériens impliqués dans la résistance à l'infection phagique permettent la découverte des premières enzymes de restriction. En 1977, Sanger *et al.* (**Sanger F. et al, 1977**) séquencent la première molécule d'ADN simple brin du phage  $\phi$ X174 et développent alors ce qu'on appelle encore aujourd'hui le « séquençage de Sanger ». Par la suite, des phages ou des enzymes de phages sont couramment utilisés en biologie moléculaire et en biotechnologie (**Murphy, 2012**). Parmi les applications directes, nous pouvons noter la technique du phage display (**Smith, 1985**), l'utilisation du phage  $\lambda$  comme vecteur de clonage pour insérer de l'ADN dans les bactéries (**Chauthaiwale et al, 1992**), l'utilisation de ligases (phage T4) (**Pascal, 2008**), et de polymérase (phages T7 et T4) lors des réactions de PCR par exemple (**Kubista et al., 2006**).

Au fil du temps, de nombreux résultats de recherche montrent que les phages non seulement contribuent à l'évolution des bactéries par le biais de la transduction mais, aussi ceux-ci contribuent directement à la toxicité des bactéries (**Kubista et al., 2006 ; Pascal, 2008**). Dans certains cas l'acquisition de nouveaux gènes par l'intermédiaire d'un phage lysogène peut modifier de manière significative la pathogénie de la bactérie. Par conséquent, il a été montré

que certaines toxines nocives pour les bactéries sont codées par les gènes du phage. Par exemple, la toxine du choléra est contenue dans le génome du bactériophage filamenteux CTX $\Phi$  qui infecte les bactéries *Vibrio Cholerae* (Davis *et al.*, 2003). De plus, certains gènes portés par les bactériophages peuvent modifier profondément n'importe quelle étape du processus d'infection bactérienne, comme l'adhésion, la colonisation, l'invasion, la résistance aux défenses immunitaires, la sensibilité aux antibiotiques et la capacité de se propager d'une personne à l'autre.



**Figure 1 :** Les grandes étapes des cent premières années de recherche sur les bactériophages.

### 3. Structure

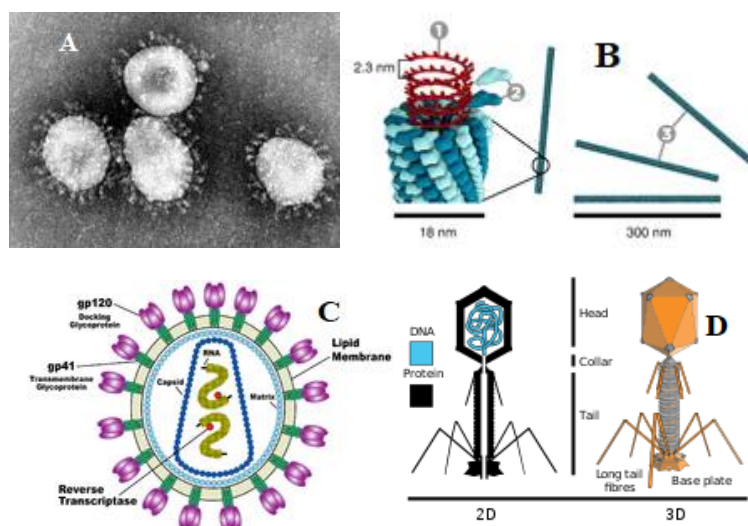
Les bactériophages sont de taille beaucoup plus petite que celles des bactéries généralement leur taille est entre de 20 à 300 nm (Madigan et Martinko, 2007). Ils reconnaissent des récepteurs spécifiques à la surface de la bactérie auxquels ils se lient puis insèrent leur matériel

génétique à l'intérieur de la bactérie. Comme tous les virus les bactériophages sont constitués de :

- ✚ Un génome : un matériel génétique (ADN ou ARN) monocaténaire (simple brin) ou bicaténaire (double brin). L'acide nucléique du phage est empaqueté d'une enveloppe protéique externe nommée « une capside ».
- ✚ Une capside : d'un mot grec, (capsa) signifiant boîte, c'est une boîte protéique qui entoure le matériel génétique (ADN ou ARN) et résiste aux enzymes protéolytiques. Elle a une conformation géométrique qu'est selon les virus soit tubulaire, soit polyédrique.

L'assemblage de la capside autour du génome forme une structure compacte ce qu'on appelle nucléocapside ce polymère de nature protéique permet de protéger le génome (**Anonyme 1**).

- La symétrie tubulaire ou hélicoïdale : est un tube enroulé en peloton, la capside est cylindrique. La forme des bactériophages est filamenteuse ou bâtonnets, pour ce qui concerne les virus humains ou animaux, le peloton est lui-même enveloppé dans un 3ème élément appelé péplos exemple : virus mosaïque du tabac ;
- La symétrie polyédrique (cubique ou icosaèdre) : un polyèdre à 20 faces triangles équilatéraux, et 12 sommets. Vu sous un certain angle, l'icosaèdre présente un contour hexagonal. Les bactériophages sont sphériques.
- Symétrie binaire ou phage caudé : la capside ou « tête » est à symétrie icosaédrique et la « queue » est à symétrie hélicoïdale (**Anonyme 2**).
- Symétrie complexe : la capside est de forme très diverse « phages pléomorphe ».

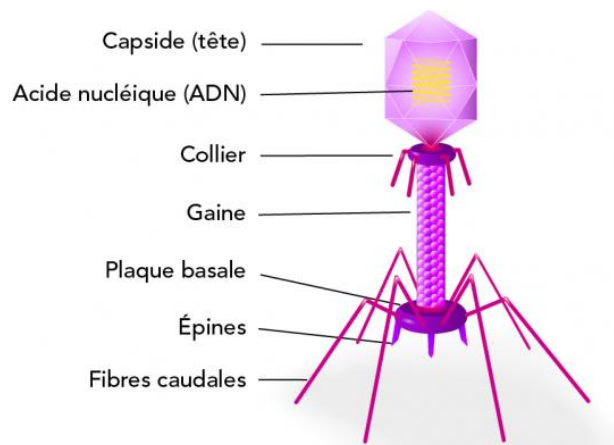


**Figure 2 :** A : Virus icosaédriques ; B : Virus hélicoïdaux ; C : Virus enveloppés ; D : Virus complexe (Anonyme2).

✚ Une queue : c'est un tube strié régulièrement recouvert d'une gaine de nature protéique il porte quelques enzymes (lysozymes) pour percer la paroi bactérienne, composé d'un empilement d'anneaux avec une disposition hélicoïdale autour d'un axe creux. Elle constitue l'organe d'injection de matériel génétique dans la cellule infectée (**Sozzi et al., 1982**).

Les queues des bactériophages sont rigides ou flexibles de longueur variable selon les familles elles peuvent être contractiles (T2, T4 et Mu) ou non contractiles (phage lambda) (**Sozzi et al., 1982 ; Madigan et Martinko, 2007**). Pour le phage T4 par exemple la taille de la queue est de longueur de 100 nm et 8 nm de diamètre.

Cependant, ce ne sont pas tous les phages qui possèdent une queue attachée à leur capsid, permettant le passage de l'acide nucléique durant l'infection. Certains phages possèdent aussi des structures terminales d'adsorption à la cellule bactérienne (crampons, fibres). (**Kutter et al., 2005**).



**Figure 3 :** Structure générale d'un phage (Anonyme 3).

#### 4. Classification

Historiquement, les bactériophages ont été toujours classifiés en fonction de leur morphologie, leur type de génome et leur relation avec son hôte (**Dublanchet, 2017**). Ils sont très diversifiés, allant de cents milles à plusieurs millions d'espèces différentes (**Keen, 2015**). Les méthodes de classification font actuellement l'objet d'un remaniement majeur, se basant désormais sur les analyses génomiques (**Dion et al., 2020**).

Actuellement, c'est l'ICTV « International Committee on Taxonomy of Virus » qui s'occupe de la classification des virus qu'ils soient des phages ou non. Celle-ci est basée sur

leur morphologie : taille, queue, gaine, enveloppe et leur composition en acides nucléiques (ARN, ADN simple brin ou double brin). Les bactériophages sont alors regroupés par : ordre, famille, sous-famille, genre et espèce (**Elbreki et al. 2014**). Toutefois, ce sont les travaux de Bradley en 1967 qui ont permis une première classification consensuelle des bactériophages.

Le dernier rapport de l'ICTV reconnaît 2284 espèces de Virus réparties en 6 ordres, 87 familles, 19 sous-familles et 349 genres (**King et al., 2012**). Sur la période allant de 1959 à 2012, 6300 virus de procaryotes (Eubactéries et Archées) ont été décrits morphologiquement, dont 6196 bactériophages (**Ackermann & Prangishvili, 2012**).

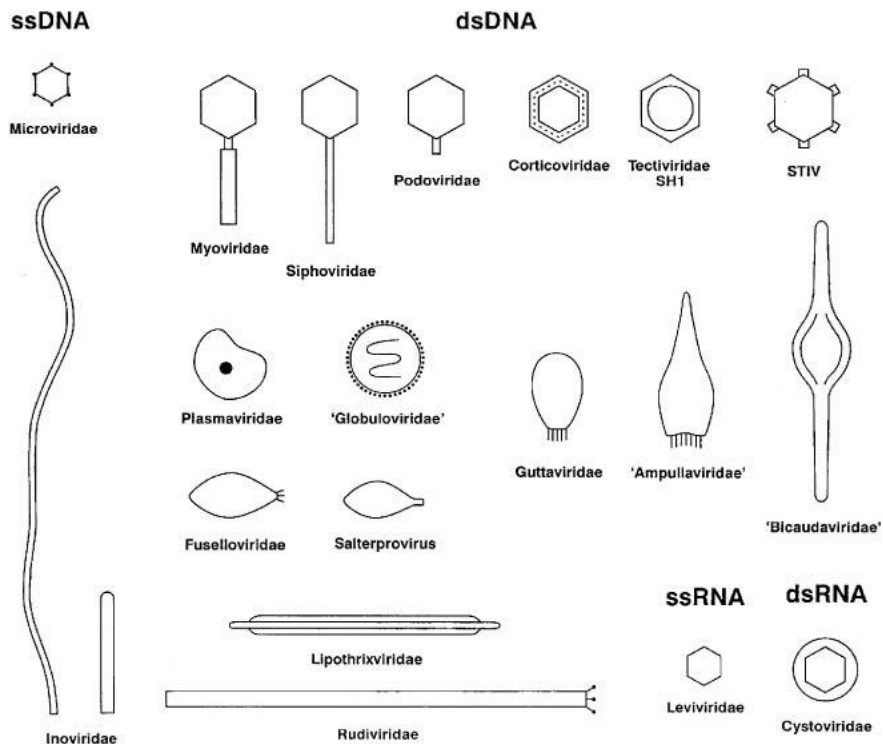
De manière générale, plus de 90% des phages ont un génome composé d'ADN linéaire double brin d'une longueur de 5 à 650 kpb et leur dimension varie de 24 à 200 nm, localisé dans une capsid avec une géométrie icosaédrique et une queue de format variable (**Monk et al., 2010**) qui permettant d'assurer le transfert du génome dans le cytoplasme bactérien (**Dublanchet, 2017**). Ces phages font partie de l'ordre des *Caudovirales* appelés aussi phages caudés. Trois familles découlent des *Caudovirales* et sont définies par le type de fibre caudale qui forme la queue présente sur le phage.

- 60% des phages sont des *Siphoviridae* et possèdent une longue queue flexible (exemples : phages Lambda, HK97, T5...);
- 25 % sont des *Myoviridae* avec une queue contractile e (phages T2, T4, T6, G...);
- 15 % sont des *Podoviridae* (phage T7, P22...) possèdent une courte queue (**Sharp, 2001**) non contractile (**Ackermann 2007, Ackermann & Kropinski 2007, Elbreki et al. 2014**).

Ces phages caudés sont largement étudiés de par leur caractère lytique, essentiel à la phagothérapie (**Dublanchet 2017**). La morphologie et le type de génome des autres familles de bactériophages (10 % restant), varie par rapport à l'absence de la queue et ils sont regroupés sous l'appellation PFP en raison de leur morphologie (Polyèdre, Filamenteux, Pléomorphe). La forme de ces phages est aussi très diversifiée avec ou sans membrane lipidique (**Ackermann 2007 ; Ofir & Sorek 2018**). Ces bactériophages (phages non caudés) sont au nombre de 208 représentent moins de 4% des phages identifiés, ils sont dispersés dans 17 familles et 20 genres différents (**banque de données de l'ICTV, 2007, Ackermann, 2007**). Les noms de 5000 phages sont disponibles sur Internet « NCBI ». Les seuls bactériophages qui présentent une structure voisine de celle des virus entériques pathogènes pour l'homme sont les Leviviridae (capsid polyédrique et génome à ARN simple brin).

**Tableau 1 :** Classification des bactériophages (Anonyme 4).

Family or Group:	Genera:	Type Member:	Particle Morphology:	Envelope :	Genome:
Corticoviridae	Corticovirus	PM2	Isometric	No	supercoiled d/s DNA
Cystoviridae	Cystovirus	Ø6	Isometric	Yes	3 segments d/s RNA
Inoviridae	Inovirus Plectrovirus	coliphage fd Acholeplasma phage	rod	No	circular s/s DNA
Leviviridae	Levivirus Allolevirus	coliphage MS2 coliphage Qbeta	icosahedral	No	1 (+)strand RNA
Lipothrixviridae	Lipothrixvirus	Thermoproteus phage 1	rod	Yes	linear d/s DNA
Microviridae	Microvirus Spirovirus	coliphage ØX174 Spiroplasma phages Mac-1 phage	icosahedral	No	circular s/s DNA
Myoviridae		coliphage T4	tailed phage	No	linear d/s DNA
Plasmaviridae	Plasmavirus	Acholeplasma phage	pleiomorphic	Yes	Circular d/s DNA
Podoviridae		coliphage T7	tailed phage	No	linear d/s DNA
Siphoviridae	lambda phage group	coliphage lambda	tailed phage	No	linear d/s DNA
Sulpholobus shibatae virus		SSV-1	lemon shaped	No	circular d/s DNA
Tectiviridae	Tectivirus	phage PRD1	icosahedral	No	linear d/s DNA

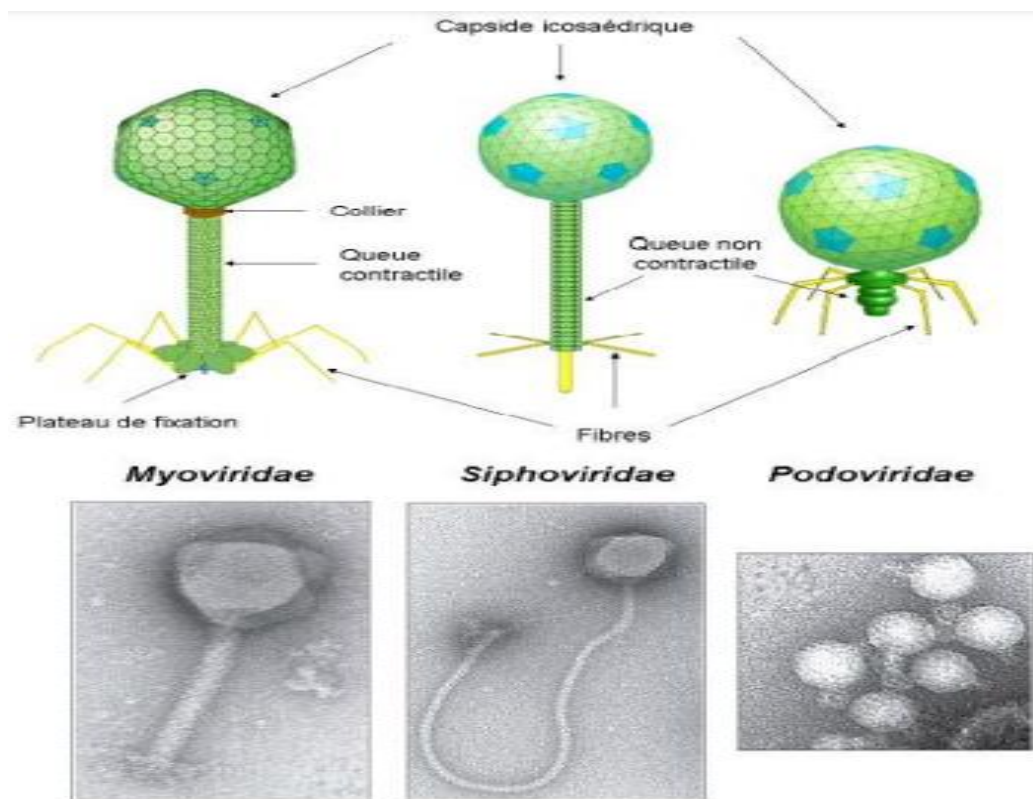


**Figure 4 :** Représentation schématique des principaux groupes de bactériophages (Ackermann, 2007). Légende : dsDNA = ADN double brin ; ssDNA = ADN simple brin ; ssRNA = ARN simple brin ; dsRNA = ARN double brin.

D'après **Bradley, (1967)** les phages sont classés en six grands morphotypes (groupe A à F), selon l'aspect de leur capsid et la nature biochimique de leur génome.

- Groupe A : les phages ayant une tête icosaoédrique avec une queue contractile munie de fibres et de spicules
- Groupe B : différent de ceux du groupe A par la présence d'une queue non contractile, dotée de fibres plus courtes.
- Groupe C : caudés, l'appendice est court et non contractile.
- Groupes D et E : dépourvus de partie caudale et ressemblent plus à certains virus humains. Ils possèdent une tête icosaoédrique, et se différencient l'un de l'autre par la nature biochimique de leur matériels génétiques. Les premiers sont à ADN et les seconds à ARN.
- Groupe F regroupe les phages filamenteux.

Les familles qui appartiennent à l'ordre des *Caudovirales* correspondent respectivement au groupe A, B et C de la classification de Bradley (**Bradley,1967**).

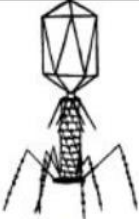

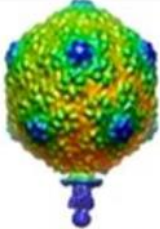


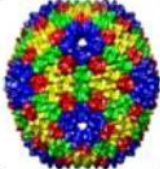
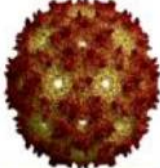
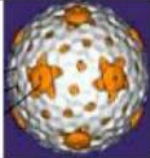






**Figure 5** : Morphologie des 3 familles de Caudovirales (Clokiet al., 2011).

**Tableau 2 :** Propositions de taxonomie décrivant de nouveaux taxons (genres, sous-familles, familles) soumis à l'ICTV, pour quelque genre des phages (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

**Tableau 3 :** Les principales familles des virus bactériens, d'après, Ackermann, (2007).

Forme	Acide nucléique	Famille	Nombre de genres/espèces	Caractéristiques	Exemples	Morphologie
Phages caudés, capsid icosaédrique (Ordre des Caudovirales)	ADN double brin linéaire	<i>Myoviridae</i>	6/1320	Queue contractile	T4	
		<i>Siphoviridae</i>	7/3229	Queue longue non contractile	λ, T5, HK97, SPP1	
		<i>Podoviridae</i>	4/771	Queue courte	T7, φ29, P22/L, sf6	
Polyédrique	ADN simple brin circulaire	<i>Microviridae</i>	4/40	Capsomères visibles, petite capsid non enveloppée	φx174	
	ADN double brin circulaire	<i>Corticoviridae</i>	1/3	Capsid contenant plusieurs couches lipidiques	PM2	
	ADN double brin linéaire	<i>Tectiviridae</i>	1/19	Couche intérieure lipidique	PRD1	
	ARN simple brin linéaire	<i>Leviviridae</i>	2/39	Très petits génomes	Ms2	
	ARN double brin linéaire	<i>Cystoviridae</i>	1/3	Enveloppe lipidique	φ6, φ12	

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

Les exemples de structures sont tirés de : phage T5 (Effantin *et al.*, 2006) ; T7 : (Agirrezabala *et al.*, 2005) ;  $\phi$ x174 (Mckenna *et al.*, 1992) ; PM2 (Abrescia *et al.*, 2008) ; PRD1 : (Abrescia *et al.*, 2004) ; Ms2 (Roshah *et al.*, 1993) ; (Marvin, 1990) ; phage TTV1 (Zillig *et al.*, 1986) ; SIRV-1 (Zillig *et al.*, 1998).

#### 4.1. Les phages à queue (caudés)

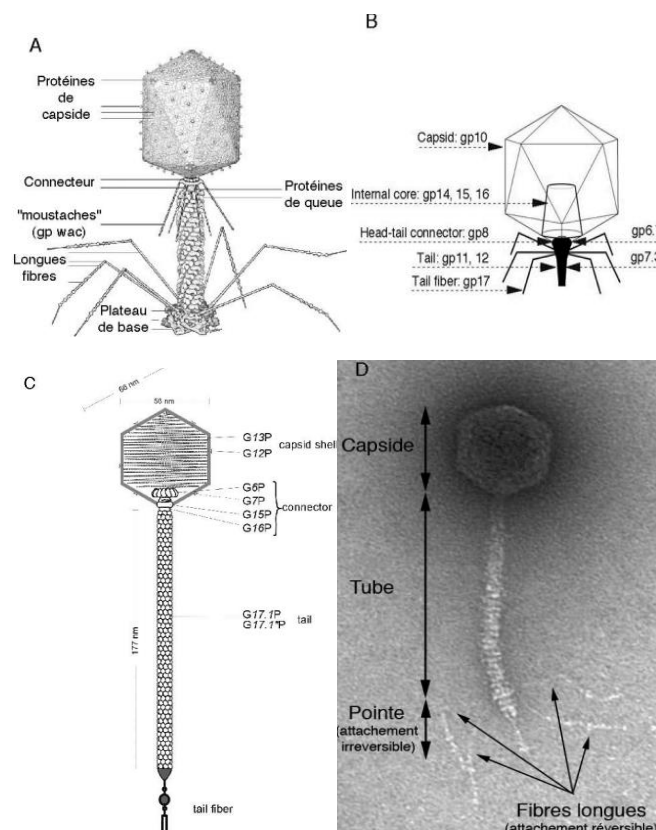
Ils sont très variés mesurent 25 à 300 nm, soit plus ou moins un centième de la taille de leur hôte. Chez les phages caudés, la capside constituée de protéines dont l'ensemble forme une enveloppe qui protège l'ADN viral.

En cela, ces phages se distinguent des autres familles de bactériophages qui possèdent pour certains membres des capsides plus complexes constituées par plusieurs couches protéiques et/ou des membranes lipidiques (Ackermann, 2003). Ainsi que chez ce groupe des phages, la queue permet d'adhérer à l'hôte et sert de conduit pour l'injection du génome, les queues sont composées d'hélices (ou des piles de disques, de sous-unités) variant de 3 à 825 nm de longueur. Elles ont généralement des plaques de base « base plates », des pointes « spikes », et des fibres terminales « terminal fibres » à leur extrémité distale ces dernier permettant la reconnaissance et la fixation à leur hôte (Dufour & Debarbieux 2017 ; Dublanche, 2017).

Tous les phages à longue queue possèdent un gène (généralement > 2 kb) codant pour une « tape measure protein » qui détermine avec précision la longueur de la queue. Les queues contractiles sont souvent des structures très complexes ; par exemple, la queue de T4 est

composée de 22 protéines différentes (Mesyanzhinov *et al.*, 2004). La forme générale de la queue non contractile est maintenue, lors de l'infection et un tube central est entouré d'une enveloppe protéique lors de celle-ci. Les protéines de liaison aux récepteurs (RBPs) se retrouvent à l'extrémité de la queue du phage ou à la plaque basale (base plate) (Tremblay *et al.*, 2006). Comme leur nom l'indique, ces protéines se lient aux récepteurs à la surface de la bactérie en permettant le déclenchement du processus d'infection. Les domaines des RBPs peuvent être interchangeables entre différents phages, fournissant ainsi un moyen de changer le spectre d'hôtes (Dunne *et al.*, 2019).

Les membres de la famille des *Podoviridae* ont une queue très courte et non contractile. Ces phages donc ont besoin d'une extension tubulaire qui pénètre les deux membranes cellulaires pour permettre l'insertion du génome dans l'hôte (Wang *et al.*, 2019).



**Figure 6 :** A, B, C. Schémas illustrant la morphologie et les différentes protéines structurales composant respectivement le phage T4 (*Myoviridae*, queue contractile), T7 (*Podoviridae*, queue courte) et SPP1 (*Siphoviridae*, queue non contractile). D. Image prise en coloration négative du phage  $\lambda$  (*Siphoviridae*, queue non contractile) illustrant les différentes parties le constituant notamment sa queue (Anonyme5).

#### 4.2. Phages à petites capsides icosaédriques ou à morphologie filamenteuse

Les capsides à symétrie icosaédrique, constituées par de multiples copies de la même protéine, sont une solution économique d'un point de vue génétique pour contenir et transporter un génome viral (Caspar & Klug, 1962) et sont très répandues en virologie (Baker *et al.*, 1999). Ces phages sont divisés en deux familles selon la nature de leur matériel génétique. Les phages de *Microviridae* qui ont un ADN simple-brin divisée en deux sous-familles, appelées *Bullavirinae* et *Gokushovirinae*, distinguées par des différences structurelles dans les protéines impliquées dans l'attachement à l'hôte (Mc Kenna *et al.*, 1992), et les *Leviviridae* qui sont composés d'ARN simple-brin (Dion *et al.*, 2020).

L'injection d'ADN dans l'hôte bactérien se fait par la présence d'une protéine qui s'oligomérisent pour former un tube qui traverse l'espace périplasmique de l'hôte (Sun *et al.*, 2014).

Finalement, les phages filamenteux, membres de la famille des *Inoviridae*, sont très différents en termes de morphologie : ils sont composés d'un génome d'ADN monocaténaire, entouré de milliers de copies de la protéine majeure de la capsid (Marvin, 1998).

#### 4.3. Phages contenant une membrane

Ce sont les phages appartenant aux familles des *Tectiviridae* (ADN double-brin linéaire) et des *Corticoviridae* (ADN double-brin circulaire), ces bactériophages ont aussi une forme icosaédrique et une membrane lipidique interne (Dion *et al.*, 2020) mais ne possèdent pas de queue. Une caractéristique qui différencie ces phages est leur protéine de capsid trimérique majeure qui est composée d'une structure à double baril beta ( $\beta$ -barrel structure) (Abrescia *et al.*, 2008). Puisque ces phages n'ont pas de queue pour délivrer leur génome, ils vont plutôt transformer leur membrane en un tube protéo-lipidique capable de percer les enveloppes cellulaires de leur hôte (Peralta *et al.*, 2013). À l'opposé, les phages de *Cystoviridae* ont une membrane lipidique externe qui entoure leur capsid icosaédrique (Vidaver *et al.*, 1973).

Finalement, il n'y a qu'un seul membre actuellement classé dans la famille des *Plasmaviridae* : il ne possède pas de capsid, mais son génome est enfermé dans une vésicule lipidique protéinique (Greenberg et Rottem, 1979).

## 5. Relation phage-cellule hôte

Deux types de relations ont été décrits :

1. Le prophage, un plasmide à faible nombre de copies qui se réplique indépendamment du chromosome de la bactérie.
2. Le prophage, s'intègre sur le chromosome par crossing-over et se réplique passivement avec le chromosome (**Leclerc *et al.*, 1995**).

L'étape de reconnaissance du récepteur bactérien par le phage est considérée comme la première étape de l'infection. Ce processus constitué généralement par des interactions spécifiques entre des structures protéiques du phage et des molécules présentes à la surface de l'hôte appelées « récepteurs ». Auxquels ils se lient puis injectent leur génome 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**). Ce phénomène est nommé « l'adsorption du phage à son hôte ».

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 le phage T4 le phénomène de la reconnaissance repose sur l'interaction spécifique entre les fibres caudales du phage et les polysaccharides qui composent la couche externe de la paroi des bactéries à Gram négatif (**Madigan et Martinko, 2007**).

Ainsi, pour sa survie il est indispensable que le phage discerne d'une part l'hôte approprié et d'autre part le récepteur bactérien spécifique au milieu d'autre récepteur non spécifique, mais la spécificité d'adsorption dépend aussi de la nature, de la structure, de la localisation et de la densité du récepteur à la surface bactérienne. La réussite de cette étape lui permettra alors de poursuivre son cycle d'infection afin de produire et libérer de nouveaux virions (**Trojet, 2011**).

## 6. Mécanisme d'action des bactériophages

### 6.1. 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 (**Duckworth, 1987**). 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.

## **6.2. Processus d'infection**

Les bactériophages ont un cycle de vie qui peut se décomposer en plusieurs étapes : l'adsorption, l'injection de l'acide nucléique, l'expression et la réplication de ce dernier, l'assemblage des virions et leur libération de la cellule permettant une nouvelle infection.

### **6.2.1. Adsorption**

L'adsorption des phages se fait en trois étapes généralement : le contact initial, la liaison réversible et l'attachement irréversible (**Duckworth, 1976**). Cette étape peut être favorisée par la présence de certains cations comme ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ).

Le contact initial requiert l'interaction entre des récepteurs présents à la surface de la bactérie et des anti-récepteurs présents sur la particule virale (i.e. les RBPs), il se fait de façon aléatoire et causé par le mouvement brownien, la dispersion, la diffusion ou l'écoulement. Le virus reconnaît donc un hôte potentiellement sensible s'accroche réversiblement à la surface de la bactérie par l'intermédiaire des longues fibres de leur queue qui reconnaissent spécifiquement les récepteurs membranaires et qui se positionne ensuite pour l'injection du matériel génétique dans l'hôte (**Duckworth, 1987**). L'adsorption du phage est non seulement une étape cruciale dans le processus d'infection, mais représente également le premier contact entre le virus et l'hôte, dictant ainsi la spécificité du spectre d'hôtes (**Silva et al., 2016**).

### **6.2.2. Injection de l'ADN viral**

Cette étape se produit en fonction de la morphologie structurale du phage selon différents mécanismes. Les phages à ARN ne seront pas abordés dans ces sections mais par contre il faut savoir que ces phages utilisent également différents mécanismes pour injecter leur ARN dans la cellule bactérienne.

Les phages de la famille des *Myoviridae* ont une queue contractile rigide qui permet de percer la membrane bactérienne et de forcer l'ADN viral à être libéré de la capsid et transféré vers le cytosol de la bactérie. Dans certains cas, les hydrolases peuvent être présentes dans le virion et dégrader les polymères de la paroi cellulaire afin de faciliter l'entrée de l'ADN viral (**González-Huici et al., 2004**).

Cependant, ces étapes spécifiques du cycle de réplication des phages sont encore mal comprises. Dans les dernières années, deux nouveaux modèles d'injection de l'ADN ont été proposés : le modèle de la mécanique continue et le modèle hydrodynamique (**Molineux et Panja, 2013**).

Le premier modèle suppose que l'ADN encapsidé forme un cercle qui remplace la pression osmotique par une interaction répulsive entre les brins d'ADN les plus proches en fonction de leur espacement. Il y aurait une « pression d'éjection » qui permet d'expulser le génome de la capsid. Cependant, le mécanisme par lequel cette force d'éjection postulée est transmise le long de l'axe hélicoïdal, des molécules d'ADN flexibles *in vivo* n'est pas encore clair (**Panja et Molineux, 2010**).

La logique du modèle hydrodynamique, qui n'a pas été clairement testée *in vivo*, est qu'après le contact avec le récepteur déclenche l'éjection de l'ADN, l'eau diffuse dans la capsid pour neutraliser le gradient osmotique. La plupart de l'eau diffusera à travers la capsid, mais comme cette dernière est pleine afin de faire de l'espace, l'ADN sera expulsé par le gradient de pression hydrostatique le long de la queue et il continuera à sortir de la capsid jusqu'à ce que le gradient de pression hydrostatique soit neutre (**Lemay et al., 2013**).

À la suite de l'injection du matériel génétique du phage dans l'hôte bactérien se produit la réplication de ce matériel génétique.

### **6.2.3. Réplication de l'ADN viral**

Les bactériophages peuvent se répliquer selon les cycles lytique, lysogénique, chronique ou pseudolysogénique. Les cycles lysogènes et lytiques sont les plus courants des phages caractéristiques, principalement des phages trouvés dans l'intestin (**Barr et al., 2013**). (Voir parties 6.3.1, 6.3.2 et 6.3.3)

### **6.2.4. Transcription et Traduction**

Dans quelques bactériophages, les ARNs de transfert (ARNts) et des gènes de réplication de l'ADN peuvent être exprimés de façon que le phage utilise le mécanisme de traduction de l'hôte (**Ling et al., 2015**). L'ARNt de phages reconnaît donc des codons qui sont abondants dans les ORF phagiques mais qui sont sous-représentés dans les ORF de l'hôte bactérien. Ainsi, les ARNt codés par ces phages stimulent la traduction préférentielle des ARNm phagiques (**Nechaev et Severinov, 2008**).

Les génomes de phage sont connus pour encoder des gènes qui reprogramment le métabolisme de l'hôte (**Hurwitz et U'ren, 2016**). Les facteurs sigma jouent un rôle critique dans l'initiation de la transcription en se liant aux ARN polymérases bactériennes (**Costanzo et Pero, 1983**).

#### **6.2.5. Assemblage des nouveaux virions**

Le processus d'assemblage des phages chez les *Caudovirales* par exemple se fait en quatre étapes principales :

1. Nucléation ;
2. Formation d'une structure intermédiaire ;
3. La procapside, remplie de copies de protéines d'échafaudage internes qui déterminent la taille de la capsid ;
4. L'empaquetage de l'ADN, couplé à la suppression de l'échafaudage et à la maturation structurelle de la capsid ;
5. L'attachement des protéines de la queue à la capsid (**Prevelige et Cortines, 2018**) ;

La deuxième étape consiste à construire une capsid icosaédrique complète et immature. À ce stade, les protéines d'échafaudage sont présentes dans la procapsid et l'assemblage se poursuit vers l'empaquetage et la maturation de l'ADN (**Prevelige et Fane, 2012**). L'ADN viral est sélectivement combiné et délivré par des enzymes de terminaison virale, et est activement transféré à travers le complexe portal selon différents mécanismes d'empaquetage (**Rao et Feiss, 2015**). Les phages utilisent quatre mécanismes principaux pour reconnaître leur propre ADN (plutôt que l'ADN de l'hôte) et initier et terminer leur encapsidation.

#### **6.2.6. Lyse de l'hôte cellulaire**

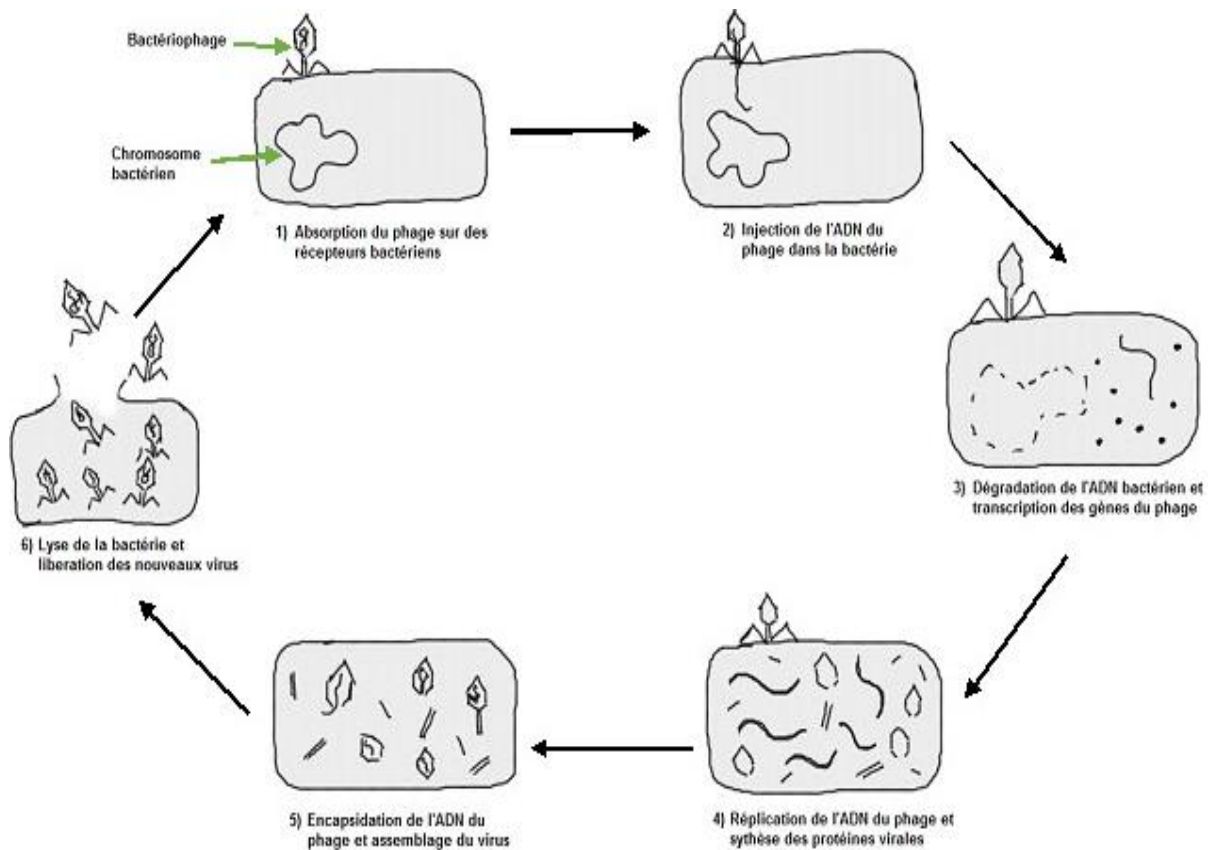
C'est la dernière étape du cycle de réplication, elle nécessite la présence de plusieurs protéines de lyse chez les phages à ADN bicaténaire, dont au moins une enzyme qui dégrade la paroi cellulaire de peptidoglycane. Pour la majorité de ces phages l'utilisation d'au moins deux protéines une hydrolase, lysine ou endolysine, et une protéine membranaire, nommée holine. La fonction de la holine est de créer des pores dans la membrane cytoplasmique à travers laquelle l'endolysine passe pour accéder à la couche de murine (**Young, 1992**). Cependant, pour les phages à ADN et à ARN simple-brin une seule protéine de lyse est suffisante pour la réalisation de la lyse cellulaire sans dégrader de façon enzymatique le peptidoglycane.

La plupart de ces phages vont plutôt bloquer la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne en se liant et en inhibant plusieurs enzymes dans la voie des précurseurs du peptidoglycane (Chamakura et Young, 2019).

Les particules virales nouvellement formées infecteront désormais de nouveaux hôtes via la reconnaissance des récepteurs cellulaires, suivi de l'injection du génome viral.

**Tableau 4 :** 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
<b>Adsorption</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- production d'inhibiteurs compétitifs s'attachant aux adhésines des bactériophages.</li> <li>- modification de la structure des récepteurs de surface.</li> <li>- production de protéines masquant les récepteurs bactériens.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- diversification des adhésines présentes sur les fibres du bactériophage.</li> <li>- production de lyase ou d'hydrolase dégradant les exopolysaccharides.</li> </ul>
<b>Pénétration</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- dégradation de l'ADN viral (enzymatique, CRISPR-Cas).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- production d'enzymes permettant la Méthylation de l'ADN viral ainsi non reconnu.</li> <li>- mutation des motifs conservés reconnus par les systèmes CRISPR-Cas.</li> </ul>
<b>Réplication</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- clivage des ARNt.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- système de réparation.</li> </ul>
<b>Assemblage / Libération</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- infection « abortive ».</li> <li>- lyse prématurée.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- production d'inhibiteur d'enzymes Bactériennes.</li> </ul>



**Figure 7 :** Mode d'infection des phages (Anonyme 6).

Les expériences faites par Ellis et Delbrück ont permis de conclure des paramètres qui caractérisent les différentes étapes de l'infection virale (**Ellis & Delbrück, 1939**). Il s'agit de : la vitesse d'adsorption, de la période dite de latence, et de la "burst size" la période de latence correspond au temps entre l'adsorption des phages et la libération de néo-particules par la lyse bactérienne tandis que la "burst size" définit la quantité de virions libérés pour chaque cellule infectée. Ces derniers paramètres déterminants le degré de virulence d'un phage donné ils peuvent varier selon l'état physiologique de la cellule et les paramètres environnementaux tels que la température (**Sillankorva et al., 2004**).

### 6.3. Les cycles de répliquions

#### 6.3.1. Cycle lytique « phages virulents »

La répliquion des phages virulents s'effectue via un cycle lytique qui se termine par une lyse de l'hôte quelques heures après l'infection et libéré des virions de la descendance. Ce type de phage prédomine en milieu aquatique (**Ackermann, 2003**).

Après l'adsorption à la surface de la cellule hôte, le phage introduit dans le cytoplasme de la bactérie son génome où l'ensemble des protéines codées par celui-ci est exprimé qui

permettent en suite la réplication du génome phagique et au final la synthèse des protéines structurales (**Grossi, 2006**). La plupart des phages qui sont problématiques pour les industries de fermentation et de bioprocédés sont de type lytique strict. A l'inverse nous verrons qu'ils peuvent également être d'un grand intérêt pour d'autres applications.

### **6.3.2. Cycle lysogénique « phages tempérés »**

Les bactériophages tempérés sont capables de subir un cycle alternatif au cycle lytique appelé cycle lysogène. Dans ce cas, le phage ne se multiplie pas et leur information génétique est intégrée dans le génome de l'hôte pour établir un état de prophage (**Campbell, 1992**) pour un temps indéfini.

L'expression des gènes viraux nécessaires au début de la réplication virale est empêchée. L'entrer dans le cycle de vie lytique ou lysogène par ces phages de descendance tempérée se fait par un signal qu'est basé sur un interrupteur génétique qui détecte les conditions environnantes dans lesquelles il devra évoluer. Des déclencheurs environnementaux tels que, la concentration en sel, le pH, la température, une carence nutritionnelle ou des déclencheurs cellulaires peuvent induire le passage au cycle lytique et libérer des progénitures de phages en établissant un cycle lytique complet. Plus récemment, des travaux ont mis en évidence la production de peptides par les phages eux-mêmes, leur permettant d'osciller entre cycles lytiques et cycles lysogéniques (**Erez et al., 2017**).

L'analyse par séquençage des gènes bactériens permet l'observation de 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**).

### **6.3.3. Le cycle pseudo-lysogénique**

Ce type de cycle est caractérisé par l'injection du génome phagique dans la cellule hôte qui ne s'intègre pas et reste latent dans le cytoplasme. Le cycle pseudolysogénique reste mal compris et interviendrait chez les bactéries ne possédant pas assez d'énergie disponible pour le phage, cela lui permettrait ainsi de survivre dans des environnements défavorables en attendant des conditions plus propices pour mettre en place un cycle lytique ou un cycle lysogénique (**Ripp and Miller, 1997**). Plus récemment, (**Latino et al., 2016**) ont mis en évidence le fait que le maintien à long terme du génome de certains phages lytiques à l'intérieur de la bactérie *P.*

*aeruginosa* PAO1, lors de la pseudolysogénie, pourrait favoriser le transfert de gènes responsables de l'apparition de résistances bactériennes.

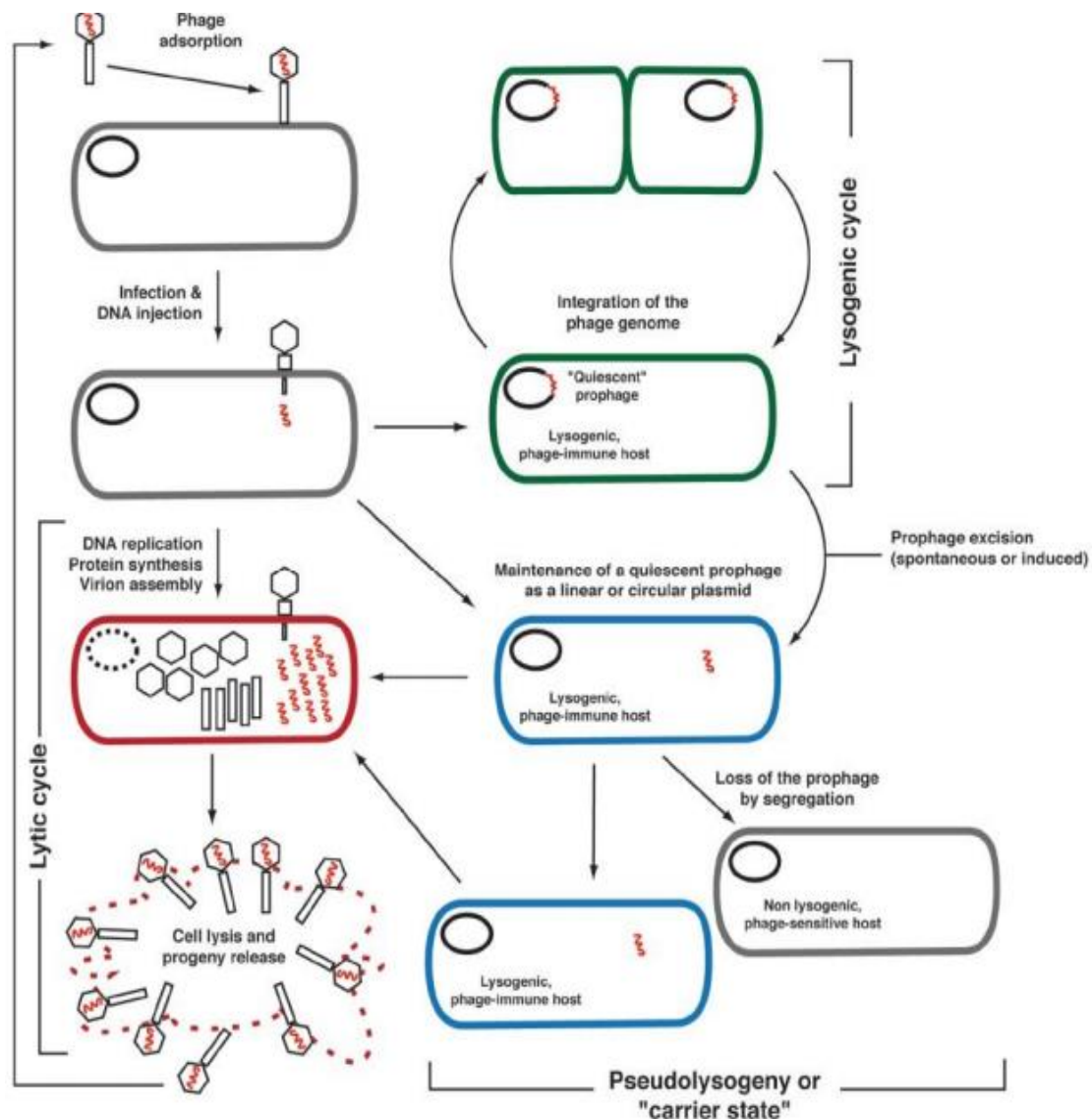
La lysogénie et la pseudolysogénie peuvent être vues comme des stratégies sélectionnées chez les virus leur permettant une transmission verticale. Si les hôtes sont trop rares ou bien si les conditions environnementales limitent fortement la survie des particules virales libres, alors le maintien du génome viral dormant dans un génome bactérien peut être sélectionné (Dublanchet, 2009).

#### 6.3.4. Le cycle chronique « phages filamenteux »

Le cycle chronique n'a été décrit que pour une espèce de phages, les phages M13 du genre *Inovirus*. En effet, dans leur cas, la libération de nouveaux virions se fait par bourgeonnement. La bactérie est alors préservée de la lyse et reste porteuse de façon chronique du génome phagique (Smeal et al., 2017).

**Tableau 5 :** Les différents cycles d'infections et les caractéristiques à prendre en compte pour une utilisation en biotechnologie (Anonyme7).

Type de cycle	Phages	Caractéristiques	Avantages	Limitations
Lytique	ADN db, <i>Caudovirales</i>	Efficacité lytique : MOI, « burst size », plus efficaces sur des cellules en croissance.	Auto réplicatifs Accroissement de la concentration sur le site infectieux Faible MOI suffisant	Relargage de toxines possible durant la lyse cellulaire
Chronique	ADN sb, <i>Inoviridae</i> <i>Enterobacteria</i> (Phage M13) <i>Pseudomonas</i> (Phage Pf3)	Phages filamenteux : pas de lyse de la cellule, sortie des virions par bourgeonnement	Auto réplicatifs Limite le relargage de toxines	Cellules bactériennes infectées restent viables Apparition rapide de résistance par modification/perte des récepteurs (Pili)
Pseudo- lysogénique	ADN db, <i>Siphoviridae</i> <i>Pseudomonas</i> (phages DMS3, MP22, D3112)	Intégration dans le génome bactérien. Réalisation d'un cycle lysogénique sans lyse de l'hôte	Inhibition des facteurs de virulence bactériens Disruption des gènes de l'hôte lors de l'intégration dans le génome Limite le relargage de toxines	Transfert possible de gènes (Transfert horizontal)



**Figure 8 :** Différents cycles de réplication des phages (Fortier & Sekulovic, 2013).

#### 6.4. Enzymes phagiques

Les enzymes phagiques contribuent au mécanisme de virulence des bactériophages, grâce à la synthèse d'un couple d'enzymes qui agissant de manière synergique : holine-endolysine rendant possible le cycle lytique

##### 6.4.1. Holines

Ce sont des enzymes qui perforent la membrane plasmique des bactéries pour libérer de nouvelles particules virales « les virions ». Pour que cette enzyme soit effective, elle doit être concentrée dans le cytoplasme bactérien ce qui permet un contrôle optimal du moment de la lyse. Les pores ainsi formés sont au nombre de 1 à 3 et font en moyenne 340nm (Wang *et al.*, 2000).

### 6.4.2. Endolysines

L'endolysine, ou lysine, c'est un complexe d'enzymes qui s'accumule dans le cytoplasme de l'hôte jusqu'à ce que les holines forment un pore dans la membrane bactérienne. Une fois ce pore formé, les lysines peuvent dégrader le peptidoglycane grâce aux différentes activités du complexe enzymatique spécifique en fonction du type de paroi de la bactérie ciblée.

Ensuite, le compartiment bactérien étant plus concentré la pression osmotique chasse le contenu bactérien vers l'extérieur, libérant ainsi les nouveaux virions. Ces enzymes peuvent constituer un traitement bactéricide alternatif à la phagothérapie : l'enzymothérapie. A l'heure actuelle, on a spécifiquement découvert l'endolysine CF-301 de *Staphylococcus* (Schmelcher et coll. 2012). Ces lysines font l'objet d'essais cliniques pour le traitement de patients atteints de bactériémie à *Staphylococcus aureus* (Clinicaltrials, 2020).

### 6.4.3. Enzymes dépolymérase

Les bactériophages possèdent une enzyme à activité polysaccharide dépolymérase qui permettent la destruction du biofilm pour protéger la bactérie. Les phages peuvent alors diffuser librement dans le biofilm jusqu'à atteindre les bactéries-cibles (Dublanche, 2017).

## 7. Similarités entre les virus procaryotes et eucaryote

Il existe une énorme diversité de virus qui peuvent infecter tout type de cellule, pour chaque genre de virus il y'a des propres caractéristiques et stratégies d'infection. Néanmoins, au fur et à mesure que de nouvelles informations sur les virus s'accumulent notamment en raison du nombre de génomes séquencés, il devient possible de déduire certains mécanismes d'évolution virale (Hendrix, 2004). Cependant, la situation est encore compliquée par le fait des séquences protéiques virales primaires de différents organismes qui semblent identiques d'un point de vue structural et fonctionnel, sont souvent très divergentes à tel point qu'aucune similarité de séquence n'est détectable (Hendrix, 2004). Il existe encore des preuves que des virus très différents aujourd'hui proviennent d'un ancêtre commun

Ainsi, les bactériophages à queue qui infectent les bactéries et la famille des virus de l'herpès sont similaires morphologiquement avec certains mécanismes d'assemblage identiques. En particulier, lorsque les particules virales « virions » sont assemblées dans la cellule, le virus de l'herpès et les bactériophages s'assemblent d'abord dans la capsid d'origine « procapsid » qui devient par la suite une capsid mature (Gregory E.,2005). Dans les deux cas, la formation de la procapsid est guidée par la présence de protéines d'échafaudage et la transition procapsid/capsid est irréversible et implique une forte

réorganisation des sous unités au sein de la capsidie lorsque l'ADN viral est incorporé par le connecteur (Newcomb *et al.*, 2001 ; Heymann *et al.*, 2003). Un autre exemple qui illustre la connexion ancestrale possible entre les virus procaryotes et les virus eucaryotes est donné par la similitude dans le repliement spatial des protéines de capsidie qui constituent l'hexon de l'adénovirus humain (Athappilly *et al.*, 1994), du phage PRD1 (Benson *et al.*, 1999) et du virus algal PBCV-1 (Nandhagopal *et al.*, 2002). Pour ces trois virus, l'hexon constituant la capsidie est un trimère, et chaque sous-unité est composée de deux domaines similaires dans le baril  $\beta$  (motif « jelly roll ») (Nandhagopal *et al.*, 2002). Pour le virus STIV infectant une archéobactérie (Rice *et al.*, 2004) la même organisation d'hexons a été trouvée récemment.

Cet exemple montre qu'il existe entre les protéines de capsidie de quatre virus infectant les trois grands genres du vivant des relations de conformation. Cela indique que certains virus avaient un ancêtre commun avant la division entre les genres eucaryotes, procaryotes et archées il y a environ 3 milliards d'années et renforce l'intérêt des études sur les bactériophages en tant que système modèle de virus eucaryotes (Gregory E., 2005).

## **8. Stabilité des bactériophages face aux conditions physico-chimiques du milieu**

La survie des bactériophages et leur stabilité peuvent être influencées par plusieurs facteurs chimiques et/ou physiques. Certains scientifiques ont également suggéré qu'il existe un lien entre la forme de certains phages et leur capacité à survivre dans différentes conditions. Ils ont prouvé que les phages possédant des fibres caudales semblent plus stables dans des conditions difficiles. Par contre, il ne semble pas y avoir de différences notables entre les types de fibres caudales (flexible, contractile ou courte). Ainsi ils ont démontré que les phages avec une plus grosse capsidie (100 nm) ont une meilleure capacité d'adaptation à différents milieux que ceux ayant une capsidie plus petite (60 nm) (Jonczyk *et al.*, 2011).

La température joue un rôle majeur pour l'attachement du phage à l'hôte, la pénétration, la multiplication et peut influencer la durée du cycle latent (lysogénie) des phages. De manière générale, une température basse qu'optimale peut diminuer la quantité du matériel génétique injecté dans les bactéries alors que des températures plus élevées rallongent le cycle de latence (Jonczyk *et al.*, 2011).

A un pH de 5 à 8 dans la plupart des cas les phages sont stables. On rapporte certaines espèces peuvent survivre à un pH de 3 ou 4. Généralement, la concentration du phage va diminuer lentement à mesure que la valeur du pH diminue. Par exemple, lorsque le pH passait de 6,19 à 5,38, le phage de *S.aureus* diminuait de deux logs entre 4 et 6 heures. Lorsque le pH est inférieur à 4,5, la prolifération de plusieurs bactériophages est altérée. Le phage T4 est instable à un pH inférieur à 5 et le phage PM2 perd son activité complètement dans une solution à un pH de 5 à 37 °C après une heure (**Ly-Chatain, 2014**).

Les phages sont aussi sensibles aux agents dénaturants des 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**).

## **9. Résistance microbienne aux phages**

De nombreuses études ont montré que la lyse virale n'induisait en moyenne qu'entre 10 % et 20 % de mortalité bactérienne. Ces faibles valeurs suggèrent le développement de mécanismes de défense des bactéries face aux infections virales (**Bourma M & Halimi D.,2013**). Ces mécanismes peuvent se traduire par :

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

Récemment, un nouveau mécanisme de résistance bactérienne a été révélé au cours de l'étude d'Andersson et Banfield. D'après ces auteurs, les bactéries ont la capacité d'intégrer des éléments génétiques particuliers provenant de séquences génomiques virales au niveau de locus appelés « regroupements de répétitions de courts palindromes régulièrement espacés » ou CRISPR (clusters of regularly interspaced short palindromic repeats), ce qui leur confère une résistance aux phages (**Berdjeb et Jacquet, 2009**).

## II. Phagothérapie

### 1. Généralité

La thérapie phagique, ou phagothérapie fondée sur l'utilisation du bactériophage pour traiter des maladies infectieuses d'origine bactérienne ; ce traitement a été largement utilisé dans le monde avant la découverte de l'ATB. Bien qu'elle ait 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 (**Dublanchet, 2009**). Certains experts contemporains affirment que la phagothérapie peut être plus efficace que les antibiotiques dans certaines conditions cliniques. De ce fait, elle se voudrait une solution à l'antibio-résistance (**Fruciano., 2011**).

Plusieurs études sont réalisées partout dans le monde ciblant les plus importants des pathogènes humains, comme *Salmonella sp.*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Vibrio sp.* Très peu d'études sont réalisées chez l'humain malheureusement afin de tester le traitement chez les animaux en laboratoire, principalement dû à la réglementation et aux normes (**Dublanchet, 2008**). Par exemple, le projet PhagoBurn, visant à évaluer l'innocuité, l'efficacité et la pharmacodynamique de cocktails de phages thérapeutiques destinés à traiter les infections de plaies de brûlure dues à *E. coli* ou à *P. aeruginosa*, s'est déroulée de 2013 à 2017, et les résultats ne sont toujours pas disponibles, dû à la rencontre de plusieurs problèmes tout au long du projet.

Le manque de connaissances détaillées *in vivo* sur les phages limite actuellement notre capacité à concevoir et à assurer le succès des essais cliniques (**Rehman et al., 2019**). Dublanchet et son équipe ont rapporté le succès d'un traitement d'une otite externe chronique à *S. aureus* d'une patiente chez laquelle l'antibiothérapie a été inefficace (**Dublanchet, 2008**). L'application locale de phages actifs *in vitro* sur le germe isolé a été associée à un antibiotique, une durée de 48 h a suffi pour observer une nette amélioration. Ensuite un patch pour le traitement des infections des plaies appelé "Phagobioderm" a été développé et commercialisé en Géorgie (**Markoishvili et al., 2002**). Ce patch biodégradable est imprégné de pyophages (actifs contre *Pseudomonas*, *E. coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus*) et d'autres composants anti-microbiens.

En États-Unis où la phagothérapie a pu sauver la vie de deux patients, le premier âgé de 68 ans et infecté par *Acinetobacter baumannii* (**Schooley et al., 2017**), le second âgé seulement de 15 ans et atteint de la fibrose kystique entraînant une infection bactérienne grave à

*Mycobacterium abscessus* (Dedrick et al., 2019). Ce dernier cas rapporte d'ailleurs la première utilisation de phages génétiquement modifiés en médecine humaine.

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



**Figure 9 :** Pyobactériophagum produit en Géorgie (nature, 2014).

## 2. Approches alternatives aux ATB

L'association de certains antibiotiques avec certains phages peut être synergique. Dès 1944 une communication de Neter soulignait la synergie entre un bactériophage et un antibiotique en l'occurrence entre bactériophage- pénicilline sur le *Staphylococcus aureus*. (Neter et Clark, 1944) et confirmés par Himmelweit l'année suivante (Himmelweit, 1945). Ce n'est que dans les années 1960 que de nombreux articles français sont publiés à l'Institut Pasteur de Paris (8 articles publiés entre 1947 et 1951, avec le titre : Antibiotiques et lyse phagique) et de nombreux articles en Roumanie et même en Russie. Heureusement, ils sont maintenant traduits (Kutateladze, Adamia, 2010). Face à des résultats encourageants, MacNeal a non seulement analysé cette combinaison sur *Staphylococcus*, mais également analysé *Streptococcus* et *E. coli* in vitro et 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 fait une observation accidentelle 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 les antibiotiques eux-mêmes sont capable de mobiliser les phages lysogènes (protophages) portés par les souches *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

### **3. 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 (Gabrielle.B., 2015).

#### **3.1. Utilisation en génie génétique**

Les bactériophages ont de nombreuses utilisations en biologie moléculaire. Ils sont utilisés comme vecteurs de clonage pour insérer l'ADN dans les bactéries. La méthode du phage display est une méthode qui permet la sélection de peptide en raison de sa présentation sur la surface de phages. Le phage display est une technique qui permet 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).

#### **3.2. Utilisation en médecine humaine**

Les bactériophages ont été largement utilisés dans le passé pour lutter contre les bactéries pathogènes dans un grand nombre d'infections bactériennes. Ils ont été utilisés avec succès pour traiter des maladies de peau dues au *Staphylococcus sp.* Ainsi que la dysenterie bacillaire, le choléra, la fièvre typhoïde et les autres salmonelloses. Plusieurs produits à base de phages qui ont été commercialisés aux dans les années 1930 (Grégory et Meyer, 2002).

Les 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 (Pirisi, 2000). 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).

### 3.3. Utilisation dans le domaine vétérinaires

L'utilisation des phages contre les infections animales et d'empêcher la propagation d'agents pathogènes des animaux au système alimentaire est un autre domaine important de la recherche sur les bactériophages (Adhya *et al.*, 2014). Une expérience faite par Smith et Huggins dans les années 80 a prouvé l'efficacité de l'injection intramusculaire de suspensions de phages à des souris 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 (Wittebole *et al.*, 2014).

### 3.4. Utilisation de l'enzyme lytique comme agent thérapeutique

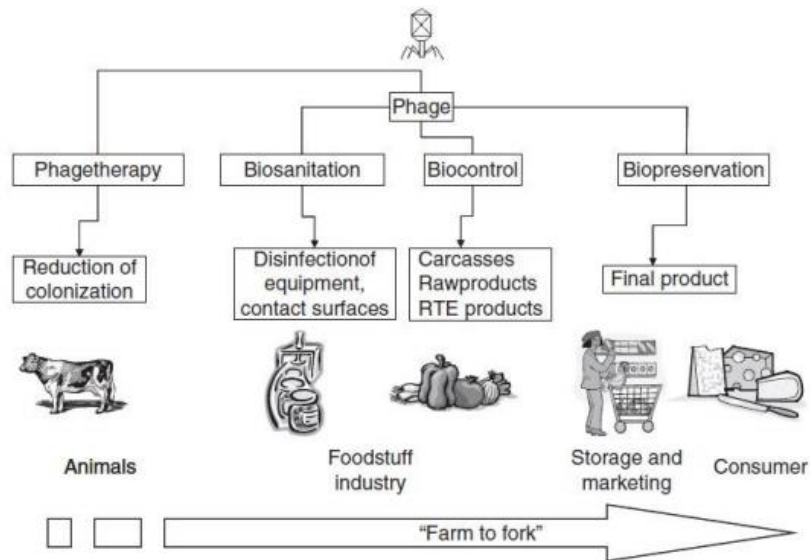
Les bactériophages utilisent des enzymes lytiques pour décomposer les parois cellulaires des bactéries au cours de leur cycle d'infection et peuvent potentiellement être utilisés comme agent thérapeutique (O' Flaherty *et al.*, 2009).

Le mécanisme d'action de la lyase consiste à hydrolyser les quatre liaisons chimiques les plus importantes du peptidoglycane, créant des trous dans la membrane, qui sont mortels pour les bactéries (Gandham, 2015). Au niveau expérimental, des lyases de bactériophages sont également étudiées contre *Enterococcus faecalis* et d'autres espèces d'entérocoques. EC300 est une enzyme conçue pour tuer *Enterococcus faecalis* dans des conditions de croissance idéales. Les résultats ont prouvé l'efficacité de l'enzyme EC300 contre une variété de souches d'*E. coli* et *Enterococcus faecalis*, y compris les souches résistantes aux antibiotiques (Proença *et al.*, 2015). Il existe de plus en plus d'études sur l'utilisation de la lyase comme agent thérapeutique, et ces études semblent avoir atteint des résultats concluants.

### 3.5. Utilisation 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 (Atterbury, Connerton, Dodd, Rees, & Connerton, 2003). 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.

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 (Tomatet *et al.*, 2013). Le « Center for Disease Control and Prévention » aux États-Unis a décrété que *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia.coli* et *Campylobacter.jejunisont* sont les principaux pathogènes responsables des décès d'origine alimentaire (Mahonyet *al.*, 2011).



**Figure 10** : Utilisation des phages en sécurité alimentaire. Tout au long du processus de production alimentaire, les phages sont utilisables : (i) la phagothérapie animale peut être utilisée afin de réduire ou éliminer le pathogène chez l'animal ; (ii) l'élimination directe des pathogènes ou bactéries d'altération est possible par l'application de suspensions de phages ; (iii) les cocktails phagiques sont également utilisés comme additifs alimentaires pour la stabilité microbiologique des produits (García *et al.*, 2008).

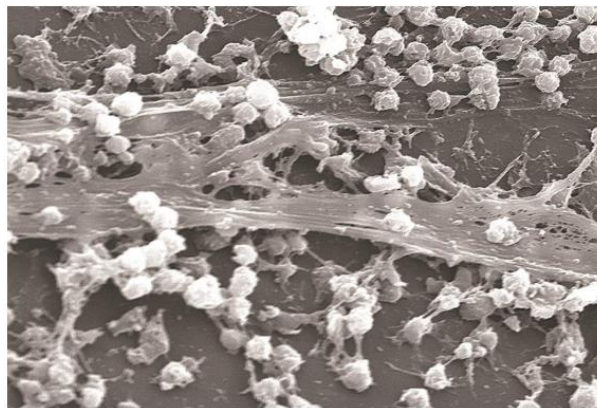
### 3.6. Utilisation pour le contrôle des biofilms

L'utilisation de phages en concomitance avec d'autres substances utilisées pour traiter les biofilms a été testée. Par exemple, l'utilisation d'un phage de *Listeria* avec un ammonium quaternaire a démontré un effet de synergie où une diminution importante de *L. monocytogenes* a été observée sur des surfaces d'acier inoxydable et de polypropylène (O'Flaherty *et al.*, 2009).

Les bactériophages ont été considérés comme agent contre les 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 (Azizian *et al.*, 2013). Par contre, l'effet des phages sur les biofilms déjà formés est plutôt faible (Azizian *et al.*, 2013). 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 le biofilm (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 observé après un traitement avec le phage  $\Phi$ S1 (O'Flaherty *et al.*, 2009). Certains phages ont même été modifiés de manière à exprimer l'enzyme DspB qui hydrolyse une adhésion cruciale pour la formation de biofilms par *S. aureus* et *E. coli*. Le phage modifié T7 a réduit le compte bactérien du biofilm de *E. coli* de 99 % (Lu & Collins, 2007).

Toutes ces études démontrent le réel potentiel des phages pour la prévention et le contrôle de la formation de biofilms. Il est nécessaire de continuer les recherches afin de mettre au point les bonnes recettes de phage et d'enzymes de phages qui pourraient être utilisées pour cette application (Lu & Collins, 2007).



**Figure 11 :** Photographie au microscope électronique d'un biofilm de *S.aureus* (Cunningham *et al.*, 2010).

### 3.7. 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 (Inal, 2003).

Ainsi que leur usage serait particulièrement indiqué pour traiter l'intérieur des réseaux hydrauliques, comme par exemple les tuyaux de circulation d'eau de boisson pour les volailles, qui regorgent généralement de bactéries surtout des bactéries générant des infections entériques, comme *Campylobacter spp* (Inal, 2003), c'est ce qu'ont tenté in vitro certains scientifiques. La phagothérapie n'a pas encore éliminé la nécessité des traitements antibiotiques. Mais il existe plusieurs rapports qui démontrent que des médecins ont réussi à traiter avec des phages des patients infectés par des superbactéries (Scott *et al.*, 2007 ; Siringan *et al.*, 2011).

L'Eliava Institute, en Géorgie, est un des premiers établissements à utiliser la phagothérapie. Les scientifiques de cet institut ont réussi à traiter avec succès, à l'aide de la phagothérapie, des patients qui avaient des ulcères cutanés, ou dont les blessures par brûlure étaient infectées, ou qui souffraient de la grippe intestinale, d'infections oculaires ou respiratoires, ainsi que beaucoup d'autres problèmes de santé. Ces infections ont tendance à être difficiles à traiter. Les médecins utilisent souvent les bactériophages en combinaison avec des antibiotiques, parce qu'une blessure peut contenir de multiples agents pathogènes. Il est difficile de choisir rapidement un bactériophage pour chacun d'eux (Carson et al, 2010).

#### 4. Avantages et inconvénients

La thérapie phagique peut sembler très avantageuse par rapport à l'utilisation des antibiotiques mais bien évidemment plusieurs limites sont aussi associées à l'utilisation des phages pour traiter les infections bactériennes.

**Tableau 6 :** Les avantages et les inconvénients de la thérapie phagique.

Avantages	Limites
La nature est une source inépuisable de phages.	Il peut être difficile de trouver des phages contre certaines bactéries cibles (bactéries intracellulaires par exemple).
Les phages sont actifs contre des bactéries résistantes aux antibiotiques.	Il y a un manque de connaissances sur la production et la conservation des phages selon les bonnes pratiques de fabrication.
Ils sont très spécifiques envers les souches bactériennes.	Les phages sont spécifiques à une ou quelques souches bactériennes (difficile de traiter une infection causée par plusieurs souches, ou encore difficile d'utiliser le même phage pour tous les patients).
Ils ont des mécanismes indépendants de ceux des antibiotiques : la résistance aux antibiotiques n'induit pas une résistance aux phages.	Il existe également plusieurs limites face à la société (craintes d'un traitement biologique).
Il existe plusieurs bénéfices écologiques : moins de rejet d'antibiotiques et de dérivés dans la nature.	Il y a un manque important d'éducation auprès des médecins.

Les phages se multiplient et persistent uniquement lorsque leur hôte bactérien est présent (Carminati <i>et al.</i> , 2016).	Il y a plusieurs réticences des industries pharmaceutiques, puisqu'il y a beaucoup d'incertitudes réglementaires et liées à la propriété intellectuelle
Ils permettent de limiter l'utilisation des antibiotiques, il serait même possible d'utiliser ce type de traitement en dehors des hôpitaux (par exemple en vente libre à la pharmacie).	Il y a très peu de patients actuellement atteints de certaines infections (Carminati <i>et al.</i> , 2016).

## 5. Traitement des infections à *Escherichia coli*

On ne sera pas surpris que les souches d'*E. coli*s pathogènes soient celles les plus couramment concernées par des essais expérimentaux. D'une part, l'acquis des connaissances sur ces bactéries et sur leurs phages est important, et d'autre part, il s'agit de pathogènes très répandus aussi bien chez l'homme que dans le monde animal. Parmi les souches d'*E. coli*, le sérovar O157 : H7, a fait l'objet de deux études récentes, l'une sur le tractus intestinal de la souris. Chez la souris, l'efficacité d'un mélange de trois phages a été évaluée (**Rolain et al., 2009**). Deux jours après l'introduction d'une quantité identique de bactéries dans l'estomac, certaines souris furent traitées par une dose unique de phages tandis que d'autres l'étaient par une dose quotidienne pendant neuf jours. Les phages administrés de manière répétée sont beaucoup plus efficaces qu'en une seule fois. Cependant, s'il n'y a plus de bactéries dans le colon et la partie basse de l'intestin grêle, elles persistent dans la partie haute de la grêle et dans le cæcum (**Rolain et al., 2009**).

Dans la même étude, 24 heures après l'ingestion d'*E. coli* O157 : H7, deux autres phages toujours administrés per os, mais une fois par jour pendant trois jours chez la souris, éliminent complètement celle-ci à tous les niveaux y compris dans les fèces six jours après le début du traitement. En revanche, chez le veau, dans un modèle de portage rectal, les mêmes bactériophages n'ont pas été aussi efficaces. S'ils ont provoqué une diminution du nombre de bactéries introduites, leur élimination n'a pas été totale. Il apparaît donc que l'effet de la phagothérapie n'est pas le même selon les modèles utilisés. Dans le premier, chez la souris infectée, les phages paraissent plus efficaces probablement parce que, après avoir éliminé une quantité des bactéries infectieuses, le système immunitaire prend le relais. Dans un modèle de portage, les phages seraient seuls à combattre les bactéries adaptées à leur hôte, le système immunitaire restant tolérant (**Comeau et al., 2008**).

Cette hypothèse a été confirmée par d'autres travaux chez le poulet. Dans le tiers-monde, 27 % des diarrhées infantiles sont dues à *E. coli* et ne relèvent pas de l'immunisation active contrairement aux diarrhées d'origine virale. Au cours de la réunion qui s'est tenue à l'Institut Pasteur de Paris le 20 novembre 2007, **Brüssow et al.** ont expliqué, quant à eux, leur objectif d'utiliser des bactériophages du type T4 pour lutter contre ces diarrhées infantiles. À partir de selles récoltées à Dhaka, Bangladesh, endroit où l'on trouve le plus de diarrhées infantiles, il a isolé des phages T4 lytiques pour *E. coli* responsable de ces diarrhées. Une combinaison réduite de quelques-uns de ces phages a permis de lyser in vitro plus de 80 % des souches entéro-pathogènes d'*E. coli*, mais ils ne sont pas spécifiques de pathogènes et sont capables de lyser les souches commensales (**Drouji, 2009**). In vivo, les bactériophages sont retrouvés dans les selles quelques heures plus tard : ces résultats chez l'homme ont été observés avec un de ces bactériophages T4 administré dans de l'eau de boisson (**Rivasi, 2013**). Ces phages passent dans l'estomac et l'intestin mais in vivo, les bactéries commensales n'ont pas été affectées par le traitement. Aucun symptôme ne fut noté pendant la durée du traitement. Aucune trace de phage ne fut retrouvée dans le sang et aucune réponse immunitaire ne fut détectée. Ces observations encouragent à poursuivre l'objectif initial (**Anonyme8**).

## **6. Traitement des infections à *S. aureus***

*S. aureus* est un pathogène majeur responsable d'un grand nombre d'infections nosocomiales. Sa capacité à résister à de nombreux antibiotiques en fait un candidat privilégié pour la phagothérapie. Deux articles récents ont démontré que les phages protègent des souris contre une infection létale à *S. aureus*, aussi bien par voie intraveineuse que par voie intrapéritonéale. Plus la phagothérapie est précoce après l'infection, meilleur est le résultat. Toutefois, **Capparelli et al.** ont montré qu'une infection chronique établie par voie intraveineuse peut être guérie après une injection unique de phages même après dix jours d'infection (**Matsuzaki et al., 2003 ;Capparelli et al., 2007**).

# **CHAPITRE II**

## **MATERIEL ET METHODES**

---

## **I. Objectif du travail**

L'objectif principal de la présente étude consiste à l'isolement des bactériophages « virus mangeurs de bactéries », et de mettre en évidence leur effet antibactérien naturel sur les souches d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* provenant de l'hôpital en s'appuyant sur la méthode des plages de lyse. Les différentes démarches entreprises pour atteindre l'objectif fixé sont récapitulées comme suit :

- Purification des souches ATCC
- Détection des phages à partir d'échantillons provenant de différents écosystèmes aquatiques
- Isolement des phages à partir des filtrats phagiques

## **II. Matériels**

### **1. Cultures bactériennes**

Les souches de références ayant fait l'objet de l'étude bactériologique proviennent de l'hôpital.

- Souche a Gram-négatives : *E.coli* ATCC 25922 ;
- Souche a Gram-positive : *S.aureus* ATCC 25923.

### **2. Cultures phagiques**

Les isolats phagiques sont obtenus à partir des échantillons d'eau prélevés sur 03 sites

- Barrage SARNO à la commune de Sidi Hamadouche ; wilaya de SIDI BEL ABBES ;
- Barrage SIDI ABDELLI à la commune Ben sekrane ; wilaya de TLEMCEN
- Barrage El Mafrouche a Terni Beni Hadiel; Wilaya de TLEMCEN.

### **3. Présentation des sites de prélèvement**

#### **3.1. Stratégie d'échantillonnage**

Le prélèvement d'un échantillon d'eau est une opération délicate à laquelle le plus grand soin doit être apporté ; il conditionne les résultats analytiques et l'interprétation qui en sera donnée (**Rodier et al., 2009**)

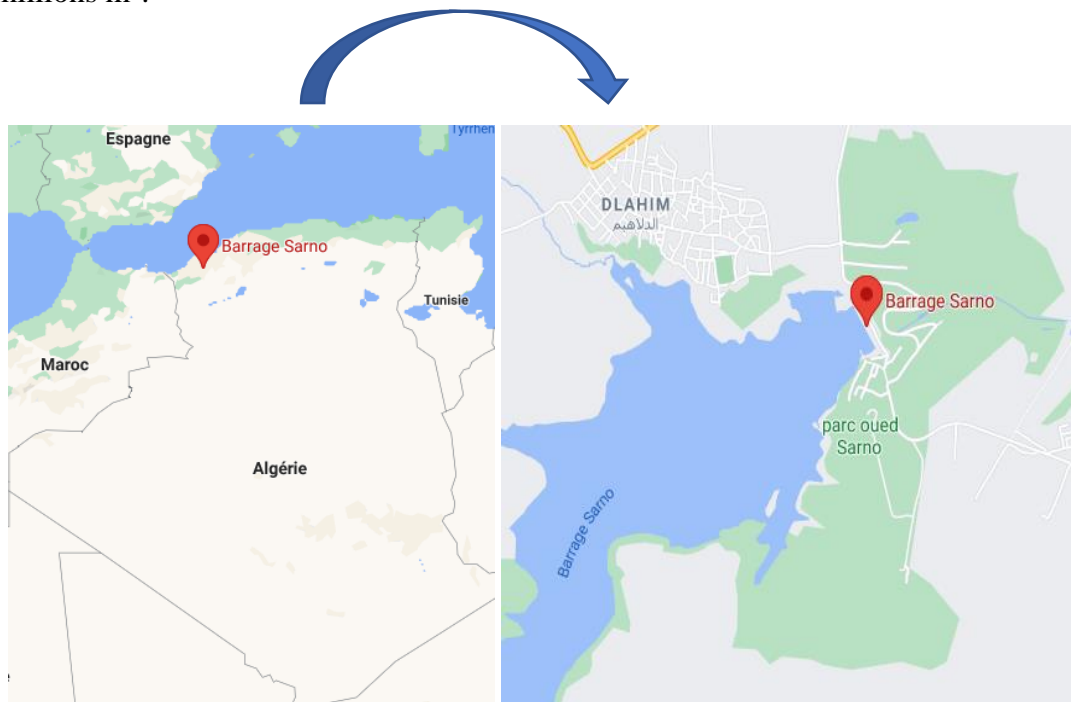
Les prélèvements ont été réalisés à partir de 03 sites (SARNO ; SA ; TLM) de façon aseptique dans des flacons en verre sombre stériles d'un volume de 250 mL, avant de choisir la station de l'échantillonnage une reconnaissance visuelle est effectuée afin de permettre de détecter des informations indispensables telles que la couleur de l'eau la direction du vent ou toutes autres observations pertinentes (mauvaises odeurs ...). Le prélèvement d'eau est effectué au bord pour les 03 sites. L'échantillonnage a été réalisé dans la matinée.

Dès que l'échantillon est prélevé, chaque flacon est muni d'une étiquette sur laquelle sont notés la date, l'heure, ainsi que le nom du site de prélèvement ; puis transporter dans une glacière au frais et à l'obscurité, ce qui permet d'assurer une conservation satisfaisante.

### 3.2. Barrage Sarno

Le barrage Sarno se trouve à 16 km au nord de la ville SIDI BEL ABBES situé à 3.5 km du confluent de l'oued Sarno et à 2.5 km de sidi Hamadouche.

Le barrage est destiné à l'alimentation en eau potable et à l'irrigation avec une capacité de 22 hm<sup>3</sup>. La moyenne des températures minimales est de 7°C et celle des températures maximales varie entre 29 et 35 °C (**Reguieg et al., 2013**). La superficie retenue du barrage sarno est de 3000 ha avec un débit annuel estimé à 10 millions m<sup>3</sup> et une capacité emmagasinée de 22 millions m<sup>3</sup>.



**Figure 12** : Situation géographique de Barrage Sarno (Google Maps, 2017).



**Figure 13 :** Présentation du site de prélèvement « Barrage Sarno ».

### 3.3. Barrage Sidi Abdelli

La ville de Sidi Abdelli est située au Nord-Est de la wilaya de TLEMCEM, plus précisément entre les monts de Tessala au Nord-Est et les monts de Tlemcen au Sud

Elle est limitée au Nord par la commune d'Aghlal (AIN TEMOUCHENT), au sud par les communes d'Ain Fezza et Ouled Mimoun, à l'Est par Ain Nehala, Talout et Ougbellil (Wilaya de Sidi Bel Abbès) et à l'Ouest par les communes de Bensekrane et d'Amieur.

Le barrage el Izdihar de Sidi Abdelli, achevé en 1989 est situé sur l'oued Isser à deux Km au Nord du village Sidi Abdelli et à 8 km de la ville Bensekrane, il s'étend sur une superficie de 669.15 Ha.



**Figure 14 :** Situation géographique de Barrage Sidi Abdelli (Google Maps, 2017).

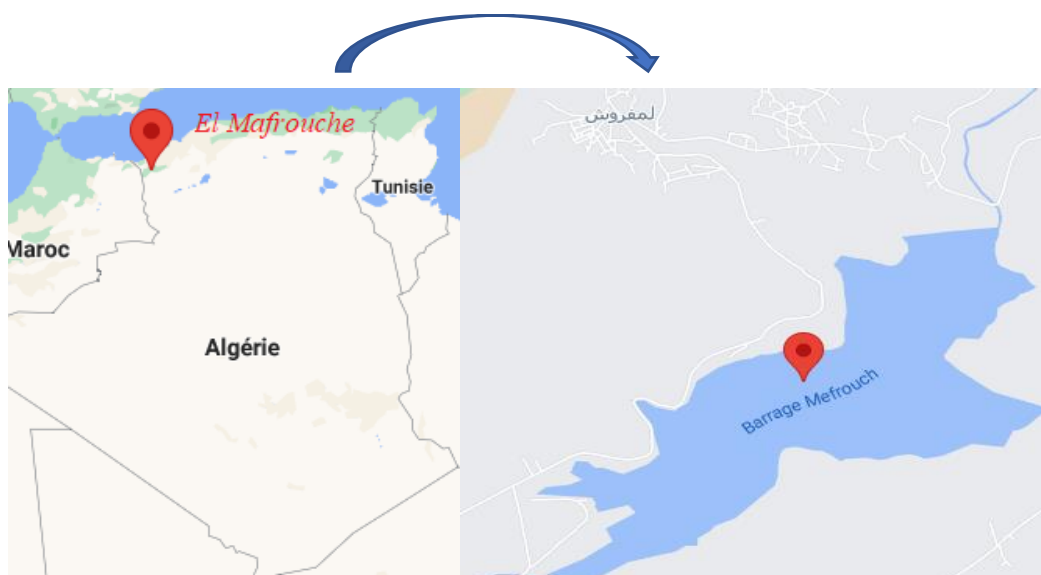


**Figure 15 :** Présentation du prélèvement « Sidi Abdelli ».

### 3.4. Barrage El Mafrouche

Il est situé à village el Mafrouche et considéré comme l'un des barrages les plus importants et les plus anciens de l'état de Tlemcen.

Il bénéficie d'un emplacement stratégique important car il est situé au Sud de la ville de Tlemcen à environ 10Km. Il a été créé à l'époque coloniale par les autorités françaises et il occupe une vaste superficie estimée à 910km<sup>2</sup> avec une capacité de 15 millions m<sup>3</sup>, et l'une des sources les plus importantes qui s'y déversent sont : Source Ain el Sultane, flux Oued El Nachef et les égouts secondaires de montagne.



**Figure 16 :** Situation géographique de Barrage El Mafrouche (Google Maps,2017).



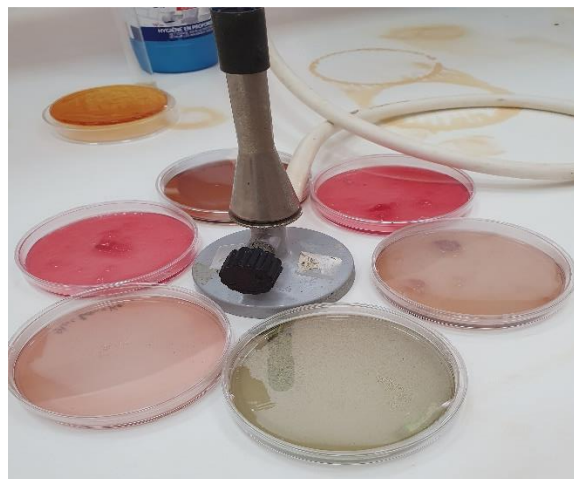
**Figure 17 :** Présentation du site de prélèvement « Barrage El Mafrouche ».

### **III. Méthodes**

#### **1. Purification et vérification de la pureté des souches ATCC**

##### **1.1. Isolement et caractérisation des souches**

Afin d'obtenir des souches pures, les souches de références misent dans un BN « Annexe 1 » sont repiquées et ensemençer par stries en appliquant la méthode d'isolement classique des trois cadrans sur différents milieux Hektoen « Annexe 2 », VRBL « Annexe 3 » et Mac Conkey « Annexe 4 » pour *E.coli* et Chapman « Annexe 5 » pour *S.aureus*, puis incubée à 37°C pendant 24 h.



**Figure 18 :** Étape d'isolement des souches ATCC.

## **1.2. Examen microscopique**

Deux examens sont réalisés, l'un direct entre lame et lamelle et l'autre indirect après coloration de Gram

### **1.2.1. Examen microscopique à l'état frais**

Les méthodes fondées sur la technique de l'état frais correspondent à l'observation d'un matériel biologique ou d'une suspension bactérienne entre lame et lamelle sans fixation préalable.

- Prélever une goutte de la suspension bactérienne et la déposer sur une lame propre
- Poser la lamelle et observer à l'objectif x40

Il permet une on observe au microscope d'une part, la présence éventuelle de bactéries (coque, diplocoque, chaînette, coccobacille, bacille...), le type de mobilité comme celle du "rameur" ou celle en "en vol de moucheron".

### **1.2.2. Coloration de Gram et observation microscopique**

La coloration de Gram est la coloration différentielle microbiologique la plus importante et la plus largement utilisée. Elle Permet de différencier les bactéries selon 2 critères : leur forme et leur affinité pour les colorants. Elle est parmi les techniques les plus communément utilisées au laboratoire de bactériologie médicale font appel à des colorations, la préparation est fixée sur une lame puis colorée.

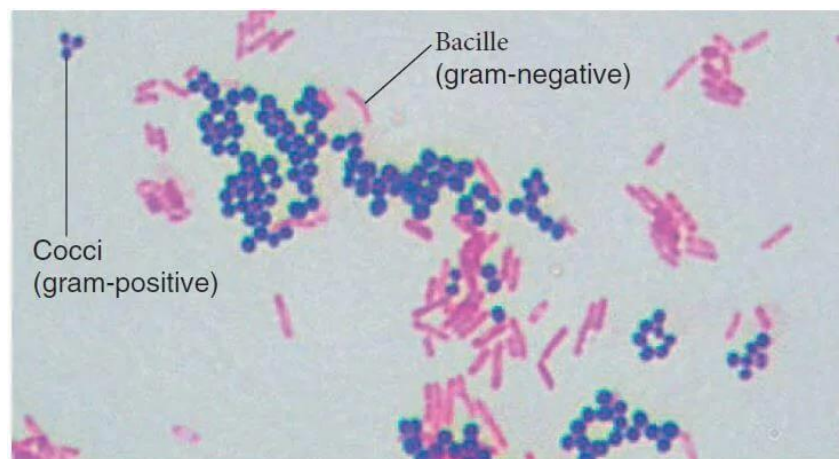
- Placer une petite goutte de la suspension bactérienne sur une lame propre
- Etaler la goutte et laisser sécher le frottis
- Passez le frottis à travers la partie supérieure d'une flamme de bec bunsen deux ou trois fois pour la fixation de la suspension

Laisser refroidir la lame ensuite continuer avec la coloration VLAFF

1. Inonder le frottis séché à l'air et fixé à la chaleur pendant 1 minute avec le réactif de coloration au cristal violet (ANNEXE 6). Veuillez noter que la qualité du frottis (concentration cellulaire trop lourde ou trop légère) affectera les résultats de la coloration de Gram.
2. Laver la lame dans un jet doux et indirect d'eau du robinet pendant 2 secondes
3. Inondation avec le mordant : iode de Gram ou Lugol (ANNEXE 7). Attendez 1 minute
4. Laver la lame dans un jet doux et indirect d'eau du robinet pendant 2 secondes.

5. Inondation la lame avec agent décolorant. Attendre 15 secondes ou ajouter goutte à goutte pour faire sortir l'agent de décoloration
6. Inondation la lame avec contre colorant « Safranine ou Fushine » (ANNEXE 8). Patienter 30 secondes à 1 minute.
7. Laver la lame dans un jet d'eau douce et indirecte de l'eau du robinet jusqu'à ce qu'aucune couleur n'apparaisse dans l'effluent, puis sécher avec du papier absorbant.
8. Observez les résultats de la procédure de coloration sous immersion dans l'huile. Examiner au microscope, objectif x100

À la fin de la coloration de Gram, les bactéries à GRAM négatif tacheront le rose / rouge et les bactéries à Gram positif tacheront le bleu / violet.



**Figure 19** : Coloration de Gram (Anonyme 9).

### 1.3. Test catalase

La catalase (Ferroporphyrine de poids moléculaire élevé) a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène avec formation de bulle. C'est l'action directe de l'enzyme qui est mise en évidence dans la masse bactérienne (Garnier et Denis, 2007). Leur principe :

- Prélever une colonie bien distincte prélevée d'une culture jeune de 24h à l'aide d'une autre pipette Pasteur car l'utilisation d'une Anse de platine peut fausser les résultats.
- Dissocier la colonie dans la goutte d' $H_2O_2$ .
- Le dégagement immédiat de bulles d'oxygène exprime la présence d'une catalase.

#### **1.4. Identification des souches « confirmation de l'identité des souches » par API**

Le système API® BioMérieux (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée de tests biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries. La galerie utilisée c'est API 20E (20 caractères pour les entérobactéries)

Dans l'API 20E, la bande de plastique contient 20 mini-chambres (Puits) de test contenant des milieux déshydratés ayant des compositions chimiquement définies pour chaque test. Ils détectent généralement une activité enzymatique, principalement liée à la fermentation des glucides ou au catabolisme des protéines ou des acides aminés par les organismes inoculés.

- Préparation de la boîte d'incubation en mettant de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Puis déposer stérilement la galerie dans la boîte.
- Prenez une seule colonie isolée à partir d'une culture pure de 18 à 24h et faites une suspension bactérienne dans de l'eau distillée stérile (0,5 Mc Farland).
- Inoculer la galerie soigneusement à l'aide d'une seringue :
  - ✓ Pour les substrats dont le nom est encadré, il convient de remplir la cupule. L'objectif est de réaliser des tests en aérobiose (riche en oxygène).
  - ✓ Pour les substrats dont le nom est souligné, il convient de remplir la cupule avec de l'huile de paraffine. Cette huile empêche le contact avec l'oxygène, créant ainsi un milieu anaérobique (absence d'oxygène) et empêche également les composés volatiles synthétisés lors de la réaction de s'échapper du tube.
- Marquez le plateau et incubez-le à 37°C pendant 18 à 24 heures.
- Après incubation ajoutez les réactifs pour les tests :
  - ✓ TDA : Une goutte de réactif TDA
  - ✓ IND : Une goutte de réactif de James ou Kovacs
  - ✓ VP : Une goutte de réactif de VP1 puis VP2

Les réactions se traduisent par le changement de couleur spontané ou après addition des réactifs précédents. La lecture des résultats se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique.

#### **1.5. Conservation des souches**

C'est une méthode utilisée dans les laboratoires pour conserver les cultures des différentes espèces microbiennes isolées. Ces cultures servent des souches de référence c'est-à-dire gardent constant l'ensemble de ces propriétés morphologique, métabolique, génétique et

physiologique. Elles sont fréquemment utilisées soit pour l'enseignement, soit pour le contrôle, soit pour la recherche, soit pour la production industrielle (Meyer *et al*, 2004).

#### **1.5.1. Conservation courte durée**

Cette méthode consiste à repiquer les isolats dans des tubes à essai contenant une gélose inclinée (Cappuccino & Welsh, 2017) « VRBL pour *E.coli* et Chapman pour *S.aureus* » ensemencés sur la pente des tubes par méthode des stries. Après une incubation de 24 h, les cultures sont stockées à 4°C pour une durée de 4 à 6 semaines pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations.

#### **1.5.2. Conservation longue durée**

Pour une conservation d'une durée plus longue les isolats sont additionnés de glycérol à 50% (1V de glycérol + 1V d'eau distillée stérile), les isolats sont conservés ensuite à une Température de – 20°C à -80°C.

## **2. Détection des bactériophages**

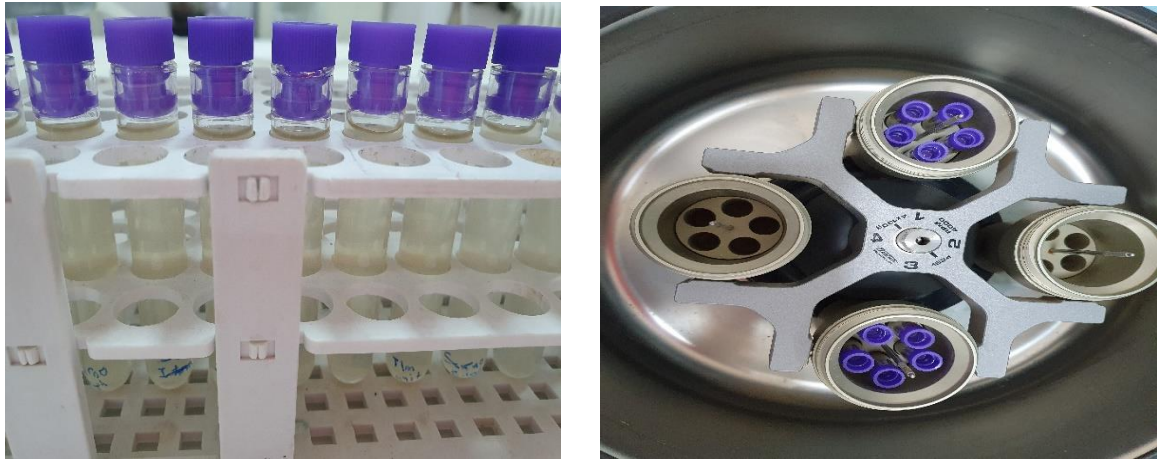
### **2.1. Préparation des échantillons et enrichissement**

Commençant toujours par une préculture préparée une nuit avant : cette dernière consiste à mettre dans un tube à essai stérile une suspension bactérienne dans un bouillon nutritif à l'aide d'une anse de platine, incubée à 37°C pendant 18 à 24h.

Ensuite dans des tubes à essais stériles 8mL d'échantillons sont d'abord mis en contact avec 1mL d'une préculture de la souche cible et 1mL de BNx10 (Annexe 9), le mélange est incubé à 37°C pendant 24h.

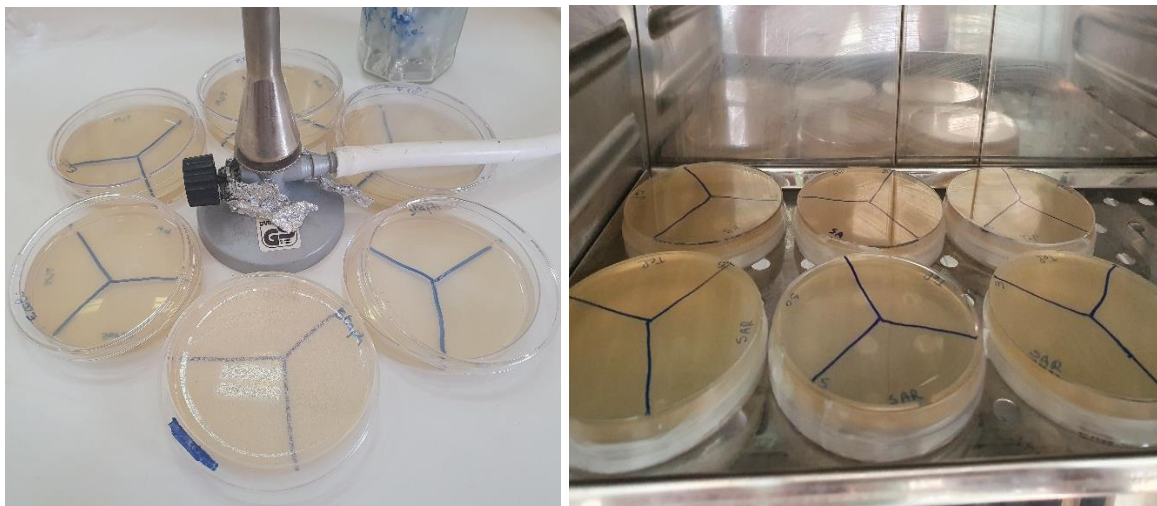
### **2.2. Mise en évidence des phages**

Après 24h, les échantillons amplifiés sont mis dans des tubes à hémolyse pour les centrifuger pendant 20 min à 4000 rpm, en utilisant une centrifugeuse de model ROTOFIX 32A HETTICH (Germany) (Annexe 10). Au même temps, et à mesure 200µl de précultures des souches cible ont été mélanger avec 5mL d'une gélose molle « 0.7% d'agar » (Annexe 11), le mélange est ensuite coulé rapidement sur des boites contenant la gélose nutritive « GN » (Annexe 12).



**Figure 20 :** Centrifugation des enrichissements.

Les surnageants obtenus après centrifugation ont été filtrés ensuite par un filtre à seringue 0.45µm (Annexe 13), dont les pores peuvent retenir les cellules bactériennes et les débris cellulaire, et laissent passer les phages. Un spot est réalisé en déposant 10 µl du filtrat de chaque échantillon, la boîte de Pétri a été préalablement divisé en trois pour chaque échantillon. Puis, une incubation a été réalisée à 37°C pendant 24 heures.



**Figure 21 :** Détection des phages.

### 3. Isolement des phages

#### 3.1. Éluion et enrichissement des phages

On a passé par les mêmes étapes que la partie « 2.1 » une préculture a été préalablement préparée pour effectuer l'enrichissement, 1mL d'une culture pure jeune de 24h a été mis en contact avec 1mL de BNx10 dans des tubes à essais contenant 8mL de l'échantillon filtrés en avance pour éviter l'obtention des grosses molécules présentes dans les sites de prélèvement. L'incubation a été faite pendant 24h à 37°C.

### 3.2. Isolement des bactériophages

Pour cette technique, après l'incubation les enrichissements ont été centrifugés à 2000rpm pendant 20 min (centrifugeuse ROTOFIX 32, Germany). Le surnageant récupéré a été ensuite filtré par un microfiltre a seringue de 0.45µm, 100µl des filtrats a été mis en contact avec 5mL d'une gélose semi-molle et 200µl d'une culture bactérienne pure jeune de 24h.

Ce mélange a été homogénéisé avec précaution et couler rapidement sur une boite couler déjà par une GN pour former une mince couche supérieure. Après solidification, les boites retournées ont été incubées à 37°C pendant 24h.

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



Figure 22 : Isolement des phages.

### 4. Purification des bactériophages

La purification des bactériophages est réalisée selon la technique de Cappuccino & Welsh, (2017). Trois étapes d'éluion / repiquage sont effectuées afin d'assurer la pureté de souches phagiques isolées.

Les phages sont élués à partir des plages de lyses récupérées sur les boîtes d'isolement, pour cela, les plages de lyses sont découpées puis transférées dans du bouillon stérile, elles sont vortexées puis entreposées à 4°C pendant 24 heures. Les solutions de phages ainsi obtenus sont utilisées pour l'étape de purification.

Des dilutions décimales sont réalisées à partir des solutions de phages, puis un volume de 100 µl est étalé sur des boîtes de Petrie préalablementensemencé de la souche cible (ensemencement en masse). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

En présence de lyse bactérienne, les plages de lyse sont récupérées et deux autres étapes d'éluition repiquage sont réalisés. Les solutions de phages résultantes de la dernière étape d'éluition sont conservées à 4°C et considérée comme des solution stocks.

## **5. Conservation des phages**

Une partie des filtrats et des solutions de phages résultantes de la dernière étape d'éluition sont conservées à 4°C et considérée comme des solution stocks phagiques. Pour une conservation d'une durée plus longue les amplifia sont additionnés de glycérol à 50% puis conservés à -20°C.

# **CHAPITRE III**

## **RESULTATS**

---

## 1. Purification et vérification de la pureté des souches ATCC

### 1.1. Isolement et caractérisation des souches

Commençant par la souche *E. coli* : ATCC 25922

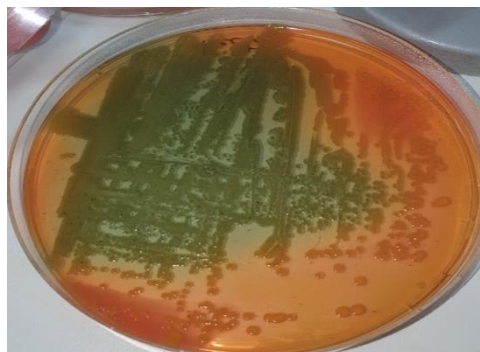
Les souches d'*E. coli* sont des bacilles à Gram négative aéro-anaérobies facultatives, oxydase négative, catalase positive mesurant de 2 à 4  $\mu\text{m}$  de longueur et d'un diamètre d'environ 0.4 à 0,6  $\mu\text{m}$ . C'est une bactérie fine et allongée à extrémité arrondie, mobile grâce à une ciliature péritriche, non halophiles et asporulés.

*Escherichia coli* (*E. coli*) est normalement présente parmi le microbiote intestinal de l'Homme et des animaux à sang chaud. Mais certaines souches de *E. coli* sont pathogènes, car elles ont acquis des facteurs de virulence. Sur la base des signes cliniques observés chez les malades, les souches de *E. coli* pathogènes sont regroupées en pathovars (ou pathotypes) parmi lesquels les EHEC.

Cependant, pour la souche *Staphylococcus aureus* : ATCC 25923 est une bactérie du genre : coques, Gram positifs, coagulase et catalase positives. Une vingtaine d'espèces de la famille des staphylocoques sont actuellement identifiées, dont l'espèce principale : *Staphylococcus aureus*, responsable de nombreuses infections humaines et animales.

#### 1.1.1. Les résultats obtenus après culture de la souche *E.coli* ATCC 25922 sur Héктоen :

La souche *E. coli* ATCC 25922 présente des colonies jaunes saumons sur la boîte due à l'acidification du milieu par fermentation de plusieurs sucres. Cet aspect est conforme avec l'aspect produit par les souches de *E. coli* sur ce milieu.



**Figure 23 :** Aspect de la souche *E. coli* ATCC 25922 sur le milieu Héктоen.

### **1.1.2. Les résultats obtenus après culture de la souche *E.coli* ATCC 25922 sur VRBL**

La souche *E.coli* ATCC 25922 présente des colonies rondes de couleur rouge pourpre, de 0,5 à 2 mm de diamètre entourées d'un halo rouge-pourpre pâle dû à la fermentation du lactose « lactose+ ». Cet aspect est conforme avec l'aspect produit par les souches de *E. coli* sur ce milieu.



**Figure 24 :** Aspect de la souche *E.coli* ATCC 25922 sur VRBL.

### **1.1.3. Les résultats obtenus après l'isolement du *S. aureus* sur le milieu Chapman**

La souche *S. aureus* ATCC 25923 produit sur milieu Chapman des colonies de taille moyenne de couleur jaune et qui s'entourent en 24 à 48 heures d'une auréole jaune, le virage du couleur du rouge de phénol vers le jaune due à l'acidification du milieu et fermentation du mannitol c'est-à-dire il s'agit d'une espèce à mannitol positive « mannitol+ ». Cet aspect est conforme avec l'aspect produit par les *S. aureus* sur milieu Chapman.

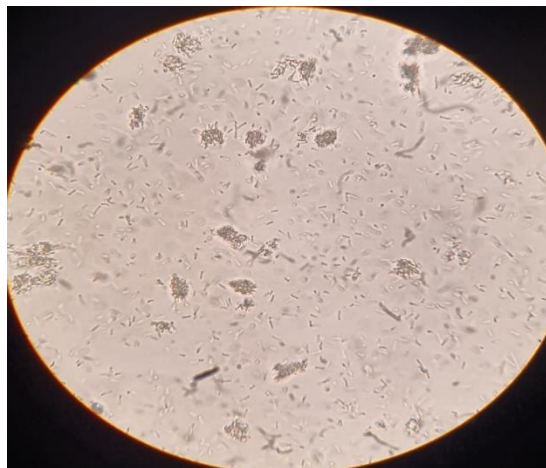


**Figure 25 :** Aspect de la souche *S. aureus* ATCC 25923 sur Chapman.

## **1.2. Examen microscopique**

### **1.2.1. Examen microscopique à l'état frais**

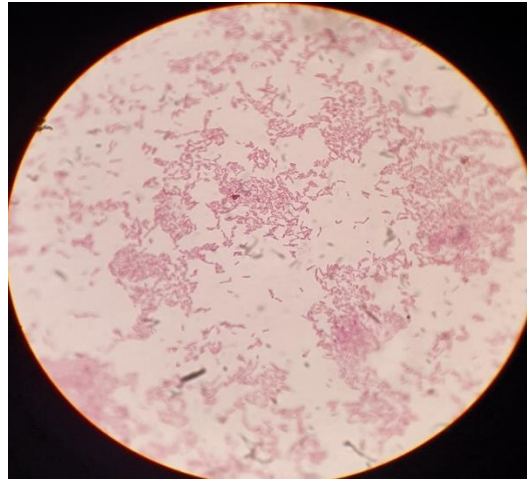
Les résultats de l'examen microscopique à l'état frais ont confirmé la mobilité d'*E.coli* en mouvement en zigzag due à sa ciliation péritriche.



**Figure 26 :** Observation microscopique de la souche *E.coli* ATCC 25922 à l'état frais.

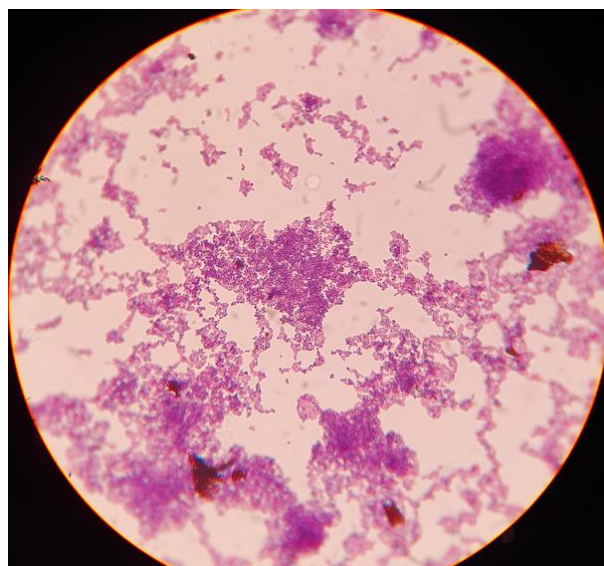
### **1.2.2. Coloration de Gram et observation microscopique**

Les résultats obtenus après coloration de Gram pour la souche *E.coli* ATCC 25922 montrent la présence de bacilles de taille moyenne avec une couleur rose claire, ces observations permettent la confirmation de l'aspect microscopique et le Gram négatif de la souche.



**Figure 27 :** Observation microscopique de la souche *E.coli* ATCC 25922 après coloration de Gram (Gx100).

L'observation microscopique de la souche *S. aureus* ATCC 25923 après coloration de Gram montre qu'elle est en forme de cocci à Gram positive « couleur mauve » disposé en Amas.



**Figure 28 :** Observation microscopique de la souche *S. aureus* ATCC 25923 après coloration de Gram (Gx100).

### 1.3. Test catalase

On a constaté un dégagement gazeux chez les deux souches purifiées. Alors c'est une preuve d'une production de l'enzyme catalase, donc les deux souches sont des catalases positives.



**Figure 29** : Résultats du test catalase pour les deux souches ATCC.

### 1.4. Identification des souches « confirmation de l'identité des souches » par Galerie API

Les résultats obtenus par la galerie API est représenté par la figure ci-dessous. L'identification de la souche est effectuée par le biais du logiciel identax. Il s'agit d'une *Escherichia coli* à 99%.

Le profile biochimique de la souche *E coli* ATCC 25922 sur galerie API 20E est illustré dans le **tableau 7** et la **figure 30** et le rapport d'identification est représenté dans la **figure 31**.



**Figure 30 :** Résultats de l'identification de la souche E.coli ATCC 25922 par Galerie API 20E.

**Tableau 7 :** Les caractères biochimiques d'Escherichia coli.

Test	GLU	LAC	H <sub>2</sub> S	GAZ	CS	ONPG	GEL	MAL	NIT	LDC	ODC	ADH	URE	TDA	IND	RM	VP	ESC
Résultat	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	+	+	-	-

[IDENTAX-TAXONOMICAL-IDENTIFIER-¶

Workspace-summary-¶

- Workspace-name:Workspace-2021/06/24-21:14:11 → → ¶
- Workspace-info:¶
- Reference-matrix-name:entdatv2¶
- Reference-matrix-info:¶
- Matrix-tests:29-(20-done) → Matrix-taxa:107¶

++++Realized-test-summary-¶:.....Saut de section (continu):.....

- 1:Motility-37°C-¶ → 11:VP-25°C-¶
- 2:MacConkey-¶ → 12:Indole-¶
- 3:Catalase-¶ → 13:Inositol-PWS-¶
- 4:Arginine-dihydrolase-¶ → 14:Lactose-PWS-¶
- 5:Lysine-decarboxylase-¶ → 15:Mannitol-PWS-¶
- 6:Ornithine-decarboxylase-¶ → 16:Rhamnose-PWS-¶
- 7:Urease-¶ → 17:Sorbitol-PWS-¶
- 8:H2S-¶ → 18:Sucrose-PWS-¶
- 9:Simmons-citrate-¶ → 19:Trehalose-PWS-¶
- 10:ONPG-¶ → 20:Xylose-PWS-¶:.....
- ¶

++++Identification-results-+++++-----¶

- Identification-OK-with-a-threshold-of-95,00%-¶
- Best-scored-taxon:Escherichia-coli → Score:99,33%¶

++++Other-taxa-scores-¶

+++++-----¶

- Escherichia-coli-(inactive):0,50%¶
- *Kluyvera cryocrescens*:0,08%¶
- *Leclercia adecarboxylata*:0,06%¶

++++Atypical-results-for-the-best-scored-taxa-+++++-----¶

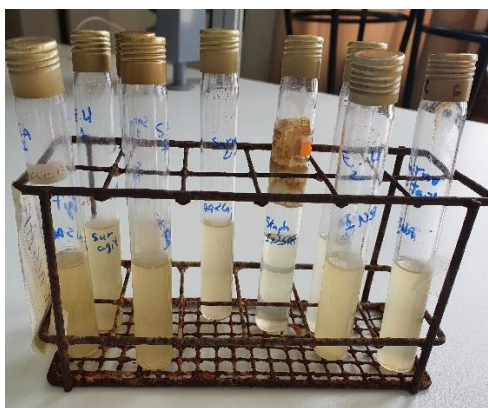
- Escherichia-coli-(inactive):Motility-37°C-id-expected-to-be--(5,00%)and-is-¶
- *Kluyvera cryocrescens*:Ornithine-decarboxylase-id-expected-to-be+(99,00%)and-is-¶
- *Leclercia adecarboxylata*:Lysine-decarboxylase-id-expected-to-be--(1,00%)and-is-¶
- *Leclercia adecarboxylata*:Sorbitol-PWS-id-expected-to-be--(1,00%)and-is-¶

Figure 31 : Résultats de l'identification par le logiciel identax.

## 2. Détection des bactériophages

### 2.1. Préparation des échantillons et enrichissement

Après enrichissement la totalité des tubes ont montrés un trouble (**Figure 33**). Ce trouble s'explique par le fait que la lyse virale n'induit que 10 % et 20 % de mortalité bactérienne.



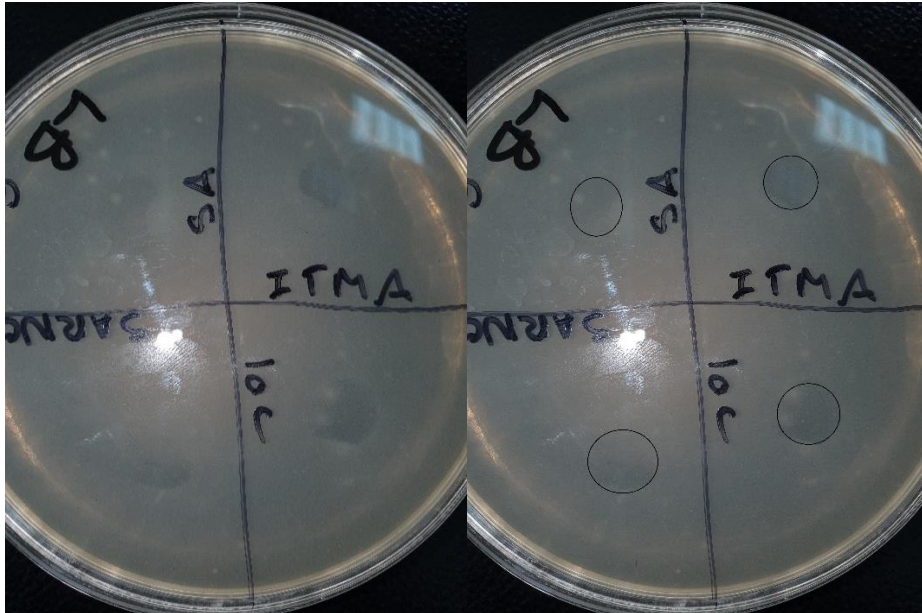
**Figure 32** : Résultats d'enrichissements.

### 2.2. Mise en évidence des phages

Les méthodes traditionnellement utilisées pour la détection s'appuient sur la technique de culture sur boîte (**Wilhelm et Poorvin, 2001**). Cette technique est souvent réalisée par un spot test, elle consiste à examiner la capacité d'un bactériophage à induire une lyse bactérienne visualisable via l'apparition des plages de lyse sur la culture d'une souches bactériennes donnée (**Carlson, 2005 ; Kutter, 2009**). Les petites gouttelettes du lysat/ filtrat de phages sont déposées sur un milieu de culture gélosé préalablementensemencé avec la souche bactérienne à tester. Parfois, différentes concentrations de lysat de phage sont utilisées, mais souvent une seule concentration est utilisée, extraite et appliquée directement à partir du lysat de la bactérie hôte utilisé en phase de pré-enrichissement (**Khan et Nilsson, 2015**).

Il est à noter que la technique ne permet la mise en évidence que des phages spécifiques à la bactérie indicatrice utilisé.

Au cours de cette étude, la technique de Spot a permis de constatés des plages de lyses (**Figure 34**), et par conséquence la présences de phages, dans le lieu de dépôt des filtrats des échantillons : « Sarno, SA, et TLM » pour *E.coli* et *S.aureus*.



**Figure 33 :** Résultats de la détection des phages.

### 3. Isolement des phages

#### 3.1. Elution et enrichissement

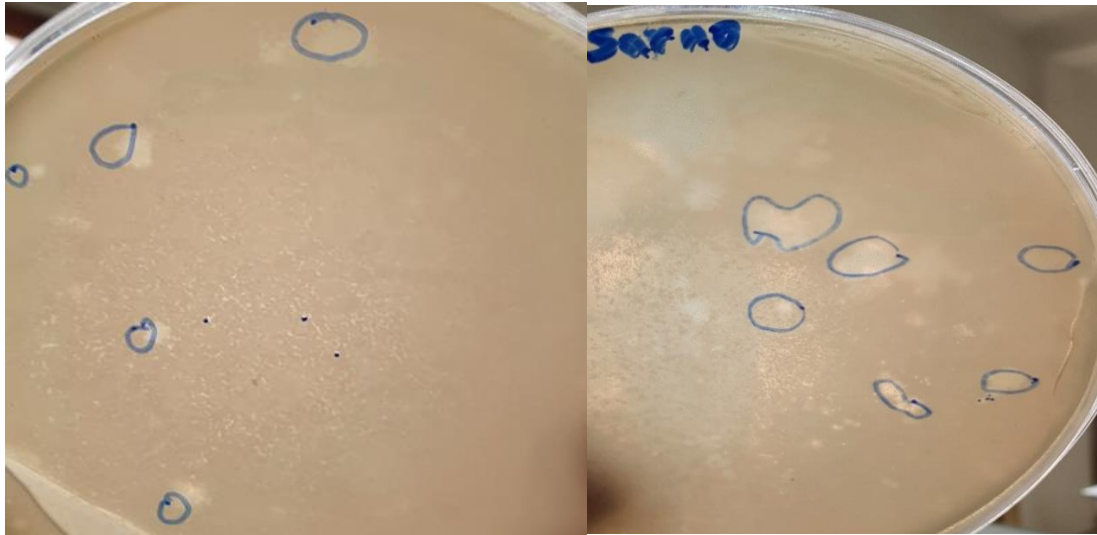
Un résultat identique de la partie « 2.1. Préparation des échantillons et enrichissement » ce qui a permis de constater la présence des troubles au niveau des tubes ensemencés.

#### 3.2. Isolement des bactériophages

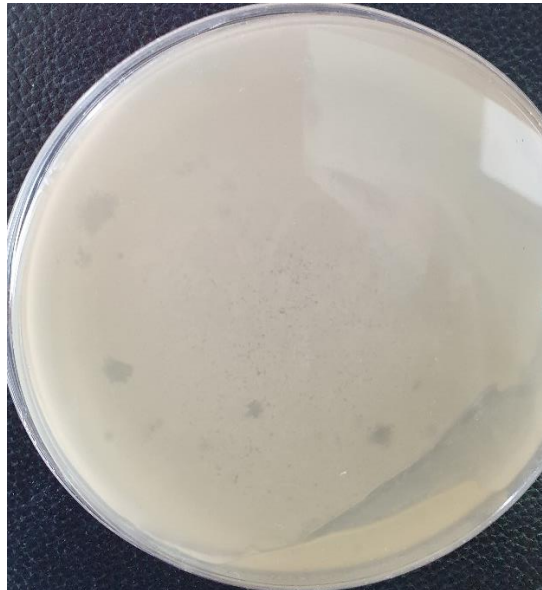
Après ensemencement et incubation la lecture des résultats (**Figures 33 et 34**) montrent la présence des plages de lyses sur les boîtes des différentes, ces plages sont de dimensions variées.

**Tableau 8.** Résultats de la présence et l'absence des phages pour les deux souches ATCC dans les trois échantillon « Sarno, SA,et TLM ».

Echantillons	E.coli	S.aureus
Sarno	+	+
SA	-	+
TLM	+	+



**Figure 34 :** Résultats d'isollements des coliphages à partir des échantillons de « Sarno et Tlm ».



**Figure 35 :** Résultat d'isolement des phages de S.aureus à partir de l'échantillon « Tlm ».

# **CHAPITRE IV**

## **DISCUSSION**

---

L'antibio-résistance est un grave problème de santé publique mondial, qui progresse extrêmement rapidement, et qui s'accélère depuis les années 2000. La résistance aux antibiotiques menace notre mode de vie actuel et compromet toutes les avancées que la médecine a effectuées depuis plus de 70 ans. La communauté scientifique se focalise actuellement sur le développement de nouveaux produits antimicrobiens pour lutter contre les souches multi-résistantes. De ces produits les phages représentent en effet un espoir immense face aux bactéries antibio-résistantes de plus en plus fréquentes. Ces agents constituent une alternatif biologique sûre, peu couteuses, facilement manipulable et durable.

Le but du présent mémoire est d'isolés les phages provenant de Barrage Sarno Wilaya de Sid Bel Abbes, Barrage Sidi Abdelli et Barrage El Mafrouche Wilaya de Tlemcen et d'étudier leurs effets antibactériens naturels sur deux souches *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* en s'appuyant sur la méthode de plage de lyse.

La première étape de cette étude a permis d'intégrer au sein du laboratoire de microbiologie appliquée de notre université (Université de Djilali Liabes à Sidi Bel Abbes) d'une collection d'échantillons qui probablement contiennent des phages. Puis la purification et l'authentification des souches ATCC (*E.coli* et *S.aureus*), gracieusement fournie par M<sup>elle</sup> BOUYAKOUB.

Il est à noter toutefois, que l'utilisation des deux souches *E.coli* et *S.aureus* fut un choix et que l'isolement des phages de ces souches est l'objectif du travail. On a choisi ces deux souches car elles sont de différents Gram c'est-à-dire «*E.coli* de Gram- et *S.aureus* de Gram+ » et l'isolement des bactériophages Anti-*S.aureus* est un moyen de lutte contre les infections nosocomiales. Concernant les phages Anti-*E.coli*, ils sont utilisés comme des agents dépolluants des eaux usées dans les stations d'épuration.

Les résultats de l'étude montrent la présence des phages dans 83% des échantillons (+). Les bactériophages sont très abondants dans le milieu aquatique, leur titre varie de  $10^4$  ml<sup>-1</sup> à plus de  $10^8$  ml<sup>-1</sup> (Bergh *et al.*, 1989). Les nombres sont généralement 3 à 10 fois plus élevés que les bactéries (Weinbauer, 2003). La relation avec le nombre et l'activité bactériennes implique que la majorité des virus aquatiques soit des phages.

Après les eaux usées, les eaux brutes constituent un échantillon de choix pour l'isolement des bactériophages, en particulier des coliphages. Les coliphages se trouvent en nombre significatif dans les eaux brutes. Ils ne présentent de variations saisonnières dans les sources de pollution ou eaux de surface (**Muniesa et al., 2012 ; Rezaeinejad et al., 2014**).

Les coliphages sont des bactériophages qui infectent *E. coli*. Le terme « coliphage », il en existe deux groupes : les coliphages somatiques et les coliphages F-spécifiques.

Les coliphages somatiques sont un groupe de bactériophages qui infectent *Escherichia coli* à travers la paroi cellulaire. Ils appartiennent aux Familles des *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* et *Microviridae* (**Rajala-Mustonen, et Heinonen-Tanski, 1994; Muniesa et al., 1999**).

Les bactériophages F -spécifiques, également connus sous le nom de coliphages sexuels ou bactériophages spécifiques aux mâles, infectent les bactéries par les pili sexuels, qui sont codés par le plasmide F. Selon la nature de leur matériel génétique on peut distinguer deux types de bactériophages F spécifiques : Les bactériophages F -spécifiques à ARN (contiennent une molécule d'ARN simple brin comme génome) et les bactériophages F -spécifiques à ADN (**Withey et al., 2005**).

Les coliphages sont détecté dans 100% des échantillons d'eaux brutes testés à travers le monde (**Mathlouthi, 2011 ; Jofre et al., 2016**). La teneur de ces échantillons en coliphages somatiques varie de  $5 \times 10^6$  à  $10^7$  PFU par 100 ml, pour des coliphage F-spécifiques, elle est comprise entre  $10^4$  et  $10^6$  PFU par 100 ml (**Grabow et al., 1993 ; Contreras-Coll et al., 2002 ; Lucena et al., 2003 ; Zhang et Farahbakhsh, 2007 ; Yahya et al., 2015**).

Pour les bactériophages de *S. aureus*, bien qu'ubiquitaire, ces microorganismes ne sont isolés que de 80% des échantillons des eaux usées (**Rasool et al., 2016**), leur nombre a été évalué à 38 PFU/ml dans les eaux de la rivière Ganga en inde (**Rai et Khairnar, 2021**).

L'isolement des bactériophages à partir des eaux usées et boue a été démontrée aussi par plusieurs auteurs (**Khan et al., 2002 ; Martineau. 2009 ; Synnoth et al., 2009**), ces auteurs ont utilisé les eaux usées provenant de la station municipale de traitement des eaux usées à Tokyo

pour le test de criblage des phages capables de lyser *Staphylococcus aureus*

L'isolement des bactériophages à partir des échantillons des milieux aquatiques « Sarno ; SA ; TLM » est parmi les nouveaux thème de recherches. Il constitue une des meilleures solutions qui nous permet de répondre de manière efficace et concrète aux menaces de l'antibio-résistance des bactéries, car leur utilisation en phagothérapie remplace le traitement par ATB.

Ajouter à cela, ces phages peuvent aussi être d'utilisés comme moyen de désinfection et de lutte contre les bactéries formatrices de biofilm.

Il est a noté que l'isolement des phages de *S.aureus* a été beaucoup plus facile avec des résultats positives pour tous les échantillons au cours de la saison pluviales. Probablement parce que les souches bactériennes y sont alors plus actives permettant la multiplication naturelle des bactériophages. Par contre pour les coliphages l'isolement a été un peu difficile pour l'échantillon d'eau «SA » peut être que ce dernier ne contient pas les phages spécifiques pour cette souche. Alors que les échantillons en provenance de «TLM et Sarno », ont donné des résultats positives. Ces dernières sont représentées par l'apparition des plages de lyses clairs de différentes dimensions. Les résultats obtenus témoignent de la diversité des phages isolés pour les deux souche cible. Car selon **Gallet *et al.*, (2011)**, les propriétés des plages de lyses dépendent des traits du phage. Le taux d'adsorption a un impact négatif sur la taille des plaques, le nombre des plaques et la concentration en phages de ces dernières. D'autre part, la taille de la plaque est à son maximum lorsque le temps de lyse est de longueur intermédiaire. De plus, les phages avec des virions de plus grande taille montrent des plaques d'une taille plus petite.

A partir de la troisième purification, aucune activité lytique n'a été observée. Cette absence de plage de lyse peut être expliquée par plusieurs interprétations.

- L'acquisition d'une résistance par les souches testées
- La conversion à la lysogénie des phages détectés, car les phages lytiques peuvent être transformés aux phages lysogéniques à cause des conditions défavorables ( $T_m$ °C élevée).

# CONCLUSION

---

## Conclusion et perspectives

L'étude de l'isolement des bactériophages à partir de certains écosystèmes aquatiques Algériens présente un intérêt particulier pour résoudre certains problèmes rencontrés dans différents secteurs tels que le secteur médical « phagothérapie », pharmaceutiques « comme vecteur, vaccin et médicaments », écologique « biomarqueurs, dépolluants des eaux usées », de la biologie moléculaire citons le lysotypage qu'est la détermination du type d'une souche bactérienne à l'aide de bactériophages. Car ces derniers sont peu coûteux à produire, rapide et respectueux de l'environnement par rapport aux méthodes récentes. Par exemple : dans les stations d'épuration.

Le but de notre mémoire est d'isolés les phages provenant de Barrage Sarno Wilaya de Sid Bel Abbes, Barrage Sidi Abdelli et Barrage El Mafrouche Wilaya de Tlemcen et d'étudier leurs effets antibactériens naturels sur deux souches *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* en s'appuyant sur la méthode de plage de lyse.

L'objectif tracer est atteint avec succès car en premier temps on a obtenu des résultats positives presque dans tous les échantillons et pour les deux souches. Le résultat apparaissait sous forme d'une zone claire « plage de lyse » ou zone de lyse sous l'action des phages. Par contre, l'absence des phages sur l'échantillon Sidi Abdelli mis en contact avec *E. coli* peut être expliquée par la présence des phages non lytiques et évidemment l'absence de lyse.

Des questions subsistent encore et de nouvelle perspective s'ouvrent afin de mieux comprendre l'effet antibactériens des phages isolés sur les souches ATCC. Des études approfondies doivent compléter ce modeste travail :

- Isolement des bactériophages à partir d'autres écosystèmes aquatiques
- Isolement des bactériophages à partir du sol
- L'étude de l'effet antibactériens d'autres souches mis à part *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.
- La caractérisation microscopique et génétique des phages isolés.

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

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

**Abrescia NG, Grimes JM, Kivelä HM, Assenberg R, Sutton GC, Butcher SJ, Bamford JK, Bamford DH, Stuart DI. (2008).** Insights into virus evolution and membrane biogenesis from the structure of the marine lipid-containing bacteriophage PM2. *Mol Cell* 31(5):749-61.

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

**Ackermann, H. W. and A. M. Kropinski (2007).** "Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes." *Res Microbiol* 158(7): 555-566.

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

**Ackermann, H. W. (2007).** "5500 Phages examined in the electron microscope." *Arch Virol* 152(2): 227-243.

**Adhya, S., Merril, C. R., & Biswas, B. (2014).** Therapeutic and prophylactic applications of bacteriophage components in modern medicine. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(1), a012518.

**Agirrezabala X, Martín-Benito J, Valle M, González JM, Valencia A, Valpuesta JM, Carrascosa JL. (2005).** Structure of the connector of bacteriophage T7 at 8Å resolution: structural homologies of a basic component of a DNA translocating machinery. *J Mol Biol* 347(5):895-902.

**Anonyme 1 :**

[https://www.bioutils.ch/system/pdf\\_documents/docs/000/000/094/original/20lesbacteriophagesNEW2017.pdf?1499334268](https://www.bioutils.ch/system/pdf_documents/docs/000/000/094/original/20lesbacteriophagesNEW2017.pdf?1499334268).

**Anonyme 2 :** <http://www.microbes-edu.org/etudiant/virus.html>.

**Anonyme 3 :** <https://parlonssciences.ca/ressources-pedagogiques/les-stim-en-contexte/phages-vs-antibiotiques>.

**Anonyme 4 :** <http://fdanieau.free.fr/cours/bts/A2/bcm/chapitre10/doc1.jpg>.

**Anonyme5** :[https://www.researchgate.net/publication/278631526\\_Studies\\_by\\_cryo-electron\\_microscopy\\_of\\_viruses\\_structures\\_phage\\_Gifsy\\_2\\_of\\_Salmonella\\_Typhimurium\\_and\\_phage\\_T5\\_of\\_Escherichia\\_Coli](https://www.researchgate.net/publication/278631526_Studies_by_cryo-electron_microscopy_of_viruses_structures_phage_Gifsy_2_of_Salmonella_Typhimurium_and_phage_T5_of_Escherichia_Coli).

**Anonyme 6** : <https://www.bioutils.ch/protocoles/20-les-bacteriophages>

**Anonyme 7** :

Bactériophages et phagothérapie : utilisation de virus naturels ...<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4665175>

**Anonyme8** :

<http://ao.um5.ac.ma/xmlui/bitstream/handle/123456789/14394/P0692009.pdf?sequence=1&isAllowed=y%20pour%20les%202%20dernier%20titre>

**Anonyme 9** : <https://microbiologie-clinique.com/Coloration-Gram.html>

**Appelt S, Fancello L, Le Bailly M, Raoult D, Drancourt M, Desnues C. (2014).** Viruses in a 14th-century coprolite. *Appl Environ Microbiol* 80(9):2648-2655.

**Arber W (1966).** Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli* 9. Host-controlled modification of bacteriophage fd. *J Mol Biol* 20:483–496.

**Atterbury, R. J., Connerton, P. L., Dodd, C. E., Rees, C. E., & 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., & Ahmadi, N. A. (2013).** Bacteriophage as a Novel Antibacterial Agent in Industry and Medicine. *Journal of Paramedical Sciences*, 4(4).

**Barr JJ, Auro R, Furlan M, Whiteson KL, Erb ML, Pogliano J, Stotland A, Wolkowicz R, Cutting AS, Doran KS, Salamon P, Youle M, Rohwer F. (2013).** Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(26):10771-10776.

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

**Born, Yannick, Bosshard, Lars, Duffy, Brion, et al., (2015).** Protection of *Erwinia amylovora* bacteriophage Y2 from UV-induced damage by natural compounds. *Bacteriophage* 5, e1074330. <https://doi.org/10.1080/21597081.2015.1074330>.

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

**Brüssow H, Hendrix RW. (2002).** Phage genomics: small is beautiful. *Cell* 108(1):13-16.

**Capparelli, M Parlato, G Borriello, P Salvatore and D. Iannelli (2007).** Experimental Phage 170 Etude de l'interaction Phage-Bactérie : Analyse fonctionnelle de l'adhésine gp38 des phages de Type T4 Therapy against *Staphylococcus aureus* in Mice. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Aug. 2007, p. 2765–2773 Vol. 51, No. 8.

**Cappuccino, J. G., & Welsh, C. T. (2017).** *Microbiology: A laboratory manual*. Pearson Education.

**Carminati A, Kerkour N, Landry C, Lopes Lourenço B, Meyer F. (2016).** Phagothérapie : une alternative à l'antibiothérapie ? *Rev Med Suisse* 12:1676-1677.

**Casjens, S. (2003).** Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol Microbiol* 49, 277-300.

**Caspar, D. L. and A. Klug, (1962).** Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 27: 1-24.

**Chamakura K, Young R. (2019).** Phage single-gene lysis: Finding the weak spot in the bacterial cell wall. *J Biol Chem* 294(10):3350-3358.

**Chauthaiwale, Vijay M., Therwath, A., Deshpandel, Vasanti V, (1992).** Bacteriophage lambda as a cloning vector. *Microbiol. Rev.* 56, 577–591.

**Clokic, M. R., A. D. Millard, A. V. Letarov and S. Heaphy (2011).** "Phages in nature." *Bacteriophage* 1(1): 31-45.

**Costanzo M et Pero J. (1983).** Structure of a *Bacillus subtilis* bacteriophage SPO1 gene encoding a RNA polymerase sigma factor. *Proc Natl Acad Sci* 80:1236-1240.

**Cunningham A.B., Lennox J.E., Ross R.J.** *Biofilm : The Hypertextbook* [en ligne] Site disponible sur :

<https://www.cs.montana.edu/webworks/projects/stevesbook/contents/chapters/chapter001/section003/green/page003.html> (Page consultée le 08/10/2016).

**Davis, B.M. and Waldor, M.K. (2003).** Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae*. *Curr Opin Microbiol*, 6, 35-42.

**Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garland RA, Russell DA, Ford K, Harris K, Gilmour KC, Soothill J, Jacobs-Sera D, Schooley RT, Hatfull GF, Spencer H. (2019).** Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med* 25(5):730-733.

Des virus pour combattre les infections, docteur Alain Dublanche, éd. Favre, 240 p., 2009.

**D'Hérelle F.** Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C R Acad Sci Paris* 1917 ; 165 : 373-5.

**D'Hérelle F.** Sur le rôle du microbe filtrant bactériophage dans la dysenterie bacillaire. *C R Acad Sci Paris* 1918 ; 167 : 970-2.

**D'Hérelle F.** Du rôle du microbe filtrant bactériophage dans la fièvre typhoïde. *C R Acad Sci Paris* 1919 ; 168 : 631-4.

**Dion MB, Oechslin F & Moineau S. (2020).** Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat Rev Microbiol* 18:125–138.

**Dublanche, A. (2009).** Des virus pour combattre les infections - la phagothérapie : renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques. Fabre.

**Dublanche, A. (2014).** "Qu'est-ce que la phagothérapie ?" HEGEL HEPatoGastroEntérologie Libérale.

**Dublanche, A. and O. Patey (2011).** "La phagothérapie : passé et avenir (faits nouveaux et procédure[s] pour une réhabilitation)." *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 26: 165–175.

**Duckworth DH (1976).** "Who discovered bacteriophage?". *Bacteriol Rev* 40:793–802.

**Duckworth DH. (1987).** History and basic properties of bacterial viruses. *Phage Ecology* 1-43. Edited by : Goyal SM, Gerba CP, Bitton G. New York, John Wiley & Sons.

**Duckworth, D. H., P. A. Gulig (2002).** "Bacteriophages: potential treatments for bacterial infections." *Biodrugs* 16(1): 57-62.

**Dufour, N. and L. Debarbieux (2017).** "[Phage therapy: a realistic weapon against multidrug resistant bacteria]." *Med Sci (Paris)* 33(4): 410-416.

**Dunne M, Rupf B, Tala M, Qabrati X, Ernst P, Shen Y, Sumrall E, Heeb L, Plückthun A, Loessner MJ, Kilcher S. (2019).** Reprogramming bacteriophage host range through structure-guided design of chimeric receptor binding proteins. *Cell Reports* 29(5):1336-1350.

**Dussoix, Daisy, Arber, Werner, (1962).** Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*H: II Control over acceptance of DNA from infecting phage lambda. *J. Mol. Biol.* 5, 37–49. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(62\)80059-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(62)80059-X).

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

**Elbreki, M., R. P. Ross, C. Hill, J. O'Mahony, O. McAuliffe and A. Coffey (2014).** "Bacteriophages and Their Derivatives as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment." *Journal of Viruses* 2014: 382539.

**Ellis EL, Delbrück M. The growth of bacteriophage. J Gen Physiol (1939) ; 22 : 365-84.**

Garnier F., Denis F. Phycobilisomes : structure and dynamics. *Annu. Rev. Microbiol.*,36 : 173-198.

**Fruciano. E. (2011).** La phagothérapie : émergence d'une idée controversée et logique d'un échec (1917-1949). L'Atelier du Centre de recherches historiques [En ligne], mis en ligne le 05 décembre2012. URL : <http://acrh.revues.org/4805> ; DOI : 10.4000/acrh.4805. Article. Consulté le 27 mars 2014.

**Gallet, R., Kannoly, S., & Wang, N. (2011).** Effects of bacteriophage traits on plaque formation. *BMC microbiology*, 11(1), 1-16.

**Gandham, P. (2015).** Bacteriophages: their use in the treatment of infections in the future. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 4(2), 897-879.

**Google Maps, (2021).** Disponible sur :

<https://www.google.com/maps/search/google+maps/@35.0864983,-3.1362382,8z/data=!3m1!4b1>

**Greenberg N & Rottem S. (1979).** Composition and molecular organization of lipids and proteins in the envelope of mycoplasma virus MVL2. *J Virol* 32:717–726.

**González-Huici V, Salas M, Hermoso JM. (2004).** The push-pull mechanism of bacteriophage Ø29 DNA injection. *Molecular Microbiology* 52(2):529–540.

**Hankin EH.** L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera. *Ann Inst Pasteur* 1896 ; 10 : 511-23.

**Hankin M.E., (1896).** The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes. *Ann. Inst. Pasteur* 10, 511:523. <https://doi.org/10.4161/bact.1.3.16736>.

**Hendrix, R.W. (2002).** Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor Popul Biol*, 61, 471-480.

**Hershey AD, and Chase M (1952).** Independent Functions of Viral Protein and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage. *J Gen Physiol* 36:39–56.

**Hurwitz BL, U'ren JM. (2016).** Viral metabolic reprogramming in marine ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 31:161–8.

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

**Jończyk, E., Klak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011).** The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia microbiologica*, 56(3), 191-200.

**Keen, E. C. (2015).** "A century of phage research: bacteriophages and the shaping of modern biology." *Bioessays* 37(1): 6-9.

**Kim MS & Bae JW. (2018).** Lysogeny is prevalent and widely distributed in the murine gut microbiota. *ISME J* 12:1127–1141.

**Kubista, Mikael, Andrade, José Manuel, Bengtsson, Martin, et al., (2006).** The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27, 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>.

**Kutter, E., A. Sulakvelidze (2005).** Bacteriophages Biology and applications. Boca Raton.

**Kutter E & Sulakvelidze A. (2005).** Bacteriophages : biology and applications. CRC Press. La Ragione RM, Narbad A, Gasson MJ, Woodward MJ. (2004) In vivo characterization of

*Lactobacillus johnsonii* FI9785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. *Lett Appl Microbiol* 38:197–205.

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

**Lemay SG, Panja D, & Molineux IJ. (2013).** Role of osmotic and hydrostatic pressures in bacteriophage genome ejection. *Physical review E: Statistical physics, plasmas, fluids, and related interdisciplinary topics* 87:22714.

**Lévesque C, Duplessis M, Labonté J, Labrie S, Fremaux C, Tremblay D, and Moineau S (2005).** Genomic Organization and Molecular Analysis of Virulent Bacteriophage 2972 Infecting an ExopolysaccharideProducing *Streptococcus thermophilus* Strain. *Appl Environ Microbiol* 71:4057 4068.

**Levy SB, and Marshall B (2004).** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10:S122–S129.

**Ling J, O'Donoghue P, Söll D. (2015).** Genetic code flexibility in microorganisms: novel mechanisms and impact on physiology. *Nat Rev Microbiol* 13(11):707-721.

**Luria SE, and Anderson TF (1942).** The Identification and Characterization of Bacteriophages with the Electron Microscope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 28:127–130.1.

**Lu, T. K., & Collins, J. J. (2007).** Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), 11197-11202.

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

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

**Marcó MB, Moineau S, Quiberoni A. (2012).** Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage* 2(3):149-158.

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

**Marvin DA. (1998).** Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr Opin Struct Biol* 8:150–158.

**Matsuzaki, S., Yasuda, M., Nishikawa, H., Kuroda, M., Ujihara, T., Shuin, T., Shen, Y., Jin, Z., Fujimoto, S., Nasimuzzaman, M. D., Wakiguchi, H., Sugihara, S., Sugiura, T., Koda, S., Muraoka, A. & Imai, S. (2003).** Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage phi MR11. *Journal of Infectious Diseases* 187, 613-624.

**McKenna R, Xia D, Willingmann P, Ilag LL, Krishnaswamy S, Rossmann MG, Olson NH, Baker TS, Incardona NL. (1992).** Atomic structure of single-stranded DNA bacteriophage phi X174 and its functional implications. *Nature* 355(6356):137-143.

**Merril CR, Scholl D, and Adhya SL (2003).** The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nat Rev Drug Discov* 2:489–497.

**Molineux IJ, Panja D. (2013).** Popping the cork: mechanisms of phage genome ejection. *Nat Rev Microbiol* 11:194–204.

**Monk, A. B., Rees, C. D., Barrow, P., Hagens, S., & Harper, D. R. (2010).** Bacteriophage applications : where are we now?. *Letters in applied microbiology*, 51(4), 363-369.

**Murphy, K.C., (2012).** Phage recombinases and their applications, in: *Advances in Virus*. pp. 367–414.

**Nature. Phage therapy gets revitalized, (2014).** [En ligne] Site disponible sur : <http://www.nature.com/news/phage-therapy-gets-revitalized-1.15348>. (Page visitée le 12/12/2014).

**Nechaev S, Severinov K. (2008).** The elusive object of desire--interactions of bacteriophages and their hosts. *Curr Opin Microbiol* 11(2):186-193.

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

**Ofir, G. and R. Sorek (2018).** "Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights." *Cell* 172(6): 1260-1270.

**Panja D & Molineux IJ. (2010).** Dynamics of bacteriophage genome ejection in vitro and in vivo. *Phys Biol* 7:045006.

**Pascal, John M., (2008).** DNA and RNA ligases : structural variations and shared mechanisms. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.12.008>.

**Peralta B, Gil-Carton D, Castaño-Díez D, Bertin A, Boulogne C, Oksanen HM, Bamford DH, Abrescia NG. (2013).** Mechanism of membranous tunnelling nanotube formation in viral genome delivery. *PLoS Biol* 11(9):e1001667.

**Pirisi, A. (2000).** "Phage therapy - advantages over antibiotics?" *The Lancet* 356 (October 21,2000): 1418.

**Prevelige PE Jr, Cortines JR. (2018).** Phage assembly and the special role of the portal protein. *Curr Opin Virol* 31:66-73.

**Prevelige PE, Fane BA. (2012).** Building the machines : scaffolding protein functions during bacteriophage morphogenesis. Rossmann MG, Rao VB (Eds.). *Viral Molecular Machines*, Springer US, 325-350.

**Prigent M, Leroy M, Confalonieri F, Dutertre M, DuBow MS. (2005).** A diversity of bacteriophage forms and genomes can be isolated from the surface sands of the Sahara Desert. *Extremophiles* 9(4):289-296.

**Proença, D., Leandro, C., Garcia, M., Pimentel, M., & 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.

**Rai, A., & Khairnar, K. (2021).** Characterization of a Bacteriophage Isolated from a River water against a Local Field Strain Multi-Drug Resistant *Staphylococcus Aureus*.

**Rao VB, Feiss M. (2015).** Mechanisms of DNA packaging by large double-stranded DNA viruses. *Annu Rev Virol* 2:351-378.

**Rasool, M. H., Yousaf, R., Siddique, A. B., Saqalein, M., & Khurshid, M. (2016).** Isolation, Characterization, and Antibacterial Activity of Bacteriophages Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pakistan. *Jundishapur journal of microbiology*, 9(10), e36135. <https://doi.org/10.5812/jjm.36135>

**Reardon S (2014).** Phage therapy gets revitalized. *Nature* 510:15–16.

**Reguieg K. (2014).** Etude de la qualité physico-chimique des eaux de barrage Sarno (Wilaya de Sidi Bel Abbes) et évaluation statistique. Mémoire Magister. Université Sidi Bel Abbes. Algérie.

**Rice, G., Tang, L., Stedman, K., Roberto, F., Spuhler, J., Gillitzer, E., Johnson, J.E., Douglas, T. and Young, M. (2004).** The structure of a thermophilic archaeal virus shows a double-stranded DNA viral capsid type that spans all domains of life. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 7716-7720.

**Rodie J., Legube B., Merlet N. (2009).** L'analyse de l'eau. 9<sup>ème</sup> édition. Duonod, Paris, 1597.

**Roshah. G, Karin. V, Kerstin. F, Lars. L. (1993).** The refined structure of bacteriophage MS2 at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*; 234(3);p 620-639.

**Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M., & Moineau, S. (2013).** Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), 675-687.

**Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, and Smith M (1977).** Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265:687–695.

**Schmelcher, M., D. M. Donovan and M. J. Loessner (2012).** "Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials." *Future Microbiol* 7(10): 1147-1171.

**Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, Barr JJ, Reed SL, Rohwer F, Benler S, Segall AM, Taplitz R, Smith DM, Kerr K, Kumaraswamy M, Nizet V, Lin L, McCauley MD, Strathdee SA, Benson CA, Pope RK, Leroux BM, Picel AC, Mateczun AJ, Cilwa KE, Regeimbal JM, Estrella LA, Wolfe DM, Henry MS, Quinones J, Salka S, Bishop-Lilly KA, Young R, Hamilton T. (2017).** Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 61(10):e00954-17.

**Sharp, R. (2001).** Bacteriophages: biology and history. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76, 667-672.

**Silva JB, Storms Z, Sauvageau D. (2016).** Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiology Letters* 363(4).

**Smeal SW, Schmitt MA, Pereira RR, Prasad A & Fisk JD. (2017).** Simulation of the M13 life cycle I: assembly of a genetically-structured deterministic chemical kinetic simulation. *Virology* 500:259–274.

**Smith, G.P., (1985).** Filamentous Fusion Phage: Novel expression vector that display cloned antigens on the virion surface. *Science* (80-. ). 228, 1315–1317.

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

**Sulakvelidze A, Alavidze Z, and Morris JG (2001).** Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 45:649–659.

**Summers WC. J Hist Biol (1993).** How bacteriophage came to be used by the phage group ; 26 : 255-67.

**Sun L, Young LN, Zhang X, Boudko SP, Fokine A, Zbornik E, Roznowski AP, Molineux IJ, Rossmann MG, Fane BA. (2014).** Icosahedral bacteriophage  $\Phi$ X174 forms a tail for DNA transport during infection. *Nature* 505(7483):432-435.

**Suttle CA. (2005).** Viruses in the sea. *Nature* 437:356–361.

**Tomat, D., Migliore, L., Aquili, V., Quiberoni, A., & Balagué, C. (2013).** Phage biocontrol of enteropathogenic and shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat products. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3.

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

**Trojet. S. (2011).** Étude de la reconnaissance Phage-Bactérie: Analyse fonctionnelle de l'adhésine gp38 des phages de la superfamille de Type T4. *Microbiologie et Génétique Moléculaire*. Université Toulouse III, 178;p 11-12-35.

**Twort FW. (1915).** An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet* 1915 ; 186 : 1241-3.

**Vandamme EJ (2014).** Phage therapy and phage control: to be revisited urgently!!: Phage therapy and phage control. *J Chem Technol Biotechnol* 89:329–333.

**Vidaver AK, Koski RK & Van Etten JL. (1973).** Bacteriophage  $\phi$ 6: a lipid-containing virus of *Pseudomonas phaseolicola*. *J Virol* 11:799–805.

**Volkin E, and Astrachan L (1956).** Phosphorus incorporation in Escherichia coli ribonucleic acid after infection with bacteriophage T2. *Virology* 2:149–161.

**Wang, I. N., D. L. Smith and R. Young (2000).** "Holins: the protein clocks of bacteriophage infections." *Annu Rev Microbiol* 54: 799-825.

**Wang C, Tu J, Liu J & Molineux IJ. (2019).** Structural dynamics of bacteriophage P22 infection initiation revealed by cryo-electron tomography. *Nat Microbiol* 4:1049– 1056.

**Wittebole, X., De Roock, S., & 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.

**Young R. (1992).** Bacteriophage lysis : mechanism and regulation. *Microbiol Rev* 56(3):430-481.

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

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

# ANNEXES

---

## Annexe 1

### ➤ **Bouillon nutritive**

✚ Milieu à préparer (pour 1L d'eau distillée)

Peptone ..... 5g

Extrait de viande .....3g

pH final à 25°C  $6,8 \pm 0,2$

## Annexe 2

### ➤ **Composition de Gélose Hektoen**

✚ Milieu à préparer (pour 1L d'eau distillée)

Protéose peptone .....12g

Extrait de levure .....3g

Chlorure de sodium .....5g

Thiosulfate de sodium .....5g

Sels biliaires .....9g

Citrate de fer ammoniacal .....1,5g

Salicine .....2g

Lactose .....12g

Saccharose .....12g

Fuchsine acide .....0,1g

Bleu de bromothymol .....0,065g

Agar .....14 g

pH final  $7,5 \pm 0,2$

### Annexe 3

#### ➤ Composition de Gélose VRBL

✚ Milieu à préparer (pour 1L d'eau distillée)

Peptone .....	7 g
Extrait de levure .....	3 g
Lactose .....	10 g
Chlorure de sodium .....	5 g
Mélange sel biliaire .....	1,5 g
Cristal violet .....	0,002 g
Rouge neutre .....	0,03 g
Agar .....	15 g
pH final 7,4 ± 0,2	

### Annexe 4

#### ➤ Composition Gélose Mac Conkey

✚ Milieu à préparer (pour 1L d'eau distillée)

Peptone .....	20 g
Sels biliaires n°3 .....	1 g
Cristal violet .....	0,001 g
Lactose .....	10 g
Rouge neutre .....	0,05 g
Chlorure de sodium .....	5 g
Agar .....	15 g
pH final 7,1	

## Annexe 5

### ➤ Composition gélose Chapman

✚ Milieu à préparer (pour 1L d'eau distillée)

Peptone .....10,0 g

Extrait de viande de bœuf .....1,0 g

Chlorure de sodium .....75,0 g

Mannitol .....10,0 g

Rouge de phénol .....0,025 g

Agar .....15,0 g

pH final  $\pm 7,5$

## Annexe 6

### ➤ Violet de gentiane phéniqué

Violet de gentiane .....10 g

Phénol .....20 g

Éthanol (95 °GL) .....100 ml

Eau distillée .....01 litre

## Annexe 7

### ➤ Solution iodée de Gram ou lugol

Iodure de potassium ..... 20 g

Iode métalloïde I<sub>2</sub> .....10 g

Eau 1 litre

## Annexe 8

### ➤ Solution de safranine

Safranine O .....25 g

Éthanol à 95 °GL .....100 ml

Solution aqueuse d'oxalate d'ammonium à 25 g/l .....800 ml

## Annexe 9

### ➤ Bouillon nutritive x10 « BN x10 »

BN dix fois concentré c'est un BN préparer pour 100mL d'eau distillé au lieu de 1000mL.

## Annexe 10

### ➤ Centrifugeuse « ROTOFIX 32A HETTICH (Germany) »



## Annexe 11

### ➤ Géllose molle (0.7% d'agar)

C'est-à-dire au lieu de préparer une géllose nutritive avec 15g d'agar, on prépare une géllose semi-molle avec 0.7% d'agar (0.7 d'agar dans un 100mL d'eau distillée)

## Annexe 12

### ➤ Géllose nutritive

✚ Milieu à préparer (pour 1L d'eau distillée)

Peptone .....5 g

Extraits de viande .....1 g

Extraits de levure .....2 g

Chlorure de sodium .....5 g

Agar .....15 g

pH final  $\pm 0.2$  7,4

## Annexe 13

### ➤ Filtre a seringue 0.4 $\mu$ m

