

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES



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

Mémoire

De fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master

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

Filière: Sciences biologiques

Spécialité: Biotechnologie microbienne

Thème :

Isolement de bactériophages à partir des eaux
usées d'Oued Mekerra

Présenté par : -Mlle BESSINI Djamila

- Mlle BOUFEDDANE Marwa

Soutenu le : 29/09/ 2020

Jury d'évaluation :

Président du jury : Dr. BININ. M A (MCA, UDL-SBA)

Examinatrice: Dr. KHALDI. A (MCB, UDL-SBA)

Encadreur : Dr. GHANEM. M (MCB, UDL-SBA)

*Année universitaire
2019 - 2020*

Remerciement

Nos premiers remerciements s'adressent à Dieu le tout puissant, qui nous a accordé la santé le courage et la volonté pour mener à bien notre travail.

Nous tenons à remercier vivement notre encadreur madame Ghanem Mimouna (Maitre de conférences à l'université DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES) d'avoir accepté de nous encadrer, nous la remercions pour toute sa gentillesse, sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'elle a consenti durant la réalisation de ce mémoire afin de nous diriger vers la bonne voie, sans oublier ses critiques bénéfiques pour nous diriger vers un esprit scientifique.

Nous remercions également les membres du jury qui nous ont fait

Un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail

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

A mes chers frères et sœurs.

*A ma confidente Mammene Ghanía pour son
encouragement et son soutien moral.*

*A toutes les personnes qui sont très chères à mon
cœur et mes amies avec lesquels j'ai partagé mes
moments de joie et de bonheur.*

Et à tous ceux qui m'aiment.

BESSINI Djamíla

Dédicace

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



A mes sœurs et mes frères

A toute ma famille

A tous mes amis sans citer les noms

Je dédie ce travail



BOUFEDDANE Marwa

Résumé

Les bactériophages sont des agents antibactériens omniprésents dans la biosphère, en quantité plus importante dans les boues et les eaux usées. La phagothérapie est l'utilisation de ces virus pour lutter contre les bactéries multi-résistantes.

Les objectifs de cette étude étaient de titrer et d'isoler des bactériophages à partir d'un échantillon d'eau d'oued Mekarra wilaya de sidi bel Abbes et de mettre en évidence leur effet antibactérien naturel sur les souches d'*Escherichia coli* (isolées de ce même site) en s'appuyant sur la méthode des plages de lyse.

Le protocole expérimental et les résultats prévus ont été analysés théoriquement à cause de l'avènement de la pandémie du Covid 19 :

- Les coliphages sont détectés dans 100% des échantillons d'eaux usées brutes testés à travers le monde.

-L'évaluation de la cinétique de réplication des phages montre que celle-ci dépend du phage, l'hôte et de l'environnement.

La phagothérapie est exploitée pour le traitement et la réduction des populations bactériennes par l'ajout des phages dans les eaux usées.

Mots clés: bactériophage, phagothérapie, Oued Mekarra, eaux usées, *Escherichia coli*, plages de lyse.

ملخص

العائيات هي فيروسات مضادة للبكتيريا موجودة في كل مكان على هذا الكوكب، بكمية أكبر في الحمأة ومياه الصرف. العلاج بالعائيات هو استخدام هذه الفيروسات لمحاربة البكتيريا متعددة المقاومة.

الهدف من هذه الدراسة هو معايرة وعزل العائيات من عينة ماء من وادي مكرة بولاية سيدي بلعباس وإثبات تأثيرها الطبيعي المضاد للبكتيريا على سلالات الإشريكية القولونية (المعزولة من نفس الموقع) باستخدام طريقة لويحة التحلل.

تم تحليل البروتوكول التجريبي والنتائج المتوقعة نظرياً بسبب ظهور وباء كوفيد 19 :

تم الكشف عن فيروسات السلالات الإشريكية القولونية في % 100 من عينات المياه المستعملة المختبرة في جميع انحاء العالم.

يوضح تقييم حركية تكرار الفيروسات البكتيرية الملتزمة أنها تعتمد على نوع هذه الفيروسات والمضيف والبيئة.

يستخدم العلاج بالعائيات للمعالجة وتقليل أعداد البكتيريا عن طريق إضافة العائيات إلى مياه الصرف الصحي

الكلمات المفتاحية: العائيات ، العلاج بالعائيات ، واد مكرة ، مياه الصرف ، الإشريكية القولونية ، مناطق التحلل .

Abstrat

Bacteriophages are antibacterial agents ubiquitous in the biosphere, in greater quantities in sludge and wastewater. Phage therapy is the use of these viruses to fight multi-resistant bacteria.

The objectives of this study were to titrate and isolate bacteriophages from a water sample from Wadi Mekarra wilaya of Sidi Bel Abbes and to demonstrate their natural antibacterial effect on strains of Escherichia coli (isolated of this same site) using the lysis plaque method.

The experimental protocol and the expected results were analyzed theoretically due to the advent of the Covide 19 pandemic:

- Coliphages are detected in 100% of raw wastewater samples tested worldwide.

-Evaluation of phage replication kinetics shows that it depends on the phage, the host and the environment.

Phage therapy is used for the treatment and reduction of bacterial populations by adding phages to wastewater.

Key words: bacteriophage, phage therapy, Oued Mekarra, wastewater, Escherichia coli, lysis areas.

- **ATB** : Antibiotique
- **ADN** : Acide Disoxiribonuclique
- **ADN db** : Phages à ADN double-brin
- **ADN sb** : Acide désoxyribonucléique simple brin
- **ARN**: Acide Ribonucléique
- **ARNm**: ARN messenger
- **API** : Appareils et Procédés d'Identification
- **BLBVB** : Bouillon lactosé bilié au vert brillant
- **CRISPR**: Clusters of Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
- **Covid-19**: Coronavirus disease 2019
- **DBO5** : Demande biologique en oxygène
- **DCO** : Demande chimique en oxygène
- **ICTV**: International Committee on Taxonomy of Viruses.
- **Km** : kilomètre
- **LB** : LuriaBertani
- **min** : minute
- **mL** : millilitre
- **MOI** : "multiplicity of infection"
- **NaCl** : Chlorure de sodium
- **nm**: nanomètre
- **OMS** : Organisation mondiale de la santé
- **PFU** : Plages Formant Unité
- **pH** : Potentiel Hydrogène
- **rpm** : Revolutions par minute (Tour par minute)
- **tf** : temps de fixation
- **UFC** : Unité Formant Colonie
- **UFP** : Unité Formant Colonie
- **UV** : Ultraviolet
- **UV** : Ultraviolet
- **URSS** : Union des républiques socialistes soviétiques
- **VP** : Voges-Proskauer
- **µg** : microgramme
- **µl** : microlitre
- **µm** : micromètre

| | |
|--|----|
| Figure 01 : Structure générale des bactériophages..... | 05 |
| Figure 02 : Principales familles de bactériophages..... | 07 |
| Figure 03 : Morphologie des 3 familles de <i>Caudovirales</i> | 08 |
| Figure 04 : Les phages T4 adsorbés à la surface d' <i>Escherichia coli</i> , vus au microscope électronique..... | 14 |
| Figure 05 : Schéma représentatif d'un cycle lysogénique..... | 18 |
| Figure 06 : Schéma du cycle lytique..... | 21 |
| Figure 07 : Articles consacrés au bactériophage et à la phagothérapie publiés dans les revues internationales entre 1967 et 2011..... | 25 |
| Figure 08 : Le phénomène de « Synergie Phages-Antibiotiques »..... | 26 |
| Figure 09 : Localisation du site d'échantillonnage..... | 34 |
| Figure 10 : Lieu de prélèvement de la boue mixte au niveau d'Oued Mekerra..... | 35 |
| Figure 11 : Détermination du type respiratoire..... | 37 |
| Figure 12 : Fiche de lecture pour la galerie API 20 ^E | 39 |
| Figure 13 : Système de filtration (Wheaton, SA)..... | 41 |
| Figure 14 : La technique de spot..... | 41 |
| Figure 15 : Aspect de la croissance des coliformes en milieu BLBVB..... | 46 |
| Figure 16 : Aspect des résultats du test de production d'indole sur eau peptonée..... | 47 |
| Figure 17 : Aspect des colonies de <i>E coli</i> sur milieu EMB..... | 47 |
| Figure 18 : Aspect de <i>E coli</i> en coloration de Gram..... | 48 |
| Figure 19 : Exemple des résultats des tests pour la recherche de catalase..... | 48 |
| Figure 20 : Exemple des résultats des tests pour la recherche du type respiratoire..... | 49 |
| Figure 21 : Outils informatique d'identification bactérienne | 50 |
| Figure 22 : Exemple de galerie Api20, appliquée sur <i>E coli</i> | 51 |

Figure 23 : Titration des bactériophages..... 52

Figure 24 : Exemple de résultats du spot test pour l'isolement des bactériophages..... 53

Figure 25 : Exemple de résultats d'une cinétique d'adsorption des coliphages..... 55

Figure 26 : Variation du taux de réplication maximum en fonction du MOI et de la souche phagique..... 57

| | |
|--|----|
| Tableau 01 : Principales familles des virus bactériens..... | 09 |
| Tableau 02: Les avantages et les inconvénients de la thérapie phagique et de l'antibiothérapie..... | 28 |
| Tableau 03 : Lecture de la galerie miniaturisée API20E..... | 39 |
| Tableau 04 : Tableau d'identification du catalogue analytique API 20 ^E | 50 |
| Tableau 05 : Les caractères biochimiques d' <i>Escherichia coli</i> | 50 |

Sommaire**Liste des abréviations****Liste des figures****Liste des tableaux****Sommaire**

| | |
|--|----|
| Introduction | 01 |
| Revue bibliographique | |
| 1. La biologie des bactériophages | 03 |
| 1.1. Définition..... | 03 |
| 1.2. Historique..... | 03 |
| 1.3. Structure et morphologie des bactériophages..... | 04 |
| 1.4. Classification..... | 06 |
| 1.5. Habitat..... | 10 |
| 1.6. Stabilité des bactériophages face aux conditions physico-chimiques du milieu..... | 11 |
| 1.7. Relation phage/cellule hôte..... | 13 |
| 1.8. La compétition entre parasites pour un même hôte..... | 14 |
| 1.9. Les mécanismes de défense de la cellule hôte et la réponse du phage..... | 14 |
| 1.9.1. Prévention de l'adsorption..... | 15 |
| 1.9.2. L'antirestriction..... | 15 |
| 1.9.3. Système CRISPR..... | 15 |
| 1.10. Types d'invasion de la cellule bactérienne..... | 16 |
| 1.10.1. Principe du cycle chronique (phages filamenteux)..... | 17 |
| 1.10.2. Principe du cycle lysogénique (phages tempérés)..... | 17 |
| 1.10.3. Principe et étapes du cycle lytique (phages virulents)..... | 18 |
| 2. La phagothérapie | |
| 2.1. Définition..... | 22 |
| 2.2. Historique..... | 23 |
| 3-Relation phage –antibiotique..... | 25 |
| 4- Les avantages et les inconvénients de la thérapie phagique et de l'antibiothérapie..... | 27 |
| 5- Domaines d'utilisation de la phagothérapie..... | 29 |
| 2.5.1. Utilisation en médecine..... | 30 |
| 2.5.2. Utilisation en vétérinaires..... | 30 |
| 2.5.3. Utilisation en génie génétique..... | 30 |
| 2.5.4. Utilisation de l'enzyme lytique comme agent thérapeutique..... | 31 |

| | |
|--|----|
| 2.5.5. Utilisation en agro-alimentaire | 31 |
| 2.5.6. Utilisation dans le traitement des infections à biofilm | 32 |
| 2.5.7. Utilisation pour désinfection des surfaces inertes | 32 |
| 2.5.8. Utilisation des bactériophages pour une décontamination sélective..... | 33 |
| Matériel et Méthodes | |
| 1. Objectif | 34 |
| 2. Matériel | 34 |
| 2.1. Isolats bactériens..... | 34 |
| 2.1. Isolats phagiques..... | 34 |
| 3. Méthodes..... ; | 35 |
| 3.1. Prélèvement des échantillons..... | 35 |
| 3.2. Isolement et identification des souches d' <i>E coli</i> | 35 |
| 3.2.1. Purification..... | 36 |
| 3.2.2. Conservation des isolats..... | 36 |
| 3.2.3. Identification des isolats..... | 36 |
| 3.2.3.1. Examen macroscopique..... | 36 |
| 3.2.3.2. Examen microscopique..... | 36 |
| 3.2.3.2.1. Observation vitale..... | 36 |
| 3.2.3.2.2. Technique de Coloration de Gram..... | 37 |
| 3.2.3.3. Mise en évidence du type respiratoire | 37 |
| 3.2.3.4. Identification biochimique..... | 38 |
| 3.3. Isolement et caractérisation des bactériophages d' <i>E coli</i> | 40 |
| 3.3.1. Titration des phages..... | 40 |
| 3.3.2. Isolement des bactériophages..... | 40 |
| 3.3.3. Purification des bactériophages..... | 42 |
| 3.3.4. Conservation des phages..... | 42 |
| 3.3.5. Cinétique de la réplication des phages..... | 42 |
| 3.3.6. Amplification des phages..... | 43 |
| 3.3.7. Stabilité des phages..... | 43 |
| Résultats et discussion | |
| 1. Site d'échantillon et de la souche cible..... | 44 |
| 2. Isolement et identification des souches d' <i>E coli</i> | 46 |
| 2.1. Identification biochimique..... | 49 |
| 3. Isolement et caractérisation des bactériophages d' <i>E coli</i> "coliphage"..... | 51 |
| 3.1. Titration des phages..... | 51 |

.....

| | |
|--|-----------|
| 3.2. Isolement des coliphages..... | 53 |
| 3.4. Cinétique de la réplication des phages..... | 54 |
| 3.5. Stabilité des phages..... | 57 |
| Conclusion et Perspectives | 59 |
| Références bibliographiques | 60 |
| Annexes..... | 73 |



INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les virus constituent des entités biologiques distinctes. Les êtres humains ont subi les maladies virales dans une grande partie de leur histoire, mais ont également manipulé ces agents en fonction de leur propres besoins (**Flint et al., 2000**). Au fil du temps, l'évolution des techniques et des connaissances et la découverte du microscope électronique ont permis la résolution des énigmes autour des virus et beaucoup d'informations ont été révélées à leur sujet. La caractéristique fondamentale de ces agents transmissibles est leur dépendance absolue vis-à-vis leurs hôtes pour la multiplication, ils sont à juste titre connus comme des parasites intracellulaires obligatoires.

En 1917, les bactériophages (ou phages) ont été reconnus comme des virus qui infectent les bactéries (littéralement : mangeurs de bactéries), ils reconnaissent, parasitent et tuent spécifiquement, pour la plupart d'entre eux, et pour chaque phage au moins une bactérie.

Ces virus sont omniprésents dans la biosphère et constituent l'entité biologique la plus nombreuse de la planète (**Wommack et Colwell, 2000**), ils peuvent être isolés à partir du sol, l'eau de mer, l'eau douce et des écosystèmes des eaux usées. En revanche, les phages sont incapables d'infecter les cellules végétales ou animales.

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

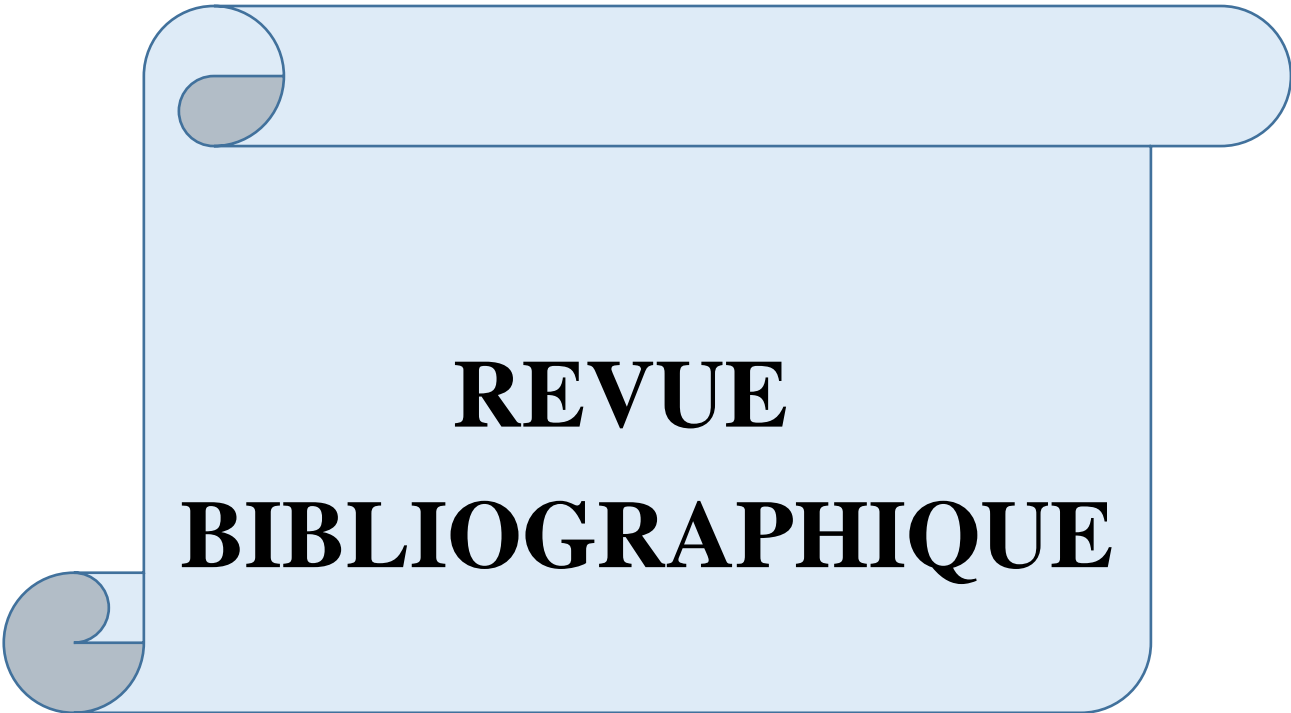
Puisque les phages sont des virus facilement manipulables, leur usage potentiel pour des applications biotechnologiques et thérapeutiques a fait l'objet de nombreux travaux de recherche. Ceux-ci incluent le contrôle des pathogènes en tant que conservateurs alimentaires (**Coffey et al., 2010**), le traitement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

La spécificité d'hôte des virus offre une technologie attrayante pour la lutte contre les infections causées par les 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 en utilisant cette technologie pour traiter les infections des animaux d'élevage, les plantes, les poissons d'aqua-culture et les humains (**Sulakvelidze et Kutter, 2005**).

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

La présente recherche constitue, très probablement, une première au niveau de notre département car aucune recherche ne semble être déjà réalisée sur les bactériophages, une thématique qui mérite des investigations et des recherches approfondies vu l'importance de ces virus comme agent antimicrobien et la place de la phagothérapie dans l'enjeu de lutte contre les souches bactériennes multi-résistantes.

Les objectifs de cette étude sont d'isoler des bactériophages à partir d'un échantillon d'eau usée d'Oued Mekerra willaya de Sidi Bel Abbas et de mettre en évidence leur effet antibactérien naturel sur les souches d'*Escherichia coli* en s'appuyant sur la méthode des plages de lyse, ainsi que de titrer ces phages présents dans notre échantillon d'eau.



**REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE**

1. La Biologie des bactériophages

1.1. Définition

Un bactériophage (ou phage; du grec *phagein*, signifiant « manger ») est un virus n'infectant que la cellule bactérienne (**Madigan et Martinko, 2007**). Chaque bactérie est l'hôte d'un phage donné, mais elle peut être infectée par différents phages qui lui sont alors tous spécifiques (**Bousseboua, 2003**).

Les bactériophages sont présents partout sur la planète et sont reconnus comme étant l'entité vivante la plus abondante sur Terre avec un nombre estimé à 10^{30} (**Sulakvelidze, 2005**). Selon (**Jończyk, 2011**) ces virus seraient dix fois plus nombreux que les bactéries. Les bactériophages comme tous les virus, sont des parasites absolus ; même s'ils possèdent toute l'information pour diriger leur reproduction dans un hôte spécifique, ils n'ont pas de machinerie pour générer de l'énergie, ni de ribosomes pour produire des protéines. Leur multiplication dépend donc entièrement de la présence de leur hôte bactérien (**Kutter et al., 2005**).

1.2. Historique

Les bactériophages ont été révélés par le bactériologiste anglais **Frederick Twort, 1915** qui décrit la transformation vitreuse de certaines colonies de Microcoques, la maladie pouvant être transmise par simple contact de colonie à colonie. Presque simultanément, le biologiste canadien **Félix d'Hérelle, 1917**, à l'institut Pasteur de Paris, découvre dans les selles de convalescents de dysenteries, un agent infectieux de même type, capable de détruire spécifiquement des cultures de *Shigella dysenterie*. D'Hérelle a proposé que l'agent responsable de cette lyse transmissible soit appelé bactériophage (**Leclerc et al., 1995**).

La première application des phages pour traiter des maladies infectieuses remonte à 1921 par Bruynogues et Maisin qui les ont utilisés avec succès pour traiter des maladies de peau dues au *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**).

Cependant, l'enthousiasme de départ pour les bactériophages a vite été remplacé par un scepticisme critique suite à des rapports négatifs sur l'inactivité de certaines préparations commerciales ainsi que la mort de patients traités (**Kutter et al., 2005; Duckworth et al., 2002**). Les résultats mitigés de la thérapie phagique, l'usage inapproprié des phages, le manque de connaissances sur la nature des bactériophages, le manque de standards de pureté et les études incontrôlées ont fait, qu'avec la découverte des antibiotiques et l'éclatement de la deuxième guerre mondiale, la phagothérapie a été abandonnée dans les pays occidentaux. Toutefois, les phages ont toujours continué à être utilisés comme agents thérapeutiques avec succès en Europe de l'Est et dans l'ex-Union soviétique.

Aujourd'hui, le taux alarmant de bactéries résistantes aux antibiotiques, combiné au fait que les nouvelles classes d'antibiotiques pour les affronter se font plus rares, imposent l'adoption d'autres alternatives, d'où un regain d'intérêt pour les bactériophages (**Sulakvelidze et al., 2001**).

1.3. Structure et morphologie des bactériophages

Les bactériophages sont de taille beaucoup plus petite que les bactéries, en générale leur taille varie de 20 à 300 nm (**Madigan et Martinko, 2007**). La structure des virus varie selon les familles auxquelles ils appartiennent. Ils sont structurellement composés des éléments suivants (**Figure 01**) :

- **Un génome** : le matériel génétique (ADN ou ARN). Pour plus de 95 % des phages connus, ce matériel est une molécule d'ADN double-brin d'une taille de 5 à 650 kpb et leur taille varie de 24 à 200 nm (**Anonyme 1**). L'acide nucléique du bactériophage est très fortement replié à l'intérieur de la capsid.
- **Une capsid**: c'est une boîte protéique qui entoure l'acide nucléique et résiste aux enzymes protéolytiques. Elle est constituée par l'assemblage, par répétition, d'une ou quelques molécules protéiques appelés unités de structure (US). Ce polymère de nature protéique permet de protéger le génome.

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

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

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

Cependant, ce ne sont pas tous les phages qui possèdent une queue attachée à leur capsidie, permettant le passage de l'acide nucléique durant l'infection. La queue peut être entourée d'une gaine de myéline comme le phage T4. Certains phages possèdent aussi des structures terminales d'adsorption à la cellule bactérienne (crampons, fibres). (**Murray et al., 1998; Kutter et al., 2005**).

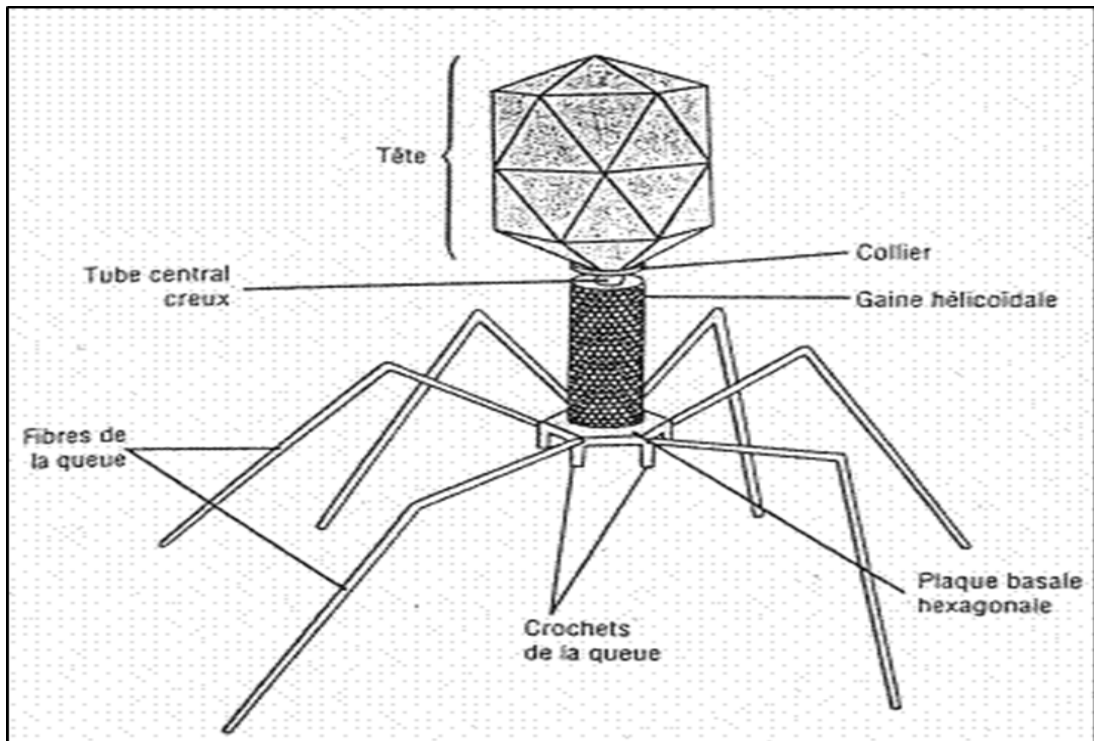


Figure 01: Structure générale des bactériophages (**Anonyme1**).

1.4. Classification

« International Committee on Taxonomy of Viruses », ou ICTV est un comité établi depuis 1966, dont la mission principale est d'établir et de mettre à jour le système de classification et de nomenclature virale à l'échelle internationale. La classification virale repose sur des critères physico-chimiques : la nature du génome (ADN ou ARN, simple ou double brin), la présence ou l'absence d'une enveloppe, la symétrie et les particularités de la capsid (Figure 02).

L'ordre des *Caudovirales* (phages d'ADN double brins de 5 à 650 kpb à queue avec une capsid) contient plus de 95 % des bactériophages qui ont été décrits (Kutter *et al.*, 2005). Trois familles découlent des *Caudovirales* et sont définies par le type de fibre caudale (fibres formant la queue) présente sur le phage (Figure 03). Soixante pour cent des phages sont des *Siphoviridae* et possèdent une longue queue flexible, 25 % sont des *Myoviridae* avec une queue contractile et 15 % sont des *Podoviridae* et possèdent une courte queue (Sharp, 2001).

Les 5% des phages n'appartenant pas à l'ordre des *Caudovirales* présentent une structure à symétrie non binaire qui peut être soit cubique, soit hélicoïdale soit complexe (Tableau 01).

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

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

L'ICTV a donc établi 1 ordre, 18 familles, 3 sous-familles et 51 genres pour classer la majorité des diverses espèces de virus bactériens connus à ce jour (Trojet, 2011) (Tableau 01).

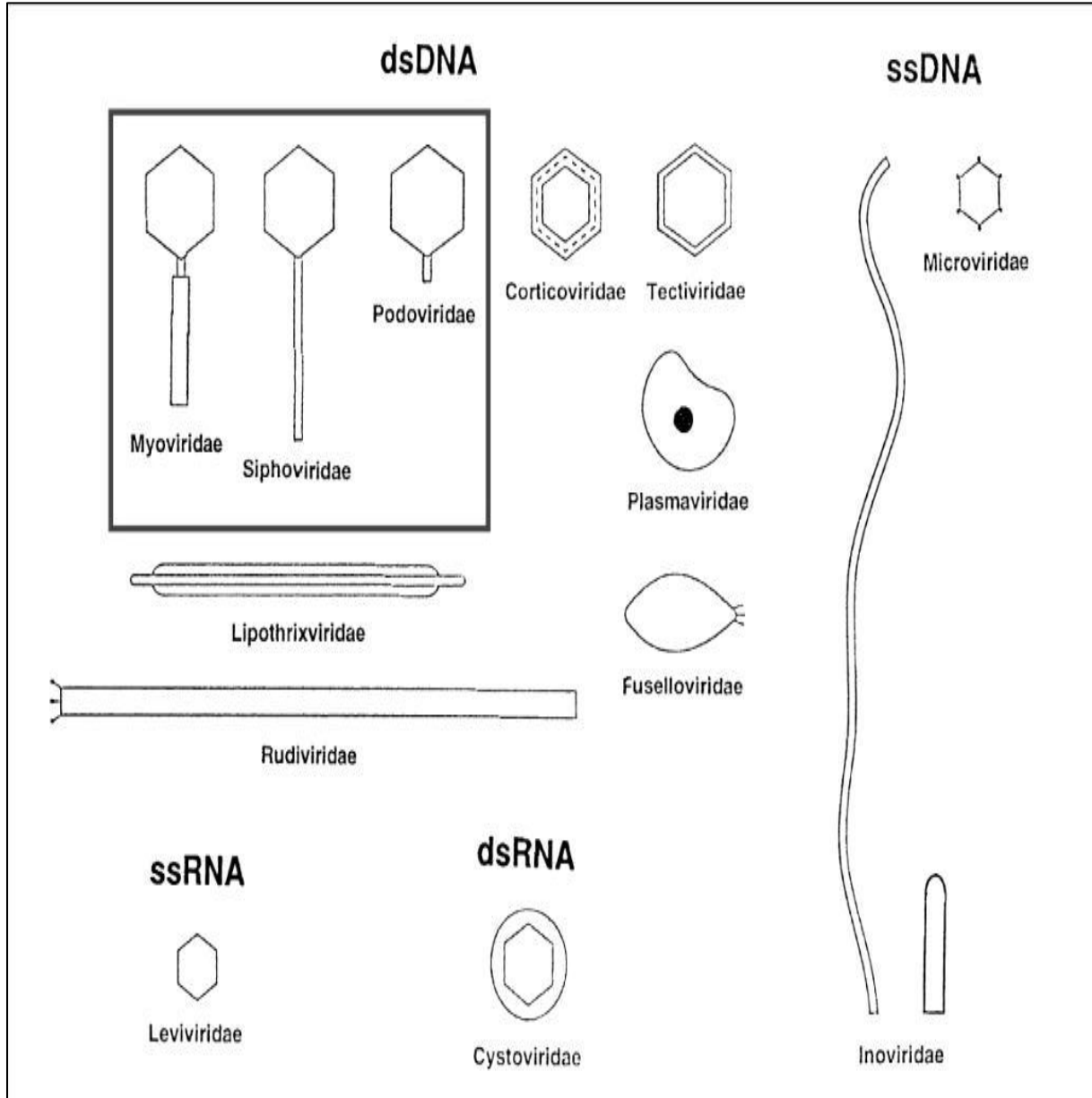


Figure 02 : Principales familles de bactériophages, **d'après Ackermann (2003).**

(**ADNs_b** : phages à ADN simple-brin ; **ADN_{db}** : phages à ADN double-brin ; **ARN_b** : phages à ARN simple-brin ; **ARN_{db}** : phages à ARN double-brin).

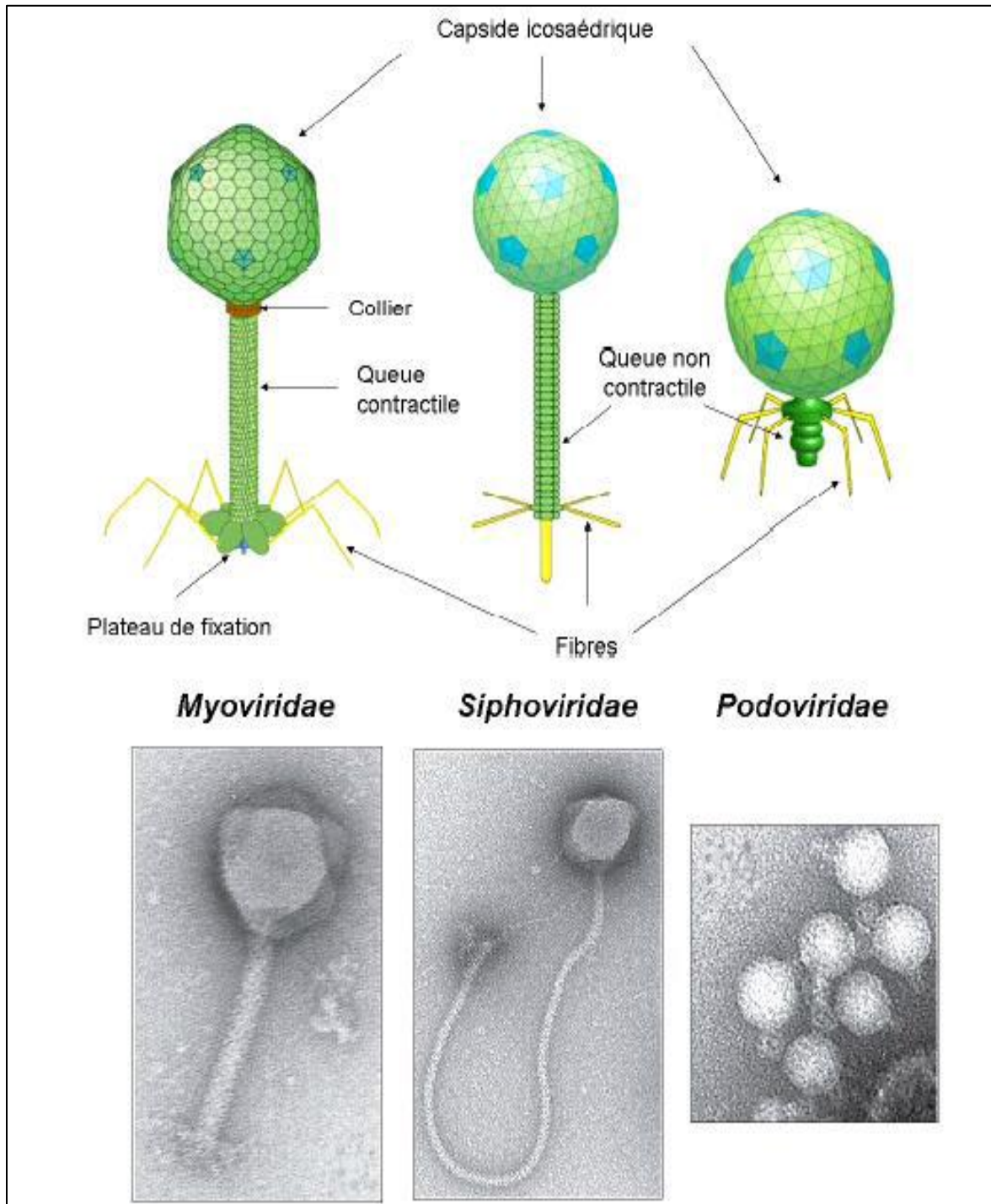
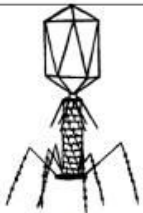

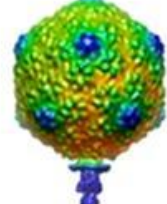
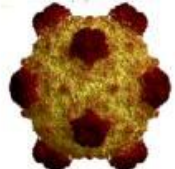

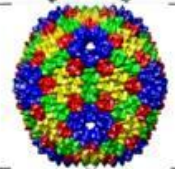
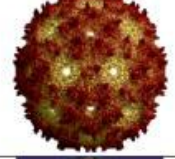
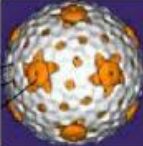







Figure 03 : Morphologie des 3 familles de *Caudovirales* (Clokie *et al.*, 2011).

Haut : Morphologie schématique adaptée.

Bas : Morphologie observée en microscopie électronique.

Tableau 01: Principales familles des virus bactériens, d'après, **Ackermann (2007)**.

| Forme | Acide nucléique | Famille | Nombre de genres/espèces | Caractéristiques | Exemples | Morphologie |
|---|----------------------------|-----------------------|--------------------------|---|---------------------|---|
| Phages caudés, capsidie icosaédrique (Ordre des Caudovirales) | ADN double brin linéaire | <i>Myoviridae</i> | 6/1320 | Queue contractile | T4 |  |
| | | <i>Siphoviridae</i> | 7/3229 | Queue longue non contractile | λ, T5, HK97, SPP1 |  |
| | | <i>Podoviridae</i> | 4/771 | Queue courte | T7, φ29, P22/L, sf6 |  |
| Polyédrique | ADN simple brin circulaire | <i>Microviridae</i> | 4/40 | Capsomères visibles, petite capsidie non enveloppée | φx174 |  |
| | ADN double brin circulaire | <i>Corticoviridae</i> | 1/3 | Capsidie contenant plusieurs couches lipidiques | PM2 |  |
| | ADN double brin linéaire | <i>Tectiviridae</i> | 1/19 | Couche intérieure lipidique | PRD1 |  |
| | ARN simple brin linéaire | <i>Leviviridae</i> | 2/39 | Très petits génomes | Ms2 |  |
| | ARN double brin linéaire | <i>Cystoviridae</i> | 1/3 | Enveloppe lipidique | 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 capsid, habitat : sources chaudes | SSV1 |  |
| | | <i>Plasmaviridae</i> | 1/5 | Pas de capsid | |  |

Les exemples de structures sont tirés de: **phage T5 (Effantin *et al.*, 2006)** ; **T7 (Agirrezabala *et al.*, 2007)** ; **φx174 (Mckenna *et al.*, 1992)** ; **PM2 (Abrescia *et al.*, 2008)** ; **PRD1 (Abrescia *et al.*, 2004)** ; **Ms2 (Roshah *et al.*, 1993)**; **phage TTV1 (Zillig *et al.*, 1986)** ; **SIRV-1 (Zillig *et al.*, 1998)**.

1.5. Habitat

Les bactériophages sont considérés comme étant plus nombreux dans la biosphère que n'importe quel autre groupe d'organismes, procaryotes inclus. Ils sont présents dans tous les types d'écosystèmes. (Wommack et Colwell, 2000). Dans un milieu donné, leur nombre est en général dix, voire cent fois plus élevé que les bactéries présentes (Dublanche et Patey, 2011). Des bactériophages dirigés contre les archaebactéries ont également été identifiés (Skurnik et Strauch, 2006).

Ce sont les prédateurs naturels des bactéries qu'on peut les rencontrer dans différents environnements naturels : sur le sol, dans les eaux salées ou douces, sur les surfaces cutanées et muqueuses des êtres vivants (et entre autres dans l'appareil digestif), ...ou plus généralement dans tous les environnements comportant des bactéries.

Ces virus particuliers participent activement à l'évolution des écosystèmes, en détruisant une partie des bactéries, engendrant ainsi un renouvellement de la biomasse bactérienne, ou en interagissant avec les bactéries de telle sorte que des échanges de gènes entre bactéries aient lieu. On estime qu'en règle générale, les bactériophages réduisent la population bactérienne globale de près de la moitié toutes les 48 heures (**Gilmore 2012 ; Jacquet 2007**).

Les études datant d'une trentaine d'années parlent d'une population de bactériophages de l'ordre de 10^7 par millilitre dans les milieux marins (le milieu aquatique contenant la plus grande quantité de phages étant les eaux usées). On peut trouver en particulier une grande quantité de phages dans les sédiments marins, que l'on estime actuellement à 10^9 phages par gramme de sédiment (**Jacquet, 2007**). Cependant, les études des quinze dernières années ont montré que leur population dans les eaux douces et dans les habitats marins était bien plus importante qu'elle n'avait été imaginée auparavant (**Personnic, 2006**). Dans ces milieux, les bactériophages œuvrent à la dynamique du renouvellement biochimique, en éliminant une partie du bactério-plancton. En effet, la lyse de ce dernier permet de rendre le carbone organique biodisponible, en le faisant passer de l'état particulaire, sous forme de cellules bactériennes, à l'état dissous exploitable, sous forme de produits de lyse (**Jacquet, 2007**).

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

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

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

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

d'adaptation à différents milieux que ceux ayant une capsidite plus petite (60 nm) (**Jonczyk et al., 2011**).

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

Dans les premières recherches de **d'Hérelle, (1921)**, le bactériophage qu'il étudiait pouvait survivre à une température dépassant 65 °C, température létale pour la majorité des bactéries non sporulées, et ce bactériophage était assez difficilement détruits par des agents physiques (chaleur ou rayons ultra-violet par exemple) et chimiques (antiseptiques par exemple).

D'après Stephan Jacquet, chercheur à l'Institut Pasteur, il existerait des variations saisonnières de la quantité de bactériophages dans un milieu donné, en fonction de la température extérieure, de l'intense du rayonnement ultra-violet, etc. Ainsi, la population de phages serait 100 fois plus importante en été qu'en hiver (**Institut Pasteur, 2007**).

Depuis, la recherche a fait des progrès, et a permis de comprendre qu'il n'existait pas un unique bactériophage mais des milliers de type et que chaque bactériophage possédait des caractéristiques différentes. Cependant, certaines caractéristiques sont communes à tous les bactériophages, notamment leur résistance aux milieux extrêmes, généralement meilleure que celle des bactéries (**Jacquet, 2007**). D'après certains auteurs (**Dublanchet et Patey 2011 ; Jacquet 2007**) un certain nombre de ces virus peuvent survivre des semaines à des années dans différents milieux (aqueux ou non) et ainsi demeurer dans les milieux les plus arides tels que les déserts chauds ou froids, à l'instar des phages observés dans le désert du Chihuahua au Mexique (**Souza, 2006**), les sources chaudes ou les fosses marines où la pression est énorme. De nombreux phages demeurent virulents malgré une exposition à une température supérieure à 60 °C, à des rayons ultra-violet, à de multiples antiseptiques ou à des milieux alcalins ou acides (**Jacquet, 2007**).

Les phages sont stables, dans la plupart des cas à un pH de 5 à 8. On rapporte certaines espèces qui survivent à un pH de 3 ou 4. Généralement, la concentration du phage va décroître lentement en même temps que le pH. Par exemple, le phage du *S. aureus* a été

diminué de deux logs entre 4 et 6 heures de temps lorsque le pH passait de 6,19 à 5,38. La propagation de plusieurs phages est altérée lorsque le pH est inférieur à 4,5. Le phage T4 est instable à un pH plus bas que 5 alors que le phage PM2 perd complètement son activité après une heure dans une solution de pH de 5 à 37 °C (**Ly-Chatain, 2014**).

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

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

1.7. Relation phage/cellule hôte

La première étape de l'infection de la bactérie par le phage est constituée généralement par des interactions spécifiques entre des structures protéiques du phage et des molécules présentes à la surface de l'hôte appelées « récepteurs », 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 (**Figure 04**) le phénomène de la reconnaissance repose sur l'interaction spécifique entre les fibres caudales du phage et les polysaccharides qui composent la couche externe de la paroi des bactéries à Gram négatif (**Madigan et Martinko, 2007**).

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**).



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

1.8. La compétition entre parasites pour un même hôte

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

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

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 (**Berdjeb et Jacquet, 2009**).

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**).

1.9.1. Prévention de l'adsorption

Les bactéries peuvent résister à l'infection par le phage en changeant la disponibilité des protéines présentes sur leur surface, empêchant ainsi la liaison spécifique nécessaire pour l'adhésion. En contrepartie, les phages peuvent aussi modifier leurs récepteurs pour pouvoir reconnaître un autre type de protéines.

Les bactéries peuvent faire subir une mutation aux protéines qu'elles expriment de manière à empêcher encore une fois l'adsorption. Par contre, les phages ont la capacité d'évoluer de manière à reconnaître la forme altérée de la protéine cible (**Labrie et al., 2010; Samson et al., 2013**).

1.9.2. L'antirestriction

Les systèmes de restriction-modification (R-M), sont très répandus chez les bactéries. Ce système utilise une enzyme de restriction (endonucléase) qui coupe l'ADN étranger (le génome du phage) à des sites spécifiques. La modification des sites de reconnaissances sur l'ADN bactérien par les méthyltransférases (Mtase) prévient l'attaque par ses propres enzymes (endonucléases). Pour échapper au système de restriction-modification, l'ADN du phage est protégé après l'invasion la MTase agit rapidement et modifie l'ADN phagique avant sa reconnaissance par l'endonucléase bactérienne, le génome du phage modifié peut se répliquer dans la cellule hôte et peut également se propager dans d'autres cellules qui expriment le même système R-M, par contre si le système R-M est différent, l'ADN phagique sera donc

clivé par une autre endonucléase. Cette stratégie s'appelle « l'antirestriction » (**Samson et al., 2013**).

1.9.3. Système CRISPR

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**).

Il s'agit donc d'une forme de système immunitaire héritable par transmission aux cellules filles, permettant aux archées et aux bactéries de faire face au changement rapide des phages et des plasmides (**Barrangou et al., 2007**).

1.10. Types d'invasion de la cellule bactérienne

On discerne trois types de bactériophages : les phages dits « virulents » ou « lytiques », représentant près de 90 % des bactériophages, ceux dits « tempérés » ou « endogènes » représentant environ 10 % et ceux dits « filamenteux », bien plus minoritaires (moins d'1 %).

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

La différence principale entre les deux principaux types de phages (virulents et tempérés) réside dans leur comportement vis-à-vis de la bactérie après intrusion : un phage lytique va directement détruire la bactérie, tandis qu'un phage tempéré va intégrer son génome à celui du chromosome bactérien, rester « silencieux » un temps et se multiplier avec lui (**Inal, 2003**).

Le troisième type de phages existants, appelés phages filamenteux sont rares et leur cycle, nommé cycle chronique, est non exploitable pour la phagothérapie (comme le cycle lysogène). Après pénétration dans la bactérie hôte, ce type phages ne va pas la lyser mais va produire en continu de nombreux phages par bourgeonnement de la membrane bactérienne (**Ackermann, 2003**).

Il existe un quatrième type de cycle de reproduction, nommé pseudo-lysogénie. Il s'agit d'un intermédiaire entre les cycles lytiques et lysogéniques, au cours duquel le génome viral ne s'intègre pas au génome de la cellule hôte, et demeure latent dans le cytoplasme. Ce cycle reste encore mal compris (**Grossi, 2006**).

1.10.1. Principe du cycle chronique (phages filamenteux)

La durée d'un cycle de réplication typique chez les phages filamenteux varie entre 10 et 15 minutes. Lors de ce cycle, le phage se fixe sur la membrane de la bactérie à partir du pili sexuel bactérien et injecte son ADN dans la bactérie. L'ADN viral introduit dans la cellule bactérienne est converti de simple brin à double brin puis répliqué et transcrit en ARNm ; les ribosomes bactériens traduisent ensuite les ARNm en protéines de la capsid virale, qui s'insèrent ensuite dans la membrane bactérienne, et s'assemblent entre elles en entourant un nouveau brin d'ADN viral, tout en traversant la membrane bactérienne jusqu'à être totalement excrétées sous forme de nouveaux virions. Cette invasion ne détruit généralement pas les bactéries et n'est donc pas intéressante en ce qui concerne la phagothérapie (**Ackermann, 2003**).

10-2. Principe du cycle lysogénique (phages tempérés)

Le cycle lysogénique, aussi nommé « lysogénisation » (Dublanche et Patey, 2011), a lieu lorsqu'un phage tempéré pénètre dans une cellule bactérienne (**figure 3**). Le génome du phage s'insère dans celui de la bactérie et devient dès lors partie intégrante de celle-ci (on appelle le génome viral intégré « prophage »). La réplication de ce matériel génétique a ainsi lieu en même temps que celui de la bactérie. Celle-ci, dont le chromosome bactérien a été envahi, transmet ensuite lors de sa division ce nouveau patrimoine génétique à sa descendance (**Dublanche, 2009**).

Cet état « silencieux » demeure jusqu'à ce qu'à un moment donné, le cycle lysogénique s'active en cycle lytique et que le génome du phage s'excise du chromosome bactérien. Ce changement d'état est relativement rare : un cas pour 100 000 phages tempérés environ (**Dublanche, 2009**), mais sa fréquence est augmentée lors d'un stress, induit par exemple par des rayons ultra-violet, des rayons X ou des substances chimiques comme des oxydants.

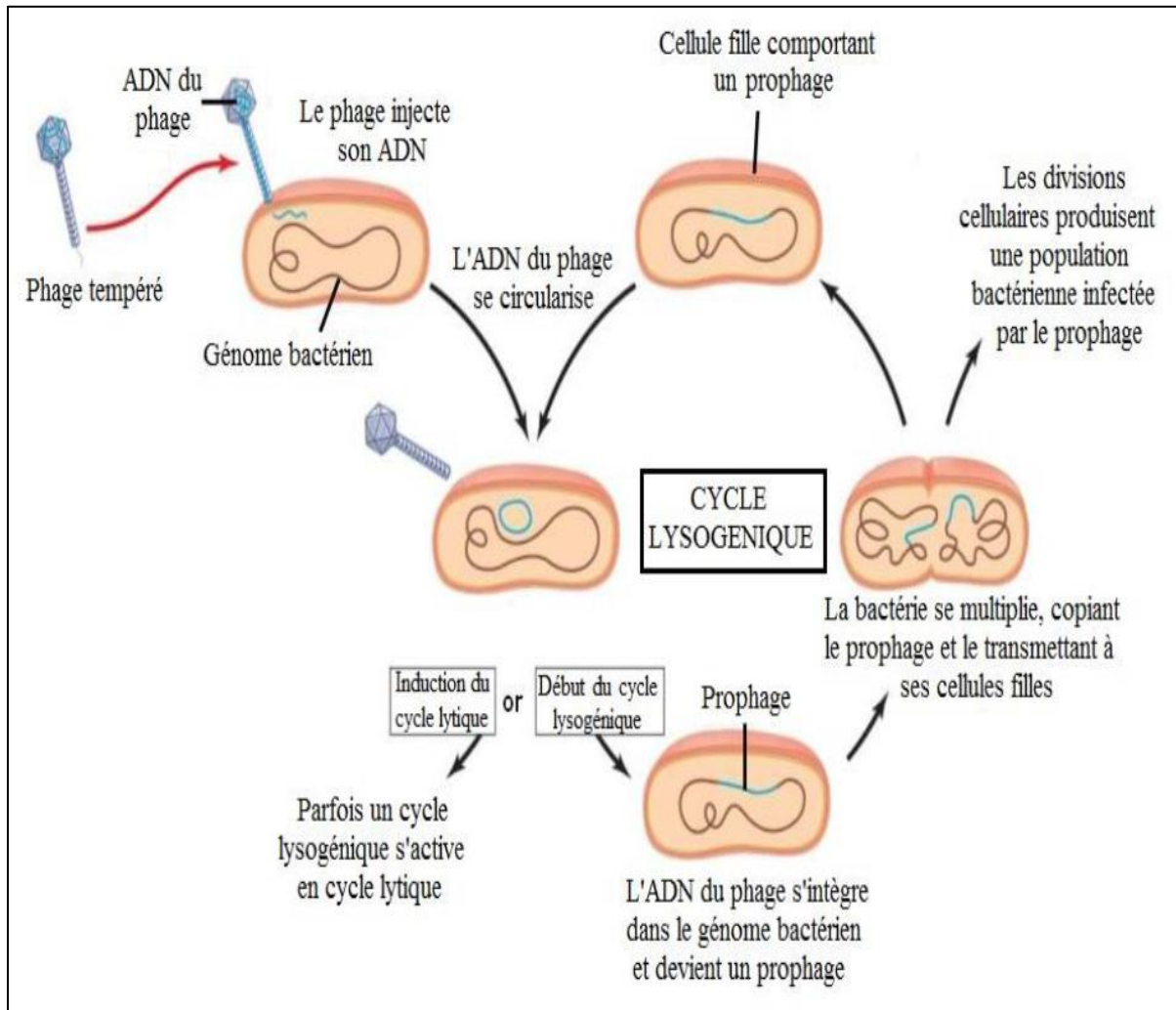


Figure 05: Schéma représentatif d'un cycle lysogénique (Anonyme 2)

10-3. Principe et étapes du cycle lytique (phages virulents)

Contrairement aux phages tempérés, les bactériophages virulents possèdent la capacité de se multiplier selon leur propre rythme, et non pas au gré des divisions bactériennes. La reproduction d'un tel phage permet d'engendrer simultanément plusieurs dizaines de virus tous identiques. Pour décrire ce cycle, le microbiologiste Mark Müller a déclaré « Les bactéries ne meurent pas, elles explosent en multiples phages. »

Un cycle lytique complet prend quelques minutes à maximum une heure pour se réaliser. À côté de cela, la réplication bactérienne ne permet, dans les conditions optimales, de générer que deux bactéries filles toutes les demi-heures chez les espèces bactériennes à développement rapide. Cette réplication dichotomique bactérienne n'est pas en mesure de

résister à une lyse par les dizaines, et même les centaines de bactériophages produits lors de leur réplication. Une colonie bactérienne entière même abondante est ainsi rapidement détruite par le nombre de bactériophages à croissance exponentielle (**Dublanchet, 2009**).

Le processus infectieux d'un bactériophage lytique débute par sa fixation sur un motif (cible) spécifique situé à la surface de la bactérie hôte (**Figure 04**). On reconnaît un certain nombre d'étapes :

a- L'adsorption spécifique

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

b-Pénétration du génome phagique dans la bactérie

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

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

c -L'expression du génome viral

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

Les phages avec des génomes de petit ADN (ont la capacité limitée de codage) utilisent L'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte pour la réplication et la transcription de l'ADN, alors que les phages avec génomes de large ADN (et, par conséquent, une plus grande capacité de codage), généralement encodent L'ADN et l'ARN Polymérase de phage. **(Drouji, 2009).**

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

Il n'y a pas de régulation temporelle de l'expression des gènes pour les phages de petits génomes: la quasi-totalité des gènes du phage commence à être transcrite et traduite peu après l'injection, ces gènes continuent à être exprimés tout au long de l'infection. **(Drouji, 2009).**

En revanche, la multiplication des phages ayant les génomes de large ADN exige la régulation temporelle de la synthèse de macromolécules du phage qui sont produites habituellement pendant les trois phases: la synthèse des produits précoces, la synthèse de la progéniture d'ADN du virus et enfin la synthèse des produits tardifs. Les produits des gènes précoces codent l'ADN, l'ARN et les protéines de synthèse de l'hôte et adaptent un mécanisme cellulaire de biosynthèse de phages qui commence par la réplication de l'ADN phagiques. Les produits des gènes tardifs codent pour des produits nécessaires pour l'assemblage des progénitures du phage **(Drouji, 2009).**

d- L'Assemblage des progénitures du phage

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

e- La lyse de la bactérie

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

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

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

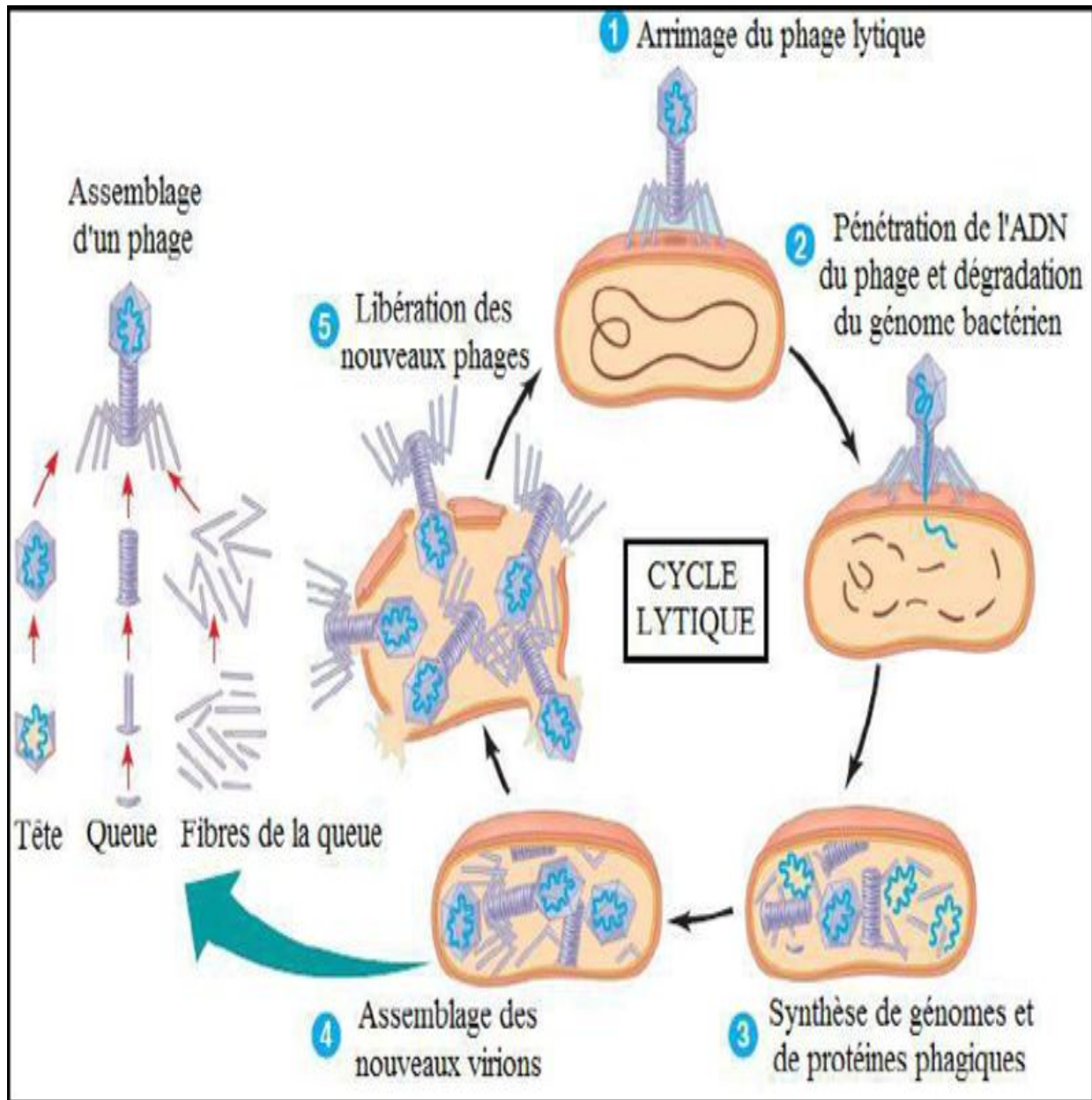


Figure 06: Schéma du cycle lytique (Anonyme 2)

2. La phagothérapie

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

2.1. Définition

La phagothérapie est un mot apparu en 1926 construit à partir de « phagos » et «therapeia » (cure). On peut toutefois signaler que le terme phagothérapie avait été préalablement utilisé dans un tout autre sens : en 1912, Fernand Boivin l'utilisa dans sa thèse en tant que traitement qui modifie la façon de se nourrir. Bien que supplanté par le sens de d'Hérelle, on trouve encore quelques fois l'usage de ce mot avec cette acceptation.

La phagothérapie est l'utilisation de bactériophages (parfois simplement appelés phages) dans le but de traiter et de guérir des infections bactériennes. La phagothérapie est donc un traitement spécifique de maladies bactériennes par des phages. Elle met à profit les propriétés destructrices, lytiques et spécifiques de tel ou tel phage vis à vis d'une bactérie infectante. Formellement, il serait plus exact d'utiliser le terme de « bactériophagothérapie ». bien qu'existant, ce terme reste néanmoins très peu utilisé du fait de sa longueur. Enfin, dans certains écrits en français l'expression « thérapie phagique » (à l'instar de « phagotherapy » des Anglo-saxons) peut être employée en lieu et place de phagothérapie (**D'hérelle, 1926**).

La phagothérapie s'est développée dans l'union soviétique. Dans les années 20, après une visite à l'institut Pasteur, un chercheur géorgien Georgy Eliava fut à l'origine de la construction à Tbilissi d'un institut dédié à la recherche et à l'application médicale des bactériophages. Cet institut est toujours en activité aujourd'hui. Un seul autre centre de recherche, à Wroclaw en Pologne propose des traitements à base de bactériophages (**Dublanchet, 2009**).

2.2. Historique de la phagothérapie

C'est en observant des « plages claires » au sein d'une culture de bactéries sur gélose en 1917 que le franco-canadien Félix D'Hérelle a formulé l'hypothèse d'une part que ces plages claires correspondaient à une lyse bactérienne et d'autre part que cette lyse pouvait être provoquée par un agent inconnu qu'il a appelé « microbe filtrant » (**D'Hérelle, 1917**) Poursuivant son hypothèse d'un « microbe tueur de microbes », qu'il appellera bactériophage, D'Hérelle isola en quelques mois des phages actifs contre plusieurs espèces bactériennes. (**D'Hérelle, 1919**) Dès 1918, il imagina un usage thérapeutique du bactériophage, (**D'Hérelle, 1918**) qu'il concrétisa en 1919 par le traitement (avec succès) d'enfants victimes de dysenterie bacillaire hospitalisés à l'hôpital NECKER de Paris. (**Dublanchet et al., 2009**) La molécule généra d'immenses espoirs thérapeutiques au point de faire dire à W. Stewart que « le temps est venu de fermer le livre des maladies infectieuses ».

La méthode proposée par D'Hérelle fait la preuve de son efficacité avec notamment le traitement de cas de peste en Égypte durant l'année 1925 (**D'Hérelle, 1925**) et son utilisation pour juguler une épidémie de choléra en Inde en 1926. (**Morison, 1935**) Ces premiers succès ont eu un retentissement tel qu'ils sont le point de départ d'une véritable « mondialisation » de la phagothérapie. Pour la première fois, dès le début des années 30, le monde médical semble enfin disposer d'une arme efficace pour traiter les infections bactériennes. (**Dublanchet et al., 2009**) C'est dans cette perspective qu'en 1933 GEORGI Eliava, un élève de Félix D'Hérelle, crée à Tbilissi « l'institut du bactériophage », première institution au monde intégralement consacrée au bactériophage et à ses applications thérapeutiques. (**Dublanchet et al., 2009**).

Après les premiers succès sont venus les premiers échecs, faisant naître les premiers doutes et les premières polémiques. (**Dublanchet et al., 2009**) Certains, à l'instar de Jules Bordet, pensent même à l'époque que la théorie de D'Hérelle est fautive, à savoir que le bactériophage n'existe pas et que l'efficacité de la méthode repose sur un phénomène enzymatique, (**Dublanchet et al., 2009**) donnant ainsi naissance à 10 ans de polémiques. L'explication des échecs et des polémiques qui en ont découlé tient au fait que l'agent à l'origine de l'efficacité de la méthode – le bactériophage – n'avait pas encore été mis en évidence à l'époque. Il faudra pour cela attendre l'invention du microscope électronique pour permettre à H. Ruska d'observer et de photographier le premier bactériophage en 1940 (un

phage actif contre *E. coli*). Si la rigueur d'expérimentateur de Félix D'Hérelle, acquise à l'institut Pasteur de Paris, lui a permis de dégager les facteurs clés du succès des préparations de bactériophages à usage thérapeutique, il n'en est pas de même de tous ceux qui prétendent, à l'époque, mettre en œuvre la phagothérapie proposée par D'Hérelle, expliquant les échecs. **(Dublanche *et al.*, 2009)**

Le coup de grâce a été porté à la phagothérapie par deux événements successifs : la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928 puis la seconde guerre mondiale, qui a généré des besoins immenses en traitements anti-infectieux. Dans ces conditions il est facile de comprendre la production de masse d'antibiotiques (plus aisés à fabriquer, plus stables et plus simples d'emploi) suivie de la montée en charge des grandes firmes pharmaceutiques qui en résultera. La seconde guerre mondiale a été le promoteur de l'âge d'or de l'antibiothérapie. En trois ou quatre décennies va naître une trentaine de nouvelles molécules générant d'immenses espoirs thérapeutiques au point de faire dire à W. Stewart que « le temps est venu de fermer le livre des maladies infectieuses ». L'abandon progressif de la phagothérapie sera le pendant de cet âge d'or des antibiotiques. Cet abandon définitif dans les années 80, sera marqué par la destruction des collections de bactériophage de l'institut Pasteur de Paris (pr J.F. Vieu) et de l'institut Pasteur de Lyon (pr J. Guillemet) **(Dublanche *et al.*, 2008)**.

Heureusement pour la phagothérapie, la guerre froide a interdit à la médecine des pays d'Europe de l'Est l'accès aux antibiotiques produits par l'industrie pharmaceutique occidentale. De plus, par décision du gouvernement de l'URSS, les professionnels de la santé et les chercheurs de ces pays ne pouvaient se rendre à l'étranger pour faire état de leur savoir-faire et de leurs découvertes. Enfin, les publications dans les revues autres que celles des pays de l'Est leur étaient interdites et, qui de plus écrites en langue russe ou géorgienne, étaient difficiles d'accès aux lecteurs des pays occidentaux. Pour toutes ces raisons, la phagothérapie ne pouvait subir d'autre sort que l'oubli.

Cependant, depuis la chute des régimes communistes de l'Est et l'émergence de bactéries multirésistantes aux antibiotiques, la phagothérapie bénéficie d'un regain d'intérêt de la part des thérapeutes occidentaux, comme en témoigne la progression du nombre de publications consacrées au bactériophage depuis les années 2000 **(Pirnay *et al.*, 2012)** **(Figure 5)**.

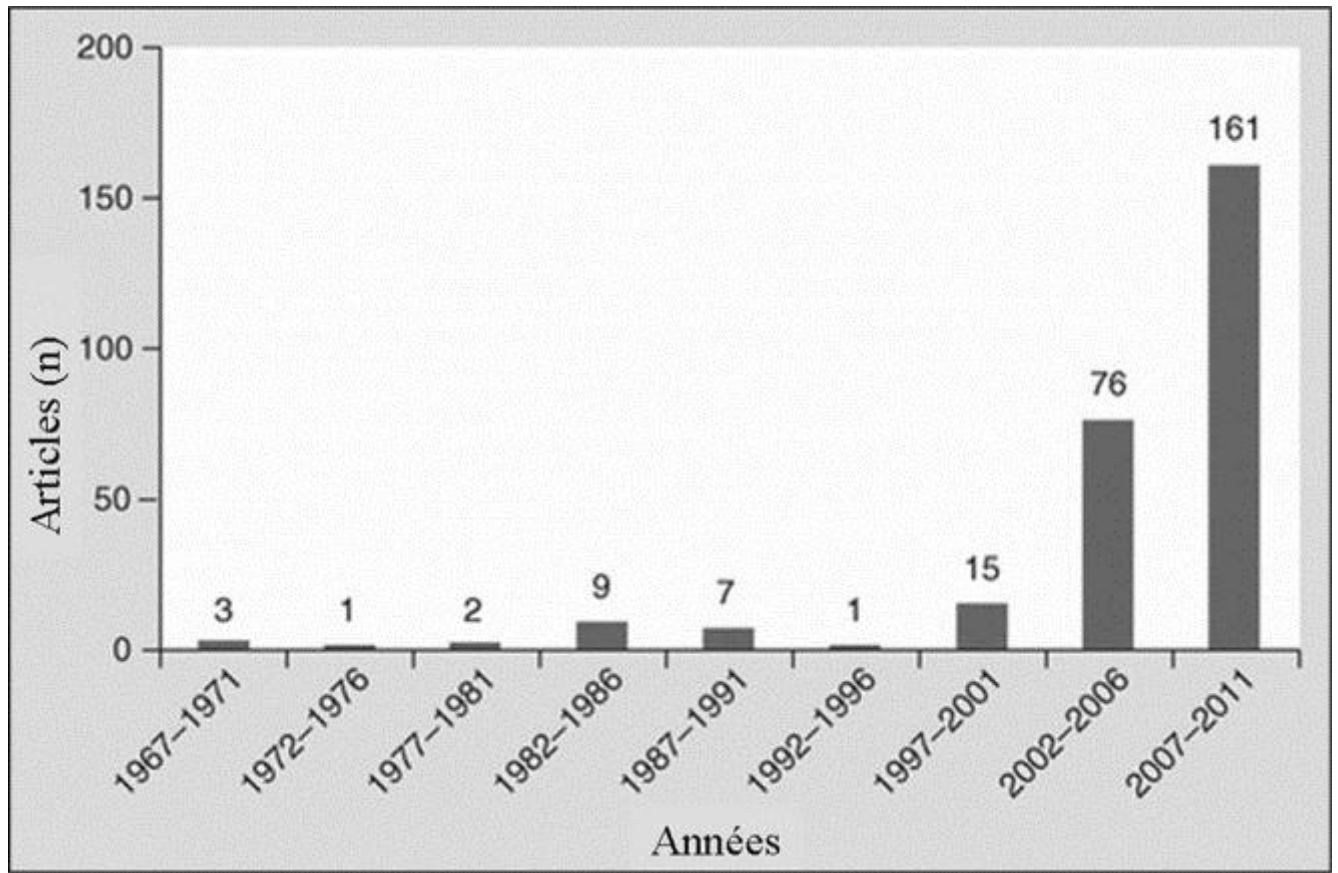


Figure 07 : Articles consacrés au bactériophage et à la phagothérapie publiés dans les revues internationales entre 1967 et 2011 (Pirnay *et al.*, 2012) .

2.3. Relation phage-antibiotique

Nous avons vu que les stratégies anti-infectieuses de l'ex-URSS et des pays occidentaux avaient divergé après la fin de la seconde guerre mondiale. Les uns poursuivant les recherches sur les phages tandis que les autres prônaient le « tout antibiotique ». Une des stratégies envisagée à l'heure actuelle serait de combiner ces deux thérapeutiques pour profiter de leurs avantages à chacune. Nombre de scientifiques pensent qu'il s'agit d'une approche d'avenir.

Il y a plusieurs intérêts à associer ces deux thérapies. Premièrement, les phages vont réduire le nombre de bactéries sur le lieu de l'infection, facilitant ainsi l'action de l'antibiotique et limitant la pression de sélection (moindre probabilité d'apparition de résistances puisque l'inoculum bactérien est plus faible) (Dublanquet, 2009).

Ensuite, une équipe française a découvert fortuitement lors d'un antibiogramme que la physiologie des bactéries était modifiée sous l'effet du stress provoqué par la présence d'un antibiotique. Celles-ci, sous cet état de stress, se divisent moins fréquemment, ce qui donne des bactéries plus grosses, au sein desquelles les phages vont pouvoir donner naissance à un

nombre accru de virions. Ce phénomène a été appelé « Synergie phages-antibiotiques » (Figure 07) (Comeau *et al.*, 2007, 2008).

Enfin, les phages auraient une action sur les biofilms. L'association phages/antibiotique permettrait donc l'accès de l'antibiotique aux bactéries dans le biofilm. Reste à savoir si cette synergie fonctionne avec n'importe quel phage et n'importe quel antibiotique. Si ce n'est pas le cas, il faut identifier les couples qui fonctionnent (Dublanchet, 2009).

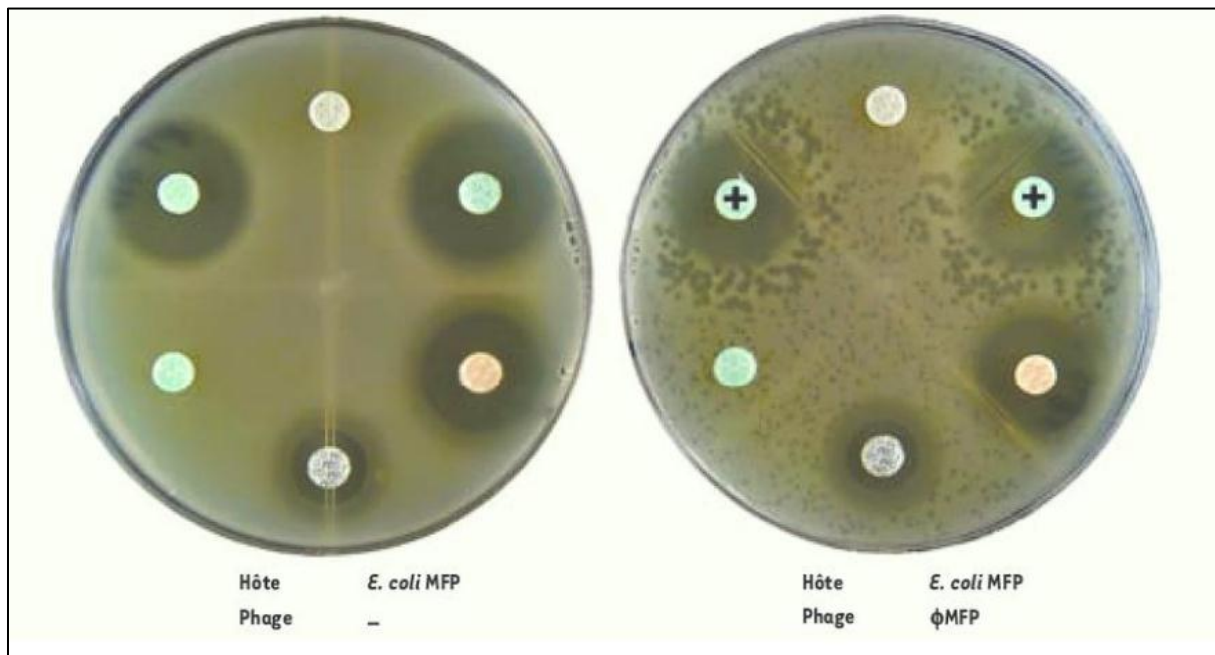


Figure 08 : Le phénomène de « Synergie Phages-Antibiotiques »

À gauche, un antibiogramme montrant la sensibilité d'une souche d'*E. coli* à différents antibiotiques. À droite, le même antibiogramme avec l'addition de phages virulents dans le tapis bactérien. Les plages de lyse sont beaucoup plus grandes à proximité de certains antibiotiques (indiqués avec les « + »). L'augmentation de la taille des plages est causée par une surproduction de phages et une lyse plus rapide des bactéries par les phages (Comeau *et al.*, 2008).

Une publication récente a montré l'intérêt d'associer phages et antibiotiques dans certaines infections à bactéries multi-résistantes. Cette publication explique en effet comment une telle association a permis de venir à bout d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistante.

La souche de *P. aeruginosa* dont parle cette étude présente une résistance à plusieurs antibiotiques du fait de la présence dans sa membrane d'un système d'efflux (une porine) lui

permettant d'évacuer de son cytoplasme ces antibiotiques. L'idée des chercheurs à l'origine de cette publication était de sélectionner un phage ayant justement pour récepteur cette porine. C'est ce qu'ils firent en isolant le phage OMKO1. L'utilisation de ce phage contre une infection à *P.aeruginosa* multi-résistante a permis d'éradiquer toutes les souches présentant la porine cible dans leur membrane, et ne laissant sur le site de l'infection que des souches dépourvues du système d'efflux. Il suffisait alors ensuite d'administrer un antibiotique habituellement actif sur cette bactérie pour détruire les souches restantes. Cette étude ouvre une voie intéressante d'une potentielle utilisation combinée phage/antibiotique qui permettrait également en utilisant deux thérapies ayant des mécanismes d'action totalement différents de limiter au maximum l'apparition de résistances contre l'une ou l'autre de ces thérapies (**Chan et al., 2016**).

On le voit, il y a un bénéfice à utiliser antibiotiques et bactériophages non seulement pour leur effets synergiques mais aussi parce que tant les antibiotiques que les bactériophages sont irremplaçables dans certaines situations. Antibiotiques et bactériophages ne sont donc pas concurrents mais bien complémentaires et la phagothérapie doit être envisagée comme une arme supplémentaire dans l'arsenal de la lutte contre les infections bactériennes (**Ravat et al., 2015**).

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

Lorsqu'on la compare à l'antibiothérapie, les avantages et les inconvénients de la phagothérapie sont souvent évalués. Un résumé en est présenté dans le **tableau2**

Tableau 02 : Les avantages et les inconvénients de la thérapie phagique et de l'antibiothérapie (Dublanche, 2014).

| | PHAGOTHÉRAPIE | ANTIBIOTHÉRAPIE |
|--------------------------------|---|---|
| Mode d'action et Pharmacologie | <ul style="list-style-type: none"> • Les phages se multiplient au foyer infectieux, disparaissent avec les bactéries. • Une dose unique est théoriquement suffisante. • Le cycle de reproduction est variable selon le phage, • La pharmacocinétique est mal connue • Applications limitées aux foyers accessibles localisés (plaies). | <ul style="list-style-type: none"> • Les antibiotiques (ATB) sont métabolisés in vivo et ont une diffusion variable selon les tissus • La pharmacocinétique est bien connue → pour les modes d'administrations (dose, rythme, durée) sont précises. |
| Spécificité | <ul style="list-style-type: none"> • Un phage ne s'attaque qu'à l'espèce bactérienne pathogène ciblée respect des flores commensales | <ul style="list-style-type: none"> • Un antibiotique à large spectre est actif sur plusieurs espèces bactériennes non-respect des flores commensales (diarrhée, mycoses). |
| Effets secondaires | <ul style="list-style-type: none"> • Rareté des effets secondaires (fièvre, céphalée) si la suspension phagiques est purifiée. | <ul style="list-style-type: none"> • Nombreux effets secondaires (rénaux, cardiaques, digestifs, allergiques, neurologiques, tendineux,...). |
| Efficacité | <ul style="list-style-type: none"> • L'efficacité est prouvée dans de nombreuses études expérimentales animales. • Les études expérimentales humaines récentes rigoureuses rares sont | <ul style="list-style-type: none"> • L'efficacité est reconnue si les indications sont bien posées. • Echec si la bactérie est méconnue et/ou résistante. • Les études expérimentales rigoureuses sont nombreuses avec |

| | | |
|-------------------------------|---|---|
| | limitées aux phages. | autorisation de mise sur le marché. |
| Production et coût | <ul style="list-style-type: none"> • Les phages naturels sont peu coûteux et rapidement utilisables. • Avec des phages génétiquement modifiés coûts important, possible, délai, disponibilités. | <ul style="list-style-type: none"> • La mise sur le marché d'un nouvel ATB est très longue et très coûteuses. |
| Impact environnemental | <ul style="list-style-type: none"> • Peu de risque si les phages sont naturels. • Risque existant avec des phages modifiés génétiquement | <ul style="list-style-type: none"> • Risques d'autant plus important que les spectres d'ATB sont larges et leur emploi massif (utilisation dans l'élevage et rejet dans les eaux usées). |
| Limites | <ul style="list-style-type: none"> • La bactérie pathogène doit être connue, isolée et testée • Absence de centre spécialisé | <ul style="list-style-type: none"> • Contre-indications connues (toxicité) • Résistances aux antibiotiques |
| Résistance | <ul style="list-style-type: none"> • La résistance bactérienne aux phages peut apparaître en cours de traitement d'où l'intérêt d'utiliser plusieurs phages ("cocktail") • Les phages restent actifs sur les bactéries résistantes aux antibiotiques et ne les sélectionnent pas. | <ul style="list-style-type: none"> • Les résistances des bactéries aux antibiotiques sont en augmentation pour toutes les espèces et pour toutes les classes d'antibiotiques partout dans le monde. • Les résistances sont souvent multiples et croisées, même entre différentes classes d'antibiotiques. |

2.5. Domaines d'utilisation de la phagothérapie

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

2.5.1. Utilisation en médecine

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

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

2.5.2. Utilisation en vétérinaires

L'utilisation des phages contre les infections animales ainsi que pour prévenir la transmission des pathogènes des animaux au système agroalimentaire est une autre sphère importante dans la recherche sur les phages (**Adhya et al., 2014**). Une expérience faite par Smith et Huggins dans les années 80 a démontré l'efficacité d'une suspension de phage administrée de manière intramusculaire à des souris qui avait été infectées par *E.coli*.

L'administration d'une seule dose de suspension de phage a été plus efficace que les multiples administrations d'antibiotiques qui avaient été donnés aux souris. Ce même groupe de recherche a utilisé les phages pour prévenir la diarrhée causée par *E.coli* chez des veaux, des porcelets et des agneaux (**Wittebole et al., 2014**).

2.5.3. Utilisation en génie génétique

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

2.5.4. Utilisation de l'enzyme lytique comme agent thérapeutique

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

2.5.5. Utilisation en agro-alimentaire

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

Aux États-Unis d'Amérique, la FDA (Food and Drug Administration) a récemment émis des directives pour lutter contre l'expansion des antibiorésistances. Pour mieux lutter contre les antibiorésistances, elle a autorisé en 2006 la pulvérisation sur la viande d'un cocktail de six phages anti-*Listeria monocytogenes* nommé ListShield™ (anciennement LMP 102), fabriqué et conditionné par la société Intralytix (FDA, 2013).

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

2.5.6. Utilisation dans le traitement des infections à biofilm

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

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

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

2.5.7. Utilisation pour désinfection des surfaces inertes

Les phages se sont avérés efficaces en application sur des surfaces inertes pour les débarrasser des bactéries ou des biofilms. Leur usage serait particulièrement indiqué pour

traiter l'intérieur des réseaux hydrauliques, comme par exemple les tuyaux de circulation d'eau de boisson pour les volailles, qui regorgent généralement de bactéries (surtout des bactéries générant des infections entériques, comme *Campylobacter spp.*) et de biofilms (Inal, 2003).

C'est ce qu'ont tenté in vitro certains scientifiques. Les bactériophages appliqués sur les surfaces contre *Campylobacter jejuni* et contre les biofilms associés se sont révélés très efficaces, en particulier les phages CP8 et CP 30 (Siringan *et al.*, 2011; Scott *et al.*, 2007). L'action des bactériophages pourrait également s'appliquer à l'aseptisation du matériel médical et des surfaces en milieu hospitalier, comme le démontre l'équipe de Carson dans une étude sur l'élimination des biofilms présents sur le matériel médical (Carson *et al.*, 2010).

2.5.8. Utilisation des 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.



**MATHERIEL
ET
METHODES**

1. Objectif

Les objectifs de la présente étude sont d'isoler des bactériophages à partir d'un échantillon d'eau du Oued Mekerra de Sidi Bel Abbès et de mettre en évidence leur effet antibactérien naturel sur les souches d'*Escherichia coli* (isolées de ce même site) en s'appuyant sur la méthode des plages de lyse, ainsi que de titrer ces phages présents dans notre échantillon d'eau.

2. Matériel

2.1. Isolats bactériens

Les souches d' *E coli* ayant fait l'objet de l'étude bactériologique proviennent des échantillons d'eau prélevés sur l'Oued Mekerra, wilaya de Sidi Bel Abbès (**Figure 09**).

2.1. Isolats phagiques

Ces isolats sont obtenus par la technique d'enrichissement en utilisant les souches bactériennes isolées à partir des échantillons d'eau prélevés sur l'Oued Mekerra, wilaya de Sidi Bel Abbès (**Figure 09**).



Figure 09 : Localisation du site d'échantillonnage (Source :Google Maps 2020).

3. Méthodes

3.1. Prélèvement des échantillons

Les échantillons d'eau du Oued Mekerra, au nombre de 2, ont été prélevés le 12/03/2020 et 27/03/2020. Les prélèvements ont été réalisés à une profondeur de 40 cm au large de l'Oued, ils ont été placés dans des flacons stériles de 250 ml de capacité. Le transport des échantillons est réalisé dans des caisses isothermes et les analyses sont effectuées dans les 3 heures qui suivent le prélèvement.



Figure 10 : Lieu de prélèvement de la boue mixte au niveau d'Oued Mekerra. (**Anonyme 3**)

3.2. Isolement et identification des souches d' *E coli*

Afin d'isoler sélectivement les coliformes de l'espèce *E coli* un enrichissement sélectif est réalisé sur un milieu liquide BLBVB (**Annexe 1**), l'enrichissement est effectué en deux étapes :

D'abord, neuf ml du milieu BLBVB sont aliquotes dans des tubes de 25 ml de capacité munies de cloches de Durham. Chaque tube est, ensuite, inoculé de 1ml d'échantillon, agité puis incubé pendant 48 h à une température de 37 °C. Après incubation, sont considérés positifs pour la croissance des coliformes, *E coli* entre autres, les tubes présentant ; trouble, virage de couleur vers le jaune et une production de gaz.

En deuxième étape, la présence des coliformes est confirmée via le test Mac KENZIE : une dose d'un tube positif est inoculée dans un tube de BLBVB avec cloche, et une autre dans un tube d'eau peptonée ; si après incubation à 44°C pendant 48 heures il y a production de gaz (BLBVB) et d'indole (mis en évidence par addition de réactif de Kovacs dans le tube d'eau peptonée) on peut soupçonner la présence d'*E. coli*.

Enfin, l'isolement des souches d' *E coli* est réalisé à partir de la dernière série de tubes BLBVB positifs. Une anse pleine de chaque culture est étalée à la surface du milieu EMB (**Annexe I**) coulé en boîtes de Pétri. Ces dernières sont mises à incuber à 37°C pendant 24 heures.

3.2.1. Purification

Après incubation, les colonies caractéristiques de *E coli* sont repiquées plusieurs fois sur milieu EMB en vue de leur purification.

3.2.2. Conservation des isolats

La méthode de conservation des isolats consiste à repiquer les isolats en tube de gélose inclinée (**Cappuccino & Welsh, 2017**). Après une incubation de 24 h, les cultures sont stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations.

3.2.3. Identification des isolats

3.2.3.1. Examen macroscopique

D'après **Cappuccino & Welsh, (2017)**, les éléments d'identification macroscopiques sont : la forme, la taille, la couleur, l'élévation, l'opacité et l'aspect de la surface des colonies.

E coli produit sur milieu EMB des colonies circulaires, plates, de 2 à 3 mm de diamètre, de couleur violet très foncé avec généralement un reflet métallique et centre noir pourpre en lumière transmise.

3.2.3.2. Examen microscopique

3.2.3.2.1. Observation vitale

L'observation à l'état frais permet l'étude microscopique des bactéries vivantes, Cette méthode permet d'observer : la forme des cellules bactérienne, leur mode de regroupement et la mobilité.

3.2.3.2.2. Technique de Coloration de Gram

Le frottis est préparé, fixé à la chaleur puis coloré pendant une minute au cristal violet ; il est ensuite rincé à l'eau distillée, traité pendant une minute avec une solution de Lugol, de nouveau rincé à l'eau distillée puis soumis à une étape de décoloration avec l'éthanol 95% pendant 15 à 30 secondes. Enfin, la préparation est colorée à la fuschine pendant 10 à 30 secondes, rincée à l'eau distillée, puis séchée au buvard ou au-dessus de la flamme d'un bec bunsen. Les lames ainsi préparées sont examinées à l'objectif (GX 100) à immersion. Sous microscope, les bactéries « Gram-positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram-négatif » sont colorées en rose ou en rouge (Cappuccino & Welsh, 2017)

3.2.3.3. Mise en évidence du type respiratoire

La détermination de type respiratoire des bactéries est effectuée sur milieu de culture Viande-Foie (VF). Dans des tubes à essai stériles, le milieu de culture en surfusion est aseptiquement ensemencé en réalisant un mouvement en hélice du bas vers le haut à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. Le milieu de culture solidifié est incubé à 37°C pendant 24h. Les résultats obtenus sont interprétés selon la **Figure 11** et le germe est dit soit : aérobic strict, anaérobic strict ou microaérophile.

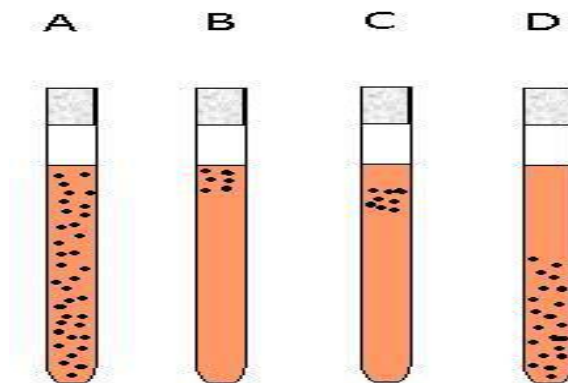


Figure 11 : Détermination du type respiratoire.

L'endroit où se trouvent les colonies dans le tube détermine le type respiratoire :

- A culture sur toute la hauteur : aéro-anaérobic facultatif (AAF).
- B culture seulement en haut : aérobic stricte (AS).
- C culture limitée entre 0,5 et 1,5 cm du haut : micro-aérophile.
- D culture seulement 1 cm au-dessous du haut : anaérobic stricte (ANS).

3.2.3.4. Identification biochimique

Les galeries API 20 E sont préparées conformément aux instructions du fabricant (bioMérieux, France) pour la culture bactérienne des souches retenues :

Le fond et le couvercle des boîtes d'incubation sont réunis, un volume d'eau distillée stérile est reparti dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide et les galeries sont placées dans les boîtes d'incubation.

Les colonies bactériennes des isolats à identifier sont diluées dans une solution de NaCl 0.9% et les inoculum sont standardisés aux concentrations cellulaires préconisées par le fabricant.

Les suspensions bactériennes sont introduites dans les tubes des galeries à l'aide d'une micropipette en évitant la formation de bulles au fond des tubes. Pour les tests CIT, VP et GEL, les tubes et cupules sont remplis. Pour les autres tests, seuls les tubes sont remplis. Les tests ADH, LDC, ODC, H₂S et URE nécessitent l'ajout d'huile de paraffine dans leurs cupules afin de créer une anaérobiose. Les galeries ainsi inoculées sont incubées à 37°C pendant 24h à 48h.

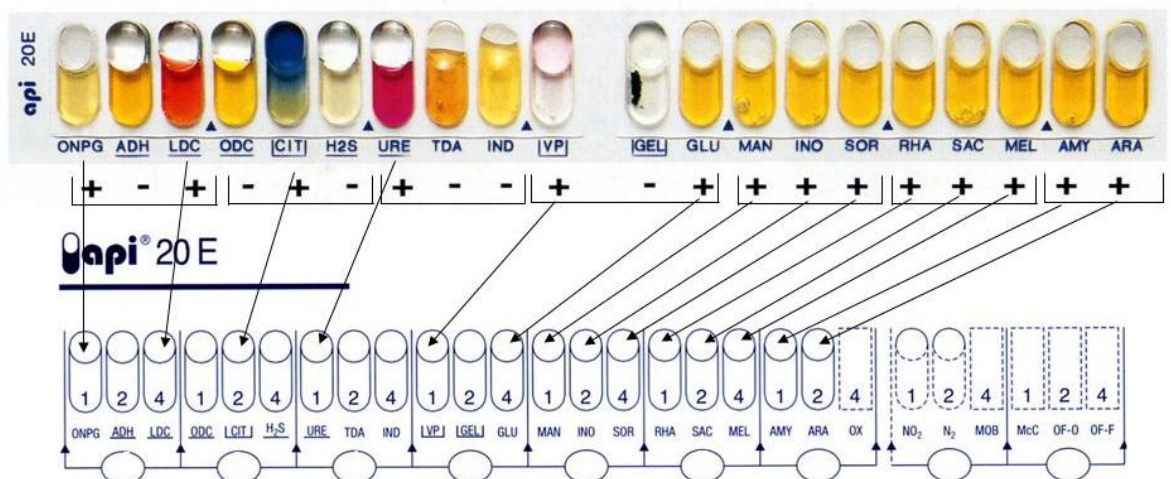
La lecture des résultats est faite en se rapportant aux guides d'utilisation, soit directement en notant le changement de l'aspect de la cupule (couleur) ou indirectement en utilisant à juste titre les réactifs de révélation (VP, NIT1 et NIT2, JAMES...). Les résultats de chaque galerie sont reportés sur les fiches d'identification sous forme de signes (+) pour les tests positifs et (-) pour les tests négatifs (**Tableau 3** et **Figure 12**).

Tableau 3 : Tableau de lecture pour la galerie API 20^E.

| TESTS | COMPOSANTS ACTIFS | QTE (mg/cup.) | REACTIONS/ENZYMES | RESULTATS | |
|------------------|-------------------------------------|---------------|---|----------------------------------|------------------------------------|
| | | | | NEGATIF | POSITIF |
| ONPG | 2-nitrophényl-β-D-galactopyranoside | 0,223 | β-galactosidase (Ortho-NitroPhényl-β-D-Galactopyranosidase) | incolor | jaune (1) |
| GLU | D-glucose | 1,9 | fermentation / oxydation (GLUcose) (3) | bleu / bleu-vert | jaune / jaune-gris |
| ARA | L-arabinose | 1,9 | fermentation / oxydation (ARABinose) (3) | bleu / bleu-vert | jaune |
| LDC | L-lysine | 1,9 | Lysine DéCarboxylase | jaune | rouge / orangé |
| ODC | L-ornithine | 1,9 | Ornithine DéCarboxylase | jaune | rouge / orangé |
| CIT | trisodium citrate | 0,756 | utilisation du CITrate | vert pâle / jaune | bleu-vert / bleu (2) |
| H ₂ S | sodium thiosulfate | 0,075 | production d'H ₂ S | incolor / grisâtre | dépôt noir / fin liseré |
| URE | urée | 0,76 | UREase | jaune | rouge / orangé |
| TDA | L-tryptophane | 0,38 | Tryptophane DésAminase | jaune | TDA / immédiat marron-rougeâtre |
| IND | L-tryptophane | 0,19 | production d'INDole | incolor vert pâle / jaune | JAMES / immédiat rose |
| OX | (voir notice du test oxydase) | - | cytochrome-OXYdase | (voir notice du test oxydase) | |
| NO ₂ | (tube GLU) | - | production de NO ₂ | NIT 1 + NIT 2 / 2-5 min jaune | rouge |

- (1) Une très légère couleur jaune est également positive.
- (2) Lecture dans le cupule (zone aérobie).
- (3) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.

Lecture des résultats de la galerie :



Résultats reportés sur la fiche d'identification

| | |
|--|--------|
| | Ident. |
|--|--------|

Se référer au catalogue pour identifier la souche à l'aide du code

Figure 12 : Fiche de lecture pour la galerie API 20^E.

L'interprétation des résultats et l'identification des isolats sont effectuées en s'appuyant sur les caractéristiques des isolats et en utilisant la fiche technique de la galerie API 20^E.

3.3. Isolement et caractérisation des bactériophages d' *E coli*

3.3.1. Titration des phages

La titration de phage permet de calculer la concentration de phages dans une solution donnée. Le principe consiste à inoculer des cultures de bactéries permissives par un volume donné de dilutions croissantes de préparation de phages. Il apparaît ainsi des plages de lyse observables macroscopiquement. Le nombre d'unité formant des plages (UFP) est alors déterminé pour chaque dilution de virus. Le titre est exprimé en UFP/mL.

La titration des bactériophages spécifiques de *E coli* est réalisée selon la technique de **Cappuccino & Welsh, (2017)**. Pour connaître la concentration des phages dans l'échantillon des eaux usées du Oued Mekerra, des dilutions décimales sont réalisées à partir de l'échantillon, puis, de chaque dilution, un volume de 100 µl est étalé sur des boîtes de Petrie préalablementensemencé d'un tapis bactérien de la souche cible (ensemencement en surface à l'aide d'un écouvillon à partir de culture bactérienne en phase exponentielle). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures. Le lendemain, les plages de lyse sont comptées et la concentration du phage est calculée comme suit :

$$\text{Nombre de plage de lyse} \times \text{dilution} \times 100 = \text{ufp/ ml (Adams, 1959)}$$

3.3.2. Isolement des bactériophages

L'isolement des bactériophages est réalisé selon la technique de **Cappuccino & Welsh, (2017)**. Cette technique comporte 2 étapes ; l'enrichissement et l'ensemencement.

Pour l'enrichissement des phages, 40 ml d'échantillon sont mis en contact avec une pré culture de la souche cible (5ml) dans 5 ml de milieu LB liquide 10 fois concentré. Le mélange est incubé à 37°C pendant 24h.

L'échantillon amplifié est ensuite centrifugé pendant 30 min à 4000 rpm, le surnageant est filtré via un filtre millipore de 0,22 µm de diamètre et le filtrat obtenu est utilisé pour la détection de l'activité lytique des bactériophages.



Figure 13 : Système de filtration (Wheaton, USA) (Benbouaziz et Satour, 2014).

Un spot est réalisé en déposant 5 μ l du filtrat au centre d'une boîte de Petrie préalablement ensemencé d'un tapis bactérien de la souche cible (ensemencement en surface à l'aide d'un écouvillon). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

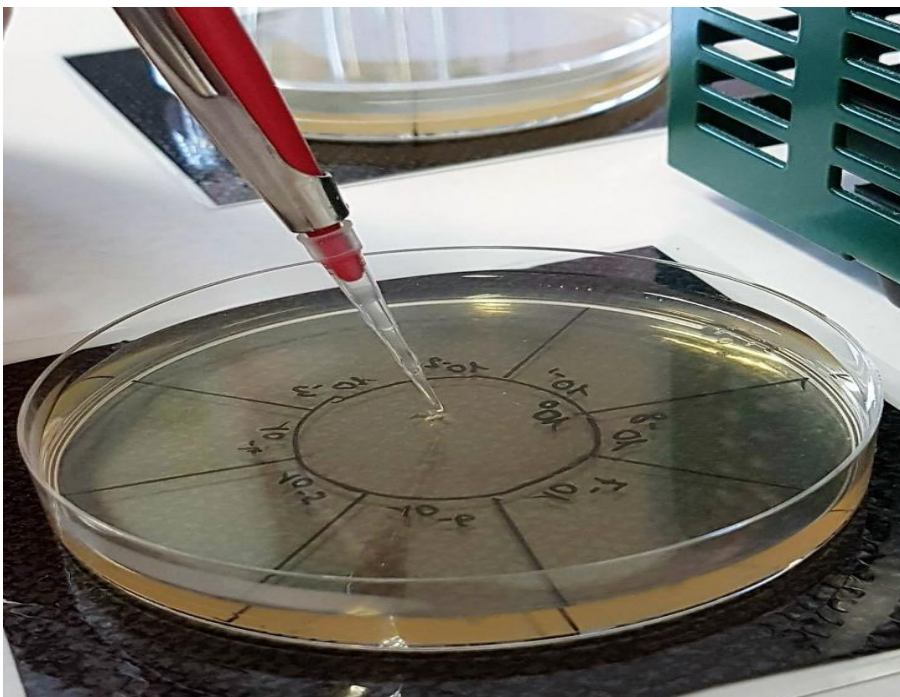


Figure 14 : La technique de spot (Anonyme 4)

En présence de lyse bactérienne, les plages de lyse sont récupérées à l'aide d'une pipette Pasteur en verre coudée, déposées dans un tube et vortexées quelques secondes avant d'être centrifugée à 4000 rpm, 10 min. Le surnageant est filtré (0.22 μm) dans un nouveau tube puis complété avec 3 ml de tampon SM (5.8 g NaCl, 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 50 ml Tris-HCl pH 7.5). Les solutions de phages ainsi obtenues sont conservées à 4°C.

3.3.3. Purification des bactériophages

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

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 d'un tapis bactérien de la souche cible (ensemencement en surface à l'aide d'un écouvillon et culture bactérienne en phase exponentielle). 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'élution repiquage sont réalisées. Les solutions de phages résultantes de la dernière étape d'élution sont conservées à 4°C et considérée comme des solutions stocks.

3.3.4. Conservation des phages

Une partie des amplifia phagiques est utilisée pour faire les stocks à 4°C telle quelle en milieu LB. Pour une conservation d'une durée plus longue les amplifia sont additionnés de glycérol à 50% puis conservés à - 20°C.

3.3.5. Cinétique de la réplication des phages

La caractérisation du cycle de réplication des phages vise à de déterminer le temps nécessaire à la fixation des virions et le ratio (MOI) permettant une amplification maximale de ceux-ci. Ces tests sont réalisés selon la technique de **Magin., (2019)** avec quelques modifications :

La détermination du temps et du taux de fixation du phage à sa bactérie hôte est réalisée en seringue, une concentration de phages (10^9 UFP/ml) est mise en contact avec une concentration égale de bactéries (ratio 1 :1) puis des prélèvements sont filtrés (via un millipore 0.22 μm à seringue) à différents intervalles de temps de contact (0, 5, 10, 15 et 20 min) à 37°C (en changeant le filtre à chaque fois). La concentration de phages dans le filtrat

est évaluée par titration sur tapis bactérien. Le taux d'adsorption, étant le pourcentage d'adoption des phages au temps de fixation (t_f), est calculé selon l'équation suivant :

$$\text{Taux d'adsorption} = \frac{[\text{concentration des phages } t_0 - \text{concentration des phages } t_f] * 100}{\text{concentration des phages } t_0}$$

Pour la détermination de la cinétique d'amplification, Le phage est amplifié tel que décrit précédemment, en utilisant différents rapports de phage/bactérie (1 :1, 1 :100 et 1 :1000) à 37°C. Le phage est titré à chaque heure pendant 8 à pour établir à quel moment l'amplification est maximale.

3.3.6. Amplification des phages

Sur le même principe que celui décrit par **(Betts et al, 2013)**, Les bactériophages isolés sont amplifiés à 37°C dans du milieu LB (20- 25 ml) en utilisant le ratio retenus après l'étude de la cinétique de la réplication des phages .Suite à une incubation de 24h, le mélange est centrifugé à 4000 rpm pendant 20 min, filtré via un filtre millipore (0,22 µm) et les concentrations en phages actifs sont évaluées par titration sur tapis bactérien.

3.3.7. Stabilité des phages

La stabilité des solutions de phages est évaluée, selon la technique de **Martineau, (2010)** en ajustant leur concentration à 10^8 ufp/ml dans le milieu de culture LB, puis, les incubant à 4°C (température de stockage), à température ambiante (pour des fins de désinfection, d'administration en solution ou de stockage) et à 37°C (conditions thermiques du corps humain) pour une durée de 2 mois. La concentration en phages des préparations est évaluée par titration tous les 15 jours. Une préparation est dite instable lorsque le ratio enregistré (titre / titre initial) est plus inférieur 0,2 deux fois consécutives **(Fortier & Moineau, 2009)**.



**RESULTATS
ET
DISCUSSION**

1. Site d'échantillon et de la souche cible

L'oued de Mekerra fait partie du bassin de la Macta, il prend origine à Crampel au sud de Bedeau (Ras el ma) dans les hautes vallées de la steppe à une cote de 1200 m d'altitude il parcourt une distance de 125km pour arriver à Sidi Bel Abbès et draine une surface de 3000 km², sa pente est de 5,5 pour cent, et il se jette dans la mer au sud d'Arzew.

Ce oued est devenu un véritable dépotoir à ciel ouvert et, par conséquent, source de diverses nuisances dues aux incessants rejets des eaux usées, les jets sauvages d'ordures ménagères et autres gravats par les riverains. L'oued Mekerra reçoit les eaux usées urbaines sur 47 points de rejet (ONA, 2007), l'équivalent de 250 L·s⁻¹ d'eaux usées (Bentekhici *et al.*, 2018).

La zone industrielle utilise un volume considérable d'eau évacuée dans le réseau domestique à plus de 80 %. Ces eaux usées industrielles riches en matière organique et métaux lourds sont évacuées vers l'oued Mekerra. La majorité des unités de production situés dans cette zone n'étant pas équipées de dispositif de traitement des eaux, les résidus industriels s'accumulent dans l'oued (Bentekhici *et al.*, 2018).

L'infiltration et la stagnation des eaux usées déversées directement dans l'oued Mekerra constituent un facteur aggravant de pollution chimique et bactériologique des eaux souterraines. L'important volume des eaux usées rejeté sans traitement dans l'oued Mekerra conduit à une forte dégradation de la qualité de la nappe alluviale et de surface, notamment les eaux du barrage Chorfa (Bentekhici *et al.*, 2018).

Selon la direction des services de l'hydraulique de Sidi Bel Abbès pour la qualité des eaux, une étude effectuée durant l'année 2010 indique que la charge polluante des eaux de l'oued Mekerra est : DBO5 de 41,296 t·a⁻¹, DCO de 123,465 t·a⁻¹, azote total 3 193 t·a⁻¹, phosphore total 2 342 t·a⁻¹. Ces valeurs font que les eaux d'oued Mekerra sont très polluées (Bentekhici *et al.*, 2018). Sur le plan bactériologique et selon Zouita *et al.*, (2018), l'analyse bactériologique de l'eau de l'oued indique une contamination par des germes différents (coliformes fécaux, streptocoque

fécaux et *Clostridium*). Ces auteurs ont enregistré des taux de coliformes égales à 3320 germes/100ml.

Dés coliformes, *E.coli* est l'espèce bactérienne commensale la plus importante de l'intestin de l'Homme et des animaux à sang chaud (10^8 par gramme de fèces). En plus de son rôle témoin de contamination fécale et de la présence d'éventuel pathogène, certains auteurs la considèrent aussi comme pathogène indiscutable pour l'Homme et l'animal et réservoir de gène d'antibiorésistance (Delery, 1999 ; James et al., 2004 ; Benabdallah-Khodja et Hamlaoui, 2016). On a longtemps pensé que *E coli* et les autres coliformes mourraient rapidement dans l'environnement aquatique limitant de ce fait leur impact en tant que réservoir hydrique de gène de résistance. Cependant, il est bien établi maintenant que de nombreux microorganismes entérique dans différents systèmes aqueux ne meurent pas mais évoluent vers un état de dormance non cultivable (Young, 1993 ; Delery, 1999).

L'élimination de ces bactéries des eaux usées s'avéré une tâche difficile, leurs teneurs restent supérieures aux limites recommandées par l'OMS même après traitement de ces eaux (Hamaidi et al., 2016). Le présent travail propose l'isolement des coliphages susceptibles d'être utilisés en phagothérapie pour influencer les techniques de traitement des eaux usées, la décontamination des eaux de l'Oued Mekkera ou même pour la lutte contre les *E coli* antibioresistantes.

L'avènement de la pandémie du Covide 19 et l'instauration des mesures préventifs par l'état, plus particulièrement le confinement et le gel des activités au sein des laboratoires des établissements universitaires du pays, ont entravés la bon conduite de la présente étude et de ce faite on s'ait retrouvé contraint à transformer le travail expérimental prévus en une analyse bibliographique.

2. Isolement et identification des souches d'*E coli*

L'isolement de souches de *E coli* devait être réalisé à partir des eaux de l'Oued mekkerra dans un site à proximité des habitations du centre-ville de la willaya où de nombreux citoyens n'hésitent pas à rejeter leurs efflux domestiques.

La stratégie d'isolement proposée met à profit d'une part l'abondance de ces microorganismes dans ce type d'échantillon et d'autre par les caractéristiques métaboliques et physiologique de ceux-ci (résistance aux sels de bile, fermentation du lactose avec production de gaz, production d'indole et la croissance à 44,5°C).

La croissance des coliformes est favorisée via ensemencement en milieu BLBVB. Dans ce milieu, la croissance des germes Gram+ est inhibée par la présence du vert brillant, et la bile, par son fort pouvoir tensioactif, inhibe la plupart des germes qui ne sont pas d'origine intestinale. La fermentation du lactose du milieu est décelée par le virage de la couleur du milieu vers le jaune et la production simultanée de gaz (**Figure 15**).



Figure 15 : Aspect de la croissance des coliformes en milieu BLBVB.

La sélection des coliformes, entre autre *E coli*, est appuyée par incubation des tubes, issus du repiquage des tubes positifs sur BLBVB et eau peptonée, à 44,5 (test de de MAC KENZIE). La fermentation du lactose avec production de gaz et l'apparition d'un anneau rouge en surface

du milieu eau peptonée, après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de KOVACS, témoigne de la production d'indole et par conséquent de la présence de *E coli* (Figure 16) (Mackenzie *et al.*, 1948).

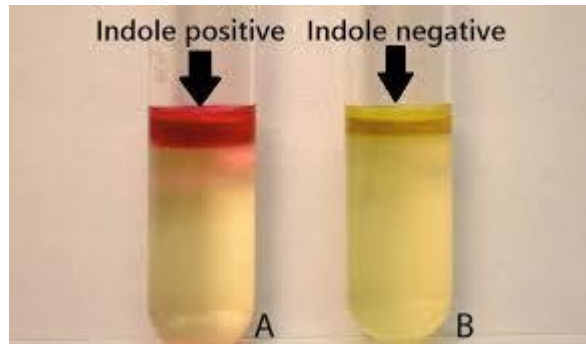


Figure 16 : Aspect des résultats du test de production d'indole sur eau peptonée.

L'isolement d'*E coli* est généralement effectué sur gélose EMB, La EMB agar contient des colorants tels que l'éosine et le bleu de méthylène qui inhibent les bactéries Gram-positives. Les colonies de *E coli* sont circulaires, plates, de 2 à 3 mm de diamètre, de couleur violet très foncé avec généralement un reflet métallique et centre noir pourpre en lumière transmise (Figure 17).

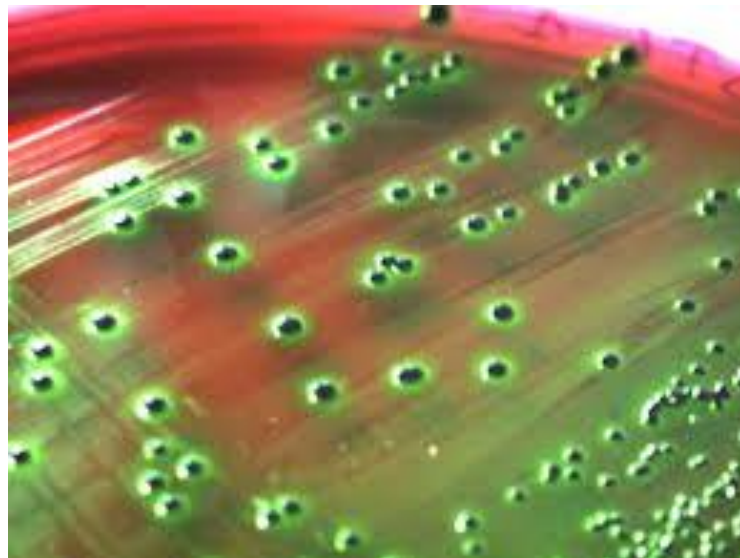


Figure 17 : Aspect des colonies de *E coli* sur milieu EMB.

Sous microscope, *E coli* se présentent sous forme de bacilles à Gram négatif (**Figure 18**), mesurant 2 à 4 μm de long sur 0.4 à 0.6 μm de large. C'est une bactérie fine et allongée à extrémités arrondies, mobile grâce à une ciliature péritriche (**Avril et al., 2000**).



Figure 18 : Aspect de *E coli* en coloration de Gram.

E.coli est une bactérie aéro-anaérobie facultatif, elle possède une catalase mais elle est dépourvue d'oxydase (**Figure 19**).

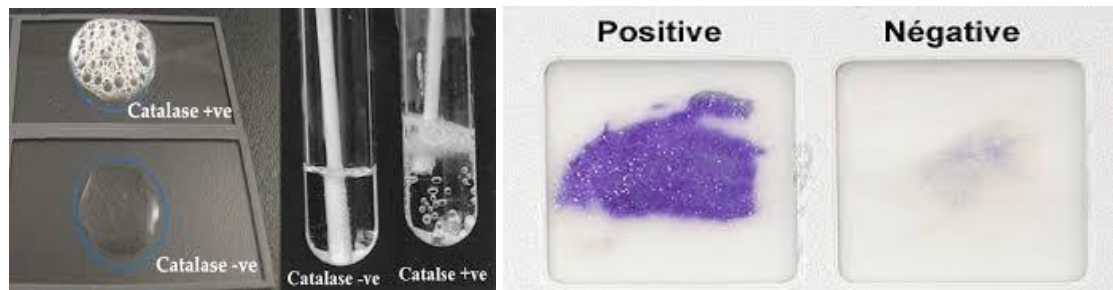


Figure 19 : Exemple des résultats des tests pour la recherche de catalase (à gauche) et d'oxydase (à droite) (**Anonyme 6 et anonyme 7**).

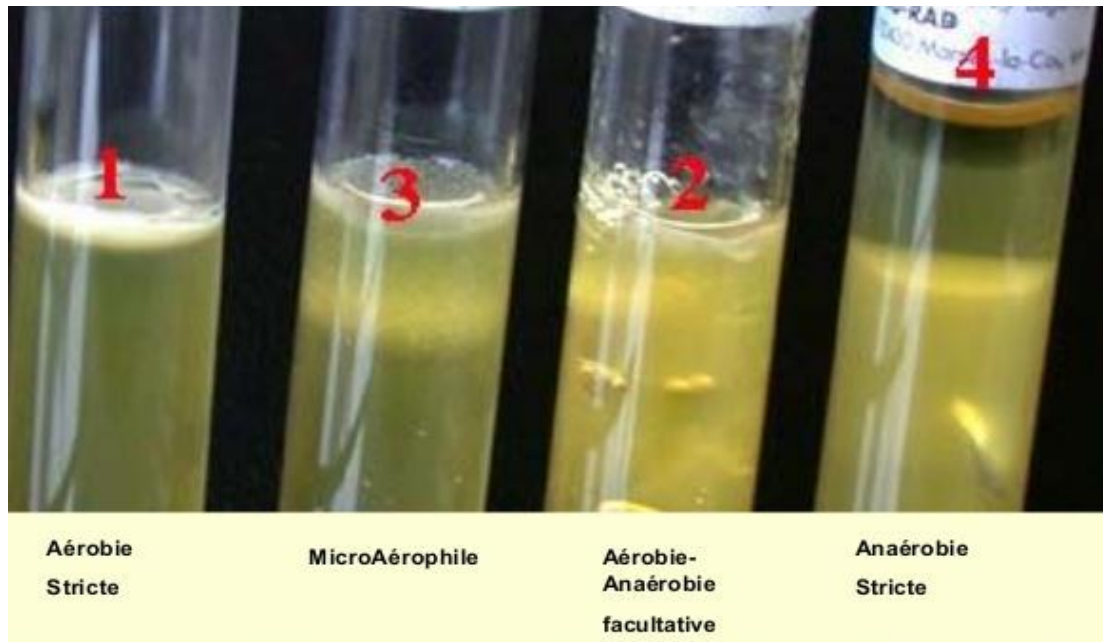


Figure 20 : Exemple des résultats des tests pour la recherche du type respiratoire (Anonyme 8).

2.1. Identification biochimique

L'identification des souches d' *E coli* se réalise via l'étude d'activités enzymatiques et de la fermentation des sucres le plus souvent effectuée à l'aide de mini systèmes d'identification disponibles dans le commerce sous forme de galeries (exemple la galerie API 20E). Ces dernières permettent l'identification de cette bactérie ainsi que le diagnostic différentiel avec les autres bactéries de la même famille (Lobril, 1998; Edler, 2001; Flaudrois, 2004; Avril *et al.*, 2006; Benabdallah-Khodja et Hamlaoui, 2016)

Le profil biochimique obtenus sert à une interprétation soit via le tableau d'identification (Tableau 4) soit via une base de données en ligne pour l'identification de bactéries et de levures « APIWEB™ » ou encore via l'usage d'un logiciel informatique tel que Identax bacterial identification system version 1.2 (Figure 21).

Tableau 4 : Tableau d'identification du catalogue analytique API 20^E (Anonyme 1)

api® 20 E TM 07584J - xi - 2010/05

TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTABELLE / TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / QUADRO DE IDENTIFICAÇÃO / ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ / IDENTIFIKATIONS TABEL / IDENTIFIERINGSTABELL / TABELA IDENTYFIKACYJNA
 % de réactions positives après 18-24 / 48 h à 36°C ± 2°C / % of positive reactions after 18-24 / 48 hrs. at 36°C ± 2°C / % der positiven Reaktionen nach 18-24 / 48 h bei 36°C ± 2°C /
 % de las reacciones positivas después de 18-24 / 48 h a 36°C ± 2°C / % di reazioni positive dopo 18-24 / 48 ore a 36°C ± 2°C / % de reacções positivas após 18-24 / 48 h a 36°C ± 2°C /
 % θετικών αντιδράσεων μετά από 18-24 / 48 ώρες στους 36°C ± 2°C / % positiva reaktioner efter 18-24 / 48 timmar vid 36°C ± 2°C / % af positive reaktioner efter 18-24 / 48 timer ved 36°C ± 2°C /
 % pozytywnych reakcji po 18-24 / 48 godzinach w 36°C ± 2°C

| API 20 E | V4.1 | ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H2S | URE | TDA | IND | VP | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | OX | NOZ | NZ | MOB | MCC | OF10 | OFF | |
|-----------------------------------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|------|-----|-----|
| Butyrivibrio fermentans | 100 | 0 | 0 | 85 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | 1 | 99 | 0 | 92 | 99 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | |
| Clostridium botulinum | 99 | 89 | 0 | 99 | 75 | 0 | 0 | 0 | 0 | 85 | 0 | 0 | 100 | 100 | 10 | 0 | 0 | 100 | 0 | 100 | 1 | 0 | 99 | 0 | 87 | 100 | 100 | 100 | |
| Clostridium histolyticum | 99 | 89 | 0 | 99 | 75 | 0 | 0 | 0 | 0 | 85 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100 | 1 | 0 | 99 | 0 | 87 | 100 | 100 | 100 | 100 | |
| Citrobacter brasiliensis | 50 | 45 | 0 | 99 | 75 | 51 | 1 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 1 | 100 | 100 | 1 | 91 | 99 | 99 | 0 | 100 | 0 | 95 | 100 | 100 | 100 | |
| Citrobacter freundii | 90 | 24 | 0 | 0 | 75 | 75 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 100 | 99 | 25 | 99 | 99 | 99 | 82 | 40 | 99 | 0 | 100 | 0 | 95 | 100 | 100 | 100 | |
| Citrobacter koseri/ferroplasticus | 99 | 75 | 0 | 100 | 97 | 0 | 1 | 0 | 99 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 25 | 99 | 99 | 1 | 1 | 98 | 99 | 0 | 100 | 0 | 95 | 100 | 100 | 100 | |
| Citrobacter koseri/ferroplasticus | 99 | 2 | 0 | 100 | 25 | 0 | 1 | 0 | 99 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 1 | 99 | 99 | 99 | 80 | 99 | 99 | 0 | 100 | 0 | 95 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Citrobacter youngae | 100 | 99 | 0 | 1 | 99 | 99 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | 95 | 100 | 1 | 0 | 25 | 100 | 0 | 85 | 0 | 95 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Edwardsiella ictalurae | 0 | 0 | 100 | 99 | 99 | 94 | 0 | 0 | 99 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Edwardsiella tarda | 0 | 0 | 100 | 99 | 99 | 94 | 0 | 0 | 99 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 98 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Enterobacter aerogenes | 99 | 0 | 99 | 96 | 82 | 0 | 1 | 0 | 0 | 85 | 0 | 0 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 0 | 100 | 0 | 97 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Enterobacter amnigenus 1 | 99 | 25 | 0 | 99 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 75 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | 99 | 100 | 99 | 99 | 99 | 99 | 0 | 100 | 0 | 92 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Enterobacter amnigenus 2 | 99 | 40 | 0 | 99 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 75 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | 99 | 100 | 1 | 99 | 99 | 99 | 0 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Enterobacter asburiae | 100 | 25 | 0 | 99 | 90 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 100 | 99 | 25 | 100 | 0 | 99 | 0 | 100 | 100 | 0 | 100 | 0 | 95 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Enterobacter cancerogenus | 100 | 75 | 0 | 99 | 99 | 0 | 0 | 0 | 0 | 89 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | 1 | 100 | 1 | 1 | 100 | 100 | 0 | 100 | 0 | 99 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Enterobacter cloacae | 98 | 82 | 1 | 92 | 90 | 0 | 1 | 0 | 0 | 85 | 0 | 0 | 99 | 99 | 12 | 90 | 85 | 96 | 90 | 99 | 99 | 0 | 100 | 0 | 95 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Enterobacter gergoviae | 99 | 0 | 32 | 100 | 75 | 0 | 99 | 0 | 0 | 90 | 0 | 0 | 100 | 99 | 23 | 88 | 100 | 99 | 100 | 99 | 100 | 0 | 100 | 0 | 90 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Enterobacter sakazakii | 99 | 0 | 0 | 99 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 97 | 0 | 88 | 99 | 100 | 86 | 99 | 0 | 100 | 0 | 97 | 100 | 100 | 100 | 100 | |
| Enterobacter sakazakii | 100 | 96 | 0 | 91 | 94 | 0 | 1 | 0 | 25 | 91 | 10 | 10 | 100 | 100 | 75 | 8 | 99 | 99 | 99 | 99 | 99 | 0 | 100 | 0 | 96 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Escherichia coli 1 | 90 | 1 | 74 | 70 | 0 | 1 | 3 | 0 | 89 | 0 | 0 | 0 | 99 | 98 | 1 | 91 | 82 | 36 | 75 | 3 | 99 | 0 | 100 | 0 | 95 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Escherichia coli 2 | 25 | 1 | 45 | 20 | 0 | 1 | 1 | 0 | 50 | 0 | 0 | 0 | 99 | 90 | 1 | 42 | 30 | 3 | 3 | 1 | 70 | 0 | 100 | 0 | 5 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Dans les deux derniers cas, l'identification de la souche est faite en se référant à une matrice d'identification permettant une interprétation probabilistique du profile biochimique.

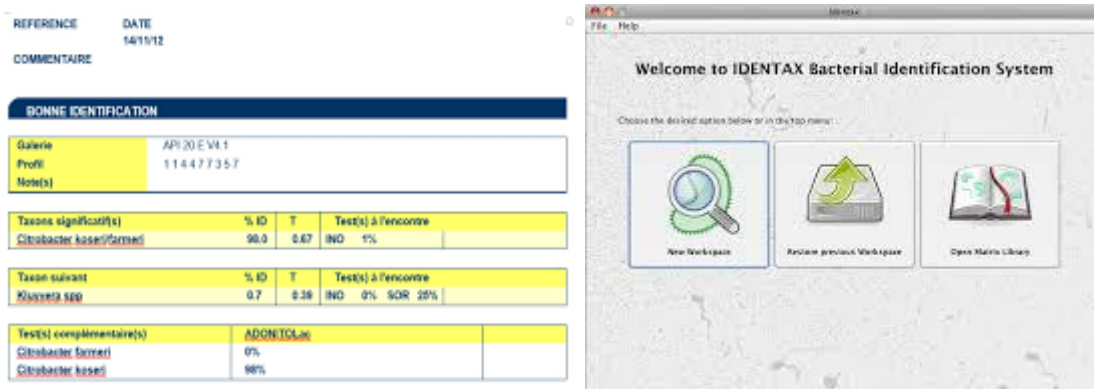


Figure 21 : Outils informatique d'identification bactérienne (à gauche : APIWEB™ ; à droite : Identax bacterial identification system version 1.2).

Le profile biochimique caractéristique de E coli sur galerie API 20E est illustré dans le **tableau 6** et la **figure 16**.

Tableau 5 : Les caractères biochimiques d'Escherichia coli

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



Figure 22 : Exemple de galerie Api20, appliquée sur *E coli*

3. Isolement et caractérisation des bactériophages d' *E coli* "coliphage"

Les coliphages sont des bactériophages qui infectent *E. coli*. Le terme «coliphage» désigne 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 type 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).

3.1. Titration des phages

La titration des phages est la technique par laquelle on détermine la charge virale ou le nombre de particules virales phagiques présentes dans un échantillon donné. La technique ne permet le dénombrement que des phages spécifique à la bactérie indicatrice utilisé, les coliphage dans le cas de cette étude. Son principe repose sur la faculté de ces virus à induire la lyse de la bactérie hôte en générant des plages de lyse (Figure 23). Le dénombrement des plages de lyse obéit au règle de dénombrement appliqués aux colonies bactériennes sur milieu solide : ne sont retenus pour le dénombrement que les boites contenant de 30 à 300 plages de lyse, le nombre de plages de lyse obtenu est reporté à la dilution correspondante et

les résultats sont exprimés en nombre d'UFP (unité formant plage de lyse) ou encore en log décimal de celle-ci.

Les bactériophages sont très abondants dans le milieu aquatique, leur titre varie de 10^4 ml⁻¹ à plus de 10^8 ml⁻¹ (Bergh *et al.*, 1989). Les nombres sont généralement 3 à 10 fois plus élevés que les bactéries (Weinbauer, 2003). La relation des phages avec le nombre et l'activité bactérienne implique que la majorité des virus aquatiques soit des phages.

Les coliphages sont détectés dans 100% des échantillons d'eaux usées brutes testés à travers le monde (Mathlouthi, 2011 ; Jofre *et al.*, 2016). La teneurs de ces échantillons en coliphages somatiques varie de 5×10^6 à 10^7 PFU par 100 ml, pour les coliphages 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).

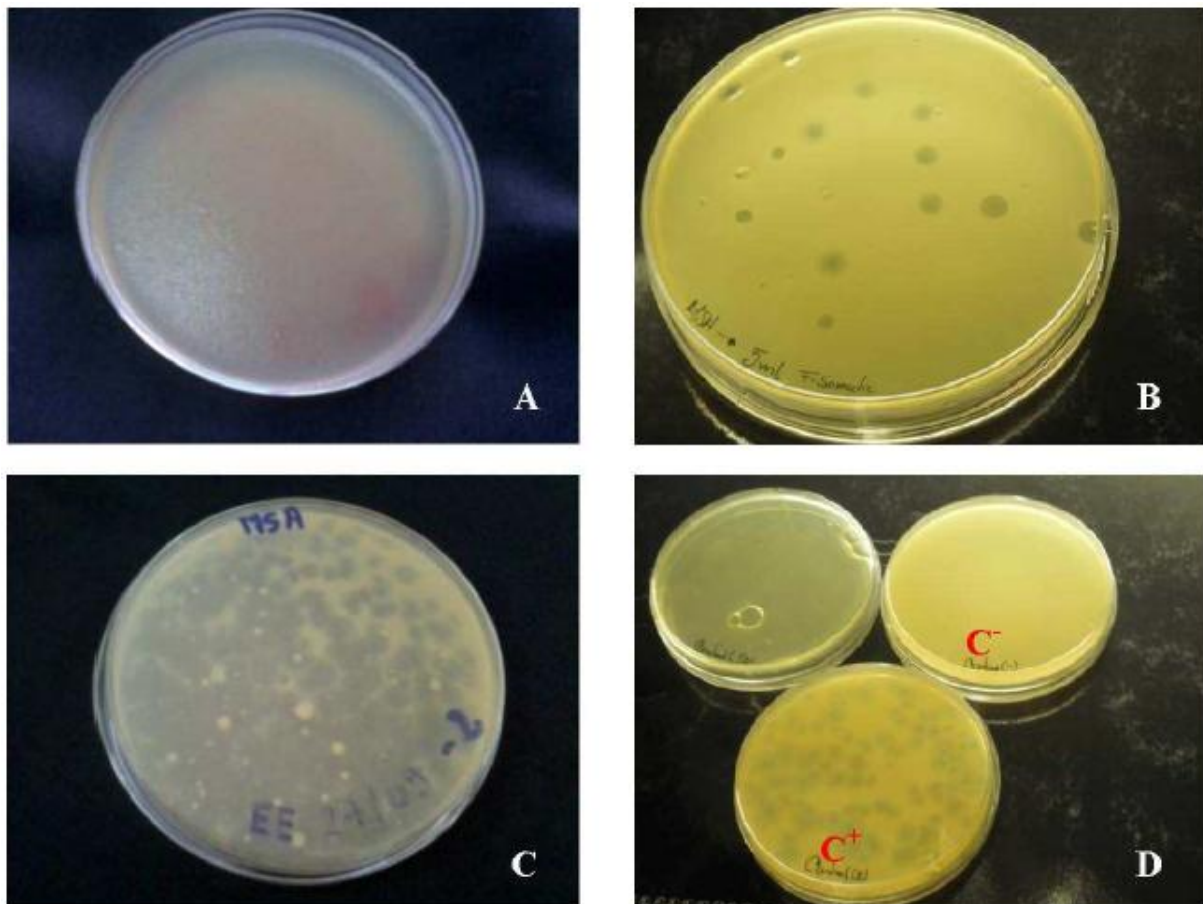


Figure 23 : Titration des bactériophages, A : absence de plages de lyse (tapis bactérien), B : échantillon dilué avec plages de lyse séparées et dénombrables, C : échantillon non dénombrable, D : contrôles négatif (C-) et positif (C+) (Mathlouthi, 2011).

En ce qui concerne les sources de contamination animale (lisier, fumier et eaux usées des abattoirs), les valeurs rapportées vont de 10^4 à 4×10^8 UFP / 100 ml pour les coliphages somatiques et de 104 UFP /100 mL à 2×10^8 pour les bactériophages F spécifiques (Grabow *et al.*, 1993; Hill et Sobsey, 1998 ; Blanch *et al.*, 2006).

3.2. Isolement des coliphages

Les méthodes traditionnellement utilisées pour l'isolement et la caractérisation de la diversité de ces phages 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 souche bactérienne donnée (Figure 24) (Carlson, 2005 ; Kutter, 2009). Les petites gouttelettes du lysat de la bactérie sont déposées sur un milieu de culture gélosé préalablementensemencé avec la souche bactérienne à tester. Parfois, différentes concentrations de lysat 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).

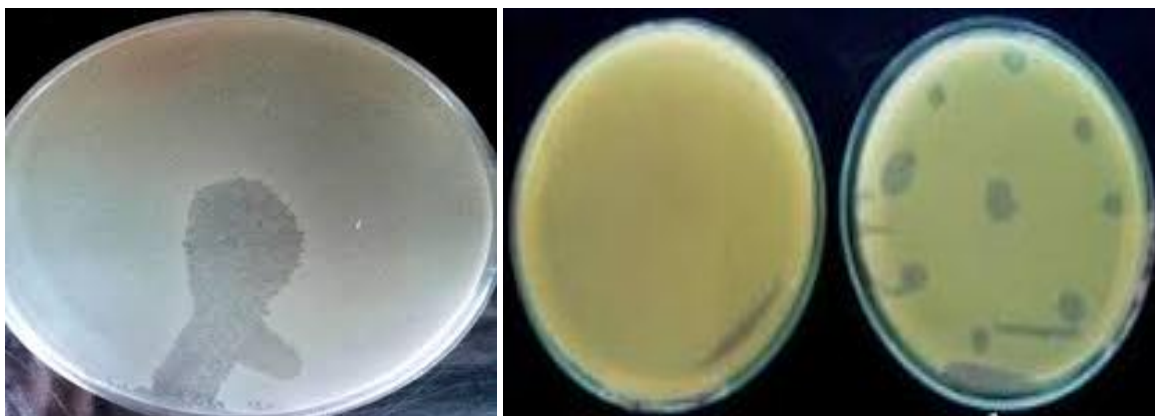


Figure 24 : Exemple de résultats du spot test pour l'isolement des bactériophages.

La puissance de cette technique réside dans son utilité pour la caractérisation phénotypique et le comptage des phages viables et, dans la détermination de leur spectre d'hôtes. Dans les échantillons environnementaux, il est souhaitable que l'hôte bactérien indicateur utilisé

soit isolé du même échantillon, ceci garanti une représentation équitable du type d'hôtes que le phage a rencontrés dans son passé récent (**Abedon, 2008**) et permet d'éviter la possibilité de résistance (**Jończyk-Matysiak et al., 2019**).

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

Les coliphages sont détectés dans 100% des échantillons d'eaux usées brutes testés à travers le monde (**Mathlouthi, 2011 ; Jofre et al., 2016**). Ceci a fait qu'ils soient utilisés comme indicateurs à la fois fécaux et viraux dans les recherches académiques depuis de nombreuses années (**Jofre, 2007**). La haute concentration de coliphages dans les eaux usées brutes et de nombreuses autres matrices contaminées par des restes fécaux, les méthodes de détection et de dénombrement simples, rapides et économiques, leur persistance dans l'eau et l'environnement, et leur résistance aux traitements utilisés pour les virus les rendent d'excellent indicateurs de substitution pour une large gamme d'applications (**Jofre et al., 2016**).

Les applications non cliniques de la phagothérapie ont suscité un intérêt pour leur potentiel de contrôle de procédés de traitement des eaux usées. En effet, **Thomas et al., (2002)** ont déjà commencé des enquêtes sur le rôle des coliphages dans le traitement des eaux usées. **Wommack et Colwell (2000)** ont concluent que l'ajout de particules virales concentrées avait tendance à réduire les populations bactériennes de 20 à 40%.

3.3. Cinétique de la réplique des phages

Le cycle de vie d'un virus peut être divisé en trois étapes successives : (1) «recherche» d'une cellule hôte sensible pour initier une infection, (2) production d'une descendance virale à l'intérieur de l'hôte infecté, et (3) sortie de la cellule hôte actuelle pour démarrer un nouveau cycle d'infection. Pour un bactériophage lytique (phage), les trois étapes de son cycle de vie correspondent aux processus d'adsorption, de maturation

et de lyse. Les taux des particules virales à chaque étape et le timing de ces processus peuvent donc être considérés comme des traits caractéristiques du cycle biologique d'un phage (Shao, et Wang, 2008). Ils permettent d'évaluer l'efficacité de l'infection phagique.

Les rapports phage : bactéries, ce que l'on appelle la multiplicité de l'infection (MOI), le taux de réplication maximal du phage, le temps de latence et le taux et le temps d'adsorption sont des caractéristiques phagiques cruciales pour le processus de production de phages. Pour usage thérapeutique, on préfère les phages avec un taux d'adsorption et de réplication élevé et une courte période de latence (Merabishvili *et al.*, 2018)

Il est possible d'évaluer la cinétique d'adsorption, taux et temps d'adsorption, d'un phage à sa bactérie hôte en mettant des concentrations élevées de phages et de bactéries en contact et en filtrant à différents temps pour déterminer la concentration de phage libre.

Les résultats rapportés dans la littérature pour le taux et temps d'adsorption des coliphages, dont un exemple est présenté en Figure 25, montre que ceux-ci dépendent non seulement du phage, mais également de l'hôte et de l'environnement.

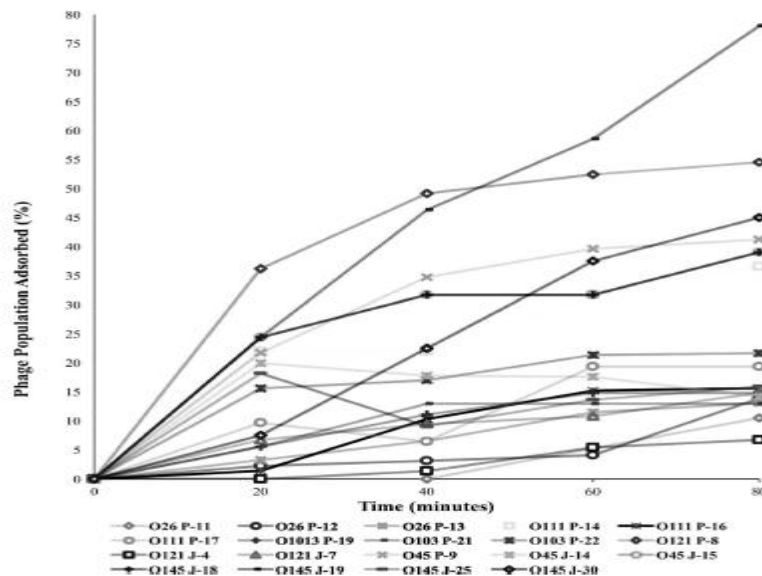


Figure 25 : Exemple de résultats d'une cinétique d'adsorption des coliphages (Litt *et al.*, 2018)

Sur le plan phage : des coliphages des familles des *Myoviridae* et des *Siphoviridae*, isolé par **Yildirim et al., (2020)**, ont présentés un taux d'adsorption très élevé de 92,7 à 97,5% dans les cinq premières minutes du processus d'incubation. **Litt et Jaroni, (2017)** ont noté que le temps d'adsorption de sept coliphages appartenant à ces même familles étaient très lents (20 min) et seulement 41% des populations initiales de phages s'adsorbait à la surface de la cellule hôte. La caractérisation de la cinétique d'adsorption de 19 coliphages appartenant aux familles des *Myoviridae*, *Siphoviridae*, ou *Tectiviridae*, par **Litt et al., (2018)**, a montré que sur les 19 phages, P-8 (O121) a présenté le temps d'adsorption le plus rapide, seulement 20 min pour que 38% de la population soit adsorbée sur la cellule hôte surface. En revanche, le phage J-19 (O145) a exprimé le taux d'adsorption maximal, avec 78% de la population initiale adsorbé après 80 min d'incubation.

Sur le plan hôte : dans le cas d'*E. coli*, par exemple, de faibles taux de croissance bactérienne sont associés à des taux d'adsorption des phages, périodes de latence plus longues et taux de réplication plus petites (**Abedon, 2008**). En revanche, quand le taux de croissance de la bactérie l'hôte augmente, la même souche de phage T4 augmente son taux de réplication (**Hadas et al., 1997**).

L'étude de la cinétique de réplication des phages vise la détermination du temps de lyse et du taux de réplication maximal, elle est souvent réalisée en utilisant différents ratios de phage/bactérie (MOI : « multiplicity of infection ») et consiste à amplifier le phage en évaluant sa concentration à différents temps d'incubation.

La valeur MOI optimale est considérée comme valeur du MOI à laquelle le phage produit un taux de réplication maximum. On aurait tendance à croire que, plus la quantité de phages au départ est grande, meilleurs seraient les rendements. En réalité, plus la concentration de départ du phage est faible par rapport à celle de la bactérie, mieux le phage s'amplifie *in vitro*. Comme les phages disposent d'une grande quantité de bactéries, qui agissent ici comme « substrats », ils peuvent se multiplier plus rapidement et plus efficacement (**Martineau, 2010**). Selon **Yildirim et al., (2020)**, le MOI optimale pour des coliphages de la familles des

Myoviridae varies selon la souche phagique de 0,001 à 0,1. Les MOI classiquement utilisés varient de 0,01 et 100 (Ly-Chatain, 2014).

La cinétique de répliation (temps de lyse et du taux de répliation maximal) dépend non seulement du MOI mais également du phage (Figure 26), de l'hôte et de l'environnement.

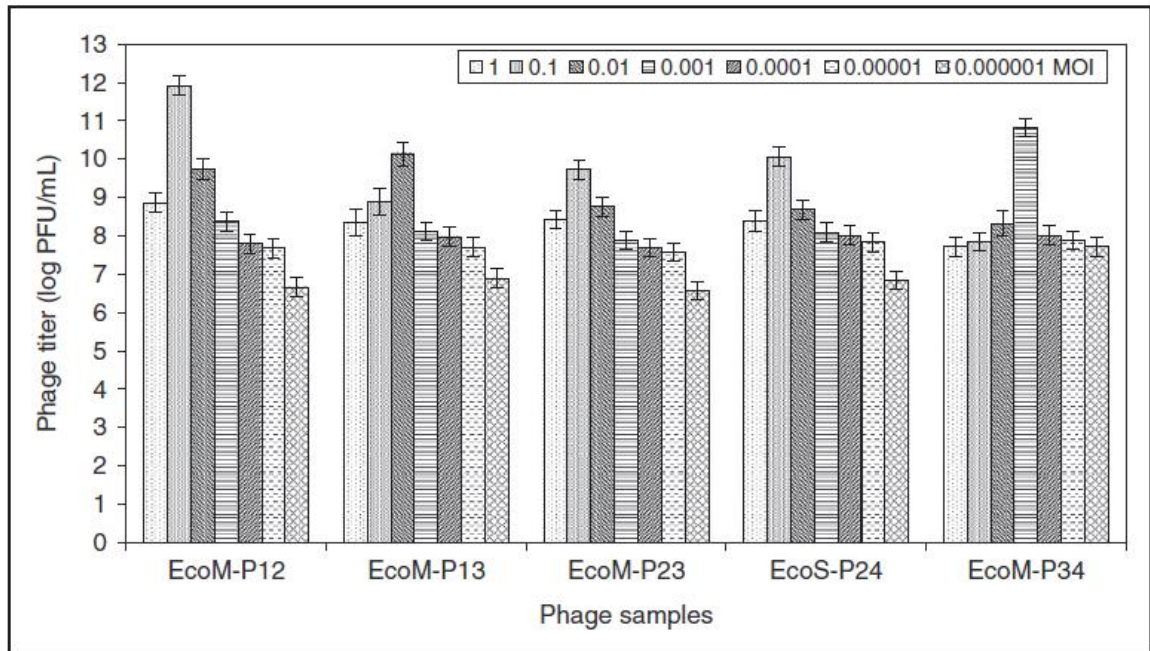


Figure 26 : Variation du taux de répliation maximum en fonction du MOI et de la souche phagique (Yildirim et al., 2020)..

Pour les coliphages, Litt et Jaroni (2017) ont enregistré des taux de répliation variant de 89 et 631 UFP / cellule. Yildirim et al., (2020) ont rapporté des taux de répliation allant de 72 à 144 PFU/cellule. Alors que Ateba et Akindolire, (2019) ont pu isolé des souches phagique avec des taux de répliation de 374, 349 et 419 PFU/cellule en utilisant la même souche que Yildirim et al., (2020)

3.5. Stabilité des phages

La température est un facteur déterminant pour la survie des bactériophages (Olson et al., 2004). Elle joue un rôle fondamental dans l'attachement, pénétration, multiplication et durée de la période de latence (dans le cas des phages lysogènes). Des températures en dessous de la valeur optimale diminuent le taux de pénétration du matériel génétique

phagique dans les cellules hôtes bactériennes et réduisent, par conséquent, le nombre de phage impliqué dans la phase de multiplication. Des températures plus élevées peuvent prolonger la durée de la phase latente (**Tey et al., 2009**). De plus, la température détermine l'abondance, la viabilité, et le stockage des bactériophages.

Feng et al., (2003) ont étudié la capacité de survie de coliphages (MS2 et Q β) dans l'eau et les eaux usées et à différentes températures. Les deux phages ont présenté une bonne stabilité à des températures allant de 5 à 35 ° C. Aussi, les coliphages, isolé par **Litt et Jaroni, (2017)**, sont restés stables pendant 90 jours sous stockage réfrigéré (4°C).



**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

Les applications non cliniques des bactériophages ont suscité un intérêt pour leur potentiel de contrôle des procédés de traitement des eaux usées. Le présent travail propose l'isolement des coliphages susceptibles d'être utilisés en phagothérapie pour influencer les techniques de traitement des eaux usées, la décontamination des eaux de l'Oued Mekkera ou même pour la lutte contre les *E coli* antibioresistantes.

L'avènement de la pandémie du Covid 19 et l'instauration des mesures préventifs par l'état ont entravés la bonne conduite de la présente étude et de ce fait on s'est retrouvé contraint à transformer le travail expérimental prévu en une analyse bibliographique.

Les travaux scientifique analysés se consentent sur l'abondance des bactériophages dans l'environnement, notamment le milieu aquatique. Les coliphages, plus spécifiquement, sont détecté dans 100% des échantillons d'eaux usées brutes testés à travers le monde, leur nombre varie de 10^4 à 10^7 PFU/100 ml. Les eaux usées brute constituent donc un échantillon de choix pour l'isolement des coliphages .

Ils admettent l'importance de l'étude de la stabilité et de la réplication des phages car ils conditionnent les résultats de la phagothérapie et la réussite de celle-ci dépendent de la concentration de phages (c'est-à-dire de la dose) délivrée au site de l'infection et de leur capacité à cibler et arrêter la croissance bactérienne et éliminer l'infection.

La haute concentration de coliphages dans les eaux usées brutes, les méthodes de détection et de dénombrement simples, rapides et économiques, leur persistance et leur résistance aux traitements utilisés pour les virus les rendent d'excellent indicateurs de contamination fécale et virale et des outils efficaces pour influencer les techniques de traitement des eaux usées et la lutte contre les *E coli* antibioresistantes.



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Abedon, S. T. (Ed.). (2008). *Bacteriophage ecology: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses* (Vol. 15). Cambridge University Press.

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

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

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

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

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

Adams, M.H. (1959). "Methods of study of bacterial viruses." In *Bacteriophages Interscience Publishers*, London, UK 447-448.

Agirrezabala. X, Velázquez-Muriel. J.A, Gómez-Puertas. P, Scheres. S.H, Carazo. J.M, Carrascosa. J.L. (2007). Quasi-atomic model of bacteriophage t7 procapsid shell: insights into the structure and evolution of a basic fold. *Structure*;15(4);p 461-472.

Agún, S., Fernández, L., González-Menéndez, E., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2018). Study of the Interactions Between Bacteriophage phiIPLA-RODI and Four Chemical Disinfectants for the Elimination of *Staphylococcus aureus* Contamination. *Viruses*, *10*(3), 103. <https://doi.org/10.3390/v10030103>

Anonyme1 :<http://www.biologiemarine.com/micro/bacphage.htm>.(Consultation le 5/ 3/2020).

Anonyme 2: Lysogenic cycle - phage lambda in: biology 1151, principles of biological science [en ligne]. [<http://bio1151b.nicerweb.net/>] (Consultation le 01/08/2020).

Anonyme 3 : <https://villesidibelabbes.files.wordpress.com/2016/11/175.jpg>. (Consultation le 01/09/2020).

Anonyme 4: <http://droguet-sebastien.e-monsite.com/pages/activites-technologiques-terminale-2014-2015/at26-bacteriophages.html><http://droguet-sebastien.e-monsite.com/pages/activites-technologiques-terminale-2014-2015/at26-bacteriophages.html> (Consultation le 02/09/2020).

Anonyme 5: <https://images.app.goo.gl/ipSTMD84TweT176D7> (Consultation le 14/09/2020).

Anonyme 6: <https://images.app.goo.gl/51NqzTcLLFTyxUAg9> (Consultation le 15 /09/2020).

Anonyme 7: <https://images.app.goo.gl/uQzhCvP1eLfRbCDK8> (Consultation le 15/09/2020).

Anonyme 8: <https://images.app.goo.gl/MX5Kw8yRq4MJRAuz7> (Consultation le 16/09/2020).

Ateba, C. N., & Akindolire, M. A. (2019). Isolation and characterisation of bacteriophages with lytic activity against virulent *Escherichia coli* O1.

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

Avril J.L., Denis F., Dabernat H., Monteil H. (2000). *Bacteriologie clinique*. 2^{ème} édition Marketing, paris. Pages 148-280.

AVRIL JL, MONTEIL H, DOBERNAT H, DENIS F. (2006). *Bacteriologie clinique*. Edition ELLIPSE.

AWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology. (1991). Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res.*, 25, 529–545. *Bacteriophage*, 1(1) : 31–45.

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

Benabdallah-Khodja A., Hamlaoui Y. (2016). Etude phénotypique de quelques souches d'Escherichia coli productrices des carbapénèmes. Mémoire de master. Université des Frères Mentouri Constantine.

Benbouaziz, A. Satour, A. (2014). Etude sur les Bactériophages et leur isolement à partir des eaux usées de la station d'épuration de chelghoum El-Aid, mémoire : université Constantine 1.

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.

Bergh O, Borsheim K Y, Bratbak G and Haldal M. (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. Nature. 340: 467–468.

Betts, Alex, Vasse, Marie, Kaltz, Oliver, et al., (2013). Back to the future: Evolving bacteriophages to increase their effectiveness against the pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Evol. Appl. 6, 1054–1063. <https://doi.org/10.1111/eva.12085>.

Blanch, A.R.; Belanche-Muñoz, L.; Bonjoch, X.; Ebdon, J.; Gantzer, C.; Lucena, F.; Ottoson, J., Kourtis, C., Iversen, A., Kühn, I.; et al. (2006). Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. Appl. Environ. microbiol. 72, 5915–5926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

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

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

Carlson, K. (2005). Working with bacteriophages: Common techniques and methodological approaches In: Kutter E, Sulakvelidze A, editors. Bacteriophages: Biology and Application. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. pp. 437–494. [[Google Scholar](#)]

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

Chan B.K., Sistro M., Wertz J.E., Kortright K.E., Narayan D., Turner P.E. (2016). Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature scientific reports*, 26(6), 7p.

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

Clokie, M.R., Millard A. D., Letarov A. V. et Heaphy, S. (2011). Phages in nature.

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

Comeau A.M., Tétart F., Trajet S.N., Prère M.F., Krisch H.M. (2007). Phage-antibiotic synergy (PAS) : β -lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. *PLoS One*, 2(8), e799.

Comeau A.M., Tétart F., Trajet S.N., Prère M.F., Krisch H.M. (2008). La «synergie phages antibiotiques» : un enjeu pour la phagothérapie. *Médecine sciences*, 24, pp. 449-451.

Contreras-Coll, N., Lucena, F., Mooijman, K.; Havelaar, A., Pierz, V., Boque, M.; Gawler, A.; Höller, C., Lambiri, M., Mirolo, G.; et al. (2002). Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. *Water Res.* 36, 4963–74. [CrossRef]

D'Hérelle F. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Compte rendu de l'Académie des Sciences*. 1917;165:373–5. [[Google Scholar](#)]

D'Hérelle F. (1918). Sur le rôle du microbe filtrant bactériophage dans la dysenterie bacillaire. *Compte rendu de l'Académie des Sciences*. 167:970–2. [[Google Scholar](#)].

D'Hérelle F. (1925). Essai de traitement de la peste bubonique par le bactériophage. *La presse Médicale*. 33:1393. [[Google Scholar](#)].

D'Hérelle F.(1919). Sur le microbe bactériophage. Comptes rendus de la Société de Biologie. 82:1237. [[Google Scholar](#)]

D'hérelle F. (1926). Le bactériophage et son comportement: masson.

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

Dublanchet a, Patey o. (2011). La phagothérapie : passé et avenir (faits nouveaux et procédure [s] pour une réhabilitation). immuno-analyse & biologie spécialisée, 26(4) : 165-75.

Dublanchet A. (1917). Des virus pour combattre les infections. favre ed 2009: 115 21).

Dublanchet A. (2008). Fruciano E. Brève histoire de la phagothérapie. Med Mal infect. 38:415–20. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)].

Dublanchet A. (2009). Editor. Des virus pour combattre les infections. Favre Ed. Premiers traitements ; pp. 108–9. [[Google Scholar](#)].

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

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

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

EDLER L. (2001). The Role of the biostatistician. Introduction to the clinical Drug Resaerch. Vienna School oh Clinical Drug Resaerch. 22-26. Page15.

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.

FDA (Food additives permitted for direct addition to food for human consumption): Listeria-specific bacteriophage preparation In: U.S. Food and Drug Administration [en

ligne].[\http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=172.785
] Consulté le 25/11/13).5

Feng YY, Ong SL, Hu JY, Tan XL, Ng WJ (2003) Effects of pH and temperature on the survival of coliphages MS2 and Qbeta. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:549–552

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

FLAUDROIS JP. (2004). BactérioGéné/croissance bactérienne. Cours de Bactériologie Médical DCEMI, UFR Médecine Lyon Sud-laboratoire de Biométrie .Pages 1-3-10.

Flint, SJ, LW Enquist, RM Krug, VR Racaniello et AM Slalka. (2000).Principes de Virologie.ASM Press, Washington, and ISBN : 1-55581-127-2, pp : 3-15.

Fortier, L.-C., & Moineau, S. (2009). Phage Production and Maintenance of Stocks, Including Expected Stock Lifetime. In M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski (Eds.), *Bacteriophages: Methods and Protocols* (Vol. 501, pp. 203-219).

future.*International Journal of Current Microbiology and Applied*, 4(2):867-879.

Gandham, P. (2015). Bacteriophages: their use in the treatment of infections in the

Gilmore b. (2012). Bacteriophages as anti-infective agents: recent developments and

Grabow,W.O.K.; Holtzhausen, C.S.; de Villiers, J.C. (1993). Research on Bacteriophages as indicators of Water Quality; WRC Report No. 321/1/93; Water Research Commission: Pretoria, South Africa, 1993.

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

Grossi O (2006). Évaluation de l'efficacité d'une suspension de bactériophages anti-staphylococciques : corrélation in vitro-in vivo. Université de Médecine de Nantes.

HAMAIDI, M., & KAIS, H. (2016). Evaluation de la charge en pathogènes et de la microfaune dans les eaux de l'effluent brute et traité rejeté dans un milieu receveur: cas de la station d'épuration de Médéa. *Larhyss Journal*, (26), 183-208.

Hérelle, F. (1921). Bactériophage ; son rôle dans l'immunité : masson et cie.

Hill, V.; Sobsey, M. (1998). Microbial indicator reductions in alternative treatment systems for swine wastewater. *Water Sci. Technol.* 38, 119–122. [[CrossRef](#)]

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

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

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

Inal JM (2003). Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, **51**, 237–244.

Institut Pasteur de Paris. (2007). Viruses : conductors of aquatic ecosystems ? presented at the infectiologie bactérienne : quelle place pour la phagothérapie ? Institut Pasteur de Paris, France..

Jacquet S. (2007). Viruses : conductors of aquatic ecosystems ? presented at the infectiologie bactérienne : quelle place pour la phagothérapie?, i.p.d.p, France, des virus pour combattre les infections. Favre ed : 115-21.

JAMES B. KAPER, JAMES P. NATARO, ET HARRY L. T. MOBLEY. (2004). « pathogenic *Escherichia coli* ». *Nat Rev Microbiol.* Pages 123-140.

Jofre, J. (2007). Indicators of waterborne viruses. In *Human Viruses in Water*; Bosch, A., Ed.; Perspectives in Medical Virology Volume 17; Elsevier: Amsterdam, the Netherlands.

Jofre, J., Lucena, F., Blanch, A. R., & Muniesa, M. (2016). Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. *Water*, 8(5), 199.

Jończyk e. (2011). The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia microbiologica*, 56(3): 191-200.

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

Jończyk-Matysiak, E., Łodej, N., Kula, D., Owczarek, B., Orwat, F., Międzybrodzki, R., ... & Górski, A. (2019). Factors determining phage stability/activity: challenges in practical phage application. *Expert review of anti-infective therapy*, 17(8), 583-606.

Khan Mirzaei, M., & Nilsson, A. S. (2015). Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PloS one*, 10(3), e0118557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118557>

Kutateladze, M. et Adamia, R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 28(12):591-595.

Kutter E. (2009). Phage host range and efficiency of plating. *Methods Mol Biol.* 501: 141–149. 10.1007/978-1-60327-164-6_14 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

Kutter, E. et Sulakvelidze, A. (2005). BACTERIOPHAGES: Biology and Applications. 1st Edition. United States of America: CRC Press.

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

Litt, P. K., & Jaroni, D. (2017). Isolation and physiomorphological characterization of Escherichia coli O157: H7-infecting bacteriophages recovered from beef cattle operations. *International Journal of Microbiology*,

Litt, P. K., Saha, J., & Jaroni, D. (2018). Characterization of bacteriophages targeting Non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli. *Journal of food protection*, 81(5), 785-794.

LOBRIL JR. (1998). Réévaluation du modèle de croissance de Monode : effet des antibiotiques sur l'énergie de maintenance. Thèse université de Lyon I France 1998.

Lucena, F.; Mendez, X.; Moron, A.; Calderon, E.; Campos, C.; Guerrero, A.; Cardenas, M.; Gantzer, C.; Shwartzbrood, L.; Skraber, S.; et al. (2003). Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. *J. Appl. Microbiol.* 2003, 94, 808–815.[CrossRef] [PubMed]

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

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

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

Magin, V. (2019). *Exploitation du potentiel des bactériophages dans le traitement des surfaces en contact avec l'eau, contaminées par un biofilm de P. aeruginosa*. Doctoral dissertation, Ecole nationale supérieure Mines-Télécom Atlantique Bretagne Pays de la Loire).

Martineau, A. (2010). Isolement et caractérisation de bactériophages comme moyen de lutte naturel contre les infections nosocomiales.

Mathlouthi, S. (2011). Recherche des bactéries pathogènes et des bactériophages dans les résidus des stations d'épuration. *Diplôme National d'Ingénieur: Sciences Appliquées et en Technologie. Université du, 7, 50.*

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

Merabishvili M, Pirnay JP, De Vos D. (2018). Guidelines to Compose an Ideal. Bacteriophage Cocktail. *Methods Mol Biol.*; 1693:99-110. Doi: 10.1007/978-1- 4939-7395-8_9. PubMed PMID: 29119435.

Morison J. (1935). Bacteriophage in cholera. *Transactions of the royal Society of Tropical Medicine.* 28 :563. [[Google Scholar](#)].

Muniesa, M., Lucena, F., Blanch, A.R.; Payán, A.; Jofre, J. (2012). Use of abundance ratios of somatic coliphages and bacteriophages of *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 for microbial source identification. *Water Res.* 46, 6410–6418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Muniesa, M., Lucena, F., Jofre, J. (1999). Study of the potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment. *J. Appl. Microbiol.*, 87, 402–409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Kobayashi, G. S., & Pfaller, M. A. (1998). Medical microbiology 3rd ed. *St. Lois: Mosby.*

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

Olson MR, Axler RP, Hicks RE (2004) Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *J Virol Meth* 122:147–152

Personnic s. (2006). Les virus planctoniques : un compartiment biologique clé des milieux aquatiques. *Le courrier de l'environnement de l'inra*, 53(53): 19-34.

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

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

Pirnay JP, Verbeken G, Rose T, Jennes S, Zizi M, Huys I, et al. (2012). Introducing yesterday's phage therapy in today's medicine. *Future Virol.*;7:379–90. [[Google Scholar](#)].

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

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

Rajala-Mustonen, R.L.; Heinonen-Tanski, H. (1994), Sensitivity of host strains and host range of coliphages isolated from Finnish and Nicaraguan wastewater. *Water Res.* 28, 1811–1815. [CrossRef]

Ravat F., Jault P., Gabard J. 2015. Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Journal of the Euro-Mediterranean Council for Burns and Fire Disasters-MBC.* 28 (1) :13-20. regulatory challenges. Expert review of anti-infective therapy, 10(5): 533-35.

Resch, G. A. J. M. (2002). Les bactériophages, nouvelle perspective dans le traitement des maladies infectieuses ? *Rev Mens Suisse Odontostomatol*, 112(6): 643-644.

Rezaeinejad, S.; Vergara, G.G.; Woo, C.H.; Lim, T.T.; Sobsey, M.D.; Gin, K.Y. (2014). Surveillance of enteric viruses and coliphages in a tropical urban catchment. *Water Res.* 58, 122–131. [CrossRef] [PubMed]

Rivasi. M. (2013). La phagothérapie une solution complémentaire aux antibiotiques. Députée européenne Europe Écologie Les Verts du grand Sud-Est; P 8.

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

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

Scott. A.E, Timms. A.R, Connerton. P.L, Carrillo. C.L, Radzum. K.A, Connerton. I.F. (2007). Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. *Plos pathogens.* (3); P 119.

Shao, Y., & Wang, I. N. (2008). Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time. *Genetics*, 180(1), 471–482. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.090100>

Sharp, R. (2001). Bacteriophages: biology and history. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(7): 667–672.

Skurnik m, Strauch e. (2006). Phage therapy: facts and fiction. *International journal of medical microbiology*, 296(1) : 5-14.

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

Souza v. (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the chihuahuan desert. proceedings of the national academy of sciences, 103(17): 6565 70.

Sozzi. T, Gnaegi. F, D'aminco. N, Hose. H.(1982). Difficultés de fermentation malolactique du vin dues à des bactériophages de *Leuconostoc oenos*. *Revue Suisse de Viticulture Arboriculture et Horticulture*, 14(1):17-23.

Sulakvelidze a. (2005). Bacteriophages: biology and applications : crc press.

Sulakvelidze, A., Z. Alavidze and J.G. Morris Jr. (2001). "Bacteriophage therapy." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**(3): 649-659.

Tey BT, Ooi ST, Yong KC, Tan Ng MY, Ling TC, Tan WS (2009) Production of fusion m13 phage bearing the disulphide constrained peptide sequence (C-WSFFSNI-C) that interacts with hepatitis B core antigen. *J African Biotechnol* 8:268–273

Thiel. K. (2004). Nature Biotechnologie, c'est-à-dire à l'encontre de bactéries ciblées, multi-résistantes ou émergentes, Vol. 22 ; p 31- 36.

Thung, T.Y., Norshafawatie, S. B. M. F., Premarathne, J. M. J. K., Chang, W. S., Loo, Y. Y., Kuan, C. H., New, C. Y., Ubong, A., Ramzi, O. S. B., Mahyudin, N.A.(2017). Isolation of food-borne pathogen bacteriophages from retail food and environmental sewage. *Int Food Res J*; 24(1):450–4.

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

Turner. P.E, Chao. L. (1999). Prisoner's dilemma in an rna virus. *Letter to nature*. (398) ; P 441-443. *Virology*, (152) ; P 227-243.

Weinbauer M G. (2003). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* 2003 (in press).

Wilhelm, S. W., and L. Poorvin. (2001). Quantification of algal viruses in marine samples. *Meth. Microbiol.* **30**: 53–65.

Withey, S., Cartmell, E., Avery, L. M., & Stephenson, T. (2005). Bacteriophages—potential for application in wastewater treatment processes. *Science of the total environment*, 339 (1-3), 1-18.

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

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

Yahya, M.; Hmaied, F.; Jebri, S.; Jofre, J.; Hamdi, M. (2015). Bacteriophages as indicators of human and animal faecal contamination in raw and treated wastewaters from Tunisia. *J. Appl. Microbiol.* 118, 1217–1225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Yildirim, Z., Sakin, T., Akçelik, M., & Akçelik, N. (2020). Identification and characterization of lytic bacteriophages specific to foodborne pathogenic *Escherichia coli* O157: H7. *Food Science and Technology International*, 1082013220929836.

Zhang, K.; Farahbakhsh, K. (2007). Removal of native coliphages and coliform bacteria from municipal wastewater by various wastewater treatment processes: Implications to water reuse. *Water Res.* **2007**, 41, 2816–2824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

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

BLBVB

| | |
|---------------------|----------|
| Peptone..... | 10,0 g. |
| Lactose | 10,0 g. |
| Bile | 20,0 ml. |
| Vert brillant | 13,0 mg |
| pH | 7,4. |

EMB

| | |
|---------------------------------------|---------------|
| Peptone | 10,0 grammes |
| Lactose | 10,0 grammes |
| éosine | 0,4 gramme |
| Bleu de méthylène | 0,0625 gramme |
| Hydrogénophosphate de potassium | 2,0 grammes |
| Agar | 15,0 grammes |

Eau Peptonée

| | |
|-------------------------------|------|
| Peptone exempte d'indole..... | 10g |
| Chlorure de sodium..... | 500g |
| Eau distillée..... | 1L |
| pH..... | 7.2 |

Tampon SM

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

Viande Foie

| | |
|------------------------|--------|
| Base viande foie | 30,0 g |
| Glucose | 2,0 g |
| Agar | 6,0 g |
| pH | 7,4 |