

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثلجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Fondamentale et Appliquée

THEME

**Formulation d'un phagoadditif pour maîtriser la
croissance des souches de *Staphylococcus spp.***

Présenté par : M^{me} Amar Tourkia
M^{me} Bouhamida Fatima Zohra
M^{me} Taaba Messaouda

Devant le jury composé de :

Président : Djokhdem Laid MAA

Examineur : Benamar Ibrahim MCB

Encadreur : Messaoudi Omar MCA

Représentant de l'incubateur : Rahmani Zakaria

Représentant de secteur socio économique : Choualhi Abdelrazza Inspecteur vétérinaire

Direction des services agricoles

"Laghouat »

Soutenu publiquement le 06/07/2023

Remerciements

A la fin de ce livre, nous voudrions exprimer notre gratitude à tous ceux qui ont contribué directement ou indirectement au développement. Ce message est en premier lieu notre superviseur, **Mr.Massaoudi Omar**, pour son aide, sa présence et son suivi continu. Les conseils qui nous ont permis de faire ce travail.

Nos sincères remerciements à **Mr.GUAZEM Boulerbah** pour nous avoir accueilli, il a été bien accueilli dans son laboratoire et aussi pour la confiance et l'aide que nous a témoigné toute l'équipe ONA Laboratoire.

Nous ne pouvons manquer d'exprimer notre gratitude à vous tous qui travaillez à l'Unité de Recherche sur les Plantes Médicinales, en particulier à son directeur, **Dr. Ben Nasser Farouk**. Et à tous les professeurs qui nous ont suivis durant notre parcours scolaire. Enfin, nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Merci également au **Crapc** de nous avoir aidé à analyser ce travail.

Et à nos parents qui nous ont soutenus moralement et financièrement jusqu'à ce jour pour leur amour et leurs encouragements. Ils nous ont tout donné. Nous sommes très fiers d'avoir des parents comme vous, que Dieu Tout Puissant vous protège Santé et bonheur et vous protège de tout mal.

Résumé

Les *Staphylococcus* spp, sont des bactéries pathogènes posent de graves problèmes dans différents secteurs tels que l'agro-alimentaire, médical et industriel. Dans notre étude, nous avons formulé un phagoadditif contenant six bactériophages lytiques isolés à partir de l'eau de mer. Les résultats de l'application du phagoadditif ont montré qu'il est très efficace pour éliminer la contamination causée par les souches de *Staphylococcus* spp. De plus, le phagoadditif s'est également révélé efficace pour éliminer les biofilms matures formés par différentes souches de *Staphylococcus* spp sur diverses surfaces telles que le plastique, le verre et l'acier inoxydable.

Mots clés : *Staphylococcus* spp ; Bactériophages ; Phagoadditif, Biofilm.

Abstract

Staphylococcus spp are pathogenic bacteria that pose serious problems in various sectors such as food processing, medicine and industry. In our study, we formulated a phagoadditive containing six lytic bacteriophages isolated from seawater. The results of the application of the phagoadditive showed that it is highly effective in eliminating contamination caused by strains of *Staphylococcus spp*. . Additionally, the phagoadditive has also been shown to be effective in removing mature biofilms formed by different strains of *Staphylococcus spp* on various surfaces such as plastic, glass, and stainless steel.

.Keywords: *Staphylococcus spp*; Bacteriophages; Phagoadditive, Biofilm

المكورات العنقدية هي بكتيريا ممرضة تسبب مشاكل خطيرة في مختلف القطاعات مثل معالجة الأغذية والأدوية والصناعة. في دراستنا ، قمنا بصياغة مجموعة ملتهمة تحتوي على ستة عاثيات حلية معزولة عن مياه البحر ، وأظهرت نتائج استخدام هذه البكتيريا أنها فعالة للغاية في القضاء على التلوث الناجم عن سلالات المكورات العنقدية . بالإضافة إلى ذلك ، فقد ثبت أيضاً أن مادة البلعمة فعالة في إزالة الأغشية الحيوية الناضجة التي تكونت من سلالات مختلفة من المكورات العنقدية على أسطح مختلفة مثل البلاستيك والزجاج والفولاذ المقاوم للصدأ.

الكلمات المفتاحية: المكورات العنقدية ؛ العاثيات ؛ الغشاء الحي.

Liste des abréviations :

GN : gélose nutritive

BHIB : Bouillon Brain Heart Infusion

CV : cristal de violet

Rpm : Revolutions per minute of rotor

DO : densité optique

AND: acide désoxyribonucléique

ARN: acide ribonucléique

ATP: Antibiotique

MH : milieu Mueller-Hinton

CV : cristal de violet

Cro: protein, the product of the cro gene of coli-phag

ONA: L'Office National de l'Assainissement

Rpm: Revolutions per minute of rotor

DO: densité optique

TFF: Filtration tangentiel

TIA: Toxi-infection Alimentaire

LB: Bertani-Luria

Ufc: unit formatrice de colonie

Ufp: unit formatrice de plage de lyse

µg: microgramme

µl: microlitre

µm: micromètre

SaA: Staphylococcus aureus

SARM: *Staphylococcus aureus* résistance à la méthicilline

Pb: Paire de bases

Liste des figures :

Figure 01 :	Reproduction virale cycle lytique et lysogénique	4
Figure 02 :	Diversité des morphotypes observés chez les bactériophages	5
Figure 03 :	Structure of Bactériophage	6
Figure 04 :	Site 1 de prélèvement à wilaya Alger Bordj El Kiffan, Plage de Mazala	11
Figure 05 :	Site 2 de prélèvement à wilaya Aïn temouchent beni saf , Palge Rachgoune	11
Figure 06 :	Méthode d'enrichissement des bactériophages	13
Figure 07 :	Les étapes des isolements des bactériophages	14
Figure 08 :	les étapes de Purification des bactériophages	15
Figure 09 :	les étapes de préparation la suspension virale à grands échelle	17
Figure 10 :	Les étapes de lyophilisation du cocktail de phagoadditif	18
Figure 11 :	L'apparition des plages de lyse dans les boîtes de <i>Staphylococcus</i>	22
Figure 12 :	Résultat de la confirmation du caractère strictement lytique des bactériophages sélectionnés par la méthode de sapote.	24
Figure 13 :	Résulta de précipitation de bactériophage par le polyéthylène glycol	26
Figure 14 :	Microscopie électronique à balayage révélant la morphologie des bactériophages présents dans le phagoadditif.	27
Figure 15 :	L'activité de phagoadditif contre les six souches de <i>Staphylococcus spp.</i>	29
Figure 16 :	Résultat de l'activité anti-biofilm des souches de <i>staphylocoques</i> , (R) Réduction et (T) Témoin	29
Figure 17 :	Le diagramme montre le pourcentage de densité optique après et avant traitement avec une suspension de phages.	30
Figure 18 :	Technique des lames on verre. T : Lames témoin, R : Lames traité par le phagoadditif.	31
Figure 19 :	Observation du biofilm formé par la souche 11-2-2 sur des lames en verre, avant (A) et après (B) traitement par le phagoadditif.	31
Figure 20 :	Formation de biofilm sur des lames inoxydables. A : Une lame témoin sans traitement par le phagoadditif ; B : Une lame après traitement par la suspension de phagoadditif.	32

Figure 21 : Biofilm formé par la souche 11-2-2 sur des lames d'acier inoxydable, A : le **33**
biofilm avant traitement par le phagoadditif ; B : Le biofilm après traitement par le
phagoadditif

Liste des Tableaux

Tableau 1	Prévalence de contamination par <i>Staphylococcus aureus</i> des viandes de volaille en Algérie.	9
Tableau 2	profil d'antibiorésistance des souches de <i>Staphylocoque</i> .	12
Tableau 3	profil d'antibiorésistance des souches de <i>Staphylocoque spp</i> sélectionnées..	21
Tableau 4	le nombre de bactériophages isolés à partir des six souches de <i>Staphylococcus</i> sélectionnées	22
Tableau 5	L'origine des bactériophages lytiques sélectionnés	23

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	.I
Liste des abréviations.....	.II
Liste des figures.....	.III
Liste des tableaux.....	.IV
Introduction.....	.V

Chapitre 1 : Synthèse Partie Synthèse bibliographique

1. Définition des bactériophages.....	03
2. Classification des bactériophages.....	03
3. Cycles lytique et lysogénique.....	03
3.1 Le cycle lytique.....	04
3.2 cycle lysogénique.....	04
4. Caractérisation et composition des bactériophages.....	04
5. Critères des sélections des phages destinés à fins de bio contrôle.....	06
6. Un phage strictement virulent.....	06
7. Un phage ayant un génome dépourvu de tout facteur de virulence.....	06
7.1 Un phage polyvalent.....	07
8 .Utilisation des bactériophages à des fins de conservation des viandes de volaille.	07
8.1Utilisation en agroalimentaire.....	07
8.2Assainissement par les phages.....	08
9. <i>Staphylococcus aureus</i>	08
9.1Caractéristique générale de <i>Staphylococcus aureus</i>	08
10.Prévalence de contamination par <i>Staphylococcus aureus</i> des viandes de volaille.	09
11.Intoxication alimentaire à <i>staphylococcus aureus</i>	09

Chapitre : 02 Matériels et méthodes

1. . Échantillonnage	11
2. Isolement des bactériophages à partir de l'eau de mer.....	12
2.1. Les souches hôte de <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.2. Enrichissement des bactériophages de <i>Staphylococcus</i>	12
2.3. .Isolement des bactériophages de <i>Staphylococcus</i>	13
2.4. Purification des bactériophages lytiques de <i>Staphylococcu</i>	14
3. Propagation des bactériophages lytiques de <i>Staphylococcus</i> en culture liquide.	15
4. Précipitation du bactériophage et Formulation de phagoadditif.....	17
5. La lyophilisation du cocktail de phagoadditif et observation des bactériophages par microscopie électronique à balayage.....	18
6. L'application de phagoadditif pour l'éradication de biofilm.....	19
6.1 L'éradication de biofilm formé sur des tubes en plastiques.....	19
6.2 L'éradication de biofilm formé sur des lames en verre.....	19
6.3. L'éradication de biofilm formé sur des lames en acier inoxydables.....	20

Chapitre: 03 Résultats et discussion

1. Les souches hôte de <i>Staphylococcus</i>	21
2. Isolement des bactériophages	21
3. Purification et sélections des bactériophages lytiques de <i>Staphylococcus spp</i>	23
4. Précipitation du bactériophage et formulation de phagoadditif.....	25
5. Lyophilisation du phagoadditif et observation des bactériophages sous microscopie électronique balayage.....	26
5. Application de phagoadditif.....	27
5.1 L'application du phagoadditif in vitro contre les <i>Staphylococcus spp</i>	27
5.2 . L'application du phagoadditif pour la lutte contre les biofilms formés par les souches de <i>Staphylococcus spp</i>	28
5.1.2 L'éradication de biofilm formé sur un support en plastique.....	29
5.1.2 L'éradication de biofilm formé sur un support en verre.....	30
5.1.3 L'éradication de biofilm formé sur un support en acier inoxydable.....	32
VI. Conclusion.....	35-36
VII. Références bibliographiques	
VIII. Annexes	

Introduction

Introduction

Les *Staphylococcus* sont responsables de problèmes majeurs dans différents secteurs, notamment l'agro-alimentaire, médical et industriel (**Sillankorva et al, 2012**). Leur présence peut entraîner des conséquences graves sur la santé des individus, telles que des intoxications alimentaires, des infections nosocomiales et des retards de production (**Bastien FRÉMAUX et Carole FEURER, 2020**). Sur le plan économique, ces contaminations peuvent engendrer des pertes financières considérables pour les entreprises agro-alimentaires et des coûts supplémentaires liés aux mesures de désinfection et de nettoyage nécessaires pour éliminer les biofilms formés par les *Staphylococcus* dans les installations industrielles (**Breitbart & Rohwer, 2005**). Les méthodes traditionnellement utilisées pour contrôler la croissance des *Staphylococcus* présentent des inconvénients importants. Les méthodes physiques, telles que la chaleur, l'irradiation, le froid et la déshydratation, peuvent être coûteuses et altérer les caractéristiques des aliments. Les méthodes chimiques, bien qu'efficaces, peuvent présenter des effets néfastes sur la santé humaine et l'environnement, en particulier lorsqu'elles sont utilisées à des concentrations élevées (**Clokier et al, 2011**). De plus, ces méthodes peuvent être coûteuses et nécessiter des procédures complexes pour leur application. En outre, les *Staphylococcus* peuvent former des biofilms, ce qui rend leur élimination encore plus difficile. Les biofilms sont des structures complexes qui protègent les bactéries contre les méthodes conventionnelles de nettoyage et de désinfection. Ainsi, les méthodes physiques et chimiques traditionnelles peuvent être moins efficaces contre les *staphylocoques* en mode biofilm. Face à ces problématiques sanitaires et économiques, il est impératif de développer des stratégies novatrices pour prévenir, contrôler et traiter les *Staphylococcus*. Ces nouvelles approches doivent être à la fois plus économiques, plus efficaces et moins toxiques pour l'homme, les animaux et l'environnement.

Afin de résoudre ces problèmes sanitaires et économiques liés aux *Staphylococcus* dans les secteurs agroalimentaire, médical et industriel, notre projet propose une solution alternative qui consiste à utiliser un cocktail de virus bactériophages lytiques qui ciblent spécifiquement les *Staphylococcus*. Ces bactériophages seront développés sous forme d'un phagoadditif, permettant un contrôle efficace de la croissance des *Staphylococcus*. L'utilisation de bactériophages lytiques présente plusieurs avantages par rapport aux méthodes traditionnelles. Ils préservent la flore microbienne bénéfique, ne nuisent pas aux propriétés des aliments et offrent des coûts réduits, une meilleure efficacité et une diminution des risques pour la santé humaine. De plus, les bactériophages sont naturellement présents dans l'environnement et leur utilisation ne laisse pas de résidus chimiques indésirables. Cette approche novatrice contribuera à améliorer la sécurité alimentaire, à réduire les infections à *Staphylococcus* et à prévenir les problèmes sanitaires et économiques associés à ces bactéries pathogènes. Elle favorise une approche respectueuse de l'environnement et réduit les effets néfastes sur la santé.

Introduction

Pour arriver à ce but, notre projet a été divisé en plusieurs étapes :

- L'isolement de bactériophages lytiques spécifiques au *Staphylococcus spp* à partir de l'eau de mer,.
- La sélection et la purification de bactériophages ayant une large plage de lyse.
- La formulation de phagoadditif contenant un mélange de six bactériophages sélectionnés.
- L'application du phagoadditif pour éliminer les biofilms de *Staphylococcus* sur des supports en verre, en plastique et en acier inoxydable.

Revue bibliographique

Revue Bibliographique

1. Définition des bactériophages

Les bactériophages sont des virus qui n'infectent que les bactéries ; ils sont également appelés phages. Il y en a entre 10³⁰ et 10³², et ils représentent l'être vivant le plus important sur Terre. Ils sont très répandus dans notre monde (océans, sols, eau potable, alimentation, etc.) et se retrouvent partout où sont présentes leurs bactéries hôtes (eaux usées, selles, sols), et ont même été isolés de certains types de bactéries. **(Kutter et al., 2005)**. Les bactériophages localisent des récepteurs particuliers à la surface d'une bactérie, s'attachent, puis insèrent leur matériel génétique à l'intérieur de la bactérie. Leur matériel génétique peut prendre la forme d'ARN ou d'ADN simple ou double brin, tout comme celui d'autres virus. Les phages utilisent le métabolisme de la bactérie pour synthétiser les composants de leur génome viral après s'y être fixés et y injecter son matériel génomique. La nouvelle génération de bactériophages est assemblée à l'intérieur de la bactérie, libérée dans le microenvironnement, puis elle se lie et tue les espèces identifiées de bactéries qui y sont présentes, recommençant le cycle à zéro. **Selon Resh et Meyer (2002) et Kutter et al. (2005)**, le cycle de reproduction typique d'une bactérie dure environ 30 minutes et génère 50 à 100 nouveaux bactériophages.

2. Classification des bactériophages :

Les phages connus jusqu'à présent sont majoritairement classés sous l'ordre des Caudovirales ou phages à queue et se divisent en trois familles : Myoviridae, Podoviridae et Siphoviridae. Ces phages à ADN double brin diffèrent par leur morphologie et la taille de leur génome **(Ackermann & Prangishvili, 2012)**. Les phages appartenant à la famille des Myoviridae ont une longue queue contractile et la présence d'une forme de « cou » qui sépare la capsid de la queue. Avec une taille de génome supérieure à 120 000 paires de bases (pb), les myophages ont habituellement le plus large génome des trois familles. Les Siphoviridae possèdent une longue queue non contractile et une capsid icosaédrique ou allongée, dépendamment du morphotype, ainsi qu'un génome d'environ 40 000 pb. Enfin, les Podoviridae ont une queue courte et une taille de génome plus petite que 20 000 pb **(Ackermann & Prangishvili, 2012; King et al., 2011; Kwan et al., 2005)**.

3. Le cycle lytique et le cycle lysogénique

Dans la nature il existe des bactériophages capables d'effectuer le cycle lysogénique et le cycle lytique ou les deux cycles, mais pas simultanément, et l'émergence de ces cycles est associée à deux types d'inhibiteurs, CI et Cro et le facteur OR, où l'OR facteur améliore la productivité de CRO et CI. L'OR améliore la productivité du répresseur lysogène CI en supprimant le codage de certains gènes du cycle lytique, tandis que le facteur OR fait le contraire. **(Jaomanjaka, F. 2014)**.

3.1 Le cycle lytique

Le phage se fixe sur un récepteur spécifique à la surface de la bactérie hôte, puis il injecte son

Revue Bibliographique

acide nucléique dans le cytoplasme de la bactérie, et les phagocytes commencent à synthétiser leurs propres protéines virales, puis ces dernières sont libérées à l'extérieur de la cellule par le phénomène de la lyse cellulaire. **Matti, R. A., Rufino, M. C., Hirigoyen, U., Mazenod, É., & Seuzaret, G. (2020).**

3.2 cycle lysogénique

En ce qui concerne le cycle lysogénique, il est similaire au cycle lytique dans les premiers stades. La différence entre eux se situe après l'entrée dans la cellule où, dans le cycle mésozoïque, l'ADN viral est combiné à l'ADN bactérien immédiatement après son entrée. Puis la bactérie copie son génome uni au génome viral, afin que ce dernier soit transmis verticalement aux générations futures. Ce cycle confère aux bactéries la propriété de résistance contre tout phagocyte similaire **Lwoff, A. (1953).**

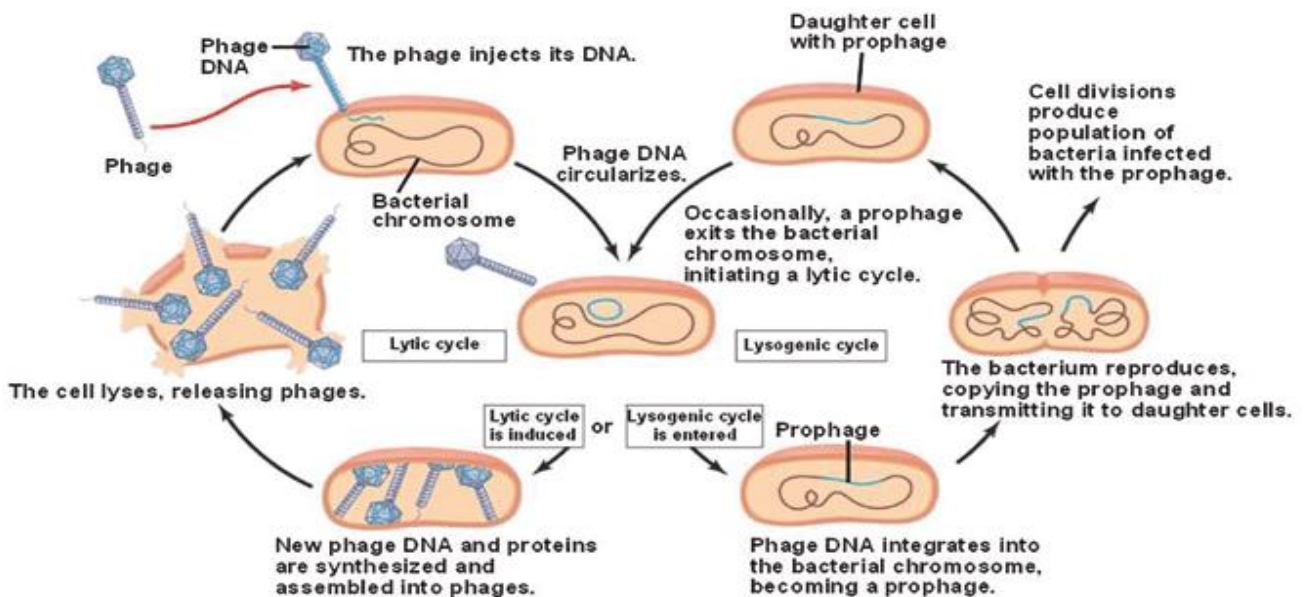


Figure 1 : Reproduction virale cycle lytique et Lysogénique.

4. Caractérisation et composition des bactériophages :

Les phages sont principalement composés d'ADN et de protéines. Selon le type de phage, le génome peut être de l'ADN ou de l'ARN, mais pas les deux. La structure simple ou double peut être circulaire ou linéaire, selon le phage. Plus de 90% des phages contiennent de grands génomes d'ADN double brin situés dans des têtes icosaédriques symétriques, avec des queues de longueurs variables. Les acides nucléiques du phage contiennent souvent des bases inhabituelles ou modifiées, qui protègent l'ADN du phage des nucléases qui décomposent les acides nucléiques de l'hôte lors de l'infection du phage. Les phages simples ne peuvent contenir que 3 à 5 gènes, tandis que les phages complexes peuvent contenir plus de 100 gènes. Pour de nombreuses espèces de phages, la capside est attachée à la structure de la queue et la capside entourant le génome du phage est également constituée de protéines codées par le phage pour protéger le phage.

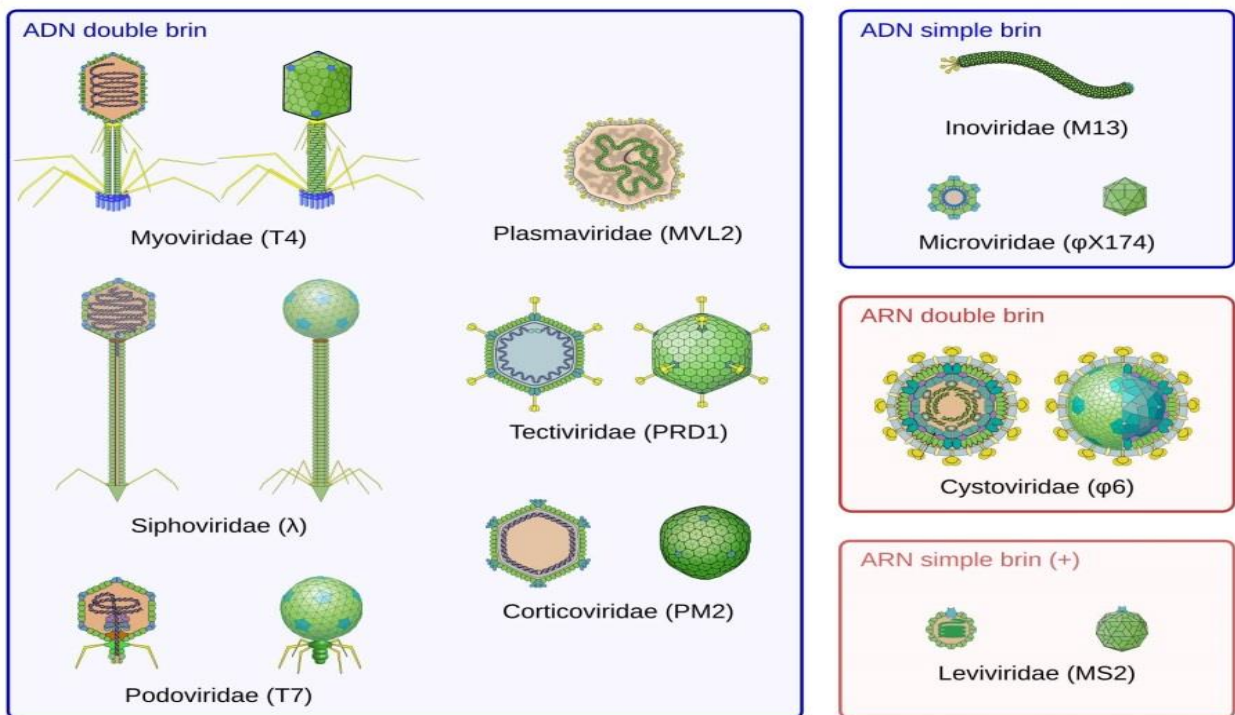


Figure 02: Diversité des morphotypes observés chez les bactériophages.

Les phagocytes sont généralement constitués de deux parties : une tête et une queue reliées par un collier. La tête contient une capsid de nature protéique dans laquelle se trouve l'ADN. La queue est également composée de protéines et possède un tube central creux entouré d'une gaine contractile. La lumière du tube est reliée à celles de la capsid permettant le passage du génome des bactériophages dans la cellule hôte lors de l'infection. La queue se termine par une plaque basale à laquelle sont attachées les fibres de la queue, responsables de la reconnaissance de la cellule hôte.

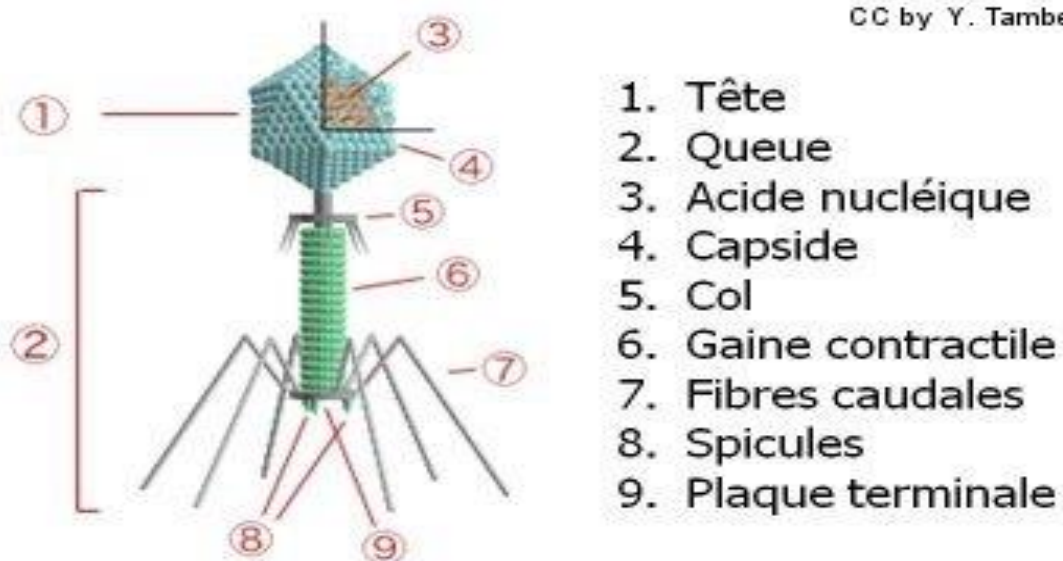


Figure 03: Structure of Bactériophage.

5. Critères des sélections des phages destinés à fins de bio contrôle :

Destiné aux utilisations à des fins médicales et alimentaires, un phage doit être bien caractérisé et passer par plusieurs étapes de validation définissant son statut d'agent de biocontrôle. La définition d'un produit phagique antimicrobien acceptable est un phage strictement virulent, possédant un génome dépourvu de gènes de virulence, polyvalent (infectant plusieurs souches de l'espèce ciblée), efficace dans tout type de matrice, in vitro et in situ et maintenant une activité lytique stable à long terme. Il est à noter que ces critères ne sont pas énumérés par ordre d'importance.

6. Un phage strictement virulent :

Un phage strictement virulent est incapable d'intégrer ou d'insérer son ADN dans celui de l'hôte bactérien, et ce, à cause de l'absence des fonctions génétiques requises pour l'intégration (**Klump et al., 2008**) ou de la présence de mutations ponctuelles affectant le module de lysogénie du phage (**Garcia et al., 2009a**).

7. Un phage ayant un génome dépourvu de tout facteur de virulence :

Un agent de bio contrôle doit avoir un génome dépourvu de facteur de virulence. L'utilisation d'un phage encodant des gènes de virulence lors des applications médicale et alimentaire, provoquera sans doute le transfert de propriétés pathogènes aux bactéries de la microflore normale humaine. Ainsi, il constituerait un risque à la santé humaine. De ce fait, le génome d'un phage destiné au contrôle microbien devrait être séquencé afin d'assurer son innocuité et l'absence de gènes de virulence potentiels.

7.1 Un phage polyvalent :

La majorité des phages isolés ont des spectres lytiques restreints et sont spécifiques à une ou deux souches d'une même espèce bactérienne (Ackermann et al., 1978; Garcia et al., 2009b; Yuan et al., 2012), d'où leur utilisation pour la caractérisation et la classification de souches par la méthode de typage par les phages.

8. Utilisation des bactériophages à des fins de conservation des viandes de volaille :

8.1 Utilisation en agroalimentaire :

Le contrôle des pathogènes qui sont présents sur les fruits et les légumes est d'un grand intérêt, car ces aliments ne sont habituellement pas transformés ou cuits de manière à tuer ces pathogènes. Plusieurs études ont démontré l'efficacité des phages pour l'élimination des pathogènes sur les aliments prêts à être consommés. Citons comme exemple l'utilisation de phage contre *Campylobacter jejuni* sur la peau de poulets conservés à 4 °C et à -20 °C. Une diminution d'un facteur de 10 a été observée chez les poulets à 4 °C et une diminution de 2,5 log a été mesurée chez les poulets à -20 °C (**Atterbury, Connerton, Dodd, Rees, & Connerton, 2003**). Un autre groupe a inoculé des peaux de poulet avec 10⁴ UFC/ml de *Campylobacter jejuni* suivi par l'administration de phages (10⁶ UFP/ml). Une diminution de 95 % de *Campylobacter jejuni* a été observée! Ce même groupe a aussi étudié la réduction de *Salmonella enterica* sur les peaux de poulets. Une diminution de 99 % de la présence bactérienne a été observée sur les peaux qui avaient été traitées par les phages, comparé aux peaux « contrôles » qui n'avaient pas été traitées par les phages (**Goode, Allen, & Barrow, 2003**). Ces études ne sont que deux exemples parmi des dizaines qui démontrent l'efficacité des phages pour diminuer la présence bactérienne sur nos aliments. Un autre aspect important dans le domaine agroalimentaire est la durée de conservation des aliments. L'utilisation des phages a aussi été étudiée dans ce contexte. . a démontré l'efficacité des phages pour réduire la densité bactérienne sur des échantillons de viandes crues. En effet, des phages anti *Salmonella typhimurium* PT160 et anti-*Campylobacter jejuni*, à

différentes multiplicités d'infection (10 ou 104 UFP/ml), ont été ajoutés à des densités bactériennes (<100 ou 104 UFC/ml) inoculées sur du bœuf cru et cuit. Les échantillons étaient ensuite incubés à 5 °C et -24°C pour simuler des conditions de réfrigération et de température pièce. Dans les conditions optimales, multiplicité d'infection (ratio phage : bactérie) élevée et densité bactérienne élevée, une inactivation des bactéries de l'ordre de 2-3 log à 5 °C et de >5,9 log à - 24 °C ont été observées lorsque comparé aux échantillons qui n'avaient pas été en contact avec les phages. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que les bactériophages pourraient être utiles pour le contrôle des pathogènes d'origine alimentaire. **(Bigwood, Hudson, Billington, Carey-Smith, & Heinemann 2008).**

L'utilisation dans le domaine agroalimentaire est très prometteur et plusieurs compagnies sont entrain de développer, ou ont déjà développé, des préparations de phages qui pourraient être utilisées dans ce milieu. **(O'Flaherty et al., 2009).**

8.2 Assainissement par les phages :

Une autre application des phages est leur utilisation dans l'assainissement et la décontamination de surfaces inertes retrouvées communément dans les usines de transformation des aliments comme les murs, le sol, les drains, le verre, l'acier inoxydable, les plaques de plâtre, les équipements industriels, etc. ainsi que dans les hôpitaux comme sur les cathéters. En effet, les phages pourraient être des substituts aux produits chimiques employés dans les industries alimentaires comme moyen de décontamination. Bien qu'ils soient efficaces, les désinfectants chimiques peuvent causer la corrosion des équipements, tuer les bactéries commensales bénéfiques, avoir des effets toxiques lorsqu'en contact direct avec l'aliment et endommager les propriétés organoleptiques de celui-ci **(Sulakvelidze, 2013)**. De plus, une étude faite par la BSSA (British Stainless Steel Association) a montré que les produits à base d'hypochlorite peuvent causer des fissures profondes dans l'acier inoxydable et faciliter l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms. Les phages sont capables de pénétrer dans les couches d'un biofilm à travers les pores et les canaux et causer la destruction de la matrice du biofilm. Une étude récente a montré que le phage seul inhibe la formation de biofilms sur un intervalle de 72 heures d'exposition alors que le mélange de phages a pu complètement éliminer le biofilm bactérien en 48 heures sans l'apparition de résistance bactérienne **(Kelly et al., 2011)**.

9. Staphylococcus aureus :

9.1 Caractéristique générale de Staphylococcus aureus

S. aureus appartient à la famille des Micrococcaceae et au genre *Staphylococcus* les *staphylocoques*. On distingue près de 44 espèces différentes, classées par leurs génomes. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), plus communément appelé *staphylocoque* doré, sont distingués des autres membres de cette famille est. Leur contenu faible en G+C d'environ 32,8 % leur tolérance élevée au sel dans le milieu (jusqu'à 20 %) ainsi que leur résistance à la digestion par le lysozyme grâce à son taux élevé d'O-acétylation au niveau de la couche de peptidoglycane. *S. aureus* est une coque à Gram positif d'environ 0,7 à 1,2 micromètre de diamètre qui se trouve seul, en paires ou en grappe dans divers milieux liquides et solides. Cette bactérie aérobie ou anaérobie facultative a une température optimale de croissance de 37°C lui conférant le caractère de mésophile.

10. Prévalence de contamination par *Staphylococcus aureus* des viandes de volaille :

Le niveau de contamination par le même germe des viandes de volaille prélevées des abattoirs algériens oscille entre 30% à 46,66% selon (Djeffal et al., 2010) et (Guergueb et al.,2014). La prévalence de contamination par *Staphylococcus aureus* des viandes de volaille en Algérie est résumée dans le Tableau :

Tableau 1. Prévalence de contamination par *Staphylococcus aureus* des viandes de volaille en Algérie.

Espèce	Prévalence	Prélèvement	Localisation	Référence
Poulet	16	Écouvillon respiratoire	Abattoir	(Titouche et al., 2016)
Poulet	46.66	Viandes	Abattoir	(Guergueb et al.,2014)
Poulet	10.5	Poumon	absent	(Benrabia et al.,2012)
Dinde	16.75	Poumon	absent	(Benrabia et al.,2012)
Poulet	30	Viandes	Abattoir	(Djeffal et al., 2010)

11. Intoxication alimentaire à *Staphylococcus aureus* :

L'entérototoxicose *Staphylococcique* représente une des causes majeures des TIA d'origine bactérienne observées dans le monde. De plus, il représente la première bactérie mise en cause parmi les foyers dont l'agent est suspecté mais non identifié (Cuq, 2007). En effet, l'ingestion d'entérotoxines présentes dans les aliments provoque un syndrome gastro-intestinal ou Toxi-infection Alimentaire (TIA) à staphylocoques (De Buyser, 1996). Les aliments peuvent être contaminés par les mains des porteurs sains ou infectés qui les manipulent ou par contact avec une matière première ou du matériel ou des surfaces contaminés (De Buyser et al.,2003). *Staphylococcus aureus* présente une bonne capacité de survie dans L'environnement grâce à sa faculté d'adaptation et à sa résistance au stress (De Buyser et al., 2003), et peut ainsi contaminer les aliments (FAO & OMS, 2003).Un aliment, primitivement souillé par des *staphylocoques* pathogènes, puis Cuit et rendu stérile, peut néanmoins rester dangereux en raison de la thermorésistance de l'entérotoxine (Toma, 2004). Souvent bénigne, son incidence doit être largement sous-estimée, notamment au niveau des foyers familiaux (De Buyser et al., 2003) En bactériologie alimentaire, seules les espèces capables de produire des entérotoxines sont considérées comme pathogènes (De Buyser, 1996). Mode de transmission : Ingestion d'aliments variés crus ou cuits, contaminés et renfermant des entérotoxines (plats cuisinés de viandes, volaille, poisson et fruits de mer...) .

Matériel et méthodes

1. Echantillonnage.

L'isolement des bactériophages, a été effectué à partir de l'eau de mer, en effet, deux échantillons d'eau de mer ont été prélevés pendant le mois de février 2023. Le premier a été prélevé à partir de la région de Mazala, wilaya Alger (**Figure 6**), tandis que le deuxième a été pris à partir de la région de Rachgoun, wilaya d'Ain Timouchent (**Figure 5**). Les prélèvements ont été effectués à une profondeur de 0,5 mètre, puis acheminés au laboratoire dans deux flacons stériles d'un litre. Une fois au laboratoire, les échantillons ont été centrifugés à 6000 rpm pendant 30 minutes, puis filtrés à l'aide d'un système de filtration (Wheaton, USA) (**Figure 7**) en utilisant un filtre de 0,22 μm pour retenir les cellules et laisser passer les phages.



Figure 04: Site 1 de prélèvement à wilaya Alger Bordj El Kiffan, Plage de Mazala (35.298855,-1.470293)



Figure 05: Site 2 de prélèvement à wilaya Aïn temouchent beni saf , Palge Rachgoune (35.298855,-1.47029)

2. Isolement des bactériophages à partir de l'eau de mer.

2.1 Les souches hôte de *Staphylococcus*:

Dans le but d'obtenir des bactériophages lytiques sélectifs contre *Staphylococcus*, les bactéries hôtes utilisées dans cette étude ont été isolées à partir de viande de poulet. Par la

Matériel et Méthodes

suite, ces souches ont été identifiées comme appartenant au genre *Staphylococcus* en utilisant des critères morphologiques, biochimiques et physiologiques. La sélection des souches parmi la collection isolée a été réalisée en fonction de leur profil de résistance à plusieurs antibiotiques ainsi que de leur virulence (Belabasi et Gharbi, 2023).

Tableau 2 : profil d'antibiorésistance des souches de *Staphylocoque* .

	FA10	FOX30	E15	DA2	AMP	VA5/SAM	AML30	CIP50	P1	OX5
24-1-A	22	0	25	23	0	22	0	31	0	0
11-1-B	17	0	21	07	0	15	0	36	0	0
11-2-2	15	0	18	15	0	14	0	31	0	0
10-2-1	2	1	19	27	11	15	0	3	0	0
14-2-2	18	0	18	2	09	12	0	27	0	0
15-1	22	0	19	22	07	13	0	42	0	0

2.2. Enrichissement des bactériophages de *Staphylococcus* :

Avant l'isolement des bactériophages, une étape d'enrichissement des souches virales dans les échantillons de l'eau de mer prélevés a été réalisée. Pour ce faire, les souches hôtes sélectionnées de *Staphylococcus* ont étéensemencées dans des tubes contenant 9 ml de milieu BHIB stérile. Les tubes ont ensuite été incubés à 37 °C pendant 24 heures.

Après incubation, à partir de cette suspension mère, des suspensions de 10 ml de souches sélectionnées de *Staphylococcus* dans le milieu BHIB, ajustées à une densité optique de 0,3 à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 600 nm, ont été préparées. Ces suspensions de 10 ml ont ensuite été ajoutées individuellement à des flacons de 250 ml contenant 15 ml d'eau de mer filtrée. Les mélanges (suspension de bactéries plus l'eau de mer) ont été incubés sous agitation à 30 °C pendant 24 heures (**Figure 6**).

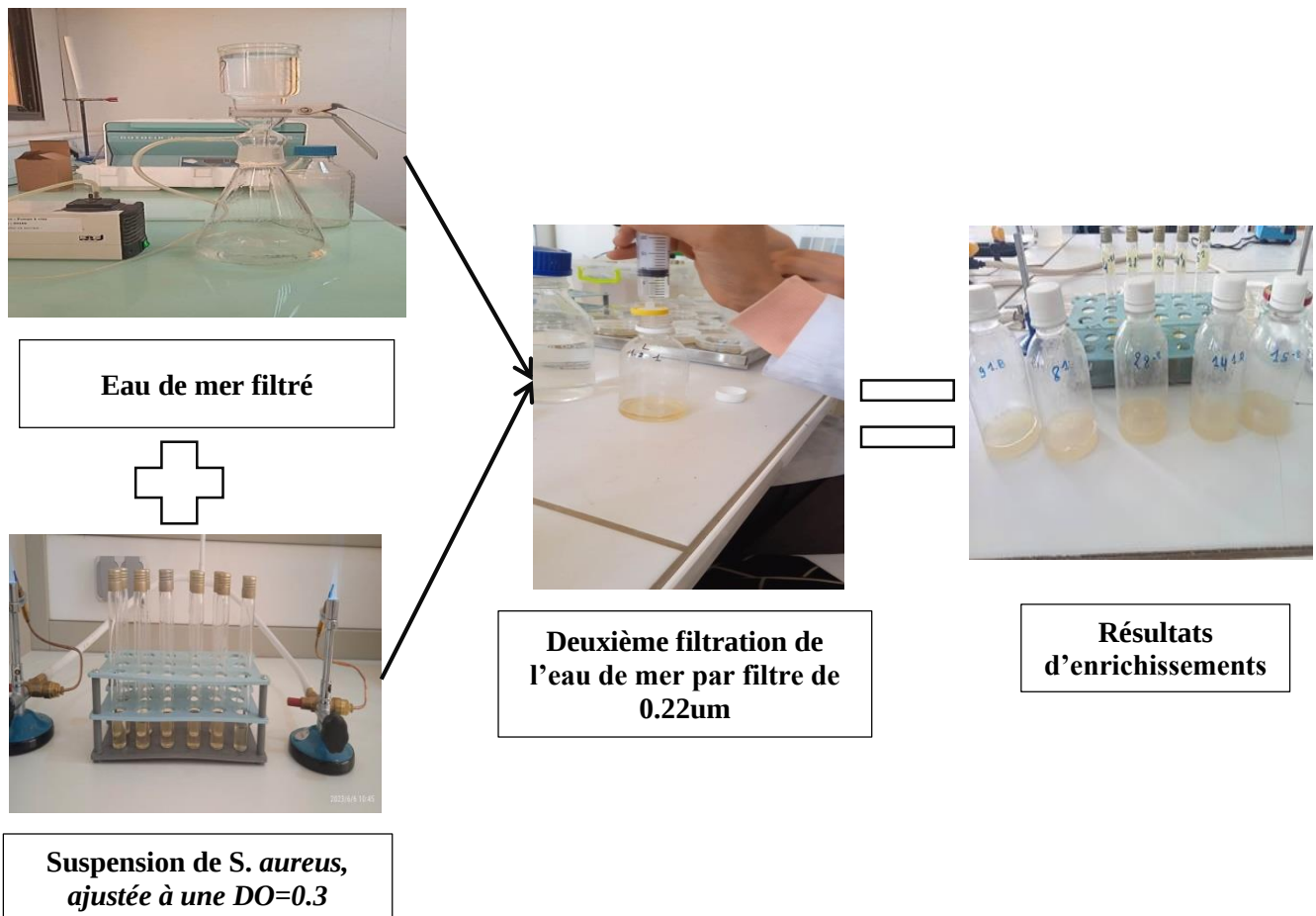


Figure 06: Méthode d'enrichissement des bactériophages

2.3. Isolement des bactériophages de *Staphylococcus*.

Pour l'isolement des bactériophages, les mélanges (suspension plus eau de mer) contenus dans les flacons de 250 ml ont été filtrés à l'aide de filtres à seringue de 0,22 µm. Ensuite, 10 µl du filtrat ont été déposés au centre des zones marquées sur des boîtes de Pétri préalablement remplies avec le milieu gélose nutritif (GN) etensemencées avec l'une des souches hôtes sélectionnées de *Staphylococcus* (**Figure 9**). Cette méthode permet une distribution homogène des bactéries, favorisant ainsi la diffusion rapide des particules phagiques et la formation de zones de lyse. Après 24 heures d'incubation des boîtes d'isolement, les bactériophages ont été identifiés par la présence de plage de lyse autour des spots sur le tapis bactérien.

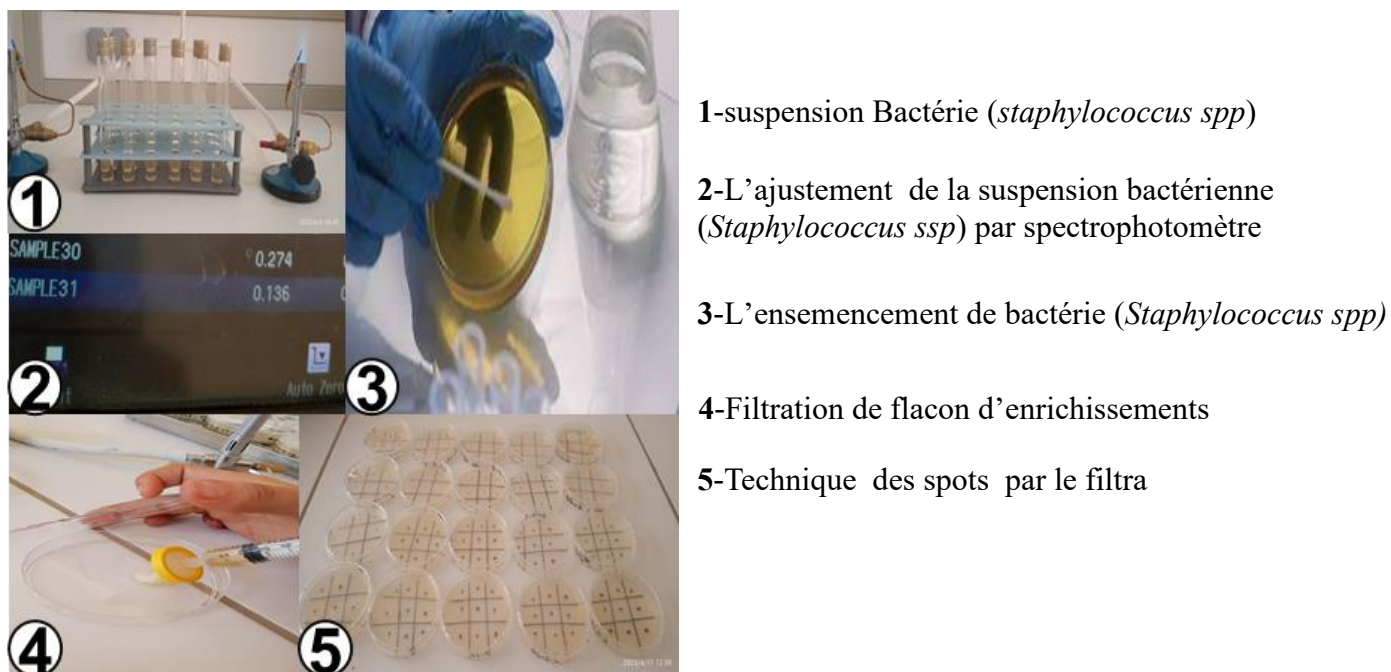


Figure 07: Les étapes des isollements des bactériophages

2.4. Purification des bactériophages lytiques de *Staphylococcus*.

La purification des bactériophages a été réalisée en suivant deux étapes successives.

Tout d'abord, les plages de lyse qui apparaissent autour des spots dans les boîtes d'isolement ont été découpées à l'aide de lames de scalpel stériles, puis transférées dans des tubes contenant 5 ml de milieu BHIB stérile. Les tubes ont ensuite été ensemencés individuellement avec la même souche bactérienne de *Staphylococcus* utilisée pour l'isolement. Les tubes ont été incubés à 37 °C. Après 24 heures de propagation des bactériophages, les cultures ont été centrifugées à 6000 rpm pendant 20 minutes, et les surnageant ont été filtrés à l'aide de filtres de 0.22 µm pour obtenir des suspensions virales.

Cette première étape de purification a été suivie d'une deuxième étape de purification sur gélose semi-solide afin d'assurer une meilleure pureté des suspensions virales (Figure 10). Dans cette étape, 300 µL des suspensions virales filtrées ont été mélangées avec 200 µL des suspensions de *Staphylococcus* ajustées à une DO=0,3. Après une incubation de 45 minutes à 37 °C, les mélanges ont été transférés dans des tubes contenant 3 mL de GN semi-solide contenant du chlorure de calcium (CaCl₂) à une concentration de 10 mM. Ensuite, les mélanges des suspensions bactériennes avec la gélose semi-solide, ont été versés dans des boîtes de Petri préalablement remplies de GN solide. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 24 heures jusqu'à l'apparition des plages de lyse.

Afin de confirmer d'une part la virulence des bactériophages isolés vis-à-vis des

Matériel et Méthodes

bactéries hôtes utilisées, et d'éviter d'autre part l'utilisation de bactériophages tempérés ou ceux qui suivent le cycle lysogénique, l'activité lytique contre les souches de *Staphylococcus* a été répétée au moins trois fois en utilisant la méthode de gélose semi-solide mentionnée précédemment.

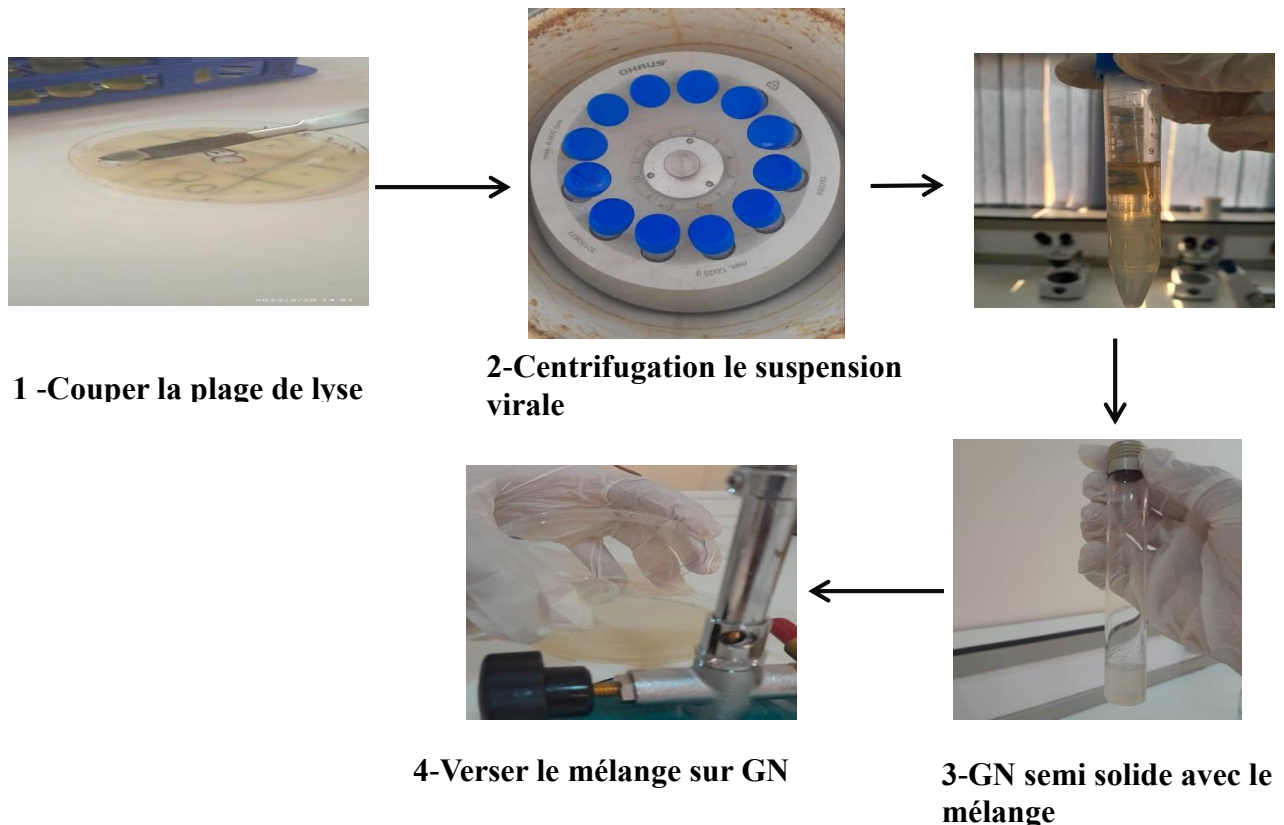


Figure 08: les étapes de Purification des bactériophages

3. Propagation des bactériophages lytiques de *Staphylococcus* en culture liquide :

Seuls les bactériophages qui remplissent les deux critères suivants ont été sélectionnés pour la propagation :

- Le phage sélectionné doit être strictement lytique, plutôt que des phages tempérés, afin d'éviter la transmission de gènes de résistance ou de virulence entre les souches bactériennes.
- Ils doivent avoir un large spectre d'action pour être capables d'infecter différentes souches appartenant au genre *Staphylococcus*..

Chaque bactériophages lytiques sélectionnés de *Staphylococcus*, isolés à partir de l'eau de mer, ont été multipliés dans 1 litre de milieu de culture liquide, pour obtenir une quantité adéquate de suspension virale contenant une concentration élevée de particules phagiques. A partir de ces suspensions vitales, les bactériophages ont été précipité, en vue de leur

Matériel et Méthodes

formulation sous forme d'un phagoadditif efficace pour contrôler la croissance de *Staphylococcus* dans divers produits alimentaires ainsi que sur des surfaces inertes.

Pour cela, 10 ml de chaque souche de *Staphylococcus* ont été inoculés dans des Erlenmeyers de 100 ml contenant 35 ml de bouillon LB. Les Erlenmeyers ont ensuite été mis en culture à 30 °C sous agitation à 150 tr/min pendant une nuit. Après incubation, la densité optique (DO) de chaque suspension bactérienne a été ajustée à environ 0,3 à 0,4. Ensuite, 10 ml de chaque suspension de *Staphylococcus* ont été inoculés dans un flacon Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de milieu LB. Les Erlenmeyers ont ensuite été incubés à 30 °C pendant 2 à 2,5 heures, jusqu'à ce que la DO atteigne 0,1. Ensuite, ces suspensions ont été infectées séparément par les suspensions de bactériophages lytiques préalablement préparées. Les mélanges (suspension virale plus culture bactérienne) ont ensuite été transférés dans un flacon Erlenmeyer de 2 litres contenant 1 litre de milieu LB stérile. Les mélanges ont été cultivés à 30°C et à 150 tr/min pendant environ 5 à 7 heures, jusqu'à ce que la densité optique atteigne 0,04-0,01. À ce stade, les cultures ont été centrifugées à 4500 tr/min pendant 15 minutes, puis filtrées à l'aide de filtres de 0,22 µm (**Figure 10**).

Les suspensions virales ainsi préparé ont été mélangé pour obtenir un cocktail de bactériophages.

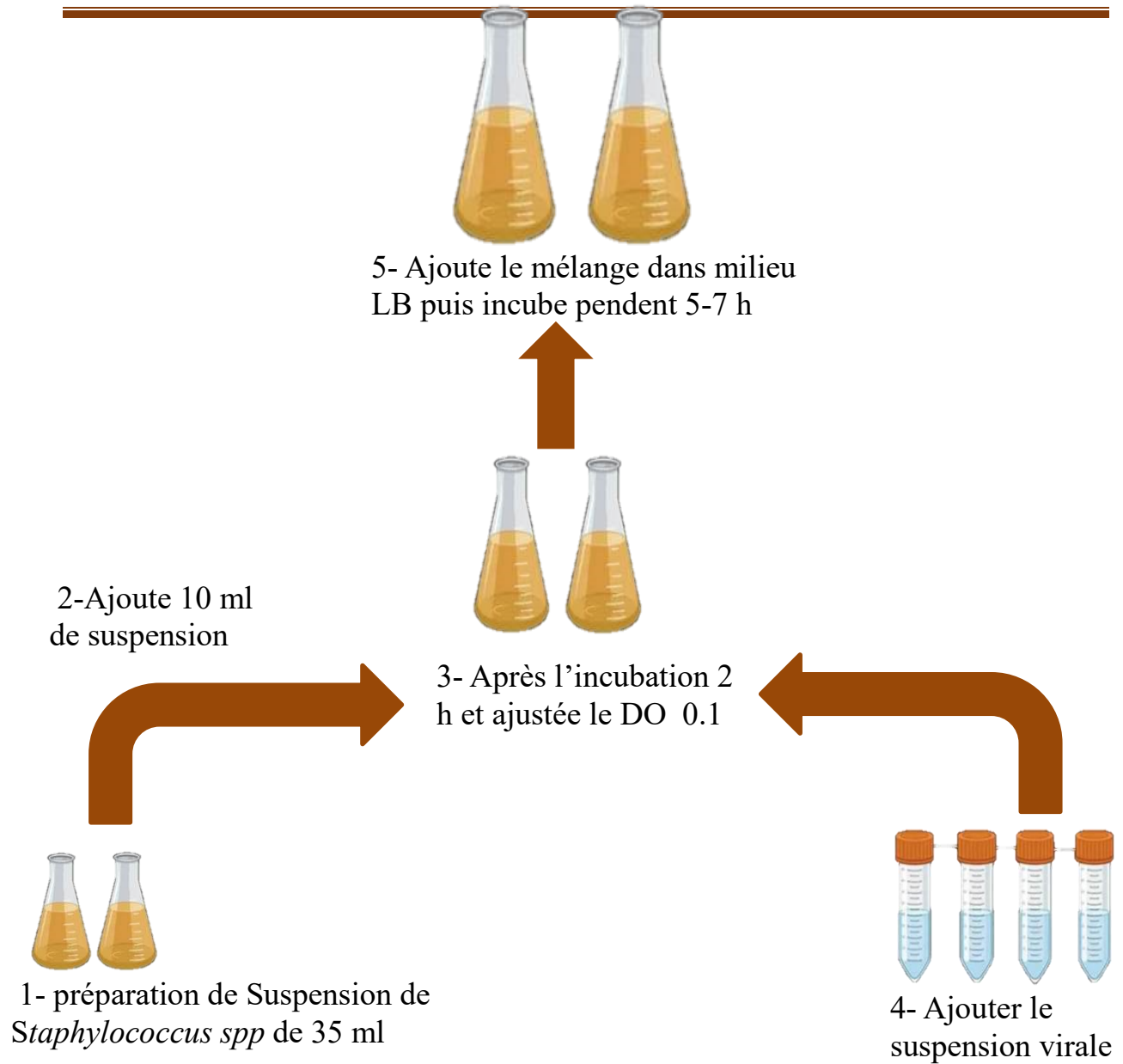


Figure 09: les étapes de préparation le suspension virale à grands échelle

4. Précipitation du bactériophage et Formulation de phagoadditif:

Afin de concentrer le cocktail phagiques, les bactériophages de *Staphylococcus* ont été soumis à une précipitation par le polyéthylène glycol (PEG). Pour cela, le PEG et le NaCl ont été ajoutés à la suspension virale à des concentrations finales de 10 % et 500 mM, respectivement. Ensuite, le mélange a été incubé à 4 °C pendant une nuit. Cela permet aux phages de précipiter sous forme d'un précipité blanc visible au fond des tubes. Les bactériophages précipités ont été récupérés par centrifugation à 4000 tr/min pendant 20 minutes. Après avoir soigneusement retiré le surnageant, le culot a été resuspendu dans un tampon PBS (pH=7), après avoir vortexé les suspensions contiennent les bactériophages précipité par PEG, les suspension ont été ensuite vortexé pendant 20 min, puis filtré par un filtre de 0.22 µm, les filtrats, qui correspond aux suspensions virales pures dans le PBS, ont été mélangés pour obtenir le phagoadditif.

La concentration du bactériophage de *Staphylococcus* dans le phagoadditif a été déterminée par titrage. Cette méthode permet de quantifier le nombre de particules de phage viables dans la suspension virale préparée. La concentration finale de bactériophage lytique dans le phagoadditif doit être ajustée entre 10^6 et 10^7 UFP/ml. Pour cela, la méthode de gélose semi-solide mentionnée précédemment a été utilisée.

Après incubation, les plages de lyse sont dénombrées, chaque plage de lyse correspond à une unité formant une plaque (UFP), le nombre des UFP trouvé correspond au nombre de bactériophage viable dans 1 ml de suspension, multiplié par l'inverse de la dilution.

Après avoir confirmé la concentration de bactériophages dans le phagoadditif, la suspension virale a été filtrée avant d'être mise dans un emballage adéquat.

5. La lyophilisation du cocktail de phagoadditif et observation des bactériophages par microscopie électronique à balayage.:

Après la précipitation du cocktail de bactériophages, une étape de lyophilisation a été réalisée. La suspension virale a été congelée en utilisant de l'azote liquide, puis elle a été placée dans un lyophilisateur pendant 24 heures. Cette procédure permet de transformer la suspension en une poudre sèche de bactériophages. Par la suite, la poudre obtenue a été directement observée sous microscope électronique à balayage afin d'observer les bactériophages.



Figure 14: Les étapes de lyophilisation du cocktail de phagoadditif

6. L'application de phagoadditif pour l'éradication de biofilm :

L'éradiquer de biofilm formé par trois souches sélectionnées de *Staphylococcus*, a été évalué sur trois supports différents : plastique, l'acier inoxydable et le verre.

6.1. L'éradication de biofilm formé sur des tubes en plastiques :

Pour l'éradication du biofilm formé dans des tubes en plastique, les souches sélectionnées de *Staphylococcus* spp ont été d'abordensemencées dans six tubes en plastique contenant le milieu LB (**Figure 12**). Après 24 heures d'incubation à 37 °C, les cultures de chaque tube ont été vidées, puis trois d'entre eux ont été remplacés par la suspension de phagoadditif préparée, tandis que les trois autres tubes ont été utilisés comme témoins

Les tubes contenant la suspension phagique ont ensuite été réincubés pendant 24 heures à 37 °C. Après 24 heures d'incubation, les tubes ont été vidés puis rincés trois fois avec de l'eau distillée stérile. Ensuite, une solution de cristal violet à 0,1% a été ajoutée à chaque tube. Après 30 minutes d'incubation dans l'obscurité (**Figure 14**), le cristal violet a été versé, puis les tubes ont été rincés deux fois avec de l'eau distillée. Le taux d'éradication du biofilm formé a été estimé en ajoutant de l'acide acétique dilué à 30% dans chaque tube, et la densité optique a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 550 nm, puis comparée à la DO du

témoin.

6.2. L'éradication de biofilm formé sur des lames en verre :

Pour étudier l'éradication de biofilm de *Staphylococcus*, sur un support en verre, des lames en verre de microscope optique ont été utilisées. En effet, ces deux lames ont été placées dans deux boîtes de pétri stériles différentes contenant de la culture bactérienne liquide de la souche de *Staphylococcus* sélectionnée, les deux boîtes sont ensuite incubées à 37 °C. Après 24 heures d'incubation, l'une des deux lames a été utilisée comme témoin, tandis que la deuxième lame a été traitée par la suspension virale en l'immergeant dans le phagoadditif. Après 24 heures d'incubation, la lame traitée par le phagoadditif a été rincée trois fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer les cellules non adhérentes. Ensuite, les deux lames, traitée et non traitée, ont été immergées dans une solution de cristal violet à 0,1% (p/v). Après 20 minutes, les lames ont été rincées à l'eau puis séchées à l'air. Une fois séchées, les lames ont été directement observées au microscope optique pour l'analyse.

6.3. L'éradication de biofilm formé sur des lames en acier inoxydables :

Des lames d'acier inoxydable de type AISI 304, mesurant 2,5 cm x 1 cm, ont été utilisées comme support pour étudier l'éradication du biofilm de *Staphylococcus* spp. par le phagoadditif. Les lames ont été placées dans des boîtes de pétri en verre, puis stérilisées dans une étuve réglée à 100 °C pendant 2 heures. Ensuite, elles ont été placées dans des boîtes de pétri stériles contenant 20 ml de suspension bactérienne liquide de *Staphylococcus*. Les boîtes ont été incubées à 37 °C. Après 24 heures d'incubation, deux lames ont été utilisées comme témoins, tandis que les deux autres lames ont été traitées avec 20 ml de suspension virale pendant 3 heures et 30 minutes. Les lames ont ensuite été rincées deux fois avec de l'eau distillée pour éliminer les cellules non adhérentes. Ensuite, elles ont été directement observées au microscope électronique à balayage pour vérifier l'éradication du biofilm.

Résultats et discussions

1. Les souches hôte de *Staphylococcus* :

Les bactéries hôtes utilisées lors de cette étude pour l'isolement des bactériophages ont été obtenues à partir d'un projet de fin d'étude de Master II en microbiologie réalisé par **Belabassi et Gharbi (2023)**, sous la supervision du Dr. Benamar Ibrahim. Les souches bactériennes ont été isolées à partir de différents échantillons de viande de poulet, et leur identification morphologique et biochimique a révélé qu'elles appartenaient au genre *Staphylococcus spp.* Après avoir étudié leur résistance à plusieurs antibiotiques ainsi que leurs virulences, six souches ont été sélectionnées pour la poursuite de ce travail. En effet, les souches sélectionnées ont montré un profil de résistance élevée vis-à-vis de nombreux antibiotiques, et certaines entre eux ont été identifiées comme étant des *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM). De plus, les souches sélectionnées ont été hémolytique et capable de former un biofilm.

Tableau 3 : profil d'antibiorésistance des souches de *Staphylocoque spp* sélectionnées.

	FA10	FOX30	E15	DA2	AMP	VA5/SAM	AML30	CIP50	P1	OX5
24-1-A	22	0	25	23	0	22	0	31	0	0
11-1-B	17	0	21	07	0	15	0	36	0	0
11-2-2	15	0	18	15	0	14	0	31	0	0
10-2-1	2	1	19	27	11	15	0	3	0	0
14-2-2	18	0	18	2	09	12	0	27	0	0
15-1	22	0	19	22	07	13	0	42	0	0

2. Isolement des bactériophages :

Après une incubation de 24 heures à 37°C des boîtes d'isolement contenant les souches sélectionnées de *Staphylococcus spp*, des plages de lyses claires ont été observées dans les boîtes, les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 14**.



Figure 11 : L'apparition des plages de lyse dans les boîtes de *Staphylococcus*

Les résultats observés dans la **Figure 11** démontrent clairement la présence de plages de lyse nettes entourant les points d'application des gouttes d'eau de mer. Chaque plage de lyse correspond à un bactériophage actif distinct qui est capable de lyser spécifiquement les bactéries hôtes du genre *Staphylococcus*, isolées à partir de la viande de poulet. Ces résultats confirment la capacité des bactériophages à cibler de manière spécifique les bactéries *Staphylococcus* et à les éliminer de manière efficace (**Barrette, G. (2015)**).

Le **Tableau 3** présente le nombre de plages de lyse observées pour chacune des six souches de *Staphylococcus* utilisées comme hôtes dans notre étude.

Tableau 3 : le nombre de bactériophages isolés à partir des six souches de *Staphylococcus* sélectionnées

Souches de <i>Staphylococcus</i> hôte utilisés	Nombre de plage de lyse obtenus
24-1-A	17
11-1-B	146
11-2-2	15
10-2-1	146
14-2-2	34
15-1	12

Chaque souche, parmi les six *Staphylococcus* sélectionnées, a été utilisée individuellement comme bactérie hôte pour l'isolement de bactériophages lytiques spécifiques. Les résultats présentés dans le **Tableau 3**, révèlent un total de 370 plages de lyse observées contre les six souches de *Staphylococcus* utilisées. Les souches bactériennes 11-1-B et 10-2-1 ont donné le plus grand nombre de plages de lyse, avec 146 plages pour chacune des deux bactéries hôtes, tandis que la souche 11-2-2 a donné le plus faible nombre de plages de lyse, avec seulement 2.

Ce faible nombre de plages de lyse peut être attribué à une possible résistance de cette souche bactérienne aux bactériophages, qui est généralement due à des enzymes de restriction (Wafiya, D et al. 2022).

Plusieurs études ont été menées pour isoler des bactériophages lytiques spécifiques à différentes bactéries pathogènes. Par exemple, **Jee Eun Han et al. (2013)** ont isolé trois souches virales lytiques à partir d'eau usée prélevée dans une ferme laitière en Corée du Sud. Ces trois souches virales ont démontré une activité lytique contre la souche N315, identifiée comme *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (MRSA). Dans une autre étude réalisée par **Longping Li et Zhiying Zhang (2014)**, un phage virulent spécifique de *S. aureus* a été isolé à partir d'eau usée utilisée pour le nettoyage du pis des vaches. Ce phage, appelé SPW, a montré des zones de lyse claires d'un diamètre de 2 à 3 mm **Marion Dalmasso et al. (2015)** ont également isolé un bactériophage lytique, ϕ APCM01, spécifique de l'espèce *Streptococcus mutans*, à partir d'un échantillon de salive. Ce phage a été identifié comme appartenant à la famille des *Siphoviridae*. Ces différentes études démontrent la capacité d'isoler des bactériophages spécifiques à certaines souches de *Staphylococcus*, ainsi que d'autres espèces bactériennes pathogènes, à partir de sources variées telles que les eaux usées, la salive et l'eau de mer.

3. Purification et sélections des bactériophages lytiques de *Staphylococcus* spp :

Un total de 370 plages de lyse, ont été observées pour les six souches de *Staphylococcus* spp utilisées comme hôtes. Une première sélection a été effectuée afin de retenir que les bactériophages qui donnent des larges diamètres de lyse contre les bactéries hôtes utilisées. Les résultats de cette sélection ont été représentés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4: L'origine des bactériophages lytiques sélectionnés

Tableau : Origine des bactériophages lytiques sélectionnés

Bactériophages sélectionnés	Souches de <i>Staphylococcus</i> hôte utilisés
ϕ Stap 1 : plage de mazala	14-2-2
ϕ Stap 2 : plage de rachgoune	24-1-A
ϕ Stap 3 : plage rachgoune	11-1-B
ϕ Stap 4 : plage mazala	10-2-1
ϕ Stap 5 :palge mazala	11-2-2
ϕ Stap 6 :palge rachgoune	15-1

D'après le **Tableau 4**, six plage de lyse, qui correspondent à six isolats distincts de bactériophages ont été prélevées à partir de chaque souche de *Staphylococcus* spp utilisée comme bactérie hôte.

Après avoir sélectionné les six plages de lyse, une étape de purification a été réalisée. Pour ce faire, les plages de lyse sélectionnées ont été découpées et transférées dans des tubes contenant les bactéries hôtes spécifiques aux bactériophages lytiques sélectionnés. Après une incubation à 37 °C, suivie d'une centrifugation, la suspension obtenue a été filtrée à l'aide d'un filtre de 0,22 μm , afin d'obtenir une suspension virale pure de bactériophages. Cette suspension a été testée pour confirmer le pouvoir strictement lytique des six bactériophages sélectionnés (de $\phi\text{Stap 1}$ au $\phi\text{Stap 6}$), pour cela, la méthode des spots a été utilisée. Les résultats de la confirmation est représentés dans la **Figure 12**.



$\phi\text{Stap 1}$, contre la souche 14-2-2



$\phi\text{Stap 2}$, contre la souche 24-1-A



$\phi\text{Stap 3}$, contre la souche 11-1-B



$\phi\text{Stap 4}$, contre la souche 10-2-1

Figure 12: Résultat de la confirmation du caractère strictement lytique des bactériophages sélectionnés par la méthode de spote.

Les résultats de la **Figure 12**, indique qu'en présence de six *Staphylococcus* spp hôtes, des plages de lyses de grand diamètre ont été formées par les six bactériophages sélectionnés. Ce test a été répété au moins trois fois pour chaque souche hôte, et des résultats

similaires à chaque répétition ont été observés, confirmant ainsi que les six bactériophages sélectionnés sont strictement lytiques contre les bactéries hôtes utilisées.

Le caractère strictement lytique est essentiel pour l'utilisation et l'application des bactériophages. En revanche, les bactériophages tempérés ou lysogéniques peuvent suivre un autre cycle de vie appelé le cycle lysogénique. Dans ce cycle, le bactériophage intègre son génome dans le génome de la bactérie hôte sans causer immédiatement sa lyse. Le génome de bactériophage peut persister silencieusement dans le génome bactérien pendant plusieurs générations, se répliquant avec la bactérie lors de la division cellulaire. Sous certaines conditions, le bactériophage peut s'activer et passer au cycle lytique, entraînant alors la lyse de la cellule bactérienne et la libération de nouvelles particules virales. Au cours de cycle lysogéniques, des gènes de virulences ou de résistance aux antibiotiques peuvent être transférés d'une bactérie à une autre lors de l'infection. Il est donc crucial de sélectionner que des bactériophages strictement lytiques afin de minimiser le risque de transfert horizontal des gènes de virulences ou de résistances, et d'assurer ainsi leur sécurité lors de leur utilisation en tant qu'agents de lutte contre les bactéries pathogènes (**García et al, 2009**).

4. Précipitation du bactériophage et formulation de phagoadditif.

En vue de leur formulation sous forme d'un phagoadditif, les bactériophages lytiques sélectionnés de *Staphylococcus* ont été multiplié dans un litre de milieu de culture liquide (milieu LB), en présence des *Staphylococcus* spp hôtes. Cette multiplication vise à obtenir une quantité suffisante de suspension virale contenant une concentration élevée de particules phagiques. Après centrifugation suivie par filtration, les six bactériophages sélectionnés, ont été précipité à partir des suspensions virales préparées, en utilisant le polyéthylène glycol (PEG), les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 13**.

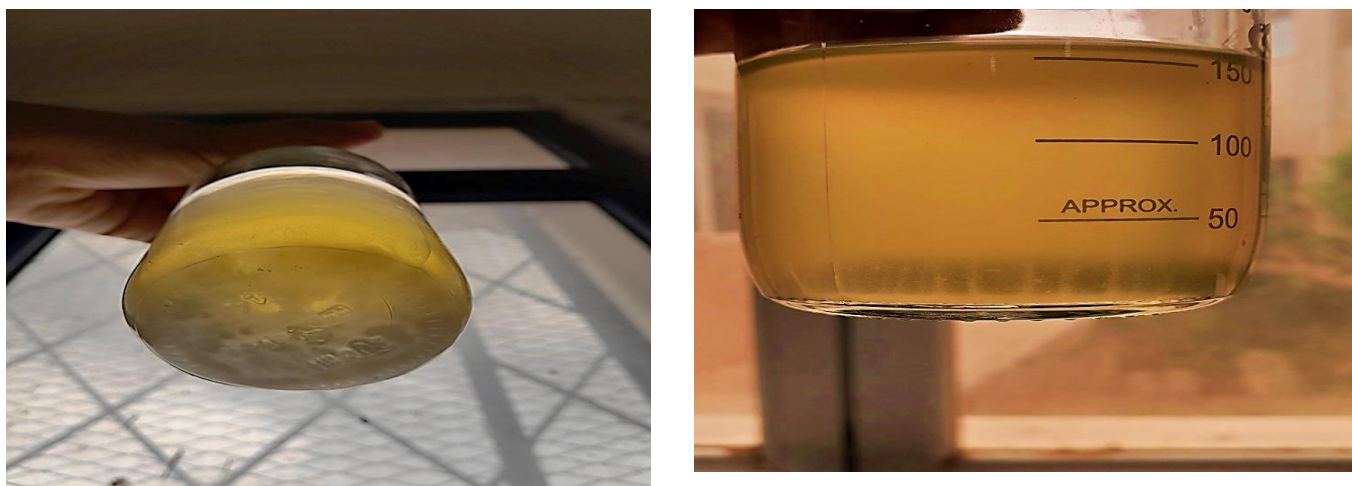


Figure 13 : Résultats de précipitation de bactériophage par le polyéthylène glycol

D'après la **Figure 13**, des précipités blancs ont été observés, cela indique la réussite de l'étape de précipitation de bactériophages, ces précipités ont été récupérés par centrifugation. En effet, le but de la précipitation c'est de purifier le bactériophage à partir de la suspension virale contenant le milieu de culture et les particules virales. Le PEG agit en provoquant une déshydratation des particules virales, ce qui entraîne leur aggrégation et leur précipitation. Il convient de noter que la précipitation des bactériophages à l'aide de PEG est une technique couramment utilisée, mais son efficacité peut varier en fonction des caractéristiques spécifiques des bactériophages et des conditions expérimentales utilisées.

Après avoir précipité les six isolats de bactériophages, le phagoadditif a été formulé par mélange des six suspensions virales. La concentration des bactériophages dans le phagoadditif a été entre 10^6 et 10^7 UFP/ml.

5. Lyophilisation du phagoadditif et observation des bactériophages sous microscopie électronique à balayage :

Dans le but d'observer la morphologie des bactériophages présentes dans la solution de phagoadditif préparée, nous avons utilisé la microscopie électronique à balayage. Pour cela, une fraction de la suspension virale de phagoadditif a été lyophilisée afin de faciliter l'observation des bactériophages. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 14**.



Figure 14 : Microscopie électronique à balayage révélant la morphologie des bactériophages présents dans le phagoadditif.

Les bactériophages observés présentent des morphologies distinctes. Certains d'entre eux possèdent une tête icosaédrique qui contient le génome viral, attachés à une queue. Cette morphologie est caractéristique des souches phagiques appartenant à la famille des *Myoviridae*. D'autres bactériophages présentent une morphologie icosaédrique sans queue, ce qui les classe dans les genres appartenant à la famille des *Tectiviridae* ou *Cystoviridae* (Connell et al, 2014).

5. Application de phagoadditif

5. 1. L'application du phagoadditif in vitro contre les *Staphylococcus spp*:

Le phagoadditif formé par une suspension virale contenant un cocktail de six bactériophages lytiques sélectionnés (ϕ Stap 1, ϕ Stap 2, ϕ Stap 3, ϕ Stap 4, ϕ Stap 5 et ϕ Stap 6) a été appliqué in vitro pour contrôler la croissance des différentes espèces de *Staphylococcus* isolées à partir de la viande de poulet, les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 18**.

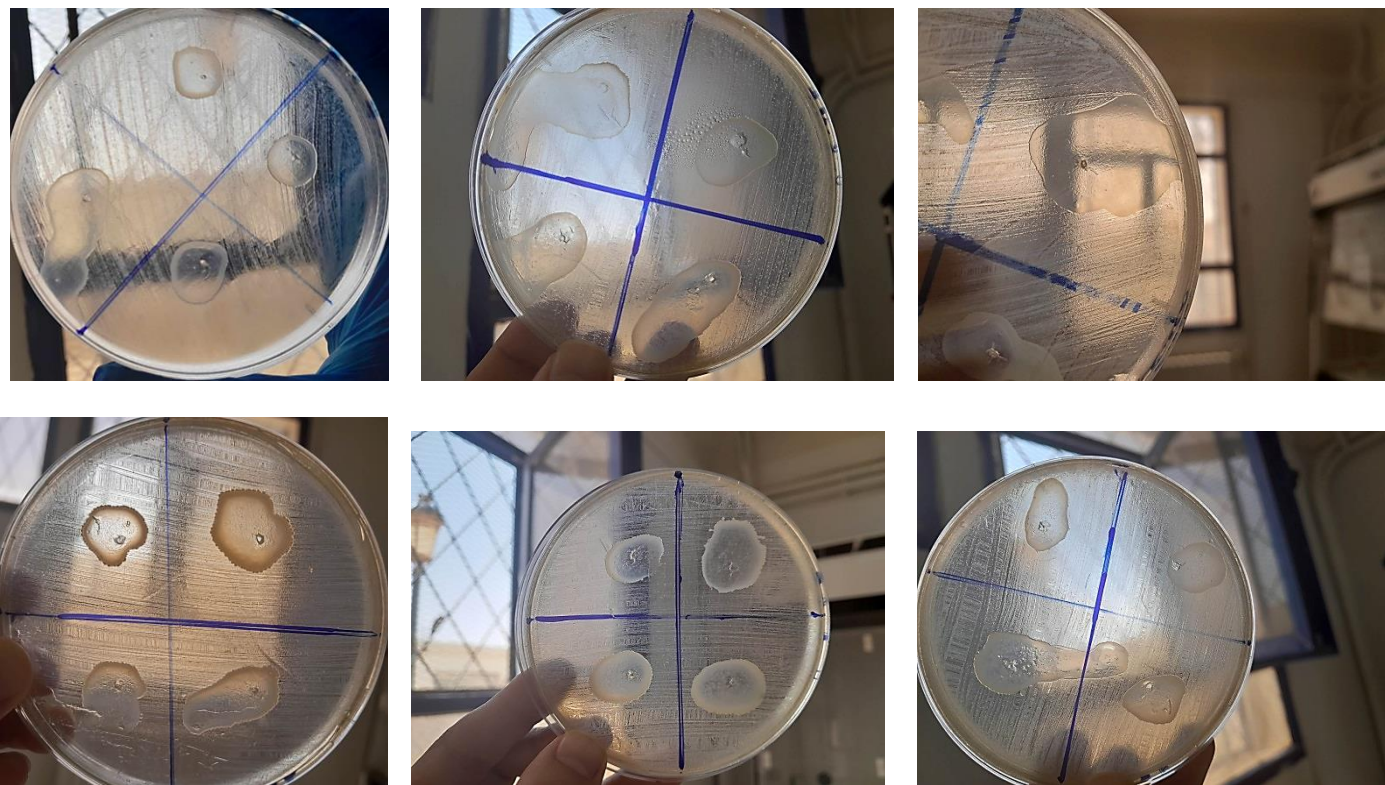


Figure 15 : L'activité de phagoadditif contre les six souches de *Staphylococcus* spp.

Les résultats de la **Figure 18** démontrent clairement que le phagoadditif préparé est efficace contre les six bactéries hôtes de *Staphylococcus* spp, utilisées dans cette étude. Cela indique que notre phagoadditif possède un large spectre d'activité, capable de cibler et d'éliminer différentes souches appartenant au genre *Staphylococcus*. Ces résultats sont prometteurs et suggèrent que notre phagoadditif pourrait être utilisé comme une méthode efficace de contrôle de la croissance des *Staphylococcus* d'origine alimentaire ou autre.

5.2. L'application du phagoadditif pour la lutte contre les biofilms formés par les souches de *Staphylococcus* spp:

Les biofilms bactériens, y compris ceux formés par des souches de *Staphylococcus*, sont des communautés microbiennes qui adhèrent fermement aux surfaces. Cette structure en biofilm confère aux bactéries une résistance extrême aux traitements de nettoyage conventionnels. Pour cela, le phagoadditif développé dans notre étude a été appliqué dans l'éradication des biofilms matures de 24 heures, formé par les différentes souches de *Staphylococcus* spp, sur trois types de surfaces : le plastique, le verre et l'acier inoxydable.

5.2.1. L'éradication de biofilm formé sur un support en plastique.

Trois souches de *Staphylococcus* ont été sélectionnées pour cette expérience : 11-1-B, 24-1-A et 11-2-2. Ces souches ont été choisies en raison de leur capacité à former un biofilm sur des supports en plastique.

Des biofilms de 24 heures ont été formés dans des tubes en plastique. Deux tubes ont été utilisés pour chaque souche sélectionnée. L'un des deux tubes a été traité avec le phagoadditif, tandis que le deuxième tube reste sans traitement et sert donc comme témoin. Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 15**.

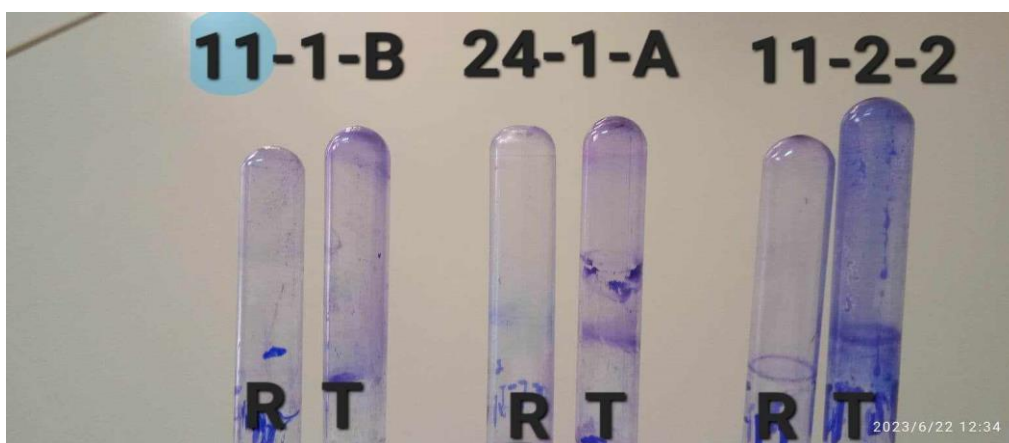


Figure 16 : Résultat de l'activité anti-biofilm des souches de *staphylocoques*, (R) Réduction et (T) Témoin.

Après avoir coloré les biofilms formés sur les tubes en plastiques, avec du cristal violet pendant 30 minutes (**Figure 16**), il est clair que la souche 11-2-2 est une très bonne formatrice de biofilm, en comparaison avec les deux tubes témoins des souches 11-1-B et 24-1-A

De plus, les résultats de la **Figure 16** indiquent une nette éradication du biofilm de 24 heures, dans les trois tubes traités avec le phagoadditif. On peut observer visuellement une diminution significative de l'intensité de la coloration par le cristal violet des tubes traités avec la suspension virales, par rapport aux tubes témoins. Ces résultats indiquent la capacité de la suspension virale préparée à éradiquer les biofilms matures de *Staphylococcus* formés pendant 24 heures sur un support en plastique.

Dans le but de quantifier le taux d'éradication du biofilm par le phagoadditif, l'acide acétique glacial à 30% a été ajouté dans chaque tube contenant les biofilms traités ainsi que

les tubes témoins. Ensuite, la densité optique de chaque solution a été mesurée à une longueur d'onde de 550 nm. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 16**.

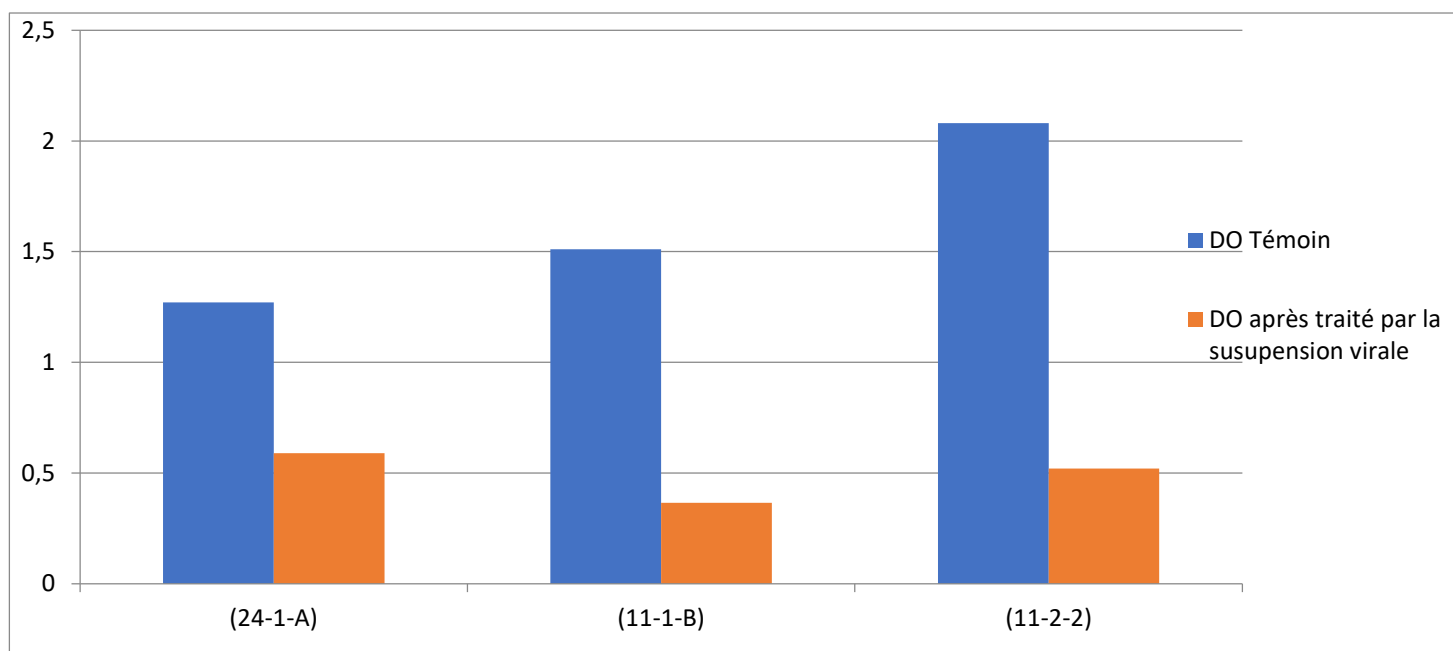


Figure 17: Le diagramme montre le pourcentage de densité optique après et avant traitement avec une suspension de phages.

En comparaison avec les tubes témoins non traités par le phagoadditif, une nette diminution des densités optiques a été observée pour les tubes traités par le phagoadditif. En effet, une éradication de 75% et 75,91% des biofilms formés pendant 24 heures a été observée pour les souches 11-1-B et 11-2-2, respectivement, tandis qu'une éradication de 53% a été observée pour le biofilm de 24h formé par la souche 24-1-A. Ces résultats confirment le pouvoir antibiofilm du phagoadditif contre les différents biofilms formés par les trois souches de *Staphylococcus* testées, sur le support en plastique. Des résultats similaires ont été obtenus par **Mark Fenton et al. (2013)**, qui ont utilisé la souche virale CHAPK pour éradiquer des biofilms de 24 heures formés par l'espèce *S. aureus* DPC5246. Les résultats ont montré que le traitement avec la souche CHAPK réduisait significativement la formation de biofilm par rapport au témoin.

5.2.2. L'éradication de biofilm formé sur un support en verre.

L'éradication du biofilm de 24 heures formé par la souche 11-2-2 sur un support en verre a été étudiée. Après avoir formé un biofilm sur la moitié de deux lames de microscope

optiques pendant 24 heures, l'une des lames a été traitée avec le phagoadditif, tandis que l'autre lame a été utilisée comme témoin. Les résultats sont présentés dans la **Figure 17**.

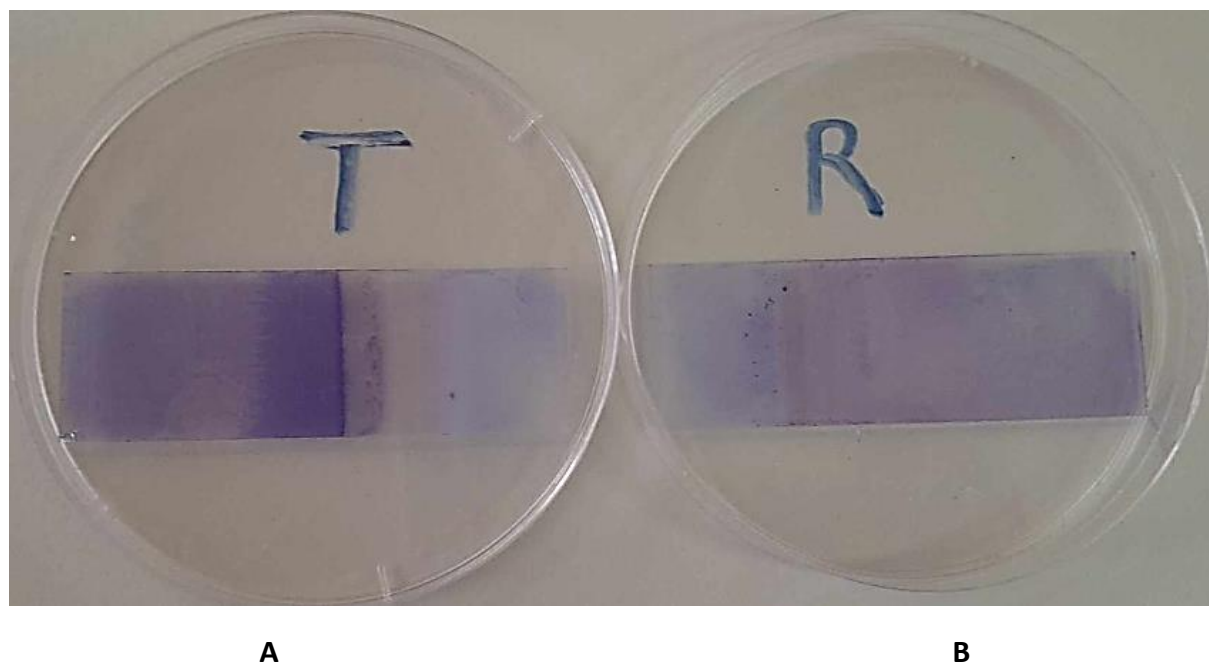


Figure 18 : Technique des lames on verre. A : Lames témoin, B : Lames traité par le phagoadditif.

Une nette réduction de l'intensité de la coloration au cristal violet a été observée pour la lame traitée par la suspension virale, par rapport à la lame témoin, indiquant ainsi une bonne éradication du biofilm de 24 heures formé par la souche 11-2-2. Les deux lames ont ensuite été observées au microscope optique, et les résultats sont représentés dans la **Figure 19**.

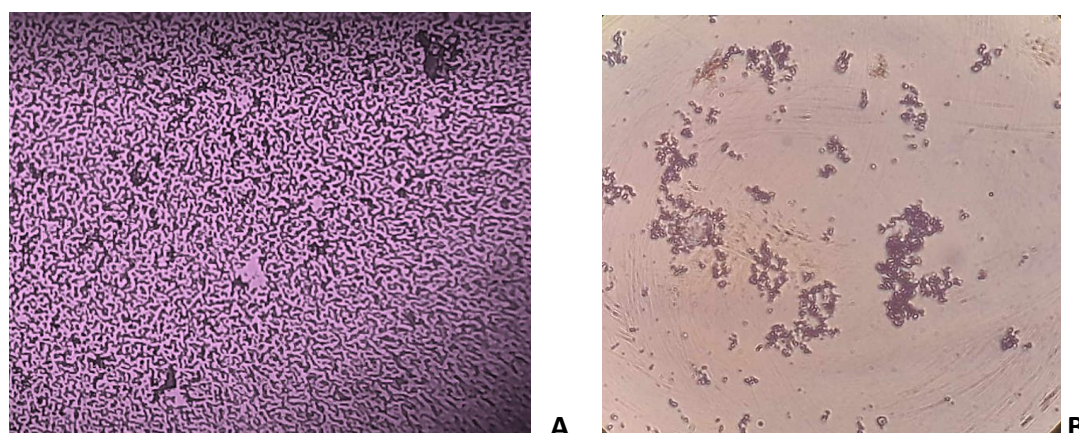


Figure 19: Observation du biofilm formé par la souche 11-2-2 sur des lames en verre, avant (A) et après (B) traitement par le phagoadditif.

Les deux lames ont été observées au microscope optique pour évaluer la structure de biofilm formé avec ou sans traitement par la suspension virale. Les images obtenues ont révélé une différence notable entre le biofilm formé par la souche 11-2-2 sur la lame traitée par la suspension virale et le biofilm observé sur la lame témoin. Sur la lame traitée, on observe une diminution significative du biofilm, avec une architecture moins développée et une présence réduite de microcolonies. En revanche, sur la lame témoin, une couche dense de cellule de la souche 11-2-2, attaché à la surface de la lame en verre, a été observé, indiquent ainsi la formation d'un biofilm mature. Ces résultats confirment l'activité anti-biofilm du phagoadditif contre le biofilm mature de 24 h formé par la souche 11-2-2, observé dans la **Figure 21**.

Le verre est une matière largement utilisée dans le domaine médical. Par conséquent, le phagoadditif peut être utilisé pour éliminer les *Staphylococcus* à l'état adhérent sur des surfaces en verre, les dispositifs médicaux en verre, ce qui peut contribuer à la prévention des infections nosocomiales.

5.2.2. L'éradication de biofilm formé sur un support en acier inoxydable.

Le biofilm de 24 h a été formé par la souche 11-2-2 sur deux lames d'acier inoxydable, puis l'une des lames a été traitée par le phagoadditif, pendant une courte durée (3h :30 min). Les résultats sont présentés dans la **Figure 19**.



Figure 20 : Formation de biofilm sur des lames inoxydables. A : Une lame témoin sans traitement par le phagoadditif ; B : Une lame après traitement par la suspension de phagoadditif.

Malgré la courte durée d'application de phagoadditif une éradication forte de biofilm de 24 formé par la souche 11-2-2 a été observé (**Figure 20. B**).

La microscopie électronique à balayage a été réalisée pour observer les lames d'acier inoxydable avant et après le traitement par la solution phagique du phagoadditif. Une application courte de la solution phagoadditif a été effectuée pour capturer l'action des

bactériophages pendant l'éradication du biofilm. Les résultats sont présentés dans la **Figure 20**.

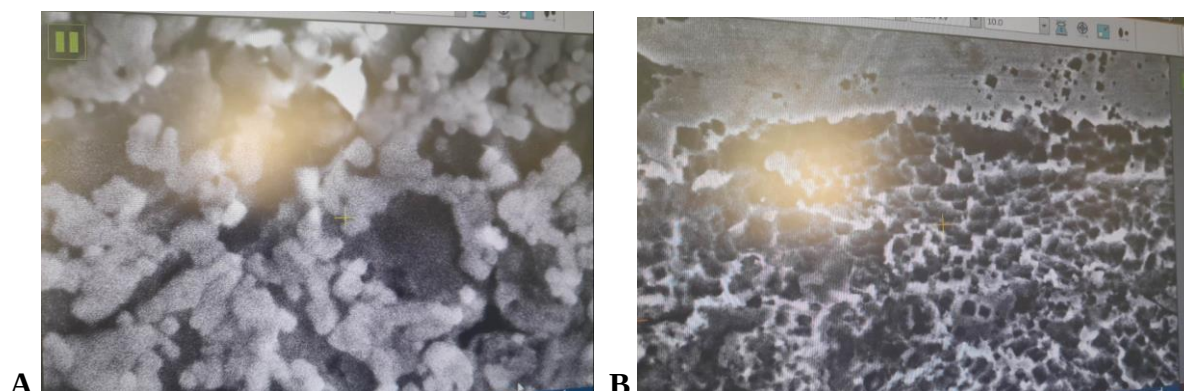


Figure 21 : Biofilm formé par la souche 11-2-2 sur des lames d'acier inoxydable, A : le biofilm avant traitement par le phagoadditif ; B : Le biofilm après traitement par le phagoadditif .

Avant l'application de la solution phagique, le biofilm formé par la souche 11-2-2 sur les lames d'acier et observé sous microscope électronique à balayage (**Figure 21. A**), apparaît sous forme d'un complexe enchevêtrée d'agrégats de cellules bactériennes denses, parfois appelées microcolonies, qui constituent les unités structurales du biofilm (**Figure 21. A**)

Lorsque la solution phagique a été appliquée sur le biofilm, les bactériophages contenus dans le phagoadditif, pénètrent à travers la matrice d'exopolysaccharide du biofilm, pour attaquer les cellules bactériennes de *Staphylococcus* constituant le biofilm. Au fur et à mesure que les bactériophages se multiplient, ils commencent à lyser les cellules hôtes, ce qui entraîne la destruction de la structure du biofilm, ce qui conduit par la suite à la formation de trous ou de zones vides dans la matrice d'exopolysaccharides. Ainsi, l'observation des trous dans la matrice d'exopolysaccharides (**Figure 21 B**), après l'application de la solution phagique indique que les bactériophages ont réussi à cibler et à éliminer les bactéries du biofilm, entraînant ainsi la dégradation de la matrice et la destruction du biofilm.

L'utilisation de l'acier inoxydable dans l'industrie est répandue, notamment dans les secteurs alimentaire, pharmaceutique, chimique et biomédical. Il est utilisé dans la fabrication d'équipements tels que des cuves de fermentation, des tuyaux, des réservoirs de stockage, des échangeurs de chaleur, des instruments chirurgicaux, etc. Les biofilms, peuvent se former sur l'acier inoxydable et entraîner des problèmes d'hygiène, de contamination et de performance des équipements industriels. La lutte contre les biofilms est donc essentielle pour maintenir

des conditions sanitaires adéquates et optimiser les processus de production. Le phagoadditif est une solution alternative prometteuse pour l'élimination des biofilms. L'utilisation de phagoadditifs permet de réduire l'utilisation d'agents chimiques tels que les produits de nettoyage et de désinfection conventionnels, tels que le CIP (Cleaning In Place). En remplaçant ou en complétant le CIP par l'utilisation de phagoadditifs, les industries peuvent bénéficier d'une approche plus ciblée et spécifique pour éliminer les biofilms, tout en réduisant l'impact sur l'environnement et en minimisant les résidus chimiques. Donc l'application de phagoadditifs comme moyenne de lutte contre les biofilms sur l'acier inoxydable suscite un intérêt croissant.

Conclusion

Cette étude vise à fabriquer une suspension de phages capables d'éliminer toutes les bactéries *Staphylococcus*, basée sur l'isolement d'un groupe différent de phages analytiques de *staphylococcus* qui ont été prélevés dans de l'eau de mer et recueillis dans une solution saline. les phages et testé la solution obtenue sur des bactéries *staphylocoques*. Nous avons constaté la formation de plusieurs plages de lyses de tailles différentes.

Dans les cas où de grandes plaques de décomposition semblaient être des phages lytique à ces *staphylococcus* à été testé 3 fois pour a conformation Le caractère lytique de ces phages, Au final nous avons choisi 6 phages lytique nommée (ϕ Stap 1, ϕ Stap 2 , ϕ Stap 3, ϕ Stap 4, ϕ Stap 5, ϕ Stap 6).

L'efficacité de la suspension de bactériophages a été testée contre le biofilm formé après 24 heures pour trois bactéries de *staphylococcus*. Après observation et mesure, nous avons constaté que les biofilms étaient éliminés par la suspension de phages à 80%.

Après observation au microscope optique. Les résultats ont montré l'efficacité des phages contre un large éventail de bactéries indésirables, et à la suite de cette expérience, nous concluons et confirmons qu'une suspension de bactériophages yéti peut être utilisée comme extrait antimicrobien, qui est efficace pour traiter certains types d'infections. en cas d'échec médicamenteux. Il est également considéré comme un antiseptique efficace pour éliminer les films formés sur toutes les surfaces En gros, c'est ce qui rend l'application de ce produit large dans plusieurs domaines, comme le domaine médical pour stériliser les outils chirurgicaux et le milieu médical en général pour prévenir la propagation des épidémies et des maladies chez les patients. Dans le domaine alimentaire, il préviendra de nombreuses catastrophes d'intoxications alimentaires. Côté industriel, il évitera aux industriels de nombreuses pertes dues à la formation de membranes, notamment Au point de critiquer les zones difficiles d'accès pour les humains.

Références bibliographiques

Références bibliographies

- **Ackermann, H. W. 2009.** Phage classification and characterization. *Methods Mol. Biol.*501:127-140.
- **Ackermann, H.-W. 1999.** Tailed bacteriophages: the order Caudovirales. *Adv. Virus Res.*51:135-201.
- **Ackermann, H.-W., A. Audurier, L. Berthiaume, L. A. Jones, J. A. Mayo & A. K.Vidaver. 1978.** Guidelines for bacteriophage characterization. *Adv. Virus Res.*23:1-24.
- **Atterbury, R. J., Connerton, P. L., Dodd, C. E., Rees, C. E., & Connerton, I. F. (2003).** Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Applied and environmental microbiology*,69(10), 6302-6306.
- **Balaban, N. & A. Rasooly. 2000.** Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.*61:1-10.
- **Belabassi et Gharbi (2023),** Évaluation de l'antibiorésistance et du potentiel de formation de biofilm des souches de *Staphylococcus* spp. isolées à partir de la viande de poulet (page18_38) .
- **Barrette, G. (2015).** Évaluation de l'utilisation des bactériophages antistaphylococcus aureus pour l'assainissement de surfaces [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
- **Bigwood, T., Hudson, J. A., Billington, C., Carey-Smith, G. V., & Heinemann, J. A.(2008).** Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiology*, 25(2), 400-406.
- **Chalmers, I., Atkinson, P., Fenton, M., Firkins, L., Crowe, S., & Cowan, K. (2013).** Tackling treatment uncertainties together: the evolution of the James Lind Initiative, 2003–2013. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 106(12), 482-491.
- **Djeffal, S., Aoun, L., Mamache, B., Elgroud, R. (2010).** Appreciation de la qualité bactériologique des carcasses de poulets de chair frais destinées à la consommation humaine. Dans : 1er symposium national des sciences avicoles (p. 72). Batna: Université de Hadj-Lakhdar - Batna1.
- **De Buyser, M. (1996).** Les staphylocoques. Dans : *Microbiologie alimentaire Tome1/Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments*, C.M.Bourgeois, J.F.Mesle et J.Zucca. Paris: Lavoisier.TEC et DOC.
- **De Buyser, M.L., Martel, J.L., Maris, P., Hennekinne, J.A., Carpentier, B., (2003).** *Staphylococcus aureus*.
- **Deghorain, M. & L. Van Melderren. 2012.** The Staphylococci phages family: an overview. *Viruses*. 4:3316-3335.
- **Daniel, A., P. E. Bonnen & V. A. Fischetti. 2007.** First complete genome sequence of two *Staphylococcus epidermidis* bacteriophages. *J. Bacteriol.* 189:2086-2100.
- **Dalmasso, M., De Haas, E., Neve, H., Strain, R., Cousin, F. J., Stockdale, S. R., ... & Hill, C. (2015).** Isolation of a novel phage with activity against *Streptococcus mutans* biofilms. *PLoS One*, 10(9), e0138651.

Références bibliographies

- **Fenton, M., Keary, R., McAuliffe, O., Ross, R. P., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2013).** Bacteriophage-derived peptidase eliminates and prevents Staphylococcal biofilms. *International journal of microbiology*, 2013.
- **Garcia, P., B. Martinez, J. M. Obeso, R. Lavigne, R. Lurz & A. Rodriguez. 2009.** Functional genomic analysis of two Staphylococcus aureus phages isolated from the dairy environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:7663-7673.
- **Goode, D., Allen, V. M., & Barrow, P. A. (2003).** Reduction of experimental Salmonella and Campylobacter contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 5032-5036.
- **Guergueb, N. (2022).** Impact des pratiques hygiéniques d'abattage et de vente sur la contamination micro
- **Han, J. E., Kim, J. H., Hwang, S. Y., Choresca Jr, C. H., Shin, S. P., Jun, J. W., ... & Park, S. C. (2013).** Isolation and characterization of a Myoviridae bacteriophage against Staphylococcus aureus isolated from dairy cows with mastitis. *Research in veterinary science*, 95(2), 758-763.
- **Jaomanjaka, F. (2014).** Diversité des bactériophages infectant la bactérie lactique *Oenococcus oeni*, responsable de la fermentation malolactique des vins (Doctoral dissertation, Université de Bordeaux).
- **Kelly, B. G., A. Vespermann & D. J. Bolton. 2009.** Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food Chem. Toxicol.* 47:969-977.
- **Kelly, D., O. McAuliffe, R. P. Ross, J. O'Mahony & A. Coffey. 2011.** Development of a broad-host-range phage cocktail for biocontrol. *Bioeng. Bugs.* 2:31-37.
- **Klumpp, J., J. Dorscht, R. Lurz, R. Biemann, M. Wieland, M. Zimmer, R. Calendar & M. J. Loessner. 2008.** The terminally redundant, nonpermuted genome of *Listeria* bacteriophage A511: a model for the SPO1-like myoviruses of gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 190:5753-5765.
- **Li, L., & Zhang, Z. (2014).** Isolation and characterization of a virulent bacteriophage SPW specific for *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis of lactating dairy cattle. *Molecular biology reports*, 41, 5829-5838.
- **LMašláňová, I., J. Doškař, M. Varga, L. Kuntová, J. Mužík, D. Malúšková, V. Růžicková & R. Pantůček. 2013.** Bacteriophages of *Staphylococcus aureus* 133.
- **Matti, R. A., Rufino, M. C., Hirigoyen, U., Mazenod, É., & Seuzaret, G. (2020).** Un bactériophage exploite le système de communication de son hôte bactérien pour entrer en cycle lytique. *médecine/sciences*, 36(11), 1078-1080.
- **Martineau, A. (2010).** Isolement et caractérisation de bactériophages comme moyen de lutte naturel contre les infections nosocomiales.
- **Novick, R. P. 2003.** Mobile genetic elements and bacterial toxin genes: the superantigen encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid.* 49:93-105.
- **O'Flaherty, S., Ross, R. P., & Coffey, A. (2009).** Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 33(4), 801-819.

Références bibliographies

- **P. García, B. Martínez, J.M. Obeso, A. Rodríguez, 2008.** Bacteriophages and their application in food safety, *Letters in Applied Microbiology*, Volume 47, Issue 6, 1 December 2008, Pages 479–485,
- **Scharn, C. R., F. C. Tenover & R. V. Goering. 2013.** Transduction of staphylococcal cassette chromosome mec elements between strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:5233-5238.
- **Sillankorva SM, Oliveira H, Azeredo J. (2012).** Bacteriophages and their role in food safety. *Int J Microbiol.* Article ID 863945.
- **Sulakvelidze, A. 2013.** Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens. *J. Sci. Food Agric.* 93:3137-3146.
- **Suzuki, H., T. Lefebure, P. P. Bitar & M. J. Stanhope. 2012.** Comparative genomic analysis of the genus *Staphylococcus* including *Staphylococcus aureus* and its newly described sister species *Staphylococcus simiae*. *BMC Genomics.* 13:1471-2164.
- **Skurnik, M., M. Pajunen & S. Kiljunen. 2007.** Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnol. Lett.* 29:995-1003.
- **Thomas, C. M. & K. M. Nielsen. 2005.** Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:711-721.
- **Wafiya, D., Labadlia Sana, M. R., & Leila, S. (2022).** Isolement et application des bactériophages.
- **Yoon H, Yun J, Lim JA, Roh E, Jung KS, Chang Y, Ryu S, Heu S. 2013** .Characterization and genomic analysis of two *Staphylococcus aureus* bacteriophages isolated from poultry/livestock farms. *J Gen Virol.* 2013 Nov;94(Pt 11):2569-2576. doi: 10.1099/vir.0.053991-0. Epub 2013 Aug 23. PMID: 23973965; PMCID: PMC3809110.

Annexe 01

1. Milieux de culture

1.1 Milieux de culture liquides

➤ Bouillon cœur cervelle (BHIB)

Composition :

Infusion de cervelle de veau.....	12.5g
Infusion de cœur de bœuf.....	05g
Peptone.....	10g
Glucose.....	02g
Chlorure de sodium.....	02g
Phosphatase di sodique.....	05g

pH= 7.4

Préparation : 37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 121°C, 15min

1.2 Milieux de culture solides

➤ Gélose nutritive

pour la conservation des souches à courte terme et faire le dénombrement sur boîtes de pétrie.

Composition :

Peptone.....	5g
Extrait de viande.....	01g
Chlorure de sodium.....	05g
Agar.....	15g

pH=7.3

Préparation : 28g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 121°C, 15min

➤ Milieu Mueller-Hinton

Composition :

Amidon.....	1.5 g
Infusion de boeuf.....	2.0 g
Agar bactériologique.....	17.0g
Peptone de caséine acide.....	17.5g

PH du milieu prêt à l'emploi 7.4 +/- 0.2 à 25°C.

Préparation : mettre en suspension 38g de milieu déshydraté dans 1l d'eau distillée. Bien agiter, faire bouillir pendant 1 minute puis stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à 121°C.

Milieu Luria-Bertani

Peptone.....	10g
Extrait de levures	5g
NaCl.....	5g

PH du milieu prêt à l'emploi 7. +/- 0.2

. Préparer les ingrédients suivants: 10 g de peptone. 5 g d'extrait de levures. 10 g de NaCl.

□ Milieu Mueller-Hinton

Amidon.....	1.5 g
Infusion de boeuf.....	2.0 g
Peptone de caséine acide.....	17.5g

PH du milieu prêt à l'emploi 7.4 +/- 0.2 à 25°C.

Préparation : mettre en suspension 38g de milieu déshydraté dans 1l d'eau distillée. Bien agiter, faire bouillir pendant 1 minute puis stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à 121°C.



projet pour obtenir un Diplôme/ Startup dans le
cadre de l'Arrêté Ministériel 1275



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة عمار تليجي بالأغواط

UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOuat

Titre du projet:

Formulation d'un phagoadditif pour maîtriser la croissance des
souches de *Staphylococcus spp.*



Image de marque

Le nom commercial

PHAGOADDITIF

Equipe d'encadrement

Superviseur principal :

Spécialisation:

Messaoudi Omar

Microbiologie appliquée

L'équipe de travail :	Spécialisation	FACULTE
Amar Tourkia	Microbiologie appliquée	FACULTE DES SCIENCES
Bouhamida Fatima Zohra	Microbiologie appliquée	FACULTE DES SCIENCES
Taaba Messaouda	Microbiologie appliquée	FACULTE DES SCIENCES



Table des matières

		page
Le premier axe <i>Présentation du projet</i>	Présentation du projet	1
	Problématique	1
Le deuxième axe <i>Aspects Innovants</i>	nature des innovations	7
	domaines d'innovation	7
Le troisième axe <i>Analyse stratégique du marché</i>	Vue du segment de marché	9
	Mesurer l'intensité de la concurrence	9
	Stratégie de marketing	10
	Business Model Canvas	12
Le quatrième axe <i>Plan de production et organisation</i>	Processus de production	14
	Achat de matières premières et d'équipements	14
	Préparation	16
	Emballage	16
	Approvisionnement	17
	main-d'œuvre	17
	partenariats clés	17
Le cinquième axe <i>Plan financier</i>	coûts et charges	19
	Numéro d'entreprise	21
	Tableau des comptes	27
	des résultats attendus	28
	Plan de trésorerie	28
Le sixième axe Le quatrième axe <i>Plan de production et organisation</i>	BILANS PREVISIONNELS SUR 5 ANS ACTIF et Passif	26
	COMPTE DE RUSULTAT PREVISIONNEL DE STARTUP: 02	27
	plan de trésorerie pour 5 ans	



الجامعة العراقية
CNCSTIU
الجامعة العراقية

الوزارة العراقية

الوزارة العراقية

Le premier axe

Présentation du projet





projet pour obtenir un Diplôme/ Startup dans le
cadre de l'Arrêté Ministériel 1275





projet pour obtenir un Diplôme/ Startup dans le
cadre de l'Arrêté Ministériel 1275





1. Présentation du projet :

Les *Staphylococcus* représentent un problème de santé publique majeur, leur propagation dans les aliments, les établissements de santé et les industries alimentaires, peut entraîner des infections nosocomiales, des intoxications alimentaires et d'autres problèmes sanitaires. Il est donc essentiel de trouver des méthodes efficaces pour les prévenir et les contrôler. Le phagoadditif offre une solution novatrice pour lutter contre les souches de *Staphylococcus*. Il s'agit d'un produit contenant un cocktail de bactériophages lytiques spécifiques aux *Staphylococcus ssp*, les bactériophages sont des virus capables de cibler et d'éliminer sélectivement ces bactéries pathogènes. Le phagoadditif peut être appliqué sur des surfaces de matériel médical, les canalisations industrielles, les produits alimentaires, et même à domicile pour le nettoyage des fruits, des légumes et des viandes. Le phagoadditif représente le premier produit en Algérie à base de virus lytique et représente donc une avancée majeure dans la lutte contre les *Staphylococcus*. Le phagoadditif offrant beaucoup d'avantages par rapport aux autres produits existant sur le marché, en effet le phagoadditif agit spécifiquement sur les *Staphylococcus*, sans affecter les autres bactéries bénéfiques, aussi, il peut être utilisé sur une variété de surfaces inertes et de tissus alimentaires. Contrairement à d'autres produits, le phagoadditif ne modifie pas les caractéristiques organoleptiques ou nutritionnelles des aliments traités. Le phagoadditif est un produit économique, puisque une seule application peut suffire à éliminer la contamination des *Staphylococcus*, réduisant ainsi les coûts liés à la désinfection répétée.

Problématique

Les *Staphylococcus* sont des bactéries pathogènes qui peuvent causer divers problèmes sanitaires et économiques dans différents domaines. Dans le secteur agro-alimentaire, les contaminations par les *Staphylococcus* peuvent entraîner des intoxications alimentaires graves, pouvant parfois conduire à la mort des individus. Ces contaminations peuvent également entraîner des rappels de produits, ce qui engendre des pertes financières considérables pour les entreprises agro-alimentaire.

Dans le domaine médical, la propagation des *Staphylococcus* dans les milieux hospitaliers est une préoccupation majeure. Ces bactéries peuvent provoquer des infections nosocomiales chez les patients vulnérables, entraînant une augmentation des coûts de santé,



des séjours prolongés à l'hôpital et une diminution de l'efficacité des traitements médicaux, due à leurs résistances aux antibiotiques, ce qui complique encore davantage leur traitement.

Dans les industries alimentaires, la formation de biofilms par les *Staphylococcus* dans les installations industrielles pose des problèmes d'hygiène. Ces biofilms peuvent entraîner des retards de production, des problèmes de qualité des produits et des coûts supplémentaires liés aux mesures de désinfection et de nettoyage nécessaires pour les éliminer.

Les méthodes actuellement utilisées pour maîtriser la croissance de *Staphylococcus* dans les secteurs agroalimentaire, industriel et médical présentent plusieurs inconvénients. En effet, les méthodes physiques reposent principalement sur l'utilisation de la chaleur (pasteurisation, UHT, appertisation), de l'irradiation (UV-Visible), du froid (congélation, réfrigération, surgélation) ou de la déshydratation, ces méthodes bien efficaces pour réduire la présence de *Staphylococcus*, mais elles sont souvent coûteuses et peuvent altérer les caractéristiques organoleptiques et nutritionnelles des aliments. D'autre part, les méthodes chimiques utilisées pour contrôler la croissance de *Staphylococcus*, peut être préoccupante en raison de leurs effets néfastes sur la santé humaine et sur l'environnement, surtout lorsque leur concentration dépasse les limites réglementaires. De plus, ces méthodes chimiques peuvent également être coûteuses et nécessiter des procédures complexes pour leur application.

En outre, les méthodes physiques et chimiques traditionnellement utilisées pour maîtriser la croissance de *Staphylococcus* peuvent être moins efficaces lorsque cette bactérie est présente sous forme de biofilms. En effet, les *staphylocoques* en mode biofilm sont plus résistants aux méthodes conventionnelles de nettoyage et de désinfection, qui peuvent avoir des difficultés à pénétrer la matrice du biofilm et à atteindre efficacement les bactéries. De même, les méthodes chimiques peuvent ne pas être aussi efficaces en raison de la capacité du biofilm à piéger et à neutraliser les agents antimicrobiens.

Les problèmes sanitaires et économiques soulevés lors de l'utilisation des méthodes conventionnelles soulignent l'importance capitale de développer des stratégies novatrices de prévention, de contrôle et de traitement des *Staphylococcus* dans les différents secteurs. Il est primordial que ces nouvelles méthodes soient à la fois plus économiques, plus efficaces et moins toxiques pour l'homme, les animaux et l'environnement.



1. L'idée du projet : la solution proposée :

L'idée du projet vise à résoudre les problèmes sanitaires et économiques liés aux *Staphylococcus* dans les secteurs agroalimentaire, médical et industriel. Pour cela, une solution alternative novatrice est proposée afin de surmonter les inconvénients des méthodes conventionnelles actuellement utilisées pour maîtriser la croissance des *Staphylococcus*.

Pour atteindre cet objectif, la solution proposée repose sur l'utilisation d'un cocktail de virus de bactériophages lytiques, capable d'infecter et de détruire sélectivement les *Staphylococcus*. Ces bactériophages seront développés sous forme d'un phagoadditif, préparé en solution pulvérisable. Le phagoadditif permettra de contrôler efficacement la croissance des *Staphylococcus* dans les secteurs agroalimentaire, médical et industriel, contribuant ainsi à résoudre les problèmes sanitaires et économiques associés à ces bactéries pathogènes.

En ciblant spécifiquement les bactéries pathogènes, les bactériophages lytiques préservent la flore microbienne bénéfique présente, sans nuire aux propriétés organoleptiques et nutritionnelles des aliments. De plus, l'utilisation de bactériophages lytiques comme alternative aux méthodes classiques offre des avantages potentiels tels que des coûts réduits, une meilleure efficacité et une diminution des risques pour la santé humaine. Les bactériophages sont naturellement présents dans l'environnement et leur utilisation n'entraîne pas de résidus chimiques indésirables.

Cette approche novatrice contribuera à améliorer la sécurité alimentaire, à réduire les infections de *Staphylococcus* et à prévenir les problèmes sanitaires et économiques associés à ces bactéries pathogènes.

Cela contribue à une approche plus respectueuse de l'environnement et à une réduction des effets néfastes sur la santé.

Objectif de projet :

- Résoudre les problèmes sanitaires et économiques liés aux *Staphylococcus* dans les secteurs agroalimentaire, médical et industriel.



- Contrairement aux approches classiques, le phagoadditif offre une solution innovante et spécifique en ciblant directement les bactéries pathogènes représentées par les *Staphylococcus*. Cela permet de contourner les inconvénients des méthodes traditionnelles qui peuvent être moins efficaces, présenter des effets indésirables ou altérer la qualité des aliments.
- Contrôler efficacement la croissance des *Staphylococcus* dans différentes denrées alimentaires, en particulier les viandes, ce qui permet de prévenir les intoxications alimentaires causées par *Staphylococcus*, tout en prolongeant la durée de conservation des aliments traités.
- Maintenir les propriétés organoleptiques et nutritionnelles des aliments.
- Préserver la flore microbienne bénéfique présente dans les aliments, tout en ciblant spécifiquement les *Staphylococcus*
- Le phagoadditif présente un large éventail d'applications, couvrant à la fois le domaine médical, le secteur agroalimentaire et industriel.
- Le phagoadditif est de préparation facile et moins coûteuse, ce qui le rend attractif pour les entreprises et les industries cherchant des solutions rentables pour contrôler la croissance des *Staphylococcus*.
- Une approche respectueuse de l'environnement en évitant l'utilisation de produits chimiques et en minimisant les résidus indésirables.



Tableau de réalisation du projet :

7	6	5	4	3	2	1			
					✓		Etudes préalables : choix de l'implantation de l'unité de production, préparation des documents nécessaires		1
				✓			Commande de matériel depuis l'étranger		3
			✓				Construction d'un siège de production (usine)		4
		✓					Installation d'équipement		5
	✓						Acquisition de matières premières		6
✓							Début de la production du premier produit		



deuxième axe

Aspects Innovants



1. nature des innovations :

L'innovation majeure du projet de phagoadditif réside dans sa production en tant que premier produit de ce genre en Algérie et en Afrique, basé sur l'utilisation de virus lytiques pour contrôler la croissance des *Staphylococcus*. Cette avancée ouvre de nouvelles perspectives pour les différents secteurs où la présence de *Staphylococcus* peut poser des problèmes sanitaires et économiques, notamment dans les domaines d'agroalimentaire, médical et industriel.

2. domaines d'innovation

Les domaines d'innovation pour le phagoadditif peuvent inclure :

- Domaine de la santé : le phagoadditif peut être utilisé dans les hôpitaux, les cliniques et autres établissements de santé pour le nettoyage des surfaces et du matériel médical, dans le but de prévenir et de contrôler la propagation des *Staphylococcus*.
- Domaine agroalimentaire : le phagoadditif offre une méthode efficace de lutte contre les *Staphylococcus* pour prévenir les intoxications alimentaires et prolonger la durée de conservation des aliments. Il peut donc être utilisé dans divers contextes tels que les fermes avicoles, les abattoirs, les boucheries, et autres installations liées à la production et à la préparation des aliments.
- Domaine industriel : Le phagoadditif peut être utilisé pour la prévention ou l'éradication des biofilms formés par la croissance des *Staphylococcus* dans les canalisations industrielles et les chaînes de production alimentaires. Cela permet de garantir la qualité des produits finaux.
- Traitement des eaux usées : le phagoadditif peut être utilisé dans les processus de traitement des eaux usées, pour contrôler la croissance des *Staphylococcus* dans l'eau potable.



Le troisième axe

Analyse stratégique du marché



1. Vue du segment de marché

Le marché potentiel pour notre produit est

- Le phagoadditif peut être utilisé dans les hôpitaux, les cliniques, les établissements de soins de santé, et les laboratoires médicaux pour le nettoyage des surfaces et du matériel médical.
- Le phagoadditif peut être utilisé dans les usines de transformation alimentaire pour réduire la formation de biofilms, préservant ainsi l'intégrité des canalisations et assurant des conditions hygiéniques dans les installations de transformation alimentaire
- Le phagoadditif peut être utilisé dans les fermes avicoles, les abattoirs et les boucheries pour réduire le risque de contamination de la viande de volaille par les *Staphylococcus*.
- le phagoadditif peut être utilisé à domicile pour le nettoyage des fruits, des légumes et de la viande afin de prévenir les intoxications alimentaires causées par le *Staphylococcus*.
- Le phagoadditif peut être utilisé dans les restaurants, les pizzerias, les cafétérias et d'autres établissements de restauration pour maintenir des surfaces propres et réduire les risques de contamination croisée.
- Le phagoadditif peut être utilisé dans les installations de traitement des eaux usées pour contrôler la croissance des *Staphylococcus* et réduire les risques de contamination de l'eau traitée.

2. Mesurer l'intensité de la concurrence

Les principaux concurrents de notre produit sont les produits chimiques de nettoyage, qui existe sur le marché et qui sont utilisés pour désinfecter les surfaces et prévenir la croissance bactérienne, dont les *Staphylococcus*. D'autre concourant de désinfection sont aussi disponibles sur le marché, telles que l'utilisation de rayonnements UV ou d'ozone. Ces produits peuvent être compétitifs en termes de prix et de disponibilité.

Le phagoadditif se distingue par son action sélective sur un groupe pathogène spécifique, à savoir les *Staphylococcus*, sans affecter les autres bactéries bénéfiques. Cette caractéristique unique le différencie des autres concurrents sur le marché.

Un avantage distinct du phagoadditif est sa capacité à être appliqué sur une variété de surfaces inertes ainsi que sur des tissus tels que les fruits, les légumes et les viandes, sans



altérer les caractéristiques organoleptiques ou nutritionnelles des tissus traités. Cela est particulièrement important dans le domaine alimentaire, où la préservation des qualités sensorielles et nutritionnelles des produits est essentielle. Un autre avantage important du phagoadditif est son caractère économique. Une seule application peut suffire à éliminer toute contamination par les *Staphylococcus*, contrairement à d'autres concurrents qui nécessitent une dose dépendante et un temps de contact prolongé pour assurer leur effet désinfectant. Cela peut se traduire par des économies de coûts significatives pour les utilisateurs.

Il est important de noter que chaque concurrent peut avoir ses propres avantages et inconvénients, et le choix du produit dépendra des besoins spécifiques de l'utilisateur

3. Stratégie de marketing

Pour promouvoir ce produit, nous avons pensé à utiliser des stratégies qui couvrent différents segments de clientèle telles que :

- Nous prévoyons de vendre le phagoadditif dans des points de vente spécialisés. Cela nous permettra de cibler directement les clients qui sont déjà intéressés par ce type de produits et qui sont susceptibles de les utiliser régulièrement.
- Nous pensons offrir un service de livraison directe aux portes des entreprises. Cela permettra aux clients de recevoir facilement et rapidement leurs commandes, ce qui facilitera l'achat et renforcera la satisfaction de nos clients.
- Nous prévoyons d'utiliser des affiches publicitaires pour attirer l'attention des clients potentiels et à renforcer la visibilité de notre produit.
- Stratégies de marketing numérique : Utilisation des médias sociaux pour élargir la portée des ventes, comme Facebook, Instagram.... etc.
- Marketing B2B : Nous avons l'intention de développer des partenariats avec des entreprises du secteur agroalimentaire, des hôpitaux, des laboratoires d'analyse médicale et d'autres secteurs où la présence de *Staphylococcus* peut poser problème. Ces partenariats nous permettront d'accéder à des canaux de distribution plus importants..
- Nous envisageons de constituer une équipe de télémarketing dédiée à la prise des commandes par téléphone, au traitement des paiements et à l'organisation de la



livraison. Cela offrira un moyen pratique aux clients de passer commande et recevoir le produit.

- Nous utiliserons les réseaux sociaux tels que Facebook, Instagram et d'autres plateformes similaires pour atteindre un large public. Publicité directe par affiches publicitaires .

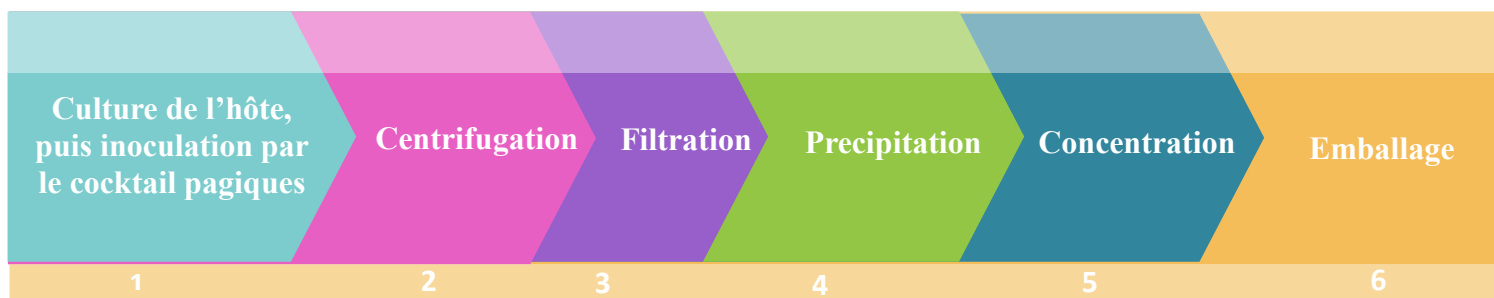
Business Model Canvas

Key Partners	Key Activities	Value Propositions	Customer	Segments clients
- Fournisseur des ingrédients de milieu de culture industriels. - Fournisseur des filtres tangentiels. - Fournisseur de l'emballage. - Fournisseur des enzymes « DNAase,	- Culture de la bactérie hôte. - Infection de l'hôte par le cocktail phagique. - Purification des phages par filtration. - Précipitation des phages et formulation de phagoadditif	- Prolonger la durée de la conservation des aliments. - Prévenir les intoxications alimentaires dues à <i>Staphylococcus</i> spp. - Préserver les caractéristiques organoleptiques et nutritionnelles des aliments. - Résoudre les problèmes liés au biofilm dans le secteur agroalimentaire et	Customer - Via un délégué commercial. - À travers le service clientèle. Channels Direct /Indirect - À travers des points de vente. -À travers le service clientèle physiques tels que des magasins	Segments clients - Les hôpitaux, les laboratoires d'analyse médicale et d'autres établissements de santé. - Utilisation à domicile pour le nettoyage de la viande, des fruits et des légumes. - Les boucheries et les restaurants. - Les éleveurs de volailles pour contrôler la croissance des <i>Staphylococcus</i> spp . - Les abattoirs avicoles. - Le Secteur industriel, pour éliminer les biofilms.
Cost Structure	Key Resources	Revenue Streams		
- Coût de l'emballage+ l'étiquetage+ les Ezs. - Coût de production - Coût de transport - Coût des filtres tangentiels.	- Le cocktail de bactériophages lytiques spécifiques aux souches de <i>Staphylococcus</i> spp. - L'infrastructure de production. - Un laboratoire équipé. - Personnel expert en microbiologie et virologie	- Les factures d'électricité et de l'eau. - La paie des salariés. - Coûts marketing et vente. - Coûts administratifs		- Vendre directe de phagoadditif à travers des commandes en ligne, des ventes sur place ou des contrats d'approvisionnement réguliers. - Vendre le phagoadditif en gros à travers l'établissement des partenariats avec des distributeurs ou des grossistes



Le quatrième axe

Plan de production et organisation



Étapes de base du processus de production

1. Processus de production.

1.1. Achat de matières premières et d'équipements

Liste des Matérielle

Fermenteur pilot de 100 litre	Centrifugeuse industrielle	Filtration tangentielle (0,22 μm) LLM Durapore



Réfrigérateur de laboratoire



Microscopie optique



Étuves de laboratoire



Poste de sécurité
microbiologique (PSM) classe
II



Distillateur d'eau
électrique (20 litre /heur)



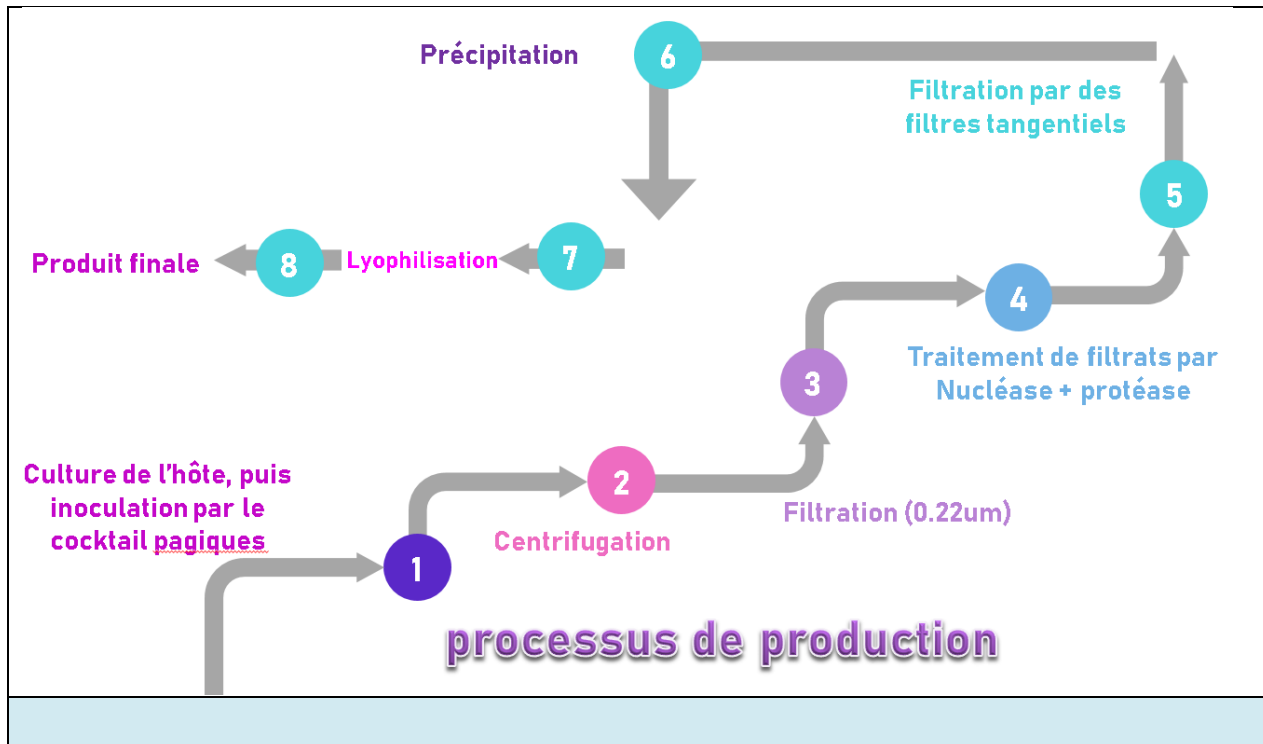
Machine de remplissage et d'emballage

Liste des produits

Produits	K_2HPO_4	Milieu de culture	Polyéthylène glycol (PEG)	L'enzyme De protéase	KH_2PO_4
PRIX	4065.05	21392.08	392.95	949.01	271.00



1.2.Préparation



1.3 Emballage

Le phagoadditif doit être emballé dans des flacons pulvérisateurs. Nous remplissons un demi-litre de la solution de phagoadditif dans chaque flacon. Ensuite, nous procédons à l'étiquetage de l'emballage. Les étiquettes du produit ont une longueur de 8 cm et une largeur de 4 cm. Ces étiquettes contiennent les informations nécessaires sur le produit, telles que le nom, les instructions d'utilisation et les précautions.

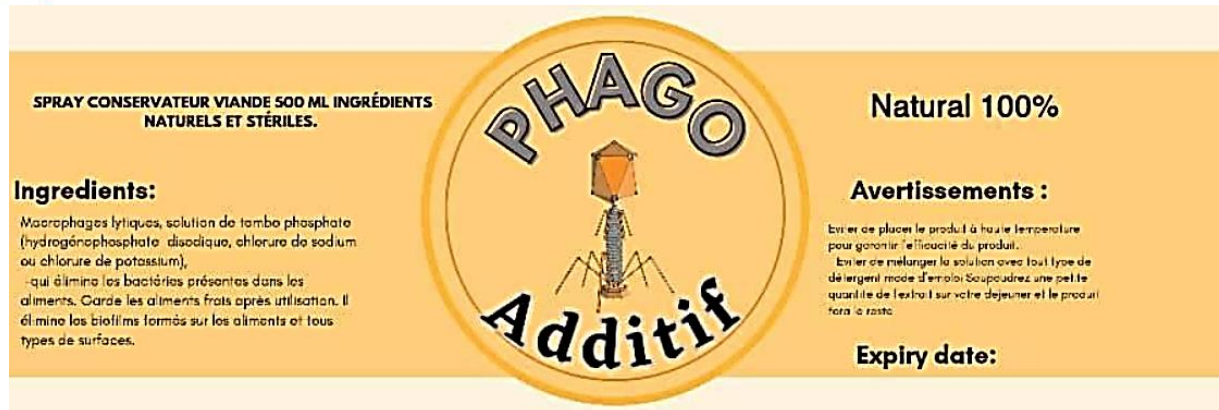


Figure : L'emballage de produit phagoadditif

2. Approvisionnement

Dans le processus d'approvisionnement, nous établissons des relations directes avec les bouchers, les éleveurs de volailles, les abattoirs et les ménagères. Nous nous engageons à fournir un approvisionnement régulier et fiable en phagoadditif à nos partenaires commerciaux. Nous travaillons en étroite collaboration avec eux pour comprendre leurs besoins en termes de quantité et de fréquence de commande. Notre objectif est de garantir un approvisionnement continu afin de répondre à la demande de nos clients..

3. main-d'œuvre

Notre projet crée environ 30 postes directs et 20 postes indirects. Les postes directs incluent des personnes spécialisées en microbiologie qui seront responsables de la recherche et du développement du phagoadditif, ainsi que des ingénieurs techniques chargés de la fabrication et de la production du produit. De plus, nous aurons besoin de deux personnes compétentes en comptabilité et en gestion budgétaire pour assurer une gestion financière efficace de l'entreprise.

4. partenariats clés

Les partenariats clés de notre projet incluent les fournisseurs mentionnés dans BMC, qui jouent un rôle crucial dans la fourniture des matières premières et des équipements nécessaires à la production du phagoadditif..



Le cinquième axe

Plan financier



1. Coûts et charges.

1.1 Le coût des besoins fonciers :

besoin	1. le nombre	1. coût unitaire	Coût total
Local	1	5 000 000	5 000 000
Total			5 000 000

1.2 Le coût des besoins en matériel de transport :

besoin	le nombre	coût unitaire	Coût total
un camion	1	500 000 000	500 000 000
Total			500 000 000

1.3 Le coût des besoins du projet en machines et équipements :

besoin	le nombre	coût unitaire	Coût total
Filtre à membrane	10	12 960	129 600
L' Autoclave	4	37 800	151 200
Microscope électronique à transmission	1	34 392.87	3 439 287
Spectrophotomètre	2	64 800	129 600
Lyophilisateur	2	473.108.84	94.621.768
Centrifugeuse industrielle	1	2506.78	2506.78
Microscope optique	3	13 500	40.500



Poste de sécurité	3	212.74	63.822
PEG	400 kg	392.95	157.180
K2hpo4	1 kg	4065.05	4 065.05
Kh2po4	1 kg	271.00	271.00
Fermenteur pilot	1	528.46	528.46
Milieu de culture	4	21392.08	64.000.000
Protéase	(20000u/g)	949.01	949.01
Distillateur	1	108070.66	108 070.66
Filtre tangentiels	2	2709.93	541 986
Machine emballage	1	250038.00	250 038.00
Congélateur	2	13556.45	27 112.9
Réfrigérateur	2	16403.030	32 806,06
étuve	4	37280.24	149 120,96
Séquençage PCR	1	6775.09	6 775.09
Total			358108.66

1. 4 Le coût des besoins en main-d'œuvre :

besoin	le nombre	coût unitaire	Coût total
Administrateur	1	32000	32000
travailleurs de la production	5	27000	135 000
Conducteur	1	25000	25000
un garde	2	26000	52000
Comptable	1	35000	35000
Ingénieurs techniques	4	36000	144 000
Microbiologistes	5	38000	190 000
Total			584 200



1.6 Coût des besoins en matériel de bureau :

besoin	le nombre	coût unitaire	Coût total
l'ordinateur	7	10 000 000	70 000 000
Bureau et Chaises	7	1 500 000	10 500 000
total			71 050 000

1.6 coûts de consommation : consommé en un an

carburant	242 000
électricité	32 000
Assurances	20 000 000
Eau	5000
téléphone	5000
internet	21 000 000

2. Numéro d'entreprise

	<u>PREVISION</u>				
Produit A destiné Client	N+1	N+2	N+3	N+4	N+5
Quantité produit A	242 000	278 300	333 960	400 752	460 768
<u>Ventes</u> <u>produit A</u> DA/U	200.00	200.00	220 .00	220.00	240.00
CHIFFRE D'AFFAI	48 400 00	55 660 00	73 471 200	88 165 440	100 584 320



Le sixième axe

Le premier modèle expérimental



BILANS PREVISIONNELS SUR 5 ANS ACTIF (En milliers DA)			
LIBELLES DES COMPTES	ANNEE N+1		
	BRUT	AMORT	NET
ACTIFS NON COURANTS			
Goodwil			
Immobilis Incorporelles			
Immobilis corporelles	17,000	2,200	14,800
Terrains	0.00	0.00	0.00
Batiments	0.00	0.00	0.00
Immob En Concession	0.00	0.00	0.00
Immobilis En Cours	0.00	0.00	0.00
Immobilis Financieres	0.00	0.00	0.00
Autres Titres Immobilisés	0.00	0.00	0.00
Prêt Et Autres Actifs Financières	0.00	0.00	0.00
Impots Différés Actif	0.00	0.00	0.00
TOTAL ACTIF NON COURANT	17,000	2,200	14,800
ACTIF COURANT			
Stocks Et Encours	0.00	0.00	0.00
Créances En Emplois Ass	0.00	0.00	0.00
Clients	0.00	0.00	0.00
Autres Débiteurss	0.00	0.00	0.00
Impots Et Assimilés	0.00	0.00	0.00
Disponibilités Et Assimilés	0.00	0.00	0.00
Placements Et Autres trésorerie	8,399	0.00	8,399
TOTAL ACTIF COURANT	8,399	0.00	8,399
TOTAL GENERAL ACTIF	25,399	2,200	23,199



ANNEE N+2			ANNEE N+3		
BRUT	AMORT	NET	BRUT	AMORT	NET
17,000	4,400	12,600	17,000	6,600	10,400
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
17,000	4,400	12,600	17,000	6,600	10,400
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9,249	0.00	9,249	11,808	0.00	11,808
9,249	0.00	9,249	11,808	0.00	11,808
26,249	4,400	21,849	28,808	6,600	22,208



ANNEE N+4			ANNEE N+5		
BRUT	AMORT	NET	BRUT	AMORT	NET
17,000	8,800	8,200	17,000	11,000	6,000
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
17,000	8,800	8,200	17,000	11,000	6,000
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15,330	0.00	15,330	20,321	0.00	20,321
15,330	0.00	15,330	20,321	0.00	20,321
32,330	8,800	23,530	37,321	11,000	26,321



BILANS PREVISIONNELS SUR 5 ANS PASSIF (En Milliers DA)

LIBELLE DES COMPTES	ANNEE N+1	ANNEE N+2	ANNEE N+3	ANNEE N+4	ANNEE N+5
CAPITAUX PROPRES					
Fonds Social	100	100	100	100	100
Résultat Net	2,972	3,523	5,330	6,172	7,741
Report A Nouveau		2,972	6,494	11,825	17,997
TOTAL 1	3,072	6,595	11,924	18,097	25,838
PASSIFS NON COURANTS					
Emprunts Et Dettes Financiers	20,000	15,000	10,000	5,000	0.00
Impots (Différés Et Provisinnés)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Autres Dettes Non Courantes	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Provisions Et Produits Const Avce	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
TOTAL PASSIF NON COURANT II	20,000	15,000	10,000	5,000	0.00
PASSIFS COURANTS					
Fournisseurs Et Comptes Rattachés	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Impots	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Autres Dettes	127	254	284	433	483
Trésorie Passif	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
TOTAL PASSIF NON COURANT III	127	254	284	433	483
TOTAL GENERAL PASSIF	23,199	21,849	22,208	23,530	26,321



COMPTE DE RUSULTAT PREVISIONNEL DE STARTUP: 02

COMPTES DE RESULTATS (PAR NATURE) PREVISIONNELS SUR 5 ANS (En milliers DA)					
RUBRIQUES	ANNEE N+1	ANNEE N+2	ANNEE N+3	ANNEE N+4	ANNEE N+5
Vente Et Produits Annexes	48,400	55,660	73,471	88,165	110,584
Variation Stocks Produits Finis Et En Cours	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Production Immobilisée	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Subvention D'exploitation	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PRODUCTION DE L'EXERCICE	48,400	55,660	73,471	88,165	110,584
Achat Consommés	40,000	44,528	58,292	71,413	91,288
Service Extérieurs Et Autres Consommations	1,300	1,652	1,712	1,712	1,872
COSOMMATION DE L'EXERCICE	41,300	46,180	60,004	73,125	93,160
VALEUR AJOUTEE D'EXPLOITATION	7,100	9,480	13,467	15,040	17,424
Charges Du Personnel	1,928	3,757	5,937	6,668	7,483
Impôts, Taxes Et Versement Assimilés	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
EXCEDANT BRUT D'EXPLOITATION	5,172	5,723	7,530	8,372	9,941
Autres Produits Opérationnels	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Autres Charges Opérationnels	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dot Amortissements, Provisions Et Pertes De Valeur	2,200	2,200	2,200	2,200	2,200
Reprise Sur Pertes De Valeur Et Provisions	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
RESULTAT OPERATIONNEL	2,972	3,523	5,330	6,172	7,741
Produits Financieres	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Charges Financieres	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
RESULTAT FINANCIER	2,972	3,523	5,330	6,172	7,741
RESULTAT ORDINAIRE AV IMPOTS					
Impôts Sexigibles Sur Résltats Ordinaires	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Impôts Différés (Variations) Sur Résultats Ordinaire	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
TOTAL DES PRODUITS DES ACTIVITES ORDINAIRES	48,400	55,660	73,471	88,165	110,584
TOTAL DES CHARGES DES ACTIVITES ORDINAIRES	45,428	52,137	68,141	81,993	102,843
RESULTAT NET DES ACTIVITES ORDINAIRES	2,972	3,523	5,330	6,172	7,741



plan de trésorerie pour 5 ans (En milliers DA)

	Anne n+1	Anne n+2	Anne n+3	Anne n+4	Anne n+5
solde a nouveau	3,100	8,399	9,249	11,808	15,330
recette					
encaissement des ventes	48,400	55,660	73,471	88,165	110,584
total recettes	48,400	55,660	73,471	88,165	110,584
depenses					
achat matieres premiere	40,000	44,528	58,292	71,413	91,288
frais de personnels	1,928	3,757	5,937	6,668	7,483
autres services	1,173	1,525	1,683	1,562	1,822
total depenses	43,101	49,810	65,912	79,643	100,593
remboursement credit		5,000	5,000	5,000	5,000
tresorerie	8,399	9,249	11,808	15,330	20,321

Le phagoadditif en poudre

