

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIC ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة عمار تليجي بالأغواط  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOAT  
كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
قسم البيولوجيا  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## MEMOIRE DE MASTER

**DOMAINE :** Science de la Nature et de la Vie (S.N.V)

**FILIERE :** Science Biologique

**OPTION :** Microbiologie Appliquée

**Thème : Isolement des bactériophages lytiques  
spécifiques aux bactéries nuisibles.**

**Présenté par : LAGGOUN ILHEM et KAOUKA MARIA**

**Jury de Soutenance :**

Nom et prénom	Grade	
Madouri Redouane	MAA	Président
Benamar Ibrahim	MAC	Examineur
Messaoudi Omar	MCA	Encadrant

**Promo : 2021-2022**



## *Remerciement*

---

A l'issue de ce travail, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance, Notre gratitude et nos vifs remerciements à **Mr Messaoudi.O**, pour sa précieuse aide, ces orientations et le temps qu'il nous a accordé pour notre encadrement.

Nous remercions par ailleurs vivement les membres du jury de nous avoir fait l'honneur de juger notre travail et d'assister à la soutenance.

Nous adressons nos sincères remerciements à **Mr GUAZEM BOULERBAH** de nous avoir accueilli dans son laboratoire et pour la confiance et l'aide qu'il nous a accordé, ainsi que toute l'équipe du laboratoire de l'ONA.

Sont oublier tous les employés de laboratoire de notre université **AMAR THELIDJI**.

Finalement, nous remercions toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la concrétisation de ce mémoire.

A mon très cher père

Qui m'a soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour, pour son amour, Et ses encouragements. Vous m'a donné à fond. Très fière d'avoir un père comme vous Qu'ALLAH le tout puissant te préserve, t'accorde Santé, bonheur et te protège de tout mal.

A ma très chère mère

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré D'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et Affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. Qu'ALLAH te protège et te donne la santé, le bonheur et longue vie.

Ilhem

A mes parents

Je dédie ce travail à mes parents et à toute ma famille ainsi que à tous eux qui m'a aidé à terminer ce travail

Maria

**Liste des abréviations :**

T4 : thyroxine

ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ADNss : Acide désoxyribonucléique simple brin

ARNss : Acide ribonucléique simple brin

ARNds : Acide ribonucléique double brin

MH : milieu Mueller-Hinton

BHIB : Bouillon Brain Heart Infusion

LB : Luria-Bertani

CV : cristal de violet

Rpm : Revolutions per minute of rotor

DO : densité optique

## Liste des figures et des tableaux :

Figure	Titre	Pages
01	les grandes étapes des cent premières années de recherche sur les bactériophages.	04
02	Structure de bactériophage T4.	05
03	les familles de phages à queue	06
04	représentation schématique des principaux groupes de phages.	07
05	cycle lytique et lysogénique d'un bactériophage	09
06	Carte montre la région d'échantillonnage : bordj senoussi ONA (33.811210,2.917341).	15
07	préparation d'eau usée filtrée par le filtre de 0.22µm, A : centrifugation d'eau usée, B : élimination des débris, C : filtration d'eau usée, D : filtre de type GS 0.22µm.	16
08	présente les étapes d'enrichissement des bactériophages	17
09	les étapes d'isolement, A : filtration des suspensions, B : préparation milieu MH dans des boite pétries et l'encadrement de ces boite, C : le calcule la densité des souches.	19
10	les étapes de la purification des bactériophages.	20
11	l'étape du test de confirmation, A : préparation de milieu MH à faible teneur en agar plus suspension virale plus suspension bactérienne, B : des boite pétrie déjà coulé par le milieu MH solide.	21
12	la première étape de la technique des tubes : les tubes qui contiennent des souches. Klebsiella pneumoniae et pseudomonas aeruginosa.	22
13	deuxième étape de technique des tubes : les quatre tubes qui contiennent la suspension phagique filtrée et les deux témoins qui contiennent MH sans souche.	23

14	l'étape de coloration par le cristal de violet (CV) (1%). A : coloration par cristal de violet les tubes de k.pneumonie, B : coloration par cristal de violet les tubes de p.aeruginosa.	23
15	les étapes de technique des lames inoxydables, A : incubation des lames + souche P.a + milieu LB, B : filtration des suspensions virale, C : incubation des tubes qui contiennent des lames avec suspension virales filtrée.	24
16	l'apparition des plages de lyse dans les boîtes de : P. aeruginosa, K.pneumoniae. Et d'escherichia coli.	26
17	l'absence des plages de lyse dans les boîtes pétrie de : A : staphylococcus aureus, B : Bacillus cereus	26
18	résultat de double couche l'apparition des plages de lyse. A : chez P. aeruginosa et B : chez K.pneumoniae.	27
19	résultat d'activité anti-biofilm de deux souches. A : chez Pseudomonas aeruginosa, B : chez Klebsiella pneumoniae.	28
20	les résultats d'éradication de biofilm de P. aeruginosa et K. pneumoniae après le traitement par des phages lytiques spécifiques pour chaque bactérie tests.	29
21	résultat d'activité anti biofilm par la technique des lames inoxydables observée à l'œil nue.	30
22	observation microscopique d'activité antibiofilm sur des lames d'acier inoxydable de biofilm de 24 h formé par P. aeruginosa. A : lame témoin. B : lame après traitement par la suspension phagique.	31
Les tableaux		
Classification et propriétés de base des bactériophages		07

<b>Remerciement</b>	<b>iii</b>
<b>Dédicace</b>	<b>iv</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>vi</b>
<b>Liste des figures et des tableaux</b>	<b>vii</b>
<b>Table des matières</b>	<b>ix</b>
<b>Résumé</b>	<b>xi</b>

### **Partie Synthèse bibliographique**

<b>Introduction</b>	<b>01</b>
<b>I. Chapitre 1 : les bactériophages</b>	<b>03</b>
<b>1. Généralité des bactériophages</b>	<b>03</b>
<b>2. Caractéristiques des bactériophages</b>	<b>04</b>
a) <b>Structure et compositions des bactériophages</b>	<b>04</b>
b) <b>Classification des bactériophages</b>	<b>05</b>
<b>3. Cycle lytique</b>	<b>08</b>
<b>4. cycle lysogénique</b>	<b>08</b>
<b>II. Chapitre 2 : phagothérapie</b>	<b>10</b>
<b>1. Définition</b>	<b>10</b>
<b>2. Principe de phagothérapie</b>	<b>10</b>
<b>3. Autres applications des bactériophages</b>	<b>11</b>
a) <b>Médecine vétérinaire</b>	<b>11</b>
b) <b>La sécurité alimentaire</b>	<b>11</b>
c) <b>Agriculture (protection des cultures)</b>	<b>11</b>
<b>4. Inhibition de biofilm</b>	<b>12</b>
a) <b>Définition de biofilm</b>	<b>12</b>
b) <b>Les phages combattent le biofilm</b>	<b>12</b>

### **Partie expérimentale**

<b>III. Matériel et méthode</b>	<b>15</b>
<b>1. Echantillonnage</b>	<b>15</b>
<b>2. Enrichissement des bactériophages</b>	<b>17</b>
<b>3. Isolement des bactériophages</b>	<b>18</b>

<b>4. Purification des bactériophages</b>	<b>19</b>
<b>5. Test de confirmation des bactériophages</b>	<b>21</b>
<b>6. Activé anti biofilm</b>	<b>22</b>
a) Technique des tubes	22
b) Technique des lames inoxydables	24
<b>IV. Résultat et discussion :</b>	<b>25</b>
<b>1. Isolement des bactériophages</b>	<b>25</b>
<b>2. Test de confirmation des bactériophages</b>	<b>27</b>
<b>3. Activité anti-biofilm</b>	<b>28</b>
a) Technique des tubes	28
b) Technique des lames inoxydables	30
<b>Conclusion</b>	<b>34</b>
<b>Référence bibliographie</b>	<b>35</b>
<b>Annexes</b>	<b>40</b>

Les bactériophages sont des virus infectent que les bactéries, on les trouve partout dans l'environnement : les océans, les eaux usée urbaine...

Les infections causées par des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques sont Responsables parfois d'un échec thérapeutique qui peut mettre la santé humaine en danger. Ainsi, les biofilms qui se forment sur divers surfaces peuvent provoquer des pertes économiques considérables. Parmi les solutions innovent, est l'utilisation des bactériophages. Pour cela, des bactériophages spécifique a certaine bactéries pathogène et formatrices de biofilm, ont été isolés à partir des eaux usées de la station d'épuration de bordj Essenouci « ONA ». Les résultats indiquent la présence des bactériophages lytiques spécifiques aux bactéries *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa* et *Klebsiella pneumoniae*, alors qu'aucun bactériophage lytique spécifique aux deux bactéries, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*, n'a été obtenues. L'étude de l'activité d'antibiofilms indique une bonne éradication de biofilm de 24 h formé par l'espèce *Pseudomonas aerogenosa* par la suspension phagique, avec une éradication de 65.5 %.

On peut conclure que les bactériophages ont une spécificité contre des diverses bactéries et ça montre que ces phages peuvent être utilisé comme cocktail antimicrobien en cas d'échec thérapeutique, et ainsi comme agent désinfectants dans le but de contribuer à la prévention et le contrôle des biofilms qui se forme sur les différentes surfaces industrielles.

Mots clé : bactériophage, bactérie multi-résistante, antibiofilm, antibactérien.

Bacteriophages are viruses that infect bacteria, they are found everywhere in the environment : oceans, urban wastewater...

Infections caused by multi-antibiotic-resistant bacteria are sometimes responsible for a therapeutic failure that can put human health at risk. Thus, biofilms that form on various surfaces can cause considerable economic losses. Allowed solutions innovate, is the use of bacteriophages. For this purpose, bacteriophages specific to certain pathogenic bacteria and biofilm forming, have been isolated from the wastewater of the purification plant bordj essenouci «ONA». The results indicate the presence of lytic bacteriophages specific to the bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa* and *Klebsiella pneumoniae*, while no lytic bacteriophage specific to the two bacteria, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*, was obtained. The study of antibiofilm activity indicates a good eradication of 24 h biofilm formed by the species *Pseudomonas aerogenosa* by phage suspension, with an eradication of 65.5.

We can conclude that bacteriophages have a specificity against various bacteria and it shows that these phages can be used as an antimicrobial cocktail in case of therapeutic failure, and thus as a disinfecting agent with the aim of contributing to the prevention and control of biofilms that are formed on the various industrial surfaces.

Mots clé : bacteriophage, multi-antibiotic-resistant, antibiofilm, antibacterien.

العائيات هي فيروسات تصيب البكتيريا، و توجد في كل مكان في البيئة : المحيطات و مياه الصرف الصحي في المناطق الحضرية

العدوى التي تسببها البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية المتعددة مسؤولة أحيانا عن فشل علاجي يمكن أن يعرض صحة الانسان للخطر. وبالتالي، فان الأغشية الحيوية التي تتشكل على أسطح مختلفة يمكن أن تسبب خسائر اقتصادية كبيرة.

الحلول المسموحة بها تبتكر، هو استخدام العائيات. لهذا الغرض، تم عزل العائيات الخاصة ببعض البكتيريا المسببة للأمراض وتشكيل الأغشية الحيوية من مياه الصرف الصحي في محطة برج السنوسي.

تشير النتائج الى وجود جراثيم غامضة خاصة بكتيريا:

*Escherichia coli* ، *pseudomonas aeruginosa* ، *klebsiella pneumonia* .

بينما لم يتم الحصول على عائية غامضة خاصة بالبكتيريا :

*Bacillus cereus* ، *staphylococcus aureus*

تشير دراسة النشاط المضاد للفيلم الى استئصال جيد للفيلم الحيوي على مدار 24 ساعة الذي شكله النوع:

*Pseudomonas aeruginosa* عن طريق تعليق العائيات ، مع استئصال 65.5 %.

يمكننا أن نستنتج أن العائيات لها خصوصية ضد البكتيريا المختلفة وتظهر أنه يمكن استخدام هذه العائيات كمزيج مضاد للميكروبات في حالة الفشل العلاجي، وبالتالي كعامل تطهير بهدف المساهمة في الوقاية والسيطرة على الأغشية الحيوية التي تتشكل على الأسطح الصناعية المختلفة.

الكلمات الأساسية: البكتيريوفاج، مضادات الأغشية الحيوية، البلاك المتحلل، المقاومة

Les bactériophages On les désigne également sous le terme de phages, ils sont des virus infectent que les bactéries, donc ce sont des parasites pour ces bactéries dans lesquelles ils se reproduisent. Leurs matériels génétiques peuvent être ARN ou ADN.

Dès qu'ils pénètrent dans la bactérie, Leurs multiplication dépendent sur deux cycles soit cycle lytique soit cycle lysogénique.

Ils présentent une grande spécificité de groupe, chez certaines espèces cette spécificité est telle qu'elle permet le classement de l'espèce en groupes de bactériophages (staphylocoque doré, salmonelles.)

Ils sont présents partout, mais en quantité plus importante dans les excréments, le sol et les eaux d'égout.

Les phages peuvent appliquer dans des divers domaines comme le domaine médecine vétérinaire, domaine agroalimentaire et domaine agriculture. .. Ils ont aussi un pouvoir d'inhiber le biofilm.

Les bactériophages sont ubiquitaires, on les trouve par tout dans notre monde les océans, les sols, les événements des grands fonds marins, l'eau que nous buvons et la nourriture que nous mangeons. Ils sont les entités vivantes les plus abondantes sur terre, les estimations sont variées entre  $10^{30}$  et  $10^{32}$  au total et jouent un rôle d'une clé dans la régulation de l'équilibre microbien dans chaque écosystème où cela a été exploré. Plus d'informations sont générées sur la biologie, l'écologie, et la nature diverse des phages, plus ce domaine devient excitant, et plus il est évident que nous en savons étonnamment peu sur eux au-delà des détails complexes de quelques systèmes modèles. **Elizabeth Kutter, Alexander Sulakvelidze. (2004).** Donc les phages avec ses diverses propriétés représentent un monde très vaste ce qui mérite d'avoir plus d'attention vu leur importance comme agent antibactérien

C'est dans cette optique que s'inscrit notre travail, qui a pour but d'isoler les bactériophages à partir des eaux usées de la station d'épuration de Laghouat « ONA », spécifique aux bactéries pathogènes multi-résistantes responsable d'infection humaine grave, ainsi que des bactéries nuisibles capable de provoquer des dégâts industrielle considérable suite à la formation des biofilms dans les canalisations ce qui provoque des pertes économique importante

---

*Synthèse  
bibliographique*

---

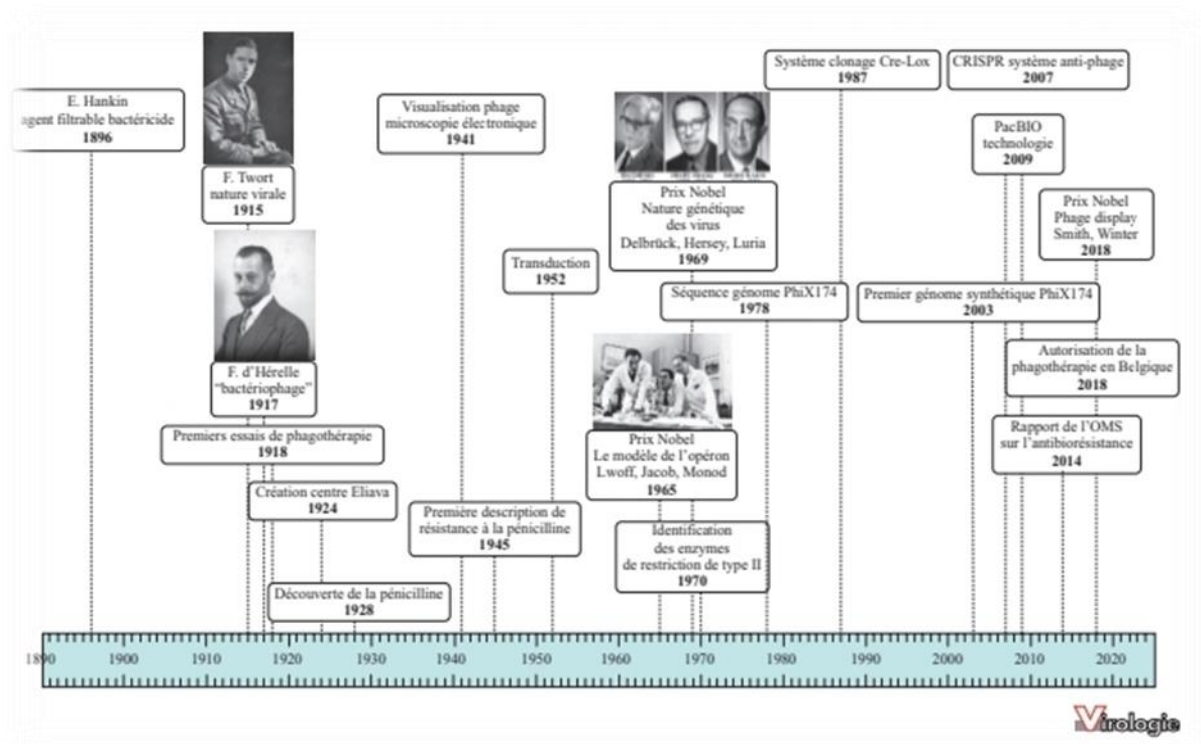
## **I. Chapitre 1 : les bactériophages :**

### **1. Généralité des bactériophages :**

Il y a environ 100 ans, l'existence de virus spécialisés dans l'infection et la destruction Des bactéries ont été découvertes et rapportées dans la littérature scientifique. Ces virus sont Désormais appelés bactériophages (**Vandamme et Mortelmans, 2019**).

Les phages ont été découverts deux fois au début du XXe siècle (**Ackermann, 2003**). Les deux principaux contributeurs à ce résultat sont Frederick Twort décrit en 1915 '*Micrococcus*' est un agent infectieux dont la nature n'est pas entièrement comprise Des propriétés virales ont été observées **Figure 1**. Lyse des cultures "*Shigella*" en bouillon, 1917 Contrairement à Twort, Félix D'Hérelle observe que caractériser la nature La taille des particules du phage est en partie due au test de plaque qu'il a développé, Largement utilisé aujourd'hui (**Ackermann, 2003 ; Poxleitner et al., 2018**).

Après leur découverte au début du XXe siècle, les phages ont été largement utilisés pour traiter diverses maladies bactériennes chez les humains et les animaux. L'augmentation alarmante de la résistance antibactérienne chez les bactéries a conduit à une révision des études d'Europe de l'Est et à l'initiation d'expériences contrôlées sur des modèles animaux. Ces études récentes ont confirmé que les phages peuvent être très efficaces dans le traitement de nombreux types d'infections bactériennes. La létalité et la spécificité des phages pour des bactéries particulières, la capacité des phages à se répliquer dans des hôtes animaux infectés et la sécurité des phages en font des agents antibactériens efficaces. **Duckworth, D.H., Gulig, P.A.(2002)**.



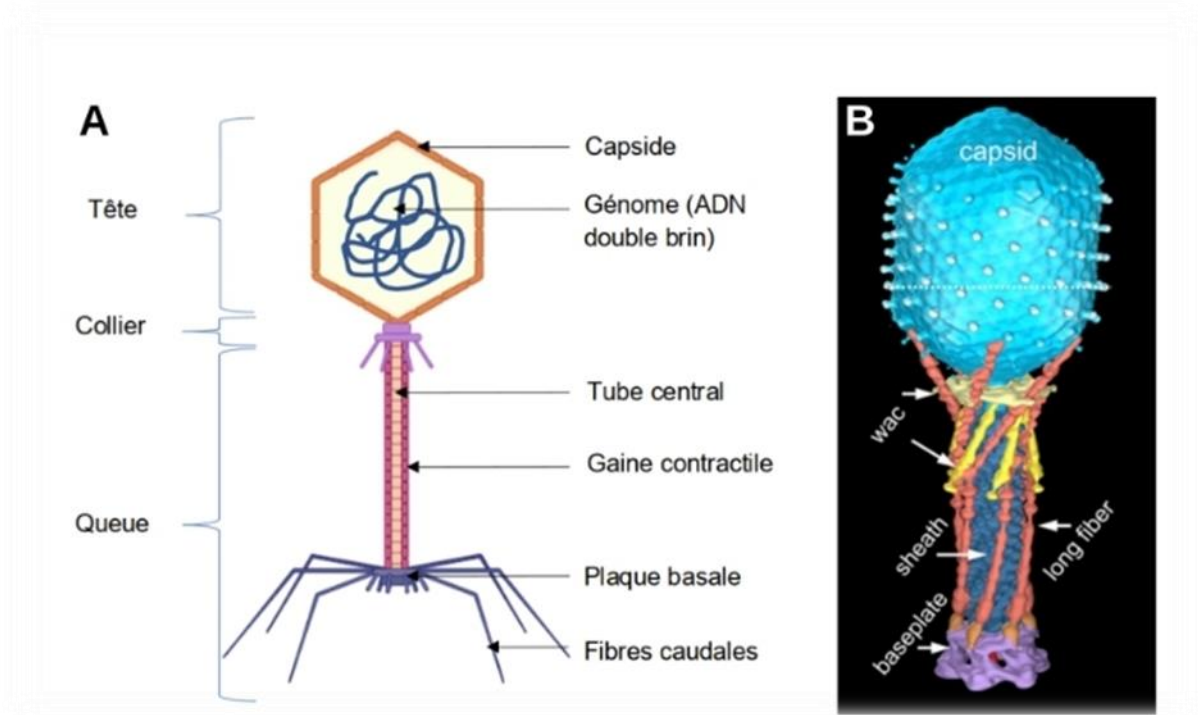
**Figure 1** : les grandes étapes des cent premières années de recherche sur les bactériophages. (Ansaldi M.,et al.(2020)).

## 2. Caractéristiques des bactériophages :

### a) Structure et composition des bactériophages :

Les bactériophages se présentent sous différentes tailles et formes. Les caractéristiques structurelles de base des bactériophages sont illustrées à la **Figure 2**, qui représente le phage appelé T4. Ce dernier est parmi les plus grands phages ; il mesure environ 200 nm de long et 80 à 100 nm de large. Les autres phages sont plus petits. La plupart des phages ont une taille comprise entre 24 et 200 nm de longueur. Tous les phages contiennent une structure de tête qui peut varier en taille et en forme. Certains sont icosaédriques (20 côtés) d'autres sont filamenteux. La tête ou capsid est composée de nombreuses copies d'une ou plusieurs protéines différentes. À l'intérieur de la tête se trouve l'acide nucléique, la capsid sert de protéger l'acide nucléique. Beaucoup de phages, mais pas tous, ont des queues attachées à la tête du phage. La queue est un tube creux à travers lequel passe l'acide nucléique lors de l'infection. La taille de la queue peut varier et certains phages n'ont même pas de structure de queue. Dans les phages

plus complexes comme T4, la queue est entourée d'une gaine contractile qui se contracte lors de l'infection de la bactérie. À l'extrémité de la queue, les phages plus complexes comme T4 ont une plaque de base et une ou plusieurs fibres de queue qui y sont attachées. La plaque de base et les fibres de la queue sont impliquées dans la liaison du phage à la cellule bactérienne. Tous les phages n'ont pas de plaques de base et de fibres de queue. Dans ces cas, d'autres structures sont impliquées dans la liaison de la particule de phage à la bactérie. **Gene Mayer, PhD , (2016).**



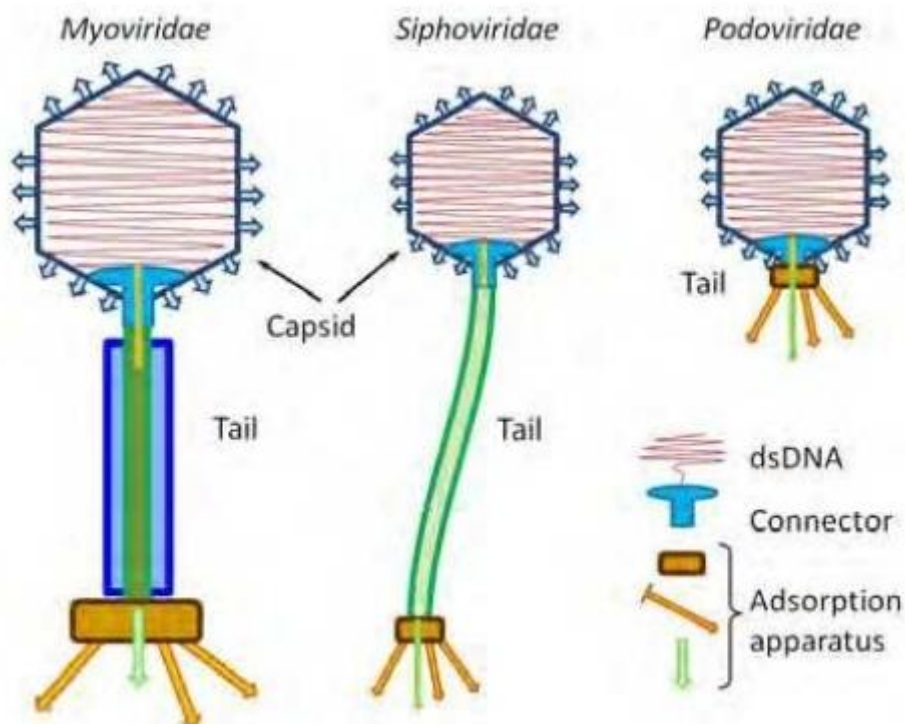
**Figure 2 :** structure de bactériophage T4. A : Schéma d'un virion de bactériophage T4, B : Reconstitution 3D d'un virion fondée sur des résultats de cryo-microscopie électronique.

### b) Classification des bactériophages :

L'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) reconnaît actuellement un ordre, 13 familles et 31 genres de phages (**Van Regenmortel, M.H.V.C.M.,etal.2000**)

Les virions ont une symétrie binaire, cubique ou hélicoïdale ou sont pléomorphes. La plupart des phages contiennent de l'ADNdb, mais il existe de petits groupes de phages avec de l'ADN simple brin (ss), de l'ARNss ou de l'ARN double brin (ds) quelques types ont une enveloppe contenant des lipides ou contiennent des lipides dans le cadre de la paroi des particules. Phages à queue (binaire symétrie) totalisent environ 5100 virus au moment de la rédaction (96% des

phages) et sont classés dans l'ordre des Caudovirales (**Figure 3**) et trois très grandes familles phylogénétiquement apparentées. en revanche, les phages "cubiques", filamenteux et pléomorphes comprennent moins de 190 virus seulement (3,6% des phages) et sont classés en 10 petites familles. Ils sont extrêmement diversifiés par leurs propriétés fondamentales et semblent constituer de nombreuses lignées différentes. Les capsides à symétrie cubique sont des icosaèdres ou des corps apparentés. Les particules sont enveloppées ou non. La présence de lipides s'accompagne d'une faible densité de flottabilité et d'une sensibilité élevée au chloroforme et à l'éther. en revanche, les phages "cubiques", filamenteux et pléomorphes comprennent moins de 190 virus seulement (3,6% des phages) et sont classés en 10 petites familles. Ils sont extrêmement diversifiés par leurs propriétés fondamentales et semblent constituer de nombreuses lignées différentes. Comme ailleurs en virologie, les familles sont principalement définies par la nature de l'acide nucléique et la morphologie des particules (**Figure 4 ; tableau 1**) il n'y a pas de critères universels pour la délimitation des genres et des espèces. L'ICTV utilise toutes les propriétés disponibles pour la classification et a adopté le "concept d'espèce polythétique". Ce qui signifie qu'une espèce est définie par un ensemble de propriétés, dont certaines peuvent être absentes dans un membre donné (**Van regenmortel, M.H.V. 1990**) .



**Figure 3** : présente les familles de phages à queue (**Ackermann, 2001**).

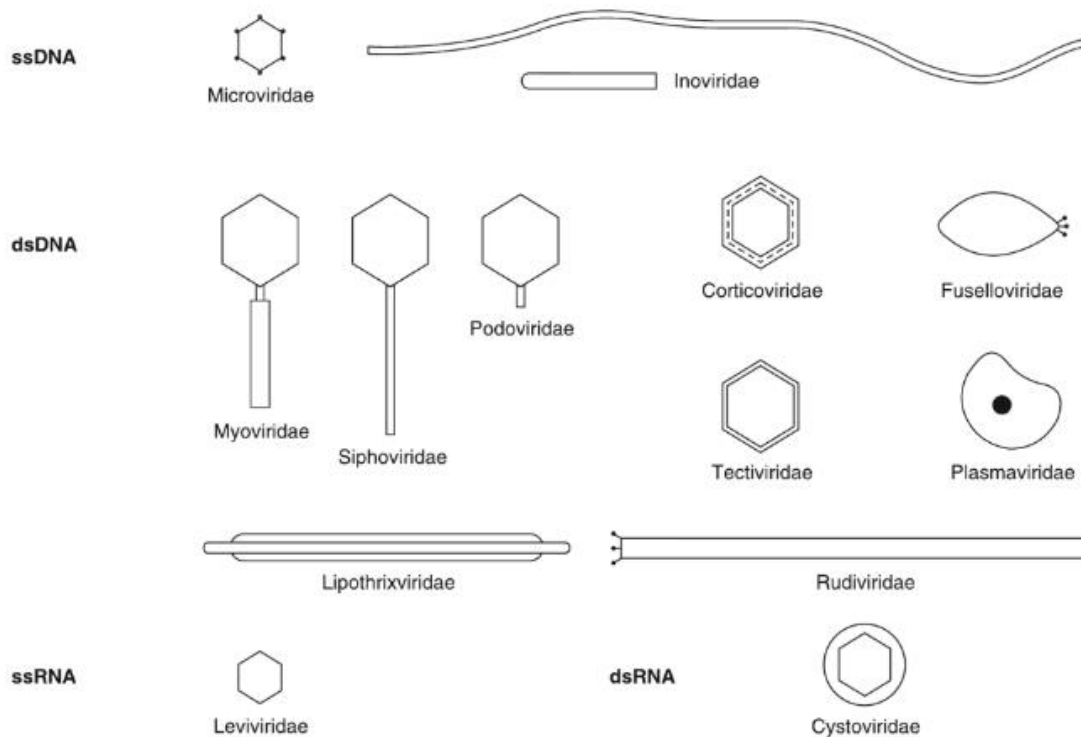


Figure 4 : représentation schématique des principaux groupes de phages.

Tableau 1 : classification et propriétés de base des bactériophages. (Ackermann,H.-W.1999)

Symmetry	Nucleic acid	Order and families	Genera	Members	Particulars
Binary (tailed)	DNA, ds, L	<i>Caudovirales</i>	15	4950	
		<i>Myoviridae</i>	6	1243	Tail contractile
		<i>Siphoviridae</i>	6	3011	Tail long, noncontractile
		<i>Podoviridae</i>	3	696	Tail short
Cubic	DNA, ss, C	<i>Microviridae</i>	4	40	
	ds, C, T	<i>Corticoviridae</i>	1	37	Complex capsid, lipids
	ds, L	<i>Tectiviridae</i>	1	18	Internal lipoprotein vesicle
	RNA, ss, L	<i>Leviviridae</i>	2	39	
	ds, L, S	<i>Cystoviridae</i>	1	1	Envelope, lipids
Helical	DNA, ss, C	<i>Inoviridae</i>	2	57	Filaments or rods
	ds, L	<i>Lipothrixviridae</i>	1	67	Envelope, lipids
	ds, L	<i>Rudiviridae</i>	1	2	Resembles TMV
Pleomorphic	DNA, ds, C, T	<i>Plasmaviridae</i>	1	6	Envelope, lipids, no capsid
	ds, C, T	<i>Fuselloviridae</i>	1	87	Spindle-shaped, no capsid

### **3. Cycle lytique :**

Durant le cycle lytique, le phage s'empare la cellule hôte, cette dernière est utilisée comme un site de reproduction des nouveaux phages, ce qui provoque la lyse et qui signifie la mort de la cellule hôte. Il passe par des étapes suivantes (**Figure 5**) :

**L'attachement :** le phage cohérent avec un récepteur spécifique qui situé à la surface de la bactérie.

**L'entrée :** le phage injecte son génome d'ADN db dans le cytoplasme de la bactérie.

La réplication de l'ADN et synthèse de protéines : l'ADN du phage est copié, et les gènes de phage sont exprimés pour fabriquer des protéines, telles que les protéines de capsid.

**L'assemblage du nouveau phage :** les capsides s'assemblent à partir des protéines capsides et sont remplies d'ADN pour générer beaucoup de nouvelles particules virales.

**La lyse :** plus tard dans le cycle lytique, le phage exprime les gènes codant les protéines qui créent des trous dans la membrane plasmique et dans la paroi cellulaire. Ces trous permettent l'entrée d'eau, qui fait gonfler et éclater la cellule comme un ballon surchargé d'eau. Lyse de la cellule libère des centaines de nouveaux phages, qui peuvent ensuite trouver et infecter d'autres cellules hôtes à proximité. (**Peter Hraven,Susan R singer (2017)**)

### **4. Cycle lysogénique :**

Le cycle lysogénique permet à un phage de se reproduire sans tuer son hôte. Les étapes de cycle lysogénique :

Les deux premières étapes (l'attachement et l'entrée) se produisent de la même façon que pour le cycle lytique. Une fois le génome pénètre dans la cellule, l'ADN viral se recombine avec une région particulière du chromosome bactérien et s'y intègre. (**Figure\_5**) (**Peter Hraven,Susan R singer (2017)**)

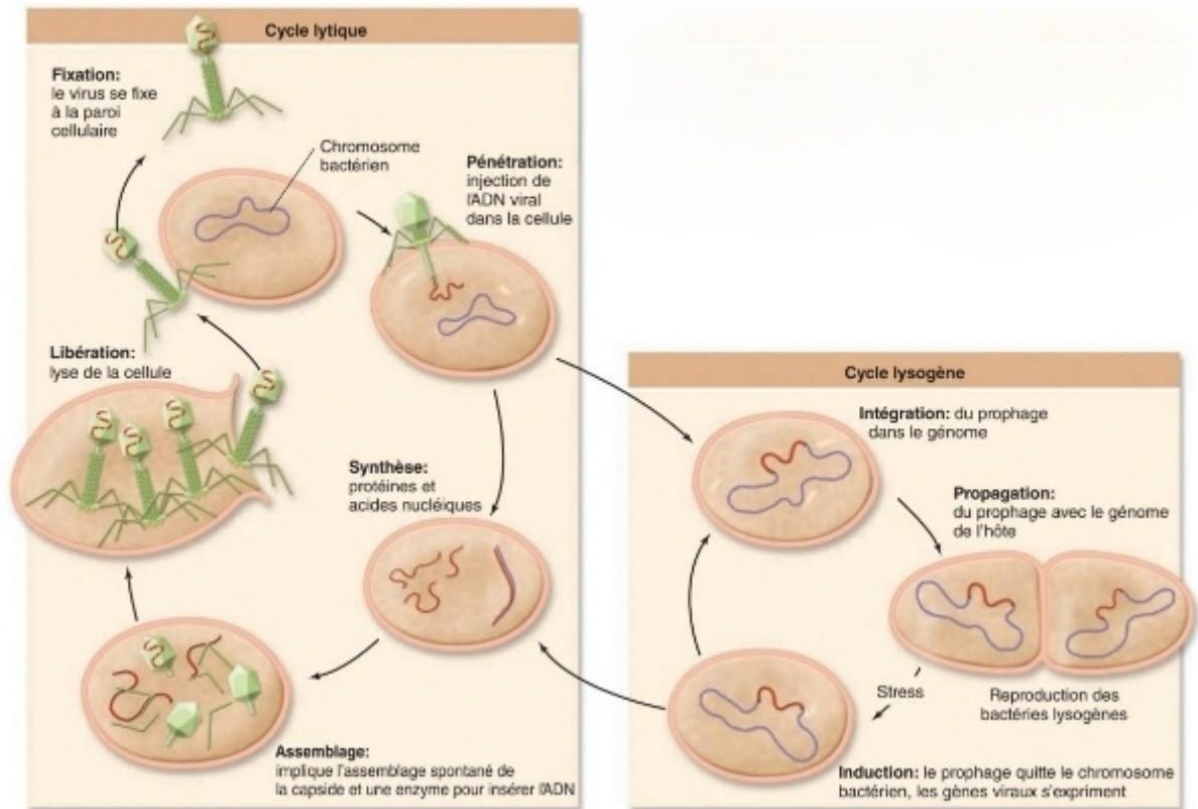


Figure 5 : cycle lytique et lysogénique d'un bactériophage (Peter Hraven,Susan R singer (2017)

## **II. Chapitre 2 : phagothérapie**

### **1. Définition :**

Aujourd'hui toutes les maladies infectieuses ne sont pas bien contrôlées par les médicaments actuels en raison de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques et au manque de moyens thérapeutiques qui ont ramené sur le devant de la scène une thérapeutique ancienne (**Ravat et al., 2015**).

C'est pourquoi il y a une réutilisation des bactériophages qui semblent être un moyen prometteur et guérisseur de contrer ce problème (**Morgane, 2019**).

Au début du XXe siècle, c'était le manque de médicaments qui ont une capacité pour combattre les infections bactériennes. Avant la découverte des antibiotiques et les utilisés traiter ces infections la phagothérapie ait connu un intérêt mondial important. Son histoire s'étend essentiellement sur deux décennies entre les deux grandes guerres mondiales. Malgré que ce traitement ait une importance, il y avait des controverses qui se développèrent. Dans les années 1940, l'apparition d'une nouvelle molécule qu'était la pénicilline provoque une régression de l'amélioration de phagothérapie. Le développement rapide de l'antibiothérapie après sa découverte laissait penser que le contrôle des maladies infectieuses et les progrès de la médecine étaient incontestables. La phagothérapie connu un déclin. Parallèlement, la recherche fondamentale sur les bactériophages d'une façon exponentielle jusqu'à permettre l'essor d'une discipline autonome. **Dublanchet et Fruciano,( 2008)**

### **2. Principe de phagothérapie :**

Comme dans le cas de l'antibiothérapie, il existe deux possibilités de traitement par Phagothérapie, dont le choix varie selon que la bactérie pathogène soit identifiée ou non :

- Soit la bactérie pathogène est inconnue, et on va alors traiter en probabiliste, en administrant un cocktail de bactériophages et en misant sur la probabilité que l'infection que l'on souhaite traiter soit causée par une bactérie qui sera ciblée par au moins un type de phages du cocktail,
- Soit la bactérie incriminée est connue auquel cas un phagogramme sera effectué pour cibler cette bactérie et choisir le phage lui correspondant. Cette deuxième approche est préférable en phagothérapie car les phages sont très spécifiques d'une espèce donnée. (**Neurohr, 2016**)

### **3. Autres applications des bactériophages :**

#### **a) Médecine vétérinaire :**

La thérapie phagique est utilisée en science vétérinaire depuis le début du 20<sup>e</sup> siècle. En 1919, les phages ont été utilisés pour la première fois en France contre la fièvre

Typhoïde des oiseaux (**Gazeev, 2018**).

Ils ont les utilisées à partir du poulet infecté par *Salmonella* qui conduit à la mortalité et la colonisation intestinale chez le poulet et a montré une efficacité contre ce pathogène.

Ils ont également montré ses capacités contre les différentes infections à *E.coli* l'administration orale des bactériophages efficaces a permis une élimination plus rapide de la bactérie dans l'intestin ou une réduction du nombre de bactéries présentes dans les fèces et/ ou les intestins chez les souris, moutons et de bovins.

L'utilisation des bactériophages semble adaptée pour : la guérison des blessures, réduire les lésions pulmonaires et la diminution de la charge bactérienne pulmonaire due aux infections à *Pseudomonas aeruginosa* **Saussereau,(2012)**.

#### **b) La sécurité alimentaire :**

Des pulvérisations de phages sont en cours de développement comme traitement pour empêcher les œufs, la volaille, la viande, le poisson, le fromage et les systèmes généraux d'alimentation et d'eau utilisés dans l'industrie alimentaire pour contrôler la contamination causée par *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shewanella*, *Campylobacter*, *Listeria* et *Legionella*. De nombreux agents pathogènes qui causent des pertes économiques dans la production alimentaire.

Les phages infectent les bactéries qui causent des pertes importantes dans tous ces domaines de l'alimentation et de l'agriculture ont le potentiel d'améliorer la sécurité alimentaire et les rendements agricoles (**Harada et al., 2018**).

#### **c) Agriculture (protection des cultures) :**

Outre les applications médicales/thérapeutiques, les contrôles basés sur les phages sont désormais également utilisés dans les secteurs de l'alimentation et de l'environnement pour protéger les aliments (légumes, fruits, viande, poisson), les fleurs et l'eau contre la détérioration bactérienne ou la contamination par des agents pathogènes (végétaux). Les phages sont également utilisés dans l'agriculture, l'horticulture et la protection des cultures

contre les agents pathogènes des plantes tels que *Xanthomonas citrus*, *Agrobacterium* et *Erwinia*. Des phages sont également en cours de développement contre le phytopathogène de la pourriture bactérienne des pommes de terre, des poireaux, du chou-fleur et d'autres cultures **Vandamme et Mortelmans, (2019)**.

#### **4. Inhibition de biofilm :**

##### **a) Définition de biofilm :**

La matrice de substance polymère extracellulaire (EPS) composée dans le biofilm est constituée d'exopolysaccharides, de protéines sécrétées, de lipides, d'ADN extracellulaire et d'autres composants mineurs **Whitchurch et al., (2002) ; Rabin et al., (2015)** . Les caractéristiques des composants de la matrice ainsi que les interactions des molécules fournissent des mécanismes pour l'adhérence du biofilm à des variétés de surfaces, la préservation des réservoirs de nutriments et la protection contre l'environnement extérieur **Yan et Bassler, (2019)**. Le biofilm se forme couramment sur des surfaces telles que les dépôts dentaires et les implants médicaux, alors qu'il est également capable de se former sans lesdites surfaces **O'Toole et al., 2000 ; Alhede et al., (2011)**.

##### **b) Les phages combattent le biofilm :**

Le traitement à base de phage est capable de lutter contre le biofilm via plusieurs mécanismes utilisant divers composants phages. Les phages sont des virus strictement spécifiques à l'hôte qui infectent les bactéries et dépendent de l'hôte lors de l'auto-réplication. Ces dernières années, avec la réduction des nouvelles découvertes d'antibiotiques et l'augmentation de la résistance aux antimicrobiens (RAM), la recherche sur les phages et la thérapie par les phages a progressivement fait son retour depuis la découverte des antibiotiques. Des milliers de phages ont été découverts (**Ackermann et Prangishvili, 2012**), mais ses formes structurales de base peuvent être classées en quatre types : les phages à queue, les phages polyédriques, les phages filamenteux et les phages pléomorphes (**Ackermann, 2009**). L'interaction hautement spécifique avec la cellule hôte repose sur la protéine de liaison au récepteur positionnée sur la fibre de queue des phages (**Dams et al., 2019** ). L'activité antibactérienne du phage est réalisée par deux enzymes principales - la dépolymérase et les lysines - qui sont respectivement responsables de la dégradation des polysaccharides capsulaires et du peptidoglycane dans les cellules bactériennes (**Schmelcher et al., 2012 ; Yan et al., 2014** ). Le domaine d'une dépolymérase est souvent affiché à l'extrémité du phage sous forme de fibres de queue. D'autre

part, les lysines sont codées soit à l'intérieur soit sur la queue du virion, qui clivent la paroi cellulaire du peptidoglycane de l'intérieur et de l'extérieur respectivement (**Sharma et al., 2018**).

Les phages sont capables de détruire les hôtes bactériens et donc d'empêcher la formation de biofilm. Les phages pourraient également pénétrer le biofilm existant et éliminer la structure du biofilm avec ou sans tuer les bactéries résidentes (**Domingo-Calap et Delgado-Martinez, 2018**).

---

## *Partie expérimentale*

---

### III. Matériels et méthodes :

#### 1. Echantillonnage :

Afin d'isoler des bactériophages, des échantillons d'eau usée ont été prélevés à partir de la station d'épuration d'eau usée de la région BORDJ SNOUSSI « ONA » durant le mois de mars 2022 (**Figure 6**). Le choix de l'eau usée pour l'isolement des bactériophages a été effectué parce que ce dernier contient des bactéries avec une charge très élevée, donc où se trouvent les bactéries on trouve les bactériophages. Pour cela, 250 ml d'eau usée a été prélevé dans une bouteille de 500 ml de volume, ensuite, elle est directement centrifugée, à 6000 rpm pendant 30 min, puis filtrée à l'aide d'un système de filtration (wheaton USA) (**Figure 7**) en utilisant des filtres de 0.22  $\mu\text{m}$ , afin de retenir les cellules et laisser passer les phages, ensuite, l'échantillon est mis dans une bouteille stérile et acheminé vers le laboratoire.

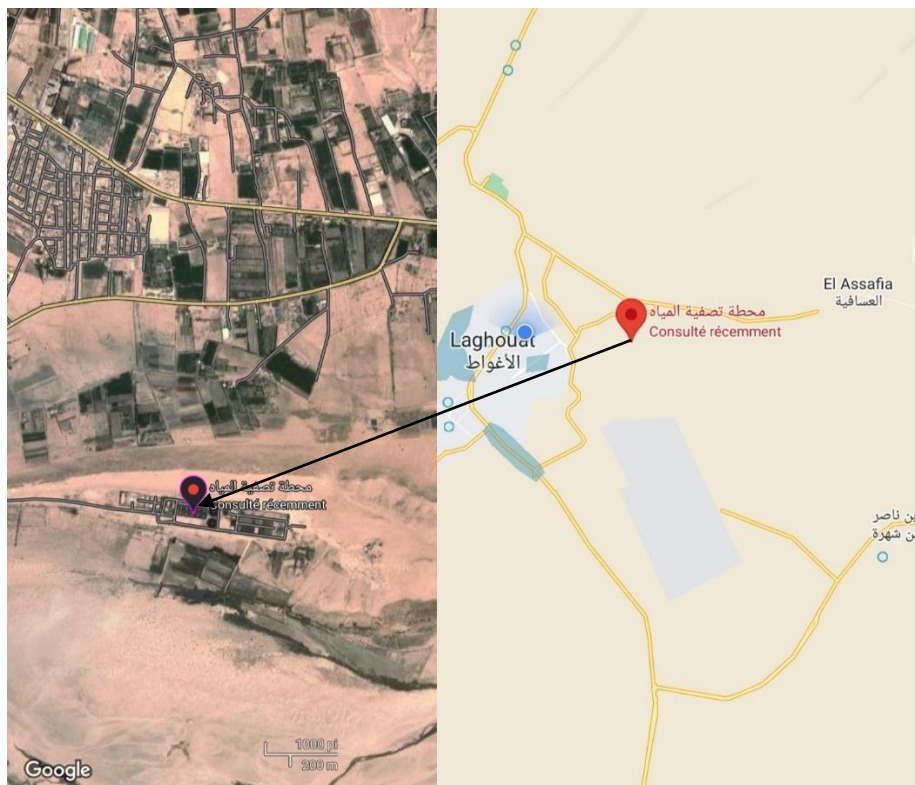


Figure 6 : Carte montre la région d'échantillonnage : Bordj Senoussi ONA (33.811210,2.917341).

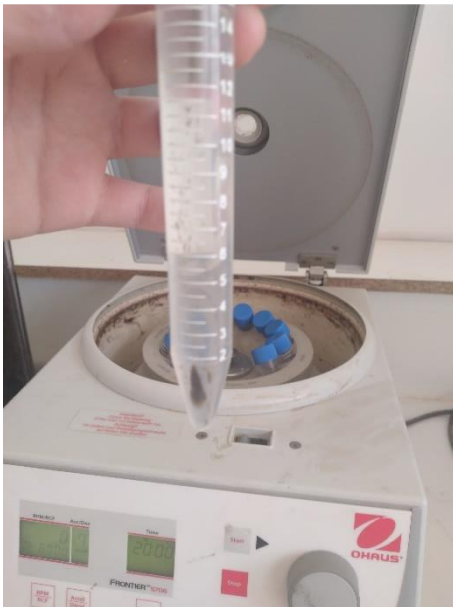
## Partie expérimentale



A



B



C



D

Figure 7 : préparation d'eau usée filtrée par le filtre de  $0,22\mu\text{m}$ , A : centrifugation d'eau usée, B : élimination des débris, C : filtration d'eau usée, D : filtre de type GS  $0,22\mu\text{m}$ .

### 2. Enrichissement des bactériophages :

Les suspensions des bactéries tests utilisé ont été préparées après avoirensemencé séparément les bactéries tests suivantes *Eschirichia.coli*, *pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus*, dans des tubes qui contient 10 ml de milieu MH, les tubes sont ensuite incubés pendant 18h à 37°C.

Dans le but d'enrichir les bactériophages dans les échantillons d'eau usée utilisée, 3 ml de chaque suspension bactérien a été mélangé séparément, dans des Erlenmeyers, avec 10 ml d'eau usée filtrée au préalable (**Figure 8**), les mélanges (suspension plus échantillon d'eau usée) ont été incubés sous agitation à 30 °C pendant 24h.

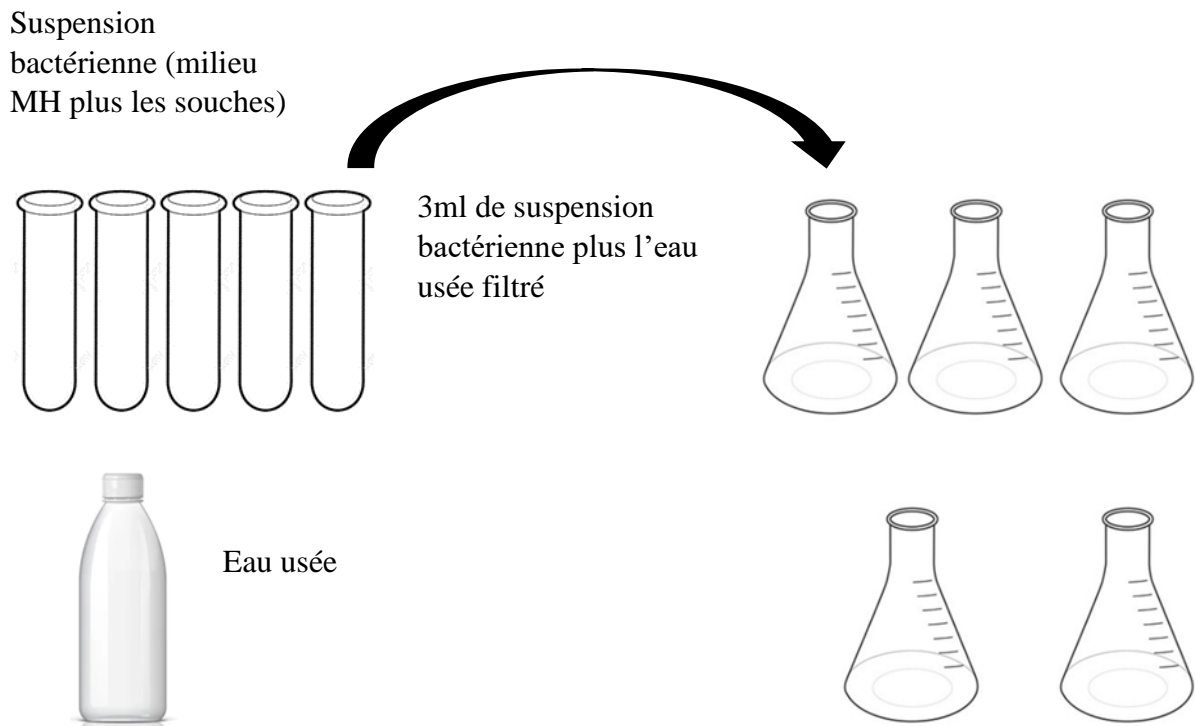


Figure 8 : Etapes d'enrichissement des bactériophages.

### 3. Isolement des bactériophages :

Afin d'isoler les bactériophages, des suspensions de bactéries test ont été préparé, en effet, chaque bactérie test a été ensemencé séparément dans des tubes contentent le milieu BHIB, après 24 h, la densité optique de chaque suspension a été ajusté entre 0.08-0.1, à l'aide d'un spectrophomètre réglé à 600 nm.

Pour l'isolement des bactériophages, des Erlenmeyers contiennent le mélange (suspension plus eau usée) ont été filtré par des filtre à seringue. 10 µl de filtra, est ensuite déposé aux milieux des cadres désigné sur des boites de pétrie, préalablement coulées par le milieu MH et ensemencé par une bactérie test (**Figure 9**).

Cette méthode est plus rapide et permet d'obtenir une distribution homogène des bactéries avec une accélération de diffusion des particules phagiques et le développement de plaque de lyse et donc les variations de la morphologie des plaques peuvent être plus facile à étudier (**Adams, 1959 ; Hamzeh, 2014**)

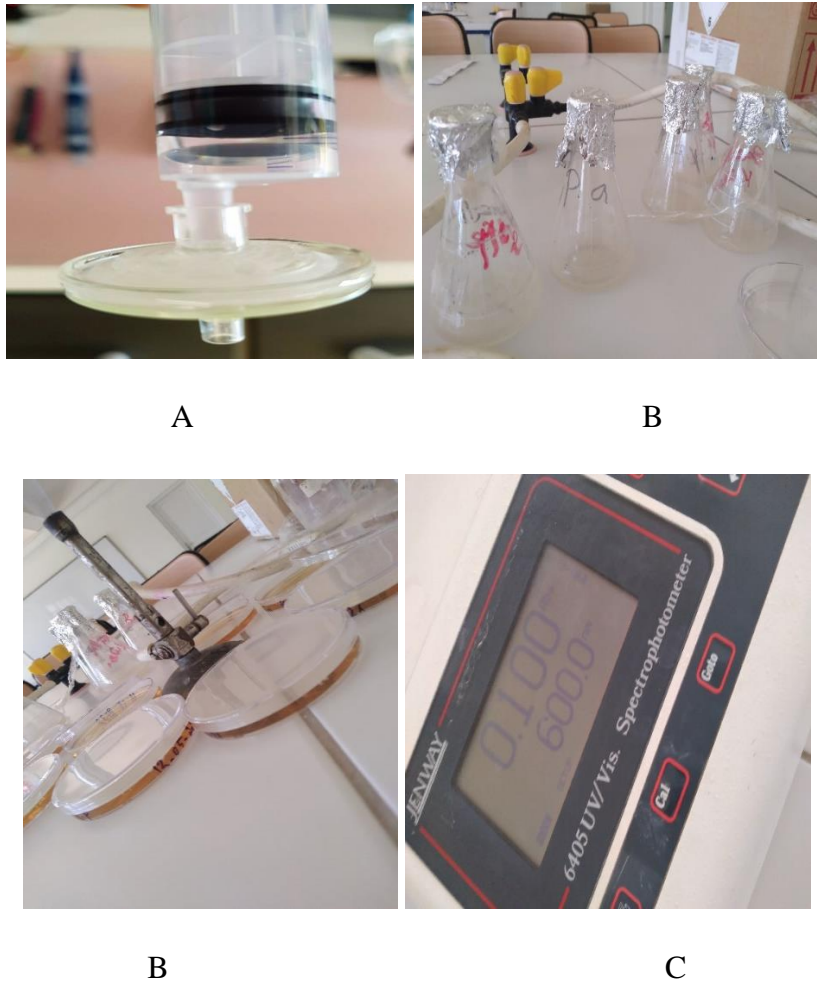


Figure 9 : Etapes d'isolement, A : filtration des suspensions, B : préparation milieu MH dans des boîtes pétries et l'encadrement de ces boîtes, C : le calcule la densité des souches.

#### 4. Purification des bactériophages :

Après 24 h d'incubation des boîtes d'isolement, les bactériophages sont reconnus suite à la présence des plages de lyse sur le tapis bactériens, ces plages sont ensuite grattées, à l'aide d'un râtelier stérile, puis transférées dans un tube contenant 5 ml de milieu BHIB. Les tubes sont ensuite ensemencés avec la bactérie pathogène sensible aux bactériophages, puis incubés à 37 °C. Après 24 h de propagation de bactériophage, les cultures sont centrifugées à 6000 rpm pendant 20 minutes, puis les surnageants sont ensuite filtrés en utilisant un filtre de 0.22 µm, pour

## Partie expérimentale

obtenir la suspension virale. Cette étape de purification a été répétée au moins trois fois pour assurer la pureté des phages. (Figure 10)

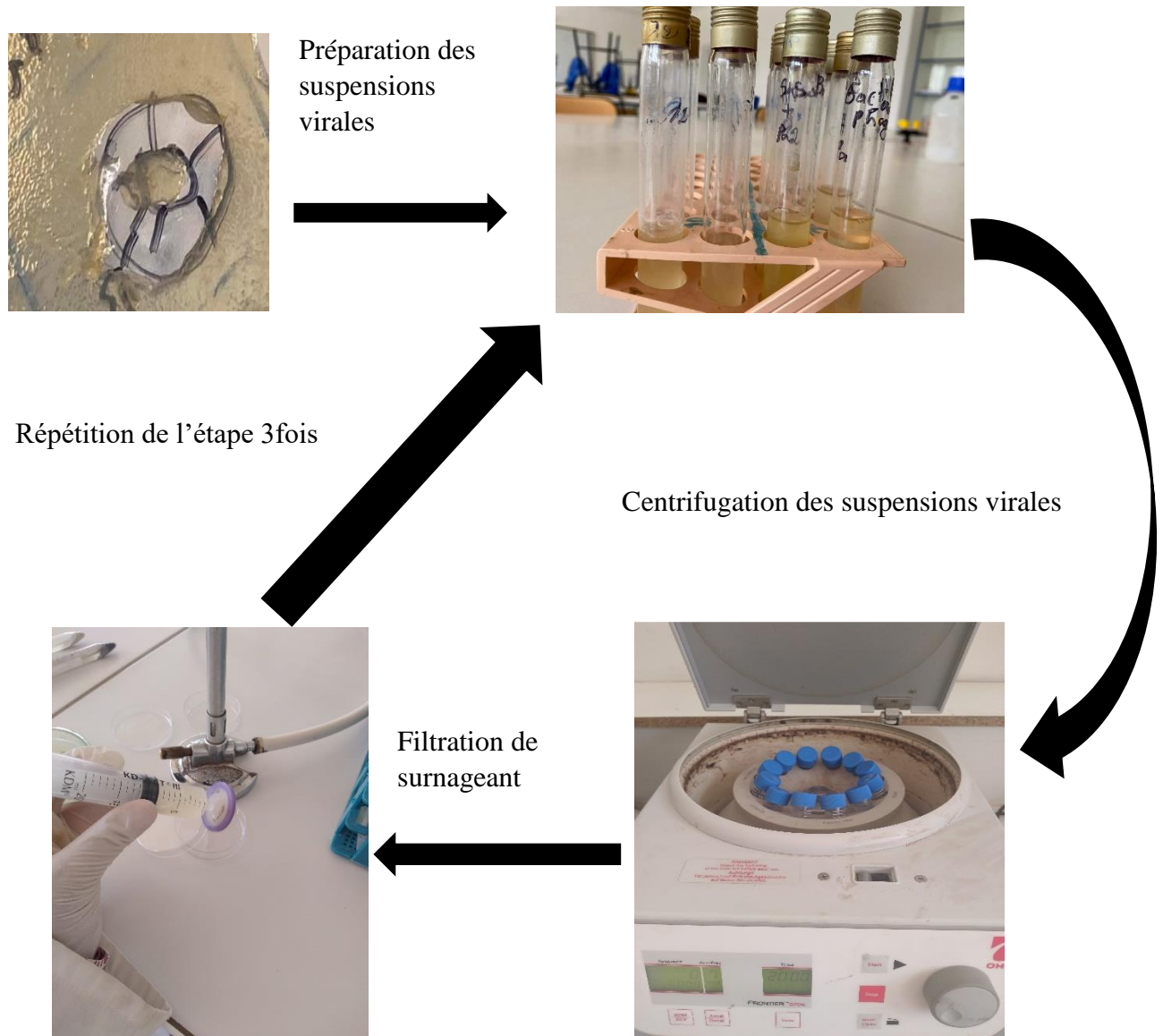


Figure 10 : Etapes de la purification des bactériophages.

### 5. Test de confirmation des bactériophages :

Afin de confirmer la présence des bactériophages dans les suspensions préparées, on a utilisé la méthode de double couche.

Pour évaluer la capacité lytique du phage **PaBor1a** sur les cellules bactériennes de *P. aeruginosa*, un test de virulence a été réalisé à travers la technique de double couche (**Pal.S, 2015**).

Dans cette méthode on mélange 6 ml de milieu Muller Hinton semi solide stérile, avec 500  $\mu$ l de suspension viral en plus de 250  $\mu$ l de la suspension bactérien ajustée à un DO= 0.3, dans un tube de centrifugation conique de 15 ml de volume.

Le mélange est ensuite versé à la surface d'une boîte de pétri préalablement coulé par le milieu MH solide. (**Figure 11**)



A



B

Figure 11 : Etape de test de confirmation, A : préparation de milieu MH à faible teneur en agar plus suspension virale plus suspension bactérienne, B : des boîte pétrie déjà coulé par le milieu MH solide.

### 6. Activité anti biofilm :

#### a) Technique des tubes :

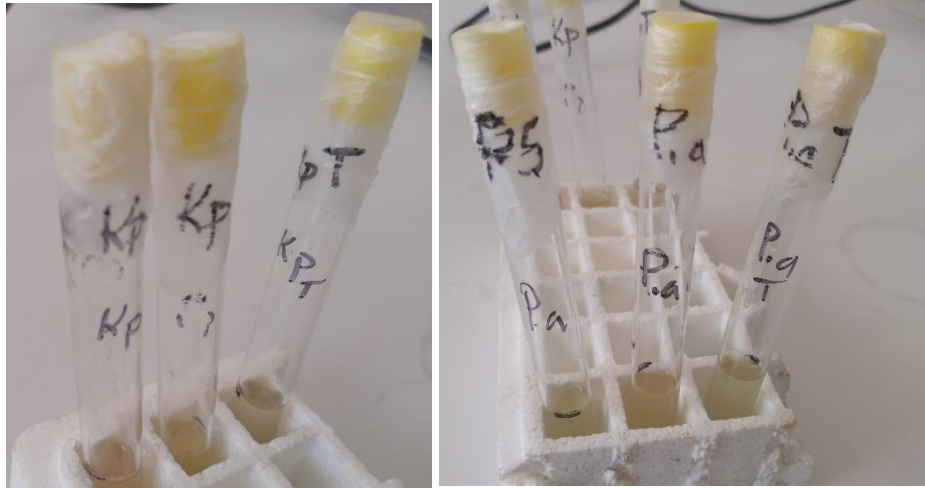
Dans le but d'éradiquer le biofilm, chaque une des deux souches *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*, ont été ensemencé dans trois tubes à verre différents contenant le milieu LB ( **Figure 12** ), après 24 heures d'incubation à 37 °C les culture de chaque tube sont vidés puis remplacé par la suspension phagique spécifique pour chaque souche pathogènes, un tube a été utilisé comme témoins négative (**Figure 13**), les tubes sont ensuite réincubé pendant 24h à 37°C Après 24 h d'incubation, les tubes sont vidés puis rincés trois fois avec l'eau distillé stérile, ensuite une solution de Crystal violet de 1% a été ajouté dans chaque tube, après 30 min d'incubation dans l'obscurité (**Figure 14**), le Crystal violet est versé puis les tubes sont rincés deux fois avec l'eau distillé, le taux d'éradication de biofilm formé est estimé après avoir ajouté dans chaque tube l'acide acétique dilué à 30%, la densité optique est mesuré par un spectrophotomètre réglé à 550 nm puis comparé avec la DO de témoin.



A

B

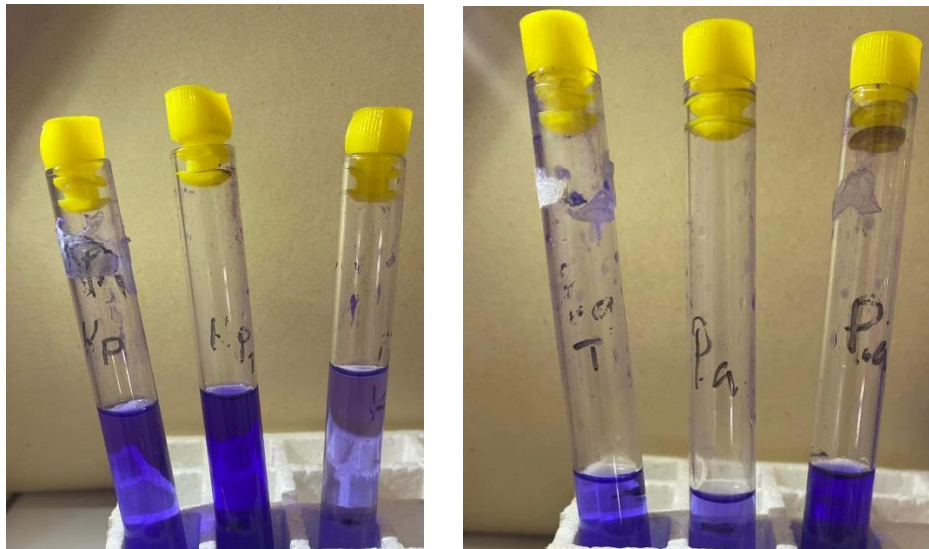
Figure 12 : Première étape de la technique des tubes.



A

B

Figure 13 : deuxième étape de technique des tubes.



A

B

Figure 14 : Etape de coloration par le cristal de violet (CV) (1%).

### b) Technique des lames inoxydables :

Des lames d'acier inoxydables de type AISI 304 et de taille 2.5 cm x 1 cm ont été utilisé comme support pour étudier l'éradication de biofilm de *P.aeruginosa*, par la suspension de bactériophage lytique. Les lames placées dans des boites de Pétri en verre, sont stérilisés à l'étuve réglé à 100 °C pendant 2 h. Elle sont ensuite placées dans des boites de pétri stériles contenant 20 ml de la culture bactérienne liquide, puis elles sont incubées à 37°C .

Après 24 h d'incubation, deux lames ont été utilisé comme témoin, elles sont donc immergé dans le bouillon MH stérile, alors deux autres lames ont été traité par la suspension viral pour cela ces lames ont été immergé dans 20 ml d'une suspension viral de bactériophage spécifique à *P.aeruginosa*. Après 24h d'incubation, les lames sont rincées deux fois avec l'eau distillé pour éliminer les cellules non adhéées, puis elles sont immergées dans le cristal violet à 1 % (p/v), après 15 minutes sont rincées avec l'eau et séchées à l'air. Une fois séchées, les lames sont directement observé au microscope optique pour vérifier l'éradication de biofilm **Figure 15**.



A

B

C

Figure 15 : Etapes de technique des lames inoxydables, A : incubation des lames + souche *P.a* + milieu LB, B : filtration des suspensions virale, C : incubation des tubes qui contiennent des lames avec suspension virales filtrée.

### IV. Résultats et discussions :

#### 1. Isolement des bactériophages :

Après une incubation de 24h à 37°C des boîtes d'isolement, des plages de lyse ont été formé dans chaque boîtes des souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* (**Figure 16**), alors aucune plage de lyse n'a été remarqué dans les boîtes contenant les bactéries *Bacillus cereus* et *staphylococcus aureus* (**Figure 17**). Trois plages de lyses ont été prélevées à partir de chaque boîte qui présente des plages de lyse, en effet, chaque plage représente une souche phagique différente

**Martineau, 2009** a isolé des bactériophages à partir d'échantillons d'eaux usées de la Station d'épuration de la ville de Montréal. Et il a montré que l'isolement des bactériophages est très aléatoire. Les phages ne sont pas trouvés dans tous les échantillons et ils ne sont pas toujours isolés à partir des mêmes bactéries hôtes.

**synnnoth et al.2009** ont décrit l'isolement de deux nouveaux phages, désignés  $\Phi$ SA012 et  $\Phi$ SA039, qui se sont avérés avoir un effet lytique sur une large gamme d'isolats de *S. aureus* obtenus à partir de lait mastitique.

**Khan et al., 2002** ont isolés des bactériophages à partir des eaux usée prélevé de la station municipale de traitement des eaux usées urbaines à Tokyo,

La présence des plages de lyse sa montre que les phages ont pris le cycle lytique spécifique aux bactéries.

L'absence de plage de lyse s'était expliquée par **Logan et al., 1980** par des différentes hypothèses supposées :

- La souche testée n'est pas sensible au bactériophage.
- La suspension phagique ne contient pas des phages lytiques.
- Le temps d'incubation du mélange (suspension phagique + culture bactérienne) n'est pas suffisant pour réaliser l'adsorption du phage au niveau de la paroi de sa bactérie hôte.
- Ça peut-être à cause de la densité phagique dans la suspension hydrique est faible.
- peut être aussi à la cause une contamination.

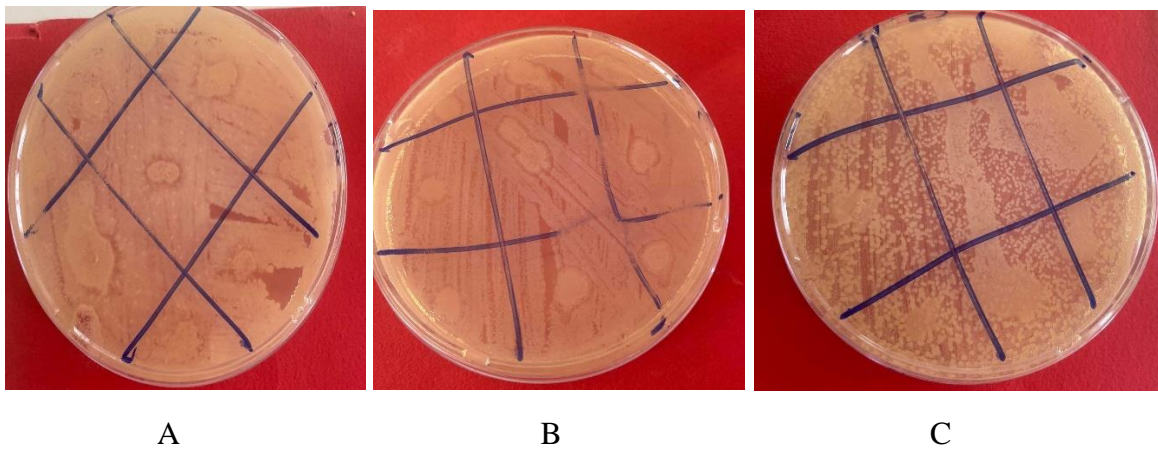


Figure 16 : l'apparition des plages de lyse dans les boîtes de : *P. aeruginosa*, *K.pneumoniae*.  
Et d'*escherichia coli*.

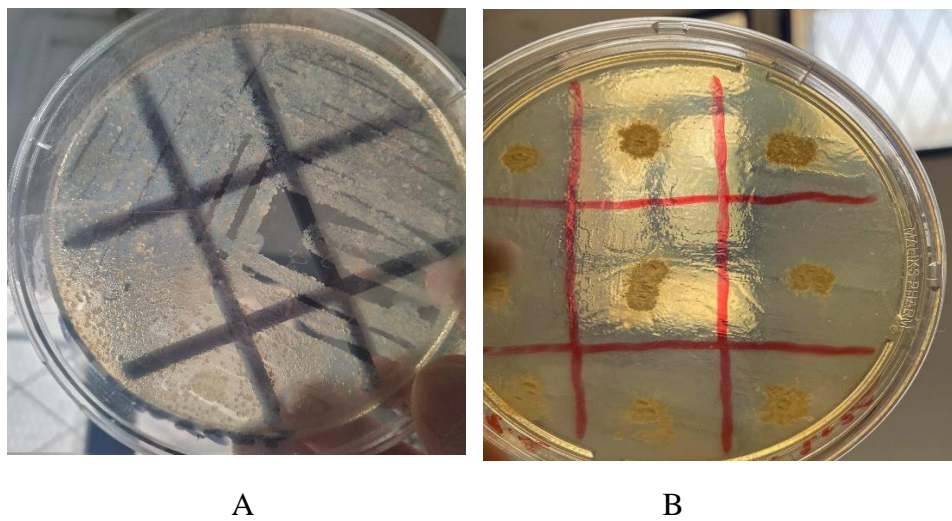


Figure 17 : l'absence des plages de lyse dans les boîtes pétrie de : A : *staphylococcus aureus*, B : *Bacillus cereus*

### 2. Test de confirmation des bacteriophages :

Après avoir préparé les suspensions phagiques spécifiques pour chaque bactéries testent, l'activité lytique des bactériophages a été confirmé par la méthode en double couche, contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonie* et *E.coli*. les résultats confirment l'activité lytique des bactériophages active contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*, alors que les phages lytiques contre *E.coli* n'ont pas montré une activité ce qui peut être expliqué par leurs disparitions.

Après l'incubation de 24h à 37°C, on a obtenu l'apparition des plages de lyse sur la nappe bactérienne chez *pseudomonas aeruginosa*  $\lambda 1$  et *klebsiella pneumoniae*  $\beta 3$ , ce qu'il montre- il y a une infection phagique. Par contre chez *E.coli*  $\alpha 1$  l'absence des plages de lyse se justifier par la disparition des bactériophages. **(Figure 18)**

**Koudou et al., 2020** ont obtenu comme résultat : une virulence qui est mise en évidence par la présence de plage de lyse sur la gélose bactérienne de *P.aeruginosa*, traduit l'activité lytique du phage sur la bactérie.

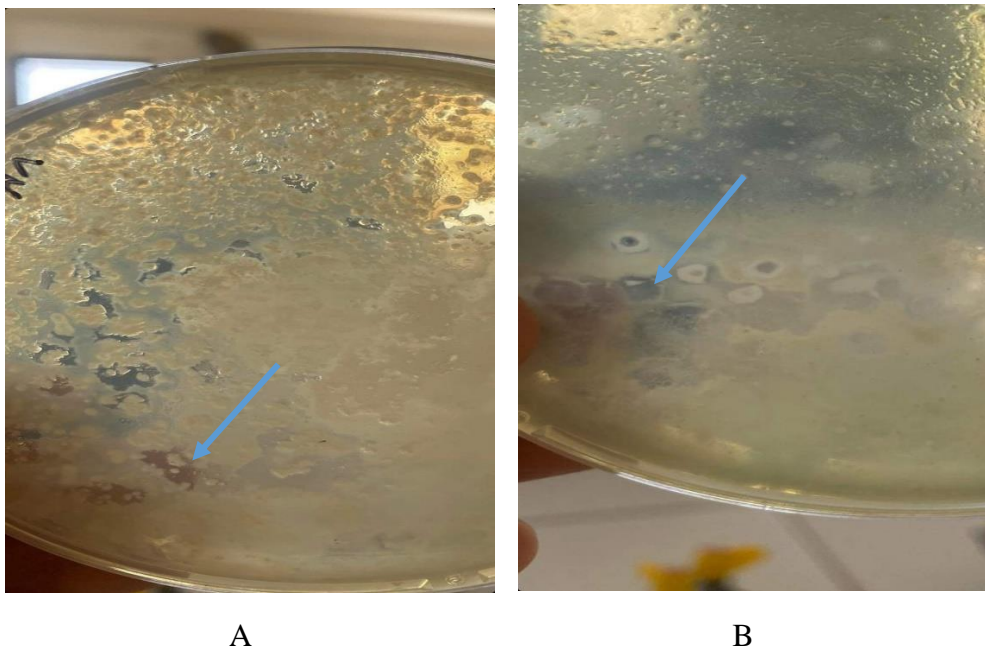


Figure 18 : résultat de double couche l'apparition des plages de lyse. A : chez *P. aeruginosa* et B : chez *K.pneumoniae*.

### 3. Activité anti biofilm :

#### a) Technique des tubes :

L'activité anti-biofilm de différentes souches phages, a été déterminée par estimation du taux d'éradication de biofilm de 24 h formé par *K.pneumoniae* et *Pseudomonas*, les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 19**.

En effet, après avoir coloré les tubes par cristal violet pendant 30 min, on a obtenu comme résultat une différence de couleur des tubes par rapport aux témoins, les résultats montrent que les suspensions phagiques sont efficaces contre le biofilm de 24 heures des souches *K.pneumoniae* et *Pseudomonas* avec une bonne éradication visible qui induit une réduction de l'intensité de la couleur de cristal violet par comparaison avec le témoin positif.

Pour *Pseudomonas aeruginosa*, on observe à l'œil nue, une grande différence de couleur entre les deux tubes : le tube témoins c'était avec une couleur foncée par contre le tube traité avec la suspension phagique devient transparent, ce qui indique qu'il y a une bonne éradication de biofilm, la même observation a été noté pour le biofilm formé par *K.pneumonie*.

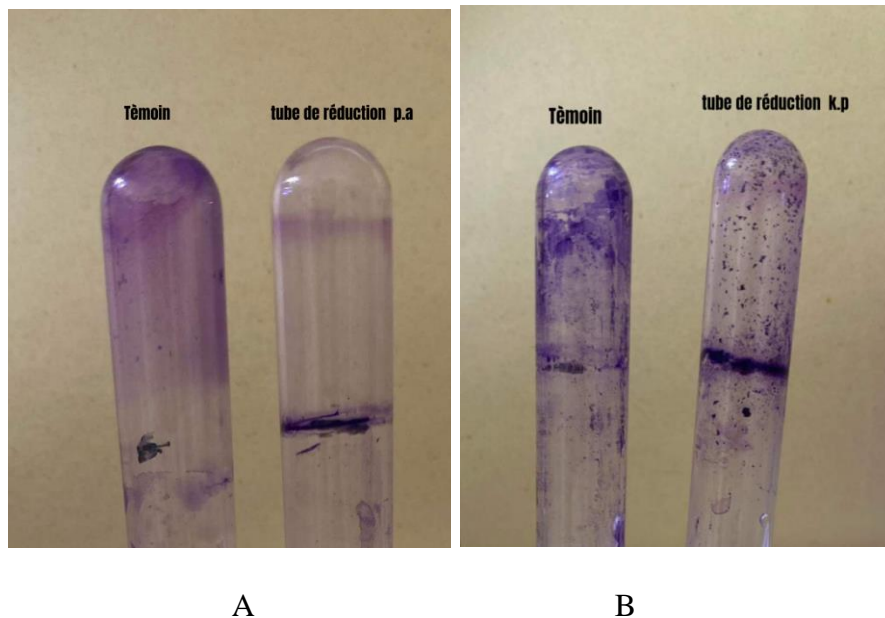


Figure 19 : résultat d'activité anti-biofilm de deux souches. A : chez *Pseudomonas aeruginosa*, B : chez *Klebsiella pneumoniae*.

## Partie expérimentale

L'activité observée dans la **Figure 19**, a été confirmée par comparaison entre la densité optique mesurée par spectrométrie UV-Visible, dans les tubes traités par les suspensions phagiques spécifiques aux deux bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*, avec les tubes témoins, les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 20** :

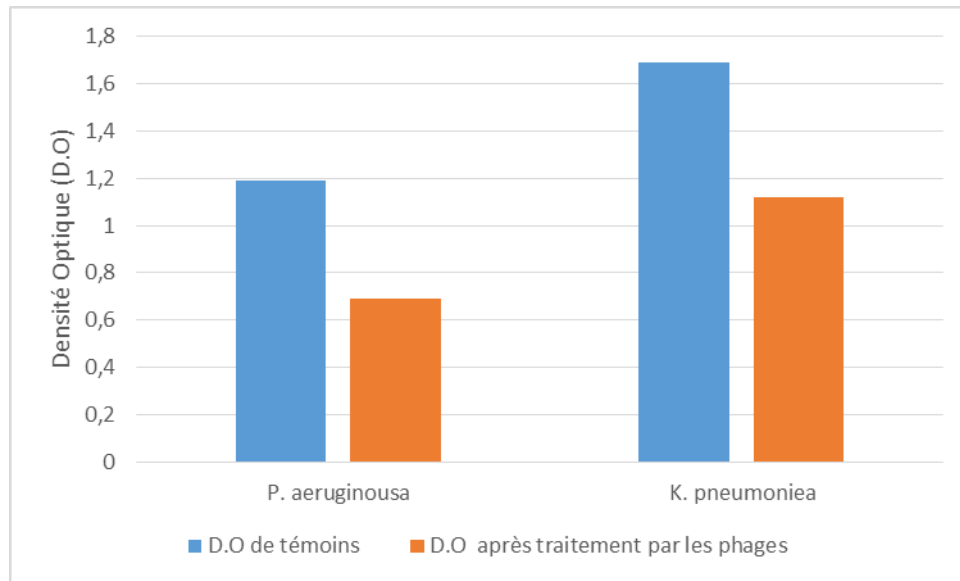


Figure 20 : les résultats d'éradication de biofilm de *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* après le traitement par des phages lytiques spécifiques pour chaque bactérie tests.

D'après les résultats représentés dans la **Figure 20**, un taux d'éradication fort de 65.50% a été obtenu contre le biofilms de 24 h de *P. aeruginosa*, alors qu'un taux d'éradication moyenne de 33.74 % a été observé pour le biofilm formé par *K. pneumoniae*. L'idée d'utiliser les bactériophages afin de réduire ou éliminé le biofilm formé par des bactéries nuisible, a été appliqué par **Adnan et al.2020**, qui ont utilisé un bactériophage M-1, isolé à partir des eaux usées, pour éliminer le biofilms formé par un isolat multirésistance de *P.aeruginosa*. Les résultats ont montré que le bactériophage MA-1 réduisait le biofilm formé après 6 h de traitement. Les auteurs ont noté aussi que le bactériophage MA-1 est capable même de détruire le biofilm de 20 jours formé par *P. aeruginosa*. Les phages peuvent également détruire indirectement les biofilms en attaquant les bactéries pionnière avant même de se fixer et colonisé la surface. Dans une autre étude, **Fong et al. 2017**, ont utilisé les bactériophages Pa193, Pa204, Pa222 et Pa223 pour éliminer le biofilm de *P. aeruginosa*, isolé à partir d'un patients

## Partie expérimentale

---

atteints de rhinosinusite chronique, ils ont constaté qu'une dose unique de ces phages, seuls ou en cocktail, élimine significativement le taux de biofilm formé de (53 à 73) % et 89 %, respectivement, après 24 à 48 h de traitement.

### b) technique des lames inoxydables :

Après la coloration pendant 30min On a observé à l'œil nue une disparition de couleur violet chez la lame qui était incubé avec la suspension virales par contre la lame de témoin a été avec une couleur foncée. **Figure 21.** Et les résultats pratique obtenus sont observées par un microscope optique sont présentées dans la **Figure 22.**

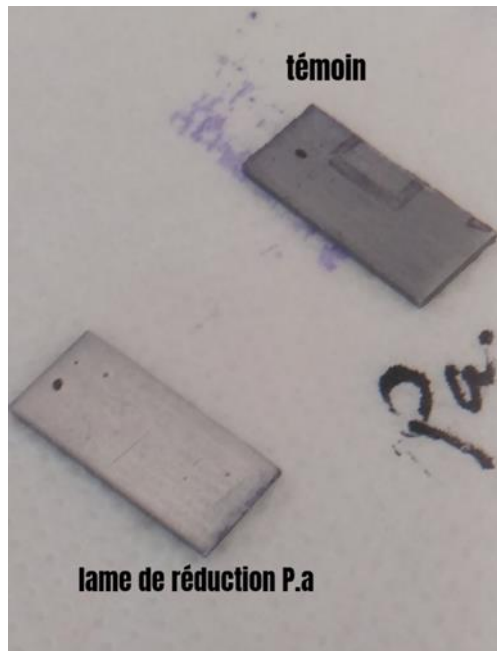


Figure 21 : résultat d'activité anti biofilm par la technique des lames inoxydables observée à l'œil nue.

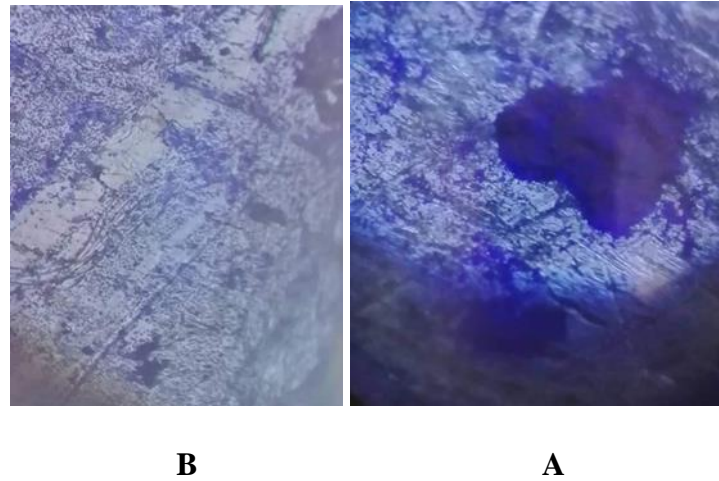


Figure 22 : observation microscopique d'activité antibiofilm sur des lames d'acier inoxydable de biofilm de 24 h formé par *P. aeruginosa*. A : lame témoin. B : lame après traitement par la suspension phagique.

La comparaison entre la lame témoin (**Figure 22,A**) et la lame traitée avec la suspension phagique (**Figure 22, B**) indique un changement dans l'architecture du biofilm et une réduction de l'épaisseur de biofilm de 24 h de *P. aeruginosa*, ce qui confirme l'activité antibiofilm de la suspension phagique spécifique à l'espèce *P. aeruginosa*. Différents mélanges phagique ont utilisé pour réduire considérablement les biofilm formé sur divers types de surfaces, dont l'acier inoxydable, le polypropylène, le polyéthylène, le verre et la céramique, Toutes les auteurs démontrent des réductions importantes des niveaux de contamination et convergent vers le fait que les phages ont un potentiel d'agents bioassainisseurs de surfaces solides (**Iacumin et al., 2016; Sillankorva et al., 2012, Roy et al.,1993; Soni & Nannapaneni 2010 , Lungren et al., 2013, Rashid et al., 2012, Woolston et al., 2013.**

Les résultats observé dans **les Figures 21 et 22**, indique l'efficacité d'utiliser les phages comme agent phagoassainisseurs qui peut être utilisé dans les différents secteurs agroalimentaire (surtout industrie laitière) et hospitalier, afin d'assainir les surfaces contaminés par les bactéries indésirables responsables d'infection humaine grave ou provoquent des pertes économique. Au même temps, les phagoassainisseurs permettrait de remplacer les détergents chimiques actuellement souvent néfastes pour la santé et l'environnement.

---

# *Conclusion*

---

L'objectif de cette étude était d'isoler une collection de bactériophages lytiques, à partir de la station d'épuration des eaux usées de BORDJ SNOUSSI « Laghouat », capables d'infecter les espèces : *Pseudomonas aerogenosa* , *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. Les résultats obtenus indiquent la présence des bactériophages lytiques spécifiques aux bactéries *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa* et *Klebsiella pneumoniae*, alors qu'aucun bactériophage lytique spécifique aux deux bactéries *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* n'a été obtenues. Ce dernier résultat peut être expliqué par :

- L'absence des bactériophages
- Les souches testées ne sont pas sensibles aux bactériophages isolés.
- La suspension phatique ne contient pas des phages lytiques (prend le cycle lysogénique)
- Le temps d'incubation n'est pas suffisant.

L'activité anti-biofilms a été évaluée contre le biofilm de 24 h formé par les deux espèces de *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats indiquent une bonne éradication de biofilm par la suspension phagique surtout le biofilm formé par l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* avec une éradication de 65.5%.

La même observation a été faite, quand l'activité anti-biofilm a été évaluée contre le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*, formé sur un support d'acier inoxydable, où l'éradication de biofilm été clair après une observation sous microscope optique. D'après les résultats obtenus, on peut conclure que les bactériophages se sont avérés efficaces contre une grande variété de bactéries indésirables, car ils sont hautement spécifiques à l'hôte. Pour cela, ces bactériophages peuvent être associés et utilisés comme cocktail antimicrobien pour traiter certaines infections on cas d'échec thérapeutique, et peuvent aussi être utilisé comme agents désinfectants dans le but de contribuer à la prévention et le contrôle des biofilms qui se forme sur les différentes surfaces industrielles, dont l'acier inoxydable, le polypropylène, le polyéthylène, le verre et la céramique nosocomiales.

---

*Référence  
bibliographique*

---

**Ackermann, H.-W. 1999.** bacteriophages, pp, 398-411. in J.P. Lederberg (Ed.-in chief) Encyclopedia of microbiology, 2nd edn, vol, 1, academic press, New York.

**Ackermann, 2001.** Frequency of morphological phage description in the year 2000, brief review. Archive virological 146(5) : 843-57.

**Ackermann, H.-W., 2003.** Bacteriophage observations and evolution. Res. Microbiol. 154, 245–251. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00067-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00067-6)

**Ackermann, HW (2009).** Classification et caractérisation des phages. Méthodes Mol. Biol. 501, 127–140. doi : 10.1007/978-1-60327-164-6\_13

**Ackermann, HW et Prangishvili, D. (2012).** Virus procaryotes étudiés par microscopie électronique. Cambre. Virole. 157, 1843–1849. doi : 10.1007/s00705-012-1383-y

**Adams, M.H., 1959.** Bacteriophages. New York, Interscience Publishers.

**Ansaldi M, Boulanger P, Brives C, Debarbieux L, Dufour N, Froissart R, Gandon S, le Hénaff C, petit MA, Rocha E, Torres-Barcelo C, 2020.** Les applications antibacteriennes des bactériophages. Virologie ; 24(1) : 23-36 doi : 10.1684/vir.2019.0805

**Adnan M, Shah MRA, Jamal M, Jalil F, Andleeb S, Nawaz MA, Pervez S, Hussain T, Shah I, Imran M. 2020.** Isolation and characterization of bacteriophage to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells and biofilm. Biologicals. ; 63:89–96

**Dams, D., Brondsted, L., Drulis-Kawa, Z. et Briers, Y. (2019).** Ingénierie des protéines de liaison aux récepteurs dans les bactériophages et les bactériocines de type queue de phage. Biochimie. Soc. Trans. 47, 449–460. doi: 10.1042/BST20180172

**Domingo-Calap, P., et Delgado-Martinez, J. (2018).** Les bactériophages : protagonistes d'une ère post-antibiotique. Antibiotiques 7:66. doi : 10.3390/antibiotiques7030066

**Dublanchet, A., 2008.** La phagothérapie au XXI<sup>e</sup> siècle. Première partie : que pourrait-elle apporter aujourd'hui ? Antibiotiques 10, 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.antib.2008.08.002>

**Duck worth, D.H, Guling, P.A.(2002).** Bacteriophages. Biodrugs, 16, pp. 57-62 <https://dio.org/10.2165/00063030-200216010-00006>

**Elizabeth Kutter, Alexander.(2004).** Bacteriophage : biology application, 1st Edition, Etat :UK 528 ;p.p :1.

**Fong SA, Drilling A, Morales S, Cornet ME, Woodworth BA, Fokkens WJ, Psaltis AJ, Vreugde S, Wormald P-J. 2017.** Activity of bacteriophages in removing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronic rhinosinusitis patients. *Front Cell Infect Microbiol.*7:418.

**Gazeev, S., 2018.** Applications of Phage Therapy in Veterinary Medicine. Programme Vét. Proj. Licence Univ. Suédoise Agric. Fac. Médecine Vét. Sci. Anim. 2016 2018:28,18.

**Gene Mayer, PhD,(2016).** BACTERIOPHAGE. In : *Microbiology and Immunology On-line*, Hunt, R.C. editor. <https://www.microbiologybook.org/mayer/phage.htm>

**Hamzeh, Z., 2014.** Étude sur l'utilisation de cocktail de bactériophages pour l'élaboration de surfaces antibactériennes (masters). Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières.

**Harada, L.K., Silva, E.C., Campos, W.F., Del Fiol, F.S., Vila, M., Dąbrowska, K., Krylov, V.N., Balcão, V.M., 2018.** Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiol. Res.* 212–213, 38–58. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.007>

**Iacumin, L., M. Manzano, G. Comi, (2016).** Phage inactivation of *Listeria monocytogenes* on San Daniele dry-cured ham and elimination of biofilms from equipment and working environments. *Microorganisms* 4: pii: E4. doi:10.3390/microorganisms4010004.

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

**Koudou et al. 2020.** Biocontrôle de l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistant par les bactériophages en aquaculture en Côte d'Ivoire. *J. Appl. Biosci*, 154: 15940 – 15949 ISSN 1997-5902 <https://doi.org/10.35759/JABs.154.10>

**Logan k.B., Ress G.F. , Seeley N.D. , and Primrose S.B.(1980).** Rapid concentration of bacteriophage from large of freshwater: evaluation of positive charged microporous filters .*J.virology.methods*,87-97

**Lungren, M. P., D. Christensen, R. Kankotia, I. Falk, B. E. Paxton, C. Y. Kim, (2013)** Bacteriophage K for reduction of *Staphylococcus aureus* biofilm on central venous catheter material. *Bacteriophage* 3: e26825. doi:10.4161/bact.26825.

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

**Morgane, A., 2019.** Intérêt de la phagothérapie dans le traitement et la prévention des maladies du tube digestif (phdthesis). Université de Lille, France.

**Neurohr, S., 2016.** La phagothérapie : des virus au service de la médecine (Thèse d'exercice). Université de Lorraine, France.

**Pal S, 2015.** Phage Therapy an alternate disease control in Aquaculture: review on recent advancements. Journal of Agriculture and Veterinary Science, 8(9) : 68-81

**Peter Hraven, Susan R singer (2017).** Les bacteriophages des virus bactériens, biologie, De BOECK SUPERIEUR, 1400 : 532-533

**Poxleitner, M., Pope, W., Jacobs-Sera, D., Sivanathan, V., Hatfull, G., 2018.** Chapter3: Phage Basics [WWW Document]. SEA-PHAGES Off. Website HHMI Sci. Educ. Alliance-Phage Hunt. Adv. Genomics Evol. Sci. Program.

URL <https://seaphagesphagediscoveryguide.helpdocsonline.com/3-0-overview> (accessed 2.20.20).

**Roy, B., H.-W. Ackermann, S. Pandian, G. Picard, J. Goulet, (1993).** Biological inactivation of adhering *Listeria monocytogenes* by listeriaphages and a quaternary ammonium compound. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2914-2917.

**Rashid, M. H., T. Revazishvili, T. Dean, A. Butani, K. Verratti, K. A. Bishop-Lilly, S. Sozhamannan, A. Sulakvelidze, C. Rajanna, (2012).** A *Yersinia pestis*-specific, lytic phage preparation significantly reduces viable *Y. pestis* on various hard surfaces experimentally contaminated with the bacterium. Bacteriophage 2: 168-177. doi:10.4161/bact.22240.

**Ravat, F., Jault, P., Gabard, J., 2015.** Bactériophages et phagothérapie : utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. Ann. Burns Fire Disasters 28,13–20.

**Schmelcher, M., Donovan, DM et Loessner, MJ (2012).** Endolysines bactériophages comme nouveaux antimicrobiens. Futur Microbiol. 7, 1147–1171. doi : 10.2217/fmb.12.97

**Saussereau, E., 2012.** Utilisation des bactériophages comme thérapie lors d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* dans le cadre de la mucoviscidose : efficacité et innocuité (phdthesis). Université Pierre et Marie Curie - Paris VI.

**Sillankorva, S. M., H. Oliveira, J. Azeredo, (2012).** Bacteriophages and their role in food safety. *Int. J. Microbiol.* 2012 : ID863945. doi:10.1155/2012/863945.

**Soni, K. A. & R. Nannapaneni, (2010).** Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms with bacteriophage P100. *J. Food Protect.* 73: 1519-1524. doi:10.4315/0362-028X-73.8.1519.

**Synnott, A. J., et al. (2009).** Isolation from sewage influent and characterization of novel *Staphylococcus aureus* bacteriophages with wide host ranges and potent lytic capabilities. *Applied and Environmental Microbiology*; 75: 4483-4490

**Vandamme, E.J., Mortelmans, K., 2019.** A century of bacteriophage research and applications : impacts on biotechnology, health, ecology and the economy!: A century of bacteriophage research and applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 94, 323–342. <https://doi.org/10.1002/jctb.5810>

**Van regenmortel, M.H.V.1990.**Virus species,a much overlooked, but essential concept in virus classification.*intervirology* 31:241-254.

**Van Regenmortel,M.H.V.C.M. Fauquet, D.H.I.Bishop, E.B.carstens, M.K.Estes, S.M.Lemon, J.Maniloff,D.J.McGeoch, C.R.Pringle,andR.B.wixkner(eds).2000.**Virus taxonomy,pp,63-136,267-284,389-393,645-650.Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses,academicpress,Sandie,calif

**Woolston, J., A. R. Parks, T. Abuladze, B. Anderson, M. Li, C. Carter, L. F. Hanna, S. Heyse, D. Charbonneau, A. Sulakvelidze, (2013).** Bacteriophages lytic for *Salmonella* rapidly reduce contamination on glass and stainless steel surfaces. *Bacteriophage* 3: e25697. doi:10.4161/bact.25697

**Yan, J., Mao, J. et Xie, J. (2014).** Dépolymérasés de polysaccharides bactériophages et applications biomédicales. *BioDrugs* 28, 265–274. doi : 10.1007/s40259-013-0081-y

---

# *Annexe*

---

**Milieu Hinton agar :**

Miller-Hinton	38g
L'eau distillée	1L
Agar	36g

**Milieu Hinton liquide :**

Miller-Hinton	30g
L'eau distillée	1L
Agar	10g

**Milieu Luria-Bertani :**

Milieu Luria-Bertani	18g
L'eau distillée	1L

**Milieu BHIB liquide :**

Milieu Brain Heart Infusion	50g
L'eau distillée	1L