

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de master complémentaire en médecine
vétérinaire.

Thème

Contribution à l'étude des phages

Présenté par :

Melle : Sameur Karima

Encadré par :

Mr. Aggad Hebib

Année Universitaire : 2018 / 2019

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de master complémentaire en médecine
vétérinaire.

Thème

Contribution à l'étude des phages

Présenté par :

Melle : Sameur Karima

Encadré par :

Mr. Aggad Hebib

devant le Jury composé de:

Président :

Examineur:

Rapporteur :

Co-rapporteur :

Année Universitaire : 2018 / 2019

SOMMAIRE

-DEDICACES	
-REMERCIEMENTS	
-Résumé	
-SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
a. Introductio.....	01
b. structure et définition des phages.....	01
c. hisrorique des phage.....	03
d. classification des phages	04
e. cycle de vie des phages.....	05
f. importance des phages	
-phagothérapie	07
-phages et antibioresistance.....	08
-importance des phages en aquaculture.....	10
-importance des phages dans le processus de fermentation.....	11
g. difficultés et obstacles à l'utilisation des phages.	12
-étude expérimental :l'isolement des bacériophages à partir des eaux usées :	
-matériel et méthode	15
-échantillianage	15
-la filtration.....	15
-protocole proprement dit	15
-résultat.....	19
-discussion et conclusion.....	20
-références bibliographiques	22

Remercîment

Avant tous Je remercie dieu le tout puissant pour le courage et la volonté qu'il m'a accordé pour mener à bien mon travail.

Ensuite, je remercie profondément mon encadreur monsieur AGGAD Hebib de m'avoir donné la chance d'aborder ce thème et de réaliser cette étude, aussi pour les efforts fournis pour me diriger vers la bonne voie et vers le bon esprit scientifique.

Je remercie aussi les techniciens de laboratoire qui m'ont aidé tout au long de mon stage.

Finalement j'exprime ma gratitude à l'ensemble des responsables, des professeurs et des travailleurs de l'institut de science vétérinaire de Tiaret ainsi qu'à toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide de près ou de loin.

Dédicace

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

A ma sœur, et mes frères

A toute ma famille

A tous mes amis sans citer les noms

Je dédie ce travail

Karima

Résumé

Cette étude préliminaire A porté sur la recherche des bactériophages lytiques à partir des différents échantillons d'eaux usées et boues mixtes a permis d'isoler des souches bactériennes notamment (E-coli) prélevées de l'eau d'égout, ces bactéries ont été purifiées par plusieurs repiquage et utilisées par la suite pour criblage de bactériophages.

Selon les tests phénotypiques classiques qui se caractérisent par leur faible pouvoir de discrimination, l'identification doit être accomplie par des tests génotypiques qui sont indisponibles dans les laboratoires de routine. Aussi l'identification des bactériophages lytique nécessite d'autres techniques à hautes performances comme la microscopie électronique et le séquençage génomique par RT-PCR.

Les résultats de cette étude révèlent d'abord la diversité des espèces bactériennes isolées et qui ont été identifiées approximativement, cela exige des techniques particulières comme les galeries API.

Des études ultérieures vont êtres suivies où ces isolats vont être utilisés comme souches de criblage de bactériophages à partir d'autre prélèvements d'eaux usées et boues de différents endroits.

Partie bibliographique

Introduction :

Les bactériophages, communément appelés phages sont des virus qui infectent spécifiquement les bactéries. Ils représentent l'entité vivante la plus importante sur terre; on en compte entre 10³⁰ et 10³². Ubiquitaires dans notre monde (océans, sols, eau potable, nourriture, etc.) et retrouvés partout où vivent leur hôte, les bactéries (eaux usées, selles, sols), ils ont même déjà été isolés de vaccins commerciaux disponibles aux États-Unis. Ce sont des commensaux normaux de l'humain que l'on retrouve fréquemment dans le tractus gastro-intestinal, sur la peau, dans l'urine et la bouche. Ce sont les prédateurs naturels des bactéries. Les bactériophages jouent donc un rôle primordial dans la balance microbienne de tous les écosystèmes (Kutter et al., 2005).

Structure et définition :

1-définition :

Les bactéries peuvent être infectées par des virus qu'on appelle bactériophages ou phages (Leclerc et al., 1995).

Chaque bactérie est l'hôte d'un phage donné, mais elle peut être infectée par différents phages qui lui sont alors tous spécifiques (Bousseboua, 2003).

Les Bactériophages comme tous les virus, ne possèdent pas d'activité métabolique propre et utilisent la machinerie biosynthétique de la cellule qu'ils infectent pour leur propre réplique. Ils sont présents partout où des bactéries sont présentes, c'est-à-dire dans tous les milieux terrestres et aquatiques, ainsi que dans toutes les espèces animales et végétales (Preux, 2013).

2-structure :

Les tailles et les morphologies de particules phagiques sont assez diversifiées. En générale leur taille varie de 20 à 300 nm (Madigan & Martinko, 2007). Ils présentent une architecture analogue aux virus, où ils sont constitués d'unités de structure protéiques, entourant et protégeant un acide nucléique ; l'ensemble constitue la nucléocapside (Haslay & Leclerc, 1993). Pour la

majeure partie des phages connus, le matériel génétique est une molécule d'ADN double-brin (Madigan & Martinko, 2007).

La capside du phage ainsi que sa queue sont de nature protéique. Une fois soumises à un choc osmotique, les têtes des particules phagiques éclatent et libèrent leur contenu d'ADN.

Ces têtes vides sont appelées fantômes (ghosts). Elles sont constituées de plus de 80% de protéines organisées en unités ou monomères, identiques entre elles. La symétrie des phages de ce type est double : cubique pour la tête, hélicoïdale pour la queue, pour cela elle est qualifiée binaire (Haslay & Leclerc, 1993). Les queues des bactériophages T2, T4 et Mu sont contractiles et sont impliquées dans la pénétration de l'acide nucléique dans l'hôte. Alors que la queue du phage lambda est non contractile (Madigan & Martinko, 2007).

La structure typique des phages a été caractérisée suite à leur observation au microscope électronique, ils peuvent avoir les formes : polyédrique, hélicoïdale ou complexe .Mais il existe aussi des phages filamenteux (Bousseboua, 2003).

Les génomes de phages ont une organisation en mosaïque avec des blocs courts de gènes partagés en différentes combinaisons. La nature en mosaïque de ces génomes suggère que des transferts latéraux de gènes et des recombinaisons non homologues ont contribué à l'évolution des phages (Prescott et al., 2010).

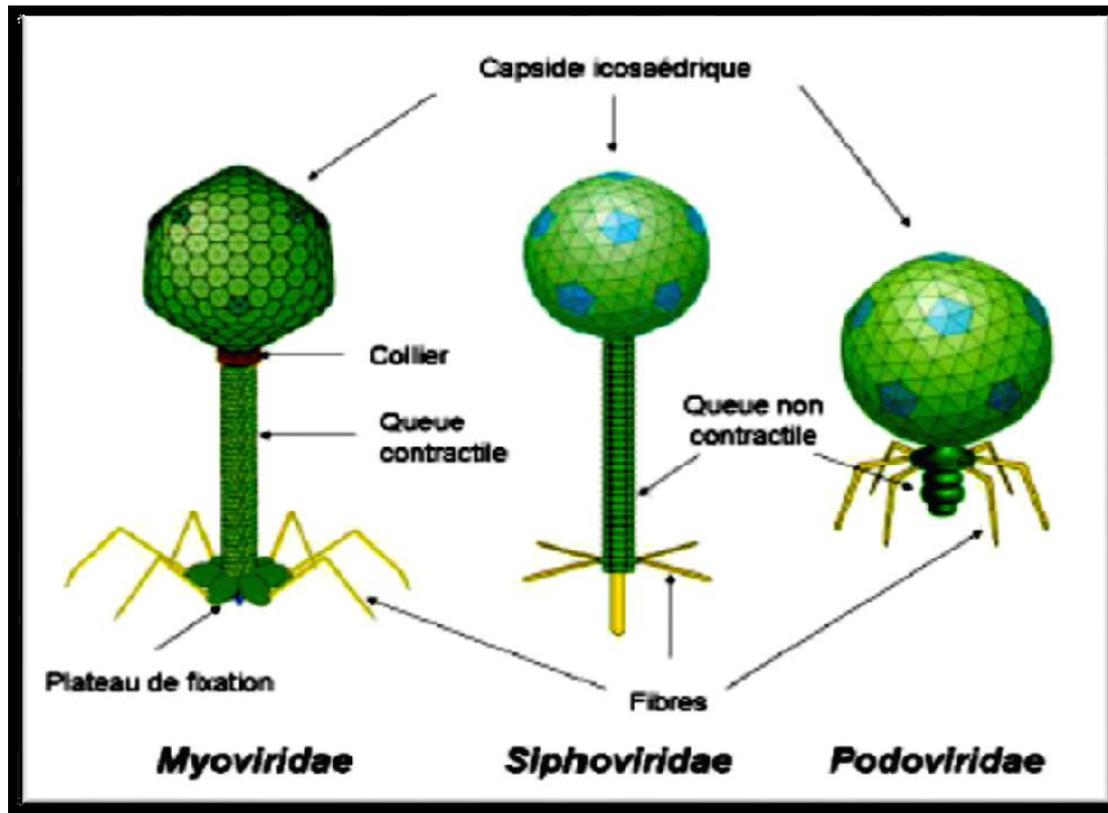


Figure 01 : morphologie schématique des trois familles des Caudovirales
(d'après <http://viralzone.expasy.org>)

Historique :

La découverte des bactériophages ne s'est pas faite en une seule étape. En effet, même si la paternité de la phagothérapie est accordée aujourd'hui à Félix d'Hérelle comme nous le verrons juste après, deux autres chercheurs ont joué un rôle non négligeable dans la découverte des phages. Le premier, Ernest Hanbury Hankin (Figure 1), remarqua lors de l'une de ses études sur la bactérie *Vibrio cholerae* en Inde, qu'il existait quelque chose dans les eaux de la Jumna (fleuve indien) capable de contrer la pathogénicité de cette bactérie (Hankin, 1896).

Le second, Frederick Twort (Figure 2), remarqua à son tour ce phénomène bactériolytique une vingtaine d'années plus tard, en 1915, lors d'expériences sur la croissance bactérienne. Ce dernier émit plusieurs hypothèses quant à la nature du responsable de cette action antibactérienne, dont l'une d'elle était qu'il s'agirait d'un virus (Twort, 1936).

À cette époque, la notion de virus n'était pas clairement définie. En effet, le microscope électronique n'ayant pas encore été inventé, seule une observation indirecte de ces derniers était possible. On les appelait alors «agents ultrafiltrables» car à la différence des bactéries, ils étaient capables de traverser un filtre de Chamberland. Ce terme d' «agent ultrafiltrable» fut employé pour la première fois en 1898, avec la mosaïque du tabac. Autant dire que l'histoire des virus ne faisait que commencer à l'époque de la découverte des bactériophages (Decoster, 2008b).

classification :

Elle est basée sur la structure de la particule virale (c'est-à dire la «nucléocapside») et sur la structure du génome. Il y a 4 types particulièrement étudiés. La plupart infectent *E. coli*.

• P hage de la série T:

Ces phages sont à l'origine de beaucoup de manipulations de Biologie moléculaire, les T2 en particulier. (début du 20ème siècle:) A partir de l'étude du T2, HERSHEY et CHASE ont pu mettre en évidence que l'ADN était le support de l'information génétique. D'autre part, VOKIN et ASTRACHAN ont mis en évidence le rôle de l'ARNm et sa fonction biologique.

Les T7 sont utilisés pour des vecteurs de clonage comme promoteur fort. Les T pairs comme les T2,4,6 appartiennent à la famille des Myoviridae. A la place de la Cytosine il y a de l'HydroxyMéthylCytosine dans leur génome. L'intérêt est que cela leur permet de résister aux enzymes de restriction lors de l'infection.

Les T impairs appartiennent à la famille des Podoviridae.

Tous les phages de la série T possèdent un ADN linéaire bicaténaire et possèdent une structure avec « tête et queue ».

• P hage Tempéré:

Ils présentent deux cycles de multiplication, contrairement aux phages T.

- un cycle lytique, comme les phages T,
- un cycle lysogène: le phage s'intègre dans le génome bactérien au lieu de rester virion.

Le plus étudié est le phage notamment pour le clonage.

Autres: phage P1, P22, P5 et phage Mu.

• **Petit phage à ADN:**

Ce sont des phages de petite taille avec deux sortes de nucléocapside.

- nucléocapside icosaédrique (comme X174, S13). L'étude de ces phages a été à l'origine de la découverte des gènes superposés.
- nucléocapside filamenteuse (comme phage fd, phage M13). Ces phages sont très utilisés car ADN simple brin (donc facilement séquençable).

• **Phage à ARN:**

Ils appartiennent à la famille des Leviridae comme le phage.

Ils servent de modèles pour la traduction de l'ARN.

Les phages présentent différents types de génomes: ADN double-brins, ADN simple-brin, ARN; et différents types de structures de nucléocapside: filamenteuse, icosaédrique ou comme les T2.

Cycle de vie de phages :

Les bactériophages produisent tous un cycle lytique, certains de manière obligatoire (bactériophages virulents), d'autres en y intégrant un cycle lysogénique (bactériophage tempérés). Adapté d'après Campbell, 2003.

a) Cycle lytique

Il conduit à la mort obligatoire de la bactérie par sa lyse et à la libération dans le milieu de particules virales. Il présente plusieurs étapes qui sont détaillées ci-dessous en s'appuyant sur l'exemple d'un bactériophage virulent modèle, le bactériophage T4 d'*Escherichia coli* (Calendar, 2006; Guttman et al., 2004; Kropinski, 2006; Leiman et al., 2003):

- Le contact : le bactériophage est présent dans le milieu extérieur et le contact avec l'hôte a lieu par hasard avec la diffusion du bactériophage.
- L'absorption : c'est une phase qui dure quelques minutes. Généralement, des adhésines présentes sur les fibres ou les spicules de la queue du bactériophage interagissent de manière spécifique avec des sites récepteurs de la bactérie.
- La pénétration : cette phase correspond au transfert de l'ADN dans la cellule hôte, la partie protéique du virion reste à l'extérieur. Elle peut être très rapide.
- Le détournement de la machinerie bactérienne : dès le début de la pénétration de l'ADN dans la cellule hôte, et avant même la fin du transfert de l'ADN, il y a transcription des gènes très précoces.
- Assemblage : avec l'expression des gènes tardifs.
- La libération des virions : deux types de protéines sont nécessaires à la libération des particules virales néoformées dans le milieu environnant : les holines et les endolysines.

b) Cycle lysogénique

Ce cycle débute de la même manière que le cycle lytique. Ensuite, le passage à la lysogénie plutôt qu'à un cycle lytique va dépendre d'interactions complexes entre les facteurs bactériens et viraux. Par exemple, pour le bactériophage d'*Escherichia coli*, bactériophage tempéré modèle, une fois l'ADN injecté, le génome est circularisé et les gènes précoces transcrits (dont les gènes *cII* et *cIII*). La présence du facteur de transcription viral *CII* en quantité suffisante est cruciale pour le choix lysogénique. Cependant, ce facteur est déstabilisé par des facteurs bactériens *Hfl* (*KC*, *B* et *D*) et est stabilisé entre autre par l'inhibiteur de protéase viral *CIII* (Banuett et al., 1986; Cheng et al., 1988; Hoyt et al., 1982; Parua et al., 2010). Par ailleurs, la concentration de la protéase *HflB* est elle-même influencée par la concentration intracellulaire en *AMPc* (Slomińska et al., 1999). Si les conditions sont réunies pour permettre un cycle lysogénique (i.e. concentration suffisante de la protéine *CII*), il y aura

synthèse de protéines virales réprimant l'expression de gènes intervenant dans le développement du cycle lytique, comme la protéine CI. Des protéines permettant l'intégration de l'ADN dans le chromosome bactérien (intégrase, transposase), par recombinaison au niveau de sites spécifiques ou de manière aléatoire, seront également synthétisées. Cependant, l'intégration n'est pas impérative pour le développement d'un cycle lysogénique et certains bactériophages se maintiennent sous forme de plasmide. Le bactériophage coexiste ainsi avec l'hôte sous une forme plus ou moins stable appelée prophage. Son ADN est répliqué en même temps que celui de la bactérie et peut rester intégré pendant des centaines ou des milliers de générations bactériennes. La bactérie est alors appelée bactérie lysogène. Dans certains cas, le prophage transmet ainsi à la bactérie des gènes de virulence lui conférant un avantage. Différents stress (changement de température, passage de la croissance bactérienne en phase stationnaire, UV) peuvent provoquer l'excision de l'ADN du prophage, interrompant la lysogénie et conduisant au démarrage d'un cycle lytique.

Importance des phages :

La thérapie phagique :

Les infections traitées causées par des coté environnemental, une étude réalisée par la compagnie intralytix, aux états unis démontre que l'application d'un mélange de phages pendant 5 min sur une surface ou des aliments contaminés avec E-Coli O157 :H7 entraîne une réduction bactérienne moyenne de 97% (Abuladze et al., 2008). Dans une étude réalisée au Royaume-Uni, les bactériophages ont été utilisés avec succès afin de réduire la colonisation par *Campylobacter jejuni* chez le poulet.

Les résultats démontrent que différentes doses de phages administrées oralement dans une suspension antiacide, entraînent une chute des comptes

bactériens de 0.5 à 5 log₁₀ ufc /g comparativement aux contrôles non traités (Carrillo, al 2005).

Les bactériophages pour une décontamination sélective :

Les bactériophages utilisés comme (désinfectants) spécifiques naturels, par leur action ciblée, pourraient réduire significativement la transmission des infections nosocomiales tout en limitant l'impact sur les surfaces de travail, les instruments, ainsi que sur les patients et le personnel hospitalier. L'utilisation de produits naturels tels que les bactériophages serait une alternative intéressante pour la prévention et le contrôle des infections nosocomiales. En plus de permettre le développement d'un volet préventif, ces produits écologiques à base de phages gagneraient à être développés comme agents thérapeutiques en alternative et /ou en supplément aux antibiotiques, couvrant ainsi les différents stades de développement d'une infection bactérienne spécifique (Martinau, 2009)

- L'utilisation des bactériophages est considérée devant le double constat du développement inquiétant des infections nosocomiales à bactérie multi-résistantes et l'absence de nouveaux antibiotiques efficaces.

- leur capacité de croissance exponentielle rapide directement au site d'infection en suivant la croissance de leur hôte bactérien jusqu'à sa disparition.

Les bactériophages sont considérés comme étant plus nombreux dans la biosphère que n'importe quel autre groupe d'organismes, procaryotes inclus. Ils sont présents dans tous les types d'écosystèmes. (Wommack et Colwell, 2000).

Phages et antibioresistance :

- Une étude publiée en janvier 2002 a montré qu'une injection de bactériophages peut sauver 100% des souris infectées par des *Enterococcus faecium* résistants à la vancomycine (Biswas et al. 2002).

- Les phages sont déjà présents et actifs dans la nature, ils possèdent la capacité d'évoluer en s'adaptant aux bactéries qu'ils infectent, c'est-à-dire qu'en présence de bactéries résistantes au phage, il est toujours possible d'isoler un

autre phage mutant qui sera efficace ou encore d'adapter le phage disponible à la souche résistante (culture prolongée du phage avec la bactérie) (Barrow et Soothill, 1997). Les mutations qui causent la résistance bactérienne aux antibiotiques sont différentes de celles qui causent la résistance phagique car chaque traitement agit à différents niveaux de la bactérie (Pirisi,2000). Les phages peuvent toujours évoluer naturellement en s'adaptant aux mécanismes de résistance des bactéries. Il est important de mentionner que le taux de développement de résistance aux phages est dix fois plus faible que celui aux antibiotiques (Sulakvelidze et al., 2001). De plus, l'utilisation d'un cocktail de phages avec différents récepteurs/spécificité permet de limiter encore plus l'apparition de résistance.

-des études récentes ont démontré bien le potentiel de la thérapie phagique pour sauver des animaux infectés (et par extension les êtres humains) avec des souches de bactéries résistantes aux antibiotiques.

	Mécanisme de résistance de la bactérie	Mécanisme de contournement du bactériophage
Absorption	<ul style="list-style-type: none">- production d'inhibiteurs compétitifs s'attachant aux adhésines du bactériophage- modification de la structure des récepteurs de surface- production de protéines masquant les récepteurs bactériens- synthèse d'une matrice d'extracellulaire	<ul style="list-style-type: none">- diversification des adhésines présentes sur les fibres du bactériophage- production de lyase ou hydrolase dégradant les Exopolysaccharides
Pénétration	<ul style="list-style-type: none">- dégradation de l'ADN viral (enzymatique, CRISPR-Cas)	<ul style="list-style-type: none">- absence des sites de reconnaissance des endonucléases- production d'enzymes permettant la méthylation de

		l'ADN viral ainsi non reconnu - mutation des motifs conservés reconnus par les systèmes CRISPR-Cas
Réplication	- clivage des ARNt ou facteurs d'élongation protéique	- système de réparation
Assemblage / Libération	- infection « abortive » - lyse prématurée	- production d'inhibiteur d'enzymes bactériennes

Table : Résistances bactériennes en fonction des étapes du cycle réplcatif viral et adaptation en retour des bactériophages.

l'importance des phages en aquaculture :

Les virus sont une composante omniprésente des réseaux trophiques microbiens dans les deux systèmes d'eau douce et marine. L'abondance des virus dans les systèmes aquatiques semble être indépendante de la salinité, mais liés à la biomasse et aux effets saisonniers.

Au début des années 1990, l'estimation réelle, rapide et directe des virus aquatique a été réalisée en utilisant des technologies nouvelles ; la Microscopie à Épifluorescence et la Symétrie en Flux.

Les résultats ont montrés une abondance virale de 10^4 à 10^8 particules/ml (Wilhelm et Matters, 2008).

De nombreuses revues de Borsheim, 1993 et Proctor, 1997 ont révélé une dominance de phages Caudovirales de l'ensemble des virus isolés de systèmes aquatiques. Ce principal agent de mortalité bactérienne jouait un rôle actif, voir prépondérant dans l'épuration des eaux et surtout dans la diminution puis la disparition des bactéries.

Plusieurs études ont montré que les bactériophages peuvent affecter la composition de la communauté bactérienne selon le modèle du «phage qui tue le meilleur» «killing the winner » (Thingstad et Lignell, 1997), en contrôlant les effectifs des groupes les plus abondants. Les groupes minoritaires, les moins compétitifs, pouvant en effet à leur tour profiter des ressources ambiantes pour

croître. Mais par contre, Bouvier et Del Giorgio (2007), ont suggéré que la faible abondance de certains groupes bactériens minoritaires puisse être en fait liée à l'action de la lyse virale.

L'importance quantitative de la lyse virale dans le transfert du carbone a été estimée pour la première fois à partir du modèle de prédiction de Fuhrman qui a montré que l'activité lytique induisait une augmentation de 27% de la production bactérienne, une baisse de 37 % de l'export du carbone bactérien vers le nanozooplancton et de 7 % vers le macrozooplancton.

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

L'importance des phages dans le processus de fermentation :

Leur importance économique peut être appréciée au sein des industries de produits laitiers. Effectivement, ces dernières ont à faire face à des contaminations de bactériophages lytiques de *Lactobacillus* qui entraînent des arrêts de fermentations (Brüssow, 2001).

L'accroissement considérable de la production de fromage au début du 19ème siècle a engendré l'apparition de nombreuses difficultés dans les usines fromagères.

La contamination par les phages demeure cependant le problème majeur pour cette industrie.

Il a été démontré qu'un virus bactérien était le principal responsable de l'absence d'activité métabolique d'un ferment durant la production fromagère.

Cet échec de la fermentation lactique a été observé pour la première fois en 1935 en Nouvelle-Zélande par Whitehead et Cox (Waes et Bossuyt, 1984).

En résumé, le processus de la fermentation du lait à lieu dans des conditions non stériles et cet environnement est propice à la contamination phagique.

Défficultés et obstacles à l'utilisation des phage :

-L'isolement des phages comme agents thérapeutiques doit se limiter aux phages lytiques car en plus de leur potentialité à transmettre des gènes (de virulence) d'une bactérie à l'autre, la période de latence des phages tempérés ne permet pas une thérapie rapide et contrôlée, et ils ne détruisent pas 100% de la bactérie infectée (Kropinski, 2006). Le séquençage du génome des phages potentiellement utilisables en thérapie est donc essentiel pour s'assurer que le génome ne renferme pas de gène de virulence ou de résistance (Duckworth et Gulig, 2002).

-Le transfert horizontal d'ADN entre souches bactériennes peut être effectué par des bactériophages et constitue un problème potentiel pour leur usage thérapeutique. Ainsi, des gènes de virulence ou de résistance à différents antibiotiques peuvent être disséminés par transduction par des phages (Resch et Meyer, 2002). Cette capacité de transduction peut être testée en laboratoire pour éviter ce problème avant toute thérapie (Duckworth et Gulig, 2002). Cette fonction est liée aux phages tempérés d'où la sélection de phages lytiques pour la thérapie phagique ou désinfection.

-Le spectre d'hôte très étroit des bactériophages leur confère un avantage de taille face aux antibiotiques mais peut aussi être considéré comme un inconvénient. Cette haute spécificité entraîne la nécessité d'avoir une large banque de phages disponibles bien caractérisés.

-Mauvaise réputation : L'image actuelle qu'ont les pays occidentaux et notamment les États-Unis des produits venant de l'ex-URSS est assez mauvaise. Ceci est dû majoritairement à des reliquats politiques de la Guerre Froide. Ainsi, la phagothérapie souffre encore aujourd'hui de ces idéologies du passé (Pearson, 2002).

-Une réglementation inadaptée.

-Essais cliniques difficilement réalisables.

-Solution alternative.

-Manque d'intérêt des laboratoires pharmaceutiques.

-Un soupçon d'espoir.

Partie Experimental

Matériels et méthodes :

1. L'échantillonnage

Un échantillon d'eau d'égout a été collecté.

2. la filtration :

Le procédé était le même pour l'ensemble des échantillons, où le contenu des flacons a été directement et équitablement distribué dans des tubes à bouchon en plastique convenables à la centrifugeuse (modèle EBA 12 de Hettich, Germany) utilisée. L'échantillon a été centrifugé pendant 10 minutes à 4500 rpm et un volume de 100 ml du surnageant a été filtré en utilisant des membranes filtrantes stériles de 0,45 µm (filtre stérile, Wattman, Germany).

Le filtrat par la suite (la suspension phagique) a été conservé à 4°C dans des flacons stériles de 100 ml après l'ajout de quelques gouttes de chloroforme.

3. protocole proprement dit :

Afin de faire tenir l'expérience en classe sur 2 séances, les manipulations du jour 1 peuvent être effectuées par l'assistant.

1. prélèvement d'échantillons:

Il est important de récupérer l'eau le jour même ou la veille de l'expérience. Au delà, les résultats ne sont pas garantis.

2. Elimination des bactéries de l'échantillon:

Les bactéries ne passent pas à travers les filtres d'une porosité de 0.45 µm. En revanche les bactériophages, plus petits passent à travers.

. filtrer environ 20ml de l'échantillon d'eau dans un nouveau tube 50ml (noté F). Attention à travailler stérilement.

Pour cela il est important de retirer le piston avant de mettre le filtre pour ne pas le déchirer. Puis le filtre est ajouté à l'extrémité de la seringue. L'eau est ensuite versée dans la seringue et le piston inséré délicatement. Appuyer

Partie Experimental : Isolement des bactériophages à partir des eaux usées

délicatement pour filtrer l'eau. Une pression trop forte risque de décrocher le filtre.



Des filtres d'une porosité de 0.45mm.



-agitateur magnétique.



-eau usée.



-milieu de culture(boite de pétri).



-incubateur.



-l'encencement de milieu de culture.

3. Enrichissement en bactériophages en milieu de culture LB(bouillon lysogène) :

* Protocole pour la préparation d'1L de milieu de culture (pour environ 40 boites de petri).

Materiel :

<u>Physique</u>	<u>Chimique</u>
<ul style="list-style-type: none">- Eau déminéralisé- Boite de petri- Balance- Bouteille en pyrex- Casserole à pression (ou autoclave)- Bec bunsen- Bain marie à 60°C- Thermomètre	<ul style="list-style-type: none">- Peptone de caséine :1g- Extrait de levure :5g- NaCl (sel de cuisine) :5g- Agar :20g- Eau déminéralisé

Mode opératoire:

- 1) Peser le tryptone, l'extrait de levure, le NaCl et l'Agar et les introduire dans une bouteille d'1L en pyrex.
- 2) Ajouter de l'eau déminéralisée (l'eau du robinet convient également) jusqu'à 100ml et fermer à l'aide d'un bouchon.

- 3) Homogénéiser en secouant la bouteille (pas de grumeaux).
- 4) Mettre à chauffer dans une casserole à pression (ou une autoclave) contenant de l'eau; Compter 15 minutes à partir du moment où la (pipette de la casserole chante), puis attendre que la pression redescende naturellement.
- 5) Après avoir récupéré la bouteille, la maintenir au bain marie à 60°C (pas en dessous), mélanger de temps en temps, puis couler les boîtes (environ 25 à 30 ml par boîte = 0,5 cm de hauteur) près d'un bec bunsen (allumé) pour éviter les contaminations.
- 6) Laisser refroidir les boîtes (couvercle fermé) environ une heure avant de les utiliser.
- 7) Les conserver (tête en bas) dans un frigo avant utilisation.

* Prélever 9ml du filtrat (tubef) et les transférer dans un nouveau tube 50ml (noté E). Garder les ml de filtrat (tube F) restants à 4°C. Ils seront utilisés plus tard.

Les 9ml ne contiennent plus de bactéries mais peuvent contenir des bactériophages contre E. coli.

* Ajouter 1 ml de milieu de culture concentré (LB 10x) aux 9ml d'eau filtrée.

A l'aide d'une anse stérile prélever un peu d'E.coli et la resuspendre dans les 10ml de solution.

* Fermer le tube.

* Incuber le tube à 37°C 24h.

E.coli va se multiplier grâce au milieu de culture. Si un ou plusieurs phages capables d'infecter E.coli sont présents dans les 9ml de l'échantillon d'eau, ils vont l'infecter et s'y multiplier (enrichissement).

Après 24h un nombre suffisant de bactériophages pourra être mis en évidence.

Après cette période d'incubation, le tube peut être gardé 1 semaine à 4°C

4) Mise en évidence des bactériophages:

Filtrer le milieu d'enrichissement délicatement comme décrit au point 2) en récupérant le filtrat dans un tube de 15ml (noté).

Cette étape permet d'éliminer E.coli qui n'a pas été lysée par les éventuels bactériophages, le filtrat (tube F) peut être gardé à 4°C. Les bactériophages sont relativement stable et la préparation peut être conservée au moins une années dans ces conditions

Faire une suspension d'E.coli (lamême souche qu'utilisée pour l'enrichissement des phages (point 3 du protocole) comme effectué au point 2 mais en resuspendant cette fois-ci E.coli dans 5ml d'eau physiologique stérile.

Imbiber un écouvillon stérile avec la suspension. Essorer légèrement contre la paroi du tube et froter l'écouvillon sur une boite de petri. Il est important d'effectuer des stries serrées afin de déposer des bactéries sur toute la boite en grande quantité. Répéter l'opération en tournant la boite d'un tiers pour strier dans une autre direction. Répéter une troisième fois l'opération en tournant encore la boite d'un tiers.

Cette manipulation est identique à l'étalement effectué pour l'expérience No 15 : les antibiotiques . Il s'agit ici d'obtenir un (gazon) bactérien.

- Laisser sécher la boite quelque minutes.
- Noter au dos de la boite les numéros ou noms des échantillons qui vont être déposé.
- Déposer 5 ul de l'enrichissement filtré (tube EF).
- Déposer 5 ul l'eau filtrée non enrichie (tubeF).
- Déposer 5 ul d'une suspension de bactériophage T4 spécifique contre E.coli (contrôle positif).
- Déposer 5 ul l'eau physiologique stérile (contrôle négatif).
- Il est également possible de déposer 5 ul d'enrichissement (EF) d'autres échantillons.

Partie Experimental : Isolement des bactériophages à partir des eaux usées

- Laisse sécher la boîte quelques minutes sans la secouer. Quand la goutte de complètement disparue, incuber la boîte à l'envers à 37°C de 12 à 24h.
- La boîte peut être conservée ensuite à 4°C.

1. Résultat :

- Observation des phages de lyse :

Des trous dans le tapis bactérien opaque (plage de lyse) ont été bien visible sous microscope ; sous forme de plages plus claires.



-filtrat,eau physiologique;
Filtrat enrichi.



-l'encencement.



-resultat final et formation
des phages.

2.Discussion et conclusion :

A travers cette étude de recherche sur les bactériophages provenant des eaux usées qui restent la source principale de contamination du milieu hydrique, les résultats révèlent la présence de phages dans les échantillons testés.

Les résultats négatifs peuvent être dus à plusieurs facteurs :

- Les souches testées ne sont pas sensibles aux bactériophages, il faudrait donc isoler d'autres souches et refaire le test plusieurs fois.
- La quantité de bactériophages dans l'eau, varie suivant la souche employée pour son identification. C'est pourquoi il est indispensable d'appliquer dans toute la recherche des souches standards sensibles pour dépister en eaux usées la présence de bactériophages. La souche Escherichia coli ATCC11303 et le phage T2 sont envisagés d'être utilisés comme souches de références pour développer cette recherche.

La quantité de virus présents dépend des facteurs géographique, climatique, le type d'échantillon et aussi selon la technique de prélèvement. Le prélèvement est primordial puisqu'il est l'étape amont qui conditionne toute la chaîne de mesure et donc la représentativité des résultats obtenus in fine. Les prélèvements doivent être effectués à partir de points différents et doivent être espacés dans le temps et tout au long des saisons. Une concentration préalable de la suspension phagique est nécessaire afin d'obtenir une quantité détectable de bactériophages par la méthode de plaque de lyse.

Références
bibliographiques

1. Abrescia. N.G, Cockburn. J.J, Grimes. J.M, Sutton. G.C, Diprose. J.M, Butcher. S.J, Fuller .S.D, San Martín. C, Burnett. R.M, Stuart. D.I, Bamford. D.H, Bamford. J.K. (2004). Insights into assembly from structural analysis of bacteriophage PRD1. *Nature*; 432(7013); p 68-74.
2. Abrescia. N.G, Nicola. G, Jonathan M. Grimes, Hanna M. Kivelä, Assenberg. R, Geoff C. Sutton, Sarah J. Butcher, Jaana K.H. Bamford, . Bamford. D.H, Stuart. D.I. (2008). Insights into Virus Evolution and Membrane Biogenesis from the Structure of the Marine Lipid-Containing Bacteriophage PM2.
3. Ackermann. H. (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*. (154);p 245-251.
4. Ackermann. H.W. (2007). "Phage classification and characterization." *Methods in Molecular Biology* .501;p 127-140.
5. Agirrezabala. X, Velázquez-Muriel. J.A, Gómez-Puertas. P, Scheres. S.H, Carazo. J.M, Carrascosa. J.L. (2007). Quasi-atomic model of bacteriophage t7 procapsid shell: insights into the structure and evolution of a basic fold. *Structure*;15(4);p 461-472.
6. Belin. D et Forterre, P. (2011). Les microbes menace ou espoir, 4èmes journées de Microbiologie de l'Université de Genève;p 26.
7. Berdjeb. L, jacquet. S. (2009). La viriosphère: quelle place dans le fonctionnement et l'évolution des écosystèmes aquatiques (partie 2) ; *Virologie*. Volume 13, Numéro 4;P 99-189.
8. Biswas. B, Adhya. S, Washart. P, Paul. B, Trostel. A.N, Powell. B, Carlton. R, Merril. C.R. (2002). Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*; *Infection and Immunity*. (70);P 204–210.
9. Bousseboua, H. (2003). Cours de microbiologie générale: Université Mentouri, Constantine (Algérie) ;p 28.

10. Brüssow. H. (2001): Phages of dairy bacteria. Annual Review of Microbiology, (55);P 283–303
11. Yoichi. M, Abe. M, Miyanaga. K, Unno. H, Tanji. Y. (2005). Alteration of tail fiber protein gp38 enables T2 phage to infect Escherichia coli O157:H7 Journal of Biotechnology; 115(1);p 101-107.
12. Zillig. W, Gropp. F. (1986). Archaeobacterial Virus Host Systems. Systematic and Applied Microbiology. 7(1); p 58-66.
13. Zillig. W, Hans. P.A, Ingelore. H, Prangishvili. D, Schweier. A, Kenneth. S, She. Q, Hien. P, Garrett. R, Jakob. K. K. (1998). Genetic elements in the extremely thermophilic Archaeon sulfolobus. Extremophiles. 2(3); p 131-140.
14. Rivasi. M. (2013). La phagothérapie une solution complémentaire aux antibiotiques. Députée européenne Europe Écologie Les Verts du grand Sud-Est;P 8.
15. Roshah. G, Karin. V, Kerstin. F, Lars. L. (1993).The refined structure of bacteriophage MS2 at 2.8 Å resolution. Journal of Molecular Biology; 234(3);p 620-639.
16. Scott. A.E, Timms. A.R, Connerton. P.L, Carrillo. C.L, Radzum. K.A, Connerton. I.F. (2007). Genome dynamics of Campylobacter jejuni in response to bacteriophage predation. Plos pathogens. (3);P 119.
17. Sekhsokh. Y, Arsalane. L, El Ouenass. M, Doublali. T, Bajjou. T, Lahlou. I. A, Bactériémie à Serratia rubidaea, Médecine et maladies infectieuses; p 3.
18. Sozzi. T, Gnaegi. F, D'aminco. N, Hose. H. (1982). Difficultés de fermentation malolactique du vin dues à des bactériophages de Leuconostoc oenos. Revue Suisse de viticulture arboriculture et horticulture. Vol. 14(1);p 17-23.
19. Thiel. K. (2004). Nature Biotechnologie, c'est-à-dire à l'encontre de bactéries ciblées, multi-résistantes ou émergentes, Vol. 22;p 31- 36.

20. Thingstad, T. and Lignell, R. (1997). Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand, aquatic microbial ecology, (13);P 19–27.
21. Trojet. S. (2011). Étude de la reconnaissance Phage-Bactérie: Analyse fonctionnelle de l'adhésine gp38 des phages de la superfamille de Type T4. Microbiologie et Génétique Moléculaire. Université Toulouse III, 178;p 11-12-35.