

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة سعيدة الدكتور مولاي الطاهر
Université de Saida Dr MOULAY Tahar



N° d'Ordre

كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la nature et de la Vie
قسم البيولوجيا
Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème

Étude de la Synergie entre Bactériophages et Substances Antimicrobiennes contre les Principales Souches Pathogènes Bactériennes

Présenté par :

- Mr : BOUADJADJ Naima
- Mr : MESLEM Imen

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président	Mr. BELLIL Yahia	MCA Université UMTS
Examineur	Mme. CHAHROUR Wassila	MCA Université UMTS
Rapporteur	Mr. BENABBOU Taha Ahmed	MCA Université UMTS

Année universitaire 2023/2024

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة الدكتور مولاي الطاهر
Université de Saida Dr MOULAY Tahar



N° d'Ordre

كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
قسم البيولوجيا
Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème

Étude de la Synergie entre Bactériophages et Substances Antimicrobiennes contre les Principales Souches Pathogènes Bactériennes

Présenté par :

- Mr : BOUADJADJ Naima
- Mr : MESLEM Imen

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président

Mr. BELLIL Yahia

MCA Université UMTS

Examineur

Mme. CHAHROUR Wassila

MCA Université UMTS

Rapporteur

Mr. BENABBOU Taha Ahmed

MCA Université UMTS

Année universitaire 2023/2024

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail particulièrement à mes chers parents, qui ont consacré leur existence à bâtir la mienne, pour leur soutien, patience et soucis de tendresse et d'affection pour tout ce qu'ils ont fait pour que je puisse arriver à ce stade.

A mon père « Mokhtar », qui est toujours disponible pour moi et prêt à m'aider, je lui confirme mon attachement et mon profond respect.

A ma merveilleuse mère « Khaira » qui m'a encouragé durant toutes mes études, et qui sans elle, ma réussite n'aurait pas eu lieu, que je fasse ou que je dise, je me saurai plus te remercier comme il se doit.

A mon pilier ferme et à la sécurité de mes jours, à ceux qui m'ont soutenu, ils étaient pour moi des sources dont je m'abreuvais : mes frères .

Naima

Je dédie ce modeste travail particulièrement à mes chers parents, qui ont consacré leur existence à bâtir la mienne, pour leur soutien, patience et soucis de tendresse et d'affection pour tout ce qu'ils ont fait pour que je puisse arriver à ce stade.

A mon père « Mokhtar », qui est toujours disponible pour moi et prêt à m'aider, je lui confirme mon attachement et mon profond respect.

A ma merveilleuse mère « Mira » qui m'a encouragé durant toutes mes études, et qui sans elle, ma réussite n'aurait pas eu lieu, que je fasse ou que je dise, je me saurai plus te remercier comme il se doit.

A ma grande sœur « Halima » spécialement et mes sœur avec mon frère ça ne suffit pas de dire simplement ma sœur avec votre tendresse votre amour. Vous m'avez soutenu pendant mes moments de faiblesse, de peur et de stress je te souhaite tout le bonheur du monde que Dieu vous bénisse.

Je dédie ma remise des diplômes, ma joie et le fruit de mon succès que j'ai souhaité.....

Me voici aujourd'hui j'ai accompli ses premières fruits grâce à Dieu tout – puissant, alors louange à Dieu pour ce qu'il m'a donné , et le chemin s'est refermé avec tout ce qu'il contenait de lourd .

Imen

Remerciements

En tout premier lieu, nous tenons à remercier « Allah », le tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté, la patience, la santé et la force pour accomplir et dépasser toutes les difficultés de ce travail.

Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous voudrions exprimer chaleureusement nos remerciements notre directeur Mr «. BENABBOU Taha Ahmed », pour le choix du thème, pour sa patience, sa disponibilité, son soutien et surtout ses précieux conseils qui ont dirigé vers la bonne voie et n'oublions jamais ces critiques pour nous orienter vers un esprit scientifique.

Nos gratitude vont également au Docteur Mr « BELLIL Yahia », pour avoir accepté de présider ce jury Nos gratitude vont également au Mme « CHAHROUR Wassila », pour avoir accepté de faire partie de ce jury et d'examiner ce modeste travail.

Nous remercions tout l'équipe pédagogique du département de biologie qui ont contribué à notre formation durant les cinq années de graduation. Enfin, nous n'oublions jamais l'aide, les conseils, surtout les encouragements et le soutien moral de nos familles et de nos précieux amis Merci, à ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur.

Liste des abréviations

GN – Gélose Nutritive

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

TE - Tétracycline

C - Chloramphénicol

CN - Ceftazidime

CAZ - Cefazolin

AUG - Amoxicilline/Acide clavulanique

IMP - Imipénème

SXT - Sulfaméthoxazole/Triméthoprim

R - Résistant

I - Intermédiaire

S - Sensible

PBP - Penicillin-binding protein

Ax - Amoxicilline

BP - Bactériophage

Liste des tableaux

Tableau 1: Spectre d'activité de quelques antibiotiques selon la nature de la aroi bactérienne.....	7
Tableau 2 : Comparaison entre antibiotiques et bactériophages	29
Tableau 3: Les antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme	38
Tableau 4 : Profil de résistance et de sensibilité des souches indicatrices	47
Tableau 5 : Résultats de la lyse spécifique des bactériophages issus de différents échantillons contre les différentes souches testées	49
Tableau 6: Résultats des tests de synergie	54

Liste des figures

Figure 1: Chronologie de la découverte des principales classes d'antibiotiques	6
Figure 2: Mode d'action des antibiotiques	8
Figure 3: Mécanismes de résistances aux antibiotiques.....	14
Figure 4: Frise chronologique retraçant les grandes phases de la découverte des phages et de leur utilisation en biologie moléculaire et en tant qu'agents antibactériens	18
Figure 5: Structure d'un bactériophage	19
Figure 6: Diversité des bactériophages (familles des bactériophages).....	21
Figure 7: Schéma du cycle lytique	23
Figure 8: Schéma du cycle lysogénique	25
Figure 9: Déclenchement du cycle lytique à partir d'un prophage actif.....	25
Figure 10: Phénomène de « Synergie Phages-Antibiotique » : à gauche présence des antibiotiques seulement, à droite présence de couple phages-antibiotiques	28
Figure 11: Illustration schématique du système hybride bio/abiotique à base de phages (M13@Ag) pour réguler les microbes intestinaux pour une thérapie immunitaire spécifique au cancer	31
Figure 12: Principaux types de vaccins phagiques.....	32
Figure 13: Repiquage des souches indicatrices.....	35
Figure 14: Schéma de conservation courte durée des bactéries purifiées	37
Figure 15: Etapes d'isolement des bactériophages	40
Figure 16: Aspect des colonies sur GN :(a) <i>E. coli</i> (b) <i>Bacillus subtilis</i>	46
Figure 17 : Aspect microscopique de <i>Listeria</i> au grossissement X 1000	46
Figure 18 : Résultat de l'antibiogramme de <i>Listeria</i> (a) et <i>Staphylococcus</i> (b)	47
Figure 19: Résultats de la lyse des bactériophages spécifiques à <i>Listeria</i>	50

Figure 20: Résultats des tests de synergie entre les bactériophages spécifiques à *Klebsiella*, l'amoxicilline et les extraits d'*Urtica urens*..... 53

Résumé

Ce mémoire explore le potentiel des bactériophages en combinaison avec des substances antimicrobiennes pour lutter contre les infections bactériennes, notamment celles causées par des souches résistantes aux antibiotiques. L'objectif principal est d'évaluer l'efficacité de la synergie entre les bactériophages et des antibiotiques couramment utilisés, ainsi que des extraits de plantes, pour améliorer l'activité antimicrobienne.

Face à la résistance croissante des bactéries aux antibiotiques, cette étude se concentre sur des solutions alternatives et complémentaires. Des bactériophages ont été isolés à partir d'échantillons d'eaux usées de divers sites et testés contre des souches bactériennes de référence telles que *E. coli*, *Klebsiella*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, et *Acinetobacter*. Les résultats ont montré une efficacité variable selon les souches et les échantillons.

En plus de tester l'activité des bactériophages seuls, l'étude a évalué leur synergie avec des substances antimicrobiennes telles que l'amoxicilline, un β -lactamine, et des extraits de la plante *Urtica urens*. Les résultats ont révélé une synergie significative, augmentant les zones d'inhibition pour plusieurs souches bactériennes testées. Par exemple, pour *Bacillus subtilis*, la zone d'inhibition est passée de 10 mm (phage seul) à 22 mm (avec amoxicilline) et à 36 mm (avec extrait 2 d'*Urtica urens*). Pour *Acinetobacter*, l'extrait 1 a montré une synergie marquée avec les phages, atteignant une zone d'inhibition de 40 mm.

Ces résultats suggèrent que les combinaisons de bactériophages et de substances antimicrobiennes peuvent constituer une stratégie prometteuse pour améliorer l'efficacité des traitements antimicrobiens, en particulier contre les souches multi-résistantes. Cette approche pourrait offrir des solutions viables pour traiter diverses infections bactériennes et contribuer à la lutte contre la résistance aux antibiotiques.

Mots clés

Bactériophages, antibiotiques, résistance aux antibiotiques, synergie antimicrobienne, *Urtica urens*, amoxicilline.

Abstract

This thesis explores the potential of bacteriophages in combination with antimicrobial substances to combat bacterial infections, particularly those caused by antibiotic-resistant strains. The primary objective is to evaluate the effectiveness of the synergy between bacteriophages and commonly used antibiotics, as well as plant extracts, to enhance antimicrobial activity.

Given the increasing resistance of bacteria to antibiotics, this study focuses on alternative and complementary solutions. Bacteriophages were isolated from wastewater samples from various sites and tested against reference bacterial strains such as *E. coli*, *Klebsiella*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, and *Acinetobacter*. The results showed varying effectiveness depending on the strains and samples.

In addition to testing the activity of bacteriophages alone, the study evaluated their synergy with antimicrobial substances such as amoxicillin, a β -lactam, and extracts from the plant *Urtica urens*. The results revealed significant synergy, increasing the inhibition zones for several bacterial strains tested. For example, for *Bacillus subtilis*, the inhibition zone increased from 10 mm (phage alone) to 22 mm (with amoxicillin) and to 36 mm (with extract 2 of *Urtica urens*). For *Acinetobacter*, extract 1 showed marked synergy with the phages, reaching an inhibition zone of 40 mm.

These results suggest that combinations of bacteriophages and antimicrobial substances can be a promising strategy to improve the effectiveness of antimicrobial treatments, particularly against multi-resistant strains. This approach could offer viable solutions to treat various bacterial infections and contribute to the fight against antibiotic resistance.

Keywords

Bacteriophages, antibiotics, antibiotic resistance, antimicrobial synergy, *Urtica urens*, amoxicillin.

ملخص

الملخص تستكشف هذا العمل إمكانيات استخدام البكتريوفاجات بالتزامن مع المواد المضادة للميكروبات لمكافحة العدوى البكتيرية، لا سيما تلك الناجمة عن السلالات المقاومة للمضادات الحيوية. الهدف الرئيسي- هو تقييم فعالية التآزر بين البكتريوفاجات والمضادات الحيوية المستخدمة بشكل شائع، بالإضافة إلى مستخلصات النباتات، لتعزيز النشاط المضاد للميكروبات.

في ظل ترايد مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية، تركز هذه الدراسة على الحلول البديلة والمكملة. تم عزل البكتريوفاجات من عينات مياه الصرف من مواقع مختلفة واختبارها ضد سلالات بكتيرية مرجعية مثل *E. coli* و *Klebsiella* و *Bacillus subtilis* و *Listeria monocytogenes* و *Acinetobacter*. أظهرت النتائج فعالية متفاوتة حسب السلالات والعينات.

بالإضافة إلى اختبار نشاط البكتريوفاجات بمفردها، قامت الدراسة بتقييم تآزرها مع المواد المضادة للميكروبات مثل الأموكسيسيلين، وهو بيتا-لاكتام، ومستخلصات من نبات *Urtica urens* أظهرت النتائج تآزرًا كبيرًا، مما زاد من مناطق التثبيط للعديد من السلالات البكتيرية المختبرة. على سبيل المثال، بالنسبة إلى *Bacillus subtilis*، زادت منطقة التثبيط من 10 ملم (البكتريوفاج وحده) إلى 22 ملم (مع الأموكسيسيلين وإلى 36 ملم) مع مستخلص 2 من *Urtica urens* بالنسبة إلى *Acinetobacter*، أظهر المستخلص 1 تآزرًا ملحوظًا مع البكتريوفاجات، حيث بلغ منطقة التثبيط 40 ملم.

تشير هذه النتائج إلى أن مزيج البكتريوفاجات والمواد المضادة للميكروبات يمكن أن يكون استراتيجية واعدة لتحسين فعالية العلاجات المضادة للميكروبات، لا سيما ضد السلالات المتعددة المقاومة. يمكن أن تقدم هذه المقاربة حلولاً قابلة للتطبيق لعلاج العدوى البكتيرية المختلفة والمساهمة في مكافحة مقاومة المضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية

بكتريوفاجات، مضادات حيوية، مقاومة المضادات الحيوية، التآزر المضاد للميكروبات، *Urtica urens*، أموكسيسيلين.

Table des matières

PARTIE I. INTRODUCTION.....	1
PARTIE II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
II.1. Resistance aux antibiotiques.....	5
II.1.1. Antibiotiques.....	5
II.1.1.1. Définition	5
II.1.1.2. Historique et chronologie L'histoire des antibiotiques	5
II.1.1.3. Spectre d'activité d'un antibiotique	6
II.1.1.4. Mode d'action des antibiotiques.....	7
II.1.1.4.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne	8
II.1.1.4.2. Antibiotiques inhibiteurs de la membrane cytoplasmique	8
II.1.1.4.3. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines	9
II.1.1.4.4. Antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs précurseurs	9
II.1.1.4.5. Antibiotiques inhibiteurs des voies métaboliques Chez les procaryotes.....	10
II.1.1.4.6. Antibiotiques anti-anaérobies	10
II.1.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	10
II.1.2.1. Types de résistance aux antibiotiques	10
II.1.2.1.1. La résistance naturelle	11
II.1.2.1.2. La résistance acquise	11
II.1.2.1.3. La résistance croisée.....	12
II.1.2.1.4. La co-résistance	12
II.1.3. Mécanismes génétiques de la résistance bactérienne	12
II.1.3.1. Mutation chromosomique	12
II.1.3.2. Mutation extrachromosomique.....	13
II.1.3.2.1. Plasmides.....	13
II.1.3.2.2. Transposons.....	13
II.1.3.2.3. Intégrons.....	13
II.1.3.3. Types de mécanismes de résistance	13
II.1.3.3.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique :	14

II.1.3.3.2. Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique :.....	15
II.1.3.3.3. Pompes à efflux :.....	15
II.1.3.3.4. Perméabilité réduite :	15
II.1.3.3.5. Protection de la cible de l'antibiotique	16
II.1.3.3.6. Piégeage de l'antibiotique :.....	16
II.2. La phagothérapie : un moyen de lutte contre la résistance aux antibiotiques	16
II.2.1. Généralités sur les bacteriophages	16
II.2.2. Historique.....	17
II.2.3. Structure et morphologie	18
II.2.4. Classification	19
II.2.4.1. Leur morphologie	19
II.2.4.2. La nature de leur génome :	20
II.2.4.3. Les analogies de structure tridimensionnelle.....	20
II.2.4.4. Autres propriétés	20
II.2.5. Habitat.....	21
II.2.6. Les types de bactériophages	22
II.2.6.1. Cycle lytique (phage virulent)	22
II.2.6.2. Cycle lysogénique (phage tempéré)	23
II.2.6.1. Cycle chronique (phages filamenteux).....	24
II.2.7. Applications des bactériophages.....	25
II.2.7.1. La phagothérapie	25
II.2.7.1.1. Brève histoire de la phagothérapie	26
II.2.7.1.2. Principe d'utilisation de la phagothérapie	26
II.2.7.1.3. Relation phages-antibiotiques.....	27
II.2.7.1.4. Synergie phages-antibiotiques (PAS)	27
II.2.7.1.5. Différence entre les bactériophages et les antibiotiques.....	28
II.2.7.2. Bactériophages en médecine humaine	29
II.2.7.2.1. Traitement des cancers	30
II.2.7.2.2. Les vaccins à base de phages	31
PARTIE III. MATERIEL ET METHODES	33
III.1. Provenance des échantillons.....	34

III.2. Revivification des souches indicatrices	34
III.2.1. Vérification de la purification des souches indicatrices	35
III.2.1.1. Observation macroscopique	36
III.2.1.2. Observation microscopique	36
III.2.1.2.1. Principe de la coloration de Gram	36
III.2.2. Conservation des souches	37
III.3. Procédure pour effectuer le test de diffusion de disque (Antibiogramme).....	37
III.3.1. Inoculation de boîtes de test	37
III.3.2. Application de disques sur des boîtes d'agar inoculées	38
III.3.3. Lecture de boîtes et interprétation des résultats	38
III.4. Recherche de bactériophages.....	39
III.4.1. Isolement des bactériophages.....	39
III.4.1. Ensemencement en double couche et inoculation des bactériophages	39
III.5. Test de synergie bactériophage substances antimicrobiennes	40
III.5.1. Synergie bactériophages substances antimicrobiennes	41
III.5.1.1. Préparation de la Solution d'Antibiotique	41
III.5.1.2. Préparation des extraits de <i>Urtica urens</i>	41
III.5.1.3. Méthode de Synergie entre Bactériophages et Substances Antimicrobiennes	42
PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION	43
IV.1. Revivification et contrôle de la pureté des souches indicatrices.....	44
IV.1.1. Examen macroscopique des colonies	44
IV.1.2. Examen microscopique des souches	45
IV.2. Détermination des profils de résistance aux antibiotiques (Antibiogramme) ...	46
IV.3. La recherche de bactériophages	49
IV.3.1. <i>Bacillus subtilis</i> :	50
IV.3.2. <i>E. coli</i> :	50
IV.3.3. <i>Listeria monocytogenes</i> :	51
IV.3.4. <i>Klebsiella</i> :	51
IV.3.5. <i>Acinetobacter</i> :	51
IV.3.6. <i>Staphylococcus aureus</i> :	51

IV.4. Résultat de la synergie phages et substances antimicrobiennes.....	52
IV.4.1. <i>E. coli</i> :	54
IV.4.2. <i>Klebsiella</i> :.....	55
IV.4.3. <i>Bacillus subtilis</i> :	55
IV.4.4. <i>Listeria monocytogenes</i> :.....	55
IV.4.5. <i>Acinetobacter</i>	55
PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	57
PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	60

PARTIE I. INTRODUCTION

Introduction

La résistance des bactéries aux antibiotiques demeure aujourd'hui un problème majeur de santé publique, particulièrement préoccupant en milieu hospitalier. Deux facteurs principaux conditionnent cette évolution : la pression de sélection exercée par l'utilisation extensive de l'antibiothérapie et la diffusion épidémique des souches résistantes (Soussy, 2007). Cette situation a conduit à une augmentation significative de la morbidité et de la mortalité liées aux infections bactériennes résistantes, ainsi qu'à une hausse des coûts de santé publique.

Bien qu'une grande attention soit actuellement accordée aux agents pathogènes à Gram positif et aux mycobactéries, les bactéries à Gram négatif, en particulier celles présentant un phénotype multirésistant, représentent toujours une menace sérieuse pour la santé publique (Poole, 2004). Ces bactéries, comme *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Pseudomonas aeruginosa*, possèdent divers mécanismes de résistance, y compris la production de bêta-lactamases à spectre étendu (ESBL) et de carbapénémases, rendant le traitement des infections qu'elles causent extrêmement difficile.

L'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques et le manque de moyens thérapeutiques efficaces ont remis sur le devant de la scène une ancienne méthode thérapeutique oubliée : la phagothérapie. Cette méthode consiste à exploiter les bactériophages, des virus spécifiques qui infectent exclusivement les bactéries, pour lutter contre ces dernières (Ravat et al., 2015). Contrairement aux antibiotiques, les bactériophages possèdent une grande spécificité pour leurs hôtes bactériens, ce qui minimise les effets sur la flore bactérienne bénéfique et réduit le risque de dysbiose.

Les bactériophages, découverts au début du 20ème siècle en France (Debarbieux, 2008), sont omniprésents dans la nature et faciles à isoler et à utiliser (Massali et al., 2016). Ils se multiplient au détriment des bactéries qu'ils infectent, offrant ainsi une alternative potentielle aux antibiotiques

classiques. Leur utilisation a été relancée par l'urgence de la crise de résistance aux antibiotiques et par l'inefficacité croissante des traitements actuels.

Les recherches récentes ont montré que les bactériophages peuvent être utilisés en combinaison avec des antibiotiques pour améliorer l'efficacité des traitements et réduire l'émergence de résistances. Par exemple, l'utilisation de phages en combinaison avec des antibiotiques comme les β -lactamines ont montré une synergie potentielle, améliorant l'élimination des bactéries résistantes. De plus, l'intégration de phages avec des extraits de plantes, connus pour leurs propriétés antimicrobiennes, offre une nouvelle dimension à cette thérapie combinée, exploitant les multiples mécanismes d'action pour surmonter la résistance bactérienne.

Cette étude prospective vise à déterminer la synergie entre les bactériophages et des substances antimicrobiennes, telles que l'amoxicilline et des extraits de plantes, dans la lutte contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. La question centrale de cette recherche est la suivante : Comment les combinaisons de bactériophages et d'agents antimicrobiens peuvent-elles améliorer l'efficacité des traitements contre les infections bactériennes résistantes ?

PARTIE II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. Resistance aux antibiotiques

II.1.1. Antibiotiques

II.1.1.1. Définition

Le mot antibiotique vient du grec (anti : « contre » et bios : « la vie »). Ce sont des substances chimiques fabriquées soit naturellement par des micro-organismes (champignons ou bactéries), soit produites industriellement par synthèse totale. D'autres antibiotiques sont semi-synthétiques, correspondant à la modification chimique d'antibiotiques naturels. Ces molécules permettent de bloquer la croissance des bactéries ou de les détruire. Dans le premier cas, elles sont appelées bactériostatiques, et dans le deuxième cas, bactéricides.

Les propriétés bactériostatiques ou bactéricides des antibiotiques proviennent de leur capacité à bloquer une étape d'un mécanisme essentiel à la multiplication ou à la survie des bactéries. Pour cela, ils visent une cible spécifique de la cellule bactérienne, présentant ainsi une toxicité sélective, c'est-à-dire qu'aux doses utilisées, ils n'affectent que certaines bactéries et non pas l'hôte infecté.

Les antibiotiques constituent un groupe de médicaments d'une importance primordiale dans la lutte contre les maladies infectieuses bactériennes. Leur rôle est de diminuer ou de stabiliser la quantité des bactéries présentes au niveau du site infectieux et d'aider l'organisme à entamer le processus de guérison. Depuis leur découverte, les antibiotiques ont radicalement modifié le pronostic des infections bactériennes, permettant de guérir des maladies autrefois mortelles, telles que les endocardites bactériennes, la syphilis, les méningites tuberculeuses et la peste (El Boujnouni, 2020).

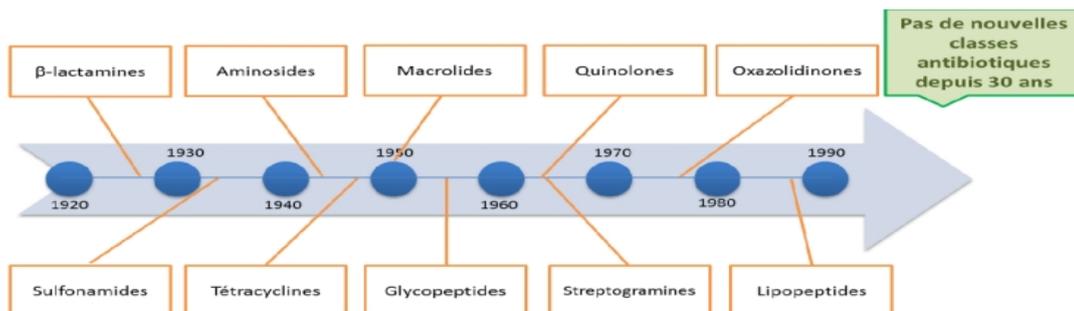
II.1.1.2. Historique et chronologie L'histoire des antibiotiques

L'histoire des antibiotiques est relativement récente, datant d'environ soixante-dix ans depuis le premier succès mondial de la pénicilline (Ait-Mouhoub, 2015). Le premier à remarquer le pouvoir antibactérien des

moisissures fut le Français Ernest Duchesne en 1887, mais sa découverte n'eut pas de suite.

La découverte officielle de la pénicilline fut en grande partie due au hasard. En 1928, Alexander Fleming, un médecin, biologiste et pharmacologue britannique, observa que la croissance de *Staphylococcus aureus* était inhibée par une colonie de moisissure appelée *Penicillium notatum*, qui avait contaminé sa boîte de Petri. Fleming émit alors l'hypothèse que ce champignon produisait une substance capable de bloquer le développement de la bactérie, qu'il appela la pénicilline. Il publia sa découverte en 1929, mais ce n'est qu'en 1945, à la fin de la Seconde Guerre mondiale, que l'utilisation thérapeutique de la pénicilline débuta. Cela fut possible grâce à l'isolement et à la purification de la molécule par les chimistes Howard Florey et Ernst Boris Chain, permettant ainsi son usage clinique (Muller, 2017).

Par la suite, de nombreuses autres molécules antibiotiques furent découvertes (Figure 1), conduisant à l'essor de cette classe thérapeutique, qui a permis de traiter de nombreuses infections autrefois considérées comme



mortelles.

Figure 1: Chronologie de la découverte des principales classes d'antibiotiques (Muller, 2017)

II.1.1.3. Spectre d'activité d'un antibiotique

Le spectre d'activité (ou d'action) d'un antibiotique se définit comme la liste des espèces microbiennes dont la majorité des souches s'avèrent sensibles. Lorsque le spectre d'activité est limité à un certain nombre

d'espèces bactériennes, il est dit "étroit". En revanche, un antibiotique actif sur de nombreuses bactéries est dit "à spectre large". Une bactérie insensible à un antibiotique est définie comme étant résistante.

Un antibiotique à spectre large agit sur un grand nombre de bactéries, incluant les bacilles et coques Gram positifs et Gram négatifs (ex. Tétracyclines, Phénicolés) (Tableau 2). À l'inverse, un antibiotique à spectre étroit agit seulement sur les bacilles et coques Gram positifs ou Gram négatifs (ex. Pénicilline G, Macrolides).

Tableau 1: Spectre d'activité de quelques antibiotiques selon la nature de la paroi bactérienne

Famille	Antibiotique	Gram +	Gram-
β-lactamines	Pénicilline G	+	-
	Oxacilline	+	-
	Ampicilline	+	+
Aminosides	Gentamicine	+	+
	Tobramycine	+	+
Phénicolés	Chloramphénicol	+	+
Tétracyclines	Doxycycline	+	+
Macrolides	Erythromycine	+	-
Glycopeptides	Vancomycine	+	-
Quinolones	Acide nalidixique	-	+
Autres	Acide fustidique	+	-

II.1.1.4. Mode d'action des antibiotiques

À la différence des antiseptiques et des désinfectants, les antibiotiques agissent généralement de façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne. Cette grande spécificité d'action explique pourquoi les antibiotiques sont actifs à très faible concentration, de l'ordre du $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sur les bactéries. Ils bloquent généralement une étape essentielle de leur développement, comme la synthèse de la paroi cellulaire, de l'ADN, des protéines, ou la production d'énergie, etc. (Figure 2).

Ce blocage se produit lorsque l'antibiotique se fixe sur sa cible : une molécule de la bactérie participant à l'un de ces processus métaboliques essentiels. Cette interaction entre l'antibiotique et sa cible est très sélective, spécifique des bactéries.

II.1.1.4.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne

Les β -lactamines, comprenant les sous-familles des pénicillines et des céphalosporines, exercent leur action antibiotique via leur noyau bêta-lactame. Ce noyau a une très forte affinité pour le site catalytique des PLP (protéines de liaison à la pénicilline), qui sont des enzymes essentielles à la synthèse et au remodelage du peptidoglycane (la muréine) de la bactérie.

Les PLP sont des transpeptidases, des enzymes qui stabilisent le peptidoglycane en formant des liaisons inter-peptidoglycane. Le peptidoglycane est le constituant principal de la paroi de toutes les espèces bactériennes, et l'inhibition de sa synthèse entraîne la mort de la bactérie par choc osmotique. Par conséquent, les inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane possèdent une activité bactéricide.

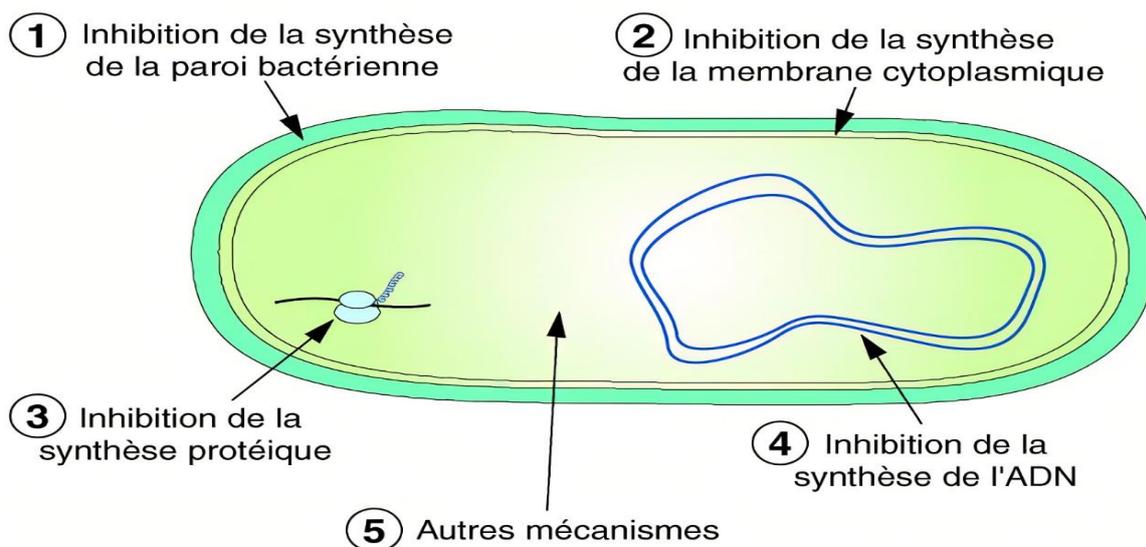


Figure 2: Mode d'action des antibiotiques

II.1.1.4.2. Antibiotiques inhibiteurs de la membrane cytoplasmique

En raison de la similitude entre les membranes des cellules bactériennes et des cellules eucaryotes, les antibiotiques actifs sur la membrane sont toxiques, et seulement un nombre restreint de molécules a trouvé une utilisation thérapeutique. Les Polymyxines, telles que la Polymyxine B et la Polymyxine E (colistine), sont constituées d'un polypeptide cyclique et d'un acide gras.

Grâce à leur extrémité hydrophobe, ces antibiotiques pénètrent à l'intérieur de la membrane et s'incorporent à la couche lipidique, tandis que leur extrémité hydrophile reste orientée vers l'extérieur. Cela entraîne une désorganisation de la structure membranaire, provoquant ainsi la mort cellulaire.

II.1.1.4.3. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines

Ce sont les composés les plus nombreux. Les antibiotiques agissent en inhibant ou en perturbant certaines étapes des biosynthèses essentielles à la vie bactérienne en se fixant sur les ribosomes, soit sur les sous-unités 30S (par exemple les Aminosides et les Tétracyclines), soit sur les sous-unités 50S (par exemple les Macrolides et les Phénicolés), ce qui perturbe la synthèse protéique.

II.1.1.4.4. Antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs précurseurs

On distingue des antibiotiques actifs d'une part sur la synthèse des ARN et d'autre part sur la synthèse des ADN ou de leurs précurseurs :

La Rifamycine agit en bloquant l'ARN polymérase.

Les Quinolones inhibent la synthèse de l'ADN de la bactérie en se fixant sur le complexe "ADN-gyrase", ce qui empêche la réplication et la transcription de l'ADN bactérien.

Les Sulfamides agissent sur la synthèse de l'acide folique, un cofacteur nécessaire à la synthèse des bases puriques et pyrimidiques incorporées dans les acides nucléiques. Leur spécificité d'action provient du fait que les eucaryotes ne synthétisent pas d'acide folique.

Les Diaminopyrimidines inhibent la réduction de l'acide folique en exploitant la différence de sensibilité entre la dihydrofolate réductase bactérienne et celle des cellules eucaryotes.

Les dérivés des **Nitrofuranes** agissent en perturbant la réplication de l'ADN.

Les Nitroimidazoles agissent en inhibant la synthèse des acides nucléiques, ce qui entraîne la mort rapide de la bactérie.

II.1.1.4.5. Antibiotiques inhibiteurs des voies métaboliques Chez les procaryotes

Le métabolisme bactérien procède par des voies très variées, permettant aux bactéries de s'adapter à une grande diversité de milieux nutritifs et de conditions de survie, bien plus variées que celles des eucaryotes. Malgré cette diversité, le nombre de molécules d'antibiotiques agissant à ce niveau et utilisables en clinique est très limité.

II.1.1.4.6. Antibiotiques anti-anaérobies

Certaines bactéries sont capables de vivre en anaérobie en utilisant des voies d'oxydoréduction indépendantes de l'oxygène, ce qui leur permet d'atteindre des niveaux de potentiel redox nettement plus bas que chez les eucaryotes. Ceci facilite l'activation métabolique spécifique de certaines molécules, comme les Nitroimidazoles, leur conférant ainsi un effet particulier sur ces organismes (ainsi que sur d'autres parasites anaérobies). Les modes d'action des antibiotiques sont très variés. Il est crucial de les comprendre, car cela permet de mieux appréhender les mécanismes de résistance naturelle et acquise des bactéries.

II.1.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est la capacité d'un microorganisme de résister aux effets des antibiotiques. On peut également dire qu'une souche est résistante lorsqu'elle est capable de survivre ou de se multiplier malgré la présence d'une concentration d'antibiotiques beaucoup plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (Pistes, 2002).

II.1.2.1. Types de résistance aux antibiotiques

L'émergence des bactéries résistantes aux antibiotiques est un phénomène inquiétant, pouvant entraîner de grandes difficultés de prise en

charge thérapeutique en médecine humaine et vétérinaire. L'utilisation abusive des antibiotiques pour la prévention et le traitement de différentes maladies infectieuses en médecine vétérinaire et humaine a contribué à une sélection de résistances vis-à-vis de différentes familles d'antibiotiques parmi les microorganismes pathogènes et commensaux des différentes flores.

II.1.2.1.1. La résistance naturelle

La résistance naturelle, également appelée résistance intrinsèque, est une caractéristique présente chez toutes les bactéries de la même espèce ou du même genre. Portée par les chromosomes, stable, et transmise à la descendance (Philippon, 2008), elle détermine le phénotype « sauvage » des bactéries et délimite le spectre d'action des antibiotiques. Par exemple, la présence d'une membrane externe chez les bacilles à Gram négatif (BGN) entraîne la résistance à diverses classes de molécules par imperméabilité (Cavallo et Merens, 2008).

II.1.2.1.2. La résistance acquise

À l'inverse, la résistance acquise n'est présente que chez certaines souches de la même espèce ou du même genre ; dans certains cas, elle peut concerner la grande majorité de ces souches, comme la production de pénicillinase chez le staphylocoque qui intéresse 90 % des souches (Cavallo et Merens, 2008). Variable dans le temps et dans l'espace, elle se propage de façon importante. Portée par le chromosome, les plasmides, ou des éléments génétiques mobiles, elle permet une transmission verticale à la descendance et horizontale entre espèces différentes (Lalaoui Rachidi, 2016). Moins stable que la résistance naturelle, elle résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie, lui permettant de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce (Lozniewski et al., 2010). Ce mode d'acquisition de résistance peut se faire selon trois mécanismes différents : transduction, transformation et conjugaison (Azmon, 2016).

II.1.2.1.3. La résistance croisée

La résistance croisée correspond à la résistance à tous les membres d'une classe d'antibiotiques due à un seul mécanisme de résistance. La résistance est de niveau variable selon les antibiotiques, en général d'autant plus faible que la molécule est plus active. Le phénomène de résistance croisée peut survenir parmi tous les membres d'une classe d'antibiotiques, comme c'est le cas pour les sulfamidés, ou être limité à quelques membres d'un groupe, comme pour les aminoglycosides, ou encore impliquer des antimicrobiens appartenant à des classes différentes (Couvralin, 2008).

II.1.2.1.4. La co-résistance

Dans la co-résistance, plusieurs mécanismes de résistance sont associés chez la même bactérie, parfois stabilisés par intégration dans le chromosome. Chacun confère (par résistance croisée) la résistance à une classe d'antibiotiques, ce qui entraîne in fine un large phénotype résistant de la bactérie hôte. Là encore, la conséquence de cette organisation génétique est la co-sélection. Dans ce cas, une classe d'antibiotiques à laquelle la bactérie est résistante pourra sélectionner la résistance à des classes d'antibiotiques non reliées. Ceci est par exemple le cas chez les pneumocoques (Couvralin, 2008).

II.1.3. Mécanismes génétiques de la résistance bactérienne

Les bactéries peuvent développer une résistance à un antibiotique initialement sensible par le biais de changements génétiques. Cette résistance est souvent instable et peut être de deux types :

II.1.3.1. Mutation chromosomique

La résistance bactérienne par mutation chromosomique résulte de modifications structurelles qui peuvent altérer la perméabilité aux antibiotiques ou rendre les cibles antibiotiques indifférentes (Azmoun, 2016). Ce type de résistance est rare et spécifique à un antibiotique ou à une famille ayant un même mode d'action, bien que des exceptions existent (Philippon, 2008).

II.1.3.2. Mutation extrachromosomique

La résistance bactérienne par acquisition de matériel génétique exogène est fréquente chez environ 80 à 90% des bactéries résistantes aux antibiotiques. Ce processus peut inclure l'échange direct de matériel chromosomique ou d'éléments mobiles tels que les plasmides, transposons et intégrons (Philippon, 2008 ; Carle, 2009). Contrairement à la résistance chromosomique, elle est souvent multiple et peut avoir un caractère épidémique.

II.1.3.2.1. Plasmides

Les plasmides de résistance aux antibiotiques ont été identifiés dès les années 1950 et sont associés à une résistance élevée, non spécifique à une classe d'antibiotiques. Ils peuvent être sélectionnés par l'usage d'antibiotiques à large spectre, favorisant leur dissémination parmi les bactéries commensales (Saadaoui, 2008).

II.1.3.2.2. Transposons

Les transposons sont des fragments d'ADN capables de se déplacer dans le génome bactérien et de transporter des gènes de résistance aux antibiotiques entre le chromosome et les plasmides (Saadaoui, 2008).

II.1.3.2.3. Intégrons

Les intégrons sont des systèmes permettant l'acquisition et l'expression de gènes de résistance sous forme de cassettes mobiles. Ils sont souvent portés par des plasmides ou des éléments génétiques intégratifs-conjugatifs (POOLE K., 2001).

II.1.3.3. Types de mécanismes de résistance

Les bactéries ont développé divers mécanismes pour neutraliser l'action des antibiotiques, incluant l'inactivation enzymatique, la modification de la cible de l'antimicrobien, l'efflux actif et la réduction de la pénétration de la molécule. D'autres mécanismes comme la protection ou la surproduction de la cible de l'antibiotique sont également décrits, mais moins fréquents et

souvent associés à certaines classes d'antibiotiques (Guardabassi et Courvalin, 2006).

La Figure 2 illustre ces différents mécanismes de résistance dans une bactérie à Gram négatif.

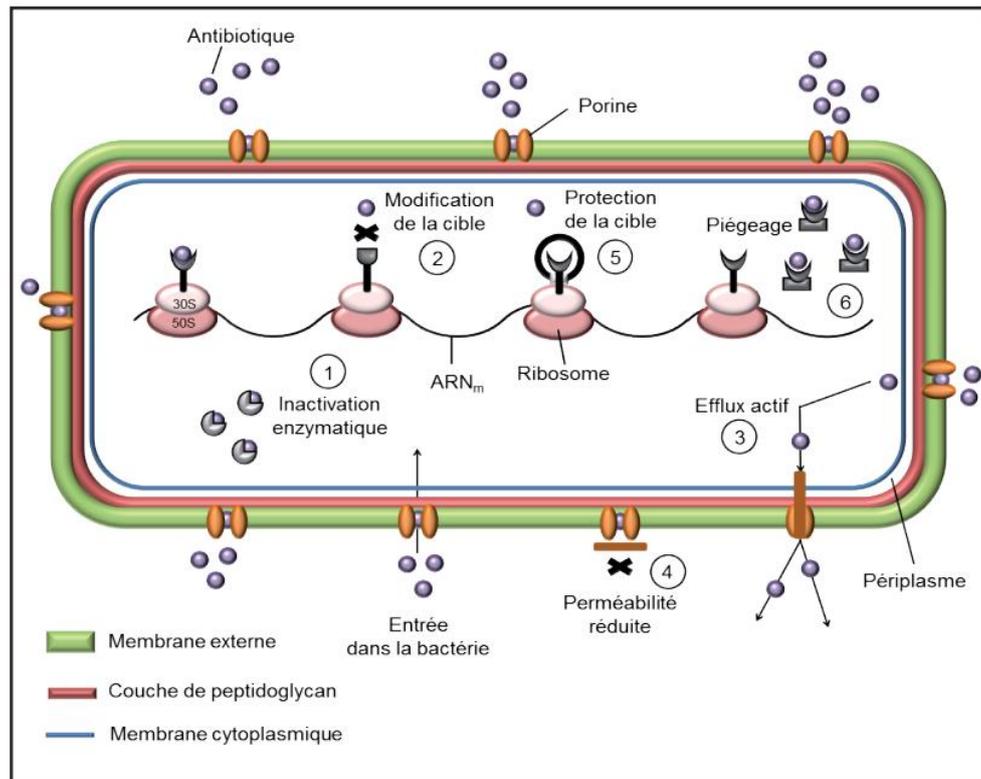


Figure 3: Mécanismes de résistances aux antibiotiques

1 inactivation enzymatique de l'antibiotique, 2 : modification de la cible de l'antibiotique, 3 : efflux actif de l'antibiotique, 4 : perméabilité réduite, 5 : protection de la cible de l'antibiotique, 6 : piégeage de l'antibiotique. ARNm : acide ribonucléique messager

II.1.3.3.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique :

L'inactivation enzymatique des antibiotiques constitue le principal mécanisme de résistance pour les bêta-lactames, les aminoglycosides, les phénicolés, ainsi que pour les macrolides, lincosamides, et streptogramines (MLS). Ce processus implique l'enzyme, qui modifie le noyau actif de l'antibiotique par hydrolyse, acétylation, phosphorylation, nucléotidylation, estérification, réduction ou addition de groupements chimiques, inhibant ainsi la liaison de l'antimicrobien à sa cible et provoquant une perte d'activité (Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Alekshun et Levy, 2007 ; Nikaido, 2009).

II.1.3.3.2. Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique

La modification structurale ou le remplacement de la cible de l'antibiotique empêchent le composé antibactérien de se lier et d'exercer son activité au sein de la bactérie. Ce mécanisme est crucial pour la résistance aux pénicillines, glycopeptides, et au groupe MLS chez les bactéries Gram positives, ainsi qu'aux quinolones chez les bactéries Gram positives et négatives. Il peut résulter de l'acquisition de matériel génétique codant pour une enzyme modifiant la cible ou d'une mutation au niveau de la séquence nucléotidique de la cible (Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Alekshun et Levy, 2007 ; Nikaido, 2009).

II.1.3.3.3. Pompes à efflux :

Les pompes à efflux, transporteurs actifs transmembranaires, sont utilisées par les bactéries pour expulser des composés toxiques comme les antibiotiques hors de la cellule, nécessitant de l'énergie. Ces pompes, telles que les pompes SDR (specific drug-resistance) et MDR (multiple drug-resistance), réduisent la concentration d'antibiotique dans le cytoplasme bactérien, limitant ainsi l'accès de l'antibiotique à sa cible. Elles sont classées selon leur spécificité de substrats et la source d'énergie utilisée, telle que l'hydrolyse de l'ATP pour les transporteurs ABC ou le gradient électrochimique pour les transporteurs secondaires (Poole, 2001 ; Li et Nikaido, 2004 ; Kumar et Schweizer, 2005).

II.1.3.3.4. Perméabilité réduite :

Les bactéries Gram négatives possèdent une structure complexe d'enveloppe externe, nécessitant que les antibiotiques hydrophiles passent par des protéines transmembranaires appelées porines. Des mutations affectant la production ou la taille des porines, comme chez *Pseudomonas aeruginosa*, réduisent la perméabilité de la membrane externe, entraînant une résistance aux quinolones, bêta-lactames, tétracyclines et chloramphénicol (Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Alekshun et Levy, 2007 ; Nikaido, 2009).

II.1.3.3.5. Protection de la cible de l'antibiotique

Certaines bactéries produisent des protéines de protection ribosomiale qui déplacent les tétracyclines de leur site de liaison, créant un encombrement stérique. Ce mécanisme est également observé chez les quinolones, où les protéines Qnr réduisent l'affinité de l'antibiotique pour les topoisomérases, cibles des quinolones (Rodriguez-Martinez et al., 2008 ; Robicsek et al., 2006 ; Cavaco et al., 2009 ; Wang et al., 2009).

II.1.3.3.6. Piégeage de l'antibiotique :

Les bactéries peuvent augmenter la production de leur cible ou produire des molécules qui se lient à l'antibiotique, réduisant ainsi sa concentration libre et son efficacité. Ce mécanisme est impliqué dans la résistance aux sulfamidés, triméthoprim, et aux glycopeptides chez *Staphylococcus aureus* (Guardabassi et Courvalin, 2006).

II.2. La phagothérapie : un moyen de lutte contre la résistance aux antibiotiques

II.2.1. Généralités sur les bacteriophages

Les bactériophages sont présents partout sur la planète et sont reconnus comme étant l'entité vivante la plus abondante sur Terre. Ils seraient dix fois plus nombreux que les bactéries (Jończyk et al., 2011). Les bactériophages ou phages, littéralement « mangeurs de bactéries », sont des virus qui infectent les bactéries (prédateurs naturels des bactéries) (Debarbieux, 2021 ; Droguet, 2021). Comme tous les virus, ils ne possèdent pas d'activité métabolique propre et utilisent la machinerie biosynthétique de la cellule qu'ils infectent pour leur propre réplication, cette dernière étant appelée « bactérie hôte » (Preux, 2013).

Certains bactériophages ont la capacité de détruire les bactéries par lyse, tout en étant inoffensifs pour les cellules humaines, animales et végétales (cellules eucaryotes). D'autres s'intègrent au chromosome bactérien (Breton, 2019).

II.2.2. Historique

Comme c'est typique dans l'histoire des sciences, la découverte des « bactériophages », ou « virus mangeurs de bactéries », s'est déroulée sur plusieurs années au cours des premiers stades de la virologie. Tout a commencé lorsque le bactériologiste britannique Ernest Hankin a découvert en 1896 que l'activité de lutte contre *Vibrio cholerae* existait dans les eaux des fleuves Gange et Jumna en Inde, causée par une source (qui passait à travers des filtres en porcelaine fine et était thermolabile) et responsable de l'éradication des épidémies de choléra (Kirby, 2012).

Deux ans plus tard, alors qu'il travaillait sur *Bacillus subtilis*, le bactériologiste russe Gamaleya a remarqué un phénomène similaire (Marza et al., 2006). Sur une période de quelques mois, d'Hérelle isole des bactériophages actifs contre différentes espèces de bacilles (*Shigella*, *E. coli*, *Proteus*, *Salmonella*). Il démontre avec beaucoup d'assurance qu'il s'agit d'un « microbe » et non pas d'une « diastase ». Mais il pense alors qu'il s'agit d'un seul et unique microbe tout en précisant n'avoir jamais isolé deux bactériophages identiques. Il le nomme Bacterophagum intestinale (un seul genre et une seule espèce) et affirme que ce microbe, dont l'expression est variable d'un isolat à l'autre (en tant que spectre et virulence), est capable d'acquérir une spécificité au contact de telle ou telle espèce bactérienne (Dublanche, 2017).

Après leur découverte au début du XXe siècle, les bactériophages ont fait l'objet de nombreux débats quant à leur nature. Certains scientifiques pensaient qu'il s'agissait d'enzymes bactériennes autolytiques induites par des facteurs extérieurs alors que d' Hérelle soutenait que les bactériophages étaient des particules indépendantes proches des virus. C'est finalement avec l'avènement de la microscopie électronique que la nature particulière des bactériophages a été avérée, mettant ainsi fin au débat (Vernhes, 2016).

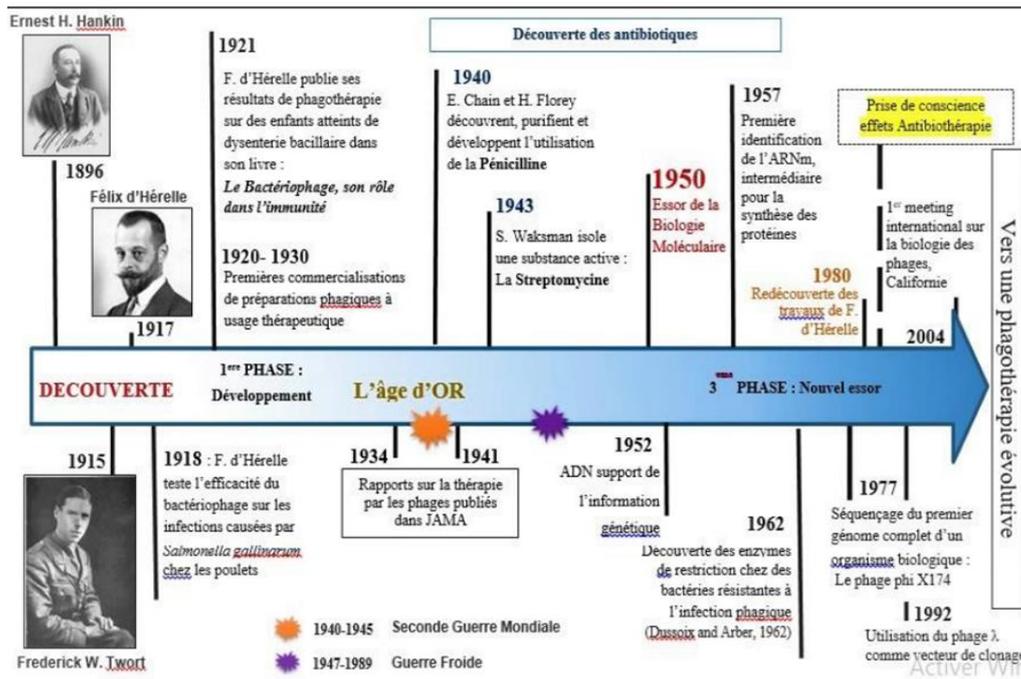


Figure 4: Frise chronologique retraçant les grandes phases de la découverte des phages et de leur utilisation en biologie moléculaire et en tant qu'agents antibactériens (Magin, 2019)

II.2.3. Structure et morphologie

Les bactériophages sont beaucoup plus petits que les bactéries, leur taille variant généralement de 20 à 300 nm. Ils sont visibles uniquement au microscope électronique grâce à l'utilisation de la coloration négative (Bouslamti, 1989 ; Massali & Bouaninba, 2016).

Les bactériophages possèdent tous la même structure générale (fig. 5) (St-Pierre-Lemieux, 2014), relativement simple, composée de protéines (60%) qui encapsulent le génome (40%) (Ye et al., 2019).

Acide nucléique : Portant l'information génétique sous la forme d'ADN ou d'ARN (Magin, 2019). Les phages à ARN sont plus stables que les phages à ADN (Pierre-Collet, 2010).

Capside : Capsule de protéines permettant au bactériophage de protéger son code génétique et de faciliter l'entrée dans l'hôte (St-Pierre-Lemieux, 2014).

Queue : Rigide ou flexible, de longueur variable, elle peut être contractile ou non. Elle constitue un tube creux recouvert d'une gaine protéique, portant également quelques enzymes (lysozymes) pour percer la paroi bactérienne (Bourema & Halimi, 2014).

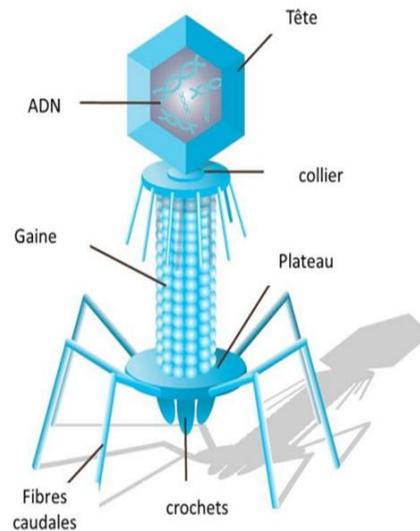


Figure 5: Structure d'un bactériophage (Morgane, 2019)

II.2.4. Classification

Les phages sont classés en fonction de la nature de leur acide nucléique et de leur structure (Hamzeh, 2014). Cette classification est fondée principalement sur plusieurs critères

II.2.4.1. Leur morphologie

Symétrie de la capsid : La capsid peut avoir une symétrie icosaédrique ou hélicoïdale.

Présence d'une queue ou non : Certains phages possèdent une queue rigide ou flexible qui peut être contractile ou non.

Enveloppe lipidique : Certains phages ont une enveloppe de lipides entourant la capsid.

II.2.4.2. La nature de leur génome :

Type d'acide nucléique : Les phages peuvent avoir un génome constitué d'ADN ou d'ARN.

Forme du génome : L'acide nucléique peut être linéaire ou circulaire.

Nombre de brins : Le génome peut être simple brin (simple brin d'ADN ou d'ARN) ou double brin (double brin d'ADN ou d'ARN).

II.2.4.3. Les analogies de structure tridimensionnelle

Protéines constitutives : La classification peut se baser sur les analogies dans les structures tridimensionnelles des protéines qui composent la particule virale.

II.2.4.4. Autres propriétés

Mode d'assemblage : La manière dont le phage s'assemble peut être un critère de classification.

Site de fixation sur la bactérie : Les points d'attachement spécifiques du phage sur la surface bactérienne peuvent également jouer un rôle.

Les phages virulents appartenant aux familles des *Myoviridae*, *Siphoviridae*, et *Podoviridae* sont regroupés dans l'ordre des *Caudovirales*. Cet ordre représente le plus grand et le plus prédominant groupe de bactériophages. Les caractéristiques de cet ordre comprennent :

Capside protéique : Une structure protéique entourant le génome viral.

ADN double brin linéaire : Leur génome est composé d'ADN double brin linéaire.

Symétrie binaire : La capside présente une symétrie cubique, tandis que la queue, si présente, possède une symétrie hélicoïdale.

Les phages de l'ordre des *Caudovirales* sont connus pour leur capacité à injecter leur matériel génétique directement dans la bactérie hôte grâce à leur queue, ce qui en fait des agents particulièrement efficaces pour la destruction des bactéries.

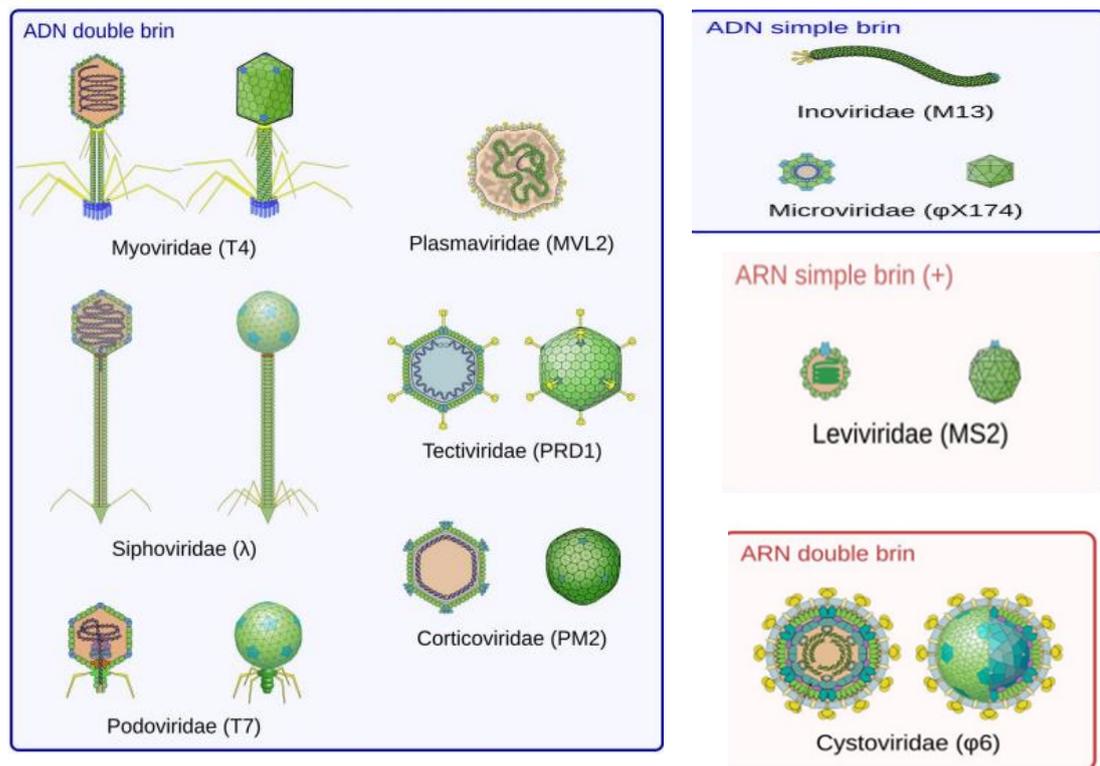


Figure 6: Diversité des bactériophages (familles des bactériophages) (Gontier, 2021)

II.2.5. Habitat

Les phages peuvent être trouvés dans n'importe quel réservoir contenant des hôtes bactériens, y compris l'eau de mer et les intestins d'animaux (Tan et al., 2008). Ils sont présents en quantités particulièrement élevées dans les excréments, le sol, les boues d'épuration et les eaux d'égout (Vonlanthen, 2011). L'équilibre entre phages et bactéries est stable, et leurs stratégies évolutives sont coordonnées. Les phages peuvent également être isolés à partir de lait cru, de lait pasteurisé, de ferments lactiques et de diverses émulsions environnementales (Mullan, 2001 ; Neter & Clark, 1944).

Il est estimé qu'il existe entre 10^{30} à 10^{32} phages dans la biosphère (Sulakvelidze, 2011). Les phages éliminent environ 50% des bactéries du monde toutes les 48 heures. Quel que soit l'habitat, il existe des phages uniques associés aux bactéries indigènes et des phages provenant d'autres environnements. Les environnements de phages les plus courants

comprennent les sédiments, les eaux douces, l'eau salée et les tubes digestifs (Abedon, 2009 ; Rohwer et al., 2009).

II.2.6. Les types de bactériophages

Selon leur cycle biologique, on distingue deux types de bactériophages : les phages lytiques et les phages tempérés (Dublanche, 2009).

II.2.6.1. Cycle lytique (phage virulent)

Lors d'un cycle lytique, le phage agit comme un virus classique : il s'empare de la cellule hôte et utilise ses ressources pour produire de nombreux nouveaux phages, ce qui entraîne la lyse (éclatement) et donc la mort de la cellule. Les étapes du cycle lytique comprennent :

L'attachement : Les protéines de la "queue" du phage se lient à un récepteur spécifique (par exemple, un transporteur de sucre) situé à la surface de la bactérie.

L'entrée : Le phage injecte son génome d'ADN double-brin dans le cytoplasme de la bactérie.

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

Assemblage du nouveau phage : Les capsides s'assemblent à partir des protéines capsides et sont remplies d'ADN pour générer de nombreuses nouvelles particules virales.

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, ce qui fait gonfler et éclater la cellule comme un ballon surchargé d'eau.

Éclatement ou lyse : L'éclatement de la cellule libère des centaines de nouveaux phages, qui peuvent ensuite trouver et infecter d'autres cellules hôtes à proximité. Quelques cycles lytiques d'infection suffisent au phage

pour se propager, tel un feu de forêt, au sein de la population bactérienne (Alberts et al., 2002).

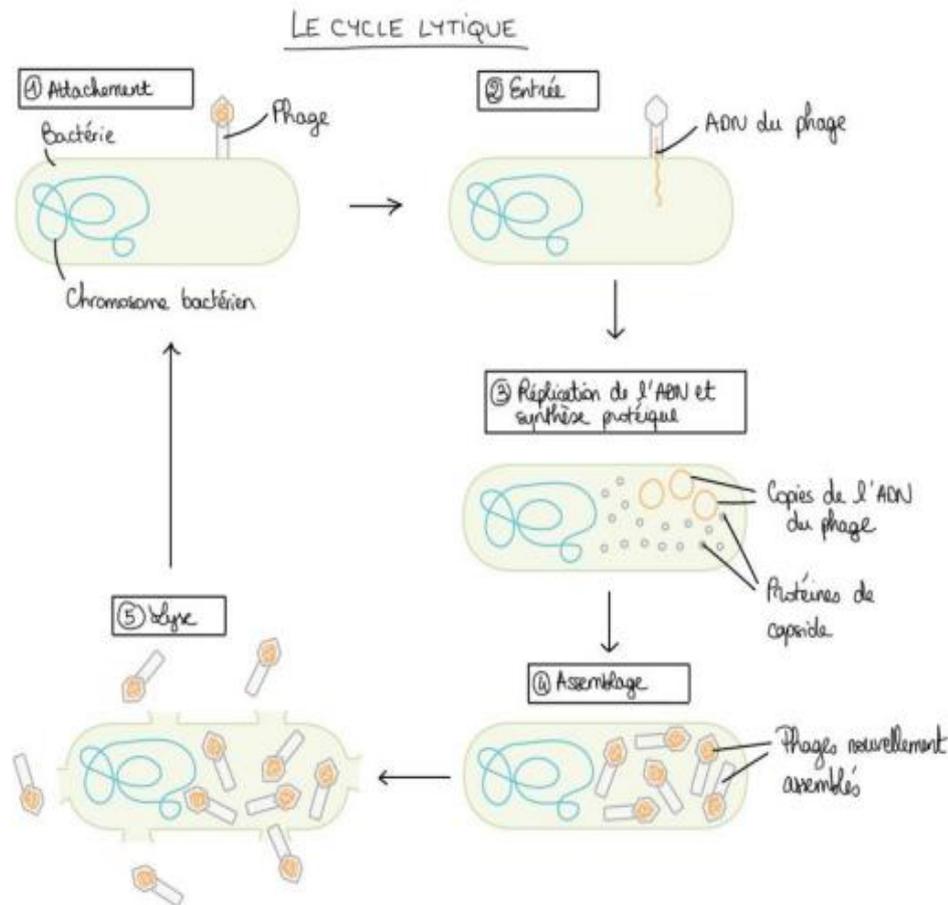


Figure 7: Schéma du cycle lytique (Alberts et al., 2002)

II.2.6.2. Cycle lysogénique (phage tempéré)

Dans le cycle lysogénique, les deux premières étapes (attachement et injection d'ADN) se produisent de la même façon que pour le cycle lytique. Cependant, une fois à l'intérieur de la cellule, l'ADN du phage n'est pas immédiatement copié ou exprimé pour fabriquer des protéines. Au contraire, l'ADN viral se recombine avec une région particulière du chromosome bactérien et s'y intègre (Alberts et al., 2002).

L'ADN intégré du phage, appelé prophage, n'est pas actif : ses gènes ne sont pas exprimés, et il n'induit pas la production de nouveaux phages. Cependant, à chaque division de la cellule hôte, le prophage est copié avec l'ADN de l'hôte et se propage ainsi.

Dans les bonnes conditions, le prophage peut devenir actif et sortir du chromosome bactérien, ce qui déclenche les étapes suivantes du cycle lytique:

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

Assemblage des phages : Les capsides s'assemblent à partir des protéines capsides et sont remplies d'ADN pour générer de nombreuses nouvelles particules virales.

Lyse : Le phage exprime les gènes codant pour les protéines qui créent des trous dans la membrane plasmique et dans la paroi cellulaire, provoquant l'éclatement de la cellule et la libération des nouveaux phages (Alberts et al., 2002).

II.2.6.1. Cycle chronique (phages filamenteux)

Il existe un nombre très restreint de bactériophages qui présentent un cycle de type « intermédiaire » dit chronique, caractéristique des phages filamenteux infectant des bactéries Gram- (Dublanche, 2017).

Une seule espèce de phage, le phage M13 (phage filamenteux), a un cycle chronique décrit. Dans ce cycle, la bactérie n'est pas lysée et continue à fonctionner comme un porteur chronique du génome phagique (Magin, 2019).

Le processus commence par l'attachement du phage à la membrane de la bactérie via les pili sexuel bactérien, suivi de l'injection de son ADN à l'intérieur de la cellule hôte. L'ADN viral est converti en double brin, répliqué, et transcrit en ARNm, qui est ensuite traduit en protéines de la capsid virale (Errafyg, 2016).

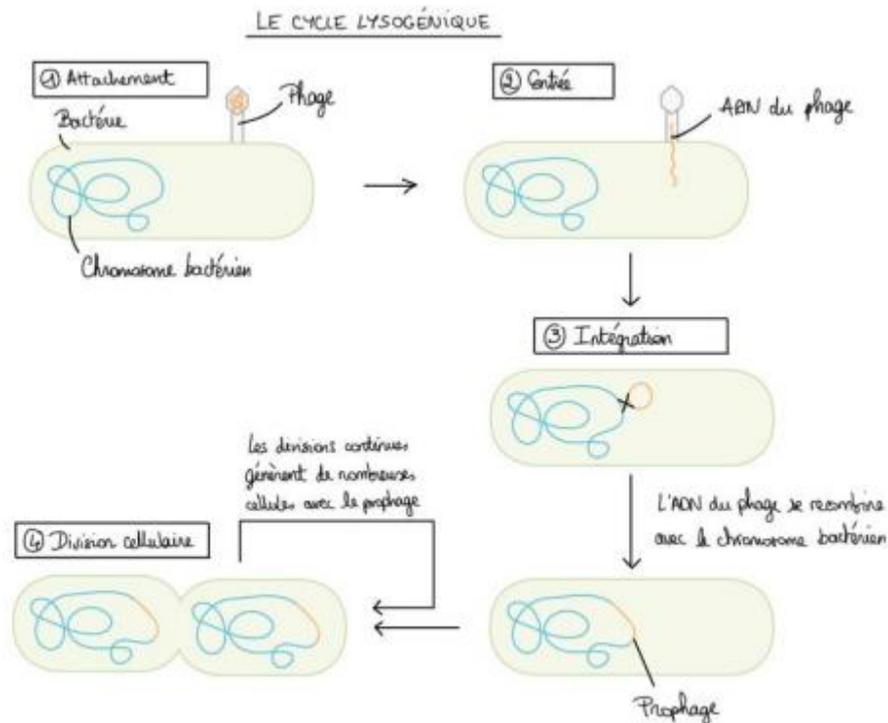


Figure 8: Schéma du cycle lysogénique (Alberts et al., 2002)

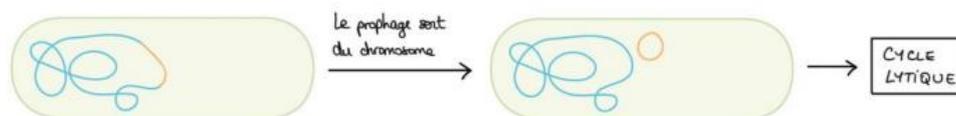


Figure 9: Déclenchement du cycle lytique à partir d'un prophage actif

Les particules virales sont produites à un faible débit et excrétées par bourgeonnement ou extrusion. Les cellules infectées continuent de se diviser, transmettant le virus à leur descendance (Dufour et al., 2016).

II.2.7. Applications des bactériophages

La recherche sur les phages bactériens utilisant une technologie de biologie moléculaire de pointe a révélé de nouvelles caractéristiques qui, à leur tour, ont ouvert la porte à un large éventail d'applications pratiques (Dublanche, 2017).

II.2.7.1. La phagothérapie

La phagothérapie consiste à utiliser les bactériophages pour tuer les bactéries pathogènes. Elle utilise des phages virulents pour traiter et guérir

spécifiquement les infections d'origine bactérienne. Cette approche exploite la propriété destructrice, lytique, et spécifique des bactériophages vis-à-vis de certaines bactéries pathogènes (Raynaud, 2020 ; Dublanche, 2017).

II.2.7.1.1. Brève histoire de la phagothérapie

Historiquement, la phagothérapie a été utilisée avant la découverte des antibiotiques. Le concept repose sur les travaux de Félix d'Hérelle à l'Institut Pasteur de Paris dans les années 1920. Il a isolé des phages à partir des selles de patients guéris de la shigellose et les a utilisés pour traiter cette infection bactérienne digestive. D'Hérelle a décrit le bactériophage comme un agent d'"immunité", infectant la bactérie et permettant la guérison de l'infection.

Son disciple, George Eliava, a fondé l'Institut du bactériophage à Tbilissi, où la phagothérapie s'est particulièrement développée en Union soviétique (URSS) et en Pologne. En France, la phagothérapie a été développée à l'Institut Pasteur de Lyon dans les années 1960-1970, mais elle a été abandonnée en raison de la disponibilité de divers antibiotiques à large spectre, administrables par voie intraveineuse ou orale (Ferry et al., 2018).

II.2.7.1.2. Principe d'utilisation de la phagothérapie

La phagothérapie repose sur le concept de bactéricidie, où la mort des bactéries est induite par le mécanisme de reproduction des bactériophages (Guillaume, 2020). Comme pour l'antibiothérapie, il existe deux approches pour traiter les infections bactériennes par phagothérapie, selon que la bactérie pathogène soit identifiée ou non :

- **Traitement probabiliste** : Lorsque la bactérie pathogène est inconnue, on administre un cocktail de bactériophages. Ce mélange augmente la probabilité que l'infection soit causée par une bactérie ciblée par au moins un des phages du cocktail.
- **Traitement spécifique** : Si la bactérie incriminée est identifiée, un phagogramme est réalisé pour cibler cette bactérie et choisir le phage

correspondant. Cette approche est préférable en phagothérapie, car les phages sont très spécifiques à une espèce donnée (Neurohr, 2016).

L'action bactéricide des phages présente quelques spécificités dues à la nature virale de ces entités :

- **Spécificité d'action** : Chaque bactériophage étant spécifique à une espèce bactérienne, cela entraîne un spectre d'action étroit avec une action ciblée sur telle ou telle bactérie.
- **Rapidité d'action** : Un cycle phagique est plus rapide que celui des bactéries (en moyenne 30 minutes contre une heure pour les bactéries).
- **Croissance exponentielle** : Chaque cycle de multiplication donne lieu à la synthèse de 30 à 300 phages par bactérie jusqu'à disparition de toute bactérie (Guillaume, 2020).

II.2.7.1.3. Relation phages-antibiotiques

Les bactériophages et les antibiotiques partagent une action commune : le contrôle et/ou l'éradication des bactéries pathogènes. Cependant, leur mode d'action est radicalement différent. Des études récentes proposent la phagothérapie comme alternative à l'antibiothérapie, notamment lorsque cette dernière devient inefficace. Certains travaux montrent que l'association de l'antibiothérapie et de la phagothérapie présente des bénéfices cliniques.

II.2.7.1.4. Synergie phages-antibiotiques (PAS)

Phagothérapie initiale : La phagothérapie cible le foyer infectieux actif.

Antibiothérapie secondaire : L'antibiothérapie intervient ensuite sur un faible inoculum.

Il a été démontré que l'ajout de faibles doses d'antibiotiques à des cultures bactériennes, qui bloquent la division cellulaire et induisent la formation de filaments, augmente significativement la production phagique. Ce phénomène est appelé la « synergie phages-antibiotiques » (PAS) (Errafyg, 2016).

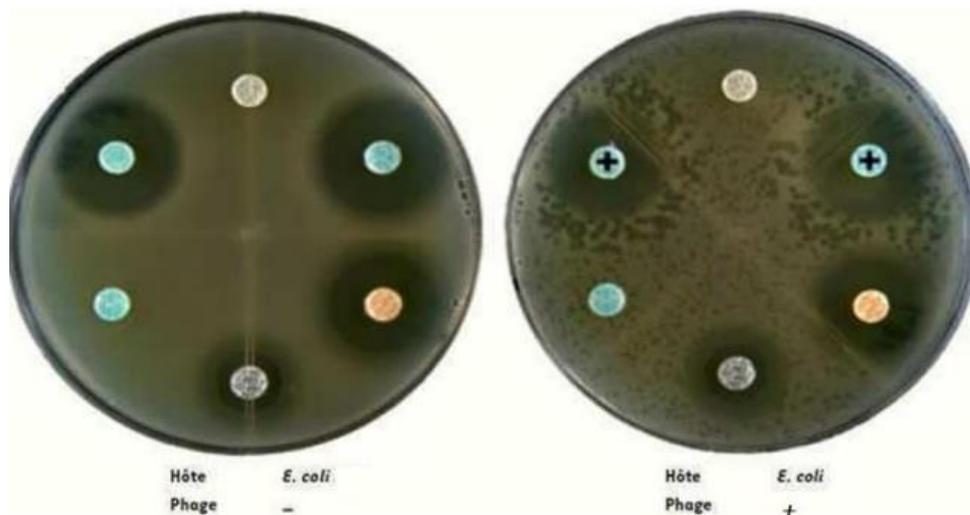


Figure 10: Phénomène de « Synergie Phages-Antibiotique » : à gauche présence des antibiotiques seulement, à droite présence de couple phages-antibiotiques (Errafyg, 2016)

Traitements mixtes

Dans le cadre de la phagothérapie, des traitements combinant antibiotiques et phages pourraient permettre une élimination plus efficace des bactéries pathogènes (Errafyg, 2016).

II.2.7.1.5. Différence entre les bactériophages et les antibiotiques

Les bactériophages sont considérés comme une alternative thérapeutique intéressante par rapport aux antibiotiques en raison de plusieurs avantages (Kolenda, 2019). Le tableau ci-dessous illustre les principales différences entre les bactériophages et les antibiotiques (Lucile, 2020).

Tableau 2 : Comparaison entre antibiotiques et bactériophages (Lucile, 2020)

Caractéristique	Antibiotiques	Bactériophages
Nature	Non vivant	Apparenté au vivant
Origine	Synthétique	Naturel
Production	Production industrielle standardisable	Production plus artisanale, difficilement standardisable
Stockage	Facile	Nécessité de l'entretien des cultures
Coût de production	Peu élevé	Élevé
Spectre d'action	Plus ou moins spécifique en fonction du spectre	Très spécifique d'une bactérie
Traitement	Standardisable	Personnalisé de l'individu et de ses bactéries
Essais thérapeutiques	Facilité de réalisation	Difficulté de réalisation des essais thérapeutiques
Pharmacocinétique et pharmacodynamie	Connu	Encore mal connues
Sort dans l'organisme	Dégradation par l'organisme, concentration décroissante dans le temps	Multiplication dans l'organisme, concentration exponentielle au sein du site infecté
Effet sur l'antibiorésistance	Favorise l'antibiorésistance	Ne favorise pas l'antibiorésistance

II.2.7.2. Bactériophages en médecine humaine

Actuellement, la prévalence croissante des infections causées par des bactéries multirésistantes est inquiétante. Il est ainsi devenu urgent de développer de nouvelles stratégies anti-infectieuses. Si l'utilisation des bactériophages comme agents antibactériens n'est pas une solution universelle, elle est réaliste tant en termes économiques que temporels. À la lumière des connaissances fondamentales obtenues au cours de plus de 100 années de recherche, des approches médicales et scientifiques rigoureuses se mettent aujourd'hui en place pour lever les derniers obstacles à la réintroduction de la phagothérapie en médecine humaine dans les pays ayant oublié ou négligé cette approche thérapeutique (Ansaldi et al., 2020).

L'utilisation des bactériophages isolés à partir du poulet infecté par *Salmonella* a permis de réduire la mortalité et la colonisation intestinale chez le poulet et a montré une efficacité contre ce pathogène (Ansaldi et al., 2020).

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 bovins (Ansaldi et al., 2020).

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

II.2.7.2.1. Traitement des cancers

Les phages présentant une forte affinité pour une cible spécifique peuvent être sélectionnés par la technologie de phage display. Actuellement, les phages tempérés, incapables de se répliquer, sont utilisés en toute sécurité dans cette technologie, représentant une option thérapeutique prometteuse. Nous avons émis l'hypothèse d'un choix rationnel basé sur le ciblage précis des caractéristiques des phages et leur capacité à cibler et tuer spécifiquement les bactéries, assistés par des nanomatériaux inorganiques, afin d'optimiser les limitations des traitements traditionnels (Dong Xue et al., 2020).

Nous proposons ici une hybridation bioinorganique basée sur les systèmes de phages, visant à remodeler un microenvironnement immunitaire anti-tumoral en manipulant le microbiote intestinal pour la suppression du cancer colorectal (CCR) (Fig. 11). Nous avons utilisé une bibliothèque de phages filamenteux M13 pour cribler des souches de phages capables de se lier à *Fusobacterium nucleatum* (Fn) in vitro. Ensuite, des nanoparticules d'argent (AgNP) ont été assemblées de manière électrostatique à la surface des phages antibactériens (M13@Ag). Après accumulation dans le

microenvironnement tumoral (TME), les M13@Ag tuent sélectivement les Fn protumorales grâce au mécanisme de reconnaissance précise des phages, tout en bloquant le recrutement des cellules immunitaires suppressives.

De plus, les phages sont hautement immunogènes et peuvent directement stimuler le système immunitaire de l'hôte grâce à leurs protéines d'enveloppe naïves, induisant ainsi la maturation des cellules dendritiques (DC) et favorisant l'activation du phénotype M1 des macrophages associés aux tumeurs (TAM) (Dong Xue et al., 2020).

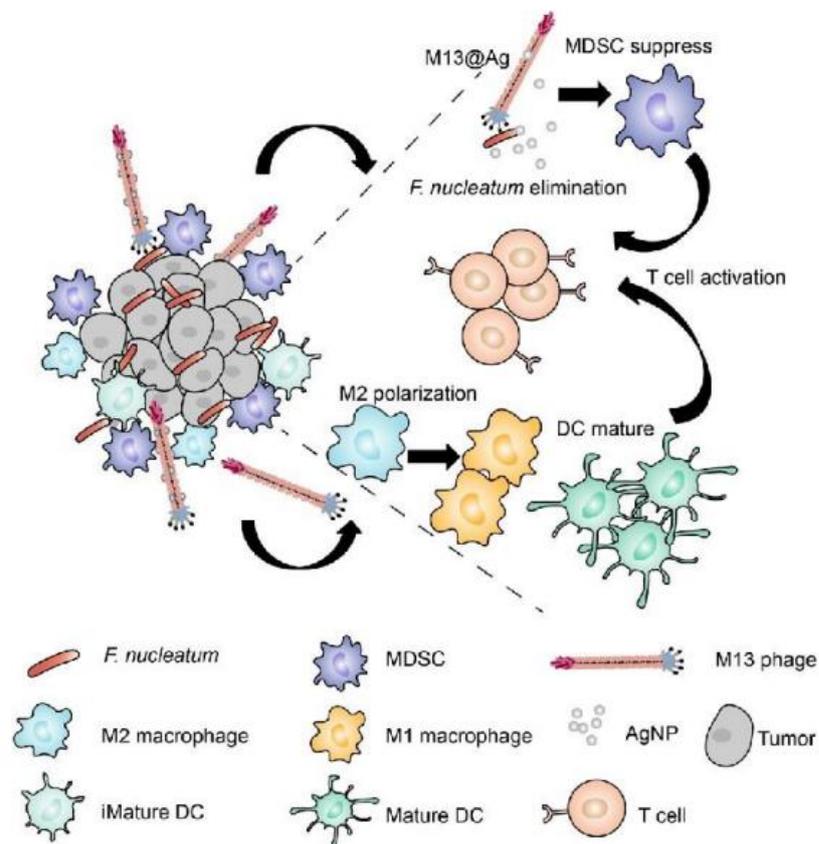


Figure 11: Illustration schématique du système hybride bio/abiotique à base de phages (M13@Ag) pour réguler les microbes intestinaux pour une thérapie immunitaire spécifique au cancer (Dong Xue et al., 2020)

II.2.7.2.2. Les vaccins à base de phages

Les vaccins à base de phages représentent une alternative puissante pour surmonter les limitations des vaccins conventionnels. Cette approche exploite les propriétés inhérentes des phages pour améliorer la stabilité et l'immunogénicité des antigènes présentés. Les vaccins à base de phages

peuvent être développés en utilisant des outils moléculaires avancés permettant la manipulation des génomes des phages à travers la technologie de présentation des phages, tirant parti des avancées en microbiologie, physiologie et immunologie. Bien que de nombreux vaccins à base de phages aient été développés pour des applications humaines, les applications vétérinaires gagnent en importance sur ce marché en raison de réglementations plus flexibles.

Dans ce contexte, la technologie des phages recombinants émerge comme une solution prometteuse pour surmonter les défis associés aux vaccins actuels. De plus, la demande croissante de nouveaux vaccins contre les agents pathogènes émergents peut être satisfaite grâce à l'approche des vaccins phagiques. Actuellement, deux principaux types de vaccins phagiques sont largement reconnus : (1) les vaccins à affichage sur phage et (2) les vaccins à ADN phage. La combinaison de ces deux stratégies a conduit au développement d'une troisième approche, (3) le vaccin à phage hybride (González-Mora et al., 2020).

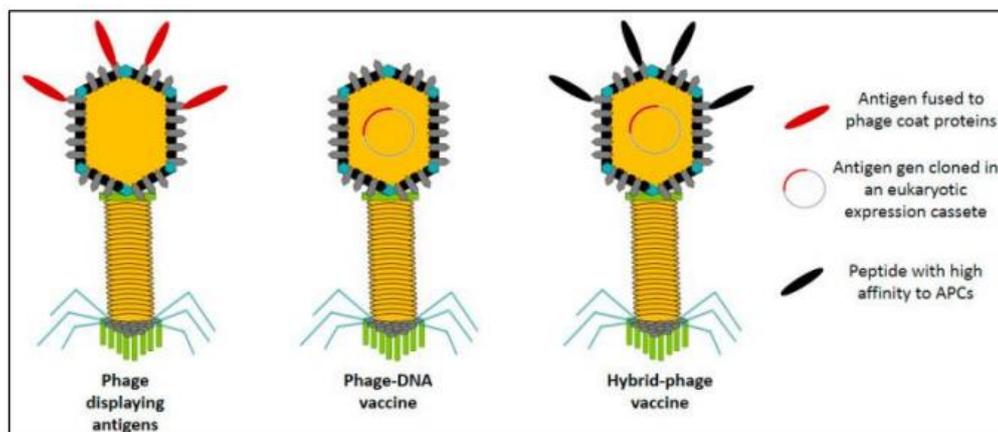


Figure 12: Principaux types de vaccins phagiques

PARTIE III. MATERIEL ET METHODES

Avec la montée alarmante des résistances bactériennes aux antibiotiques traditionnels, la recherche de nouvelles approches thérapeutiques est devenue cruciale. Une des stratégies prometteuses est l'utilisation des bactériophages, des virus spécifiques aux bactéries, pour cibler et éliminer les pathogènes résistants. La phagothérapie, qui tire parti de cette propriété unique des phages, offre une alternative ou un complément potentiellement efficace aux traitements antibiotiques classiques.

L'intérêt croissant pour la phagothérapie est renforcé par des études montrant que les phages peuvent agir en synergie avec des antibiotiques et des extraits de plantes, améliorant ainsi l'efficacité globale du traitement antimicrobien. Cette synergie pourrait non seulement maximiser l'efficacité de la thérapie, mais également réduire la probabilité de développement de résistances bactériennes.

Dans ce contexte, notre étude se concentre sur l'isolement de bactériophages spécifiques à partir de différentes sources, en vue d'étudier leur interaction avec des substances antimicrobiennes telles que les antibiotiques et les extraits de plantes. Le but ultime est de déterminer l'efficacité de ces combinaisons dans la lutte contre les bactéries à Gram-positif et Gram-négatif.

III.1. Provenance des échantillons

Des échantillons ont été prélevés à partir de trois sites distincts : la station d'épuration située à Ain El Hadjar, Saïda, l'oued El Oukrif, et le regard principal collecteur des eaux usées à Rebahia, Saïda. Les échantillons ont été collectés dans des flacons stériles de 200 ml. Immédiatement après les prélèvements, les échantillons ont été transportés au laboratoire de microbiologie de l'Université de Saïda Dr Moulay Tahar pour les analyses nécessaires.

III.2. Revivification des souches indicatrices

Pour la revivification des souches indicatrices, quelques colonies ont été prélevées et transférées dans des tubes à essai stériles contenant 5 ml de

bouillon nutritif préalablement préparé. Les tubes ont ensuite été incubés pendant 24 heures à 37 °C. Après cette période d'incubation, la présence de troubles dans le bouillon indique une croissance bactérienne.

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude comprennent *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Klebsiella*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter* et *Enterococcus*.



Figure 13: Repiquage des souches indicatrices

III.2.1. Vérification de la purification des souches indicatrices

Après incubation, à partir des pré-cultures sur bouillon nutritif, un deuxième repiquage sur gélose nutritive a été réalisé en utilisant une anse de platine. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24 heures. L'opération de purification a été renouvelée à deux reprises en prenant chaque fois une colonie bien isolée sur la gélose.

On obtient ainsi une culture dont la pureté est estimée par observation macroscopique et microscopique. Après purification, des répliques de ces isolats ont été conservées pour les analyses ultérieures.

III.2.1.1. Observation macroscopique

L'observation macroscopique des colonies bactériennes est une étape cruciale dans l'analyse microbiologique. Elle permet d'examiner visuellement les colonies cultivées sur milieu de culture, en évaluant leur taille, leur forme, leur couleur, leur texture et leur mode de croissance. Cette observation initiale est essentielle pour détecter des caractéristiques macroscopiques distinctives telles que l'aspect lisse ou rugueux des colonies, leur bordure et leur élévation.

III.2.1.2. Observation microscopique

La coloration de Gram est une étape clé dans l'identification des souches bactériennes. Elle permet de différencier les bactéries en Gram positif, qui apparaissent en violet, des bactéries en Gram négatif, qui apparaissent en rose. Cette coloration permet également de déterminer la forme des bactéries (bâtonnets, coques, etc.) et d'évaluer leur mode de regroupement selon la méthode classique. La coloration de Gram constitue donc une étape importante dans la caractérisation des bactéries (Boutadjine and Boultif, 2019).

III.2.1.2.1. Principe de la coloration de Gram

La coloration de Gram commence par la préparation de l'échantillon, où une goutte d'ED est déposée sur une lame stérile et une colonie est étalée. Ensuite, le violet de gentiane est appliqué pendant 30 secondes à 1 minute, suivi d'un rinçage à l'eau. Le mordantage est réalisé avec du lugol pour la même durée, puis rincé à l'eau déminéralisée. La décoloration rapide à l'alcool est cruciale et doit être surveillée attentivement ; un rinçage abondant à l'eau déminéralisée suit pour arrêter la décoloration. Enfin, la recoloration est effectuée avec de la fuchsine pendant 30 secondes à 1 minute, avant un lavage à l'eau déminéralisée et un séchage de la lame. L'observation se fait ensuite à l'aide d'une goutte d'huile à immersion sous un objectif 100 (grossissement $\times 1000$).

III.2.2. Conservation des souches

La conservation à court terme des souches pures est effectuée sur gélose nutritive inclinée. Après croissance à température optimale, les cultures sont maintenues à 4 °C (fig 13).

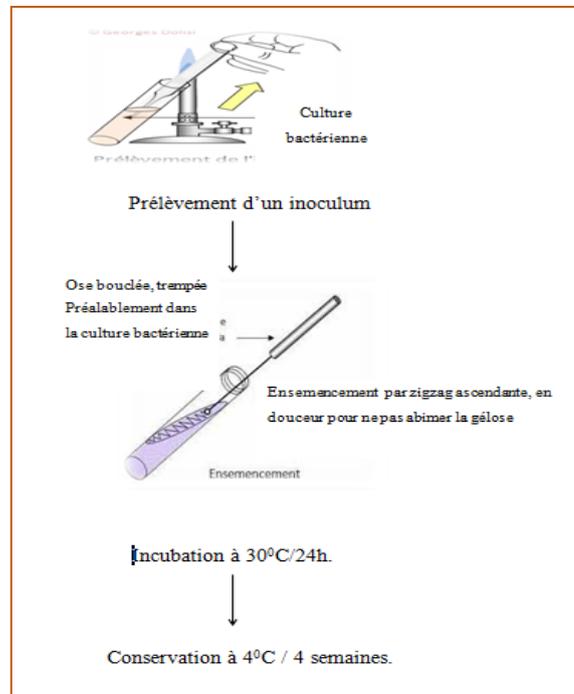


Figure 14: Schéma de conservation courte durée des bactéries purifiées

III.3. Procédure pour effectuer le test de diffusion de disque (Antibiogramme)

III.3.1. Inoculation de boîtes de test

L'inoculation des boîtes a été réalisée à l'aide d'un écouvillon stérile, la procédure a consisté de plonger l'écouvillon dans la suspension ajusté 15 minutes suivant l'étalonnage de la turbidité de l'inoculum à 0,5 MacFarland. L'écouvillon devait être tourné et pressé fortement contre la paroi interne du tube au-dessus du niveau de liquide, pour éliminer l'excès de l'inoculum.

La surface séchée d'une boîte de gélose MH a été inoculée en étalant l'écouvillon sur toute la surface de la gélose stérile. Cette procédure a été répétée en stries deux fois, en faisant tourner la boîte d'environ 60° à chaque fois pour assurer une distribution uniforme de l'inoculum.

Le couvercle peut être laissé entrouvert pendant 3 à 5 minutes, mais pas plus de 15 minutes, afin de permettre l'absorption de l'excès d'humidité superficielle avant l'application des disques imprégnés d'antibiotiques.

III.3.2. Application de disques sur des boîtes d'agar inoculées

Les disques d'antibiotiques (Tableau 2) ont ensuite été distribués à la surface de la boîte inoculée. Chaque disque a été enfoncé pour assurer un contact complet avec la surface de la gélose. Que les disques aient été placés individuellement ou avec un dispositif de distribution, ils ont été répartis uniformément de manière qu'ils ne soient pas inférieurs à 24 mm de centre à centre. Normalement, il ne faut pas placer plus de 5 disques sur une boîte de 100 mm.

Les boîtes ont été inversées (couvercle vers le bas) et placées dans un incubateur réglé à 37°C dans les 15 minutes suivant l'application des disques.

III.3.3. Lecture de boîtes et interprétation des résultats

Après 16 à 18 heures d'incubation, les zones d'inhibitions ont été mesurées au millimètre près, à l'aide d'une règle.

Les diamètres des zones d'inhibition ont été interprétés en se référant aux diamètres discriminants fixés par CLSI M100-S (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2012).

Tableau 3: Les antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme

Symbole	Antibiotique	Famille	La charge de disque par µg
AUG	Amoxicilline +acide clavulanique	Bêta-lactamines	30
CAZ	Ceftazidime	Bêta-lactamines	30
IMP	Imipenème	Bêta-lactamines	10
C	Chloramphénicol	Phénicoles	30
CN	Gentamicine	Aminoglycosides	10
SXT	Sulfaméthoxazole/Triméthopri me	Sulfamides	25
TE	Tétracycline	Cycline	30

III.4. Recherche de bactériophages

Les bactériophages capables d'infecter diverses espèces de bactéries et de mettre en évidence leur effet antibactérien naturel comparable à celui d'un antibiotique. Les bactériophages sont isolés à partir d'échantillons d'eaux usées, incubés avec la bactérie cible pour être ensuite sélectionnés selon leur capacité d'amplification.

III.4.1. Isolement des bactériophages

Les bactériophages sont isolés à partir d'échantillons d'eaux usées. Tout d'abord, 100 μL d'échantillon sont mis en contact avec la bactérie cible (500 μL) dans 5 mL de milieu Luria-Bertani (LB) 10 fois concentré à 37°C pendant toute la nuit. Ensuite, l'échantillon amplifié est centrifugé pendant 10 minutes à 6000 tours/minute. Le surnageant est filtré à l'aide d'un filtre de porosité de 0,45 μm . Une série de dilutions à moitié est préparée dans du CaCl_2 à une concentration de 11 g/L.

III.4.1. Ensemencement en double couche et inoculation des bactériophages

15 mL d'agar Mueller-Hinton ou de gélose nutritive sont versés dans une boîte de Petri stérile. Après solidification, la boîte est divisée en quatre parties égales. Trois secteurs sont destinés à recevoir les échantillons individuels, tandis que le quatrième secteur est réservé au mélange des trois extraits d'échantillons. Ensuite, à l'aide d'une micropipette, 20 μL de chaque dilution du filtrat de bactériophage sont déposés lentement dans chaque secteur préalablement marqué de la boîte de Petri, puis laissés à sécher à la surface de l'agar. Simultanément, un inoculum est préparé à partir du bouillon de culture incubé pendant 16 heures, en utilisant les mêmes bactéries que celles employées lors de l'étape d'enrichissement. 200 μL de cette suspension sont prélevés et ajoutés à 12 mL d'agar Mueller-Hinton ou gélose nutritive fondu à environ 50°C, puis mélangés rapidement par inversion du tube. Cette solution est ensuite versée immédiatement sur la première couche d'agar dans la boîte de Petri et laissée à refroidir. Enfin, les boîtes de Petri sont inversées et

placées dans un incubateur à 37°C pendant 24 heures afin de permettre la formation de plages de lyse (Droguet, 2021).



Figure 15: Etapes d'isolement des bactériophages

III.5. Test de synergie bactériophage substances antimicrobiennes

Le but de cette partie consiste à évaluer l'efficacité combinée des bactériophages isolés précédemment avec des substances antimicrobiennes, telles que les antibiotiques et les extraits de plantes. Pour cette étude, nous

avons utilisé l'amoxicilline, un antibiotique de la famille des β -lactamines, ainsi que des extraits de plantes de la variété *Urtica urens* (ortie brûlante).

III.5.1. Synergie bactériophages substances antimicrobiennes

III.5.1.1. Préparation de la Solution d'Antibiotique

La préparation de la solution d'antibiotique commence à partir de la poudre d'amoxicilline. La solution mère est obtenue en mélangeant 1 g d'amoxicilline avec 5 mL d'eau distillée stérile, ce qui donne une concentration de 2×10^5 $\mu\text{g/mL}$. À partir de cette solution mère, une dilution est effectuée pour obtenir une solution d'antibiotique à une concentration de 3×10^3 $\mu\text{g/mL}$. Ensuite, 10 μL de cette solution contiendront 30 μg d'antibiotique, correspondant à la même concentration que celle trouvée dans les disques d'antibiogramme.

III.5.1.2. Préparation des extraits de *Urtica urens*

La préparation des extraits de deux variétés de la plante *Urtica urens* a été réalisée selon la méthode décrite par Herhira et al. (2024). Le processus débute par un nettoyage méticuleux pour éliminer les impuretés, suivi du séchage des plantes fraîches à basse température jusqu'à déshydratation complète. Les plantes séchées sont ensuite réduites en fine poudre à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Pour l'extraction, 10 g de poudre de plante sont pesés et placés dans un flacon, auquel est ajouté 100 mL de solvant d'extraction. Après un mélange vigoureux, le mélange macère pendant 24 à 48 heures à température ambiante, avec agitation régulière. Le filtrat est ensuite clarifié à travers un papier filtre pour éliminer les particules solides, et éventuellement soumis à un second filtrage pour obtenir un extrait limpide. L'extrait est concentré sous vide à basse température à l'aide d'un évaporateur évaporation douce au bain-marie. Enfin, l'extrait concentré est conservé dans des flacons ambrés à 4°C jusqu'à son utilisation ultérieure, assurant ainsi sa préservation et sa stabilité.

III.5.1.3. Méthode de Synergie entre Bactériophages et Substances Antimicrobiennes

Pour cette partie, 15 mL d'agar Mueller-Hinton ou de gélose nutritive sont coulés dans une boîte de Petri stérile et laissés à solidifier. Une fois solidifié, la boîte est divisée en six parties égales. Trois secteurs sont réservés pour recevoir individuellement des substances antimicrobiennes (amoxicilline, 1^{er} extrait de *Urtica urens* et 2^{ème} extrait de *Urtica urens* de l'autre variante), tandis que les trois autres secteurs sont destinés à recevoir un mélange de substances antimicrobiennes avec des bactériophages, chaque secteur étant préalablement marqué. Dans les secteurs témoins, 10 µL d'eau distillée stérile sont ajoutés. Simultanément, un inoculum est préparé à partir d'un bouillon de culture incubé pendant 16 heures, en utilisant les mêmes bactéries que celles employées lors de l'étape l'isolement des bactériophages. 200 µL de cette suspension sont prélevés et ajoutés à 12 mL d'agar Mueller-Hinton ou de gélose nutritive fondu à environ 50°C, puis mélangés vigoureusement par inversion du tube. Cette solution est immédiatement versée sur la première couche d'agar dans la boîte de Petri et laissée à refroidir. Les boîtes de Petri sont ensuite inversées et placées dans un incubateur à 37°C pendant 24 heures afin de permettre la formation de zones de lyse, évaluant ainsi la synergie entre les bactériophages et les substances antimicrobiennes (Droguet, 2021).

PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION

L'objectif de cette étude est de mener un isolement des bactériophages ciblant les principales souches pathogènes bactériennes, et d'explorer l'effet synergique potentiel entre les phages isolés et diverses substances antimicrobiennes, notamment l'amoxicilline et les extraits de la plante *Urtica urens*.

La première étape cruciale de cette étude consiste à isoler les bactériophages à partir de différentes sources d'échantillons, telles que les eaux usées et les eaux de l'oued. Ce processus d'isolement implique la collecte d'échantillons d'eaux usées de divers sites, suivie de l'enrichissement et de la purification des phages pour cibler spécifiquement les souches bactériennes pathogènes comme *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter*, et *Enterococcus*.

Une fois isolés, les phages sont combinés avec des substances antimicrobiennes dans des tests de synergie. L'amoxicilline, un antibiotique de la famille des β -lactamines, et les extraits de *Urtica urens*, connue pour ses propriétés médicinales, sont sélectionnés pour ces tests.

IV.1. Revivification et contrôle de la pureté des souches indicatrices

IV.1.1. Examen macroscopique des colonies

La pureté des cultures a été vérifiée en effectuant des repiquages successifs sur gélose GN, suivis d'une incubation à 37 °C pendant 24 heures. Cette étape a été répétée jusqu'à ce que des colonies présentant une taille, une forme et une couleur identiques soient obtenues, ce qui témoigne de la pureté des souches bactériennes (fig 16) (Idoui et al., 2009). Cette méthode est essentielle pour garantir que les tests ultérieurs sont réalisés sur des cultures bactériennes homogènes et non contaminées par d'autres microorganismes. La précision de cette étape est cruciale, car une culture pure permet d'obtenir des résultats reproductibles et fiables lors des essais de sensibilité aux antimicrobiens et de la synergie avec les bactériophages.

IV.1.2. Examen microscopique des souches

Les souches indicatrices obtenues à partir de la gélose GN ont été examinées au microscope optique après coloration de Gram avec un grossissement de 1000x. Les bactéries *E. coli*, *Klebsiella* et *Acinetobacter* observées étaient de couleur rose, indiquant qu'elles ne retiennent pas la coloration de Gram (fig 17). Ces résultats sont cohérents avec les caractéristiques des bactéries à Gram négatif, qui possèdent une paroi cellulaire plus fine avec une couche de peptidoglycane réduite, entourée d'une membrane externe riche en lipopolysaccharides (Beveridge, 2001). Les observations montrent également que ces bactéries peuvent être isolées ou regroupées en paires ou en chaînes, présentant des formes de coccobacilles ou de bacilles.

En revanche, les bactéries *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Enterococcus* étaient de couleur violette et retenaient la coloration de Gram, ce qui est typique des bactéries à Gram positif. Ces bactéries possèdent une paroi cellulaire épaisse riche en peptidoglycane, ce qui leur permet de retenir le colorant violet de la coloration de Gram (Madigan et al., 2009). Les formes observées étaient des cocci ou ovoïdes pour *Staphylococcus* et *Enterococcus*, et des bacilles pour *Listeria*, ce qui est conforme aux descriptions morphologiques de ces bactéries. Un exemple de l'aspect microscopique de *Listeria* présenté dans la figure 17. Les différences observées entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif sont en accord avec les structures de leurs parois cellulaires respectives, ce qui a des implications importantes pour la sensibilité aux antibiotiques et l'action des bactériophages. Par exemple, les bactéries à Gram négatif, avec leur membrane externe, peuvent être plus résistantes à certains antibiotiques en raison de la barrière supplémentaire qu'elle représente (Nikaido, 2003). En revanche, les bactéries à Gram positif, avec leur épaisse couche de

peptidoglycane, peuvent être plus susceptibles à la lyse par les enzymes lytiques des phages (Schmelcher et al., 2012).



Figure 16: Aspect des colonies sur GN :(a) *E. coli* (b) *Bacillus subtilis*



Figure 17 : Aspect microscopique de *Listeria* au grossissement X 1000

IV.2. Détermination des profils de résistance aux antibiotiques (Antibiogramme)

Après 24 heures d'incubation, le diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne est mesuré pour chaque antibiotique, permettant ainsi de déterminer la sensibilité des germes. Les résultats obtenus sont ensuite comparés aux valeurs critiques afin de classer les souches en trois catégories : Sensible (S), Résistante (R) et Intermédiaire (I). Cette classification, basée sur la taille de la zone d'inhibition, permet de déterminer si les germes sont sensibles, résistants ou ont une sensibilité intermédiaire à l'antibiotique testé.

Un exemple de résultat de l'antibiogramme est présenté dans la figure 18, tandis que les résultats de l'antibiogramme sont résumés dans le tableau 3.

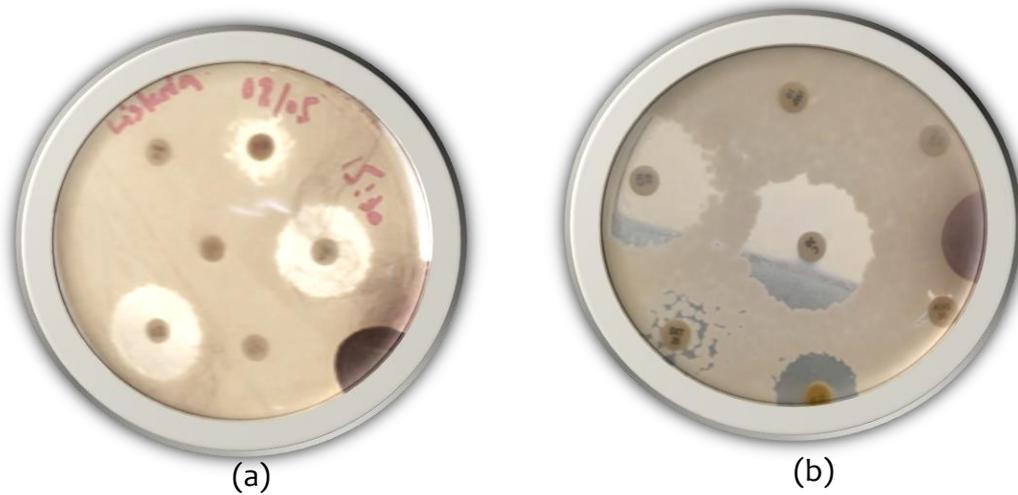


Figure 18 : Résultat de l'antibiogramme de *Listeria* (a) et *Klebsiella* (b)

Tableau 4 : Profil de résistance et de sensibilité des souches indicatrices

	TE	C	CN	CAZ	AUG	IMP	SXT
<i>Listeria monocytogenes</i>	R	S	S	R	R	R	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	R	R	S
<i>Bacillus subtilis</i>	S	S	I	S	R	R	R
<i>Klebsiella</i>	I	S	S	R	R	R	R
<i>Acinetobacter</i>	S	R	S	R	R	I	R

Les classifications (R, I, S) sont basées sur les standards typiques du CLSI, où "R" signifie résistant, "I" intermédiaire, et "S" sensible.

Listeria monocytogenes montre une résistance élevée aux antibiotiques couramment utilisés, sauf pour le Chloramphénicol (C) et la Gentamicine (CN), où elle est sensible. Cette résistance élevée est préoccupante car elle limite les options de traitement efficaces. Selon Harakeh et al. (2009), la résistance aux β -lactamines est courante chez *Listeria* en raison de la présence de gènes de résistance spécifiques.

Staphylococcus aureus montre une sensibilité à la plupart des antibiotiques testés, sauf pour l'Amoxicilline/Clavulanate (AUG) et l'Imipénème (IMP). Cela suggère que les β -lactamines peuvent ne pas être efficaces, mais d'autres options comme la Tétracycline (TE) et la Gentamicine (CN) restent viables. Cette observation est en accord avec les études de Chambers et DeLeo (2009), qui indiquent que les souches de *S. aureus* peuvent développer une résistance aux carbapénèmes et aux combinaisons de β -lactamines avec des inhibiteurs de β -lactamase.

Bacillus subtilis est principalement sensible à la Tétracycline (TE), au Chloramphénicol (C), et à la Ceftazidime (CAZ), mais montre une résistance à l'Amoxicilline/Clavulanate (AUG), l'Imipénème (IMP) et le Sulfaméthoxazole/Triméthoprim (SXT). La sensibilité intermédiaire à la Gentamicine (CN) peut limiter son efficacité, ce qui est conforme aux observations de Earl et al. (2008), qui décrivent des mécanismes de résistance spécifiques aux antibiotiques chez *Bacillus*.

Klebsiella monocytogenes montre une sensibilité au Chloramphénicol (C) et à la Gentamicine (CN), mais une résistance élevée aux autres antibiotiques, y compris les β -lactamines et les carbapénèmes, ce qui est préoccupant et limite les options de traitement. Cette résistance élevée est souvent due à la production de β -lactamases à spectre étendu (ESBL) et de carbapénémases (Nordmann et Poirel, 2002).

Acinetobacter montre une résistance élevée à la majorité des antibiotiques testés, avec une sensibilité uniquement à la Tétracycline (TE) et à la Gentamicine (CN). L'imipénème (IMP) montre une sensibilité intermédiaire, ce qui peut nécessiter des doses ajustées pour être efficace. La résistance multiple observée est en accord avec les études de Peleg et Seifert (2008), qui soulignent la capacité d'*Acinetobacter* à acquérir des résistances par divers mécanismes, incluant l'efflux actif et la modification des cibles.

Les résultats révèlent une diversité dans les profils de résistance des différentes souches bactériennes. Tandis que certaines souches comme

Staphylococcus et *Bacillus* montrent une bonne sensibilité à plusieurs antibiotiques, d'autres comme *Klebsiella* et *Acinetobacter* posent des défis significatifs en raison de leur résistance élevée. Ces profils de résistance soulignent l'importance de la surveillance continue des résistances antibiotiques et l'exploration de thérapies combinées, telles que l'utilisation de bactériophages en synergie avec des antibiotiques, pour gérer les infections bactériennes résistantes.

IV.3. La recherche de bactériophages

Les bactériophages sont des agents antimicrobiens naturels qui peuvent être utilisés dans le cadre de thérapies phagiques pour cibler spécifiquement certaines souches bactériennes. Les résultats obtenus dans cette étude soutiennent l'idée que les bactériophages ont un potentiel d'efficacité contre ces souches bactériennes.

Les bactériophages ont été isolés à partir d'échantillons d'eaux usées prélevés dans trois sites distincts : l'échantillon 1 provenant de la station d'épuration située à Ain El Hadjar, Saïda, l'échantillon 2 de l'oued El Oukrif, et l'échantillon 3 du regard principal collecteur des eaux usées à Rebahia, Saïda. Ces échantillons ont été utilisés dans cette étude pour cibler différentes souches bactériennes de référence, notamment *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Klebsiella*, et *Acinetobacter*. La figure présentée ci-dessous illustre les résultats des tests de lyse des bactériophages spécifiques à *Listeria*.

Tableau 5 : Résultats de la lyse spécifique des bactériophages issus de différents échantillons contre les différentes souches testées

Bactérie	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Cocktails des phages
<i>Bacillus subtilis</i>	07 mm	09 mm	07 mm	10 mm
<i>E. coli</i>	11 mm	10 mm	10 mm	06 mm
<i>Listeria monocytogenes</i>	0 mm	0 mm	0 mm	08 mm
<i>Klebsiella</i>	09 mm	08 mm	0 mm	07 mm
<i>Acinetobacter</i>	10 mm	04 mm	06 mm	07 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

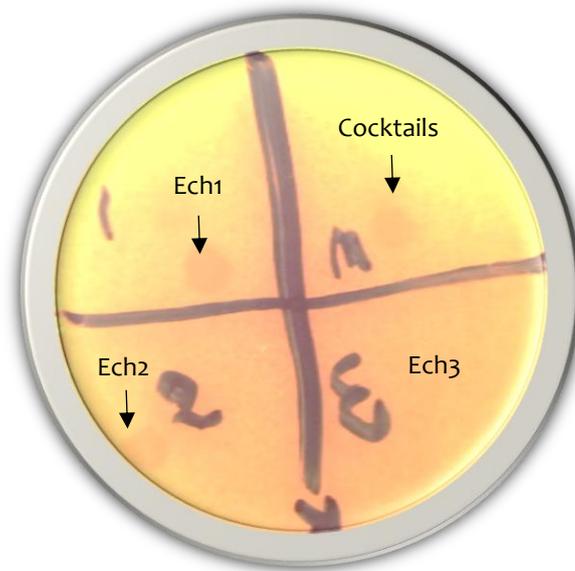


Figure 19: Résultats de la lyse des bactériophages spécifiques à *Listeria*

IV.3.1. *Bacillus subtilis* :

Les plages de lyse pour *Bacillus subtilis* varient de 7 mm à 10 mm, indiquant que les bactériophages ont une activité lytique modérée contre cette bactérie. L'efficacité légèrement supérieure dans le mélange des échantillons (10 mm) suggère que la combinaison de phages provenant de différents échantillons peut améliorer l'activité lytique. Ces résultats sont cohérents avec des études antérieures qui ont démontré que les cocktails de phages peuvent parfois être plus efficaces que des phages individuels en raison de la diversité génétique accrue (Chan et Abedon, 2012).

IV.3.2. *E. coli* :

Les diamètres des plages de lyse pour *E. coli* sont assez constants (10-11 mm) dans les échantillons individuels, mais une réduction notable (6 mm) est observée dans le mélange des échantillons. Cela pourrait suggérer une interaction défavorable ou une compétition entre les phages. Cette observation est soutenue par des recherches montrant que les phages peuvent interagir de manière complexe, parfois réduisant l'efficacité globale lorsque combinés (Schmerer et al., 2014).

IV.3.3. *Listeria monocytogenes* :

Aucune plage de lyse n'est observée dans les échantillons individuels pour *Listeria monocytogenes*, mais une plage de 8 mm apparaît dans le mélange des échantillons. Cela suggère que la combinaison de phages dans le mélange est nécessaire pour lyser cette bactérie, ce qui peut être dû à la complémentarité des phages contre différentes cibles ou mécanismes de résistance (Carlton et al., 2005).

IV.3.4. *Klebsiella* :

Les diamètres des plages de lyse pour *Klebsiella* varient, avec aucune activité lytique observée dans l'échantillon 3. La présence de plages de lyse dans les autres échantillons (7-9 mm) indique une activité lytique variable des phages contre *Klebsiella*. Cette variabilité peut être due à la diversité génétique des phages et des souches bactériennes, affectant l'efficacité des phages (Domingo-Calap et al., 2016).

IV.3.5. *Acinetobacter* :

Les plages de lyse pour *Acinetobacter* vont de 4 mm à 10 mm, avec une activité lytique la plus faible observée dans l'échantillon 2. Les phages montrent une efficacité modérée contre *Acinetobacter*, avec une variation notable entre les échantillons. Ces variations peuvent être expliquées par des différences dans la concentration de phages ou des facteurs environnementaux influençant l'activité phagique (Chan et Abedon, 2012).

IV.3.6. *Staphylococcus aureus* :

L'absence de zones d'inhibition pour *Staphylococcus aureus* dans nos échantillons indique que les bactériophages spécifiques à cette souche n'ont pas été présents ou suffisamment concentrés pour être détectés. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce résultat :

Source et diversité des échantillons : Les échantillons d'eaux usées collectés peuvent ne pas contenir de bactériophages actifs contre *Staphylococcus aureus*. La diversité et la concentration de phages dans un

environnement donné peuvent varier considérablement en fonction de plusieurs facteurs, tels que la source de l'échantillon et les conditions environnementales (Abedon et al., 2011).

Caractéristiques spécifiques des phages : Les bactériophages ont des spectres d'hôtes spécifiques. Il se peut que les phages présents dans nos échantillons soient spécifiques à d'autres bactéries et ne soient pas capables d'infecter *Staphylococcus aureus*. La spécificité des phages est souvent déterminée par les récepteurs bactériens auxquels ils se lient (Hyman & Abedon, 2010).

Concentration de phages : La concentration de phages dans les échantillons peut ne pas être suffisante pour produire une zone d'inhibition visible. Dans certains cas, les phages peuvent être présents en nombre trop faible pour détecter une activité lytique visible sur les plaques de culture (Salmond & Fineran, 2015).

Résistance des bactéries : *Staphylococcus aureus* peut également posséder des mécanismes de résistance aux phages. Les bactéries peuvent évoluer pour devenir résistantes aux phages par diverses stratégies, comme la modification des récepteurs de surface, la production d'enzymes antibactériens, et d'autres mécanismes de défense (Labrie et al., 2010).

Les résultats indiquent que l'efficacité des bactériophages varie en fonction des souches bactériennes et des échantillons utilisés. Le mélange des échantillons semble parfois améliorer l'activité lytique, notamment contre *Listeria monocytogenes*. Cependant, pour *E. coli*, le mélange semble réduire l'efficacité des phages, suggérant des interactions complexes qui méritent une étude plus approfondie. Ces observations soulignent l'importance de la sélection et de l'optimisation des cocktails de phages pour maximiser leur efficacité contre des souches bactériennes spécifiques.

IV.4. Résultat de la synergie phages et substances antimicrobiennes

Dans cette partie de l'étude, notre objectif était d'évaluer la synergie entre les bactériophages et des substances antimicrobiennes telles que

l'amoxicilline, faisant partie des β -lactamines. Les β -lactamines agissent en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne en ciblant les protéines de liaison à la pénicilline (PBP). Cette action affaiblit la paroi cellulaire, conduisant à la lyse bactérienne. La combinaison de l'action des bactériophages et des β -lactamines crée une pression sélective accrue sur les bactéries, améliorant ainsi l'efficacité globale du traitement. Les bactéries affaiblies par les β -lactamines sont plus susceptibles d'être lysées par les phages, et vice versa.

Nous avons également évalué la synergie entre les bactériophages et les extraits de la plante *Urtica urens*. Ces extraits possèdent des propriétés inhibitrices contre les bactéries, pouvant perturber la membrane cellulaire, interférer avec la synthèse de la paroi cellulaire ou induire la production de radicaux libres intracellulaires. Ces effets peuvent favoriser la lyse bactérienne par les bactériophages en compromettant la structure et le fonctionnement cellulaires des bactéries cibles.

La figure présentée ci-dessous illustre les résultats des tests de synergie entre les bactériophages spécifiques à *Klebsiella*, l'amoxicilline et les extraits d'*Urtica urens*.

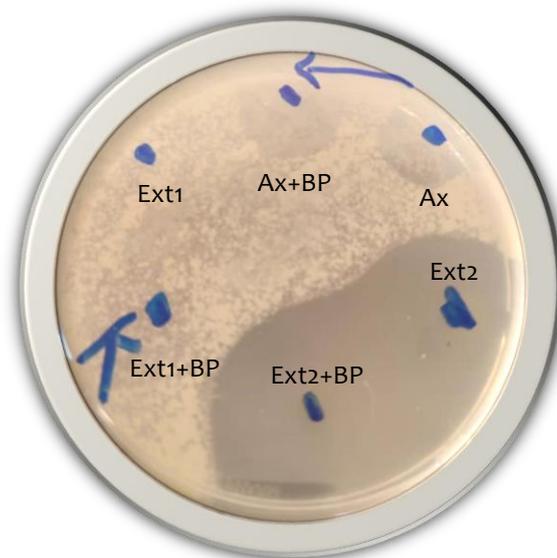


Figure 20: Résultats des tests de synergie entre les bactériophages spécifiques à *Klebsiella*, l'amoxicilline et les extraits d'*Urtica urens*

Ax : Amoxicilline ; BP : Bactériophage ; Ext1 : Extrait 1 d'*Urtica urens* ; Ext2 : Extrait 2 d'*Urtica urens*.

Les résultats des tests de synergie entre les bactériophages, l'amoxicilline et les extraits d'*Urtica urens* sont présentés dans le tableau ci-après.

Tableau 6: Résultats des tests de synergie

Bactérie	BP	Ax	Ax+BP	Ext1	Ext1+BP	Ext2	Ext2+BP
<i>E. coli</i>	06 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	30 mm	40 mm
<i>Klebsiella</i>	9 mm	20 mm	24 mm	30 mm	36 mm	0 mm	0 mm
<i>Bacillus subtilis</i>	10 mm	22 mm	10 mm	0 mm	0 mm	18 mm	36 mm
<i>Listeria monocytogenes</i>	8 mm	16 mm	20 mm	15 mm	15 mm	0 mm	0 mm
<i>Acinetobacter</i>	10 mm	9 mm	0 mm	0 mm	0 mm	40 mm	40 mm

Ax : Amoxicilline ; BP : Bactériophage ; Ext1 : Extrait 1 d'*Urtica urens* ; Ext2 : Extrait 2 d'*Urtica urens*

IV.4.1. *E. coli* :

L'absence de synergie entre les phages et l'amoxicilline (Ax) pour *E. coli* pourrait être due à la nature de résistance intrinsèque de la souche à ce β -lactamine, comme décrit par Tamma et al. (2019). En revanche, l'extrait 2 (Ext2) d'*Urtica urens* a montré une forte activité antimicrobienne, potentiellement due à la présence de composés bioactifs comme les flavonoïdes et les tanins qui perturbent la membrane cellulaire bactérienne (Cushnie & Lamb, 2011). De plus, l'extrait 2 d'*Urtica urens* montre une activité antibactérienne significative, tant seul qu'en combinaison avec le bactériophage. La synergie observée avec le bactériophage suggère que cet extrait pourrait contenir des composés qui facilitent l'action du bactériophage, ouvrant des perspectives intéressantes pour des traitements combinés. Cependant, un résultat inexplicable a été observé : bien que le bactériophage seul ait montré une activité modeste contre *E. coli*, la

combinaison du bactériophage avec l'amoxicilline a montré une absence totale d'activité (0 mm). Cela pourrait suggérer une interaction antagoniste entre l'amoxicilline et le bactériophage ou une inactivation du bactériophage en présence de l'antibiotique.

IV.4.2. *Klebsiella* :

La synergie entre Ax et les phages pour *Klebsiella* montre une légère augmentation de l'inhibition, ce qui peut s'expliquer par une action combinée sur la paroi cellulaire et la lyse phagique (Torres-Barceló, 2018). L'extrait 1 (Ext1) d'*Urtica urens* a montré une forte activité, possiblement en perturbant la membrane cellulaire ou en inhibant la synthèse de la paroi (Biswas et al., 2012).

IV.4.3. *Bacillus subtilis* :

Pour *Bacillus*, la synergie entre Ext2 et les phages est particulièrement notable. Les composants de *Urtica urens* dans Ext2 peuvent augmenter la perméabilité cellulaire, facilitant l'accès des phages (Mookherjee et al., 2017). La faible synergie entre Ax et les phages pourrait indiquer une résistance partielle ou des interactions antagonistes.

IV.4.4. *Listeria monocytogenes* :

La synergie entre Ax et les phages pour *Listeria* indique une augmentation modérée de l'inhibition, ce qui pourrait être dû à l'action combinée sur la paroi cellulaire et l'effet lytique des phages (Lood et al., 2015). L'absence de synergie avec Ext2 peut être attribuée à l'inefficacité des composants actifs d'*Urtica urens* contre cette souche spécifique.

IV.4.5. *Acinetobacter*

Pour *Acinetobacter*, Ext2 montre une synergie significative avec les phages, suggérant que les composants de Ext2 améliorent l'accès des phages aux cellules bactériennes (Górski et al., 2019). L'absence de synergie entre Ax et les phages pourrait indiquer une résistance complète ou des interactions antagonistes.

Les résultats de cette étude montrent que la synergie entre les bactériophages et les substances antimicrobiennes varie selon les souches bactériennes et les agents antimicrobiens utilisés. Les combinaisons de phages avec l'amoxicilline ont montré des synergies pour certaines souches comme *Klebsiella* et *Listeria*, mais pas pour d'autres comme *E. coli* et *Acinetobacter*. Cela pourrait être dû à la spécificité des mécanismes d'action des phages et des antibiotiques, ainsi qu'à la résistance intrinsèque des bactéries.

Les extraits d'*Urtica urens* ont révélé des synergies intéressantes, en particulier Ext1 pour *Acinetobacter* et Ext2 pour *Bacillus*. Les composés bioactifs présents dans *Urtica urens* semblent jouer un rôle crucial dans l'amélioration de l'efficacité des phages, probablement en augmentant la perméabilité cellulaire ou en induisant des stress oxydatifs (Agyare et al., 2016).

Ces résultats suggèrent que les thérapies combinées utilisant des phages et des substances antimicrobiennes pourraient offrir une solution efficace pour traiter les infections bactériennes, y compris celles résistantes aux antibiotiques. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces synergies et pour optimiser ces combinaisons pour une application clinique.

PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Cette étude a exploré le potentiel des bactériophages en tant qu'agents antimicrobiens et leur synergie avec d'autres substances antimicrobiennes comme l'amoxicilline et les extraits de plantes d'*Urtica urens*. Nos résultats montrent une variation significative de l'efficacité des bactériophages selon les souches bactériennes et les échantillons utilisés, mettant en évidence l'importance de la source des phages et de la composition du milieu.

Les bactériophages isolés ont montré une activité lytique notable contre diverses souches bactériennes, avec une efficacité variable. Les tests de lyse ont démontré que les phages isolés pouvaient lyser *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Klebsiella* et *Acinetobacter*, bien que l'efficacité variait entre les échantillons et les combinaisons d'échantillons. Notamment, une combinaison d'échantillons a été nécessaire pour observer une activité lytique contre *Listeria monocytogenes*, soulignant l'importance des mélanges de phages pour certaines souches.

Les tests de synergie ont révélé que l'association des bactériophages avec l'amoxicilline et les extraits d'*Urtica urens* pouvait améliorer l'efficacité antimicrobienne. Par exemple, la combinaison de phages avec l'amoxicilline a montré une synergie significative contre *Klebsiella*, *Bacillus* et *Listeria*. De même, certains extraits de plantes ont amplifié l'effet lytique des phages, en particulier contre *Acinetobacter*.

Ces résultats soutiennent l'idée que la thérapie phagique, seule ou en combinaison avec des antibiotiques ou des extraits de plantes, représente une stratégie prometteuse pour lutter contre les infections bactériennes, y compris celles causées par des souches résistantes aux antibiotiques. Cependant, l'efficacité variable des bactériophages selon les souches et les conditions expérimentales souligne la nécessité de poursuivre les recherches pour optimiser l'utilisation des phages et des combinaisons thérapeutiques.

Comme perspectives, il est crucial de développer des cocktails de phages efficaces contre un large éventail de souches bactériennes, en tenant

compte des interactions potentielles entre les phages. Les résultats in vitro doivent être validés par des études cliniques et des essais sur des modèles animaux pour évaluer l'efficacité et la sécurité des thérapies combinées. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes de résistance des bactéries aux phages et développer des stratégies pour surmonter cette résistance. En plus des applications médicales, les phages peuvent être utilisés dans l'industrie agroalimentaire et la gestion des eaux usées pour contrôler les bactéries pathogènes. En résumé, cette étude met en lumière le potentiel des bactériophages et des combinaisons antimicrobiennes comme outils efficaces pour lutter contre les infections bactériennes, ouvrant la voie à de nouvelles approches dans la gestion des infections résistantes aux antibiotiques.

PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Abedon, S. T., Et Al. (2011). Phage Therapy Pharmacology: Phage Cocktails. *Advances In Applied Microbiology*, 78, 1-23.
2. Abedon, ST, 2009. Phage Evolution And Ecology. *Advances In Applied Microbiology* DOI: 10.1016/S0065-2164(08)01001-0.
3. Alberts, B, Johnson, A, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K. Et Walter, P,2002 . The Life Cycle Of Bacteriophage Lambda." Dans *Molecular Biology Of The Cell* (4th Ed.). New York, NY: Garland.
4. Ait-Mouhoub, S. E. (2015). L'automédication Aux Antibiotiques En Médecine Générale : Etude Quantitative Auprès De Patients.
5. Ansaldi, M., Boulanger, P., Brives, Ch., Debarbieux, L., Dufour, N., Froissart, R., Gandon, S., Le Hénaff, C., Petit, M-A., Rocha, E., Et Al, 2020. Les Applications Antibactériennes Desbactériophages. 24, Pp.23-36. <https://Hal.Archives-Ouvertes.Fr/Hal-02530998>.
6. Agyare, C., Boakye, Y. D., Bekoe, E. O., Hensel, A., Dapaah, S. O., & Appiah, T. (2016). Review: African Medicinal Plants With Wound Healing Properties. *Journal Of Ethnopharmacology*, 177, 85-100.
7. (Aminov, R. I. (2010). A Brief History Of The Antibiotic Era: Lessons Learned And Challenges For The Future. *Frontiers In Microbiology*, 1, 134.
8. ALEKSHUN M.N., LEVY S.B. Molecular Mechanisms Of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*, 2007, 128, 1037-1050 ; NIKAIDO H. Multidrug Resistance In Bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, 2009, 78, 119-146.
9. Alberts, B, Johnson, A, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K. Et Walter, P,2002 . The Life Cycle Of Bacteriophage Lambda." Dans *Molecular Biology Of The Cell* (4th Ed.). New York, NY: Garland.
10. Azmoun S. (2016). Epidémiologie De La Résistance Bactérienne Aux Antibiotiques Au CHU Demarrakech. Thèse De Doctorat En Médecine. Université Cadi Ayyad De Marrakech. 117pp.

11. Beveridge, T. J. (2001). Use Of The Gram Stain In Microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, 76(3), 111-118.
12. Biswas, B., Adhya, S., Washart, P., Paul, B., Trostel, A. N., Powell, B., ... & Merrill, C. R. (2002). Bacteriophage Therapy Rescues Mice Bacteremic From A Clinical Isolate Of *Staphylococcus Aureus*. *Journal Of Infectious Diseases*, 185(2), 220-230.
13. (Breton, A., 2019. La Phagothérapie Orale. Science Du Vivant [Q-Bio], Dumas.
14. Bouslamti, R., 1989. L'absorption Des Phages Chez Rhizobium Meliloti: Rôle Des Lipopolysaccharides (Phdthesis). DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS, France.
15. (Bourema, M., Halimi, D., 2014. Isolement De Bactériophages A Partir Des Eaux Usées Et Identification De Leurs Bactéries Hôtes (Master). Frères Mentouri Constantine1, Constantine.
16. Carlton, R. M., Noordman, W. H., Biswas, B., De Meester, E. D., &Loessner, M. J. (2005). Bacteriophage P100, A First Step Toward A Natural Control Of *Listeria Monocytogenes* In Foods. *Applied And Environmental Microbiology*, 71(9), 5639-5646.
17. Chambers, H. F., & Deleo, F. R. (2009). Waves Of Resistance: *Staphylococcus Aureus* In The Antibiotic Era. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 629-641.
18. Chan, B. K., & Abedon, S. T. (2012). Phage Therapy Pharmacology: Phage Cocktails. *Advances In Applied Microbiology*, 78, 1-23.
19. Cushnie, T. P., & Lamb, A. J. (2011). Recent Advances In Understanding The Antibacterial Properties Of Flavonoids. *International Journal Of Antimicrobial Agents*, 38(2), 99-107.
20. (CAVALLO J.D., MERENS A. Antibacterial Spectrum Of An Antibiotic And Clinical Categorization. *Pathol. Biol.*, 2008, 56, 300-304.

21. -COURVALIN, P. (2008). La Résistance Des Bactéries Aux Antibiotiques: Combinaisons De Mécanismes Biochimiques Et Génétiques. Bulletin De l'Académie Vétérinaire De France.
22. -Carle, S. (2009). La Résistance Aux Antibiotiques: Un Enjeu De Santé Publique Important!. *Pharmactuel*, 42.
23. CAVACO L.M., HASMAN H., XIA S., AARESTRUP F.M. Qnrd, A Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance In Salmonella Enterica Sérovar Kentucky And Bovismorbificans Strains Of Human Origin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009, 53, 603-608.
24. Domingo-Calap, P., Georgel, P., & Bahram, S. (2016). Back To The Future: Bacteriophages As Promising Therapeutic Tools. *HLA*, 87(3), 133-140.
25. Debarbieux, L., 2008. La Phagothérapie Expérimentale A Lgaube Du Xxie Siècle. *Médecine Mal. Infect.* 38, 4213425. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2008.06.014>.
26. Debarbieux, L., 2021. Bactériophage, A Table ! Radio France. <https://www.radiofrance.fr/franceculture/podcasts/la-methode-scientifique/bacteriophage-a-table-8093875>.
27. Dong Xue, Pei Pan, Di-Wei Zheng, Peng Bao, Xuan Zeng, Xian-Zheng Zhang, 2020. Bioinorganic Hybrid Bacteriophage For Modulation Of Intestinal Microbiota To Remodel Tumorimmune Microenvironment Against Colorectal Cancer.
28. Dublanchet, A., 2017. La Phagothérapie : Des Virus Pour Combattre Les Infections : Renouveau D'un Traitement Au Secours Des Antibiotiques.
29. Dublanchet A, Editor. *Des Virus Pour Combattre Les Infections*. Favre Ed; 2009. Reproduction Et Propagation ; Pp. 69–73.
30. Droguet, S., 2021. Recherche De Bactériophages. Biotechnologies Au Lycée.

31. Dufour N, Chevallereau A, Debarbieux L , 2016. Les Bactériophages : Comment Ces Virus Alliés Fonctionnent-Ils? 31-34 .
32. Earl, A. M., Losick, R., & Kolter, R. (2008). Ecology And Genomics Of *Bacillus Subtilis*. *Trends In Microbiology*, 16(6), 269-275.
33. Errafyg, A, 2016. Rôle De La Phagotherapie Dans Le Traitement Des Infections Bacteriennes (Thesis). MOHAMMED V-RABAT, Maroc).
34. Ferry T, Kolenda C, Gustave CA Et Al. ,2018. Phage Therapy In Bone And Joint Infection : History, Scientific Basis, Feasibility And Perspectives In France. *Virologie (Montrouge)*. 2020 Feb 1;24(1):4-11. Doi: 10.1684/Vir.2020.0810.
35. EL BOUJNOUNI, A. (2020). « HISTOIRE DE LA RESISTANCE BACTERIENNE AUX ANTIBIOTIQUES » ; Thèse De Doctorat : Pharmacie, Université MOHAMMED V – RABAT)
36. Górski, A., Międzybrodzki, R., Weber-Dąbrowska, B., Fortuna, W., Letkiewicz, S., Rogóż, P., ... & Borysowski, J. (2019). Phage Therapy: Combating Infections With A 'Living' Antibiotic. *Infection*, 47(3), 389-399.
37. Gontier Marie ,2021. Les Bactériophages, De Leur Découverte A Leurs Utilisations <https://Planet-Vie.Ens.Fr/Thematiques/Microbiologie/Virologie/Les-Bacteriophages-De-Leurdecouverte-A-Leurs-Utilisations>);
38. González-Mora, A., Hernández-Pérez, J., Iqbal, H.M., Rito-Palomares, M., Benavides, J., 2020. Vaccins A Base De Bactériophages : Une Approche Puissante Pour L'administration D'antigènes.
39. Guardabassi L., Courvalin P. Modes Of Antimicrobial Action And Mechanisms Of Bacterial Resistance. In : Aarestrup F.M. (Ed.), *Antimicrobial Resistance In Bacteria Of Animal Origin*. ASM Press : Washington, 2006, 1-18.
40. Guillaume, F, 2020. La Phagothérapie : Une Thérapeutique D'espoir Face A L'antibiorésistance ? (Thèse D'exercice). Université De Limoges.

-
41. Harakeh, S., Yassine, H., Gharios, M., Barbour, E., Hajjar, S., El-Fadel, M., & Toufeili, I. (2009). Isolat Ion, Molecular Characterization And Antimicrobial Resistance Patterns Of *Salmonella* And *Escherichia Coli* Isolates From Meat-Based Fast Food In Lebanon. *Science Of The Total Environment*, 407(10), 2322-2329.
 42. Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). Bacteriophage Host Range And Bacterial Resistance. *Advances In Applied Microbiology*, 70, 217-248.
 43. Herhiha, M., Miloudi, J., Saidi, A. (2024). Caractérisation Phytochimique Et Biologique D'une Espèce De La Famille Des Urticacées (*Urticadioica*). Mémoire De Master En Biochimie, Université Moulay Tahar Saïda.
 44. Hamzeh, Z., 2014. Comme Exigence Partielle De La Maîtrise En Sciences E Génie Des Matériaux Lignocellulosi Mémoire De Master. Université Du Québec A Trois-Rivières.
 45. Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The Influence Of External Factors On Bacteriophages—Review. *Folia Microbiologica*, 56(3), 191-200.
 46. Kolenda, C., (2019). Phagothérapie Et Infections Ostéo-Articulaires : Evaluation De L'activité Antibiofilm Et Antibactérienne Intracellulaire D'un Assemblage De Trois Bactériophages Anti-*Staphylococcus Aureus*. Université Claude Bernard, Lyon.).
 47. KUMAR A., SCHWEIZER H.P. Bacterial Resistance To Antibiotics: Active Efflux And Reduced Uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2005, 57, 1486-1513.
 48. Kirby, A.E, 2012. Synergistic Action Of Gentamicin And Bacteriophage In A Continuous Culture Population Of *Staphylococcus Aureus*. *PLOS One*, 7(11): 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051017>.
 49. Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage Resistance Mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317-327.
 50. Lucile, G., 2020. Histoire De Phagothérapie A Lyon (Thèse D'exercice). Université De Claude Bernard–Lyon 1.).

51. Lood, R., Winer, B. Y., Pelzek, A. J., Diez-Martinez, R., Thandar, M., Euler, C. W., & Fischetti, V. A. (2015). Novel Phage Lysin Capable Of Killing The Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterium *Acinetobacter Baumannii* In A Mouse Bacteremia Model. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 59(4), 1983-1991.
52. -LALAOUI RACHIDI S. (2016). Profil Bactériologique Des Pneumopathies Nosocomiales De L'adulte Et Etat De Résistance Aux Antibiotiques. Thèse Doctorat En Médecine, Université Cadi Ayyadmarrakech, 117p.
53. -LOZNIEWSKI A., RABAUD C., Nancy. (Juillet 2010). Résistance Bactérienne Aux Antibiotiques. *Infections Associées Aux Soins*. CCLIN Sud-Est.1 :1-4.
54. Louise. G. Pistes. (2002). La Résistance Bactérienne Aux Antibiotiques Université Laval. Disponible Sur : www.pistes.fse.ulaval.ca/sae/?no_version=2055.
55. ; LI X.Z., NIKAIDO H. Efflux-Mediated Drug Resistance In Bacteria. *Drugs*, 2004, 64, 159-204. Madigan, M. T., Et Al. (2009). *Brock Biology Of Microorganisms*. Benjamin Cummings.
56. Mookherjee, N., Anderson, M. A., Haagsman, H. P., & Davidson, D. J. (2017). Antimicrobial Host Defence Peptides: Functions And Clinical Potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(5), 321-337.
57. Massali, F.Z., Bouaninba, S., 2016. Etudes Sur Les Bactériophages Du Sol Et Leurs Méthodes D'isolement (Master). Frères Mentouri Constantine1, Constantine.
58. Muller, A. (2017). Bon Usage Des Antibiotiques: Résultats D'actions Dans Différents Types D'établissements De Santé (Doctoral Dissertation, Université Bourgogne Franche-comté).
59. Mehdi. S. (2008). La Fréquence Des Bactéries Multi Résistante A L'hôpital Hassan li De Settat .THESE. [En Ligne] .Pour l'Obtention Du

- Doctorat En Pharmacie. RABAT : UNIVERSITE MOHAMMED V FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE, P ; 48-51.
60. (Memmu W. (2018) : Etude De La Résistance Aux Antibiotiques Des Souches d'Entérocoques Isolées De Divers Service De CHU De Tlemcen. Université Abou Bekr Bellkaid Tlemcen, Algérie ; 49p.
61. Magin, V., 2019. Exploitation Du Potentiel Des Bactériophages Dans Le Traitement Des Surfaces En Contact Avec L'eau, Contaminées Par Un Biofilm De *P. Aeruginosa* (Phdthesis). Ecole Nationale Supérieure Mines-Télécom Atlantique, France.
62. Morgane, A., 2019. Intérêt De La Phagothérapie Dans Le Traitement Et La Prévention Des Maladies Du Tube Digestif (Phdthesis). Université De Lille, France.).
63. Mullan, WMA , 2001. Isolation And Purification Of Bacteriophages. Dairy Science Food.
64. Neter, E, Clark, P ,1944. The Effects Of Penicillin On Staphylococcus Bacteriophage. *Journal Of Bacteriology*
65. Nikaido, H. (2003). Molecular Basis Of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593-656.
66. Nordmann, P., & Poirel, L. (2002). Emergence Of Plasmid-Mediated Resistance To Quinolones In Enterobacteriaceae. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(3), 349-351.
67. Neurohr, S., 2016. La Phagothérapie: Des Virus Au Service De La Médecine (Thèse D'exercice). Université De Lorraine, France.).
68. Peleg, A. Y., & Seifert, H. (2008). *Acinetobacter Baumannii*: Emergence Of A Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 538-582.
69. Poole, K., 2004. Efflux-Mediated Multiresistance In Gram-Negative Bacteria. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10, 12326. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2004.00763.X>.

70. Poole K. Multidrug Resistance In Gram-Negative Bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2001, 4, 500-508.
- Philippon, A. (2008). *Résistance Bactérienne: Définitions, Mécanismes, Evolution*; EMC. Elsevier Masson SAS, Paris), *Maladies Infectieuses*, 10, 1-13.
- Pierre-Collet, G., 2010. *Rétention De Virus En Ultrafiltration: Protocole De Caractérisation (Phd)*. Université De Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier.).
71. Pierre-Collet, G., 2010. *Rétention De Virus En Ultrafiltration: Protocole De Caractérisation (Phd)*. Université De Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier.).
72. Poole K. Multidrug Resistance In Gram-Negative Bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2001, 4, 500-508).
73. Preux, O., 2013. *Assemblage Et Maturation De La Capside Du Bactériophage T5 : Analyse Des Processus D'expansion Et De Décoration (Thèse)*. Université PARIS-SUD 11).
74. Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C. (2015). A Century Of The Phage: Past, Present And Future. *Nature Reviews Microbiology*, 13(12), 777-786.
75. Sausseureau, E., 2012. *Utilisation Des Bactériophages Comme Thérapie Lors D'une Infection A Pseudomonas Aeruginosa Dans Le Cadre De La Mucoviscidose: Efficacité Et Innocuité (Phdthesis)*. Université Pierre Et Marie Curie - Paris VI.
76. Sulakvelidze, A, 2011. Safety By Nature: Potential Bacteriophage Applications. *Microbe Magazine* 6. 122-126. 10.1128/Microbe.6.122.1
77. Schmelcher, M., Donovan, D. M., & Loessner, M. J. (2012). Bacteriophage Endolysins As Novel Antimicrobials. *Future Microbiology*, 7(10), 1147-1171.
78. Schmelcher, M., Et Al. (2012). Bacteriophage Endolysins As Novel Antimicrobials. *Future Microbiology*, 7(10), 1147-1171.

-
79. Schmerer, M., Molineux, I. J., & Bull, J. J. (2014). Synergy As A Rationale For Phage Therapy Using Phage Cocktails. *Peerj*, 2, E590.
80. Soussy C.-J. 2007. Résistance Bactérienne Aux Antibiotiques. Monographies En Urologie. P: 21-46 .
81. SAADAoui, M. (2008). La Fréquence Des Bactéries Multi Résistante A L'hôpital Hassan li De Settat (Doctoral Dissertation).
82. St-Pierre-Lemieux, G., 2014. Papiers Bioactifs A Base De Phages Pour Emballage Alimentaire: Etudes En Vue D'une Production Pilote (Masters). Université Du Québec A Trois-Rivières, Trois-Rivières.
83. Ravat, F., Jault, P., Gabard, J., 2015. Bactériophages Et Phagothérapie: Utilisation De Virus Naturels Pour Traiter Les Infections Bactériennes. *Ann. Burns Fire Disasters* 28, 13320.
84. (Raynaud, S., 2020. Étude Fonctionnelle Et Cibles D'un ARN Régulateur Exprimé Par Le Pathogène Humain *Staphylococcus Aureus* Et Impliqué Dans L'internalisation Des Bactéries Par Les Cellules Humaines. Université De Rennes 1.).
85. RODRIGUEZ-MARTINEZ J.M., VELASCO C., BRIALES A., GARCIA I., CONEJO M.C., PASCUAL A. Qnr-Like Pentapeptide Repeat Proteins In Gram-Positive Bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2008, 61, 1240-1243.
86. Rohwer, F, Prangishvili, D. & Lindell, D ,2009. Roles Of Viruses In The Environment. *Environmental Microbiology*
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02101>.
87. ROBICSEK A., JACOBY G.A., HOOPER D.C. The Worldwide Emergence Of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. *Lancet Infect. Dis.*, 2006a, 6, 629-640.
88. Tamma, P. D., Aitken, S. L., Bonomo, R. A., Mathers, A. J., Van Duin, D., & Clancy, C. J. (2019). Infectious Diseases Society Of America Guidance On The Treatment Of Antimicrobial-Resistant Gram-Negative Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 69(11), 2063-2068.

89. Torres-Barceló, C. (2018). Phage Therapy Faces Evolutionary Challenges. *Viruses*, 10(6), 323.
90. Tan, GH, Nordin, MS. & Napsiah, AB, 2008. Isolation And Characterization Of Lytic Bacteriophages From Sewage Water (Pengasin Gandan Pencirian Bakteriofaj Daripada Air Kumbahan. *Journal Of Tropical Agriculture And Food Science*.
91. Vernhes, E., (2016). Maturation De La Capside Du Bactériophage T5 : Etude Structurale Et Fonctionnelle De La Protéine De Décoration Pb10. Université PARIS– SACLZ.).
92. (Vonlanthen, A, 2011. Dossier – Bactériophages (Phages) : Le Futur Des Antibiotiques? In Dossiers, Podcast Science. URL: [Http://Www.Podcastscience.Fm/Dossiers/2011/03/11/Dossierbacteriophages-Phages-Lefutur-Des-A](http://www.podcastscience.fm/dossiers/2011/03/11/dossierbacteriophages-phages-lefutur-des-a)).
93. Ye, M., Sun, M., Huang, D., Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, S., Hu, F., Jiang, X., Jiao, W., (2019). A Review Of Bacteriophage Therapy For Pathogenic Bacteria Inactivation In The Soil Environment. *Environ. Int.* 129, 488–496. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.062>.
94. Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., ... & Wang, M. (2009). New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(5), 1892-1897.