

## COLLECTION ANTIBIORÉSISTANCE

### BIOCHIMIE-BIOLOGIE-BIOTECHNOLOGIE



## BACTÉRIOPHAGES ET PHAGOTHÉRAPIE

**Série :** Sciences et technologies de laboratoire (STL) spécialités biotechnologies

**Niveau :** Terminale

**Parties :** Microorganismes et domaines d'application des biotechnologies ;  
Observer la diversité du vivant

## ■ PRÉSENTATION DU SCÉNARIO

Ce scénario pédagogique permet de découvrir l'utilisation des bactériophages comme alternative thérapeutique aux antibiotiques, dans le contexte de l'antibiorésistance, en s'appuyant sur l'approche « Une seule santé ». Il se compose de deux séances :

### Séance 1 - À la découverte des bactériophages (activité documentaire)

La première séance est une activité documentaire qui permet de comprendre ce qu'est la phagothérapie. Elle débute par une mise en situation qui permet de comprendre les enjeux liés à l'antibiorésistance, puis à partir d'extraits d'une étude scientifique, les élèves travaillent en groupe et répondent à plusieurs questions pour découvrir l'intérêt des bactériophages dans le traitement d'infections bactériennes. La séance se termine par la construction d'une maquette de bactériophage.

### Séance 2 – Recherche et dénombrement de phages en vue de la production d'un traitement alternatif contre *E. coli* (activité pratique)

La deuxième séance est une activité pratique qui se déroule en laboratoire de biotechnologie. Les élèves recherchent et dénombrent des phages dans des échantillons d'eau. Ils mettent en œuvre des techniques comme la filtration, le pré-enrichissement phagique et le phagogramme, puis évaluent l'efficacité des phages contre une souche bactérienne résistante. Ces activités permettent aux élèves de comprendre les étapes de développement d'un traitement de phagothérapie et de prendre conscience de la complexité de leur utilisation pour lutter contre l'antibiorésistance.

# ■ SÉANCE 1 – ACTIVITÉ DOCUMENTAIRE : À LA DÉCOUVERTE DES BACTÉRIOPHAGES

## Présentation de la séance

Cette séance est une activité documentaire qui permet de découvrir les bactériophages et de comprendre en quoi ils peuvent être une alternative thérapeutique pour le traitement d'infections bactériennes résistantes aux antibiotiques.

La séance est organisée en plusieurs temps :

- Mise en situation et construction de la problématique
- Présentation de l'article de recherche scientifique, support principal de l'activité technologique proposée
- Activité 1 : Bactériophages et infection bactérienne
- Activité 2 : la phagothérapie
- Construction d'un modèle de capsid virale
- Bilan de la séance

## Objectifs de la séance

### S4 : Microorganismes et domaines d'application des biotechnologies

- Savoir-faire : schématiser la structure d'une bactérie, comparer la structure d'une paroi de bactérie Gram + et Gram -, expliquer les rôles de la paroi bactérienne.
- Concepts : Coques/bacilles ; agrandissement/grossissement ; ultrastructure ; chromosome bactérien ; plasmide ; paroi ; peptidoglycane ; membrane externe ; lipopolysaccharide (LPS) ou lipopolysaccharide (LPS).

### S4.5 Les virus, parasites obligatoires de la cellule

- Savoir-faire : identifier sur un schéma les principaux éléments de structure d'un virus, repérer, sur un schéma de cycle infectieux, les principales étapes de la multiplication virale, identifier les structures de la cellule infectée mobilisées lors de la multiplication virale, caractériser le processus de fixation, décrire les conséquences cellulaires d'une infection de cellule eucaryote, comparer les principales étapes d'un cycle lytique et d'un cycle lysogène phagique.
- Concepts : capsid ; matériel génétique ; virus à ADN / virus à acide ribonucléique (ARN) ; enveloppe facultative ; parasite obligatoire ; cycle infectieux ; cellule cible ; spécificité ; interaction récepteur-ligand ; bourgeonnement viral ; lyse cellulaire ; infection lytique ; infection latente ; bactériophage ; phage virulent ; phage tempéré ; cycle lysogène / cycle lytique.

### T1 – Observer la diversité du vivant

- Savoir-faire : interpréter une observation au microscope en identifiant des structures spécifiques, comparer des observations au microscope de différents types cellulaires.
- Concepts : échelle ; critères de reconnaissance cytologique ; moisissure.

## Déroulement de la séance

### 1 - Mise en situation et construction de la problématique

#### Activités des élèves et rôle de l'enseignant

Dans cette mise en situation, l'enseignant introduit le phénomène de l'antibiorésistance à partir de l'interview de Céline Pulcini (document 1) portant sur l'antibiorésistance comme problème de santé publique. Ensuite, à partir du document 2 – bactériothérapie et phagothérapie – il montre que, dans ce contexte, les bactériophages suscitent à nouveau l'intérêt des chercheurs comme solution alternative aux antibiotiques. L'enseignant construit avec les élèves la problématique suivante : en quoi les bactériophages peuvent-ils être une alternative aux antibiotiques dans un contexte de faible innovation thérapeutique ?

#### Ressources

**Document 1** – vidéo [Antibiorésistance et santé humaine](#), interview de Céline PULCINI, professeur de médecine.

**Document 2** – Bactériophages et phagothérapie.

Les bactériophages (littéralement « mangeurs de bactéries ») sont des virus probablement apparus en même temps que les premières bactéries. Ils sont considérés comme les organismes les plus nombreux sur Terre (de  $10^{30}$  à  $10^{32}$ ) et présents en abondance dans tous les écosystèmes incluant des bactéries. Ils participent de façon active à la régulation des populations bactériennes. En 1896, Ernest Hankin fut le premier à remarquer que les eaux du Gange, en Inde, possédaient un pouvoir bactéricide. Après filtration, elles avaient la capacité de soigner des patients atteints du choléra, une maladie causée par la bactérie *Vibrio cholerae*. Ce n'est qu'en 1915 et 1917 que deux scientifiques, Frederick Twort et Félix d'Hérelle, étudièrent plus en détail ce phénomène. En 1922, ce dernier isola le mystérieux agent infectieux et le nomma bactériophage. Dès leur découverte, les bactériophages ont été utilisés par l'Homme à des fins de traitements des infections bactériennes, les bactériophages ayant une activité antibactérienne très sélective (grâce à la reconnaissance de récepteurs spécifiques d'une espèce, voire d'une souche bactérienne). Cependant cette stratégie thérapeutique fut rapidement abandonnée au profit des antibiotiques.

La résistance des bactéries aux antibiotiques est un phénomène apparu très rapidement à la suite de l'utilisation de ces médicaments, dans les années 1950. Les molécules antibiotiques efficaces se raréfiant, les bactéries s'adaptant toujours plus rapidement, on voit apparaître des bactéries toto-résistantes (résistantes à quasiment tous les antibiotiques disponibles). Dans ce contexte, les bactériophages, suscitent de nouveau l'intérêt des chercheurs comme solution alternative aux antibiotiques.

Source : [Les bactériophages, de leur découverte à leurs utilisations](#), site Planet-Vie.

## 2 - Présentation de l'article de recherche scientifique, support principal de l'activité technologique proposée

### Activités des élèves et rôle de l'enseignant

L'enseignant présente l'étude « *Dynamic Model Exposes the Energetics and Dynamics of the Injection Machinery for Bacteriophage T4* », de Maghsoodi et al., à partir de laquelle l'activité documentaire proposée est construite. L'article original est également mis à disposition des élèves. L'enseignant explique le travail des chercheurs : les auteurs ont réalisé le suivi, en microscopie électronique, de l'infection de mini-bactéries *E. coli* (*E. coli mini-cells*) par le bactériophage T4.

### Consigne

Identifier dans la publication deux indicateurs de la fiabilité de la source.

### Réponse attendue

Il s'agit d'une publication scientifique récente dans une revue spécialisée internationale à comité de lecture : *Biophysical Journal*. Les auteurs et le laboratoire sont identifiés et la bibliographie est fournie.

## 3 – Activité : bactériophages et infection bactérienne

### Activité des élèves et rôle de l'enseignant

Des extraits de l'étude sont distribués aux différents groupes de 3 ou 4 élèves, qui répondent aux questions.

### Questions

1. Décrire précisément l'objet identifié par les auteurs comme « *E. coli* » observable sur l'électronographie du document 2 (figure A).
2. Repérer sur l'électronographie du document 2 (figure B) la paroi bactérienne et la légende.
3. Argumenter que la morphologie observée est différente de celle attendue pour la bactérie *E. coli*. À partir d'une recherche internet, proposer une explication.
4. Utiliser le vocabulaire fourni pour traduire les légendes soulignées sur la figure A du document 3, puis positionner si cela est possible ces mêmes légendes sur la figure B du document 3.  
Vocabulaire à utiliser : acide nucléique, tête du virus, queue du virus, tube central, gaine contractile, capsid et plaque basale.
5. Visionner la vidéo : « *Le phage T4 attaque E. coli* » et associer les images G, H, I et J du document 4 aux propositions ci-dessous :

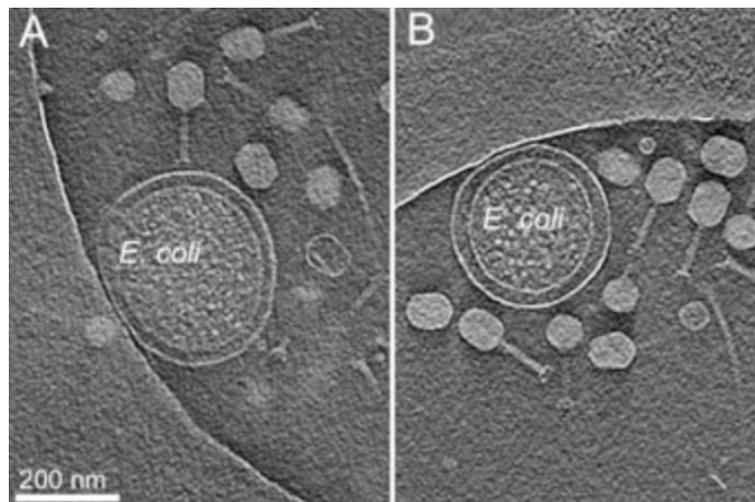
- Image G** • • Injection de l'ADN phagique dans le cytoplasme bactérien.
- Image H** • • Contraction de la gaine contractile de la queue du bactériophage.
- Image I** • • Percement des enveloppes bactériennes.
- Image J** • • Fixation du phage sur la bactérie hôte suite à la reconnaissance de récepteurs bactériens spécifiques.

#### Aides possibles

- Aide pour la question 2  
Vocabulaire à mobiliser : forme, taille, paroi, peptidoglycane, membrane plasmique, membrane externe, cytoplasme.
- Aide pour la question 3  
Vocabulaire à mobiliser : membrane externe et espace périplasmique, cytoplasme et membrane bactérienne.

#### Ressources

**Document 2** - Électronographie d'une préparation de « mini-cells » d'*Escherichia coli* infectées par le bactériophage T4.



Source : Hu, B., Margolin, W., Molineux, I. J., & Liu, J. (2015). [Structural remodeling of bacteriophage T4 and host membranes during infection initiation.](#)

**Document 3** - Structure du bactériophage T4.

Figure A - électrographie d'un bactériophage T4 en début d'infection d'une « mini-cell » d'*E. coli*.

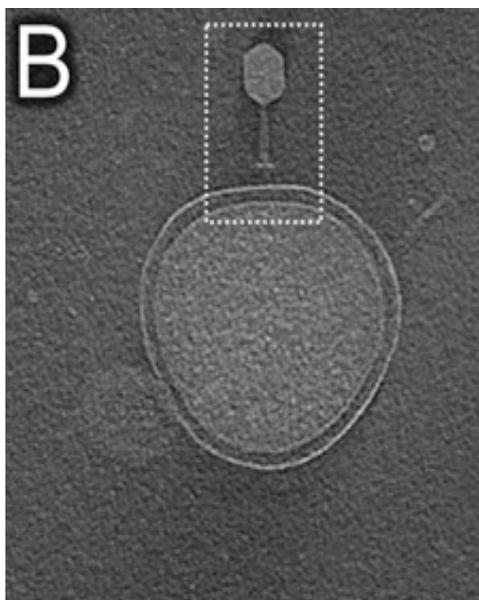
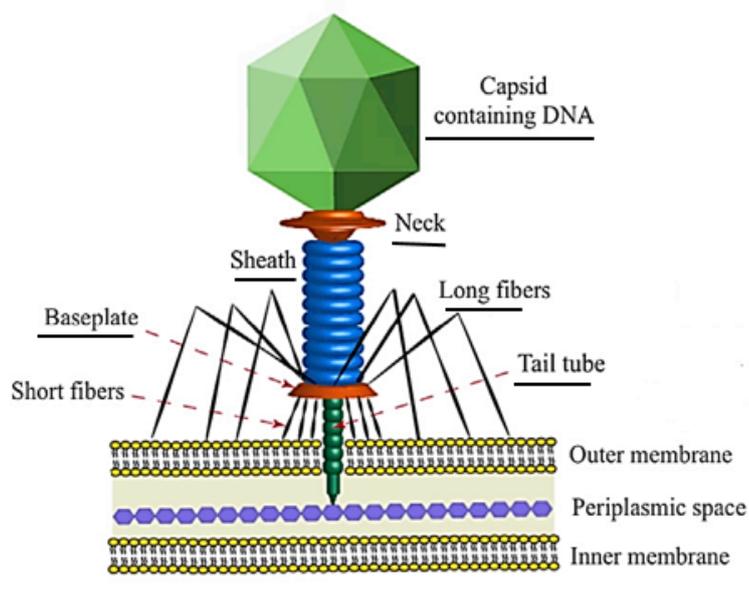
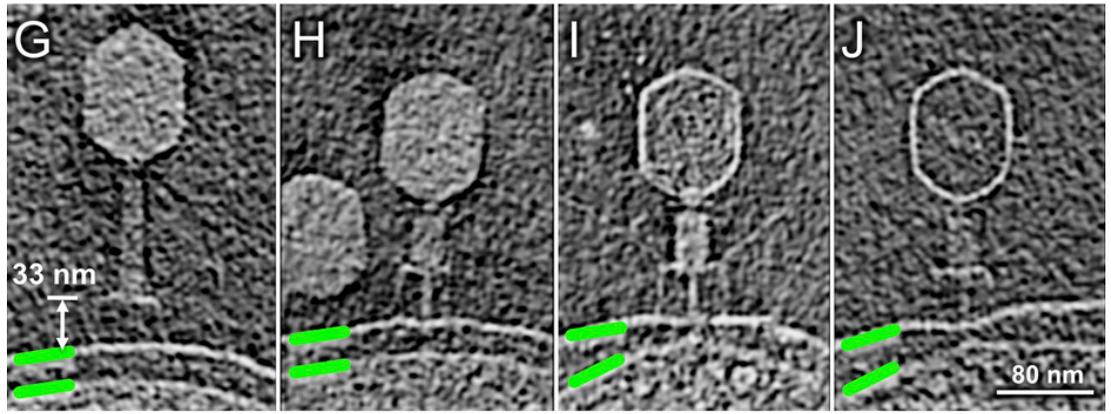


Figure B - Schéma légendé du phage T4.



Source : Maghsoodi A, Chatterjee A, Andricioaei I, Perkins NC. [Dynamic Model Exposes the Energetics and Dynamics of the Injection Machinery for Bacteriophage T4](#). *Biophys J*. 2017.

**Document 4** - Cinétique d'infection de « mini-cell » d'*E. coli* par un bactériophage T4. Agrandissements d'électronographie de virions individuels après 1 min (G), 3 min (H), 5 min (I) et 10 min (J) d'infection.



Source : u, B., Margolin, W., Molineux, I. J., & Liu, J. (2015). [Structural remodeling of bacteriophage T4 and host membranes during infection initiation.](#)

**Document 5** – vidéo « [Le phage T4 attaque \*E. coli\*](#) ».

#### 4 - Activité : la phagothérapie

##### Activité des élèves et rôle de l'enseignant

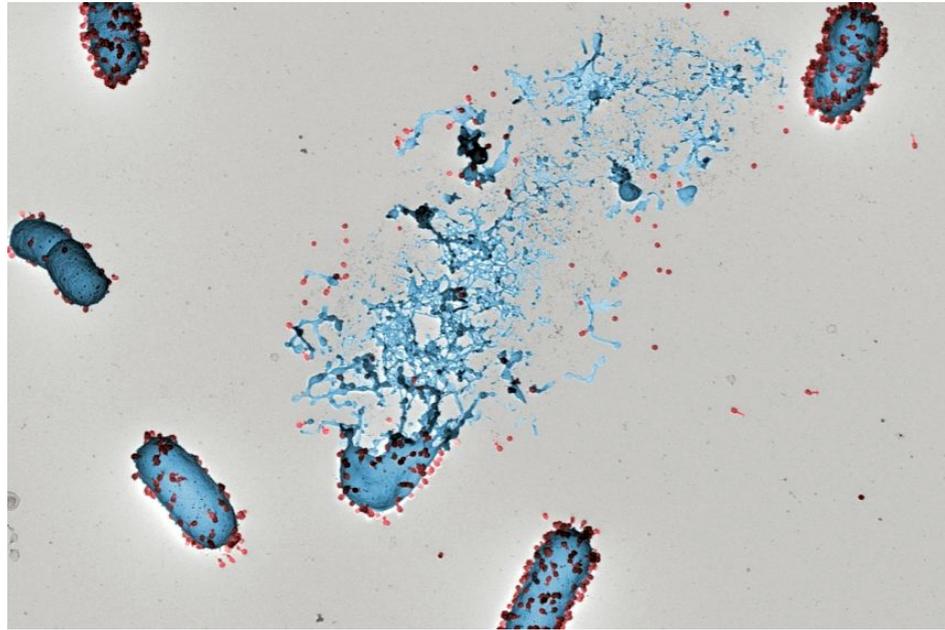
Dans cette seconde activité, les élèves étudient l'utilisation de phages pour lutter contre les infections bactériennes, face à des bactéries devenues de plus en plus résistantes aux antibiotiques.

##### Questions

6. Décrire la photographie du document 6 et proposer une définition de la phagothérapie.
7. Décrire le cycle lytique d'un bactériophage, en utilisant le document 7.
8. Argumenter la nécessité de n'utiliser que des phages virulents et non des phages tempérés dans le cadre d'une éventuelle phagothérapie, en analysant le document 7.
9. Analyser les résultats de l'antibiogramme présenté dans le document 8 pour conclure que la souche d'*Escherichia coli* MFP est résistante aux antibiotiques amoxicilline et TSU (triméthoprime/sulfaméthoxazole).
10. Analyser la figure B du document 8 pour justifier l'intérêt dans ce cas de combiner une antibiothérapie et une phagothérapie.

## Ressources

**Document 6** - image colorisée et en négatif en microscopie électronique à balayage d'une bactérie lysée par les phages.

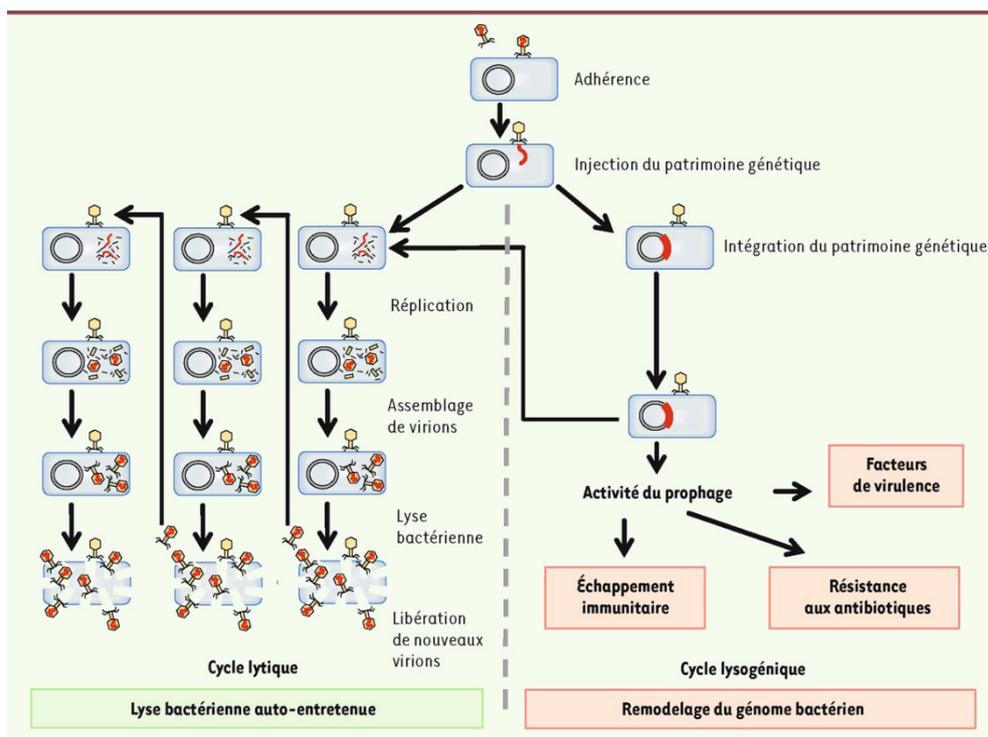


Crédits : L. Debarbieux, Institut Pasteur; M. and C. Rohde, Helmholtz Centre for Infection Research) Cara, « Phage Therapy ».

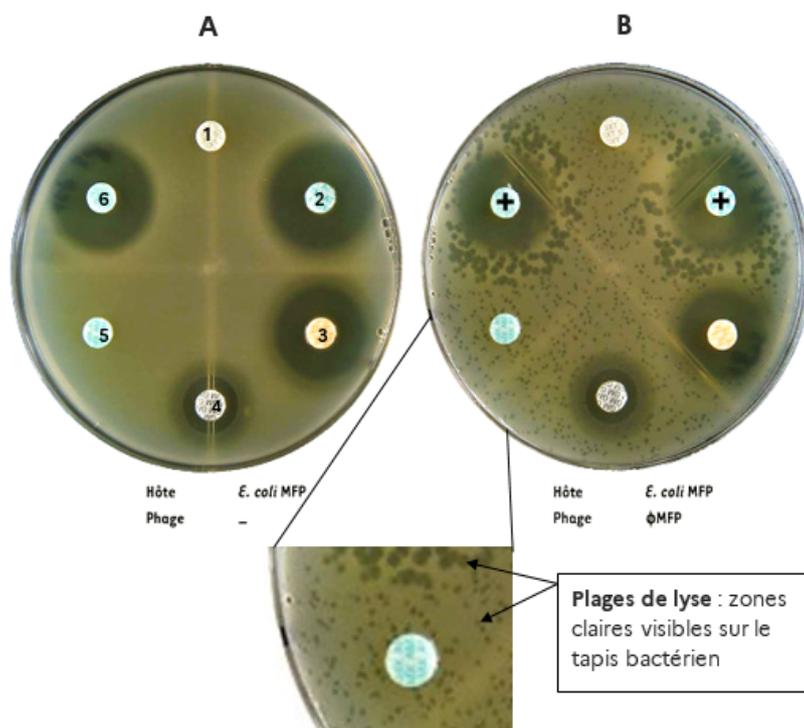
**Document 7** – « Les phages à visée thérapeutique », extrait de « Les virus au service de la santé : les bactériophages », revue Médecine/santé.

« Les bactériophages (nommés également phages) sont des virus naturels qui infectent les bactéries. Ils sont très répandus dans l'environnement, en particulier dans les environnements telluriques et surtout aqueux, tels que l'eau salée ou douce, ou les égouts. (...) Le plus souvent, chaque phage est spécifique d'une seule espèce bactérienne, voire d'une population clonale. (...) Les phages ont un rôle majeur dans l'équilibre écologique du monde bactérien. En fonction de leur activité sur leur bactérie hôte, deux types de phages existent : les phages tempérés, qui accomplissent un cycle lytique et lysogénique, et les phages virulents, qui n'accomplissent qu'un cycle lytique (Figure ci-dessous). Au cours du cycle lysogénique, le génome des phages s'intègre dans le génome bactérien sous la forme d'un prophage. Ils peuvent ainsi contribuer à enrichir le patrimoine génétique de la bactérie, en intégrant des gènes codant des facteurs de virulence, comme des toxines, ou des facteurs facilitant l'échappement à l'immunité, ou des gènes de résistance aux antibiotiques. Sous certaines conditions, le prophage peut s'exciser et infecter une autre bactérie environnante de la même espèce en reprenant un cycle lytique. Lors d'un cycle lytique, les phages détournent la machinerie cellulaire bactérienne pour produire des centaines de nouveaux virions. Les bactériophages provoquent ensuite la lyse de la bactérie hôte par la production de protéines virales, telles que l'endolysine qui dégrade le peptidoglycane, ou la holine qui forme des pores dans la membrane plasmique. Cette lyse aboutit à la libération de nouveaux virions qui vont pouvoir à leur tour infecter les bactéries environnantes, selon un processus potentiellement autoentretenu (en théorie), jusqu'à la disparition complète de la communauté bactérienne ».

Figure - Mécanisme d'action des phages : le cycle lysogénique peut apporter des avantages à la bactérie, et le cycle lytique peut aboutir à l'éradication de la population bactérienne.



Source : extrait [Les virus au service de la santé : les bactériophages](#), Nicolas Benech et al. ; 2022, revue médecine/science.



**Document 8** – antibiogrammes pour l'évaluation de la synergie « phages-antibiotiques ».

À gauche (A) : antibiogramme montrant la sensibilité de la souche uropathogène *E. coli* MFP à différents antibiotiques.

À droite (B) : même antibiogramme réalisé avec l'addition de plusieurs centaines de phages virulents MFP.

Antibiotiques :

1. TSU (triméthoprime-sulfaméthoxazole)
2. Aztreonam
3. Tétracycline
4. Gentamicine
5. Amoxicilline
6. Céfixime

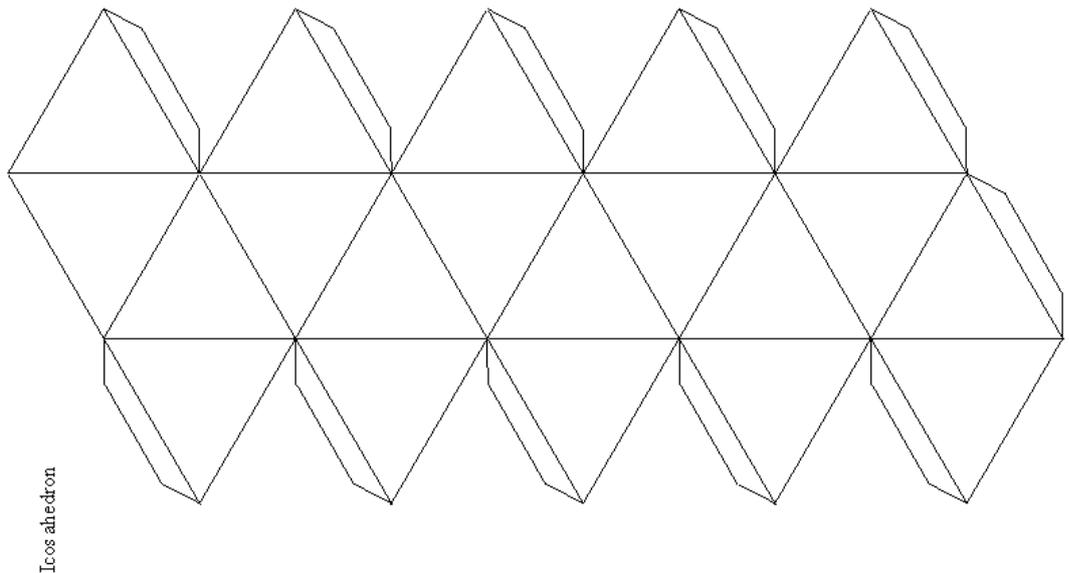
Source : Comeau et al., « [La « synergie phages-antibiotiques » - Un enjeu pour la phagothérapie](#) »).

## 5 - Construction d'un modèle de capside virale

### Consigne

Construire une maquette de bactériophage en utilisant des matériaux de récupération et le document 9. Expliquer en quoi la maquette produite permet de représenter un bactériophage et identifier les limites.

**Document 9** - patron d'icosaèdre.



Source : site [Polyhedra](#)

## Éléments attendus

La construction d'un modèle phagique implique :

- une tête avec une structure icosaédrique en papier cartonné ;
- une queue pouvant être réalisée avec des cannellonis, des cylindres de papier ou des pailles en bois ;
- un acide nucléique ou génome représenté par un morceau de laine ou de fil à placer dans la capsid ;
- une plaque basale pouvant être fabriquée en papier, et les fibres caudales avec des cure-dents, des pailles pliées, etc.

## 6 - Bilan de la séance

L'enseignant demande aux élèves ce qu'ils ont appris au cours de la séance. Un bilan des apprentissages est construit avec les élèves.

### Bilan

Face à la progression de la résistance aux antibiotiques, dans un contexte de faible innovation thérapeutique, la phagothérapie apparaît comme être une nouvelle stratégie, prometteuse, pour lutter les infections et l'antibiorésistance.

La phagothérapie se fonde sur la destruction de bactéries pathogènes par des virus bactériophages qui les détruisent, mais qui sont incapables d'infecter les humains.

Les bactériophages sont constitués d'une capsid qui protège l'ADN viral et une queue spécifique aux récepteurs de la surface bactérienne, qui leur permet une reconnaissance et une infection précises des cellules cibles. Ces phages, parasites obligatoires, suivent un cycle infectieux déterminé par leur type (virulent ou tempéré). Les phages virulents exécutent un cycle lytique, où après l'injection de leur matériel génétique, ils exploitent les ressources de l'hôte pour la réplication virale, aboutissant à la lyse cellulaire et la libération de nouveaux virions.

La phagothérapie, associée ou non à une antibiothérapie, offre une nouvelle stratégie pour surmonter les défis posés par la résistance aux antibiotiques en augmentant ainsi l'efficacité des traitements contre les infections bactériennes résistantes.

## Sources documentaires

- Maghsoodi Ameneh, Anupam Chatterjee, Ioan Andricioaei, et Noel C. Perkins. [\*Dynamic Model Exposes the Energetics and Dynamics of the Injection Machinery for Bacteriophage T4\*](#). Biophysical Journal 113, n° 1 (11 juillet 2017): 195205.
- Planet-Vie. [« Les bactériophages, de leur découverte à leurs utilisations »](#). Consulté le 7 octobre 2023.
- Bo Hu, William Margolin, Ian J. Molineux, et Jun Liu. [« Structural remodeling of bacteriophage T4 and host membranes during infection initiation »](#). Proceedings of the National Academy of Sciences 112, n° 35 (septembre 2015): E491928.
- [Le phage T4 attaque E. coli, 2019.](#)
- Cara, Graziella. [« Phage Therapy : A Model to Predict Its Efficacy against Pathogenic Bacteria »](#). INSERM (blog), 17 mai 2022.
- Comeau, André M., Françoise Tétart, Sabrina N. Trojet, Marie-Françoise Prère, et Henry M. Krisch. [« La « synergie phages-antibiotiques » - Un enjeu pour la phagothérapie »](#). Médecine/sciences 24, no 5 (1er mai 2008) : 44951.
- <https://www.polyhedra.net/en/model.php?name-en=icosahedron>

## Ressources complémentaires

- Institut Pasteur. « [Les bactériophages comme thérapie post-antibiotiques](#) », 15 novembre 2018.
- INSERM. « [Bataille de microbes : C'est quoi la phagothérapie ?](#) »
- INSERM, La science pour la santé ».
- Kim, Seung-Jin, et Min-Kyu Oh. « [Minicell-forming Escherichia coli mutant with increased chemical production capacity and tolerance to toxic compounds](#) ». *Bioresource Technology* 371.

## ■ SÉANCE 2 – RECHERCHE ET DÉNOMBREMENT DE PHAGES EN VUE DE LA PRODUCTION D'UN TRAITEMENT ALTERNATIF CONTRE *E. COLI*

### Présentation de la séance

En lien avec l'activité documentaire de la séance 1 sur la découverte des bactériophages, cette séance permet de comprendre en quoi la phagothérapie est peut-être une alternative à l'utilisation d'antibiotiques pour lutter contre l'antibiorésistance. Les élèves recherchent et isolent des phages à partir d'échantillons d'eau, réalisent un pré-enrichissement en phages potentiellement actifs, vérifient leur efficacité contre la souche cible par la mise en œuvre d'un phagogramme, et expérimentent la détermination de la concentration phagique d'un extrait de phage T2.

Cette séance permet de prendre conscience de la difficulté à trouver des phages actifs contre une souche cible et d'apprendre les étapes de conception d'un traitement de phagothérapie.

La séance est organisée en plusieurs temps :

1. Mise en perspective par une courte analyse documentaire autour de l'utilisation des bactériophages pour combattre les infections à bactéries multirésistantes ou totirésistantes.
2. Recherche de bactériophages actifs contre une bactérie test à partir d'eau prélevée dans l'environnement, en mettant en œuvre 3 techniques :
  - filtration sur membrane de l'eau ;
  - pré-enrichissement phagique ;
  - phagogramme.
3. Dénombrement de phages par la technique des spots.

La séance proposée, d'une durée totale de 9 heures (3x3 heures) est programmée sur une semaine en classe de terminale STL Biotechnologie et sur trois journées dont au moins deux consécutives. Elle a lieu au laboratoire de biotechnologie et nécessite l'accès à des postes informatiques. L'ensemble des manipulations proposées utilise comme souche cible une souche d'*Escherichia coli* de classe de sécurité 1.

## Objectifs de la séance

### Partie S : concepts scientifiques

- **S4.5 Les virus, parasites obligatoires de la cellule**
  - **Savoir-faire** : décrire les conséquences cellulaires d'une infection de cellule eucaryote.
  - **Concepts** : bourgeonnement viral, lyse cellulaire, infection lytique, infection latente.

### Partie T : fondamentaux technologiques expérimentaux

- **T4.2 Réaliser un dénombrement après culture en milieu solide**
  - **Savoir-faire** : réaliser un dénombrement par filtration sur membrane, exploiter un résultat de dénombrement issu d'une filtration.
  - **Concepts** : unité formant colonies (UFC), critère microbiologique, système de filtration, membrane filtrante.

### Partie L : travailler ensemble au laboratoire de biotechnologies

- **L1.2 Conduite d'un projet de recherche au laboratoire de biotechnologies**
  - **Savoir-faire** : rédiger un document de travail approprié, valider la ou les méthodes et analyser les résultats expérimentaux.
  - **Concepts** : procédure / mode opératoire, matière d'œuvre / étalon de contrôle / témoin, répétabilité / reproductibilité, acceptabilité / conformité.
- **L2.1 Dangers**
  - **Savoir-faire** : identifier en autonomie le danger et ses voies d'exposition associées, comprendre les données de sécurité associées à un produit chimique dangereux.
  - **Concepts** : danger, voies d'exposition, mentions de danger / pictogrammes, classe de risques infectieux.
- **L3.6 Exprimer et critiquer le résultat de mesure**
  - **Savoir-faire** : exprimer le résultat de mesure, s'interroger sur la cohérence d'un résultat de mesure dans un contexte donné.
  - **Concepts** : incertitude, chiffre significatif, règle d'arrondissement, valeur de référence / critère / ordre de grandeur.

### Objectifs du programme de première mobilisés

- **Savoir-faire** : Acquérir les fondamentaux technologiques et scientifiques des biotechnologies : réaliser un dénombrement après culture en milieu solide.
- **Thématique pour l'enseignement** : l'eau - qualité microbiologique et biochimique, impact d'une pollution nitrate sur la biodiversité, recherche de bactériophages.

## Déroulement de la séance

Il est important de signifier aux élèves que l'activité technologique est réalisée sur une souche d'*Escherichia coli* de classe 1 et non sur une souche réellement multirésistante aux antibiotiques, ce qui permet aux élèves de traiter les échantillons en maîtrisant le niveau de risque biologique.

Le visionnage collectif de la vidéo en début de séance permet de contextualiser l'activité technologique et de remobiliser les éléments de l'activité documentaire de la séance 1. La construction du schéma organisationnel est faite de façon collective. L'enseignant dirige l'activité technologique en donnant les consignes et en contrôlant individuellement, l'avancée de la réflexion préliminaire, permettant à l'élève de s'appropriier les documents techniques. Il circule parmi les élèves et valide individuellement les réponses à ces questions pour lesquelles il est demandé de « faire valider ».

L'enseignant organise les phases de mise en commun des observations et résultats pour les questions 14, 15 et 21.

### 1 - Mise en situation

La phagothérapie est une méthode de traitement des infections bactériennes alternative aux antibiotiques qui utilise des virus appelés bactériophages, actifs contre des bactéries pathogènes.

**Document 1** – vidéo [Les bactériophages](#), 2014, Saison 5, épisode 1 - Laurent Debarbieux.

**Document 2** – Le bactériophage au service de notre santé.

Une start-up française de biotechnologies, Pherecydes Pharma, étudie la possibilité de collecter et de référencer des bactériophages qui seraient utilisables en phagothérapie lors du traitement des gastroentérites humaines provoquées par des souches d'*Escherichia coli* résistantes aux antibiotiques. Pour cela, elle collecte des échantillons d'eaux usées et y recherche des phages actifs contre cette souche bactérienne.

Cette démarche a permis à cette start-up de sélectionner, à partir d'un effluent d'eau usée d'un hôpital, un phage actif nommé 825 contre cette souche.

Cette entreprise développe une stratégie de traitement par « cocktail de phages » ; de proposer à chaque patient un mélange « à façon » de différents phages actifs. Cette approche de traitement par un cocktail de phages vise à réduire les risques d'apparition de résistances bactériennes aux phages. L'emploi d'un cocktail de phage dans le cadre de la phagothérapie optimise les chances d'efficacité du traitement. Afin de préparer les cocktails phagiques, la société réalise régulièrement des dénombrements de phages afin de s'assurer que leur concentration est au moins égale à 109 UFP· mL<sup>-1</sup> (UFP=Unité Formant Plage de lyse).

Source : [Le bactériophage au service de notre santé : phagothérapie, production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques par « Phage display » et utilisation diagnostique en tant que détecteur de bactéries](#), 2020, Lucie Allard.

## 2 - Mise en perspective de la séance

**Question 1** - Argumenter l'intérêt d'utiliser des cocktails de phages plutôt qu'un seul phage dans le cas d'une phagothérapie en utilisant le document 4.

**Question 2** - Analyser le document 5, en déduire l'intérêt de rechercher des bactériophages efficaces contre les bactéries résistantes aux antibiotiques dans les eaux usées des hôpitaux.

**Question 3** - Schématiser l'évolution de l'aspect d'une plage de lyse lors de la cinétique d'infection en utilisant l'activité documentaire « à la découverte des bactériophages ».

**Question 4** - Proposer une définition de l'unité « Unité Formant Plage » (UFP) par analogie avec l'unité « UFC ».<

## 3 - Activité technologique (AT) expérimentale 1 : recherche de bactériophages actifs contre une souche test

### 3.1 - Questions préliminaires - Jour 1

**Question 5** - Préparer un schéma organisationnel de la procédure opératoire de la fiche technique du document 7 « recherche de bactériophages actifs contre une souche test » en incluant la liste du matériel nécessaire.

**Question 6** – Expliquer, par le calcul, le choix de milieu LB 10X lors de l'étape d'enrichissement des phages éventuels.

**Question 7** - Procéder, *a priori*, à la démarche de prévention des risques et argumenter la nécessité de l'élimination de la boîte « LB + Filtre eau n° x » dans la poubelle DASRI.

**Question 8** - Expliquer le rôle des 2 témoins réalisés à l'étape 3 - Phagogramme.

### 3.2 - Réalisation pratique AT1 – Jour 1

**Manipulation 1** - Réaliser, à partir des échantillons d'eau douce de surface collectées par les élèves, les 3 étapes de la fiche technique 1 du document 7 :

- étape 1 - Filtration sur membrane ;
- étape 2 - Pré-enrichissement phagique ;
- étape 3 – Phagogramme.

### 3.3 - Présentation et exploitation des résultats – AT1 – Jour 2

- Étape 1 - Filtration sur membrane

**Question 9** - Analyser les résultats obtenus sur la membrane de filtration après 24 heures de culture. Argumenter l'importance de la filtration de l'échantillon d'eau préalable à la recherche de bactériophages.

- Étape 2 - Pré-enrichissement phagique

**Question 10** - Interpréter de façon collective l'ensemble des résultats (mise en commun organisée par l'enseignant) de l'étape de pré-enrichissement des phages et conclure.

- Étape 3 – Phagogramme

**Question 11** - Photographier le résultat du phagogramme, l'importer dans un logiciel de retouche d'images et l'annoter avec l'ensemble des informations utiles. Enregistrer le document dans l'ENT.

**Question 12** - Interpréter le phagogramme après avoir validé la technique.

**Question 13** - Compléter la fiche d'autoévaluation de la technique du phagogramme ci-dessous.

**Document 3** - Fiche d'autoévaluation de la technique du phagogramme

Objectif technique observé	Atteint	Partiellement atteint	Non atteint	Causes possibles et remédiations
Double couche trouble				
Trouble homogène				
Double couche lisse (sans « grumeaux »)				
Double couche recouvrant toute la surface de la gélose.				
Pas de « projections » de phages autour du témoin d'efficacité				
Pas de coulures des échantillons de phages				
Identification convenable des échantillons				
Gélose non impactée par les dépôts des échantillons				

Ajuster les gestes techniques en conséquence lors de la réalisation de seconde mise en œuvre (M2).

**Question 14** - Rédiger collectivement un principe de la technique du phagogramme en transposant celui de l'antibiogramme.

## 4 - Activité technologique expérimentale 2 : dénombrement des phages par la technique des spots – Jour 2

### 4.1 Questions préliminaires – Jour 2

**Question 15** - Compléter le tableau de dilution en cascade de la suspension phagique « P » (document 9) avant de réaliser M2. Donner un exemple de calcul.

**Question 16** - Dresser la liste du matériel nécessaire.

### 4.2 Réalisation pratique AT2 - Jour 2

Manipulation 2 - Dénombrement des phages par la méthode des spots : document 9.

### 4.3 Présentation et exploitation des résultats – AT2 – Jour 3

**Question 17** - Analyser les résultats des témoins avant d'exploiter les résultats des échantillons.

**Question 18** - Présenter sous forme de tableau l'ensemble des résultats du dénombrement des plages de lyse.

**Question 19** - Critiquer la cohérence des résultats obtenus pour la gamme de dilution.

**Question 20** - Argumenter le choix du ou des spots utilisable(s) pour calculer la concentration phagique.

Donnée : les résultats interprétables sont compris entre 5 et 20 plages de lyse par spot.

**Question 21** - Établir les équations aux grandeurs, aux unités et aux valeurs numériques afin de calculer la concentration en nombre d'UFP notée  $C_{N(UFP; \text{échantillon})}$

Présenter le résultat en écriture scientifique avec 2 chiffres significatifs.

**Question 22** - Compléter le tableau de résultats projeté et argumenter sur la notion d'incertitude des résultats.

**Question 23** - Conclure en précisant si la concentration de cet extrait est conforme aux exigences de la société.

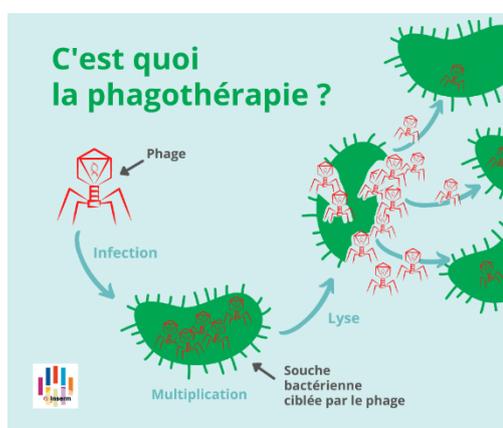
## Ressources

**Document 4** - « Bataille de microbes : C'est quoi la phagothérapie ? ».

La phagothérapie est une forme de lutte biologique. Elle se fonde sur la destruction de bactéries pathogènes par des virus mortels pour ces dernières, mais incapables de nous infecter. Ces virus spécifiques des bactéries s'appellent des bactériophages – mais on peut aussi dire « phages ». On en trouve en abondance, partout. Il en existe une infinité, chacun étant capable d'infecter et de détruire une seule espèce de bactéries, voire uniquement certaines bactéries d'une espèce particulière. Et avec eux, pas de risque incontournable de résistance : si une bactérie mute et devient insensible à un phage donné, il en existe forcément un autre capable de la tuer.

Dans la pratique, la phagothérapie est une approche hautement individualisée : les bactéries à l'origine de l'infection dont souffre un patient sont prélevées, mises en culture et placées au contact d'un mélange de phages. Ceux qui sont capables d'infecter les bactéries du patient vont s'y multiplier jusqu'à provoquer leur rupture (« lyse ») et donc leur mort. Libérés dans le milieu de culture, les phages néoformés infectent alors les bactéries toujours vivantes et le cycle recommence. Lorsque toutes les bactéries sont mortes, le milieu de culture contient un grand nombre de phages, qui sont purifiés et administrés au patient. Le même cycle d'infection/destruction se déroule alors jusqu'à la disparition de toutes les bactéries ciblées et la guérison de l'infection. Et puisqu'il n'y a plus aucune bactérie à infecter dans l'organisme du patient, les phages disparaissent.

Figure – schéma du principe de la phagothérapie.



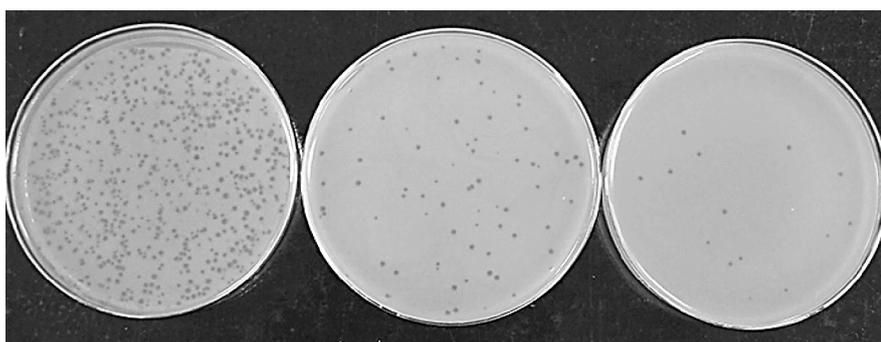
Source : Article « [Bataille de microbes : C'est quoi la phagothérapie ?](#) », INSERM.

**Document 5** - Pourcentage de souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques isolées chez des malades vivant à domicile (ville) ou hospitalisés.

Antibiotique	% de souches résistantes chez les malades de ville	% de souches résistantes chez les malades hospitalisés
Amoxicilline	41,8 %	51 %
Amoxicilline + acide clavulanique	16,9 %	30 %
Céfotaxime	3,2 %	8 %

Source : [rapport annuel de l'Onerba France \(Observatoire National de l'Épidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques\) de 2018](#).

**Document 6** - plages de lyse.



Ces boîtes de Petri contiennent des bactériophages T4 mis en présence d'un tapis bactérien d'*E. coli*. Les plages de lyse, qui se présentent sous la forme de petits ronds, correspondent aux endroits où les bactéries ont été lysées. La concentration en bactériophages mise au contact du tapis bactérien décroît de gauche à droite. *D'après un travail de l'American Society for Microbiology.*

Source : [Planet-vie, Les bactériophages, de leur découverte à leurs utilisations](#)

## Sources documentaires

- Planet-Vie. « [Les bactériophages, de leur découverte à leurs utilisations](#) ».
- Bio outils, « [20 : Les bactériophages](#) ».
- INSERM. « [Bataille de microbes : C'est quoi la phagothérapie ?](#) ».

## Ressources complémentaires

- Institut Pasteur. « [Les bactériophages comme thérapie post-antibiotiques](#) », 15 novembre 2018.
- [L'incroyable histoire des tueurs de bactéries](#), ARTE, 2019.