



Biocontrôle de l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistant par les bactériophages en aquaculture en Côte d'Ivoire

Amian Aristide KOUDOU^{1,2}, Solange KAKOU-NGAZOA², Audrey ADDABLAH², Kouadio Bernard ALLALI², Serge AOUSSI², Hortense ATTA DiALLO¹, Mireille DOSSO²

¹Department des sciences de la nature, Université Nangui Abrogoua, Abidjan (Côte d'Ivoire), 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire.

²Plateforme de biologie moléculaire, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, 01 BP 490 Abidjan 01, Côte d'Ivoire.

Auteur correspondant : Solange Kakou-Ngazoa, Institut Pasteur de Cote d'Ivoire, BP 490 Abidjan 01. Email : ngazoa_solange@yahoo.fr

Original submitted in on 1st September 2020. Published online at www.m.elewa.org/journals/ on 31st October 2020
<https://doi.org/10.35759/JABs.154.10>

RESUME

Objectif : Cette étude a pour objectif d'évaluer la réduction de l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* par les bactériophages en aquaculture

Méthodologie et résultats : Le phage (*PaBor1a*) de la bio-collection des phages de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et la souche *Pseudomonas aeruginosa* (PA001-2018) multi-résistante isolée des poissons piscicoles ont été utilisés pour cette étude. D'une part dans les conditions *in vitro*, 100 µl d'une solution de phage (10⁸ UFP) et de PA001-2018 ont été mis en culture dans 5 ml de bouillon Luria Bethani pendant 24 h. D'autre part dans les conditions *in vivo*, un aquarium de 5 L d'eau contenant 6 poissons (*Oreochromis niloticus*) a été inoculé avec 100 µl de PA001-2018 et du phage *PaBor1a* pendant 24 h. En présence du phage, la charge bactérienne a été réduite après 2-4 h dans les tests *in vitro* et *in vivo*. La décroissance de la population bactérienne et la croissance de celle du phage ont été parallèlement observée. Ce résultat démontre l'efficacité du phage *PaBor1a* dans le contrôle de la bactérie PA001- 2018 multi-résistante.

Conclusion et applications des résultats: La réduction de la charge bactérienne montre le bio contrôle de l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* par le phage *PaBor1a*. Ce résultat se propose comme alternative thérapeutique pour la lutte contre les infections bactérienne en aquaculture par la méthode balnéaire

Mots clés : aquaculture, *Oreochromis niloticus*, multi-résistant, phages, *Pseudomonas aeruginosa*.

Biocontrol of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection by bacteriophages in Cote d'Ivoire aquaculture

ABSTRACT

Objective: To evaluate the reduction of *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistant infection in aquaculture tests by phage activity.

Methodology and Results: The phage (*PaBor1a*) from the phage bio-collection of the Pasteur Institute of Côte d'Ivoire was used against multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (PA001-2018) isolated from aquaculture fish in this study. The test *in vitro* was conducted by culture of , the phage (10^8 PFU) and 100 μ l of PA001-2018 in 3 ml of Luria Bethani broth for 24 h. And the test *in vivo* occurs in aquarium tank of 5 L containing 6 fishes (*Oreochromis niloticus*), and inoculated with 100 μ l of PA001-2018 and phage *PaBor1a* (10^8 PFU) for 24 h. The negative tests were conducted without phage *PaBor1a* under the same conditions. The results shows that the presence of the phage, the bacterial load was reduced after 2- 4 h in both tests. Bacterial decay and phage growth were observed in parallel. This result demonstrates the efficacy of phage *PaBor1a* against the multidrug resistant PA001- 2018 bacteria in aquarium tank.

Conclusion and applications of results: reduction of bacterial load show the bio control of *Pseudomonas aeruginosa* infection by phage *PaBor1a*. This result is proposed as a therapeutic alternative in aquaculture against bacterial infection in aquaculture by washing method

Keywords: aquaculture, *Pseudomonas aeruginosa*, multi-resistant, phages

INTRODUCTION

La résistance bactérienne aux antibiotiques (ATB) est devenue une menace d'ampleur mondiale pour la santé publique. Elle est multisectorielle et impacte autant la santé humaine, animale et l'équilibre des écosystèmes (Abeles *et al.*, 2015 ; OMS, 2017). Dans les pays à ressources limitées comme ceux de l'Afrique, ce phénomène prend de l'ampleur dans le secteur agricole (Ouedraogo *et al.*, 2017 ; FAO, 2018). L'une des principales raisons de la multi-résistance bactérienne est l'usage abusif et inapproprié des antibiotiques (ATB) chez l'homme et en agriculture (Collineau *et al.*, 2017). En Afrique, le secteur aquacole utilise des quantités importantes d'antibiotiques pour la lutte contre de nombreux ichtyo-pathogènes (Ouedraogo *et al.*, 2017). Leur emploi dans le secteur aquacole entraîne des résidus dans l'environnement et dans les denrées alimentaires (Okombe *et al.*, 2017; Dib *et al.*, 2018). Il est démontré qu'en Afrique, leur teneur dans les poissons d'élevage, dépassent les limites maximales fixées par la Commission du Codex Alimentarius (Shekarchian *et al.*, 2016 ; Limbu, 2020). Par ailleurs, leur usage induit une augmentation de la prévalence des bactéries multi-résistantes qui représentent des risques sanitaires

(Aly & Alboutti, 2014; Mensah *et al.*, 2014 ; Koudou *et al.*, 2020). Il est donc important de mettre en place des politiques et des méthodes pour limiter l'usage des ATB chez les animaux destinés à l'alimentation afin de protéger la santé humaine en Afrique (OMS, 2017). Dans un contexte de développement durable, les techniques et pratiques agricoles doivent concilier les intérêts économiques, sociales et environnementaux. Ainsi, une utilisation d'agents biologiques tels que les bactériophages pourrait constituer une alternative aux antibiotiques (Nagel *et al.*, 2016). Les bactériophages ou phages sont des virus qui infectent spécifiquement les bactéries (Dublanche, 2014). Plusieurs études ont montré l'utilisation des bactériophages pour le contrôle des bactéries pathogènes en médecine humaine, vétérinaire, en industrie et assainissement de l'environnement. Jusqu'à présent, leur utilisation dans le secteur aquacole a connu de nombreux succès (Pereira *et al.*, 2016 ; Kalatzis *et al.*, 2018). Par ailleurs, à la différence des antibiotiques ils ne présenteraient aucunes externalités négatives sur les milieux aquatiques pour leur résilience (Doss *et al.*, 2017) En Côte d'Ivoire, des bactériophages sont isolés de l'environnement mais aucune utilisation

thérapeutique ou de biocontrôle n'est encore réalisée (Essouh *et al.*, 2015; Kakou *et al.*, 2017; Ngazoa-Kakou *et al.*, 2019). La présente étude est menée pour évaluer l'efficacité du bactériophage *PaBor1a* dans le contrôle des ichtyo-pathogènes.

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique

Espèce de poisson : Des poissons juvéniles de Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) dont la masse varie entre 40 et 50 g, la taille entre 15 et 17 cm ont été prélevés à la station d'alevinage de Dabou (Côte d'Ivoire). Ils ont été transportés au laboratoire dans des ballons contenant de l'oxygène.

Souche bactérienne : *P. aeruginosa* isolé des poissons piscicoles a été utilisée comme bactérie pour l'expérimentation.

Bactériophage : *PaBor1*, bactériophage spécifique à la bactérie *P. aeruginosa* a servi dans cette expérimentation. Il provient de la bio-collection du projet PhageTech, hébergé par la Plateforme de Biologie Moléculaire (Institut Pasteur de Côte d'Ivoire). Il a été isolé de la lagune Ebrié située dans ville d'Abidjan (Côte d'Ivoire).

Test de virulence du bactériophage : Pour évaluer la capacité lytique du phage *PaBor1a* sur les cellules bactériennes de *P. aeruginosa*, un test de virulence a été réalisé à travers la technique de double couche (Pal, 2015). Cent (100) µl de la souche de *P. aeruginosa* (18-24h de culture) est ajoutée à une gélose LB à 0,7 % d'agar. Le mélange est versé dans une boîte de pétri contenant une couche de gélose LB à 1,5% d'agar. Après séchage, des répliques de 20 µl de la solution de phage sont déposées sur la gélose double couche. Les boîtes sont séchées puis incubées à 37° C pendant 24 h.

Effet des phages sur la croissance bactérienne : Pour évaluer la réduction bactérienne par les phages, des expérimentations *in vitro* et *in vivo* ont été réalisés. *In vitro*, 100 µl d'une culture bactérienne de 18-24h de *P. aeruginosa* ont été inoculés dans 5 ml de bouillon LB, puis 100 µl du phage *PaBor1a* ont été ajoutés au mélange. Ce mélange est incubé à 37° C. Parallèlement, un contrôle de la croissance bactérienne est réalisé dans les mêmes conditions de culture avec 100 µl de la bactérie inoculée dans 5 ml de LB (Fister *et al.*, 2016). *In vivo*, 1 ml de culture bactérienne de *P. aeruginosa* (18-24h) et 1 ml du phage *PaBor1a* sont inoculés dans un aquarium contenant 5 L d'eau et 6 poissons. Dans les mêmes conditions, un second aquarium est inoculé avec

En tant qu'agents biologiques, les bactériophages sont utilisés contre une bactérie pathogène multi-résistante (*P. aeruginosa*) isolée chez des poissons piscicoles.

1 ml de *P. aeruginosa*. ((Kalatzis *et al.*, 2018). À différents temps (0, 2, 4, 6 et 24 h), les bactéries et les phages des divers tests réalisés *in vitro* et *in vivo* sont dénombrés pour évaluer la réduction bactérienne par les phages et la dynamique de la population microbienne. Le dénombrement est réalisé suivant la méthode conventionnelle (Pech *et al.*, 2017). 1 ml de la culture prélevée a été centrifugé à 12000 tours à 4° C pendant 5 minutes. Le surnageant et le culot sont séparément recueillis dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml. Pour le dénombrement des bactéries, une dilution décimale en série (10⁰ à 10⁻⁸) a été réalisée avec le culot. Ensuite, 20 µl de chaque dilution sont déposés sur des boîtes de pétri contenant une gélose LB à 1,5 % d'agar. Les boîtes ont été incubées à 37° C pendant 24 h. Le calcul du dénombrement des bactéries est effectué suivant la formule ci-dessous.

$$B(ufc)^n = \frac{(N \times F)}{V(ml)}$$

ufc : unité formant colonies, **B** ; nombre de bactéries
F : facteur de dilution, **V** : volume inoculum, **N** : nombre de colonies bactériennes

Le titre du phage (nombre de particules virales/ml) est déterminé selon la technique de double couche. Suivant une méthode adaptée à celle décrite par Kalatzis *et al.* (2016), la titration des bactériophages est réalisée avec le surnageant obtenu à partir de la centrifugation de la culture. Le surnageant est dilué en série (10⁰ - 10⁻⁸) avec un tampon de magnésium salin (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO₄; pH 7.2). Préalablement, des boîtes de pétri sont préparées avec une gélose LB à 1.5 % agar. Ensuite, 100 µl d'une culture bactérienne (*P. aeruginosa*) de 24 h sont ajoutés à 3 ml d'une gélose molle de LB (0,7 % d'agar). La gélose molle est coulée sur la gélose solide. Après 15 mn d'incubation, 10 µl de chaque série de dilutions de phages sont déposés sur la gélose double couche. Les boîtes sont incubées à 37° C pendant 24 h. Le titre des phages est évalué à partir du nombre de plages de lyses observées sur la gélose selon Maal *et al.* (2015) à travers la formule ci-dessous :

$$T(ufP)^n = \frac{(N \times F)}{V(ml)}$$

ufp : unité formant plages de lyse

T : titre du phage, N : nombre de plages de lyse, V : volume déposé, F : facteur de dilution

RESULTATS

Activité lytique du phage PaBor1a : Sur le milieu de culture solide, le bactériophage PaBor1a, testé sur la bactérie *P. aeruginosa* a montré une virulence. Cette

virulence qui est mise en évidence par la présence de plages de lyse sur la gélose bactérienne de *P. aeruginosa* (Figure 1), traduit l'activité lytique du phage sur la bactérie.

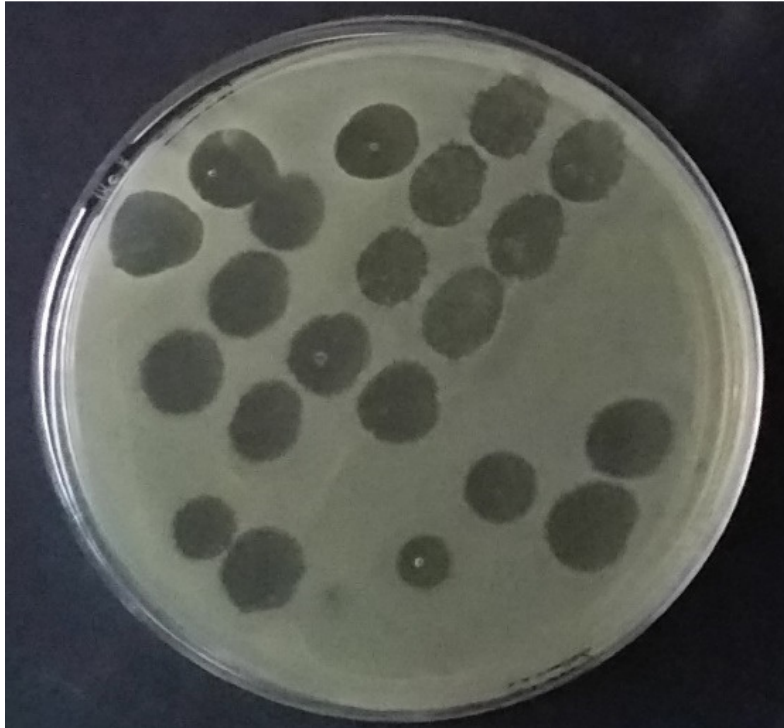


Figure 1 : Plages de lyse traduisant l'activité lytique du phage PaBor 1 sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Réduction de la croissance bactérienne *in vitro*: En absence du phage, la bactérie *P. aeruginosa* prolifère dans le milieu de culture à partir du temps T₀ jusqu'au temps T₆. CETTE CROISSANCE EST TRADUITE PAR UNE AUGMENTATION DE 10⁷ à 10¹⁰ cellules bactérienne/ ml). La prolifération atteint le niveau maximal au bout du temps T₆. Au-delà du temps T₆, la croissance bactérienne diminue

10⁴ cellules (Figure 2 A). En présence du phage PaBor1a, la population bactérienne est réduite de 10⁶ entre le temps T₀ et T₄. Après le temps T₄, la présence bactérienne est quasiment inexistante dans le milieu de culture. Cependant, entre le temps T₀ et T₆, la population des phages augmente dans le milieu. Elle passe de 10⁷ à 10⁸ UFP (Figure 2 B).

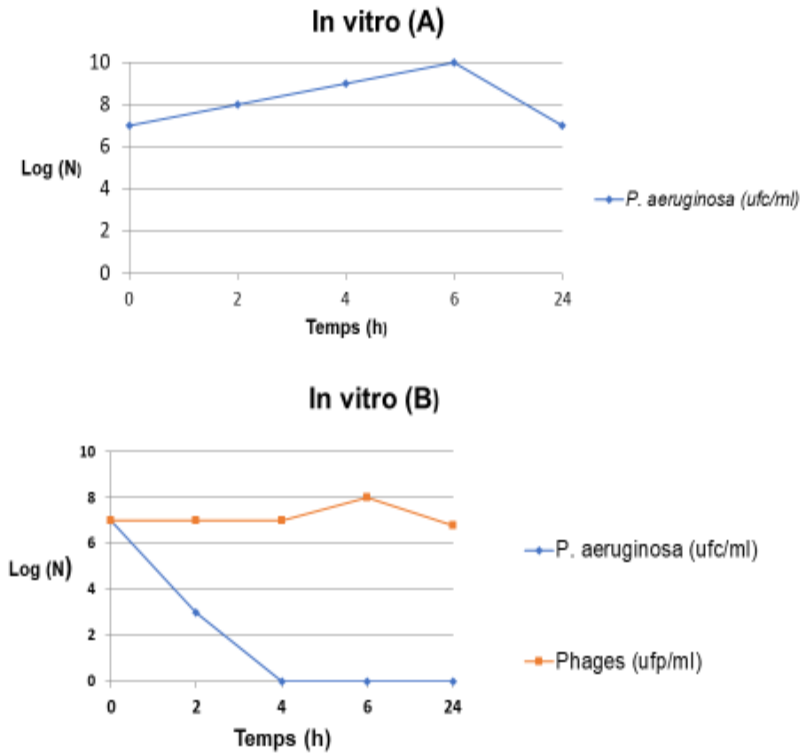


Figure 2 : Activité lytique de *PaBor1a* sur *P. aeruginosa* dans le milieu LB
A : sans traitement de phages **B** : avec traitement de phages

Réduction de la population bactérienne par les phages dans les aquariums / test *in vivo* : En absence du phage *PaBor1a*, la charge bactérienne de *P. aeruginosa* et des autres germes inconnus augmentent dans l'aquarium respectivement de 10^3 et 10^4 cellules entre le temps T_0 et le temps T_{24} (Figure 3 A). En présence du phage, la charge de *P. aeruginosa* diminue

de 10^2 cellules dans l'aquarium et demeure constante après le temps T_4 . Par contre, entre le temps T_4 et T_6 , la population des phages augmente de 10^1 particules virales. L'activité lytique du phage *PaBor1a* montre une réduction de la charge bactérienne de *Pseudomonas*. Parallèlement, la charge virale du phage *PaBor1a* augmente entre le temps T_0 et T_{24} h. (Figure 3 B).

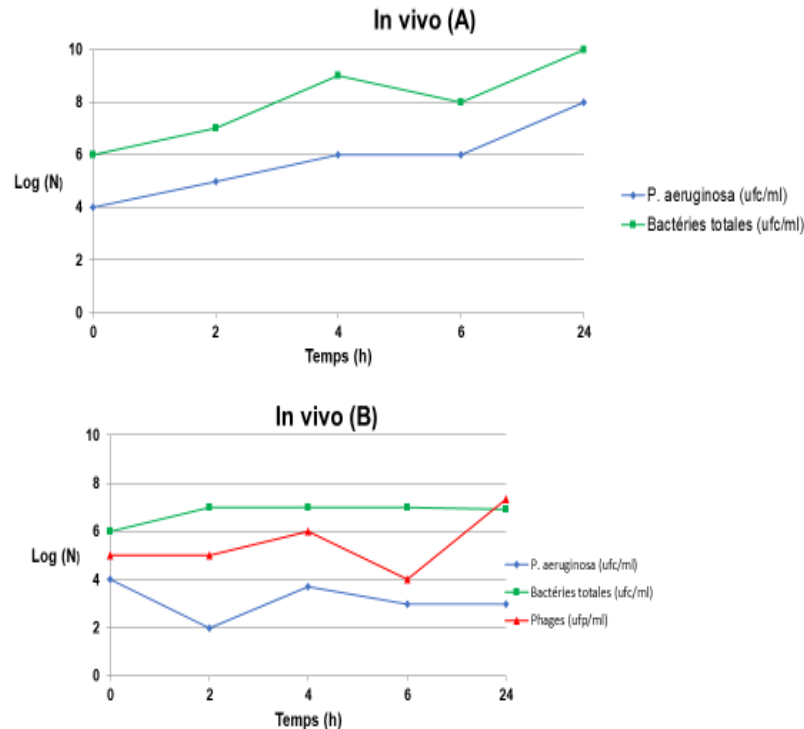


Figure 3: Activité lytique d phage *PaBor1a* sur *P aeruginosa* dans l'aquarium
A : sans traitement de phages **B :** avec traitement de phages

DISCUSSION.

L'utilisation des phages pour le traitement ou le contrôle des infections bactériennes est abordée dans la présente étude. Une bactérie multi-résistante (*P. aeruginosa*) isolée des poissons piscicoles (Koudou *et al.*, 2020) a été soumise à un phage spécifique. Mis en interaction dans les conditions *in vitro* et *in vivo*, la dynamique de la population de ces microorganismes a montré une coévolution antagoniste. Une interaction de ce type est réalisée entre une communauté bactérienne cible et un ou des phage(s) à cycle lytique (Katals *et al.*, 2018). En effet, le phage et la bactérie utilisés dans cette étude sont isolés respectivement dans la lagune et les poissons piscicoles. Leurs différentes provenances révèlent le caractère ubiquitaire de ces microorganismes. Des études antérieures ont également montré l'isolement des phages dans divers biotopes tels que : les eaux usées, les poissons et la lagune (Maal *et al.*, 2015 ; Kakou *et al.*, 2017 ; Ngazoa-Kakou *et al.*, 2018). La coexistence des bactéries et les bactériophages dépend d'une part de la possibilité qu'ils ont d'évoluer et d'autre part de la pression de sélection induite par les phages infectieux sur les bactéries sensibles. Plus la probabilité de rencontre entre les bactéries sensibles et les bactériophages infectieux, est

importante et plus leur population évolue inversement. Ainsi, le test de virulence réalisé a permis de révéler la sensibilité des bactéries aux bactériophages. Ce test représente une étape importante dans les critères de sélection du phage comme bon <<candidat>> pour son utilisation à des fins thérapeutique (Hyman, 2019). Cela signifie que le phage a une affinité avec la bactérie *P aeruginosa* et il présente un cycle lytique qui est traduit par la présence de zones translucides (plages de lyses). Il importe donc peu la niche ou le réservoir d'où est isolé le phage et la bactérie. L'effet du phages *PaBor1a* sur une communauté bactérienne dépend de la capacité lytique du phage. De nombreux travaux ont montré l'efficacité des phages isolés des eaux usées sur des bactéries pathogènes des humains et des animaux (Pal, 2015 ; Plaza *et al.*, 2018.). L'étroite évolution des populations de phages et de bactéries a été décrite à travers plusieurs modèles expérimentaux. Quel que soit le modèle expérimentale (*in vitro* ou *in vivo*), le but est de montrer l'efficacité des bactériophages dans le contrôle des bactéries pathogènes. Dans le modèle *in vitro* de la présente étude, les bactériophages interagissent avec *P. aeruginosa* dans un milieu de culture liquide (LB). Lors de cette interaction, la

population bactérienne décroît au profit de celle des bactériophages après quelques heures (temps < 4h). La population bactérienne est réduite d'au moins 10^2 cellules bactériennes par intervalle de temps de 2 heures. Au-delà du temps T_6 , la population de phages diminue également dans le milieu. Cette baisse de la population des phages s'expliquerait par le fait que la population des bactéries qui constituait sa cible est quasiment absente. En effet, les phages et les bactéries entretiennent une relation de proie et prédateur. Cette interaction les lie à une relation dépendance de leurs populations les unes des autres. Ainsi lors de l'interaction, leurs populations présentent une évolution antagoniste. Cette relation met en évidence le fait que les phages soient des parasites obligatoires des bactéries Dublanche (2014). Un tel modèle a été présenté par les travaux de Gauthier *et al.* (2016) a présenté le modèle *in vitro* de l'efficacité des phages dans le contrôle de *E. coli* responsable des infections urinaires. Dans le modèle *in vivo*, les populations de bactéries (*P. aeruginosa* et autres germes) prolifèrent dans l'aquarium en absence de phage. Cette évolution des populations bactériennes n'est pas contrainte par la prédation du phage. Cependant, l'évolution inverse observée au niveau de leurs populations serait due à une compétition pour les nutriments nécessaires à leur croissance. Dans l'aquarium inoculé avec le phage, la corrélation antagoniste observée entre les populations de phages et celles des bactéries montre une phase d'activité lytique des phages sur les bactéries. Cette interaction a été mise en évidence dans le contrôle de *Staphylococcus aureus* infectant les souris (Ochieng'

CONCLUSION ET APPLICATION DES RÉSULTATS

La présente étude montre que les phages utilisés ont une importante capacité lytique face à *Pseudomonas aeruginosa* qui est une bactérie multi-résistante. Le contrôle de cette bactérie par les phages dans les conditions *in vivo* est très remarquable dans le sens où ces derniers permettent une réduction d'au moins 10^2 cellules bactériennes en 2 h. Ils pourraient donc constituer une bonne alternative à l'usage des antibiotiques dans le secteur aquacole pour le contrôle des ichtyopathogènes. Il serait nécessaire d'inciter les aquaculteurs à l'utilisation de ces méthodes biologiques

REMERCIEMENTS

Ce projet est rendu possible grâce à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et la chaire de recherche sur les bactériophages de l'université Laval, Canada.

Oduor *et al.*, 2016). Pendant le cycle lytique, le phage détruit les cellules bactériennes pour produire de nouvelles particules virales (virions), d'où l'augmentation de son titre (Pereira *et al.*, 2017 ; Sylva *et al.*, 2014). En effet, l'efficacité des phages est influencée par les paramètres physico-chimiques (Sylva *et al.*, 2014). Dans cette étude, une diminution de la population du phage a été observée en même temps que celle de sa bactérie hôte. En effet, dans une relation de type proie et prédateur, la population du prédateur peut diminuer avec celle de sa proie qui constitue sa ressource alimentaire. Ce phénomène contribue à la régulation des écosystèmes (Abedon *et al.*, 2011) La diminution de la population de *P. aeruginosa* s'expliquerait par le fait que la bactérie n'ait pas suffisamment de nutriments pour sa croissance. L'apport de nutriments aux poissons favorise la croissance bactérienne qui déclenche une importante activité lytique du phage dont la population persiste dans le milieu. L'efficacité du biocontrôle par les phages en aquaculture a été également démontrée par plusieurs études sur des communautés bactériennes pour le traitement de poissons et de crevettes (Pereira *et al.*, 2016 ; Kalatzis *et al.*, 2018). Dans les systèmes aquacoles, ils existent des bactéries non-pathogènes jouant un rôle essentiel dans le fonctionnement et la productivité de ces écosystèmes. Car les bactéries représentent un important compartiment biologique impliqué dans le recyclage de la matière organique dans les milieux aquatiques. La gestion durable de ces milieux et ressources aquatiques nécessite l'utilisation de méthodes écologiques pour le contrôle d'organismes qui leurs sont indésirables.

moins coûteuses car présents dans les écosystèmes naturels et facile à produire. Cela va dans l'intérêt de la préservation de la santé humaine, animale et environnementale dans un contexte d'émergence de la multi-résistante bactérienne. Il est important de réaliser une expérimentation de biocontrôle par les phages de plusieurs pathogènes multi-résistants. Les paramètres physico-chimiques étant un facteur déterminant de l'efficacité des phages, il faut en tenir compte dans les études à grande échelle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abedon, S. T., C. Thomas-Abedon, A. Thomas, and H. Mazure 2011. Bacteriophage prehistory. *Bacteriophage*. 1(3): 174-178.
- Abeles SR, Ly M, Santiago-Rodriguez TM, Pride DT 2015. Effects of Long Term Antibiotic Therapy on Human Oral and Fecal Viromes. *PLoS ONE* 10(8): e0134941. doi:10.1371/journal.pone.0134941
- Aly SM, Albutti A, 2014. Antimicrobials Use in Aquaculture and their Public Health Impact . *J Aquac Res Development* 5: 247. doi:10.4172/2155-9546.1000247
- Bougnom BP, Zongo C, McNally A et al 2019. Wastewater used for urban agriculture in West Africa as a reservoir for antibacterial resistance dissemination. *Environ Res* 168:14–24
- Collineau L, et al, 2017. Guidance on the selection of appropriate indicators for quantification of antimicrobial usage in humans and animals. *Zoonoses Public Health* 64:165–184.
- Dib AL, Agabou A, Chahed A et al, 2018. Isolation, molecular characterization and antimicrobial resistance of Enterobacteriaceae isolated from fish and seafood. *Food Control* 88:54–60.
- Doss J , Culbertson K, Hahn D, Camacho J , Barekzi N, 2017. A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. *viruses* 9, 50; doi:10.3390/v9030050
- Duarte LN, Coelho F, Oliveira V, Cleary DFR, Martins P, Gomes NCM 2019. Characterization of bacterioplankton communities from a hatchery recirculating aquaculture system (RAS) for juvenile sole (*Solea senegalensis*) production. *PLoS ONE* 14(1): e0211209.
- Dublanchet A, 2014. Qu'est-ce que la phagothérapie ? *Hegel Vol. 4 N° 4 - 2014*
- Essoh C, Latino L, Midoux C, Blouin Y, Loukou C, Nguetta S-PA., Lathro S, Cablanmian A, Kouassi AK., Vergnaud G, Pourcel C, 2015. Investigation of a Large Collection of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages collected from a Single Environmental Source in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Plos One*, 10(6): p 010548.
- FAO, 2016. The state of world fisheries and aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, p 200
- FAO, 2018. The state of world fisheries and aquaculture 2018—meeting the sustainable development goals. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, p 210
- Fister S, Robben C, Witte AK, Schoder D, Wagner M and Rossmann P, 2016. Influence of Environmental Factors on Phage–Bacteria Interaction and on the Efficacy and Infectivity of Phage P100. *Front. Microbiol.* 7:1152. doi: 10.3389/fmicb.2016.01152
- Gaultier M, De Sordi L, Maura D, Arachchi H, Volant S, Dillies MA and Debarbieux L, 2016. Bacteriophages to reduce gut carriage of antibiotic resistant uropathogens with low impact on microbiota composition. *Environmental Microbiology* 18(7), 2237–2245
- Ghozlan AA, Zaki MM, Gaber M, Nour A, 2018. Effect of different water sources on survival rate (%) growth performance, feed utilization, fish yield, and economic evaluation on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) monosex reared in earthen ponds. *Oceanogr Fish Open Access Journal* ;6(1):1–7.
- Hyman P, 2019. Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals*, 12, 35
- Kakou Ngazoa ES, Kouya D, Koudou AA, Abole A, Guessend KN, Sylla A, Sina Kouamé M, Coulibaly Ngolo D, Kouassi Kan S, Meite S, Aoussi S, Dosso M. 2017. New identification of phages in water and in fishes from Lagoon Ebrié and their application for multidrug strains in Abidjan, West Africa. *World J Pharma Res* 6:84–89. <https://doi.org/10.20959/wjpr201799006>.
- Kalatzis, P., Bastias, R., Kokkari, C., & Katharios, P. 2016. Isolation and characterization of two lytic bacteriophages, St2 and Grn1; phage therapy application for biological control of *Vibrio alginolyticus* in aquaculture live feeds. *P L o S One*, 11(3), [e0151101]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151101>
- Katharios P, Kalatzis PG, Kokkari C, Sarropoulou E, Middelboe M, 2017. Isolation and characterization of a N4-like lytic bacteriophage infecting *Vibrio splendidus*, a pathogen of fish and bivalves. *PLoS ONE* 12(12): e0190083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190083>
- Kalatzis P, Castillo D, Katharios P, Middelboe M, 2018. Bacteriophage Interactions with Marine

- Pathogenic Vibrios: Implications for Phage Therapy Antibiotics, 7, 15; doi:10.3390/antibiotics7010015
- Kazimierczak J, Wójcik EA, Witaszewska J, Guziński A, Górecka E, Stańczyk M, Kaczorek E, Siwicki AK, Dastyh J, 2019. Complete genome sequences of Aeromonas and Pseudomonas phages as a supportive tool for development of antibacterial treatment in aquaculture. *Virology Journal*, 16:4 <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1113-5>
- Koné M, 2015. Biosécurité en pisciculture et traitements contre le parasite *Argulus* sp. pour une amélioration de la production du tilapia du Nil *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) de Côte d'Ivoire. Thèse de Doctorat unique, Université Nangui Abrogoua. 190 p
- Kotob MH, Menanteau-Ledouble S, Kumar G, Abdelzاهر M El-Matbouli M 2016. The impact of co-infections on fish: a review, *Veterinary research* 7:98 DOI 10.1186/s13567-016-0383-4
- Koudou AA, Kakou-Ngazon S, Konan KF, Aka E, Addablah A, Coulibaly ND, KOUASSI S, Kouamé-Sina M, Atta Diallo H, Guessend N, Ahoussi S, Dosso M, 2020. Occurrence of multidrug-resistant bacteria in aquaculture farms in Côte d'Ivoire (West Africa). *African Journal of Microbiology Research*, 14(5) 182-188
- Limbu SM, 2020. Antibiotics Use in African Aquaculture: Their Potential Risks on Fish and Human Health. *Current Microbiological Research in Africa* PP 203-221 https://doi.org/10.1007/978-3-030-35296-7_8
- Mensah SEP., Koudandé OD, Sanders P, Laurentie M., Mensah GA., Abiola FA, 2014. Résidus d'antibiotiques et denrées d'origine animale en Afrique : risques de santé publique. *Revue scientifique et technique* 33 (3) : n° 10062014-00034-FR
- Nagel TE, Chan BK, De Vos D, El-Shibiny A, Kang'ethe EK, Makumi A, Pirnay JP, 2016. The Developing World Urgently Needs Phages to Combat Pathogenic Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 7, 882.
- Ngazona-Kakou S, Philippe C, Tremblay DM, Loignon S, Koudou A, Abole A, Ngolo Coulibaly D, Kouassi Kan S, Kouamé Sina M, Aoussi S, Dosso M, Moineau S, 2018. Complete genome sequence of Ebrios, a novel T7virus isolated from the Ebrie Lagoon in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Genome Announc* 6:e00280-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00280-18>.
- Ngazona-Kakou S, Shao Y, Rousseau GM, Addablah AA, Tremblay DM, Hutinet G, Lemire N, Plante PL, Corbeil J, Koudou A, Soro BK, Coulibaly DN, Aoussi S, Dosso M, Moineau S, 2019. Complete genome sequence of *Escherichia coli* siphophage BRET. *Microbiol Resour Announc* 8:e01644-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01644-18>
- Nofal M and Abdel-Latif HMR 2017. Ectoparasites and Bacterial Co-infections causing Summer Mortalities Among Cultured Fishes at Al-Manzala with Special Reference to Water quality parameters. *Life Sci J* 2017;14(6):72-83]. ISSN: 1097-8135 (Print) / ISSN: 2372-613X (Online). <http://www.lifesciencesite.com>. 11. doi:10.7537/marslsj140617.11.
- Ochieng' Oduor JM, Onkoba N, Maloba F, Nyachio A, 2016. Experimental phage therapy against haematogenous multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia in mice. *Afr J Lab Med.*;5(1), a435. <http://dx.doi.org/10.4102/ajlm.v5i1.435>
- Okombe EV., Luboya LR, Nzuzi MG, Pongombo SC, 2017. *Agronomie Africaine* 29 (3) : 207 - 216
- OMS, 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organization (Document inédit).
- Ouedraogo AS, Pierre HJ, Ban'uls AL, Ouedraogo R, Godreuil S 2017. Emergence and spread of antibiotic resistance in West Africa: contributing factors and threat assessment. *Tropical Health and Medicine* 27:147-154.
- Pal S, 2015. Phage Therapy an alternate disease control in Aquaculture: review on recent advancements. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 8(9) : 68-81
- Pereira C, Moreirinha C, Lewickab M, Almeida P, Clemente C, Romalded J L, Nunes M L, Almeida A, 2016. Characterization and *in vitro* evaluation of new bacteriophages for the biocontrol of *Escherichia coli*. *Virus Research* .09.019
- Pereira C, Moreirinha C, Lewickab M, Almeida P, Clemente C, Romalded JL, Nunes ML, Almeida D, 2016. Characterization and *in vitro* evaluation of new bacteriophages for the

- biocontrol of *Escherichia coli* *Virus Research* .09.019
- Plaza, N.; Castillo, D.; Pérez-Reytor, D.; Higuera, G.; García, K.; Bastías, R, 2018. Bacteriophages in the control of pathogenic vibrios. *Electron. J. Biotechnol.*, 31, 24–33.
- Shekarchian S, Schwartz BS, Teherani A, Irby D, Chin-Hong PV, 2016. Is it time for a coordinated and longitudinal approach to antibiotic stewardship education? *Clin Infect Dis* 63:848–849.
- Silva YJ, Costa L, Pereira C, Mateus C, Cunha A[^], et al, 2014. Phage Therapy as an Approach to Prevent *Vibrio anguillarum* Infections in Fish Larvae Production. *PLoS ONE* 9(12): e114197. doi:10.1371/journal.pone.0114197
- Silva Y J, Costa L, Pereira C, Cunha A, Calado R, Newton CM, Almeida A, 2014. Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture. *Applied Microbiology, Microbial Biotechnology*, 7, 401–413