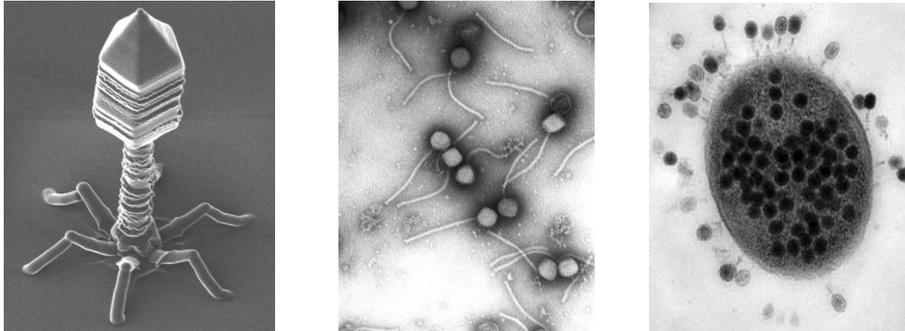


**Dénombrement des bactériophages lactiques**

**I-Présentation des phages et impact en bio-industries**

- Les bactériophages sont des virus infectant les bactéries. Près de 97% des bactériophages appartiennent à l'ordre des *Caudovirales* : ils comportent une capsidie à symétrie cubique (généralement icosaédrique) associée à une queue contractile comportant des fibres caudales à la base :



*Phages P008 (famille des Siphoviridae) infectant les lactocoques*

- Les bactériophages lactiques c'est-à-dire infectant les souches de bactéries lactiques appartiennent à la famille des *Siphoviridae*. Ils sont reconnus depuis longtemps comme la principale cause de ralentissement de la croissance des souches naturelles de lactocoques composant les levains de fromagerie. La sélection de souches résistantes à ces phages est indispensable pour un contrôle optimum des fabrications.

- D'une façon générale, les bactériophages ne doivent pas toujours être considérés comme nuisibles, ils peuvent être utilisés pour **de nombreuses applications positives** :

-en contexte médical : les suspensions phagiques peuvent être utilisées pour traiter des infections bactériennes persistantes et résistantes aux antibiotiques = **phagothérapie**

-en contexte agro-alimentaire : ils peuvent être ajoutés dans certaines productions alimentaires pour exercer un effet préventif sur les contaminants bactériens. On les utilise donc comme conservateur.

-comme agents « désinfectants » : les suspensions phagiques peuvent être utilisées comme alternatives à des protocoles de désinfection physique ou chimique pour traiter les surfaces en milieu clinique ou industriel, afin d'éliminer les bactéries sur les surfaces.

On peut soit faire une « **désinfection** » **phagique étendue**, en utilisant des cocktails de phages, chaque phage du cocktail étant dirigé vers un type de bactéries à éliminer. Ou bien faire de la « **désinfection** » **phagique ciblée**, en utilisant un phage spécifique d'une souche bactérienne que l'on veut éliminer exclusivement.

*Exemple* : document annexe « ListShield », suspension phagique dirigée contre *L.monocytogenes*, ajoutée dans certaines productions laitières ou pour le traitement des surfaces.

- Les bactériophages sont donc fréquemment étudiés :
  - on étudie leur impact sur les souches bactériennes (notion de **spectre phagique**),
  - on les dénombre par méthode adaptée.

## **II-Principe général du dénombrement par la méthode des plages de lyse**

- Les phages ne sont pas cultivables de la même façon que les bactéries ou les cellules eucaryotes : ils ne peuvent se développer seuls sur un milieu de culture. Ils ont besoin d'une cellule hôte (l'hôte est une bactérie dans le cas d'un phage) grâce à laquelle ils vont pouvoir se multiplier : les phages comme tous les autres virus sont donc des parasites intracellulaires obligatoires.
- De façon à pouvoir visualiser l'impact d'un phage sur une bactérie, le phage en question doit pouvoir lyser la bactérie (phage lytique) → c'est donc une méthode indirecte de caractérisation, la présence de phages est révélée par la disparition des bactéries hôtes.
- Pour dénombrer les particules phagiques il faut donc :
  - disposer d'une souche bactérienne sensible au phage à titrer.
  - que le phage étudié soit lytique et non lysogénique.
  - que la souche bactérienne soit en conditions de multiplication.
  - utiliser des conditions optimales pour l'adsorption phages / bactéries (température et pH adapté, présence de cations divalents...).

La méthode de dénombrement par les plages de lyse consiste à placer une culture bactérienne sensible aux phages à titrer sur un milieu gélosé en présence de dilutions de la suspension phagique.

**→ La présence de phages lytiques dans la culture bactérienne entraîne la lyse des bactéries du tapis, ce qui se traduit par l'apparition de plages claires (ou plages de lyse) dans le tapis bactérien.**

Chaque phage initialement présent dans la suspension est à l'origine de la formation d'une plage de lyse. Par analogie avec le dénombrement des bactéries on utilisera le terme **unité formant plage (=UFP)** pour établir la correspondance à une particule phagique.

Deux techniques de dénombrement peuvent être mises en œuvre :

- technique en **double couche** (ou **Top agar**),
- technique en **micro-gouttes de Hull** (ou technique des **spots**).

### **Contexte professionnel de la manipulation**

Dans une fromagerie, plusieurs accidents de fabrication ont été observés avec des problèmes de prise en masse insuffisante des caillés de fromage liée à la présence de bactériophages. Malgré des protocoles de nettoyage – désinfection plus stricts, les problèmes persistent. L'entreprise envisage éventuellement de remplacer leurs levains d'origine par des souches plus résistantes.

Un bactériophage P008 a été mis en évidence dans le lactosérum obtenu lors de l'égouttage des fromages. On réalisera le titrage de ce phage par la méthode des plages de lyse dans le but de surveiller la propagation de l'infection phagique. Deux techniques de dénombrement seront utilisées, en comparant les résultats obtenus.

A l'issue de ce protocole, on réalisera une suspension stock de ce phage permettant de tester ultérieurement la sensibilité ou non d'autres levains à ce phage.

## **Fiche protocole 1 : Dénombrement de la suspension phagique (J1)**

### **1-Matériels et réactifs**

- boîtes de Pétri carrées 12 x 12 cm et boîtes standard 90 mm
- tubes à hémolyse stériles
- tubes Eppendorf stériles
- 1 flacon de milieu gélosé M17 Top agar en surfusion à 47°C
- 1 bain Marie (réglage à 47°C)
- 1 flacon de milieu gélosé M17 maintenu en surfusion à 60°C
- 1 pilulier contenant environ 20 mL de tampon PB (phage buffer)

#### Composition du tampon PB :

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g
- NaCl 5g
- 10 mL d'une solution de CaCl<sub>2</sub> à 0,1 mol/L
- 10 mL d'une solution de MgSO<sub>4</sub> à 0,1 mol/L
- H<sub>2</sub>O qsp 1L, ajuster le pH à 6,4

- 1 seringue stérile de 5 mL + 1 filtre adaptable 0,22 microns (pour le groupe)
- pipette automatique P20, P100 et P1000 + cônes stériles
- 1 culture de *Lactococcus lactis* de 18h en bouillon M17
- 150 µL de suspension de phage P008 isolé du lactosérum

### **2-Préparation des dilutions de la suspension de phages**

Dans une série de tubes Eppendorf, diluer la suspension phagique à titrer de façon décimale jusqu'à 10<sup>-8</sup> sous un volume final de 1 mL. Le diluant est le tampon PB.

### **3-Dénombrement par technique en double couche**

#### Etape 1 : Adsorption des phages sur les bactéries hôtes

-Dans des tubes à hémolyse stériles, mélanger 20 µL de chaque dilution phagique et 200 µL de la culture de *Lactococcus*. On testera les dilutions phagiques de 10<sup>0</sup> à 10<sup>-8</sup> en simple essai.

-Homogénéiser par rotations manuelles et laisser les phages s'adsorber sur les bactéries pendant 10 minutes à température ambiante. Puis au bout de 10 minutes, placer le portoir à 37°C pendant 15 minutes pour poursuivre l'adsorption (ne pas réhomogénéiser).

#### Etape 2 : Ensemencement des milieux

-Après la phase d'adsorption, ajouter à nouveau à chaque tube précédent de mélange bactéries – phages, 100 µL de la culture de *Lactococcus*.

-Ajouter ensuite dans chaque tube, 4 mL de milieu Top agar en surfusion à 47°C (maintenir le flacon dans un bain marie à 47°C pendant les pipetages).

-Homogénéiser doucement le tube par 2 retournements successifs et verser rapidement en surface des milieux gélosés M17 coulés en boîte de Pétri. Bien répartir le top agar à la surface de la gélose.

-Laisser solidifier et incubé 24 – 48 h à 37°C en position retournée.

-Après incubation, dénombrer les UFP sur les boîtes présentant entre 10 et 100 UFP.

#### **4-Dénombrement par la technique des micro-gouttes de Hull**

Cette variante propose un titrage sur une seule boîte par dépôt et étalement de 5 µL des dilutions de phages sous forme de spots de 2 cm de diamètre en surface d'un milieu gélosé. Le milieu est préalablement ensemencé en masse directement dans le flacon, à l'aide de la souche bactérienne hôte.

##### **Mode opératoire**

-A partir de la culture en bouillon de la souche hôte, réaliser une dilution au 1/10 en eau physiologique.

-Ensemencer le reste du flacon de gélose M17 en surfusion (soit environ 60 mL) avec 1 mL de la dilution précédente.

Attention : attendre que la température de surfusion soit devenue acceptable pour l'inoculation.

Couler en boîte de Pétri 12 x 12 cm. Laisser solidifier, puis sécher sous PSM pendant 15 min.

-Prévoir un gabarit permettant la réalisation de 9 dépôts régulièrement espacés.

-Les dilutions phagiques (de  $10^0$  à  $10^{-8}$ ) sont déposées régulièrement en surface de la gélose bien sèche sous forme de spots ronds d'environ 2 cm de diamètre : pour cela, déposer à l'aide d'une pipette automatique 5 µL par dépôt, puis à l'aide d'une anse, étaler la goutte de 5 µL de façon à former un cercle de 2 cm de diamètre environ (une anse suffit pour traiter toute la boîte). Veiller à ne pas altérer la surface de la gélose.

-Laisser sécher les dépôts, éventuellement en utilisant le PSM, puis incuber 24 – 48 h à 37°C en position retournée.

-Après incubation, compter les plages de lyse dans les spots où elles sont non confluentes.

#### **5-Réalisation de témoins**

En parallèle des dénombrements, sur une gélose M17 préalablement coulée et partagée en 2 zones, proposer un protocole permettant d'effectuer :

-un témoin n°1 de viabilité et de pureté de la souche,

-un témoin n°2 permettant de vérifier que l'activité antimicrobienne de la suspension phagique isolée du lactosérum, est exclusivement liée aux phages qu'elle renferme.

##### **Rapport d'activité**

###### Compréhension de la méthode :

-Expliquer le rôle des constituants du tampon phagique utilisé.

-Expliquer la préparation du témoin n°2.

-Exploiter la boîte témoin après incubation.

###### Dénombrement par technique en double couche

-Proposer un organigramme schématique résumant la technique.

-Calculer la concentration de la suspension phagique initiale.

###### Dénombrement par la technique des spots

-Schématiser la boîte obtenue après incubation.

-Calculer la concentration de la suspension phagique initiale et comparer les résultats des deux méthodes.

## **Fiche protocole 2 : Préparation d'une suspension stock de phages (J2)**

Une suspension stock est une préparation hautement concentrée en phages obtenue par récupération des particules virales directement au sein des plages de lyse. La suspension est mise en présence d'un agent cryoprotecteur permettant une congélation à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Mode opératoire**

On opère à partir des boîtes de dénombrement en double couche : chaque plage de lyse comporte une quantité importante de phages se répartissant dans la couche de top agar. On choisit une ou deux boîtes présentant un nombre de plages de lyse élevé (généralement celles correspondant aux dilutions  $10^0$  et  $10^{-1}$ ), à partir desquelles on récupère la couche de top agar pour remettre en suspension les phages.

-A l'aide d'une spatule inox stérile prélever toute l'épaisseur du top agar sur les boîtes retenues et placer la pellicule de gélose dans un flacon stérile de 40 mL.

-Ajouter 5 mL de tampon PB. Bien boucher le flacon.

-Homogénéiser efficacement par agitation et de nombreux retournements successifs de façon mettre en suspension les phages.

-Transférer le contenu dans un tube stérile centrifugeable, puis centrifuger à 250 g pendant 5 min.

-Après centrifugation, transvaser aseptiquement la totalité du surnageant dans une seringue stérile équipée d'un filtre  $0,45\ \mu\text{m}$ . Filtrer et récupérer le contenu dans un tube à hémolyse.

-Estimer le volume du filtrat, puis ajouter dans le tube du glycérol stérile, de façon à obtenir une concentration finale en glycérol de 10%.

-Homogénéiser et stocker le tube à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La suspension stock peut être ainsi conservée plusieurs mois. Il est également possible de stocker de plus faibles volumes de suspension phagique en tube Eppendorf de façon à décongeler seulement un aliquote lors d'une manipulation.

### **Rapport d'activité**

-Expliquer l'intérêt de l'étape de centrifugation.

-Expliquer l'intérêt de la filtration à  $0,45\ \mu\text{m}$ .

-Expliquer l'intérêt de l'ajout de glycérol.

-Construire un organigramme schématique résumant le protocole.