

Génétique

Bactériophages

Réf :117 134

Français – p 1

Kit effet bactéricide du bactériophage T4

Version : 5202

1. Effet bactéricide des bactériophages

1.1 Principe générale

La manipulation proposée ici consiste à réaliser une culture bactérienne sur laquelle seront déposées des disques d'antibiotiques à tester et une goutte de suspension de bactériophages T4. L'efficacité des antibiotiques sera évaluée par l'apparition d'une plage d'inhibition dans laquelle les bactéries n'auront pu se développer. L'action des bactériophages sera mise en évidence par l'apparition d'une plage de lyse au sein de laquelle les bactéries en développement sont détruites car parasitées par le bactériophage.

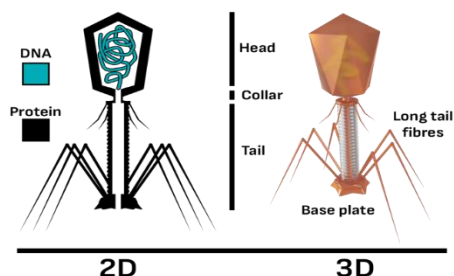
2. Les bactériophages

Les bactériophages sont des virus de bactéries et, avec les virus de plantes, ce sont les seuls virus que l'on peut manipuler en classe en toute sécurité.

2.1 Historique

C'est en observant des « plages claires » au sein d'une culture de bactéries sur gélose en 1917 que le franco-canadien Félix D'Hérelle a formulé l'hypothèse d'une part que ces plages claires correspondaient à une lyse bactérienne et d'autre part que cette lyse pouvait être provoquée par un agent inconnu qu'il nomme "bactériophage", littéralement "le mangeur de bactéries". D'Hérelle isole en quelques mois des bactériophages actifs contre plusieurs espèces bactériennes. Dès 1918, il imagine un usage thérapeutique du bactériophage qu'il concrétise en 1919 par le traitement (avec succès) d'enfants victimes de dysenterie bacillaire hospitalisés à l'hôpital Necker de Paris. La phagothérapie est née.

2.2 Structure d'un bactériophage



Les bactériophages sont des virus n'infectant que des bactéries. Leur taille est comprise entre 20 et 200 nm. Ils sont constitués d'une enveloppe protéique externe (la capside) protégeant le matériel génétique. Pour une majorité des bactériophages connus, ce matériel est une molécule d'ADN double-brin, mais il peut être aussi constitué d'ADN simple-brin, d'ARN simple-brin, ou d'ARN double-brin.

S'il existe différentes morphologies de bactériophages, la structure commune est la même. Elle comporte au minimum (figure 1) :

- le matériel génétique, en général contenu dans une capside,
- un dispositif d'arrimage à la bactérie cible,
- un dispositif d'injection du matériel génétique dans la bactérie.

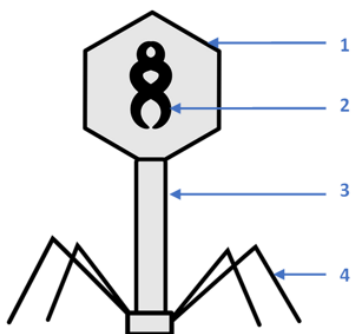


Figure 1 :
1=capside, 2=matériel génétique,
3=dispositif d'injection du matériel génétique,
4=dispositif d'arrimage

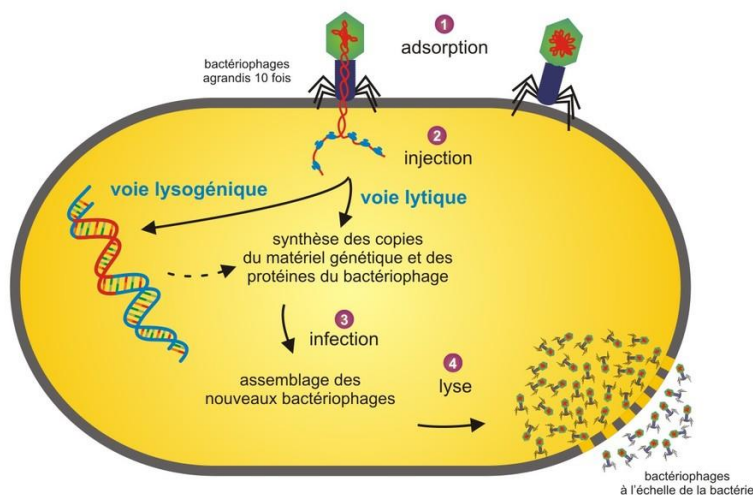
Le cycle de reproduction des bactériophages :

Selon leur cycle biologique, on distingue deux types de bactériophages : les virulents et les tempérés (figure 2).

Les bactériophages virulents détruisent la bactérie.

Les bactériophages tempérés sont dotés de la propriété d'intégrer leur génome au chromosome bactérien.

Figure 2 : les cycles lytiques et lysogéniques



Source : Institut Pasteur, Laurent Debarbieux. <https://research.pasteur.fr/fr/team/group-laurent-debarbieux/>

3. Composition

Pour 40 boîtes :

- Milieu Mueller Hinton 1L
- 1 tube inoculum Escherichia coli (type k12), culture dense lyophilisée.
- (Souche Pasteur)
- 1 Tube d'eau physiologique stérile (1 x 50mL)
- 1 tube bactériophages T4 (400 µL) (tube unique pour la classe)
- Disques imprégnés de pénicilline (x 50)
- Disques imprégnés de tétracycline (x 50)
- 40 boîtes de Pétri

4. Stockage et conservation



	Stockage	Conservation avant ouverture
Milieu de culture Mueller Hinton	+ 4 °C	Plusieurs mois - voir date de péremption sur emballage
Tubes disques antibiotiques	- 20 °C ou 4 °C	Plusieurs mois - voir date de péremption sur emballage
Inocula bactériens Tubes stériles d'eau physiologique Tubes bactériophages T4	+ 4 °C	4 mois environ après réception

5. Matériel nécessaire (Non fourni)

- Micropipette 2-20 µL
- Tubes stériles (tubes à hémolyse ou des tubes en verre à bouchon à vis stériles etc.) 1,5 mL
- Pipette pasteur stérile 1 mL
- Pince stérile
- Râteaux / anse
- Bec électrique (atmosphère stérile)
- Bain marie ou micro-onde
- Incubateur ou étuve
- Vortex (optionnel)

6. Mise en œuvre

6.1 Préparation des boîtes de gélose (48h avant le TP)

Prévoir le volume en fonction du nombre de boîtes de Pétri diamètre 9cm utilisées par postes de travail *Elève* et quelques boîtes supplémentaires pour le laboratoire afin d'ensemencer la souche *E.coli*.

Remarque : on coule 20 mL de milieu dans une boîte de Pétri de 9 cm de diamètre.

* Réchauffer le contenu des bouteilles de Mueller Hinton :

- Soit au bain marie, 90°C, remuer régulièrement pour homogénéiser
- Soit au micro-onde, remplacer le bouchon métallique par du coton cardé stérile par exemple, réchauffer par session de 1 à 2 minutes en remuant régulièrement pour homogénéiser

* Lorsque le milieu est liquide :

- Couler chaque boîte et laisser refroidir.

Une fois solidifiées, les boîtes de gélose peuvent être stockées plusieurs heures au froid (couvercle vers le bas).

6.2 Préparation des inocula

6.2.1 Méthode simplifiée

- Reprendre le lyophilisat (*E.coli*) avec 3 mL d'eau physiologique fourni dans le kit.
- Bien agiter (bouchons fermés).
- Transférer 1 mL de la solution d'inoculum dans les 47 mL d'eau physiologique stérile (dilution finale de 1/50^{ème}) qui correspond à un trouble de 1 sur échelle de McFarland.
- Distribuer 3 mL de cette suspension dans des tubes à hémolyse ou des tubes en verre à bouchon à vis stériles.

6.2.2 Méthode avec échelle Mac Farland

Il est à noter que la technique d'ensemencement qui associe une réhydratation d'un lyophilisat puis inondation de boîtes de Pétri par pipette Pasteur simplifie la préparation et réduit les temps de manipulation. Cependant une mise en œuvre plus classique est possible.

Protocole

Etalon Mc Farland

- Stériliser 1 flacon d'eau physiologique (0,9% NaCl)
- Préparer l'étalon de Mac Farland 0,5: (Densité Optique de 0,08 à 0,1 à 625 nm) : Dans une fiole de 100 mL : introduire 0,5 mL de solution de BaCl₂ dihydraté à 1%. Compléter à 100 mL avec une solution de H₂SO₄ à 10mL/L. Conserver dans des flacons identiques à ceux qui seront utilisés pour préparer la suspension de microorganismes contenant l'eau physiologique précédemment citée.

Pour chaque poste de travail élèves, stériliser (en fonction du nombre de boîtes ensemencées) :

- Petits tubes en verre à bouchon à vis autoclavables (si on ne travaille pas avec tubes à hémolyse stériles jetables)
- pinces fines métalliques emballées dans de l'aluminium

Juste avant le TP, en conditions stériles :

- Faire une suspension d'*E. coli* dans le flacon d'eau physiologique stérilisée. La suspension doit avoir un trouble comparable à l'étalon Mac Farland 0,5 à 1.

Distribuer 3 mL de cette suspension dans des tubes à hémolyse ou des tubes en verre à bouchon à vis stériles.

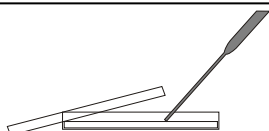
Remarque : Prévoir le volume de suspension (de bactéries) et le nombre nécessaire de tubes en fonction du nombre de paillasse d'élèves et du nombre de boîtes ensemencées.

6.3 Inondation des boîtes de milieu Mueller Hinton

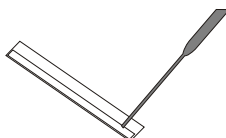
A l'aide d'un marqueur diviser la boîte en 3 parties (2 antibiotiques + 1 goutte de bactériophages) ou 4 parties (2 antibiotiques + 1 goutte de bactériophages + 1 goutte eau stérile) suivant l'option retenue.

Procéder ensuite à l'inondation des géloses.

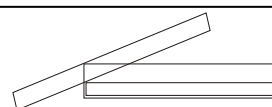
Prélever environ 1 mL de suspension bactérienne. Inonder la gélose.



Répartir la suspension sur toute la surface de la boîte de Pétri.

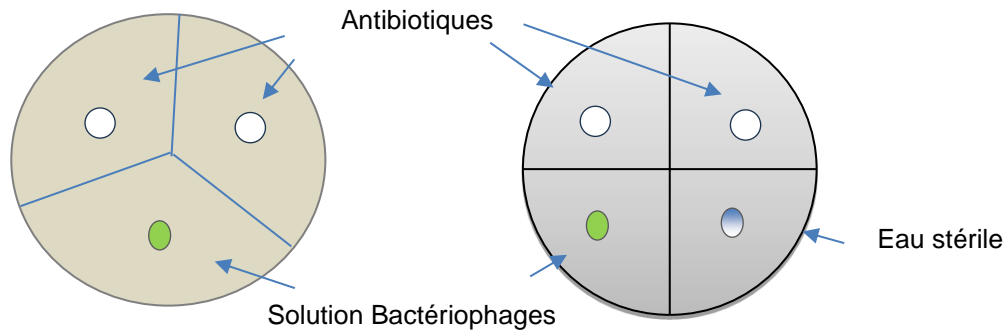


Laisser la boîte de Pétri légèrement entre-ouverte. Laissez sécher 5 min)



6.4 Dépôt des disques et de la solution

- À l'aide d'une pince stérile (ou pince inox flambée à l'alcool), déposer les 2 disques d'antibiotiques différents selon le schéma ci-contre.
- Déposer 10 μL de solution bactériophages à l'aide d'une micropipette
Ou une goutte fine à l'aide d'une anse ou d'un capillaire stérile (laisser imprégner).
- Option témoin : Déposer 20 μL d'eau stérile à l'aide d'une micropipette.



6.5 Incubation



Après le TP :

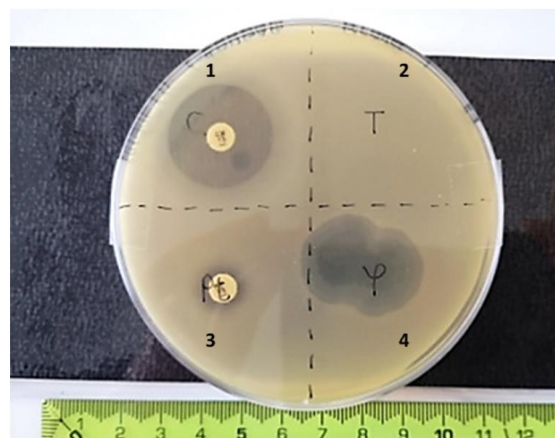
Après absorption des gouttes de bactériophages, les boîtes sont incubées à l'envers à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Les boîtes sont ensuite stockées à l'envers, parafilmées, et au réfrigérateur en attendant la lecture par les élèves.

Les élèves disposeront de solution de désinfection de paillasse, de savon et de gel hydroalcoolique avant et après la manipulation des boîtes.

7. Résultats

Les plages de lyse apparaissent autour des disques antibiotiques ainsi qu'autour de l'emplacement de la goutte de bactériophage T4.



Résultat de la culture d'*E. coli*

1 : disque de gentamicine, 2 : témoin sans dépôt, 3 : disque de pristinaamycine, 4 : dépôt d'une goutte de bactériophages T4

8. Service après-vente

La garantie est de 2 ans.

Pour tous réglages, contacter le **Support Technique** au **09 69 32 02 10**.

Le matériel doit être retourné dans nos ateliers et pour toutes les réparations ou pièces détachées, veuillez contacter :

JEULIN – S.A.V.

468 rue Jacques Monod

CS 21900

27019 EVREUX CEDEX France

09 69 32 02 10*

** appel non surtaxé*