

BAPTISTE GUYOMARD
VIOLETTE LAUNEAU
ARTHUR SALLES
138ÈME PROMOTION

BACTÉRIOPHAGES T4 CONTRE *E-COLI*

MATÉRIELS ET MÉTHODES

MATÉRIELS ET MÉTHODES



A/ CULTURE DE BACTÉRIES:

- **Objectif :** Constituer un stock suffisant de bactéries en faisant une culture overnight de bactéries.

- **Matériel :**

1. Bactéries : *Escherichia-Coli MG1655*, connues pour être hôte du bactériophage T4. Récupérées sur boîte de pétri gélosée.
2. Milieu de culture utilisé : Lysogeny Broth or LB type Miller (*Sigma-Aldrich Merck L3522*).
3. Falcon tube de 15 mL.
4. Cryotube de 1,5 mL.



- **Manipulation :**

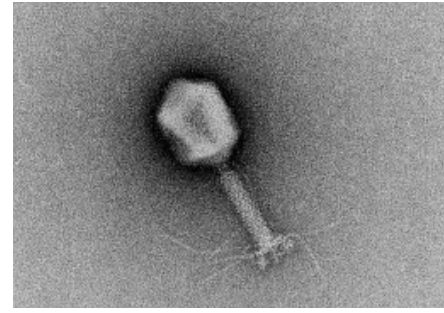
Préparation du milieu liquide : Pour 1L final, mélanger 20g de poudre LB dans 1L d'eau distillée. Homogénéiser la solution et chauffer jusqu'à dissolution complète du solide. Autoclaver le mélange pour stérilisation.

Culture des Bactéries : Sous atmosphère stérile (hotte ou bec). Pipetter 10mL de milieu liquide LB stérile puis verser dans un Falcon de 50mL. À l'aide d'une anse stérile, gratter la surface de la boîte de pétri au niveau d'une colonie développée. Déposer les bactéries accrochées dans le Falcon. Visser le Falcon et placer-le dans un incubateur sous agitation à 37°C pendant une nuit (12h Overnight ON). Par la suite pour perpétuer la culture, réitérer la procédure en pipettant 4 mL de bouillon précédent que vous verser dans 6mL de LB stérile.

Stockage à -80°C : Pour la congélation de la souche, des cryotubes spécifiques doivent être utilisés. Sous atmosphère stérile, pipetter 0,9ml de LB stérile à insérer dans les cryotubes. Prélever en trempant une anse stérile dans le bouillon et l'insérer dans le tube en agitant bien dans le LB liquide. Laisser incubé à 37°C pendant une nuit. Rajouter si développement bactérien efficace le glycérol à 20% en masse et stocker le tube à -80°C.



B/ CULTURE ET PROPAGATION DES BACTÉRIOPHAGES:



T4 en MET ©Institut Pasteur/Eric Larquet -

- **Objectif :** Constituer un stock suffisant de bactériophages
- **Matériel :**
 1. Bactériophage : *Escherichia coli virus T4*, spécifique à la bactérie.
 2. Milieu de culture utilisé : Lysogeny Broth or LB type Miller (*Sigma-Aldrich Merck L3522*).
 3. Falcon tube de 15 mL.
 4. Seringue plastique
 5. Filtre adaptable pour seringue de porosité 0,45 microns.

- **Manipulation :**

Prélever 1mL de solution initiale contenant des phages compléter par 8ml d'eau MiliQ stérile. Ajouter 1ml de milieu de culture concentré (LB 10x) aux 9ml d'eau filtrée. A l'aide d'une anse stérile prélever un peu d'E. coli et la re-suspendre dans les 10ml de solution. Fermer le tube et Incuber le tube à 37°C pendant 24h.

E. coli va se multiplier grâce au milieu de culture. Si un ou plusieurs phages capables d'infecter E. coli sont présents dans les 9ml de l'échantillon d'eau, ils vont l'infecter et s'y multiplier (enrichissement). Après 24h un nombre suffisant de bactériophages pourra être mis en évidence. Prélever le bouillon à l'aide d'une seringue et filtrer le contenu pour se débarrasser des bactéries du bouillon.

Après cette période d'incubation, le tube peut être conservé plusieurs mois à 4 °C.

C/ RÉALISATION DES COUCHES D'AGAR

- **Objectif :** Mettre au point les milieux de cultures solides.
- **Matériel :**
 1. Agar Sigma-Aldrich A1296,
 2. LB type Miller (*Sigma-Aldrich Merck L3522*),
 3. Boîtes de pétri plastiques stériles,
- **Manipulation :**

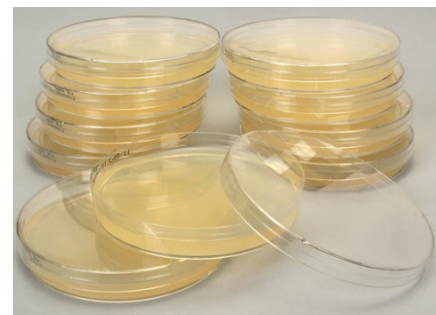
Préparation des milieux :

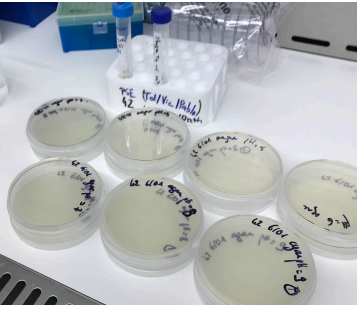
Gel première couche (dure notée LB+AGAR) :

- Peser **10g** d'agar et verser dans une bouteille de 500mL ;
- Peser 10g de LB Broth et verser dans la bouteille ;
- Ajouter de l'eau distillée jusqu'à obtenir 500mL de solution ;
- Homogénéiser le milieu.

Gel deuxième couche (molle notée Top Agar):

- Peser **6g** d'agar et verser dans une bouteille de 500 mL





- Peser 10g de LB Broth et verser dans la bouteille.
- Ajouter de l'eau distillée jusqu'à obtenir 500mL de solution ;
- Homogénéiser le milieu en secouant.

Les bouteilles sont alors autoclaves pour l'étape de stérilisation. Elles doivent être ouvertes uniquement en milieu stérile.

Coulage dans les boites :

Se placer dans un milieu stériles avant d'ouvrir les boites. À l'aide d'un micro-ondes, réchauffer le gel jusqu'à sa surfusion en veillant à ne pas faire déborder le contenu. Couler des couches de LB+AGAR de 5mm environ et répartissant sur toute la surface de manière homogène. Laisser refroidir sous la hotte sans le couvercle (pour éviter la condensation).

Une fois que cette première couche est refroidit, couler 3mm de Top Agar sur l'ensemble de la surface rapidement de manière à avoir une surface homogène plane.

D/ MISE EN ÉVIDENCE DES LYSES

- **Objectif :** Mettre en contact les bactériophages avec les bactéries sur milieu solide pour observer des plages de lyse et fixer le rapport phages/bactéries.

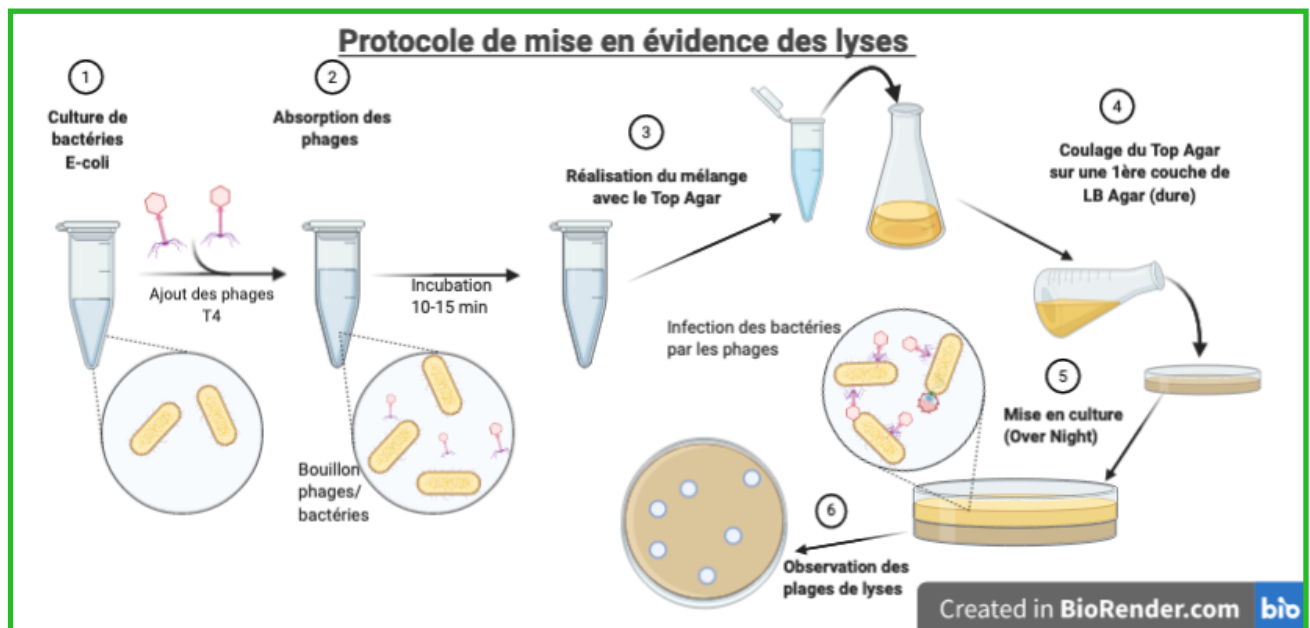
- **Matériel :**

1. Boites de pétri avec LB+AGAR préalablement coulé ;
2. Préparation pour Top Agar ;
3. Bouillon LB contenant E-coli ;
4. Suspension de bactériophages ;
5. Eppendorf de 1,5mL ;
6. Cuve à spectrométrie 1mL ;
7. Tube de 50mL

- **Manipulation :**

Préparer une culture liquide de E-coli dans un tube de 15mL. Prélever dans un eppendorf 100 μ L de cette culture, et 1mL dans une cuve à spectrométrie et réaliser la densité optique (DO) de la culture. Si la culture est dans une croissance exponentielle (DO comprise entre 0,4 et 0,8) alors la culture peut être utilisée pour la suite. Noter la valeur de la DO pour qu'elle devienne la référence pour les autres expériences et ainsi avoir toujours le même rapport phages/bactéries.

Dans l'éppendorf, rajouter 100 μ L de suspension de phages et incubé le pendant 15 min à 37°C. Chauffer la préparation de Top Agar jusqu'à sa surfusion (45°C environ) et diviser le dans plusieurs tubes de 15mL remplis jusqu'à 6mL. À l'aide d'un thermomètre contrôler la température, à 39°C ajouter au Top Agar du mélange Phages+Bactéries puis verser le tout sur la LB+AGAR dur. Incuber les boites à 37°C pendant une nuit. Pour que l'expérience soit exploitable le nombre de plages de lyse doit être inférieur à environ 100 et ne doivent pas se toucher.



Remarque : Le bon rapport phage/bactérie est celui pour lequel à l'issue de l'expérience, on peut dénombrer (grâce à ImageJ par exemple) entre 30 et 300 plages de lyse. Afin de déterminer la concentration optimale en phages dans la solution qu'on incorpore à la culture liquide bactérienne, il faut en amont établir un étalon de solutions de phages et réaliser la manipulation suivante avec une concentration en bactéries fixée (reproductible grâce à la DO). On obtient plusieurs boîtes dont seules quelques-unes sont en fait exploitables, dans lesquelles des plages de lyse sont visibles et dénombrables.

E/ MODIFICATION PH

• **Objectif :** Étudier l'influence du pH du Top Agar sur l'action des phages.

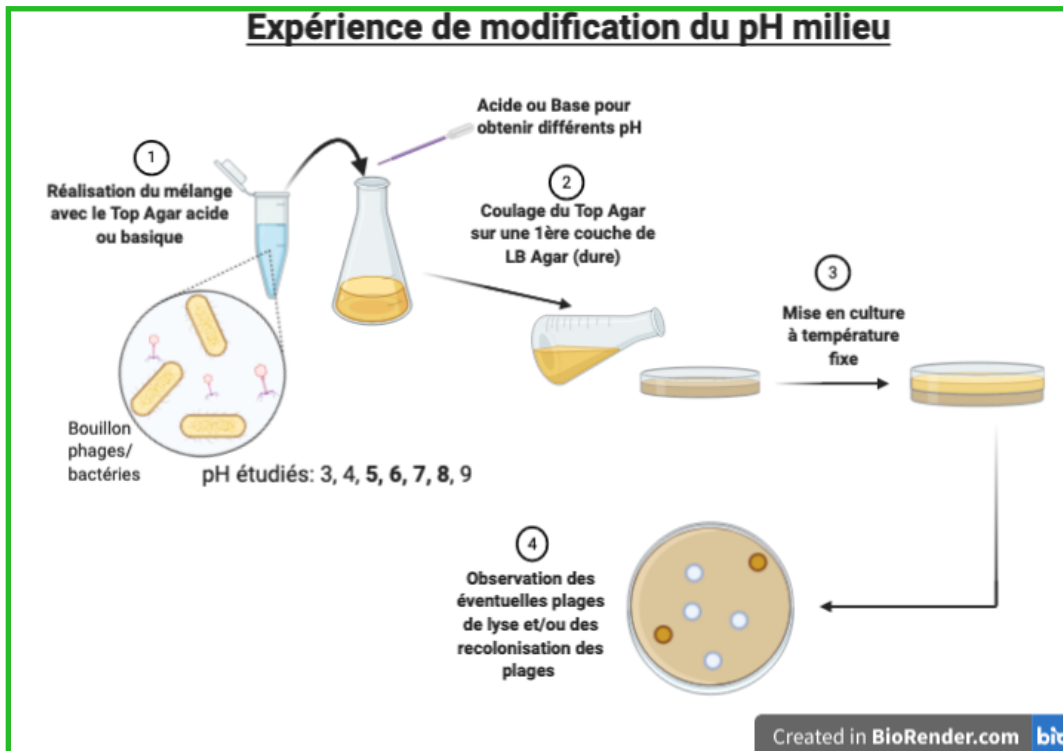
• **Matériel :**

1. Boîtes de pétri avec LB+AGAR préalablement coulé ;
2. Préparation pour Top Agar ;
3. Bouillon LB contenant E-coli ;
4. Suspension de bactériophages ;
5. Eppendorf de 1,5mL ;
6. Cuve à spectrométrie 1mL ;
7. Tube de 50mL ;
8. Eau physiologique stérile NaCl 0,9% en masse ;
9. Solution d'acide chlorhydrique concentrée ;
10. Solution d'hydroxyde de sodium concentrée ;
11. pH-mètre ;

• **Manipulation :**

Dans un eppendorf, mélanger 100µL de solution de phages avec 100µL de bouillon bactérien, et incuber-le pendant 15min à 37°C. À partir d'une préparation de Top Agar à pH neutre originellement, ajouter de l'acide chlorhydrique ou de la soude au mélange

jusqu'à obtenir le pH souhaité. Pour les mesures de pH utiliser un pH-mètre étalonné et nettoyé à l'alcool préalablement. Couler les boîtes de pétri et les incubent overnight à 37°C. Réaliser les boîtes témoins pour chaque variation de pH.



F/ MODIFICATION TEMPÉRATURE

• **Objectif :** Étudier l'influence de la température de stockage sur l'action des phages.

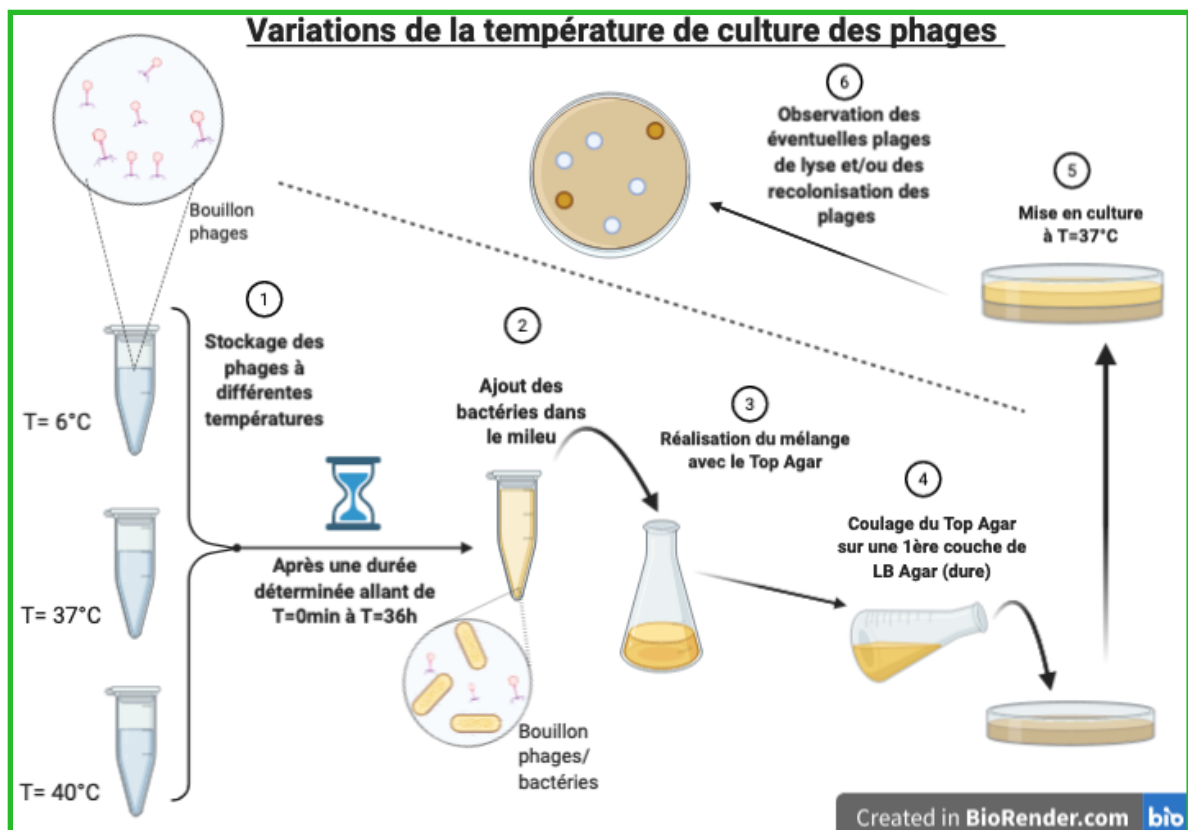
• **Matériel :**

1. Boîtes de pétri avec LB+AGAR préalablement coulé ;
2. Préparation pour Top Agar ;
3. Bouillon LB contenant E-coli ;
4. Suspension de bactériophages ;
5. Eppendorf de 1,5mL ;
6. Tube de 50mL ;
7. Eau physiologique stérile NaCl 0,9% en masse ;

• **Manipulation :**

Préparer plusieurs eppendorfs contenant 100 µL de bouillon de phages et les stocker à différentes températures pendant une durée déterminée allant de 0 min à 36h. Pipetter 100µL de bactéries aux 100µL de phages stockés et ajouter le tout à la préparation de Top Agar et couler les boîtes. Incuber les boîtes à 37°C overnight. Pour chaque paramètre modifié, réaliser une boîte témoin ne contenant pas de phages.

Expérience des variations des conditions de température				
Température des phages	Frigo 6°C		40°C	
	Témoin	Test	Témoin	Test
t = 0 min (T = 37,5°C au départ)	T= Bactéries + Eau phy	E= Bactéries + Phages	T= Bactéries + Eau phy	E= Bactéries + Phages
t = 10 min	T	E	T	E
t = 20 min	T	E	T	E
t = 30 min	T	E	T	E
t = 40 min	T	E	T	E
t = 50 min	T	E	T	E
t = 1h	T	E	T	E
t = 1h30	T	E	T	E
t = 2h	T	E	T	E
t = 1,5 j	T	E	T	E



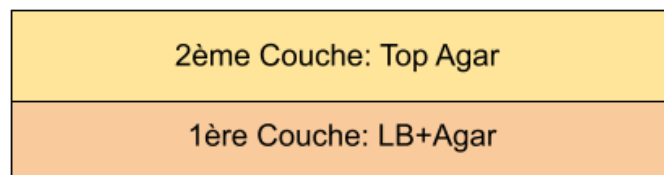
G/ ETUDE DE LA MIGRATION DE COLONIES EN PRÉSENCE DE PHAGES

- **Objectif :** Étudier la propagation des colonies bactériennes en contact avec des phages au cours du temps.
- **Matériel :**
 1. Boîtes de pétri "maison" avec LB+AGAR préalablement coulé ;
 2. Préparation pour Top Agar ;
 3. Bouillon LB contenant E-coli ;
 4. Suspension de bactériophages ;
 5. Eppendorf de 1,5mL ;
 6. Tube de 50mL ;
 7. Caméra Basler acA1300-60gm ;
 8. Logiciel Pylon Viewer ;
 9. Eau physiologique stérile NaCl 0,9% en masse ;

- **Manipulation :**

Préparation de la cuve :

Commencer par nettoyer la cuve, à l'eau de javel (l'alcool pourrait endommager les joints silicone), rincer et placer la sous la hotte stérile. Délimiter les deux rangées à l'aide des frontières stériles amovibles en plexiglass.



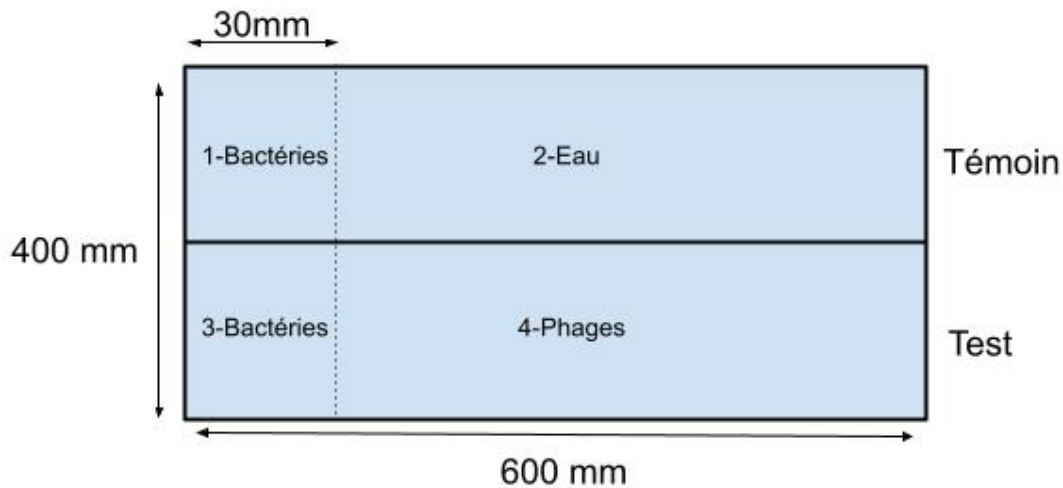
Première couche :

- Couler la première couche de LB+Agar dans les deux rangées.

$$V_{\text{agar}} = L . l . e = \frac{400\text{mm} . 600\text{mm} . 5\text{mm}}{2} = 0,6\text{L d'agar.}$$

- Percer les bulles qui apparaissent en surface rapidement à l'aide d'une pointe de pipette stérile.
- Laisser reposer en refermant le couvercle, jusqu'à ce que le gel soit solide.

Seconde couche :



Sur le schéma sont délimités les 4 zones comportant des mélanges Top Agar différents, les voies témoins et test sont séparées par le plexiglass de l'étape précédente.

-Toujours sous hotte, séparer les zones 1&2 et 3&4 à l'aide de frontières amovibles, en évitant d'endommager la 1ère couche.

-À partir de préparation de Top Agar classique, réaliser les mélanges définis dans le tableau ci-dessous:

<p>Zone 1</p> <p>V(eau) = 360 µL + V(top agar) = 200*30*3 = 18 mL</p>	<p>Zone 2</p> <p>V (eau) = 56400 µL = 5,64 mL + V (top agar) = 0,3 L - 0,018 L = 282 mL</p>	<p><i>Témoin</i></p>
<p>Zone 3</p> <p>V(bact) = 360 µL + V(top agar) = 200*30*3 = 18 mL</p>	<p>Zone 4</p> <p>V (phages) = 56400 µL = 5,64 mL + V (top agar) = 0,3 L - 0,018 L = 282 mL</p>	<p><i>Test</i></p>

-Incuber ces mélanges pendant 15min à 37°C.

-Couler dans cet ordre temps en veillant à éviter les éclaboussures sur les autres zones: 4 puis 2 et attendre la solidification.

-Enlever les frontières amovibles entre 1&2 et 3&4 quand tout est sec et couler le Top Agar dans les 1 et 3.

-Percer les bulles qui apparaissent en surface rapidement à l'aide d'une pointe de pipette stérile.

-Laisser reposer en refermant le couvercle, jusqu'à ce que le gel soit solide.

Acquisition video :

- Refermer la cuve et la placer dans l'incubateur à 37°C équipé de l'appareil photo.
- Faire la mise au point et adapter le gain sur le logiciel et régler la durée et le nombre de photos.

H/ COMPTAGE DES PLAGES DE LYES PAR IMAGEJ

Une fois les durées d'incubation réalisées, prendre en photo les boîtes de pétris et les charger sur le logiciel ImageJ. Le but est de dénombrer les plages de lyses grâce aux outils internes au logiciel. Plusieurs didacticiels existent sur l'utilisation de ces outils:

-<https://blog.espci.fr/mecaflu/files/2019/02/tuto-imagej.pdf>

-https://silico.biotoul.fr/site/images/b/b2/1112_TP_ImageJ.pdf