

RECHERCHE DE BACTERIOPHAGES DANS LES EAUX DE GUADELOUPE

PALATIN J. , LENDO K. , POULAIN J.

TSTL, Lycée Raoul Georges Nicolo, Basse-Terre, GUADELOUPE

INTRODUCTION

Les antibiotiques sont des médicaments qui agissent soit en empêchant le développement des bactéries (antibiotiques bactériostatiques) soit en les tuant (antibiotiques bactéricides). Un grand nombre des antibiotiques existants sont constitués de molécules naturelles, fabriquées par des micro-organismes : des champignons ou d'autres bactéries.

Il existe plusieurs familles d'antibiotiques, et chacune d'entre elle n'est active que contre une bactérie ou une famille de bactéries spécifiques. Les antibiotiques sont efficaces uniquement contre les bactéries ou maladies d'origine bactérienne ; elles n'ont aucune efficacité sur les virus ou les champignons.

Depuis leur première utilisation au milieu du 20^{ème} siècle, ils ont permis de progresser dans le traitement des maladies. Mais leur usage massif souvent inapproprié favorise l'apparition des résistances bactériennes aux antibiotiques.

L'utilisation massive des antibiotiques pose donc problème. Certaines bactéries devenues résistantes aux antibiotiques sont responsables d'infection relativement courante ou grave.

Comment lutter contre des bactéries devenues multi-résistantes aux antibiotiques ?

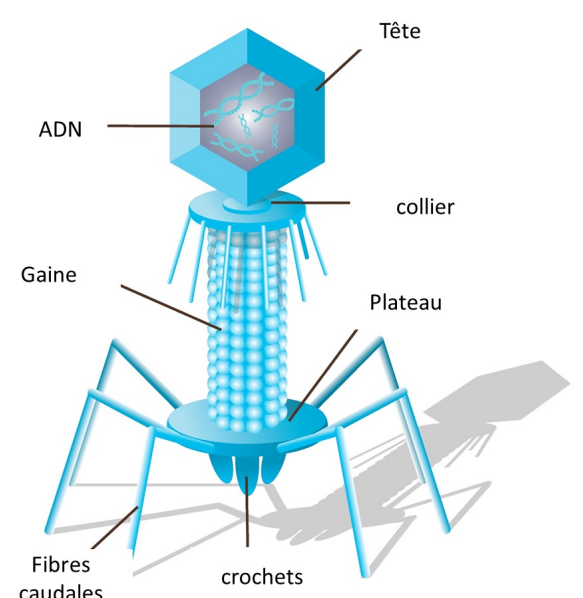
MODELE D'ETUDE

Les bactériophages (dit phages) constituent un type de virus qui infecte des bactéries, mis en évidence par Frédéric Twort en 1915 et en 1917 par Félix d'Hérelle. Chaque phage est spécifique d'une espèce bactérienne. Certains phages ont une action **bactériostatique** et d'autres ont une action **bactéricide** sur les bactéries.

Les bactériophages, bien que méconnus, représentent la biomasse la plus importante de la planète (10^7 /mL en milieu liquide et 10^9 /mL dans les sédiments). On les trouve dans l'eau de mer, de rivières et d'égout, sur les végétaux, sur les sols, sur la peau...

L'utilisation des bactériophages est une technique pionnière efficace de lutte contre les infections bactériennes. Les phages agissent principalement sur les Brucella, le bacille koch et sur diverses bactéries marines..

STRUCTURE D'UN BACTÉRIOPHAGE



Hypothèse. Les eaux de Guadeloupe contiennent des bactériophages

Objectifs. Déterminer si des eaux de mer et de rivière contiennent des bactériophages à action antibactérienne

PRELEVEMENTS D'EAU DE MER ET D'EAU DE RIVIERE

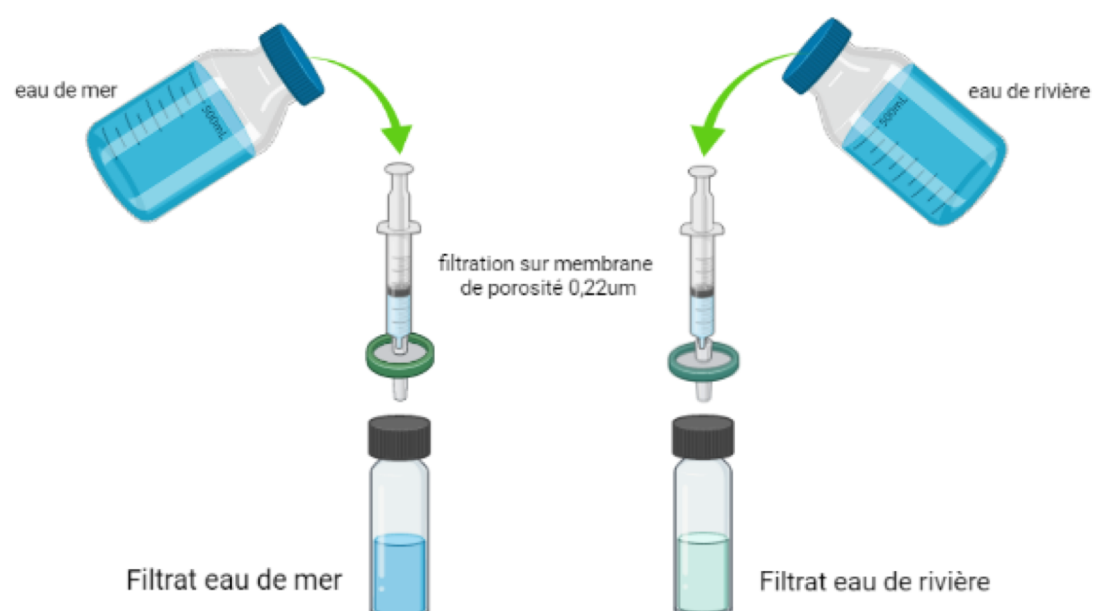
Des échantillons d'eau de mer ont été prélevés à la plage de Bananier et sont notés «Eau de mer». Des échantillons d'eau de la rivière ont été prélevés à la rivière de Grand-Rivière à Vieux Habitants et sont notés «Eau de rivière ». Les échantillons ont été prélevés avec des flacons stériles.

PREPARATION DE SUSPENSIONS PHAGIQUES : ELIMINATION DES MICROORGANISMES DES ECHANTILLONS D'EAU DE MER ET DE RIVIERE PAR FILTRATION SUR MEMBRANE

Pour obtenir des suspensions de bactériophages ou suspensions phagiques, nous avons utilisé une méthode de filtration.

Les échantillons d'eaux de mer et de rivière ont été filtrés sur des membranes de porosité 0,22µm. Nous avons ainsi pu éliminer les contaminants tels que les débris et les microorganismes présents (bactéries...). Les filtrats obtenus sont notés « H₂O pure M » et « H₂O pure R ».

Si les eaux prélevées contiennent des phages, ces virus se trouveront dans le filtrat car leur taille de l'ordre du nanomètre (nm) est inférieure à celle des pores de la membrane.



DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIOPHAGES DANS DES FILTRATS D'UNE EAU DE MER ET D'UNE EAU DE RIVIÈRE PAR TECHNIQUE EN DOUBLE COUCHE AVEC SPOTS

PROCEDURE OPERATOIRE

1. Préparation de la gélose en double couche

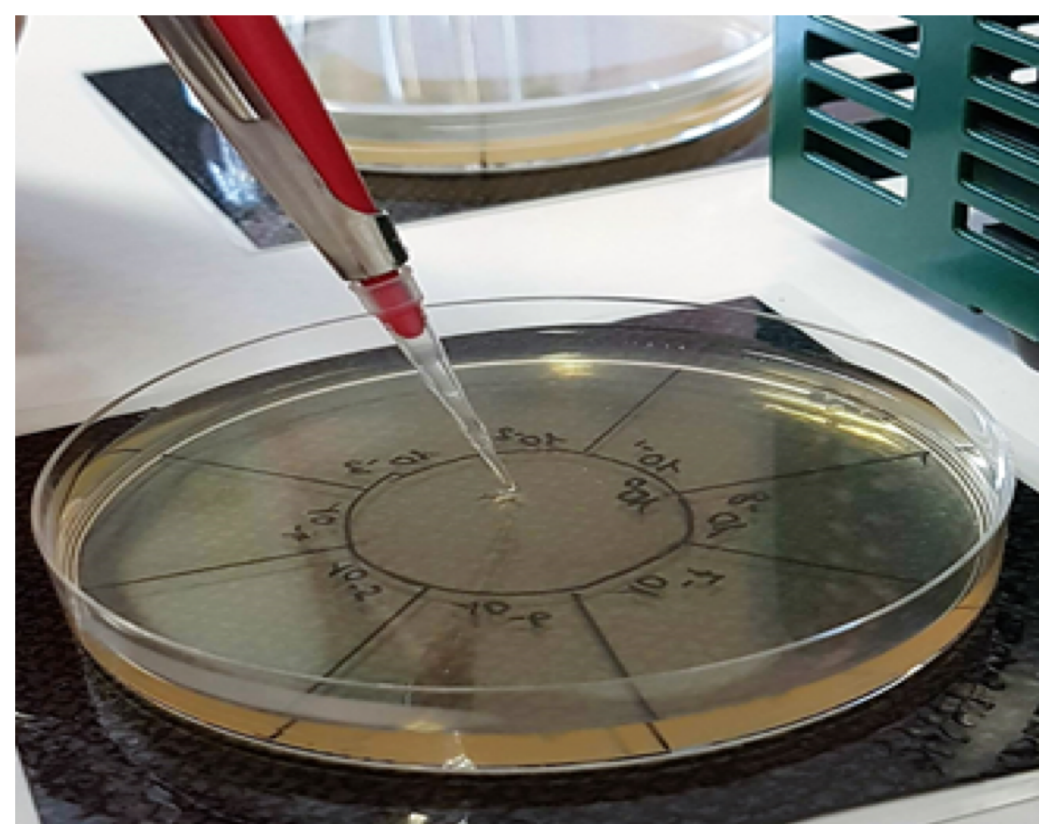
- Sortir un tube de gélose molle Mueller Hinton à 6g/L maintenue en surfusion à 55°C
- Laisser redescendre la température à environ 45°C
- Inoculer la gélose légèrement refroidie avec 0,2mL de la suspension bactérienne
- Homogénéiser rapidement le contenu du tube au vortex
- Couler immédiatement la gélose molle inoculer sur la gélose dure solidifiée
- Laisser solidifier

2. Dilutions de 10^{-1} à 10^{-6}

- Annoter les 6 microtubes stériles
- Effectuer une dilution allant de 10^{-1} à 10^{-6} à partir des suspensions phagiques «H₂O pure R ou M », avec le diluant « eau CaCl₂ »

3. Dénombrement des phages par méthode des spots

- Tracer 1 cercle central et fractionner la boîte en 8 parts égales sur le fond la boîte à l'aide du gabarit
- Noter sur la tranche : l'origine de chaque échantillon testé/déposé.
- Homogénéiser/ centrifuger chaque échantillon
- Déposer lentement 5µL de l'échantillon « H₂O pure R ou M » au centre
- Déposer lentement 5µL de chaque dilution dans son secteur respectif
- Faire de même pour l'eau physiologique stérile notée « témoin - »
- Laisser les dépôts sécher sur la gélose sans la secouer

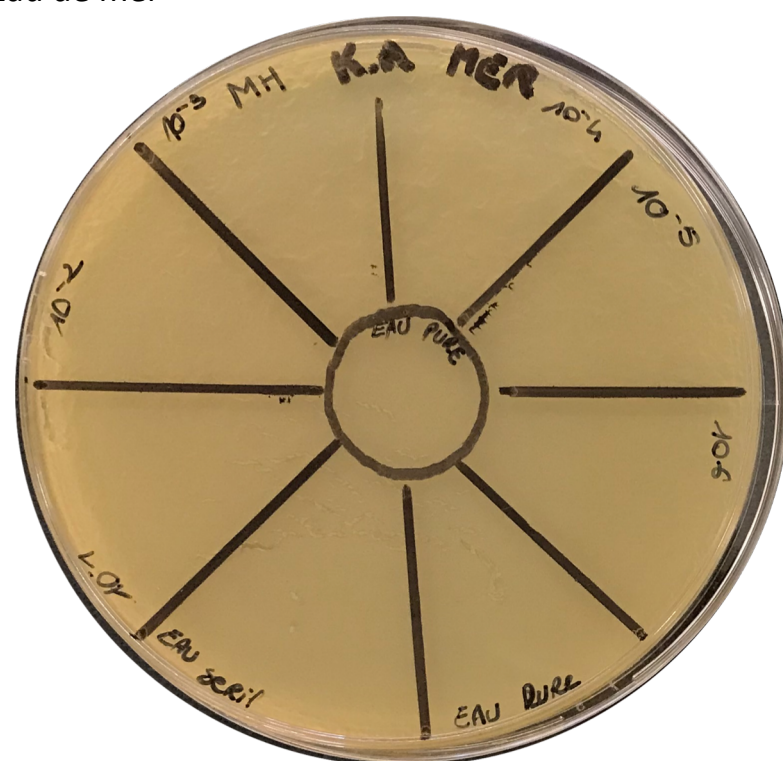


4. Mise en incubation

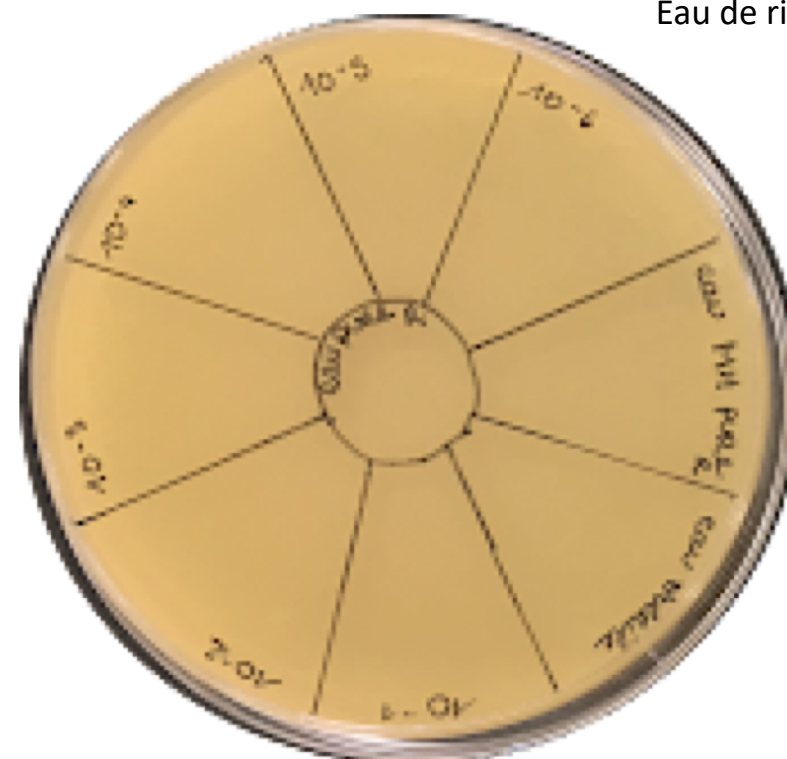
- Attendre que la dernière goutte déposée soit complètement séchée
- Incuber la boîte à l'envers à 35°C pendant 18 à 24h.

PRÉSENTATION ET EXPLOITATION DES RÉSULTATS

Eau de mer



Eau de rivière



On remarque que dans le secteur « eau stérile », témoin négatif, il y a une absence de plages de lyse; étant le résultat attendu notre manipulation est **validée**.

Dans les secteurs contenant les filtrats d'eaux pure et ceux allant de la dilution 10^{-1} à 10^{-6} , on observe une absence de plages de lyse ce qui signifie que les bactéries *E.coli* n'ont donc pas été tuées par des bactériophages.

Les filtrats d'eau de mer et de rivière ne contiennent donc pas de bactériophages à action antibactérienne sur la souche *E. coli*
Notre hypothèse n'a pas pu être vérifiée.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Afin de lutter contre le problème de multi-résistances des bactéries aux antibiotiques, nous avons proposé de favoriser à nouveau l'utilisation des bactériophages. Nous avons donc recherché des bactériophages dans les eaux de Guadeloupe. Cependant nous n'avons pas pu démontrer la présence de bactériophages dans les eaux de mers et rivières que nous avons prélevées.

Il aurait fallu effectuer un enrichissement en bactériophages à partir de la souche bactérienne *E.coli* après la filtration. Cela peut aussi se traduire par le fait que la souche choisie *E.coli* ne semble pas sensible aux éventuelles bactériophages des deux milieux, on pourrait également changer la souche utilisée lors de notre dénombrement.