



**HAL**  
open science

# Purification du bactériophage MS2 et discrimination des phages infectieux et non infectieux par leurs propriétés de surface

Camille Bach

► **To cite this version:**

Camille Bach. Purification du bactériophage MS2 et discrimination des phages infectieux et non infectieux par leurs propriétés de surface. Microbiologie et Parasitologie. 2013. hal-01864523

**HAL Id: hal-01864523**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01864523>**

Submitted on 30 Aug 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Faculté des Sciences et Techniques, Université de Lorraine, Nancy



Master 2 Microbiologie  
Spécialité Microbiologie Environnementale et Sanitaire

Rapport de stage  
janvier – juillet 2013

**Purification du bactériophage MS2 et discrimination des  
phages infectieux et non infectieux  
par leurs propriétés de surface**

**Camille BACH**

Soutenu le 17/07/2013

Directeur de stage : Dr Isabelle BERTRAND



Laboratoire de Chimie, Physique et Microbiologie pour l'Environnement  
LCPME UMR 7564 CNRS – Université de Lorraine  
Equipe de Microbiologie Environnementale  
Faculté de Pharmacie  
5, rue Albert Lebrun – BP 80403  
54001 NANCY Cedex

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier vivement le Professeur Eric Gelhaye (IaM, UMR 1136) pour la réalisation des chromatographies à échange d'ions et pour ses précieux conseils dans la réalisation des expérimentations.

Nous remercions également Mme Céline Caillet (LIEC, UMR 7360) pour les mesures de taille des phages MS2.

## SOMMAIRE

### ABREVIATIONS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCTION</b> .....  | <b>1</b>  |
| 1- Les bactériophages ARN F-spécifiques .....  | 2         |
| 1.1- Classification .....  | 2         |
| 1.2- Morphologie.....  | 2         |
| 1.2.1- La capside.....   | 2         |
| 1.2.2- Le génome.....  | 3         |
| 1.3- Les phages ARN F-spécifiques comme modèles d'étude des virus entériques pathogènes... 3       |           |
| 2- Les propriétés interfaciales des phages ARN F-spécifiques .....                                 | 4         |
| 2.1- La charge électrostatique .....   | 5         |
| 2.2- La balance hydrophile/hydrophobe .....  | 6         |
| 3- Purification des particules virales .....   | 7         |
| 3.1- Méthodes de purification .....  | 7         |
| 3.1.1- Purification par dialyse .....  | 7         |
| 3.1.2- Purification par précipitation au polyéthylène glycol .....                                 | 7         |
| 3.1.3- Purification par gradient de densité au chlorure de césium .....                            | 8         |
| 3.1.4- Purification par chromatographie à échange d'ions.....                                      | 8         |
| 3.2- Comparaison des différentes techniques de purification .....                                  | 9         |
| <b>MATERIEL ET METHODES</b> .....  | <b>11</b> |
| 1- Production des stocks de phage MS2 et des cultures de travail de la bactérie hôte.....          | 11        |
| 1.1- Production et contrôle des cultures d'essai de la bactérie hôte <i>Escherichia coli</i> ..... | 11        |
| 1.2- Etalonnage des mesures de turbidité.....  | 11        |
| 1.3- Production du phage MS2 .....   | 11        |
| 1.3.1- Mise en culture du phage MS2 .....  | 11        |
| 1.3.2- Titrage du bactériophage MS2.....   | 12        |
| 2- Quantification du génome viral.....   | 12        |
| 2.1- Extraction de l'ARN viral .....   | 13        |
| 2.2- RT-PCR quantitative.....  | 13        |
| 2.2.1- Rétro-transcription (RT).....   | 13        |
| 2.2.2- PCR quantitative.....   | 14        |
| 2.2.3- Quantification stricte du génome viral.....   | 14        |
| 3- Purification du phage MS2 par dialyse .....   | 14        |
| 4- Chromatographie à échange d'ions sur colonne DEAE.....  | 15        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.1- Chromatographie DEAE sur colonne « classique » .....   | 15        |
| 4.2- Chromatographie DEAE sur mini-colonne .....  | 15        |
| 5- Mesures de taille des particules virales au ZetaSizer® par DLS (Diffusion Light Scattering) .....                            | 16        |
| 6- Test d'adhésion sur support hydrophobe .....   | 16        |
| 6.1- Préparation du support hydrophobe .....  | 16        |
| 6.2- Test d'adhésion sur le support hydrophobe .....  | 16        |
| <b>RESULTATS .....</b>  | <b>17</b> |
| 1- Essais préliminaires .....   | 17        |
| 1.1- Contrôles de la culture de travail de la bactérie hôte <i>Escherichia coli</i> .....                                       | 17        |
| 1.2- Suspensions de travail du bactériophage MS2 : concentrations en phage infectieux et en génome .....                        | 17        |
| 1.2.1- Concentration en phage infectieux.....   | 18        |
| 1.2.2- Concentration en génome .....  | 18        |
| 2- Stabilité des suspensions de phages.....   | 19        |
| 2.1- Détermination de la taille des particules virales.....   | 19        |
| 2.1.1- Taille des particules virales en fonction de la force ionique .....  | 19        |
| 2.1.2- Taille des particules virales en fonction du pH .....  | 19        |
| 2.2- Evaluation de l'influence de la force ionique sur la détection du phage MS2 par culture et RT-qPCR .....                   | 20        |
| 2.2.1- Infectiosité du phage MS2 en fonction de la force ionique .....  | 20        |
| 2.2.2- Quantification du génome du phage MS2 en fonction de la force ionique.....   | 21        |
| 2.3- Evaluation d'un nettoyage de la colonne de chromatographie en termes d'infectiosité et de matériel génétique résiduel..... | 21        |
| 3- Purification d'une suspension de phage MS2 .....   | 22        |
| 3.1- Purification par chromatographie à échange d'anions .....  | 22        |
| 3.2- Purification par dialyse .....   | 23        |
| 4- Discrimination des phages infectieux et non infectieux.....  | 23        |
| 4.1- Discrimination par la charge : chromatographie à échange d'ions .....  | 23        |
| 4.1.1- Chromatographie en gradient de NaCl .....  | 23        |
| 4.1.2- Chromatographie en paliers de NaCl .....   | 24        |
| 4.1.3- Essai sur un autre type de colonne : mini-colonne DEAE.....  | 25        |
| 4.2- Discrimination en fonction de la balance hydrophile / hydrophobe : adhésion sur un support hydrophobe.....                 | 26        |
| <b>DISCUSSION .....</b>   | <b>27</b> |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>ANNEXE.....</b>  | <b>34</b> |
| <b>RESUME</b>   |           |

## ABREVIATIONS

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : ADN complémentaire

**ARN** : Acide ribonucléique

**cg** : copies de génome

**CT** : Cycle threshold

**E** : Efficacité ou rendement de PCR

**PBS** : Phosphate Buffered Saline

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**qPCR** : PCR quantitative

**RT** : Reverse Transcription

**TYGA** : Tryptone Yeast Glucose Agar

**TYGB** : Tryptone Yeast Glucose Broth

**UFC** : Unité Formant Colonie

**UFP** : Unité Formant Plaque

## INTRODUCTION

Les virus entériques pathogènes (norovirus, virus de l'hépatite A, entérovirus...) et les bactériophages fécaux non pathogènes (phages ARN F-spécifiques, coliphages somatiques, phages de *Bacteroides fragilis*) sont des virus nus (dépourvus d'enveloppe), excrétés par voie fécale dans le milieu hydrique dans lequel ils sont considérés comme des particules biologiquement inertes. Les méthodes moléculaires permettent la détection rapide et spécifique du génome des virus entériques dans le milieu hydrique, mais la mise en évidence de génome viral dans l'environnement n'est pas corrélée à la présence de virus infectieux (Gassilloud *et al.*, 2003). L'évaluation de l'infectiosité reste ainsi indispensable pour l'évaluation du risque sanitaire lié à la contamination virale du milieu hydrique. Les techniques de culture cellulaire constituent la référence pour détecter les virus infectieux dans le milieu hydrique, mais certains virus entériques comme le norovirus ne sont pas cultivables. Dans ce contexte, il apparaît nécessaire de développer des méthodes de discrimination des virus infectieux et non infectieux.

La dissémination des virus entériques dans l'environnement est notamment gouvernée par les propriétés de surfaces des particules virales (charge électrostatique et balance hydrophile/hydrophobe) au travers des phénomènes d'adhésion aux surfaces ou d'agrégation. Les propriétés de surface pourraient se modifier au cours de l'inactivation virale et constituer un élément de distinction entre des particules infectieuses et non infectieuses. Or les études concernant les propriétés de surface des particules virales sont réalisées sur des stocks de virus natifs dans lesquels les virus non infectieux peuvent être présents à des concentrations supérieures aux virus infectieux (Ogorzaly *et al.*, 2013). La distinction entre particules infectieuses et non infectieuses n'est possible que si une quantification des virus infectieux par titrage et une quantification de l'ensemble des virus par détection du génome sont applicables en fin d'expérimentation. L'étude des propriétés de surface nécessite également de travailler avec des particules purifiées et des travaux récents ont souligné l'influence de la méthode de purification sur les propriétés de surface (Dika *et al.*, 2013b). Dans ce contexte, la chromatographie à échange d'ions présente plusieurs avantages. Cette méthode peut être utilisée pour purifier des bactériophages (Adriaenssens *et al.*, 2012b) et elle pourrait apporter des informations sur la charge globale de particules virales tout en permettant ensuite de quantifier les virus infectieux par culture et l'ensemble des virus par RT-PCR quantitative.

En prenant en compte ces différents éléments, notre travail a deux objectifs. Dans un premier temps, nous évaluerons la chromatographie à échange d'ions comme technique de purification de particules virales. Dans un second temps, nous évaluerons la possibilité de discriminer les phages infectieux et non infectieux par leurs propriétés de surface en fonction (i) de leur charge par chromatographie ou par agrégation et (ii) de leur balance hydrophile/hydrophobe par des tests d'adhésion sur un support hydrophobe.



## 1- Les bactériophages ARN F-spécifiques

Les bactériophages ARN F-spécifiques sont des phages à ARN simple brin qui appartiennent à la famille des *Leviviridae*. Comme tous les virus, ils ont besoin d'un hôte pour leur réplication, ici il s'agit de bactéries capables de synthétiser des pili sexuels ou F-pili comme les entérobactéries telles qu'*Escherichia coli*. Ce sont des virus non enveloppés qui possèdent une capsidie icosaédrique à l'intérieur de laquelle on retrouve le génome qui est le support de l'information génétique. Les phages ARN F-spécifiques sont des particules virales de petite taille dont le diamètre est compris entre 20 et 30 nm.

### 1.1- Classification

A ce jour, 5568 phages ont été observés au microscope et répertoriés (Ackermann *et al.*, 2007). Selon l'ICTV (Comité International sur la Taxonomie des Virus), il n'existe qu'un seul ordre : celui des *Caudovirales*, ou phages à queue, qui regroupe 96% des phages connus. Cet ordre est divisé en 3 familles : *Myoviridae*, *Podoviridae* et *Siphoviridae*. Les autres phages sont regroupés sous l'appellation PFP pour Polyèdre, Filamenteux, Pléomorphe, en raison de leur morphologie. Les PFP sont au nombre de 208, ce qui représente moins de 4% des phages identifiés. Les morphologies des différents groupes de bactériophages sont représentées sur la **figure 1**.

Les seuls bactériophages qui présentent une structure voisine des virus entériques pathogènes pour l'homme sont les *Leviviridae*. Les bactériophages ARN-F spécifiques appartiennent à cette famille des *Leviviridae* qui comprend deux genres : les *Levivirus* et les *Allolevivirus*. Chacun de ces genres est subdivisé en deux génogroupes. Les génogroupes I et II appartiennent au genre *Levivirus* et les phages MS2 et GA sont couramment utilisés comme représentants respectifs de ces deux génogroupes. Les génogroupes III et IV composent le genre *Allolevivirus* et les phages Q $\beta$  et SP sont respectivement utilisés pour étudier ces deux génogroupes (Bollback et Huelsenbeck, 2001).

Les génogroupes des bactériophages ARN F-spécifiques retrouvés dans les fèces diffèrent entre humains et animaux (Scott *et al.*, 2002). Ainsi les génogroupes II et III sont retrouvés dans les selles humaines alors que les selles d'animaux contiennent de façon prédominante, mais non exclusive, les génogroupes I et IV (Schaper *et al.*, 2002). Le ratio entre les génogroupes I et II de ces bactériophages pourrait être utilisé pour l'estimation de l'origine de la contamination fécale du milieu hydrique environnemental (Ogorzaly *et al.*, 2009).

### 1.2- Morphologie

#### 1.2.1- La capsidie

Les bactériophages ARN F-spécifiques possèdent une capsidie d'environ 20 à 30 nm de diamètre. Nous prendrons ici l'exemple du bactériophage MS2 (**figure 2**). La capsidie du phage MS2 est composée d'une protéine de maturation de 44 000 Da présente en une seule copie et d'une protéine de capsidie de 13 700 Da qui est la protéine majoritaire du phage puisqu'elle est présente en 180 copies.

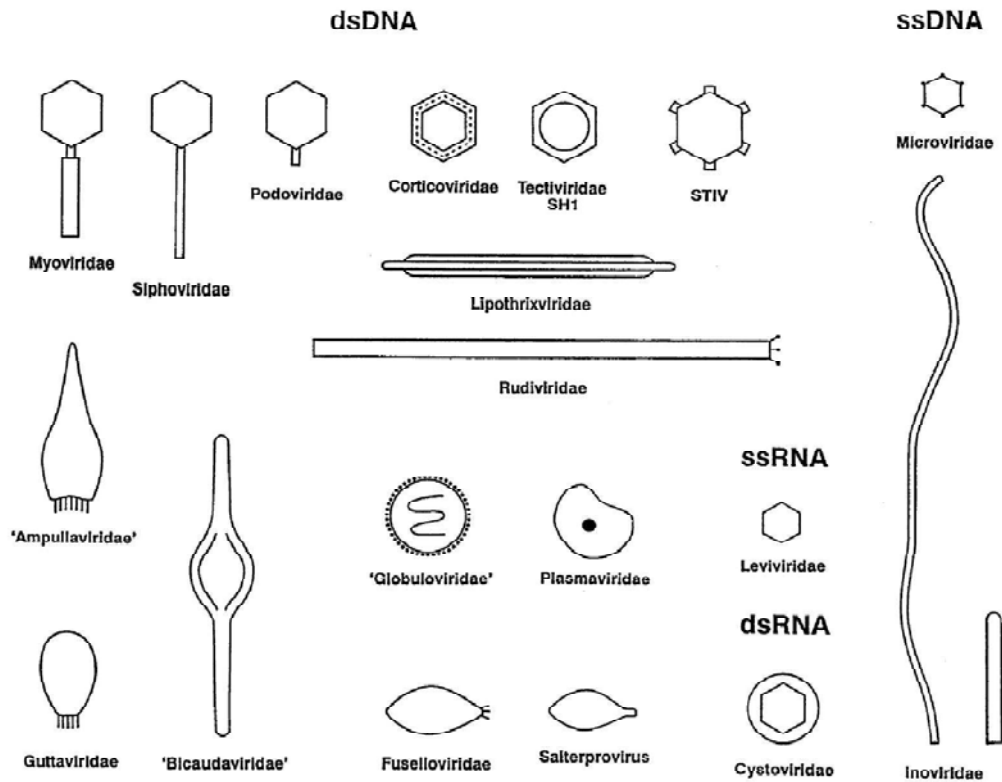


Figure 1: Représentation schématique des principaux groupes de bactériophages (Ackermann, 2007). Légende : dsDNA = ADN double brin ; ssDNA = ADN simple brin ; ssRNA = ARN simple brin ; dsRNA = ARN double brin.

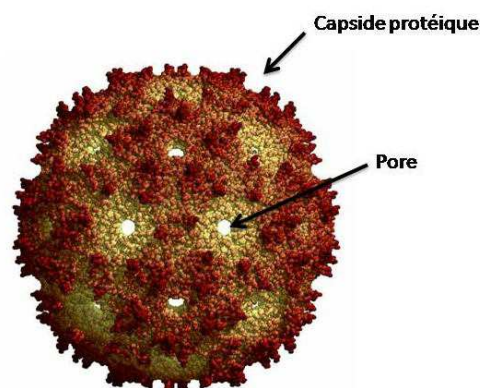


Figure 2: Schéma d'un bactériophage MS2 (Référence PDB, Virusworld Enterobacteria phage MS2 PDB\_ID : 2MS2)

Des observations de bactériophages ARN F-spécifiques réalisées par cristallographie aux rayons X (Valegard *et al.*, 1990) ont montré que la protéine de capsidie existe sous trois conformations : A, B et C. L'association d'un exemplaire de chacune de ces trois conformations constitue un capsomère. La capsidie des phages ARN F-spécifiques est constituée de 60 capsomères, elle est de forme icosaédrique.

La capsidie possède deux fonctions :

- Elle protège le génome viral de l'environnement extérieur.
- Elle possède le site de reconnaissance spécifique pour la fixation du phage sur le récepteur présent au niveau des F-pili de la bactérie hôte.

### 1.2.2- Le génome

Les bactériophages se répliquent grâce à leur seul acide nucléique après entrée de celui-ci dans le cytoplasme bactérien. Le génome viral sert de support de l'information génétique, mais aussi pour sa propre réplication. Les bactériophages ARN F-spécifiques possèdent un ARN simple brin non segmenté de polarité positive codant quatre protéines :

- Une protéine de maturation ou protéine A qui est nécessaire pour la reconnaissance et l'adsorption du phage aux pili sexuels de la bactérie hôte lors de l'infection virale. Cette protéine est localisée au niveau de la capsidie mais sa position exacte n'est pas connue.
- La protéine de capsidie ou protéine C qui est l'unité constitutive de base de la capsidie de ces phages.
- La réplicase qui est une ARN polymérase ARN dépendante indispensable à la réplication du génome viral au sein de la bactérie hôte.
- Une protéine spécifique en fonction du genre :
  - une protéine de lyse pour les *Levivirus* qui est impliquée dans la lyse bactérienne,
  - une protéine « readthrough » pour les *Allolevivirus* qui joue un rôle dans le phénomène d'infectivité (Klovins *et al.*, 2002). Chez ce genre, la lyse de la bactérie est assurée par la protéine de maturation.

La structure du génome pour les genres *Levivirus* et *Allolevivirus* est représentée sur la **figure 3**. Le genre *Levivirus* possède un ARN plus petit (3 500 nucléotides) que le genre *Allolevivirus* (4 200 nucléotides) (Bollback et Huelsenbeck, 2001).

### 1.3- Les phages ARN F-spécifiques comme modèles d'étude des virus entériques pathogènes

Les virus entériques pathogènes pour l'homme peuvent être classés en fonction de leur pathogénicité, il s'agit (Koopmans et Duizer, 2004) :

- de virus responsables de gastro-entérites : norovirus, sapovirus, adénovirus, rotavirus et astrovirus,
- des virus des hépatites A et E,

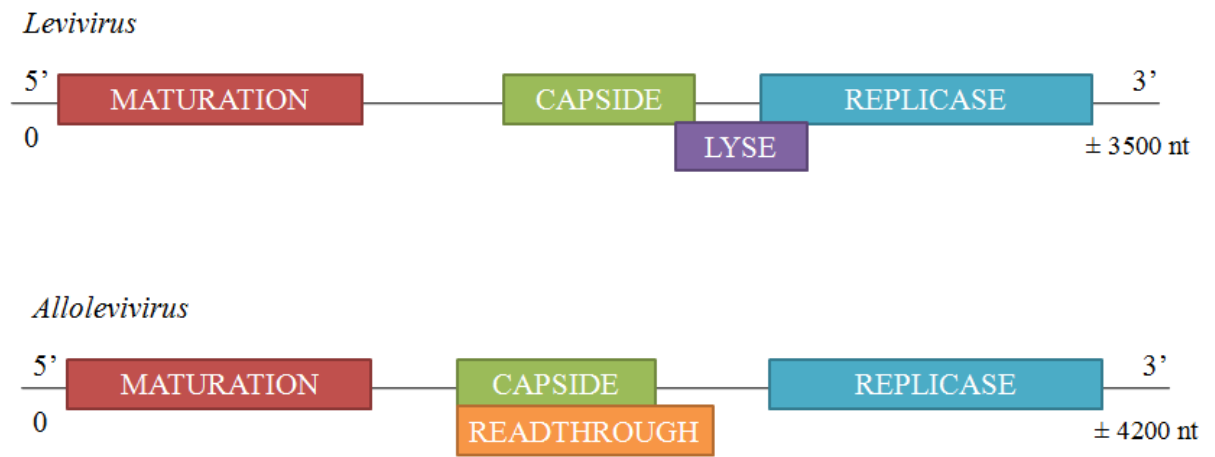


Figure 3 : Représentation schématique de la structure du génome des genres *Levivirus* et *Allolevivirus* (Bollback et Huelsenbeck, 2001).

- de virus responsables de diverses pathologies liées aux infections à entérovirus (comme le Poliovirus) qui provoquent des symptômes variés notamment neuroaux.

Ces virus entériques sont des virus nus qui possèdent, pour la plupart d'entre eux, une capsid de 20 à 40 nm de diamètre et un ARN simple brin de 7 à 9 kb comme support de l'information génétique. Les seules exceptions sont les rotavirus et les adénovirus. Les rotavirus possèdent comme génome un ARN double-brin et leur capsid mesure 75 nm de diamètre. Les adénovirus sont des virus à ADN dont la capsid a un diamètre de 80-110 nm. Tous les virus entériques pathogènes ont une structure icosaédrique.

Le génome des virus entériques peut être détecté et quantifié par RT-PCR temps réel. Par contre, les particules virales infectieuses ne sont pas détectables pour la totalité de ces virus entériques et notamment pour les norovirus qui sont considérés comme la cause majeure de gastro-entérites virales et pour lesquels aucune lignée cellulaire permissive n'a été identifiée à l'heure actuelle.

A notre connaissance, il n'existe à l'heure actuelle aucune étude décrivant les propriétés interfaciales des virus entériques pathogènes. Seules quelques informations sur leur  $pI$  sont disponibles (Michen et Graule, 2010). En ce qui concerne les bactériophage ARN F-spécifiques, une étude a caractérisé les propriétés interfaciales de quatre de ces phages (Langlet *et al.*, 2008b) : MS2, GA, Q $\beta$  et SP en termes de charges et d'hydrophobicité. Ces quatre phages présentent une charge de surface négative proche à pH 7 dans du NaNO<sub>3</sub>. La séquence d'hydrophobicité obtenue en revanche est la suivante : MS2 < Q $\beta$  < GA < SP, le phage MS2 étant le moins hydrophobe. Ces phages ARN F-spécifiques peuvent être envisagés comme des modèles des virus entériques pathogènes pour l'étude des propriétés interfaciales.

## **2- Les propriétés interfaciales des phages ARN F-spécifiques**

Les travaux réalisés par Duval et Ohshima (2006), Langlet (2008) et plus récemment par Dika (2013) montrent que le phage MS2 est à considérer comme une particule molle et perméable. Ainsi, Dika *et al.* (2011) observent des différences de mobilité électrophorétique et de profils d'agrégation entre les virus natifs et les VLPs (Virus Like Particle ou particules virales dépourvues de génome). Ces résultats montrent l'impact du génome sur les propriétés de surface et mettent ainsi en évidence le caractère perméable de ce type de particules virales. De par leur taille et leur perméabilité, les bactériophages ARN F-spécifiques peuvent être considérés comme des colloïdes mous. L'impact du génome contenu dans les particules virales justifie de parler de propriétés interfaciales qui sont constituées principalement par la charge électrostatique et la balance hydrophile/hydrophobe qui définissent le devenir des particules virales dans l'environnement.

## 2.1- La charge électrostatique

La charge électrostatique des particules virales est due à la charge présente au niveau de la chaîne latérale et des terminaisons (carboxyles, amines) des acides aminés constituant les protéines de capsid. Ce sont les groupements de type NH<sub>2</sub>, SH, COOH ... qui sont définis par leur constante d'ionisation propre (pKa). Ces groupements peuvent s'ioniser en fonction du pH du milieu et ainsi donner une charge globale (positive, négative ou neutre) aux protéines (**figure 4**). La valeur de pH pour laquelle la charge électrostatique de la protéine est nulle correspond à son point isoélectrique (*pI* ou IEP). La connaissance du *pI* d'un virus permet de différencier simplement les domaines de pH pour lesquels le virus est chargé négativement (pH supérieurs au *pI*), positivement (pH inférieurs au *pI*) ou neutre (pH égal au *pI*) (Gerba, 1984). L'estimation de la valeur du *pI* peut être réalisée de façon théorique ou expérimentale.

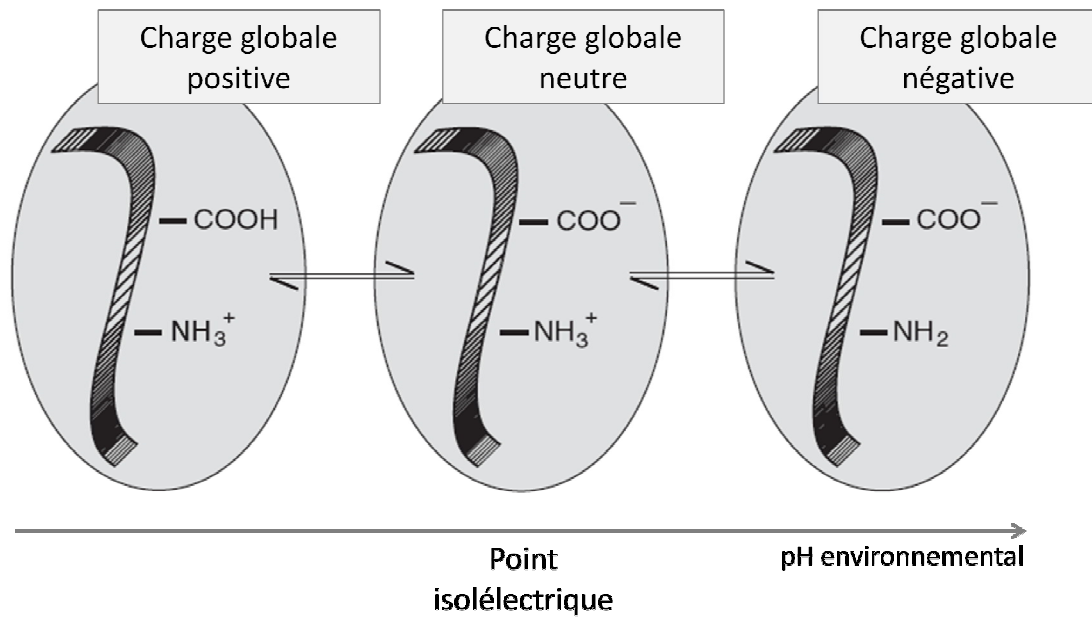
L'estimation théorique de la valeur de *pI* d'une particule virale utilise la séquence primaire en acides aminés des protéines de la capsid et le pKa de la chaîne latérale de chaque acide aminé. Par ce type de méthode, Langlet *et al.* (2008a) estiment le *pI* de la capsid du phage MS2 à 9.

Le *pI* peut également être déterminé de façon expérimentale par focalisation électrique, étude de la mobilité électrophorétique et chromatofocalisation. La focalisation électrique et la mobilité électrophorétique sont les deux méthodes les plus couramment utilisées pour déterminer le *pI* d'une particule virale (Michen and Graule, 2010).

La focalisation isoélectrique (IEF) est basée sur la migration, induite par un courant électrique, des particules virales dans un gradient de pH. Les particules virales cessent de migrer lorsque le pH est égal au *pI* car elles ont alors une charge nette qui est nulle. La détermination de la zone où les virus ont cessé leur migration peut se faire par un marquage préalable du virus avec un produit radioactif, ou par analyse des différentes zones du gel afin de déterminer celle contenant la plus grande quantité de virus. Le marquage de virus pourrait entraîner une dénaturation des protéines de capsid.

L'électrophorèse utilisée pour déterminer le *pI* consiste à mesurer la vitesse de migration d'une particule virale soumise à un champ électrique ce qui permet d'estimer la mobilité électrophorétique  $\mu$  de cette particule. Le *pI* correspond au pH pour lequel  $\mu$  est nulle. La nano-électrophorèse permet d'adapter cette technique aux particules nanométriques non marquées.

La chromatofocalisation est une technique qui permet de s'approcher du comportement en focalisation isoélectrique d'une particule en regardant sa rétention sur une colonne échangeuse d'ions soumise à un gradient de pH. Contrairement aux méthodes électrophorétiques, il n'y a pas besoin d'appliquer ici de courant électrique pour générer le gradient de pH. Brorson *et al.* (2008) utilisent cette technique pour déterminer le *pI* de différents phages de structure icosaédrique (PhiX174, PR772 et PP7 appartenant



**Figure 4 : Représentation schématique de l'état d'ionisation des protéines en fonction du pH (Michen et Graule, 2010).**

respectivement aux familles des *Microviridae*, *Tectiviridae* et *Leviviridae*) (**tableau 1**). Cette étude est la première où cette méthode est utilisée sur des virus intacts. Les résultats obtenus montrent cependant que cette approche serait moins précise lorsqu'elle concerne des virus, par rapport aux protéines pour lesquelles des différences de  $pI$  de seulement 0,02 unités pH ont été trouvées, sûrement en raison de la taille des phages et des interactions entre les particules. Par contre, cette méthode pourrait permettre un niveau élevé de purification des bactériophages en fonction de leur  $pI$ .

On note une différence entre les valeurs de  $pI$  obtenues expérimentalement et les valeurs de  $pI$  théoriques. Ainsi, pour le bactériophage MS2, le  $pI$  théorique est d'environ 9 (Langlet *et al.*, 2008a) alors qu'expérimentalement un  $pI$  moyen de 3,5 est trouvé à partir des valeurs issues de six études (Michen and Graule, 2010). Plusieurs explications sont données pour justifier ces différences (Langlet *et al.*, 2008a) :

- D'une part, le phénomène de repliement tridimensionnel des protéines lors de la formation de la capsidie pourrait intervenir. Ainsi, Penrod *et al.* (1996) ne prennent en compte que les acides aminés en surface de la capsidie et obtiennent alors un  $pI$  correspondant à la valeur expérimentale.

- D'autre part, le génome viral situé à l'intérieur de la capsidie influence très certainement la charge globale de la particule. Langlet *et al.* (2008a) suggéraient déjà un impact du génome sur la charge globale du bactériophage. Par calcul ces auteurs obtenaient un  $pI$  d'environ 9 pour la capsidie seule et de 2,9 pour le génome du phage MS2. Cet impact du génome sur la charge a été prouvé par Dika *et al.* (2011). En effet, des différences de comportement ont été observées en termes d'électrocinétique entre des particules de MS2 et des VLPs qui correspondent à des particules virales dépourvues de génome.

Selon des travaux réalisés par Langlet *et al.* (2008a), la comparaison de deux particules virales en terme de charge électrostatique nécessite d'étudier la mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique et non uniquement en fonction du pH. La comparaison de la pente obtenue lors de la mesure de la mobilité électrophorétique pour une force ionique croissante permettrait d'évaluer le ratio entre la densité de charge externe et la densité de charge interne d'une particule. Par ce type de méthode, Dika (2013) conclut que le phage MS2 a une charge électrostatique effective plus importante que les phages PhiX174 et PRD1.

## 2.2- La balance hydrophile/hydrophobe

La capsidie virale présente des domaines hydrophiles et des domaines hydrophobes en fonction des acides aminés la constituant et des structures secondaires et tertiaires. On parle de balance hydrophile/hydrophobe et cette dernière est essentielle pour prédire la capacité d'adhésion des virus sur une surface (Gerba, 1984). Cette balance peut être définie par la propension des phages à s'agréger en fonction de la force ionique du milieu : on utilise des concentrations salines croissantes dans le milieu jusqu'à observer l'agrégation du virus à l'aide de mesures de taille. Par comparaison de ces profils d'agrégation, il a été montré que le phage GA est plus hydrophobe que le phage Q $\beta$  lui-même plus hydrophobe que le phage



Tableau 1 : Détermination du *pI* de bactériophages par chromatofocalisation (d'après Brorsonet *al.*, 2008)

| Phage | Famille             | Hôte                 | Colonne <sup>b</sup>               | Tampon <sup>c</sup>           | <i>pI</i> | Quantité de phages déposée (UFP) | Rendement de récupération du phage | Détection                           |
|-------|---------------------|----------------------|------------------------------------|-------------------------------|-----------|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| ΦX174 | <i>Microviridae</i> | <i>E. coli</i>       | Echangeuse d'anions <sup>a</sup>   | Tampon A <sup>d</sup>         | 6 - 7     | >1.10 <sup>12</sup>              | 15%                                | Absorbance(280nm)<br>Plages de lyse |
|       |                     |                      | Echangeuse de cations <sup>b</sup> | Tampon B <sup>e</sup>         |           |                                  |                                    |                                     |
| PR772 | <i>Tectiviridae</i> | <i>E. coli</i>       | Echangeuse de cations <sup>b</sup> | Tampon B <sup>e</sup>         | 4,3 – 4,9 | Non précisé                      | Non précisé                        |                                     |
| PP7   | <i>Leviviridae</i>  | <i>P. aeruginosa</i> | Echangeuse d'anions <sup>c</sup>   | Acide citrique (pH : 2,6-6,5) | 3,8 – 4,2 | Non précisé                      | 72%                                |                                     |
|       |                     |                      | Echangeuse de cations <sup>b</sup> | Tampon B <sup>e</sup>         |           |                                  |                                    |                                     |

a : éthylvinylbenzène/divinylbenzène (EVB-DVB) avec groupements amine tertiaire (ProPac WAX-10, Dionex)

b : éthylvinylbenzène/divinylbenzène (EVB-DVB) avec groupements acide carboxylique (ProPac WCX-10, Dionex)

c : silice avec acide aspartique (Poly CAT A, PolyLC)

d : Tampon A : triéthylène-tétramine 1,9 mM, triméthylamine 1,45mM, triéthanolamine 1,65mM, 1,4-diméthylpipérazine 1,15mM, pipérazine 0,5mM, bis-tris 2,6mM, N-méthyl-diéthanolamine 7,8mM, bis-tris propane 0,95mM, imidazole 1,9mM, N-méthylpipérazine 1,05mM (pH : 9-5,6)

e : Tampon B : MOPS 2 mM, acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonate 4 mM, acide glutarique 6mM, acide pyroglutamique 2mM (pH : 4-7)

MS2. On obtient donc la séquence d'hydrophobicité suivante : MS2 < Q $\beta$  < GA (Langlet, 2008). Les effets hydrophobes joueraient un grand rôle dans l'adhésion des particules virales aux surfaces. Ainsi Bales *et al.* (1993) ont montré qu'en greffant des groupes hydrophobes à des billes de silice, l'adhésion du phage MS2 sur ces billes augmentait. Dika *et al.* (2013b) comparent l'adhésion des phages MS2, Q $\beta$  et GA sur des supports hydrophobes, les concentrations observées pour ces trois phages sont en accord avec leur séquence d'hydrophobicité. Le phage MS2 est celui qui se fixe en plus faible quantité, alors que le phage GA est retrouvé à des concentrations significativement supérieures aux phages MS2 et Q $\beta$ . Pelleieux *et al.* (2012) observent la même séquence d'adhésion de ces trois phages ARN F-spécifiques en travaillant avec des surfaces en PEHD (Polyéthylène haute densité) colonisées par un biofilm d'eau potable de deux mois.

### 3- Purification des particules virales

De nombreux paramètres peuvent influencer les interactions entre les particules virales : aussi bien leurs propriétés physico-chimiques que le milieu dans lequel les virus se trouvent. La purification nous permettrait de nous affranchir au maximum des interactions liées au milieu et ainsi d'observer les effets de différents paramètres (pH, force ionique) sur les virus seuls.

Ainsi, Dika *et al.* (2013b) ont comparé trois techniques de purification : la dialyse, la précipitation au polyéthylène glycol et le gradient de densité au chlorure de césium en termes d'effets sur l'agrégation et l'électrocinétique du phage MS2 natif et de VLPs de MS2. Les différences qui ont été observées dans cette étude mettent clairement en évidence l'importance de la méthode de purification sur l'étude des propriétés interfaciales des bactériophages.

#### 3.1- Méthodes de purification

##### 3.1.1- Purification par dialyse

La dialyse est une technique de purification de solutions. Son principe consiste à séparer deux solutions par une membrane de dialyse qui laisse passer les particules dont la masse moléculaire est inférieure au seuil de coupure de la membrane de dialyse. Par un effet de diffusion, les particules de taille inférieure à 100 kDa traverseront la membrane alors que les phages ou les virus seront retenus.

##### 3.1.2- Purification par précipitation au polyéthylène glycol

La purification par précipitation au polyéthylène glycol (PEG) consiste à ajouter à la suspension virale du PEG à une concentration finale de 10% et du NaCl à une concentration finale de 500 mM. La suspension est ensuite centrifugée et les particules virales récupérées dans le culot de PEG sont remises en suspension dans du NaNO<sub>3</sub> 1mM (Nguyen *et al.*, 2011). Une étude récente montre que la purification par précipitation au PEG peut entraîner une modification des propriétés interfaciales du phage MS2 (Dika *et al.*, 2013b).

### 3.1.3- Purification par gradient de densité au chlorure de césium

La purification par gradient de densité au chlorure de césium (CsCl) est une technique couramment utilisée pour purifier les virus (Penrod *et al.*, 1996). C'est une technique de centrifugation affinée. En effet, un des paramètres influençant la vitesse de sédimentation d'une particule est la différence de densité entre la particule et le milieu dans lequel elle se trouve. Cette vitesse de sédimentation peut être modulée en faisant varier la densité du milieu grâce à un gradient de concentration. Les particules dont la densité est supérieure à la densité du milieu vont sédimenter. Plus la différence de densité est grande et plus la sédimentation se fera rapidement. En revanche, en l'absence de différence de densité, il n'y aura pas de sédimentation et ce quelque soit l'accélération. Si la particule présente une densité plus faible que celle du milieu, elle s'élèvera jusqu'à atteindre un niveau de densité égale à la sienne ou à défaut elle flottera à la surface.

Dans la technique de purification par gradient de densité au chlorure de césium, la suspension phagique est concentré par ultracentrifugation et le culot est remis en suspension dans du CsCl à une densité équivalente à deux fois la densité des particules virales à purifier. La densité des particules de phage MS2 est de  $1,4 \text{ g.mL}^{-1}$ . Le gradient de densité est formé par centrifugation isopycnique. La bande correspondant aux particules recherchées est retirée à l'aide d'une seringue et remise en suspension dans du  $\text{NaNO}_3$  1mM (Dika *et al.*, 2013b).

### 3.1.4- Purification par chromatographie à échange d'ions

La chromatographie à échange d'ions est une chromatographie en phase liquide qui permet d'isoler des particules chargées électriquement d'un mélange liquide de molécules chargées. Le mélange va passer sur une phase stationnaire solide chargée avec des ions connus et les molécules d'intérêt seront retenues en fonction de leur charge, puis éluées avec un tampon de force ionique croissante. Le paramètre qui va permettre la séparation des différents constituants est la charge nette. Pour cela on utilise des résines chargées positivement ou échangeuses d'anions ou négativement ou échangeuses de cations.

Ainsi, dans le cas de la chromatographie échangeuse d'anions, la résine est chargée positivement. Seules les molécules chargées négativement vont se fixer sur la phase stationnaire. Les molécules chargées positivement ou neutres ne seront pas retenues et sont éluées immédiatement. Différentes études concernant la purification de bactériophages par chromatographie à échange d'ions sont présentées dans le **tableau 2**.

Adriaenssens *et al.* (2012b) ont réalisé une revue bibliographique de l'utilisation de la chromatographie à échange d'anions sur colonne CIM® (Convective Interactive Media) pour la purification de 11 bactériophages de type tête-queue et infectant cinq espèces bactériennes différentes. Deux types de résine sont utilisés dans ces différentes études :

- le DEAE ou DiEthylAminoEthyl qui est une résine échangeuse d'anions faibles,
- le QA ou Amine Quaternaire qui est une résine échangeuses d'anions forts.

Globalement les rendements de récupération de phages tête-queue infectieux varient de 35% à 99,9% en fonction du bactériophage purifié (Adriaenssens *et al.*, 2012b). La chromatographie à échange d'anions sur colonne DEAE et QA a aussi été utilisée pour

Tableau 2: Purification de bactériophages par chromatographie à échange d'ions (d'après Adriaenssens et al., 2012b)

| Phage      | Famille                         | Hôte                   | Colonne <sup>a</sup>                           | Tampon dépôt      | Tampon élution | Inoculum (UFP)  | Rendement de récupération | Détection des phages   | Référence   |
|------------|---------------------------------|------------------------|--|-------------------|----------------|---|---------------------------|------------------------|---|
| LIMEstone1 | <i>Myoviridae</i> (Vil-like)    | <i>D. solani</i>       | QA/DEAE CIM <sup>®</sup> disque                | Tris <sup>b</sup> | NaCl           | >7,4.10 <sup>12</sup>   | 99,9%                     | UV<br>Plages de lyse   | Adriaenssens et al. (2012a)                             |
| LIMEstone2 | <i>Myoviridae</i> (Vil-like)    |                        | QA/DEAE CIM <sup>®</sup> disque                | Phosphate         | NaCl 0,6 M     | >5,9.10 <sup>11</sup>   | 70%                       |                        | Merabishvili et al. (2009); Vandersteegen et al. (2011) |
| ISP        | <i>Myoviridae</i> (Twort-like)  | <i>S. aureus</i>       | QA/DEAE CIM <sup>®</sup> disque                | Tris <sup>b</sup> | NaCl 0,8 M     | >2,9.10 <sup>11</sup>   | 35-65%                    |                        | Adriaenssens et al. (2012b)                             |
| ΦE2005-A   | <i>Myoviridae</i> (PB1-like)    | <i>P. aeruginosa</i>   | QA-8f CIM <sup>®</sup>                         | Tris <sup>b</sup> | NaCl 0,25 M    | 1,3.10 <sup>11</sup>  | 40-70%                    |                        | Lindberg et Latta (1974)                                |
| ΦPaer14    |                                 |                        |  |                   |                |   |                           |                        |   |
| ΦE2005-C   |                                 |                        |  |                   |                |   |                           |                        |   |
| ΦM4        | <i>Myoviridae</i> (PB1-like)    | <i>P. aeruginosa</i>   | QA-8f CIM <sup>®</sup>                         | Tris <sup>b</sup> | NaCl 0,56 M    | 1,3.10 <sup>11</sup>  | 40-70%                    |                        | Adriaenssens et al. (2012b)                             |
| Φ 208      | <i>Podoviridae</i>              | <i>B.thailandensis</i> | QA CIM <sup>®</sup> disque                     | Tris <sup>c</sup> | NaCl 0,3 M     | 5,0.10 <sup>9</sup>   | 70%                       |                        | Cornelissen et al.(2011); Shaburova et al. (2009)       |
| Φ15        | <i>Podoviridae</i> (T7-like)    | <i>P. putida</i>       | QA/DEAE CIM <sup>®</sup> disque                | Tris <sup>b</sup> | NaCl 0,3 M     | 2,4.10 <sup>11</sup>  | 87%                       |                        | Adriaenssens et al. (2012b)                             |
| ΦPaer4     | <i>Podoviridae</i> (LUZ24-like) | <i>P. aeruginosa</i>   | CIMac <sup>™</sup> QA/ CIM <sup>®</sup> QA-8 f | Tris <sup>b</sup> | NaCl 0,3 M     | QA :<br>5.10 <sup>9</sup> -<br>1.10 <sup>10</sup><br>QA-8f :<br>>1,3.10 <sup>11</sup> | 40-70%                    |                        | Ceyssens et al. (2009)                                  |
| LUZ19      | <i>Podoviridae</i> (jKMV-like)  | <i>P. aeruginosa</i>   | QA/DEAE CIM <sup>®</sup> disque                | Tris <sup>b</sup> | NaCl 0,6 M     | >3,5.10 <sup>12</sup>   | 70%                       | Ceyssens et al. (2009) |   |

Tableau 2 (suite) : Purification de bactériophages par chromatographie à échange d'ions (d'après Adriaenssens et al., 2012b)

| Phage    | Famille             | Hôte   | Colonne <sup>a</sup>           | Tampon dépôt                  | Tampon élution                                      | Inoculum (UFP)       | Rendement de récupération | Détection des phages   | Référence                |
|----------|---------------------|--|--------------------------------|-------------------------------|---|----------------------|---------------------------|--|--------------------------|
| PRD1     | <i>Tectiviridae</i> | <i>S. enterica</i><br>Serovar<br>Typhimurium | QA/DEAE<br>CIM® Monolithique   | Potassium<br>Phosphate        | QA : NaCl 0,6-<br>0,7 M<br>DEAE : NaCl<br>0,8-0,9 M | >3.10 <sup>13</sup>  | 60-80%                    | A 280nm  | Oksanen et al.<br>(2012) |
| Φ05_2302 |                     | <i>P. aeruginosa</i>                         | QA/DEAE<br>CIM® Monolithique   | Tris <sup>d</sup>             |   | Non<br>précisé       | QA : 70%<br>DEAE : 50%    | Plages de<br>lyse  | Smrekar et al.<br>(2007) |
| T4       | <i>Myoviridae</i>   | <i>E.coli</i>                                | QA / CLHP<br>CIM® Monolithique | Phosphate                     | NaCl<br>0,5 M                                       | >2.10 <sup>8</sup>   | 70%                       |  |                          |
| M13      | <i>Inoviridae</i>   | <i>E.coli</i>                                | QA                             | Tris-HCl<br>50 mM<br>pH : 7,5 | Tampon citrate<br>pH4,<br>NaCl 1,5 M                | 1,4.10 <sup>11</sup> | 74%                       | A 280nm<br><br>Plages de<br>lyse<br><br>SDS-PAGE<br>(pureté) | Monjezi et al.<br>(2010) |
| M13      | <i>Inoviridae</i>   | <i>E.coli</i>                                | DEAE                           | Tris-HCl<br>50 mM<br>pH : 7,5 | Tris-HCl<br>50 mMNaCl2 M<br>pH : 2,2                | 1.10 <sup>12</sup>   | 82%                       | Plages de<br>lyse  | Ling et al.<br>(2004)    |

<sup>a</sup> : quand plusieurs colonnes ont été utilisées, la colonne ayant permis d'obtenir les meilleurs rendements de récupération est indiquée en gras

Tris<sup>b</sup> : Tris-HCl 20 mM, pH 7,5

Tris<sup>c</sup> : Tris-HCl 50 mM, MgSO<sub>4</sub> 8 mM, pH 7,2

Tris<sup>d</sup> : Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,2 mM, pH 7,2

Phosphate : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 125 mM, pH 7,2

Potassium Phosphate : 20 mM potassium phosphate, 1mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,2

purifier des bactériophages à structure icosaédrique comme le phage PRD1 (Oksanen *et al.*, 2012). Les auteurs obtiennent des rendements de récupération de phages infectieux compris entre 60 et 80%. Les techniques de détection des phages utilisées ici sont l'absorbance à 280 nm pour détecter les protéines et le comptage des plages de lyses formées sur boîte après incubation avec la bactérie hôte. Ling *et al.* (2004) obtiennent un meilleur rendement de récupération de phage M13 infectieux avec une purification par chromatographie qu'avec une technique de purification par précipitation au PEG.

En termes de préservation de l'infectiosité des phages purifiés, la chromatographie à échange d'anions apparaît comme une bonne alternative aux méthodes traditionnelles de purification par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium. En effet, la purification utilisant un gradient de CsCl provoque une grande perte d'infectiosité, surtout chez les bactériophages à morphologie de type tête-queue. Cette perte peut être due à une agrégation ou précipitation lors des centrifugations avec le CsCl, ou encore à une inactivation par contraction de la gaine de la queue comme observé pour le phage 0305Φ8-36 (Pathria *et al.*, 2012).

En comparant par SDS-PAGE la pureté des échantillons obtenus après purification sur deux bactériophages tête-queue (LIMEstone 1 et Φ15), Adriaenssens *et al.* (2012b) trouvent un niveau de pureté comparable entre les phages obtenus après chromatographie et gradient de CsCl. Sur un autre modèle de phage icosaédrique, le phage PR772, Brorson *et al.* (2008) montrent un degré de purification équivalent entre une technique de chromatofocalisation et une purification par gradient de CsCl. Les auteurs se basent sur le ratio d'absorbance à 260 nm et 280 nm pour évaluer le niveau de pureté des échantillons. Sur un phage filamenteux appartenant à la famille des *Inoviridae*, le phage M13, Monjezi *et al.* (2010) observent un même niveau de pureté comparable entre la chromatographie par échange d'anions et la purification par gradient de CsCl par SDS-PAGE.

Les différents avantages de la chromatographie sont les suivants (Oksanen *et al.*, 2012) :

- La conservation de l'infectivité du virus pendant l'étape de purification,
- La concentration finale en virus,
- Son adaptabilité à différents volumes grâce aux différentes tailles de colonne existantes (de 1 mL à 8000 mL).
- Sa rapidité, cette méthode peut être effectuée en une journée de travail,

Bien que la chromatographie ait de nombreux avantages par rapport aux techniques traditionnelles de purification, elle nécessite la mise en place d'un protocole optimisé pour chaque bactériophage (Adriaenssens *et al.*, 2012b).

### 3.2- Comparaison des différentes techniques de purification

Dika *et al.* (2013b) se sont intéressés aux effets que la purification pouvait avoir sur le comportement des bactériophages MS2, en les comparant à des capsides vides (VLPs). Au niveau de l'agrégation du phage en fonction du pH, les auteurs retrouvent des différences en fonction de la méthode de purification. Ainsi, le phage MS2 purifié par dialyse agrège à partir

de pH 4 et pour des pH plus acides, soit à partir de son point isoélectrique. Après une purification par précipitation au PEG, MS2 agrège pour des pH inférieurs ou égaux à 6 et aucune agrégation n'est observée quel que soit le pH après une purification au CsCl. Ceci peut s'expliquer par le fait que cette purification est bien meilleure que les autres (dialyse et précipitation au PEG), en effet c'est la méthode de purification la plus sélective pour les particules virales. La sélection des particules se fait selon leur densité et toutes les particules ayant une densité différente sont éliminées. Les VLPs s'agrègent au niveau du *pI* après une purification par dialyse ou PEG et ne s'agrègent pas après une purification au CsCl.

Au niveau de la mobilité électrophorétique, les mesures effectuées après une purification au PEG diffèrent totalement des résultats obtenus après une dialyse ou un gradient de chlorure de césium. En comparant les profils électrocinétiques de virus natifs de MS2 et de VLPs les auteurs n'ont vu aucune différence entre les deux après purification au PEG. D'importantes différences sont pourtant présentes après purification par dialyse ou gradient de chlorure de césium. Une des hypothèses pouvant expliquer cette absence de différence entre virus et VLPs est que le PEG formerait une couche autour des particules, rapprochant ainsi leurs charges électrostatiques (Dika, 2013). Ces résultats mettent en évidence l'importance de la méthode de purification pour l'étude des propriétés interfaciales des bactériophages.

Aucune étude sur la purification par chromatographie n'ayant été effectuée à notre connaissance pour le phage MS2, nous ne pouvons comparer les résultats de cette purification aux autres.

## MATERIEL ET METHODES

### 1- Production des stocks de phage MS2 et des cultures de travail de la bactérie hôte

La production et le contrôle des cultures de travail de la bactérie hôte (*Escherichia coli* K12 Hfr), ainsi que la production et le titrage des stocks de phage MS2 sont effectués selon la norme NF EN ISO 10705-1 (2001). Cette méthode normalisée porte sur la détection et le dénombrement des bactériophages ARN F-spécifiques dans le milieu hydrique. La composition des différents milieux utilisés lors de ces expérimentations est précisée en **annexe**.

#### 1.1- Production et contrôle des cultures d'essai de la bactérie hôte *Escherichia coli*

Cette étape initiale permet la production des cultures de travail de la bactérie hôte *E. coli* K12 Hfr. Un isolement est réalisé sur gélose Mac Conkey à partir d'une culture mère. Après 18 h d'incubation à 37°C, des colonies lactose positif (colonies rouges) sont mises en culture dans du milieu TYGB (Bouillon Tryptone-Extrait de levure-Glucose) complété à 1% de glucose-calcium. Après 5 h d'incubation sous agitation, 10 mL de glycérol stérile sont ajoutés à la suspension bactérienne qui est aliquotée en fractions de 1 mL conservées à -80°C.

#### 1.2- Etalonnage des mesures de turbidité

Le titrage du bactériophage nécessite que la bactérie hôte soit en phase exponentielle de croissance et que la suspension bactérienne ait atteint une concentration d'environ  $10^8$  UFC/mL (UFC : unité formant colonie). L'étalonnage permet de déterminer la valeur de densité optique pour une longueur d'onde de 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) correspondant à la phase exponentielle de croissance de la bactérie.

La culture d'essai produite précédemment est inoculée dans du milieu TYGB à 1% de glucose-calcium placé à 37°C sous agitation (100 rpm). Une mesure de la densité optique et un ensemencement sur milieu TYGA solide sont ensuite effectués toutes les 30 minutes pendant 5 heures. Après 24 h d'incubation à 37°C, le nombre total de colonies bactériennes est compté afin de déterminer la valeur de densité optique ( $DO_{600nm}$ ) correspondant à une densité cellulaire d'environ  $10^8$  UFC/mL. Selon la norme, une densité optique comprise entre 0,3 et 0,5 correspond à la phase exponentielle de croissance de la bactérie *E. coli* K12Hfr dans ces conditions de culture.

#### 1.3- Production du phage MS2

##### 1.3.1- Mise en culture du phage MS2

Les suspensions de travail du phage MS2 (ATCC, réf. 15597-B1) sont également produites selon la norme ISO 10705-1 (2001), mais sans étape de traitement au chloroforme.



Une pré-culture de la bactérie hôte est produite dans du milieu TYGB à 1% de glucose-calcium. Après 18 h à 37°C sous agitation, 500 µL de la pré-culture d'*E. coli* sont prélevés et inoculés dans 50 mL de TYGB à 1% de glucose-calcium. Après une incubation de 90 minutes à 37°C sous agitation, le phage est inoculé pour obtenir une concentration finale de 10<sup>7</sup> UFP/mL. Après 5 heures d'incubation à 37°C sous agitation, le milieu est centrifugé à 3000 g pendant 20 minutes. Le surnageant est filtré sur un filtre-seringue de 0,22µm de porosité (Millipore, Millex GP, réf.5CG033RS) puis conservé à 4°C.

Un contrôle de la pureté de la suspension phagique est effectué par RT-PCR après extraction des acides nucléiques à la chaleur (30 minutes à 50°C). Le génome des trois génogroupes I, II et III de phages ANR F-spécifiques régulièrement manipulés au laboratoire est recherché par RT-PCR en temps réel (*cf* paragraphe 2). La « pureté » du stock de phage MS2 est avérée lorsque celui-ci est bien négatif pour le génome des génogroupes II et III.

### 1.3.2- Titrage du bactériophage MS2

Le dénombrement des phages MS2 s'effectue par la technique du dénombrement des plages de lyse, toujours selon la norme ISO 10705-1 (2001).

Le dénombrement des phages MS2 infectieux est réalisé en utilisant une culture d'*E. coli* K12 Hfr en phase exponentielle de croissance dans du milieu TYGB à 1% de glucose-calcium. Une série de dilutions au dixième du phage MS2 est réalisée dans du tampon PBS stérile si le titrage est réalisé à partir de la suspension stock de phage MS2 ou dans du tampon NaNO<sub>3</sub> 1 mM stérile si le titrage est effectué après purification du phage par dialyse (*cf* paragraphe 3). Dans des tubes à hémolyse contenant 2,5 mL de milieu TYGA (Gélose Tryptone-Extrait de levure-Glucose) semi-solide à 1% de glucose-calcium chauffé à 50°C, sont ajoutés 1 mL de suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance et 1 mL de dilution de la suspension phagique. Après homogénéisation au vortex, le contenu de chaque tube est coulé dans une boîte de Pétri contenant du milieu TYGA solide à 1% de glucose-calcium.

Après incubation à 37°C pendant 18 heures, les plages de lyse sont dénombrées pour chaque boîte de Pétri contenant entre 10 et 100 plages de lyse. Le titre en phage infectieux sera alors obtenu en Unité Formant Plage par mL (UFP/mL). Pour chaque titrage, des témoins négatifs utilisant du PBS ou du NaNO<sub>3</sub>, ainsi qu'un témoin positif correspondant à la première dilution au dixième du stock de phage MS2 sont testés. La vérification de l'absence de contamination de la bactérie hôte est également réalisée en début et fin de manipulation. Le titrage est validé seulement si aucune plage de lyse n'apparaît pour les témoins négatifs.

## **2- Quantification du génome viral**

La quantification du génome viral nécessite tout d'abord une extraction de l'ARN du bactériophage. L'extraction est suivie d'une détection par rétro-transcription et PCR quantitative (RT-qPCR). Nous avons utilisé un plasmide contenant un fragment du génome du phage MS2 pour réaliser la quantification stricte de l'ARN viral.

## 2.1- Extraction de l'ARN viral

L'extraction de l'ARN viral du phage MS2 est réalisée avec le kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, ref. 52906) selon le protocole défini par le fournisseur.

Les capsides virales de chaque échantillon (140 µL) sont tout d'abord lysées avec le tampon de lyse AVL contenant 10 µg/mL de Carrier RNA. Le carrier RNA permet une meilleure fixation des acides nucléiques à la silice et limite une éventuelle dégradation par les RNases. Après homogénéisation et incubation pendant 10 minutes à température ambiante et addition d'un volume identique d'éthanol absolu, l'échantillon est déposé sur une colonne de silice en deux dépôts avec une centrifugation d'une minute à 6000 g à chaque dépôt. Deux lavages successifs sont réalisés avec les tampons AW1 (6000 g, 1 minute) puis AW2 (14000 g, 3 minutes). L'élution se fait avec 100 µL de tampon AVE. Après incubation pendant une minute, les acides nucléiques sont récupérés par centrifugation et immédiatement congelés à -80°C.

## 2.2- RT-PCR quantitative

La quantification du génome suit le protocole développé par Ogorzaly et Gantzer (2006). La RT-PCR est réalisée en deux étapes distinctes pour la rétro-transcription et la PCR. Les gènes cibles de la quantification par PCR sont les gènes de la protéine de maturation pour le génogroupe I (phage MS2), le gène de la réplicase pour le génogroupe II et le gène de la protéine de capsid pour le génogroupe III.

L'étape de rétro-transcription (RT) permet la synthèse du brin complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN viral par une transcriptase inverse. Ce fragment d'ADNc est ensuite amplifié et quantifié lors de l'étape de PCR utilisant deux amorces et une sonde TaqMan spécifiques du génogroupe recherché. La sonde comporte sur l'extrémité 5' un fluorochrome émetteur appelé reporter qui est ici le FAM (6-carboxyfluorescein) et sur l'extrémité 3' un quencher MGB-NFQ (Minor Groove Binder Non Fluorescence Quencher) absorbant la fluorescence par phénomène de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert). Au cours de l'élongation, la dégradation de la sonde entraîne l'éloignement de ces deux éléments et l'émission de fluorescence qui est mesurée à chaque cycle de la PCR. Le cycle de PCR (Ct) à partir duquel l'intensité de fluorescence est devenue significativement supérieure au seuil de base est déterminé pour chaque échantillon. La valeur de Ct est inversement proportionnelle à la quantité initiale de génome viral de l'échantillon.

### 2.2.1- Rétro-transcription (RT)

La rétro-transcription s'effectue en deux étapes présentées dans le **tableau 3**. Ces étapes s'effectuent dans un thermocycleur Veriti (Life Technologies) dans des microtubes de 0,2 mL.

La première étape d'incubation permet l'hybridation des amorces antisens avec l'ARN cible. La seconde étape permet quand à elle la synthèse de l'ADNc grâce à l'action de la transcriptase inverse (SuperScript III, Invitrogen).

**Tableau 3 : Protocole de rétro-transcription de l'ARN viral (Ogorzaly et Gantzer, 2006)**

| <b>1<sup>ère</sup> étape de rétro-transcription</b>               | <b>Volume par réaction</b> |
|---|----------------------------|
| dNTP (Applied Biosystems, réf. N8080260)                          | 1 µL                       |
| Amorces antisens à 20µM (Proligo-Sigma)                           | 1 µL                       |
| Eau DNase-RNase free (Sigma, réf. W4502)                          | 3,5 µL                     |
| Répartir 5,5µL de milieu réactionnel par tube                     |                            |
| Ajouter 7,5µL d'ARN viral extrait                                 |                            |
| Incubation : 5 minutes à 65°C                                     |                            |
| <b>2<sup>ème</sup> étape de rétro-transcription</b>               |                            |
| Tampon 5X (Fischer scientifique, réf. M43853)                     | 4 µL                       |
| DTT (Fischer scientifique, réf. M43853)                           | 1 µL                       |
| RNase inhibitor à 40 U/µL (Promega, réf. N2115)                   | 1 µL                       |
| SuperScript III à 200 U/µL<br>(Fischer scientifique, réf. M43853) | 1 µL                       |
| Ajouter 7µL de milieu réactionnel dans les tubes                  |                            |
| Incubation : 60 minutes à 50°C puis 15 minutes à 75°C             |                            |

### 2.2.2- PCR quantitative

L'étape de qPCR est présentée dans le **tableau 4**. Elle est réalisée dans une plaque de 96 puits. La réaction de PCR est effectuée dans le thermocycleur StepOne Plus (Life Technologies). Les résultats de détection de fluorescence sont analysés en temps réel avec le logiciel StepOne Software v2.0 (Applied Biosystems) afin de déterminer la valeur de Ct de chaque échantillon.

Les amorces et la sonde utilisées pour détecter le génome du phage MS2 sont présentées dans le **tableau 5**. Les amorces et sondes spécifiques des génogroupes II et III utilisées pour vérifier la « pureté » des stocks de phage MS2 sont également présentées dans le **tableau 5**.

### 2.2.3- Quantification stricte du génome viral

Afin de réaliser une quantification stricte du génome appartenant au phage MS2, une séquence nucléotidique comportant le fragment détecté par la RT-qPCR décrite dans le **tableau 5** a été intégrée dans un plasmide (Eurofins).

La séquence intégrée comporte à son extrémité 3' un site de restriction pour l'enzyme EcoRI et à son extrémité 5' un promoteur SP6. A partir du plasmide dans lequel a été insérée la séquence d'intérêt plusieurs étapes doivent être mises en œuvre pour obtenir la séquence d'intérêt purifiée et quantifiée. Après linéarisation du plasmide par actions de l'enzyme EcoRI, une seule bande doit être observée sur gel d'agarose. L'ADN plasmidique est transcrit en ARNt puis traité à la DNase pour éliminer l'ADN résiduel. Après vérification du traitement à la DNase, ARNt est dosé au spectrophotomètre à 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). La concentration en génome en g/mL permet de calculer la concentration en copies de génome par mL (cg/mL).

Cet ARNt est ensuite utilisé pour réaliser une gamme étalon représentant la valeur de Ct en fonction de la concentration initiale de copies de génome. Cette gamme étalon permettra de quantifier le génome de phage MS2 dans nos échantillons.

## **3- Purification du phage MS2 par dialyse**

La suspension phagique est clarifiée par centrifugation à 27000 g et 4°C pendant 1 heure. Le surnageant est filtré sur filtre-seringue de porosité 0,22 µm puis placé dans une membrane de dialyse présentant un seuil de coupure de 100 kDa (Spectrum, MWCO, Réf. 131420). La dialyse est réalisée en deux étapes de 14 heures minimum chacune dans 20 L d'eau déminéralisée amenée à pH 7 par ajout de NaOH puis dans 20 L de NaNO<sub>3</sub> 1 mM à pH 7 sous agitation. Le dialysat est filtré sur filtre-seringue de porosité 0,22µm, puis conservé à 4°C à l'obscurité. Après dialyse, un titrage et une quantification de l'ARN du phage MS2 sont systématiquement réalisés.

**Tableau 4 : Protocole de PCR en temps réel (Ogorzaly et Gantzer, 2006)**

| Réactifs   | Volume par réaction |
|--|---------------------|
| TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, réf. 4304437),  | 12,5 µL             |
| Amorces sens à 40µM (Proligo-Sigma)  | 0,65 µL             |
| Amorces antisens à 40µM (Proligo-Sigma)  | 0,65 µL             |
| Sonde TaqMan (Applied Biosystems)  | 0,5 µL              |
| Eau DNase-RNase free (Sigma, réf. W4502)   | 5,7 µL              |
| Répartir 50µL de ce mélange réactionnel dans les puits   |                     |
| Ajouter 5µL d'ADNc   |                     |
| Amplification : 2 minutes à 50°C, 10 minutes à 95°C puis 45 cycles de 15 secondes à 95°C et 60 secondes à 60°C |                     |

**Tableau 5 : Séquences des amorces et des sondes TaqMan MGB pour la détection de l'ARN des génogroupes I (MS2), II et III des phages ARN F-spécifiques par RT-PCR (Ogorzaly et Gantzer, 2006)**

| Génogroupe |                 | Séquences (5'-3')          | Localisation           |
|------------|-----------------|----------------------------|------------------------|
| I          | Amorce sens     | TCAGTGGTCCATACCTTAGATGC    | 1255-1277 <sup>a</sup> |
|            | Amorce antisens | ACCCCGTTAGCGAAGTTGCT       | 1404-1423 <sup>a</sup> |
|            | Sonde           | FAM-CTCGTCGACAATGG-MGBNFQ  | 1362-1375 <sup>a</sup> |
| II         | Amorce sens     | TGCAAACCTAACTCGGAATGG      | 3273-3293 <sup>b</sup> |
|            | Amorce antisens | AGGAGAGAACGCAGGCCTCTA      | 3325-3345 <sup>b</sup> |
|            | Sonde           | FAM-TCCCTCTATTTCTCT-MGBNFQ | 3304-3318 <sup>b</sup> |
| III        | Amorce sens     | CCGCGTGGGGTAAATCC          | 1412-1428 <sup>c</sup> |
|            | Amorce antisens | TTCTTACGATTGCGAGAAGGCT     | 1506-1527 <sup>c</sup> |
|            | Sonde           | FAM-AAGCGGGTGCAGTT-MGBNFQ  | 1455-1468 <sup>c</sup> |

<sup>a</sup> : phage MS2 : référence GenBank NC\_001417

<sup>b</sup> : phage GA : référence GenBank NC\_001426

<sup>c</sup> : phage MX1 : référence GenBank AF059242

## 4- Chromatographie à échange d'ions sur colonne DEAE

La chromatographie à échange d'ions est un type de chromatographie en phase liquide qui permet d'isoler une substance chargée électriquement d'un mélange de molécules chargées. Pour cela, on fait passer le mélange sur une phase stationnaire (solide) chargée. Cette phase stationnaire peut contenir des groupements fonctionnels soit anioniques (pour les échanges de cations), soit cationiques (pour les échanges d'anions). Avec une phase stationnaire comprenant des cations, les anions progresseront dans la colonne à des vitesses différentes selon leur charge alors que les cations ne seront pas retenus lors de leur parcours dans la colonne. Le principe de la chromatographie à échange d'ions est schématisé sur la **figure 5**.

Des colonnes DEAE (DiEthylAminoEthyl) chargées positivement sont utilisées pour nos expérimentations, il s'agit donc d'une chromatographie par échange d'anions. Ces colonnes permettent la séparation spécifique de molécules chargées négativement en fonction de leur charge. Les différentes protéines, qui ont adhéré sur la colonne DEAE, sont éluées au fur et à mesure que la concentration saline du tampon d'éluion est augmentée jusqu'à atteindre une concentration en sels permettant d'annuler leur charge.

### 4.1- Chromatographie DEAE sur colonne « classique »

Ces expérimentations ont été réalisées à l'laM (UMR 1136 INRA Université de Lorraine). Nous utilisons une colonne DEAE Sepharose (Sigma) équilibrée dans du tampon TE (Tris 30 mM, EDTA 1 mM, HCl qsp pH 8). Le volume mort de la colonne est d'environ 20 mL. La suspension phagique purifiée, ou non, par dialyse est déposée sur la colonne après dilution dans du tampon TE. Après passage de tampon TE, un gradient ou des paliers de concentrations croissantes en NaCl dans du tampon TE sont utilisés pour éluer les phages de la colonne. Une fois l'expérience terminée, la colonne est reconditionnée avec du tampon TE à 1 M de NaCl, rincée au tampon TE puis conservée à 4°C.

### 4.2- Chromatographie DEAE sur mini-colonne

Un autre type de colonne DEAE est utilisé : une mini-colonne DEAE (Cellufine MiniColumn A500 1mL, Réf. 19805-51). Le protocole d'utilisation est celui du fournisseur. La colonne est tout d'abord rincée avec 10 mL de tampon TE, en évitant la formation de bulles d'air. Après ce rinçage, l'échantillon est déposé. Différents paliers de concentration croissante en NaCl (tampon TE additionné de NaCl pour des concentrations en sel allant de 30 mM à 1 M), d'un volume de 10 mL chacun, sont utilisés pour éluer les phages. Le débit maximal à appliquer sur la colonne est de 10 mL/min, nous appliquons un débit d'environ 2,5 mL/min dans nos expérimentations. Des fractions de 10 mL sont récupérées.

A la fin de l'expérimentation, 10 mL de tampon TE à 3 M de NaCl sont utilisés pour régénérer et nettoyer la colonne. 10 mL de tampon TE sans NaCl sont passés pour le rinçage, puis la colonne est remplie d'éthanol 20% avant d'être refermée et conservée à 4°C.

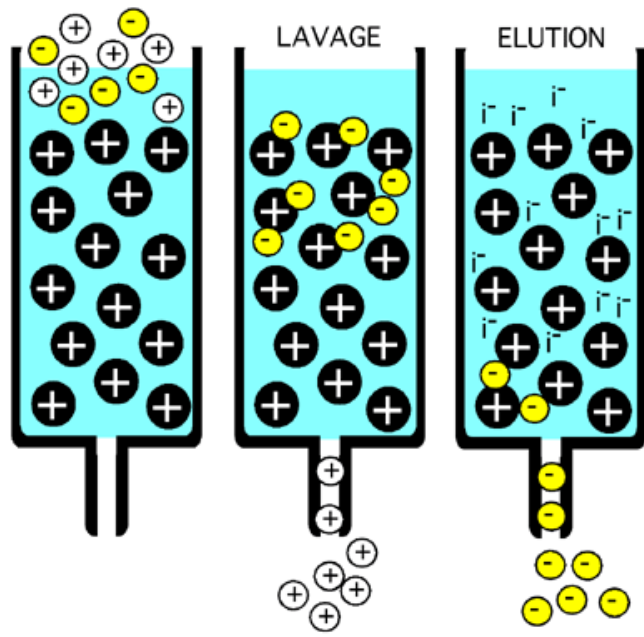


Figure 5 : Principe de la chromatographie à échange d'ions.  
 (Source : <http://pages.usherbrooke.ca/bcm-514-bl/5e.html>)

## 5- Mesures de taille des particules virales au ZetaSizer® par DLS (Diffusion Light Scattering)

Les mesures de taille sont utilisées pour déterminer si les bactériophages sont, ou non, à l'état de particules agrégées lors des expérimentations. Les mesures de taille des particules de phage MS2 sont réalisées après purification du stock de phages par dialyse. Les suspensions de bactériophage utilisées pour les mesures de taille doivent contenir au minimum  $10^{10}$  UFP/mL. Immédiatement avant la mesure de taille, les stocks phagiques purifiés sont de nouveau filtrés à l'aide de filtres-seringue de porosité 0,22  $\mu\text{m}$ .

Lors de nos mesures, la taille des particules est étudiée dans du  $\text{NaNO}_3$  1mM à différentes valeurs de pH (de 2 à 7) et dans du tampon TE à pH 8 contenant différentes concentrations en NaCl (0, 60, 120, 400 et 800 mM), toutes ces solutions sont filtrées sur membrane 0,22  $\mu\text{m}$  avant inoculation du phage. Pour chaque condition étudiée, 200  $\mu\text{L}$  de suspension phagique et 800  $\mu\text{L}$  de milieu sont mélangés.

Les mesures de taille sont effectuées dans le Zeta-Sizer Nano ZS (Malvern Instruments). La mesure est réalisée avec le logiciel DTS (Dispersion Technology Software, Malvern Instruments) selon le protocole décrit par Langlet (2008).

## 6- Test d'adhésion sur support hydrophobe

### 6.1- Préparation du support hydrophobe

Des lames en verre d'une surface de  $1 \times 2 \text{cm}^2$  et de 0,1 cm d'épaisseur sont recouvertes par pulvérisation d'une couche de 5 à 10 nm de chrome (K575 Turbu, Emitech). Ces lames sont ensuite recouvertes d'une couche d'or de 40 nm d'épaisseur. Elles sont immergées pendant 15 heures dans une solution de 1-dodécane-thiol  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}-\text{SH}$  (>98%, Sigma, Réf.471364) à 2 mM. Les supports hydrophobes sont conservés pendant 3 semaines maximum dans de l'éthanol absolu et à 20°C (Dika *et al.*, 2013a).

### 6.2- Test d'adhésion sur le support hydrophobe

La concentration en phage doit être d'environ  $10^6$  UFP/mL. Nous travaillons avec une solution de  $\text{NaNO}_3$  à 100 mM (pH 7), préalablement filtrée sur membrane 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Millex GP, Réf. 5CG033RS). Avant utilisation, les lames hydrophobes sont rincées deux fois pendant 10 min dans du  $\text{NaNO}_3$  100 mM. Les lames sont placées dans 4 mL de suspension phagique pendant 3 h à 20°C. Après incubation, les lames sont rincées pendant 2 fois 10 min dans du  $\text{NaNO}_3$  100 mM avant d'être plongées dans 4 mL de tampon de lyse pendant 15 min pour l'extraction des acides nucléiques qui est poursuivie suivant le paragraphe 2.1 en ajustant le volume d'éthanol. Des fractions de 1 mL de la suspension phagique sont prélevées avant incubation et après incubation de la lame pour quantifier l'ARN du phage MS2 (*cf* paragraphe 2) et déterminer les concentrations en phages infectieux (*cf* paragraphe 1.3.2).



## RESULTATS

L'ensemble des expérimentations est réalisé avec le bactériophage ARN F-spécifique MS2. Nous avons dans un premier temps effectué tous les essais préliminaires à nos expérimentations, à savoir produire nos stocks de phages MS2 et en déterminer les concentrations aussi bien en phage infectieux qu'en matériel génétique. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la stabilité de notre suspension phagique aussi bien en termes d'agrégation que de survie à nos conditions expérimentales. Dans un troisième temps nous avons évalué la chromatographie comme technique de purification d'une solution stock de phage MS2. Enfin, nous avons tenté de discriminer les phages infectieux et non infectieux par leurs propriétés de surface, en termes de charge par chromatographie à échange d'ions et de balance hydrophile/hydrophobe par l'étude de l'adhésion sur des surfaces hydrophobes.

### 1- Essais préliminaires

#### 1.1- Contrôles de la culture de travail de la bactérie hôte *Escherichia coli*

Afin de déterminer la gamme de densité optique correspondant à la phase exponentielle de croissance d'*Escherichia coli* (période où elle est la plus sensible à l'infection par les bactériophages ARN F-spécifiques), nous réalisons en parallèle des mesures de densité optique ( $DO_{600nm}$ ) d'une culture d'*Escherichia coli* K12 Hfr et des numérations des bactéries cultivables en UFC (Unité Formant Colonie) sur milieu gélosé (TYGA). Lors de la phase exponentielle la concentration en bactéries cultivables doit être d'environ  $10^8$  UFC/mL. Les données obtenues sont présentées sur la **figure 6**.

Lors de nos expérimentations la phase exponentielle est retrouvée à environ 180 minutes d'incubation, ce qui correspond à une densité optique de 0,4 pour  $\lambda=600$  nm. Pour cette valeur de turbidité, les concentrations en bactéries cultivables retrouvées sont de l'ordre de  $1,7 \cdot 10^8$  UFC/mL.

Par la suite, lors du titrage du bactériophage MS2, des mesures de turbidité de la bactérie hôte sont réalisées dès 150 minutes d'incubation et la phase exponentielle de croissance est considérée comme étant atteinte pour une turbidité de l'ordre de 0,4.

#### 1.2- Suspensions de travail du bactériophage MS2 : concentrations en phage infectieux et en génome

Trois suspensions de travail du bactériophage MS2 ont été produites au cours de ce travail, les concentrations en phages infectieux et génome ont été déterminées pour chacune d'entre elles immédiatement après production. Lorsque les suspensions de phage MS2 ont été dialysées ou inactivées par traitement thermique, une nouvelle détermination des concentrations en phages infectieux et en génome a été effectuée.

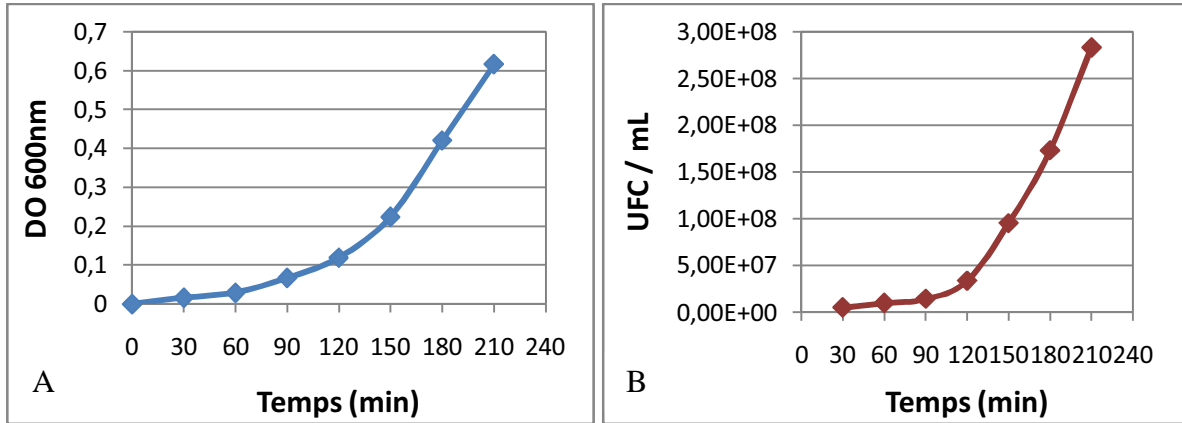


Figure 6 : Suivi d'une culture d'*Escherichia coli* K12 Hfr par mesure de la densité optique à 600 nm (A) et par numération des bactéries cultivables (B).

### 1.2.1- Concentration en phage infectieux

La concentration en phages infectieux des suspensions est déterminée en triplicat selon la norme ISO 10705-1 (2001). Les concentrations en phages MS2 infectieux détectées après la production, après la dialyse et après inactivation par traitement thermique sont présentées dans le **tableau 6**.

Les concentrations en phages MS2 infectieux immédiatement après production sont comprises entre  $2,6 \cdot 10^{11}$  et  $3,5 \cdot 10^{11}$  UFP/mL. Après purification par dialyse, les concentrations en phage MS2 infectieux sont comprises entre  $8,2 \cdot 10^{10}$  et  $1,4 \cdot 10^{11}$  UFP/mL (n=2). Après inactivation à la chaleur (60°C, 8h), on retrouve un titre en phages infectieux compris entre  $1,3 \cdot 10^6$  et  $6,2 \cdot 10^6$  UFP/mL (n=3).

### 1.2.2- Concentration en génome

Avant d'effectuer les quantifications de génome sur les suspensions de travail de phage MS2, un contrôle de pureté est effectué par RT-PCR en temps réel afin de vérifier que notre suspension de travail ne contient qu'un seul bactériophage.

La concentration en nombre de copies de génome/mL de la suspension de phage MS2 est déterminée grâce à une gamme étalon réalisée avec l'ARN transcrit (ARNt) et analysée par RT-qPCR et spectrophotométrie. Ceci permet d'obtenir la droite étalon représentant les valeurs de Ct obtenu par RT-qPCR en fonction de la quantité ARNt déposée par puits. La gamme étalon moyenne obtenue aux cours des différentes RT-qPCR est présentée sur la **figure 7**, elle nous permet d'obtenir plusieurs informations :

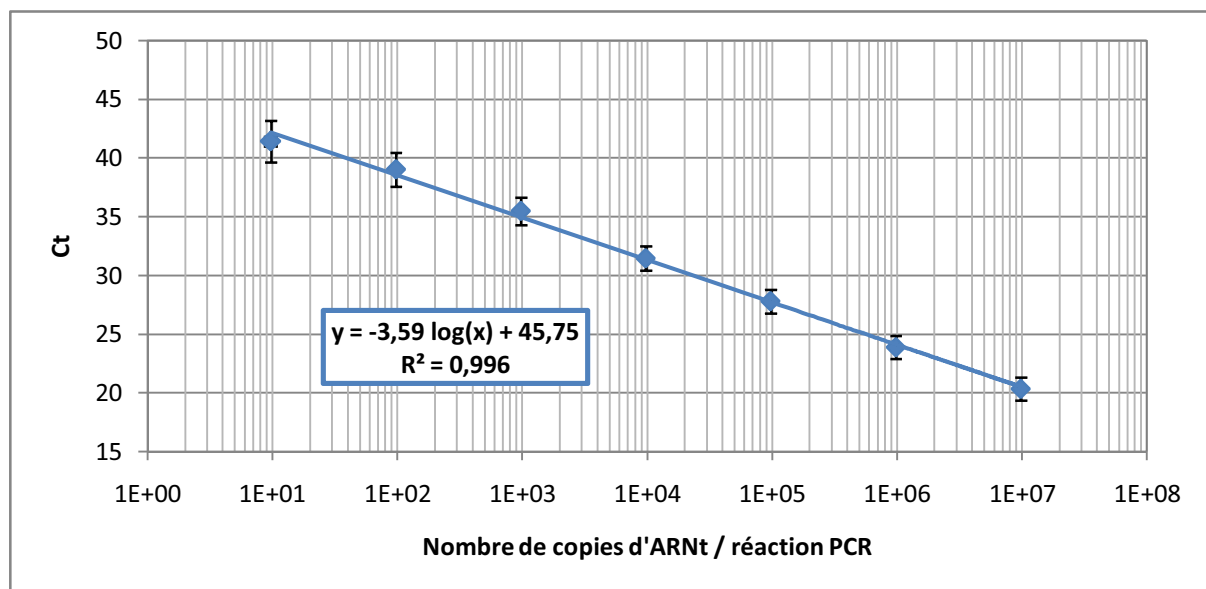
- La pente de la droite est -3,59. Cette valeur permet d'estimer l'efficacité ou rendement de la RT-qPCR à 90% d'après l'équation :  $E = (10^{-1/\text{pente}}) - 1$ . L'efficacité de la RT-qPCR doit être comprise entre 75 et 125%.
- Le coefficient de détermination est de 0,996, il doit être supérieur ou égal à 0,99.
- Le domaine de linéarité de RT-qPCR s'étend sur 6  $\log_{10}$  puisqu'il est compris entre  $1 \cdot 10^1$  et  $1 \cdot 10^7$  copies de génome par réaction. Le domaine de linéarité doit au minimum sur 4  $\log_{10}$  pour permettre une utilisation de la gamme en PCR quantitative.
- La sensibilité correspond à la dernière dilution où tous les réplicats sont encore positifs. Elle est de  $1 \cdot 10^2$  copies de génome par réaction de RT-qPCR.
- La limite de détection correspond à la dilution pour laquelle au moins un des réplicats est positif. Elle est de  $1 \cdot 10^1$  copies de génome par réaction de RT-qPCR en travaillant à partir de l'ARNt.

D'après ces différents éléments, la droite obtenue avec la gamme de dilution de l'ARNt remplit tous les critères nécessaires à la validation d'une droite étalon par RT-qPCR. Elle nous permettra de quantifier le génome du bactériophage MS2 dans nos différents échantillons.

Les concentrations en génome du phage MS2 détectées après la production, après la dialyse et après inactivation par traitement thermique sont présentées dans le **tableau 6**. Les concentrations en génome du phage MS2 immédiatement après production sont comprises entre  $5,10 \cdot 10^{12}$  et  $3,10 \cdot 10^{13}$  copies de génome (cg) /mL (n=3). Après purification par dialyse, les concentrations en génome sont comprises entre  $1,06 \cdot 10^{12}$  et  $1,38 \cdot 10^{13}$  cg/mL (n=2).

**Tableau 6 : Concentrations en phages MS2 infectieux (UFP/mL) et en génome (copies de génome/mL) détectées après la production, après la dialyse et après inactivation par traitement thermique (60°C, 8h) pour trois suspensions de phage MS2.**

|                                     |              | Suspension 1        | Suspension 2        | Suspension 3        |
|-------------------------------------|--------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Après production</b>             | Infectiosité | $2,6 \cdot 10^{11}$ | $3,5 \cdot 10^{11}$ | $3,5 \cdot 10^{11}$ |
|                                     | Génome       | $5,1 \cdot 10^{12}$ | $2,1 \cdot 10^{13}$ | $2,1 \cdot 10^{13}$ |
| <b>Après dialyse</b>                | Infectiosité | Non dialysée        | $8,2 \cdot 10^{10}$ | $1,4 \cdot 10^{11}$ |
|                                     | Génome       |                     | $1,1 \cdot 10^{12}$ | $1,4 \cdot 10^{13}$ |
| <b>Après inactivation thermique</b> | Infectiosité | $2,4 \cdot 10^6$    | $1,3 \cdot 10^6$    | $6,2 \cdot 10^6$    |
|                                     | Génome       | $7,4 \cdot 10^{11}$ | $7,4 \cdot 10^{11}$ | $1,8 \cdot 10^{13}$ |



**Figure 7 : Gamme étalon obtenue avec l'ARN transcrit pour le phage MS2 (n=6).**

Après inactivation à la chaleur (60°C, 8h), les concentrations en génome s'échelonnent entre  $7,40.10^{11}$  et  $1,80.10^{13}$  UFP par mL (n=3).

*Globalement, nous obtenons un ratio entre le génome et l'infectiosité compris entre 1,5 et  $2 \log_{10}$  pour le phage MS2 après production, c'est-à-dire qu'un phage infectieux est détecté pour 20 à 100 copies de génome, et ce ratio est conservé après dialyse. La diminution des concentrations pour les phages infectieux et le génome peut être due en partie à une dilution de l'échantillon lors de la dialyse. Après inactivation à la chaleur, on observe un ratio entre le génome et l'infectiosité compris entre 5,5 et  $6,5 \log_{10}$ , ce qui signifie qu'un phage infectieux est détecté pour  $6.10^5$  à  $3.10^6$  copies de génome.*

## 2- Stabilité des suspensions de phages

### 2.1- Détermination de la taille des particules virales

Des mesures de taille sont réalisées sur des bactériophages MS2 afin de déterminer l'état des particules (isolées ou agrégées) lors de nos expérimentations. Une agrégation des particules entrainerait un biais au niveau du titrage du phage infectieux par la technique des plages de lyse. La taille des particules est mesurée par DLS (Dynamic Light Scattering) ou diffusion dynamique de la lumière. Lors de nos mesures un seul pic a été obtenu pour chaque échantillon. Ce pic correspond à la population majoritaire de la suspension et comprend 99 à 100% de la totalité des particules détectées. A partir de ce pic, il est possible de déterminer la taille de 80% de la population analysée.

#### 2.1.1- Taille des particules virales en fonction de la force ionique

Lors de la chromatographie à échange d'ions, les phages sont élués de la colonne par un gradient de NaCl ou par des paliers de NaCl de force ionique croissante, puis détectés par méthode de culture et RT-qPCR. C'est pourquoi il est important de vérifier l'absence d'agrégation liée à une augmentation de la force ionique.

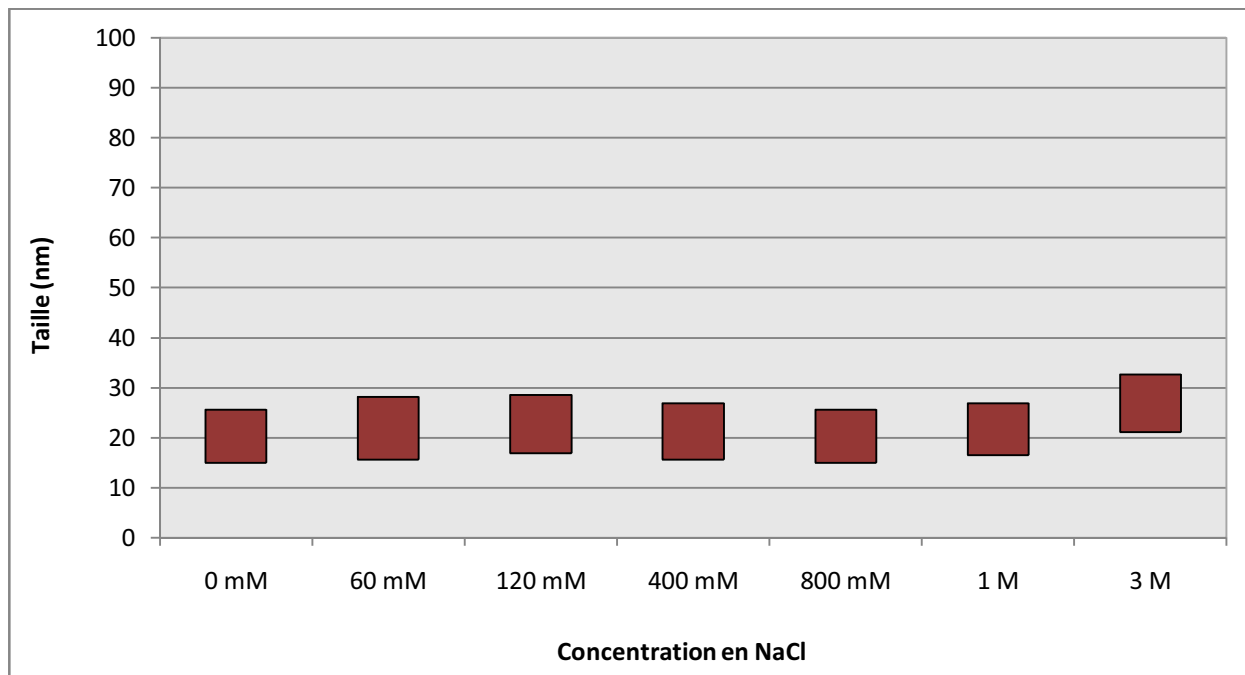
Les mesures de taille sont effectuées sur une suspension de phage dialysé, titré à  $1,4.10^{11}$  UFP/mL. Cette suspension est placée dans du tampon d'éluion TE (Tris 30 mM, EDTA 1 mM, HCl pH 8) à différentes concentrations en NaCl : 0 mM, 60 mM, 120 mM, 400 mM, 800 mM, 1 M et 3 M.

La **figure 8** présente les valeurs de taille (en nm) obtenues lors de l'analyse effectuée en triplicat. La taille moyenne des particules virales quelle que soit la force ionique est de  $23,8 \pm 8,8$  nm ce qui correspond à la taille moyenne d'une particule isolée. Aucune agrégation n'est obtenue en augmentant la force ionique pour un pH de 8.

#### 2.1.2- Taille des particules virales en fonction du pH

Les mesures de taille des particules du phage MS2 sont réalisées après dialyse dans des solutions de  $\text{NaNO}_3$  à 1 mM, solution dans laquelle se retrouve le phage après dialyse, pour des valeurs de pH allant de 2 à 7. Les suspensions de phage MS2 testées sont :

- MS2 dialysés (noté « infectieux ») contenant  $8,20.10^{10}$  UFP/mL et  $1,06.10^{12}$  cg/mL



**Figure 8 : Taille des particules de phage MS2 mesurée par DLS dans du tampon d'éluion TE à différentes concentrations en NaCl. Les valeurs de taille indiquées correspondent à 80% des particules.**

- MS2 dialysés et inactivés par traitement thermique (noté « inactivés ») contenant  $1,26 \cdot 10^6$  UFP/mL et  $7,40 \cdot 10^{11}$  cg/mL.

La **figure 9** présente les valeurs de taille (en nm) obtenues pour les différents pH lors d'une analyse effectuée en triplicat. Pour les phages MS2 « infectieux » (**figure 9A**), nous observons que 80% des particules ont une taille comprise entre 13 et 28 nm pour des pH allant de 7 à 4, entre 29 et 53 nm à pH de 3 et entre 164 et 369 nm à pH 2. Pour les phages MS2 « inactivés » à la chaleur, 80% des particules ont une taille comprise entre 13 et 27 nm pour des pH allant de 7 à 4, entre 19 et 35 nm à pH 3 et entre 295 et 664 nm pour un pH de 2 (**figure 9B**).

Pour les deux suspensions de phages, les tailles obtenues pour un pH compris entre 7 et 4 correspondent à celle d'une particule isolée. A pH 3, les tailles mesurées sont légèrement supérieure à celles de particule de MS2 isolées. En revanche, à pH 2, on observe une nette augmentation de la taille des particules qui correspond à l'agrégation du phage MS2.

Ainsi l'agrégation du phage MS2 est observée pour un pH de 2 dans du  $\text{NaNO}_3$  1 mM pour des phages « infectieux » et « inactivés ». Par contre, ces mesures de taille semblent montrer une tendance à la formation d'agrégats de plus grande taille et de tailles plus hétérogènes pour les phages « inactivés » que pour les phages « infectieux ».

*Nous n'observons aucune agrégation de nos phages MS2 en fonction de la force ionique, par contre, une agrégation est observée pour un pH inférieur ou égal à 2. Nous nous placerons à des pH compris entre 7 et 8 le phage MS2 sera donc à l'état de particules isolées.*

## 2.2- Evaluation de l'influence de la force ionique sur la détection du phage MS2 par culture et RT-qPCR

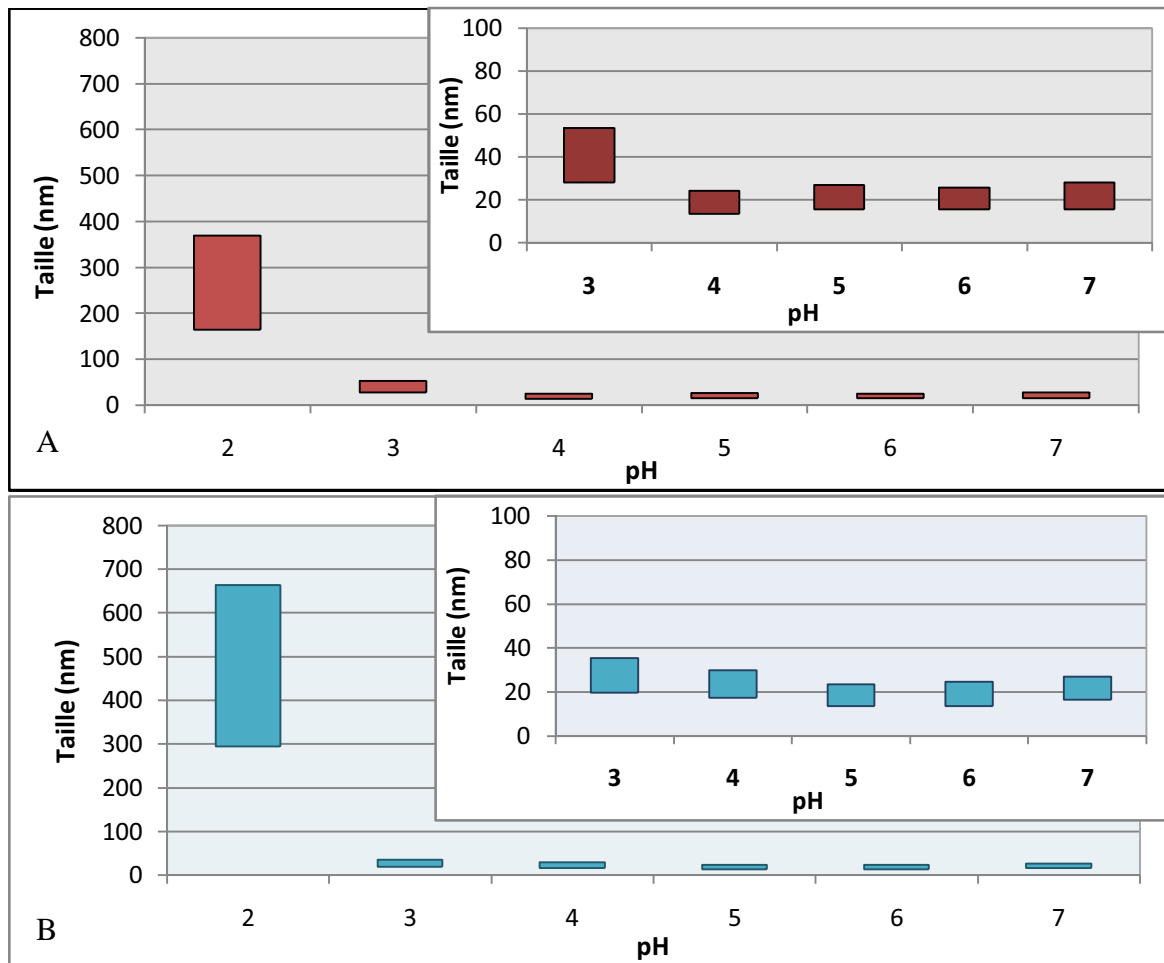
La détection du phage MS2 lors de la chromatographie à échange d'ions est réalisée par culture et RT-qPCR. Préalablement aux expérimentations, il est nécessaire de vérifier l'absence d'impact d'une concentration élevée en NaCl sur ces deux méthodes de détection.

### 2.2.1- Infectiosité du phage MS2 en fonction de la force ionique

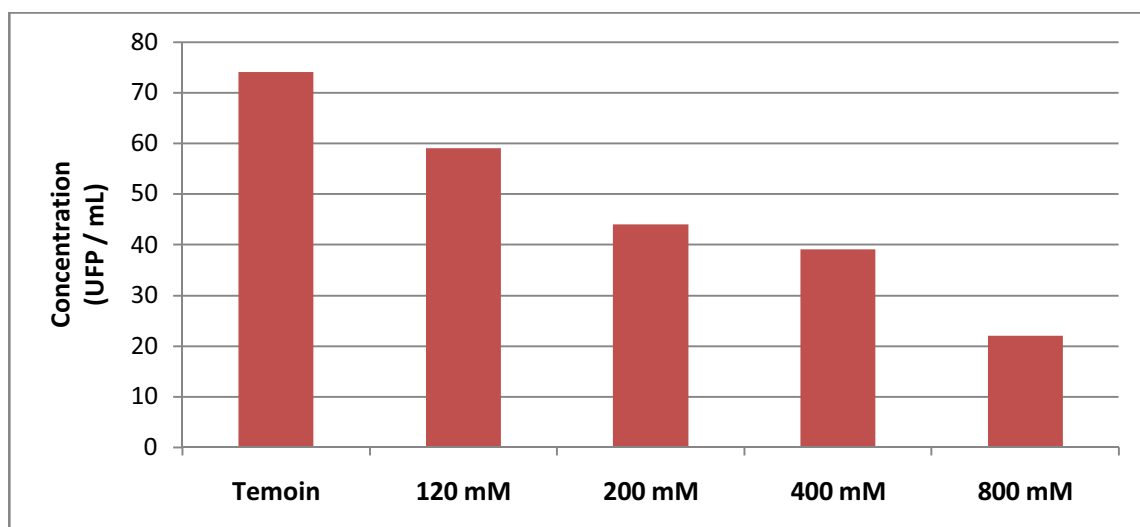
Le phage MS2 dialysé est mis en suspension à une concentration de  $10^3$  UFP/mL dans du tampon TE à 120, 200, 400 et 800 mM de NaCl et dans une solution de  $\text{NaNO}_3$  1 mM pour le témoin d'expérimentation. Les différentes suspensions sont maintenues à 4°C pendant 48h ce qui représente le délai habituel pour l'analyse des fractions de chromatographie. La concentration en phages infectieux est ensuite déterminée en duplicat après une dilution dans du  $\text{NaNO}_3$  1mM, dilution habituellement pratiquée pour les titrages des phages en sortie de colonne. Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure 10**.

Les titres en phages infectieux dans du tampon TE contenant 120, 200, 400 et 800 mM de NaCl correspondent à 80, 60, 53 et 31% de la concentration en phages infectieux détectés dans la suspension témoin.

*Nous observons une diminution progressive du titre infectieux avec l'augmentation de la concentration en NaCl, allant de 20% pour 120 mM à 69% pour 800 mM après 48 heures d'incubation du phage MS2. Cette diminution du titre infectieux peut être liée à une*



**Figure 9 : Taille des particules de phage MS2, analysées par DLS dans du  $\text{NaNO}_3$  1 mM, pour des phages « infectieux » (A) et « inactivés » par traitement thermique ( $60^\circ\text{C}$ , 8h) (B). Les valeurs de taille indiquées correspondent à 80% des particules. Insert : grossissement pour les pH de 3 à 7.**



**Figure 10 : Quantification des phages MS2 infectieux après 48h d'incubation dans du tampon TE contenant 120, 200, 400 et 800 mM de NaCl.**



*inhibition du phage, mais dans ce cas la dilution préalable au titrage dans du NaNO<sub>3</sub> 1 mM devrait suffire à lever cette inhibition. Cette diminution de l'infectiosité peut également être due à de l'inactivation ou à l'adhésion du phage sur les parois du tube.*

### 2.2.2- Quantification du génome du phage MS2 en fonction de la force ionique

Des dilutions du stock de phage MS2 dialysé sont effectuées dans du tampon TE contenant 120, 200, 400 et 800 mM de NaCl et dans du NaNO<sub>3</sub> 1mM pour le témoin.. Pour une concentration en NaCl de 120, 200, 400 et 800 mM, nous n'observons pas de différence au niveau des Ct obtenus. L'analyse par RT-qPCR après dilution des ARN extraits au 1/10<sup>ème</sup> est également réalisée afin de mettre en évidence une éventuelle inhibition de cette méthode et là encore, nous n'observons pas de différence en terme de quantité de génome.

*Aucune inhibition de la PCR n'est observée lorsqu'on augmente la concentration en NaCl. Au niveau de l'infectiosité, une forte concentration en NaCl provoque une inactivation du bactériophage MS2. En effet, le fait que les valeurs de PCR ne changent pas quelle que soit la concentration en NaCl prouve qu'il ne s'agit pas d'une adhésion augmentée aux parois du tube.*

### 2.3- Evaluation d'un nettoyage de la colonne de chromatographie en termes d'infectiosité et de matériel génétique résiduel

Après dépôt d'une solution stock de phages dialysés ou non sur les colonnes DEAE, un nettoyage s'impose avant de les réutiliser.

Un premier nettoyage des colonnes DEAE basé sur l'utilisation de tampon TE contenant 200 mM de NaCl a été évalué suite à un dépôt de solution stock sur la colonne (de l'ordre de 10<sup>13</sup> copies de génomes déposées). Après passage de 1 L de cette solution, 6,5.10<sup>5</sup> cg/mL à 1,3.10<sup>8</sup> cg/mL sont encore détectés. Un second nettoyage utilisant une solution de NaOH à 0,1 M (400 mL par colonne), suivi d'un rinçage avec du tampon TE dépourvu de NaCl (400 mL) a alors été testé et 1.10<sup>4</sup> cg / mL ont encore été détectées suite à ce nettoyage.

L'évaluation de ces protocoles de nettoyage a été effectuée uniquement par RT-qPCR. Toutefois, le nettoyage par une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M devrait permettre d'inactiver les phages qui n'ont pas été élués de la colonne. L'infectiosité du phage MS2 est déterminée après 4 heures d'incubation dans une solution de NaOH 0,1 M, ce qui correspond aux conditions appliquées lors du nettoyage des colonnes. A partir d'une concentration en phages MS2 infectieux de 10<sup>10</sup> UFP/mL, nous ne détectons aucun phage infectieux après 4 heures d'incubation dans une solution de NaOH 0,1 M.

*L'application d'un nettoyage de la résine DEAE avec une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M permet d'éliminer seulement une partie du génome phagique, mais la totalité des phages infectieux. Par la suite, nous ne pourrions analyser le génome que sur les colonnes n'ayant jamais servi pour notre phage. Pour les colonnes déjà utilisées puis nettoyées avec de la soude 0,1 M, seuls les résultats d'infectiosité seront exploités.*

### 3- Purification d'une suspension de phage MS2

#### 3.1- Purification par chromatographie à échange d'anions

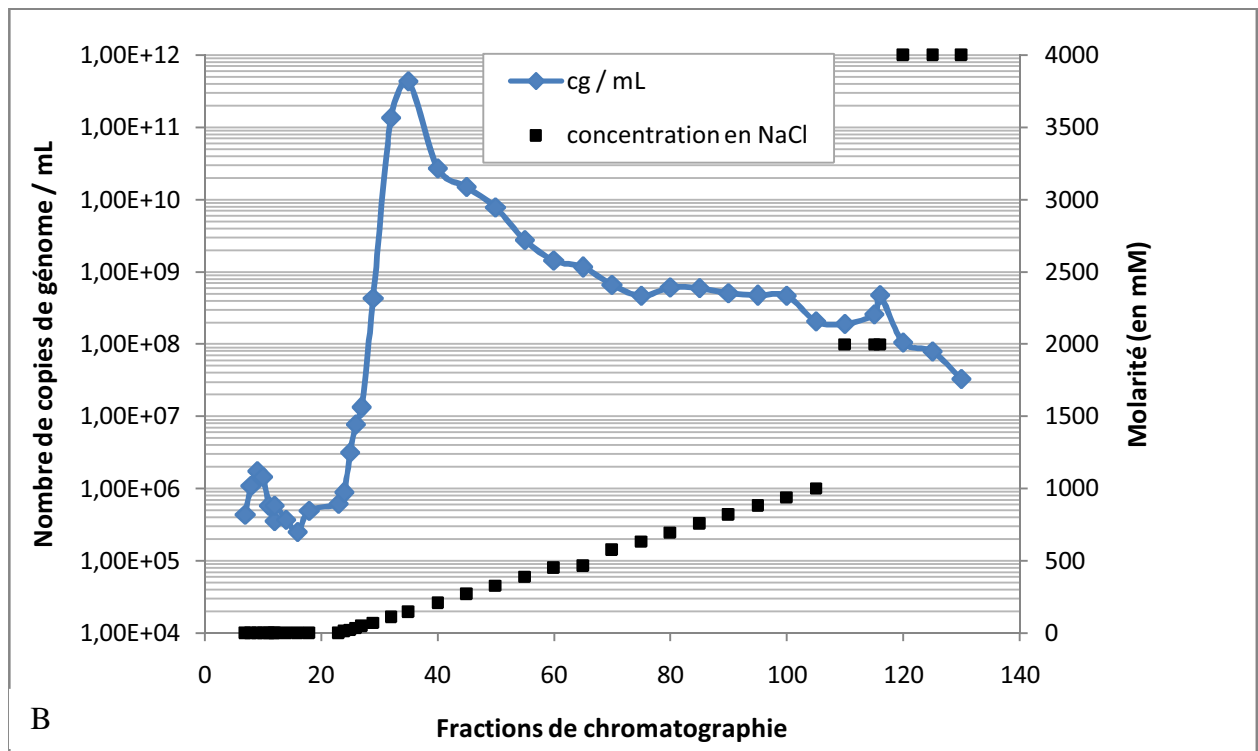
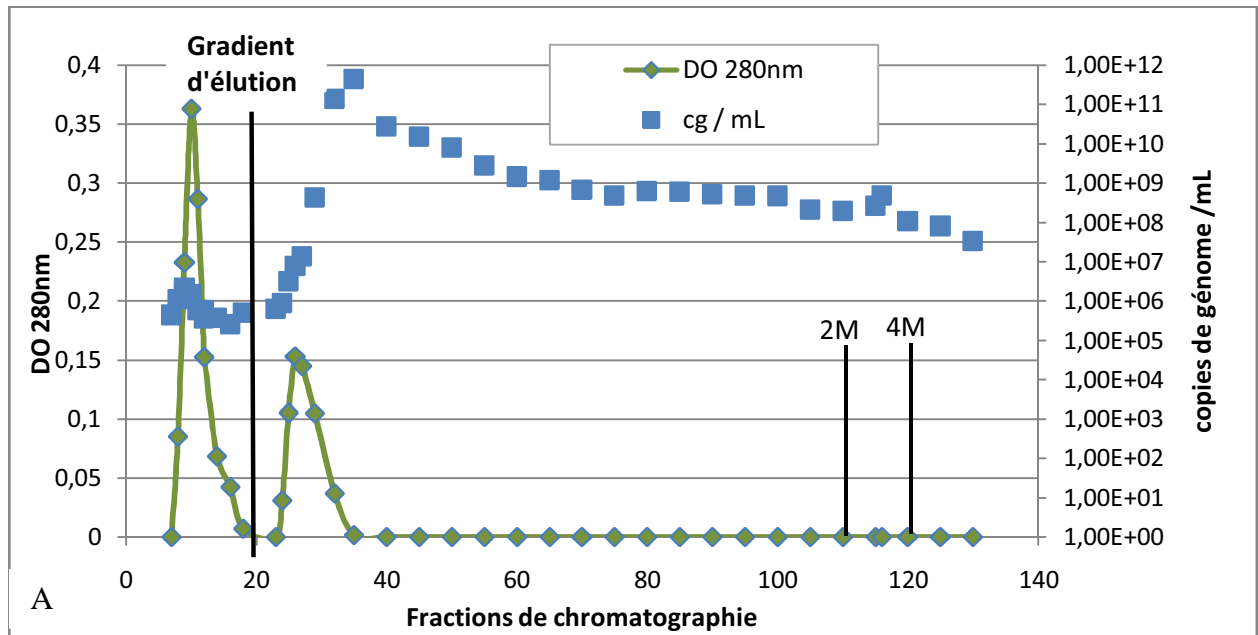
Nous utilisons ici un stock de phage MS2 non dialysé donc non purifié et contenant  $2,7 \cdot 10^{12}$  copies de génome/mL. Cette solution présente une absorbance à 280 nm de 6,05. Nous déposons 2 mL de cette suspension phagique préalablement mélangée avec 2 mL de tampon TE (Tris 30mM, EDTA 1mM, HCl pH 8). Un débit constant de 1,5 mL/min est fixé pendant toute la durée de l'expérimentation. Les fractions obtenues lors du dépôt du phage et de l'élution ont un volume compris entre 2,9 mL et 3,1 mL, 130 fractions sont récupérées. Lors de cette expérimentation, l'absorbance à 280 nm et les concentrations en génome sont mesurées lors du dépôt du phage sur la colonne et pendant l'élution.

Les résultats correspondants aux mesures d'absorbance et aux concentrations en génome sont représentés sur la **figure 11A**. Après dépôt du phage sur la colonne, nous observons un premier pic d'absorbance à 280 nm. Le gradient de concentration de NaCl est mis en place à la fin de ce premier pic d'absorbance. Un deuxième pic d'absorbance est alors observé. A la fin du gradient de NaCl, deux paliers de plus fortes concentrations en NaCl de 2 M puis de 4 M sont appliqués afin de s'assurer que le phage a bien été élué de la colonne. Aucun nouveau pic d'absorbance n'est alors observé. Les différentes fractions correspondant à ces deux pics sont analysées par RT-qPCR ainsi qu'une fraction sur cinq pour celles dont l'absorbance à 280 nm est nulle.

Lors du premier pic d'absorbance pour lequel une valeur de 0,36 a été mesurée, du génome du phage MS2 est détecté à une concentration de  $1 \cdot 10^6$  cg/mL. Ainsi, moins de 0,1% du génome de l'échantillon est alors détecté, ce pic correspondrait à des protéines liées à la production du stock phagique qui ne sont par retenues par la résine DEAE lors du dépôt de l'échantillon. Lors du second pic d'absorbance correspondant à une valeur de 0,15, la concentration en génome détectée est de l'ordre de  $10^7$  cg/mL. Ce pic d'absorbance correspond également à moins de 0,1% de la quantité de génome déposée sur la colonne.

L'analyse par RT-qPCR (**figures 11A et 11B**) révèle la présence d'un seul pic pour le génome du phage MS2 (fractions 30 à 40), observé immédiatement après le second pic d'absorbance et qui correspond à une concentration de  $4,4 \cdot 10^{11}$  cg/mL. Ainsi, plus de 34% du génome du phage MS2 déposé est élué de la colonne lors de ce pic. La phase de décroissance de ce pic est très étendue et les quantités de génome détectées après la fraction 40 représentent  $1 \cdot 10^{11}$  copies de génome soit 1,9% de la quantité totale de génome déposé. Les quantités de génome du phage MS2 détectées dans l'ensemble des fractions d'élution analysées correspondent à  $1,9 \cdot 10^{12}$  copies de génome récupérées pour  $5,4 \cdot 10^{12}$  copies de génome déposées sur la colonne. Ainsi, plus de 35% des phages MS2 déposés sur la colonne DEAE sont récupérés lors de l'élution d'après l'analyse par RT-qPCR.

L'élution du phage MS2 est observée rapidement après la mise en place du gradient de NaCl (**figure 11B**). Ainsi, l'élution du phage débute dès 100 mM de NaCl. Pour la fraction présentant le maximum de matériel génétique (fraction 35), la concentration en NaCl se situe entre 120 et 150 mM. Par contre, l'application de concentrations en NaCl beaucoup plus élevées (2 et 4 M) n'entraîne pas d'augmentation de la quantité de phage MS2 élué.



**Figure 11 : Chromatographie à échange d'anions sur colonne DEAE du phage MS2. (A) Comparaison de l'absorbance à 280 nm et de la quantification du génome. (B) Comparaison de la concentration en NaCl et de la quantification du génome.**

*Le second pic d'absorbance à 280 nm et le pic de matériel génétique sont distants de deux fractions d'élution, ce décalage lors de la phase d'élution permettrait de purifier le phage MS2 par chromatographie à échange d'anions en récupérant uniquement les fractions d'élution immédiatement après le second pic d'absorbance.*

*Lors de cette première chromatographie, du génome de phage MS2 est détecté lors de la phase de dépôt de l'échantillon sur la colonne. Afin d'améliorer l'adsorption du phage MS2 sur la résine DEAE, les conditions de dépôt de l'échantillon sont modifiées lors des prochaines chromatographies. La suspension est diluée au ½ dans du tampon TE dépourvu de NaCl afin de placer le phage dans des conditions similaires à celles rencontrées dans la colonne. De plus, le dépôt est réalisé à un débit inférieur à 1 mL/minute afin de faciliter les interactions entre le phage et la résine DEAE (Adriaenssens et al., 2012b).*

### 3.2- Purification par dialyse

Après une purification par dialyse, le titre en phage infectieux et en matériel génétique chute légèrement (**tableau 6**) mais on retrouve toujours environ  $10^{11}$  UFP/mL et des quantités de génome de l'ordre de  $10^{12}$  à  $10^{13}$  cg/mL. Après dialyse, l'absorbance à 280 nm de la suspension phagique est nulle et le volume de la suspension phagique n'est pas modifié.

*La dialyse nous permet donc d'éliminer toutes les protéines contaminantes détectées à 280 nm dans la solution stock non purifiée.*

## 4- Discrimination des phages infectieux et non infectieux

### 4.1- Discrimination par la charge : chromatographie à échange d'ions

#### 4.1.1- Chromatographie en gradient de NaCl

Une chromatographie sur résine DEAE est réalisée avec deux suspensions de phages MS2 :

- MS2 « infectieux » ou stock de phages natifs : pour cette suspension,  $1,6 \cdot 10^{11}$  UFP sont déposées sur la colonne, ce qui correspond à  $1 \cdot 10^{13}$  copies de génome, soit une différence de  $2 \log_{10}$  entre le matériel génétique et les phages infectieux.
- MS2 « inactivés » par traitement thermique : pour cette suspension de travail,  $2,6 \cdot 10^6$  UFP sont déposées sur la colonne. Cette suspension contient encore  $8,7 \cdot 10^{12}$  copies de génome, soit une différence de plus de  $6 \log_{10}$  entre le matériel génétique et les infectieux.

Deux colonnes distinctes sont utilisées, l'une pour les phages « infectieux » (colonne A) et l'autre pour les phages « inactivés » (colonne B). Après le dépôt, un volume de tampon TE supérieur au volume mort de la colonne (20mL) est passé sur la colonne avant d'appliquer un gradient de NaCl de concentration comprise entre 0 et 200 mM. L'application de ce gradient de NaCl devrait permettre une analyse plus fine des fractions d'élution en fonction de leur force ionique. Les fractions récupérées font 5 mL pour la colonne A et 4 mL pour la colonne B, une fraction est récupérée toutes les 2 minutes. Ces fractions sont ensuite

analysées par RT-qPCR et par titrage. Les résultats obtenus pour les colonnes A et B sont représentés respectivement sur les **figures 12A et 12B**.

Pour la colonne A, le génome du phage MS2 est détecté à partir de la fraction 20, notre optimisation du dépôt a bien fonctionné. En revanche pour le phage « inactivé », du phage est élué dès le dépôt sur la colonne.

Pour le stock de phages natifs, un seul pic correspondant à une concentration de  $7,9 \cdot 10^{10}$  cg/mL est observé pour l'ARN pour concentration en NaCl de 120 mM. Un seul pic est également observé pour les phages infectieux à  $3,8 \cdot 10^8$  UFP/mL, il correspond également à 120 mM de NaCl. Le ratio entre le génome et l'infectiosité est d'environ d'2  $\log_{10}$ .

Pour les phages « inactivés », la concentration maximale en génome atteint  $7,2 \cdot 10^9$  cg/mL à 120 mM de NaCl, un plateau est ensuite observé jusqu'à la fin de l'élution. Un seul pic est observé pour les phages infectieux à  $4 \cdot 10^3$  UFP/mL pour une concentration en NaCl de 120 mM. Le ratio entre le génome et l'infectiosité est d'environ 6  $\log_{10}$ .

Au cours de l'élution, nous récupérons  $1,7 \cdot 10^{10}$  UFP sur les  $1,6 \cdot 10^{11}$  UFP déposées pour les phages infectieux, soit un taux de récupération d'environ 10%. Pour les phages inactivés à la chaleur, nous récupérons  $2,2 \cdot 10^5$  UFP sur les  $2,6 \cdot 10^6$  UFP déposées soit un taux de récupération d'environ 8%.

*Ainsi, les concentrations maximales en génome et en phages infectieux sont observées pour une même concentration en NaCl de l'ordre de 120 mM. Comme noté lors de l'expérimentation précédente, la décroissance de l'élution est très lente et des concentrations élevées en génome sont encore observées à la fin du gradient d'élution correspondant à une concentration de 200 mM de NaCl.*

#### 4.1.2- Chromatographie en paliers de NaCl

Ces chromatographies sont effectuées sur les mêmes colonnes que précédemment. Par contre, l'élution des phages est réalisée, non pas en gradient de NaCl, mais par des paliers de NaCl de concentration croissante. L'avantage des paliers de NaCl est qu'ils permettent une quantification beaucoup plus rapide des phages infectieux pour chaque concentration en NaCl, d'autant que l'absence de densité optique détectable à 280 nm pour les phages dialysés ne permet pas de disposer d'un repère pour l'analyse des 80 à 130 fractions obtenues lors de l'élution en gradient de NaCl. Le volume mort de la colonne de chromatographie est d'environ 20 mL, les paliers ont un volume de 50 mL chacun. La deuxième modification apportée par rapport aux expérimentations précédentes est une forte diminution de la quantité de phages analysés par colonne puisque seulement  $10^6$  UFP sont déposés sur chaque colonne. Il s'agit ici de limiter le risque d'agrégation du phage MS2 dans la colonne pouvant expliquer l'élution très lente des phages lors des précédents essais.

Le dépôt de l'échantillon (2 mL contenant  $2,8 \cdot 10^6$  UFP) est effectué à faible débit (< 1 mL/min), de même que le premier lavage avec 50 mL de tampon TE sans NaCl. L'élution est ensuite réalisée à un débit de 2,5 mL/min grâce à des paliers de 50 mL de tampon TE contenant 30, 60, 90, 120, 200, 400 et 800 mM de NaCl. Deux expérimentations ont été

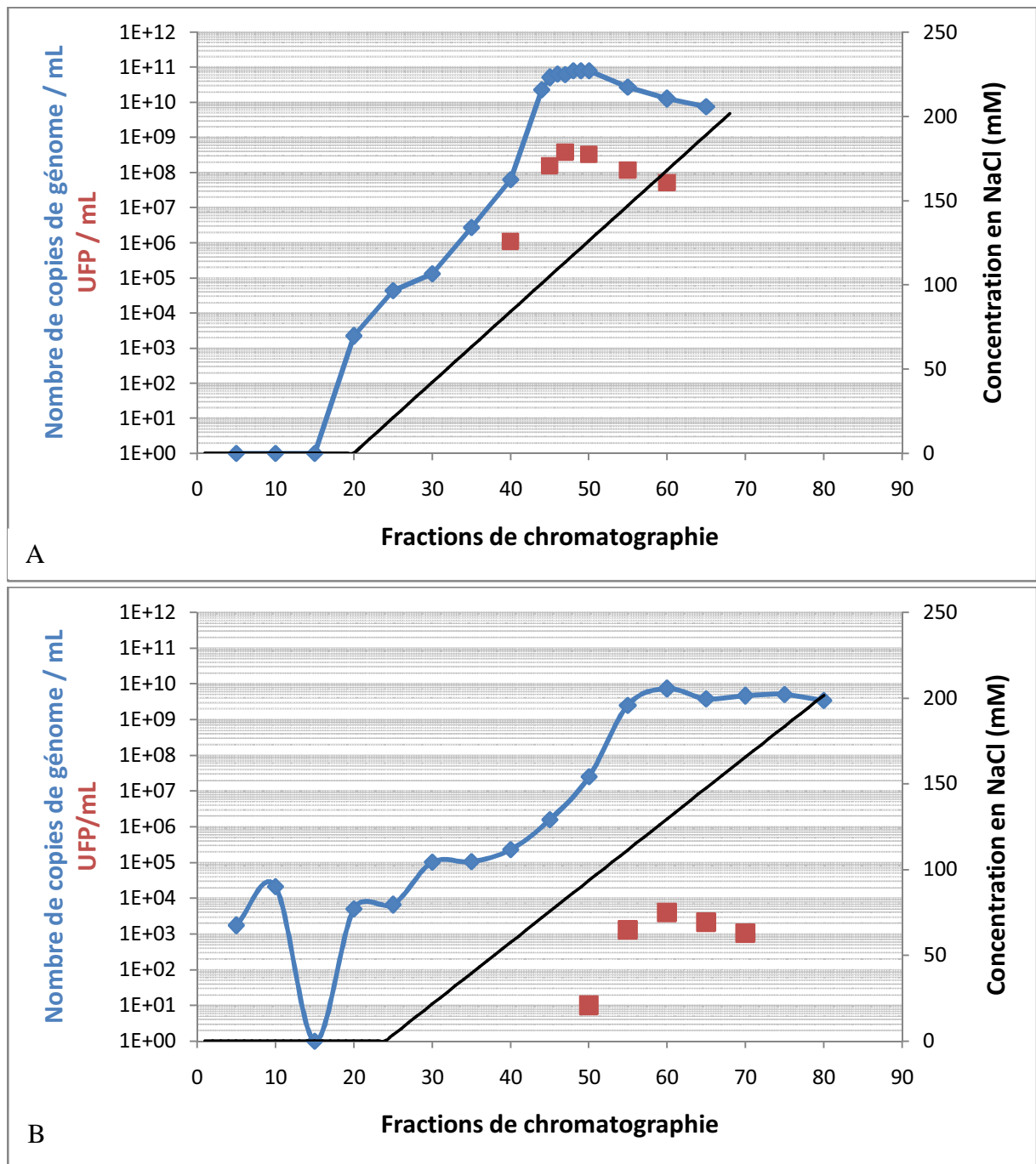


Figure 12 : Chromatographie échangeuse d’anions sur colonne DEAE avec élution en gradient de NaCl pour une suspension de phages MS2 natifs (A) et une suspension de phages MS2 inactivés par traitement thermique (60°C, 8h) (B). Quantification du génome phagique et des phages infectieux.

réalisées, et un palier supplémentaire contenant 1 M de NaCl a été utilisé lors de la seconde expérimentation. Les fractions d'élution correspondant à chaque palier (50 mL) sont récupérées puis analysées par la méthode de titrage des plages de lyse. Le volume mort de la colonne est de 20 mL, les fractions sont récupérées dès le changement de palier de concentrations. Elles correspondent donc à une concentration en NaCl intermédiaire à deux paliers. Les résultats obtenus pour les deux expérimentations sont présentés sur la **figure 13**.

L'élution du phage MS2 est observée pour une concentration en NaCl supérieure à 120 mM, c'est-à-dire comprise entre 120 et 200 mM. Lors du premier essai, la concentration en phages infectieux la plus élevée est observée pour une concentration supérieure à 200 mM, puis celle-ci diminue. Lors de la deuxième expérimentation, la concentration en phages la plus élevée est observée dès le début de l'élution, puis diminue progressivement.

18 et 42% des phages infectieux sont récupérés respectivement lors de la première et de la deuxième expérimentation. Bien qu'une concentration de 1 M de NaCl n'ait été appliquée que pour le deuxième essai, la différence de récupération est due aux quantités de phages élués lors du passage des fractions contenant 200 et 400 mM de NaCl.

*Ainsi comme nous l'avons observé en appliquant une élution par gradient, l'élution du phage MS2 débute pour une concentration en NaCl d'environ 120 mM et se poursuit pour des concentrations en NaCl plus élevées.*

#### 4.1.3- Essai sur un autre type de colonne : mini-colonne DEAE

Une chromatographie à échange d'anions est réalisée sur une mini-colonne DEAE de 1 mL avec une élution par paliers de NaCl. Cette colonne étant neuve, les phages infectieux et le génome viral sont quantifiés dans les différentes fractions d'élution. L'échantillon déposé sur la colonne contient  $1,4 \cdot 10^6$  UFP et  $1,4 \cdot 10^8$  copies de génome dans 10 mL de tampon TE dépourvu de NaCl. Le débit appliqué lors du dépôt de l'échantillon est de 1 mL/min, ce débit sera ensuite augmenté à 2 mL/min pour appliquer les différents paliers d'élution d'un volume de 10 mL contenant 30, 60, 90, 120, 200, 400, 800 mM et 1 M de NaCl. 10 mL de tampon TE à 3 M de NaCl sont appliqués pour régénérer la colonne et 10 mL de tampon TE à 0 mM de NaCl sont utilisés pour rincer la colonne, ces deux fractions sont également analysées. Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure 14**.

L'élution des phages infectieux et du génome est observé pour des concentrations en NaCl supérieures à 200 mM. L'élution se poursuit jusqu'à des concentrations en NaCl de 3 M, ainsi que dans le tampon de lavage. Globalement,  $2,5 \cdot 10^6$  copies de génome et  $1,8 \cdot 10^3$  UFP sont élués, ce qui représente des taux de récupération de 1,78% pour le génome et de 0,13% pour les phages infectieux.

Pour l'échantillon déposé, nous observons un écart de  $2 \log_{10}$  entre le génome et les phages infectieux. Lors de l'élution, nous observons par contre un écart de  $3 \log_{10}$  entre le génome et les phages infectieux.

*L'expérimentation réalisée sur cette mini-colonne DEAE semble montrer une adhésion plus importante des phages MS2 à la résine DEAE que lors des expérimentations précédentes.*

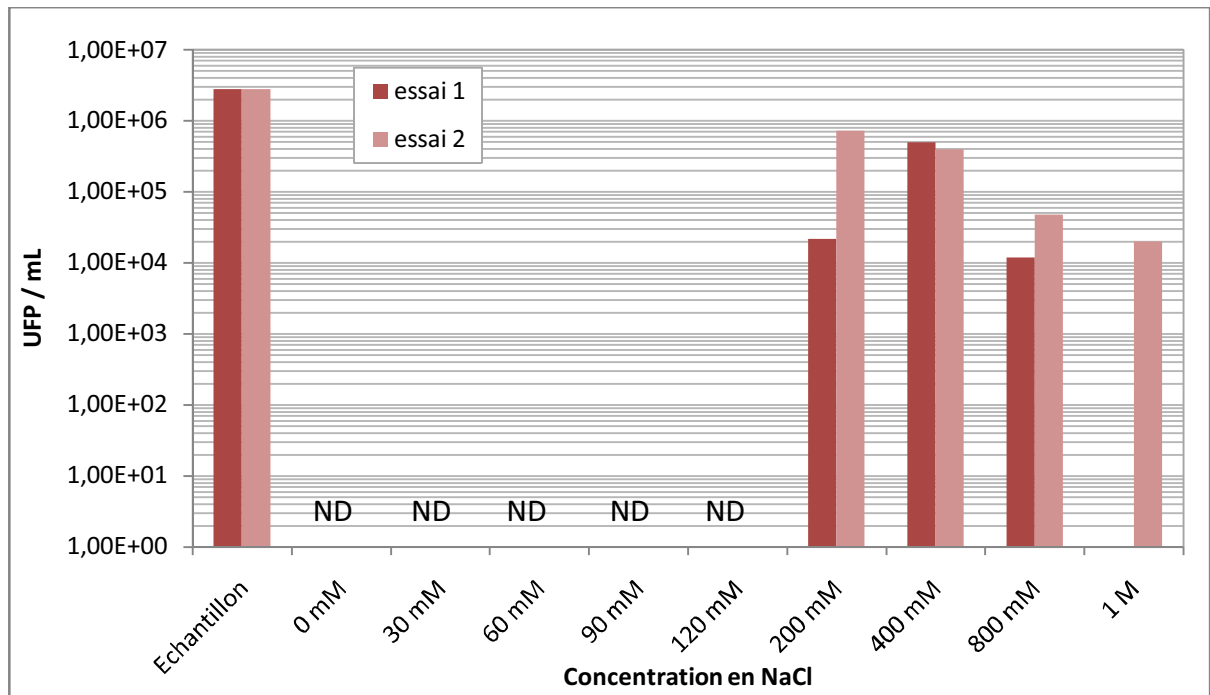


Figure 13 : Chromatographie échangeuse d’anions sur colonne DEAE d’une suspension de phages MS2 avec élution en paliers de NaCl. Analyse des fractions d’élution par quantification des phages infectieux. ND : non détecté.

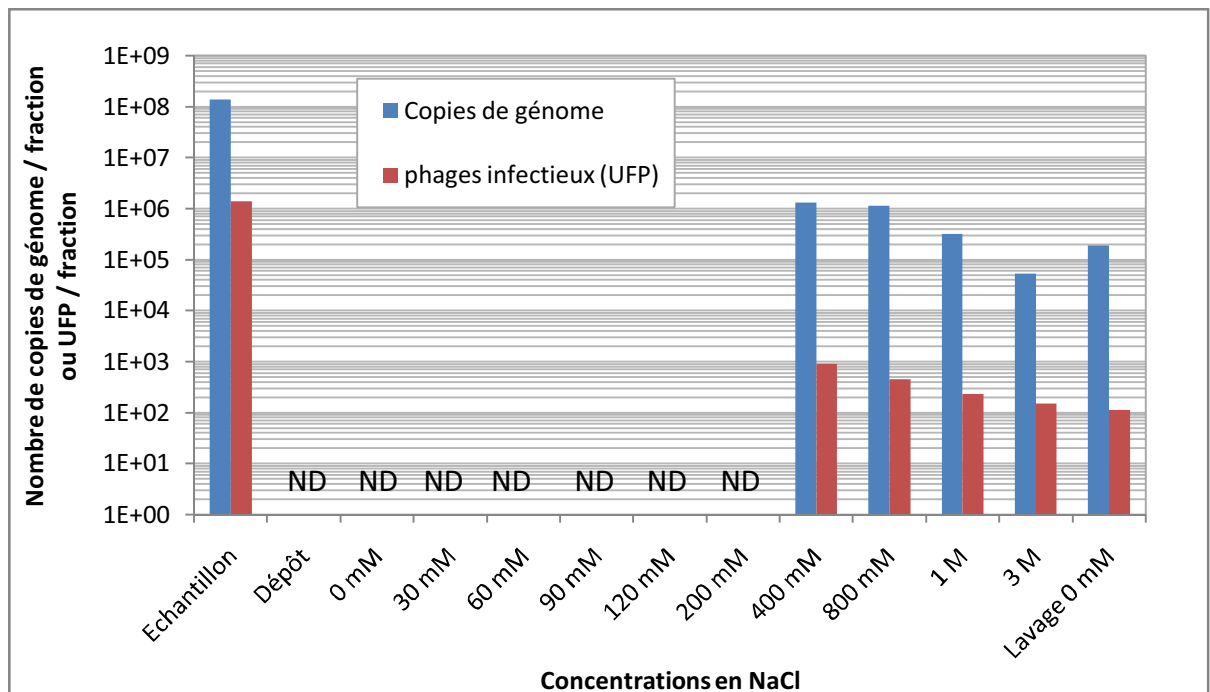


Figure 14 : Chromatographie échangeuse d’anions sur mini-colonne DEAE d’une suspension de phages MS2 avec élution en paliers de NaCl. Analyse des fractions d’élution par quantification du génome et des phages infectieux. ND : non détecté.



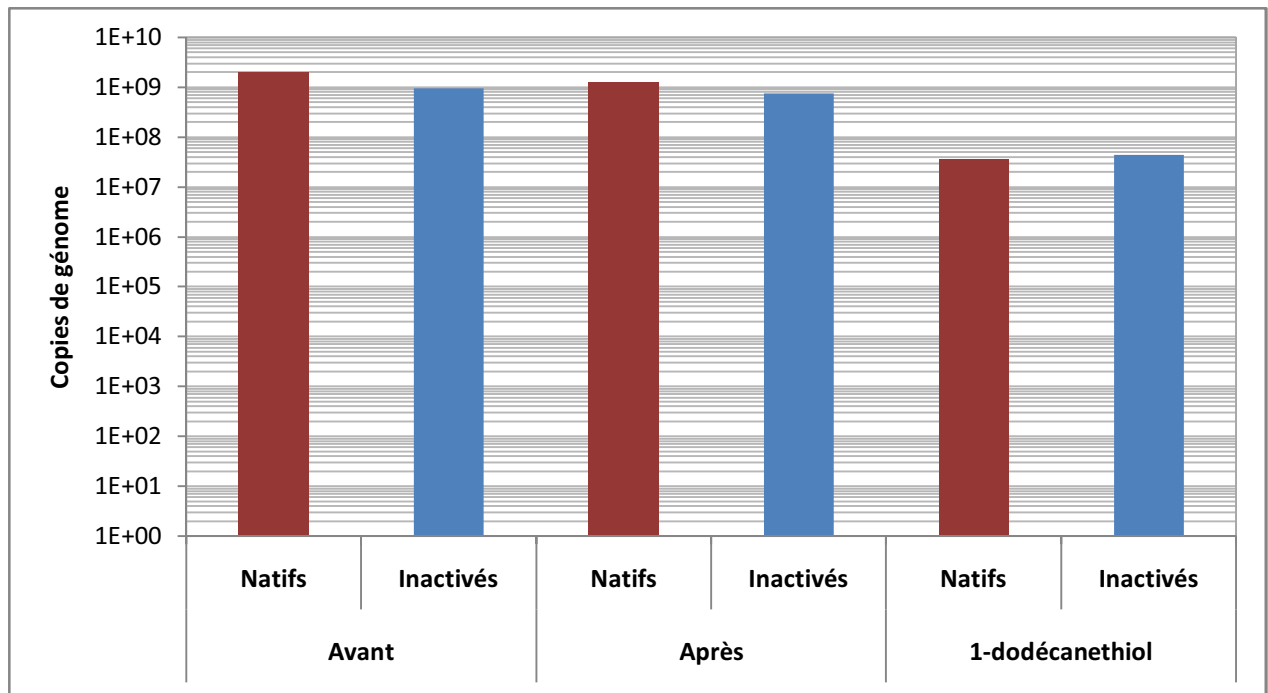
*De plus, le ratio entre le génome et les phages infectieux est plus important que celui de la suspension initiale, contrairement à ce qui a été observé auparavant.*

#### 4.2- Discrimination en fonction de la balance hydrophile / hydrophobe : adhésion sur un support hydrophobe

Cette expérimentation vise à évaluer l'adhésion de phages MS2 infectieux et inactivés par traitement thermique (60°C, 8h) sur des supports hydrophobes afin de comparer leur balance hydrophile/hydrophobe. Des lames de verre recouvertes de 1-dodécane-thiol sont immergées dans des suspensions de phages natifs et inactivés préparées dans du NaNO<sub>3</sub> 100 mM. Seul le génome a pu être détecté car le traitement appliqué pour rendre les lames hydrophobes s'est avéré inactivant pour le phage MS2. Le génome est quantifié dans les suspensions avant et après immersion des lames hydrophobes, ainsi que sur les lames. Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure 15**.

Les deux suspensions de phages natifs et inactivés contiennent respectivement  $2 \cdot 10^9$  et  $9,4 \cdot 10^8$  copies de génome. Après incubation de la lame hydrophobe,  $1,3 \cdot 10^9$  et  $7,4 \cdot 10^8$  copies de génome sont détectés pour ces deux suspensions. Au niveau des supports hydrophobes,  $3,5 \cdot 10^7$  et  $4,4 \cdot 10^7$  copies de génome sont détectés pour les phages natifs et pour les phages inactivés, respectivement.

*Ainsi, les quantités de génome retrouvées sur les supports hydrophobes ne permettent pas de mettre en évidence de différence de balance hydrophile/hydrophobe entre des phages natifs et des phages inactivés par traitement thermique.*



**Figure 15 : Adhésion du phage MS2 sur une surface hydrophobe pour des phages natifs et des phages inactivés par traitement thermique (60°, 8h) dans une solution de  $\text{NaN}_3$  100 mM. Quantification du génome du phage MS2 dans la suspension avant immersion du support hydrophobe (Avant), après immersion du support hydrophobe (Après) et sur le support hydrophobe (1-dodécane-thiol).**

## DISCUSSION

Dans les pays développés, les virus entériques sont à l'origine de 80% des gastroentérites liées à la consommation d'eau (Koopmans et Duizer, 2004). Dans le milieu hydrique, ces virus peuvent être considérés comme des particules biologiquement inertes. Leur devenir dans l'environnement est lié à leurs propriétés de surface qui sont principalement représentées par la charge électrostatique et la balance hydrophile/hydrophobe. Des modifications de ces propriétés de surface au cours de l'inactivation virale nous permettraient de discriminer la population de phages infectieux des phages non infectieux. Il apparaît en effet nécessaire de développer de nouvelles méthodes de détection des virus infectieux car les méthodes de culture cellulaire ne sont pas applicables à tous les virus pathogènes (norovirus) et la détection de génome viral par PCR n'est pas corrélée à l'infectiosité (Gassilloud *et al.*, 2003). Devant l'impossibilité d'obtenir certains virus entériques d'importance sanitaire par culture cellulaire (norovirus) et les grandes concentrations en particules virales nécessaires pour certaines méthodes analytiques d'étude des propriétés de surface ( $10^{11}$  particules virales / mL sont nécessaire pour tester la mobilité électrophorétique) de nombreuses études portant sur la purification et les propriétés de surface sont réalisées avec des bactériophages ARN F-spécifiques (Langlet, 2008 ; Dika, 2013). Cependant, aucune de ces études ne fait la distinction entre les phages infectieux et les phages non infectieux. Or évaluer l'infectiosité reste nécessaire pour évaluer le risque viral et donc le risque sanitaire lié au virus entériques pathogènes.

Dans ce contexte, notre travail visait à évaluer le potentiel de la chromatographie à échange d'anions pour la purification des particules virales et pour la discrimination des particules virales infectieuses et non infectieuses grâce à l'analyse par titrage et RT-qPCR. Cette distinction nous semble en effet essentielle pour pouvoir approcher les propriétés interfaciales pouvant être en lien avec l'inactivation virale. Nous travaillerons sur un bactériophage ARN F-spécifique : le phage MS2.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la comparaison des concentrations en phages infectieux et en génome pour des stocks de phages MS2 natifs qui révèle des concentrations en génome 10 à 100 fois supérieures aux concentrations en phage infectieux. Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus par Ogorzaly *et al.* (2013) sur des virus pathogènes : les adénovirus. Ceci montre la nécessité de discriminer les virus infectieux parmi l'ensemble de particules virales d'une suspension lors de l'étude des propriétés de surface pour pouvoir définir des caractéristiques propres aux virus infectieux.

Lors des expérimentations réalisées par chromatographie sur colonne DEAE, l'élution est réalisée par application d'un tampon TE contenant une concentration croissante en NaCl. Nous avons tout d'abord évalué l'impact de différentes concentrations en NaCl sur la détection du phage MS2 par titrage et par RT-qPCR. Ainsi, si nous n'observons pas d'inhibition au niveau de l'extraction et de la RT qPCR, la concentration en NaCl a cependant une influence sur le titrage. En effet, nous observons une diminution progressive de

l'infectiosité corrélée à l'augmentation de la molarité : cette diminution est de 20% à 120 mM de NaCl et atteint même 70% lorsque la concentration en NaCl est de 800 mM. Dans leur étude sur la purification par la chromatographie du bactériophage T4, Smrekar *et al.* (2007) ne retrouvent pas d'inhibition de l'infectiosité pour des concentrations en NaCl allant de 0,1 à 1,5 M. En revanche, ils observent une diminution de l'infectiosité à partir de 2 M de NaCl. Le phage MS2 pourrait être plus sensible que le phage T4 à de fortes concentrations en NaCl et cette perte d'infectiosité est liée à une inactivation du phage, et non à une inhibition ou à une augmentation de l'adhésion aux parois.

Nous avons également vérifié que le phage MS2 était à l'état de particules isolées dans nos conditions expérimentales. Cette information est importante car l'agrégation peut entraîner un biais au niveau du titrage du phage MS2. L'agrégation peut également modifier les charges des particules. Dans les conditions de la chromatographie, à savoir dans du tampon TE à pH 8 pour des molarités allant de 0 à 3 M de NaCl, aucune agrégation des particules virales n'est observée pas mesure de taille. Ainsi, dans le cadre de nos expérimentations en colonne de chromatographie, les phages seront à l'état de particules isolées.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué la chromatographie à échange d'anions comme méthode de purification d'une solution stock de phage MS2. Les expérimentations ont été réalisées avec une colonne DEAE décrite dans la littérature pour purifier différents bactériophages (Ling *et al.*, 2004 ; Adriaenssens *et al.*, 2012b ; Oksanen *et al.*, 2012). Nos résultats montrent que cette méthode permet la purification du bactériophage MS2 que nous arrivons à séparer des protéines contaminantes. Nous obtenons en effet un décalage entre le pic d'absorbance à 280 nm et le pic de matériel génétique. Ainsi, en récupérant la fraction contenant le maximum de matériel génétique pour laquelle l'absorbance à 280 nm est nulle, nous observons un rendement de récupération de 25% en se basant sur la détection du génome. Au laboratoire, les suspensions de bactériophages sont purifiées par dialyse. Par rapport à la chromatographie, la dialyse présente l'avantage de ne pas nécessiter d'optimisation des conditions expérimentales contrairement à la chromatographie qui doit être optimisée pour chaque virus. La dialyse permet d'obtenir un niveau de pureté évalué par une absorbance nulle à 280 nm au moins équivalent à celui de la chromatographie. L'inactivation d'une partie des phages est observée pour les deux méthodes, mais elles permettent tout de même d'aboutir à des concentrations de l'ordre de  $10^{12}$  UFP/mL.

Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés à la discrimination des phages infectieux et non infectieux par leurs propriétés de surface. Nous avons tout d'abord regardé les différences possibles au niveau de la charge par chromatographie à échange d'anions. Lorsque nous travaillons en gradient de NaCl, les phages, aussi bien infectieux que non infectieux, sont élués pour des concentrations en NaCl supérieures à 100 mM. Les expériences effectuées en paliers de NaCl sur la même colonne mais avec un phage dilué nous ont permis de déterminer que les phages infectieux étaient élués pour une concentration en NaCl supérieure à 120 mM. Cette élution est en adéquation avec les

résultats obtenus par Dika *et al.* (2013a) qui observent la plus faible mobilité électrophorétique ( $\mu$ ) pour le phage MS2 pour une force ionique supérieure à 100 mM de  $\text{NaNO}_3$ . Le plateau de mobilité électrophorétique atteint par MS2 à 100 mM est le même pour les phages PhiX174 et PRD1. Ces trois phages devraient donc être élués en même temps lors d'une analyse par chromatographie DEAE avec gradient de NaCl. Cette valeur de mobilité électrophorétique proche de 0 signifie aussi la diminution des charges nettes du bactériophage d'où son élution dans la colonne à partir de 100 mM. En effet, la colonne est chargée positivement et retient donc les anions, l'augmentation de la force ionique va faire diminuer la charge nette négative de MS2 jusqu'à son décrochage de la colonne. Lors des premières chromatographies sur les colonnes DEAE, les pics de génome et de phages infectieux se superposent et ce quelle que soit la proportion de virus inactivés dans le milieu. De plus, les écarts entre matériel génétique et phage infectieux sont les mêmes que ce soit en sortie de chromatographie ou dans l'échantillon déposé. Oksanen *et al.* (2012) mentionnaient déjà comme désavantage de la chromatographie le fait qu'elle ne permette pas de séparer les particules virales matures contenant de l'ADN des capsides vides, alors que cette séparation peut être obtenue avec des techniques de centrifugation zonale grâce à leurs différentes vitesses de sédimentation (phage PRD1). En revanche, l'essai pratiqué sur une mini-colonne DEAE neuve, nous a permis de voir des différences entre le matériel génétique et les phages infectieux en termes d'élution. En effet le matériel génétique semble être élué à des quantités 10 fois supérieures aux phages infectieux. Toutefois la seule expérimentation réalisée avec ce type de colonne a montré des taux de récupération très faibles de 1,78% pour le génome et 0,13% pour les phages infectieux et ces résultats doivent donc être confirmés.

L'élution du phage MS2 sur la mini-colonne DEAE s'effectue pour une concentration en NaCl supérieure à 200 mM, ceci nous montre que l'élution de ce phage dépend de la concentration en NaCl et certainement aussi de la densité de charge de la colonne qui peut diminuer au fur et à mesure de son utilisation. Ainsi, Adriaenssens *et al.* (2012b) ont observé qu'une colonne CIM DEAE neuve a la capacité de retenir  $1,2 \cdot 10^{12}$  particules infectieuses de phage LUZ19, alors qu'une colonne utilisée plusieurs fois pour des phages différents ne peut pas retenir plus de  $9,7 \cdot 10^{10}$  UFP. L'hypothèse émise par les auteurs est que certaines particules sont sûrement fixées trop fortement à la matrice de la colonne et ne peuvent pas être éluées même avec une solution à forte molarité en NaCl.

Nous obtenons pour toutes nos expériences de chromatographie une élution très étalée du bactériophage, nous empêchant de déterminer avec précision sa charge. Cette observation peut avoir plusieurs origines, notamment une forte hétérogénéité de la charge des particules virales ou la présence de phénomènes d'agrégation qui entraîneraient des perturbations de l'élution.

Lors de nos expériences en paliers de NaCl, nous obtenons des taux de récupération des phages infectieux allant de 18 à 42%. Dans la littérature, certains auteurs obtiennent des rendements de récupération des phages infectieux supérieurs à 90% (Adriaenssens *et al.*, 2012b). Il faut toutefois noter que nous avons observé une inactivation de 20% des phages MS2 pour une concentration en NaCl de 120 mM. Lorsque nous travaillons en gradient de NaCl, nous récupérons de 8 à 10 % des particules infectieuses déposées sur la colonne. Ce

faible rendement est lié au fait que nous n'avons pu analyser toutes les fractions de la chromatographie en gradient de NaCl, contrairement aux paliers qui sont tous analysés.

Le principal problème que nous avons rencontré avec les colonnes de chromatographie DEAE est l'impossibilité d'éluer la totalité des phages. Même après un passage de tampon TE à 4 M de NaCl, il reste toujours une grande quantité de phages non élués. Oksanen *et al.* (2012) obtiennent des profils d'élution similaires avec encore  $10^{11}$  UFP / mL détectées à la fin de l'élution sur colonne DEAE. Adriaenssens *et al.* (2012b) réalisent un lavage des colonnes avec de la soude 1 M qui permet d'inactiver la totalité des phages adhérents à la colonne et non élués. Dans notre étude, un lavage à la soude 0,1 M a permis de d'inactiver plus de  $10 \log_{10}$  des phages adhérents. Ce type de nettoyage nous permet d'éliminer l'infectiosité du phage MS2 mais ne permet pas de décrocher les particules virales et leur génome de la colonne. Lors d'une nouvelle utilisation de la colonne, seule l'analyse des virus infectieux sera donc possible.

Les mesures de taille en fonction du pH nous ont également apporté des informations sur les phages infectieux et non infectieux en termes de charge électrostatique. La comparaison de suspensions de phages natifs et inactivés par traitement thermique nous montre comme seule différence le fait que les particules virales inactivées à la chaleur (60°C, 8h) forment des agrégats pouvant atteindre des tailles jusqu'à 80 fois supérieures à celles obtenues pour les phages non inactivés. La population des particules inactivées semble aussi plus hétérogène et présente des agrégats de tailles très différentes. Cependant, les particules virales infectieuses comme les non infectieuses s'agrègent ici pour un pH de 2. Nos résultats diffèrent de ceux obtenus par Dika *et al.* (2013b), qui ont observé une agrégation dès  $\text{pH} \leq 4$  pour un phage purifié lui aussi par dialyse.

Nous nous sommes aussi intéressés à la balance hydrophile/hydrophobe comme propriété interfaciale permettant une discrimination entre les particules virales infectieuses et inactivées. Une comparaison de l'adhésion de phages MS2 natifs et inactivés à la chaleur sur des surfaces hydrophobes n'a pas montré de différences d'adhésion entre ces deux suspensions. Toutefois, la quantification des phages MS2 infectieux n'a pas été réalisable en raison d'une inactivation des phages MS2 en présence des lames hydrophobes.

En conclusion, nos expérimentations nous ont permis de montrer la faisabilité de la chromatographie à échange d'anions sur colonne DEAE pour purifier une solution stock de phage MS2. L'étude de la charge globale des phages MS2 et sa comparaison pour des particules infectieuses et non infectieuses par cette méthode nécessitera des optimisations. Il pourrait être intéressant d'utiliser d'autres résines comme les amines quaternaires, qui sont des échangeuses d'anions forts, pour améliorer l'élution des particules et la comparaison des différentes populations de phages constituant une suspension. De même, il serait intéressant de comparer l'efficacité de la dialyse par rapport à la chromatographie en termes de purification par d'autres méthodes que l'absorbance à 280 nm, par exemple en comparant les résultats obtenus pour ces deux purifications par SDS-PAGE. Enfin des expériences de chromatofocalisation pourraient permettre de confirmer les valeurs de  $pI$  obtenues par électrofocalisation en s'affranchissant de l'hydrodynamique des particules avec une détection des phages infectieux et non infectieux (Langlet, 2008).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ackermann H.-W. 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch. Virol.* **152**(2) :227-243.
- Adriaenssens E. M., J. Van Vaerenbergh, D. Vandenneuvel, V. Dunon, P.-J. Ceysens, M. De Proft, A. M. Kropinski, J.-P. Noben, M. Maes, R. Lavigne. 2012a. T4-related bacteriophage limestone isolates for the control of soft rot on potato caused by "Dickeya solani". *PLoS One.* **7**(3):e33227.
- Adriaenssens E. M., S. M. Lehman, K. Vandersteegen, D. Vandenneuvel, D. L. Philippe, A. Cornelissen, M. R. J. Clokie, A. J. García, M. De Proft, M. Maes, R. Lavigne. 2012b. CIM<sup>®</sup> monolithic anion-exchange chromatography as a useful alternative to CsCl gradient purification of bacteriophage particles. *Virology* . **434**(2):265-270.
- Bales R. C., S. Li, K. M. Maguire, M. T. Yahya, C. P. Gerba. 1993. MS-2 and poliovirus transport in porous media: Hydrophobic effects and chemical perturbations. *Water Resour. Res.* **29**(4):957-963.
- Bollback J. P. et J. P. Huelsenbeck. 2001. Phylogeny, genome evolution, and host specificity of single-stranded rna bacteriophage (family *Leviviridae*). *J. Mol. Evol.* **52**(2):117-128.
- Brorson K., H. Shen, S. Lute, J. S. Pérez, D. D. Frey. 2008. Characterization and purification of bacteriophages using chromatofocusing. *J. Chromatogr. A.* **1207**(1–2): 110-121.
- Ceysens P.-J., J.-P. Noben, H.-W. Ackermann, J. Verhaegen, D. De Vos, J.-P. Pirnay, M. Merabishvili, M. Vaneechoutte, A. Chibeu, G. Volckaert, R. Lavigne. 2009. Survey of *Pseudomonas aeruginosa* and its phages: de novo peptide sequencing as a novel tool to assess the diversity of worldwide collected viruses. *Environ. Microbiol.* **11**(5): 1303-13.
- Cornelissen A., P.-J. Ceysens, J. T'syen, H. Van Praet, J.-P. Noben, O. V. Shaburova, V. N. Krylov, G. Volckaert, R. Lavigne. 2011. The T7-related *Pseudomonas putida* phage  $\phi$ 15 displays virion-associated biofilm degradation properties. *PLoS ONE.* **6**(4):e18597.
- Dika C., J. F. L. Duval, H. M. Ly-Chatain, C. Merlin, C. Gantzer. 2011. Impact of internal RNA on aggregation and electrokinetics of viruses: comparison between MS2 phage and corresponding virus-like particles. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**(14):4939-48.
- Dika C. 2013. Propriétés interfaciales des virus, concept de particules molles multicouches, corrélation avec les capacités d'adhésion. Thèse Université de Lorraine, 160 pages.
- Dika C., M. H. Ly-Chatain, G. Francius, J. F. L. Duval, C. Gantzer. 2013a. Non-DLVO adhesion of F-specific RNA bacteriophages to abiotic surfaces: Importance of surface roughness, hydrophobic and electrostatic interactions. *Colloid. Surface. A.* In Press.

- Dika C., C. Gantzer, A. Perrin, J. F. L. Duval. 2013b. Impact of the virus purification protocol on aggregation and electrokinetics of MS2 phages and corresponding virus-like particles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**(15):5691-5700.
- Duval J. F. L. et H. Ohshima. 2006. Electrophoresis of diffuse soft particles. *Langmuir.* **22**(8):3533-46.
- Gassilloud B., L. Schwartzbrod, C. Gantzer. 2003. Presence of viral genomes in mineral water: A sufficient condition to assume infectious risk? *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(7):3965-69.
- Gerba C. P. 1984. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Adv. Appl. Microbiol.* **30**:133-168.
- Klovins J., G. P. Overbeek, S. H. E. Van Den Worm, H.-W. Ackermann, J. Van Duin. 2002. Nucleotide sequence of a ssRNA phage from *Acinetobacter*: kinship to coliphages. *J. Gen. Virol.* **83**(6):1523-33.
- Koopmans M. et E. Duizer. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int. J. Food Microbiol.* **90**(1):23-41.
- Langlet J. 2008. Propriétés interfaciales des bactériophages ARN-F spécifiques : Implications lors des processus d'adhésion-agrégation. Thèse Nancy Université, 166 pages.
- Langlet J., F. Gaboriaud, C. Gantzer, J. F. L. Duval. 2008a. Impact of chemical and structural anisotropy on the electrophoretic mobility of spherical soft multilayer particles: the case of bacteriophage MS2. *Biophys. J.* **94**(8):3293-3312.
- Langlet J., F. Gaboriaud, J. F. L. Duval, C. Gantzer. 2008b. Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: Implication for membrane filtration processes. *Water Res.* **42**(10-11):2769-77.
- Lindberg R. B. et R. L. Latta. 1974. Phage typing of *Pseudomonas aeruginosa*: clinical and epidemiologic considerations. *J. Infect. Dis.* **130**Suppl(0):33-42.
- Ling T. C., C. K. Loong, W. S. Tan, B. T. Tey, W. M. W. Abdullah, A. Ariff. 2004. Purification of filamentous bacteriophage M13 by expanded bed anion exchange chromatography. *J. Microbiol.* **42**(3):228-232.
- Merabishvili M., J.-P. Pirnay, G. Verbeken, N. Chanishvili, M. Tediashvili, N. Lashkhi, T. Glonti, V. Krylov, J. Mast, L. Van Parys, R. Lavigne, G. Volckaert, W. Mattheus, G. Verween, P. De Corte, T. Rose, S. Jennes, M. Zizi, D. De Vos, M. Vaneechoutte. 2009. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS ONE.* **4**(3):e4944.
- Michen B. et T. Graule. 2010. Isoelectric points of viruses. *J. Appl. Microbiol.* **109**(2):388-397.



- Monjezi R., B. T. Tey, C. C. Sieo, W. S. 2010. Purification of bacteriophage M13 by anion exchange chromatography. *J. Chromatogr. B.* **878**(21):1855-59.
- Nguyen T. H., N. Easter, L. Gutierrez, L. Huyett, E. Defnet, S. E. Mylon, J. K. Ferri, N. A. Viet. 2011. The RNA core weakly influences the interactions of the bacteriophage MS2 at key environmental interfaces. *Soft Matter.* **7**(21):10449-56.
- Ogorzaly L., A. Tissier, I. Bertrand, A. Maul, C. Gantzer. 2009. Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. *Water Res.* **43**(5):1257-64.
- Ogorzaly L., H.-M. Cauchie, C. Penny, A. Perrin, C. Gantzer, I. Bertrand. 2013. Two-day detection of infectious enteric and non-enteric adenoviruses by improved ICC-qPCR. *Appl. Microbiol. Biot.* **97**(9):4159-66.
- Oksanen H. M., A. Domanska, D. H. Bamford. 2012. Monolithic ion exchange chromatographic methods for virus purification. *Virology.* **434**(2):271-77.
- Pathria S., M. Rolando, K. Lieman, S. Hayes, S. Hardies, P. Serwer. 2012. Islands of non-essential genes, including a DNA translocation operon, in the genome of bacteriophage 0305Φ8-36. *Bacteriophage.* **2**(1):25-35.
- Pelleïeux S., I. Bertrand, S. Skali-Lami, L. Mathieu, G. Francius, C. Gantzer. 2012. Accumulation of MS2, GA, and Qβ phages on high density polyethylene (HDPE) and drinking water biofilms under flow/non-flow conditions. *Water Res.* **46**(19):6574-84.
- Schaper M., J. Jofre, M. Uys, W. O. K. Grabow. 2002. Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. *J. Appl. Microbiol.* **92**(4):657–667.
- Scott T. M., J. B. Rose, T. M. Jenkins, S. R. Farrah, J. Lukasik. 2002. Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(12):5796-5803.
- Smrekar F., M. Ciringier, M. Peterka, A. Podgornik, A. Štrancar. 2008. Purification and concentration of bacteriophage T4 using monolithic chromatographic supports. *J. Chromatogr. B.* **861**(2):177-80.
- Valegård K., L. Liljas, K. Fridborg, T. Unge. 1990. The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. *Nature.* **345**(6270):36-41.

## ANNEXE

### Milieux nécessaire à la production et au titrage des phages ARN F-spécifiques (Norme NF EN ISO 10705-1 2001)

#### 1. TYGB: Bouillon tryptone-extrait de levure-glucose

##### • Milieu de base

|                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| <b>Bacto tryptone</b>            | 10 g     |
| <b>Extrait de levure</b>         | 1 g      |
| <b>Chlorure de sodium (NaCl)</b> | 8 g      |
| <b>Eau distillée</b>             | 1 000 ml |

Dissoudre les composants dans l'eau chaude. Ajuster le pH de sorte qu'après la stérilisation il soit de  $7,2 \pm 0,1$  à  $25^{\circ}\text{C}$ . Répartir le milieu dans les fioles par volumes de 50 ml et stériliser à l'autoclave à  $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 15 min.

Stockage :  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  à l'obscurité (6 mois maximum).

##### • Solution calcium-glucose

|   |        |
|---|--------|
| <b>Chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O)</b> | 3 g    |
| <b>Glucose</b>  | 10 g   |
| <b>Eau distillée</b>  | 100 ml |

Dissoudre les composants dans l'eau tout en chauffant doucement. Refroidir à température ambiante et stériliser en filtrant sur une membrane de porosité  $0,22 \mu\text{m}$ .

Stockage :  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  à l'obscurité (6 mois maximum).

##### • Milieu complet

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| <b>Milieu de base</b>           | 50 mL  |
| <b>Solution Glucose-Calcium</b> | 0,5 mL |

Stockage :  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  à l'obscurité (6 mois maximum).

#### 2. TYGA: Gélose tryptone-extrait de levure-glucose

##### • Milieu de base

|                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| <b>Bacto tryptone</b>            | 10 g     |
| <b>Extrait de levure</b>         | 1 g      |
| <b>Chlorure de sodium (NaCl)</b> | 8 g      |
| <b>Agar</b>                      | 16 g     |
| <b>Eau distillée</b>             | 1 000 ml |

Dissoudre les composants dans l'eau. Ajuster le pH de sorte qu'après la stérilisation il soit de  $7,2 \pm 0,1$  à  $25^{\circ}\text{C}$ . Répartir le milieu dans les flacons par volumes de 500 ml et stériliser à l'autoclave à  $12 \pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 15 min.

Stockage :  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  à l'obscurité (6 mois maximum).

- **Milieu complet**

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| <b>Milieu de base</b>           | 500 mL |
| <b>Solution Glucose-Calcium</b> | 5 mL   |

Le milieu complet est coulé dans des boîtes de Pétri (20 ml par boîte pour des boîtes de 90 mm de diamètre).

Laisser se solidifier et conserver dans l'obscurité à  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 6 mois maximum s'il est bien protégé contre la dessiccation.

### **3. ssTYGA: Gélose semi-solide tryptone-extrait de levure-glucose**

Préparer un milieu de base conformément au TYGA, en utilisant seulement la moitié de la masse d'agar (8 g). Répartir dans des flacons par volumes de 50 ml et stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à  $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

Stockage :  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  à l'obscurité (6 mois maximum).

## RESUME

En cas de contamination virale de l'environnement, la détermination de l'infectiosité des particules est indispensable à l'évaluation du risque sanitaire. Ce travail vise à apporter des données sur l'intérêt des propriétés de surface (charge et balance hydrophile/hydrophobe) des particules virales pour la distinction entre virus infectieux et non infectieux. Les méthodes mises en œuvre nécessitent l'obtention de virus purifiés.

Dans un premier temps, la purification de particules virales (phage MS2) par chromatographie à échange d'ions sur colonne DEAE a été évaluée. Elle aboutit à un niveau de pureté qui semble proche de la dialyse mais nécessite une optimisation plus importante. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé la chromatographie à échange d'ions, l'étude de l'agrégation en fonction du pH et l'adhésion sur support hydrophobe pour comparer des phages MS2 infectieux et non infectieux. Parmi ces trois méthodes, la chromatographie pourrait apporter des informations sur ces deux types de particules mais nécessitera une phase importante de développement méthodologique.

**Mots clé :** virus, infectiosité, propriétés de surface

**TITLE:** MS2 bacteriophage's purification and discrimination between infectious and non-infectious phages depending on their surface properties

### **ABSTRACT:**

In case of viral contamination of environment, the determination of particles infectivity is essential for the health risk control. The aim of the present work was to provide information about viral particles surface properties (charge and hydrophobic/hydrophilic balance) to discriminate infectious and non-infectious virus. First of all, virus needed to be purified before further studies.

Initially, purification of viral particles (MS2 phage) was evaluated by ion exchange chromatography on DEAE column. It led to a level of purity that seems close to dialysis but required more optimization. Secondly, to compare MS2 phages infectious and non-infectious, we used different methods: the ion exchange chromatography, the aggregation function of pH and adhesion to hydrophobic support. Of these three methods, chromatography provides information on these two types of particles, but still requires significant methodological development phases.