

Optimisation d'une production industrielle de bactériophages en système Cellstat

Céleste Caffin¹, Lhéa Milhamont², Eva Duriez³, Agathe Hembert⁴,
Marie Deblieck⁵, Denis Watier⁶
denis.watier@univ-littoral.fr

^{1,2,3,4,5,6} IUT du Littoral Côte d'Opale, Département Génie Biologique, Université du Littoral Côte d'Opale, 62200, Boulogne-sur-Mer

⁶ BPA, Université du Littoral Côte d'Opale, Unité sous Contrat (USC) ULCO - Anses, EA 7394 – ICV Institut Charles Viollette, 62200, Boulogne-sur-Mer

Thèmes - Chimie - Biologie - Santé

Résumé - *L'objectif de cette étude était de proposer un protocole facilement transférable à l'industrie utilisant un milieu de culture commercial, peu onéreux, simple à préparer, n'induisant pas de répression catabolique et facilitant la purification des phages. Nous avons utilisé un système de production Cellstat en raison de critères de productivité volumétrique, de sécurité (limitation de la co-évolution) et de flexibilité (choix du taux de croissance). Le dimensionnement du montage utilisé permet d'extrapoler les résultats à une production industrielle. Il a été conçu dans un souci de simplicité avec des coûts maîtrisés.*

Mots-Clés - *bactériophages T7, Escherichia coli, Cellstat, phagothérapie*

1 Introduction

La multiplication des antibiorésistances implique de développer des stratégies de substitution dans la lutte contre les bactéries pathogènes telle que la phagothérapie. Celle-ci implique la production quantitative et qualitative de bactériophages. Des productions en Cellstat (production en continu) permettent de maintenir les bactéries dans un état physiologique constant et optimal pour la multiplication des phages [1]. Le système est composé de deux bioréacteurs connectés en série où le débit à travers le système est constant (figure 1). Les bactéries sont cultivées dans un état physiologique constant dans le premier réacteur R1 qui alimente le second bioréacteur R2. Les phages vont pouvoir s'y multiplier au dépend des bactéries. La dissociation de la croissance des bactéries de celle des phages minimise les risques de pression de sélection. Dans ces conditions, l'optimisation des titres de phages est directement liée à l'optimisation de la production de bactéries hôte. Le milieu de culture utilisé est également une problématique dont il faut tenir compte.

Nous proposons un protocole d'obtention d'une population qualitative et quantitative d'*Escherichia coli* stable permettant la production de bactériophages à des titres élevés et facilement transférable à l'industrie. Le milieu de culture commercial utilisé est peu onéreux, simple à préparer, il n'induit pas de répression catabolique et facilite la purification des phages. Le dimensionnement du montage utilisé permet d'extrapoler les résultats à une production industrielle. Il a été conçu dans un souci de simplicité avec des coûts maîtrisés.

2 Matériels et méthodes

La souche hôte est *Escherichia coli* ATCC 11303. Le bactériophage T7 (RPS T7) a été fourni par l'entreprise Clean Cells (Material Transfer Agreement du 16/12/20). Le milieu de culture EPT (Eau Peptonée Tamponnée 20L à pH 6,3) a été autoclavé 3h à 121°C. Les inocula sont incubés une nuit à l'étuve à 37°C et non aérés. La population bactérienne a été estimée à l'aide d'un turbidimètre HANNA HIB3614 (Équivalence 1 NTU = $1,71 \cdot 10^6$ UFC.mL⁻¹). La concentration en oxygène a été contrôlée avec une sonde optique (METTLER Toledo). Un analyseur élémentaire carbone/azote (Flash EA 1112 Thermo Fisher) permet de suivre la consommation de peptones (substrat). Le montage de culture en Cellstat est présenté sur la figure 1. Le milieu EPT a été introduit dans le premier fermenteur R1 où *E. coli* se développe (New Brunswick Bioflo 3000, volume utile 1,2 L, 37°C 650 rpm, aération 2 L.min⁻¹). Une pompe péristaltique

permet d'introduire en continu les bactéries dans le bioréacteur de production de phages R2. L'homogénéisation est assurée à l'aide d'un agitateur magnétique. La température est régulée à 37°C. Le volume est maintenu constant par un système de trop plein. Le titrage de la population phagique a été réalisé par la méthode des microgouttes.

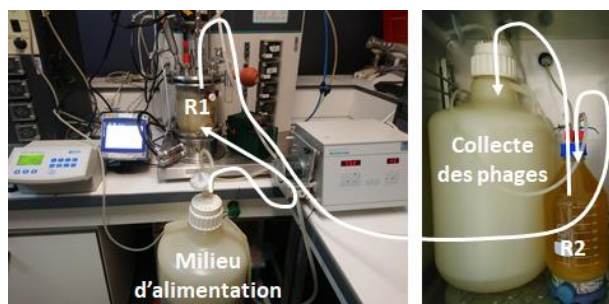


Figure 1 : Montage expérimental.

3 Résultats et discussion

Les conditions de production en Cellstat sont directement dépendantes du taux de dilution (vitesse de renouvellement du milieu dans R1) et de la concentration en substrat du milieu d'alimentation de R1. Dans ces différentes conditions expérimentales, quatre paramètres (figure 2) sont à prendre en considération dans l'optimisation de la production industrielle de phages :

- La population bactérienne. Le nombre de phages est directement proportionnel au nombre de bactéries infectées. De plus l'obtention de phages plus concentrés facilite leur purification.
- le rendement de production (Rx'''). Un rendement élevé permet de minimiser les coûts de fonctionnement et l'investissement (temps et matériel).
- le taux de croissance bactérien. La vitesse de croissance des phages augmente avec la vitesse de développement des bactéries [2].
- les peptones restantes. Les composés organiques restants en fin de production peuvent complexifier la purification des phages [3].

Le graphique a de la figure 2 représente la population bactérienne atteinte à l'équilibre en Cellstat en fonction de la concentration en substrat du milieu d'alimentation et du taux de dilution. Les résultats montrent que le taux de dilution impacte fortement la population bactérienne à l'équilibre. Un taux de dilution de 0,625 h⁻¹ associé à une concentration en EPT de 11 g.L⁻¹ donnent les populations en bactéries les plus élevées.

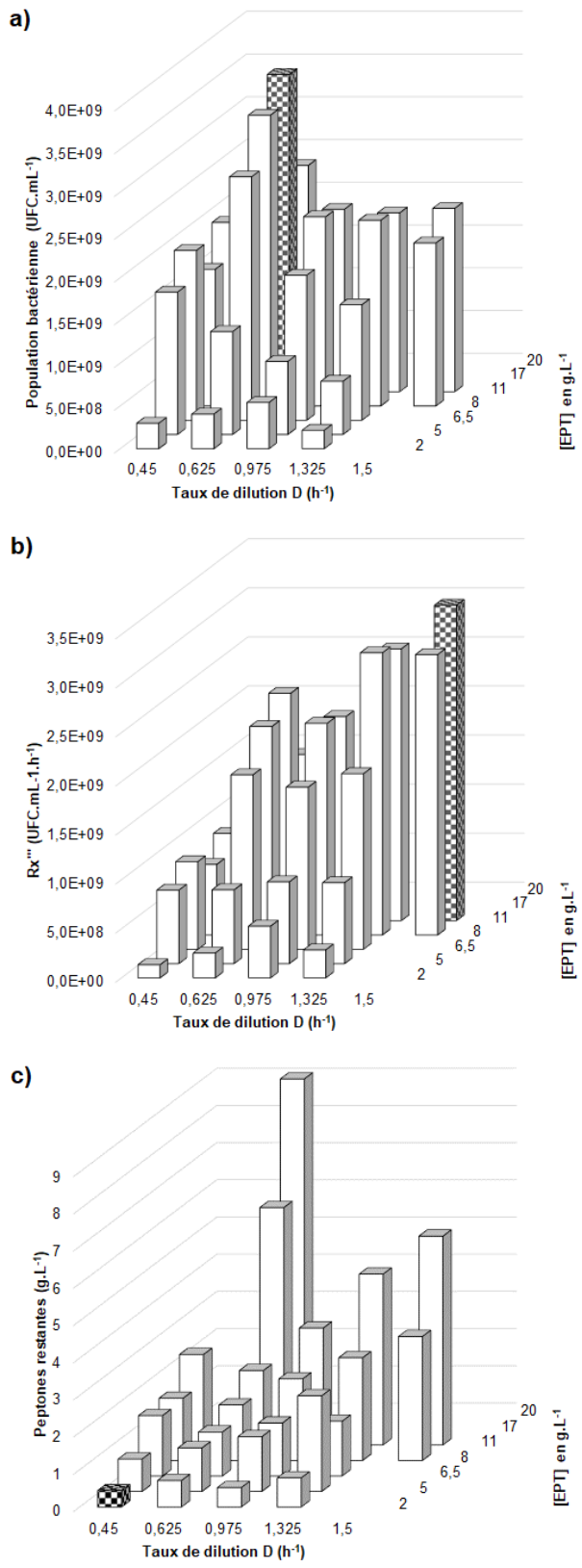


Figure 2 : Les graphiques représentent les populations d'*Escherichia coli* (a), la productivité volumique (b) et la concentration restante de peptones après croissance des bactéries (c) obtenues à l'équilibre pour une production en Cellstat en fonction de la concentration du

milieu EPT et du taux de dilution. Les histogrammes en damiers correspondent aux conditions optimales.

Pour faciliter la séparation et la purification des bactériophages, il est préférable que la suspension finale de bactériophages à purifier contienne le moins possible de molécules organiques ce qui correspond à une concentration de 2 g.L⁻¹ et un taux de dilution de 0,45 h⁻¹. Les conditions optimales divergent pour chaque paramètre et impliquent donc des compromis.

4 Conclusion

Des études antérieures ont démontré que le système Cellstat était le procédé le plus adapté à la production de bactériophages [1]. La composition et les concentrations optimales du milieu de culture restent des points encore débattus. Nos résultats montrent que dans un but de production industrielle de bactériophages, les conditions les plus adaptées pour la culture de bactéries, correspondent au milieu EPT (pH 6,3) à 8 g.L⁻¹ pour un taux de dilution de 0,625 h⁻¹. Ces conditions nous semblent être le meilleur compromis à même de répondre aux exigences de simplicité (technologie du procédé), de rendement quantitatif (économique) et qualitatif (spécificité du bactériophage et facilité de purification) demandées par l'industrie.

Bibliographie

[1] Mancuso F., Shi J. et Malik D.J., 2018. High Throughput Manufacturing of Bacteriophages Using Continuous Stirred Tank Bioreactors Connected in Series to Ensure Optimum Host Bacteria Physiology for Phage Production. *Virus*. 10, 537.

[2] Nabergoj, D., Modic, P. et Podgornik, A., 2018. Effect of bacterial growth rate on bacteriophage population growth rate. *MicrobiologyOpen*. 7

[3] Sochocka M., Tomczyk T., Sobczyński M., Szermer-Olearnik B. et Boratyński J. 2015. The kinetics of *Escherichia coli* B growth and bacteriophage T4 multiplication in SM-1 novel minimal culture medium. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 61, 75.