

TP 10 Numération des bactériophages par la technique des plages de lyse

Couple bactériophage/bactéries sensibles : T2 / *E. coli*

1. Numération d'une suspension de bactériophage : technique de la double couche

Cette technique consiste à mettre en présence les bactériophages et les bactéries sensibles (en large excès) dans de la gélose semi-molle, nommée top-agar. L'ensemble est coulé sur un milieu nutritif convenable gélose. La gélose demi-molle permet une meilleure formation des plages de lyse.

Préparation de la suspension phagique : réaliser une série de dilutions décimales de la suspension de phages fournie (diluant choisi) en fonction du titre présumé. On vise environ 50 plages de lyse par boîte.

Mise en présence des bactéries et des phages :

Dans une série de tubes à hémolyse stériles, introduire

- 100µL de dilution phagique à tester
- 100µL de culture de bactéries sensibles en phase de croissance exponentielle.

Attendre 15 à 20 min à 37°C (adsorption)

- ajouter alors très doucement 4mL de gélose demi-molle conservée en surfusion à 45°C. Homogénéiser avec précaution ; couler rapidement sur un milieu gélose LB. Ne plus toucher les boîtes.

(les boîtes coulées doivent être parfaitement sèches).

- Après refroidissement, incuber boîtes retournées à 37°C pendant 24h

Compte rendu

1. Expliquer l'origine d'une plage de lyse
2. Comment peut-on qualifier le phage testé ?
3. Présenter les manipulations effectuées et les résultats obtenus.

Déterminer le titre de la suspension phagique.

2. Préparation d'une suspension de bactériophages par amplification et évaluation du titre en bactériophages par la technique des micro-gouttes.

Cette manipulation a pour but de préparer un stock de bactériophages exempt de bactéries et d'en estimer le titre.

Amplification du bactériophage

- Introduire dans un erlen d'une culture de la bactérie sensible (préincubée à 37°C, en phase de croissance exponentielle) une petite quantité de bactériophage (environ 1 phage pour 10 000 bactéries).
- Laisser à 37°C pendant environ 2h, attendre 15 minutes avant de remettre l'agitation pour que l'adsorption se fasse.. Cette préparation sera effectuée pour l'ensemble de la classe.
- Par binôme, filtrer un échantillon de quelques mL à l'aide d'une seringue équipée d'un filtre 0,22µm. Récupérer le filtrat dans un tube à hémolyse stérile.

Évaluation du titre en bactériophages par la technique des micro-gouttes

La souche sensible est ensemencée en nappe sur un milieu gélose. Les dilutions de la suspension phagique sont déposées sous petit volume (5 à 10µL) sur le milieu gélose. Après incubation, on observe de très petites plages de lyse car les bactériophages diffusent mal à la surface d'un milieu « dur ». Le dénombrement (grossier) est possible seulement si les plages de lyse ne sont pas confluentes.

Travailler individuellement

- Vérifier la stérilité du filtrat par un isolement sur milieu gélose.

- Réaliser un tapis bactérien de la souche sensible en étalant 0,1mL de préculture par la technique du râteau ou des billes de verre.
- Laisser sécher 15 min.
- Déposer 10 μ L à la pipette automatique de chaque dilution du phage (dilutions décimales en bouillon nutritif LB) à la surface du milieu. On peut tester jusqu'à 8 (voir 10) dilutions par boîte.
- Attendre que la goutte pénètre bien dans la gélose. Incuber 24h à 37°C (le comptage portera si possible sur des gouttes contenant 10 à 20 plages de lyse).
- Conserver deux aliquots de la suspension phagique en tube eppendorfs stériles de 1mL et en présence d'un cryoprotecteur : le glycérol. Indiquer le nom et le titre estimé du phage. Congeler à -80°C.

Compte rendu

1. *Déterminer la quantité de phages à introduire dans l'erlen de culture si on veut avoir environ 1 phage pour 10 000 bactéries*
2. *Justifier le protocole d'amplification des phages.*
3. *Résultats du dénombrement ; estimation du titre de la solution stock de phages récupérée.*

Composition des milieux

Gélose LB : Luria Bertani

tryptone 10g ; extrait de levure 5g ; NaCl 10g ; agar