

## 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 $\mu$ 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