

## **Cycle lytique du bactériophage T2 chez *E. coli* : obtention d'un lysat phagique et numération de bactériophages par obtention d'unités formant plaque de lyse (UFP)**

### **1. Préparation d'un lysat phagique**

#### **1.1 Matériel, réactifs, souches**

- Souche *E. Coli* sensible au phage T2, fournie en bouillon LB
- Suspension de phages T2 vers  $10^{10}$  UFP/mL
- Erlen de 25 mL de milieu LB stérile
- Flacon de 30 mL de NaCl 9g/L stérile
- 10 mL de milieu LB stérile
- tube pour centrifugation 4000 g et centrifugeuse, Filtre 0,45  $\mu$ m stérile + seringue
- Microcuvettes pour photométrie
- Bain à agitation à 37°C, incubateur à 37°C, Matériel usuel du laboratoire de microbiologie

#### **1.2 Infection d'une suspension de *E. Coli* en culture et production d'un lysat phagique**

- Mesurer la biomasse de la culture de *E. coli* sensible fournie par son atténuation (Optical Density, OD) à 620 nm (limite de linéarité 0,6)
- Isoler la souche sur milieu gélosé LB
- Inoculer 25 mL de milieu en Erlenmeyer avec x mL de suspension de souche *E. coli* sensible de façon à obtenir une absorbance de biomasse à 620 nm voisine de 0,1 (soit environ  $2 \cdot 10^8$  bactéries/mL).
- Cultiver sous agitation à 37°C. Suivre l'absorbance à 620 nm toutes les 20 minutes environ.
- Quand l'absorbance atteint 0,25 (soit environ  $5 \cdot 10^8$  bactéries/mL, soit environ  $10^{10}$  bactéries dans le milieu total), inoculer avec 40  $\mu$ L de suspension phagique (soit environ  $4 \cdot 10^8$  phages). 3 minutes sans agitation.
- Cultiver 1 heure et demi à 2 heures sous agitation à 37°C. Mesurer l'absorbance à 620 nm toutes les 20 minutes environ.
- Centrifuger quelques mL de cette "culture" 5 minutes vers 4 000 g.
- Filtrer sur filtre 0,45  $\mu$ m
- Recueillir le filtrat en tube à hémolyse stérile et conditionner pour un stockage long au congélateur -80 °C.

### **Compte-rendu**

Remettre les résultats expérimentaux. Remettre la préparation phagique conditionnée. Calculer la MOI au départ (multiplicité d'infection ; avec le matériel utilisé 1 d'atténuation correspond à  $2 \cdot 10^9$  bactéries par mL). Commenter les valeurs d'atténuation. Quel est l'intérêt de la centrifugation et de la filtration ? Compléter le tableau annexe permettant de calculer a priori quel titre on attend pour le lysat phagique récupéré. On supposera qu'une bactérie infectée donne naissance à 70 phages, que la durée d'un cycle phagique est de 40 minutes environ, que le temps de génération de *E. coli* dans les conditions proposées est normalement de 40 minutes (et que de toute manière le milieu LB ne permet guère d'aller au delà de  $4 \cdot 10^9$  bactéries par mL avant la phase de plateau de biomasse (milieu épuisé)).

## Document annexe

Temps post infection phagique	Nbre bact. Non infectées	Nbre phages libres	Nbre bact. infectées	Nbre bact. Lysées lors du cycle	MOI
0	$NB_0 = OD_{infection} * 2 \cdot 10^9 * \text{volume}$ =	$NP_0 = 0,04 * 10^{10}$ = $4 \cdot 10^8$	0	0	
0 + « adsorption »		0	$4 \cdot 10^8$	0	-
40 min, fin de premier cycle, lyse		$= 70 * 4 \cdot 10^8$ $= 280 \cdot 10^8$	-	$4 \cdot 10^8$	
40 min + « adsorption »				-	-
80 min, fin de 2° cycle, lyse			-		
					-
					-

Volume de culture = mL

Conclusion :

[phages attendus] à 90 min après infection =

par mL