Cycle lytique du bactériophage T2 chez *E. coli* : obtention d'un lysat phagique et numération de bactériophages par obtention d'unités formant plage 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 à environ 10^{10} UFP/mL
- Erlen de 20 mL de milieu LB stérile
- Flacon de 30 mL de NaCl 9g/L stérile
- 1 boite de Pétri de milieu nutritif gélosé LB
- 10 mL de milieu LB stérile
- tube pour centrifugation 4000 g et centrifugeuse, Filtre 0,45 µm stérile + seringue
- Microcuves 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 absorbance à 620 nm (limite de linéarité 0,6)
- Isoler la souche sur milieu gélosé LB
- Inoculer 20 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 2.10^8 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 10^8 bactéries/mL, soit environ 10^{10} bactéries dans le milieu total), inoculer avec 40 µL de suspension phagique (soit environ 4 10^8 phages). 3 minutes sans agitation.
- Cultiver 1 heure et demi 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 µm
- 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). Commenter les valeurs d'absorbance. Quel est l'intérêt de la centrifugation et de la filtration ? Quel titre attend-on pour le lysat phagique récupéré en supposant 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 toutes manières le milieu LB ne permet guère d'aller au delà de 2 10^9 bactéries par mL avant la phase de plateau de biomasse (milieu épuisé)).

2. Dénombrement d'unités formant plages de lyse (UFP) : ordre de grandeur du titre d'un lysat phagique, méthode dite des microgouttes (ou spots)

2.1. Principe

La souche sensible est ensemencée en nappe sur un milieu nutritif gélosé convenable. Des dilutions de la suspension de bactériophages à étudier sont déposées sous petit volume (classiquement 5 à 10 µL) sur le milieu nutritif ensemencé.

On incube. Chaque bactériophage donne potentiellement une plage de lyse.

Par diffusion, les phages rencontrent leurs cibles. Les phages se multiplient uniquement dans les bactéries en croissance. Une bactérie infectée va libérer les virions au sein du tapis bactérien en pleine croissance ce qui va conduire à l'infection – grâce à la diffusion - puis à la lyse des bactéries avoisinantes en phase de croissance, et ce au rythme du cycle du phage . L'arrêt de l'infection se fait naturellement lorsque les bactéries ne se multiplient plus. Le diamètre d'une plage de lyse ayant pour origine l'infection d'une seule bactérie par un phage dépend de l'efficacité d'infection, de multiplication, de lyse et de diffusion du bactériophage. Si le nombre des bactériophages mis au contact des bactéries est trop élevé, le phénomène d'éclaircissement est généralisé à tout le tapis bactérien, la lyse est à confluence des plages. Les plages de lyse sont petites car les bactériophages diffusent mal à la surface d'un milieu gélosé « dur » classique. En fonction de sa concentration, chaque dépôt donne un tâche claire de plages de lyse à confluence ou une tâche trouble parsemée de petites plages de lyse. Le dénombrement grossier est ainsi possible.

2.2. Mode opératoire de l'expérimentation proposée

2.2.1 Matériel et réactifs à disposition

Lysat phagique et préculture de la nuit de la souche cible (E. coli T2 sensible) sur milieu (LB) ; bouillon nutritif LB et milieu nutritif LB agarosé à 12 g/L, en surfusion.

2.2.2. Mise en place des infections phagiques

- Couler le milieu de culture en boite de Pétri ; « sécher ». Réaliser « un tapis » de la souche à infecter en inondant avec 3 mL de préculture, 4 minutes de sédimentation, retrait de l'inoculum (on peut aussi réaliser le tapis par la technique à l'écouvillon à condition de bien maîtriser la technique). Laisser sécher $\frac{1}{4}$ d'heure à l'étuve ou mieux, sous PSM (la surface du milieu est alors mate).
- Réaliser une gamme convenable de dilutions de raison 1/10 de la suspension de bactériophages à tester en milieu nutritif liquide.
- Déposer 10 µL de chacune des dilutions à tester de la suspension phagique à la surface de la boite. Laisser quelques minutes à température ambiante pour l'absorption des dépôts. On peut déposer 6 à 7 spots sur une boite.
- Incuber. Ne retourner la boite que lorsque chaque spot a bien pénétré.

Technique plus performante avec tapis inoculum en « top gar »

On peut réaliser de façon simple et très efficace le « tapis » de la souche à infecter par inoculation de 100 µL de préculture de souche cible à 3 mL de « Top agar LB »en surfusion à 45°C, homogénéisation et coulage à la surface d'une boite de Pétri de milieu LB agarosé.
« Top agar LB » = LB agarosé vers 6 à 10 g/L (le diamètre des plages diminue avec le taux d'agar et on n'a pas intérêt à des plages de diamètre trop élevé avec cette technique).

Compte-rendu :

- Résultats obtenus pour la manipulation réalisée.

3 Dénombrement d'unités formant plages de lyse. Initiation à la technique standard de dénombrement de plages de lyse

3.1 Principe

Une suspension de la souche à infecter et une suspension du bactériophage à dénombrer (lysat phagique stérile, débarrassé de toute bactérie) sont mises en contact (mélange) pendant la durée nécessaire à l'adsorption (et seulement l'adsorption) des phages sur les bactéries réceptrices. Le rapport [nombre de bactéries/ nombre de virions] est >>> 1 (multiplicity of infection = MOI <<<1). Le mélange est alors additionné d'un milieu de culture à faible teneur en agar et en surfusion (la concentration finale en agar est voisine de 6 g/L, on parle de gélose demi-molle).
On recouvre une boîte de milieu de culture agarosé avec ce mélange en surfusion (« top agar »). On incube.
Les conditions sont telles que s'il n'y avait pas d'infection phagique on obtiendrait, après croissance, un tapis bactérien.

Statistiquement, chaque bactériophage s'est adsorbé à une bactérie et une seule et conduit à l'apparition d'une plage claire dite plage de lyse au niveau de la culture.

Les phages se multiplient uniquement dans les bactéries en croissance. Une bactérie infectée va libérer les virions au sein du tapis bactérien en pleine croissance ce qui va conduire à l'infection puis à la lyse des bactéries avoisinantes en phase de croissance au rythme du cycle du phage – grâce à la diffusion en gélose molle. L'arrêt de l'infection se fait naturellement lorsque les bactéries sont en phase stationnaire.

Le diamètre d'une plage de lyse ayant pour origine l'infection d'une seule bactérie par un phage dépend de l'efficacité d'infection, de multiplication, de lyse et de diffusion du bactériophage. Si le nombre des bactériophages mis au contact des bactéries est trop élevé, le phénomène d'éclaircissement est généralisé à tout le tapis bactérien, la lyse est confluante.

3.2 Mode opératoire pour titrer une suspensionde phages T2

3.2.1 Matériel, réactifs, souches

- Souche E. Coli sensible au phage T2, fournie en bouillon LB. Culture de la nuit.
- Lysat de phages T2 (lysat phagique réalisé au §1 et dont l'ordre de grandeur du titre est prévu, cf calculs du $1)
- Flacon de 30 mL de NaCl 9g/L stérile (diluant convenable)
- 6 boites de Pétri de milieu nutritif gélosé LB
- Tubes à essai stériles
- milieu LB à 6g/L en gélose (top LB agar), en surfusion à 46°C

3.2.2. mise en place des infections phagiques

➔ Réaliser des dilutions convenables en série géométrique de raison 1/10 de la suspension de phages à titrer. Travailler, par exemple, selon un plan du type :

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Suspension phagique	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
NaCl 9g/L	450 µL	450 µL	450 µL	450 µL	450 µL	450 µL	450 µL	450 µL	450 µL	450 µL
Dilution réalisée	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Titre attendu UFP/mL										
UFP attendues sur une boite (100 µL de suspension phagique sont finalement étalés)										

➔ **Tester 3 ou 4 dilutions successives convenablement choisies**. Dans une série de 3 ou 4 tubes stériles préchauffés à 37°C, mélanger 100 µL de dilution de chacune des suspensions phagiques à tester et 100 µL de culture de E. coli. Transférer immédiatement 4 minutes à 37°C (séjour à l'étuve) pour laisser les bactériophages s'adsorber aux bactéries (pas plus de 4 min pour qu'aucune descendance phagique n'ait le temps d'apparaître). Revenir à la paillasse rapidement et ajouter alors très doucement 3 mL de milieu gélosé « gélose demi-molle » en surfusion (top agar). Homogénéiser très doucement et, avant refroidissement, verser et répartir à la surface d'une boîte de Pétri contenant du milieu nutritif agarosé (étape délicate, faut couler le top agar en surfusion avant gélification…). Incuber boites retournées. Il est intéressant de travailler avec des boites de milieu préchauffées quelques minutes à 37°C, cela facilite la bonne répartition du top agar en surface avant gélification.

On observe soit des plages de lyse à confluence plus ou moins importante, soit des plages de lyse distinctes qui permettent alors un dénombrement, soit aucune plage de lyse et juste le trouble de la nappe de culture.

Compte-rendu

Compte-rendu technique. Résultats obtenus pour la manipulation réalisée. Titre du lysat phagique.

Bibliographie

Sambrook, Fritsch, Maniatis ; Molecular cloning (1989) ; chapitre 4.19 et suivants.
J. Vieira et J. Messing in Methods in Enzymology, Academic Press : (1987) 153, 3 et suivantes.
Génie fermentaire, travaux pratiques ; F. Deneuville ; Doin ; 1991.