

Licence Sciences, Technologies, Santé mention Biologie, Parcours Génétique, Biochimie, Physiologie Animale et Physiologie Végétale

Parcours Bloc 2 semestre 6

Travaux pratiques UE 6.2b2

Le but de ces travaux pratiques est d'étudier le cycle de multiplication du phage T2. Il s'agira pour cela de titrer une suspension de phages que vous aurez à votre disposition par la technique des plages de lyse, d'amplifier cette suspension et d'étudier le cycle de ce phage. La souche bactérienne E. coli B est sensible au phage T2 et sera utilisée pour les infections et pour le dénombrement.

1ère séance

I-Titration du stock de phage par la méthode des plages de lyse.

La titration de phage permet de calculer la concentration de phages dans une culture donnée. Le principe consiste à inoculer des cultures de bactéries permissives par un volume donné de dilutions croissantes de préparation de phages. Un milieu nutritif gélifié est ensuite mélangé aux bactéries infectées et coulé sur une gélose nutritive. Ainsi, l'infection ne se propagera pas à distance mais uniquement de cellule à cellule à partir de la cellule primitivement infectée par chaque virus. Il apparaît ainsi des plages de lyse observables macroscopiquement. Le nombre d'unité formant des plages (UFP) est alors déterminé pour chaque dilution de virus. Le titre est exprimé en UFP/mL.

Préparatifs :

- Distribuer 900 µl de tampon de dilution MgSO₄ 10 mM dans 4 tubes eppendorfs soigneusement annotés de 10⁻¹ à 10⁻⁴.
- Préparer 3 tubes à hémolyse contenant 900 µl de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance (DO= 0.1); ceci correspond au tapis bactérien.
- Etiqueter 3 boîtes de Pétri contenant de la gélose ordinaire avec « titre T2 : 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ »

Dilution et étalement :

- Prélever 100µl de la solution stock de phage et les déposer dans le premier tube de tampon de dilution MgSO₄ 10 mM noté 10⁻¹. Faire les dilutions au dixième en cascade en prélevant 100µl du premier tube jusqu'au suivant (il est nécessaire de bien homogénéiser délicatement le tout par aspiration-refoulement avant de faire la dilution suivante).
- Prélever 100 µl des dilutions 10⁻² 10⁻³ 10⁻⁴ et les déposer dans les tubes à hémolyse contenant le tapis bactérien.
- Ajouter la totalité de chaque dilution phages-bactéries dans un tube à essai contenant de la gélose en surfusion (maintenue à 50°C) et verser le tout très rapidement dans une

boîte de Pétri annotée contenant de la gélose ordinaire. Laisser sécher et mettre à incuber 24h à 37°C.

II. Numération des bactéries avant infection.

- Distribuer 900 µl de milieu TS dans 7 tubes eppendorfs.
- A partir du tube à hémolyse contenant les bactéries, prélever 100µl de bactéries et les déposer dans le premier tube eppendorfs.
- Réaliser une cascade de dilution jusqu' 10^{-8} .
- Etaler 0,1ml des dilutions 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}

Ne pas traîner car les bactéries fraîchement diluées recommencent rapidement à se multiplier.

But : calculer la MOI dans l'expérience de l'amplification du phage.

III : Amplification du phage.

L'amplification du phage se fait dans des conditions où les bactéries sont en phase exponentielle de croissance.

Ajouter 50ml de CaCl₂ puis 50ml de la solution stock de phage à 5ml de bactéries en phase exponentielles de croissance et mettre immédiatement sous agitation à 37°C pendant 24h.

Deuxième séance :

I- Analyse des résultats et calcul du titre de la suspension de phage stock.

- Chaque plaque de lyse correspond à l'infection primaire par un seul phage qui s'est multiplié. Compter les plages de lyse sur les différentes boîtes. Les plages de lyse doivent être bien distinctes.
- Faire la moyenne entre les deux boîtes pour chaque dilution de phages testée. Apprécier la concordance des résultats en fonction du facteur de dilution utilisé.
- Le titre d'une suspension virale s'exprime UFP /ml: unité formant des plages par millilitre.

II- Calculer la MOI

II; Titration du lysat phagique

Préparatifs :

- Les préparatifs sont les mêmes que pour la séance 1. Les dilutions iront jusqu'à 10^{-7} .
- Récupérer votre lysat phagique. Centrifuger 5mn à 3500rpm Transférer stérilement votre lysat dans un tube eppendorf .

Dilution et étalement : Suivre le protocole de la séance 1. Etaler les dilutions 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}

II- Etude du cycle de multiplication du phage T2.

III-

Ajouter 100µl de phage T2 titré la veille à 10 ml de bactéries en phase exponentielle de croissance et mettre sous agitation à 37°C. Ceci correspond au temps 0 de l'expérience. Effectuer les prélèvements et étalements aux temps indiqués dans le tableau ci-dessous : Attention ces étalements peuvent être ajuster en fonction de la titration de la veille

Temps en mn	ND	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
15									
30									
40									
55									
65									
75									
85									
105									
120									

Troisième séance :

Analyse des résultats et compte-rendu.

ANNEXE

Solutions utilisées

Bleu de Coomassie	0,25 g de Coomassie Brilliant Blue R-250 A dissoudre dans 45 ml EtOH 100 % 45 ml H ₂ O 10 ml d'acide acétique glacial
Solution de décoloration	10 % acide acétique glacial 45 % EtOH 45 % H ₂ O
Tampon de charge des protéines (2X)	0,125 M TrisHCl pH 6,8 4 % SDS 20 % glycérol 10 % Bmercaptoethanol 0,01% Bleu de Bromophénol
Tris-HCl pH 8,8 4X	1,5 M Tris pH 8,8 avec HCl
Tris-HCl pH 6,8 4X	0,5 M Tris pH 6,8 avec HCl
Tampon d'électrophorèse de protéines (5X)	15,1 g Tris 72 g Glycine 5 g SDS pour 1 litre volume final