****

**Chapitre 7 : Amplification des phages**

Vous avez terminé le processus d'isolement des phages lorsque vous avez préparé et titré un lysat. Si vous avez prélevé votre lysat initial à partir d'une seule plaque avec une haute densité de plages de lyse lors de votre dernier cycle de purification, vous n'avez probablement que cinq millilitres de lysat, ce qui n'est pas un volume suffisant pour l'extraction d'ADN, faire la microscopie électronique à transmission (TEM), et l'archivage du phage. Par conséquent, vous devez générer plus de lysat pour augmenter votre stock de phages. En effet, vous devrez collecter 8 à 10 ml de lysats avec un titre de 5 x 109 UFP / ml ou plus. Cela peut être accompli en préparant des plaques supplémentaires qui ont une très haute densité de plages de lyse, avec des plages de lyse presque confluentes (Figure 7.0-1), et en inondant ces plaques pour récolter les lysats. Un lysat préparé à partir de plaques confluentes a souvent un titre élevé et est appelé lysat à titre élevé (« high-titer lysate [HTL] » en anglais). Les « HTL » sont le point de départ de nombreuses expériences de base en biologie des phages et servent à l’entreposage à long terme.

|  |
| --- |
| [https://dzf8vqv24eqhg.cloudfront.net/userfiles/11001/13941/ckfinder/images/Figure%207_0_1%20Webbed%20plate%20copy.jpg](https://dzf8vqv24eqhg.cloudfront.net/userfiles/11001/13941/ckfinder/images/Figure%207_0_1%20Webbed%20plate%20copy.jpg?width=529&height=529) |
| Figure 7.0-1. Plaques avec plages de lyse confluentes. |

L'astuce pour faire des plaques confluentes qui donneront un lysat avec un titre de 5 x 109 ou plus consiste à obtenir le bon nombre de phages sur la plaque. Si trop peu de phages sont ajoutés à la gélose molle avant l'incubation, la plaque sera légèrement recouverte de plages de lyse et donnera trop peu de phages lorsqu'elle sera inondée et le lysat récolté. De même, si trop de phages sont ajoutés à la gélose molle avant l'incubation, ils tueront toutes les bactéries dès le début de l’infection et le rendement en phages résultant sera faible. Par conséquent, vous devez utiliser le nombre de phages qui permettront des cycles maximum d'infection et de lyse avant d’épuiser les bactéries hôtes. Cela peut être accompli en déterminant le nombre de plages de lyse formées par votre phage qui se traduira par une plaque confluente, comme décrit ci-dessous.

La taille des plages de lyse varie d'un phage à l'autre (Figure 7.0-2), tout comme le nombre de plages de lyse nécessaires pour former une plaque confluente. Plus la taille de la plage de lyse est petite, plus vous aurez besoin de plages de lyse pour obtenir une plaque confluente. Plus la taille de la plage de lyse est grande, moins vous en aurez besoin pour faire une plaque confluente.

|  |
| --- |
| [https://dzf8vqv24eqhg.cloudfront.net/userfiles/11001/13941/ckfinder/images/Figure%207_0_2%20sm_md_lg%20plaques.jpg](https://dzf8vqv24eqhg.cloudfront.net/userfiles/11001/13941/ckfinder/images/Figure%207_0_2%20sm_md_lg%20plaques.jpg?width=1600&height=532) |
| Figure 7.0-2. Exemples de petites (A), moyennes (B) et grandes (C) plages de lyse. |

Vous pouvez calculer le nombre de plages de lyse nécessaires pour préparer une plaque confluente en fonction des données dont vous disposez déjà. Une façon de le faire est de se référer aux plaques obtenues par test de plages de lyse lors de vos rondes de purification. Il est très probable que l'une de vos dilutions ait donné une plaque confluente. Vous pouvez facilement calculer le nombre de plages de lyse qui étaient sur cette plaque confluente car dans cette même expérience, vous avez effectué des dilutions en série et obtenu des plaques qui ont donné un nombre mesurable de plages de lyse. (Un exemple de la façon d'effectuer ce calcul est fourni plus loin dans le protocole 7.1, **Préparation de plaques confluentes à partir de lysats de titre connu**.) Si vos tests de plages de lyse précédents n'ont jamais généré une plaque qui ressemble à une plaque confluente, vous pouvez toujours utiliser les informations des plaques qui ont donné une densité élevée de plages de lyse pour estimer le nombre de plages de lyse nécessaires pour générer une plaque confluente. Par exemple, doubler le nombre de plages de lyse sur une plaque pourrait créer une plaque confluente. Alternativement, vous pouvez calculer le nombre de plages de lyse nécessaires pour recouvrir une plaque en fonction du diamètre et de la surface de la plaque.

Une fois que vous savez combien de plages de lyse sont nécessaires pour obtenir une plaque confluente, vous savez combien de particules de phages utiliser dans un test de plages de lyse pour générer une plaque confluente. N'oubliez pas que chaque plage de lyse d'une plaque provient d'une seule particule de phage. En utilisant le titre de votre lysat, calculez le volume de votre lysat qui contiendra la quantité souhaitée de particules de phage.

|  |
| --- |
|  |
| Figure 7.0-3. Organigramme des expériences pour l’amplification des phages. |