****

**Protocole 11.1 : Créer et tester des lysogènes : Striation à partir d’un phage à titre élevé**

**Objectif :** Créer un lysogène avec votre phage

**But** **:** Les phages isolés dans le programme SEA-PHAGES sont tous capables de former des plages de lyse, ce qui signifie qu'ils peuvent accomplir le cycle lytique. Cependant, certains phages qui peuvent former des plages de lyse sont des phages tempérés ; c'est-à-dire qu'après avoir infecté une bactérie hôte, ce type de phage peut réprimer les fonctions lytiques de ses gènes, avec pour résultat que son génome se maintient de manière stable dans la cellule hôte tout au long de multiples cycles de division cellulaire. La bactérie hôte qui contient une copie stable d'un génome de phage est appelée lysogène.

Les lysogènes sont isolés en les séparant du phage infectieux exogène. Une fois isolés, les lysogènes peuvent être utilisés comme tapis bactériens hôtes pour tester, à l'aide d'un test de sensibilité, la capacité d'autres phages à infecter ce nouveau lysogène.

**Matériel requis** **:**

* Culture bactérienne hôte (250 μl)
* Plaque de gélose
* Gélose molle
* Tampon de phage
* Microtubes

**Protocole** **:**

Jour 1

1. Préparez votre paillasse pour travailler dans des conditions aseptiques et réunissez le matériel requis.
2. Effectuez une titration par dépôt de gouttes de votre lysat.
3. Diluez en série votre lysat jusqu’à la dilution 10-8 selon le protocole de **Dilutions en série** (6.2).
4. Faites une titration par dépôt de gouttes selon le protocole **Titration par dépôt de gouttes** (6.4).

Jour 2

1. Vérifiez les plaques chaque jour pour la présence de lysogènes (« mesa »).
2. Une « mesa » est une prolifération de cellules bactériennes dans la zone clarifiée causée par l’infection des phages et la lyse bactérienne. Elle ressemblera à une zone trouble dans l'une des gouttes. Une « mesa » est provoquée par la croissance de cellules bactériennes en présence de phages et est donc une excellente source de lysogènes.
3. Une « mesa » n'apparaîtra probablement pas le premier jour. Une vraie « mesa » est généralement aussi bien développée que le tapis bactérien dans une zone non infectée, au jour deux ou trois (Figure 11.1-1).

|  |
| --- |
| https://dzf8vqv24eqhg.cloudfront.net/userfiles/11001/13941/ckfinder/images/11_01(1).jpg |
| Figure 11.1-1. Cette image représente quatre phages utilisés à différentes dilutions en série (100 –> 10-4). Une « mesa » est reconnaissable pour les phages A, B et C. Cependant, le phage D peut également avoir produit des lysogènes. Continuez avec le protocole, qu'il y ait ou non une croissance bactérienne visible sur les gouttes. Notez que le phage A a des « mesas » à la dilution 10-3 au moins, tandis que les phages B et C ont des « mesas » visibles pour les dilutions 10-2. Attention : ne pas inoculer plusieurs phages différents pour l'isolement de lysogènes sur une seule plaque comme illustré sur la photo, afin d’éviter de sélectionner des double-lysogènes !  |

1. Striez les cellules provenant de la « mesa » sur une nouvelle plaque de gélose.
2. Identifiez le dessous d'une plaque de gélose.
3. À l'aide d'un bâton stérile, d'un embout de micropipette ou d'une boucle d’inoculation stérile, touchez la « mesa » qui pousse dans la goutte.
4. Si vous utilisez une boucle métallique, stérilisez-la en la chauffant dans une flamme jusqu'à ce qu'elle devienne rouge, puis en la laissant refroidir avant de toucher les bactéries.
5. Touchez le bâton, l’embout ou la boucle sur la gélose et faites des striations avec des mouvements de gauche à droite, sur le tiers supérieur de la gélose. Jetez le bâton ou l’embout, ou stérilisez de nouveau la boucle en la passant sous la flamme.
6. L’objectif de cette étape est de disperser les bactéries le plus possible.
7. Avec un nouveau bâton ou embout (ou une boucle stérile), passez une fois dans la première striation et refaites des mouvements de gauche à droite dans un tiers adjacent de la gélose, en veillant à ne pas repasser dans les striations faites précédemment.
8. Cette deuxième étape de striation vous permet de disperser une fraction seulement des bactéries de la première étape de striation, afin de les diluer.
9. Répétez l'étape 4 pour créer une troisième étape de striation sur le tiers restant de la plaque.
10. Cette troisième étape dilue encore davantage l'échantillon de bactéries. Espérons que vous aurez des cellules bactériennes individuelles dans cette troisième étape de striation, qui se développeront en colonies isolées.
11. Incubez à la température appropriée pendant 2 à 4 jours.

Jour 3

1. Testez et confirmez les lysogènes potentiels.
2. Choisissez 6 à 10 colonies pour tester la lysogénie. Tous ne seront pas des lysogènes. Testez la lysogénie via le **Test et Vérification de lysogènes potentiels :** **Repiquage de culture (« Patch Assay »)** (11.2) et **Test et Vérification de lysogènes potentiels : Libération de phages en milieu liquide** (11.3), ou amplifiez par PCR les sites de fixation présents dans le lysogène.

**Conseils utiles :**

* Lors de la préparation d'un lysogène, vous devrez peut-être effectuer trois cycles de purification par striation pour éliminer le phage exogène de votre culture bactérienne provenant de la « mesa ». Chaque cycle nécessite environ 4 jours d'incubation.
* N'oubliez pas que vous allez strier les cellules bactériennes, pas les phages, comme cela est discuté dans le protocole de purification. Rien n’apparaitra sur une plaque striée de phages uniquement, peu importe la durée d'incubation.
* Ne jamais utiliser plus d’un phage sur une plaque de gélose pour obtenir des « mesas ». Vous courez le risque de créer des lysogènes doubles si les gouttes de dépôts de phages sont côte à côte.
* Essayez de repiquer des bactéries dans le milieu de la colonie. Faites de votre mieux pour éviter de toucher la surface de la gélose autour de votre colonie pour éviter de capter des phages exogènes supplémentaires.