****

**Protocole 11.2 :** **Test et vérification de lysogènes potentiels :** **Repiquage de culture (« patch assay »)**

**Objectif :** Identifier les lysogènes en repiquant les lysogènes putatifs sur une couche de cellules hôtes (« patch assay ») et en incubant pour observer la clarification du tapis bactérien causée par la lyse.

**But :** Toutes les cultures de lysogènes libèrent des phages dans l'environnement lorsque les cellules individuelles entrent spontanément dans le cycle lytique. Ainsi, il est possible de différencier les vrais lysogènes des cellules bactériennes insensibles en testant la présence de phages dans les cellules. Cette méthode teste la libération de phages en déposant des lysogènes putatifs sur une plaque ensemencée par l'hôte, en les incubant jusqu'à ce que la croissance cellulaire soit visible et en observant les signes de lyse cellulaire.

**Matériel requis** **:**

* Plaques avec des colonies bactériennes qui sont des lysogènes potentiels
* Plaques de gélose
* Gélose molle
* Culture bactérienne hôte (250 µl)
* Bâtons stériles ou boucles de fil pour les striations bactériennes

**Protocole** **:**

Jour 1

1. Préparez votre paillasse pour un travailler dans des conditions aseptiques et réunissez le matériel requis.
2. Préparez deux plaques pour cette procédure.
3. Dessinez des grilles identiques sous deux plaques de gélose et numérotez les carrés de 1 à 10 (ou quel que soit le nombre de colonies de lysogènes putatifs que vous testez).
4. Identifiez les deux plaques. Une plaque est votre plaque expérimentale sur laquelle vous observerez la lyse autour des lysogènes sur un tapis de cellules hôtes après incubation ; l'autre plaque contiendra uniquement les lysogènes, qui y seront repiqués (« patch »).
5. La plaque expérimentale vous permettra de déterminer la présence de vrais lysogènes, alors que la plaque contenant uniquement les lysogènes putatifs vous servira à les repiquer pour de futures expériences.
6. Préparez une culture de 250 µl de bactéries hôtes.
7. Pour cette partie de l'expérience, vous aurez besoin de 3 ml de gélose molle. Votre enseignant peut vous la fournir ou vous devrez peut-être le préparer selon le protocole trouvé dans la boîte à outils.
8. À l'aide d'une pipette stérile de 5 ml, transférez 3 ml de gélose molle dans un tube de culture contenant des bactéries hôtes, puis aspirez immédiatement la solution dans la même pipette.
9. Distribuez le mélange gélose-bactéries UNIQUEMENT sur la plaque expérimentale.
10. Inclinez doucement, mais rapidement la plaque dans plusieurs directions jusqu'à ce que le mélange de gélose molle recouvre uniformément la plaque.
11. Ne préparez pas de tapis bactérien sur la plaque contenant uniquement les lysogènes.
12. Laissez la gélose molle solidifier et sécher complètement. Cela devrait prendre environ 15 minutes.
13. Faites vos repiquages.
14. Choisissez une colonie dans la plaque de striations de lysogènes, obtenue suite au protocole **Créer et tester des lysogènes : Striation à partir d’un phage à titre élevé** (11.1), en touchant légèrement une boucle ou un cure-dent stérile au centre d'une colonie isolée.
15. Si vous utilisez une boucle métallique, stérilisez-la en la chauffant à la flamme jusqu'à ce qu'elle devienne rouge, puis en la laissant refroidir avant de ramasser les bactéries.
16. Striez une petite quantité de cellules lysogènes candidates sur les deux plaques en faisant glisser doucement la boucle ou le bâton à travers la surface de la plaque *lysogène-uniquement* en premier, suivie par la *plaque expérimentale* (la plaque avec le tapis bactérien préalablement préparée), comme le montre la Figure 11.2-1.
17. Ne creusez pas la gélose. La surface de la plaque lysogène est beaucoup plus ferme que celle de la plaque expérimentale qui contient le tapis bactérien hôte.
18. Vous pouvez obtenir de meilleurs résultats sur le tapis bactérien en touchant légèrement la gélose supérieure avec la boucle ou le bâton dans une série de 6 à 8 « petits coups » adjacents au lieu de la faire glisser à travers la gélose supérieure.

|  |
| --- |
| C:\Users\vtrembl2\Desktop\Traduction Phages\Images icones\repiquage.png |
| Figure 11.2-1. Plaques de repiquage pour tester les lysogènes putatifs. La plaque de lysogènes uniquement est une plaque de gélose ordinaire sans tapis bactérien hôte et contient les repiquages de cinq colonies de lysogènes putatifs. La plaque expérimentale a les mêmes colonies bactériennes déposées sur un tapis bactérien hôte de type sauvage. Les patchs A, B et E sont positives en tant que lysogènes en raison des zones clarifiées causées par la libération des phages. Les patchs C et D ne montrent pas de clarification causée par la libération de phages, mais seulement des zones sans les bactéries du tapis bactérien, bactéries qui ont été enlevées lors du dépôt des lysogènes putatifs. |

Important: Utilisez la même boucle ou un même bâton pour les deux plaques, sans utiliser une nouvelle, pour que la même colonie se développe sur les deux plaques.

Jour 2

1. Identifiez les lysogènes.
2. Recherchez les zones de clarification dans le tapis, causées par la lyse cellulaire autour des repiquages sur la plaque expérimentale (Figure 11.2-1). Ce sont des lysogènes candidats.
3. Striez chaque candidat lysogène positif de la plaque de *lysogène uniquement* sur une plaque de gélose pour obtenir des colonies bien isolées.
4. Identifiez le dessous d'une plaque de gélose.
5. Indiquez s'il s'agit de votre premier, deuxième ou troisième cycle de purification de lysogène.
6. À l'aide d'un bâton stérile, d'un embout de micropipette ou d'une boucle stérile, touchez le centre de la colonie de lysogène que vous purifiez à partir de la plaque de *lysogène uniquement*.
7. Si vous utilisez une boucle métallique, stérilisez-la en la chauffant à la flamme jusqu'à ce qu'elle devienne rouge, puis laissez-la refroidir avant de ramasser les bactéries.
8. Striez avec le bâton ou la boucle la surface de la gélose en faisant des mouvements de gauche à droite sur le tiers supérieur de la gélose. Jetez le bâton ou stérilisez de nouveau la boucle.
9. L'objectif de cette étape est de diffuser le plus possible les bactéries.
10. Avec un nouveau bâton (ou une boucle stérile), touchez une fois la première série de striations et faites des mouvements de gauche à droite dans un tiers adjacent de la gélose, en veillant à ne pas toucher à nouveau les premières striations.
11. Cette deuxième étape vous permet de disperser une fraction seulement des bactéries de la première striation, les diluant ainsi.
12. Répétez l'étape 4 pour créer une troisième série de striations sur le tiers restant de la plaque.
13. Cette troisième étape dilue davantage l'échantillon de bactéries. Espérons que vous aurez des cellules bactériennes individuelles suite à cette troisième striation, qui se développeront en colonies isolées.
14. Incubez à la température appropriée pendant 2 à 4 jours (jusqu'à ce que des colonies bien isolées soient visibles).
15. Répétez le processus de prélèvement et striation des colonies isolées à partir des plaques de striation trois fois consécutives afin d’obtenir un lysogène pur.
16. Effectuez à nouveau le test de repiquage avec vos nouveaux candidats lysogènes (provenant de colonies bien isolées de vos troisièmes cycles de purification) pour confirmer qu'il s'agit bien de lysogènes.
17. Contrairement à la première fois que vous avez effectué le test de repiquage, ces cellules n'auront aucun phage exogène (comme celles provenant des « mesas » initiales).
18. Vous êtes prêt à inoculer une culture liquide pour les tests de **Libération de phages en milieux liquides** (11.3) et **Test de sensibilité** (11.4).
19. Un ou plusieurs aliquotes de tous les lysogènes confirmés doivent être congelés pour une utilisation future.

**Conseils utiles** **:**

* Il est très important que les lysogènes potentiels soient séparés et purifiés des phages exogènes qui peuvent avoir adhérés aux cellules lors de la création initiale de la « mésa ». Sinon, vous ne pourrez jamais différencier un lysogène libérant un nouveau phage par induction spontanée, et une lignée cellulaire résistante aux mutants qui était recouverte d’une grande quantité du phage initial sur sa membrane cellulaire.
* Assurez-vous que la gélose molle soit complètement solidifiée avant de faire vos repiquages.