

**Protocole 5.3 : Test du dénombrement des plages de lyse**

**Objectif** **:** Détecter la présence de phages sur les tapis bactériens

**But :** Le test dénombrement des plages de lyse vous permet de confirmer visuellement la présence de particules de phage dans un échantillon. Il s'agit d'un test polyvalent qui peut être utilisé pour l'isolement, la purification et le titrage des phages. Dans le test de plages de lyse, les bactéries hôtes sont mélangées avec un échantillon de phages et cultivées en un tapis bactérien sur gélose. Si des phages sont présents, ils infecteront et se répliqueront au sein de l'hôte bactérien, tuant l'hôte dans le processus. Les phages nouvellement répliqués diffusent dans la gélose et répètent le processus d'infection, de réplication et de lyse des bactéries hôtes voisines. En conséquence, une zone circulaire claire (clarifiée) appelée plage de lyse deviendra apparente sur le tapis bactérien. Notez que chaque plage de lyse provient d'une seule particule de phage dans l'échantillon de phage d'origine.

**Matériel requis :**

* Échantillons de phages pour l'isolement, la purification ou le titrage
* Bactérie hôte (250 μl / plaque)
* Plaques de gélose (agar)
* Tampon de phage
* Gélose molle (top agar)
* Microtubes
* Pipettes sérologiques de 5 ml
* Phage de contrôle positif (facultatif)

**Protocole :**

Jour 1

1. Préparez votre paillasse pour travailler dans des conditions aseptiques et réunissez le matériel requis.
2. Réunissez les échantillons que vous souhaitez analyser.

Important : Vos échantillons de phages peuvent provenir d’un isolement direct, d’un isolement enrichi filtré ou repiqué d’une plage de lyse. Il est probable que vos échantillons proviennent de dilutions en série.

1. Inoculez les bactéries hôtes avec vos échantillons de phage.
2. Préparez le même nombre d'aliquotes de 250 µl de cultures bactériennes hôtes que vous avez d’échantillons de phages, plus un pour un contrôle positif et un pour un contrôle négatif.
	1. Identifiez les tubes de culture en conséquence.
3. Utilisez une micropipette et une technique aseptique pour distribuer chaque échantillon de phages dans le tube de culture approprié contenant 250 μl de bactéries hôtes conformément au Tableau 5.3-1.
4. Mélangez en tapotant délicatement sur les tubes.

Important : assurez-vous que votre échantillon entre en contact avec les bactéries. Lorsque vous pipetez un volume aussi petit que 10 μl, parfois l’échantillon peut rester collé à la paroi du tube.

1. Laissez votre échantillon reposer pendant 5 à 10 minutes pour permettre la fixation.

|  |
| --- |
| **Tableau 5.3-1. Volumes d'échantillon de phages ajoutés aux cultures bactériennes pour un test de lyse.** |
| **Type d’échantillon** | **Volume de l’échantillon** |
| Échantillon de l’isolement direct | 500 μl |
| Culture enrichie | 10 μl |
| Dilutions en série des plages de lyse repiquées | 10 μl |
| Lysats à titrer | 10 μl |
| Contrôle négatif | 10 ul de tampon de phage |
| Contrôle positif | 10 ul d’un échantillon de phages fourni |

1. Inoculez les échantillons avec la couche de gélose molle (top agar). Pour ce faire, vous aurez besoin de 3 ml de la gélose molle par échantillon. Votre enseignant peut vous le fournir ou vous devrez peut-être le faire selon le protocole trouvé dans la boîte à outils.
	1. Préparez le même nombre de plaques de gélose que vous avez d'échantillons. (N'oubliez pas vos échantillons de contrôle positifs et négatifs.) Identifiez les plaques en conséquence.
	2. Retirez une bouteille de gélose molle du bain à 55°C.

Important: Vous devez conserver la gélose molle dans le bain à 55°C aussi longtemps que possible pour éviter qu'elle ne se solidifie prématurément sur votre paillasse.

* 1. Pour chaque échantillon, incluant les contrôles.
		1. À l'aide d'une pipette stérile de 5 ml, transférez aseptiquement 3 ml de gélose molle dans un tube hôte inoculé (c'est-à-dire le tube contenant l'hôte bactérien et l'échantillon de phages).

Important : Essayez d'éviter de faire ou de retirer des bulles, car elles peuvent ressembler à des plages de lyse sur les plaques.

* + 1. Aspirez immédiatement le mélange dans la pipette et transférez-le sur la plaque appropriée. Jetez la pipette.

Important : la gélose molle ne doit pas rester dans la pipette pour plus que quelques secondes car la gélose commencera à se solidifier.

* + 1. Inclinez doucement, mais rapidement la plaque dans plusieurs directions jusqu'à ce que le mélange de gélose molle recouvre uniformément la plaque de gélose.
1. Répétez ce processus pour chacun de vos échantillons.
2. Incubez les plaques pour permettre la croissance bactérienne et l'infection des phages.
	1. Laissez les plaques reposer pendant environ 20 minutes jusqu'à ce que la gélose molle se soit solidifiée.
	2. Une fois la gélose molle solidifiée, inversez doucement les plaques et placez-les dans l'incubateur approprié.
	3. Incubez les plaques à la température requise pendant 24 à 48 heures.
	4. Notez le temps d'incubation et la température dans votre cahier de laboratoire.

Jour 2

1. Vérifiez les plaques pour la présence de plages de lyse.
2. Retirez les plaques de l'incubateur et placez-les devant une source de lumière pour rechercher les plages de lyse. (Il est plus facile de les voir si vous retirez le couvercle.)
	1. Si vous ne voyez pas de plages de lyse, remettez les plaques dans l'incubateur pour poursuivre l'incubation et vérifiez à nouveau après un jour.
3. Notez vos résultats dans votre cahier de laboratoire.
	1. Soyez précis. Que voyez-vous sur vos plaques? Comptez le nombre de plages de lyse et notez la taille, la forme et les autres caractéristiques distinctives des plages. N'oubliez pas que les résultats négatifs sont également importants.

Important : La morphologie d'une plage de lyse est une caractéristique importante. Noter simplement « petit » ou « rond » n'est pas suffisant. Essayez d'être précis dans vos descriptions des plages de lyse. Une bonne description inclura la taille, la turbidité, le type de contour, etc.

**Conseils utiles :**

• Lorsque vous pipetez la gélose molle sur la plaque, évitez d'introduire des bulles car elles ressembleront à des plages de lyse plus tard.

• Il est important que la gélose molle ne soit ni trop chaude (elle tuerait les bactéries et les phages) ni trop froide (elle durcirait trop rapidement).

• Un problème courant consiste à inverser la plaque avant que la gélose molle ne soit suffisamment solidifiée, ce qui fait que la gélose molle et les bactéries glissent dans le couvercle ! La rapidité avec laquelle la gélose molle se solidifie dépend de nombreux facteurs, y compris la température ambiante et l'humidité. Vous pouvez vérifier la gélose molle en tapotant doucement le côté de la plaque et en vérifiant si elle bouge. De plus, lorsque vous manipulez les plaques, regardez ce qui se passe lorsque vous les incliner.

• Lorsque vous observez des plaques après incubation, il se peut qu’il n’y ait qu’une seule plage de lyse et qu’elle soit aussi petite qu'une pointe d’épingle.

• Si vos plaques présentent une condensation excessive dans le couvercle, faites attention aux gouttes lors de la visualisation de vos plaques.