

**Protocole 5.4 : Repiquage d’une plage de lyse**

**Objectif :** Prélever des particules de phage à partir d'une plage de lyse et créer un échantillon liquide

**But** **:** Une plage de lyse est une zone clarifiée sur un tapis bactérien qui se forme lorsqu'une seule particule de phage infecte les bactéries, se reproduit et les lyse. En conséquence, une plage de lyse est remplie de millions de particules de phage identiques. Pour récupérer le phage d'une plage de lyse, cette plage est « prélevée » (ou repiquée) et les particules de phage de la plage sont mises en suspension dans du tampon de phage. Vous pouvez ensuite utiliser l'échantillon liquide de phages pour plusieurs expériences, y compris pour réaliser la technique de dépôt de la goutte ou la purification de la plage de lyse.

**Matériel requis** **:**

* Plaques de gélose avec plages de lyse à l’étude
* Tampon de phage
* Microtubes

**Protocole :**

1. Préparez votre paillasse pour travailler dans des conditions aseptiques et rassemblez le matériel requis.
2. Identifiez les plages de lyse.
3. À l'aide d'un marqueur, entourez, sous la boîte de Pétri, les plages de lyse que vous souhaitez repiquer. Si vous choisissez plusieurs plages de lyse, identifiez chaque plage de lyse avec une lettre ou un chiffre unique, ou avec un autre identifiant.
   1. Il est possible que vous choisissiez des plages provenant de plusieurs boîtes de Petri différentes. Assurez-vous d'identifier les plages de lyse d'une manière qui vous permettra de les retracer, et notez bien les détails dans votre cahier de laboratoire.
4. Notez la morphologie détaillée de chacune des plages de lyse (par exemple, taille, trouble ou clair, type de contour) que vous avez encerclées.
5. Identifiez et préparez les microtubes.
6. Préparez autant de tubes que le nombre de plages de lyse que vous avez l'intention de repiquer.
7. Identifiez chaque tube en fonction de l'identifiant que vous avez utilisé pour chaque plage de lyse.
8. En conditions aseptiques, répartissez 100 µl de tampon de phage dans chaque microtube.
9. Repiquez une plage de lyse.
10. Placez un embout stérile sur une micropipette P200.
11. En tenant la micropipette perpendiculairement à la surface de la gélose, piquez doucement la gélose molle au milieu de la plage de lyse (Figure 5.4-1).
    1. Évitez de toucher les bactéries entourant la plage de lyse.
12. Placez l'extrémité de l’embout dans le tampon de phage du microtube correspondant. Ensuite, tapotez l'embout sur la paroi du microtube et effectuez deux ou trois pipetages pour déloger les particules de phage. Jetez l'embout.
13. Bien mélanger au vortex.
14. Répétez les étapes 1 à 4 pour chaque plage de lyse que vous choisissez.
15. Selon les indications de votre enseignant, votre prochaine étape consistera à exécuter le protocole de **Dilutions en série** (6.2) ou la **Technique de dépôt de gouttes** (5.6).

|  |
| --- |
| C:\Users\vtrembl2\Desktop\Traduction Phages\Images icones\tapis bactérien.png |
| Figure 5.4-1. Repiquer une plage de lyse d’une plaque d'agar. |

**Conseils utiles** **:**

* Pendant l'incubation de la plaque de gélose, les particules phagiques sont situées principalement dans la plage de lyse visible, qui cesse de s'agrandir une fois que les cellules bactériennes ont cessé de croître. Mais une fois que les cellules ont cessé de croître, les particules de phages peuvent continuer à diffuser dans les zones environnantes. Par conséquent, il est utile de choisir des plages de lyse raisonnablement fraîches. Rappelez-vous également que plus les plages de lyse sont éloignées les unes des autres, plus elles sont susceptibles d'être exemptes de phages contaminants des plages voisines.
* Lorsque vous purifiez un phage, choisissez une plaque d’agar contenant un petit nombre (2 à 30) de plages de lyse. Plus une plage de lyse est éloignée des plages adjacentes, meilleures sont vos chances d’isoler un seul type de phage.
* Ces échantillons doivent être utilisés immédiatement car la concentration de particules infectieuses diminue rapidement dans le tampon de phage.