****

**Protocole 8.1a : Montage d'échantillons de phages pour MET et coloration par l'acétate d'uranyle**

**Objectif** **:** Préparer votre échantillon de phages pour les observer avec un microscope électronique à transmission

**But** **:** Les particules de phages individuelles sont trop petites pour être vues avec des microscopes optiques, ce qui nécessite l'utilisation de la microscopie électronique à transmission (MET). Pour observer vos phages à l'aide de la MET, un échantillon de votre lysat doit d'abord être concentré et purgé des débris de protéines et de membranes bactériennes. Cela est accompli en sédimentant votre phage dans une microcentrifugeuse et en remettant en suspension le culot de phages dans un tampon de phage frais.

L'échantillon concentré est ensuite placé sur une grille de microscopie électronique. Une fois sur la grille, les sels et les débris bactériens restants sont rincés et l'échantillon est coloré à l'acétate d'uranyle. Lorsque la grille colorée est placée dans le microscope électronique, le faisceau d'électrons pénètre dans les particules de phages, mais pas dans la couche d’acétate d’uranyle entourant votre phage, rendant le phage visible sur le fond sombre (par contraste).

Important : vous utiliserez de l'acétate d'uranyle (AU) comme solution de coloration. L'AU est une substance dangereuse nécessitant des précautions spéciales pour travailler en toute sécurité. Veuillez suivre les instructions de votre enseignant pour la manipulation et l'élimination des matériaux exposés à l’AU.

**Matériel requis** **:**

* Lysat à titre élevé
* Tampon de phage
* Pince pour ME
* Grilles en cuivre recouvertes de carbone et de formvar avec mailles de 200 à 400
* Morceaux de papier filtre Whatman pour assécher
* Eau stérile et filtrée
* 1% d'acétate d'uranyle (filtré immédiatement avant utilisation)

**Protocole** **:**

1. Préparez vos échantillons de phages.
2. Transférez aseptiquement 100 μl de votre lysat à titre élevé dans un microtube stérile. La concentration idéale de votre échantillon remis en suspension est de 1010 UFP / ml. Vous devez donc titrer votre lysat puis choisir un volume, une durée de centrifugation et un volume de remise en suspension appropriés conformément au Tableau 8.1a-1.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Tableau 8.1a-1. Temps de centrifugation pour sédimenter les échantillons de phages dans une microcentrifugeuse. | | | |
| Concentration initiale (UFP / ml) | Volume initial | Temps | Volume de remise en suspension final |
| 1010 | 100 μl | 22 min | 100 μl |
| 5 x 109 | 100 μl | 22 min | 50 μl |
| 1 x 109 | 500 μl | 30 min | 50 μl |
| 5 x 108 | 500 μl | 30 min | 10 μl |
| 1 x 108 | 1000 μl | 40 min | 10 μl |

1. Équilibrez le(s) tube(s) et centrifugez selon le Tableau 8.1a-1 à 4°C à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse pour sédimenter les particules de phages au fond du tube.
2. À l'aide d'une micropipette, retirez le plus possible de surnageant sans perturber le culot. Vous devez retirer la majorité du surnageant, en laissant le moins de liquide possible sans déloger le culot. (Si vous ne voyez pas le culot, ne vous inquiétez pas, il est toujours là ! Vous avez juste un échantillon vraiment pur).
3. Remettez en suspension le culot dans le volume approprié de tampon de phage (Tableau 8.1a-1) et mélangez doucement à l'aide de l’embout de la micropipette. Notez qu'un pipetage vigoureux peut endommager les particules de phage.
4. Continuez avec le reste du protocole immédiatement pour éviter d'endommager les têtes de phage.
5. Préparez votre espace de travail. (Cela peut avoir été fait avant le cours par votre enseignant.)
6. Mettez une nouvelle paire de gants.
7. Couvrez la zone de travail désignée avec du papier de protection pour paillasse (papier absorbant) ou un grand Kimwipe pour créer une surface de travail propre.
8. À l'aide d'une pince pour ME, retirez une nouvelle grille d'une boîte de grilles inutilisées, en touchant uniquement le bord de la grille. Si vous n'utilisez pas de pince inversée, faites glisser le protecteur en silicone des pinces vers le bas pour que la pince reste fermée autour de la grille lorsque vous lâchez la pince.
9. Placez la pince sur le papier de sorte que le côté sombre et brillant de la grille soit orienté vers le HAUT.
10. Montage et coloration de votre phage.
11. À l'aide d'une micropipette, déposez 5 μl de lysat sur la grille, sans la toucher avec l’embout de la micropipette.
12. Laissez le lysat reposer sur la grille pendant au moins 2 à 10 minutes, mais ne laissez pas l'échantillon s'évaporer complètement ! Pendant ce temps, le phage se déposera et s'adsorbera sur la grille.
13. Rincez la grille une fois en utilisant la méthode suivante :
14. À l'aide de la pince, relevez la grille pour lui donner un angle de 45°.
15. Pipetez soigneusement 60 μl d'eau stérile sur le dessus de la face sombre et brillante de la grille, de façon à ce que la goutte glisse sur l’échantillon, et laissez égoutter l’excès dans une boîte de Pétri. Répétez avec environ six grosses gouttes.
16. Replacez la grille horizontalement de sorte que le côté sombre et brillant soit à nouveau orienté vers le haut. Si nécessaire, absorbez tout excès d'eau en touchant délicatement un rebord de la grille avec un morceau de papier filtre.

Important : travaillez rapidement et soigneusement ! Ne laissez PAS la grille sécher, sinon les capsides des phages pourraient s'endommager.

1. Ajoutez 5 µl d'acétate d'uranyle 1% sur la grille.

Important : L'acétate d'uranyle est un composé très toxique. Vous devez porter des gants tout au long de cette procédure et à chaque endroit où cette solution a été utilisée.

1. Commencez immédiatement à éliminer l'excès de la solution de coloration en utilisant un coin de papier filtre. La coloration à l’uranyle d’acétate se produit en laissant une très fine couche séchée sur toute la grille. Vous devez continuer à éliminer la solution jusqu'à ce que la surface de la grille ressemble à une nappe d'huile présentant les couleurs de l’arc-en-ciel. Laissez ensuite la grille sécher à l'air avant de la remettre en sécurité dans la boîte.
2. Observez votre phage.
3. Placez votre grille dans la boîte de grille désignée pour leur entreposage. Assurez-vous de noter avec précision l'emplacement de votre grille dans la boîte.
4. Transportez vos échantillons à votre centre de microscopie électronique pour l'imagerie.

1. Calculez le diamètre de la capside et la longueur de la queue par rapport à la barre de taille.
2. À l'aide d'une règle, mesurez le point le plus large (bord à bord, pas sommet à sommet) de la capside et la longueur de la queue (à l'exclusion de la capside et de toutes les fibres de queue visibles). Si possible, mesurez plusieurs têtes et queues de phage et faites la moyenne de leurs valeurs respectives.
3. Mesurez la longueur de la barre de taille avec la règle.
4. En utilisant les longueurs connues et relatives de la barre de taille, calculez la longueur de la capside et de la queue.

Exemple : Le phage dans la micrographie électronique ci-dessous a un diamètre de capside moyen de 1.6 cm (16 mm) et une longueur de queue de 4.8 cm (48 mm). La barre de taille de 100 nm mesure 2.4 cm de long.

|  |
| --- |
| https://dzf8vqv24eqhg.cloudfront.net/userfiles/11001/13941/ckfinder/images/Gumbie_EMPic.png |

Pour trouver la taille réelle de la queue, définissez le rapport entre la barre de taille et la taille réelle et résolvez pour la taille inconnue :

(barre de taille à l'échelle) / (barre de taille mesurée) = (taille inconnue) / (taille mesurée)

(100 nm) / (24 mm) = (taille de queue inconnue) / 48 mm

taille de queue inconnue = (100 nm) (48 nm) / (24 mm)

taille de queue inconnue = 200 nm

1. Comparez vos longueurs de capside et de queue avec celles de vos camarades de classe.
2. Enregistrez vos résultats dans Phagesdb selon le protocole 7.2 : **Entrée d’un phage dans la base de données « Actinobactériophages »**.

**Conseils utiles** **:**

* Les pinces à microscopie électronique sont très délicates. Ne les déposez jamais sans avoir d'abord replacé sa gaine protectrice.
* Il est extrêmement important que les grilles ne sèchent pas, en particulier entre le dernier lavage à l'eau et l'ajout de la solution de coloration. Les protéines de la capside se déstabilisent dans l'eau (car il n'y a pas de sels disponibles) et la capside s'effondrera ou éclatera si la grille se dessèche avant d'ajouter la solution de coloration. La coloration agit comme un fixateur et aidera à stabiliser les capsides lorsqu'elles sèchent.
* Les capsides colorées positivement (les têtes des phages semblent noires parce que la coloration a pénétré dans la capside) ne doivent pas être utilisées pour décrire la taille ou la morphologie du phage. Une coloration positive et un effondrement de la capside peuvent être causés par le séchage de la grille.
* Si un précipité blanc est visible sur les grilles après séchage, une nouvelle grille doit être préparée. Les précipités sont des restes de sels du lysat qui n'ont pas été complètement rincés et peuvent endommager la MET.
* Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque des lysats FRAIS sont utilisés pour les expériences de coloration pour la ME.