**Table of Contents**

**1- Bienvenue dans le programme SEA PHAGES 1**

**2- Règles de base en laboratoire 2**

Sécurité en laboratoire 2

Consigner les résultats 4

Prévenir la contamination 8

Protocole 2.1: Exercise sur les techniques aseptiques 16

**3- Principes de base des phages 22**

**4- Principes de base des hôtes 37**

*Arthrobacter globiformis* 42

*Arthrobacter* sp. 45

*Gordonia rubripertincta* 48

*Gordonia terrae* 51

*Microbacterium foliorum* 54

*Microbacterium testaceum* 57

*Mycobacterium smegmatis* 60

**5- Isolement direct 63**

Protocole 5.1 : Collecte d’échantillons environnementaux 67

Protocole 5.2 : Isolement direct 70

Protocole 5.3 : Test du dénombrement des plages de lyse 73

Protocole 5.4 : Repiquage d’une plage de lyse 78

Protocole 5.5 : Isolement après enrichissement 81

Protocole 5.6 : Technique du depot de gouttes 86

**6- Repiquer une plage de lyse 90**

Protocole 6.1 : Test de plages de lyse pour la purification 95

Protocole 6.2 : Dilutions en série 98

Protocole 6.3 : Collecter des lysats de phages à la surface d’une

boîte de Pétri 102

Protocole 6.4 : Titration par depot de gouttes 106

Protocole 6.5 : Titration entière sur boîte de Pétri 111

**7- Amplification des phages 115**

Protocole 7.1 : Préparation de plaques confluentes à partir d’un

lysat de titre connu 119

Protocole 7.2 : Entrée d’un phage dans la base de données

« Actinobactériophages » 124

Protocole 7.3 : Archivage de votre échantillon de phage 129

**8- Visualisation des particules phagiques par microscopie électronique**

**à transmission 133**

Protocole 8.1a : Montage d’échantillons de phages pour MET et

coloration par l’acétate d’uranyle 137

Protocole 8.1b : Montage d’échantillons de phages pour MET et

coloration par l’acétate d’uranyle (protocole Classique

utilisant un adhésif Pelco) 143

**9- Extraire l’ADN de phage 149**

Protocole 9.1 : Extraction d’ADN de phage 152

**10- Caractériser un génome de phage par l’utilisation d’enzymes de**

**restriction 157**

Protocole 10.1 : Préparer des digestions par enzymes de restriction 161

Protocole 10.2 : Préparation d’un gel d’agarose 165

Protocole 10.3 : Électrophorèse sur gel de digestions par enzymes de

restriction 169

Protocole 10.4 : Analyse des gels de digestion par enzymes de

restriction 173

**11- Explorer davantage 178**

Protocole 11.1 : Créer et tester des lysogènes : Striation à partir

d’un phage à titre élevé 182

Protocole 11.2 : Test et verification de lysogènes potentiels :

Repiquage de culture (« patch assay ») 187

Protocole 11.3 : Test et verification de lysogènes potentiels :

Libération de phages en milieu liquide 192

Protocole 11.4 : Test de sensibilité 195

Protocole 11.5 : Test de la gamme d’hôtes 200

**12- Boîte à outils 204**

Protocole 12.1 : Préparer la couche supérieure de gélose molle

(Middlebrook 1X Top Agar pour *M*. *smegmatis*) 205

Protocole 12.2 : Striation de phages sur plaque de gélose 207

Protocole 12.3 : Prendre des photos de plaques de gélose 212

**Aperçu: Introduction à la bioinformatique 215**