

Cycle lytique du bactériophage T2 chez *E. coli* : obtention d'un lysat phagique et numération de bactériophages par obtention d'unités formant plaque de lyse (UFP)

1. Préparation d'un lysat phagique

1.1 Matériel, réactifs, souches

- Souche *E. Coli* sensible au phage T2, fournie en bouillon LB
- Suspension de phages T2 vers 10^{10} UFP/mL
- Erlen de 25 mL de milieu LB stérile
- Flacon de 30 mL de NaCl 9g/L stérile
- 10 mL de milieu LB stérile
- tube pour centrifugation 4000 g et centrifugeuse, Filtre 0,45 μ m stérile + seringue
- Microcuvettes pour photométrie
- Bain à agitation à 37°C, incubateur à 37°C, Matériel usuel du laboratoire de microbiologie

1.2 Infection d'une suspension de *E. Coli* en culture et production d'un lysat phagique

- Mesurer la biomasse de la culture de *E. coli* sensible fournie par son atténuation (Optical Density, OD) à 620 nm (limite de linéarité 0,6)
- Isoler la souche sur milieu gélosé LB
- Inoculer 25 mL de milieu en Erlenmeyer avec x mL de suspension de souche *E. coli* sensible de façon à obtenir une absorbance de biomasse à 620 nm voisine de 0,1 (soit environ $2 \cdot 10^8$ bactéries/mL).
- Cultiver sous agitation à 37°C. Suivre l'absorbance à 620 nm toutes les 20 minutes environ.
- Quand l'absorbance atteint 0,25 (soit environ $5 \cdot 10^8$ bactéries/mL, soit environ 10^{10} bactéries dans le milieu total), inoculer avec 40 μ L de suspension phagique (soit environ $4 \cdot 10^8$ phages). 3 minutes sans agitation.
- Cultiver 1 heure et demi à 2 heures sous agitation à 37°C. Mesurer l'absorbance à 620 nm toutes les 20 minutes environ.
- Centrifuger quelques mL de cette "culture" 5 minutes vers 4 000 g.
- Filtrer sur filtre 0,45 μ m
- Recueillir le filtrat en tube à hémolyse stérile et conditionner pour un stockage long au congélateur -80 °C.

Compte-rendu

Remettre les résultats expérimentaux. Remettre la préparation phagique conditionnée. Calculer la MOI au départ (multiplicité d'infection ; avec le matériel utilisé 1 d'atténuation correspond à $2 \cdot 10^9$ bactéries par mL). Commenter les valeurs d'atténuation. Quel est l'intérêt de la centrifugation et de la filtration ? Compléter le tableau annexe permettant de calculer a priori quel titre on attend pour le lysat phagique récupéré. On supposera qu'une bactérie infectée donne naissance à 70 phages, que la durée d'un cycle phagique est de 40 minutes environ, que le temps de génération de *E. coli* dans les conditions proposées est normalement de 40 minutes (et que de toute manière le milieu LB ne permet guère d'aller au delà de $4 \cdot 10^9$ bactéries par mL avant la phase de plateau de biomasse (milieu épuisé)).

Document annexe

Temps post infection phagique	Nbre bact. Non infectées	Nbre phages libres	Nbre bact. infectées	Nbre bact. Lysées lors du cycle	MOI
0	$NB_0 = OD_{infection} * 2 \cdot 10^9 * \text{volume}$ =	$NP_0 = 0,04 * 10^{10}$ = $4 \cdot 10^8$	0	0	
0 + « adsorption »		0	$4 \cdot 10^8$	0	-
40 min, fin de premier cycle, lyse		$= 70 * 4 \cdot 10^8$ $= 280 \cdot 10^8$	-	$4 \cdot 10^8$	
40 min + « adsorption »				-	-
80 min, fin de 2° cycle, lyse			-		
					-
					-

Volume de culture = mL

Conclusion :

[phages attendus] à 90 min après infection =

par mL