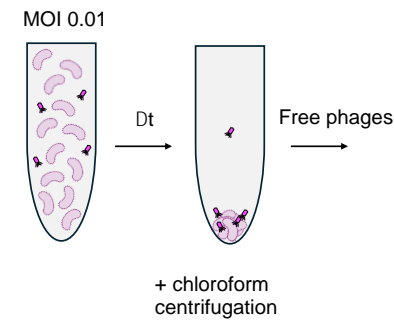


TEST D'ADSORPTION

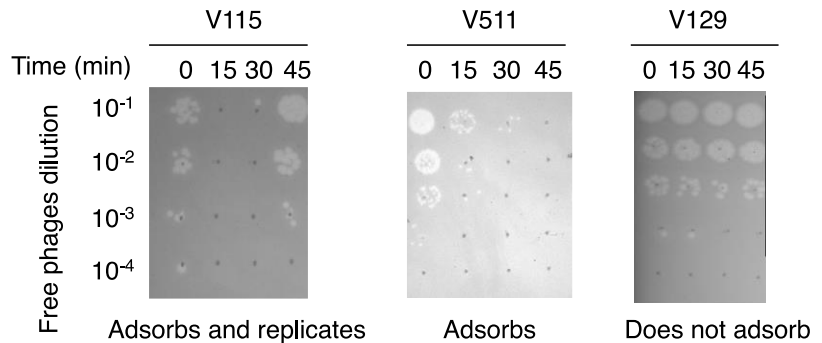
Introduction

La première étape de l'infection, étape externe, correspond à l'adsorption du phage à un récepteur (polysaccharide ou protéine extra-membranaire). Cette adsorption piège les phages à la surface des cellules, et conduit à une diminution de la quantité de phage libre dans le milieu. C'est ce que l'on mesure dans cet essai (voir figure ci-dessous). On travaille si possible à MOI faible pour observer la disparition totale des phages libres. Après le temps nécessaire à l'adsorption (Photo de gauche, 15 min) on peut observer une augmentation des phages libres (45 min), résultant de la libération de la progénie. Cet essai peut aussi permettre de mettre en évidence une résistance médiée par des mécanismes intracellulaire. Dans ce cas, on observe une diminution des phages libres (photo centre, 30 min) mais jamais d'augmentation (45 min). Le chloroforme permet de tuer les cellules (et donc de figer l'essai), après centrifugation les phages piégés sur la membrane sont dans le culot.

Méthode



Exemple de résultats



Matériel

- La bactérie hôte
- Le phage
- Marine Broth (MB) filtré sur 0.2µm pour éliminer les agrégats
- Marine agar
- Erlen (contrôle phage seul ; bactérie plus phages à MOI 0.01)
- Tubes Eppendorf 1.5mL annotés
- 1 boîte de petri moyenne gélose Marine agar (MA) pour titrer la bactérie hôte
- 1 grande boîte de petri gélose MA pour titrer les phages
- 20 mL de Top agar en MB (0.2% pour les phages schizo : 0.4% pour les autres phages)
- Chloroforme

Méthode

Jour -1

- Lancer une culture de la souche bactérienne dans 5mL de Marine Broth (MB), ON, 20°C agitation douce (100 rpm)

Jour 0, Test d'adsorption

- Diluer la culture initiale au 1/100 dans 50 mL de MB dans un erlenmeyer
- Lorsque la suspension atteint une DO 0,3, prélever 1mL de la culture, faire des dilution limite (10^{-1} à 10^{-8}) et déposer une goutte de 5 ul de chaque dilution sur gélose MA=> confirmation de CFU/mL
- Mettre 10 mL de suspension bactérienne à DO 0,3 dans un petit erlenmeyer
- Idem pour le contrôle phage seul mettre 10 mL de milieu MB dans un petit erlenmeyer
- A la suspension bactérienne, ajouter le phage pour avoir une **MOI 0.01**, mélanger et laisser en statique à 20°C
- Mettre le même volume de phages dans le tube contrôle, mélanger, prélever 1mL et placer dans un tube Eppendorf, contenant 100uL de chloroforme, ça c'est **T0**
- Aux temps **T5, T10, T15, T30, T60, T120, T180, T240** prélever 1mL du mélange bactéries+ phages et placer dans un tube eppendorf, contenant 100uL de chloroforme, vortexer, garder à 4°C jusqu'à l'étape de titration du phage.

Quand la cinétique est finie :

- Centrifuger pendant 5min à 13 000 rpm.
- Prélever 100 ul de surnageant (bien au-dessus du chloroforme) pour dilution limite en plaque 96 puits (Pur à 10^{-7})
- Déposer **5ul** sur tapis bactérien en top agar

TIPs

- Chaque phage et hôte se comporte différemment il est donc important de connaître leur vitesse de croissance, le rapport DO 0.3 =>CFU/ml, le titre de phage en tenant compte du decay etc. Donc avant de commencer :
 - i) Evaluer sur 3 manipes distinctes le rapport DO 0.3 et CFU/mL ;
 - ii) la veille de la manipe d'adsorption, titrer le phage.
- Il est probable que la phase de croissance détermine l'expression du récepteur, au cas ou ça ne marche pas à DO 0.3 (après au moins 3 tentatives) prévoir de tester d'autres DOs.
- On peut aussi avoir des résultats uniquement avec une plus forte MOI (0.1 à 1) ou bien plus faible (<0.001).
- Dans une première manipe faire des temps longs, puis pour manipes 2 et 3 se concentrer sur la fenêtre de chute des phages libres (temps d'adsorption max) et re-augmentation (début de réplication lyse). Le temps d'adsorption varie beaucoup, de l'ordre de 1 minutes à 15-30 minutes pour nos phages.
- Le chloroforme peut altérer certains phages, confirmer donc sur le stock de phage qu'il n'y a pas d'effet sur le titre infectieux.

- Pour certains phages on observe une baisse de la quantité de phages libre mais jamais une disparition.
- Ce protocole peut nous permettre d'estimer grossièrement le temps nécessaire à la production de phages, cependant comme on utilise du chloroforme qui lyse les cellules, ce temps correspond à l'éclipse (temps entre injection du génome du phage et production de particules dans la cellule) et non à la latence (temps entre injection du génome du phage et libération de particules dans la cellule). Si on veut estimer le temps de latence, il ne faut pas traiter au chloroforme, à la place, centrifuger les cellules et filtrer le surnageant sur 0.2 μm .

Reference

Hyman, P. & Abedon, S. T. Practical methods for determining phage growth parameters. *Methods Mol Biol* 501, 175-202, doi:10.1007/978-1-60327-164-6_18 (2009).