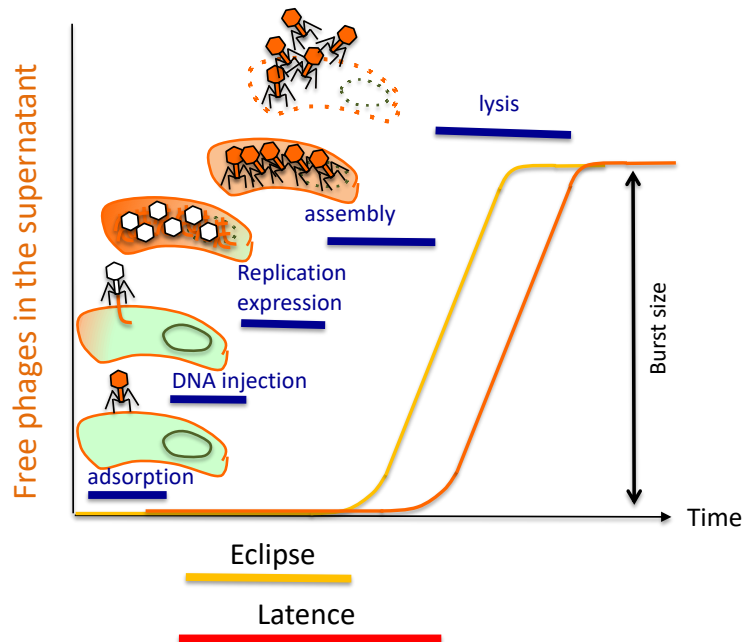


## DYNAMIQUE D'INFECTION ET EVALUATION DE LA TAILLE DE LA PROGENIE

### Introduction

L'infection par le phage comprend une étape extracellulaire (adsorption à un récepteur spécifique) et intracellulaire (injection de l'ADN dans le cytoplasme, détournement de la machinerie cellulaire à son profit pour expression des gènes viraux et réplication de l'ADN, encapsidation de l'ADN viral, assemblage tête queue, lyse de la cellule pour la libération de la progénie). Le protocole visant à déterminer la dynamique d'adsorption est présenté dans une autre fiche. Ici nous utilisons une méthode simplifiée pour évaluer le temps de latence et la taille de la progénie libérée par une seule cellule (burst size) (Figure ci-dessous).

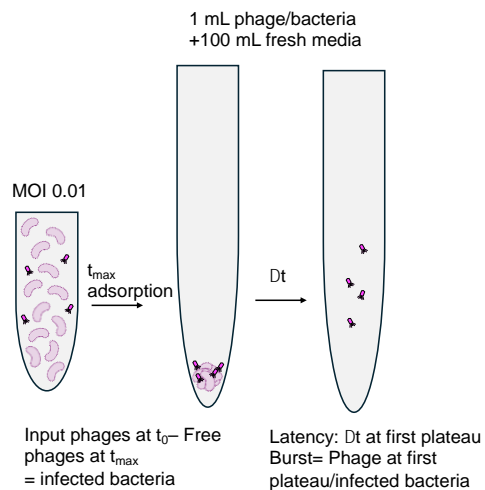


Le phage est mis en présence de la bactérie à faible MOI (0.01) pour éviter surinfection. Le **contrôle input** (en PFU/mL) correspond à la même quantité de phage dans du milieu sans bactérie. On incube le temps nécessaire à adsorption maximale (préalablement déterminé) et on quantifie la présence de phage libres, soit le **Contrôle phage libres** (PFU/mL). Le contrôle input – contrôle phage libre = concentration de phages adsorbés = la concentration de bactéries infectées (CFU/mL).

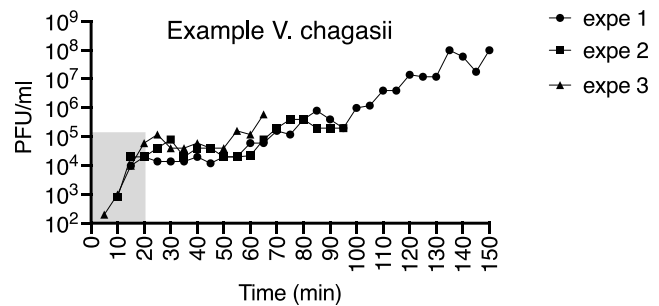
On centrifuge les bactéries pour enlever l'excès de phages non adsorbés et on reprend les cellules par un large volume de milieu frais (100X), on incube cette fois avec agitation douce, on prélève un aliquot (1 mL) à intervalle de temps régulier. Chaque aliquote est centrifugée, le surnageant est récupéré et soit filtré, soit complété de 10% de chloroforme. Les phages libres sont alors titrés.

La quantité de particules libérées dans le surnageant augmente jusqu'à une première phase plateau (= temps de latence, 15 minutes dans la Figure ci-dessous). Le nombre de PFU/mL obtenu au plateau divisé par nombre de cellules infectées/mL = burst size

## Méthode



## Résultats



Burst= Phage plateau/infected bacteria

## Matériel

- La bactérie hôte
- Le phage
- Marine Broth (MB) filtré sur 0.2µm pour éliminer les agrégats
- Erlenmeyers (contrôle phage seul ; bactérie plus phages à MOI 0.01 théorique)
- Tubes Eppendorf 1.5mL annotés
- Boîte de petri moyenne gélose Marine agar (MA) pour titrer la bactérie hôte
- Grande boîte de petri gélose MA pour titrer les phages
- 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

- Diluer la culture initiale au 1/100 dans 10 mL de MB dans un erlenmeyer
- Lorsque la suspension atteint une DO 0.3, prélever 100 µl de la culture, faire des dilutions limite ( $10^{-1}$  à  $10^{-8}$ ) et déposer une goutte de 5 µl de chaque dilution sur gélose MA=> confirmation de CFU/mL
- Mettre 5 mL de suspension bactérienne à DO 0,3 dans un petit erlenmeyer ou tube en verre
- Pour le **contrôle input** mettre 5 mL de milieu MB dans le même type de contenant
- A la suspension bactérienne, ajouter X µL de phage pour avoir une MOI 0.01
- Mettre le même volume de phages dans le **contrôle input**. Mélanger et laisser en statique à 20°C jusqu'à la fin de l'expérience.
- A  $t_{\max}$  adsorption prélever 1 mL de la suspension bactérie + phage et centrifuger à 6000 rpm pendant 5 min
- Récupérer le surnageant=> **contrôle phages libres** issus du surnageant après adsorption), ajouter 100µL de chloroforme, vortexer et réserver à 4°C

- Resuspendre le culot par 1mL de MB frais et dans un erlenmeyer ajouter MB frais qsp 100ml, incuber sous agitation lente (100 rpm) à 20°C.
- Toutes les 10 min, prélever 1 ml de culture, centrifuger, au surnageant dans un tube Eppendorf ajouter et 100uL de chloroforme, vortexer, garder à 4°C jusqu'à l'étape de titration du phage.
- A la fin de la manipe, prélever 1 mL du contrôle input et ajoute 100ul de chloroforme
- Centrifuger les tubes contrôle input, contrôle phage libre et tubes de cinétique pendant 5min à 13 000 rpm.
- Prélever 100 µl de surnageant pour dilution limite en plaque 96 puits (Pur à 10<sup>-7</sup>)
- Déposer 5ul de chaque dilution sur tapis bactérien en top agar.

### Tips Importantes !

- Il y a la théorie et la réalité. Certains phages produisent un excellent titre par la méthode « high titer stock » et de grosse plaque ; pourtant montre un petit burst (10) au premier plateau (exemple le phage P115 de *V. chagasii*). En fait il semble que la croissance des phages se fait en plusieurs plateaux d'infection par les progénies successives sur les cellules non infectées, permettant d'obtenir deux logs de plus de phages après quelques heures.
- Pour certains phages, on n'observe pas de plateau et la multiplication des phages requiert au moins 6 heures d'infection.
- Ici aussi la notion de MOI faible varie selon phage. Certains nécessitent de travailler à MOI <0.001.

### References

Zurabov and Zhilenkov *Virology* (2021) 18:9 Characterization of four virulent *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages, and evaluation of their potential use in complex phage preparation.

*Pour la technique Gold mais super lourde (donc pas adapté à un grand nombre de phages) :* Martha R.J. Clokie et al. (eds.), *Bacteriophages: Methods and Protocols*, Volume 3, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1681, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7343-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7343-9_3), © Springer Science+Business Media LLC 2018