

Diapositive 1 :

Dans cette conférence, je discuterai où et comment isoler les phages et comment obtenir des isolats et des stocks purs.

Diapositive 2 :

Les phages peuvent être trouvés partout dans l'environnement. L'eau est un endroit d'isolement commun. Des concentrations élevées de phages sont présentes dans l'eau de mer, l'eau douce et les stations d'épuration d'eau. De plus, des phages se retrouvent dans des échantillons de sol, attachés aux particules du sol. Les animaux infectés représentent également une importante source d'isolement. Les eaux usées provenant des fermes, des échantillons d'intestins, des échantillons de matières fécales et de litières sont utilisées dans le processus d'isolement. Une source commune de phages pour le traitement humain est une personne infectée. Comme ces patients possèdent la bactérie cible, il devrait également y avoir présence de phages infectant ces bactéries. Ces phages sont isolés à partir d'un échantillon de selles, d'un écouvillon de peau, de la salive et même de la plaque dentaire. De même, les humains en bonne santé peuvent représenter une source riche de phages pour les agents pathogènes commensaux. Ces phages peuvent être facilement isolés à partir des sécrétions nasales. Les phages peuvent également être isolés de lieux plus hostiles à la vie tels que les sources d'eau chaude et les glaciers.

Diapositive 3 :

Lorsque l'échantillon est disponible, les phages sont isolés. Tout d'abord, l'échantillon est prétraité à la fois physiquement, par exemple par extraction dans une solution tampon, par centrifugation ou par filtration, chimiquement par chloroforme, tuant les bactéries présentes dans l'échantillon. Le prétraitement est suivi d'une étape d'enrichissement. Cela implique l'incubation de l'échantillon avec le ou les hôte(s) souhaité(s) en culture liquide, souvent pendant la nuit, pour amplifier les phages dans l'échantillon. Cela entraînera une concentration plus élevée en phages recherchés dans l'échantillon et permettra un isolement plus facile. Par la suite, un test de plaque de lyse sur gélose double agar est réalisé au cours duquel une suspension de bactéries et d'échantillon est mélangée avec une solution d'agar semi-solide puis mise en culture. Si les phages infectent les bactéries cibles avec une efficacité suffisante, des plages se formeront.

Diapositive 4 :

Après isolement des phages de l'échantillon, des isolats purs sont obtenus par purification de la plage. Les plages apparaissent suite au test en gélose double agar précédemment décrit. Ensuite, les plages obtenues sont extraites du milieu solide, éluées, puis diluées avant d'être incubées avec les bactéries cibles pour former de nouvelles plages individuelles. Ce processus de purification de la plage est répété au moins trois fois pour s'assurer que la plage finale ne contient pas de contaminants.

Diapositive 5 :

Lorsqu'un isolat pur est disponible, un stock de phage contenant des particules de phage pur en forte concentration est généré. Une plage purifiée est isolée et incubée avec le ou les hôte(s) souhaité(s) en culture liquide. Après une nuit d'incubation, on ajoute du chloroforme pour tuer les bactéries présentes dans la culture. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation. Le surnageant contenant les phages est séparé et du chloroforme est une nouvelle fois ajouté. Des dilutions en série du stock de phage généré et un test de plaque de lyse sont réalisés afin de déterminer le titre (ou le nombre de plages par ml) du stock.

Diapositive 6 :

Les phages peuvent aussi être isolés des lysogènes. Les lysogènes sont des bactéries dans lesquelles le génome du phage est intégré au chromosome bactérien. Le phage est alors présent comme un prophage. Ce prophage peut être induit et ainsi libéré du chromosome de l'hôte via un endommagement de l'ADN qui entraînera une réponse SOS activant la protéine RecA. Cette protéine va réprimer le répresseur CI qui bloque normalement les promoteurs lytiques. En inhibant ce répresseur, les promoteurs lytiques sont exprimés et le prophage peut quitter le chromosome bactérien. Les méthodes courantes pour induire des dommages à l'ADN sont par exemple le traitement UV et l'addition de mitomycine C.