

Matériel et méthodes

ÉTUDE DES MODALITÉS D'ADAPTATION DE LA RÉSISTANCE
ANTIBIOTIQUE DE SOUCHES BACTÉRIENNES E. COLI

I. Préparation du milieu de culture : cuve, gels d'agar et antibiotique

1. Produits

Produit	Prix	Lien
Agar	100g pour 56,30€	Sigma Aldrich
LB Broth (Lennox)	250g pour 30,10€	Sigma Aldrich
Charbon végétal	30g pour 2,90€	Aroma Zone
Ciprofloxacine	5g pour 27,60€	Sigma Aldrich
Eau distillée	-	-
Pastille Javel	-	-
PMMA	-	-

2. Matériel

- Balance numérique ;
- Étuve (90°C) ;
- Hotte stérile ;
- Bécher (3L) ;
- Cuve ;
- Agitateur magnétique ;
- Flacons stériles (1L et 0,5L).

3. Méthode

a. Création de la cuve

Les différentes parties de la cuve ont été découpées au laser dans du PMMA puis assemblées à l'aide d'une colle plastique classique. Du silicone a été coulé dans les recoins.

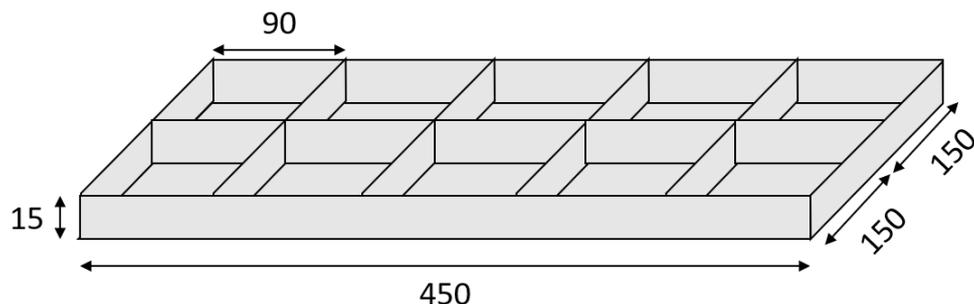


Figure 1 : schéma de la cuve de culture, dimensions données en mm.

b. Préparation des gels

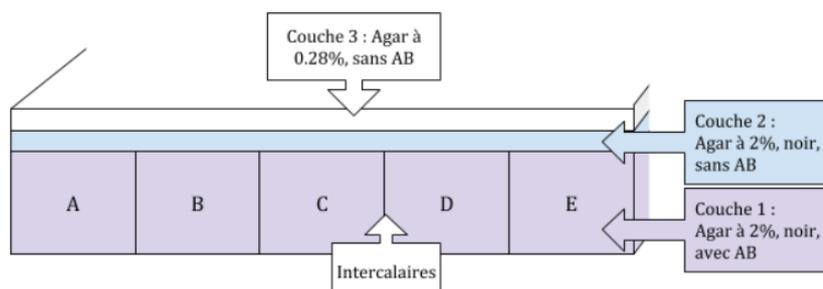


Figure 2 : schéma des conditions de culture instaurées sur le PAD - Les lettres A à E correspondent aux différentes concentrations en AB établies dans les voies de culture.

Gel première couche (dur, sans antibiotique pour l'instant) :

- Peser 20g d'agar et verser dans une bouteille de 1L ;
- Peser 20g de LB Broth et verser dans la bouteille ;
- Ajouter 1g de charbon végétal et verser dans la bouteille ;
- Ajouter de l'eau distillée jusqu'à obtenir 1L de solution ;
- Homogénéiser le milieu en secouant.

Gel deuxième couche (dur, sans AB) :

- Peser 10g d'agar et verser dans une bouteille de 500 mL
- Peser 10g de LB Broth et verser dans la bouteille.
- Peser 0,5g de charbon végétal et verser dans la bouteille ;
- Ajouter de l'eau distillée jusqu'à obtenir 1L de solution ;
- Homogénéiser le milieu en secouant.

Gel troisième couche (mou, sans AB) :

- Peser 1,4g d'agar et verser dans une bouteille de 500 mL ;
- Peser 10g de LB Broth et verser dans la bouteille ;
- Ajouter de l'eau distillée jusqu'à obtenir 500 mL de solution ;
- Homogénéiser le milieu en secouant.

Les 3 bouteilles sont ensuite autoclavées pendant 1h puis entreposées à l'étuve en attendant d'être utilisées (les gels doivent être utilisés le jour où ils sont fabriqués).

c. Préparation de la solution d'antibiotique (ciprofloxacine)

- Dans un tube à essai, introduire 10mg de ciprofloxacine et 10mL d'eau ;
- Ajouter du HCl goutte à goutte pour se placer en milieu acide, jusqu'à ce que la totalité de la ciprofloxacine soit dissoute (passage d'une solution blanchâtre à une solution transparente) (on obtient la solution mère d'AB).

d. Lavage de la cuve

Avant et après chaque expérience, la cuve doit être lavée à l'aide d'eau de javel (Attention, surtout **pas d'éthanol**, cela pourrait dégrader la colle et casser la cuve) :

- Dissoudre une moitié de pastille de javel dans 3 litres d'eau et mettre sous agitation magnétique ;
- Remplir la cuve vide avec de la solution et laisser tremper entre 30 minutes et une heure ;
- Vider la cuve et essuyer à l'aide d'essuie-tout ;
- Frotter à l'aide d'essuie-tout imbibé de javel les recoins de la cuve et le couvercle. Plusieurs passages sont nécessaires afin de bien désinfecter la cuve et éviter la contamination future ;
- Remettre le couvercle et laisser sécher l'ensemble.

II. Coulage des gels et dépôts de bactéries

1. Produits

Produit	Prix	Lien
Bactéries E. coli Wild Type	-	-
Bactéries E. coli Souche marR	-	-
ULTRASTOP	30 mL pour 11,20€	Megro
Kanamycine	1g pour 28,30€	Sigma Aldrich

2. Matériel

- Bec bunsen avec bombonne de gaz
- Aiguille
- Papier Kimtech
- Micropipettes

3. Méthode

a. Préparation de la couche 1 pour les 2 voies de culture

- Placer la cuve sous une hotte stérile ;
- Remplir le compartiment A ([AB] = 0) avec 2x100 mL ;
- Prélever 4 μL de la solution d'AB et les ajouter aux 800 mL de gel restants, mélanger et verser 2x100 mL dans les compartiments B ([AB] = $5 \cdot 10^{-9}$ mol/L) ;
- Prélever 27 μL de la solution d'AB et les ajouter aux 600 mL de gel restants, mélanger et verser 2x100 mL dans les compartiments C ([AB] = $5 \cdot 10^{-8}$ mol/L) ;
- Prélever 180 μL de la solution d'AB et les ajouter aux 400 mL de gel restants, mélanger et verser 2x100 mL dans les compartiments D ([AB] = $5 \cdot 10^{-7}$ mol/L) ;
- Prélever 900 μL de la solution d'AB et les ajouter aux 200 mL de gel restants, mélanger et verser 2x100 mL dans les compartiments E ([AB] = $5 \cdot 10^{-6}$ mol/L) ;

Zone du PAD	V à ajouter (μL)	V à ajouter (mL)	[C] solution mère(g/mL)	[C] voulu (g/mL)	Volume (mL)	Masse d'AB restante dans la solution (g)	Masse d'AB à ajouter à la solution (g)
B	4	0,0040	0,001	5,00E-09	800	0,000000	0,000004
C	27	0,0270	5,00E-09	5,00E-08	600	0,000003	0,000027
D	180	0,1800	5,00E-08	5,00E-07	400	0,000020	0,000180
E	900	0,9000	5,00E-07	5,00E-06	200	0,000100	0,000900

- Les bulles qui apparaissent à la surface du gel sont percées avec une aiguille chauffée grâce à un bec bunsen afin d'obtenir une surface la plus lisse possible ;
- Laisser reposer la cuve, en refermant le couvercle, jusqu'à ce que le gel ait solidifié.

b. Préparation de la couche 2 pour les 2 vois de culture

- Une fois la couche 1 solidifiée et toujours sous hotte, verser 400 mL de gel de la deuxième couche ;
- Les bulles qui apparaissent à la surface du gel sont percées avec une aiguille chauffée grâce à un bec bunsen afin d'obtenir une surface la plus lisse possible ;
- Laisser reposer la cuve, en refermant le couvercle, jusqu'à ce que le gel ait solidifié.

c. Préparation de la couche 3 pour les 2 vois de culture

- Une fois la couche 2 solidifiée et toujours sous hotte, verser 300 mL de gel de la troisième couche ;
- Les bulles qui apparaissent à la surface du gel sont percées avec une aiguille chauffée grâce à un bec bunsen afin d'obtenir une surface la plus lisse possible ;
- Laisser reposer la cuve, en refermant le couvercle, jusqu'à ce que le gel ait solidifié.

d. Application de l'antibuée ULTRASTOP

- Toujours sous hotte, mettre une centaine de μL d'ULTRASTOP sur un papier Kimtech ;
- Frotter la partie intérieure du couvercle.

e. Mise en culture des bactéries

- Des boîtes de Petri avec les différentes souches nous ont été fournies par le corps enseignant ;
- Sous hotte, préparer plusieurs tubes en versant 2 mL de LB à 2% en masse ;
- Si culture de souches marR/A/B rajouter 2 μL de solution de kanamycine à 6mg/mL ;
- En dehors de la hotte à proximité d'une flamme de bec bunsen, ouvrir les boîtes de Petri et prélever avec un inoculateur une colonie de bactéries ;
- Placer la colonie dans un tube et mettre dans un incubateur à 37°C quelques heures.

f. Dépôt des bactéries

- Prélever un petit volume d'une colonie de bactérie incubée se trouvant dans un tube à essai ;
- Mesurer le DO et réaliser les dilutions nécessaires afin d'avoir un DO identique pour les différentes colonies que l'on veut déposer dans la cuve ;
- À l'aide d'une micropipette, prélever 50 μL de bactéries et faire un dépôt sur une extrémité de la cuve, réaliser la manipulation trois fois pour chaque voie de culture ;
- Refermer la cuve et la placer dans la zone d'acquisition d'image.

III. Gestion de la température et acquisition

1. Matériel

- Contrôleur de température (TEMPCONTROL 37-2 Digital) et son unité de chauffage ;
- Ordinateur avec logiciel [Pylon Viewer](#) ;
- Caméra ;
- Support pour caméra ;
- Carton ;
- Générateur de courant ;
- Barres lumineuses LED.

2. Méthode

a. Mise en place de la zone d'acquisition

On réalise le montage suivant :

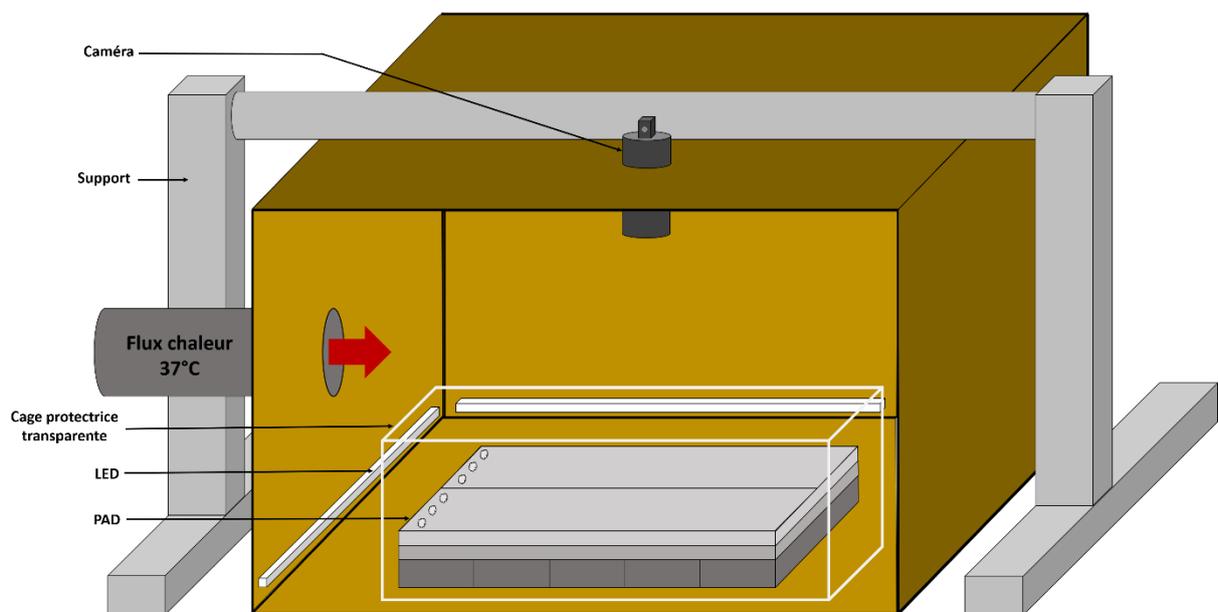


Figure 3 : schéma du montage expérimental

Note : la partie avant du carton peut se fermer afin de ne plus laisser passer la lumière extérieure.

b. Contrôle de la température

On contrôle la température avec le contrôleur TEMPCONTROL 37-2 Digital qu'on relie à son unité de chauffage. On fixe la température à 37°C, température optimale pour le développement des bactéries E. coli.

c. Acquisition d'image

- Brancher la caméra à l'ordinateur via son boîtier (OUT = de la cam vers le boîtier et in = du boîtier vers le PC) ;
- Ouvrir le logiciel Pylon Viewer ;
- Choisir la caméra (Devices → GigE → Basler acA1300-60gm (21537219))
- Réglages : cliquer sur Features → Basler acA1300-60gm (21537219), voir les annexes pour les réglages précis ;
- Cocher la case « Enable Acquisition Frame » ;
- Lancer l'acquisition.

ANNEXE CAMÉRA

