Protocoles et Méthodes

PSE Évolution de bactéries en phase liquide

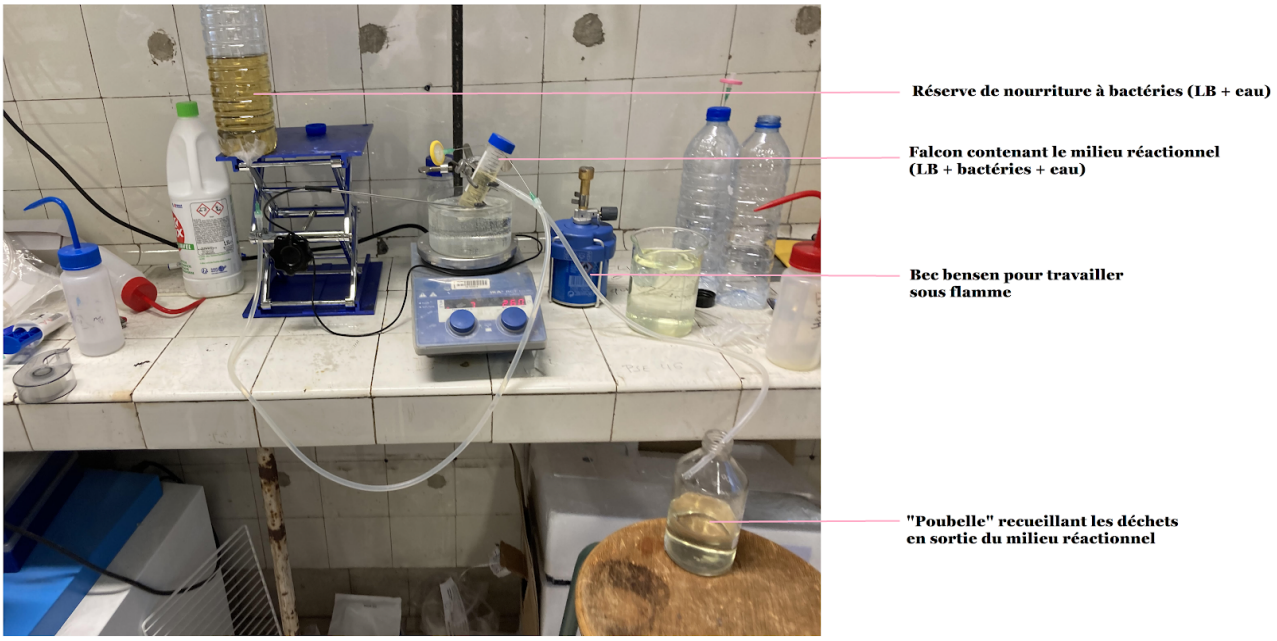
Lucas Bernier, Clémence Lemercier, Gabriel Goujon

I) Matériel

Équipement	Quantité	Prix	Expériences
Antibiotique : ampicilline	50mg	215€/100 g	Expériences 2 et 3
Bactéries E.Coli	1 unité de ATCC	394 €	Toutes
LB 10x	1kg	118€/kg	Milieu de culture et boites de pétri
Agar	50g	350€/kg	Boites de pétri
Turbidimètre	1	~700€	Expérience 3
Bec bunsen	3	56€	Toutes
Seringues	~50	~80€/25	Conception du chemostat
Filtre 0.1 microns	~20	272€/50	Conception du chémostat
Récipient plastique 2L hermétique stérile	10	/	Conception du chémostat
Tuyaux souples de diamètre 12 mm	1m	70€/50m	Conception chémostat
Raccord luer	5	116€/10	Conception chémostat
Colle forte		/	Conception du chémostat
Mécanisme de contrôle du débit	1	/	Conception du chémostat
Falcon 50mL	30	50€/100	Conception du chémostat

II) Protocoles et méthodes

a) Le montage du chémostat



Le milieu de culture est réalisé dans un falcon 25mL stériles (récipient en plastique transparent de centrifugeuse, très pratique à manipuler), et est constitué d'eau et de poudre de LB, avec parfois de l'ampicilline. Le contenant à nourriture est d'abord une bouteille d'eau classique comme sur la photo, ensuite remplacé par un récipient de laboratoire en plastique plus approprié et stérile (pour des soucis de contaminations). Le récipient à nourriture, de 1L et contenant 500mL de nourriture maximum, est surélevé par un support élévateur, de façon à ce que la gravité fasse couler la réserve de nourriture. Un tuyau en plastique Versilic Saint-Gobain est connecté à deux têtes de seringues à ses extrémités, grâce à des raccords Luer. Les aiguilles sont plantées dans le bas du récipient et dans le haut du milieu de culture, puis l'étanchéité et la stabilité est assurée par de la colle forte. Le débit est contrôlé par un robinet artisanal, réalisé avec deux plaques de métal plaquées au tuyau et assemblées avec des vis : plus les vis sont serrées, plus les plaques se rapprochent, plus la section du tube diminue, plus le débit diminue. On peut arriver à faire des débits de l'ordre de 1goutte/30secondes : le récipient peut s'écouler durant plusieurs jours.

Le milieu réactionnel est porté à 37°C (température de croissance idéale des bactéries) et est agité par une plaque chauffante agitante. Un autre tuyau sert de sortie au réacteur : il est muni d'un coté par un embout de micropipette stérile que l'on a fendu dans sa longueur par un cutter, de façon à pouvoir faire passer tout liquide qui arrive à sa hauteur. Cet embout est inséré en haut du réacteur par un trou dans le falcon réalisé à l'aiguille et au cutter, puis rendu hermétique par de la colle forte. Cela fonctionne comme un trop-plein (qui définit alors le volume du milieu réactionnel) : quand le niveau du milieu réactionnel dépasse cet embout, il coule grâce à la gravité dans le tube et arrive dans un récipient poubelle, situé plus bas que le réacteur. Ce récipient poubelle est recouvert de parafilm pour éviter les odeurs et les projections.

Le falcon du réacteur et le récipient de nourriture sont muni d'une aiguille supplémentaire sur laquelle on ajoute un filtre 0.1microlitre : cela permet de faire une arrivé d'air, et donc de laisser couler le milieu à pression constante (ce qui est primordiale car le moteur du réacteur est la gravité) tout en restant en conditions stérile.
Toutes les manipulations sont réalisées sous hotte stérile, ou sous bec bunsen.

Remarques et difficultés :
*Le récipient de nourriture doit être placé très haut par rapport au milieu réactionnel (pas comme sur la photo) pour que les variations de hauteurs suite à l'écoulement soient négligeables.
*Il est difficile de percer le falcon proprement sans se blesser : il faut des aiguilles très aiguisées, tout comme le cutter. Nous recommandons fortement à ceux qui voudraient reproduire la manipulation d'agir très précautionneusement.
*Il est difficile de réaliser le trou de sortie dans le falcon de façon hermétique : l'embout de micropipette étant large, il faut faire un gros trou qui ne fait passer que l'embout : de nombreuses fuites peuvent arriver à cet endroit. La colle peut aider à boucher.
*Il est difficile de couper parfaitement l'embout de micropipette sans le plier, le trouer, et de façon à bien guider le liquide. Attention également à ne pas se blesser.
*Il faut bien faire attention aux contaminations dans le montage : elles détruiraient l'expérience, qui doit reprendre à la toute première partie.
*Il faut faire passer une quantité importante de javel concentrée dans tout le montage avant de mettre le LB et les bactéries à chaque expérience pour prévenir une éventuelle contamination
*Attention à bien travailler avec un milieu nutritif stérile (autoclavé), cela demande du temps et de l'organisation.

b) Mise en culture de bactérie

Durant la longue période qu'a consisté la confection du chemostat (entre délais livraison et construction la confection s'est effectué plusieurs mois après les débuts du projets) nous avons effectué plusieurs mises en cultures de bactéries afin de se faire la main sur ces méthodes biologiques, mais aussi de tester nos souches et en particulier étudier la concentration seuil en ampicilline où l'effet antibiotique se fait ressentir.
Pour cela nous avons préparé un milieu de culture d'agar et de LB que nous avons coulé sur une boîte de pétri, possédant après refroidissement la texture d'un gel. Le dépôt de bactéries s'est effectué sous hôte à l'aide de pipettes pasteur que l'on passe sous flamme avant de stériliser l'objet de prélèvement. Un simple contact avec le gel d'agar permet le refroidissement essentiel de la pipette pasteur afin de ne pas tuer les bactéries à prélever.
On prélève ensuite une petite pointe de notre échantillon de bactéries que l'on étale sur notre gel avec la méthode des quadrants. On effectue le dépôt en striant légèrement le premier quadrant avec la pointe de la pipette sans repasser sur un strie. On répète l'opération sur le quadrant suivant faisant démarrer la première strie sur le début du quadrant précédent afin de prélever une petite quantité des bactéries déjà étalées. Le but étant alors d'obtenir des bactéries isolées sur le dernier quadrant et observer des colonies après croissance à cet emplacement.
La croissance s'effectue à l'étuve à 37 degrés en ayant pris soin de bien sceller la boîte avec du parafilm pour éviter toute contamination.
Du point de vue des mesures, nous avons effectué plusieurs mises en culture avec des milieux de culture de concentration diverses en antibiotiques: 0, 2, 4, 6, 8, 10 et 12µg/ml de milieu. On observe le développement de colonies jusqu'à une concentration de 6 µg/ml de milieu. On estime alors la concentration seuil pour l'effet de l'ampicilline situé vers 7µg/ml de milieu. Cela nous a permis d'être préparer dès lors que notre chemostat a été conçu pour effectuer des mesures avec une concentration graduelle pertinente en ampicilline.

Remarques et difficultées:

*Attention lors du prélèvement des bactéries avec un instrument stérilisé sous flamme afin de bien refroidir l'instrument afin de ne pas brûler et tuer les bactéries.
*Prendre toutes les précautions nécessaires pour travailler en milieu stérile.
*N'ayant initialement pas de connaissance pratique en biologie, il nous a fallu nous faire la main sur quelques boîtes de pétri avant de se lancer dans les tests à l'antibiotiques.

c) Mesures au chemostat : réaction évolutive d'une souche E-coli à un stress graduel en ampicilline

Evolution: Une fois en possession de notre chemostat, nous avons dans le temps restant effectuer quelques mesures.
Pour cela, nous avons préalablement préparé du milieu de culture eau+LB avec une concentration en LB constante pour toutes les expériences et égale à la concentration de référence indiquée sur le flacon de LB en poudre.
Cette préparation est autoclavée afin de garantir des conditions stériles.
On connecte ensuite le réservoir au chemostat et on laisse le milieu s'écouler jusqu'à ce que le milieu réactionnel soit à sa hauteur stationnaire avant d'engager la souche E-Coli (une pointe de pipette pasteur).
Le débit est alors ajusté avec un goutte à goutte suffisant pour que l'expérience se déroule sur plusieurs jours (idéalement l'intervalle de temps entre deux séances). Ce goutte à goutte est ajustable grâce à l'élévation du réservoir et au diamètre d'entrée contrôlé par le robinet constitué des deux plaques de métal (voir a)). Le but est que les bactéries soient alimentées en continue pour que les observations ne soient pas influencées par une pénurie.
A chaque séance nous avons alors compté le nombre de bactéries dans le milieu en prélevant échantillon négligeable par rapport au volume total à la micropette que l'on a déposé dans un Eppendorf.
Les échantillons sont, après utilisation, congelés en prévision d'éventuelles mesures à refaire.
Dès lors, nous avons remplacé le réservoir par un nouveau contenant une concentration en ampicilline supérieur à la précédente (0 puis 4,8,16 µg/ml de milieu).

Suivi de la population par comptage des bactéries: Pour suivre la population de bactéries après chaque administration, nous avons utilisé un turbidimètre qui informe sur la teneur en bactérie en renvoyant un coefficient proportionnel au nombre de bactérie dans son régime linéaire (pas directement le nombre dans notre cas car l'appareil était mal calibré).
Du fait du mauvais calibrage, nous avons effectué une mesure de ce nombre plus précise en utilisant un microscope optique au grossissement x40.
Pour ce faire, on dépose notre prélèvement sur une lame de microscope munie de quadrillages gradués.
L'observation du microscope se fait sur un ordinateur grâce à une caméra et un logiciel d'acquisition.
On focalise de sorte à observer environ 6 carrés dont la dimension indiqué sur la lame permet par comptage du nombre de bactérie par carré de remonter à la concentration en bactérie.
Pour le comptage nous avons pris à chaque fois deux photos et avons sur chacune compté dans chacun des 6 carreaux le nombre de bactéries afin de réduire l'incertitude et assimiler ce nombre à sa moyenne. Lorsque l'image était trop dense nous avons dilué par 10 ou 100 l'échantillon afin d'observer quelques dizaines de bactéries par unité de surface.
On peut donc suivre la population de bactéries présentent dans le milieu de culture

Remarques et difficultées:

*La durée des expériences rend le processus compliqué, il est arrivé que des écoulements s'arrêtent et nous obligent à recommencer.
*Des contaminations nous ont obligé à recommencer nos expériences.
*L'ajustement du débit est très compliqué et varie au fur et à mesure que la bouteille se vide.
*Nous avons manqué de temps pour effectuer plus de mesures et étudier des paramètres autres que la concentration en antibiotique
*L'intervalle de temps entre chaque changement de réservoir et la durée des expériences n'était pas constant mais fonction des séances rendant l'interprétation et la comparaison des résultats compliqués.