

Effets du stress sur la persistance d'*E. Coli*

Protocoles et méthodes

D.Rébet, M. Eidelsberg, S. Shen

1. Préparation du matériel

La séance précédant celle de la manipulation, on stérilise une centaine d'Eppendorf, on prépare au minimum 500ml de LB, ainsi qu'une solution d'ampicilline à sa stock concentration, soit 100mg/ml. On coule également au moins 12 boîtes de Petri de gélose de LB.

2. Matériel

- 100 Eppendorf
- 6 Falcon
- 2 becs Bunsen
- Centrifugeuse
- Micropipettes P20, P200 et P1000
- Cônes
- 500 ml LB
- Ampicilline à la stock concentration
- Incubateur
- *E.Coli* en phase stationnaire
- Boîtes de Petri de gélose

3. Préparation des phases stationnaire et exponentielle

On a à disposition un falcon de 20 ml d'*E.Coli* en phase stationnaire. On en prélève 200 μ l que l'on transfère dans un Falcon contenant 19,8 ml de LB. On met ce Falcon à incuber (37°C, sous agitation) pendant 1h30. On effectue toute la suite du protocole de la même façon en parallèle sur les deux populations.

4. Dosage initial

Après l'incubation de la phase exponentielle, on prélève 0,5 ml de solution mère d'*E.Coli*, que l'on dilue dans 50 ml de LB. On agite puis on prélève 200 μ l auxquels on fait subir les protocoles de lavage (cf 6) puis de dilution (cf 7) et de culture (cf 8). On a ainsi une référence sur la concentration initiale de bactéries, que l'on va utiliser pour normaliser nos résultats.

5. Incubation

On prélève 0,5 ml de solution mère, que l'on dilue dans 50ml de LB auxquels on a précédemment ajouté 50 μ l de la solution d'ampicilline. On a alors une concentration en ampicilline de 100 μ g/ml, ce qui correspond à la concentration normalement utilisée pour tuer les bactéries. On agite puis on prélève 200 μ l auxquels on fait subir les protocoles de lavage (cf 6) puis de dilution (cf 7) et de culture (cf 8). Dès que le prélèvement est effectué, on place le Falcon à l'incubateur, puis on refait des prélèvements à 10, 30, 60 et 120 min qui subissent le même traitement.

6. Lavage

Les 200 μ l prélevés sont placés à la centrifugeuse pendant 45s à 9600 rpm (vitesse max de la centrifugeuse). On prélève alors délicatement 190 μ l du LB qui surnage, en faisant attention de ne pas décoller les bactéries qui se sont déposées au fond. On rajoute alors à l'Eppendorf 190 μ l de LB pur. On répète cette manip une seconde fois. On a ainsi lavé les bactéries en faisant fortement diminuer la concentration en antibiotique, qui ne peut alors avoir qu'un effet négligeable.

7. Dilutions sérielles

On prépare pour chaque prélèvement lavé 6 Eppendorf : le premier avec 900 μl de LB, les autres avec 990 μl de LB. On prélève 100 μl de solution lavée que l'on ajoute au premier Eppendorf. On agite cet Eppendorf puis on y prélève 10 μl afin de les ajouter dans le deuxième Eppendorf que l'on agite à son tour et ainsi de suite. On a alors des solutions diluées 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 et 10^7 fois.

8. Culture

Pour chaque prélèvement, on prépare une boite de Petri de gélose en traçant dessus un quadrillage 5×5 . On pourra ainsi pour 5 concentrations différentes effectuer 5 dépôts de goutte. Pour les prélèvements initiaux, n'ayant pas été exposés à l'ampicilline, on dépose des gouttes diluées 10^3 à 10^7 fois. Pour les autres, de 10^2 à 10^6 fois. On laisse ces boites à température ambiante pendant 24h.

9. Analyse

Une fois que les colonies se sont développées, on les compte. On fait la moyenne sur les 5 réplication et on prend comme base pour le calcul la concentration pour laquelle on peut compter entre 5 et 50 colonies (bonne échelle pour que l'on puisse à la fois avoir assez de colonies pour minimiser la variabilité, mais assez peu pour qu'elles ne se recouvrent pas). On peut alors remonter à la concentration présente dans le prélèvement que l'on a effectué dans le Falcon avec de l'ampicilline. On normalise alors par la concentration initiale mesurée grâce au prélèvement effectué en 4. On peut finalement tracer les courbes de survie des différentes populations.