



PROJET SCIENTIFIQUE EN EQUIPE

ANTIBIORÉSISTANCE DES BACTÉRIES - MÉTHODES & PROTOCOLES

PIERRE DELZERS, JAD BOUSTANY, OMAR BENJELLOUN
5 mai 2023

Nous avons établi trois protocoles durant notre projet scientifique : un premier permettant de suivre la croissance des bactéries choisies, un second pour évaluer la CMI (Concentration minimale inhibitrice) de ces bactéries face à l'antibiotique que nous utilisons, et un dernier correspondant à l'expérience centrale de notre projet scientifique.

1 Protocole pour déterminer la vitesse de croissance des bactéries

1.1 Matériel requis

- Bactéries E. Coli
- Milieu de culture LB
- Tubes à essai stériles
- Pipettes stériles
- Eppendorfs 1.5mL stériles
- Chronomètre
- Incubateur à température contrôlée
- Spectromètre
- Cuvettes stériles

1.2 Protocole

- Diluer 0.05 mL d'une solution de bactéries E. Coli OverNight dans 5 mL de milieu de culture LB contenu dans un tube à essai stérile.
- Placer le tube à essai dans un incubateur à 37°C pendant 2 heures afin d'éviter la mesure du "lag" (période d'adaptation des bactéries au nouvel environnement où celles-ci ne se développent pas).
- Commencer l'expérience en lançant le chronomètre, en prélevant 0.1 mL du milieu bactérien à verser dans un eppendorf contenant 0.9mL de LB et en remettant le tube à essai à l'incubateur à 37°C.
- Mesurer immédiatement la densité optique de la solution contenue dans l'eppendorf au spectromètre en la versant dans une cuvette adaptée.
- Répéter à intervalle de temps régulé le prélèvement et la dilution de 0.1mL de la solution bactérienne du tube à essai dans un eppendorf ainsi que la mesure de la densité optique de l'échantillon. Ne pas oublier de replacer le tube à essai dans l'incubateur après chaque opération.

La régression linéaire des densités optiques en fonction du temps d'incubation des bactéries nous donne le doubling-time des bactéries E.Coli correspondant au temps nécessaire pour que la population d'E.Coli double.

Les temps de mesure de la densité optique du milieu préconisés sont :

Temps pour mesures (*min*) | 0 | 20 | 40 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 135 | 150

2 Protocole pour évaluer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de ces bactéries face à l'antibiotique choisi

2.1 Matériel requis

- Bactéries E. Coli
- Plaque 96 puits
- Milieu de culture LB
- Tubes à essai stériles
- Antibiotique (ici l'ampicilline)
- Pipettes stériles
- Incubateur à température contrôlée
- Spectromètre pour plaque à puits
- Eau distillée
- Chronomètre

2.2 Protocole

- Diluer 0.1 mL d'une solution de bactéries E. Coli OverNight dans 5 mL de milieu de culture LB contenu dans un tube à essai stérile.
- Placer le tube à essai dans un incubateur à 37°C pendant 2 heures afin d'éviter la mesure du "lag" (période d'adaptation des bactéries au nouvel environnement où celles-ci ne se développent pas).
- Préparer la solution mère d'antibiotique étudié, ici l'ampicilline, de concentration massique 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Préparer une gamme de solutions d'antibiotiques diluées à l'aide de la solution mère et de l'eau distillée. Le facteur de dilution ira de 1 à 400 par exemple afin d'identifier la CMI.
- Verser ensuite dans les puits de la plaque 96 puits 50 μL de la solution contenant des bactéries et 50 μL d'une des concentrations d'antibiotique étudiées (dilution par un facteur 2 de la solution d'antibiotique).
- Placer la plaque 96 puits dans un incubateur à 37°C pendant 24 heures.
- Analyser la densité optique de chaque puit de la plaque à l'aide d'un spectromètre adapté

Les puits où la concentration d'antibiotique dépasse le MIC donnera une densité optique faible car les bactéries n'ont pas pu s'y développer. Il y a alors moins de milieu biologique dans le puit qui absorbe et diffuse fortement la lumière du spectromètre.

Les différentes concentrations d'antibiotiques réalisés sont :

Puits Ligne A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$C_{\text{Antibio}}(\mu\text{g}/\text{mL})$	1	3	5	7	10	15	20	25	30	40	50	60
Puits Ligne B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$C_{\text{Antibio}}(\mu\text{g}/\text{mL})$	80	100	125	150	175	200	225	250	275	300	350	400

3 Protocole pour l'étude du développement d'une antibiorésistance chez les bactéries après exposition à un stress thermique

NB : H = Chaleur, A = Antibiotique, N = Négatif

3.1 Matériel requis

- Bactéries E. Coli
- Milieu de culture LB
- Solution d'ampicilline à $100\mu\text{g}/\text{mL}$
- Tubes à centrifuger de 5 mL
- Tubes à essai stériles
- Pipettes stériles
- Boîtes de Petri stériles préparées en LB Agar
- Tubes Eppendorf de 1.5 mL stériles
- 2 Incubateurs à température contrôlée
- Chronomètre
- Centrifugeuse
- Réfrigérateur

3.2 Protocole

- Diluer 0.1 mL d'une solution de bactéries E. Coli OverNight dans 5 mL de milieu de culture LB contenu dans trois tubes à essai stériles : HA, NHA, NHNA
- Placer le tube à essai dans un incubateur à 37°C pendant 2 heures afin d'éviter la mesure du "lag" (période d'adaptation des bactéries au nouvel environnement où celles-ci ne se développent pas).
- Prélever $10\mu\text{L}$ de l'un des tubes à essai et réaliser à l'aide des eppendorfs deux solutions de dilution 10^{-5} et 10^{-6} .
- Commencer l'expérience en lançant le chronomètre en même temps d'ensemencer 2 boîtes de Pétri avec les deux dilutions précédentes et de placer le tube HA dans l'incubateur à 42°C et les tubes NHA et NHNA dans l'incubateur à 37°C
- Incuber les tubes pendant 30 minutes.
- Répéter l'étape de prélèvement, de dilution et d'ensemencement pour les tubes NHA et HA en relevant le temps où l'ensemencement est réalisé.
- Ajouter 1 mL de la solution d'ampicilline dans les tubes NHA et HA.
- Incuber les tubes pendant 1 heure à 37°C .
- Centrifuger les tubes NHA et HA à 6000 rpm pendant 6 min.
- Éliminer le surnageant et ajouter 5 mL de LB.
- Répéter l'étape de centrifugation et d'élimination du surnageant une autre fois. Ne pas oublier d'ajouter les 5mL de LB une fois l'élimination réalisée.
- Répéter l'étape de prélèvement, de dilution et d'ensemencement pour les tubes HA, NHA et NHNA en relevant le temps où l'ensemencement est réalisé.
- Laisser les boîtes de pétri sur la paillasse pendant 3 jours, puis les placer au frigo pendant 4 jours.
- Compter les bactéries sur chaque boîte de pétri et analyser les résultats.