

Transferts de matériel génétique entre bactéries : la conjugaison

Remarque préalable : Les manipulations seront conduites sous PSM. L'élimination conforme des déchets sera particulièrement surveillée. On prendra grand soin à la décontamination des surfaces et aux gestes de lavage des mains.

1. Questions Préliminaires :

Définir le terme conjugaison dans le contexte d'échanges génétiques entre bactéries.

Qu'est ce qui caractérise une souche donneuse ?

Qu'est ce qui caractérise une souche receveuse ?

Qu'est ce qu'une souche Hfr ?

2. Présentation des souches et de la manipulation

Souche donatrice disponible : souche *E. coli* RL114 possédant un plasmide conjugatif avec un gène de résistance codant pour une pénicillinase de haut niveau (TEM-2). Ainsi la souche est résistante à l'ampicilline, la ticarcilline, la céfalotine et le couple amoxicilline/acide clavulanique. Cette souche est en outre tétracycline résistante. Culture de 18 heures en bouillon cœur-cervelle.

Souche réceptrice : souche *E. coli* K12 F⁻ portant deux marqueurs chromosomiques de résistance à deux antibiotiques : la rifampicine et l'acide nalidixique. Culture de 18 heures en bouillon cœur-cervelle.

Il s'agit de montrer le transfert du plasmide de résistance pénicillinase TEM-2 par conjugaison.

Les deux souches sont fournies isolées sur agar trypticase-soja et en culture agitée, 37°C, en bouillon cœur-cervelle.

3. Mode opératoire et compte-rendu des manipulations et des résultats

3.1 Vérification de la pureté des 2 souches fournies

Pour chaque souche, vérifier la pureté : frottis et coloration de Gram sur chaque culture liquide, analyse de l'isolement fourni, réalisation d'un isolement à partir de la culture liquide fournie.

3.2 Réalisation de deux cultures en phase exponentielle

Inoculer 8 mL de milieu cœur-cervelle préchauffé à 37°C avec 600 µL de souche donatrice.

Inoculer 8 mL de milieu cœur-cervelle préchauffé à 37°C avec 600 µL de souche réceptrice.

Incuber à 37°C sous agitation pendant 40 minutes environ (de façon à obtenir une culture en phase exponentielle d'absorbance supérieure à 0,5).

Pour chaque souche, évaluer la biomasse par mesure d'absorbance liée au trouble, à 620 nm et **utiliser immédiatement pour la conjugaison**. On utilisera la correspondance 1 d'absorbance à 600 nm pour 1,5 10⁹ bactéries/mL. Limite de linéarité : 0,7.

Consigner les manipulations réalisées et les résultats bruts obtenus dans le compte-rendu. Donner la concentration des cultures donatrices et réceptrices ainsi obtenues.

3.3 Conjugaison en milieu liquide

Dans un Erlen stérile de 50 mL préchauffé à 37°C, introduire 2 mL de la culture de souche donatrice en phase exponentielle et 2 mL de la culture de la souche réceptrice en phase exponentielle. Homogénéiser doucement. Incuber désormais à 37°C **sans agitation. Déclencher un chronomètre.**

Remarque : chaque culture a été diluée au $\frac{1}{2}$ lors du mélange ...

3.4 Dénombrements des transconjugants

Le tableau ci-dessous présente les instructions pour dénombrer les transconjugants par l'acquisition du caractère « ampicilline résistant », par l'acquisition du caractère « tétracycline résistant » mais aussi par l'acquisition des deux caractères « ampicilline résistant et tétracycline résistant ». Chaque étudiant ne réalise que deux des trois de manipulations proposées.

test d'acquisition de la résistance à la seule ampicilline	test d'acquisition de la résistance à l'ampicilline ainsi qu'aux tétracyclines	test d'acquisition de la résistance aux seules tétracyclines
Au temps 6 minutes, prélever sans agiter 0,5 mL de milieu de conjugaison. Passer immédiatement le prélèvement à l'agitation vortex. Réaliser une dilution au 1/10 en eau physiologique stérile (100 μ L + 900 μ L) et au 1/100 (10 μ L + 990 μ L) en eau physiologique stérile.		
Etaler 100 μ L des dilutions 10^{-1} et 10^{-2} à la surface d'une boîte de Pétri de milieu Muller-Hinton (MH) plus ampicilline 100 mg/L et acide nalidixique 50 mg/L. Incuber à 37°C.	Etaler 100 μ L des dilutions 10^0 et 10^{-1} à la surface d'une boîte de Pétri de milieu Muller-Hinton (MH) plus tétracycline 40 mg/L, ampicilline 100 mg/L et acide nalidixique 50 mg/L. Incuber à 37°C.	Etaler 100 μ L des dilutions 10^0 et 10^{-1} à la surface d'une boîte de Pétri de milieu Muller-Hinton (MH) plus tétracycline 40 mg/L et acide nalidixique 50 mg/L. Incuber à 37°C.
Au temps 45 minutes, prélever 2 mL de milieu de conjugaison. Passer immédiatement le prélèvement à l'agitation vortex. Réaliser une dilution au 1/10 et au 1/100 en eau physiologique stérile.		
Etaler 100 μ L des dilutions 10^{-1} et 10^{-2} à la surface d'une boîte de Pétri de milieu Muller-Hinton plus ampicilline et acide nalidixique. Incuber à 37°C.	Etaler 100 μ L des dilutions 10^{-1} et 10^{-2} à la surface d'une boîte de Pétri de milieu Muller-Hinton plus tétracycline 40 mg/L,, ampicilline 100 mg/L et acide nalidixique 50 mg/L. Incuber à 37°C.	Etaler 100 μ L des dilutions 10^{-1} et 10^{-2} à la surface d'une boîte de Pétri de milieu Muller-Hinton plus tétracycline 40 mg/L et acide nalidixique 50 mg/L. Incuber à 37°C.

3.5 Vérification des phénotypes de résistance aux antibiotiques des 2 souches donatrices et réceptrices fournies

Il s'agit de vérifier les caractères de résistance aux antibiotiques des 2 souches de départ. On utilisera un protocole pour antibiogramme standard par la méthode des disques. Onensemencera les boîtes à l'aide d'un écouvillon (à partir d'une suspension à environ $1 \text{ à } 3 \cdot 10^8$ bactéries/mL, c'est à dire une dilution au 1/20 des cultures de départ). Plonger l'écouvillon dans la suspension, l'essorer doucement sur les parois du tube, ensemenecer en frottant la totalité de la surface de la boîte 3 fois en tournant de 60°C entre chaque fois).

Tester la souche donatrice et la souche réceptrice pour les antibiotiques : ampicilline, (ampicilline/acide clavulanique), céfalotine, tétracycline, rifampicine, acide nalidixique.

3.6 Compte-rendu pour les étapes 3.2 à 3.5

- Compte-rendu du travail réalisé.
- Analyse et interprétation des résultats de conjugaisons. On répondra en particulier aux questions suivantes : Quel est l'intérêt de la manipulation au temps 6 minutes ? Pourquoi le dénombrement des transconjugants est-il a priori biaisé ? Ce biais est-il négligeable ? Calculer l'efficacité de conjugaison = (nombre de transconjugants/nombre de donatrices) à 6 et 45 minutes.
- Vérification des souches de départ. Grâce aux résultats des antibiogrammes et à l'aide d'abaques, estimer les CMI des antibiotiques testés et on conclure quant à la validité des milieux sélectifs utilisés pour lire les conjugaisons.

4. Données concernant la réalisation des milieux additionnés d'antibiotiques

Solution stock d'ampicilline (Amp100x) à 10 mg/mL, solution stock d'acide nalidixique (Nal200x) à 10 mg/mL et solution stock d'oxytétracycline (OT250x) à 10 mg/mL.

D'où les réalisations suivantes :

MH + Amp 100 mg/L + Nal 50 mg/L = 250 mL de MH en surfusion + x mL Amp100x + y mL Nal200x.

MH + Nal 50 mg/L + OT 40 mg/L = 250 mL de MH en surfusion + y mL Nal200x + z mL OT 250x.

MH + Amp100 mg/L + Nal 50 mg/L + OT 40 mg/L = 250 mL de MH en surfusion + x mL Amp100x + y mL Nal200x + z mL OT 250x.

5. Bibliographie

Données aimablement fournies par Mme C. Arpin, Laboratoire de Microbiologie, Université de Bordeaux 2. Ainsi que les souches.