

## **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-cerveille.

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

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-cerveille.

### **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 : analyse de l'isolement fourni, frottis et coloration de Gram sur chaque culture liquide, 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-cerveille préchauffé à 37°C avec 600 µL de souche donatrice.

Inoculer 8 mL de milieu cœur-cerveille 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 de densité optique liée au trouble, à 620 nm et **utiliser immédiatement pour la conjugaison**. On utilisera la correspondance 1 de densité optique à 600 nm pour 1,5 10<sup>9</sup> 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 stérilement 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 bactéries transconjuguées

Le tableau ci-dessous présente les instructions pour dénombrer les transconjuguées 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 qu'une 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
A un temps exactement connu entre 3 et 6 minutes, prélever sans agiter 0,5 mL de milieu de conjugaison. Passer immédiatement le prélèvement à l'agitation vortex. Réaliser aussi une dilution au 1/10 en eau physiologique stérile (100 µL + 900 µL).		
Etaler 100 µL des dilutions 10 <sup>0</sup> et 10 <sup>-1</sup> 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 µL des dilutions 10 <sup>0</sup> et 10 <sup>-1</sup> 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 µL des dilutions 10 <sup>0</sup> et 10 <sup>-1</sup> 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. Et Réaliser une dilution au 1/10 (100 µL + 900 µL) en eau physiologique stérile et au 1/100.		
Etaler 100 µL des dilutions 10 <sup>-1</sup> et 10 <sup>-2</sup> à la surface d'une boîte de Pétri de milieu Muller-Hinton plus ampicilline et acide nalidixique. Incuber à 37°C.	Etaler 100 µL des dilutions 10 <sup>-1</sup> et 10 <sup>-2</sup> 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 µL des dilutions 10 <sup>-1</sup> et 10 <sup>-2</sup> 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 afin de valider les concentrations en antibiotiques dans les milieux de sélection réalisés. 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 à 2 10<sup>8</sup> bactéries/mL, soit un trouble Mc Farland 0,5, soit une DO<sub>600nm</sub> vers 0,1 ). 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**.

Données EUCAST (06/11/2015) pour *E. Coli* ATCC 25922, souche standard de phénotype sensible à l'ampicilline et à l'acide nalidixique:

Disque antibiotique	CMI mg/L	Diamètre d'inhibition
---------------------	----------	-----------------------

ampicilline	2-8 (cible 4)	15-22 (19)
Acide nalidixique	1-4 (cible 2)	22-28 (25)

Données Sanofi/Pasteur 1998 pour toute souche usuelle :

Disque antibiotique	Relation CMI mg/L et diamètre d'inhibition	Phénotype résistant pour
Tétracycline	19 mm pour 4 mg/L et 22 mm pour 17 mg/L	CMI >16 mg/L
Rifampicine	14 mm pour 16 mg/L et 19 mm pour 4 mg/L	CMI > 16 mg/L

### 3.6 Compte-rendu pour les étapes 3.2 à 3.5

- Compte-rendu du travail réalisé en s'aidant de tableaux comme ci-dessous :

DO souche donatrice, cult. expo. =	DO souche receveuse, cult. expo. =
[bactéries donatrices] cult. expo. =	[bactéries receveuses] cult. expo. =
[bactéries donatrices] dans le milieu de conjug. =	[bactéries receveuses] dans le milieu de conjug. =

Durée à l'interruption de conjug.	Connu entre 3 et 6 min	45 min
UFC transconjuguées comptées 100µL dil. 10 <sup>0</sup>		-
UFC transconjuguées comptées 100µL dil. 10 <sup>-1</sup>		
UFC transconjuguées comptées 100µL dil. 10 <sup>-2</sup>	-	
[transconjuguées] bact/mL dans le milieu de conjug. (moy. pondérée)		
Efficacité de conjugaison		

- Analyser et interpréter les résultats des conjugaisons. On répondra en particulier aux questions suivantes : Quel est l'intérêt de la manipulation au temps 3-6 minutes ? Pourquoi le dénombrement des transconjuguées au temps 45 min est-il a priori biaisé ? Ce biais est-il négligeable ? Calculer l'efficacité de conjugaison = (nombre de transconjuguées/nombre de donatrices) à 3-6 et 45 minutes.
- Vérification des souches de départ. Grâce aux résultats des antibiogrammes et à l'aide des données proposées 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.