

MASTER 1
TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE
UNITE D'ENSEIGNEMENT DE CHIMIOETHERAPIES
ANTI-INFECTIEUSES (UE-S7-5a)

ANNEE 2005 - 2006

I - CONJUGAISON - INCOMPATIBILITE PLASMIDIQUE (J1 à J6)

II - CURE PLASMIDIQUE (J1 à J6)

III - SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DES ENTEROBACTERIES (J4 à J6)

- Antibiogramme interprétatif
- Test de Gots
- Méthode iodométrique de détection des β -lactamases

COMPTE-RENDUS : rédiger 2 comptes-rendus indépendants par binôme
(1 sur Conjugaison/Cure; 1 sur Entérobactéries)
à rendre avant le 09 décembre 2005

INDISPENSABLE

Blouse en coton
Feutre indélébile
Cheveux longs attachés
Polycopié lu et compris
Calculs faits pour J1 (cure) et J2 (conjugaison/cure)
Binôme choisi ; travail réparti

Penser à bien sécher les géloses TS ou MH avant utilisation (boîte entr'ouverte dans l'étuve ou autour du bec Bunsen).

N'incuber à l'étuve ou au bain-marie que des milieux ensemencés du jour. Pas de tube d'eau ou de milieu déjà cultivé.

I - CONJUGAISON

- PRINCIPE

Cette expérience a pour but de montrer la possibilité de transfert par conjugaison de facteurs de résistance aux antibiotiques (facteurs R) et la possibilité ou l'impossibilité pour 2 facteurs R différents de coexister (compatibilité) ou non (incompatibilité) dans les bactéries d'un clone en l'absence de pression de sélection.

Principe de la conjugaison :

C'est le transfert d'un plasmide conjugatif codant pour la résistance à un ou plusieurs antibiotiques d'une souche donatrice à une souche réceptrice. La souche réceptrice doit posséder un caractère de résistance chromosomique vis à vis d'un antibiotique auquel la souche donatrice est sensible. Afin de sélectionner les transconjugants (bactéries réceptrices ayant acquis le plasmide de résistance) tout en éliminant les bactéries donatrices et les bactéries réceptrices n'ayant pas acquis le plasmide de la donatrice, la sélection s'effectue en présence de 2 antibiotiques : l'un correspond à une des résistances transférées, l'autre correspond à la résistance non transférable de la souche réceptrice. La fréquence de transfert est estimée par le rapport entre le nombre de transconjugants et le nombre de bactéries donatrices.

Principe de l'incompatibilité :

La souche réceptrice possède, elle aussi, un plasmide de résistance à un ou plusieurs antibiotiques. Après la conjugaison, les transconjugants (bactéries réceptrices ayant acquis le plasmide de la donatrice) posséderont donc 2 plasmides : celui de la réceptrice et celui de la donatrice.

- Si ces 2 plasmides n'appartiennent pas au même groupe d'incompatibilité, ils sont compatibles. Ils vont coexister dans la bactérie.

- Si ces 2 plasmides appartiennent au même groupe d'incompatibilité, ils sont incompatibles. Ils ne peuvent pas coexister dans la bactérie. Un des 2 plasmides chassera l'autre. Ce phénomène se révèle mieux en l'absence d'antibiotique (= sans pression de sélection).

- PROTOCOLE

- J1

- Souches :

	<u>Binômes pairs</u>	<u>Binômes impairs</u>
<i>E. coli</i> K12 R69 :	souche donatrice D ou	réceptrice R
<i>E. coli</i> K12 R95 :	souche réceptrice 1 R1 ou	donatrice 1 D1
<i>E. coli</i> K12 R113:	souche réceptrice 2 R2 ou	donatrice 2 D2
<i>E. coli</i> Y :	souche issue d'un des croisements et à identifier.	

Les 4 souches sont distribuées sur gélose trypticase soja (TS)

- Pratiquer un antibiogramme par la méthode des disques pour connaître la résistance des 4 souches. Tester : acide nalidixique (NA), amoxicilline (AMX), kanamycine (K), streptomycine (S), rifampicine (RA) et tétracycline (TE) (cf. fiche technique). **Faire sécher les géloses 15 min. entrouvertes à l'étuve avant leur utilisation.**

- Ensemencer chaque souche sauf la souche Y en bouillon TS. Incuber 24h à 37°C.

- Préparer les calculs pour J2 pour tous les antibiotiques (voir p.3).

- J2

- Lecture et interprétation des 3 antibiogrammes :

Noter les résistances et les interpréter (plasmidiques ou chromosomiques).
Mettre les résultats sous forme de tableau.

- Préparation des 4 milieux de sélection :

Couler les milieux de sélection et les faire sécher pendant l'heure d'incubation

D'après les antibiogrammes, choisir les 2 antibiotiques à inclure dans chaque milieu de sélection des transconjugants pour les croisements suivants : - croisement 1 : R69 x R95
- croisement 2 : R69 x R113

Couler 2 milieux de sélection pour chaque croisement (donc 4 au total) : 1 pour le croisement de 1h, l'autre pour le croisement de 24h : ajouter chaque antibiotique correctement dilué à 18 mL de gélose de Mueller Hinton en surfusion de façon à obtenir un **volume final de 20 ml** sachant que les concentrations finales en antibiotiques doivent être les suivantes dans la gélose:

ampicilline ou amoxicilline :	100 mg/L
streptomycine :	500 mg/L
kanamycine :	50 mg/L
acide nalidixique :	50 mg/L
tétracycline :	15 mg/L

Vous disposez de solutions mères à 1 g/L pour chaque antibiotique sauf pour l'amoxicilline qui est à 2g/L et pour la streptomycine qui est à 10 g/L.

**- Croisements : Utiliser les bouillons TS ensemencés en J1 -
Ne pas les vortexer (pilis fragiles)**

- Réaliser les mélanges suivants dans de grands tubes à essai stériles :

- croisement 1 :

binômes pairs : 1 mL de la souche donatrice (R69) + 4 mL de la souche réceptrice 1 (R95) : D x R1
binômes impairs : 1 mL de la souche donatrice 1 (R95) + 4 mL de la souche réceptrice (R69): D1 x R

- croisement 2 :

binômes pairs : 1 mL de la souche donatrice (R69) + 4 mL de la souche réceptrice 2 (R113): D x R2
binômes impairs : 1 mL de la souche donatrice 2 (R113) + 4 mL de la souche réceptrice (R69): D2 x R

Mélanger doucement puis incuber 1h à 37°C au bain-marie **sans agitation** pour ne pas casser les pili ni séparer les bactéries.

- Numération de la donatrice (NB: les binômes impairs ont 2 donatrices) :

Faire des dilutions de raison 10 de la souche donatrice en eau distillée stérile (v. final = 1 mL).
Vortexer.

Ensemencer 50 µL des dilutions 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} sur **une seule** gélose TS séchée. Incuber 24h à 37°C.

- Sélection des transconjugants après 1h de croisement :

Pour chaque croisement, ensemencer 50 µL des dilutions Pur, 10^{-1} et 10^{-2} du mélange D x R sur un milieu de sélection bien sec.

Vérifier la sélectivité des milieux de sélection : ensemencer 25 µL de la souche donatrice et 25 µL de la souche réceptrice sur la même boîte. Incuber 24h à 37°C.

**Conserver les 2 milieux de sélection non utilisés à 4°C.
Conserver les bouillons D et R à T° du laboratoire.
Remettre les croisements D x R 24h à 37°C au bain-marie.**

- J3 A faire pour chacun des 2 croisements (R69 x R95 et R69 x R113)

- Croisement de 1 heure

- estimation de la fréquence de transfert : compter les colonies de donatrice et les colonies de transconjugants et faire le rapport nombre de transconjugants/nombre de donatrices.

- culture sans pression de sélection : ensemencer 5 colonies dans un bouillon TS.

- analyse des transconjugants : pratiquer un antibiogramme par la méthode des disques : mettre 3 gouttes du bouillon TS ensemencé ci-dessus dans 10 mL d'eau stérile et en inonder une gélose MH. Tester les mêmes antibiotiques que J1. **Incuber la gélose. Incuber le bouillon TS 24h à 37°C.**

- Croisement de 24 heures : à faire uniquement si le croisement de 1h a échoué

- sélection des transconjugants après 24h de croisement : ensemencer 50 µL des dilutions Pur, 10^{-1} et 10^{-2} sur le milieu de sélection. Ensemencer 25 µL de D et 25 µL de R. Incuber 24h à 37°C.

- J4 A faire pour chacun des 2 croisements (R69 x R95 et R69 x R113)

- Croisement de 1 heure

- Lecture et interprétation de l'antibiogramme fait J3 (transferts, incompatibilités).
- Antibiogramme sur le bouillon TS incubé depuis J3 : 1 anse de bouillon dans 10 mL d'eau puis ensemencement de la gélose MH. Incuber 24h à 37°C.

- Croisement de 24 heures (s'il a été étudié en J3)

- Estimation de la fréquence de transfert après 24h de croisement.
- Culture sans pression de sélection.
- Analyse des transconjugants.

cf. J3

- J5 A faire pour chacun des 2 croisements (R69 x R95 et R69 x R113)

- Croisement de 1 heure

- Lecture et interprétation de l'antibiogramme fait J4.
- Comparaison avec l'antibiogramme fait J3 - Interpréter les différences éventuelles.

- Croisement de 24 heures (s'il a été étudié en J3 et J4)

- Lecture et interprétation de l'antibiogramme fait en J4 (transferts, incompatibilités).
- Antibiogramme sur le bouillon TS incubé depuis J4. Incuber 24h à 37°C.

- J6

A faire pour chacun des 2 croisements de 24 heures (R69 x R95 et R69 x R113) s'ils ont été étudiés en J3, J4 et J5 : - Lecture et interprétation de l'antibiogramme fait en J5.

- Comparaison avec l'antibiogramme fait en J4 - Interpréter les différences éventuelles.

Interpréter l'ensemble des résultats (voir page 6).

II - CURE PLASMIDIQUE

- **PRINCIPE.** Cette expérience a pour but de

- provoquer la perte d'un plasmide de résistance aux antibiotiques par culture de la souche en présence d'un agent curant utilisé à une concentration subinhibitrice (proche de la CMI). Les agents curants empêchent par différents mécanismes la réplication de l'ADN (bromure d'éthidium, acridine orange, U.V., antibiotiques...). L'agent curant choisi est la rifampicine.
- repérer les clones curés par la technique de réplique sur velours.
- contrôler la perte du plasmide par l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.

- PROTOCOLE

- J1

La souche étudiée est distribuée en bouillon TS: *E. coli* R69 ou R95 ou Y selon les binômes.

- **Cure** : culture en présence de l'agent curant : détermination de la CMI à la rifampicine en milieu liquide. Ceci permettra de choisir le tube renfermant la concentration subinhibitrice la plus proche.

* gammes de dilution de la rifampicine 10x dans l'eau (600 à 18.75 µg/mL)

- A partir d'une solution mère de rifampicine à 1g/L, préparer :

- 1 mL de rifampicine à 600 µg/mL

- 1 mL de rifampicine à 400 µg/mL

- Diluer de 2 en 2 **dans l'eau** :

Mettre 0,5 mL d'eau dans 9 tubes à hémolyse numérotés 300, 200, 150, 100, 75, 50, 37.5, 25 et 18.75.

Diluer les tubes 600 µg/mL et 400 µg/mL de 2 en 2 sans changer de cône de pipette:

tube 600 ==> 300 ==> 150 ==> 75 ==> 37.5 ==> 18.75.

(ex. 0,5 mL d'eau + 0,5 mL rifampicine 600 = 1 mL rifampicine 300.....)

tube 400 ==> 200 ==> 100 ==> 50 ==> 25.

* gamme de dilution de la rifampicine 1x dans du bouillon TS (60 à 1.875 µg/mL)

- Mettre 0.8 mL de **bouillon TS** dans 11 tubes numérotés 60, 40, 30, 20, 15, 10, 7.5, 5.0, 3.75, 2.5 et 1.875.

- Ajouter 0.1 mL des solutions de rifampicine 10x correspondantes.

- Préparer 1 douzième tube = tube témoin avec 0.9 mL de bouillon TS stérile.

* dilution de la culture bactérienne à 10^{-5}

0.1 mL de la culture bactérienne dans 10 mL d'eau = 10^{-2} . Puis 0.1 mL dans 10 mL d'eau = 10^{-4} . Puis 0.2 mL dans 1.8 mL de **bouillon TS stérile** = 10^{-5} .

* ensemencement

- Ajouter aux 12 tubes 0.1 mL de la dilution 10^{-5} de la culture bactérienne en commençant par le tube Témoin. Incuber 24h à 37°C.

- J2

- **Isolement et culture de bactéries susceptibles d'avoir curé leur plasmide**

* Lire la CMI

* Choisir le tube de concentration directement inférieure à la CMI. Cette concentration subinhibitrice, c'est-à-dire qui n'empêche pas la multiplication bactérienne, devrait empêcher la réplication du plasmide chez certaines bactéries.

- A partir de ce tube, préparer des dilutions 10^{-5} et 10^{-6} dans un volume final de 2 mL.

- Avec chaque dilution ensemencer une gélose MH par inondation et ré-aspiration immédiate. Incuber 24h à 37°C afin d'obtenir des colonies isolées.

* Lire l'antibiogramme de la souche à curer (cf. p. 2 et 3). Déterminer les résistances à médiation plasmidique probable. Déduire la valeur de la CMI à la rifampicine d'après le diamètre lu sur l'antibiogramme. Comparer à celle lue dans la gamme de CMI.

- J3

- Repiquer à partir des boîtes 10^{-5} et 10^{-6} de J2 50 colonies avec 25 cure dents sur une gélose TS placée sur le diagramme de repiquage.

- Incuber la gélose TS à 37°C.

- J4

- Préparer dès le début de la séance 1 à 3 milieux sélecteurs contenant un antibiotique correspondant à une résistance plasmidique supposée de la souche : Ajouter l'antibiotique à 18 mL de gélose MH en surfusion à 55°C et couler en boîte de Petri (cf. conjugaison pour les concentrations). Faire sécher ces milieux sélecteurs + 1 milieu non sélecteur (MH) **1h à 37°C.**

NB. Ne pas couler de milieu non sélecteur : utiliser un milieu déjà coulé.

Réplique sur velours :

- Fixer le velours sur l'appareil à réplique.

- Inscrire un repère sur le(s) milieu(x) sélecteur(s) et non sélecteur ainsi que sur le velours.

- Répliquer la gélose avec les 50 colonies sur le(s) milieu(x) sélecteur(s) puis sur le milieu non sélecteur.

- Incuber à 37°C.

- Mettre le velours dans l'eau de Javel.

- Garder la boîte d'origine à 4°C.

- J5

- Repérer et compter les clones qui ont poussé sur milieu non sélecteur et qui n'ont pas poussé sur milieu sélecteur.

- Faire un antibiogramme sur **2 clones** susceptibles d'avoir curé leur(s) plasmide(s) avec les mêmes antibiotiques que p.2.

- J6

- Lire les antibiogrammes.

- Calculer la fréquence de cure.

- Conclure.

COMPTE RENDU

Les résultats seront présentés sous forme de tableau(x) pour la conjugaison et la cure. Ces résultats seront commentés. **La conclusion devra confronter les expériences de cure et de conjugaison.** Il est recommandé de regarder les résultats de croisement d'un autre binôme (pair si vous êtes impair et vice-versa) ainsi que les différents résultats de cure.

La souche Y est un transconjugant issu des croisements entre les souches R69, R95 et R113. Vous déduirez de quel croisement elle est issue.

III- SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DES ENTEROBACTERIES

Deux souches sont distribuées sur gélose TS à chaque binôme pour les 3 études suivantes :

- antibiogramme interprétatif
- test de Gots : méthode de détection d'enzymes inactivant les antibiotiques
- méthode iodométrique de détection des β -lactamases

NB. Pour les parties A, B et C penser à bien faire sécher vos géloses avant utilisation.

A - ANTIBIOGRAMME PAR DIFFUSION EN GELOSE

- J4 Insemencer 3 géloses Mueller Hinton (MH) avec la même dilution (**voir fiche technique**).

Tester : - Boîte 1 : pénicilline G (PG), amoxicilline (AMX), ticarcilline (TIC), céfalotine (CF), céfoxitine (FOX) et ceftazidime (CAZ).

Déposer le disque AMC (amoxicilline + acide clavulanique) sur la boîte à l'aide d'une pince selon les indications données lors de la séance de TP.

- Boîte 2 : acide nalidixique (NA), péfloxacin (PEF), streptomycine (S), kanamycine (K), sulfamides (SSS) et triméthoprime (TMP).

- Boîte 3 : tétracycline (TE), chloramphénicol (C), rifampicine (RA), vancomycine (VA), pristinamycine (PT) et métronidazole (MTR).

Insemencer un bouillon TS avec une colonie de chacune des souches distribuées.

Incuber 24h à 37°C.

- J5 Lire les antibiogrammes, donner les catégories cliniques (S/R/I) et interpréter les mécanismes de résistance (voir fiche technique).

Se communiquer entre binôme les résultats de lecture des antibiogrammes.

B - TEST de GOTS : détection d'enzymes inactivant les antibiotiques

- Principe

Si l'on cultive une souche productrice d'une enzyme inactivant un antibiotique sur une gélose renfermant cet antibiotique et ensemencée au préalable avec une souche indicatrice (sensible à cet antibiotique), la production d'enzyme provoquera une dégradation de l'antibiotique dans le milieu de culture et se traduira par la croissance de la souche indicatrice autour de la souche productrice.

Cette technique est utilisable pour mettre en évidence les β -lactamases, les chloramphénicol-acétyl transférases et les enzymes inactivant les macrolides.

- **Protocole** : Technique en « feuille de trèfle » :

- J5

D'après les résultats de l'antibiogramme, choisir 1 ou 2 antibiotiques pour lesquels un test de Gots semble intéressant. Insemencer en conséquence 1 ou 2 géloses MH (comme pour un antibiogramme, cf. fiche technique) avec la souche indicatrice *Micrococcus luteus* multisensible.

Quand la boîte est totalement sèche, placer au centre un disque d'antibiotique avec une pince, puis

- effectuer une strie partant du disque avec une colonie des souches à étudier.
- procéder de même avec une souche témoin positif et avec une souche témoin négatif.
- incubé 24 heures à 37°C.

- J6

Lecture des boîtes : rechercher un éperon caractéristique dans le diamètre d'inhibition de la souche indicatrice.

C - DETECTION DE β -LACTAMASES PAR LA METHODE IODOMETRIQUE EN GEL:

- Principe de la méthode iodométrique

On coule un gel d'agarose renfermant de l'amidon, une solution iodo-iodurée et de la benzylpénicilline (pénicilline G) en milieu tamponné à pH 7. L'iode forme un complexe de couleur violet foncé avec l'amidon.

Lorsque la benzylpénicilline est hydrolysée par une β -lactamase, l'acide pénicilloïque produit réduit l'iode et le déplace de l'amidon ce qui entraîne une décoloration du gel.

Le diamètre de décoloration est proportionnel à la quantité d'enzyme et à son activité.

- Protocole

- J5

- Préparation du gel

A 15 mL de gel d'agarose et d'amidon en surfusion à 55°C, ajouter 0.45 mL d'une solution de benzylpénicilline à 10g/L et 0.3 mL de solution iodo-iodurée. Couler dans une boîte de Petri.

Laisser solidifier. **Mettre 15 min. au réfrigérateur.**

Quand le gel est bien solidifié, faire 4 puits avec la partie large d'un embout jaune de pipette.

- Dépôt des échantillons sur le gel d'amidon

Déposer dans chaque puits 50 μ L de suspension bactérienne :

- culture en bouillon TS pour le témoin +
- culture en bouillon TS pour le témoin -
- culture en bouillon TS des souches à tester

Laisser la boîte à T° ambiante.

- J6

- Lecture

Mesurer les diamètres de décoloration. Conclure sur la présence ou non d'une β -lactamase.

Le compte rendu doit souligner quel est le profil de résistance aux antibiotiques des souches étudiées, les résistances naturelles et acquises, les mécanismes de résistance possibles et ceux avérés par les tests mis en oeuvre.