



Travail de Fin d'Études
Catégorie **Paramédicale**

**Caractérisation génotypique et
phénotypique des souches S1 et S1H de
la bactérie *Rhodospirillum rubrum* dans
le cadre du projet MELiSSA.**

Maître de stage : Dr. Felice Mastroleo

Promoteur : Mr. Erik Toussaint

Présenté par

DE GREEF VITALINE

En vue de l'obtention du

grade de Bachelier –

Technologue de laboratoire
médical

Section Biologie Médicale

Année académique 2013-2014

Site de Fleurus



Travail de Fin d'Études
Catégorie **Paramédicale**

**Caractérisation génotypique et
phénotypique des souches S1 et S1H de
la bactérie *Rhodospirillum rubrum* dans
le cadre du projet MELiSSA.**

Maître de stage : Dr. Felice Mastroleo

Promoteur : Mr. Erik Toussaint

Présenté par

DE GREEF VITALINE

En vue de l'obtention du

grade de Bachelier –

Technologue de laboratoire
médical

Section Biologie Médicale

Année académique 2013-2014

Site de Fleurus

Alors que ce travail de fin d'étude se termine, je me suis rendu compte que cette merveilleuse expérience n'aurait pu se réaliser sans un grand nombre de personnes. Ce petit mot est donc dédié à toutes ces personnes qui ont été présentes à mes côtés durant ce stage.

Premièrement, je tiens à remercier particulièrement Monsieur Mastroleo Felice, qui m'a permis de réaliser mon stage au sein du SCK•CEN. Je le remercie, entre autres, de m'avoir appris à mener à bien un travail de recherche, pour avoir été mon mentor, en me conseillant et en m'épaulant tout au long de la durée de mon stage.

Je tiens à remercier toute l'équipe de microbiologie, qui m'a accueillie comme l'une des leurs dans leur laboratoire en espérant ne pas les avoir trop bousculés dans leurs habitudes. Parmi cette équipe je remercie tout particulièrement Madame Condori Catachura Sandra, qui m'a accompagnée tout au long de mon stage à travers le laboratoire, qui m'a donné sa confiance, ses connaissances et son amitié. Je lui souhaite également beaucoup de succès dans la suite de ses projets.

Je tiens également à remercier toutes ces personnes, avec qui je n'ai pas vraiment travaillé, mais qui ont été présentes lors de mon stage. Je pense à Madame Baatout Sarah, pour sa bonne humeur perpétuelle et ses précieux conseils ainsi que pour les petites fêtes auxquelles nous avons été conviés. Madame Michaux Arlette et Monsieur Tabury Kevin, pour les conseils pratiques (en français) et leur bonne humeur.

Je remercie plus encore mes camarades de laboratoire, Joye, Salvatore, Delphine, Sotiria et Marie sans qui cette aventure n'aurait pas été pareille. Après les fous rires et les pleurs il en est ressorti de merveilleuses amitiés. Mes colocataires du Dormitory pour leur gentillesse et leur amitié que je n'oublierai jamais.

Je remercie par la même occasion mon promoteur, Monsieur Toussaint Erik, pour ses nombreux conseils ainsi que pour les nombreuses relectures.

Il reste certainement un grand nombre de personnes non citées mais dont l'importance n'est pas moindre car cette expérience a été faite avant tout d'un enrichissement social.

Pour finir, je remercie ma famille de m'avoir soutenu et encouragé lors de cette épreuve parfois périlleuse.

PRÉSENTATION DU CENTRE [1]

INTRODUCTION

Maintenant vieux de plus de 60 ans, le SCK•CEN (Studie centrum voor kernenergie – Centre d'étude de l'énergie nucléaire) représente l'un des plus grands centres de recherche de Belgique. Il compte plus de 700 collaborateurs dont la tâche quotidienne est de se consacrer au **développement d'applications pacifiques de la radioactivité**. Ces applications sont principalement orientées vers le **futur**, et sont destinées au monde médical, industriel et au secteur de l'énergie.

L'entreprise est située à Mol, dans la province d'Anvers, en Belgique. Dans ce domaine grand de 334 ha, uniquement 10% est constitué du site technique proprement dit (réacteurs de recherche, bureaux, laboratoires...).



FIGURE 1:VUE AÉRIENNE ACTUELLE DU SCK•CEN [2]

RECHERCHE FONDAMENTALE ET APPLIQUÉE:

Les recherches sont divisées en trois instituts scientifiques :

- L'institut « Science des Matériaux nucléaires »
- L'institut « Systèmes nucléaires avancés »
- L'institut « Environnement, Santé et Sûreté ».

Il existe également trois thèmes de recherche qui caractérisent leurs activités :

- La sûreté des installations nucléaires
- La gestion durable des déchets radioactifs
- La protection de la population et de l'environnement contre le rayonnement ionisant.

LEUR MISSION:

Leur but est d'ouvrir de nouvelles perspectives à l'énergie nucléaire et aux rayonnements ionisants pour des applications civiles. Cela est mené à bien grâce à une recherche indépendante, fondamentale et appliquée et en proposant également des conseils, des formations, des services et des produits. Leur devise est : « **La recherche dans une optique durable** ».

LEURS VALEURS:

- Responsabilité
- Excellence
- Innovation
- Intégrité
- Durabilité

Ces valeurs sont suivies à l'aide d'une charte d'éthique qui joue le rôle de fil conducteur pour le bon fonctionnement du centre de recherche.

LEURS DIFFÉRENTES INSTALLATIONS DE RECHERCHE :

- VENUS-GUINEVERE et MYRRHA pour le développement de réacteur de 4^{ème} génération.
- Laboratoire de Haute et Moyenne Activité(LHMA) qui étudie les conséquences des irradiations sur les matériaux utilisés dans les installations nucléaires.
- Belgian Reactor 1 (BR1), le plus vieux réacteur de recherche de Belgique (1956)
- Belgian Reactor 2 (BR2), fait partie des plus puissants au monde (1961), est impliqué dans la production de radio-isotopes pour les applications médicales et industrielles.
- Belgian Reactor 3 (BR3) est un prototype de réacteur à eau pressurisée.
- Laboratoires d'analyse nucléaire et chimique contrôlent les doses de radiations soumises aux travailleurs du secteur nucléaire.
- HADES, laboratoire installé à 224m sous le sol étudie les réactions des couches d'argile dans le but potentiel d'en faire une zone d'enfouissement des déchets hautement radioactifs.

TABLE DES MATIÈRES

Présentation du centre [1]	4
Introduction	4
Recherche fondamentale et appliquée:.....	4
Leur mission:.....	5
Leurs valeurs:	5
leurs différentes installations de recherche :	5
Introduction générale :	11
PARTIE THEORIQUE	
1. Le projet MELISSA [3A].....	13
1.1. INTRODUCTION [3B]:	13
1.2. La boucle MELISSA:.....	14
Compartiment I (liquéfacteur):	15
Compartiment II (photohétérotrophe) :	15
Compartiment III (nitrificateur):	16
Compartiment IV (photosynthétique):.....	16
Compartiment V (ÉQUIPAGE):.....	16
2. Rhodospirillum rubrum [7],[8],[9]	17
2.1. caractéristiques principales	17
2.2. Métabolisme [12].....	19
2.3. Les pigments [13].....	20
2.4. Utilisation [13]	22
3. Techniques utilisées.....	22
3.1. La courbe de croissance [15]	22
Introduction	22
Méthode de mesure:	24
3.2. La PCR [17].....	25
3.3. Design et analyse des primers.....	28
3.4. test des primers par électrophorèse.....	28
3.5. Le comptage viable par cytométrie en flux [21a].....	29
3.6. dosage de pigments [13].....	31
MATÉRIEL ET MÉTHODES	
1. mise en culture de Rhodospirillum rubrum.....	33
Milieu de culture : SISTROM Succinate liquide	33
1.1. Matériel :.....	33
1.2. Composés :.....	33
Base du milieu Sistrom:	33

Solution C:.....	33
Solution des éléments en trace:.....	34
Autres solutions:.....	34
1.3. Préparation:	34
Solution C:.....	34
Solution des éléments en trace :.....	35
Autres solutions:.....	35
1.4. Ajustement du pH:.....	36
1.5. Stérilisation:.....	36
1.6. Conservation:	36
2. Pré-cultures	36
1.1. Principe :.....	36
1.2. Matériel :.....	36
1.3. Protocole :.....	37
3. Cultures	37
3.1. Principe :.....	37
3.2. Matériel :.....	37
3.3. Protocole :.....	37
4. Courbe de croissance	38
4.1. Principe :.....	38
4.2. Matériel :.....	38
4.3. Protocole :.....	38
5. Test d'axénicité.....	39
5.1. Principe :.....	39
5.2. Matériel:.....	39
5.3. Protocole :.....	39
6. Test de la thréonine.....	40
6.1. Principe :.....	40
6.2. Matériel :.....	40
6.3. Protocole:.....	40
Préparation des différentes solutions de thréonine :.....	40
Préparation des milieux de culture :	41
Expérience :	41
Lecture des résultats :	42
7. Test de l'acétoïne	42
7.1. Principe:.....	42
7.2. Matériel :.....	42
7.3. Protocole :.....	42

Préparation des milieux de culture :	42
Expérience :	43
Lecture des résultats :	43
8. Test du glycérol	44
8.1. Principe :	44
8.2. Matériel :	44
8.3. Protocole :	44
Calcul de la masse de glycérol à peser	44
Préparation du milieu Sistrom-glycérol :	45
Expérience :	45
Lecture des résultats :	46
9. Biologie moléculaire : séquençage	46
9.1. Principe général :	46
9.2. Design des primers	46
9.3. Extraction de l'ADN	50
Principe :	50
Matériel :	50
Protocole :	50
9.4. PCR	51
Principe:	51
Matériel:	51
Protocole	51
9.5. électrophorèse sur gel	53
9.6. purification d'adn à partir du gel (QIAquick gel extraction)	54
Principe :	54
Matériel :	54
Protocole:	54
9.7. Préparation des échantillons pour le séquençage	55
Principe:	55
Matériel:	55
Protocole:	55
10. Extraction de pigments	55
10.1. Prinicpe	55
10.2. Matériel	56
10.3. Protocole	56
11. Test de mobilité	57
11.1. Principe :	57
11.2. Matériel :	57

11.3.	Protocole :	57
12.	Microscopie optique.....	58
12.1.	Principe :	58
12.2.	Matériel :	58
12.3.	Protocole :	58
13.	Microscopie électronique.....	58
14.	Comptage cellulaire.....	59
14.1.	Principe :	59
14.2.	Matériel :	59
14.3.	Protocole :	59
14.4.	Cytométrie en flux.....	60
-	Protocole :	60

RESULTATS ET DISCUSSION

1.	Courbe de croissance.....	62
1.1.	Résultat :	62
1.2.	Discussion :	62
2.	PCR- Electrophorèse.....	64
3.	Analyse du séquençage.....	66
4.	Test de la thréonine.....	69
4.1.	Résultats.....	69
4.2.	Discussion :	69
5.	Test de l'acétoïne.....	70
5.1.	Résultats.....	70
5.2.	Discussion.....	71
6.	Test du glycérol.....	72
6.1.	Résultats.....	72
6.2.	Discussion.....	72
7.	Test de mobilité.....	73
7.1.	Résultats.....	73
8.	Life count.....	74
8.1.	Résultats.....	74
Erreur	74
8.2.	Discussion.....	75
9.	Extraction de pigments.....	75
9.1.	Résultats.....	76
9.2.	Discussion.....	77
10.	Microscopie optique.....	78

10.1.	Résultats	78
10.2.	Discussion	78
11.	Microscopie électronique.....	79
11.1.	Résultats	79
11.2.	Discussion	81

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

BIBLIOGRAPHIE

Liste des figures	88
Liste des abréviations	89

ANNEXES

INTRODUCTION GÉNÉRALE :

Voilà maintenant presque 25 ans que le projet MELiSSA, lancé par l'Agence Spatiale Européenne a vu le jour. Ce projet ambitieux est étudié dans le monde entier dans le but de pouvoir réaliser des missions spatiales de longue durée en procurant à l'équipage de l'oxygène, de l'eau purifiée et de la nourriture. Les déchets de l'équipage seront acheminés vers différents compartiments qui permettront ce recyclage. Le compartiment qui nous intéresse plus particulièrement est le second qui est composé de la bactérie pourpre non-sulfureuse, *Rhodospirillum rubrum* ATCC25903 (S1H).

Le rôle de *Rhodospirillum rubrum* sera de dégrader les déchets venant du premier compartiment, notamment les acides gras volatils et les acides aminés. Les conditions dans lesquelles la bactérie va travailler au sein de ce compartiment sont l'anaérobie et la lumière.

Notre but ici sera de comparer deux souches. La première, utilisée dans le cadre du projet MELiSSA, la souche mutante de *Rhodospirillum rubrum* ATCC25903, encore appelée S1H et la seconde, sa souche parente *Rhodospirillum rubrum* ATCC11170. Mais sur quels points les comparer ?

Grâce aux techniques poussées de comparaison de génotype appartenant à la bioinformatique, des mutations ont été révélées dans le génome de S1H par rapport à sa souche parente. Les mutations peuvent être simplement ponctuelles, ou parfois constituer une délétion de plusieurs paires de bases. Ces mutations ont-elles un réel impact sur la bactérie ? Procurent-elles un avantage au sein du cycle MELiSSA ?

Nous allons essayer de répondre à ces questions via des expériences réalisées en laboratoire. Notre première étape sera de confirmer ces mutations à l'aide de plusieurs techniques de biologie moléculaire. Cette étape sera la caractérisation génotypique. Ensuite, nous testerons ces bactéries sur les différents gènes mutés afin de voir si cela a un impact sur son propre comportement. Cette étape sera la caractérisation phénotypique.

Pour des soucis de place et de temps, les différentes expériences seront optimisées dans le milieu Siström dont les conditions d'incubations sont l'aérobie et l'obscurité. Ces conditions faciles d'utilisations et rapides nous permettent d'avoir des résultats qui pourront nous orienter par la suite pour tester *Rhodospirillum rubrum* dans ses conditions expérimentales au sein du cycle MELiSSA : L'anaérobie et la lumière.

PARTIE

THEORIQUE

1. LE PROJET MELISSA [3A]

1.1. INTRODUCTION [3B]:

MELISSA est un acronyme qui signifie « Micro-Ecological Life Support System Alternative » [4]. Développé par l'ESA depuis 1989 [3], ce projet multidisciplinaire a pour but de comprendre les écosystèmes artificiels et de développer des technologies pour réaliser, dans le futur, des missions spatiales habitées de longue durée basées sur un système de support de vie de type régénératif. La boucle MELISSA se base sur l'écosystème simplifié d'un lac, que l'on peut observer en figure 2. Dès lors, les 5 délimitations représentées sur ce schéma sont utilisées pour définir les 5 compartiments qui composent la boucle MELISSA. Son but est de recycler totalement les déchets de l'équipage qui seront emmenés dans les différents compartiments, et donc, mis en présence de différents organismes afin de fournir de l'eau épurée, de la nourriture fraîche et de l'oxygène à l'équipage. L'ensemble des compartiments sont mis en relation, les échanges entre ceux-ci forment alors l'écosystème artificiel.

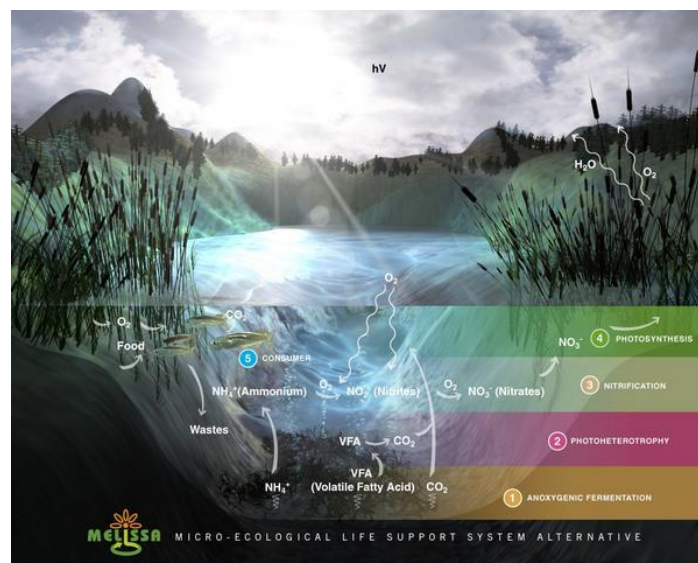


FIGURE 2: ECOSYSTÈME D'UN LAC AFRICAIN COMME MODÈLE POUR MELISSA [4]

1.2. LA BOUCLE MELISSA:

Comme expliqué précédemment, la boucle est composée de 5 compartiments tous étroitement interconnectés (Voir figure 3). Les premiers compartiments (I → III) contiennent des bactéries qui ont été choisies minutieusement pour leur action de dégradation des déchets. Le choix de bactéries est primordial, leurs activités métaboliques doivent être parfaitement connues et maîtrisées afin d'avoir le contrôle sur le système. Ainsi, les déchets passent d'un compartiment à l'autre et sont dégradés de manières différentes. Le compartiment IV est composé des plantes supérieures (IVb) et de cyanobactéries (IVa) qui permettent la production de nourriture et d'O₂. Et enfin, le compartiment V est composé de l'équipage, les consommateurs.

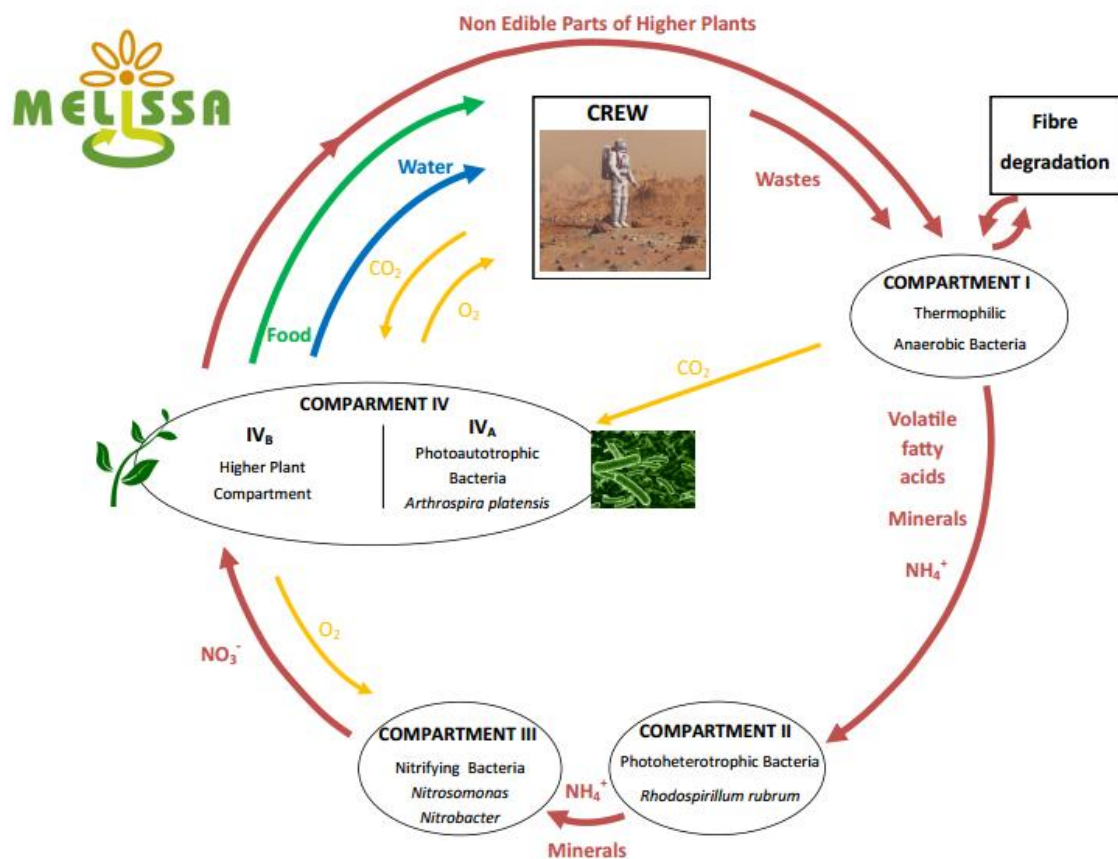


FIGURE 3: LE SCHÉMA SIMPLIFIÉ DE LA BOUCLE MELISSA (SOURCE: ESA).

COMPARTIMENT I (LIQUÉFACTEUR):

Ce compartiment va récolter directement des déchets de l'équipage comme les fèces, l'urine ou encore les parties non comestibles des plantes supérieures venant du compartiment précédent (compartiment IV).

Celui-ci a pour but de dégrader les différents déchets en ammonium (NH_4^+), H_2 , CO_2 , acides gras volatils et minéraux. Cette dégradation se réalise grâce à des bactéries **anaérobies thermophiles**. La dégradation s'effectue pour trois grands domaines : la protéolyse, la saccharolyse et la cellulolyse.

Au début du projet MELiSSA, des bactéries mésophiles étaient utilisées dans ce compartiment. Cependant un faible pourcentage de l'ordre de 15% de dégradation était observé. Les mesures prises en compte, ils augmentèrent le nombre de bactéries et décidèrent de travailler avec plusieurs souches autochtones, bactéries qui viennent toutes d'un même endroit. Cet arrangement augmente considérablement l'efficacité du compartiment avec une protéolyse atteignant 70% ainsi qu'une dégradation des fibres élevée à 44%. De plus, le fait de travailler à haute température (55°C) permet d'éliminer les pathogènes éventuellement présents dans les déchets.

Des études sont actuellement en cours afin de résoudre certains problèmes persistants. En effet, la dégradation du matériel fibreux reste extrêmement lente. De plus il est difficile d'extraire les composés non-dégradés afin de leur soumettre un traitement plus spécifique.

COMPARTIMENT II (PHOTOHÉTÉROTROPHIQUE) :

Ce compartiment, placé directement après le compartiment I, a pour but de récolter ce qui a été dégradé par ce premier compartiment (NH_4^+ , minéraux, acides gras volatils, H_2).

Ces déchets sont pris en charge par la bactérie *Rhodospirillum rubrum* ATCC 25903 (S1H) qui va consommer les acides gras volatils. De plus, celle-ci va dégrader les acides aminés en ammonium, utiles pour le compartiment suivant. La bactérie va travailler dans des conditions d'**anaérobies** en présence de **lumière**.

COMPARTIMENT III (NITRIFICATEUR):

Ce compartiment, dans la suite du compartiment III récupère les minéraux et l'ammonium. Sa principale fonction sera de transformer cet ammonium en nitrate.

L'ammonium est pris premièrement en charge par *Nitrosomonas europaea* ATCC19178 qui va oxyder l'ammonium en nitrites et ces nitrites sont alors pris en charge par *Nitrobacter wynogradskyi* ATCC25391 qui va oxyder les nitrites en nitrates. Le compartiment est donc composé d'un mélange de bactéries afin d'oxyder complètement l'ammonium en nitrate pour qu'il soit disponible pour le compartiment suivant.

COMPARTIMENT IV (PHOTOSYNTHÉTIQUE):

Le compartiment IV a la particularité d'être divisé en deux parties. L'une contient les plantes supérieures (IVb) et l'autre contient les bactéries photoautotrophes ou cyanobactéries (*Arthrospira sp.* PCC8005).

Ce compartiment est destiné à la régénération de l'air en produisant de l'O₂ à partir du CO₂ rejeté par l'équipage et par le compartiment I. Ce n'est pas son unique rôle car celui-ci permet également de produire une source alimentaire variée. Variée car les plantes supérieures peuvent être de différents types comme le blé, la tomate, les pommes-de-terre, etc et *Arthrospira* est un complément alimentaire aux multiples propriétés nutritives bien connues [6].

COMPARTIMENT V (ÉQUIPAGE):

Et enfin, voici le dernier compartiment qui boucle le cycle. Celui-ci est composé de l'équipage. Le cycle permet donc en finalité de recycler l'eau et l'air ainsi que de nourrir l'équipage avec les produits du compartiment IV, alors que leurs propres déchets sont quant à eux, la matière première du compartiment I.

2. RHODOSPIRILLUM RUBRUM [7],[8],[9]

2.1. CARACTÉRISTIQUES PRINCIPALES

Rhodospirillum rubrum est une bactérie pourpre non sulfureuse. Cette catégorie de bactéries a été appelée de la sorte car ils pensaient qu'elles ne pouvaient utiliser le soufre comme donneur d'électrons pour la réduction du CO₂. Cependant, le soufre peut être utilisé par la plupart de ces bactéries, seulement, dans une quantité moindre par rapport aux bactéries « sulfureuses ». La taxonomie de *R. rubrum* est la suivante :

Règne	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	Alphaproteobacteria
Ordre	Rhodospirillales
Famille	Rhodospirillaceae
Genre	Rhodospirillum
Espèce	<i>Rhodospirillum rubrum</i>

FIGURE 4: TAXONOMIE DE *R.RUBRUM*

Cette bactérie, longue de 3 à 10µm et à peine large d'1 µm est GRAM négative, comme toutes les bactéries du phylum des Protéobactéries. Elles adoptent généralement une forme de spirale ou sont parfois simplement incurvées. Les colonies adoptent une couleur pourpre car elles contiennent des pigments caroténoïdes et de la bactériochlorophylle. De plus, ces bactéries sont mobiles, elles sont flagellées au niveau polaire. Elles effectuent la fission binaire pour se diviser et possèdent des membranes photosynthétiques qui leur permettent d'effectuer la photosynthèse. [10]



FIGURE 5: *R. RUBRUM* AU MICROSCOPE APRÈS COLORATION GRAM [11]

Rhodospirillum rubrum possède un nom qui décrit parfaitement son genre. De l'ancien Grec « rhodon » qui signifie rose et du Latin, « spira » qui signifie spire et « rubrum » qui signifie rouge.

La souche parente S1 (ATCC 11170) a été désignée comme le néotype de *R. rubrum* en 1971 par Pfenning et Trüper. La souche S1H (ATCC 25903) est quant à elle un mutant naturel de *R. rubrum* S1 utilisée dans le second compartiment du cycle MELiSSA. [10]

2.2. MÉTABOLISME [12]

Unique dans de nombreux domaines, sa plus grande particularité réside dans un métabolisme très diversifié que l'on peut représenter comme suit :

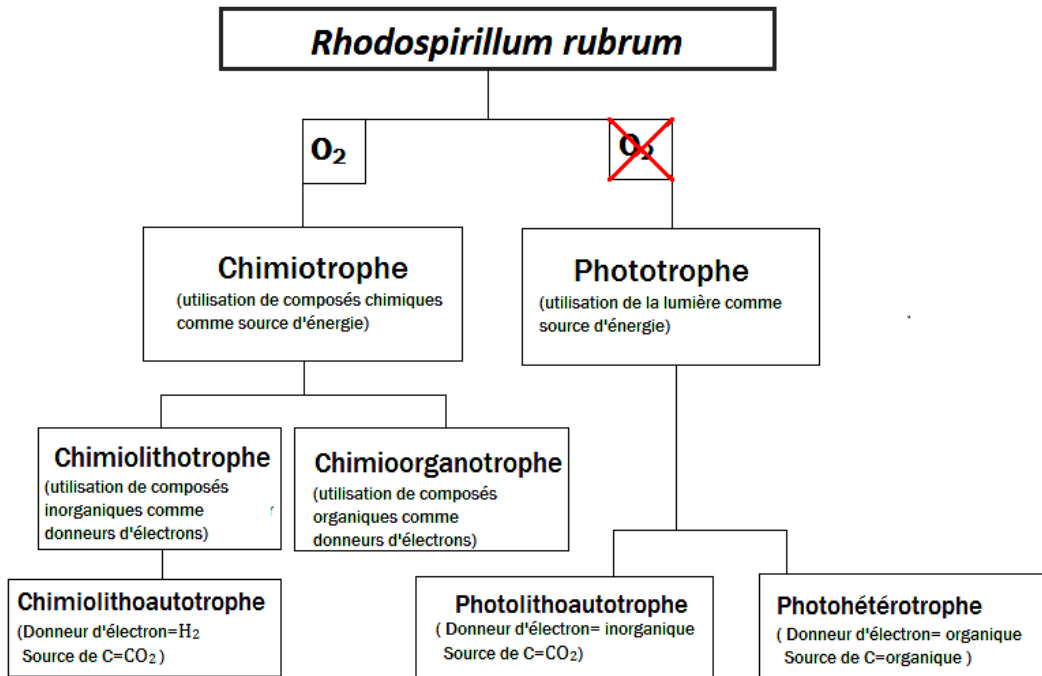


FIGURE 6: MÉTABOLISME DE *R. RUBRUM* [12]

La partie la plus intéressante pour le projet MELiSSA est que *R. rubrum* a la capacité d'être photohétérotrophe, cela signifie qu'elle utilise la lumière comme source d'énergie et que la source de carbone est organique. Ce métabolisme se réalise en anaérobie, cette caractéristique est importante car cela exclut la consommation d'oxygène, laissant dès lors celui-ci majoritairement à l'équipage.

Dû à cette grande diversité métabolique, nous pouvons retrouver *R. rubrum* à de nombreux endroits comme l'eau stagnante, les lacs, les eaux usées, au niveau des usines de traitement des eaux usées, des sédiments ou encore au niveau de sols humides, etc. se développant principalement dans les endroits contenant beaucoup de matière organique soluble. De cette propriété, cela en fait un excellent candidat pour traiter les eaux usées venant du premier compartiment du cycle MELiSSA.

2.3. LES PIGMENTS [13]

Rhodospirillum rubrum possède des pigments qui la rendent capable de faire la photosynthèse. Les principaux pigments sont représentés par les caroténoïdes et la bactériochlorophylle. Cette dernière, comparé aux chlorophylles des plantes, absorbent la lumière à des longueurs d'onde plus grandes.

Organisme	Chlorophylles				Bactériochlorophylles						Caroténoïdes	Phycobiliprotéines	
	a	b	c	d	a	b	c	d	e	g			
Eucaryotes													
Mousses	+	+	-	-								+	-
Algues vertes	+	+	-	-								+	-
Algues brunes	+	-	+	-								+	-
Algues rouges	+	-	-	+								+	+
Procaryotes													
Cyanobactéries	+	-	-	+								+	+
Bactéries pourpres sulfureuses					+	+	-	-	-	-		+	-
Bactéries pourpres non- sulfureuses					+	+	-	-	-	-		+	-

FIGURE 7: DISTRIBUTION DES PIGMENTS [14]

LA BACTÉRIOCHLOROPHYLLE:

La bactériochlorophylle, encore appelée chlorophylle bactérienne a un rôle important dans la phosphorylation cyclique, elle occupe une place centrale en tant que photopigment. La bactériochlorophylle a (BChl a) est l'unique bactériochlorophylle synthétisée par *Rhodospirillum rubrum*. Cette molécule est représentée en figure 7, sa structure est presque similaire à celle de la chlorophylle végétale. Comparé aux chlorophylles végétales qui absorbent la lumière dans le visible, la bactériochlorophylle absorbe la lumière jusque dans l'infrarouge.

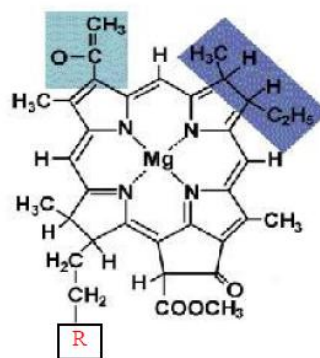


FIGURE 7: MOLÉCULE DE BACTÉRIOCHLOROPHYLLE A [13]

LES CAROTÉNOÏDES :

Leur rôle principal est de collecter la lumière et de la transférer aux bactériochlorophylles. Chez *R. rubrum*, le caroténoïde principal est la spirilloxanthine.

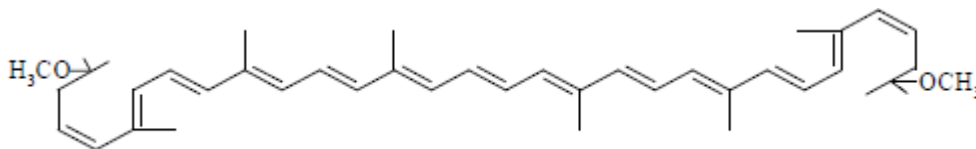


FIGURE 8: MOLÉCULE DE SPIRILLOXANTHINE [13]

2.4. UTILISATION [13]

Grâce à son métabolisme polyvalent, *R. rubrum* est utilisé dans de nombreux domaines :

- Le traitement des eaux usées
- Production de biomasse comme source de nourriture animale
- Production d'hydrogène
- Production de biopolymères
- Production de fertilisants
- Production de vitamines ou autres molécules organiques

3. TECHNIQUES UTILISÉES

3.1. LA COURBE DE CROISSANCE [15]

INTRODUCTION

La croissance est définie comme étant « l'augmentation du nombre de cellules microbiennes dans une population ». La croissance bactérienne peut-être séparée en 4 grandes parties représentées et expliquées ci-dessous.

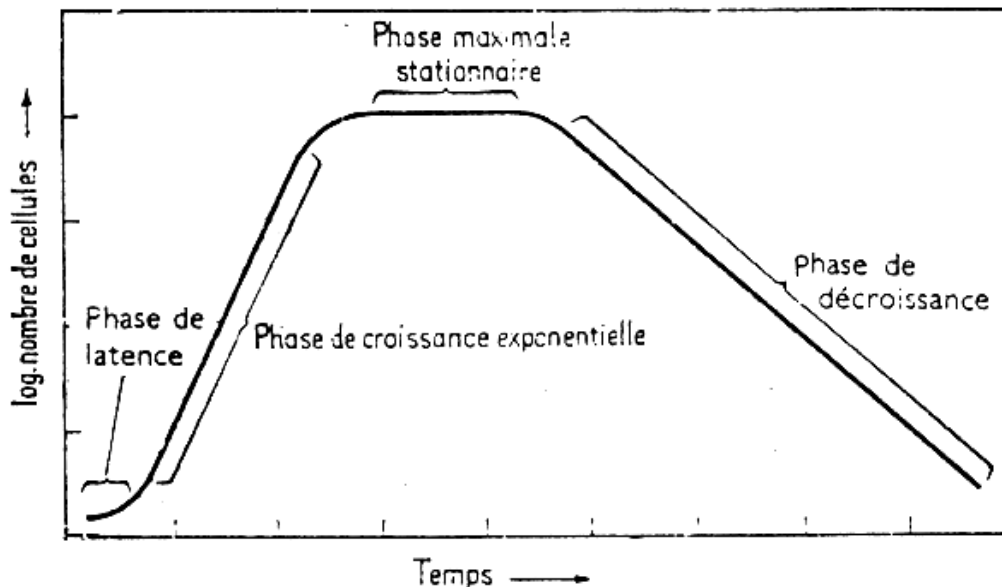


FIGURE9: REPRESENTATION D'UNE COURBE DE CROISSANCE [8]

1ÈRE PARTIE OU PHASE DE LATENCE:

Avant de grandir, les bactéries ont besoin de s'acclimater au nouvel environnement. Quand une population microbienne est inoculée dans un nouveau milieu, la croissance ne commence pas immédiatement mais après une certaine période = la phase de latence.

2ÈME PARTIE OU PHASE DE CROISSANCE EXPONENTIELLE:

Chaque cellule se divise en deux nouvelles cellules et chacune d'entre elles se divisent à nouveau en deux nouvelles cellules. Nous observons alors une croissance exponentielle. Les cellules qui se trouvent dans cette phase sont dans leur meilleur état de santé.

3ÈME PARTIE OU PHASE MAXIMALE STATIONNAIRE:

La phase exponentielle ne peut durer indéfiniment. La limitation est due au fait que le milieu n'est plus assez riche, ou en d'autres mots, qu'il manque quelque chose d'essentiel à la croissance bactérienne dû à la consommation des ressources disponibles. Un autre facteur limitant la croissance est le fait que des déchets bactériens s'accumulent dans le milieu. Ces déchets atteignent un seuil de toxicité pour les bactéries, ce qui provoque leur inhibition. En conclusion, les bactéries manquent de nourriture, ou deviennent inhibées par leurs propres déchets, la population atteint donc une phase stationnaire. Lors de cette phase, il n'y a plus d'augmentation nette, ni de diminution. Malgré cela, les fonctions cellulaires, comme le métabolisme énergétique, continuent.

4ÈME PARTIE OU PHASE DE DÉCROISSANCE:

Si l'incubation continue, après avoir atteint la phase stationnaire, les cellules vont commencer à mourir. Dans certains cas, cette phase peut être accompagnée de lyse cellulaire, encore appelée : phase de mort cellulaire.

MÉTHODE DE MESURE:

La mesure de turbidimétrie d'une croissance bactérienne se réalise à l'aide d'un spectrophotomètre. Une lumière incidente (monochromateur à 680nm) est envoyée sur un l'échantillon. Cette longueur d'onde particulière est utilisée car, sachant que *R. rubrum* possède des pigments, il était important de trouver une longueur d'onde d'absorbance caractéristique de la bactérie elle-même et non de ses pigments. Plus l'échantillon contiendra de bactéries, plus la lumière sera absorbée par celles-ci et donc la cellule photoélectrique recevra moins de lumière transmise.

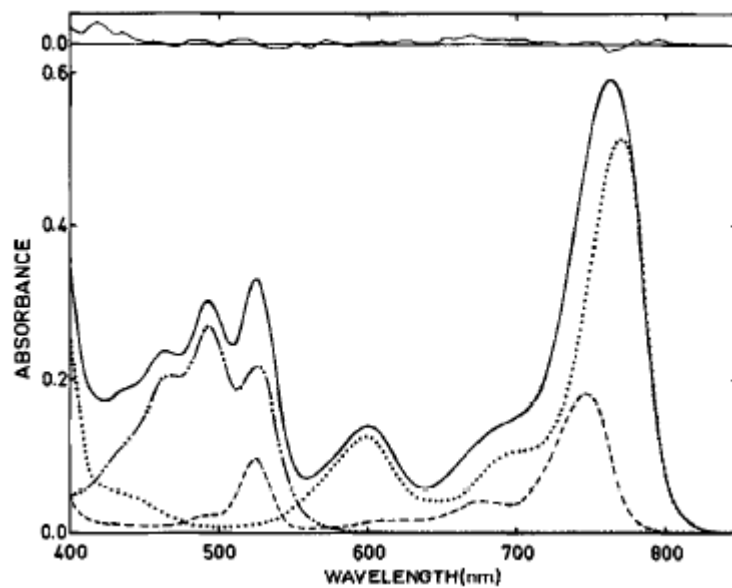


FIGURE 8: REPRÉSENTATION DU SPECTRE D'ABSORPTION DE *R. RUBRUM* DANS LE MÉLANGE ACÉTONE/MÉTHANOL AVEC EN LIGNE CONTINUE L'ADDITION DE TOUS LES PIGMENTS. [16A]

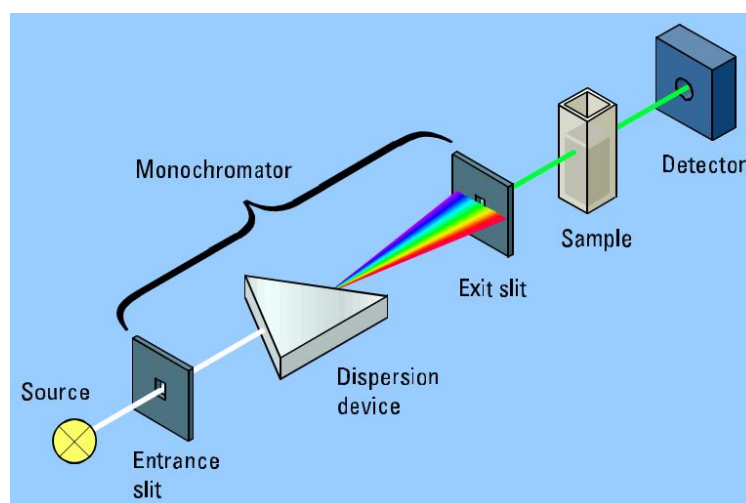


FIGURE 9: SCHÉMA D'UN SPECTROPHOTOMÈTRE [16B]

La spectrophotométrie a pour but de mesurer la capacité d'une solution à absorber la lumière d'une longueur d'onde donnée. La loi de Beer-Lambert exprime la variation de l'intensité lumineuse en fonction de la distance parcourue.

$$E = \varepsilon . C . l$$

La valeur d'extinction mesurée doit toujours se trouver entre 0 et 1 car la loi de Beer-Lambert est dérivée de cette formule :

$$E = -\log \frac{I}{I_0}$$

3.2. LA PCR [17]

La PCR classique:

La technique Polymerase Chain Reaction (PCR) est une technique de répliation ciblée *in vitro*. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. L'ordre de grandeur à retenir est celui du million de copies en quelques heures. C'est généralement suffisant pour une utilisation ultérieure.

Le principe et les conditions expérimentales qui en découlent sont très simples. Il s'agit de réaliser une succession de réactions de répliation d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3-prime pointent l'une vers l'autre. Les amorces ou «primers» en anglais définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier.

On utilise les produits de chaque étape de synthèse comme matrices pour les étapes suivantes, au lieu de les séparer afin de ne réutiliser que la matrice originale. Au lieu d'être linéaire, l'amplification obtenue est exponentielle.

Imaginée par K. Mullis en 1985 (lauréat du Prix Nobel en 1993), la technique connaît un essor considérable à partir de la commercialisation (vers 1988), d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées (la Taq polymérase), qui permet une automatisation de la technique.

Une PCR classique se déroule dans un tube de type eppendorf lui-même placé dans un appareil programmable appelé thermocycleur. Le thermocycleur porte le tube aux

températures voulues pendant les durées programmées (un cycle) et recommence plusieurs fois le même cycle.

Un cycle reproduit trois températures différentes pendant des durées différentes. La durée d'un cycle est de l'ordre de la minute.

Avant la réaction, tous les « acteurs » de la PCR sont introduits dans un même tube :

- l'ADN à amplifier;
 - des oligonucléotides (ou amorces), spécifiques du segment d'ADN voulu;
 - de l'ADN polymérase;
 - et enfin du mélange des quatre désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN.
- Tous sont ajoutés en large excès par rapport à l'ADN.

La séquence cible représente le segment d'ADN qui sera amplifié. Elle est déterminée lors du choix du couple d'amorces. Cette étape est déterminante. Le choix des amorces doit tenir compte de plusieurs paramètres en même temps.

Une amorce doit être constituée de 18 à 28 nucléotides, posséder un pourcentage en GC de 50 à 60%. Leur température d'hybridation (T_m) doit se situer entre 55 et 60°C. Cette dernière peut être évaluée approximativement en utilisant la formule suivante : $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. Dans un couple, les extrémités 3' des amorces ne doivent pas être complémentaires. Elles ne doivent posséder qu'un seul C ou G dans les 4 derniers nucléotides et aucune séquence palindromique ne doit être présente pour éviter la formation de structure secondaire, comme les « hairpin ».

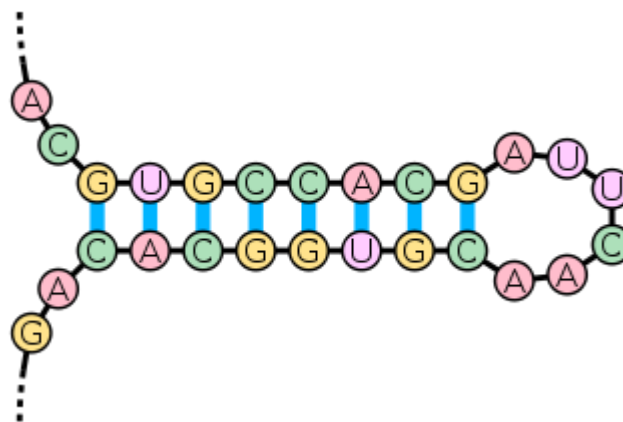


FIGURE 11: EXEMPLE DE STRUCTURE SECONDAIRE "HAIRPIN" [18]

ETAPES D'UN CYCLE D'AMPLIFICATION :

Chaque cycle d'amplification comporte trois étapes :

1) DÉNATURATION : cette première étape consiste à chauffer le milieu réactionnel à environ 94°C pendant 1 à 3 minutes, à cette température l'ADN double brin devient simple brin.

2) HYBRIDATION : la température est abaissée à environ 50°C-65°C pendant 0.5 à 2 minutes pour permettre l'hybridation des amorces aux séquences complémentaires présentes dans la molécule d'ADN.

3) ELONGATION (ou extension des amorces) : la température est élevée à 72°C et est maintenue 1 à 3 minutes pour permettre à l'ADN polymérase de synthétiser de nouveaux brins d'ADN.

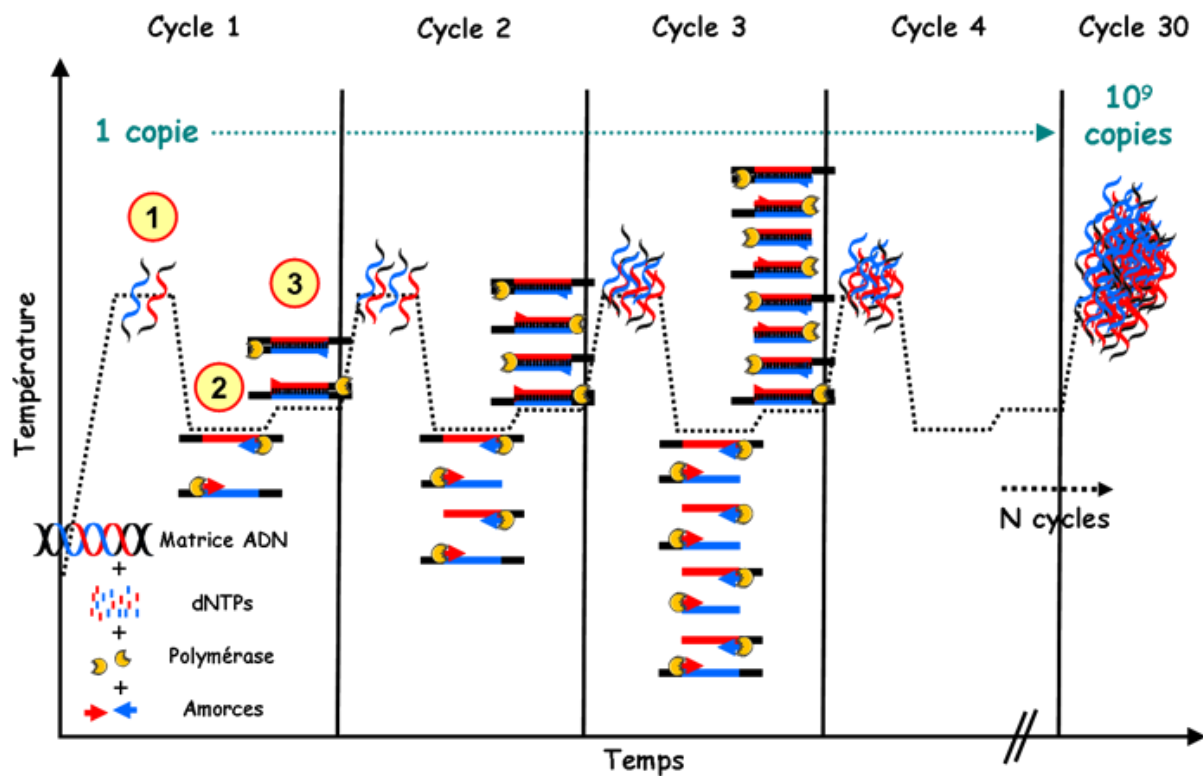


FIGURE 12: SCHÉMA REPRÉSENTANT LE FONCTIONNEMENT DE LA PCR [19]

AMPLIFICATION EXPONENTIELLE :

A la fin de ces 3 étapes, les séquences d'ADN synthétisées servent à leur tour de matrice pour le cycle suivant. Le nombre de cycles effectués est spécifique à chaque PCR et varie entre 30 à 50 cycles. Pour la copie d'un fragment d'ADN, on obtient ainsi 2^n fragments après n cycles, l'augmentation du nombre de molécules est EXPONENTIELLE.

3.3. DESIGN ET ANALYSE DES PRIMERS

Le design de primers ou d'amorces est une étape importante qui précède la PCR. Celle-ci consiste à fabriquer des séquences d'ADN qui englobent le gène d'intérêt afin de pouvoir ensuite l'amplifier. Pour ce faire, une série de programmes sont utilisés (voir la partie matériel et méthodes).

3.4. TEST DES PRIMERS PAR ÉLECTROPHORÈSE

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique qui va nous permettre lors de cette expérience, de séparer l'ADN en fonction de son poids moléculaire. Cette technique est basée sur le fait que les acides nucléiques, chargés négativement, vont migrer à l'aide d'un champ électrique vers la borne positive. Les petits fragments d'ADN, vont migrer plus rapidement à travers les mailles du gel d'agarose tandis que les plus gros fragments seront plus lents [20].



FIGURE 9: APPAREILLAGE POUR ÉLECTROPHORÈSE BIORAD

3.5. LE COMPTAGE VIABLE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX [21A]

Le cytomètre en flux est un automate permettant l'analyse de plusieurs paramètres sur une bactérie qui aura été individualisée à l'aide de la focalisation hydrodynamique.

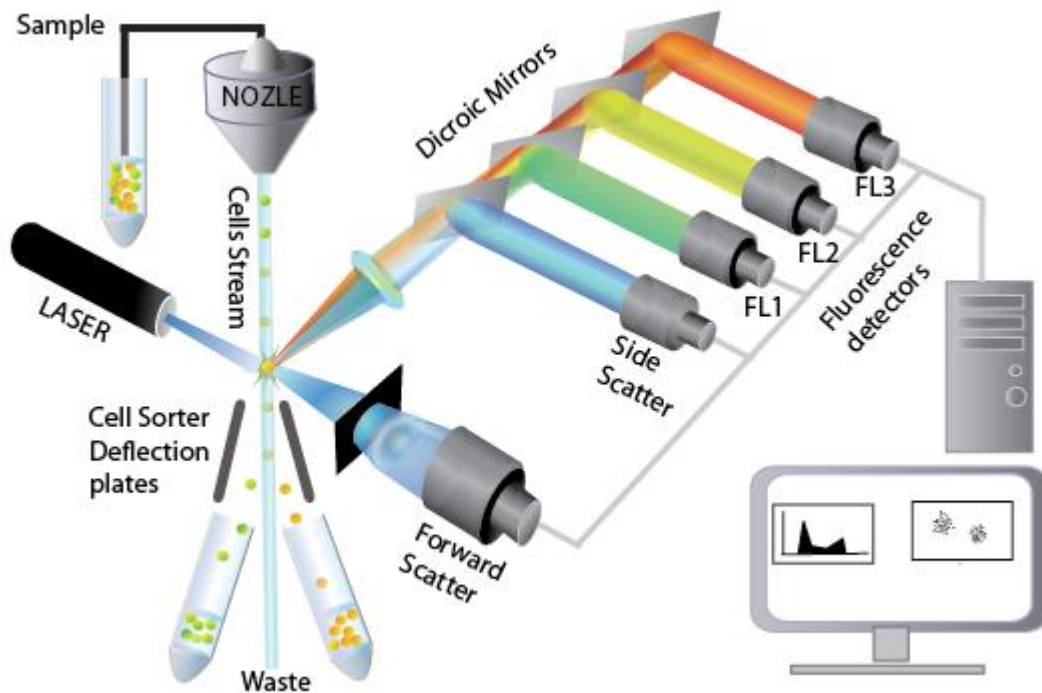


FIGURE 10: REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU CYTOMÈTRE EN FLUX [21B]

Les paramètres mesurés sont:

- Le Forward Scatter (FSC). Celui-ci permet de donner des informations sur la taille relative.
- Le Side Scatter (SSC). Celui-ci permet de donner des informations sur la granularité intracellulaire relative.
- La Fluorescence (FL). Celle-ci permet de donner l'intensité relative de fluorescence.
- La concentration cellulaire permet de donner un comptage absolu.

Le paramètre qui va nous intéresser dans le cadre de la microbiologie et plus précisément dans le comptage viable ou « Live/dead » est la fluorescence. La fluorescence est la propriété qu'ont certaines molécules (fluorochromes) à absorber de l'énergie lumineuse (photons) et de réémettre de l'énergie lumineuse à longueur d'onde plus élevée (Figure 11). Deux marqueurs d'acides nucléiques aux propriétés différentes sont utilisés. Le Syto9 (vert) pénètre la paroi de toutes les bactéries et est détecté par le FL1 alors que l'iodure de propidium (rouge) ne pénètre que les parois endommagées des cellules mortes (ou blessées) et est détecté par le FL3.

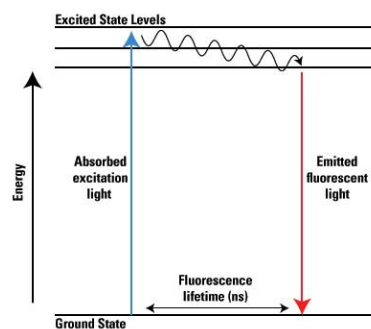


Figure 11: Diagramme de Jablonski [22]

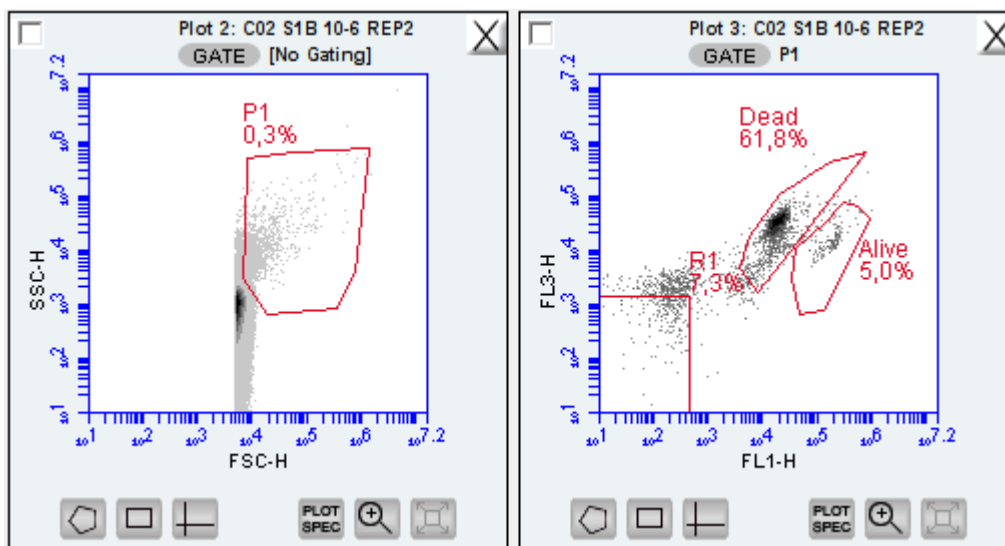


FIGURE 12: EXEMPLE DE RÉSULTAT DE CYTOGRAMME S1 EN PHASE STATIONNAIRE
 À GAUCHE : LA POPULATION D'INTÉRÊT EST CIBLÉE À L'AIDE DU FSC ET SSC
 À DROITE : DANS LA POPULATION D'INTÉRÊT, DISTINCTION ENTRE LES BACTÉRIES VIVANTES ET MORTES

3.6. DOSAGE DE PIGMENTS [13]

Comme vu précédemment, *Rhodospirillum rubrum* contient de nombreux pigments dont la majorité est représentée par la bactériochlorophylle *a* (BChl_a) et les caroténoïdes. Le dosage de ces pigments donne une idée sur l'activité photosynthétique de la bactérie.

La quantification de la concentration des pigments est ici réalisée par spectrophotométrie. Avant de pouvoir quantifier, il existe une étape importante: l'extraction à l'aide d'un mélange de solvants organiques. Cette étape révèle quelques inconvénients comme notamment l'évaporation du solvant utilisé pendant les étapes de centrifugation ou même une extraction inachevée.

Une fois les pigments extraits, le dosage pourra être réalisé grâce à la formule de Beer-Lambert qui lie l'absorbance mesurée et la concentration en pigments suivant cette formule :

$$E_{680\text{nm}} = C_{\text{pigment}} \cdot \epsilon_{\text{pigment}} \cdot l$$

E=Extinction mesurée à l'aide du spectrophotomètre

C=La concentration en pigments

ε=Le coefficient d'extinction du pigment

l= La longueur du trajet optique

**MATERIEL ET
METHODES**

1. MISE EN CULTURE DE RHODOSPIRILLUM RUBRUM

MILIEU DE CULTURE : SISTROM SUCCINATE LIQUIDE

SOP version 01 du 11/01/2010

Auteur : Liselotte Leysen du SCK•CEN

1.1. MATÉRIEL :

- Balance
- Balance analytique
- Pipettes
- Autoclave

1.2. COMPOSÉS :

BASE DU MILIEU SISTROM:

Component	Amount
Milli Q water	918 mL
L-cystine	30 g

SOLUTION C:

Component	MM (g/mol)	Concentration in stock solution (g/1000mL)
Nitrilotriacetic acid	191,14	10
MgSO ₄ 7H ₂ O	246,47	29,5
CaCl ₂ 2H ₂ O	147,01	3,835
FeSO ₄ 7H ₂ O	278,01	0,099
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	1235,86	0,00925
Nicotinic acid	123,11	0,05
Thiamine HCl	337,27	0,025
Biotin	244,31	0,0005 ou 500µL d'une solution à 0,1%

SOLUTION DES ÉLÉMENTS EN TRACE:

Component	MM (g/mol)	Concentration in stock solution (g/1000mL)
ZnSO ₄ 7H ₂ O	287,56	1,095
EDTA	292,24	0,250
FeSO ₄ 7H ₂ O	278,01	0,500
MnSO ₄ H ₂ O	169,01	0,154
CuSO ₄ 5H ₂ O	249,69	0,0892
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	291,03	0,0248
H ₃ BO ₃	61,63	0,0114

AUTRES SOLUTIONS:

Component	MM (g/mol)	Concentration in stock solution (g/1000mL)
KH ₂ PO ₄	136,09	1M
(NH ₄) ₂ SO ₄	132,14	10%
Na ₂ succinate 6H ₂ O	270,10	10%
L-glutaminc acid	147,13	5%
L-aspartic acid	133,10	1%
NaCl	58,44	5%

1.3. PRÉPARATION:

SOLUTION C:

Préparer 1000mL de solution C.

Dissoudre en premier lieu l'acide Nitrilotriacétique dans environs 800mL d'eau Milli Q et ajuster le pH jusqu'à 6,8-7,0 en utilisant du KOH.

Les autres composés peuvent alors être pesés et ajoutés à la solution.

Pour la Biotine, préparer une solution à 0,1%. Ajouter 500µL de cette solution.

→ Compléter la solution à 1000mL avec de l'eau Milli Q.

SOLUTION DES ÉLÉMENTS EN TRACE :

Préparer 100ml de la solution d'éléments traces.

Peser les différents produits et les dissoudre dans environ 60mL d'eau Milli Q.

→ Compléter la solution à 100mL avec de l'eau Milli Q.

AUTRES SOLUTIONS:

- KH₂PO₄

Préparer une solution de 500mL à 1M. Pour cela, peser 68,045g et les dissoudre dans environ 300mL d'eau Milli Q, et compléter le volume à 500mL.

- (NH₄)₂SO₄

Préparer une solution de 200mL à 10%. Pour cela, peser 20g et les dissoudre dans environ 150mL d'eau Milli Q, et compléter le volume à 200mL.

- Na₂ succinate.6H₂O

Préparer une solution de 500mL à 10%. Pour cela, peser 50g et les dissoudre dans environ 300mL d'eau Milli Q, et compléter le volume à 500mL.

- L-glutamic acid

Préparer une solution de 100mL à 5%. Pour cela, peser 5g et les dissoudre dans environ 60mL d'eau Milli Q, et compléter le volume à 100mL.

- L-aspartic acid

Préparer une solution de 100mL à 1%. Pour cela, peser 1g et les dissoudre dans environ 60mL d'eau Milli Q, et compléter le volume à 100mL.

- NaCl

Préparer une solution de 500mL à 5%. Pour cela, peser 25g et les dissoudre dans environ 300mL d'eau Milli Q, et compléter le volume à 500mL.

1.4. AJUSTEMENT DU pH:

Le pH de la solution C a été ajusté lors de l'ajout du premier composé. La solution de KH_2PO_4 doit être ajustée à un pH de 6,8.

Les solutions d'acides aminés (L-aspartate et L-glutamate) doivent être ajustées à un pH de 7,0. Pour ajuster le pH, utiliser des pastilles de KOH en les ajoutant une-à-une dans la solution. Quand le pH voulu est proche, ajuster avec une solution de KOH 1M goutte par goutte.

1.5. STÉRILISATION:

La solution C ainsi que la solution « trace elements » est stérilisée à l'aide d'un filtre 0,2 μm .

Les autres solutions sont autoclavées à une température de 121°C pendant 20 minutes.

1.6. CONSERVATION:

Garder toutes les solutions à 4°C jusqu'à utilisation. Avant utilisation, laisser les solutions revenir à température ambiante.

2. PRÉ-CULTURES

1.1. PRINCIPE :

La pré-culture vient, comme son nom l'indique avant la culture. Celle-ci a pour but de préparer l'échantillon. Elle permet d'adapter les bactéries à un nouvel environnement (du milieu gélosé au milieu liquide) et également de les rendre apte à une culture de plus grand volume.

1.2. MATÉRIEL :

- Tubes en plastiques de 10mL
- Oëse en platique
- Milieu Sistro
- Pipetus
- Pipette de 10mL
- Souches sur boîte de Petri

1.3. PROTOCOLE :

- 1) Travailler sous conditions stériles sous la hotte à flux laminaire ou près de la flamme après lavage de la paillasse avec de l'Umonium®.
- 2) Remplir les tubes de pré-culture avec 2mL de milieu Siström (les tubes sont remplis à 1/5 de volume afin de conserver des conditions d'aérobies)
- 3) Prélever une colonie à partir des boîtes de pétri (Prendre soin de prélever des colonies identiques en taille et en forme pour les différents répliques biologiques)
- 4) Emulsionner cette colonie dans les 2mL de milieu Siström
- 5) Effectuer au minimum 4 répliques biologiques afin d'avoir pour la suite des résultats reproductibles
- 6) Placer les tubes sur un agitateur dans l'incubateur à 30°C
Conditions Dark Aerobies (DAE)

3. CULTURES

3.1. PRINCIPE :

La culture bactérienne est l'élément de base de toute expérience microbiologique. Elle consiste à donner à la bactérie un milieu contenant de l'espace et des nutriments nécessaires à sa croissance et cela dans des conditions optimales. Dans notre cas, la culture consistera à remplir des flasques avec du milieu Siström où les bactéries provenant des pré-cultures pourront être inoculées et ensuite pousser.

3.2. MATÉRIEL :

- Flasques de culture 250mL
- Pipettes graduées de 25mL
- Micropipette (P1000)
- Pré-cultures bactérienne

3.3. PROTOCOLE :

- 1) Travailler sous conditions stériles sous la hotte à flux laminaire ou près de la flamme après lavage de la paillasse avec de l'Umonium®.
- 2) Remplir les flasques avec 50mL de milieu Siström (1 :5 vol/vol pour les conditions aérobies)
- 3) Inoculer le milieu avec 500µL de pré-culture bactérienne (1%)
- 4) Les cultures sont mises à l'incubateur à 30°C sous DAE avec agitation constante

4. COURBE DE CROISSANCE

4.1. PRINCIPE :

La courbe de croissance consiste à prendre des mesures de densité optique (DO) de la souche à partir de culture à différents moment de sa croissance pour observer la courbe que celle-ci suit. La courbe obtenue pourra nous informer sur les différentes phases caractéristiques d'une courbe de croissance et ainsi, par exemple savoir quand celle-ci est en phase exponentielle pour les différentes expériences car c'est à ce moment qu'elle est la plus active métaboliquement.

4.2. MATÉRIEL :

- Flasque de cultures de 200mL
- Pipette (P1000) + tips
- Spectrophotomètre : ULTROSPEC 3000, UV/visible Spectrophoometer, lecture à 680nm
- Cuvettes de lecture
- Hotte à flux laminaire ou flamme pour travailler en conditions stériles

4.3. PROTOCOLE :

- 1) Allumer le spectrophotomètre (cela prend quelques minutes le temps de faire une calibration interne)
- 2) Régler la longueur d'onde à 680nm
- 3) Faire un zéro interne de la machine sans cuvette
- 4) Travailler sous conditions stériles sous la hotte à flux laminaire ou près de la flamme après lavage de la paillasse avec de l'Umonium®.
- 5) Prélever stérilement à l'aide d'une pipette 1mL de culture de chaque réplica qu'on place dans une cuvette de lecture
- 6) Placer la cuvette dans le spectrophotomètre
- 7) Lire l'extinction de l'échantillon
- 8) Les mesures se font à différents moments clés de la croissance bactérienne.

Après optimisation, voici les temps où les mesures seront prises :

Temps (heures)	0	16	24	40	42	44	46	48	64	72	88	96	112	120
----------------	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----

5. TEST D'AXÉNICITÉ

5.1. PRINCIPE :

Le test d'axénicité a pour but de vérifier si les cultures sont bien exemptes de contamination. Une culture axénique ne contiendra que notre souche d'intérêt : *Rhodospirillum rubrum* et ne contiendra aucun contaminant [23]. Ce test consiste à ensemençer toutes les 24h, des boîtes de pétri contenant du milieu LB. Ce milieu riche laissera pousser n'importe quel contaminant si celui-ci est présent. Il sera important de garder ces boîtes environs une semaine car il existe deux types de contaminants : ceux à croissance rapide, qui pousseront généralement le lendemain de la mise en culture, et ceux à croissance lente, dont il faudra plusieurs jours avant de les voir pousser.

5.2. MATÉRIEL:

- Oëse en plastique
- Parafilm
- Boîtes de pétri contenant du milieu LB agar
- Hotte à flux laminaire ou flamme pour le travail en milieu stérile
- Cultures à analyser

5.3. PROTOCOLE :

- 1) Désinfecter correctement son plan de travail (hotte à flux laminaire ou paillasse)
 - 2) Travailler en condition stérile
 - 3) Tremper l'oëse stérile dans la culture en veillant à ne pas toucher les bords de la flasque
 - 4) Ensemençer la boîte LB
 - 5) Mettre du parafilm tout autour de la boîte pour éviter qu'elle ne sèche trop vite
 - 6) Incuber les boîtes à 30°C
 - 7) Observer les boîtes tous les jours après ensemençement pendant environ une semaine
- Recommencer ces étapes environs toutes les 48h de la culture.

6. TEST DE LA THRÉONINE

6.1. PRINCIPE :

Le séquençage du génotype nous a montré qu'il y avait une mutation dans la souche S1H par rapport à la souche S1 dans le gène du métabolisme de la thréonine portant le l'appellation Rru_A2877. Afin de pouvoir éventuellement détecter une différence au niveau phénotypique, le principe de cette expérience sera de comparer les deux souches S1 et S1H en testant leur croissance dans plusieurs milieux contenant des concentrations différentes en thréonine [24A].

6.2. MATÉRIEL :

- Spectrophotomètre Eppendorf BioPhotometer
- Plaques 24 puits
- Solutions de L-thréonine à différentes concentrations (1mM, 0,5mM, 0,3mM, 0,1mM) basées sur le travail de Sturani et al. 1963 [24B]
- Pipettes (P1000, P100)
- Parafilm
- Cuvettes de lecture à petit volume
- Pré-culture bactérienne

6.3. PROTOCOLE:

PRÉPARATION DES DIFFÉRENTES SOLUTIONS DE THRÉONINE :

MM thréonine= 119,1192 g/mol

Préparer une solution stock de thréonine à 1M en pesant 5,9559g de thréonine pour 50mL d'eau Milli Q.

Ajuster le pH de la solution à 7, ensuite stériliser cette solution à l'aide de l'autoclave.

A partir de cette solution stock, préparer d'autre solutions moins concentrées :

- 0,1M : 500 μ L de solution stock pour 4,5mL d'eau Milli Q
- 0,3M : 1,5mL de solution stock pour 3,5mL d'eau Milli Q
- 0,5M : 2,5mL de solution stock pour 2,5mL d'eau Milli Q

PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE :

Ces différentes solutions étant préparées, il faut maintenant les ajouter au milieu Sistrom de la sorte :

- 40mL de milieu Sistrom +40 μ L de thréonine 1M

→Milieu contenant de la thréonine à 1mM.

- 40mL de milieu Sistrom +40 μ L de thréonine 0,5M

→Milieu contenant de la thréonine à 0,5mM.

-40mL de milieu Sistrom +40 μ L de thréonine 0,3M

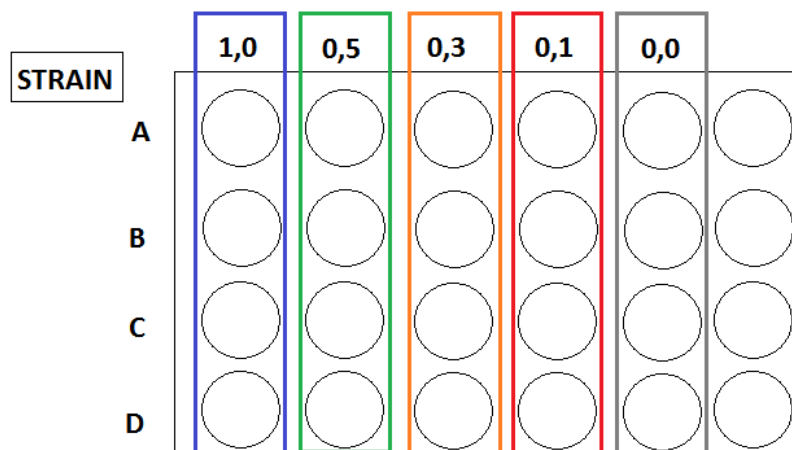
→Milieu contenant de la thréonine à 0,3mM.

- 40mL de milieu Sistrom +40 μ L de thréonine 0,1M

→Milieu contenant de la thréonine à 0,1mM.

EXPÉRIENCE :

Nous utilisons alors une plaque 24 puits pour l'expérience et l'on répartit les différents milieux de la sorte :



- Dans cette **rangée de puits**, on utilise 1mL de milieu SISTROM contenant de la thréonine à 1mM.
- Dans cette **rangée de puits**, on utilise 1mL de milieu SISTROM contenant de la thréonine à 0,5mM
- Dans cette **rangée de puits**, on utilise 1mL de milieu SISTROM contenant de la thréonine à 0,3mM
- Dans cette **rangée de puits**, on utilise 1mL de milieu SISTROM contenant de la thréonine à 0,1mM
- Dans cette **rangée de puits**, on utilise 1mL de milieu SISTROM sans thréonine. Celui-ci jouera le rôle de contrôle positif.

A ces différents puits, ajouter 10µL de pré-culture bactérienne.

Incuber la plaque à 30°C sous DAE en agitation permanente.

Rem : Travailler sous conditions stériles sous la hotte à flux laminaire ou près de la flamme après lavage de la paillasse avec de l'Umonium®.

LECTURE DES RÉSULTATS :

Prélever le volume du puits et l'introduire dans une cuvette de lecture

Lire l'extinction à 600nm → Extrapoler les résultats à 680nm en augmentant de 20% la valeur obtenue.

7. TEST DE L'ACÉTOÏNE

7.1. PRINCIPE:

Le séquençage du génome nous a montré qu'il y avait une mutation dans la souche S1H par rapport à la souche S1 dans le gène du métabolisme de l'acétoïne portant l'appellation Rru_A0932. Afin de pouvoir éventuellement détecter une différence au niveau phénotypique, le but de cette expérience sera de réaliser une courbe de croissance à des pH différents [25], [26].

7.2. MATÉRIEL :

- Spectrophotomètre Eppendorf BioPhotometer
- Plaques 24 puits
- Milieux Sistro à différents pH (5,0/ 5,5/ 6,0/ 6,5 et 7)
- Pipettes (P1000, P100)
- Parafilm
- Cuvettes de lecture à petit volume
- Pré-culture bactérienne

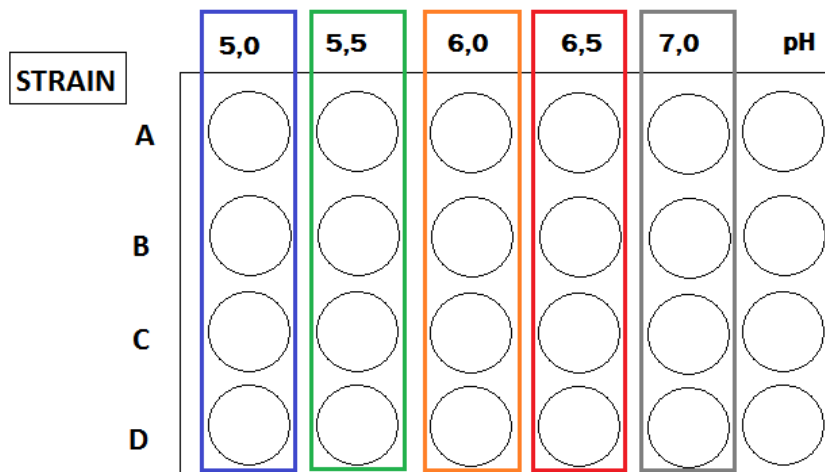
7.3. PROTOCOLE :

PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE :

Le milieu est préparé de façon normale. Le pH est ensuite ajusté pour les différentes solutions à l'aide d'une solution d'HCl 5M, de la façon la plus stérile possible. Le milieu au pH 7 nous servira de contrôle.

EXPÉRIENCE :

Nous utilisons alors une plaque 24 puits pour l'expérience et l'on répartit les différents milieux de la sorte :



- Dans cette rangée de puits, on utilise 1mL de milieu SISTROM à pH 5,0
- Dans cette rangée de puits, on utilise 1mL de milieu SISTROM à pH 5,5
- Dans cette rangée de puits, on utilise 1mL de milieu SISTROM à pH 6,0
- Dans cette rangée de puits, on utilise 1mL de milieu SISTROM à pH 6,5
- Dans cette rangée de puits, on utilise 1mL de milieu SISTROM à pH 7,0, celui-ci jouera le rôle de contrôle positif.

A ces différents puits, ajouter 10 μ L de pré-culture bactérienne.

Incuber la plaque à 30°C sous DAE en agitation permanente.

Rem : Travailler sous conditions stériles sous la hotte à flux laminaire ou près de la flamme après lavage de la paillasse avec de l'Umonium®.

LECTURE DES RÉSULTATS :

Prélever 50 μ L du puits et l'introduire dans une cuvette de lecture à différents moments de la courbe de croissance

Lire l'extinction à 600nm → Extrapoler les résultats à 680nm en augmentant de 20% la valeur obtenue.

8. TEST DU GLYCÉROL

8.1. PRINCIPE :

Le séquençage du génome nous a montré qu'il y avait une mutation dans la souche S1H par rapport à la souche S1 dans le gène du métabolisme du glycérol portant l'appellation Rru_A2409. Afin de pouvoir éventuellement détecter une différence au niveau phénotypique, le principe de ce test résidera dans le fait que la source de carbone du milieu Sistrom, le succinate, est remplacé par le glycérol dans les mêmes conditions stœchiométriques dans le but de comparer la croissance bactérienne.

8.2. MATÉRIEL :

- Spectrophotomètre Eppendorf BioPhotometer
- Plaques 24 puits
- Milieu Sistrom dont la source de carbone est le glycérol
- Milieu Sistrom normal
- Pipettes (P1000, P100)
- Parafilm
- Cuvettes de lecture à petit volume
- Pré-culture bactérienne

8.3. PROTOCOLE :

CALCUL DE LA MASSE DE GLYCÉROL À PESER

→ Masse de succinate dans le milieu SIS = 10g pour 100mL

$$\frac{\text{Masse C}}{\text{MM C}} = \frac{\text{Masse succinate}}{\text{MM succinate}}$$

$$\text{Masse C} = \left(\frac{\text{Masse succinate}}{\text{MM succinate}} \right) \times \text{MM C}$$

$$\text{Masse C} = \left(\frac{10\text{g}}{270,10\text{g/mol}} \right) \times 12,0107\text{g/mol}$$

Masse C = 0,445g de Carbone dans 10g de succinate

$$\rightarrow \frac{\text{Masse } C}{MM \text{ } C} = \frac{\text{Masse glycérol}}{MM \text{ glycérol}}$$

$$\text{Masse glycérol} = \frac{\text{Masse } C}{MM \text{ } C} \times MM \text{ glycérol}$$

$$\text{Masse glycérol} = \frac{0,445g}{12,0107 \frac{g}{mol}} \times 92,0938 \frac{g}{mol}$$

$$\text{Masse glycérol} = \underline{3,41g} \text{ de glycérol dans } 100ml$$

PRÉPARATION DU MILIEU SISTROM-GLYCÉROL :

Peser 3,41g de glycérol pour 100mL d'eau milli Q. Bien que le glycérol soit liquide, il faut en prélever une masse car il a la propriété d'être visqueux.

Ajouter 20 mL de cette solution au milieu Sistrom à la place de la solution de succinate de sodium.

EXPÉRIENCE :

Nous utilisons alors une plaque 24 puits pour l'expérience et l'on répartit les différents milieux de la sorte :

STRAIN	S1 Glycérol	TEM S1 Succinate	S1H Glycérol	TEM S1H Succinate		
A	○	○	○	○	✕	✕
B	○	○	○	○	✕	✕
C	○	○	○	○	✕	✕
D	○	○	○	○	✕	✕

- Dans cette **rangée de puits**, on utilise 1mL de milieu SISTROM-glycérol
- Dans cette **rangée de puits**, on utilise 1mL de milieu SISTROM-succinate, celui-ci jouera le rôle du contrôle positif pour la souche S1
- Dans cette **rangée de puits**, on utilise 1mL de milieu SISTROM-glycérol
- Dans cette **rangée de puits**, on utilise 1mL de milieu SISTROM-succinate, celui-ci jouera le rôle du contrôle positif pour la souche S1H

A ces différents puits, ajouter 10µL de pré-culture bactérienne.

Incuber la plaque à 30°C sous DAE en agitation permanente.

Rem : Travailler sous conditions stériles sous la hotte à flux laminaire ou près de la flamme après lavage de la paillasse avec de l'Umonium®.

LECTURE DES RÉSULTATS :

Prélever 50µL du puits et l'introduire dans une cuvette de lecture

Lire l'extinction à 600nm → Extrapoler les résultats à 680nm en augmentant de 20% la valeur obtenue.

9. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE : SÉQUENÇAGE

9.1. PRINCIPE GÉNÉRAL :

Afin de réaliser le séquençage des gènes d'intérêt, toutes sortes de manipulations de biologie moléculaire sont à réaliser. Dans l'ordre, à partir des bactéries, il faut extraire l'ADN, ensuite, développer les primers pour chaque gène. Il faudra alors tester ces primers avec l'ADN par PCR dont les produits seront visualisés sur gel d'électrophorèse. Enfin, une dernière PCR réalisée avec une enzyme de haute fidélité dont l'entièreté du produit sera transféré sur gel. La bande d'intérêt sur le gel sera ensuite découpée et suivra alors une étape de purification d'ADN à partir du gel. Enfin, les échantillons pourront être préparés et envoyés au séquençage.

9.2. DESIGN DES PRIMERS

La séquence d'intérêt est d'abord sélectionnée dans le génome de *R. rubrum* à l'aide du site internet du « National Center for Biotechnology Information » ou NCBI. La rubrique « gene » permet de sélectionner le gène d'intérêt au niveau du génome entier et d'en savoir toutes les caractéristiques nécessaires.

Une fois la séquence du gène d'intérêt obtenue, il faut alors trouver des primers qui englobent cette séquence. Cette étape se réalise grâce à un programme online : Primer3Plus.

FIGURE 13: UTILISATION DU PROGRAMME PRIMER 3 PLUS [27]

Les amorces doivent avoir certaines caractéristiques (« general settings ») :

- Leur longueur varie entre 15 et 30 paires de bases (pb)
- Le pourcentage de G et C doit se trouver entre 40 et 60%
- Le primer (5'→3') se termine de préférence par un G ou un C ou GC ou CG dans le but d'augmenter l'efficacité de complémentarité car entre ces deux bases, il y a 3 ponts H.
- La température de melting (T_m) doit se trouver entre 55 et 70°C
- Les primers ne doivent pas être complémentaires

Une fois les primers trouvés, ceux-ci doivent être analysés. Un premier programme est utilisé pour vérifier la longueur du segment d'intérêt : « In silico PCR amplification ».

In silico PCR amplification

[Input primers in fasta format](#)

Primer 1¹ 5'- -3' [C](#)

Primer 2¹ 5'- -3' [C](#)

Migroorganism

▼

Include plasmids (if available)

Allow ▼ mismatches, but in ▼ nucleotides in 3' end

Maximum length of bands

nucleotides

¹Degenerated nucleotides are allowed; A+T+G+C must be 10 or more.

[Info](#)

FIGURE 14: EXEMPLE: VÉRIFICATION DE LA LONGUEUR DU GENE RRU_A0526
SOURCE: [28]

In silico PCR Amplification

Primer 1 -> 5'-GGCACTGTGACCCCTCCTA-3'
Primer 2 -> 5'-CATCATCGCAATCCCCTTTA-3'
No mismatches allowed.

[NCBI](#)

G+C: 65.4

Rhodospirillum rubrum ATCC11170 (4352825 bp)

Position	Length
620643	1505

[All sequences](#) (Fasta)

Computed in 0 seconds

Please [help us](#) improve this resource by reporting problems, suggestions etc.

FIGURE 15: RÉSULTAT DU PROGRAMME IN SILICO POUR LA VÉRIFICATION DE LA LONGUEUR DU
SEGMENT [28]

Le programme suivant est utilisé dans le but de vérifier l'efficacité des primers : « Netprimer ».

Analysis Results #1: CAGATCGCGAAGACGATTTT			
Rating	: 70.0	3' end stability	: -7.31 kcal/mol
Molecular Wt	: 6141.09	ΔH	: -156.3 kcal/mol
Tm	: 57.98 °C	ΔS	: -0.41 kcal/°K/mol
GC%	: 45.0	5' end ΔG	: -6.6 kcal/mol
GC Clamp	: 0	Self Dimer (ΔG)	: -13.51 kcal/mol
nmol/A ₂₆₀	: 5.06	Hairpin (ΔG)	: -3.36 kcal/mol
ug/A ₂₆₀	: 31.09	Repeats (# of pairs)	: kcal/mol
ΔG	: -34.57 kcal/mol	Run (# of bases)	: 4 kcal/mol

FIGURE 16: EXEMPLE DE RÉSULTAT D'ANALYSE DE PRIMER SUR NETPRIMER [29]

Les paramètres pris en compte sont le « rating » dont la valeur doit être supérieure à 80%, ainsi que les valeurs de ΔG pour les « hairpin », self dimer et cross dimer qui ne doivent pas excéder les -10 kcal/mol.

9.3. EXTRACTION DE L'ADN

PRINCIPE :

L'ADN va directement être extrait à l'aide d'une colonne d'affinité à partir de cultures bactériennes.

MATÉRIEL :

- Kit QIAamp® DNA Mini Kit

lot n°142346692

PROTOCOLE :

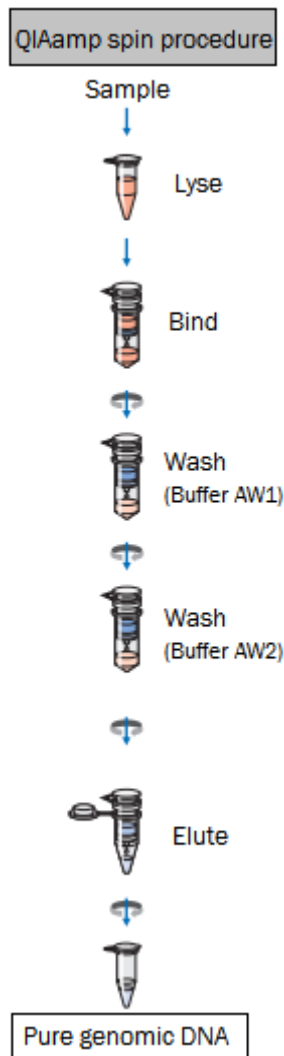


FIGURE 17: REPRÉSENTATION DU PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN

- 1) Ajouter 200µL de tampon AL à l'échantillon. Mixer en donnant des coups de vortex pendant environ 15 "
- 2) Incuber à 56°C pendant 10'
- 3) Centrifuger brièvement pour précipiter l'échantillon
- 4) Ajouter 200µL d'éthanol 100% et mélanger par coups de vortex pendant 15". Centrifuger brièvement.
- 5) Déposer avec précaution l'échantillon sur la « QIAamp Mini spin column » qui aura été placée sur un tube collecteur de 2mL. Fermer la colonne et centrifuger à 8000rpm pendant 1min. Placer ensuite la colonne sur un nouveau tube collecteur et jeter l'ancien contenant le filtrat.
- 6) Ouvrir précautionneusement la colonne et ajouter 500µL de tampon AW1. fermer la colonne et centrifuger à 8000rpm pendant 1min. Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur et jeter l'ancien.
- 7) Ouvrir précautionneusement la colonne et ajouter 500µL de tampon AW2. fermer la colonne et centrifuger à 14000rpm pendant 3min. Placer la colonne sur un eppendorf de 1,5mL et jeter l'ancien tube collecteur.
- 8) Ouvrir précautionneusement la colonne et ajouter 200µL de tampon AE. Incuber à température ambiante pendant 1min, et centrifuger à 8000rpm pendant 1 min.
- 9) Le produit final est l'ADN purifié
- 10) Quantifier l'ADN à l'aide du NANODROP

9.4. PCR

PRINCIPE:

Le principe de la PCR est d'amplifier un gène d'intérêt *in vitro* afin d'obtenir une quantité suffisante nécessaire à l'analyse.

MATÉRIEL:

- Tubes à PCR
- Micropipettes (P10, P20, P200, P1000)
- Tips
- Glace
- Machine à PCR : PCR applied biosystem 9700



FIGURE 18: THERMOCYCLER

PROTOCOLE

- **MASTER MIX- TEST PRIMER:**

Master Mix	Stock concentration	Final concentration	Final volume	Volume 1X (µl)
gDNA (25	2
Taq buffer (10X)	10	1	25	2,5
dNTPs mix (mM)	10	0,1	25	0,25
Primer-F µM	20	0,5	25	0,625
Primer-R µM	20	0,5	25	0,625
Taq enzyme (U/µL)	5	0,05	25	0,25
MQ water				18,75
			Final volume	25 µl

- **MASTER MIX PUSHION ENZYME- SÉQUENÇAGE:**

Master Mix	Stock concentration	Final concentration	Final volume	Volume 1X (µl)	
Dest. Water			50	36,25	13,9
5X Phusion HF Buffer	5X	1X	50	10	4
dNTPs mix	10 mM	200µM each	50	1	0,4
Primer-F µM	20	0,5	50	0,625	0,25
Primer-R µM	20	0,5	50	0,625	0,25
DNA				1 (4ng/ul)	1 (0,4ng/ul)
DMSO		3%		--	--
Taq enzyme (U/µL)	5	0,02 U/µl	50	0,5	0,2
			Final volume	50 µl	20 µl

- **PROGRAMMATION DE LA PCR**

Initial Denaturation	94°C x 3 min
Denaturation	94°C x 30 sec
Annealing	... °C x 30 sec
Extension	72°C x ...min
Final extension	72°C x 7 min

Voir annexe n°1 pour le détail de programmation de chaque échantillon.

9.5. ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL

- Peser 1g d'agarose pour 100mL de tampon TBE
- Dissoudre ces 1g en chauffant à l'aide d'un micro-onde jusqu'à obtenir une solution limpide
- Refroidir légèrement le gel et ajouter 5 μ L de GEL-RED
- Couler le gel dans le moule



FIGURE 19: REPRÉSENTATION DU MOULE DU GEL

- Laisser polymériser pendant environ 15 minutes en plaçant les peignes qui serviront de puits
- Vérifier le niveau de tampon TBE dans la cuve électrophorétique il doit être suffisant.

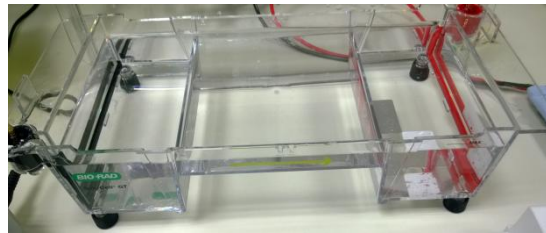


FIGURE 20: CUVE ÉLECTROPHORÉTIQUE

- Placer le gel dans la cuve électrophorétique et vérifier le niveau de celle-ci
- Charger les échantillons (5 μ L) dans les différents puits ainsi que la « ladder » (Gene Ruler™ 1kb Plus DNA Ladder, ready-to-use) (2 μ L)

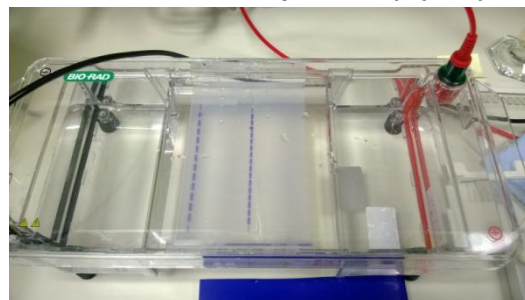


FIGURE 21: MONTAGE POUR LE RUNNING DU GEL

- Runner le gel pendant une heure à 70V



- Analyser le gel grâce au lecteur BIORAD



9.6. PURIFICATION D'ADN À PARTIR DU GEL (QIAQUICK GEL EXTRACTION)

PRINCIPE :

Le principe de cette méthode est l'utilisation d'une colonne d'affinité pour, à partir d'un gel, récupérer et purifier l'ADN d'intérêt.

MATÉRIEL :

- Kit "QIAquick Gel Extraction"

PROTOCOLE:

- 1) Exciser le fragment d'ADN depuis le gel d'agarose à l'aide d'un scalpel.
- 2) Peser chaque morceau de gel dans un eppendorf de 1,5mL. Ajouter 3 volumes de tampon QG pour un volume de gel (100mg~100µL)
- 3) Incuber à 50°C pendant 10minutes (ou jusqu'à ce que le gel soit complètement dissout). Aider la dissolution en vortexant les tubes toutes les 2-3 minutes
- 4) Après dissolution, vérifier que la couleur de la mixture est bien jaune (similaire à la couleur du tampon QG)
- 5) Ajouter 1mL d'isopropanol aux échantillons et mixer
- 6) Placer une colonne QIAquick spin sur un tube collecteur de 2mL
- 7) Déposer l'échantillon au sommet de cette colonne, l'ADN s'y liera. Centrifuger pendant une minute. La capacité maximale de la colonne est de 800µL, répéter l'étape jusqu'à ce que tout l'échantillon soit passé par la colonne
- 8) Retirer le tube collecteur et jeter le filtrat
- 9) Ajouter 500µL de tampon GC et centrifuger pendant 1 minute
- 10) Pour laver la colonne, ajouter 750µL de tampon PE et centrifuger 1 minute

- 11) Jeter le filtrat et centrifuger à nouveau pendant 1 minute à 13000 rpm
- 12) Placer sous la colonne, un tube eppendorf de 1,5mL
- 13) Pour éluer l'ADN, ajouter 50 μ L de tampon EB sur la membrane de la colonne
- 14) Quantifier l'ADN à l'aide du Nanodrop

9.7. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR LE SÉQUENÇAGE

PRINCIPE:

Les produits d'électrophorèse maintenant purifiés, il faut alors combiner les différents composés afin de les envoyer pour le séquençage.

MATÉRIEL:

- Produit PCR purifié
- Amorces
- Tubes eppendorf de 1,5mL

PROTOCOLE:

- 1) Ajouter 5 μ L d'échantillon d'ADN purifié d'une concentration minimale de 50ng/ μ L
- 2) Ajouter un primer (F ou R en fonction de sa position par rapport à l'emplacement de la mutation) à une concentration de 5mM → Diluer le primer : 15 μ L d'eau Milli Q pour 5 μ L de primer à 20mM
- 3) Les échantillons sont ensuite correctement étiquetés et envoyés au séquençage

10. EXTRACTION DE PIGMENTS

10.1. PRINCIPES

Rhodospirillum rubrum a la caractéristique de posséder des pigments. Grâce à cette technique, les pigments vont pouvoir être extraits et ensuite quantifiés à l'aide de la formule de Beer-Lambert [13]. Cette méthode d'extraction se réalise à l'aide d'un solvant organique.

10.2. MATÉRIEL

- Centrifugeuse
- Cuvettes en verre
- Acétone
- Tampon PBS
- Pipette (P1000)
- Tips
- Echantillon de culture bactérienne (1mL)
- Spectrophotomètre : AQUAMATE UNICAM
- Mesure de 3 λ ($\lambda_1=496\text{nm}$; $\lambda_2=515\text{nm}$; $\lambda_3=763\text{nm}$)



FIGURE 22: SPECTROPHOTOMÈTRE
AQUAMATE [30]

10.3. PROTOCOLE

- 1) Prélever un échantillon de 1mL de culture bactérienne à différents moments de la courbe de croissance (Temps 0, phase exponentielle et phase stationnaire).
- 2) Centrifuger les échantillons à 12.000 rpm pendant 10 minutes.
- 3) Eliminer le surnageant.
- 4) Resuspendre le culot dans 2mL de tampon PBS.
- 5) Centrifuger à 12.000 rpm pendant 10 minutes.
- 6) Eliminer le surnageant.
- 7) Resuspendre le culot dans 2mL d'acétone
- 8) Centrifuger à 12.000 rpm pendant 10 minutes
- 9) Utiliser le surnageant pour les mesures
- 10) Mesurer l'absorbance à longueurs d'ondes multiples (496nm/515nm/763nm)
- 11) Mesurer le spectre d'absorbance de 315nm à 1100nm
- 12) Convertir les différentes DO en concentrations grâce à ces formules [13] :

$$C_{\text{caroténoïdes}} = \frac{(DO_{496\text{nm}} + DO_{515\text{nm}})/2}{\epsilon_{\text{moy}} \cdot l} \times 1000 \times 2$$

$$C_{\text{BChla}} = \frac{DO_{763\text{nm}}}{\epsilon_{763\text{nm}} \cdot l} \times 1000 \times 2$$

11. TEST DE MOBILITÉ

11.1. PRINCIPE :

Le séquençage du génome nous a montré qu'il y avait une mutation dans la souche S1H par rapport à la souche S1 dans un gène impliqué dans la mobilité cellulaire et portant l'appellation Rru_A0526. Afin de pouvoir éventuellement détecter une différence au niveau phénotypique, le but de ce test sera de comparer la mobilité des deux souches S1 et S1H en utilisant des géloses d'agar molles (0,3%) [31].

11.2. MATÉRIEL :

- Boîtes de Siström à 0,3% d'agar (au lieu de 1,5% d'agar pour la boîte standard)
- Cure-dents stériles
- Papier aluminium
- Hotte à flux laminaire ou flamme pour travailler en conditions stériles
- Boîtes contenant les colonies originelles des deux souches étudiées

11.3. PROTOCOLE :

- 1) Travailler sous conditions stériles sous la hotte à flux laminaire ou près de la flamme après lavage de la paillasse avec de l'Umonium®.
- 2) Prélever avec le bout du cure-dent une petite colonie
- 3) Rentrer le bout du cure-dent contenant les bactéries au centre de la gélose sans toucher le fond de la boîte de pétri
- 4) Effectuer 4 répliques pour chaque souche
- 5) Recouvrir les boîtes à l'aide de papier aluminium pour éviter la lumière
- 6) Incuber à 30°C sous DAE
- 7) Prendre les mesures de mobilité environ tous les jours en mesurant à l'aide d'une règle.

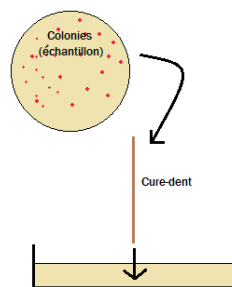


FIGURE 23: REPRÉSENTATION DU PROTOCOLE DU TEST DE MOBILITÉ

12. MICROSCOPIE OPTIQUE

12.1. PRINCIPE :

La microscopie optique permet de visualiser les bactéries et ainsi d'observer d'éventuelles différences entre les deux souches S1 et S1H.

12.2. MATÉRIEL :

- Lames de microscopie
- Lamelle couvre-objet
- Echantillon de culture bactérienne
- Microscope : Grossissement 600X (objectif 60x à immersion et oculaire 10x)

12.3. PROTOCOLE :

- 1) Une goutte de pré-culture est déposée sur la lame porte objet
- 2) L'échantillon est recouvert à l'aide d'une lamelle couvre objet
- 3) Le microscope est calibré
- 4) Visualisation et prise de photos

13. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Voir annexe n°5

14. COMPTAGE CELLULAIRE

14.1. PRINCIPE :

Le comptage cellulaire permet d'obtenir un nombre de cellule vivante par mL. Le but ici est de comparer deux techniques de comptage ; la cytométrie en flux et le classique comptage sur boîte.

14.2. MATÉRIEL :

- Boîtes de Petri avec Sistrum (3 boîtes par échantillon) +billes (~5 par boîte)
- Solution saline filtrée
- Micropipettes (P1000, P200)
- Tips
- Tubes eppendorf 1,5mL et 2,0mL
- Cytomètre en flux ACCURI C6



FIGURE 24: CYTOMÈTRE EN FLUX [32]

14.3. PROTOCOLE :

- 1) Diluer chaque échantillon jusqu'à obtenir la dilution appropriée, afin d'obtenir un nombre de colonies à compter situé entre 30 et 300.
- 2) Transférer 1mL de la dilution appropriée dans un eppendorf de 1,5m pour la cytométrie en flux.
- 3) Déposer 100µL de la bonne dilution sur chaque boîte (3 répliques par échantillon), disperser l'échantillon à l'aide des billes, retirer les billes, incuber les boîtes entre 8 à 10 jours à 30°C sous DAE conditions.

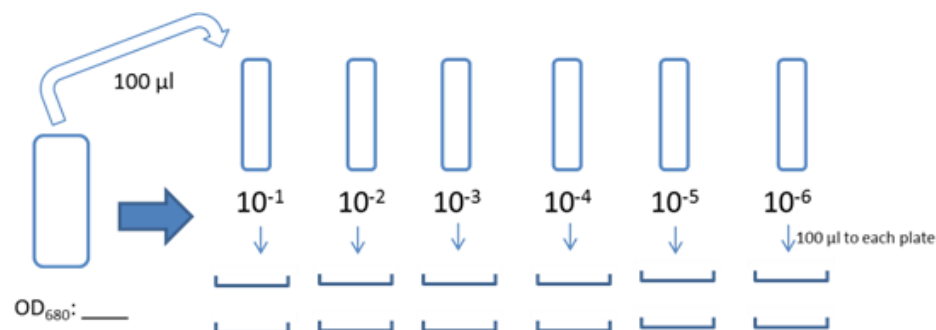


FIGURE 25: ILLUSTRATION DU PROTOCOLE DE DILUTION EN SÉRIE

4) Réaliser le comptage sur boîte quand les colonies on atteint la bonne taille.

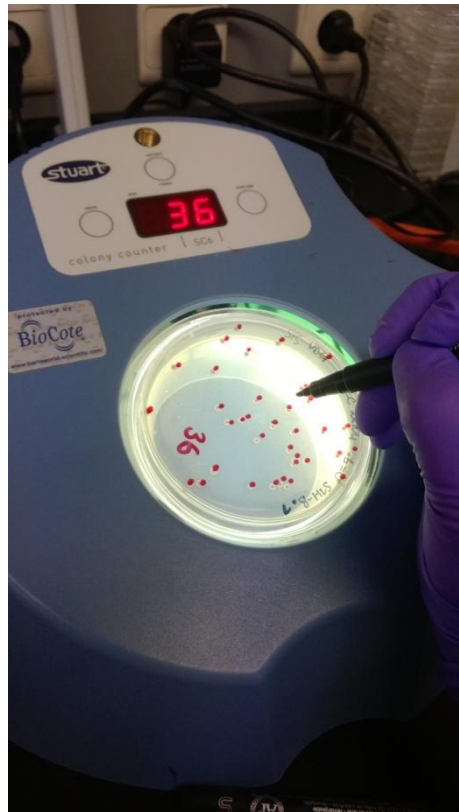


FIGURE 26: ILLUSTRATION DU COMPTAGE SUR BOÎTE

14.4. CYTOMÉTRIE EN FLUX

- PROTOCOLE :

- 1) Ouvrir le Template « Live/dead *R.rubrum* »
- 2) Cliquer sur « backflush »
- 3) Faire passer un tube contenant 2mL d'eau Milli Q filtrée
- 4) Régler les paramètres :
 - Set threshold: 5000 in FSC-H trigger channel
 - Fluidics: Fast
 - Volume: 100 μ L
- 5) Préparer les échantillons en ajoutant 3 μ L du mix de fluorochromes (1,5 μ L de SYTO-9 et 1,5 μ L d'iodure de propidium ou propidium iodide (PI))
- 6) Incuber les échantillons 15 minutes dans le noir
- 7) Passer les échantillons 3 fois de sorte à obtenir une moyenne.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. COURBE DE CROISSANCE

La courbe de croissance a été réalisée à l'aide de 4 réplicas biologiques par souche. Cette technique nous permet d'obtenir une moyenne et un écart-type qui confirmeront ou infirmeront la validité de nos résultats.

Les mesures de DO et de pH ont été prises à différents moments clés de la courbe de croissance. Il est important de spécifier qu'il existe probablement d'autres points pour compléter ces résultats, mais une mesure manuelle continue est impossible.

1.1. RÉSULTAT :

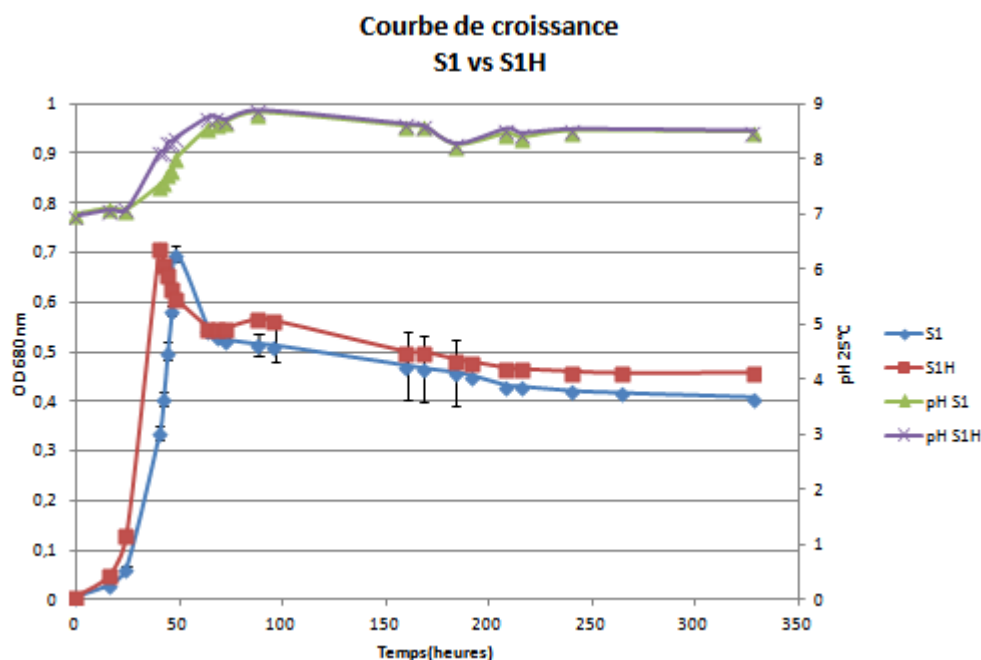


FIGURE 27: RÉSULTAT DE LA COURBE DE CROISSANCE DE S1 VS S1H AINSI QUE DU PH

1.2. DISCUSSION :

Nous pouvons observer plusieurs choses sur cette courbe. Les différentes phases apparaissent, la phase d'adaptation, bien que courte pour les deux souches est observable de 0 à 20 heures environ. C'est durant cette phase que la bactérie s'adapte à son milieu avant de pouvoir croître et se diviser.

Ensuite vient la phase exponentielle. Cette partie est bien représentée car on peut voir que sur environ 20 heures de temps, la bactérie passe d'une OD $\sim 0,1$ à $\sim 0,7$. Les bactéries sont au meilleur de leur forme et se divisent sans arrêt. Afin de comparer le comportement des deux souches, il est important de calculer le temps de génération.

Celui-ci permet d'évaluer la vitesse de croissance pour chaque souche. Pour cela, nous utilisons cette formule :

<p>Temps de génération (h) = $\ln 2 / \mu$</p> <p>avec $\mu = (\ln DO_2 - \ln DO_1) / t_2 - t_1$</p> <p>Les valeurs de DO sont prises dans la partie la plus pentue de la phase exponentielle.</p>

	S1	S1H
Temps de génération (h)	6,598	6,593
Erreur	0,3102	0,3614

Les deux souches ont une vitesse de croissance quasi identique bien qu'il y ait une légère extrapolation car il reste une période où aucune mesure n'a été prise.

Les bactéries atteignent ensuite la phase stationnaire (peu visible dans le cas présent), phase où les bactéries qui se divisent sont en équilibre avec les bactéries qui meurent. Ensuite l'équilibre est rompu et la phase de décroissance est bien visible, la DO chutant rapidement aux alentours de 0.5.

Le pH est également mesuré en même temps que les mesures de DO. Celui-ci augmente avec la croissance bactérienne. Cette augmentation est due aux déchets, comme les minéraux et l'ammonium, relâchés dans le milieu par les bactéries.

2. PCR- ELECTROPHORÈSE

Les PCR et électrophorèses sont réalisées selon les méthodes décrites ci-avant. La liste complète des primers et des produits de PCR attendus se trouve en Annexe 4.

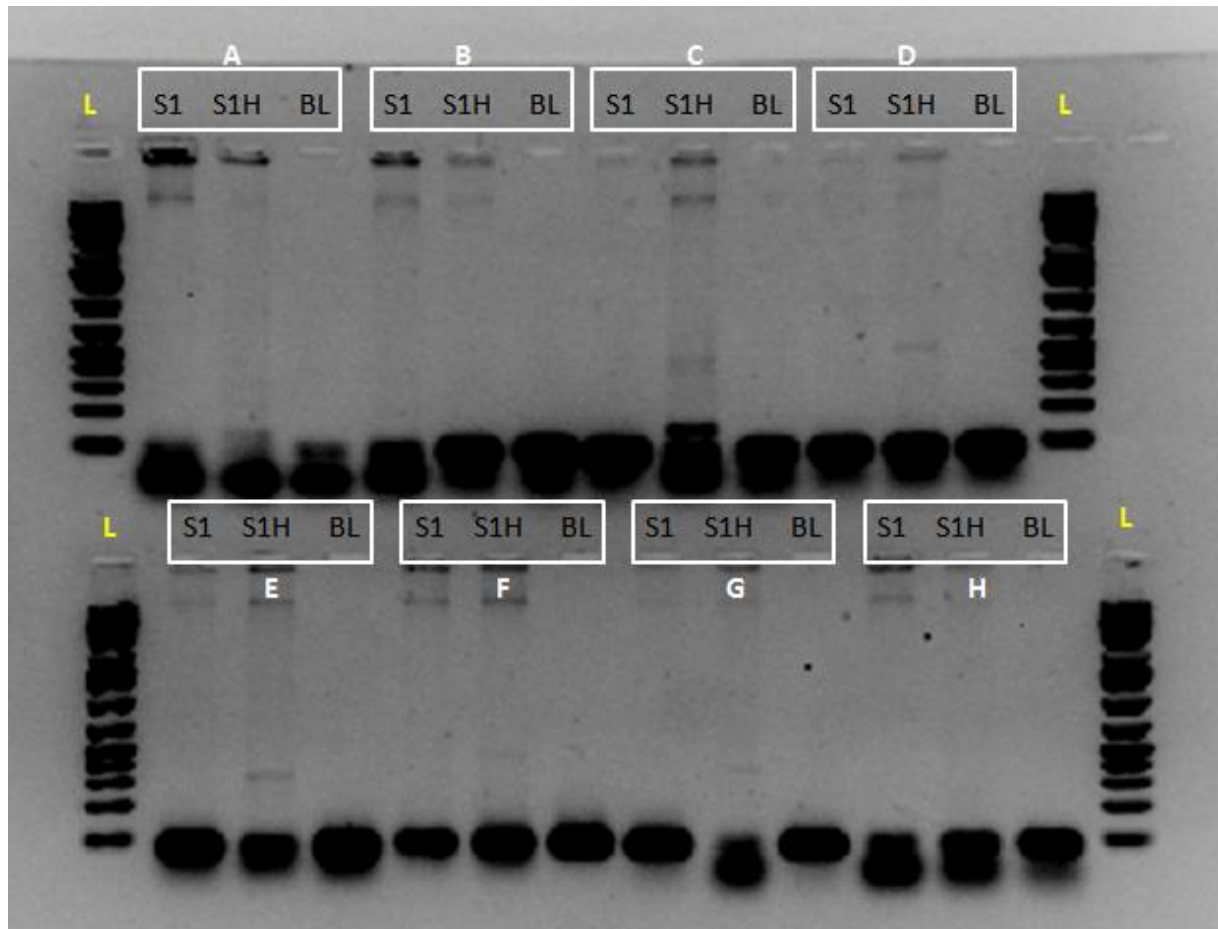


Figure 28: Résultat de l'électrophorèse sur gel avec la Dream Taq Polymérase

L= Ladder

A : Rru_A2877 paire n°2

B : Rru_A2877 paire n°5

C : Rru_A2877 paire n°5 séq

D : Rru_A0932 paire n°1

E : Rru_A2409 paire n°3

F : Rru_A0932 paire n°4

G : Rru_A2409 paire n°1

H : Rru_A2409 paire n°7

S1 : ADN de S1 purifié utilisé

S1H : ADN de S1H purifié utilisé

BL= Blanc (ne contient pas d'ADN)

Ci-dessus se trouve le résultat du gel avec l'enzyme Dream Taq. Après de nombreuses optimisations, nous pouvons voir que le résultat n'est toujours pas concluant car tous les primers se trouvent dans le fond du gel, comme s'ils ne s'étaient pas liés à l'ADN.

Rem : Plusieurs paires de primers sont testées car il peut arriver que certaines paires ne fonctionnent pas correctement. Il est donc intéressant de sélectionner plusieurs paires afin de s'assurer d'avoir, au sein de cette sélection, au moins une paire utilisable.

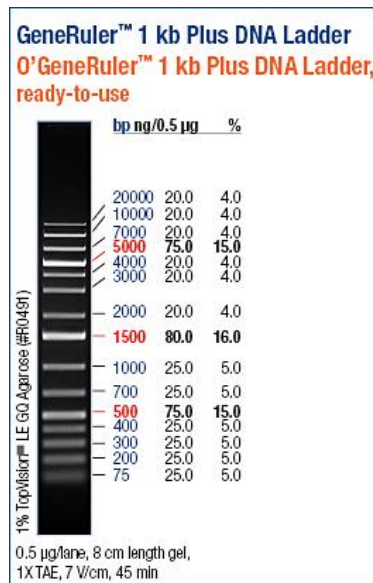


Figure 29: « Ladder » utilisée lors des électrophorèses

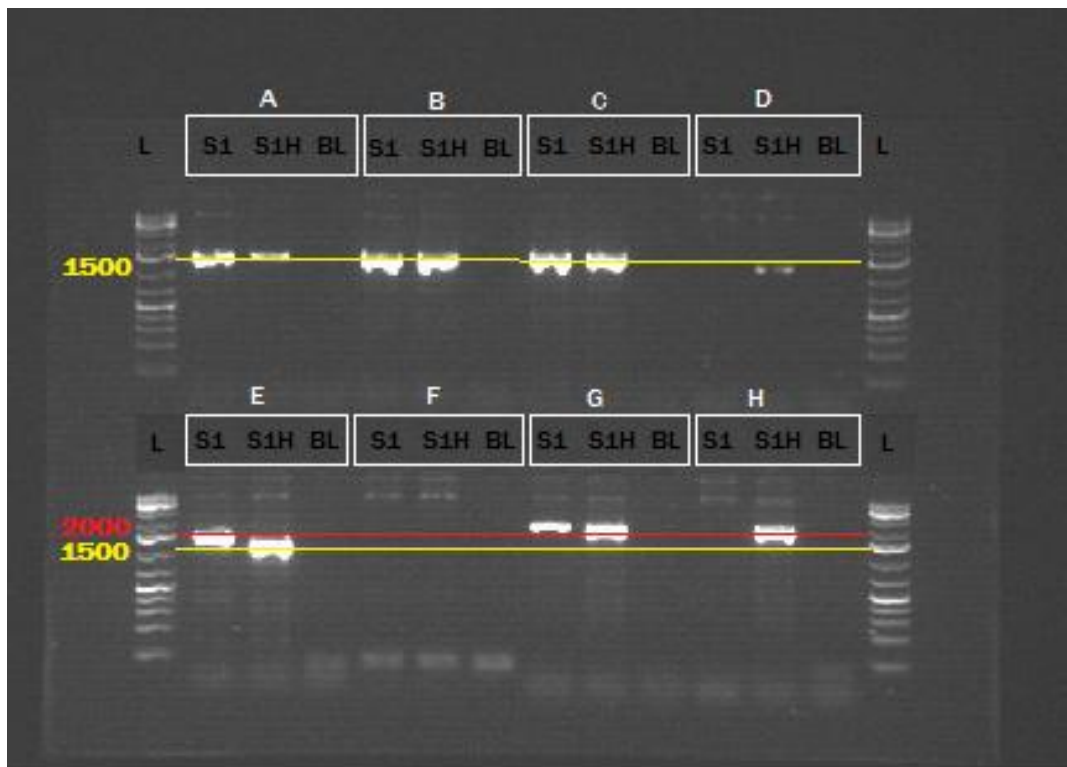


Figure 30: Résultat de l'électrophorèse sur gel avec la PHUSION High Fidelity enzyme

L= Ladder

A : Rru_A2877 paire n°2

B : Rru_A2877 paire n°5

C : Rru_A2877 paire n°5 séq

D : Rru_A0932 paire n°1

E : Rru_A2409 paire n°3

F : Rru_A0932 paire n°4

G : Rru_A2409 paire n°1

H : Rru_A2409 paire n°7

S1 : ADN de S1 purifié utilisé

S1H : ADN de S1H purifié utilisé

BL= Blanc (ne contient pas d'ADN)

La dernière solution trouvée pour l'optimisation était d'utiliser une autre enzyme, plus efficace : L'enzyme PHUSION High Fidelity. Après révélation nous pouvons observer sur ce gel les bandes d'intérêt. La ladder permet de confirmer que c'est bien notre fragment d'ADN qui a été amplifié. Cependant, toutes les paires ne fonctionnent pas, nous utiliserons donc pour la suite les paires :

- B: Rru_A2877 paire n°2
- E: Rru_A2409 paire n°7
- G: Rru_A0932 paire n°4

3. ANALYSE DU SÉQUENÇAGE

Gène Rru_A0932 p4

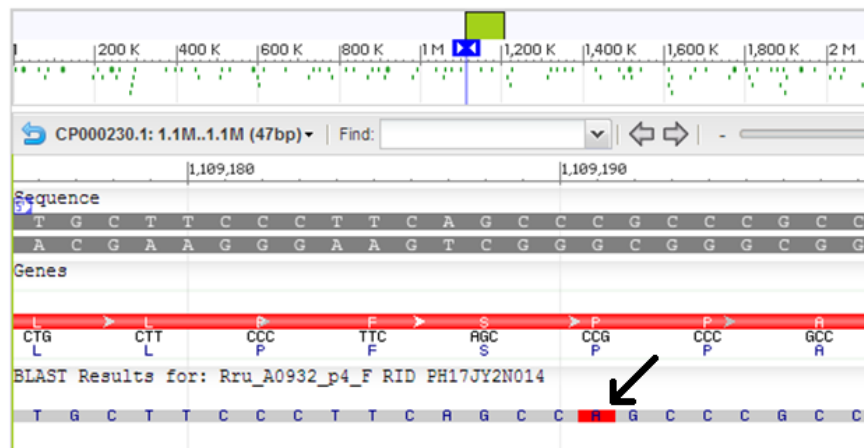


FIGURE 31: *R. RUBRUM* S1H, PRIMER: RRU_A0932 P4 F



FIGURE 32: *R. RUBRUM* S1PRIMER: RRU_A0932_P4_F

DISCUSSION

Nous pouvons observer grâce à l'analyse du séquençage qu'il existe une mutation au niveau du gène impliqué dans le métabolisme de l'acétoïne. Vu qu'il n'y a qu'un seul nucléotide modifié, on parle de mutation ponctuelle (ou SNP pour single nucleotide polymorphism). En effet, une cytosine (C) normalement présente dans la souche parente S1 est remplacée par une adénine (A) dans la souche mutée S1H. En conséquence, la proline de S1 (codon CCG) est remplacé par de la glutamine (codon CAG) dans la protéine correspondante à ce gène Rru_A0932.

Gène **Rru_A2409 p7**

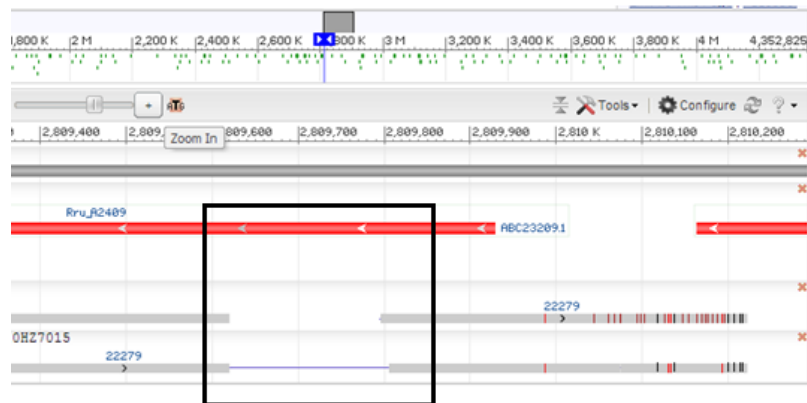


FIGURE 33:R. RUBRUM S1H PRIMER: RRU_A2409_P7_R

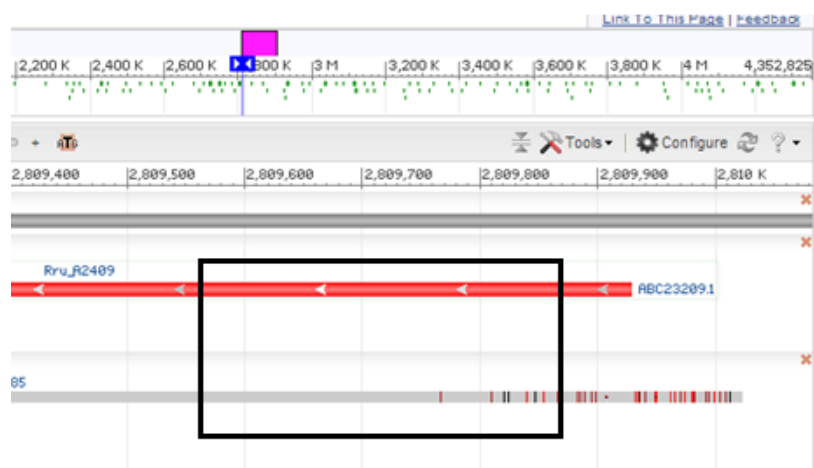


FIGURE 34:R. RUBRUM S1 PRIMER: RRU_A2409_P7_R

DISCUSSION

Nous pouvons observer grâce à l'analyse du séquençage qu'il existe une mutation au niveau du gène impliqué dans le métabolisme du glycérol. La mutation est une grande délétion de 179 nucléotides au niveau de la souche mutante par rapport à la souche parente pour ce gène Rru_A2409.

Gène Rru_A2877 p2

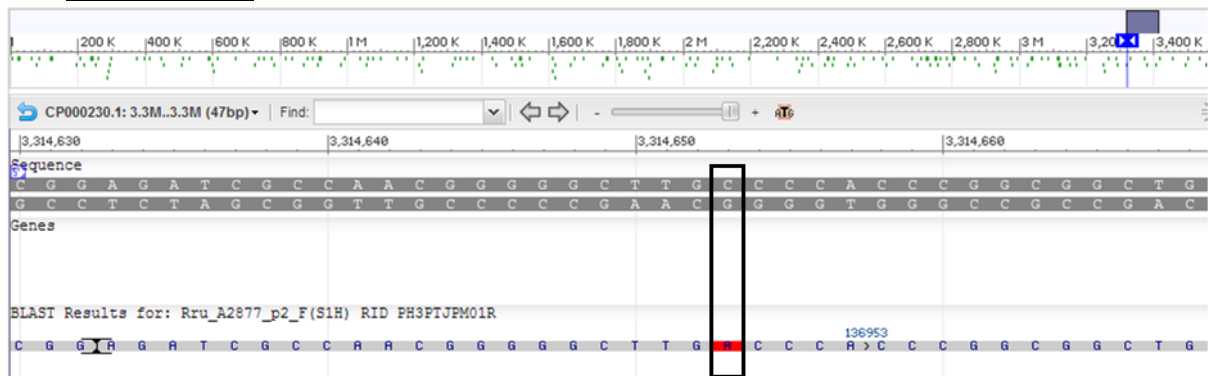


FIGURE 35: *R. RUBRUM* S1HPRIMER: RRU_A2877_P2

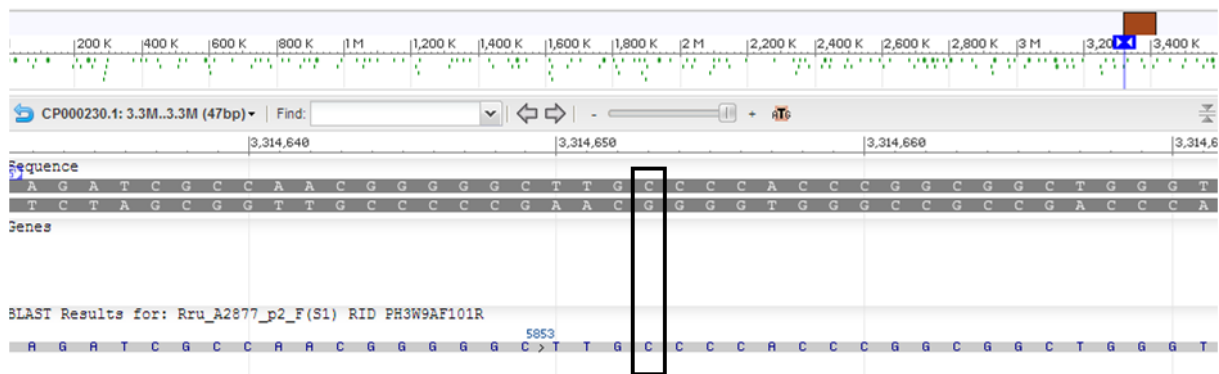


FIGURE 36: *R. RUBRUM* S1 PRIMER: RRU_A2877_P2

DISCUSSION

Nous pouvons observer grâce à l'analyse du séquençage qu'il existe une mutation au niveau du gène impliqué dans le métabolisme de la thréonine. La mutation est ponctuelle (SNP's) et se situe dans la région promotrice. Une cytosine normalement présente dans la souche parente est remplacée par une adénine dans la souche mutée.

→ Suite au séquençage, nous avons la preuve génotypique qu'il existe des différences entre les deux souches d'intérêt S1 et S1H. La caractérisation génotypique s'arrête ici. Le but dans la suite des événements sera de vérifier si ces mutations ont un impact au niveau phénotypique.

4. TEST DE LA THRÉONINE

Comme nous le savons, la thréonine est un acide aminé. Connaître son effet sur les bactéries S1 et S1H est dès lors très intéressant car dans le cycle MELiSSA, *Rhodospirillum rubrum* reçoit les déchets du 1^{er} compartiment contenant une grande quantité d'acides aminés issus de la dégradation protéique.

4.1. RÉSULTATS

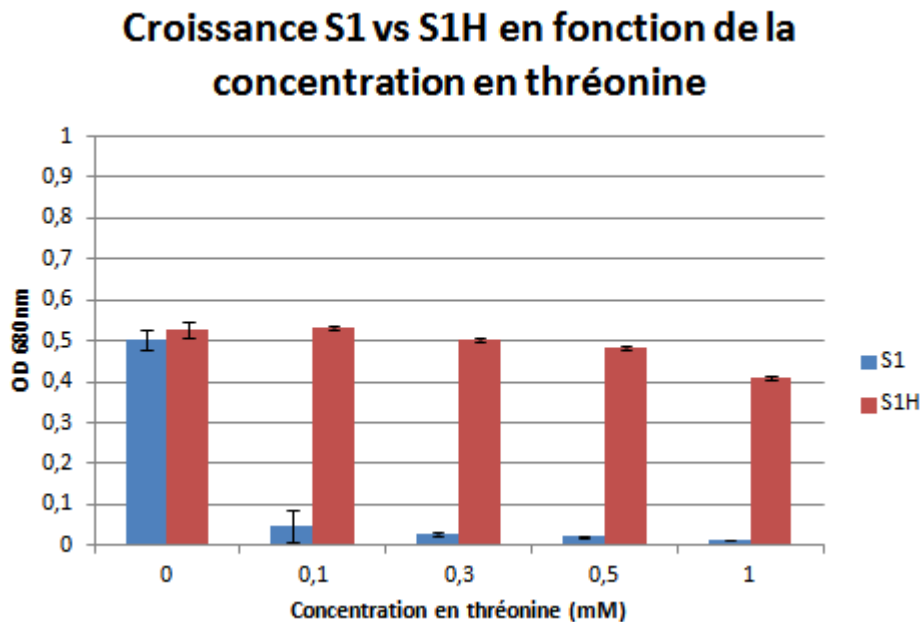


FIGURE 37: RÉSULTATS DU TEST DE LA THRÉONINE POUR S1 ET S1H

4.2. DISCUSSION :

Comme nous le montre clairement ce graphique, nous pouvons voir que la souche S1 ne peut se développer dans aucun milieu contenant de la thréonine, du moins, pour les concentrations testées. Au contraire, S1H n'éprouve aucune difficulté à se développer en présence de thréonine comme cela a déjà été montré précédemment [24].

Ces résultats sont dès lors intéressants car la souche S1H, utilisée pour le cycle MELiSSA est tout à fait apte à se développer malgré la présence d'une quantité importante d'acides aminés (en provenance du compartiment I) alors que la souche parente, S1 en est incapable. La mutation de ce gène est donc un réel avantage.

5. TEST DE L'ACÉTOÏNE

L'acétoïne est un composé produit par la bactérie afin de réguler le pH de son environnement. Ce test nous permettra donc d'évaluer le comportement des différentes souches S1 et S1H dans des conditions de pH différentes.

5.1. RÉSULTATS

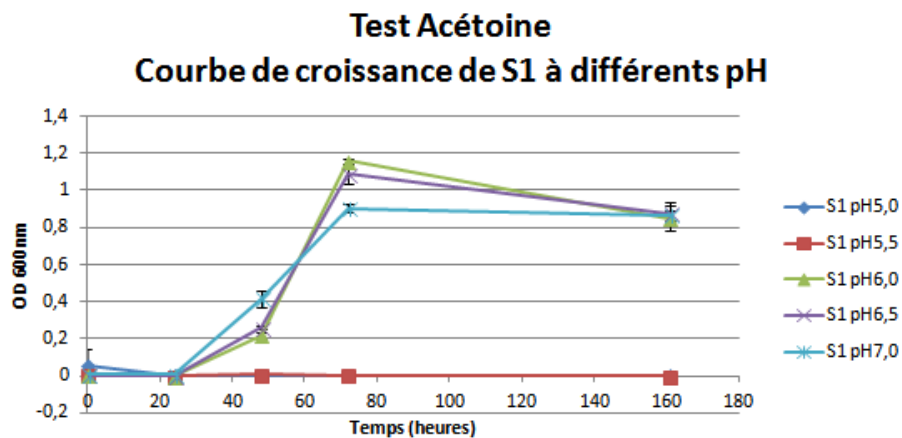


FIGURE 38: RÉSULTAT DU TEST DE L'ACÉTOÏNE POUR S1

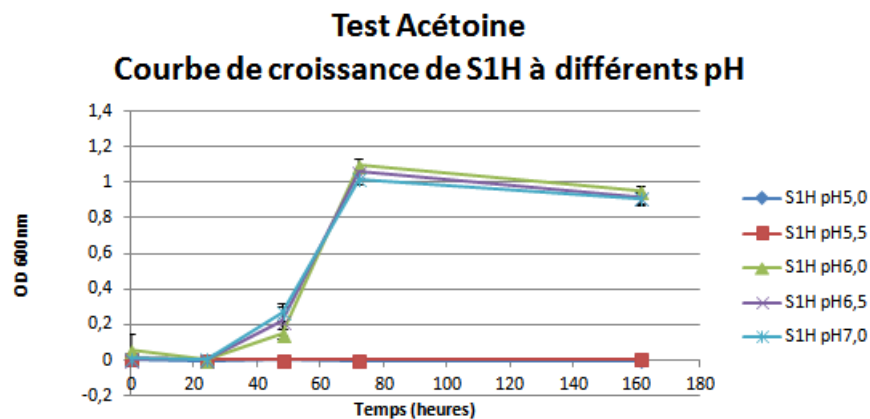


FIGURE 39: RÉSULTAT DU TEST DE L'ACÉTOÏNE POUR S1H

	G(t)				
pH	5	5,5	6	6,5	7
S1					
Moyenne	0	0	10,46427	12,18677	22,6703
Erreur	0	0	0,634101	0,442021	4,3528
S1H					
Moyenne	0	0	8,9188	11,2712	13,2047
Erreur	0	0	1,0283	3,2152	2,5444

FIGURE 40: TEMPS DE GÉNÉRATION À PARTIR DE 4 RÉPLICAS BIOLOGIQUES AVEC ERREURS

5.2. DISCUSSION

Comme nous le montre ces graphiques, il n'y a pas de réelle différence entre la souche S1 et S1H, elles se comportent toutes deux de la même manière.

Nous pouvons voir que pour des pH inférieurs à 6,0, la bactérie n'est pas en mesure de se multiplier. Tandis que pour les pH allant de 6,0 à 7,0, la bactérie est tout à fait en mesure de croître.

Grâce au calcul des différents temps de génération, nous pouvons quantifier ces résultats. Nous pouvons voir que pour S1 et S1H, à pH 6, le temps de génération est plus rapide, ce qui pourrait indiquer que ce pH est plus favorable à la croissance des bactéries. Cependant, comme vu précédemment, nous obtenons pour la courbe de croissance classique un temps de génération plus rapide. Ceci s'explique par le fait que les conditions expérimentales sont différentes pour les deux tests. Les conditions idéales de culture sont celles utilisées lors de la courbe de croissance, dans des flasques assez grandes, renfermant assez d'oxygène tandis que celles utilisées pour le test de l'acétoïne sont plus précaires (plaques 24 puits). De plus, certains problèmes sont survenus lors de cette expérience. Il est survenu un problème de température au niveau de l'incubateur dû à une grande occupation de l'espace. Ceci a provoqué un échauffement des cultures. C'est pourquoi ces résultats doivent être pris avec précaution.

6. TEST DU GLYCÉROL

6.1. RÉSULTATS

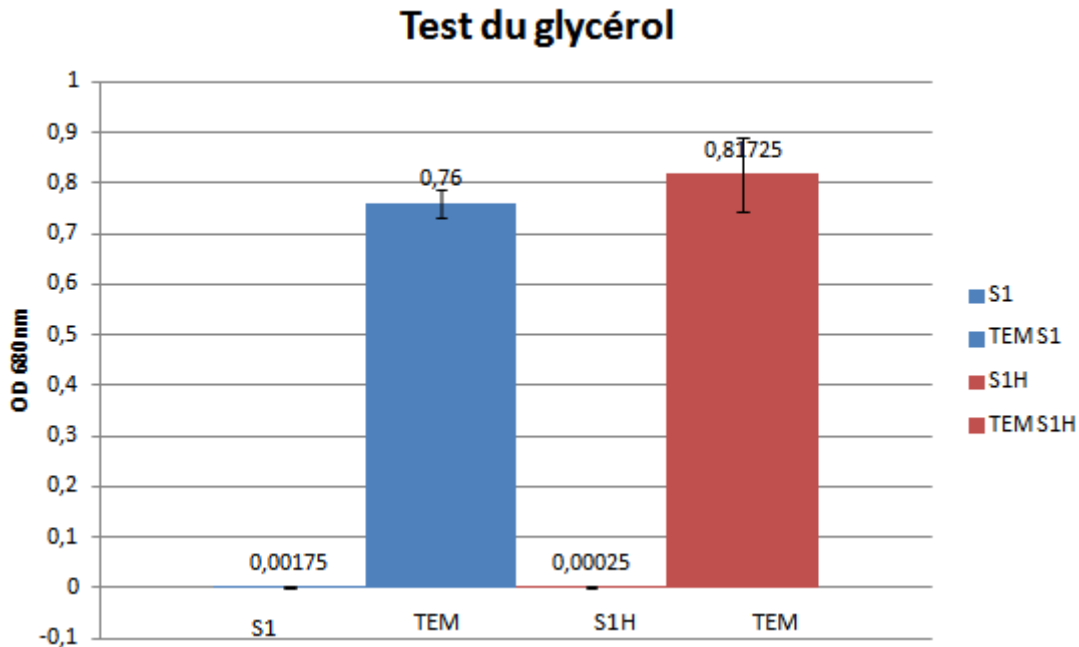


FIGURE 41: GRAPHIQUE DU TEST DU GLYCÉROL QUI COMPARE LA CROISSANCE DE S1 ET S1H DANS DIFFÉRENTES CONDITIONS

S1= SOUCHE S1 DANS LE MILIEU SIS + THRÉONINE
TEM S1= SOUCHE S1 DANS LE MILIEU SIS = TÉMOIN S1
S1H= SOUCHE S1H DANS LE MILIEU SIS + THRÉONINE
TEM S1H= SOUCHE S1H DANS LE MILIEU SIS = TÉMOIN S1H

6.2. DISCUSSION

Les résultats sont divisés en deux parties, il y a les tests, qui contiennent du glycérol dans le milieu comme unique source de carbone et les témoins qui permettent de valider l'expérience et dont la source de carbone est le succinate comme d'origine dans le milieu Sistrom.

Les résultats sont sans équivoque. La bactérie *Rhodospirillum rubrum*, qu'elle soit de souche S1 ou S1H ne peut pousser si l'unique source de carbone est le glycérol.

7. TEST DE MOBILITÉ

7.1. RÉSULTATS

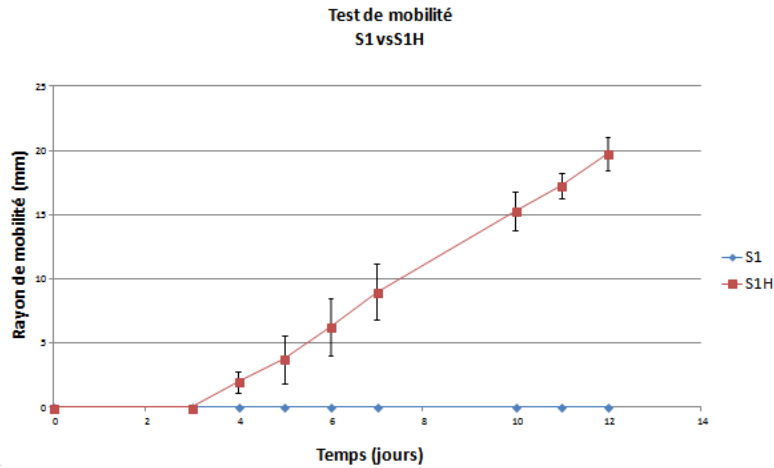


FIGURE 42: TEST DE MOBILITÉ (PAR MESURE DE DIAMÈTRE) DE S1 ET S1H EN FONCTION DU TEMPS.



FIGURE 43: VISUALISATION DE LA MOBILITÉ DE S1 APRÈS 9 JOURS D'INCUBATION

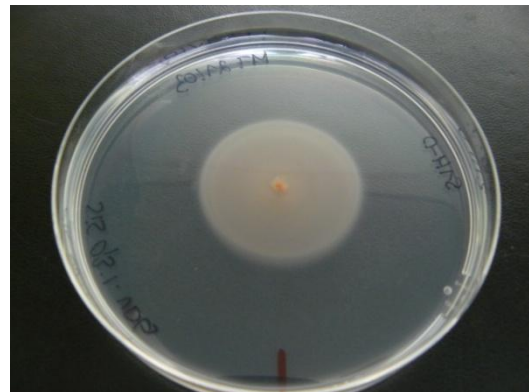


FIGURE 44: VISUALISATION DE LA MOBILITÉ DE S1H APRÈS 9 JOURS D'INCUBATION

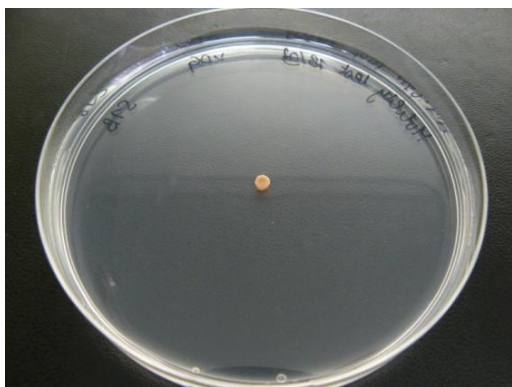


FIGURE 45: VISUALISATION DE LA MOBILITÉ DE S1 APRÈS 13 JOURS D'INCUBATION



FIGURE 46: VISUALISATION DE LA MOBILITÉ DE S1H APRÈS 13 JOURS D'INCUBATION

Discussion :

Les résultats sont claires, nous pouvons voir, après 9 jours ou encore 13 jours d'incubation, que la souche S1H est mobile tandis que S1 ne l'est pas. Il existe cependant quelques exceptions où un des quatre répliques biologiques de S1 est mobile mais beaucoup moins que S1H.

Cette propriété pour S1H pourrait être avantageuse dans l'espace en condition de microgravité où les conditions de mélange pourraient ne pas être idéales au niveau du bioréacteur de la boucle MELiSSA. Et donc, la bactérie pourrait se mouvoir et atteindre plus facilement les différents nutriments.

8. LIFE COUNT

8.1. RÉSULTATS

	S1			S1H		
	t=0	Phase exp.	Phase stat.	t=0	Phase exp.	Phase stat.
DO moyenne	0,0725	0,760	0,547	0,0735	0,513	0,5825
Dilution	10^{-4}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-4}	10^{-7}	10^{-6}
Cytométrie en flux	6,42E+06	9,37E+08	1,07E+09	7,87E+06	3,66E+09	4,17E+08
Erreur	1,54E+06	3,10E+08	1,52E+08	1,86E+06	8,12E+08	1,95E+08
Boîte de Petri	3,26E+06	1,02E+09	5,67E+08	5,40E+06	2,00E+09	2,25E+08
Erreur	6,68E+05	5,91E+08	7,82E+07	2,21E+06	8,16E+08	1,89E+08
Ratio Cytométrie/ Boîtes	2,08	1,17	1,93	1,55	2,26	2,61
Erreur	0,825	0,629	0,399	0,382	0,352	1,353

8.2. DISCUSSION

Cette expérience nous permet de voir que le nombre de bactéries suit la courbe de croissance dans le sens où, leur nombre augmente lors de la phase exponentielle pour diminuer lors de la phase stationnaire. Ce tableau nous permet également de remarquer qu'il n'y a pas de différence notable entre les deux souches ; elles se comportent toutes deux plus ou moins de la même manière.

Le calcul du ratio nous permet de comparer les deux méthodes de comptage, on peut voir que de manière générale, le cytomètre en flux compte deux fois plus de bactéries que le comptable sur boîte de Petri. Ce phénomène a déjà été observé précédemment et il a été attribué aux fluorochromes utilisés. En effet, le PI émet de la lumière qui est capté par le détecteur qui est censé capter uniquement la lumière venant du SYTO9. Dans ce cas, une partie des cellules mortes donnent un signal de cellules vivantes, d'où la surestimation observée.

9. EXTRACTION DE PIGMENTS

Après les différentes mesures faites à l'aide du spectrophotomètre, la loi de Beer-Lambert nous permet de calculer les concentrations en pigments (caroténoïdes et bactériochlorophylle).

La formule ci-dessous nous permet de calculer la concentration en caroténoïdes. Deux DO sont prises en compte car les caroténoïdes absorbent à ces deux longueurs d'onde. Le facteur 1000 nous permet de passer du mL au L tandis que le facteur 2 vient du fait que nous utilisons 1mL de culture et que nous mesurons la DO dans 2mL de solvant.

$$C_{\text{caroténoïdes}} = \frac{(DO_{496nm} + DO_{515nm})/2}{\epsilon_{\text{moy}} \cdot l} \times 1000 \times 2$$

L'autre formule ci-dessous nous permet de calculer la concentration en bactériochlorophylle. Une seule longueur d'onde est nécessaire pour en calculer la concentration. Les facteurs ont quant à eux, la même signification.

$$C_{BChla} = \frac{DO_{763nm}}{\epsilon_{763nm} \cdot l} \times 1000 \times 2$$

9.1. RÉSULTATS

Concentration en caroténoïdes et en bactériochlorophylle chez S1 à différents points de la courbe de croissance

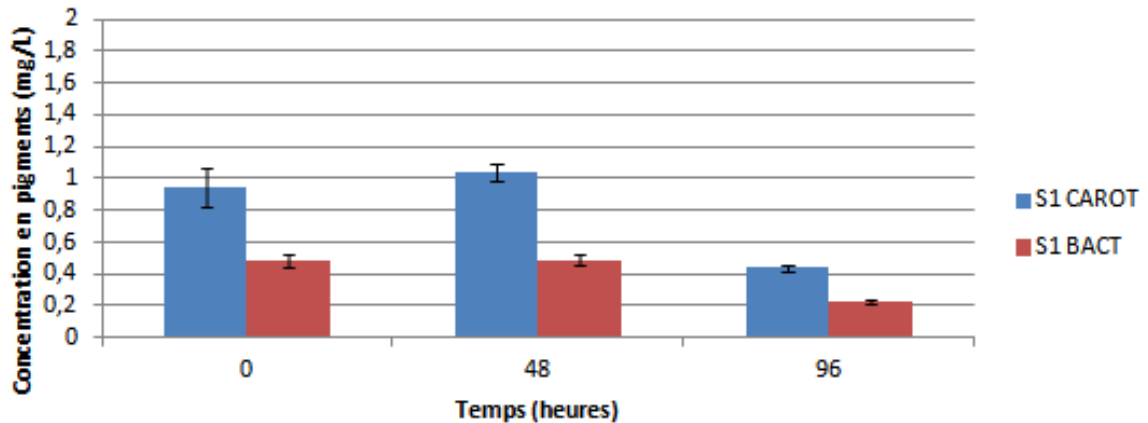


FIGURE 47: RÉSULTAT DE L'EXTRACTION DE PIGMENTS POUR S1

Concentration en caroténoïdes et en bactériochlorophylle chez S1H à différents points de la courbe de croissance

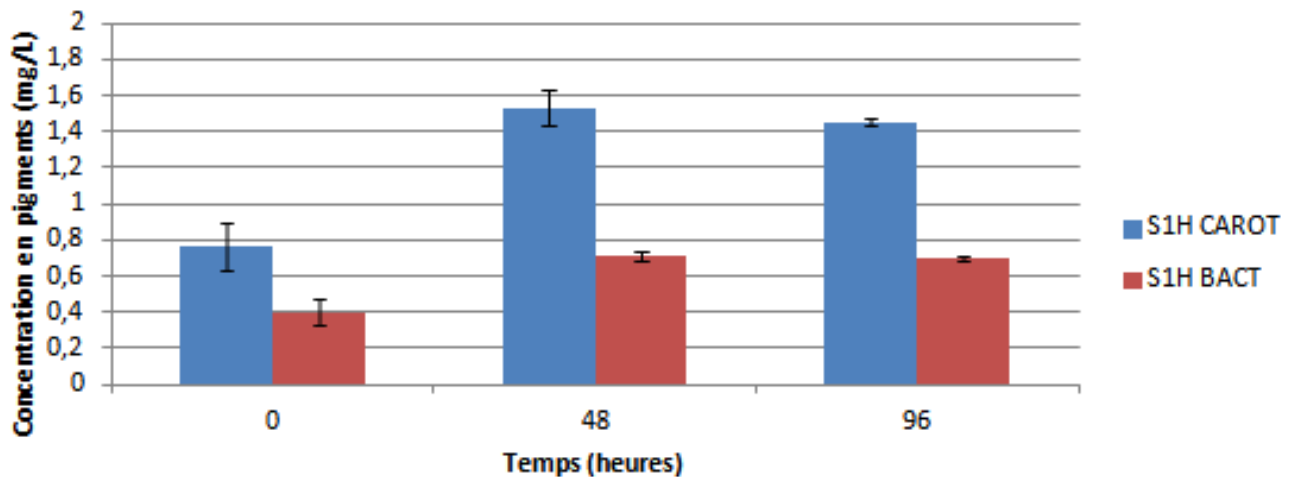


FIGURE 48: RÉSULTAT DE L'EXTRACTION DE PIGMENTS POUR S1H

	t=0	Phase exponentielle	Phase stationnaire
Rapport caroténoïdes/Bactéριοchlorophylle			
S1	1,96473029	2,11956522	1,95238095
S1H	1,91729323	2,15937941	2,09090909
DO à 680 nm			
S1	0,0725	0,76	0,547
Erreur	0,00465475	0,01169045	0,041833
S1H	0,0735	0,513	0,5825
Erreur	0,00173205	0,02913188	0,00310913

9.2. DISCUSSION

Les mesures ont été faites à différents moments de la courbe de croissance : Au temps 0, durant la phase exponentielle (48h) et en phase stationnaire (96h). En règle générale au sein d'une même souche, nous pouvons observer que la concentration en pigment augmente fortement jusqu'en phase exponentielle et subit ensuite une légère diminution. Cette relation est en accord avec la courbe de croissance. Plus il y aura de bactéries, plus il y aura de pigments et inversement, quand le nombre de bactéries diminuera, par corrélation, la concentration en pigments diminuera également. Nous remarquons également pour une même souche, que la concentration en caroténoïdes est plus élevée que celle en bactériochlorophylle.

Pour comparer les deux souches, nous remarquons qu'en règle générale, la concentration en pigments est plus élevée chez S1H que chez S1. Cela est confirmé simplement quand on observe les colonies sur boîte Sistro, nous remarquons que la coloration de S1 est moins prononcée que celle de S1H.

Cependant il faut rester prudent. La concentration en pigments reste extrêmement faible. Ceci est tout à fait normal car les bactéries sont cultivées en milieu Siström DAE. Ces conditions ne sont pas favorables à la production de pigments car la bactérie se développe à l'abri de la lumière. Cependant, il existe malgré tout une concentration seuil en pigments.

Pour ce qui est du rapport des caroténoïdes sur la bactériochlorophylle, on peut observer qu'en règle générale pour chacune des phases la concentration en caroténoïdes est deux fois supérieure à celle en bactériochlorophylle.

10. MICROSCOPIE OPTIQUE

10.1. RÉSULTATS

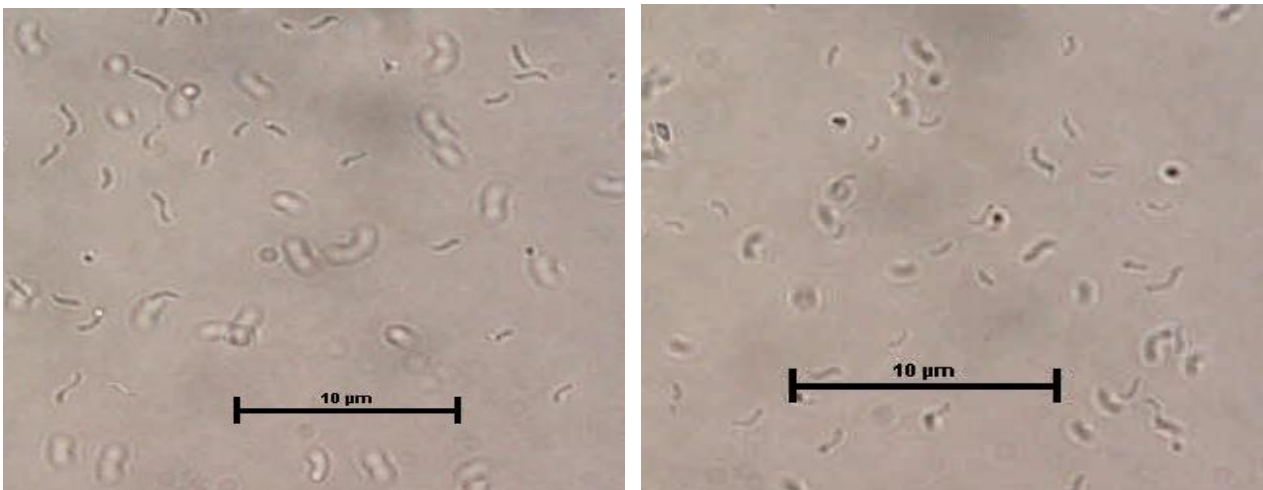


FIGURE 49: MICROSCOPIE OPTIQUE, ZOOM 600X, S1 (À GAUCHE) ET S1H (À DROITE) EN PHASE EXPONENTIELLE

10.2. DISCUSSION

La microscopie optique ne nous montre aucune différence notable entre les deux souches vu le faible grossissement disponible pour cette souche. On remarque une légère forme incurvée et une longueur d'environ $2\mu\text{m}$, conformément à la littérature.

11. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

11.1. RÉSULTATS



FIGURE 50: MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE, ZOOM 5000X, S1 PHASE EXPONENTIELLE SIS DAE

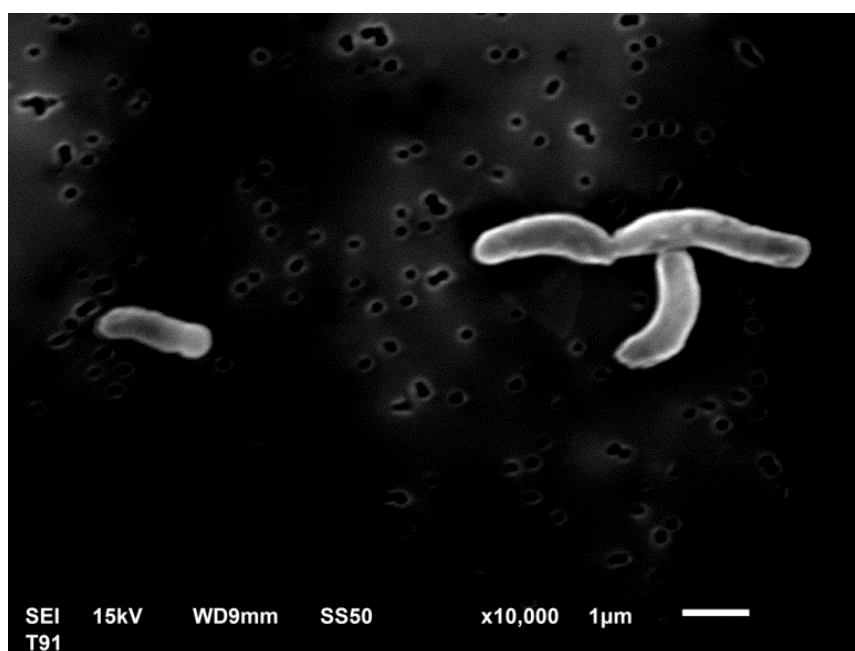


FIGURE 51: MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE, ZOOM 10000X, S1 PHASE EXPONENTIELLE SIS DAE

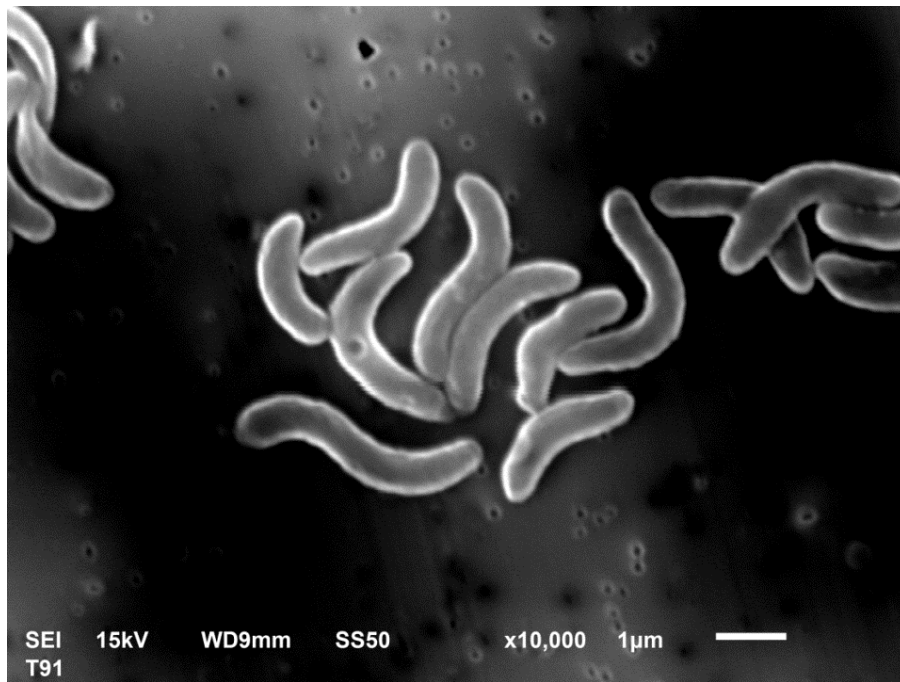


FIGURE 52: MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE, ZOOM 10000X, S1H PHASE EXPONENTIELLE SIS DAE

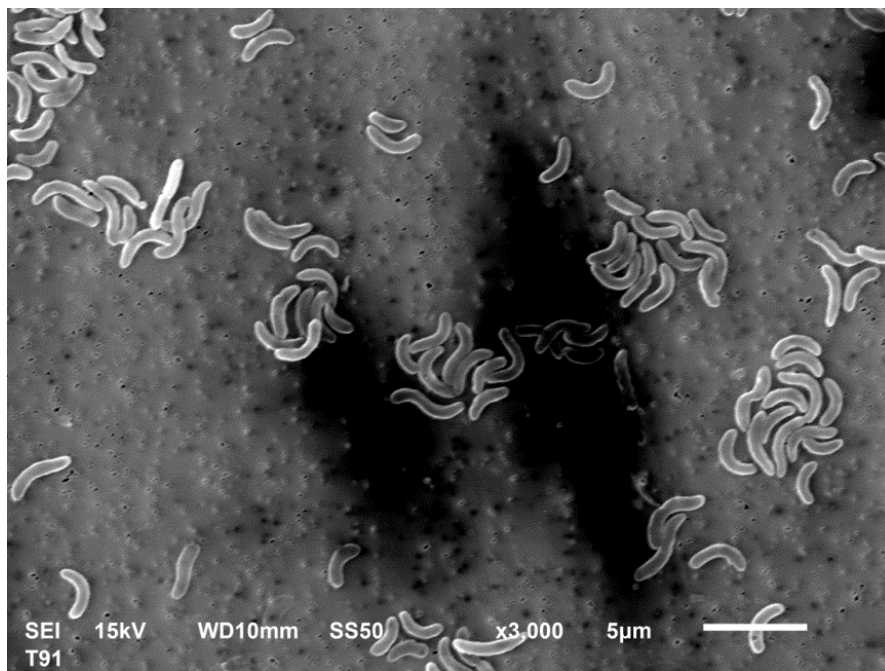


FIGURE 53: MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE, ZOOM 3000X, S1H PHASE EXPONENTIELLE SIS DAE

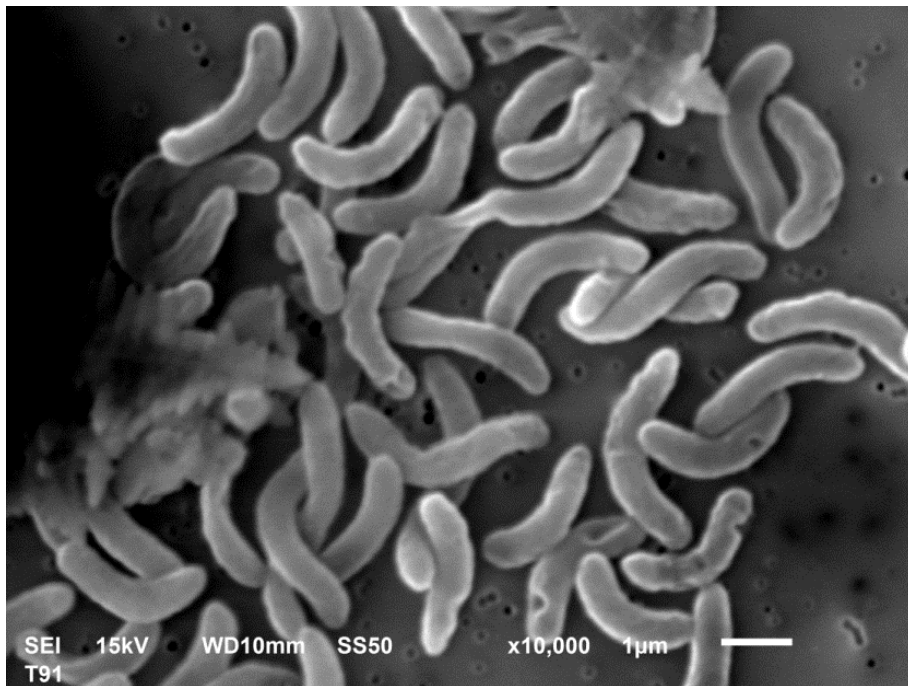


FIGURE 54: MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE, ZOOM 10000X, S1H PHASE EXPONENTIELLE SIS DAE

11.2. DISCUSSION

La microscopie électronique nous permet de visualiser correctement les 2 souches étudiées. Il n'y a pas de différence notable entre les deux souches. La taille des bactéries est d'environ 2-2,5μm de long pour 0,5-1,0μm de large. On peut facilement visualiser la forme incurvée caractéristique de *R. rubrum*. La microscopie électronique réalisée dans les conditions décrites ci-dessus ne nous a pas permis de distinguer les flagelles de *R. rubrum*.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

A travers ces nombreuses techniques et expériences réalisées, nous avons pu constater qu'une simple mutation ponctuelle pouvait engendrer au niveau du comportement bactérien des différences significatives pour certaines et pour d'autres, aucun changement.

Nous avons donc compris pourquoi S1H est utilisée plutôt que sa souche parente S1 ; car celle-ci possède divers avantages. Parmi ces avantages, nous pouvons citer la mobilité conférée à S1H, qui pourra lui permettre de se mouvoir au sein du milieu sans difficulté et ainsi atteindre les éléments nécessaires à sa survie en condition de microgravité spatiale. Nous pouvons également citer la résistance à la thréonine, un acide aminé qui sera produit par le premier compartiment. S1H a montré une résistance par rapport à S1 ce qui lui permettra de se comporter normalement face à la présence de l'acide aminé, ce que S1 n'aurait pu faire. Les autres tests ne nous ont pas montrés de différence significative entre les deux souches mais ces résultats doivent être pris en considération.

En effet, ces premiers tests ont été réalisés dans le milieu Sistrom-succinate en condition aérobie dans l'obscurité (DAE - dark aerobic) qui sont les conditions de culture les plus favorables à *R. rubrum* et les plus faciles à mettre en oeuvre. Cependant, nous savons que le milieu utilisé dans le cadre du projet MELiSSA par *R. rubrum* possède des conditions totalement différentes puisque la source de carbone est l'acetate et les conditions de culture sont anaérobie et sous illumination continue.

La prochaine étape serait donc de tester ces mêmes expériences dans les conditions réelles d'utilisation de MELiSSA. Ceci nous permettra d'établir de vrais pronostics quant au comportement de S1H sous les différentes conditions de stress qu'elle pourrait subir.

A travers ce stage, nous pouvons donc imaginer la masse de travail de recherche qu'il reste à effectuer afin que tous les paramètres soient pris en compte. Car ici, le travail ne consistait qu'en l'étude de quelques paramètres au sein d'un seul compartiment pour une souche bactérienne dans un milieu facile d'utilisation alors que le travail complet devra prendre en compte les 5 compartiments, ainsi que tous les paramètres en relation avec l'espace et les interconnexions entre les différents compartiments.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SCK•CEN. (2014). *Brève présentation*. [En ligne] <https://www.sckcen.be/fr/About/Introduction>, consulté le 13 février 2014
- [2] SCK•CEN. (2002). *50 Years Belgian Nuclear Research Centre*. [En ligne] <http://www.sckcen.be/sckcen50/uk/index.htm>, consulté le 11 février 2014
- [3A] Hendrickx L1, De Wever H, Hermans V, Mastroleo F, Morin N, Wilmotte A, Janssen P, Mergeay M. *Microbial ecology of the closed artificial ecosystem MELiSSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative): reinventing and compartmentalizing the Earth's food and oxygen regeneration system for long-haul space exploration missions*. Res Microbiol. 2006 Jan-Feb;157(1):77-86.
- [3B] European Space Agency. (2006). *MELiSSA Topics*. [En ligne] <http://ecls.esa.int/ecls/?p=melissafulltext>, consulté le 13 février 2014
- [4] Hendrickx L1, Mergeay M., *From the deep sea to the stars: human life support through minimal communities*. Curr Opin Microbiol. 2007 Jun;10(3):231-7.
- [5] SCK•CEN. (2014). *Life support system for space flight based on bacterial waste conversion*. [En ligne] http://science.sckcen.be/en/Institutes/EHS/MCB/Microbiology/Life_support_system, consulté le 13 février 2014
- [6] Herbwisdom. (2014). *Spirulina (Arthrospira platensis)*. [En ligne] <http://www.herbwisdom.com/herb-spirulina.html>, consulté le 2 juin 2014
- [7] Dr. Iris Keren. (2011). *Rhodospirillum rubrum*. [En ligne] https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Rhodospirillum_rubrum, consulté le 13 février 2014
- [8] Lansing M. Prescott, J.P. (2003). *Microbiologie*. De Boeck Supérieur.
- [9] Madigan, M.P. (2000). *Biology of microorganisms*. Brock
- [10] A. Christine Munk, A. C. (2011, Juin 30). Complete genome sequence of *Rhodospirillum rubrum* type strain (S1). *Standards in Genomic Sciences*, pp. 293-302.
- [11] Corbis Image. (2006). *CorbisImages Rhodospirillum rubrum Bacteria*. [En ligne] <http://www.corbisimages.com/stock-photo/rights-managed/42-20490851/rhodospirillum-rubrum-bacteria>, consulté le 23 février 2014
- [12] Mastroleo F. (2005). *Preliminary characterisation of the photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum ATCC25903 by means of phenotypic and molecular methods*, Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme d'Etude Approfondie en Sciences Biologiques, Université de Mons-Hainaut
- [13] Favier-Teodorescu L. (2004). *Etude cinétique et stoechiométrique de la croissance de Rhodospirillum rubrum en photobioréacteur*, Présenté pour l'obtention du grade de Docteur d'Université, Université Blaise Pascal
- [14] Lincoln Taïz, Eduardo Zeiger. (2010). *Plant physiology Online*. [En ligne] <http://5e.plantphys.net/image.php?id=78>, consulté le 23 février 2014

- [15] GILLY, M. F.-N. (2003). *Croissance Bactérienne*. [En ligne] <http://spiralconnect.univ-lyon1.fr/webapp/course/course.html?id=1680680&viewMode=visu&idChapter=1680680>, consulté le 5 mars 2014
- [16A] Plant Cell Physiol (1989). *Carotenoid Profiles in Pigment-Protein Complexes of Rhodospirillum rubrum*, 30 (4): 497-504
- [16B] Site TPE. (2006). *Nourrir l'humanité sans viande ?*. [En ligne] <http://tpe-nourrir-humanite.e-monsite.com/pages/presentation-orale/ii-l-agriculture-actuelle.html>, consulté le 3 mars 2014
- [17] Motte F., *TP de Chimie Clinique*, cours de BAC3 en Biologie Médicale, option Chimie clinique (2013), HELHa-ISC, Fleurus
- [18] Wikipédia. (2014). *Stem loop*. [En ligne] <http://en.wikipedia.org/wiki/Stem-loop>, consulté le 25 avril 2014
- [19] Ouverture Pédagogique et Novatrice des LABORATOIRES. (2013). *La PCR, qu'est ce que c'est ?* [En ligne] <https://ed414-openlab.unistra.fr/LES-TP/ADN-ET-GENETIQUE-2009-2012/POUR-PREPARER-LE-TP/LA-PCR-QUEST-CE-QUE-CEST/>, consulté le 13 mars 2014
- [20] Motte F., *Biologie moléculaire*, cours de BAC2 en Biologie Médicale, option Chimie clinique (2013), HELHa-ISC, Fleurus
- [21A] Bailly N., *Introduction à la cytométrie en flux : théorie et initiation pratique*, cours de BAC3 en TP d'Hématologie, option Chimie clinique (2013), HELHa-ISC, Fleurus
- [21B] UT-BIORAD. *FACS Flow Cytometry*, [En ligne] <http://utbiorad.casaccia.enea.it/facs-flow-cytometry.html>, consulté le 5 juin 2014
- [22] Thermo Scientific. (2014). *Fluorescent Probes*. [En ligne] <http://www.piercenet.com/method/fluorescent-probes>, consulté le 24 mars 2014
- [23] Wikipédia. (2014). *Axenic* [En ligne] <http://en.wikipedia.org/wiki/Axenic>, consulté le 15 avril 2014
- [24A] Catherine Ning, H. G. (1966, Octobre 17). *Regulation of L-isoleucine Biosynthesis in the Photosynthetic Bacterium Rhodospirillum rubrum*. Adolphus Busch III Laboratory of Molecular Biology .
- [24B] Sturani HS, Datta MH, Hughes M, Gest H. (1963). *Regulation of enzyme activity by specific reversal of feedback inhibition*. Science 141: 1053-4.
- [25] S. M. Hussain Qadri, D. S. (1973, Juin 14). *Pyruvic decarboxylase and acetoin formation in Athiorhodaceae*. *Can. J. Microbiol.* 19, pp. 1137-1143.
- [26] Zijun Xiao, P. X. (2007). *Acetoin Metabolism in Bacteria*. *Critical Reviews in Microbiology*, 33, pp. 127-140.
- [27] Primer3Plus. (2014). *Pick primers form a DNA sequence* [En ligne] <http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi> utilisé le 12 mars 2014

- [28] In silico PCR amplification, [En ligne] <http://insilico.ehu.es/PCR/index.php?mo=Rhodospirillum>, consulté le 12 mars 2014
- [29] PREMIER Biosoft. (2014). *Net Primer*. [En ligne] <http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/AnalyzePrimer.jsp>, consulté le 12 mars 2014
- [30] Scientiis International. (2005). *Thermo Scientific AquaMate™ Accessories for UV-Vis Spectrophotometers*. [En ligne] http://scientiis.com/laboratorium/catalog/index.php?manufacturers_id=165&sort=2a&filter_id=323, consulté le 15 mai 2014
- [31] Ze-Yu Jiang, B. G. (1998, Mars). Isolation of *Rhodospirillum centenum* Mutants Defective in Phototactic Colony Motility by Transposon Mutagenesis. *Jornal of Bacteriology* , pp. 1248-1255.
- [32] BD Biosciences. (2014). *BD Accuri C6*. [En ligne] http://www.bdbiosciences.com/instruments/accuri/index.jsp?utm_source=LabX&utm_medium=NL&utm_campaign=may, consulté le 18 mai 2014

LISTE DES FIGURES

Figure 1: VUE AÉRIENNE ACTUELLE DU SCK•CEN [2]	4
Figure 2: ECOSYSTÈME D'UN LAC AFRICAÏN COMME MODÈLE POUR MELISSA [4]	13
Figure 3: Le Schéma simplifié de la boucle MELISSA (source: ESA).	14
Figure 4: Taxonomie de <i>R. rubrum</i>	17
Figure 5: <i>R. RUBRUM</i> AU MICROSCOPE APRÈS COLORATION GRAM [11]	18
Figure 6: Métabolisme de <i>R. rubrum</i> [12]	19
Figure 7: DISTRIBUTION DES PIGMENTS [14]	20
Figure 8: Représentation du spectre d'absorption de <i>R. rubrum</i> dans le mélange acétone/méthanol avec en ligne continue l'addition de tous les pigments. [16a]	24
Figure 9: Appareillage pour électrophorèse biorad	28
Figure 10: Représentation schématique du cytomètre en flux [21b]	29
Figure 11: Diagramme de Jablonski [22]	30
Figure 12: Exemple de résultat de cytogramme de S1 en phase stationnaire à gauche : la population d'intérêt est ciblée à l'aide du FSC et SSC à droite : dans la population d'intérêt, distinction entre les bactéries vivantes et mortes	30
Figure 13: Utilisation du programme primer 3 plus [27]	47
Figure 14: exemple: vérification de la longueur du gene <i>rru_a0526</i> SOURCE: [28]	48
Figure 15: résultat du programme in silico pour la vérification de la longueur du segment [28]	48
Figure 16: exemple de résultat d'analyse de primer sur netprimer [29]	49
Figure 17: Représentation du protocole d'extraction d'ADN	50
Figure 18: Thermocycler	51
Figure 19: Représentation du moule du gel	53
Figure 20: CUVE électrophorétique	53
Figure 21: Montage pour le running du gel	53
Figure 22: Spectrophotomètre aquamate [30]	56
Figure 23: représentation du protocole du test de mobilité	57
Figure 25: illustration du protocole de dilution en série	59
Figure 24: Cytomètre en flux [32]	59
Figure 26: illustration du comptage sur boîte	60
Figure 27: Résultat de la courbe de croissance de S1 vs S1H ainsi que du pH	62
Figure 28: Résultat de l'électrophorèse sur gel avec la Dream Taq Polymérase	64
Figure 29: « Ladder » utilisée lors des électrophorèses	65
Figure 30: Résultat de l'électrophorèse sur gel avec la PHUSION High Fidelity enzyme	65
Figure 31: <i>R. rubrum</i> S1H, Primer: Rru_A0932_p4_F	66
Figure 32: <i>R. rubrum</i> S1 Primer: Rru_A0932_p4_F	66
Figure 33: <i>R. rubrum</i> S1H Primer: Rru_A2409_p7_R	67
Figure 34: <i>R. rubrum</i> S1 Primer: Rru_A2409_p7_R	67
Figure 35: <i>R. rubrum</i> S1H Primer: Rru_A2877_p2	68
Figure 36: <i>R. rubrum</i> S1 Primer: Rru_A2877_p2	68
Figure 37: Résultats du test de la thréonine pour S1 et S1H	69
Figure 38: Résultat du test de l'acétoïne pour S1	70
Figure 39: Résultat du test de l'acétoïne pour S1H	70
Figure 40: Temps de génération à partir de 4 réplicas biologiques avec erreurs	71
Figure 41: Graphique du test du glycérol qui compare la croissance de S1 et S1H dans différentes conditions S1= Souche S1 dans le milieu Sis + thréonine TEM S1= Souche S1 dans le milieu SIS =	

Témoin S1 S1H= Souche S1H dans le milieu SIS + thréonine TEM S1H= souche S1H dans le milieu SIS = Témoin S1H.....	72
Figure 42: Test de Mobilité (par mesure de diamètre) de S1 et S1H en fonction du temps.	73
Figure 43: Visualisation de la mobilité de S1 après 9 jours d'incubation.....	73
Figure 44: Visualisation de la mobilité de S1H après 9 jours d'incubation.....	73
Figure 45: Visualisation de la mobilité de S1 après 13 jours d'incubation	73
Figure 46: Visualisation de la mobilité de S1H après 13 jours d'incubation.....	73
Figure 47: Résultat de l'extraction de pigments pour S1.....	76
Figure 48: Résultat de l'extraction de pigments pour S1H	76
Figure 49: microscopie optique, zoom 600x, S1(à gauche) et S1H (à droite) en Phase exponentielle	78
Figure 51:Microscopie électronique, zoom 5000x, s1 Phase exponentielle sis dae	79
Figure 52: Microscopie électronique, zoom 10000x, s1 Phase exponentielle sis dae	79
Figure 53: Microscopie électronique, zoom 10000x, s1h Phase exponentielle sis dae.....	80
Figure 54: Microscopie électronique, zoom 3000x, s1h Phase exponentielle sis dae	80
Figure 55: Microscopie électronique, zoom 10000x, s1H Phase exponentielle sis dae.....	81

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Bcl/bclh : bacteriochlorophylle	LB : riche de Luria-Bertani
Crt : caroténoïde	PBS: tampon phosphate salin
DAE : Dark aerobic	PI: Propidium iodide
DO: densité optique ou absorbance	rpm : rotation par minute
Exp : exponentielle	Sis: Siström
LAN : light anaérobic	

ANNEXES

TABLE DES ANNEXES

ANNEXE N°1 TABLEAU DE PROGRAMMATION DE LA PCR EN UTILISANT L'ENZYME DREAM TAQ

ANNEXE N°2 TABLEAU DE PROGRAMATION DE PCR EN UTILISANT LA PHUSION HIGH FIDELITY ENZYME

ANNEXE N°3 - SCANS DE L'EXTRACTION DE PIGMENTS
SPECTRES D'ABSORPTION

ANNEXE N°4 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES DIFFÉRENTS GÈNES TESTÉS

ANNEXE N°5 : MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

ANNEXE N°6: RÉFÉRENCE DES DIFFÉRENTS PRODUITS UTILISÉS

ANNEXE N°1 TABLEAU DE PROGRAMMATION DE LA PCR EN UTILISANT L'ENZYME DREAM TAQ

Rru_A2877 p2	TEMPERATURE	TEMPS	CYCLES
INITIAL	94°C	3 min	1
DENATURATION	94°C	30 sec	} 30
DENATURATION	94°C	30 sec	
ANNEALING	58°C	30 sec	
EXTENSION	72°C	1min27sec	} 1
FINAL EXTENSION	72°C	7min	
Rru_A2877 p5			
INITIAL	94°C	3 min	1
DENATURATION	94°C	30 sec	} 30
DENATURATION	94°C	30 sec	
ANNEALING	58°C	30 sec	
EXTENSION	72°C	1min27sec	} 1
FINAL EXTENSION	72°C	7min	
Rru_A2877 p5séq			
INITIAL	94°C	3 min	1
DENATURATION	94°C	30 sec	} 30
DENATURATION	94°C	30 sec	
ANNEALING	58°C	30 sec	
EXTENSION	72°C	1min27sec	} 1
FINAL EXTENSION	72°C	7min	
Rru_A0932 p1			
INITIAL	94°C	3 min	1
DENATURATION	94°C	30 sec	} 30
DENATURATION	94°C	30 sec	
ANNEALING	58°C	30 sec	
EXTENSION	72°C	1min27sec	} 1
FINAL EXTENSION	72°C	7min	
Rru_A0932 p3			
INITIAL	94°C	3 min	1
DENATURATION	94°C	30 sec	} 30
DENATURATION	94°C	30 sec	
ANNEALING	58°C	30 sec	
EXTENSION	72°C	1min27sec	} 1
FINAL EXTENSION	72°C	7min	
Rru_A0932 p4			
INITIAL	94°C	3 min	1
DENATURATION	94°C	30 sec	} 30
DENATURATION	94°C	30 sec	
ANNEALING	58°C	30 sec	
EXTENSION	72°C	1min27sec	} 1
FINAL EXTENSION	72°C	7min	
Rru_A2409 p1			
INITIAL	94°C	3 min	1
DENATURATION	94°C	30 sec	} 30
DENATURATION	94°C	30 sec	
ANNEALING	58°C	30 sec	
EXTENSION	72°C	1min27sec	} 1
FINAL EXTENSION	72°C	7min	

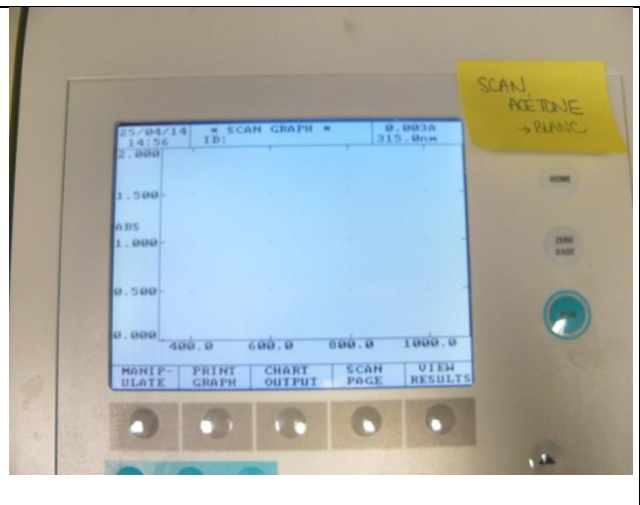
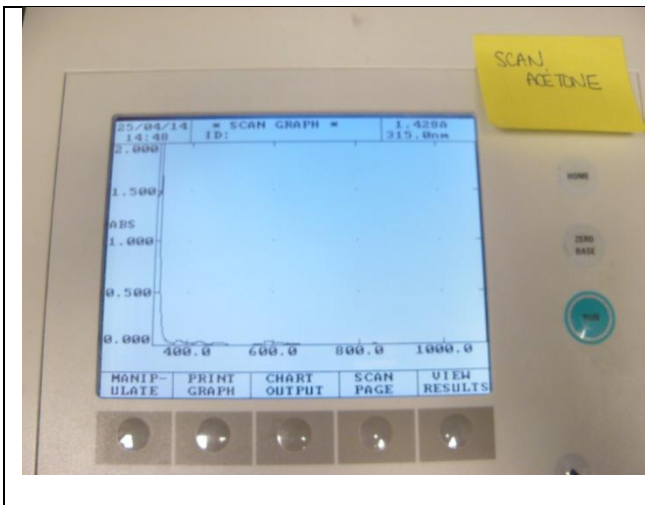
Rru_A2409 p7			
INITIAL DENATURATION	94°C	3 min	1
DENATURATION	94°C	30 sec	} 30
ANNEALING	58°C	30 sec	
EXTENSION	72°C	1min27sec	
FINAL EXTENSION	72°C	7min	1

ANNEXE N°2 TABLEAU DE PROGRAMATION DE PCR EN UTILISANT LA PHUSION HIGH FIDELITY ENZYME

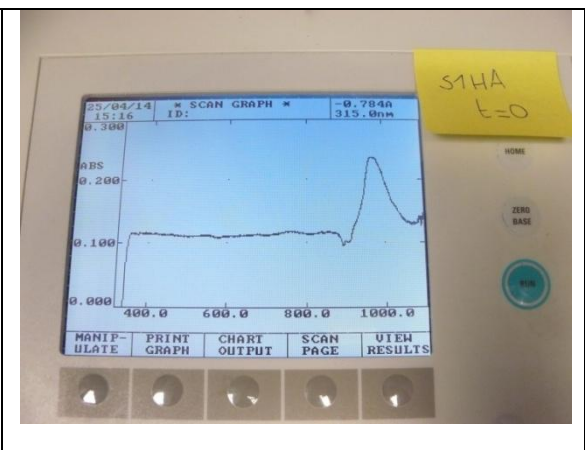
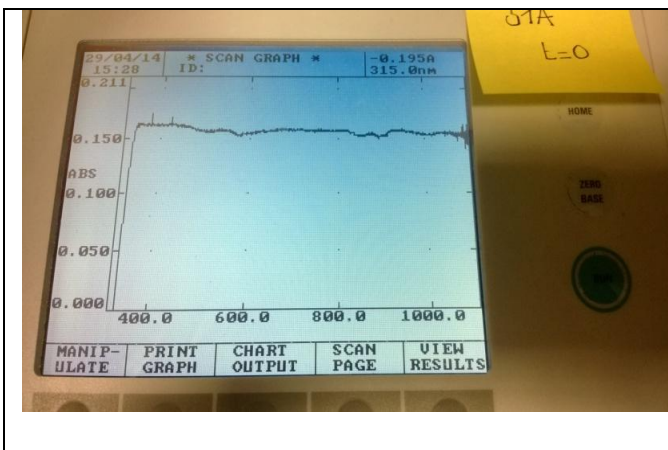
Rru_A2877 p5	TEMPERATURE	TIME	CYCLES
INITIAL DENATURATION	98°C	30sec	1
DENATURATION	98°C	8sec	} 30
ANNEALING	58°C	30sec	
EXTENSION	72°C	22,035 sec	
FINAL EXTENSION	72°C	7min	1
Rru_A2877 p2	TEMPERATURE	TIME	CYCLES
INITIAL DENATURATION	98°C	30sec	1
DENATURATION	98°C	8sec	} 30
ANNEALING	58°C	30sec	
EXTENSION	72°C	21,885 sec	
FINAL EXTENSION	72°C	7min	1
Rru_A2877 p5séq	TEMPERATURE	TIME	CYCLES
INITIAL DENATURATION	98°C	30sec	1
DENATURATION	98°C	8sec	} 30
ANNEALING	58°C	30sec	
EXTENSION	72°C	23,49 sec	
FINAL EXTENSION	72°C	7min	1
Rru_A2409 p1	TEMPERATURE	TIME	CYCLES
INITIAL DENATURATION	98°C	30sec	1
DENATURATION	98°C	8sec	} 30
ANNEALING	58°C	30sec	
EXTENSION	72°C	21,75 sec	
FINAL EXTENSION	72°C	7min	1
Rru_A2409 p7	TEMPERATURE	TIME	CYCLES
INITIAL DENATURATION	98°C	30sec	1
DENATURATION	98°C	8sec	} 30
ANNEALING	56°C	30sec	
EXTENSION	72°C	23,055 sec	
FINAL EXTENSION	72°C	7min	1
Rru_A0932 p1	TEMPERATURE	TIME	CYCLES
INITIAL DENATURATION	98°C	30sec	1
DENATURATION	98°C	8sec	} 30
ANNEALING	60°C	30sec	
EXTENSION	72°C	32,415 sec	
FINAL EXTENSION	72°C	7min	1
Rru_A0932 p3	TEMPERATURE	TIME	CYCLES
INITIAL DENATURATION	98°C	30sec	1
DENATURATION	98°C	8sec	} 30
ANNEALING	60°C	30sec	
EXTENSION	72°C	32,025 sec	
FINAL EXTENSION	72°C	7min	1
Rru_A0932 p4	TEMPERATURE	TIME	CYCLES
INITIAL DENATURATION	98°C	30sec	1
DENATURATION	98°C	8sec	} 30
ANNEALING	60°C	30sec	
EXTENSION	72°C	31,935 sec	
FINAL EXTENSION	72°C	7min	1

ANNEXE N°3 - SCANS DE L'EXTRACTION DE PIGMENTS SPECTRES D'ABSORPTION

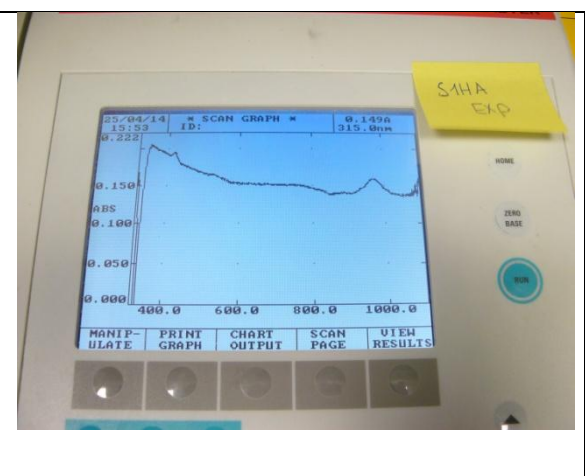
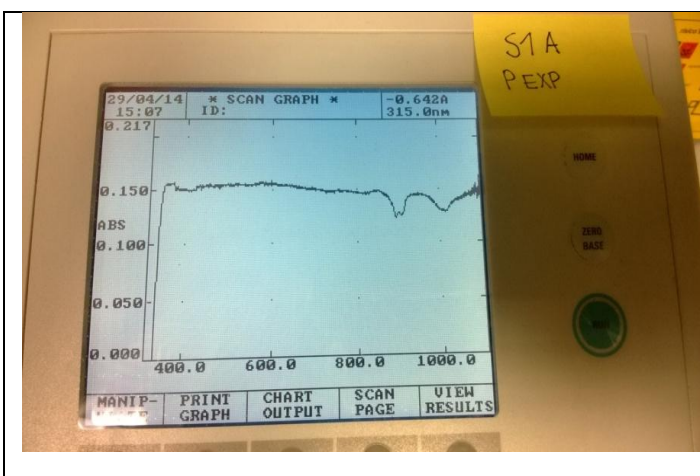
SCANS DE L'ACÉTONE/ BLANC



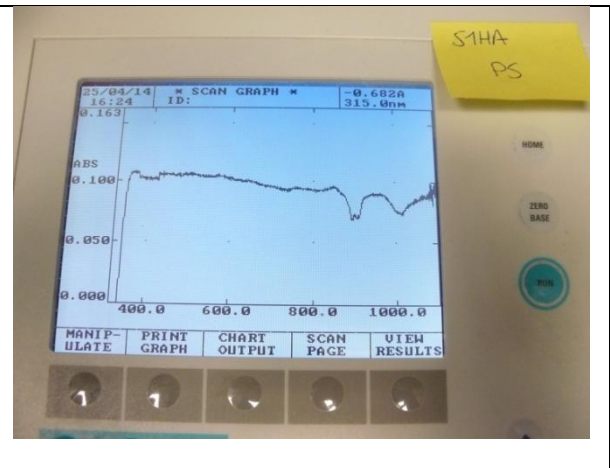
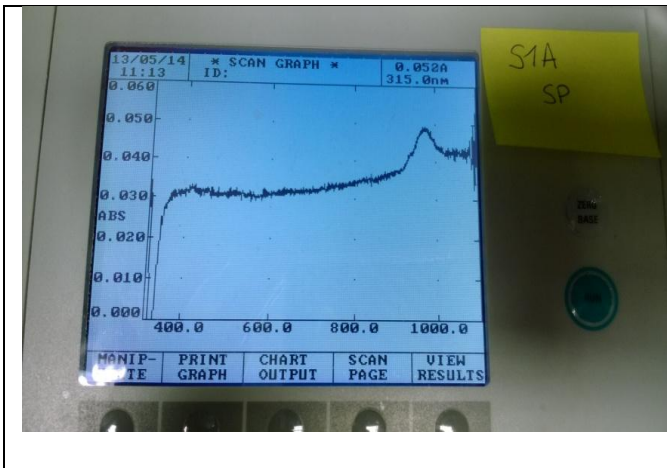
SCANS DE S1 ET S1H À T=0



SCANS DE S1 ET S1H EN PHASE EXPONENTIELLE




SCANS DE S1 ET S1H EN PHASE STATIONNAIRE



ANNEXE N°4 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES DIFFÉRENTS GÈNES TESTÉS

Gène	Nom	Séquence	Longueur du fragment attendu (pb)	Bases	Tm	%GC
Thréonine déshydratase	Rru_A2877_p2_F	AAT-CAG-TGG-TTT-GGC-ACG-AT	1459	20	58	45
	Rru_A2877_p2_R	CAT-CGG-CGA-GAG-GCT-TAA-T		19	58	52,6
	Rru_A2877_p5_F	TTT-CGC-TCG-AAA-TCA-GTG-GT	1469	20	58	45
	Rru_A2877_p5_R	CAT-CGG-CGA-GAG-GCT-TAA-T		19	58	52,6
	Rru_A2877_p5seq_F	AAT-CAG-TGG-TTT-GGC-ACG-AT	1566	20	58	45
	Rru_A2877_p5seq_R	AGA-AGG-CCA-AGA-CAC-AGC-AG		20	62	55
Métabolisme de l'acétoïne	Rru_A0932_p1_F	TTA-CTT-GCG-CTC-TCC-CCT-TA	2161	20	60	50
	Rru_A0932_p1_R	GCA-GGG-AAG-TTG-AAC-AGG-TC		20	62	55
	Rru_A0932_p3_F	GCA-TCA-AGT-CCT-TCA-GCA-CA	2135	20	60	50
	Rru_A0932_p3_R	GTT-CAT-CCT-GCG-GTA-CAA-GG		20	62	55
	Rru_A0932_p4_F	GCA-TCA-AGT-CCT-TCA-GCA-CA	2129	20	60	50
	Rru_A0932_p4_R	CCT-GCG-GTA-CAA-GGT-ATT-GC		20	62	55
Métabolisme du glycérol	Rru_A2409_p1_F	GTC-ATC-CGC-ATC-GAA-CAG-T	1450	19	58	52,6
	Rru_A2409_p1_R	CCG-CCG-GAG-TCA-GAA-TAT-C		19	60	57,9
	Rru_A2409_p7_F	TCA-TGA-CCC-TTC-ATG-ACA-CC	1537	20	60	50
	Rru_A2409_p7_R	GCC-GGA-GTC-AGA-ATA-TCG		18	56	55,6
Mobilité "swimming"	Rru_A0526_F	GGC-ACT-GTG-ACC-CTC-TCC-TA	1503	20	64	60
	Rru_A0526_R	TCA-TCG-CAA-TCC-CCT-TTA-GA		20	58	45
	Rru_A0526_R_2	CAT-CAT-CGC-AAT-CCC-CTT-TA		20	58	45
"Swarming"	Rru_A2209_F	CTC-GGC-GAT-CAA-AGA-AAA-TC	3489	20	58	45
	Rru_A2209_R	ATG-GTG-TCG-GCT-TAT-GGT-GT		20	60	50

ANNEXE N°5 : MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

 <p>STUDIECENTRUM VOOR KERNENERGIE CENTRE D'ETUDE DE L'ENERGIE NUCLEAIRE</p>	<p>LABORATORY FOR MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY</p> <p>PROTOCOL FOR THE PREPARATION OF LIQUID BIOLOGICAL SAMPLES FOR SCANNING ELECTRON MICROSCOPY</p>	<p>Version : 02</p> <p>Date : 14/04/2013</p> <p>Author : Katinka Wouters, Hugo Moors</p>
---	---	--

Aim

Preparation of liquid samples (e.g. microbial cultures) for subsequent Scanning Electron Microscopy (SEM) by fixation, dehydration, drying and coating.

Reagentia and accessories

Reagentia from previous preparations, accessories and a copy of this protocol can be found in the microbiology lab, in the drawer labeled 'SEM' (bottom drawer next to bioreactor bench). Please keep it organized!

- Washing solution - 2 mL per sample:
0.15M **cacodylate** solution (= 3.21 g sodium cacodylate in 100 mL of MQ H₂O)
(stored as toxic compound)

Fixation solution - 3 mL per sample:
3% **gluteraldehyde** (w/v) in washing solution, pH 7.6 (= 6 mL of gluteraldehyde 25% (w/v) in 44 mL of 0.15M cacodylate solution)
(stored in µbio fridge, polystyrene box)

- Ascending graded series of **ethanol** concentrations - 1 mL per sample (3 mL for 100 % ethanol):
30, 50, 70, 90, 95, 100% ethanol in MQ H₂O (v/v)
- Pure **hexamethyldisilazane** (HMDS, liquid) – 3 mL per sample
- Membrane filters (0.1 µm or 0.2µm pore size, e.g. Nuclepore TrackEtch Polycarbonate)
- Filterholders
- 1 - 2 - 5 mL syringes
- Messing or aluminium stubs
- Carbon tape or glue

Protocol – WORK UNDER THE HOOD!

A) Fixation

- Concentrate cells from 500 µL of sample (preferably about 10⁵-10⁶ cells / mL) on the 0.2 µm or 0.1 µm filter surface using a syringe. Use the membranes with shiny side up.

- Flood filter surface with 1 mL of fixation solution using a syringe. Let it fix for 20 minutes. Perform this step twice.
- Wash the filter surface twice with 1 mL of the wash solution using a new syringe.
- Flood the filter surface a third time with 1 mL of the wash solution and store overnight at 4°C inside the filterholders. Wrap with parafilm.

B) Dehydration

- Rinse the filter surface with the ascending graded series of ethanol using a syringe, starting with 30 %, and ending with 100% ethanol, 1 mL each. Wait 10 minutes between each step.
- Replace the final 100% solution twice.

C) Drying

- Replace the ethanol solution with 1 mL of HMDS, using a syringe. Perform this step three times and wait 10 minutes between each step.
- Air-dry the filters at room temperature in a dessicator for minimum one hour.
- Tape on a messing or aluminum stub using carbon tape or carbon glue.
- Dry samples can be kept in a dessicator for several weeks.

D) Coating

Sputter coat with gold particles, using the ScanCoat, located in room 01000-0068.

Contact Leen Verheyen (2718) to check availability of the lab and the ScanCoat.

Write down the number of cycles you used and your budgetnumber in the note book (will not be used until new gold foil will have to be bought)

Coating Protocol

- 1) Put your samples on or in a sample holder and place them in the vacuum chamber. Make sure that the top of low stubs always stick out of the holder
- 2) Turn on the cooling water by opening the tap labeled 'scancoat'
- 3) Adjust Argon pressure on the gas bottle until the mark
- 4) Turn Scancoat power ON
- 5) Press 'Pump'. It will pull a vacuum, to remove the oxygen
- 6) Start a cycle without High Voltage ('HT' off), to adjust the Argon pressure.
 - a. Press 'Start'
 - b. Adjust pressure at the back of the device. Ideally, pressure is between 6 and 8 mbar (outer scale)
 - c. Hold for about 100 seconds
- 7) When pressure is OK: start sputtering by putting 'HT' on
 - ➔ 50 mA and 600V is expected
 - ➔ A steady purple plasma glow indicates stable sputtering
- 8) Two cycli of 300 seconds should be enough. Beware to turn off 'HT' at the end and beginning of a cycle. When you start a new cycle, pressure has to be readjusted because the vacuum pump will start automatically when a cycle ends.
- 9) When you're finished:
 - Turn off HT
 - Press 'Vent' (other side of 'Pump')
 - Open Chamber and remove samples

- Turn off Scancoat
- Close cooling water tap
- Close gas bottle

Remarks

- a. Sputtering will be of low quality if:
 - Argon pressure is too low (< 6 mbar) \rightarrow current is too high \rightarrow gold will 'melt' at the top \rightarrow it will either not reach the stub, or it will cluster in big chunk of gold (resulting in low resolution SEM images). This is visible by unstability of the purple plasma glow.
 - Argon pressure is too high (> 8 mbar) \rightarrow too much Argon \rightarrow too much inert gas \rightarrow not enough conductivity for the gold (current too low) \rightarrow less coating.
- b. Current depends on the height of the stubs, so:
 - Don't sputtercoat stubs of different heights together in one cycle
 - Pressure needs to be readjusted when a new cycle starts with stubs of a height different from the previous cycle
- c. The higher the amount of stubs, the higher the current (e.g. 52 mbar instead of 50 mbar)

ANNEXE N°6: RÉFÉRENCE DES DIFFÉRENTS PRODUITS UTILISÉS

Produits/Matériel	Références
Cuvettes de lecture	Greiner Bio-one Cuvettes 10x10x45 Semi-micro Item n° 613001
Tampon TBE	BIO RAD 10x TBE Buffer (5l) Exp: 2016-04-18
Agar en poudre	VWR CHEMICALS Prolabo Agar powder (250g) Product: 20767.232 Batch: 13J070027
Agarose	Roche Agarose MP (500g) Lot : 16733300 Ref: 11388991001 Exp: Jan 2015
L-thréonine	Sigma-Aldrich L-threonine (100g) Lot: 08M01921V
Glycérol	MERCK Glycerol Lot : 1.04092.1000
LB agar	Invitrogen LB Agar (Lennox L Agar) Lot: 00301241 Ref: 2222700-041
Acétone	EMSURE® ACS, ISO, REag. Ph Eur Acetone for analysis
Microscope optique	Images were acquired with a Nikon Eclipse Ti (automated inverted wide-field epifluorescence microscope) equipped with a 40×magnification
Microscope électronique	JEOL JSM6610 LV type scanning electron microscope

Voilà maintenant presque 25 ans que l'ESA, l'Agence Spatiale Européenne a développé le projet MELiSSA, « Micro-Ecological Life Support System Alternative ». Ce projet a pour but de réaliser, dans le futur, des missions spatiales habitées de longues durées basées sur un système de vie de type régénératif. La boucle MELiSSA est composée de différents compartiments qui sont des bioréacteurs contenant chacun d'eux un microorganisme remplissant une tâche bien particulière.

La bactérie pourpre non sulfureuse *Rhodospirillum rubrum* souche S1H (ATCC25903) a été choisie comme microorganisme pour le second compartiment de la boucle MELiSSA. Son rôle au sein de ce bioréacteur est principalement de dégrader les acides gras volatils venant du premier bioréacteur. En effet, ces derniers seraient dommageables s'ils arrivaient dans le troisième compartiment.

Le but de ce stage a été de comparer deux souches ; *Rhodospirillum rubrum* S1H (ATCC25903) souche mutante utilisée dans le cadre du projet MELiSSA et *Rhodospirillum rubrum* S1 (ATCC11170), sa souche parente. La comparaison se base sur le fait que des mutations sur certains gènes ont pu être révélées suite au séquençage de ces deux génomes. C'est donc ce qui a été testé, premièrement au niveau génotypique à l'aide de nombreuses techniques de biologie moléculaires et ensuite au niveau phénotypique pour voir si le gène affecté donnait un réel changement de comportement à la bactérie.