

Protocole Agrégation Amibes Dictyostellium Discoideum

Simon Messelot, Romain De Oliveira, Gwenolé Le Gars

June 15, 2016

1 Mise en culture

1.1 Préparation du milieu de culture

On utilise pour cela un milieu HL5, dont la composition dans un 1 L de solution est la suivante :

- 5g d'extrait de levure
- 10g de glucose
- 10g proteose peptone
- 0,35g de Na_2HPO_4
- 0,35g de KH_2PO_4

Le mélange est ensuite autoclavé pendant 2h pour pouvoir être utilisé par la suite. 0,1g d'ampicilline sont enfin ajoutés pour éviter toutes contaminations bactériennes.

1.2 Décongélation

Pour être conservées avant leur mise en culture, les amibes sont congelées dans un tube de 2mL contenant 50% de milieu de culture et 50% de DMSO. Une étape de décongélation est donc nécessaire pour pouvoir les utiliser. Les amibes sont ensuite cultivées dans des flacons de culture (boîtes ou flask) de 75 cm² de surface, en plastique, contenant un milieu de culture. Elles adhèrent au fond de la boîte au bout de 30 min grâce au traitement spécial du plastique qui permet la formation d'un tapis cellulaire (monocouche). Le flacon est ensuite vidé et du milieu HL5 est rajouté (10 mL)

1.3 Culture axénique en suspension

Les amibes sont mises en culture axénique (culture isolée de toute autre espèce ou de souches d'organisme vivant) en milieu HL5 placé dans un incubateur à 22 degrés pendant 2-3 jours pour ne pas dépasser la densité cellulaire de $2 \cdot 10^7$ cellules. ml^{-1} .

1.4 Détermination de la densité cellulaire

La densité cellulaire est facilement calculé à l'aide d'un hématimètre (cf Figure 1). Celle-ci se présente sous la forme d'une lame quadrillée possédant des chambres de numérations. Le volume des chambres de numérations est connue (*un carreau* = $5 \cdot 10^{-4} mm^3$). L'estimation du nombre de cellules par volume dans le mélange initial peut se faire grâce à la formule suivante :

$$\frac{\text{cellules solution initiale}}{\text{Volume}} = \frac{\text{dilution} * \text{Nombre de cellules}}{\text{Surface} * \text{Profondeur de la chambre de comptage}}$$

2 Agrégation des amibes

2.1 Préparation du tampon d'agrégation

Pour pouvoir s'agréger, les amibes ont besoin d'un milieu non-nutritif. On utilise pour cela un milieu SOR C dont la composition pour 1L de solution est la suivante :

- 2g KH_2PO_4
- 0,29g Na_2HPO_4 ou 0,55g Na_2HPO_4, H_2O
- 0,0555g $CaCl_2$ à 50mM

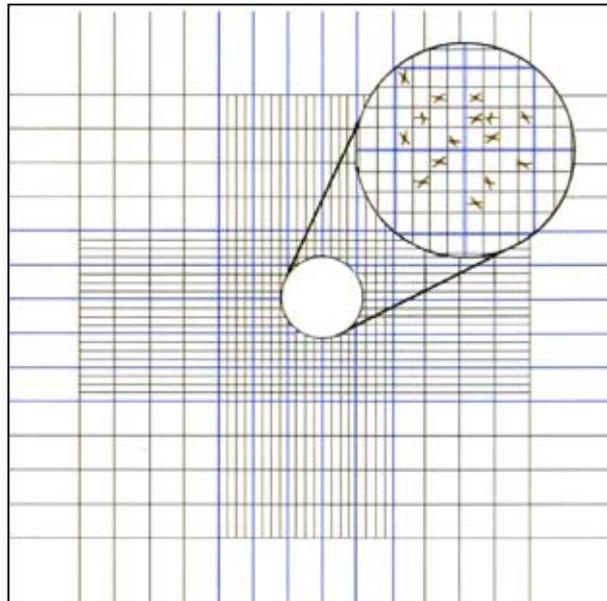


Figure 1: Principe de mesure de la densité cellulaire

2.2 Préparation du milieu au développement

Les cellules sont collectées dans un tube de 10 mL et centrifugées à 500g pendant 4 min à température ambiante. Le surnageant est enlevé et les cellules sont repiquées dans 5 mL de SOR C froid. Cette étape est répétée deux fois pour un total de 3 lavages. On fera attention à mettre le tube dans de la glace entre l'étape de centrifugation et le dernier repiquage.

2.3 Agrégation sur gel d'agar

En utilisant une micro-pipette P200, 50 μ l de milieu SOR C contenant les amibes (soit approximativement $2,5 \cdot 10^7$ cellules) sont versés sur 4-5 cm d'une boîte de pétri contenant un gel d'agar non-nutritif (20g d'agar solide dans 1L d'eau distillée placée à l'autoclave). Les cellules se fixent totalement sur le gel au bout de 30 minutes et l'excès de milieu à la surface est alors retiré à l'aide d'un papier filtre. La boîte d'agar est ensuite placée à l'obscurité avec une petite source lumineuse de l'autre côté d'où a été ajouté le milieu. Pour cela, on place la boîte dans un carton avec une fente étroite en un côté d'où passe la lumière. Pour maintenir un taux d'humidité suffisant lors de l'agrégation, on place un papier imbibé d'eau autour de la boîte. La formation du slug débute au bout de 16h et migrera vers la lumière.

2.4 Acquisition des images

Pour l'observation du milieu, on utilise un microscope *motic* (grossissement $\times 40$) relié à une caméra pylon USB. Les images sont retransmises sur l'ordinateur à l'aide du logiciel pylon viewer (gratuit).