

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**Université Mustapha Stambouli de Mascara**  
Faculté des Sciences de la Nature et de Vie  
Laboratoire de Bioconversion et Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de**  
**« Magistère »**  
**Spécialité : Substances Naturelles et Innovation thérapeutique**  
**S.N.I.T.**

**Thème :**

---

**Quels Rôles des Exopolysaccharides (EPS) dans**  
**l'expression et l'implantation de la flore microbienne**  
**commensale ?**

---

Présenté par : **M<sup>elle</sup> ABDI Fatima Zohra**

**Membres du Jury**

<b>Pr. MEDDAH B.</b>	<b>Université de MASCARA</b>	<b>Président</b>
<b>Pr. TIR TOUIL A.</b>	<b>Université de MASCARA</b>	<b>Encadreur</b>
<b>Dr. HARIRI A.</b>	<b>M.C.A. Université de MASCARA</b>	<b>Examineur</b>
<b>Dr. CHOUITAH O.</b>	<b>M.C.A. Université de MASCARA</b>	<b>Examineur</b>

**Année universitaire 2015- 2016**

## Remerciements

Je remercie tout d'abord le bon DIEU qui m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

J'exprime mes sincères remerciements à **Mr MEDDAH B.** pour l'intérêt qu'il porte à ce travail et pour sa disponibilité à présider le jury.

Je remercie **M<sup>me</sup> TIRTOUIL A.**, mon encadreur, de m'avoir accordé sa confiance pour réaliser ce travail de recherche. Elle a su m'aider tout au long de la réalisation de ce mémoire et m'avoir soutenu à franchir les caps difficiles. Je souhaite être à la hauteur de votre attente et votre espérance.

Mes remerciements s'adressent à **Mr HARIRI A.** et **M<sup>me</sup> CHOUITAH O.** d'avoir consenti à participer à ce jury de thèse.

Je veux également remercier : **CHABANE W., BELKHOUDJA H., BELMIMOUN A., SID ALARBI K., KERBOUB H., MERRAH H. LAHCEN F.** pour leurs collaborations.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont partagé avec moi leurs compétences pour la réalisation de ce travail : **BOUKHNOUFA A. OUELD ELCHIKH S. OUAHDI M.**

Merci à tout le personnel du département de Biologie de l'Université de MASCARA et du Laboratoire de Microbiologie pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

Je réserve cette dernière ligne pour **M<sup>me</sup> LAKHDAR D.** et **M<sup>me</sup> YEROU**, je dis simplement merci pour leur croyance en moi et leur soutien.

*A tous qui ont contribué à ma formation.*

*A tous, j'adresse mes remerciements les plus chaleureux et qu'ils sachent que dans la vie, il y a des valeurs qui ne s'oublient jamais à savoir la disponibilité et la générosité.*

*M<sup>lle</sup> ABDI F. Z.*

## Résumé

La flore commensale joue un rôle important dans l'équilibre physiologique de l'hôte. Cette flore se présente dans l'organisme sous forme d'un biofilms. L'ensemble des données montrent que les exopolysaccharides (EPS) sont les principaux responsables de la structure des biofilms. Grâce à leurs propriétés interactives et régulatrices, les polysaccharides participent au contrôle de l'activité cellulaire (prolifération, différenciation, adhésion et migration).

Dans ce travail, nous sommes intéressés à la capacité de la flore commensale de sécréter des EPS et les rôles de ces derniers dans l'adhésion, l'auto-agrégation et la co-agrégation des bactéries au niveau des tissus.

Quatre bactéries commensales ont été isolées à partir de deux sites différents : *Staphylococcus epidermidis* à partir de la couche superficielle de l'épiderme d'un adulte sain, *Lactobacillus reuteri*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* à partir des selles d'un nouveau-né nourris au sein et deux pathogènes à partir d'un frottis vaginal.

Les premiers résultats montrent que la production des EPS était très importante chez les *Lactobacillus reuteri* par rapport aux autres bactéries ce qui augmente leur capacité d'adhésion ; En plus, l'auto et la co-agrégation (co-agrégation pathogène – commensale) ont suivi le même profil que le taux de production des EPS. Ces résultats ont permis de conclure que les EPS peuvent jouer un rôle crucial dans l'implantation et la restauration de notre flore commensale.

**Mots clés :** EPS, bactéries commensales, bactéries pathogène, adhésion, auto-agrégation, co-agrégation.

### Abstract

Commensal flora plays an important role in the host's physiological balance. This flora present in the body in the form of a biofilm. All the data show that the Exopolysaccharides (EPS) are the main responsible for the structure of biofilms. Structural diversity confers to these macromolecules numerous biological activities. Through their interactive and regulatory properties, polysaccharides are involved in controlling cell activity (proliferation, differentiation, adhesion and migration).

In this study, we are interested for the ability of the commensal flora to secreted EPS and roles of these in adhesion, au-aggregation and co-aggregation. In this context, we isolated four commensal bacteria from two different sites: *Staphylococcus epidermidis* from the skin's superficial layer of a healthy adult. *Lactobacillus reuteri*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* from the stool of a newborn breastfed, two pathogens from a vaginal smear.

The first results show that the production of EPS was very important in *Lactobacillus reuteri* compared to other bacteria which increases their adhesion ability; In addition, the auto and co-aggregation (pathogenic - commensal) followed the same profile EPS production rates.

These results showed that the EPS can play a crucial role in the implementation and the restoration of our commensal flora.

**Key-words:** EPS, commensal bacteria, pathogenic bacteria, adhesion, auto-aggregation, co-aggregation.

# Sommaire

# Sommaire

Sommaire.....	i
Liste des tableaux .....	iv
Liste des figures .....	iv
Liste des abréviations .....	v
<b>Partie 1 : Synthèse bibliographique</b>	
<b>Introduction .....</b>	<b>01</b>
<b>I. Biofilm bactérien.....</b>	<b>02</b>
<b>I.1. Définition .....</b>	<b>02</b>
<b>I.2. Les étapes de formation d'un biofilm .....</b>	<b>02</b>
<b>I.3. Les facteurs influençant la formation d'un biofilm.....</b>	<b>04</b>
<b>I.4. Facteurs favorisant la dispersion d'un biofilm.....</b>	<b>04</b>
<b>I.5. Ecologie d'un biofilm .....</b>	<b>05</b>
<b>I.6. Les types de communication bactérienne au sein d'un biofilm .....</b>	<b>06</b>
I.6.1. Le <i>quorum sensing</i> .....	06
I.6.2. Le <i>swarming</i> ou essaimage.....	07
I.6.3. Autres mécanismes régulateurs de la formation de biofilms .....	09
<b>I.7. Avantages conférés par le mode de vie en biofilm .....</b>	<b>10</b>
I.7.1. Avantages métaboliques .....	10
I.7.2. Protection des micro-organismes du biofilm .....	10
a. Protection mécanique .....	11
b. Protection contre la destruction des cellules.....	11
I.7.3 Adaptations aux conditions environnementales .....	12
a. Adaptation au stress environnemental .....	12
b. Résistance aux stress environnementaux .....	13
<b>I.8. Importance des biofilms .....</b>	<b>14</b>
Exemple : Flore commensale et protection de l'organisme.....	14
<b>II. La flore bactérienne commensale.....</b>	<b>16</b>
<b>II.1. Généralité .....</b>	<b>16</b>
<b>II.2. Composition et évolution de l'écosystème gastro-intestinal .....</b>	<b>18</b>
<b>II.3. La microflore intestinale .....</b>	<b>18</b>
<b>II.4. Développement normal de la flore intestinale .....</b>	<b>18</b>

# Sommaire

<b>II.5. Rôle de la flore intestinale</b> .....	20
<b>II.6. Méthodes d'étude de la flore intestinale</b> .....	22
<b>II.7. Etablissement de la flore digestive chez le nouveau-né</b> .....	22
<b>II.8. Les facteurs influençant la cinétique d'implantation de la flore digestive</b> .....	24
II.8.1. Le mode d'accouchement .....	24
II.8.2. influence de l'environnement .....	25
II.8.3. Le terme de naissance .....	25
II.8.4. L'antibiothérapie .....	25
II.8.5. Les vaccinations précoces .....	26
II.8.6. le mode de l'alimentation.....	26
<b>II.9. Les conséquences cliniques des perturbations dans l'établissement de la flore intestinale</b> .....	27
II.9.1. Entérocolite ulcéro-nécrosante .....	27
II.9.2. Allergie .....	28
II.10. Modulation de la flore intestinale .....	29
II.10.1. Les probiotiques .....	29
II.10.2. Les prébiotiques.....	29
II.10.3. Les nucléotides .....	30
<b>III. Les Polysaccharides bactériens</b> .....	31
<b>III.1. Les polysaccharides de la paroi</b> .....	31
III.1.1. Les peptidoglycanes .....	31
III.1.2. Les acides téichoïques .....	31
III.1.3. Les LPS .....	32
<b>III.2. Polysaccharides exocellulaires</b> .....	32
III.2. 1. Composition et classification des Exopolysaccharides .....	34
III.2.2. Classification .....	34
III.2.3. Les substituants .....	35
<b>III.3. Biosynthèse des CPS</b> .....	36
<b>III.4. Fonction des EPS</b> .....	37
III.4.1. Pour la souche productrice .....	37
III.4.2 Utilisations et applications industrielles.....	39
<b>Partie II : étude Expérimentale</b>	
<b>I. Matériels et Méthodes</b> .....	40
<b>I.1. Objectifs du travail</b> .....	40
<b>I.2. Origine des souches utilisées</b> .....	41

# Sommaire

<b>I.3. Milieux de culture et produits chimique utilisés</b> .....	<b>41</b>
<b>I.4. analyses microbiologiques</b> .....	<b>41</b>
I.4.1. Préparation de solution mère et dilution décimale.....	41
I.4.2. Identification des bactéries isolées.....	42
<b>I.5. Evaluation des propriétés d'adhérence des bactéries commensale</b> .....	<b>42</b>
I.5.1. Adhérence sur tube de verre .....	42
I.5.2. Méthode MATS .....	42
<b>I.6. Test d'auto et co-agrégation</b> .....	<b>43</b>
I.6.1. Test d'auto agrégation.....	43
I.6.2. Test de coagrégation .....	43
<b>I.7. Estimation du rendement des EPS</b> .....	<b>44</b>
I.7.1. Extraction des EPS .....	44
I.7.2. Dosage et quantification des EPS .....	44
<b>I.8. Les analyses statistiques</b> .....	<b>45</b>
<b>II. Résultats et Discussion</b> .....	<b>46</b>
<b>II.1. résultats d'identification des bactéries isolées</b> .....	<b>46</b>
<b>II.2. Résultats d'évaluation des propriétés d'adhérence des bactéries commensale</b> .....	<b>48</b>
II.2.1. Résultats d'adhérence sur tube de verre .....	48
II.2.2. Résultats d'adhérence par la méthode MATS .....	48
<b>II.3. Résultats de Test d'auto et co-agrégation</b> .....	<b>49</b>
II.3.1. Résultats de Test d'auto agrégation.....	49
II.3.2. Résultats de Test de coagrégation .....	49
<b>II.4. Estimation du rendement des EPS</b> .....	<b>51</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>60</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>61</b>
<b>Annexe</b> .....	

# Sommaire

## Liste des tableaux

<b>Tableau n°01</b> : Facteurs influençant l'attachement de cellules et la formation d'un biofilm....	05
<b>Tableau n°02</b> : Rôles des différents groupes bactériens retrouvés dans le microbiote .....	22
<b>Tableau n°03</b> : Résultats d'identification de <i>L. reuteri</i> isolée des selles d'un nourrisson .....	47
<b>Tableau n°04</b> : Résultats d'identification de <i>E. coli</i> isolée des selles d'un nourrisson .....	48
<b>Tableau n°05</b> : Résultats d'identification de <i>S. épidermidis</i> isolée de la peau .....	49
<b>Tableau n°06</b> : Résultats d'identification de <i>E. faecalis</i> isolée des selles d'un nourrisson .....	49
<b>Tableau n°07</b> : Résultats d'identification de <i>S. aureus</i> isolée d'un frottis vaginal .....	50
<b>Tableau n°08</b> : Résultats d'identification de <i>C. albicans</i> isolée d'un frottis vaginal .....	51
<b>Tableau n°09</b> : Résultats d'adhésion des bactéries sur tube en verre .....	52
<b>Tableau n°10</b> : Résultats d'évaluation de l'hydrophobicité des souches par la méthode MATH	53

## Liste des figures

<b>Figure n°01</b> : Représentation schématique de la formation d'un biofilm polymicrobien ...	04
<b>Figure n°02</b> : Furanones <i>Delisea pulchra</i> .....	07
<b>Figure n°03</b> : Système de quorum sensing chez <i>P. aeruginosa</i> .....	08
<b>Figure n°04</b> : Colonisation microbienne du tractus gastro-intestinal humain.....	21
<b>Figure n°05</b> : Changement du microbiote intestinal en fonction de l'âge .....	25
<b>Figure n°06</b> : Structure des Lipopolysaccharides .....	33
<b>Figure n°07</b> : Schéma de biosynthèse des polysaccharides.....	38
<b>Figure n°08</b> : Auto- agrégation des bactéries commensales.....	54
<b>Figure n°09</b> : Co-agrégation de la flore commensale .....	55
<b>Figure n°10</b> : Co-agrégation (bactéries commensales - <i>S. aureus</i> ).....	56
<b>Figure n°11</b> : Co-agrégation (bactéries commensales – <i>C. albicans</i> ) .....	57
<b>Figure n°12</b> : Rendement des EPS produits par les bactéries commensales .....	58

# **Introduction**

# Introduction

## Introduction

La flore intestinale est variable dans le temps en fonction des différents éléments (age, alimentation, état de santé, antibiothérapie,...). Cette flore est source de certains nutriments et vitamines nécessaires à l'hôte et constitue une barrière écologique contre l'implantation de germes virulents.

Les populations microbiennes à l'intérieur du tractus gastro-intestinal coexistent en ayant chacune leur niche écologique nécessaire à leur croissance (Fooks et Gibson, 2002).

Le concept des espèces bénéfiques existe depuis longtemps (Liévin et al., 2000). Selon ce concept, certaines bactéries formant le microbiote intestinal seraient associées à des effets positifs sur la santé, alors que d'autres sont considérées comme néfastes. Les bactéries potentiellement favorables pour la santé incluent principalement les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* et leur dominance chez les nouveau-nés nourris au sein leur procureraient une protection contre les infections intestinales (Picard et al., 2005).

Pendant l'installation des flores commensales, les germes commencent à sécréter une matrice environnante appelée substance polymérique extracellulaire (EPS). Ces derniers présentent une grande variabilité structurale. Cette diversité donne aux EPS une activité biologique cruciale dans la formation des biofilms.

La perturbation du microbiote peut enjoinde certaines pathologies, donc le problème qui se pose : que sont les paramètres qui peuvent rééquilibrer cette flore, et est-ce que les EPS peuvent-ils avoir un rôle dans la modulation de la flore intestinale ?

L'objectif de notre étude consiste à essayer de comprendre si les EPS - sécrétés par certains microorganismes de la flore commensale – interviennent à la fois dans les interactions microbiennes symbiotiques hôte/ flore commensale (adhésion), flore commensale/flore commensale (auto-agrégation) et les relations antagonistes flore commensale/ flore pathogène (co-agrégation), permettant ainsi le maintien de l'homéostasie intestinale.

# Introduction

La présente étude s'articule autour de deux parties :

- Première partie est une synthèse bibliographique sur le biofilm bactérien, sa formation et les facteurs influençant puis nous avons pris un modèle des biofilms qui est la flore commensale : son organisation et les paramètres perturbateurs et les modulateurs de cette flore ; les exopolysaccharides (EPS) : composition, localisation, types, rôles.
- Deuxième partie expérimentale décrit les principales étapes d'isolement et d'identification des bactéries commensales (*L. reuteri*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*) et des bactéries pathogènes (*S. aureus*, *C. albicans*) ; la détermination de la capacité d'adhérence, l'hydrophobicité des souches et le taux d'auto-agrégation et co-agrégation et les démarches d'extraction et de dosage des EPS a été réalisée. En suite une exposition des résultats obtenus, suivi d'une discussion à la lumière des données de la littérature.

Enfin, une conclusion générale et des perspectives qui sont un ensemble de réflexions achèvent ce travail.

Chapitre I :

biofilm bactérien

## I. Biofilm bactérien

### I.1. Définition

Les biofilms bactériens sont définis comme des agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice polymérique (Jaques *et al.*, 2010). Les bactéries peuvent tout aussi bien adhérer à une surface biotique qu'une surface abiotique.

La formation d'un biofilm se fait en plusieurs étapes selon un modèle bien établi. Les biofilms bactériens isolés de divers environnements partagent des caractéristiques communes :

- ✓ Les cellules bactériennes sont retenues ensemble par une matrice polymérique composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques ;
- ✓ Le développement du biofilm survient en réponse à des signaux extracellulaires, soit présents dans l'environnement ou produits par les cellules bactériennes ;
- ✓ Le biofilm protège les bactéries contre le système immunitaire de l'hôte, la dessiccation et les biocides (antibiotiques et désinfectants).

### I.2. Les étapes de formation d'un biofilm

#### Étape 1 : Adhésion réversible à la surface

Les micro-organismes sont fréquemment perçus comme flottant librement et comme étant solitaires (on dit qu'ils sont planctoniques).

Toutefois, dans des conditions naturelles, la plupart des microorganismes ont tendance à adhérer aux surfaces et finalement à former des biofilms (Flemming *et al.*, 2007).

Cette adhésion initiale est réversible.

#### Étape 2 : Adhésion permanente à la surface

Au fur et à mesure que les bactéries se multiplient, leur adhésion devient plus solide (on dit qu'elles sont sessiles) et elles se différencient, en modifiant leur schéma d'expression génique de manière à favoriser leur survie (Flemming *et al.*, 2007 ; Donlan et Costerton,

2002). Ce processus est habituellement le résultat d'un type de communication bactérienne appelée « quorum sensing ».

### **Étape 3 : Matrice protectrice visqueuse/biofilm**

Une fois fermement attachées, les bactéries commencent à sécréter une matrice environnante appelée substance polymérique extracellulaire (SPE) (Sutherland, 2001). Il s'agit d'une matrice protectrice ou « matière visqueuse ». De petites colonies de bactéries forment alors le biofilm initial (Hall-Stoodley et Stoodley, 2009; Donlan et Costerton, 2002). La composition exacte de la SPE varie selon les micro-organismes présents mais se compose en général de polysaccharides, protéines, glycolipides et ADN bactérien (Hall-Stoodley et *al.*, 2009 ; Flemming et *al.*, 2007; Sutherland, 2001). On pense que l'ADN bactérien libéré par les bactéries vivantes ou mortes fournit un composant structurel important pour la matrice SPE du biofilm (Rice et *al.*, 2007). Les diverses protéines et enzymes sécrétées aident le biofilm à adhérer plus fortement (Flemming et *al.*, 2007).

Les biofilms complètement matures répandent continuellement des bactéries planctoniques, des micro-colonies et des fragments de biofilm, qui se dispersent alors et adhèrent à d'autres parties, formant alors de nouvelles colonies de biofilms (Costerton et *al.*, 1999 ; Donlan et Costerton, 2002). Le fait de vivre dans des communautés microbiennes mixtes typiques des biofilms permet aux micro-organismes de partager leurs « compétences et aptitudes » individuelles pour la survie du groupe (Xavier et Foster, 2007; Hibbing et *al.*, 2010). Ce qui leur donne de nombreux avantages en termes de protection.

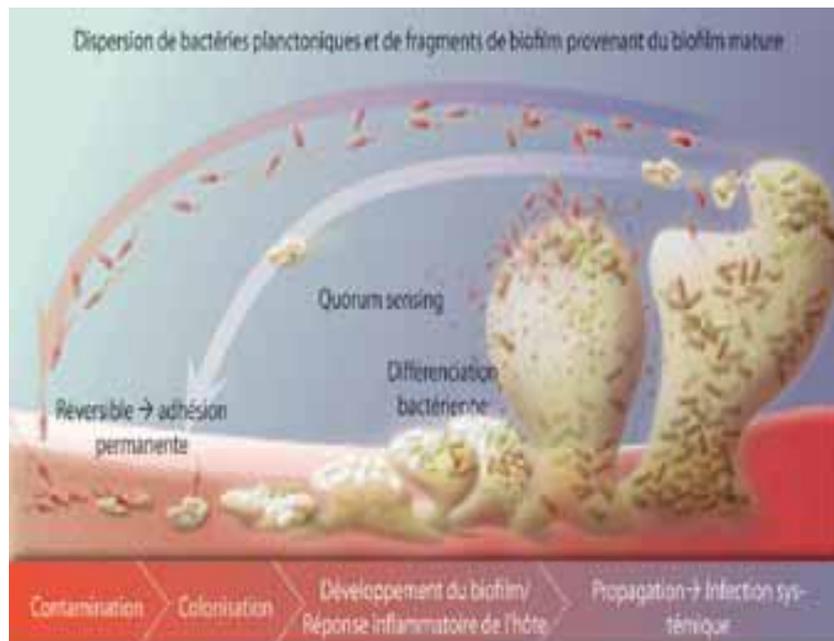


Figure n°01 : Représentation schématique de la formation d'un biofilm polymicrobien (Phillips et al., 2010)

### I.3. Les facteurs influençant la formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm est influencée par plusieurs facteurs qui sont illustrés dans le tableau suivant :

**Tableau 1:** Facteurs influençant l'attachement de cellules et la formation d'un biofilm D'après (Donlan, 2002)

Propriétés du substrat	Propriétés du milieu aqueux environnant	Propriétés des cellules
Texture, rugosité, présence d'aspérités	Vitesse du flux, présence d'un flux laminaire ou non.	Hydrophobicité de la surface des cellules.
Hydrophobicité	pH	Présences de fimbriae
Présence préalable d'un film protéique recouvrant la surface	Température	Présence de flagelles
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La présence des cations (<math>\text{Ca}^{2+}</math>, <math>\text{Na}^{2+}</math>, <math>\text{Fe}^{3+}</math> ...)</li> <li>• Fer, nutriments</li> </ul>	Rôle des structures polymériques extracellulaires d'exopolysaccharides

	• Sources de carbone disponibles	
	• Disponibilité de milieu en oxygène	
	Présence d'agents antimicrobiens	

**I.4. Facteurs favorisant la dispersion d'un biofilm**

Les mécanismes d'attachement et de détachement d'un biofilm sont étroitement liés puisque les facteurs moléculaires intervenant dans l'attachement doivent être détruits ou inactivés pour qu'il y ait détachement (Spormann, 2008). Plusieurs facteurs peuvent induire le détachement du biofilm et l'essaimage de bactéries sous forme planctonique, permettant ainsi la colonisation d'autres sites. Parmi ces facteurs, on peut citer :

- ✓ L'action mécanique exercée par un flux de liquide, par exemple au sein d'une vessie ;
- ✓ L'arrêt de la synthèse de matériaux constitutifs du biofilm : polysaccharides de la matrice par exemple ;
- ✓ La lyse de cellules du biofilm par l'action d'un phage, d'EDTA, de NaCl, de CaCl<sub>2</sub>, ou encore d'agents chélateurs (Spormann, 2008) ;
- ✓ L'action de facteurs de détachements : surfactants ou enzymes dégradant la matrice (Otto, 2008).

La dispersion d'un biofilm peut aussi être initiée par des changements environnementaux : limitation en oxygène ou en nutriments (Spormann, 2008), modification du pH ou présence de certains composés spécifiques (Gjermansen et *al.*, 2005). La dispersion des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* est la plus étudiée (Goller et Romeo, 2008). Pour ces derniers, une augmentation de la concentration en carbone, citrate, glutamate ou glucose, entraîne un détachement massif de plus de 80% des cellules constituant le biofilm (Sauer et *al.*, 2004).

Au sein d'un biofilms, les bactéries vivent en communauté, sont fixées à un support, et interagissent. On peut ainsi parler d'« écologie du biofilm ».

**I.5. Ecologie d'un biofilm**

On distingue différents types d'interactions qui ont des effets positifs (la coopération dans les systèmes de dégradation de certains nutriments complexes, ou encore la production d'enzymes profitables à l'ensemble de la communauté de microorganismes (Tomlin, 2005).

A l'opposé, les différentes colonies de micro-organismes occupant une même niche écologique entrent en compétition pour l'acquisition des ressources se trouvant dans le milieu. Deux mécanismes de compétition entre bactéries est la production de bactériocines<sup>12</sup> et la baisse du pH (Irie et Parsek, 2008).

Les biofilms ont une architecture complexe et irrégulière, en forme de coraux ou de champignons. Cette architecture n'est pas figée: les micro-organismes bougent à partir du lieu de leurs premières divisions cellulaires : il y a une véritable dynamique interne au sein des biofilms permettant des échanges d'eau, de nutriments, de déchets, mais aussi d'information et de caractères transmissibles génétiquement (Clutterbuck et *al.*, 2007). L'échange de plasmides au sein des biofilms se fait par des phénomènes de conjugaison.

Au sein d'un biofilm, les micro-organismes communiquent entre eux par des signaux de cellules à cellules. Ces derniers, appelés « quorum sensing », jouent un rôle important dans le développement et la régulation de la formation des biofilms.

## **I.6. Les types de communication bactérienne au sein d'un biofilm**

### **I.6.1. Le *quorum sensing***

La dynamique du biofilm repose sur un comportement collectif, impliquant nécessairement des mécanismes efficaces de communication cellulaire. Il est bien connu, aujourd'hui, que les bactéries au sein d'un biofilm communiquent entre elles par de petites molécules signal. Ces échanges d'information permettent aux individus d'évaluer la densité cellulaire locale (*quorum*) dans le but d'initier une réponse concertée de la population bactérienne. En termes de réponse, une sécrétion et une accumulation de molécules vont avoir lieu dans le milieu extracellulaire. Cette régulation est appelée *quorum sensing*.

Il existe plusieurs classes de molécules comparées très souvent dans leur action aux hormones. Selon le type de bactéries, ces *triggers* n'auront pas la même origine chimique : pour les bactéries Gram négatif les AcylHomoSerine Lactone (AHL ou AHSL) seront les plus fréquemment rencontrés (Eberl et *al.*, 1996), tandis que pour les bactéries à Gram positif ce

seront plutôt de petits peptides. Un dernier type de molécule a été mis en évidence par Bassler *et al.* (1994), mais sa structure n'a été connue qu'en 2001b par Schauder *et al.*, il s'agit d'une furanone (ou AI-2) qui permettrait une communication inter-espèce, contrairement aux deux autres qui se limitent à l'intra-espèce.

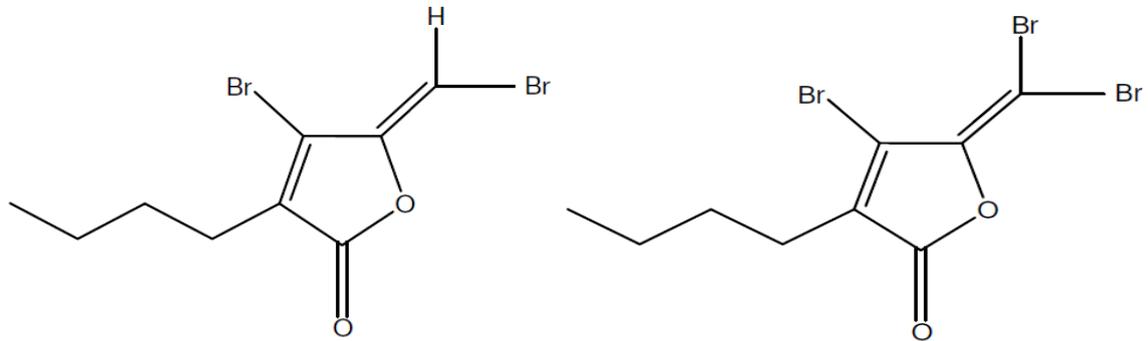


Figure n°02 : Furanones *Delisea pulchra* (Rasmussen *et al.*, 2000)

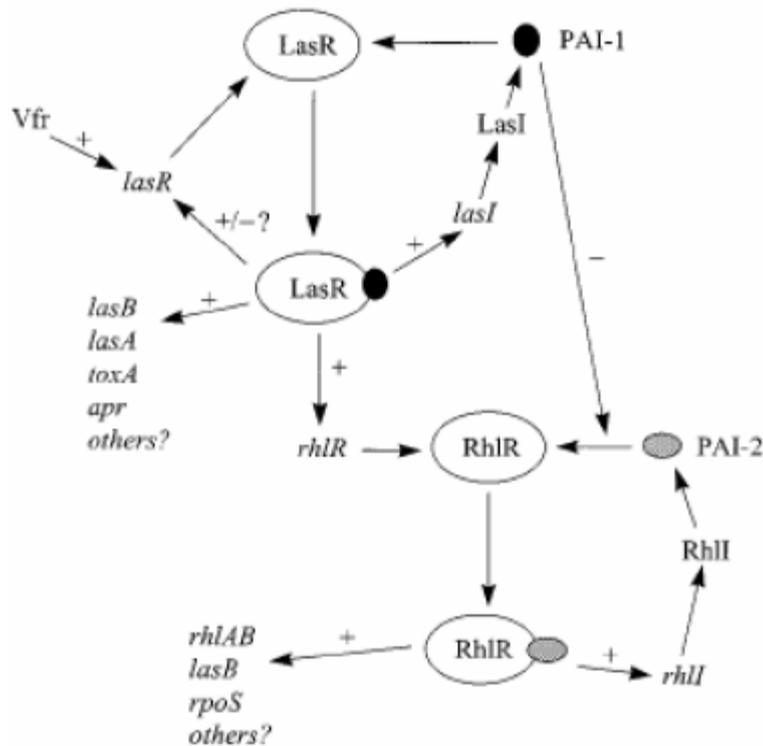


Figure n°03 : Système de quorum sensing chez *P. aeruginosa* (Pesci *et al.*, 1997)  
Ou PAI-1 : 3-oxo-C<sub>12</sub>-AHL et PAI-2 : C<sub>4</sub>-AHL

Le quorum sensing semble avoir un rôle très important au sein d'un biofilm, les premiers travaux effectués datent de 1997 par Batchelor *et al.* et montrent que des AHL sont retrouvées

en divers lieux (roches immergées, cathéters) et synthétisées par diverses bactéries (Stickler *et al.*, 1998).

De nombreuses études ont montré que les AHL régulaient la structure spatiale du biofilm.

### I.6.2. Le *swarming* ou essaimage

Il s'agit d'un mouvement de groupe que présentent certaines espèces bactériennes lorsqu'elles croissent sur un support plus ou moins solide. C'est un mode de déplacement bactérien qui va entraîner la colonisation du support et mettant en jeu la rotation de flagelles. Très souvent le *swarming* est l'un des mécanismes déclenchés par le *quorum sensing*, provoquant une transformation des bactéries végétatives en bactéries swarmeuses. Certains auteurs (Harshey & Matsuyama, 1994b) parlent même de dimorphisme cellulaire, puisqu'ils observent que les bactéries swarmeuses sont très allongées, multinuclées et beaucoup plus riches en flagelles que les cellules végétatives. Les flagelles sont des appendices situés autour (ils sont dits péritriches) et/ou à l'extrémité (ils sont dits polaires) des bactéries et qui par rotation vont permettre leur déplacement.

Les flagelles caractérisent aussi les bactéries swarmeuses (ou nageuses) qui évoluent dans un milieu liquide.

Les flagelles sont de véritables moteurs moléculaires et peuvent être assimilés à des hélices de bateau par leur mode d'action.

D'un point de vue génétique, le passage des bactéries d'un état végétatif à un état migrant s'effectue via l'opéron *flhDC*. C'est en 1996, qu'Eberl montre qu'un mutant *flhD*- de *S. liquefaciens* est incapable d'essaimer du fait qu'elle ne peut pas synthétiser de flagelles. Si cette bactérie mutante est transformée avec un plasmide contenant l'opéron *flhD* inducible par l'IPTG (IsoPropyle- $\beta$ -D-ThioGalactopyranoside), elle pourra essaimer sur un milieu nutritif solide enrichi avec l'inducteur. De plus, l'observation au microscope électronique des bactéries transformées montre qu'en présence d'IPTG elles possèdent une flagellation péritriche normale, ainsi qu'une taille plus allongée. L'activation de l'opéron *flhDC* provoque une hyperflagellation et un allongement cellulaire. Les mêmes conclusions ont pu être faites après une étude effectuée sur *Proteus mirabilis* (Furness *et al.*, 1997).

Ce phénomène est retrouvé de manière ubiquiste parmi les Eubactéries (Harshey, 1994b). Kirov *et al.* (2002) ont mis en évidence que 50 à 60% des bactéries du genre *Aeromonas* étaient capable de synthétiser des flagelles latéraux, signent qu'elles peuvent essaimer.

*In vitro*, la bactérie swarmeuse est capable de coloniser un milieu nutritif solide en quelques heures seulement, à partir de quelques microlitres de culture liquide. Mais, cette différenciation bactérienne est fonction de la composition du milieu de culture et de sa concentration en agar. Cette particularité a été observée chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium* en 1994b par Harshey & Matsuyama. Ils montrent que les deux bactéries n'essaient que sur des milieux à faible teneur en agar (0,5%) et uniquement sur certains milieux de culture.

Le *swarming* peut être modifié voire inhibé par des changements du milieu de culture solide sur lequel croissent les bactéries. En effet, chez certaines espèces bactériennes de *Serratia*, d'*Escherichia*, de *Salmonella* ou de *Pseudomonas* les conditions de *swarming* ne sont obtenues que si le milieu de culture contient moins de 1% d'agar ; au-delà, l'essaimage sera inhibé. Par contre, des souches comme *P. mirabilis* présenteront toujours un phénotype essaillant pour des milieux contenant 2,5% d'agar. Plus un milieu est riche en agar moins l'eau sera disponible et plus la viscosité de la matrice extracellulaire sera élevée.

Le *swarming*, reposant sur l'existence d'un dimorphisme bactérien (bactéries plus allongées, hyperflagellées...) est donc dû à la rotation des flagelles bactériens. Ces flagelles tournent dans un milieu extracellulaire dont la viscosité doit être adaptée au mode de locomotion bactérien pour éviter toute surconsommation d'énergie. Afin de fluidifier le milieu et de réduire les forces de friction par rapport au support, la bactérie synthétise des biosurfactants. Ces derniers sont le plus souvent des polysaccharides.

### **I.6.3. Autres mécanismes régulateurs de la formation de biofilms**

Les polysaccharides présents à la surface des cellules jouent un rôle important dans les interactions entre bactéries et leur environnement immédiat. Par exemple, on trouve à la surface d'*Escherichia coli* l'antigène du lipopolysaccharide (LPS) et l'antigène polysaccharidique de capsule K. Les lipopolysaccharides, appelés aussi endotoxines, font partie de la paroi des bactéries Gram-négatives. Ils peuvent inhiber ou stimuler la formation de biofilms selon les cas. Les polysaccharides des capsules sont des facteurs de virulence ; ils

protègent les bactéries des défenses immunitaires de l'hôte (phagocytose et activation du complément) (Beloin et *al.*, 2008).

Trois polymères synthétisés par les bactéries du biofilm et faisant partie de la matrice ont un rôle important dans la formation d'un biofilm et dans l'expression de facteurs de virulence; il s'agit de la cellulose, de l'acide colanique (polymère chargé composé de glucose, galactose, fructose et acide glucuronique) et du PGA ( $\beta$ -1,6-N-acetyl-D-glucosamine).

La synthèse d'acide colanique peut être induite par des concentrations d'antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines, proches des concentrations létales ; l'acide colanique forme une capsule. Il en résulte une exacerbation de la formation et de la persistance d'un biofilm face à des agents anti- microbiens (Sailer, 2003).

Le mode de vie sous forme de biofilms protège les micro-organismes qui le constituent et leur confère de nombreux avantages : coopération dans certains systèmes cataboliques, synergies entre micro-organismes, expressions phénotypiques de facteurs de résistance lors de situations de stress...

### **I.7. Avantages conférés par le mode de vie en biofilm**

Les études menées sur les biofilms ces dernières années ont permis d'établir l'existence de changements radicaux dans l'expression génétique et les phénotypes entre les formes planctonique et sessile. Ces changements radicaux permettent d'expliquer l'adaptation des biofilms à des conditions environnementales stressantes et l'acquisition d'avantages évolutifs (Clutterbuck, 2007 ; Goller, 2008). Par exemple, les micro-organismes au sein des biofilms sont plus résistants à la réponse immunitaire de l'hôte et aux agents antibactériens que leurs congénères vivant sous forme planctonique (Clutterbuck, 2007).

Néanmoins, on commence tout juste à comprendre et à identifier les facteurs génétiques et environnementaux permettant la transition entre ces deux modes de vie (Goller, 2008).

On va s'intéresser dans la partie qui va suivre aux différents avantages conférés par le mode de vie sous forme de biofilms. On distingue tout d'abord des avantages métaboliques.

#### **I.7.1. Avantages métaboliques**

Le mode de vie en biofilm permet aux bactéries d'acquérir des avantages d'un point de vue métabolique. L'organisation communautaire du biofilm permet d'optimiser les mécanismes de capture de substrats et de réaliser de véritables économies d'énergie. Des réserves énergétiques sont ainsi constituées (Bury-Moné, 2007). D'autre part, l'organisation architecturale complexe du biofilm permet une coopération entre micro-organismes dans les systèmes de dégradation de certains nutriments complexes (Tomlin *et al.*, 2005). Le mode de vie en biofilm assure une promiscuité entre cellules et permet la réalisation d'actions synergiques.

Le mode de vie sous forme de biofilm apporte ainsi des avantages d'un point de vue métabolique aux micro-organismes le constituant : économie d'énergie et constitution de réserves. Il préserve aussi ces derniers de l'action d'un certain nombre de facteurs hostiles présents dans l'environnement.

### **I.7.2. Protection des micro-organismes du biofilm**

L'organisation structurale en biofilm procure aux micro-organismes le constituant une véritable gangue protectrice et les préserve d'un certain nombre de facteurs d'agression comme par exemple la dessiccation ou encore l'action d'agents antibiotiques.

#### **c. Protection mécanique**

La matrice assure une protection mécanique des micro-organismes contre l'entrée dans le biofilm d'antiseptiques, de détergents et d'antibiotiques (Costerton, 1999).

La matrice crée un environnement protégé et assure la protection génétique des microorganismes du biofilm et l'acquisition de caractères de résistance. L'organisation en communauté de micro-organismes au sein du biofilm est propice à l'échange d'informations, avec entre autres, la possibilité de transfert de caractères de résistance (Costerton, 1999).

Les propriétés physico-chimiques de la matrice d'exopolysaccharides sont variables d'un biofilm à l'autre. Elle est toujours initialement composée de polysaccharides. Sa très forte teneur en eau, due à sa capacité à fixer un grand nombre de molécules d'eau par des liaisons hydrogène, permet de lutter contre la dessiccation de certains biofilms dans le milieu naturel (Clutterbuck, 2007). Parfois, la couche la plus externe de la matrice se déshydrate afin de former une interface sèche et d'empêcher une dessiccation plus marquée (Sutherland, 2001).

D'autre part, cette matrice protège les micro-organismes de la dérive en les empêchant d'être emportés par le courant. Elle permet ainsi la colonisation de niches écologiques (Wanner et Bauchrowitz, 2006).

La matrice d'exopolysaccharides joue aussi un rôle mineur dans les propriétés d'antibiorésistance des biofilms en se liant directement aux agents anti-microbiens et en les empêchant de pénétrer au sein du biofilm (Donlan, 2002).

Ainsi, la matrice d'exopolysaccharides joue un rôle structural et fonctionnel important puisqu'elle sert de barrière protectrice contre la dessiccation, les substances bactéricides mais aussi contre les bactériophages (Donlan, 2002).

#### **d. Protection contre la destruction des cellules.**

Des mutations génétiques au niveau de séquences codant pour les molécules du quorum sensing dans certains micro-organismes entraînent des changements de phénotypes et l'acquisition de caractères de résistance à la destruction physico-chimique des cellules (Tomlin *et al.*, 2005). D'autre part, les biofilms résistent mieux aux stress thermiques et à l'exposition aux rayons ultra-violets que les micro-organismes vivant sous forme planctonique (Martinez et Casadevall, 2007).

Le mode de vie des micro-organismes sous forme de biofilm confère donc non seulement des avantages d'un point de vue métabolique, une protection mécanique, l'acquisition de caractères de résistance aux antibiotiques mais permet aussi l'acquisition d'une meilleure résistance aux rayons ultraviolets et aux hautes températures par rapport à leurs congénères planctoniques. (Martinez et Casadevall, 2007).

### **I.7.3 Adaptations aux conditions environnementales**

#### **a. Adaptation au stress environnemental**

Des études menées sur des biofilms d'*Escherichia coli*, de *Vibrio cholerae* et de *Pseudomonas aeruginosa* ont permis de montrer l'importance du rôle d'un facteur, le facteur  $\sigma$  RpoS, dans la réponse des communautés microbiennes organisées en biofilms dans des situations de stress (Spormann, 2008).

Certaines conditions environnementales engendrant un stress pour les cellules (stress oxydatif, irradiation UV, hautes températures, hyper-osmolarité, baisse importante du pH, manque de source carbonée...) entraînent des modifications de l'expression du génome.

Lors d'un stress, il y a activation du facteur  $\sigma$  RpoS, qui va stimuler la réponse au stress par un ensemble de modifications du métabolisme des cellules (Spormann, 2008).

L'intégration de l'ensemble des stress auxquels sont soumises les cellules par le facteur RpoS va ainsi engendrer des modifications phénotypiques importantes du biofilm, dont l'acquisition d'une antibiorésistance. On peut lister l'ensemble des modifications métaboliques au sein d'un biofilm en situation de stress de la façon suivante (Spormann, 2008) :

- ✓ Diminution de la croissance ;
- ✓ Expression de facteurs de virulence ;
- ✓ Augmentation de la résistance des biofilms aux antibiotiques et autres agents antimicrobiens ;
- ✓ Stimulation de la synthèse d'exopolysaccharides et de curli ;
- ✓ Stimulation de la synthèse de transporteurs ;
- ✓ Inhibition de la biosynthèse du flagelle : lors de fortes concentrations de sels, de sucres, d'alcools, hautes températures, variations extrêmes du pH (Goller, 2008) ;
- ✓ Dispersion du biofilm, détachement et essaimage de bactéries planctoniques, influencés par la disponibilité du milieu en nutriments, la concentration en oxygène, le pH, la présence de certains composés spécifiques (Goller, 2008 ; Gjermansen, 2005).

L'exemple du rôle de RpoS au sein des biofilms de *Vibrio cholerae* est très intéressant. Il joue un rôle clef dans la dernière phase de l'infection au niveau de l'intestin et dans la dispersion du biofilm de *Vibrio cholerae*. RpoS intervient dans l'essaimage des cellules à partir de biofilms formés sur des muqueuses. Une des cibles de l'action de RpoS est la biosynthèse des vibrio-polysaccharides VPS (Muller *et al.*, 2007 ; Nielsen *et al.*, 2006). Ainsi, le facteur RpoS occupe un rôle central dans la régulation de la physiologie des microorganismes.

**b. Résistance aux stress environnementaux**

On rappelle que les biofilms sont composés d'une ou de plusieurs espèces de microorganismes, qualifiés respectivement de biofilms homogènes et hétérogènes. Ces deux catégories de biofilms répondent-elles de la même façon à une situation de stress ?

Des expériences ont été réalisées avec des biofilms composés respectivement d'une et de quatre espèces différentes de micro-organismes, afin d'évaluer la résistance aux agents anti-microbiens (Burmolle, 2006). Les agents anti-microbiens testés dans cette étude sont le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) et la tétracycline. Le peroxyde d'hydrogène est à l'origine d'un stress oxydatif de la bactérie. La tétracycline inhibe la synthèse de protéines bactériennes. Les bactéries suivantes ont été mises en présence des agents anti-microbiens cités, en biofilm homogène et en biofilm hétérogène : *Microbacterium phyllosphaerae*, *Shewanella japonica*, *Dokdonia donghaensis* et *Acinetobacter lwoffii*.

L'activité des biofilms permettant d'évaluer la résistance aux agents antimicrobiens a été déterminée par le test de réduction du 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). Le TTC est un composé soluble et incolore qui, lorsqu'il est réduit par le complexe enzymatique oxydatif bactérien devient un sel rouge insoluble. Les résultats de l'étude démontrent que le peroxyde d'hydrogène et la tétracycline sont moins efficaces sur les biofilms composés d'espèces différentes de micro-organismes. Ainsi, les biofilms hétérogènes sont significativement plus résistants aux antibiotiques que les biofilms homogènes (Burmolle, 2006).

La résistance accrue des biofilms hétérogènes aux agents antimicrobiens peut être liée à des modifications de la matrice extracellulaire des biofilms, qui serait alors moins perméable. Il y aurait des interactions entre les polymères sécrétés par les divers microorganismes du biofilm, qui aboutiraient à une augmentation de viscosité de la matrice (Skillman, 1999 ; Burmolle, 2006).

Les biofilms hétérogènes sont plus résistants à l'invasion d'autres microorganismes.

Prenons l'exemple de l'invasion de biofilms par *Pseudoalteromonas tunicata*. Il s'agit d'une bactérie marine qui a pour particularité de produire des substances bactéricides de haut poids moléculaire. Une de ces protéines est bactéricide pour les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Les biofilms homogènes et hétérogènes ont été exposés à ces protéines, visualisables par un immunomarqueur fluorescent. Les résultats montrent que l'invasion des

biofilms par *Pseudoalteromonas tunicata* est moindre dans les biofilms hétérogènes, comparativement aux biofilms homogènes (Burmolle, 2006).

Les espèces bactériennes ont tout à gagner en s'organisant en biofilms avec d'autres espèces bactériennes car cela leur permet d'acquérir des avantages et un fitness augmenté et d'être plus résistantes aux stress environnementaux que les biofilms homogènes. Cette capacité de résistance exprimée par les biofilms rend leur élimination difficile. Ceci a un impact considérable, compte-tenu de l'importance médicale et industrielle des biofilms. (De Chalvet De Rochemonteix, 2009)

### **I.8. Importance des biofilms**

#### **Exemple : Flore commensale et protection de l'organisme**

Tous les organes internes creux en communication directe avec l'environnement extérieur comme la bouche, l'anus, les cavités nasales ou encore le vagin, sont des niches écologiques abritant des micro-organismes qui existent majoritairement sous forme de biofilms. Ces micro-organismes sont pour la plupart des bactéries, mais on trouve aussi des champignons et des levures (Martini, 2006). Ils co-évoluent avec leur hôte et son système immunitaire et jouent un rôle fonctionnel important pour l'organisme, dans la digestion par exemple, surtout chez les ruminants. Ces micro-organismes, présents de façon physiologique chez un individu sain, constituent la flore commensale de l'organisme.

Les bactéries commensales peuvent être réparties en 4 flores principales (cutanée, respiratoire, génitale et digestive)

Cette flore commensale joue un véritable rôle de protection de l'organisme face à des infections. Elle n'est, à l'état normal chez un individu sain, à l'origine d'aucune infection. Ceci est dû à la présence d'une véritable homéostasie bactérienne. Tout désordre de cette homéostasie entraîne des troubles (digestifs, cutanés...). On rencontre ainsi des infections dues à des micro-organismes de la flore commensale lors d'effraction des barrières cutanées et muqueuses. Les microorganismes de la flore commensale ne peuvent donc devenir pathogènes que lorsque des conditions de déséquilibre leur permettent de proliférer (De Chalvet De Rochemonteix, 2009)

# **Chapitre 2 : la flore bactérienne commensale**

# Synthèse bibliographique Chapitre 2 : La flore bactérienne commensale

## II. La flore bactérienne commensale

### II.1. Généralité

De nombreuses bactéries sont normalement présentes sur la peau et les muqueuses des sujets sains. Elles constituent les flores commensales résidentes. Celles-ci participent activement au maintien de la santé. Par exemple, la flore intestinale synthétise de la vitamine K, aide à l'absorption des aliments, prévient par son équilibre la prolifération de bactéries commensales potentiellement dangereuses (*Clostridium difficile*) et gêne la colonisation par des bactéries pathogènes.

Les bactéries commensales peuvent être réparties en 4 flores principales (cutanée, respiratoire, génitale et digestive).

1. **La flore cutanée** est variable en qualité et en quantité ( $10^2$  à  $10^6/cm^2$ ) selon la topographie.

➤ *La flore résidente* est formée de germes Gram + potentiellement peu pathogènes

- Staphylocoques à coagulase négative
- Corynébactéries

➤ *La flore transitoire* est plus polymorphe et peut comporter des germes potentiellement pathogènes, provenant du tube digestif ou du rhinopharynx :

- Entérobactéries
- Staphylocoque doré.

Les mains portent souvent une flore transitoire abondante (rôle dans la transmission croisée).

2. **La flore de l'arbre respiratoire supérieur** est très variable et abondante au niveau du rhinopharynx ( $10^8/ml$  de sécrétion pharyngée). Elle contient de nombreux opportunistes majeurs :

- Staphylocoque doré (orifices narinaux en particulier)
- Streptocoques (groupables ou non, dont *S.pneumoniae*)
- Haemophilus
- Neisseria (éventuellement *Neisseria meningitidis* dont le portage est transitoire)

## Synthèse bibliographique Chapitre 2 : La flore bactérienne commensale

- *Branhamella catarrhalis*
- Anaérobies, corynébactéries, lactobacilles.

Au niveau de la trachée, la flore est minime et activement combattue par le mucus, les cils, les macrophages, etc... L'arbre respiratoire inférieur est stérile.

3. **La flore génitale** joue un rôle de protection, essentiel chez la femme. Les lactobacilles acidophiles ou bacilles de Döderlein, par leur sécrétion d'acide lactique entretiennent un pH bas qui limite la flore commensale. Cette flore commensale est réduite à :

- Streptocoque
- Corynébactéries
- Bifidobacterium.

Après la ménopause, les anaérobies et entérobactéries sont plus abondantes.

4. **La flore digestive** est la plus abondante et la plus importante. Elle varie en fonction des différents étages du tube digestif. Au niveau de la bouche peuvent se trouver la plupart des germes présents dans le rhinopharynx avec comme particularité l'abondance des streptocoques surtout non groupables, la présence éventuelle d'entérobactéries et d'anaérobies. Les streptocoques jouent un rôle important dans la genèse de la plaque dentaire et, s'ils essaient, dans le développement des endocardites. On dénombre habituellement  $10^8$  à  $10^9$  germes par ml de salive. L'estomac possède une flore très pauvre du fait de son acidité. L'intestin grêle possède aussi une flore pauvre en raison du péristaltisme et de l'abondance des sécrétions. Les germes présents sont essentiellement des streptocoques, staphylocoques et lactobacilles.

La flore colique est en revanche extrêmement variée et abondante. Elle comprend  $10^{11}$ - $10^{12}$  bactéries/gr avec une nette prédominance des anaérobies stricts (99,9 %), surtout Bactéroïdes ( $\approx 10^{11}$  par gramme de selle), Bifidobactérium, Clostridium. Viennent ensuite les Entérobactéries (E.coli,  $10^8$ /gr, Proteus, Klebsielle...), Entérocoques et Staphylocoques. Cette flore est habituellement stable et limite l'implantation d'espèces pathogènes telles que Salmonelle, Shigelle ou Campylobacter et le développement de bactéries commensales potentiellement dangereuses.

## **Synthèse bibliographique Chapitre 2 : La flore bactérienne commensale**

### **II.2. Composition et évolution de l'écosystème gastro-intestinal**

Le tractus gastro-intestinal est un écosystème complexe et ouvert aux microorganismes exogènes. De par sa surface totale (muqueuse) estimée à 200-300 m<sup>2</sup>, il représente la plus grande surface du corps en contact avec l'environnement (Holzapfel *et al.*, 1998). L'écosystème gastro-intestinal est généré par une alliance stable entre l'épithélium gastro-intestinal, le système immunitaire et une importante flore microbienne. Ces trois composants sont continuellement liés entre eux et évoluent ensemble en assurant une fonction et une activité normale de l'écosystème. Si l'un des trois composants de l'écosystème se défaille, l'alliance est altérée et par conséquent diverses pathologies s'y installent (McCracken *et al.*, 2001).

Les interactions entre les microorganismes et l'hôte peuvent être de trois types : symbiose, commensalisme et pathogénicité (Hooper *et al.*, 2001). L'hôte est protégé contre la microflore intestinale pathogène par les barrières chimiques et physiques formées par l'épithélium gastro-intestinal (Kagnoff *et al.*, 1997).

### **II.3. La microflore intestinale**

Selon la définition d'Isolauri *et al.*, (2002), la flore intestinale normale est collection complexe et en équilibre de microorganismes qui habitent normalement dans le tractus gastro-intestinal et remplissant un rôle dans la nutrition, la physiologie et le contrôle du système immunitaire de l'hôte. Après une colonisation complète, la microflore intestinale est considérée comme un organe acquis après la naissance. Il est constitué d'une grande diversité d'espèces microbiennes assurant différentes fonctions pour l'hôte. La microflore du tractus gastro-intestinal a été estimée à près de 10<sup>13</sup>-10<sup>14</sup> cellules microbiennes représentant 400 à 500 espèces et sous espèces. Cette microflore représente environ 10 fois le nombre total de cellules du corps humain (Moore *et al.*, 1974 ; Bjorksten *et al.*, 2001).

### **II.4. Développement normal de la flore intestinale**

Les études montrent que lorsque la naissance se passe de façon naturelle, le profil de la colonisation bactérienne intestinale du nouveau-né est assez stéréotypé. On peut le diviser en 4 phases durant la première année chez l'enfant allaité (Orrhage *et al.*, 1999). Au-delà, le profil bactérien de la flore intestinale se rapproche de celui de l'adulte avec 10<sup>10-11</sup> Unités formant colonies (UFC) par gramme de contenu colique.

## **Synthèse bibliographique Chapitre 2 : La flore bactérienne commensale**

### **La 1<sup>ère</sup> phase**

Les premières bactéries qui s'installent sont des germes anaérobies facultatifs, notamment des streptocoques, des entérobactéries et des staphylocoques. Peu de germes anaérobies stricts sont trouvés à ce stade. Le déterminant essentiel de la nature des germes de la nature des germes rencontrés est la flore vaginale et surtout fécale de la mère. L'écologie bactérienne de l'environnement immédiat du lieu de naissance est également importante. Après 48 heures, le nombre de germes est déjà de l'ordre de  $10^4$  -  $10^6$  UFC/ml de contenu intestinal. Cette étape est indépendante du type d'alimentation de l'enfant mais elle peut être influencée par une antibiothérapie maternelle.

### **La 2<sup>ème</sup> phase**

A cette étape, la concentration des germes anaérobies stricts (bifidobactéries et lactobacilles) augmente jusqu'à voisiner  $10^9$  UFC/ml au dixième jour. Par ailleurs, le profil bactérien se diversifie avec augmentation en nombre d'*Escherichia coli*, *Bacteroide spp.* Et pour une moindre part de *Clostridia*. Le groupe des staphylocoques diminue parallèlement. Cette phase est clairement influencée par l'alimentation.

Les enfants nourris exclusivement au sien ont un contenu intestinal nettement plus riche en bactéries anaérobies strictes notamment en bifidobactéries et, dans moindre mesure, en lactobacilles. Cela est lié à l'existence des facteurs bifidogènes dans le lait maternel parmi eux, on trouve les protéines, la lactoferrine et la caséine-kappa.

Ces facteurs concourent au maintien d'un pouvoir tampon faible favorable à la croissance des bifidobactéries. Grâce à leur métabolisme anaérobie strict qui entraîne la formation d'acide lactique et acétique, ces bactéries maintiennent un pH liminal acide, favorisant leur propre développement aux dépens des germes anaérobies facultatifs potentiellement pathogènes.

### **La 3<sup>ème</sup> phase**

La troisième phase démarre avec le début de la diversification alimentaire. Les différences entre l'enfant nourri au sein et celui nourri au lait artificiel s'estompent. Les entérobactéries augmentent en nombre de même que les streptocoques et les *Clostridia*. La flore anaérobie

## Synthèse bibliographique Chapitre 2 : La flore bactérienne commensale

stricte plus diversifiée augmente également durant cette phase, au profit de variétés microbiennes très spécifiques du côlon ( *Fusobacterium*, *Eubacterium*,...etc.).

### La 4<sup>ème</sup> phase

A la fin de la première année, la composition de la flore intestinale se rapproche de celle de l'adulte. Cette quatrième année, la composition de la flore intestinale se rapproche de celle de l'adulte. Cette quatrième phase est marquée par la très grande augmentation de la flore anaérobie stricte dans la partie distale du côlon (Bjorkstén, 1999). Il y a des différences peuvent persister entre l'enfant et l'adulte, cela tient probablement aux habitudes alimentaires et à l'hygiène. Les différences observées entre les enfants normaux et allergiques, constant quelle que soit la région, sont en revanche plus intrigantes (Bjorkstén, 1999)

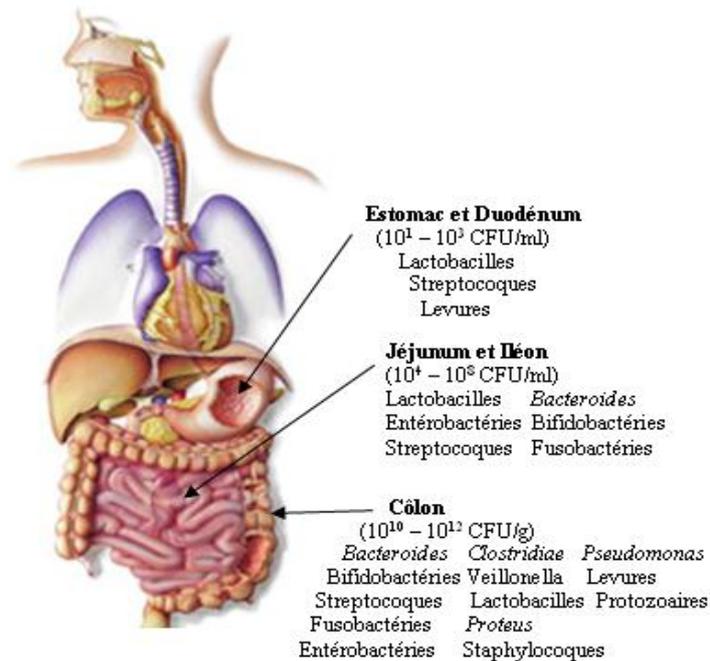


Figure n°04 : Colonisation microbienne du tractus gastro-intestinal humain (Holzapfel *et al.*, 1998).

### II.5. Rôle de la flore intestinale

Le nombre de cellules bactériennes associées à l'organisme humain est évalué à  $10^{14}$ , recouvrant environ 400 espèces, dépassant ainsi d'environ 10 fois le nombre de cellules eucaryotes. La flore subit des variations importantes quantitatives et qualitatives tout au long

## Synthèse bibliographique Chapitre 2 : La flore bactérienne commensale

de tube digestif. Au niveau du côlon la population est plus abondante, avec environ  $10^{11}$  bactéries / g de contenu. Constitué de façon dominante de genres anaérobies stricts.

Les fonctions de la flore sont multiples, une des fonctions est son rôle métabolique par la fermentation au niveau colique des substrats d'origine endogènes ou exogène et non absorbés dans l'intestin grêle (Bernalier et Donadille, 2004). Les métabolites produits à partir de la fermentation des glucides sont principalement des acides gras à chaîne courte. Ces métabolites sont en grande partie absorbés et ont des effets physiologiques bénéfiques.

A côté de ce rôle métabolique, la microflore intestinale joue un rôle majeur dans la résistance à la colonisation des bactéries exogènes qu'elles soient à potentialité pathogène ou non. Cette fonction de barrière est essentielle car elle maintient un équilibre relativement stable dans la microflore du tube digestif.

En fin, la microflore intestinale a une influence considérable sur le système immunitaire intestinale. (Moreau, 2004 ; Forchielli, 2005).

**Tableau n° 2: Rôles des différents groupes bactériens retrouvés dans le microbiote.**

Bactéries intestinales	Rôles	Effet
<b>Bifidobactéries</b>	Digestion/absorption des aliments Stimule la fonction immunitaire Synthèse des vitamines	+
<b>Lactobacilles</b>	Digestion/absorption des aliments Stimule la fonction immunitaire	+
<b>Bacteroides</b>	Synthèse des vitamines Putréfaction intestinale	+/-
<b>Entérocoques</b> <i>E. coli</i>	Inhibition des bactéries exogènes Diarrhées/ constipation	+/-
<b>Streptocoques</b> <i>Ps. aeruginosa</i> <i>Poteus sp.</i>	Stimule la fonction immunitaire Production des précurseurs cancéreux Putréfaction intestinale	+/- -
<b>Staphylocoques</b> <i>Clostridium</i> <i>Veillonellae</i>	Production des précurseurs cancéreux	-

(Adapté de Salminen et *al.*, 1998)

## **Synthèse bibliographique Chapitre 2 : La flore bactérienne commensale**

### **II.6. Méthodes d'étude de la flore intestinale**

Jusqu'à il y a quelques années l'analyse de la flore intestinale n'était basée que sur des techniques de culture avec isolement sur différents milieux non sélectifs et sélectifs et identification des micro-organismes basée sur des caractères morphologiques et biochimiques.

Les techniques moléculaires basées sur l'analyse moléculaire de l'ARN ribosomal 16S (ARN16S) ou de son gène codant (ADNr16S) ont été récemment appliquées à l'écologie microbienne (Zoetendal et al., 2004).

Ces techniques parmi de déceler la part non cultivable de la flore. Cependant, la comparaison entre les analyses moléculaires et classiques de la flore est délicate, l'identification bactérienne étant faite sur des critères phénotypiques et métaboliques dans les techniques de culture et sur des critères phylogéniques pour les techniques de biologie moléculaire. De plus, l'approche moléculaire détecte les groupes bactériens dominants, alors que la culture, grâce à l'utilisation des milieux sélectifs permettant l'identification de genres bactériens sous dominants. Cependant, l'utilisation de PCR avec des amorces spécifiques peut permettre d'étudier un genre bactérien voire une espèce bactérienne isolé, et de descendre ainsi le seuil de détection, permettant de suivre la colonisation digestives d'une espèce voir d'une souche. D'autre part, les résultats sont exprimés en valeur relative (pourcentage par rapport aux bactéries totales) pour les études utilisant des méthodes moléculaires, alors qu'ils sont exprimés en mesures absolue du nombre de microorganismes avec les techniques de culture. Donc, ces deux approches de l'étude de la flore sont complémentaires.

### **II.7. Etablissement de la flore digestive chez le nouveau-né**

Le nouveau-né stérile dans l'utérus, dès la naissance se trouve plongé dans un univers bactérien riche et se colonise rapidement avec une flore simple à partir des flores de sa mère et de l'environnement proche.

La colonisation par les bactéries des flores vaginale et fécale de la mère a été clairement montrée (Tannock et al., 1990 ; Mandar et al., 1996).

Les nouveau-nés étant colonisés plutôt par les entérobactéries et bifidobactéries d'origine fécale que par les lactobacilles d'origine vaginale (Tannock et al., 1990). Ensuite, ils sont

## Synthèse bibliographique Chapitre 2 : La flore bactérienne commensale

continuellement exposés à des nouvelles bactéries provenant de l'environnement, de la nourriture et des bactéries cutanées des adultes qui les touchent.

Une flore complexe et stable, proche de celle de l'adulte, ne semble être obtenue qu'entre 2 et 4 ans (Kleessen et al., 2000). Les facteurs bactériens permettant l'implantation d'une souche donnée sont peu connus. Une étude sur le suivi de l'implantation d'*Escherichia coli* a montré que les souches résidentes, contrairement aux souches transitoires, avaient certaines caractéristiques pouvant favoriser leur colonisation comme des gènes codant des fimbriae ou des hémolysines (Nowrouzian et al., 2003). Des études chez l'animal ont montré que les premières bactéries colonisant le tube digestif étaient capables d'induire des glycosylations spécifiques du glycocalyx et de moduler l'expression des gènes des entérocytes, montrant l'avantage écologique de ces premières colonisatrices (Hooper et al., 2001)

Malgré les différences observées entre les études, liées aussi bien aux techniques bactériologiques mises en œuvre qu'aux variations individuelles ou géographiques, un schéma général d'implantation se dégage.

Chez l'enfant à terme, les premières bactéries implantées sont des organismes aérobies-anaérobies facultatifs :

- Les entérobactéries : principalement l'espèce *E.coli* ;
- Les entérocoques et les staphylocoques (Ducluzeau, 1993) ;
- Les bactéries aérobies-anaérobies facultatives, dont le niveau atteint rapidement  $10^9$  à  $10^{10}$  UFC/g de contenu colique, consomment l'oxygène, diminuant ainsi le potentiel redox de la lumière du tube digestif, ce qui permet l'implantation des genres anaérobies stricts (*Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*) ainsi que celle des lactobacilles, microaérophiles.

Les méthodes moléculaires ont confirmé cette séquence d'implantation (Harmsen et al., 2000 ; Favier et al., 2003). Ces techniques ont permis également de compléter des données en mettant en évidence les genres bactériens difficilement ou non cultivables. Ainsi Harmsen et al.(2000), après la mise au point de sondes spécifiques, ont observé 2 genres non identifiés par culture : le genre *Coriobacterium* pour lequel un taux plus élevé a été retrouvé chez les nouveau-nés nourris artificiellement par rapport à des nouveau-nés allaités, et le cluster *Atopobium* pour lequel une diversité augmentant avec l'âge a été décrite.

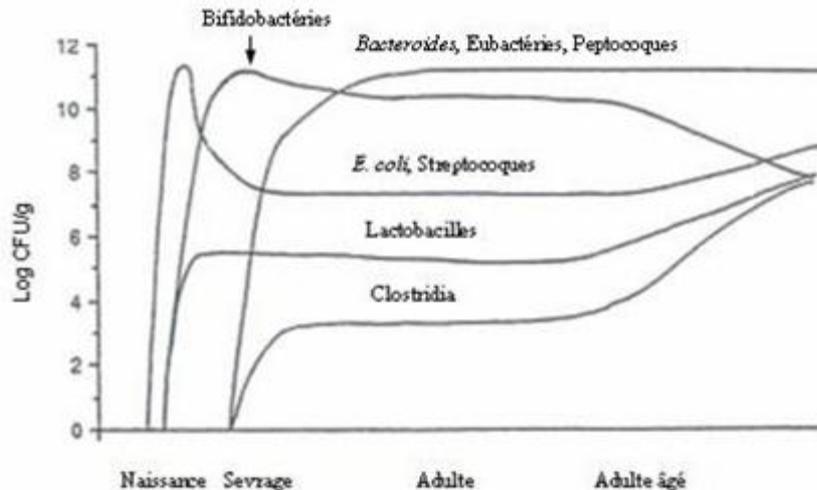


Figure n° 5. Changement du microbiote intestinal en fonction de l'âge (Ballongue, 1998).

### II.8. Les facteurs influençant la cinétique d'implantation de la flore digestive

De nombreux éléments vont influencer cette cinétique d'implantation et la composition de la flore intestinale du nouveau-né parmi lesquels le mode d'accouchement, l'environnement, le type d'alimentation, l'âge gestationnel et l'antibiothérapie.

#### II.8.2. Influence du mode d'accouchement

Les enfants nés par césarienne rencontrent majoritairement en premier lieu les bactéries de leur environnement : air et personnel soignant. L'implantation de leur flore est donc différente de celle des nouveau-nés nés par voie basse. Les premières bactéries implantées sont toujours les anaérobies facultatifs (entérobactéries, entérocoques, staphylocoques), mais la flore anaérobie stricte s'implante beaucoup plus tardivement, ce retard portant principalement sur les genres *Bifidobacterium* et *Bacteroides*, bactéries d'origine entérique (Grönlund et al., 2000). Le suivi sur 6 mois d'une cohorte a montré que ce retard de colonisation était toujours significatif à 1 mois pour le genre *Bifidobacterium* et à 6 mois pour le genre *Bacteroides* (Grönlund et al., 2000).

#### II.8.3. Influence de l'environnement

L'environnement joue un rôle important dans la colonisation intestinale. Certaines études ont mis en évidence la colonisation à plus haut niveau et plus fréquente chez les enfants nés

## **Synthèse bibliographique Chapitre 2 : La flore bactérienne commensale**

dans les pays en voie développement par les bifidobactéries (Simhon *et al.*, 1982 ; Adlerberth *et al.*, 1991 ; Sepp *et al.*, 2000). Ces différences de flore sont vraisemblablement liées aux conditions plus strictes d'hygiène entourant les accouchements dans les pays industrialisés, réduisant l'exposition de l'enfant aux flores fécale et vaginale de sa mère.

### **II.8.4. Influence du terme de naissance**

Si de nombreuses études portent sur l'implantation de la flore digestive du nouveau-né, peu concernent le prématuré. Les faits notables de l'implantation de la microflore digestive chez ces nouveau-nés sont d'une part un retard de colonisation important par rapport aux enfants à terme et d'autre part une colonisation par un nombre plus réduit d'espèces bactériennes (Magne *et al.*, 2005 ; Westerbeek *et al.*, 2006). Si la flore aérobie (entérobactéries, entérocoques, staphylocoques) colonise assez rapidement le prématuré, l'implantation de la flore anaérobie — *Bifidobacterium* et *Bacteroides* — est retardée (Schwiertz *et al.*, 2003).

### **II.8.5. Influence de l'antibiothérapie**

Les conséquences d'une antibiothérapie ont été étudiées surtout sur la sélection de micro-organismes résistants. La plupart des études ont été effectuées dans des unités de soins intensifs, montrant qu'une antibiothérapie supérieure à 3 jours est un facteur de risque de colonisation par des entérobactéries résistantes (Bennet *et al.*, 1986). Ce facteur de risque est d'autant plus élevé que l'antibiothérapie est à large spectre. D'autres études n'ont pas montré de relation aussi évidente, cependant, au cours d'épidémies à bactéries multirésistantes, la mise en place d'une politique de restriction des antibiotiques a permis de stopper des épidémies (White *et al.*, 1997). La colonisation par des bactéries résistantes a également été corrélée à la durée de l'hospitalisation, au faible âge gestationnel et au faible poids de naissance, montrant l'importance du transfert horizontal des souches.

En revanche, l'influence de l'antibiothérapie sur l'implantation globale de la flore n'a été que très peu étudiée. Goldman n'a pas observé de modification de l'implantation de la flore chez le nouveau-né même avec une antibiothérapie de plus de 3 jours, mais seule la flore aérobie a été étudiée (Goldmann *et al.*, 1978). Dans l'étude de Bennet, 60 à 80 % des enfants ayant reçu une antibiothérapie ont été colonisés par une flore anaérobie à un niveau

## **Synthèse bibliographique Chapitre 2 : La flore bactérienne commensale**

n'excédant pas  $10^6$  bactéries/g fécès alors que 100 % des enfants non traités étaient colonisés à un niveau de  $10^7$ /g (Bennet *et al.*, 1986).

De même, peu d'études portent sur l'effet de l'antibiothérapie de courte durée. L'administration d'une antibiothérapie pendant 2 à 4 jours pour suspicion d'infection materno-fœtale a montré un retard de colonisation (Bonnemaison *et al.*, 2003 ; Campeotto *et al.*, 2004). Ce retard peut durer plus de 10 jours (Bonnemaison *et al.*, 2003). En outre, l'antibiothérapie favorise l'implantation de bactéries ayant acquis des mécanismes de résistance (Campeotto *et al.*, 2004).

L'antibiothérapie administrée à la mère *per partum* peut aussi influencer l'implantation de la flore du nouveau-né. Le cas le plus fréquent concerne l'antibioprophylaxie *per partum* de l'infection néonatale à streptocoque du groupe B. S'il n'est pas question de revenir sur cette pratique consensuelle qui a montré son efficacité dans la diminution de l'incidence de cette infection, certaines études ont montré d'une part une augmentation des infections néonatales à germes résistants à l'antibiotique (Stoll *et al.*, 2002), d'autre part une modification de l'implantation de la flore chez le nouveau-né avec diminution de la colonisation par les genres *Bifidobacterium* et *Clostridium* (Jaureguy *et al.*, 2004). Cette modification de flore pourrait être responsable d'une altération de l'effet barrière favorisant la colonisation par des micro-organismes résistants.

### **II.8.6. Les vaccinations précoces**

Un lien a été montré entre la prévalence de l'asthme et la vaccination précoce (1 à 2 mois). Dans certaines circonstances, la vaccination pourrait avoir une incidence sur la flore intestinale et l'orientation du système immunitaire vers une voie une voie pro-inflammatoire et pro-allergie (AFSSA, 2003)

### **II.8.7. Influence du mode d'alimentation**

Le mode d'alimentation du nouveau-né est l'un des facteurs les plus étudiés. La flore qui s'implante chez le nouveau-né allaité est moins diversifiée que celle du nouveau-né nourri au lait artificiel (Ducluzeau, 1993; Orrhage et Nord, 1999). La différence la plus notable est la colonisation dominante par le genre *Bifidobacterium* chez le nouveau-né allaité. Parallèlement l'implantation des entérobactéries, et surtout des *Clostridium* et des *Bacteroides* est retardée et/ou se fait à un niveau moins élevé. Dès qu'une alimentation mixte est en route, la flore

## **Synthèse bibliographique Chapitre 2 : La flore bactérienne commensale**

semble reprendre un profil de flore de nouveau-né nourri au lait artificiel. Cependant, certaines études ont montré que les nouveau-nés nourris au lait artificiel peuvent être colonisés par le genre *Bifidobacterium* aussi rapidement et à un niveau aussi élevé que les nouveau-nés allaités (Lundequist *et al.*, 1985). Mais les espèces dominantes semblent être différentes, avec entre autre l'absence de l'espèce *bifidum*, ce qui modifierait l'effet barrière, pouvant ainsi expliquer l'implantation d'une flore plus variée.

De nombreux travaux ont recherché les composants du lait responsables de cette colonisation dominante du genre *Bifidobacterium*. Une plus faible concentration en protéines du lait maternel, une capacité tampon réduite, des protéines particulières telles que le lysozyme, la lactoferrine, les immunoglobulines (IgA surtout) ont été évoqués comme facteurs bifidogènes (Langhendries, 1998). Cependant, les modifications des formules infantiles prenant en compte ces différents facteurs n'ont pas favorisé l'implantation d'une flore similaire à celle du nouveau-né allaité supposée être une flore à effets bénéfiques (Langhendries, 1998). Ce n'est que tardivement que l'on s'est intéressé aux oligosaccharides, pourtant quantitativement le 3<sup>e</sup> constituant du lait humain après le lactose et les lipides. En raison de leur structure — liaisons glycosidiques  $\beta$  — ils ne sont pas hydrolysables par les enzymes digestives humaines et ne sont donc pas assimilés au niveau de l'intestin grêle, constituant ainsi les véritables facteurs bifidogènes du lait maternel (Coppa *et al.*, 2004).

### **II.9. Les conséquences cliniques des perturbations dans l'établissement de la flore intestinale**

Les conséquences cliniques de ces modifications de flore sont actuellement mal connues, mais ces modifications pourraient altérer les fonctions physiologiques de la flore, entre autres l'effet barrière et la stimulation adéquate du système immunitaire intestinal.

#### **II.9.1. Entérocolite ulcéro-nécrosante**

L'altération de l'effet barrière, responsable de la résistance à la colonisation par des bactéries à potentialité pathogène et/ou multi-résistantes aux antibiotiques, peut être responsable de l'augmentation de pathologies à point de départ digestif. Cette absence de flore de barrière efficace est surtout cruciale chez le grand prématuré, sujet plus sensible que le nouveau-né à terme aux infections et dont la colonisation intestinale par une flore commensale normale est extrêmement retardée (Gewolb, 1999 ; Butel, 2001).

## Synthèse bibliographique Chapitre 2 : La flore bactérienne commensale

### II.9.2. Allergie

Outre cet effet barrière, la flore et son établissement séquentiel sont maintenant reconnus avoir un rôle important dans le développement du système immunitaire intestinal (SII), immature à la naissance (Moreau, 2004 ; Forchielli et Walker, 2005). En effet, la flore représente un stimulus important et un des premiers signaux pour la maturation postnatale du SII, jouant un rôle dans l'activation des lymphocytes T. Cette stimulation permet la mise en place de la réponse de type inducteur impliquée dans la protection vis-à-vis des pathogènes, mais aussi de type suppresseur pour le développement de la tolérance orale. De plus la composition de la flore intervient vraisemblablement dans la stimulation des T helper (Th) afin d'établir un équilibre Th1/Th2/Treg, le nouveau-né naissant avec un profil Th2. Un déséquilibre dans ces sous-populations est un facteur de risque de maladie allergique ou de maladie inflammatoire chronique intestinale. Enfin, les cellules épithéliales intestinales, par l'intermédiaire de récepteurs comme les Toll Like Receptors (TLR), sont capables de réagir aux structures bactériennes, participant ainsi à la réponse immunitaire innée ou adaptative par l'envoi de signaux aux cellules immunitaires de la *lamina propria*.

Certaines études semblent montrer un lien entre l'établissement de la flore et le risque allergique. En effet, des différences quantitatives et qualitatives de la flore fécale entre des enfants allergiques et des enfants non allergiques ont été décrites par différentes équipes (Björkstén et al., 2001 ; Kalliomaki et al., 2001 ; Watanabe et al., 2003). Ces différences portaient principalement sur le genre *Bifidobacterium* avec une colonisation de plus faible niveau chez les enfants allergiques. De plus, la répartition des espèces de bifidobactéries serait différente entre les 2 groupes avec une fréquence d'isolement plus faible des espèces *infantis*, *breve* et *bifidum* et plus élevée de l'espèce *adolescentis* chez les enfants allergiques (Ouwehand et al., 2001). Un retard de colonisation par le genre *Bifidobacterium* et par certaines espèces serait donc un facteur de risque de développer une affection allergique. Cependant, les bifidobactéries ne sont certainement pas les seules bactéries jouant un rôle dans la stimulation de l'immunité. Une corrélation entre la colonisation par le genre *Bacteroides* à un mois de vie et un pourcentage de cellules productrices d'IgA et d'IgM dans le sang périphérique plus élevé a été montrée (Grönlund *et al.*, 2000). Le rôle de cette flore semble conforté par le fait que des études menées chez des enfants nés par césarienne (Kero *et al.*, 2002 ; Laubereau *et al.*, 2004), grands prématurés (Agosti, 2003), ou nés de mères ayant

## **Synthèse bibliographique Chapitre 2 : La flore bactérienne commensale**

reçu une antibiothérapie pendant la grossesse (McKeever et *al.*, 2002) facteurs modifiant l'implantation de la flore, ont un risque plus élevé d'atopie.

### **II.10. Modulation de la flore intestinale**

L'importance que revêt aujourd'hui l'établissement de la flore fait que les recherches actuelles portant sur l'amélioration des laits et produits laitiers dans le but de favoriser l'implantation d'une flore physiologiquement bénéfique sont de plus en plus séduisantes. Différentes approches existent actuellement : l'ajout de bactéries probiotiques vivantes dans le produit laitier ou au cours de processus de fabrication, de prébiotiques, de bactéries non viables et de métabolites bactériens ou de nucléotides. Un rapport de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) a fait en 2003 le point sur l'utilisation de ces ingrédients dans les préparations lactées pour nourrissons.

#### **II.10.1. Les probiotiques**

Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, ont un bénéfice pour la santé de l'hôte. De nombreuses études ont été conduites chez le nourrisson de plus de un mois, avec des probiotiques appartenant principalement aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Les effets bénéfiques recherchés ont été principalement une amélioration ou la prévention de la diarrhée, la réduction d'infections (infections respiratoires, urinaires, bactériémies) (Kullen et Bettler, 2005).

La recherche d'effets santé par la modulation de la flore apparaît particulièrement intéressante chez le nouveau-né prématuré, chez lequel l'établissement d'une flore aberrante est un fort risque d'infections digestives telles que l'ECUN. De plus, l'effet protecteur de l'administration de bifidobactéries a été montré dans 2 modèles animaux d'ECUN, relié à une diminution significative du niveau de colonisation des *Clostridium* (Butel et al., 1998) ou des médiateurs de l'inflammation (Caplan *et al.*, 1999).

#### **II.10.2. Les prébiotiques**

Les prébiotiques sont des ingrédients alimentaires non digestibles capables de stimuler de façon sélective, au niveau colique, la croissance et/ou l'activité d'un nombre limité de bactéries susceptibles d'améliorer la physiologie de l'hôte (Gibson et Roberfroid, 1995). Par

## **Synthèse bibliographique Chapitre 2 : La flore bactérienne commensale**

l'adjonction de prébiotique dans les laits et produits laitiers, l'effet recherché est l'augmentation du nombre de bifidobactéries et de bactéries productrices d'acide lactique, bénéfiques pour l'hôte. Cette approche est intéressante car physiologique, se rapprochant de l'effet bifidogène du lait maternel par la présence d'oligosaccharides, prébiotiques naturels. Cependant la composition extrêmement complexe en oligosaccharides du lait maternel ne peut être reproduite industriellement. Ce sont donc des oligosaccharides synthétiques ou hémisynthétiques d'origine animale ou végétale qui sont utilisés. Leur propriété d'être non digestible les rapproche des oligosaccharides du lait maternel. Les prébiotiques les plus couramment utilisés sont des fructo-oligosaccharides (FOS) ou des galacto-oligosaccharides (GOS), correspondant à des unités répétées de fructose ou de galactose, respectivement. Ils sont non hydrolysables par les enzymes humaines et leur effet bifidogène a été démontré *in vitro* et *in vivo*.

Des effets bénéfiques pourraient également être reliés à l'adjonction de bactéries non viables et de métabolites bactériens (ex : les exopolysaccharides...) (Salminen *et al.*, 1998 ; Yazourh *et al.*, 2000)

### **II.10.3. Les nucléotides**

D'autres approches sont développées, comme l'adjonction de nucléotides. En effet, les nucléotides jouent un rôle clé dans de nombreux processus biologiques et des études menées chez l'homme et dans des modèles animaux suggèrent que les nucléotides d'origine alimentaire pourraient exercer des effets significatifs sur les systèmes immunitaires et gastro-intestinaux (Carver, 1999). Les nucléotides représenteraient 2 à 5 % de l'azote non protéinique du lait de femme. Cet azote pourrait contribuer à une utilisation plus efficace des protéines par les nouveau-nés allaités, qui reçoivent une quantité relativement faible de protéines comparativement à ceux alimentés par une formule. Plusieurs études ont montré les effets bénéfiques d'une formule infantile supplémentée en nucléotides sur les épisodes diarrhéiques du nourrisson (Cosgrove, 1998). L'étude de Gil *et al.* a montré que l'ajout de nucléotides pouvait favoriser l'implantation d'une flore plus riche en bifidobactéries, cependant ces résultats n'ont pas été confirmés (Balmer *et al.*, 1994). D'autres travaux ont montré également un effet sur la réponse immunitaire en modèle animal et chez le nourrisson.

**Chapitre 3 :**  
**Les**  
**exopolysaccharides**  
**bactériens**

## **Synthèse bibliographique Chapitre 3: Les exopolysaccharides bactériens**

### **III. Les Polysaccharides bactériens**

Les bactéries synthétisent plusieurs types de polysaccharides qui peuvent être classés en trois grands groupes selon leur localisation dans la cellule:

- ❖ Le premier groupe rassemble les polysaccharides du cytosol, ils servent de source de carbone et d'énergie à la cellule;
- ❖ Le second groupe concerne les constituants de la paroi tels que les acides téichoïques et les peptidoglycanes;
- ❖ Le troisième groupe qui fera l'objet de cette mémoire plus détaillée, réunit les polysaccharides élaborés par la cellule et secrétés dans le milieu.

#### **III.1. Les polysaccharides de la paroi**

La surface des cellules bactériennes est une structure complexe, très riche en molécules contenant des composants glucidiques. Ces éléments structuraux de la paroi microbienne peuvent se diviser en plusieurs classes suivant leur nature (Leclerc *et al.*, 1995).

##### **III.1.1. Les peptidoglycanes**

Sont des macromolécules constituées d'un squelette polysaccharidique linéaire d'acides N-acétylmuramiques et de N-acétylglucosamines. Ces résidus sont liés entre eux par des liaisons  $\beta$ -1,4. Les groupements carboxyles de l'acide N-acétylmuramique sont les points d'ancrage des chaînes latérales peptidiques. Ces chaînes latérales sont constituées d'acides aminés L et D : la L-lysine, l'acide D-glutamique et parfois d'acide M-diaminopimélique.

##### **III.1.2. Les acides téichoïques**

Sont des polymères constitués d'unités glycéro-phosphate liées en 1,3 ou 1,2 ou d'unités ribitol-phosphate liées en 1,5 ou encore d'unités plus complexes dans lesquelles le glycérol ou le ribitol est associé à des sucres comme le glucose, le galactose ou la N-acétylglucosamine. Les acides téichoïques sont étroitement associés au réseau de peptidoglycanes et pour certains d'entre eux (acides lipotéichoïques) à la membrane cytoplasmique. Ils traversent les diverses couches de peptidoglycanes de part en part pour émerger à la surface externe et en assurent la cohésion.

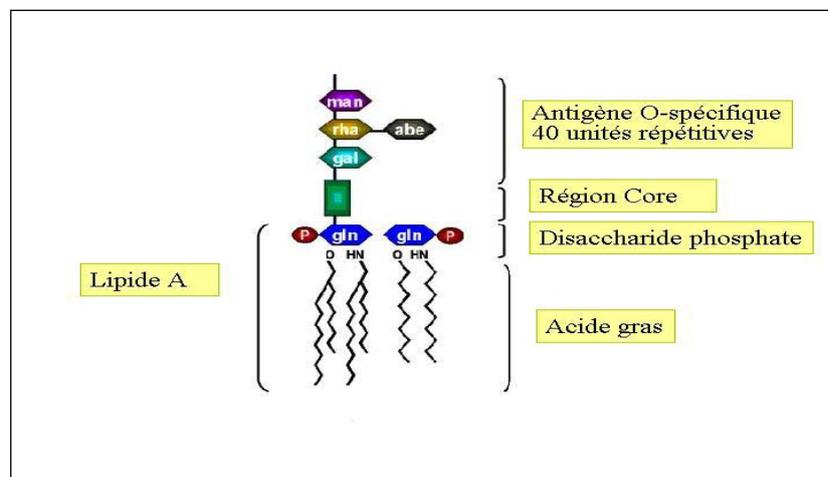
## Synthèse bibliographique Chapitre 3: Les exopolysaccharides bactériens

### III.1.3. Les LPS

Les LPS sont des constituants uniques et caractéristiques de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Ils sont composés de deux parties osidiques et une partie lipidique :

- ✓ La chaîne O-spécifique est très variable et responsable du pouvoir pathogène de certaines bactéries. Elle porte les déterminants antigéniques responsables de la spécificité de type ;
- ✓ Le « core » est également une partie glycanique mais sa composition est beaucoup moins variable ;
- ✓ Le troisième constituant des LPS est le lipide A formé d'une ossature de glucosamine portant des chaînes aliphatiques : il est responsable de la toxicité de la molécule.

Les activités biologiques des LPS (ou endotoxines) sont très diversifiées. Une partie seulement de celles-ci peut être mise en relation avec les symptômes cliniques associés aux infections invasives à Gram négatif et aux chocs septiques (Whitfield et Valvano, 1993).



**Figure n°6 :** Structure des Lipopolysaccharides d'après (Whitfield et Valvano, 1993)

### III.2. Polysaccharides exocellulaires

Les polysaccharides exocellulaires sont synthétisés à la fois par des bactéries à Gram positif, négatif et des cyanobactéries. Ils se présentent soit sous forme d'une capsule enrobant la cellule soit secrétés dans le milieu environnant. Dans certains cas, les deux formes sont produites par le micro-organisme (De Vuyst *et al.*, 2001).

Ces polymères sont majoritairement composés d'oses. Toutes leurs voies de synthèses ne sont pas encore connues car elles sont différentes et particulières à chaque bactérie. La biosynthèse de quelques EPS a toutefois été particulièrement étudiée : Les dextrans sont exclusivement composés de glucose. Ils sont synthétisés par des bactéries (Streptococcus et

## **Synthèse bibliographique Chapitre 3: Les exopolysaccharides bactériens**

Leuconostoc), qui n'utilisent qu'un substrat spécifique, le sucrose. En l'absence de ce substrat, la bactérie se développe mais elle est incapable de synthétiser le polymère. La synthèse de ce polysaccharide est très particulière comme celle du mutane et du levane, puisqu'elle a lieu dans la paroi cellulaire ou à l'extérieur de la cellule (De Vuyst *et al.*, 2001).

La biosynthèse des polysaccharides de surface à partir de précurseurs cytoplasmiques est plus commune et relativement bien connue pour les espèces les plus courantes de bactéries à Gram négatif (Sutherland, 1994). De tels micro-organismes produisent des EPS à partir de diverses sources de carbone, la synthèse intracellulaire du polymère est suivie d'une excrétion dans le milieu extracellulaire. La batterie enzymatique propre à chaque bactérie permet de produire des polysaccharides possédant une unité répétitive régulière ou non. Ils peuvent être ramifiés ou linéaires. La cellulose bactérienne ou les pullulanes sont produits suivant ce schéma de synthèse.

Une interrogation récurrente sur la biosynthèse des EPS concerne la participation d'accepteurs. Lors de la formation des lipopolysaccharides, l'accepteur est la région "Core" sur laquelle l'antigène O-spécifique est transféré par des enzymes appropriées. En ce qui concerne les peptidoglycanes et les acides téichoïques le même mécanisme a été décrit (Sutherland, 1985).

D'après les études récentes (De Vuyst *et al.*, 2001), il semble que la majorité des EPS soit synthétisée par des mécanismes intracellulaires de cette nature, qui nécessitent la présence du substrat dans la cellule. Ce substrat est alors phosphorylé puis éventuellement modifié suivant les besoins des processus anaboliques de formation du polymère.

Puis, ces résidus sont transformés en "nucléotides sucres" (uridine-5'-diphosphoglucose ou UDP-glucose par exemple) qui sont les précurseurs activés du polymère. Le premier monosaccharide peut être lié à un transporteur lipidique (undecaprenyl phosphate ou isoprénoïde pyrophosphate).

La polymérisation des monosaccharides activés est réalisée sur la face interne de la membrane cytoplasmique ou bien l'unité répétitive est transportée à travers la membrane avant la polymérisation. Après la sécrétion, le polymère est libéré dans le milieu de culture ou reste attaché à la membrane en formant une capsule autour de la cellule.

La biosynthèse du squelette glycosidique vient d'être brièvement exposée, cependant les EPS ne sont pas exclusivement constitués d'un enchaînement de monosaccharides. Les oses peuvent, être substitués par des groupements fonctionnels. Ces modifications ont lieu sur les monosaccharides avant la construction de l'unité répétitive ou après la polymérisation. Ces substituants confèrent une grande partie de leurs propriétés physiques aux EPS.

## **Synthèse bibliographique Chapitre 3: Les exopolysaccharides bactériens**

### **III.2. 1. Composition et classification des Exopolysaccharides**

#### **a. Composition osidique**

Les EPS sont composées de résidus glycosidiques, qui peuvent être liés de façon covalente à des substituants organiques ou inorganiques. Les sucres que l'on peut trouver dans les EPS sont extrêmement divers. La plupart de ces résidus sont également présents chez les animaux et les végétaux. Le D-glucose, le D-galactose et le D-mannose sous forme pyranose, sont présents dans de nombreux EPS. Parmi les 6-déoxy-hexoses, le L-fucose et le L-rhamnose sont les monosaccharides les plus fréquemment rencontrés. Les EPS de cellules eucaryotes se distinguent par la production, dans certains cas, de pentoses comme le D-ribose ou le D-xylose, qui sont beaucoup moins fréquents dans les polysaccharides dérivés des procaryotes (Sutherland, 1998).

Les cyanobactéries produisent également des EPS, plus de 70 souches ont été répertoriées, mais seulement 10 monosaccharides différents ont été rencontrés :

- Des hexoses : glucose (présent dans 90 % des polymères), galactose et mannose
- Des pentoses : ribose, xylose et arabinose
- Des déoxy-hexoses : fucose et rhamnose
- Des hexoses acides : acide glucuronique et acide galacturonique (De Philippis et al., 1998).

En plus des monosaccharides les plus communs cités ci-dessus, les EPS peuvent contenir un ou plusieurs sucres rares, comme les hexoses de configuration absolue L, les hexosamines N-acétylées telles que la N-acétylglucosamine, la N-acétylgalactosamine, la N-acétylmannosamine ou des amino-sucres comme la fucosamine ou la talosamine.

#### **III.2.2. Classification**

Devant la grande diversité de compositions et de structures des EPS, il est difficile d'en établir une classification.

Selon leur composition chimique, les EPS peuvent être subdivisés en deux groupes: les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides. Cette nomenclature proposée par Sutherland dès 1972, a été adoptée et reprise par de nombreux auteurs:

#### **a. Homopolysaccharides**

Les homopolysaccharides sont constitués d'un seul type de monomère saccharidique. Ils comprennent des glucanes, uniquement constitué de D-glucose. Mais, l'enchaînement de leurs

## **Synthèse bibliographique Chapitre 3: Les exopolysaccharides bactériens**

résidus et la présence de ramifications modifient leurs comportements en solution. Par exemple : le scléroglycane est très visqueux alors que le curdlane forme un gel en solution et la cellulose bactérienne est insoluble. (Whistler *et al.*, 1993).

### **b. Hétéropolysaccharides**

La majorité des polysaccharides bactériens est probablement constituée d'hétéropolysaccharides qui sont formés d'unités répétitives, variables dans leur taille (de di- à octasaccharides), mais aussi d'autres groupes peuvent être présents, tels des groupements phosphate, amino ou acétyle. (Rougeaux *et al.*, 1999a, Dubreucq *et al.*, 1996).

Les hétéropolysaccharides comme les homopolysaccharides peuvent être ramifiés ou linéaires. Il existe donc une très grande variété de structures possibles. Cette classe de polymères représente une source de molécules dont les propriétés physico-chimiques sont très diverses.

### **III.2.3. Les substituants**

#### **a. Substituants organiques**

Les EPS microbiens peuvent contenir divers substituants liés par des liaisons éther, esters, amide ou acétalique au squelette glycosidique. Ces substituants sont très fréquemment rencontrés dans les unités répétitives des EPS bactériens alors qu'ils sont beaucoup plus rares dans les polysaccharides d'eucaryotes.

Ces groupements sont en grande partie responsables des propriétés physico-chimiques des polymères qui les portent :

#### **b. Les substituants inorganiques**

Les groupements sulfates ont longtemps été limités aux polysaccharides eucaryotes et aux protéoglycans mais il s'avère que les polysaccharides sulfatés sont également présents chez les procaryotes. La majorité des EPS sulfatés décrits sont produits par des cyanobactéries (De Philippis *et al.*, 1998).

Les phosphates sont beaucoup plus répandus et représentent un constituant fréquemment rencontré dans les EPS bactériens. Les groupements phosphates peuvent se présenter sous deux formes : (i) sous forme de mono-esters, ils contribuent alors à accentuer le caractère anionique des polysaccharides qui les portent (Parolis *et al.*, 1996a). (ii) sous forme de phosphodiesters. L'atome de phosphore est alors engagé dans deux liaisons avec les hydroxyles de deux résidus différents (van Casteren *et al.*, 1998).

### **III.3. Biosynthèse des CPS**

## Synthèse bibliographique Chapitre 3: Les exopolysaccharides bactériens

Leur synthèse s'effectue *via* des mécanismes intracellulaires nécessitant la présence de précurseurs comme du glucose ou du galactose, qui seront phosphorylés en C1 ou C6. Ces résidus sont transformés en « nucléotides sucres » comme de l'UDP-glucose par exemple. Le premier monosaccharide peut être lié à un transporteur lipidique (undecaprényl phosphate ou isoprénoïde pyrophosphate). La première unité répétitive (liée à son transporteur lipidique) se forme sur la face interne de la membrane cytoplasmique, puis par un système enzymatique est transférée vers la face externe de la membrane où s'effectue la polymérisation des unités répétitives (Whitfield & Paiment, 2003).

Une fois la biosynthèse terminée, le polymère est libéré dans le milieu extracellulaire (EPS) ou reste attaché à la membrane formant une capsule (CPS) autour de la cellule.

Les ramifications ou substitutions présentes dans les EPS se feront sur les monosaccharides avant ou juste après la polymérisation.

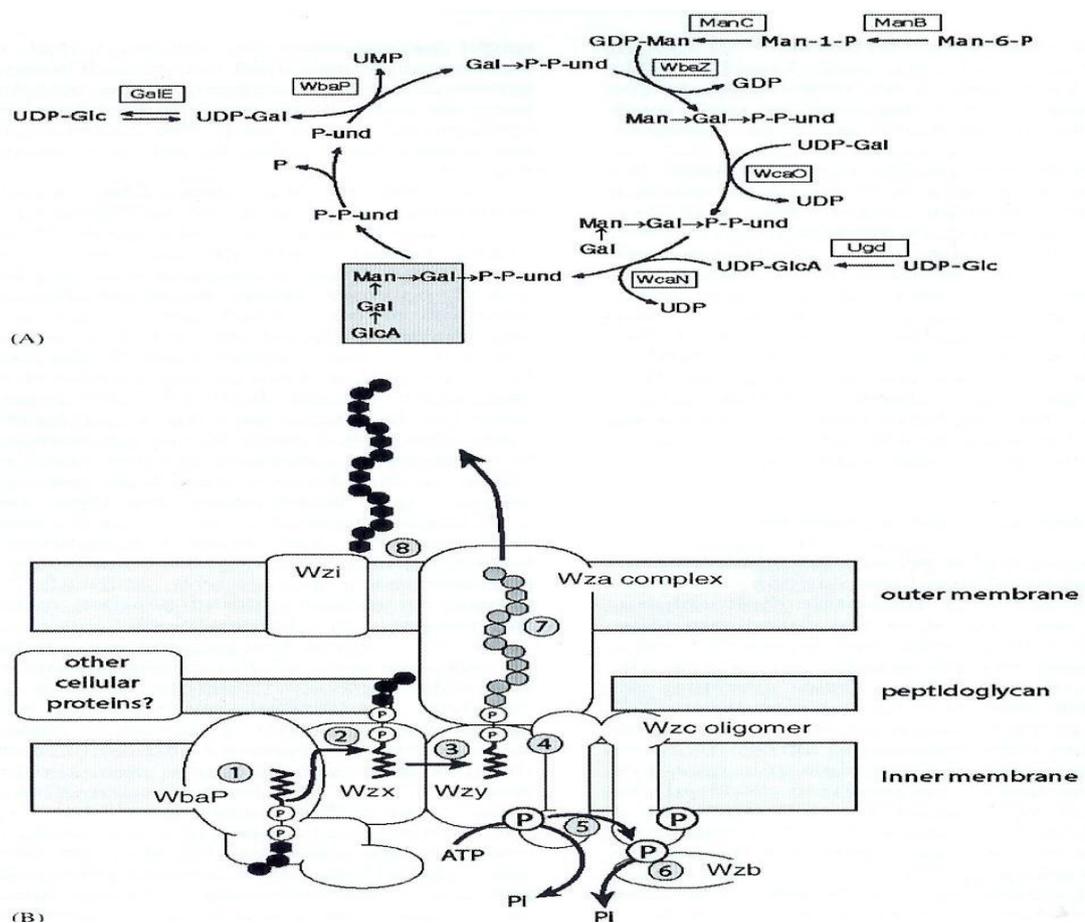


Figure n°7 : Schéma de biosynthèse des polysaccharides (Whitfield & Paiment, 2003)

### III.4. Fonction des EPS

## Synthèse bibliographique Chapitre 3: Les exopolysaccharides bactériens

### III.4.1. Pour la souche productrice

Des bactéries productrices d'EPS ont été identifiées dans une gamme de niches écologiques différentes et il est évident que le rôle joué par l'EPS dépend de l'environnement du microorganisme. Il a été proposé que la capacité de production d'EPS constitue une réponse directe et logique aux pressions sélectives de l'environnement (Dudman, 1977). L'anabolisme d'EPS demande beaucoup d'énergie, il est donc improbable qu'une bactérie utilise autant d'énergie et de substrat sans en tirer un avantage. L'importance des EPS pour la cellule ne semble pas être très grande si on considère les bactéries *in vitro*. Par contre, sous des conditions naturelles, ce qui signifie des conditions fortement concurrentielles, les EPS semblent donner aux bactéries un avantage compétitif et leur permettre de se maintenir (Cerning, 1990). La prolifération des microorganismes ne semble pas être affectée par la présence ou l'absence d'une capsule. L'enlèvement mécanique ou enzymatique de la capsule polysaccharidique n'affecte pas négativement la croissance cellulaire *in vitro* et des mutants non-producteurs d'EPS peuvent apparaître spontanément. En général, les bactéries productrices d'EPS ne sont pas capables de cataboliser les EPS qu'elles ont produites. Ainsi, les EPS ne semblent pas jouer le rôle d'une source d'énergie quoique dans certains cas, une dégradation du polymère a été observée (Cerning, 1990).

Le rôle des EPS pour la cellule le plus souvent proposé est de nature protectrice vis à vis de son environnement. La capacité de s'enrober dans une couche d'EPS avec un forte teneur en eau la rend plus résistante à la dessiccation et à la déprédation des protozoaires. La nature anionique de la couche d'EPS autour de la cellule peut aider à capturer des minéraux essentiels et des nutriments. Ainsi, un rôle écologique de l'EPS des cyanobactéries semble être le recyclage des métaux multivalents comme le  $Mn^{2+}$ .

De plus, une couche d'EPS autour de la cellule influence significativement la diffusion de différentes molécules aussi bien vers l'extérieur ou vers l'intérieur de la cellule. Ainsi, des agents anti-microbiens peuvent plus difficilement l'atteindre (Whitfield et Valvano, 1988). La production d'EPS a conféré à une souche de *Lactococcus lactis* une tolérance augmentée envers le cuivre, la nisine et le lysozyme (Looijesteijn *et al.*, 2001). Une autre fonction des EPS pourrait être de protéger les cellules contre la phagocytose. Il semble qu'il existe une relation entre l'encapsulation de la bactérie et les phénomènes de virulence. En augmentant l'hydrophobicité de la surface bactérienne, la capsule diminue sa disposition à être absorbée par les neutrophiles.

## **Synthèse bibliographique Chapitre 3: Les exopolysaccharides bactériens**

Dans la littérature, il existe des données contradictoires en ce qui concerne la relation entre les EPS et la résistance phagique. Bien qu'il semble que la capsule ait la fonction de protéger la cellule, les bactériophages actifs sur les souches encapsulées sont généralement spécifiques pour les polysaccharides de la capsule. Valyasevi *et al.* (1994) ont montré que les polysaccharides de la paroi des souches de *L. cremoris* KH et *L. lactis* C2 favorisent l'adsorption des bactériophages Kh et sK1, respectivement. D'autre part, la production d'un EPS capsulaire confère à *L. lactis* MG1614 contenant le plasmide pNZ4030 codant pour la production d'EPS une résistance accrue envers le bactériophage ML3 (Looijesteijn *et al.*, 2001).

Dans l'environnement naturel, les micro-organismes se trouvent souvent en haute densité cellulaires dans un biofilm. La production d'un glycocalyx, qui est composé principalement d'EPS, est essentielle pour la formation d'un biofilm. C'est l'EPS qui rend la bactérie capable de s'attacher aux surfaces et qui protège contre les surfactants et même les antibiotiques (O'Toole, 2003). De plus, si un biofilm est composé de plusieurs souches, comme c'est le cas par exemple dans les intestins, les produits métaboliques d'une souche peuvent servir comme substrat pour une autre et la capacité de s'attacher d'une cellule peut procurer des sites d'attachement à d'autres (Dunne, 2002). La capacité de s'attacher n'est toutefois pas toujours avantageuse pour l'homme et peut occasionner des pertes économiques considérables causées par l'obstruction des conduits d'écoulement des fluides, des filtres ou des échangeurs de chaleur (Bryers, 1993). Parfois, la destruction corrosive causée par des biofilms bactériens peut être une source inépuisable de profit économique, comme on peut le constater après une visite chez le dentiste.

### **III.4.2 Utilisations et applications industrielles**

Les polysaccharides d'origine microbienne sont toujours en compétition dans les applications avec d'autres polymères d'origine naturelle ou synthétique. Souvent les propriétés physiques et écologiques des EPS sont supérieures mais les polysaccharides d'autres origines sont presque toujours meilleur marché à produire. C'est pourquoi les EPS doivent avoir un avantage majeur, comme par exemple un bénéfice pour la santé du consommateur, Ils ont utilisé dans les industries alimentaires grâce à leurs propriétés rhéologiques et même dans la cosmétologie et le domaine médical.

# **Partie expérimentale**

# **Chapitre 1 :**

# **Matériels et**

# **Méthodes**

### I. Matériels et Méthodes

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de recherche de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire (LBGMSS) de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université De Mascara, pour une durée de 2 ans allant de Mai 2014 à avril 2016.

#### I.1. Objectifs du travail

Notre propos est d'essayer d'exploiter et de comprendre les interactions symbiotiques entre la flore commensale et l'hôte, ou d'antagonisme entre la flore commensale et la flore pathogène. Tout en mettant en évidence le rôle des EPS microbiens dans ces interactions à savoir leurs rôles dans la colonisation et l'installation de la flore commensale aux niveaux des tissus, l'équilibre de l'homéostasie de la flore commensale et bénéfique dans l'organisme et dans la protection de l'organisme contre la flore pathogène.

#### I.2. Origine des souches utilisées

Deux sites différents ont été ciblés pour l'isolement des bactéries qui appartiennent à notre flore commensale :

- *Staphylococcus epidermidis* a été isolé à partir de la couche superficielle de l'épiderme d'un adulte sain.
- *Lactobacillus reuteri*, *Escherichia coli* et *Entérocoque faecalis* ont été isolés à partir des selles d'un nouveau-né nourris au sein.

Comme des germes pathogènes *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* sont isolées à partir d'un frottis vaginal d'une femme infectée.

**I.3. analyses microbiologiques****I.3.1. Préparation de solution mère et dilution décimale**

Pour *Lactobacillus reuteri*, *E.coli* et *Entérocoque faecalis*. : Un gramme de selles a été mis dans un tube contenant 9ml de l'eau physiologique (0,9% de NaCl), la suspension a été homogénéisée pendant 2 mn. 0.1 ml des dilutions ( $10^9$ ,  $10^{10}$  et  $10^{11}$ ), sont ensemencés sur milieu MRS (lactobacillus) et milieu EMB (E. Coli) et gélose au sang (*Enterococcus*).

Concernant *Staphylococcus epidermidis* et *S. aureus* ont été isolée sur milieu Chapman.

Concernant *Candida albicans* a été isolée sur milieu Sabouraud additionné de chloramphénicol.

**I.4.2. Identification des bactéries isolées**

L'identification de ces bactéries repose sur les principaux critères biochimiques caractérisant les bactéries et qui permet de distinguer chacune de son groupe : coloration de Gram, test catalase, test oxydase, test ADH, type fermentaire, etc...

Concernant l'identification de *Candida albicans* repose sur l'observation macroscopique et l'aspect des colonies, examen microscopique, teste de germination, test de clamydosporulation et étude des caractères physiologiques (système API 20 CAUX).

**I.5. Evaluation des propriétés d'adhérence des bactéries commensales**

L'évaluation de l'adhérence de nos souches est une étape indispensable. Deux méthodes différentes ont été utilisées durant cette étude.

**I.5.1. Adhérence sur tube de verre**

La méthode d'adhérence sur tube de verre a été utilisée pour évaluer l'adhésion sur tissus durs de nos souches; une adhésion importante peut être corrélée à la production d'exopolysaccharides de surface (Hamada et Slade, 1980 ; Mukasa et Slade, 1973).

Dans un tube de verre contenant 10mL de MRS additionné de 1% de saccharose (poids/volume), 500 µL d'une culture overnight de la bactérie à tester ( $DO_{650nm} = 0.1$ ) est

ajoutée. La culture est incubée à 37°C avec une inclinaison de 30°. La formation du biofilm est évaluée à 24 heures puis à 48 heures, selon une échelle établie par Murchison *et al.* (1981); Les valeurs de cette échelle s'étendent de 0 (aucune adhérence) à 4 (fortement adhérent).

### **I.5.2. Méthode MATH**

La méthode MATH a été utilisée ici pour l'exploration de l'hydrophobicité de surface selon la méthode de Kos *et al.* (2003) avec une légère modification de Chew *et al.* (2015).

Une suspension de 10 mL des isolats est centrifugée à 8400g pendant 15 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans du tampon phosphate de potassium (0.01M, pH=7). Le culot est ainsi lavé deux fois à 8400g pendant 15 minutes et à nouveau resuspendu dans du tampon phosphate. La densité optique de la suspension obtenue est mesurée pour une longueur d'onde de 400nm. Un mL du solvant (polaire ou apolaire) est alors ajouté à 6 mL de la suspension bactérienne et le mélange obtenu est vortexé pendant 90 s. La complète séparation des 2 phases est attendue (environ 15 min). Un échantillon de 5mL de la phase aqueuse est prélevé et sa densité optique mesurée  $DO_{400nm}$  (A1).

L'hydrophobicité est mesurée selon la formule :

$$(1 - A1/A0) * 100$$

### **I.6. Test d'auto et co-agrégation**

#### **I.6.1. Test d'auto- agrégation**

L'étude de l'auto-agrégation des bactéries commensales bénéfiques est déterminée par un dosage spectrophotométrique de l'auto-agrégation selon la méthode de Kos *et al.* (2003).

Brièvement, une culture bactérienne de 18 h est récoltée, lavée et diluée ( $DO_{600\text{ nm}} = 0.5$ ) dans le PBS (tampon phosphate, pH 7.4). Par la suite, un aliquote de 4 ml de la suspension cellulaire des bactéries commensales sont mélangés pendant 10 sec par un vortex et incubé pendant 4 h et 24 h à 37 °C. De plus, l'auto-agrégation entre les bactéries commensales est

aussi déterminée. La densité optique est mesurée par un spectrophotomètre UV-Vis, et le pourcentage de l'auto-agrégation (%) est exprimé par :

$$100* [ DO_A / DO_B ]$$

Où :

DO<sub>A</sub> : est l'absorbance après 4h ou 24 h d'incubation.

DO<sub>B</sub> : est l'absorbance avant l'incubation.

### I.6.2. Test de co-agrégation

Le pourcentage de co-agrégation entre la flore commensales et la flore pathogène représenté par *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*, est déterminé par un dosage spectrophotométrique (Kos *et al.*, 2003).

La préparation de la flore commensale bénéfique a été faite par la même méthode de l'auto-agrégation. Pour *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*, une culture de 18 h est diluée a une solution de PBS (DO<sub>600nm</sub>= 1.0).

Un volume de 2 ml de la suspension (bactérienne bénéfique) et mélangé avec 2 ml de chaque suspension de *Staphylococcus aureus* et *Candida albican*. Ce mélange a été mixé pendant 10 s et incubé à 37°C pendant 4 h et 24 h. La densité optique est mesurée par un spectrophotomètre UV-Vis, et le pourcentage de co-agrégation (%) est exprimé par :

$$\text{Pourcentage de co-agrégation (\%)} = \frac{[(DO_x + DO_y) - 2 (DO_m)]}{(DO_x + DO_y)}$$

DO<sub>x</sub> : l'absorbance de la flore commensale bénéfique

DO<sub>y</sub> : l'absorbance de la flore pathogène

DO<sub>m</sub> : l'absorbance après 4h et 24h d'incubation.

**I.7. Estimation du rendement des EPS****I.7.1. Extraction des EPS**

Pour l'extraction des EPS, nous avons utilisé le protocole d'Ismail et Nampootheri (2010) :

- Récupération par centrifugation (5000/10 min) des cellules bactériennes après ébullition à 80°C pendant 15 mn ;
- Précipitation des EPS :
  1. Ultrafiltration du surnageant (trois fois à 4°C) ;
  2. Addition de 3 volume d'éthanol à -20°C ;
  3. Centrifugation à 10 000 g/20 mn à 4 °C ;
  4. Dissolution du culot dans trois volumes d'éthanol et centrifugation aux mêmes conditions ;
  5. Dissolution du culot obtenu dans l'eau physiologique ;
  6. Lyophilisation.

**I.7.2. Dosage et quantification des EPS**

Nous avons appliqué la méthode de Dubois *et al.* (1956). En présence de l'acide sulfurique et à chaud, les glucides sont déshydratés en dérivés du furfural qui se combinent facilement avec le phénol et donnent une coloration rose-saumon (le glucose fournit de l'hydroxyfurfural). L'absorbance est lue à la longueur d'onde de 490 nm. La coloration est permanente. Cette méthode permet de détecter des quantités de glucides pouvant atteindre 1 µg. Pour chaque échantillon de bactérie, nous avons procédé de la manière suivante : à 1ml de phénol à 5% w/v (5 g de phénol dans 100 ml d'eau distillée glacée), 1 ml d'échantillon est ajouté. Le tout est homogénéisé par un vortex. Ensuite, on ajoute 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré.

L'ensemble est incubé dans un bain marie à 100°C pendant 5 mn. A la sortie du bain marie, l'échantillon est stocké pendant 30 mn à l'obscurité. Ensuite, la lecture de l'absorbance de l'échantillon, à la longueur d'onde 490 nm, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre.

Pour déterminer la courbe d'étalonnage, dix solutions étalons de concentration allant de 0 à 70 mg/ml ont été préparées à partir d'une solution étalon de glucose (v/v), (1 ml pour chaque

solution) ; l'eau physiologique est utilisée comme diluant. L'absorbance de chaque concentration étant déterminée, la courbe d'étalonnage est ensuite établie.

La quantité de sucres Q (mg) est déterminée selon l'équation suivante :

$$Q = 1 \cdot 20 \cdot C.$$

C : étant la concentration de sucres de l'échantillon, dégagée à partir de la courbe d'étalonnage.

### **I.8. Les analyses statistiques**

Tous les résultats ont été exprimés en moyennes  $\pm$  écart-types, les analyses statistiques sont effectuées par EXCEL Microsoft (2010). Les résultats de l'auto-agrégation et co-agrégation ont été soumis à deux tests d'analyses de variances (ANOVA), suivie par le test de comparaison multiple avec un  $p < 0.05$  est considéré comme significatif.

# **Chapitre 2 :**

# **Résultats**

**et**

# **Discussion**

## II. Résultats et discussion

Les résultats d'identification des bactéries étudiées sont récapitulés dans les tableaux suivants.

## II.1. La flore commensale bénéfique

Après isolement sur milieux sélectifs et identification des souches bénéfiques de la flore commensales, les résultats sont représentés dans les tableaux n° : 03, 04, 05 et 06.

**Tableau n° 03 :** Résultats d'identification de *Lactobacillus reuteri* isolée des selles d'un nourrisson.

Test réalisé	Résultat de <i>Lactobacillus reuteri</i>	Références (Figarella et Leyral, 1998 ; De Man <i>et al.</i> , 1960)
Culture sur MRS	Colonies de très petite taille d'un diamètre de 1 mm, de couleur crème luisante	Colonies de très petite taille d'un diamètre de 1 mm, de couleur crème luisante
Coloration de Gram	Bacilles colorés en violet : <b>Gram positif</b>	Bacilles à <b>Gram positif</b>
Catalase /oxydase	Négatif/Négatif	Négatif/Négatif
Test de mannitol mobilité	Immobile	Immobile
Test d'ADH	ADH positifs	ADH positifs
Test d'indole	Indole négatif	Indole négatif
Fermentation des sucres	Fermentation de glucose, saccharose, lactose, gluconate, arabinose, fructose, galactose, et de maltose.  Ne fermente pas le manitol, manose, rhamnose, sorbitol et la xylose.	Fermentation de glucose, saccharose, lactose, gluconate, arabinose, fructose, galactose, et de maltose.  Ne fermente pas le manitol, manose, rhamnose, sorbitol et la xylose.
Caractère homo-hétéro fermentaire	Il y a eu production de gaz (CO <sub>2</sub> ) dans la cloche de Durham : la souche testée est donc hétérofermentaire obligatoirement.	Production de gaz (CO <sub>2</sub> ) dans la cloche de Durham : la souche testée est hétérofermentaire obligatoirement.

Aptitude texturée	Croissance avec l'apparition d'opalescence laiteuse avec modification de la texture du milieu : hétéropolysaccharides.	Croissance avec l'apparition d'opalescence laiteuse avec modification de la texture du milieu : hétéropolysaccharides.
-------------------	--	--

**Tableau n° 04 :** Résultats d'identification de *Escherichia coli* isolée des selles d'un nourrisson

Test réalisé	Souche étudiée : <i>E. coli</i>	Référence (Figarella et Leyral, 1998)
Culture sur EMB	Colonies violettes noirâtres à reflets métallique.	Colonies violettes à reflet métalliques.
Culture sur Hektoen	Colonies de couleur saumon, de diamètre de 3 mm	Colonies saumonées
Culture sur Mac Conkey	Colonies rose à rouge brique	Colonies rouge foncé
Coloration de Gram	Coccobacille colorés en rose : Gram négatif	Coccobacille à Gram négatif
Mobilité	Mobile	Mobile
Galerie classique	Fermente le mannitol ; Incapable d'assimiler le citrate ; Fermente le glucose ; Rouge de méthyle <sup>+</sup> , VP <sup>-</sup> , Urée <sup>-</sup> , indole <sup>-</sup> , ONPG <sup>+</sup> , H <sub>2</sub> S <sup>-</sup> .	Fermente le mannitol ; Incapable d'assimiler le citrate ; Fermente le glucose ; Rouge de méthyle <sup>+</sup> , VP <sup>-</sup> , Urée <sup>-</sup> , indole <sup>-</sup> , ONPG <sup>+</sup> , H <sub>2</sub> S <sup>-</sup> .

Ces tests ont été confirmés par galerie API 20E qui permet l'affirmation que la souche est une *E.coli*.

**Tableau n°05 :** Résultats d'identification d' *Staphylococcus epidermidis* isolée de la peau

Test réalisé	Notre souche : <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Référence (Figarella et Leyral, 1998)
Culture sur Chapman	Colonies d'un aspect crémeux, d'une couleur blanchâtre et d'un diamètre d'environ 2 mm.	Colonie blanche, aspect crimeux

Coloration de Gram	Cocci regroupées en amas de couleur violette : Gram positif	Des coques à Gram positif
Test de catalase	Catalase positive	Catalase positive
Test de coagulase	Coagulase négative	Coagulase négative
Culture sur gélose DN <sub>ase</sub>	ADN <sub>ase</sub> négatif	AD <sub>ase</sub> négatif
Fermentation de Mannitol	Négative	Négative

**Tableau n°06 :** Résultats d'identification d'*Enterococcus faecalis* isolée des selles d'un nourrisson.

Test réalisé	Notre souche : <i>Enterococcus faecalis</i>	Référence (Figarella et Leyral, 1998)
Culture sur BEA	Les colonies sont petites et translucides avec un halo noir très net.	Les colonies sont petites et translucides avec un halo noir très net.
Coloration de Gram	Des diplocoques sous forme ovale et des chaînes courtes de couleur violette : Gram positif.	Des coques à Gram positif
Test de catalase	Catalase négative	Catalase négative
Test d'ADH	ADH positive	ADH positive
Culture à 45°C	Il y a une croissance à 45°C.	Pousse à 45°C.
Culture en bouillon bilié	Il y a une croissance en présence de la bile	Pousse en présence de la bile.
Culture en milieu hypersalé (NaCl 65 g/L).	Il y a une croissance en présence de NaCl (65g/L)	Pousse en présence de NaCl (65g/L).
Fermentation des sucres	Arabinose -, Raffinose-, saccharose+, lactose <sup>+</sup> .	Arabinose-, Raffinose-, saccharose+, lactose <sup>+</sup> .
Galerie classique	Fermente le mannitol ; Esculine <sup>+</sup> , VP <sup>+</sup> , Urée <sup>-</sup> , indole <sup>-</sup> , ONPG <sup>+</sup> , H <sub>2</sub> S <sup>-</sup> .	Fermente le mannitol ; Esculine <sup>+</sup> , VP <sup>+</sup> , Urée <sup>-</sup> , indole <sup>-</sup> , ONPG <sup>+</sup> , H <sub>2</sub> S <sup>-</sup> .

## II.2. Les souches pathogènes

Les tableaux n°07 et 08 résumant les résultats de l'isolement et l'identification des souches pathogènes.

**Tableau n°07 :** Résultats d'identification de *Staphylococcus aureus* isolée d'un frottis vaginal

Test réalisé	Notre souche	Référence (Figarella et Leyral, 1998)
Culture sur Chapman	Colonies d'un aspect crémeux, d'une couleur blanchâtre et d'un diamètre d'environ 1 mm.	Colonie blanche, aspect crémeux.
Coloration de Gram	Cocci regroupées en amas de couleur violette : Gram positif.	Des coques à Gram positif
Test de catalase	Catalase positive	Catalase positive
Test de coagulase	Coagulase positive	Coagulase positive
Culture sur gélose ADN <sub>ase</sub>	ADN <sub>ase</sub> positive	ADN <sub>ase</sub> positif

**Tableau n° 08:** Résultats d'identification de *Candida albicans* isolée d'un frottis vaginal

Test réalisé	Notre souche : <i>Candida albicans</i>	Références
Examen direct	Après coloration au bleu de méthylène, on observe des blastospores, filaments, pseudofilaments.	Après coloration au bleu de méthylène, on observe des blastospores, filaments, pseudofilaments (Ripert, 2013).
Culture sur milieu Sabouraud +chloramphénicol	Colonies blanches, légèrement élevées, crémeuses, rondes et lisses.	Selon Cardinale (2001) :
Examen au microscope optique après la culture sur milieu Sabouraud	Présence des levures ovoïdes à bourgeonnement multilatéral.  Après 5 jours, nous avons	-La culture de <i>C. albicans</i> sur milieu sabouraud donne des colonies blanches, légèrement élevées, crémeuses, rondes et lisses.  - <i>C. albicans</i> est une levure

	observé de pseudofilamentation.	bourgeonnante, ovalaires (3 x 6 µm), non capsulées, à bourgeonnement multipolaire. -Présente des filaments : pseudomycélium, eumycélium avec blastospores.
Test de Blastèse/ <b>test de filamentation en sérum</b>	Observation de tubes germinatifs au bout de 3 h.	<i>Candida albicans</i> produit des tubes germinatifs en 3 heures à 37°C, dans un milieu pour blastèse ou dans du sérum (humain/animal).

## II.2. Résultats d'évaluation des propriétés d'adhérence des bactéries

Les propriétés d'adhérence des souches commensales ont été évaluées in vitro selon deux méthodes : la méthode d'adhérence sur tube de verre et la méthode MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbons).

### II.2.1. Adhérence sur tube de verre

Les résultats de l'adhérence sur tube de verre recueillis à 48 h sont résumés dans le tableau suivant.

**Tableau n°09** : résultats d'adhérence des bactéries sur tube de verre

Souches	échelle de Murchison (0 à 4)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	04
<i>Entérocoque faecalis</i>	03
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	04
<i>Escherichia coli</i>	03

D'après ce tableau, nous avons remarqué que les souches présentent un score d'adhésion sur tube de verre supérieur ou égal à trois (3) selon l'échelle visuelle de Murchison et nous avons constaté que l'adhérence des *Lactobacillus reuteri* et *Staphylococcus epidermidis* est plus importante que celle des *Entérocoque faecalis* et *Escherichia coli*. L'adhésion sur un support solide a une relation directe avec la production des exopolysaccharides de surface.

### II.2.2. Résultats d'évaluation d'adhérence par la Méthode MATH

Les souches sont ensuite été testées pour leur hydrophobicité de surface selon la méthode MATH.

D'après les résultats représentés dans le tableau n°10, nous avons remarqué que les souches présentent un caractère hydrophobe mais avec des pourcentages différents. Il est remarquable que *Lactobacillus reuteri* a été la plus hydrophobe ( $92.23 \pm 1.54$ ), suivi *Staphylococcus epidermidis* ( $91.99 \pm 2.6$ ), *Entérocoque faecalis* et *Escherichia coli*, respectivement.

**Tableau n° 10 :** Résultats d'évaluation de l'hydrophobicité des souches par la méthode de MATH.

souches	Hydrophobicité de surface	
	Xylène	Toluène
<i>Lactobacillus reuteri</i>	$92.23 \pm 1.54$	$93.23 \pm 2.14$
<i>Enterococcus faecalis</i>	$75.56 \pm 3.21$	$74.25 \pm 1.23$
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	$91.99 \pm 2.6$	$90.65 \pm 3.42$
<i>Escherichia coli</i>	$60.82 \pm 5.62$	$60.54 \pm 2.35$

\*Les résultats sont exprimés la moyenne de trois essais  $\pm$  écart moyen

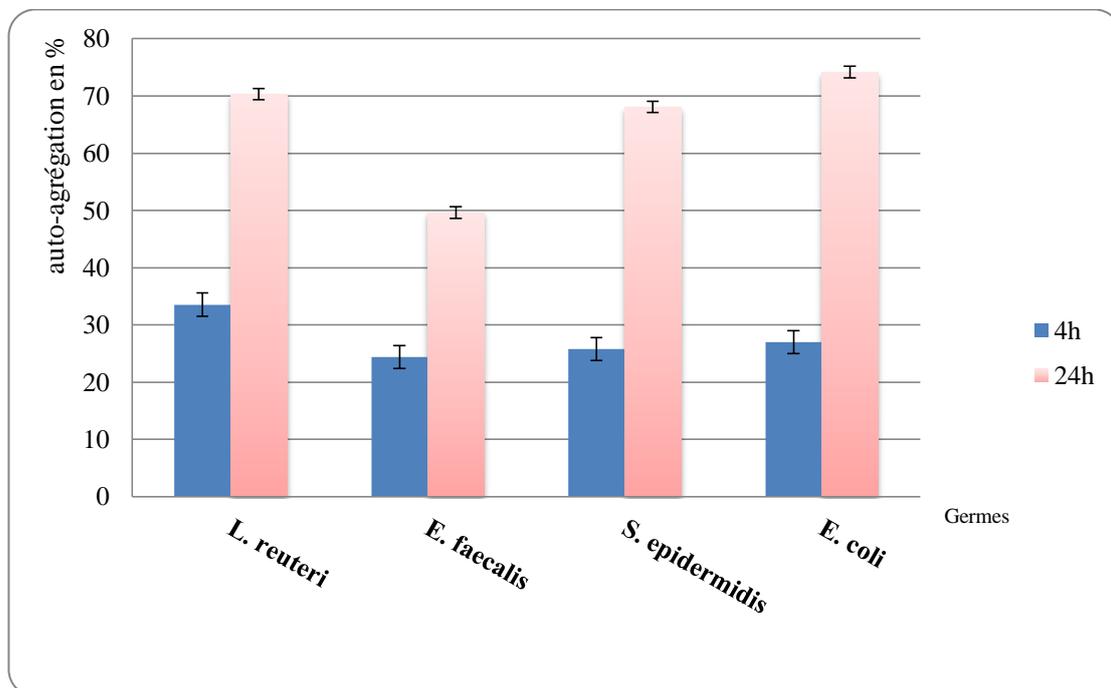
### II.3. Résultats de test d'auto et co-agrégation

#### 1. Test d'auto agrégation

L'auto-agrégation s'effectue entre les cellules de la même espèce ou de même genre.

Le pourcentage de l'auto-agrégation a été mesuré et calculé après l'incubation des souches pendant 4 h et 24 h.

D'après les résultats (figure n°08), nous avons constaté que toutes les souches présentent une capacité d'auto-agrégation très importante après 24h d'incubation (*E. coli* :  $74,20 \pm 2,54\%$  ; *L. reuteri* :  $70,32 \pm 2,56\%$  ; *S. epidermidis* :  $68,09 \pm 2,03\%$  ; *E. faecalis* :  $49,62 \pm 2,04\%$ ).



**Figure n°08.** Pourcentage de l'auto-agrégation des bactéries commensales

- Le temps d'incubation est significativement influencé le taux d'auto-agrégation (*S. epidermidis* :  $25,83 \pm 1,02\%$  après 4h et  $68,09 \pm 2,03\%$  après 24h).

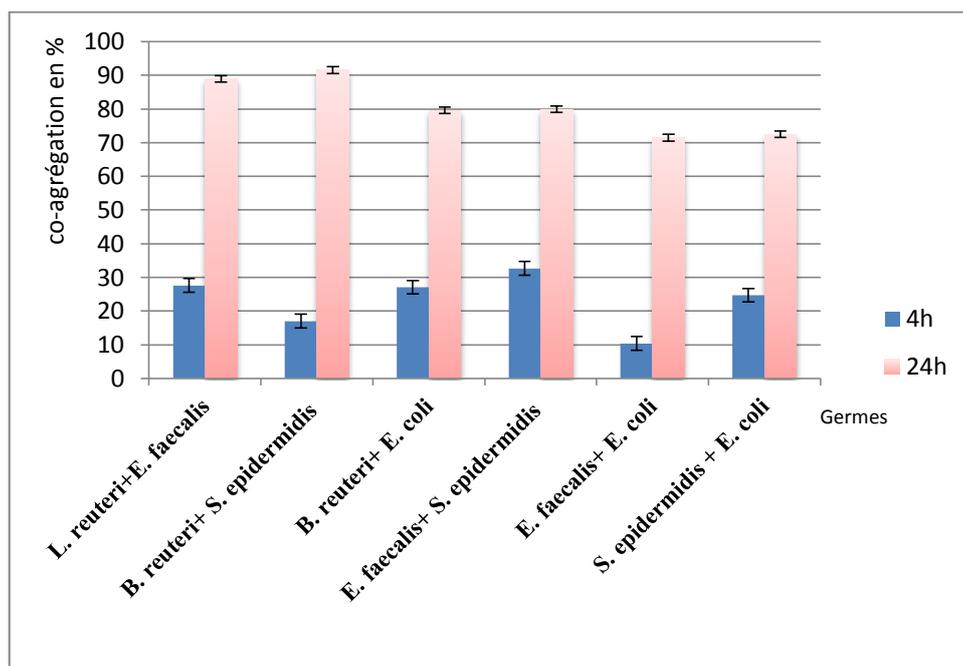
L'auto-agrégation est un processus qui permet aux bactéries de former un biofilm sur les cellules de l'hôte et de former une barrière afin d'empêcher la fixation et l'installation des bactéries pathogènes.

## 2. Test de co-agrégation

La co-agrégation s'effectue entre deux bactéries d'espèces différentes qui leur permet de s'accumuler, de former des colonies.

### a- Les bactéries commensales

La co-agrégation entre les bactéries commensales peut contribuer à la formation d'une flore diversifiée et plus stable. Le pourcentage de la co-agrégation a été mesuré et calculé après l'incubation des souches pendant 4 h et 24 h.



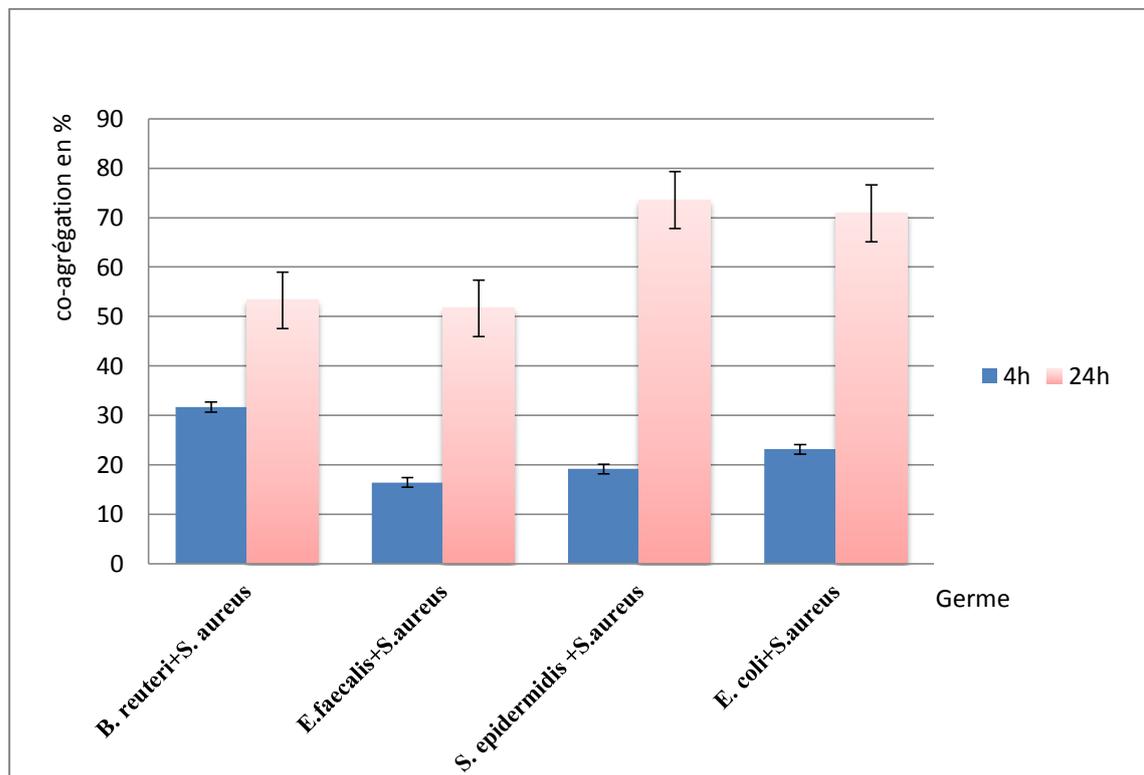
**Figure n°09. Taux de co-agrégation de la flore commensale entre elle.**

D'après les résultats, nous remarquons que les souches ont présenté un taux de co-agrégation très important (> 70 %) au bout de 24 h d'incubation.

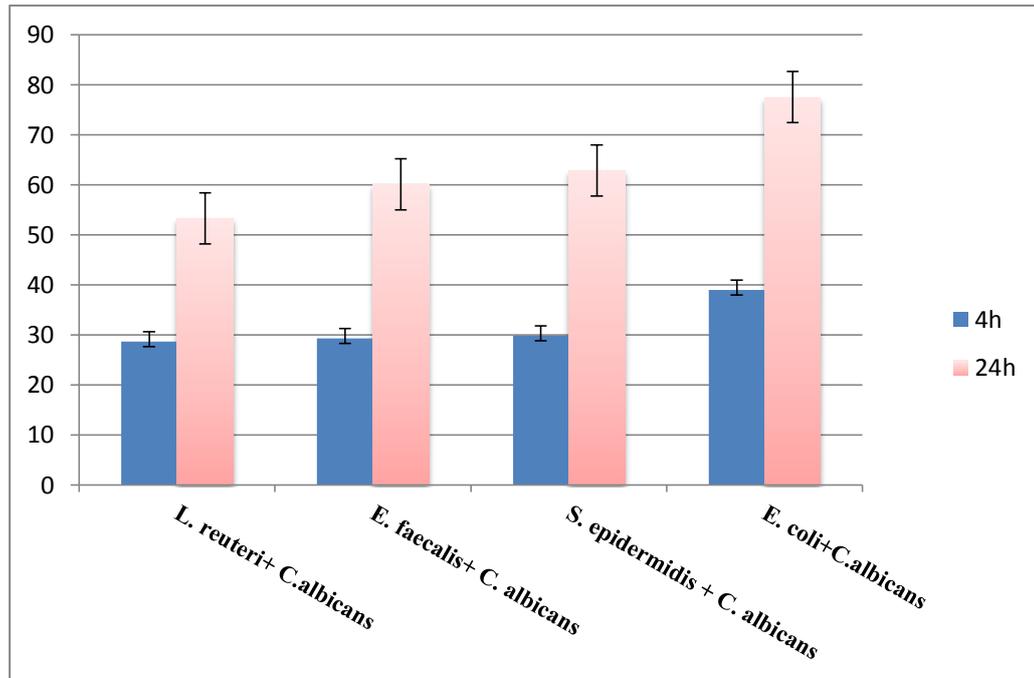
Nous constatons toute fois que le taux de co-agrégation le plus important est de  $91,51 \pm 2,05\%$  pour (*L. reuteri* + *S. epidermidis*).

### b- Les souches pathogènes (*S.aureus*, *C. albicans*)

La co-agrégation détermine aussi le pouvoir des cellules de la bactérie commensale de se lier aux cellules de la bactérie pathogène et de les piéger afin que ces dernières ne peuvent pas adhérer et se fixer sur leurs cibles au niveau des cellules épithéliales.



**Figure n° 10:** pourcentage de co-agrégation (bactéries commensales – *S. aureus*)



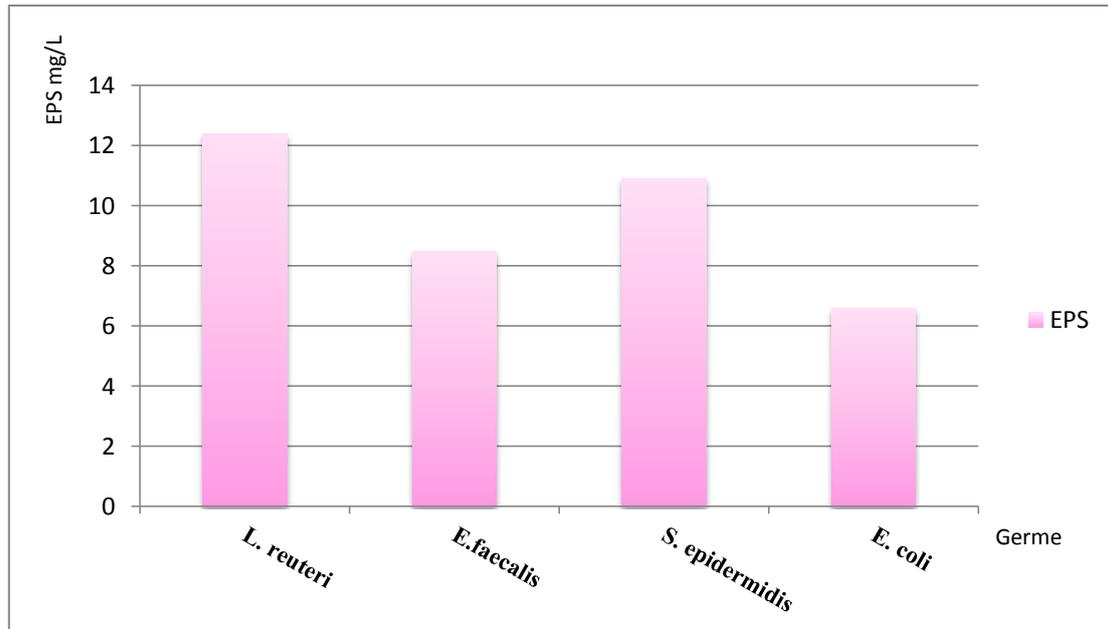
**Figure n°11.** Pourcentage de co-agrégation (bactéries commensales – *C. albicans*).

Concernant nos résultats, nous remarquons que les bactéries de la flore commensale possèdent une capacité très importante de co-agrégation (> 50%) vis-à-vis les souches pathogènes choisies (*S. aureus*, *C. albicans*), cette capacité est en concordance avec le pourcentage d'adhésion de ces bactéries et leur caractère hydrophobe.

D'après nos résultats, nous avons constaté que *E. coli* présente un taux de co-agrégation élevés vis-à-vis *C. albicans* ( $77.5 \pm 3.04\%$ ), alors que *S. epidermidis* présentent un taux de co-agrégation élevé avec *S. aureus* ( $73.6 \pm 3.5\%$ ).

#### II.4. Estimation de rendement des EPS

Etant donné qu'il n'existe pas des méthodes quantitatives directes pour analyser les EPS dans un échantillon donné, donc nous avons procédé à des méthodes d'extraction (physiques : ultrafiltration et centrifugation ; chimiques : précipitation par éthanol).



**Figure n°12.** Rendement des EPS produit par les bactéries commensales.

Les résultats montrent que toutes nos souches (*L. reuteri*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *E. coli*) capables de produire les EPS mais avec des proportions différentes (12.4 mg/L, 8.5 mg/L, 10.6 mg/L et 6.6 mg/L, respectivement).

Ces résultats sont positivement corrélés avec ceux d'adhésion sur tube de verre, d'auto-agrégation et de co-agrégation. Donc nous pouvons dire que les EPS jouent un rôle d'adhésine spécifique qui assure l'adhésion des bactéries sur les surfaces et peut être impliqué dans les phénomènes de reconnaissance entre les bactéries (auto et/ou co-agrégation).

**Discussion générale**

Notre travail avait pour objectif de comprendre les rôles des EPS dans la colonisation et l'installation de la flore commensale.

L'adhérence bactérienne est la propriété que possède certaines bactéries pour se fixer à la surface des cellules de la peau ou des muqueuses (couche de cellules tapissant l'intérieur des organes creux en contact avec l'air) chez l'homme et chez l'animal.

Elle permet à certaines bactéries commensales qui vivent aux dépens d'un individu (l'hôte) sans le nuire, de se reproduire, se multiplier et de constituer de cette manière des colonies.

Dans le cadre de notre travail, nous avons sélectionné quatre souches qui représentent la flore commensale : *L. reuteri*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* et *E. coli*. Alors que, *S. aureus* et *C. albicans* font présenter la flore pathogène.

La première méthode pour évaluer l'adhérence, c'est la méthode d'adhérence sur tube de verre décrite par Mukasa et Slade (1973), modifiée par Hamada et Torii (1978), celle permettrait d'évaluer la production d'exopolysaccharides par les bactéries.

Nos résultats suggèrent que les souches utilisées (*L. reuteri*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* et *E. coli*) sont en mesure de produire des EPS puisque ces souches ont été capables d'adhérer à une surface de verre. Cependant, les études faisant état de production d'EPS par des souches identiques sont peu nombreuses en particulier pour *E. coli*.

Bien que l'adhérence permise par les EPS soit une adhérence de type irréversible, il nous a semblé intéressant d'évaluer dans un système complexe comme l'intestin, les mécanismes d'adhésion primaire (adhésion réversible) chez les souches ayant montrées des capacités à persister sur des tissus durs. En effet, ces mécanismes d'adhésion primaire sont les premiers à intervenir dans l'initiation de l'adhérence bactérienne à une surface.

Parmi ceux-ci, l'hydrophobicité de la surface bactérienne est un mécanisme d'adhérence majeur car elle joue un rôle clé dans le premier contact entre une cellule bactérienne et le mucus ou les cellules épithéliales (Schillinger et al., 2005 ; Wadstrom et al., 1987 ; Rosenberg et al., 1983).

Pour mesurer l'hydrophobicité de surface, de nombreuses méthodes sont disponibles mais l'une des plus citées dans la littérature et caractérisées par sa facilité de mise en œuvre, reste la méthode de MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbons).

L'hydrophobicité de la surface cellulaire des souches peut être regroupée en faible hydrophobicité ou hydrophile (0-35%), hydrophobie modérée (36-70%) et hydrophobie élevée (71-100%) (Colloca *et al.*, 2000 ; Ahumada *et al.*, 1999).

Dans cette étude, *L. reuteri* et *S. epidermidis* ont été caractérisées par une hydrophobicité élevée (>90%), même *Enterococcus faecalis* a présenté une hydrophobicité élevée (>70%) alors que *E. coli* a été considérée comme hydrophobe modérée (>60%).

Étant donné la fiabilité de ces techniques validées par d'autres études pour leur efficacité à prédire les capacités d'adhésion. Les résultats pourraient indiquer que les souches montrant une hydrophobicité forte ont une bonne capacité de colonisation des tissus (Schillinger *et al.*, 2005 ; Wadstrom *et al.*, 1987 ; Rosenberger *et al.*, 1983).

Les résultats d'hydrophobicité obtenus dans ce travail sont comparables aux valeurs obtenues pour les souches les plus adhérentes (Chew *et al.*, 2015 ; Mobili *et al.*, 2010).

Cette adhérence est probablement due à la présence des groupes carboxyliques sur la surface microbienne (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996).

Toutefois, il faut noter que l'hydrophobicité de surface est un paramètre fragile, elle peut être altérée par l'exposition aux antibiotiques, de surfactants et de lectines.

Bien que l'hydrophobicité soit habituellement considérée comme stable chez les bactéries à Gram positif, ceci est de plus en plus remis en question.

A côté de cela, il est important de prendre en compte que le contact initial lors de l'adhésion se passe entre la bactérie et un support conditionné (l'intestin), et que le conditionnement de la surface peut modifier de façon importante son hydrophobicité.

La formation d'agrégats bactériens multicellulaires est considérée comme paramètre cruciale pour la colonisation des muqueuses telles que celles de l'intestin, la cavité buccale ...etc (Chew *et al.*, 2015 ; Reid *et al.*, 1990). Elle est manifestée soit par une adhérence entre les bactéries de même espèce « auto-agrégation », soit par une adhérence entre deux espèces

différentes « co-agrégation » (Ekmekci *et al.*, 2009). La capacité d'adhésion sur les cellules épithéliales est un critère de choix pour la sélection des probiotiques (Kos *et al.*, 2003). En outre, la capacité d'auto-agrégation semble être nécessaire pour l'adhésion des cellules épithéliales (Chew *et al.*, 2015 ; Del Ras *et al.*, 2000). Donc, la capacité d'agrégation est une propriété souche dépendante qui permet de prolonger le séjour dans le tractus digestif, l'exclusion des germes pathogènes et renforcer le système immunitaire (Lebeer *et al.*, 2008).

Dans cette étude, la capacité d'auto-agrégation des souches a été évaluée par spectrophotométrie, les résultats ont montré que *L. reuteri*, *E. coli* et *S. epidermidis* présentent un pourcentage d'auto-agrégation élevé par rapport à celui de *E. faecalis* et que cette capacité est dépendante au temps.

La capacité de co-agrégation avec un autre microorganisme pathogène est l'un des mécanismes de la flore commensale pour empêcher la colonisation de la flore pathogène, elle constitue un mécanisme de défense contre les infections (Moreau *et al.*, 2004). La flore commensale capable de créer une niche hostile pour les germes pathogènes par la formation des co-agrégats.

A travers les tests de corrélation, le taux d'hydrophobicité est corrélé avec le pourcentage d'auto-agrégation et co-agrégation.

Concernant la production des EPS, *L. reuteri* prend l'ampleur suivi par *S. epidermidis*, *E. faecalis* et *E. coli*. En outre le taux de production des EPS par les bactéries est corrélé avec ses capacités d'adhésion, d'auto-agrégation et co-agrégation. La formation d'agrégats a été significativement améliorée dans les souches de haute productivité des EPS (*L. reuteri* et *S. epidermidis*). Alors que, les souches à faible production des EPS ont présenté une capacité d'agrégation relativement réduite (*E. faecalis* et *E. coli*).

Selon O'Toole *et al.* (2000) et Cerning (1990), c'est les EPS qui rendent la bactérie capable de s'attacher aux surfaces et assurer une meilleure adhésion.

D'autre étude suggère qu'il y a des protéines glycosylés multifonctionnelles qui promouvaient l'adhésion et l'invasion de cellules épithéliales, l'auto-agrégation de bactéries et la formation de biofilm (Coté, 2013).

Ces molécules ne sont pas seulement des facteurs d'adhérence mais également des déterminants sociaux permettant d'organiser les communautés bactériennes.

Les glycoprotéines sont également impliquées dans les reconnaissances entre cellules et, dans de nombreux cas, elles constituent des récepteurs qui permettent l'adhérence des bactéries, par l'intermédiaire des adhésines (Voet et Voet, 2005).

**Conclusion**

Les EPS sont secrétées par de nombreuses espèces de bactéries provenant de diverses niches écologiques. Les propriétés de cette couche hydrophile secrétée autour des bactéries semblent importantes pour leur survie en milieu naturel. Les EPS influencent la manière dont les bactéries interagissent avec le milieu extérieur, qu'il soit liquide ou solide. En milieu naturel, la majeure partie des bactéries s'adsorbent, sélectivement ou non, à des surfaces inertes ou des organismes vivants. Donc, Les EPS constituent une zone d'adhésion et d'échange, ils ont un rôle de tampon et de protection.

Cette recherche s'est intéressée principalement à l'implantation de la flore commensale (via l'évaluation des propriétés d'adhérence) et leur expression (évaluation de l'auto-agrégation et co-agrégation) au niveau des cavités de l'organisme.

A la lumière des résultats recueillis, il nous est possible de conclure que les quatre souches isolées (*L. reuteri*, *E.coli*, *S. epidermidis* et *E.feacalis*) possédants une capacité d'adhérence importante sur un support solide (varies de 3-4 selon l'échelle de Murchison), cette capacité a une relation directe avec le taux de production des EPS de surface.

L'hydrophobicité est facteur non négligeable dans l'adhérence des bactéries, elle est évaluée par la méthode de MATH, a révélé que les souches sont hydrophobes mais avec des pourcentages différents (*L. reuteri* plus hydrophobe que les autres).

La capacité d'auto-agrégation ou de co-agrégation à d'autres bactéries est une propriété souche dépendante qui intervient dans la lutte contre les bactéries indésirables :

Le test d'auto-agrégation nous a permet de déduire que *L. reuteri* et *E. coli* présentent une forte capacité d'auto-agrégation.

Le test de co-agrégation a permet conclure que les quatre souches peuvent se lier aux germes pathogènes (*S. aureus* et *C. albicans*) et d'occuper les sites de fixation sur les cellules épithéliales, mais avec des proportions différentes et que la capacité d'adhésion est liée à plusieurs facteurs parmi eux les EPS.

## Conclusion

Concernant l'estimation de rendement de production, les quatre souches ont montré que *L. reuteri* présentent une capacité de sécrétion des EPS très importante, suivit par *S. epidermidis*, *E. faecalis* et *E. coli*, respectivement.

En perspective, il serait intéressant de caractériser et de comprendre, au niveau cellulaire et moléculaire, le (s) mécanisme (s) par lequel(s) la flore commensale par le biais des EPS améliore l'installation des germes bénéfiques et bloque l'invasion des cellules épithéliales par les germes pathogènes. En mettent l'accent sur la caractérisation structurale des EPS qui leur permet d'intervenir dans la formation et la stabilisation des biofilms, particulièrement du microbiote intestinal.

Aussi, des recherches devront être entreprises sur la capacité des EPS à stimuler le système immunitaire en culture cellulaire et/ou avec un modèle animal.

***References***

***bibliographiques***

### References bibliographiques

1. Adlerberth I., Carlsson B., de Man P., Jalil F., Khan S. R., Larsson P., et al. 1991. Intestinal colonization with *Enterobacteriaceae* in Pakistani and Swedish hospital-delivered infants. *Acta Paediat Scand* . 80 : 602-10.
2. AFSSA. 2003. Rapport du groupe de travail « Alimentation infantile et modification de la flore intestinale ».
3. Agosti M., Vegni C., Gangi S., Benedetti V., Marini A. 2003. Allergic manifestations in very low-birthweight infants: a 6-year follow-up. *Acta Paediatr Suppl* . 91 : 44-7.
4. Ahumada, M. C., M. E. Colloca, M. E. Lopez, H. Pese de Ruiz, and M. E. Nader-Macias. 1999. Characterization of Lactobacilli Isolated From The Tongue and Gum. *Anaerobe* 5:129-135.
5. Annock G. W., Fuller R., Smith S. L., Hall M.A., 1990. Plasmid profiling of members of the family Enterobacteriaceae, lactobacilli , and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *J Clin Microbiol*; 28:1225-8
6. Ballongue J. 1998. Bifidobacteria and probiotic action. In Salminen S. and Von Wright S. *Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects* (2<sup>nd</sup> edition) pp. 519-587.
7. Balmer SE, Hanvey LS, Wharton BA. 1994. Diet and faecal flora in the newborn : nucleotides. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*; 70 : F137-F140.
8. Bellon-Fontaine M. N., Rault J., and van Oss C. J. 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 7:47-53.
9. Beloin C, Roux A, Ghigo JM (2008) *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 322: 249- 289.
10. Bennet R, Eriksson M, Nord CE, Zetterstrom R. 1986. Fecal bacterial microflora of newborn infants during intensive care management and treatment with five antibiotic regimens. *Pediatr Infect Dis*. 5 : 533-9.
11. Bernalier-Donadille A. 2004. Principales fonctions métaboliques de la flore intestinale de l'homme. In Rambaud J.C., Buts J. P., Corthier G, Flourie B. *Flore microbienne intestinale*. Montrouge. John Libbey Eurotext :61-80.
12. Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. 2001. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol*; 108 : 516-20.

## Références bibliographiques

13. Bonnemaïson E, Lanotte P, Cantagrel S, Thionois S, Quentin R, Chamboux C, et al. 2003. Comparison of fecal flora following administration of two antibiotic protocols for suspected maternofetal infection. *Biol Neonate*; 84 : 304-10.
14. Bryers J. D. 1993. The biotechnology of interfaces. *J. Appl Bacteriol Symposium*. 74:98s-109s.
15. Burmolle M, Webb JS *et al.* 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 3916-3923
16. Bury- Moné S. 2007. Les biofilms. Polycopié. Ecole Normale Supérieure de Cachan. 17 p.
17. Butel MJ, Roland N, Hibert A, Popot F, Favre A, Tessède AC, et al. 1998. Clostridial pathogenicity in experimental necrotising enterocolitis in gnotobiotic quails and protective role of bifidobacteria. *J Med Microbiol*; 47 : 391-9.
18. Butel MJ. La flore du prématuré. In : Dupont C, Gauthier F, Goulet O, Moktari M, Vodovar, M, eds. 2001. L'intestin du prématuré. Noisiel : Guigoz Éditions, : 111-42.
19. Campeotto F, Péjoan H, Perronneau D, Bonet A, Doucet-Populaire F, Dupont C, et al. Influence of antibiotics on intestinal colonisation at birth. *J Pediat Gastroenterol Nutr* 2004 ; 39(Suppl 1) : S409.
20. Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, Russell T, Lickerman M, Amer M, et al. 1999. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology*; 117 : 577-83.
21. Cardinale V. 2001. Les candidoses vaginales récidivantes à *Candida albicans*. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Henri Poincaré - Nancy 1.
22. Carver JD. 1999. Dietary nucleotides : effects on the immune and gastrointestinal systems. *Acta Paediat Suppl*; 430 : 83-8.
23. Cerning, J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 7:113-30.
24. Chen J., S. M. Lee et Y. Mao. 2004. Protective effect of exopolysaccharide colonic acid of *Escherichia coli* O157:H7 to osmotic and oxidative stress. *Int J Food Microbiol.* 93:281-6.
25. Chew S. Y., Cheah Y. K., Seow H. F., Sandai D. et Than L.T. L. 2015. Probiotic *Lactobacillus rhamnusus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 exhibit strong

## Références bibliographiques

- antifungal effects against vulvovaginal candidiasis- causing *Candida glabrata* isolates. *J. Applied Microbiology*. 118. 1180-1190.
26. Clutterbuck AL, Woods EJ, *et al.* 2007. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol.*, Mar 31; 121 (1-2): 1-17
27. Colloca M. F., Ahmuda M. C., Lopez M. E. and Nader-Mcias M. E. 2000. Surface properties of lactobacilli isolated from healthy subjects. *Oral Dis* 6, 227-233.
28. Coppa GV, Bruni S, Morelli L, Soldi S, Gabrielli O. 2004 . The first prebiotics in humans : human milk oligosaccharides. *J Clin Gastroenterol* ; 38 : S80-S83.
29. Cosgrove M. 1998. Nucleotides. *Nutrition*; 14 : 748-51.
30. Costerton J. W. 1999. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents*. 11:217-21; discussion 237-9.
31. Costerton J. W., G. G. Geesey et K. J. Cheng. 1978. How bacteria stick. *Sci Am*. 238:86-95.
32. Costerton J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber et H. M. Lappin Scott. 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 49:711-45.
33. Costerton J.W., Stewart P.S. et Greenberg E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284(5418): 1318-22.
34. Côté Jean-Philippe. 2013. Les autotransporteurs auto-associatifs d'Escherichia coli : de facteurs de virulence à déterminants sociaux. Thèses et mémoires électroniques de l'Université de Montréal.
35. De Chalvet De Rochemonteix A. 2009. Les Biofilms Et La Peau. Thèse pour un doctorat vétérinaire, La Faculté De Médecine De Créteil. École Nationale Veterinaire d'Alfort.
36. De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol*. 23. 130-135.
37. De Philippis R. et Vincenzini M., 1998. Exocellular polysacchrides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews*. 22:151-175.
38. De Vuyst L., De Vin F., Vainielgem F., Degeest B. 2001. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 11: 687-707.
39. Del Ras F., Vuong, C., Kocianova S., Voyich J. M., Yao Y., Fischer E. R., DeLeo F. R., and Otto M. 2000. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial

## Références bibliographiques

- biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem.* 279:54881-6. E pub 2004 Oct 22.
40. Donlan R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 8:881-90.
41. Donlan R. M. et Costerton J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*; 15(2): 167-93.
42. Dubois M., K. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers et F. Smith. 1956. A colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.* 28:350-6.
43. Dubreucq Guy, Domon Bruno, Fournet Bernard.1996. Structure determination of a novel uronic acid residue isolated from the exopolysaccharide produced by a bacterium originating from deep sea hydrothermal vents. *Carbohydrate Research.* Vol.290 : 175-181.
44. Dubreucq, G., Domon, B. and Fournet B. 1996. Structure determination of a novel acid residue from the exopolysaccharide produced by a bacterium originating from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydr. Res.* 290: 185-187
45. Ducluzeau R. 1993. Installation, équilibre et rôle de la flore microbienne chez le nouveau-né. *Ann Pédiatr.* 40 : 13-22.
46. Dudman W.F., ed. 1977. *The role of surface polysaccharides in natural environments.* Academic Press, New York, USA.
47. Dunne W. M. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev.* 15:155-66.
48. Eberl L., S. Molin et M. Givskov. 1999. Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* 181:1703-12.
49. Ekmekçi, H., Aslim, B. and Darilmaz, D.O. 2009. Some factors affecting the autoaggregation ability of vaginal lactobacilli isolated from turkish women. *Archives Biological Sciences, Belgrade.* 61 (3): 407-412.
50. Favier C.F., Vaughan E.E., De Vos W.M., Akkermans A.D. 2005. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol*; 68:219-26.
51. Figarella Jean et Leyral Guy. 1998. *Microbiologie Technique.* 2 ed. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine.

## Références bibliographiques

52. Flemming H.C., Neu T.R. et Wozniak D.J. 2007. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *J Bacteriol*; 189(22): 7945-47.
53. Fooks LJ et Gibson GR. 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. *J Nutr.* Vol.88;1:S39-49.
54. Forchielli M. L et Walker W. A. 2005. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr.* ; 93 (Suppl ) : S41-S48.
55. Furness R. B., G. M. Fraser, N. A. Hay et C. Hughes. 1997. Negative feedback from a *Proteus* class II flagellum export defect to the *flhDC* master operon controlling cell division and flagellum assembly. *J Bacteriol.* 179:5585-8.
56. Gewolb IH, Schwalbe RS, Taciak VL, Harrison TS, Panigrahi P. 1999. Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*; 80 : F167-F173.
57. Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota : introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*; 125 : 1401-12.
58. Gjermansen Morten, Ragas Paula, Sternberg Claus, Molin Soren et Nielsen Tim Tolker. 2005. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental Microbiology.* 7: 894–904
59. Goldmann DA, Leclair J, Macone A. 1978 . Bacterial colonization of neonates admitted to an intensive care environment. *J Pediatr*; 93 : 288-93.
60. Goller CC, Romeo T. 2008. Environmental influences on biofilm development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322: 37- 66
61. Grönlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E.2000. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy : a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*; 83 : F186-F192.
62. Grönlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. 1999. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery : permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediat Gastroenterol Nutr.* 28 : 19-25.
63. Hall-Stoodley L. et Stoodley P. 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol.* 11(7): 1034-43.
64. Hamada S ., and Slade H. D. 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 44:331-84.

## Références bibliographiques

65. Hamada, S., and M. Torii. 1978. Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. *Infect Immun* 20:592-9.
66. Harmsen H.J., Wilderboer-Veloo A. C. , Grijpstra J, Kol J, Degener J.E. et Welling. 2000. Development of 16s rRNA-based probs for the *Coribacterium* group and the *atopobium* cluster and their application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human feces form volunteers of different age groups. *Appl Environ Microbiol*; 66:452.
67. Harshey R. M. 1994a. Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. *Mol Microbiol.* 13:389-94.
68. Harshey R. M. et T. Matsuyama. 1994b. Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:8631-5.
69. Hibbing M. E., Fuqua C., Parsek M. R., Peterson S. B. 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol*; 8(1): 15-25.
70. Holzapfel W. H., Harberer P., Snel J., Schillinger U. et Huis in't Veld J. H. J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. International. *Journal of Food Microbiology.* 41: 85-101.
71. Hooper L. V. et Gordon J. I. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science.* 292, 1115-1118.
72. Irie Y, Parsek M. R. 2008. Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 322: 67- 84.
73. Ismail B. et Nampoothiri K. M. 2010. Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lb. plantarum* MTCC 9510. *Arch Microbiol* 192:1049-1057.
74. Isolauri E., Kirjavainen P. V. et Salminen S. 2002. Probiotics: A role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut.* 50: 54-59.
75. Jaureguy F, Carton M, Panel P, Foucaud P, Butel MJ, Doucet-Populaire F. Effects of intrapartum prophylaxis on the intestinal bacterial colonization in infants. *J Clin Microbiol* 2004 ; 42 : 5184-8.
76. Kagnoff M. F. et Eckmann L. 1997. Epithelial cells as sensors of microbial infection. *Journal of Clinical investigation.* 100; 6-10.

## Références bibliographiques

77. Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. 2001. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol*; 107 : 129-34.
78. Kero J, Gissler M, Gronlund MM, Kero P, Koskinen P, Hemminki E, et al. 2002 . Mode of delivery and asthma - is there a connection ? *Pediatr Res*; 52 : 6-11.
79. Kirov S. M., B. C. Tassell, A. B. Semmler, L. A. O'Donovan, A. A. Rabaan et J. G. Shaw. 2002. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *J Bacteriol.* 184:547-55.
80. Kleessen B, Schwarz S, Boehm A, Fuhrmann H, Richter A, Henle T *et al.* 2000. Jerusalem artichoke and chicory inulin in bakery products affect faecal microbiota of healthy volunteers. *Br J Nutr* 98, 540–549.
81. Kos B., Suskoic J., Simpraga M., Frece J. et Matosic S. 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl Microbiol* 94, 981-987.
82. Kullen MJ, Bettler J. 2005. The delivery of probiotics and prebiotics to infants. *Curr Pharm Des*; 11 : 55-74.
83. Langhendries JP, Paquay T, Hannon M, Darimont J. 1998. Acquisition de la flore intestinale néonatale : rôle sur la morbidité et perspectives thérapeutiques. *Arch Pediatr*; 5 : 644-53.
84. Laubereau B, Filipiak-Pittroff B, von BA, Grubl A, Reinhardt D, Wichmann HE, et al. 2004. Caesarean section and gastrointestinal symptoms, atopic dermatitis, and sensitisation during the first year of life. *Arch Dis Child*; 89 : 993-7.
85. Lebeer S., Vanderleyden J. et de Keersmaecker S. 2008. Genes and Molecules of lactobacilli supporting Probiotic action. *Microbiol. And Mole. Biol. Rev.* 12. 728-764.
86. Leclerc H., J.L. Gaillard, and M. Simonet. 1995. Morphologie-Structure dans Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. p 58-59. Doin Editeur-Paris.

## Références bibliographiques

87. Liévin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser JR et Servin AL. 2000. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*;47(5):646-52.
88. Looijesteijn P.J., Trapet L., de Vries E., Abee T., Hugenholtz J. 2001. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int J Food Microbiol* 64: 71-80.
89. Lundequist B, Nord CE, Winberg J. 1985. The composition of the faecal microflora in breastfed and bottle fed infants from birth to eight weeks. *Acta Paediat Scand*; 74 : 45-51.
90. Macracken V.J. et Lorenz R. G. 2001. The gastrointestinal ecosystem : a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cellular Microbiology*. 3:1-11.
91. Magne F, Suau A, Pochart P, Desjeux JF. 2005. Fecal microbial community in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 41 : 386-92.
92. Mandar R. et Mikelsaar M. 1996. Transmission of mother's microflora to newborn at birth. *Boil Neonate*; 86:557-63.
93. Martinez L. R. et Casadevall A. 2007. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. *Applied and Environmental Microbiology*, 4592- 4601.
94. Martini MC. 2006. Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie. Deuxième Edition. Editions Tec et Doc Lavoisier.
95. Mccracken V. J. et Lorenz R. G. 2001. The gastrointestinal ecosystem : a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cellular Microbiology*. 3. 1-11.
96. McKeever TM, Lewis SA, Smith C, Hubbard R. 2002 . The importance of prenatal exposures on the development of allergic disease : a birth cohort study using the West Midlands General Practice Database. *Am J Respir Crit Care Med*; 166 : 827-32.
97. Mobili P., Serradell L. et Trejo S. 2010. Heterogeneity of S-layer proteins from aggregatin and non-aggregating *Lactobacillus kefir* strains. *AntonieVan Leeuwenhoek*. 95:363-372.
98. Moore W. E. C. et Holdeman L. V. 1974. Human faecal flora: The normal flora of 20 Japanese- Hawaiians. *Applied Microbiology*. 27: 961-979.
99. Moreau M.C. 2004. Influence de la microbiologie intestinale sur l'immunité de l'hôte : conditions physiologiques. In : Rambaud JC, Buts JP, Corthier G, Flourié B, eds. Flore microbienne intestinale. Montrouge : John Libbey Eurotext. 131-49.

## Références bibliographiques

100. Mukasa H., and Slade. H. D. 1973. Mechanism of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces. I. Roles of insoluble dextran-levan synthetase enzymes and cell wall polysaccharide antigen in plaque formation. *Infect Immun* 8:555-62.
101. Muller J, Miller MC, Nielsen AT *et al.* (2007) *vpsA*- and *luxO*- independent biofilms of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 275: 199- 206
102. Murchison H., Larrimore S., and Curtiss R. 1981. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* mutants defective in adherence and aggregation. *Infect Immun* 34:1044-55.
103. Nielsen AT, Dolganov NA, Otto G *et al.* (2006) *RpoS* controls the *Vibrio cholerae* mucosal escape response. *PLoS Pathog.* 2 (10): e109.
104. Nowrouzian F., Hesselmar B., Saalman R., Strannegard I.L., Aberg N., Wold A.E. *et al.* 2003. *Escherichia coli* in infant's intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatr Res*; 54:8-14.
105. Orrhage K. *et Nord C. E.* 1999. Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Paediatr Suppl.* 430 : 47-57.
106. O'Toole G. A. 2003. To build a biofilm. *J. Bacteriol.* 185:2687-9.
107. Otto M. 2008. Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 322: 207- 2
108. Ouwehand AC, Isolauri E, He F, Hashimoto H, Benno Y, Salminen S. 2001. Differences in *Bifidobacterium* flora composition in allergic and healthy infants. *J Allergy Clin Immunol*; 108 : 144-5.
109. Parolis H., Parolis L. A., Boan I.F., Rodriguez-Valera F., Widmalm G., Manca M. C., Jansson P. E. and Sutherland I. W. 1996a. The structure of the exopolysaccharide produced by the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei* strain R4 (ATCC3350). *Carbohydr. Res*; 295:147-56.
110. Parolis Haralambos, Parolis A.S. Lesley, Boán Isabel F., Rodríguez-Valera Francisco, Widmalm Göran, Manca M.Cristina, Jansson Per-Erik, Sutherland Ian W.. 1996. The structure of the exopolysaccharide produced by the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei* strain R4 (ATCC 33500). *Carbohydrate Research*. Vol. 295 :147-156.
111. Pesci E. C., Pearson J. P. *et Iglewski B. H.* 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol.* 179:5756-67.

## Références bibliographiques

112. Phillips PL, Wolcott RD, Fletcher J, Schultz GS. 2010. Biofilms made easy. *Wounds international*. 1: (3); 1-6.
113. Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F et Matuchansky C. 2005. bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther*. 15;22(6):495-512.
114. Rasmussen, T. B., M. Manefield, J. B. Andersen, L. Eberl, U. Anthony, C Christophersen, P. Steinberg, S. Kjelleberg, and M. Givskov. 2000. How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology*. 146:3237-44.
115. REID G. 1999. Potential preventive strategies and therapies in urinary tract infection. *World J. Urol*. 17(6), 359-363.
116. Rice K.C., Mann E.E., Endres J.L. *et al*. 2007. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 104(19): 8113-18.
117. Ripert C. 2013. Mycologie médicale. Tec et Toc Lavoisier edition. Paris.
118. Rosenberg, M., H. Judes, and E. Weiss. 1983. Cell surface hydrophobicity of dental plaque microorganisms in situ. *Infect Immun* 42:831-4.
119. Rougeaux H, Kervarec N, Pichon R and Guezennec J. 1999a. Structure of the exopolysaccharide of *Vibrio diabolicus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydr. Res* 322: 40-45. Sailer FC, Meberg BM, Young KD (2003) Beta-lactam induction of colanic acid gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 226: 245- 249.
120. Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee YK. 1998. Probiotics: how should we they be defined? *Trends in Food Science and Technology*; 10: 107-10.
121. Sauer K, Camper *et al*. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during developing a biofilm. *J. Bacteriol*. 184: 1140-1154
122. Schauder, S., K. Shokat, M. G. Surette et B. L. Bassler. 2001b. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol*. 41:463-76.
123. Schillinger, U., C. Guigas, and W. H. Holzapfel. 2005. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *Int Dairy J* 15:1289-1297.

## Références bibliographiques

124. Schwiertz A, Gruhl B, Lobnitz M, Michel P, Radke M, Blaut M. 2003 . Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res.* 54 : 393-9.
125. Sepp E, Naaber P, Voor T, Mikelsaar M, Björkstén B. 2000 . Development of intestinal microflora during the first month of life in Estonian and Swedish infants. *Microbiol Ecol Health Dis.* 12 : 22-6.
126. Simhon A, Douglas JR, Drasar BS, Soothill JF. 1982. Effect of feeding on infants'faecal flora. *Arch Dis Child;* 57 : 54-8.
127. Skillman LC, Sutherland IW, Jones MV. 1999. The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. *J.Appl.Microbiol. Symp. Suppl.* 85:13S-18S.
128. Spormann A. M. 2008. Physiology of microbes in biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 322: 17- 36.
129. Stickler, D. J., N. S. Morris, R. J. McLean, and C. Fuqua. 1998. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. *Appl Environ Microbiol.* 64:3486-90.
130. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, et al. 2002 . Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med;* 347 : 240-7.
131. Sutherland I. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology.* 147(Pt 1): 3-9.
132. Sutherland, I. W. 1972. Bacterial exopolysaccharides. *Adv Microb Physiol.* 8:143-213.
133. Sutherland, I. W. 1985. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol* 39:243-70.
134. Sutherland, I. W. 1994. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnol Adv.* 12:393-448.
135. Sutherland, I. W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol.* 16:41-6.
136. Tannock G. W., 1990. The normal microflora: an introduction. In *Medical importance of normal microflora.* Tannock, G. W., Ed., pp. 1-23, Kluwer Academic Publishers, London, UK.

## Références bibliographiques

137. Tomlin K.L., Malott R.J. et al. 2005. Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 5208- 5218.
138. Valyasevi R., Sandine W.E., Geller B.L. 1994. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2 bacteriophage sk1 involves rhamnose and glucose moieties in the cell wall. *J Dairy Sci* 77: 1-6.
139. Van Casteren W.H.M., Dijkema C., Schols H.A., Beldman G., Voragen A.G.J. 1998. Characterisation and modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B40. *Carbo Poly* 37: 123-130.
140. Voet Donald, Voet G. Judith. 2005. Biochimie. Ed. De Boeck Supérieur.
141. Wadstrom, T., K. Andersson, M. Sydow, L. Axelsson, S. Lindgren, and B. Gullmar. 1987. Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J Appl Bacteriol* 62:513-20.
142. Wanner O, Bauchrowitz M (2006) Les biofilms sont omniprésents. *EAWAG News* 60 f: 4-7
143. Watanabe S, Narisawa Y, Arase S, Okamatsu H, Ikenaga T, Tajiri Y, et al. 2003. Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *J Allergy Clin Immunol* . 111 : 587-91.
144. Westerbeek EA, van den BA, Lafeber HN, Knol J, Fetter WP, van Elburg RM. 2006. The intestinal bacterial colonisation in preterm infants : A review of the literature. *Clin Nutr* . 25 : 361-8.
145. Whistler R.L., BeMiller J.N., 1993, Polysaccharides, Dans *Carbohydrate chemistry for food scientists*, AACC Chemist, Eagan Press, St-Paul, Minnesota, USA, pp. 63-89.
146. White AC, Atmar RL, Wilson J, Cate TR, Stager CE, Greenberg SB. 1997. Effects of requiring prior to authorization for selected antimicrobials : expeditures, susceptibilities, and clinical outcomes. *Clin Infect Dis*. 25 : 230-9.
147. Whitfield, C., and A. Paiment. 2003. Biosynthesis and assembly of Group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli* and related extracellular polysaccharides in other bacteria. *Carbohydr Res* 338:2491-502.
148. Whitfield, C., and M. A. Valvano. 1993. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Adv Microb Physiol*. 35:135-246.
149. Xavier J. B. et Foster K. R. 2007. Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA*; 104(3): 876-81.

## Références bibliographiques

150. Yazourh A, Mullie C, Leroux B, Romond C, Romond MB. 2000. Reproduction par effet prébiotique de la flore intestinale du nourrisson. Arch Pediatr. 7(Suppl 2) : 244s-6s.
151. Zoetandal E.G., Collier C.T, Koike S., Makie R. I. et Gaskins H. R. 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota : a review. J. Nutr; 134:465-72.

**Annexe I : Composition des milieux liquides et gélés utilisés**

**Milieu MRS : pH 6.5 ± 0.2 (BD Sciences)**

Peptone.....	10g/L
Extrait de bœuf.....	10g/L
Extrait de levure.....	5g/L
Dextrose.....	20g/L
Polysorbate .....	1g/L
Citrate d'ammonium .....	2g/L
Acétate de sodium .....	5g/L
Sulfate de magnésium .....	0.1g/L
Sulfate de manganèse .....	0.05g/L
Phosphate dipotassique .....	2g/L
Agar .....	15g

Pour les lactobacilles ajuster le pH à 5.4 avec l'acide acétique. Autoclaver 20 min à 120 min.

**Milieu gélose esculine**

Peptone .....	10 g/L
Esculine .....	01g/L
Citrate de fer ammoniacal .....	01g/L
Gélose .....	20g/L
Eau distillée .....	1000ml

pH 7, Stérilisation 20 min à 120 °C.

**Milieu Clark et Lubs**

Peptone .....	7g
Phosphate dipotassique .....	5g
Glucose .....	5g
Eau distillée .....	1000ml

pH 7, autoclaver 20min à 120°C

Milieu de dilution (peptone-sel)

NaCl .....	8.5g/L
Peptone .....	1g/L
Eau distillée .....	1000 ml

Autoclavage durant 15 min à 121°C.

**Gélose nutritif (GN)**

Peptone .....	5g/L
Extrait de viande .....	1g/L
Extrait de levure .....	2g/L
NaCl .....	5g/L
Agar .....	15g/L
Eau distillée .....	1000g/L

**Tompon phosphate**

Phosphate monopotassique .....	54 g/L
Phosphate disodique .....	17.8g/L

Autoclavage 20min à 120 °C.

**ADN gélose**

Hydrolysats trypsique de caséine .....	20g/L
--	-------

**Annexes**

ADN .....	2g/L
NaCl .....	5g/L
Agar .....	12g/L
pH 7.4	

**Milieu Chapman**

NaCl .....	10g/L
Extrait de viande de bœuf .....	1g/L
Mannitol .....	10g/L
Rouge de phénol .....	0.25g/L
Agar .....	12g/L
pH 7.4	

**Citrate de Simmons (gélose)**

Citrate de sodium.....	2g/L
NaCl .....	5 g/L
Sulfate de magnésium .....	0.2g/L
Phosphate monoammonique .....	1g/L
Phosphate biphosphorique .....	1g/L
Bleu de bromothymol .....	0.08g/L
Agar .....	15g/L
pH 7.2	

**Clark et Lubs (bouillon)**

Peptone .....	5g/L
Glucose .....	5g/L
Hydrogénophosphate .....	5g/L
pH 7.5	

**TSI**

Peptone .....	15g/L
Extrait de viande .....	3g/L
Extrait de levure .....	3g/L
Peptone pepsique de viande .....	5g/L
Glucose .....	10g/L
Lactose .....	10 g/L
Saccharose .....	10g/L
Rouge de phénol .....	0.024g/L
NaCl .....	5g/L
Sulfate de fer .....	0.2g/L
Thiosulfate de Sodium .....	0.3g/L
Agar .....	11g/L
pH 7.5	

## Les tests d'identification

### ❖ Coloration de Gram

C'est une coloration différentielle basée sur la composition pariétale permettant de distinguer entre les deux groupes bactériens, les Gram positif et les Gram négatif ainsi de déterminer la forme (cocci ou bacille) et le mode de regroupement (Aminetou *et al.*, 2008).

### ❖ Coloration au bleu de méthylène

Cette coloration était réalisée pour les champignons afin de déterminer leur aspect microscopique (Aminetou *et al.*, 2008).

## I.4.3.2. Identification enzymatique

### ❖ Test de la catalase

#### Principe

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et oxygène.

#### Technique

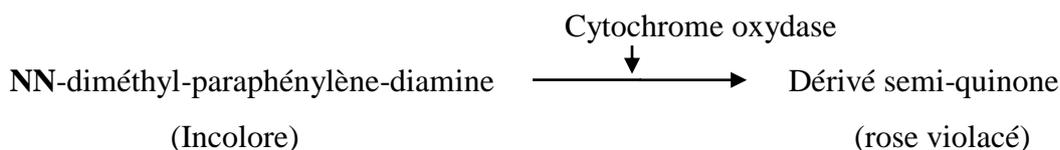
Déposer sur une lame de verre une ou deux gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes. Prélever à l'aide de l'effilure d'une pipette pasteur un fragment de colonie et dissocier la culture dans l'eau oxygénée.

#### Lecture

La présence d'une catalase se traduit, en quelques secondes, par la formation de bulles d'oxygène (Joffin, *et al.*, 2001).

### ❖ Test de l'oxydase

L'oxydase est une enzyme respiratoire catalysant une réaction d'oxydoréduction impliquant une molécule de dioxygène (O<sub>2</sub>) comme accepteur d'électron. On dit qu'une bactérie est oxydase positive (+) si un fragment de culture est capable d'oxyder le **NN-diméthyl-paraphénylène-diamine (PDA)** en semi-quinone (rose violacé).



#### Technique

Sur une lame, on a déposé avec une pipette Pasteur une colonie dans une goutte de NN-diméthyl-paraphénylène-diamine en suspension.

#### Lecture

- S'il y a apparition d'une couleur rose violette, la bactérie possède une oxydase.

- Si la suspension reste incolore, la bactérie ne possède pas l'oxydase (Joffin, *et al*, 2001).

### **I.3.3. Identification biochimique**

Pour confirmer la caractérisation morphologique et enzymatique, nous avons passé aux tests biochimiques, nous avons suivi les étapes Galerie biochimique classique décrites ci-dessous.

On prend une colonie bien isolée et on ensemence les différents milieux de la galerie classique.

#### **✓ Milieu Three Sugar Iron (TSI)**

La gélose TSI (Triple Sugar Iron) permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène.

### **Principe**

Les fermentations sucrées se traduisent par une acidification du milieu de culture indiquée par un virage de couleur au jaune.

Les germes qui fermentent le lactose ou le saccharose font le virage de couleur de la pente du tube au jaune.

Les germes qui fermentent que le glucose font le virage de couleur du culot du tube au jaune.

Les germes qui ne fermentent aucun des trois sucres ne modifient pas la couleur du milieu.

La production manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique.

La production de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone) résultant des fermentations sucrées se traduit par l'apparition de bulles ou bien par la fragmentation de la gélose (Murray, B *et al*, 1999).

### **Technique**

A partir d'une colonie prélevée d'un milieu d'isolement sélectif, ensemencer le culot par piqûre centrale et la surface inclinée par des stries serrées.

Il est nécessaire d'utiliser des cultures pures prélevées au centre de colonies bien isolées, sinon les réactions croisées rendent l'identification impossible à réaliser.

Incuber à 37°C pendant 24 heures.

### **Lecture**

La gélose TSI fournit quatre renseignements principaux :

**-Fermentation de glucose**

- Culot rouge : glucose non fermenté
- Culot jaune : glucose fermenté

**- Fermentation du lactose et/ou du saccharose**

- Pente inclinée rouge : lactose et saccharose non fermentés
- Pente inclinée jaune : lactose et/ou saccharose fermenté(s)

**- Production de gaz**

- Apparition de gaz dans le culot.

**-Formation d'H<sub>2</sub>S :**

- Formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre.

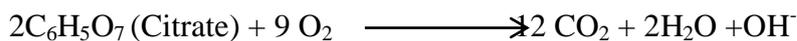
✓ **Milieu Citrate de Simmons**

Cette gélose conditionnée dans un tube, en grande pente, est destinée à l'identification des bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (*Salmonella*, *Citrobacter*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*...).

**Principe**

Le milieu ne contenant qu'une seule source de carbone (citrate), seules les bactéries possédant un citrate perméase sont capables de se développer.

L'utilisation du citrate se traduit par une alcalinisation du milieu lorsque la dégradation est complète et en aérobiose, suivant le schéma réactionnel suivant :



L'alcalinisation est observée par le virage de l'indicateur de pH, le bleu de bromothymol, du vert au bleu.

**Technique**

A partir d'une colonie prélevée d'un milieu d'isolement sélectif, ensemercer la pente de la gélose selon une strie longitudinale à l'aide d'une pipette Pasteur jusqu'à le culot.

Une incubation de 24 à 48 heures à 37°C est nécessaire pour la plupart des *Enterobacteriaceae*, mais on peut être amené à prolonger la durée d'incubation.

**Lecture**

- Les bactéries « citrate positives » présentent une culture sur la pente avec alcalinisation du milieu (gélose bleue).
- Pour les bactéries « citrate négatives », aucune culture n'est visible et le milieu garde sa couleur d'origine (verte).

✓ **Milieu mannitol mobilité**

**Principe**

❖ ***Fermentation du mannitol***

Les bactéries mannitol positive acidifient le milieu qui vire au jaune (teinte du rouge de phénol en milieu acide). Ce milieu convient beaucoup plus aux bacilles à gram négatif fermentatif.

❖ ***Réduction des nitrates et production de gaz***

Les nitrates sont réduits en nitrites puis en N<sub>2</sub> par le nitrate réductase.

La production du gaz sera révélée par l'apparition de bulles.

❖ ***Étude de la mobilité***

Les bactéries très mobiles peuvent se déplacer dans la gélose molle.

**Technique**

- À partir d'une colonie prélevée d'un milieu d'isolement sélectif, nous avons ensemencé le milieu par piqûre centrale.
- Incubation à 37°C pendant 24 heures (Joffin, *et al*, 2001).

**Lecture**

- Culture dans tout le milieu la souche mobile ;
- Culture dans le milieu la souche est immobile ;
- Le milieu devenu jaune la souche est mannitol positive-Le milieu rouge la souche est mannitol négative ;
- Apparition des bulles la souche est gaz positive ;

✓ **Milieu Urée-Indole**

C'est un milieu synthétique complexe qui fournit un ensemble de résultats utiles à l'identification de nombreux germes bactériens, notamment les *Enterobacteriaceae* (Joffin, *et al*, 2001).

**Technique**

- On a ensemencé le milieu avec une colonie bactérienne bien isolée.
- Incubation à 37°C pendant 24 heures.

**Lecture**

- L'observation d'une alcalinisation imputable à l'hydrolyse de l'urée est révélée par l'indicateur du pH, le rouge de phénol, qui vire de sa teinte de départ jaune orangée au rouge.
- La dégradation du tryptophane aboutit à la formation de l'indole après l'addition du réactif de Kowacs .

### ✓ Décarboxylases ODC, LDC, ADH

Le diagnostic différentiel des espèces appartenant aux familles des *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* et *Pseudomonadaceae*, est souvent facilité par la recherche de la lysine décarboxylase (LDC), de l'ornithose décarboxylase (ODC) et de l'arginine dihydrolase (ADH).

#### Technique

Avec une colonie bactérienne bien isolée, ensemercer le milieu Mœller témoin et des milieux LDC, ODC et ADH qui ont été recouverts par une fine couche de paraffine pour assurer l'anaérobiose.

Incubation à 37°C pendant 24 heures.

#### Lecture

Le résultat positif se traduit par une couleur violette du milieu indicateur de l'alcalinisation.

### ✓ Milieu Clark et Lubs

Les entérobactéries dégradent le glucose soit par la voie fermentaire butane-diol, soit par la voie fermentaire acides mixtes :

- La fermentation acide mixte conduit principalement à la formation d'acides.
- La fermentation butane-diol conduit à la formation d'acides organiques et d'acétyl-méthyl-carbinol ou d'acétoïne.

#### Technique

Avec une colonie bactérienne bien isolée de chaque souche, ensemercer le milieu Clark et Lubs.

Incubation à 37°C pendant 24 heures.

#### Lecture

Un résultat positif est traduit par une teinte rouge après l'addition des réactifs : 0,5 ml de solution d' $\alpha$ -naphtol et 0,5 ml de solution de soude à 16%, le rouge méthyle pour la réaction de Voges-Proskauer et la fermentation acide mixte respectivement (Joffin, *et al*, 2001).

### ✓ Test de l'ONPG

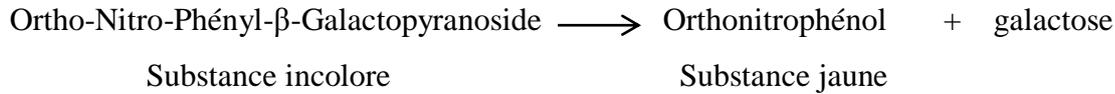
La recherche de la  $\beta$ -galactosidase est un des premiers tests enzymatiques réalisés en pratique courante. Il est particulièrement important pour les entérobactéries.

En effet, pour que le lactose soit fermenté par une bactérie, il faut :

- Qu'il pénètre dans la cellule microbienne, cette pénétration est assurée par une enzyme membranaire (la  $\beta$  galactoside-perméase)

- Qu'une autre enzyme intracellulaire, la  $\beta$  galactosidase, scinde la molécule de lactose en glucose et galactose.

On utilise l'ONPG ou Ortho-Nitro-Phényl- $\beta$  Galactopyranoside qui sera hydrolysé, comme le lactose, par la  $\beta$  galactosidase en libérant du galactose et de l'orthonitrophénol de couleur jaune (Joffin, *et al*, 2001).



### Technique

A partir : de Kligler ou milieu lactosé BCP.

- Réaliser une suspension épaisse des bactéries testées en eau physiologique ;
- Ajoutez avec une pipette Pasteur stérile un disque imprégné d'ONPG ;
- Incubation 30 min à 37°C (au bain marie) ;

### Lecture

- S'il y a apparition d'une couleur jaune, la bactérie possède une  $\beta$  galactosidase.
- Si la suspension reste incolore, la bactérie ne possède pas  $\beta$  galactosidase (Joffin, *et al*, 2001).

#### ✓ Bouillon nitraté

Ce milieu est utilisé pour mettre en évidence le nitrate réductase, enzyme présente chez les bactéries douées d'une respiration anaérobie.

### Technique

Ensemencer le bouillon avec une colonie bactérienne bien isolée.

Incubation à 37°pendant 24 heures.

### Lecture

Après l'ajout du réactif :

- S'il y'a une couleur rouge dans le tube, la bactérie possède une nitrate réductase.
- S'il n'y a pas un changement de couleur dans le tube, la bactérie ne possède pas un nitrate réductase (Joffin, *et al*, 2001).

#### ✓ La gélose à la bile, à l'esculine et à l'azide de sodium (BEA)

C'est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement et le dénombrement des entérocoques et streptocoques du groupe D.

### Principe

- L'azide de sodium provoque l'inhibition des bactéries contaminants Gram négatives.
- La bile de bœuf empêche la croissance des bactéries Gram positives ou négatives non intestinales

- Les entérocoques hydrolysent l'esculine en esculétine et en glucose. L'esculétine produite forme un complexe noir en présence des ions ferriques apportés par le citrate de fer.

### **Technique**

Ce milieu s'ensemence par piqûre centrale, à la pipette Pasteur, sur toute la hauteur du tube.

### **Incubation**

Incuber le milieu en aérobiose à 37°C pendant 24 à 48 heures.

### **Lecture**

Le résultat positif se traduit par virage de couleur du milieu à l'esculine vers noir.

### ✓ **Gélose viande-foie (VF)**

La gélose viande-foie glucosée est un milieu spécialement étudié pour la culture et l'isolement des bactéries anaérobies en profondeur. Ce milieu permet également la recherche du mode respiratoire des microorganismes.

### **Principe**

-La peptone viande-foie favorise la croissance de la plupart des microorganismes et plus spécialement celle des germes anaérobies.

- Le glucose constitue la source énergétique du développement.

### **Technique**

- Refroidir et maintenir le milieu à 47°C ;
- Chauffer le produit à analyser afin de détruire les formes végétatives et d'activer les spores ;
- Transférer le milieu dans un tube contenant 5 ml de l'inoculum ou de ses dilutions décimales, en évitant au maximum d'incorporer d'air ;
- Homogénéiser parfaitement par retournement complet ;
- Refroidir dans un bain d'eau glacée ;
- Incuber à 37°C.

### **Lecture**

Effectuer la lecture après 24 heures d'incubation, puis quotidiennement pendant 5 jours en comptant les colonies noires.

➤ **Tests pour les bactéries Gram positif**

❖ **Recherche de la coagulase**

### **Principe**

La coagulase est un test utilisé pour l'identification de *Staphylococcus aureus*. Cette enzyme se présente sous deux formes liée ou libre, lesquelles ont des propriétés différentes et nécessitent des tests différents pour les identifier.

*Coagulase Libre (Test en tube)* : est une enzyme responsable de la formation d'un caillot visible résultant de l'activation des facteurs de coagulation du plasma (Murray, 1999).

### Technique

- D'abord, on a effectué un enrichissement de la souche dans un bouillon cœur-cerveille à 37°C pendant 18 heures.
- Ensuite, on a introduit dans un tube stérile 0,5 ml de la suspension bactérienne et 0,5 ml du plasma oxalaté.
- Incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures (Murray, 1999).

### Lecture

- S'il y a une formation d'un caillot visible au fond du tube. la bactérie possède une Coagulase.
- S'il n'y a pas une formation d'un caillot visible au fond du tube. la bactérie ne possède pas une Coagulase (Murray, 1999).

### ❖ Recherche de l'ADNase

Ce test est réalisé pour différencier l'espèce *Staphylococcus aureus*.

### Principe

L'ADNase est une enzyme qui dégrade l'acide désoxyribonucléique (ADN) en libérant les nucléotides.

### Technique

- Préparer une culture de la souche dans un bouillon cœur-cerveille de 24 heures
- Chauffer la suspension préparée à 100°C pendant 15 minutes
- Après refroidissement, Ensemencer une gélose à ADN par une strie verticale.
- Incubation à 37°C pendant 24 heures.

### Lecture

La détection de l'enzyme se fait par l'ajout de quelques gouttes d'une solution d'acide chlorhydrique sur la strie (Guillaume, 2006).