

Détection de la production d'une molécule de quorum sensing chez la bactérie *Enterococcus faecalis*

Auteurs **Karima Bensalem 1**, **Francisco Javier López Baena 2**

1 Département de biochimie, Faculté des sciences, Université Badji Mokhtar Annaba UBMA, BP12 Sidi Amar 23000 Annaba Algérie.

2 Département de microbiologie, Faculté de biologie, Université de Séville, Avenue Reine Mercedes, 6-41012, Séville Espagne.

Introduction

Plusieurs espèces bactériennes utilisent un mécanisme de communication intercellulaire connu sous le nom de : « quorum sensing » ou (QS). Ce processus de signalisation permet aux cellules bactériennes qui composent une colonie bactérienne de coordonner leur expression de gènes d'une manière dépendante de la densité cellulaire (Fuqua *et al.*, 2001 ; Bassler et Losick, 2006). Donc, le système de quorum sensing permet aux cellules dans une colonie bactérienne d'agir en coopération (Atkinson et Williams, 2009).

Matériels et Méthodes

1- Prélèvement, isolement et identification de l'espèce *Enterococcus*

faecalis.

1-1 Prélèvement et isolement de la souche bactérienne.

Les souches d'*Enterococcus faecalis* ont été issues de prélèvements cliniques des dents de patients ayant des infections endodontiques dans le service de chirurgie dentaire des CHU de la ville d'Annaba. Seulement une souche d'*E.faecalis* bien caractérisée a été choisie pour étude.

1-2 Identification de la souche *E.faecalis*.

1-2-1 Culture sur milieu sélectif : la gélose au tellurite de potassium.

Enterococcus faecalis étant la seule espèce du genre *Enterococcus* capable de réduire le tellurite de potassium (qui constitue souvent une substance inhibitrice pour les autres espèces) en donnant des colonies noires sur gélose au tellurite.

1-2-2 La galerie API 20 STREP (BioMérieux, USA).

*Principe de la technique.

L'identification d'*E.faecalis* a été réalisée par la galerie API 20 STREP (Bio-Mérieux, USA).

1-2-3 La Spectrométrie de masse (MALDI-TOF).

La technique de spectrométrie de masse (MALDI-TOF) a été réalisée en partenariat avec le laboratoire de microbiologie de l'unité de recherche des risques microbiens (U2RM), au CHU Côte de Nacre, 14033 Caen Cedex, France.

2. Détection de la production de molécule de quorum sensing chez la souche *E.faecalis*.

La technique de détection de molécule signalée produite chez *E.faecalis* a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de microbiologie, Faculté de biologie, Université de Séville,

6-41012 Séville, Espagne.

2-1 Souche bactérienne.

La souche bactérienne *Agrobacterium tumefaciens* au plasmide (pZLR4) appelée « the biosensor strain » a été utilisée pour la détection des molécules AHLs. Le plasmide (pZLR4) contient le gène de la β -galactosidase. Lorsque cette souche *A.tumefaciens* (pZLR4) détecte une molécule AHL, la transcription du gène de la β -galactosidase est activée et l'enzyme β galactosidase est produite, cette enzyme clive son substrat chromogène (X-Gal).

2-2 Milieu de culture.

Le milieu de culture YM (*Yeast Mold Agar*) a été utilisé pour la culture de la souche *Agrobacterium tumefaciens* (pZLR4).

2-3 Le substrat chromogène (X-Gal).

Le X-Gal est un substrat chromogène appelé : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside.

Le X-Gal est un substrat chromogène pour l'enzyme β -galactosidase, ce substrat produit une riche couleur bleue pouvant être détectée facilement par vision du milieu.

2-4 La molécule signalée AHL dite : témoin ou « control ».

HHL50 : La (C6-HSL) : N-hexanoyl-L-homoserine lactone, cette molécule signalée a été obtenue par extraction dans l'acétate d'éthyle et a été préalablement préparée.

2-5 Détection de la molécule signalée produite par *E.faecalis*.

Deux essais ont été adoptés respectivement :

-un essai direct pour la détection de la molécule signalée, une probable molécule AHL produite

dans le surnageant de culture d'*E.faecalis*.

-un essai indirect pour la confirmation de la détection de cette molécule.

*Essai direct:

5 mL du milieu YM (0.8 % (w/v)) ont été mélangés avec 300 μ L. Chaque puits a été rempli selon le protocole de la figure 12.

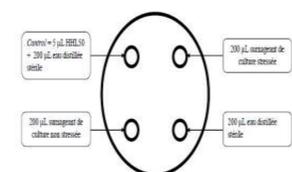


Figure 12 : Essai direct pour la détection de molécules signalées chez *E.faecalis*.

*Essai Indirect:

5 mL du milieu YM ont été mélangés avec 300 μ L de la souche biosensor et 40 μ L du substrat X-Gal en plus de (5 μ L de la molécule HHL50, puis 10 μ L de la molécule HHL50). Ce mélange liquide en surfusion a été ensuite coulé dans une boîte de Pétri, solidifié et refroidi. Quatre puits ont été formés dans la gélose à l'aide d'un anneau en métal stérile. Le diamètre du puits dans la gélose était environ de 3 millimètre et l'épaisseur de la gélose dans la boîte de Pétri était environ de 2 millimètre. Chaque puits a été rempli selon le protocole de la figure 13.

on analyse s'il y a une production d'une couleur bleue autour des puits dans la gélose.

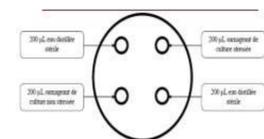


Figure 13 : Essai indirect pour la détection de molécules signalées chez *E.faecalis*.

Résultats et Discussion

1- Isolement et identification de l'espèce *Enterococcus faecalis*.

1-1 Isolement.

Les résultats d'examen des cultures obtenues sur gélose M17 ont révélé la présence de colonies blanchâtres, muqueuses, opaques, de 1 à 2 mm de diamètre et ne produisant pas de la catalase (catalase-négative). De plus, la mise en culture de la souche *E.faecalis* sur le milieu bile esculine azide (BEA) nous a permis d'observer des colonies caractéristiques du genre

Enterococcus à savoir, des colonies translucides entourées d'un halo noir (figure 15).



Figure 15 : Aspect macroscopique d'*E.faecalis* sur gélose BEA

1-2 Identification.

1-2-1 Culture sur milieu sélectif : Tellurite de potassium.

Dans le but d'identifier l'espèce *Enterococcus faecalis*, cette dernière a été mise en culture sur le milieu sélectif au tellurite de potassium, après une incubation de 24h à 37°C en aérobiose, on observe de petites colonies noires (figure 17).



Figure 17 : Aspect macroscopique d'*Enterococcus faecalis* sur gélose au tellurite de potassium.



Figure 18 : Résultats d'identification de l'espèce par API 20 Strep.

1-2-2 La galerie API 20 Strep.

L'identification des 20 caractères biochimiques à l'aide de la galerie API 20 Strep rajoutée au 21ème caractère hémolytique obtenu par culture sur gélose au sang frais a permis l'identification de l'espèce *Enterococcus faecalis* en recherchant le profil numérique dans la base de donnée du catalogue analytique (figure 18).

Figure 18 : Résultats d'identification de l'espèce par API 20 Strep.

1-2-3 La spectrométrie de masse (MALDI-TOF).

le score ou log obtenu était supérieur à 2 (score > 2), ce qui signifie que l'espèce est *Enterococcus faecalis*.

2-Détection de la production de molécule de quorum sensing chez la souche *E.faecalis*.

La détection de la production de molécule de QS chez la souche *E.faecalis* par le biosensor *A.tumefaciens* (pZLR4) a été réalisée comme suit : Après incubation, Nous avons analysé la production de la couleur bleue autour de chaque puits dans la gélose en boîte de Pétri. Les résultats d'analyse obtenus sont illustrés par la figure 21 et mentionnés dans les tableaux 06 et 07.

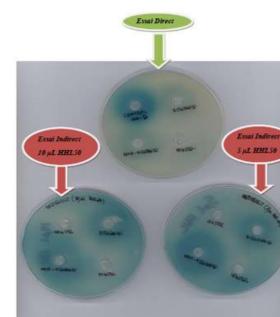


Figure 21 : Détection de la production de molécule de quorum sensing probablement de type « AHL » ou N-Acyl Homoserine Lactone chez la souche Gram-positif *E.faecalis* en utilisant le biosensor *Agrobacterium tumefaciens* (pZLR4).

Essai direct

Tableau 06 : Résultats de la détection de molécules signalées produites par *E.faecalis* au cours de l'essai direct.

Composition des 4 trous dans la gélose	Production de la couleur bleue
Control = 5 μ L HHL50 + 200 μ L eau distillée stérile	(+) présence de couleur bleue intense
200 μ L surnageant de culture stressée	(+) présence de couleur bleue
200 μ L surnageant de culture non stressée	(+) présence de couleur bleue
200 μ L eau distillée stérile	(-) absence de couleur bleue

Essai indirect

Tableau 07 : Résultats de la détection de molécules signalées produites par *E.faecalis* au cours de l'essai indirect.

Composition des 4 trous dans la gélose	Production de la couleur bleue
200 μ L eau distillée stérile	(-) absence de couleur bleue
200 μ L surnageant de culture stressée	(+) présence de couleur bleue intense (le diamètre de l'halo bleu = 20 mm)
200 μ L surnageant de culture non stressée	(+) présence de couleur bleue très intense (le diamètre de l'halo bleu = 25 mm)
200 μ L eau distillée stérile	(-) absence de couleur bleue

Une classe majeure des autoinducteurs est celle des AHLs : N-acyl homoserine lactones (Beveridge, 1999). À ce jour, plusieurs approches qualitatives et quantitatives ont été développées pour la détection des molécules AHLs. Ces approches comprennent les techniques basées sur des cellules entières appelées : « whole-cell-based bioassays » en utilisant des souches bactériennes détectant les molécules AHLs. Ces souches sont appelées :

« biosensors » (Steindler et Venturi, 2007).

Cette technique est relativement sensible et simple. Dans cette méthode l'expression du système de la β -galactosidase a été utilisée comme un indicateur spécifique de l'expression du gène (Luo *et al.*, 2001).

Conclusion

La souche *E.faecalis* produit une molécule signalée de QS dans le surnageant de la culture stressée et non stressée pouvant être détectée par la souche bactérienne biosensor *Agrobacterium tumefaciens* (pZLR4). Cette molécule de QS est suspectée d'être une molécule de type AHL. Donc cette bactérie Gram-positif *E.faecalis* a peut-être la possibilité de produire une molécule de QS de type AHL comme chez les bactéries Gram-négatives, en plus des autres molécules signalées déjà connues : AI-2 et les peptides cycliques.

Références bibliographiques

- Atkinson, S., Williams, P. J. R. (2009) Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J. R. Soc. Interface.*, **6**, 959-78.
- Bassler, B.L., Losick, R. (2006) Bacterially Speaking. *Cell.*, **125**, 237-246.
- Boyer, M., Wisniewski-Dye, F. (2009) Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum. *FEMS. Microbiol. Ecol.*, **70**, 1-19.
- Kristich, C.J., Li, Y.H., Cvitkovich, D.G., Dunny, G.M. (2004) Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.*, **186**, 154-163.
- Luo, Z. Q., Clemente, T.E., Farrand, S.K. (2001) Construction of a derivative of *Agrobacterium tumefaciens* C58 that does not mutate to tetracycline resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:98-103.