

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار-عنابة

Université Badji Mokhtar- Annaba



FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

**THÈSE**

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

**En MICROBIOLOGIE**

**Option : Microbiologie Appliquée**

**THÈME**

*Recherche et identification des systèmes de communication cellulaire dans le biofilm de la souche bactérienne Enterococcus faecalis*

Présentée par : **BENSALEM Karima**

Directeur de thèse : Pr. DJERIBI Ryad Université d'Annaba.

Membres du jury :

Président : Pr. CHEKIREB Djamel Université d'Annaba.

Examinatrice : Pr. HASSAINE Hafida Université de Tlemcen.

Examinatrice: Pr. BOUCHERIT-ATMANI Zahia Université de Tlemcen.

Année Universitaire : 2017/2018

**DEDICACES**

*Je dédie le fruit de ce travail à mes chers parents qui m'ont donné la vie, et l'encouragement durant toute mon existence :*

*À celle qui m'a donné la naissance, une personne qui m'a tout donné sans compter, sans toi je ne suis rien, que dieu te préserve MA CHERE MAMAN ZMORDA, je t'aime...*

*À celui qui a toujours été là pour moi, qui m'a soutenu tout au long de mes études, des mots ne pourront jamais exprimer la profondeur de mon respect, ma considération, ma reconnaissance et mon amour pour toi MON CHER PAPA AHMED...*

*À MON CHER EPOUX HICHEM BENHADID, ton amour est un don du dieu, dans tes yeux, j'ai toujours pu lire de la tendresse, la gentillesse, l'honnêteté. Tu m'as toujours soutenu, compris et réconforté, tu es l'espoir de ma vie.*

*À mon adorable petite ange LYDIA MALAK, ma fille tu es l'espoir, la lumière et la joie de ma vie. Tous les mots ne sauraient exprimer l'amour que j'ai pour toi. J'espère que ma thèse sera pour toi source de fierté et qu'elle sera un exemple à suivre.*

*À ma sœur « HANENE », mon frère « HICHEM », à ma grande famille paternelle BENSALEM, à ma grande famille maternelle STAMBOULI, et à ma belle famille BENHADID.*



*Karima*

---

## Remerciements

*Au nom de DIEU, le plus grand merci lui revient de m'avoir aidé tout au long de mes études.*

*Tout d'abord, J'exprime mes mes vifs remerciements les plus sincères à mon directeur de thèse Ryad Djeribi, Professeur, à l'Université Badji Mokhtar Annaba, de m'avoir encadré et conseillé tout au long de ce travail.*

*Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude au Professeur Francisco Javier López Baena de m'avoir offert l'opportunité de réaliser la plus importante partie de ma thèse au laboratoire de microbiologie, faculté de biologie de l'université de Séville en Espagne.*

*Je tiens aussi à remercier vivement le Professeur Jean Christophe Giard du laboratoire de microbiologie, Unité de recherche des risques microbiens (U2RM), CHU Côte de Nacre, Caen, France de m'avoir aidé dans l'identification de la souche bactérienne *Enterococcus faecalis* par la technique de spectrométrie de masse (MALDI-TOF).*

*Je tiens aussi à remercier individuellement :*

- *Tous les membres du laboratoire de microbiologie de l'université de Séville, pour leur accueil, aide et gentillesse.*

*J'adresse mes vifs remerciements aussi au :*

- *Professeur CHEKIREB Djamel, pour m'avoir honoré ce travail en l'évaluant et en acceptant de présider le jury.*
- *Professeur HASSAINE Hafida, pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse.*
- *Professeur BOUCHERIT-ATMANI Zahia, pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse.*

*Sur une note plus personnelle, je tiens à remercier particulièrement mes chers parents et mon cher mari. Je leur exprime ma profonde gratitude pour leur soutien moral et financier ainsi que pour leurs patience et encouragements durant tout mon parcours de recherche.*

---

**Table des matières**

Résumés.

Liste des abréviations.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Introduction..... 1

**Synthèse bibliographique.**

**Chapitre I. Les systèmes de communication cellulaire chez les bactéries..... 5**

1- La communication cellulaire chez les bactéries..... 5

2- La communication cellulaire chez les bactéries Gram-négatives..... 8

3- La communication cellulaire chez les bactéries Gram-positives..... 13

4- La communication cellulaire inter-espèces..... 14

    4-1 Autoinducteur AI-2..... 14

        4-1-1 Le système AI-2 : la synthèse du signal..... 16

        4-1-2 Le système AI-2 : Détection du signal et transcription des gènes..... 17

    4-2 Diffusible Signal Factor (DSF)..... 18

        4-2-1 Purification et caractérisation de la structure des molécules signales de la famille DSF..... 19

        4-2-2 Biosynthèse des molécules signales de la famille DSF..... 20

        4-2-3 Nomenclature des molécules DSF..... 21

        4-2-4 Caractéristiques structurales et activité biologique des molécules DSF..... 22

        4-2-5 Effet de la molécule signal « DSF » sur la dispersion du biofilm..... 24

        4-2-6 Rôles des molécules « DSF » dans la communication inter-espèces..... 24

**Chapitre II. Etude du biofilm bactérien..... 26**

1-Définition du biofilm..... 26

2-Les caractéristiques de base d'un biofilm..... 26

3-Composition du biofilm.....	26
4-Les facteurs affectant la formation du biofilm.....	27
<b>Chapitre III. Etude de l'espèce <i>Enterococcus faecalis</i>.....</b>	<b>29</b>
1-Taxonomie et identification.....	29
2-Caractères morphologiques et culturaux.....	29
3-Virulence et pathogénèse.....	30
4-Résistance aux antibiotiques.....	31
5- Etude du Biofilm de la bactérie <i>E.faecalis</i> .....	32
<b>Chapitre IV. Les systèmes de communication cellulaire (quorum sensing) chez la bactérie <i>E.faecalis</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>Chapitre V. Intérêt du quorum sensing.....</b>	<b>37</b>
<b>Matériels et Méthodes.</b>	
1- Prélèvement, isolement et identification de l'espèce <i>Enterococcus faecalis</i> .....	39
1-1 Prélèvement et isolement de la souche bactérienne.....	39
1-2 Identification de la souche <i>E.faecalis</i> .....	40
1-2-1- Culture sur milieu sélectif : Tellurite de potassium.....	40
1-2-2- La galerie API 20 STREP (BioMérieux, USA).....	41
1-2-3- La spectrométrie de masse (MALDI-TOF).....	42
<b>2- Etude de l'effet de certaines molécules signales de quorum sensing appelées (AHLs) :</b>	
<b>N-Acyl Homoserine Lactones sur la formation de biofilm d'<i>E.faecalis</i>.....</b>	<b>44</b>
2-1 Molécules AHLs.....	44
2-2 Formation de biofilm d' <i>E.faecalis</i> en présence et en absence des molécules AHLs.....	45

<b>3- Influence de la présence de la vancomycine (stress chimique) sur la formation de biofilm d'<i>E.faecalis</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>4-Détection de la production de molécule de quorum sensing chez la souche <i>E.faecalis</i>.....</b>	<b>52</b>
4-1 Souche bactérienne.....	52
4-2 Milieu de culture.....	52
4-3 Le substrat chromogène (X-Gal).....	52
4-4 La molécule signale AHL dite : témoin ou « <i>control</i> ».....	52
4-5 Détection de la molécule signale produite par <i>E.faecalis</i> .....	53
<b>5-Effet de l'insuline sur la formation de biofilm par la souche <i>E.faecalis</i>.....</b>	<b>55</b>

## Résultats et Discussion.

<b>1- Isolement et identification de l'espèce <i>Enterococcus faecalis</i>.....</b>	<b>58</b>
1-1 Isolement.....	58
1-2 Identification.....	59
1-2-1 Culture sur milieu sélectif : Tellurite de potassium.....	59
1-2-2 La galerie API 20 Strep.....	60
1-2-3 La spectrométrie de masse (MALDI-TOF).....	60
<b>2- Etude de l'effet de certaines molécules signales de quorum sensing appelées (AHLs) : N-Acyl Homoserine Lactones sur la formation de biofilm de <i>E.faecalis</i>.....</b>	<b>61</b>
2-1 Quantification du biofilm de <i>E.faecalis</i> formé sur du polystyrène en absence et en présence des molécules AHLs (C <sub>6</sub> -HSL et C <sub>8</sub> -HSL).....	61
<b>3- Influence de la présence de la vancomycine sur la formation de biofilm d'<i>E.faecalis</i>.....</b>	<b>66</b>

<b>4-Détection de la production de molécule de quorum sensing chez la souche <i>E.faecalis</i>.....</b>	<b>69</b>
<b>5-Effet de l'insuline sur la formation du biofilm par la souche <i>E.faecalis</i>.....</b>	<b>75</b>
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>84</b>
Références bibliographiques.....	86

Publication scientifique.

Annexes.

---

# *Résumés*

## Résumé

Ce travail de recherche porte sur l'étude de l'impact de certaines biomolécules de communication interbactérienne appelées : N-Acyl Homoserine Lactones « AHLs » sur la formation de biofilm par *E.faecalis*. En outre, sur la recherche et l'identification des molécules signales de QS produites par *E.faecalis*. Ainsi que, l'effet que peuvent exercer des biomolécules (1. Antibiotique (stress) : vancomycine, 2. hormone hypoglycémiant : l'insuline) sur l'aptitude de la bactérie à former le biofilm sur une surface inerte en polystyrène. La bactérie mise en étude dans cette recherche appelée : *Enterococcus faecalis*, a été isolée des échantillons dentaires chez des patients ayant des infections endodontiques, au service de chirurgie dentaire, dans les centres hospitaliers universitaires (CHU) de la ville d'Annaba en Algérie. Les résultats de cette étude ont démontré que :

\*Les molécules signales de quorum sensing (de communication intercellulaire bactérienne) de type « AHLs » stimulent la formation du biofilm par la bactérie Gram-positive isolée de la cavité buccale humaine *E.faecalis*.

\*La bactérie Gram-positive *E.faecalis* produit une molécule de QS pouvant être détectée par le biosenseur *A.tumefaciens* (pZLR4).

\*La bactérie *E.faecalis* s'est adaptée au stress par l'antibiotique « vancomycine » en augmentant la formation de biofilm.

\*L'hormone hypoglycémiant (l'insuline) a pu jouer le rôle d'une molécule de signalisation et de communication intercellulaire bactérienne chez *E.faecalis* et par conséquent l'insuline a stimulé et augmenté la formation du biofilm par *E.faecalis*.

**Mots clés :** *Enterococcus faecalis*, quorum sensing, communication cellulaire, biofilm, AHLs, insuline.

## **Abstract**

This research focuses on the study of the impact of biomolecules of bacterial intercellular communication named: N-Acyl Homoserine Lactones “AHLs” on *Enterococcus faecalis* biofilm formation. In addition, on the detection of a quorum sensing molecule produced by *E.faecalis* and detected by the biosensor bacterial strain *A.tumefaciens* (pZLR4).

Also, the study of biomolecules’ effect which are (1.Antibiotic: vancomycin, 2.hypoglycemic hormone: insulin) on the ability of the bacterium *E.faecalis* to form the biofilm on an inert surface of polystyrene. The bacterium studied in this research is named: *Enterococcus faecalis*, a Gram-positive bacterium which was isolated from dental samples in patients with endodontic infections in the dental surgery service of the university hospital of Annaba in Algeria. The results of this study demonstrated that:

\*The biomolecules of quorum sensing named “AHLs” stimulated the biofilm formation by the Gram-positive bacteria isolated from the human oral cavity which is *E.faecalis*.

\**E.faecalis* produces a quorum sensing signal molecule detected by the biosensor strain *A.tumefaciens* (pZLR4).

\* The bacteria *E.faecalis* has adapted to stress with the antibiotic "vancomycin" by increasing the biofilm formation.

\*The hypoglycemic hormone (insulin) could act as a signaling molecule of intercellular communication in *E.faecalis* biofilm and therefore insulin stimulated and increased the biofilm formation by *E.faecalis*.

**Key words:** *Enterococcus faecalis*, quorum sensing, intercellular communication, biofilm, AHLs, insulin.

## ملخص

يهتم هذا البحث بدراسة تأثير بعض الجزيئات الحيوية التي تلعب دورا في الإتصال بين خلايا البكتيريا و المسماة: AHLs

على تشكيل البيوفيلم *biofilm* للبكتيريا *Enterococcus faecalis*.

و من جهة أخرى البحث عن الجزيئات الحيوية التي تلعب دورا في الإتصال بين خلايا البكتيريا *E.faecalis*.

إضافة إلى دراسة تأثير جزيئات حيوية أخرى (1. المضاد الحيوي: الفانكوميسين -2. هرمون القصور السكري: الأنسولين)

على قدرة البكتيريا *E.faecalis* على تشكيل البيوفيلم *biofilm* على سطح حامل من البوليستيرين.

البكتيريا المدروسة في هذا البحث تدعى: *Enterococcus faecalis* حيث تم عزلها من عينات الأسنان عند المرضى

الذين يعانون من التهابات في الأسنان في قسم جراحة الأسنان في عدة مستشفيات جامعية بمدينة عنابة بالجزائر.

أظهرت نتائج هذه الدراسة ما يلي:

\* جزيئات الإتصال بين خلايا البكتيريا و المسماة: AHLs تحفز تشكيل بيوفيلم البكتيريا *E.faecalis*.

\*البكتيريا *E.faecalis* تنتج جزيئة تلعب دورا في الإتصال بين خلايا هذه البكتيريا. تم التعرف على هذه الجزيئة باستعمال

بكتيريا خاصة تدعى (*The biosensor A.tumefaciens (pZLR4)*)

\* تكيفت البكتيريا *E.faecalis* مع المضاد الحيوي "الفانكوميسين" عن طريق زيادة تشكيل البيوفيلم.

\*جزيئة هرمون القصور السكري: الأنسولين يمكن أن تعمل كناقل أي كجزيئة اتصال بين خلايا البكتيريا *E.faecalis* و

بالتالي الأنسولين يحفز و يزيد من تشكيل بيوفيلم البكتيريا *E.faecalis*.

**الكلمات المفتاحية:** *Enterococcus faecalis* -quorum sensing - اتصال بين الخلايا- بيوفيلم *biofilm* -AHLs-

الأنسولين.

Liste des abréviations

*A*

ADH	Arginine DiHydrolase
AHLs	N-Acyl Homoserine Lactones
AI	AutoInducteur
AI-1	AutoInducteur-1
AI-2	AutoInducteur-2
AI-3	AutoInducteur-3
AIP	AutoInducing Peptide
Alpha-GAL	Alpha-Galactosidase
AMD	Amidon
ARA	Arabinose

*B*

BEA	Bile Esculine Azide
βGUR	β-Glucuronidase
βGAL	β-Galactosidase

*C*

C6-HSL	N-hexanoyl-L-HomoSerine Lactone
C7-HSL	N-heptanoyl HomoSerine Lactone
C8-HSL	N-Octanoyl-L-HomoSerine Lactone
C10-HSL	N-Decanoyl-HomoSerine Lactone

*D*

DHMF	2,4-DiHydroxy-2-Methyle dihydro-3-Furanone
DKPs	DiKetoPiperazines
DO	Densité Optique
DO <sub>600</sub>	Densité Optique à 600 nm
DO <sub>570</sub>	Densité Optique à 570 nm
DPD	4,5-Dihydroxy-2,3-Pentane Dione
DSF	Diffusible Signal Factor

**F**

EPS	ExoPolySaccharide
ESC	Esculine
ESI-MS	<i>Electro Spray Ionization Mass Spectrometry</i>

**G**

GBAP	<i>Gelatinase Biosynthesis-Activating Pheromone</i>
GC%	pourcentage de Guanine et Cytosine
GLYG	Glycogène

**H**

HHQ	2 Heptyl-4-Quinolone
HIP	acide hippurique
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>

**I**

IDDM	<i>Insulin-Dependent-Diabetes-Mellitus</i> (diabète de type 1)
INU	Inuline

**L**

LAC	Acidification (lactose)
LAP	Leucine Amino Peptidase
LBBM	Laboratoire des Biofilms et Biocontamination des Matériaux
LPS	LipoPolySaccharide

**M**

MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
MAN	Acidification (mannitol)
MS	Mass Spectrometry
m/z	masse/charge

*N*

<i>NIDDM</i>	<i>Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus</i> (diabète de type 2)
nm	nanomètre
<i>NMR</i>	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>

*P*

PAL	Phosphatase Alcaline
<i>PBPs</i>	<i>Penicillin Binding Proteins</i>
pH	Potentiel Hydrogène
<i>PQS</i>	<i>Pseudomonas Quinolone Signal</i>
PYRA	PyrolidonylArylamidase

*Q*

QS	Quorum Sensing
----	----------------

*R*

RAF	Acidification (raffinose)
RH	S-Ribosyl Homocysteine
RIB	Acidification (ribose)
rpm	rotation par minute

*S*

SAH	S-Adenosyl Homocysteine
SAM	S-Adenosyl Methionine
SOR	Acidification (Sorbitol)
SSI	<i>Surgical Site Infections</i>

*T*

<i>T1DM</i>	<i>Type 1 Diabetes Mellitus</i>
<i>T2DM</i>	<i>Type 2 Diabetes Mellitus</i>
THMF	2,4-TetraHydroxy-2-Methyle tetrahydro-3-Furanone
<i>TOF</i>	<i>Time Of Flight</i>
TRE	Acidification (trehalose)
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>

**U**

UFC	Unité Formant Colonie
-----	-----------------------

**V**

VP	VogesProskauer (Production d'acétoïne)
----	--

**W**

W/V	Weight/Volume
-----	---------------

**X**

<i>Xcc</i>	<i>Xanthomonas campestris pv campestris</i>
------------	---

**Y**

<i>YM</i>	<i>Yeast Mold</i>
-----------	-------------------

---

Liste des figures

N° figure	Titre	Page
1	Les molécules signales de quorum sensing détectées chez les bactéries Gram-négatives.	12
2	Diagramme simplifié de la synthèse du signal AI-2.	16
3	Synthèse des molécules signales de la famille DSF de configuration <i>cis</i> par « <i>Favorskii Rearrangement</i> ».	20
4	Structure biochimique de la molécule C <sub>6</sub> -HSL.	44
5	Structure biochimique de la molécule C <sub>8</sub> -HSL.	44
6	Inoculation de la microplaque.	46
7	Coloration du biofilm.	47
8	Décoloration du biofilm.	48
9	Lecteur de microplaques (mesure de la DO <sub>570</sub> ).	48
10	Protocole expérimental réalisé pour analyser l'effet du stress sur le système de quorum sensing et le mécanisme de formation de biofilm chez <i>E.faecalis</i> .	50
11	Structure biochimique de la molécule C <sub>6</sub> -HSL.	53
12	Essai direct pour la détection des molécules signales chez <i>E.faecalis</i> .	54
13	Essai indirect pour la détection des molécules signales chez <i>E.faecalis</i> .	55
14	Protocole expérimental réalisé pour analyser l'effet de l'hormone hypoglycémiant (l'insuline) sur le mécanisme de formation de biofilm chez <i>E.faecalis</i> .	56
15	Aspect macroscopique d' <i>E.faecalis</i> sur gélose BEA.	58
16	Observation microscopique après coloration de Gram (grossissement X100).	59
17	Aspect macroscopique d' <i>Enterococcus faecalis</i> sur gélose au tellurite de potassium.	59
18	Résultats d'identification de l'espèce par API 20 Sterp.	60
19	Valeurs obtenues de la densité optique à 570 nm (DO <sub>570</sub> ) de la formation de biofilm d' <i>E.faecalis</i> sur du polystyrène dans le contrôle négatif (CN) (sans les AHLs) et dans le contrôle positif 1 (CP1 : avec 1 µL de C <sub>6</sub> -HSL) et (CP2 : avec 1 µL de C <sub>8</sub> -HSL).	62
20	Effet de la présence de l'antibiotique « la vancomycine » sur la formation de biofilm par <i>E.faecalis</i> .	67
21	Détection de la production de molécule de quorum sensing probablement de type « AHL » ou N-Acyl Homoserine Lactone chez la souche Gram-positif <i>E.faecalis</i>	70

	en utilisant le <i>biosensor Agrobacterium tumefaciens</i> (pZLR4).	
<b>22</b>	Effets de l'insuline sur la formation de biofilm d' <i>E.faecalis</i> .	<b>75</b>

Liste des tableaux

<b>N<sup>o</sup> Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Ensemencement de la microplaque en présence et en absence des molécules AHLs.	<b>46</b>
<b>2</b>	Ensemencement de la microplaque par le surnageant de culture stressée et le surnageant de culture non stressée.	<b>51</b>
<b>3</b>	Ensemencement de la microplaque par l'hormone hypoglycémiante (insuline) seule et en présence d'un surnageant de culture stressée.	<b>57</b>
<b>4</b>	Calculs du taux d'augmentation de la formation de biofilm par rapport au témoin en pourcentage (%).	<b>62</b>
<b>5</b>	Calculs du taux d'augmentation de la formation de biofilm en présence et en absence de la vancomycine par rapport au témoin en pourcentage (%).	<b>67</b>
<b>6</b>	Résultats de la détection de molécules signales produites par <i>E.faecalis</i> au cours de l'essai direct.	<b>71</b>
<b>7</b>	Résultats de la détection de molécules signales produites par <i>E.faecalis</i> au cours de l'essai indirect.	<b>71</b>
<b>8</b>	Calculs du taux d'augmentation de la formation de biofilm en présence de l'insuline et le surnageant de culture stressée et non stressée par rapport au témoin en pourcentage (%).	<b>75</b>

# *Introduction*

## **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).

Il a été démontré que ce système de QS joue un rôle crucial dans les interactions bactéries pathogènes-hôtes (Boyer et Wisniewski-Dye, 2009).

La communication intercellulaire bactérienne est basée sur des biomolécules appelées : « Autoinducteurs » ou (AI), ces biomolécules sont des composés chimiques endogènes qui sont synthétisés à l'intérieur de la cellule bactérienne (synthèse intracellulaire) tout au long de la croissance des bactéries et puis sont sécrétées dans le milieu extérieur à la bactérie (sécrétion extracellulaire) (Waters et Bassler, 2005 ; Bassler et Losick, 2006 ; Steindler et Venturi, 2007).

Certains autoinducteurs sont liés aux récepteurs membranaires situés à la surface cellulaire, alors que d'autres peuvent franchir la membrane cellulaire et se lier aux récepteurs intracellulaires. Après la liaison des autoinducteurs aux récepteurs correspondants, ces autoinducteurs activent un large spectre de systèmes effecteurs affectant la régulation de l'expression d'un nombre de gènes, tels que les gènes qui codent pour la synthèse et la sécrétion des antibiotiques, des facteurs de virulence, et la formation de biofilm (Whitehead *et al.*, 2001 ; Waters et Bassler, 2005 ; Bassler et Losick, 2006 ; Steindler et Venturi, 2007).

Les autoinducteurs les plus répandus et importants sont les : « N-Acyl Homosérine Lactones » ou (AHLs), appelés aussi : « Autoinducteur-1 » ou (AI-1) (Galloway *et al.*, 2011).

Ces AHLs constituent la classe d'autoinducteurs trouvée chez les bactéries Gram-négatives. En effet, le quorum sensing basé sur les AHLs représente l'un des systèmes bactériens les plus étudiés et mieux compris au niveau moléculaire (Geske *et al.*, 2008).

Les peptides cycliques représentent la classe majeure des molécules de signalisation intercellulaire chez les bactéries Gram-positives (Duan *et al.*, 2003 ; Xavier et Bassler, 2003 ; Vendeville *et al.*, 2005 ; De Keersmaecker *et al.*, 2006).

Les effets des molécules signales peuvent être différents selon la concentration de la molécule signalé (Geske *et al.*, 2008 ; Galloway *et al.*, 2011).

*E.faecalis* est une bactérie de morphologie sphérique dite : cocci, Gram-positif, anaérobie facultative. Cette bactérie est connue comme étant l'espèce la plus fréquemment détectée dans les canaux radiculaires des dents chez des patients ayant subi un traitement endodontique inefficace (Wang *et al.*, 2011). Le système de quorum sensing (QS) chez *E.faecalis* est étroitement lié avec la formation de biofilm (Lu *et al.*, 2013).

Il est important de connaître que l'effet des molécules signales de QS appelées : « N-Acyl Homosérine Lactones » ou (AHLs) produites uniquement par les bactéries Gram-négatives sur la formation de biofilm par les bactéries Gram-positives de la cavité buccale ou orale n'a pas encore été étudié et n'est pas bien connu (Withers *et al.*, 2001).

Le quorum sensing est le déterminant de la densité cellulaire de la population bactérienne, ce système est un constituant intégral de la régulation globale des gènes bactériens, facilitant l'adaptation des bactéries au stress environnemental (Withers *et al.*, 2001).

Donc, les bactéries peuvent utiliser le système de QS pour faire face à un stress environnemental, on peut dire que ce système de QS est une manière d'adaptation des bactéries au stress. Sachant que, l'effet du stress de nature chimique en utilisant des

antibiotiques tel que : la vancomycine sur la formation de biofilm par la souche *E.faecalis* n'est pas encore évident (Bansal *et al.*, 2007 ; Kendall *et al.*, 2007 ; Shpakov,2009).

De plus, on a pu démontrer récemment que les bactéries reçoivent les signaux via les hormones des vertébrés et les (*hormonelike factors*), tels que : la sérotonine et la mélatonine. L'adrénaline et les catécholamines forment un groupe spécifique d'autoinducteurs responsables de la communication intercellulaire bactérienne (Bansal *et al.*, 2007 ; Kendall *et al.*, 2007 ; Shpakov,2009).

Il est important de savoir que le rôle que joue l'hormone (l'insuline) dans la signalisation intercellulaire bactérienne n'est pas bien connu. De plus, le rôle de cette hormone dans la modulation du système de QS des bactéries et spécifiquement de la bactérie *E.faecalis*, ainsi que l'effet de cette hormone sur la formation de biofilm par *E.faecalis* n'a pas été bien étudié.

Les objectifs de la présente étude consistaient à :

- 1 - Mettre en évidence la présence des souches d'*E.faecalis* dans les dents des patients atteints d'infections endodontiques au niveau des hôpitaux de la ville d'Annaba,
- 2- Etudier l'effet des « AHLs » (ces dernières sont des biomolécules de quorum sensing dites molécules signales produites chez les bactéries Gram-négatives) sur la formation de biofilm de la bactérie à Gram-positif (*E.faecalis*) sur une surface en polystyrène,
- 3- Analyser l'impact d'un stress de nature chimique (la vancomycine) sur la formation de biofilm par *E.faecalis*,
- 4- Détecter la production de molécules de quorum sensing chez la souche Gram-positive *E.faecalis*,

5- Analyser l'effet de l'hormone hypoglycémisante « insuline » sur le mécanisme de communication cellulaire (QS) de la souche *E.faecalis* par la quantification du biofilm d'*E.faecalis* sur surface en polystyrène.

*Synthèse*  
*Bibliographique*

## Synthèse Bibliographique.

### Chapitre I. Les systèmes de communication cellulaire chez les bactéries.

#### 1- La communication cellulaire chez les bactéries.

La communication inter-cellulaire bactérienne nommée (quorum sensing, QS) dépend considérablement des autoinducteurs (AI), des composés chimiques endogènes qui sont synthétisés et secrétés dans l'environnement. Plus le nombre de cellules dans une population bactérienne en croissance augmente, et plus les concentrations en autoinducteurs s'élèvent dans le milieu de culture (Shpakov, 2009 ; Muras *et al.*, 2018).

Par évaluation de la concentration extracellulaire en autoinducteurs (AI), les bactéries déterminent la densité de leur propre population (communication intra-spécifique) et parfois la densité des populations d'autres espèces bactériennes (communication inter-espèces) (Shpakov, 2009).

Certains autoinducteurs (AI) sont liés aux récepteurs membranaires situés sur la surface cellulaire, alors que d'autres peuvent traverser la membrane, pénétrer à l'intérieur et se lient aux récepteurs intracellulaires. Les principales familles des autoinducteurs (AI) bactériens, c'est-à-dire les molécules signales produites et secrétées par les cellules bactériennes, responsables de la communication inter-cellulaire (Quorum Sensing, QS), de nature non peptidique sont : Les *N*-acyl homosérine lactones, les dérivés de 2-méthyl-2,3,4,5-tetrahydroxy tetrahydrofurane, les dérivés de l'indole et de quinoline, et les composés liés à l'adrénaline (Shpakov, 2009).

Les peptides cycliques représentent la classe majeure des molécules de communication inter-cellulaire chez les bactéries Gram-positives (Warren *et al.*, 2011).

La communication cellulaire chez les microorganismes est essentielle pour la colonisation initiale et la formation ultérieure du biofilm ; pour cela cette communication requiert un contact physique entre les bactéries colonisatrices et entre les bactéries et leur hôte (Kolenbrander *et al.*, 2002).

Il est peu probable que les différentes espèces dans le biofilm oral fonctionnent comme des éléments indépendants ; mais plutôt ; ces organismes fonctionnent comme une communauté coordonnée qui utilise une communication intra et inter-espèces (Kolenbrander *et al.*, 2002).

La découverte des signaux solubles, tel que l'autoinducteur-2 ou (AI-2) : « *autoinducer-2* », qui peut être échangé dans les communautés multi-espèces afin de transmettre l'information entre les organismes, a émergé comme un nouvel axe de recherche. Généralement, les mécanismes de communication utilisés par les bactéries de la cavité buccale pour former le biofilm sont très peu connus (Kolenbrander *et al.*, 2002).

De nombreuses espèces bactériennes utilisent le mécanisme de communication inter-cellulaire connu sous le nom de « quorum sensing ». Ce processus de signalisation permet aux cellules composant une colonie bactérienne de coordonner leur expression de gènes d'une manière dépendante de la densité cellulaire (Fuqua *et al.*, 1994 ; Bassler et Losick, 2006 ; Fuqua *et al.*, 2001).

Lorsque la population bactérienne atteint la densité cellulaire suffisante (le quorum) donc la concentration en autoinducteurs suffisante, les autoinducteurs se fixent aux récepteurs correspondants dans les cellules bactériennes, ce qui déclenche une cascade de transduction du signal qui résulte en un grand changement dans l'expression des gènes dans la population (Bassler, 2009 ; Boyer et Wisniewski-Dye, 2009 ; Atkinson et Williams, 2009).

Ainsi, le quorum sensing permet aux cellules dans une colonie bactérienne d'agir en coopération. Plusieurs espèces bactériennes cliniquement pathogènes utilisent les systèmes de quorum sensing afin de réguler les processus associés avec la virulence ; ceci augmente les chances de survie des bactéries car une attaque coordonnée sur l'hôte est faite seulement lorsque la population bactérienne atteint une densité élevée ; augmentant la probabilité que les défenses de l'hôte seront envahies avec succès (Geske *et al.*, 2007 ; Raina *et al.*, 2009).

Bien que les systèmes de quorum sensing sont utilisés par plusieurs bactéries pathogènes pour réguler la virulence, ils ne sont pas essentiels pour la survie (Rasmussen et Givskov, 2006).

Ainsi, la perturbation du quorum sensing appelée « quorum quenching » devrait atténuer la pathogénicité sans imposer le niveau d'une pression sélective associée avec les traitements antibactériens (Hentzer *et al.*, 2003 ; Geske *et al.*, 2008).

La dépendance des systèmes de quorum sensing sur un langage de petites molécules « autoinducteurs » offre l'opportunité d'étudier ces systèmes au niveau moléculaire (Geske *et al.*, 2008 ; Hodgkinson *et al.*, 2007).

Ainsi la découverte des petites molécules non-naturelles qui peuvent moduler les systèmes de quorum sensing a attiré un considérable intérêt (Givskov *et al.*, 1996).

Bien que les étapes fondamentales impliquées dans tous les systèmes de quorum sensing bactériens connus sont analogues, il existe des variations entre les différentes espèces sur le plan de un ou plusieurs aspects de ces processus de signalisation, la nature exacte des signaux chimiques, les récepteurs, les mécanismes de transduction du signal et les expressions phénotypiques (Waters et Bassler, 2005).

L'intérêt particulier du point de vue chimique est la riche diversité des molécules signales impliquées dans le quorum sensing, et la découverte continue des nouveaux auto-inducteurs sert à augmenter notre appréciation de la complexité des molécules chimiques de communication bactérienne (Bassler et Losick, 2006 ; Waters et Bassler, 2005).

Malgré le grand nombre des auto-inducteurs, quelques systèmes de quorum sensing sont mal connus ou ne sont pas bien caractérisés au niveau moléculaire. La concentration d'une molécule signale reflète le nombre de cellules bactériennes, et la perception d'un seuil de cette molécule signale indique que la population a atteint le quorum, c'est à dire qu'elle est prête à faire une décision pour changer son comportement. Ainsi, le QS constitue un mécanisme pour un comportement multicellulaire chez les procaryotes et est actuellement connu pour réguler la virulence, la production des métabolites secondaires, la symbiose et la formation du biofilm (Dunny et Winans, 1999; England *et al.*, 1999 ; Shapiro, 1998 ; Williams *et al.*, 2000).

La signalisation inter-cellulaire ne se produit pas uniquement aux densités cellulaires élevées, et le terme « quorum sensing » s'applique maintenant pour décrire toute communication inter-cellulaire bactérienne qui implique de petites molécules signales diffusibles (Withers *et al.*, 2001).

## **2- La communication cellulaire chez les bactéries Gram-négatives.**

Dans ces lignes nous allons mettre au point un type de systèmes de quorum sensing chez les bactéries Gram-négatives, ce système est régulé par une classe particulière d'autoinducteurs, il s'agit des : *N-acylated-L-homoserine lactones (AHLs)* ou N-Acyl-L-Homoserine Lactones (Geske *et al.*, 2008).

**\* N-Acyl-L-Homoserine Lactones (AHLs)**

Les N-Acyl-L-Homoserine Lactones ou (AHLs) représentent la classe des autoinducteurs les plus répandus chez les bactéries Gram-négatives ; en effet le quorum sensing régulé par ce type de molécules représente l'un des systèmes bactériens qui sont très bien connus au niveau moléculaire (Geske *et al.*, 2008).

Le système de quorum sensing basé sur les (AHLs) est connu pour la régulation de plusieurs fonctions cellulaires comme la bioluminescence, la mobilité, la production des métabolites secondaires, l'expression des facteurs de virulence et le transfert conjugal des plasmides (Fuqua *et al.*, 2001, Schauder et Bassler, 2001).

La signalisation basée sur les AHLs a été reconnue importante pour la formation du biofilm chez quelques organismes (Davies *et al.*, 1998 ; McNab et Lamont, 2003).

La communication cellulaire chez les bactéries appelée « quorum sensing » ou QS est basée sur l'interaction d'une petite molécule signalé diffusible avec un récepteur « *sensor* » ou avec un activateur transcriptionnel « *transcriptional activator* » (Withers *et al.*, 2001).

Chez les bactéries Gram-négatives, il est actuellement clair que les N-Acyl-Homoserine Lactones se lient directement aux homologues LuxR (récepteur de la molécule AHL) (Withers *et al.*, 2001).

Le quorum sensing est le déterminant de la densité cellulaire de la population bactérienne, ce système est un constituant intégral de la régulation globale des gènes bactériens, facilitant l'adaptation des bactéries au stress environnemental (Withers *et al.*, 2001).

Les N-Acyl-Homoserine Lactones sont produites durant les infections humaines et animales. Ces molécules ont une fonction autre que celle du quorum sensing, cette fonction a

été suggérée par rapport à leurs activités immunomodulatrices « *immunomodulatory activities* » et pharmacologiques intrinsèques (Withers *et al.*, 2001).

Il est important de connaître qu'en plus des molécules signales de la famille des AHLs, les récepteurs de type-LuxR peuvent aussi être activés par d'autres molécules : les Diketopiperazines (DKPs), dont la structure est différente de celle des AHLs (Degrassi *et al.*, 2002 ; Holden *et al.*, 1999 ; Deng *et al.*, 2011).

### **Définition des DKPs :**

Les Diketopiperazines ont été identifiés chez *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas alkaligenes* (Degrassi *et al.*, 2002 ; Holden *et al.*, 1999 ; Deng *et al.*, 2011).

Le quorum sensing basé sur la molécule *N*-acyl homosérine lactone a été démontré chez diverses bactéries Gram-négatives. Les protéines responsables de la synthèse des AHLs sont : les AHLs synthases de la famille LuxI. Les protéines de la famille LuxR constituent l'activateur transcriptionnel ou le récepteur de ces molécules (Moré *et al.*, 1996 ; Jiang *et al.*, 1998).

Les protéines LuxI catalysent la formation des molécules signales « AHLs ». Les études *in vitro* et *in vivo* ont révélé que la partie « homosérine lactone » dérive de *S*-adenosyl methionine. Les chaînes *N*-acyl qui ont une longueur de 4 à 14 carbones, qui peuvent être saturées ou insaturées et peuvent aussi contenir ou ne pas contenir un C3 hydroxy ou un groupe oxo (par exemple : voir la figure (1a, b, c), ces chaînes proviennent de acyl-acyl carrier protein (acyl-ACP) ou acyl-coenzyme A (acyl-CoA) (Moré *et al.*, 1996 ; Jiang *et al.*, 1998).

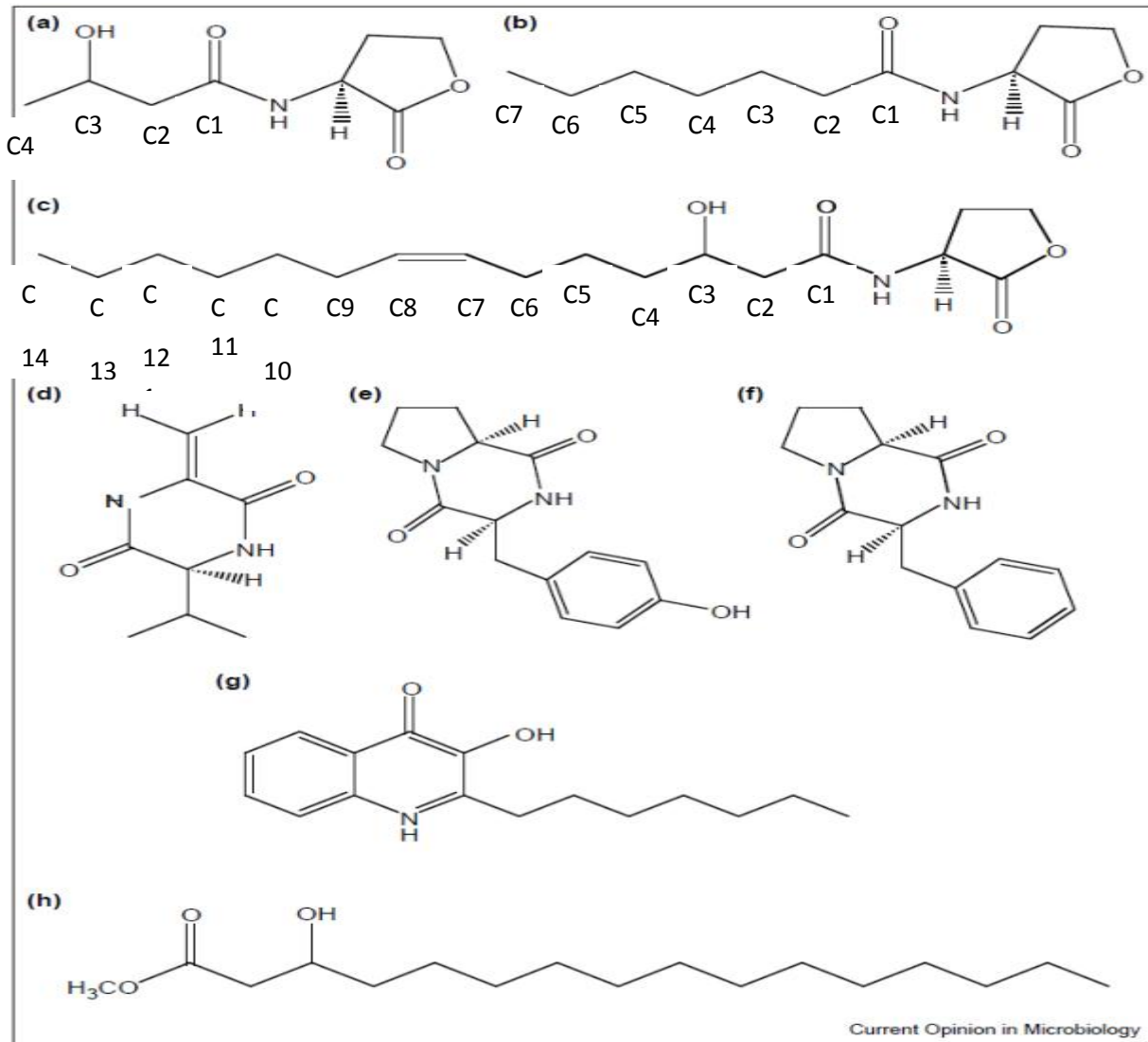
Les AHLs avec des chaînes *N*-acyl ont été identifiées récemment. Par exemple, Lithgow *et al* ont montré que chez *Rhizobium leguminosarum* : Le *N*-heptanoyl-homosérine lactone (C7-HSL, figure 1b) est produit à partir de LuxI homologue (Lithgow *et al.*, 2000).

Une seconde famille des AHLs synthases, LuxM, a été identifiée chez *Vibrio* spp : LuxM a été identifiée chez *Vibrio harveyi*, et AinS chez *Vibrio fischeri* (Bassler *et al.*, 1993 ; Hanzelka *et al.*, 1999).

Ces AHL synthases dirigent la synthèse de *N*-(3-hydroxy butanoyl)-homosérine lactone (3-hydroxy-C4-HSL ; figure 1a), et *N*-octanoyl-homosérine lactone (C8-HSL), respectivement. Malgré le manque d'homologie avec la famille LuxI, ils catalysent la formation des AHLs à partir des mêmes substrats comme les protéines LuxI. Plus récemment, il existe un troisième 3<sup>ème</sup> type des AHL synthases, HdtS, a été obtenu à partir des études sur *Pseudomonas fluorescens* F113 (Withers *et al.*, 2001).

Lorsqu'elle s'exprime chez *Escherichia coli*, *hdtS* dirige la production de trois (03) AHLs, appelées : *N*-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl) homosérine lactone (figure 1c), *N*-decanoyl-homosérine lactone (C10-HSL) et *N*-hexanoyl-homosérine lactone (C6-HSL) (Withers *et al.*, 2001).

La figure 01 englobe la plupart des molécules signales de quorum sensing détectées chez les bactéries Gram-négatives.



**Figure 01 :** Les molécules signales de quorum sensing détectées chez les bactéries Gram-négatives. (a) *N*-(3-hydroxybutanoyl) homosérine lactone (3-hydroxy-C4-HSL) produite par *Vibrio harveyi*. (b) *N*-heptanoylhomosérine lactone (C7-HSL) produite par *Rhizobium leguminosarum*. (c) *N*-(3-hydroxy-7-*cis*-tetradecenoyl) homosérine lactone (3-hydroxy-C14 : -HSL) produite par *R.leguminosarum* et *Pseudomonas fluorescens* F113. (d, e, f) ces dipeptides cycliques (diketopipérazines) sont produits par *Pseudomonas* spp : *P.aeruginosa* produit cyclo ( $\Delta$ Ala-L-Val) (d) et cyclo (L-Pro-L-Tyr) (e).

*P.fluorescens* et *P.alcaligenes* produisent cyclo (L-Phe-L-Pro) (f).

(d) a aussi été isolé dans les surnageants de *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* et *Enterobacter agglomerans*.

(g) the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS), 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone.

(h) la molécule signale de quorum sensing volatile, 3-hydroxy-palmitic acid-methyl ester, produite par *Ralstonia solanacearum* (Withers *et al.*, 2001).

### 3- La communication cellulaire chez les bactéries Gram-positives.

Le quorum sensing chez les bactéries Gram-positives est basé sur un système d'autoinduction de nature peptidique (molécules peptidiques). Ces molécules de nature peptidique interagissent avec deux systèmes de QS régulant la transcription des gènes chez ces bactéries Gram-positives (Novick, 2003).

Les peptides impliqués dans le QS des bactéries Gram-positives sont souvent reconnus grâce à des récepteurs correspondants spécifiques. Quelques exemples de systèmes de QS chez les bactéries Gram-positives :

\**Staphylococcus aureus* est l'une des espèces bactériennes Gram-positives commensales chez l'homme, par contre cette bactérie peut causer des infections telles que : les pneumonies, les ostéomyélites et d'autres infections. Le système de QS qu'utilise cette bactérie est l'un des systèmes les plus étudiés chez les bactéries Gram-positives (Novick, 2003).

La molécule signalée chez *S.aureus* est appelée : *The S.aureus Autoinducing Peptide (AIP)*. Cette molécule est codée par le gène AgrD. Cette molécule AIP est reconnue par son récepteur correspondant ArgC (Haas *et al.*, 2002 ; Reading et Sperandio, 2006).

\**Enterococcus faecalis* est une bactérie commensale du tractus gastro-intestinal, souvent la cause d'infections nosocomiales comme les infections des sites chirurgicaux et les infections du tractus urinaire (Haas *et al.*, 2002 ; Reading et Sperandio, 2006).

La cytolysine est le facteur de virulence majeur chez *E.faecalis*, ce facteur de virulence possède deux activités (bactériocine et une activité hémolytique). La cytolysine est composée de deux sous-unités : CylLL et CylLS. La cytolysine joue aussi le rôle de molécule d'autoinduction de QS (Haas *et al.*, 2002 ; Reading et Sperandio, 2006).

#### 4- La communication cellulaire inter-espèces.

##### 4-1 Autoinducteur AI-2.

Il a été proposé que le système de quorum sensing régulé par l'autoinducteur AI-2 est utilisé par les bactéries Gram-négatives et aussi les bactéries Gram-positives et que ce système peut aussi représenter un moyen possible par lequel les différentes espèces bactériennes peuvent communiquer entre elles (communication inter-espèces). L'autoinducteur AI-2 et l'enzyme responsable de sa synthèse LuxS ont été corrélés avec la pathogénicité chez une variété d'organismes (Vendeville *et al.*, 2005 ; Xavier et Bassler, 2003 ; Ahmed *et al.*, 2009 ; Ahmed *et al.*, 2007 ; Balestrino *et al.*, 2005 ; Gao *et al.*, 2009 ; Ohtani *et al.*, 2002; Armbuster *et al.*, 2010).

La découverte des antagonistes de l'autoinducteur AI-2 peut fournir un moyen possible pour atteindre une antivirulence à large spectre (Li *et al.*, 2008). Les AHLs et les peptides représentent les deux classes majeures de molécules responsables du quorum sensing chez les bactéries, utilisées par les bactéries Gram-négatives et Gram-positives, respectivement, pour la communication intra-espèces. Récemment, une famille de molécules appelée génériquement : *autoinducer-2* (AI-2) a été trouvée (Chen *et al.*, 2002).

Il a été proposé que le (AI-2) est un autoinducteur non spécifique d'espèces, cet autoinducteur assure la communication intra et inter-espèces chez les bactéries Gram-négatives et Gram-positives (Xavier et Bassler, 2003 ; Thiel *et al.*, 2009).

Le système de quorum sensing basé sur le AI-2 a été identifié pour la première fois au début des années 1990 chez la bactérie Gram-négative : *Vibrio harveyi* (Bassler *et al.*, 1994).

Il a été observé qu'une souche de la bactérie déficiente en AHL est restée capable de produire une bioluminescence même en absence de l'autoinducteur AHL naturel 3-hydroxy-C4-HSL (Lowery *et al.*, 2008).

Cela a suggéré qu'une seconde voie de quorum sensing, employant une molécule de signalisation différente, a été opérée. Ce nouvel autoinducteur dont la structure a été à l'heure inconnue, a été appelé AI-2. Il a été ensuite démontré que les fluides de cultures sans cellules (surnageants de cultures) récoltés à partir d'un nombre d'espèces bactériennes ont été capables de stimuler l'activité de AI-2 dans une souche de *V.harveyi* (Bassler *et al.*, 1997).

Cela a suggéré que le signal AI-2 peut être produit par de nombreuses espèces bactériennes. Des travaux ultérieurs ont démontré que le même gène a été responsable de la biosynthèse de AI-2 chez *V.harveyi*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* (Surette *et al.*, 1999).

Ce gène désigné *luxS*, a été retrouvé chez plus de 70 espèces bactériennes ; dans tous les cas connus, si une bactérie produit le AI-2, cela veut dire qu'elle possède un gène *luxS*, et si ce gène est inactivé, la production de AI-2 est éliminée (Lowery *et al.*, 2008).

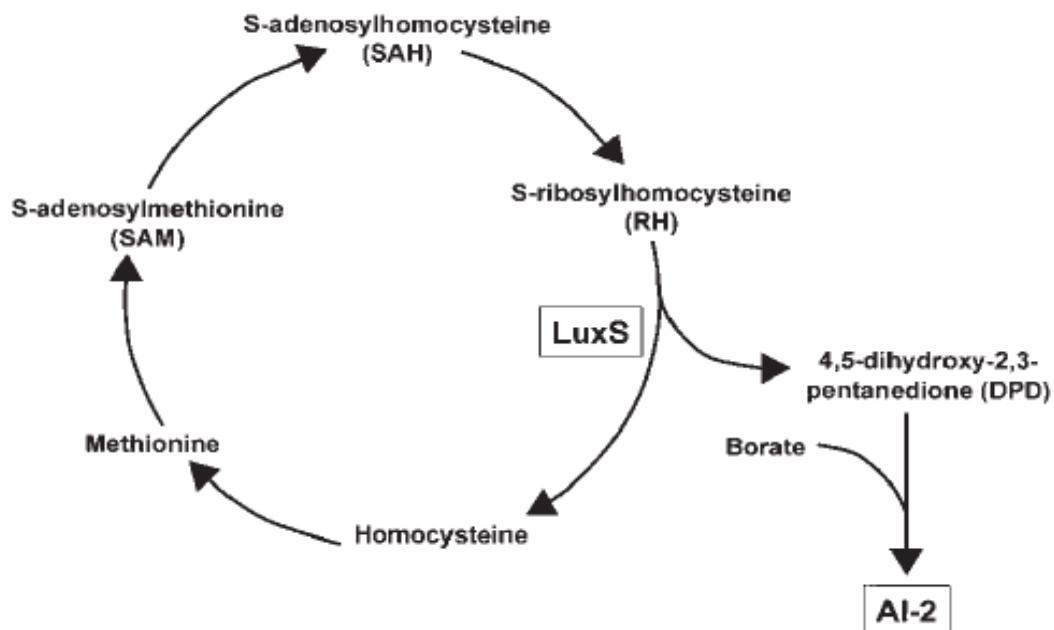
Ces observations ont conduit à la proposition que le AI-2 est une molécule de signalisation universelle pour la communication inter-espèces. Il convient de noter que le produit du gène *luxS*, l'enzyme LuxS, est supposé avoir un rôle métabolique dans les cellules, en plus d'être responsable de la biosynthèse de AI-2 (Vendeville *et al.*, 2005).

En dépit de cette controverse, il existe un nombre croissant de preuves qui montrent que le AI-2 représente en effet un langage universel pour la communication inter-espèces. Le quorum sensing basé sur le AI-2 est connu pour être beaucoup plus complexe que celui assuré par les AHLs. Le système AI-2 a été corrélé à la pathogénicité chez une variété d'organismes ; cette molécule AI-2 est connue pour réguler une multitude de processus

bactériens tels que la virulence et la formation de biofilm (Li *et al.*, 2008 ; Federle et Bassler, 2003).

L'accumulation ultérieure de l'autoinducteur AI-2 peut endommager l'ADN cellulaire et, donc, le AI-2 est extrudé de la cellule. Par ailleurs, le AI-2 peut être pris et dégradé par les cellules ultérieurement dans le but de recapturer les molécules constituantes. Surette et Bassler en 1999, ont noté que la perte de l'activité de AI-2 pourrait également résulter de la terminaison de la production. Ils ont conclu que la production de AI-2 est régulée par rapport au niveau de la disponibilité du substrat de l'enzyme LuxS et que la signalisation AI-2 reflète l'état métabolique de la cellule. Sur la base que les surnageants de culture de différentes espèces bactériennes peuvent induire la bioluminescence chez *Vibrio harveyi*, le signal AI-2 peut certainement être considéré comme un signal non-spécifique d'espèces (Surette *et al.*, 1999).

#### 4-1-1 Le système AI-2 : la synthèse du signal.



**Figure 02 :** Diagramme simplifié de la synthèse du signal AI-2 (McNab et Lamont, 2003).

L'enzyme LuxS, le produit du gène *luxS*, qui est largement conservé chez les bactéries, est responsable de la biosynthèse du signal AI-2 (Xavier et Bassler, 2005).

La conversion de S-ribosylhomocystéine (RH) en homocystéine et 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD) est catalysée par l'enzyme LuxS. La conversion de DPD en AI-2 ou en 4-hydroxy-5-méthyle-3(2H)-furanone (non montré dans le schéma) est supposée se produire spontanément (McNab et Lamont, 2003 ; Hyunjoon *et al.*, 2017).

L'enzyme LuxS, aussi appelée « S-ribosylhomocystéinase » synthétise le 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD), ce dernier subit des réarrangements spontanés pour former une variété de dérivés du DPD qui s'inter-convertissent et existent en équilibre connu sous le nom de « AI-2 pool » (Pei et Zhu, 2004).

La cyclisation de DPD génère les composés S-DHMF et R-DHMF (DHMF = 2,4-dihydroxy-2-méthyle dihydro-3-furanone) ; le R-DHMF subit une hydratation pour donner le R-THMF (THMF = 2,4-tetrahydroxy-2-méthyle tetrahydro-3-furanone) et s'il existe suffisamment de borate dans la solution, le S-THMF-borate est généré (Chen *et al.*, 2002 ; Thiel *et al.*, 2009).

#### **4-1-2 Le système AI-2 : Détection du signal et transcription des gènes.**

Les réponses au signal AI-2 chez différentes espèces bactériennes peuvent être déclenchées par différents composés du « AI-2 pool ». Puisque la nature chimique de la molécule de signalisation active présente dans le « AI-2 pool » varie entre les espèces, il n'est pas surprenant que la nature du récepteur AI-2 pour ces signaux est aussi variable. Jusqu'à ce jour, seulement trois protéines (récepteurs) qui se lient avec les composantes du signal AI-2 ont été caractérisées (Xavier et Bassler, 2005).

En 2002, Chen *et al* ont défini la structure cristalline de la protéine (récepteur) nécessaire à la reconnaissance du signal AI-2 chez *V.harveyi*, LuxP, complexée à ses ligands natifs dérivés de DPD. Ce ligand a été ainsi identifié : le S-THMF-borate (Chen *et al.*, 2002 ; Miller *et al.*, 2009).

Par ailleurs, chez les deux bactéries *S.typhimurium* et *E.coli*, la protéine LsrB est le récepteur capable de se lier à la molécule AI-2, l'analyse de la structure cristalline a révélé que le signal AI-2 actif chez *S.typhimurium* est le R-THMF (Miller *et al.*, 2004 ; Miller *et al.*, 2009).

En 2006, James *et al* ont proposé que le récepteur du signal AI-2 chez la bactérie *Actinobacillus actinomycetemcomitans* a été le RbsB, bien que la structure de la molécule AI-2 active n'a pas encore été déterminée (James *et al.*, 2006).

Il convient de noter que le R-THMF et S-THMF-borate sont deux molécules bien distinctes malgré le fait que toutes les deux sont dérivées du DPD et se convertissent rapidement en solution (Lowery *et al.*, 2008).

#### **4-2 Diffusible Signal Factor (DSF) ou Facteur Signal Diffusible.**

Il existe encore d'autres molécules de QS moins largement distribuées telles que : *bradyoxetin*, *autoinducer* chez *E.coli* (AI-3), et 2 heptyl-4-quinolone (HHQ), ces molécules ont été identifiées et caractérisées au cours des deux dernières décennies. En dehors de ces molécules de QS mentionnées ci-dessus, la molécule (DSF) *Diffusible Signal Factor*, qui a été identifiée à l'origine chez *Xanthomonas campestris pv campestris* (Xcc), représente un autre type de molécules de QS intéressant détecté chez les bactéries pathogènes Gram-négatives (Loh *et al.*, 2002 ; Diggle *et al.*, 2006 ; Barber *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 2004).

Des travaux de recherche ont démontré que les molécules signales appartenant à la famille « DSF » sont répandues (Wang *et al.*, 2004).

#### **4-2-1 Purification et caractérisation de la structure des molécules signales de la famille DSF.**

Les extraits de DSF bruts ont été initialement préparés par extraction des surnageants de culture de Xcc en utilisant 0,3 volumes de « sodium bicarbonate-equilibrated ethyl acetate ». Le protocole d'extraction a ensuite été optimisé afin d'améliorer le rendement des DSF en utilisant un volume égal d'acétate d'éthyle (Wang *et al.*, 2004).

La molécule DSF pure a été obtenue par une purification ultérieure avec « *flash column chromatography* et *high-performance liquid chromatography* » (HPLC). La structure chimique de DSF a été déterminée en utilisant « *Mass Spectrometry* » (MS) et « *Nuclear Magnetic Resonance* » (NMR) (Wang *et al.*, 2004).

Les données de la technique « *high-resolution electrospray ionization mass spectrometry* » (ESI-MS) ont suggéré une formule moléculaire de C<sub>13</sub> H<sub>23</sub> O<sub>2</sub>. L'analyse avec « *NMR spectrometry* » indique qu'il existe deux groupes CH<sub>3</sub> terminaux aux sites C-12 et C-13 et sept groupes CH<sub>2</sub> de C-4 à C-10. Il existe une double liaison avec une « *cis*-configuration » aux sites C-2 jusqu'à C-3 (Wang *et al.*, 2004).

En combinaison, ces données indiquent que la molécule DSF est une *cis-11-methyl-2-dodecenoic acid*, un nouvel acide gras  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturé (Wang *et al.*, 2004).

En plus de l'acétate d'éthyle, le chloroforme a aussi été utilisé pour l'extraction des molécules signales de la famille DSF à partir des surnageants de la culture bactérienne. Compte tenu du fait que, les acides gras existent comme des anions dans les surnageants de culture bactérienne, faibles, de base, et que ces anions sont moins solubles dans le solvant

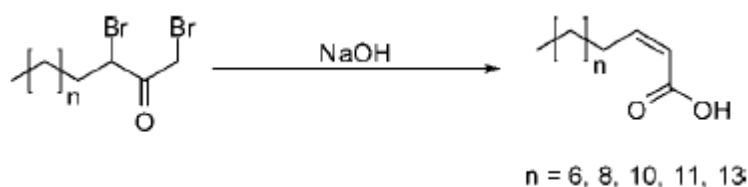
organique que les acides libres correspondants ; une étude récente a révisé le protocole d'extraction en utilisant des surnageants acidifiés pour l'extraction par solvant (Boulton *et al.*, 2004 ; Deng *et al.*, 2010).

Les résultats ont montré qu'en ajustant la valeur du pH des surnageants à ~4,0, améliorerait considérablement l'efficacité de l'extraction des molécules signales de la famille DSF (Boulton *et al.*, 2004 ; Deng *et al.*, 2010).

#### 4-2-2 Biosynthèse des molécules signales de la famille DSF.

La biosynthèse du signal DSF chez *Xcc* dépend des deux gènes : *rpfF* et *rpfB*. Ces deux gènes codent pour deux enzymes « *enoyl-CoA hydratase* » et « *long-chain fatty acyl CoA ligase* » respectivement. Le mécanisme de production des molécules signales de la famille DSF apparaît être largement conservé. Chimiquement, DSF et ses *cis*-analogues ont été synthétisés par « *Favorskii rearrangement* » (Barber *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 2004 ; Slater *et al.*, 2000),

(figure 03).



**Figure 03** : Synthèse des molécules signales de la famille DSF de configuration *cis* par

« *Favorskii Rearrangement* » (Deng *et al.*, 2011).

Les dérivés *trans* de DSF ont été synthétisés à partir de la préparation de 2-bromo fatty acids suivi par l'élimination de « *hydrobromic acids* » en utilisant une base forte comme « *potassium tert-butoxide* » (Deng *et al.*, 2011).

#### 4-2-3 Nomenclature des molécules DSF.

La première molécule signale de la famille DSF a été identifiée chez *Xcc* en 2004 et a été connue comme DSF : *cis-11-Methyl-2-dodecenoic acid* (Wang *et al.*, 2004).

Une nouvelle nomenclature a été récemment proposée dans le but de couvrir toutes les molécules signales de la famille DSF (Deng *et al.*, 2010). Par exemple : *cis-11-methyl-2-dodecenoic acid (DSF)* est désignée comme : 11-Me-C<sub>12</sub>: $\Delta^2$ .

11-Me indique un groupe méthyle sur le carbone 11 (C-11) de la chaîne carbonée de l'acide gras, suivi par la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras (C<sub>12</sub> représente une chaîne d'acide gras de 12 carbones), ensuite la position de la double liaison dans la chaîne d'acide gras ( $\Delta^2$  indique une double liaison de configuration *cis* au site 2, c-à-d entre C-2 et C-3 de la chaîne carbonée de l'acide gras) (Deng *et al.*, 2010).

Pour les molécules DSF avec une configuration *trans*, leur nomenclature suit les mêmes règles, mais en insérant un « t » à côté de la position de la double liaison, exemple :  $\Delta^{2t}$ .

$\Delta^2$  : double liaison au site 2, entre C-2 et C-3 de la chaîne carbonée de l'acide gras avec une configuration *cis* (Deng *et al.*, 2010).

$\Delta^{2t}$  : double liaison au site 2, entre C-2 et C-3 de la chaîne carbonée de l'acide gras avec une configuration *trans* (Deng *et al.*, 2010).

#### 4-2-4 Caractéristiques structurales et activité biologique des molécules DSF.

Parmi les caractéristiques structurales des molécules DSF, on a :

- La chaîne carbonée de l'acide gras avec des variations dans la longueur de la chaîne,
- La configuration de la double liaison (*cis* ou *trans*),
- La chaîne latérale.

Il s'avère que ces caractéristiques structurales peuvent contribuer à leur activité biologique et à la spécificité de la signalisation dans la communication cellulaire intra-espèces et inter-espèces. L'une des caractéristiques clés qui pourraient influencer sur l'activité de signalisation intra-espèces est la présence ou l'absence d'une double liaison et sa configuration (Wang *et al.*, 2004).

En synthétisant une gamme de dérivés de structure de DSF, Wang *et al* ont analysé les caractéristiques structurales des acides gras qui ont une importance dans le quorum sensing et la régulation de la virulence via le QS chez *Xcc*. DSF (11-Me-C<sub>12</sub>:  $\Delta^2$ ), qui contient une double liaison de configuration *cis* à la position  $\alpha$ ,  $\beta$ , a montré une activité d'environ 200 à 20000 fois plus importante qu'avec son isomère *trans* et son isomère saturé (absence de la double liaison) respectivement, dans l'induction de l'expression des gènes de virulence (Wang *et al.*, 2004).

Ces données ont démontré que la double liaison  $\alpha$ ,  $\beta$  et la configuration *cis* de l'acide gras sont essentielles pour l'activité de la signalisation (QS) chez *Xcc*. Les variations dans la substitution du groupe méthyle et la longueur de la chaîne peuvent aussi influencer sur l'activité biologique des molécules signales de la famille DSF. DSF, qui diffère de C<sub>12</sub>: $\Delta^2$  par la substitution d'un groupe méthyle au C11, a montré une importance dans l'induction de l'expression des gènes de virulence chez *Xcc* d'environ 120 fois (Wang *et al.*, 2004).

La même étude a aussi démontré que l'ajout d'un atome de carbone ou l'élimination de deux atomes de carbones dans la chaîne de l'acide gras pourrait inhiber l'activité de signalisation de la molécule par 2 à 5 fois. La comparaison de DSF avec 11-Me-C<sub>12</sub>:  $\Delta^{2,5}$  a démontré qu'une double liaison de plus cause environ ~ 20% de réduction de l'activité de la signalisation, et ceci dans l'induction de l'EPS (exopolysaccharide) et la production de xylanase chez *Xanthomonas oryzae pv oryzae* (Wang *et al.*, 2004).

Les caractéristiques structurales des molécules signales de la famille DSF ont également une incidence sur leur activité biologique dans la communication cellulaire inter-espèces. Il a été rapporté que, entre les trois molécules : DSF, C<sub>12</sub>:  $\Delta^2$ , et 11-Me-C<sub>12</sub>:  $\Delta^{2,5}$ , C'est C<sub>12</sub>:  $\Delta^2$  qui est l'inhibiteur le plus puissant de la formation du tube germinal (*germ tube formation*) par *Candida albicans*, suivi par 11-Me-C<sub>12</sub>:  $\Delta^{2,5}$  et DSF.

Une étude récente a démontré que C<sub>12</sub>:  $\Delta^2$  a été environ 10 % moins active que DSF et 11-Me-C<sub>12</sub>:  $\Delta^{2,5}$  dans l'induction de la production de l'EPS chez *Xcc*, alors que chez *Burkholderia cenocepacia*, c'est la DSF qui a été moins active par rapport aux deux autres molécules signales dans l'induction de l'expression des gènes de virulence (Deng *et al.*, 2010).

Enfin, les conclusions citées ci-dessus indiquent que l'activité biologique des molécules signales de la famille DSF dépend non seulement de leurs caractéristiques structurales mais aussi des espèces bactériennes sur lesquelles ces molécules agissent (Deng *et al.*, 2010).

Les molécules DSF sont connues pour réguler un ensemble de fonctions biologiques importantes telles que la formation du biofilm, la croissance cellulaire, la production de facteurs de virulence, qui sont indispensables à la survie et à la pathogénèse de la bactérie (Deng *et al.*, 2010).

L'identification du mécanisme de signalisation DSF largement conservé présente une évidence qui nous laisse croire que le système de QS est un mécanisme de régulation génétique de la communauté bactérienne essentiel pour la physiologie et la virulence bactérienne (Deng *et al.*, 2010).

#### **4-2-5 Effet de la molécule signalale « DSF » sur la dispersion du biofilm.**

Il existe une fonction biologique importante modulée par la molécule signalale du QS « DSF » chez Xcc, cette fonction est la dispersion du biofilm (He *et al.*, 2006 ; Dow *et al.*, 2003 ; Tao *et al.*, 2010).

La mutation du gène *rpfF* chez les deux souches de Xcc 8004 et XC1 a causé la formation d'agrégats de cellules bactériennes, et l'addition des molécules « DSF » a entraîné la suppression de l'agrégation cellulaire, suggérant un rôle crucial de la molécule DSF dans la modulation du changement des cellules de Xcc entre les formes planctoniques et de biofilm (He *et al.*, 2006 ; Dow *et al.*, 2003 ; Tao *et al.*, 2010).

RpfC et RpfG sont le récepteur et le régulateur de réponse d'origine de la molécule « DSF » respectivement.

#### **4-2-6 Rôles des molécules « DSF » dans la communication inter-espèces.**

Il a été bien établi que les molécules signalales de la famille « DSF » contrôlent un ensemble de fonctions biologiques via la signalisation intra-espèces. Toutefois, ces molécules peuvent potentiellement jouer des rôles importants dans l'écologie microbienne via la communication inter-espèces (Wang *et al.*, 2004 ; Boulton *et al.*, 2004 ; Deng *et al.*, 2010 ; Ryan *et al.*, 2008).

Une étude a démontré qu'une molécule signalale de la famille DSF : (C<sub>10</sub> : Δ<sup>2</sup>) produite par *Pseudomonas aeruginosa* n'entraîne pas uniquement la formation de son propre biofilm,

mais induit aussi la dispersion du biofilm d'autres espèces bactériennes : *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, et *Staphylococcus aureus*. En plus, le signal DSF : (C<sub>10</sub> : $\Delta^2$ ) de *P.aeruginosa* s'est avéré capable d'induire une dispersion du biofilm chez *Candida albicans*, ainsi que chez diverses bactéries (Davies et Marques, 2009).

## Chapitre II. Etude du biofilm bactérien.

### 1- Définition du biofilm.

Les bactéries peuvent former des biofilms sur n'importe quelle surface ayant un fluide contenant des nutriments. La formation du biofilm implique principalement les trois (03) composants majeurs : les cellules bactériennes, une surface solide, et un milieu fluide (Costerton *et al.*, 1987).

Le biofilm est intégré dans sa propre matrice de substances de polymères extracellulaires (EPS). Le biofilm est un mode de croissance microbienne où les communautés dynamiques des cellules en interaction sont irréversiblement attachées à un substrat solide, ainsi que les uns aux autres (Costerton *et al.*, 1994).

### 2- Les caractéristiques de base d'un biofilm.

En 1997, Caldwell *et al* ont mis en évidence quatre caractéristiques du biofilm :

- L'autopoïèse : doit posséder la capacité de l'auto-organisation.
- L'homéostasie : résister aux perturbations environnementales.
- La synergie : doit être plus efficace en association qu'en isolation.
- *The communality* : devrait répondre aux changements environnementaux comme une unité plutôt que comme des individus seuls.

L'exemple typique du biofilm est la plaque dentaire (Caldwell *et al.*, 1997).

### 3- Composition du biofilm.

Un biofilm entièrement développé est décrit comme un arrangement hétérogène de cellules microbiennes sur une surface solide. L'unité structurelle de base ; sont les

microcolonies ou les amas de cellules, est formée par les cellules bactériennes adhérentes à la surface (Wingender *et al.*, 1999).

Le biofilm est composé d'une matrice contenant des protéines, des polysaccharides, des acides nucléiques et de sel, qui représentent 85 % du volume, tandis que 15 % sont constitués de cellules (Nivens *et al.*, 2002).

Lorsque le biofilm devient mature, sa structure et sa composition sont modifiées en fonction des conditions environnementales (conditions de croissance, nature des mouvements des fluides, propriétés physico-chimiques du substrat, disponibilité des nutriments) (Donlan et Costerton, 2002).

Les canaux d'eau sont considérés comme un système circulatoire primitif dans un biofilm. Ces microcolonies ont tendance à se détacher de la communauté du biofilm et ont un grand impact dans l'infection bactérienne chronique. Au cours du processus de détachement, le biofilm transfère les cellules, les polymères, et les précipités du biofilm vers le fluide dans lequel baigne le biofilm, ce qui est important dans la formation des caractéristiques morphologiques et de la structure du biofilm mature (Stewart *et al.*, 1993).

Il est également considéré comme un mécanisme de dispersion actif (De beer *et al.*, 1994). La minéralisation du biofilm se produit lorsque les ions minéraux incluant :  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  se lient et se précipitent dans un biofilm ionique dans un environnement favorable (McLean *et al.*, 2000).

#### **4- Les facteurs affectant la formation du biofilm.**

Les trois composants impliqués dans la formation du biofilm sont :

- Les cellules bactériennes
- Le milieu fluide

- La surface solide

Les étapes de la formation du biofilm sont :

Etape 01 : la formation d'une couche conditionnée

L'adsorption de molécules inorganiques et organiques à la surface solide, formant la couche conditionnée. Durant la formation de la plaque dentaire, la surface des dents est conditionnée par la salive.

Etape 02 : l'attachement des cellules bactériennes planctoniques

C'est-à-dire l'adhésion des cellules microbiennes à cette couche (Grenier et Mayrand, 1986).

Etape 03 : la croissance bactérienne et l'expansion du biofilm

La microcolonie est formée par la monocouche de micro-organismes qui attirent des colonisateurs secondaires et donne naissance à la structure finale du biofilm (Taylor et Doyle, 1987).

Cette communauté de microorganismes métaboliquement active est un biofilm mature où les individus partagent des avantages (Bowden et Hamilton, 1998).

Deux types d'interactions microbiennes se produisent au niveau cellulaire durant la formation du biofilm : la co-adhésion et la co-agrégation (Busscher et Van der Mei, 2003).

### Chapitre III. Etude de l'espèce *Enterococcus faecalis*.

#### 1- Taxonomie et identification.

En 1930, Lancefield a classifié sérologiquement les Entérocoques comme des Streptocoques du groupe D. En 1937, Sherman a proposé un schéma de classification, dans lequel il a recommandé que le terme « *Enterococcus* » doit être utilisé spécifiquement pour les Streptocoques qui poussent à une température de croissance de 10 et 45<sup>0</sup>C, à un pH de 9,6 et en présence de 6,5 % de NaCl, et qui survivent à une température de 60<sup>0</sup>C pendant 30 minutes et qui ont la capacité de dégrader l'esculine (Murray, 1990 ; Cetinkaya *et al.*, 2000).

En 1980, basé sur les différences génétiques, les Entérocoques ont été enlevés ou supprimés du genre *Streptococcus* et placés dans leur propre genre *Enterococcus*. Les espèces telles que : *faecalis*, *faecium* et *durans* ont été retenues, mais ont été précédées par le genre *Enterococcus* à la place du genre *Streptococcus* (Cetinkaya *et al.*, 2000).

#### 2- Caractères morphologiques et cultureux.

*Enterococcus faecalis* est une bactérie, cocci, Gram-positive, ne forme pas de spore, anaérobie facultative. Les cellules d'*E.faecalis* ont une forme sphérique ou ovoïde (qui présente la forme d'un œuf) dite : cocci, et leur taille est de 0,5 à 1 µm de diamètre (Isabela *et al.*, 2004).

Le mode de regroupement des cellules de la bactérie *E.faecalis* est soit : en cellule seule, en paire, ou en courte chaînette, et sont fréquemment allongées dans la direction de la chaîne. La plupart des souches d'*E.faecalis* sont non-hémolytiques et immobiles (Isabela *et al.*, 2004).

La surface des colonies sur gélose au sang est circulaire, lisse, et entière. Le GC % de l'ADN de cette souche se situe entre 37 et 40 (Isabela *et al.*, 2004).

### 3- Virulence et pathogénèse.

*Enterococcus faecalis* est une bactérie pathogène isolée fréquemment des infections endodontiques. Plus de 90 % des infections à Entérocoques chez les humains sont causées par *E.faecalis* (Kayaoglu et Orstavik, 2004).

Les Entérocoques ont été impliqués dans les infections endodontiques. Les données des études de cultures ont révélé que la souche *Enterococcus faecalis* est occasionnellement isolée à partir des infections endodontiques primaires ; mais fréquemment isolée des échecs de traitements endodontiques (Isabela *et al.*, 2004).

*E.faecalis* est l'espèce bactérienne la plus isolée ou détectée dans les infections de la cavité buccale ou infections orales telles que : les parodontites marginales, les canaux radiculaires infectés, et les abcès périradiculaires (Kayaoglu et Orstavik, 2004 ; Isabela *et al.*, 2004).

Dans les études *in vitro*, il a été rapporté qu'*E.faecalis* peut coloniser les canaux radiculaires et survivre sans le soutien des autres bactéries (Kayaoglu et Orstavik, 2004). Après la contamination du canal radiculaire par *Enterococcus faecalis*, cette bactérie colonise les parois dentinaires sous les conditions de stress ou stressantes telles que : la déficience en nutriments ou les médicaments endodontiques, avec l'aide des fractions adhésives (Kayaoglu et Orstavik, 2004 ; Jett *et al.*, 1994).

La substance d'agrégation, les hydrates de carbone de surface ou les fragments liant la fibronectine (*fibronectin-binding moieties*), facilitent l'adhérence de l'organisme au collagène

de l'hôte et aux protéines de la matrice extracellulaire présentes dans la dentine. Les toxines extracellulaires, telle que : la cytolysine peut endommager les tissus, alors que les bactériocines telle que : AS-48, inhibent la croissance des autres bactéries (Kayaoglu et Orstavik, 2004 ; Jett *et al.*, 1994).

L'acide lipoteichoïque et la production du superoxyde ou les phéromones, peut moduler le processus inflammatoire local par la stimulation des leucocytes pour libérer plusieurs médiateurs tels que : le facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor*, les interleukines et les prostaglandines et contribuer à des dommages périradiculaires (Kayaoglu et Orstavik, 2004 ; Jett *et al.*, 1994).

L'enzyme appelée : hyaluronidase, aide à la dégradation du composé « hyaluronane » présent dans la dentine, en dissaccharides et fournit de l'énergie à la bactérie.

La gélatinase produite par *E.faecalis* contribue à la dégradation de la dent (la résorption osseuse) et à la dégradation de la matrice organique de la dentine, et par conséquent cette enzyme joue un rôle important dans la pathogénèse de l'inflammation périapicale (Kayaoglu et Orstavik, 2004 ; Jett *et al.*, 1994).

#### **4- Résistance aux antibiotiques.**

Les Entérocoques résistent à plusieurs agents antimicrobiens. Cette résistance peut être intrinsèque ou acquise via le transfert de gènes. Les gènes de résistance intrinsèque se trouvent dans le chromosome. La résistance acquise résulte soit d'une mutation dans l'ADN existant, ou bien d'une acquisition d'un nouveau gène via le transfert de plasmides et de transposons (Mundy *et al.*, 2000).

La résistance intrinsèque des Entérocoques à plusieurs agents antimicrobiens utilisés peut être un avantage pour assurer l'acquisition ultérieure de gènes codant pour une résistance

à haut niveau à plusieurs molécules d'antibiotiques telles que : les aminoglycosides, les pénicillines, la tétracycline, le chloramphénicol, et la vancomycine (Mundy *et al.*, 2000).

Ceci permet à l'organisme de survivre dans un environnement dans lequel les agents antimicrobiens sont utilisés. Certaines études ont démontré que la molécule « chlorhexidine » est très efficace contre l'espèce *Enterococcus faecalis* (Schafer et Bossmann, 2001 ; Basarani *et al.*, 2003).

En 1990, Orstavik et Haapaasalo ont démontré que la molécule « iodine-potassium iodide » apparait plus puissante et efficace contre *E.faecalis* que les molécules : « sodium hypochlorite » ou « chlorhexidine » (Orstavik et Haapasalo, 1990 ; Torabinejad *et al.*, 2003).

#### **5- Etude du Biofilm de la bactérie *E.faecalis*.**

L'une des propriétés cliniquement importantes des microorganismes endodontiques tel que *E.faecalis* est leur capacité à former des biofilms (Ricucci et Siqueira, 2010 ; Chavez, 2007).

D'après les études, parmi les différents isolats bactériens cliniques isolés des infections endodontiques, *E.faecalis* est la seule espèce qui a été largement étudiée pour sa capacité à former des biofilms (Duggan et Sedgley, 2007 ; Ahmad *et al.*, 2009).

Si les bactéries participent dans l'échange des gènes dans un biofilm via le transfert horizontal de gènes, ce processus conduisant à la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques entre les différentes espèces peut être accéléré. Comme résumé par Madson et al, les taux de transfert horizontal des gènes sont typiquement élevés dans les biofilms que dans les niches planctoniques. Par conséquent, il existe une connexion entre la formation de biofilm et le transfert horizontal de gènes (Madsen *et al.*, 2012).

*E.faecalis* est une bactérie Gram-positive, *coccus*, anaérobie facultative, et est potentiellement associée avec les infections endodontiques (Sundqvist *et al.*, 1998; Sedgley *et al.*, 2006).

Les souches cliniques d'*E.faecalis* isolées des patients ayant des endocardites infectieuses ont été significativement associées avec une plus grande formation de biofilm que les isolats cliniques non associés avec les endocardites (Mohamed *et al.*, 2004).

Ceci peut être attribué aux facteurs de virulence spécifiques tels que : la production de gélatinase et la présence de facteurs d'adhérence ; cette combinaison est associée avec la formation de biofilms plus épais (Mohamed et Murray, 2005).

*E.faecalis* adhéree à la dent peut résister à l'hydroxyde de calcium pendant plus de 10 jours par la formation de biofilm. Ceci aide *E.faecalis* à résister contre la destruction en rendant la bactérie 1000 fois plus résistante à la phagocytose et aux anticorps. *E.faecalis* a la capacité de former le biofilm et peut résister à l'hydroxyde de calcium en maintenant l'homéostasie du pH, mais à un pH de 11.5 ou plus, *E.faecalis* est incapable de survivre (Sedgley *et al.*, 2005).

#### Chapitre IV. Les systèmes de communication cellulaire (quorum sensing) chez la bactérie *E.faecalis*.

Le système de QS chez les bactéries Gram-positives est basé sur les peptides cycliques. Chez *E.faecalis*, la molécule signalée appelée : « *Gelatinase Biosynthesis-Activating Pheromone* » ou (GBAP) est un peptide autoinducteur impliqué dans le système *fsr* de quorum sensing chez *E.faecalis* (Bourgogne *et al.*, 2006 ; Gutschik *et al.*, 1979 ; McAleese *et al.*, 2001 ; Jacob et Hobbs, 1974 ; Klibi *et al.*, 2007 ; Murray *et al.*, 1993).

Le système *fsr* chez *E.faecalis* contrôle l'expression des protéases extracellulaires responsables de la pathogénicité, la gélatinase, et une sérine protéase via un mécanisme de QS (Klibi *et al.*, 2007 ; McGavin *et al.*, 1997 ; Megran, 1992) et des études récentes ont suggéré que ce système de QS chez *E.faecalis* régule aussi la formation du biofilm ; ainsi que la régulation d'autres gènes de virulence (Bourgogne *et al.*, 2006 ; Gutschik *et al.*, 1979 ; McAleese *et al.*, 2001).

De la traduction du gène *fsrD*, résulte la production de la protéine (GBAP). La protéine (GBAP) est souvent produite de la traduction du gène *fsrD*, et non pas du gène *fsrB* (Kenneth *et al.*, 2011).

La rupture (mutation) du gène *fsrD*, entraîne une perte de la production de la protéine GBAP.

Le système *fsr* de quorum sensing chez la bactérie *E.faecalis* est composé de quatre composantes, comme celles retrouvées dans le système *agr* chez les Staphylocoques et chez d'autres génomes de bactéries Gram-positives, ces composantes sont comme suit :

\*Un propeptide *AIP*, codé par le gène (*FsrD*).

\*Une enzyme appelée : *cysteine protease-like*, codée par le gène (*FsrB*).

\*Deux (02) protéines dites : *sensory proteins*, codées par les deux (02) gènes (*FsrC* et *FsrA*) (Kenneth *et al.*, 2011).

Le système de QS chez *E.faecalis* est régulé par trois (03) types de gènes appelés : *fsrB*, *gelE*, *sprE*. Ces trois (03) types de gènes responsables du mécanisme de quorum sensing chez *E.faecalis* sont étroitement liés avec la formation de biofilm chez *E.faecalis* (Lu *et al.*, 2013).

Il existe un autre système de QS chez *E.faecalis* basé sur le gène LuxS. Ce gène est impliqué dans la production d'une enzyme qui catalyse la production de la molécule signal ou l'autoinducteur (AI-2). Il est bien connu que les bactéries utilisent le système de QS afin de coordonner l'expression des gènes en contrôlant la concentration des molécules connues sous le nom d'autoinducteurs ou (AI). Shao *et al* en 2012, ont confirmé dans leur étude, la présence d'un système de QS basé sur le gène LuxS et la molécule AI-2 chez une souche d'*E.faecalis* V583 résistante à la vancomycine (Shao *et al.*, 2012).

Ils ont confirmé que l'addition de la molécule AI-2 à la souche *E.faecalis* a provoqué l'expression de 15 protéines différentes chez la souche, telles que : les protéines impliquées dans le métabolisme, la traduction, la production de l'énergie et la biogénèse (biosynthèse) de la paroi cellulaire (Shao *et al.*, 2012).

Les enzymes : « *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* » et « *malate dehydrogenase* » sont associées avec le métabolisme des carbohydrates et la production de l'énergie, ces deux enzymes ont été positivement régulées suite à une induction par la molécule AI-2. De plus, l'addition de l'autoinducteur AI-2 à la souche d'*E.faecalis* a négativement régulé les enzymes : « *acetyl-coenzyme A carboxylase* » et « *ornithine carbamoyltransferase* ». Ces deux (02) dernières enzymes sont les enzymes clés impliquées dans le métabolisme d'*E.faecalis* (Shao *et al.*, 2012).

Toutes ces informations citées ci-dessus suggèrent que la signalisation basée sur l'autoinducteur (AI-2) peut jouer un rôle dans la régulation d'un grand nombre de propriétés métaboliques importantes chez *E.faecalis*. L'autoinducteur AI-2 joue aussi un autre rôle chez *E.faecalis* en régulant la formation de biofilm, car l'addition de la molécule AI-2 à la souche *E.faecalis* V583 a favorisé la formation de biofilm. En conclusion, le système de QS chez *E.faecalis* basé sur LuxS/AI-2 joue un rôle important chez la souche *E.faecalis* résistante à la vancomycine (Shao *et al.*, 2012).

Il est bien connu que la capacité ou l'aptitude de certaines souches bactériennes à former les biofilms a été associée avec la virulence chez un nombre de pathogènes tel que : *Enterococcus faecalis*. Une association entre la formation de biofilm et la virulence a été rapportée pour *E.faecalis*. Cette bactérie Gram-positive a été récemment reconnue comme étant une cause des infections nosocomiales (Donlan, 2002 ; Richards *et al.*, 2000).

Il est évident que la majorité des isolats cliniques d'*E.faecalis* possèdent l'aptitude de formation de biofilm *in vitro* (Mohamed *et al.*, 2004 ; Toledo *et al.*, 2001).

En 2004, Hancock et Perego ont rapporté que l'activité d'une seule enzyme contrôlée par un seul système de signalisation ou appelé encore système de QS, joue un rôle clé dans la formation de biofilms par la souche *E.faecalis* (Hancock et Perego, 2004). Cette enzyme clé est : « la gélatinase » (Barrett *et al.*, 1998).

Cette gélatinase dégrade un large spectre de substrats *in vitro*, tels que : la caséine, la gélatine, l'hémoglobine, le collagène (Makinen *et al.*, 1989 ; Waters *et al.*, 2003).

L'expression du gène codant pour la gélatinase appelé : *gelE*, est dépendante des gènes *fsr* responsables du système de QS (Qin *et al.*, 2000 ; Qin *et al* 2001).

Hancock et Perego ont pu déterminer un rôle pour les gènes *fsr*, ainsi que le gène *gelE* dans la formation de biofilm. Enfin, comme la formation de biofilm, la gélatinase a été associée avec la virulence (Singh *et al.*, 1998). Donc, le système de QS chez *E.faecalis* régule la formation de biofilm par l'intermédiaire de l'enzyme responsable « la gélatinase » (Carniol et Gilmore, 2004).

### **Chapitre V. Intérêt du quorum sensing.**

Le Quorum Sensing en biologie des procaryotes signifie la capacité d'une bactérie à détecter l'information des autres cellules dans une population lorsque cette population atteint une certaine densité cellulaire dite « Quorum ». Ce phénomène de QS ou de communication intercellulaire est basé sur le principe suivant : lorsqu'une seule cellule bactérienne produit des molécules signales appelées : « Autoinducteurs » dans l'environnement, leur concentration est trop faible pour être détectée par les autres cellules. Cependant, lorsqu'un nombre suffisant de cellules bactériennes est présent, la concentration des autoinducteurs atteint un certain niveau permettant aux cellules bactériennes de détecter une masse cellulaire critique et en réponse, activer ou désactiver les gènes cibles (Vasil, 2003).

La découverte de la communication intercellulaire chez les bactéries nous a conduit à la connaissance que les bactéries sont capables d'organiser une activité coordonnée. Cette capacité de comportement collectif comme un groupe représente des avantages évidents : par exemple la capacité de migrer vers un environnement meilleur (c'est-à-dire un meilleur apport en nutriments), et d'adapter de nouveaux modes de croissance tels que : la sporulation, ou la formation de biofilm. Ceci peut offrir une protection contre les agents nuisibles bactéricides.

À travers l'utilisation de ces autoinducteurs, les bactéries peuvent réguler leur comportement selon la densité cellulaire de la population (De Kievit et Iglewski, 2000).

Il est maintenant connu qu'une portion significative du génome bactérien (4 à 10 %) et du protéome ( $\geq 20\%$ ) peut être influencée par le Quorum Sensing. Ceci implique que le Quorum Sensing est un mécanisme utilisé par les bactéries pathogènes pas uniquement pour moduler la production des facteurs de virulence mais aussi pour l'adaptation aux demandes métaboliques de la vie en communauté (Sifri, 2008 ; Arevalo-Ferro *et al.*, 2003).

Le Quorum Sensing est un mécanisme de régulation utilisé par plusieurs bactéries Gram-négatives et Gram-positives pour répondre aux facteurs variant en fonction du changement de la densité de la population microbienne et l'expression de gènes spécifiques. Le Quorum Sensing offre aux bactéries pathogènes un mécanisme pour minimiser les réponses immunitaires de l'hôte en retardant la production des tissus endommageant les facteurs de virulence jusqu'à ce qu'un nombre suffisant de bactéries se prépare à envahir les mécanismes de défense de l'hôte et établir l'infection (Eberhard, 1972).

Le Quorum Sensing est utilisé pour réguler la conjugaison bactérienne (le transfert d'ADN) chez *E. faecalis* (England *et al.*, 1999 ; Kleerebezem *et al.*, 1997).

Il est connu que le Quorum Sensing joue un rôle important dans la formation de biofilm mature (Vasil, 2003).

De plus, le Quorum Sensing est une nouvelle cible dans la thérapie antimicrobienne. La découverte qu'un large spectre d'organismes utilise le système de Quorum Sensing pour contrôler la production des facteurs de virulence rend le système de QS une cible intéressante pour la découverte de nouvelles thérapies anti-virulence (Quorum Quenching). (Kaufmann *et al.*, 2011).

*Matériels &  
Méthodes*

## 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.

Les examens bactériologiques ont été réalisés au sein du laboratoire de recherche spécialisé dans les biofilms et la biocontamination des matériaux (LBBM) de l'Université Badji Mokhtar Annaba, 23000 Annaba, Algérie.

Les isolats ont été cultivés sur le milieu (gélose M17) ou le milieu TSA (*Trypticase Soy Agar*) (Sigma-Aldrich) et incubés à 37<sup>0</sup>C pendant 24 à 48 heures en anaérobiose ; ces conditions d'anaérobiose ont été créées en utilisant une jarre d'anaérobiose contenant 1 à 2 sachets générateurs de gaz (85% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) (*BD Gas Pak Anaerobe Generating Container System*), car l'espèce *E.faecalis* est anaérobie facultative. Le bouillon de culture M17 (Sigma-Aldrich) a été utilisé afin de préparer les cultures liquides d'*E.faecalis* (Kristich *et al.*, 2004).

Les cultures liquides d'*Enterococcus faecalis* en bouillon M17 ont été réensemencées sur une gélose sélective : bile esculine azide (BEA).

- L'azide de sodium provoque l'inhibition des bactéries contaminantes à Gram négatif.
- La bile de bœuf empêche la croissance des bactéries à Gram positif.
- Les entérocoques hydrolysent l'esculine en glucose et en esculétine.

Ce dernier composé forme un complexe noir en présence des ions ferriques apportés par le citrate de fer. L'incubation est réalisée en anaérobiose à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, l'examen macroscopique est réalisé sur les colonies obtenues à la surface du milieu gélosé.

Les isolats suspectés d'appartenir au genre *Enterococcus* ont été immédiatement vérifiés par un examen microscopique au microscope optique après coloration de Gram. L'analyse microscopique après coloration de Gram permet de déterminer la morphologie des bactéries, leur mode de regroupement le type de Gram ainsi que la pureté de la souche. Les entérocoques sont des bactéries Gram positives de forme ovoïde qui se regroupent en diplocoque ou en courtes chainettes.

Le test de la catalase. Ce test est fondamental pour orienter l'identification des coques à Gram positif. La catalase est une enzyme qui empêche l'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette enzyme permet de catalyser l'hydrolyse de l'eau oxygénée en libérant de l'oxygène. Ce test est réalisé en prélevant une quantité suffisante de culture et en la mettant en contact d'eau oxygénée, la réaction positive se manifeste par un dégagement d'oxygène sous forme de bulles de gaz (Schleifer and Kilpper-Balz, 1984 ; Schleifer and Kilpper-Balz, 1987 ; Leclerc *et al.*, 1996 ; Manero and Blanch, 1999).

## **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). Le système API 20 Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques sous forme de 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres. Ce système permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plus part des streptocoques, entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants.

Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré.

La souche *E.faecalis* a été mise en culture sur 2 boites de gélose Columbia au sang de mouton.

- l'une est inoculée par méthode d'épuisement afin de pouvoir déterminer le type d'hémolyse ce qui constitue le 21ème résultat permettant l'identification par galerie API 20 Strep.
- l'autre boite de gélose au sang frais sera inoculée par inondation afin d'avoir une biomasse suffisante pour l'ensemencement de la galerie biochimique.

Une fois les boites incubées en anaérobiose à 37°C durant 24 heures, la galerie a été inoculée suivant les recommandations du fabricant puis incubée à 37°C en aérobie

pendant 4 heures à 4 heures 30 minutes pour une première lecture et 24 heures si nécessaire pour une deuxième lecture. Après incubation de la galerie, toutes les réactions ont été notées sur la fiche des résultats. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique en recherchant le profil numérique obtenu dans la liste des profils (Winston *et al.*, 2004 ; Zoletti *et al.*, 2006).

### **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.

Nous avons utilisé cette technique: la spectrométrie de masse ou (MALDI-TOF) : (MALDI : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*, TOF : *Time Of Flight*) afin de confirmer l'identification de la souche.

#### **\*Description de la technique.**

L'introduction récente de cette technique de spectrométrie de masse (MALDI-TOF) en bactériologie médicale a changé la manière d'identification des micro-organismes isolés d'échantillons biologiques. Cette technique d'analyse a remplacé les méthodes d'identification phénotypique traditionnelles. Comparée à ces dernières, la spectrométrie de masse nous a permis en moyenne de réduire le délai d'identification des micro-organismes. L'identification exacte de l'espèce bactérienne dépend de la richesse des banques de spectres, aujourd'hui encore incomplètes. L'incrémentation régulière de nouvelles données devrait cependant permettre d'atteindre rapidement une plus grande spécificité. Enfin, la spectrométrie de masse (MALDI-TOF) est une méthode rapide et fiable pour l'identification des microorganismes d'intérêt médical. Si la non-exhaustivité des banques de spectre ne permet pas encore l'identification de toutes les bactéries rencontrées en bactériologie

médicale, l'incrémentation de nouvelles données permettra sans doute, dans un avenir proche, d'atteindre une grande spécificité (Carbonnelle *et al.*, 2007 ; Nagy *et al.*, 2009).

Dans la présente étude, la technique de la spectrométrie de masse ou MALDI-TOF basée sur l'étude du déplacement d'entités ioniques dans des champs électromagnétiques nous a permis l'identification de l'espèce bactérienne étudiée *E.faecalis* grâce à l'analyse de son contenu protéique (Claydon *et al.*, 1996). L'appareil utilisé est le MALDI-TOF Bruker Microflex.

L'ionisation de l'échantillon est essentielle et réalisée grâce à une matrice, en général, un dérivé de l'acide cinnamique, qui permet l'ionisation et la désorption homogène de l'échantillon biologique (colonie d'*E.faecalis* de 24 heures prélevée à partir d'un milieu de culture gélosé M17) avec lequel elle est co-cristallisée sur une surface métallique. La source d'énergie est un faisceau laser pulsé émettant dans le domaine des ultraviolets. Les ions ainsi générés à partir d'une colonie d'*E.faecalis* finement étalée sur la cible en acier, sont séparés en fonction de leur temps de vol (TOF) ou *Time Of Flight*, c'est-à-dire la mesure du temps qu'ils mettent, lorsqu'ils sont soumis à une tension accélératrice pour parcourir la longueur du tube de vol. La zone de vol étant hors du champ électrique, la séparation des ions ne dépend que de la vitesse acquise lors de la phase d'accélération. Ainsi, les ions de rapport masse sur charge ( $m/z$ ) le plus petit parviendront au détecteur les premiers. Pour chaque groupe d'ions de même rapport  $m/z$ , un signal est enregistré au niveau du détecteur sous la forme d'une fonction temps/intensité, l'ensemble des pics ainsi enregistrés constituant un spectre de masse. Le principal avantage de la spectrométrie de masse est le gain de temps significatif pour l'identification des bactéries puisqu'il suffit de quelques minutes à partir du prélèvement d'une colonie isolée sur un milieu de culture solide pour obtenir une identification sécurisée au niveau de l'espèce, là où vingt-quatre heures supplémentaires sont nécessaires avec les techniques d'identification phénotypiques (Fenselau and Demirev, 2001).

## 2- Etude de l'effet de certaines molécules signales de quorum sensing appelées (AHLs) : N-Acyl Homoserine Lactones sur la formation de biofilm d'*E.faecalis*.

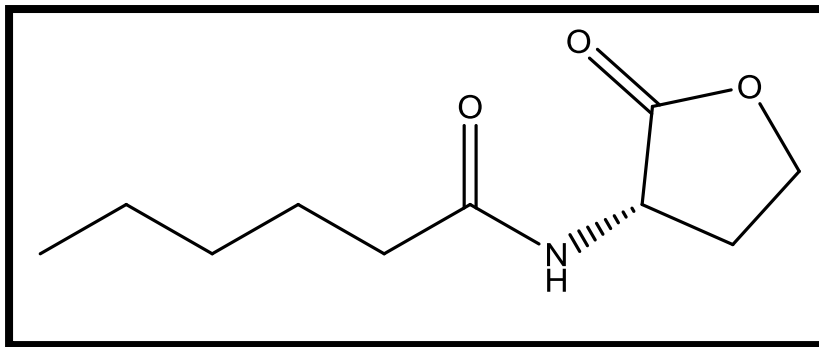
La technique de quantification de biofilm a été menée en collaboration avec le laboratoire de microbiologie, Faculté de biologie, Université de Séville, 6-41012 Séville, Espagne.

### 2-1 Molécules AHLs.

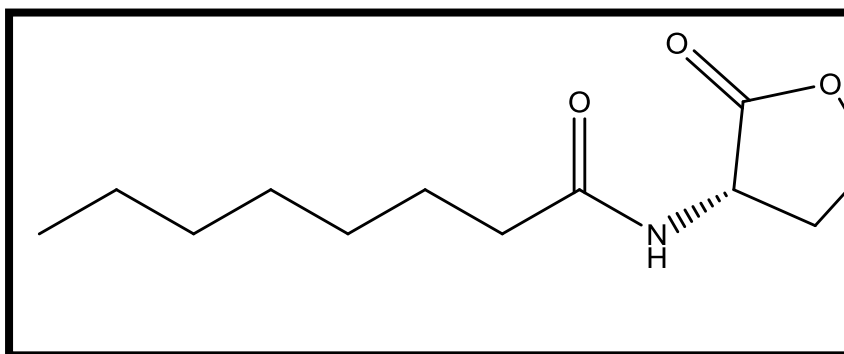
Les molécules signales AHLs de quorum sensing utilisées dans la présente étude ont été fournies par Sigma-Aldrich ; et sont disponibles commercialement. Deux (02) molécules signales AHLs ont été testées :

\*La (C<sub>6</sub>-HSL) : N-hexanoyl-L-homoserine lactone (Figure 04)

\*La (C<sub>8</sub>-HSL) : N-Octanoyl-L-homoserine lactone (Figure 05).



**Figure 04** : Structure biochimique de la molécule C<sub>6</sub>-HSL (Chen *et al.*, 2013).



**Figure 05** : Structure biochimique de la molécule C<sub>8</sub>-HSL (Chen *et al.*, 2013).

Nous avons étudié l'effet de chaque molécule AHL citée ci-dessus sur la formation de biofilm de la bactérie Gram-positif *E.faecalis*. Le volume de chaque molécule AHL ajoutée à la culture liquide d'*E.faecalis* dans le bouillon M17 en microplaque a été de 1 µL.

## **2-2 Formation de biofilm d'*E.faecalis* en absence et en présence des molécules AHLs.**

-Inoculation de la microplaque: L'inoculum a été préparé à partir d'une culture liquide d'*E.faecalis* en bouillon M17 à 1 % glucose. Puis, 200 µL de cette culture liquide ont été ajoutés dans chaque puits de la microplaque (Christensen *et al.*, 1985 ; Kennedy and O'Gara ; 2004 ; Stepanovic *et al.*, 2007). Les microplaques utilisées pour la formation de biofilm étaient toutes en polystyrène, stériles, à 96 well (96 puits) (Sterilin Limited, U.K).

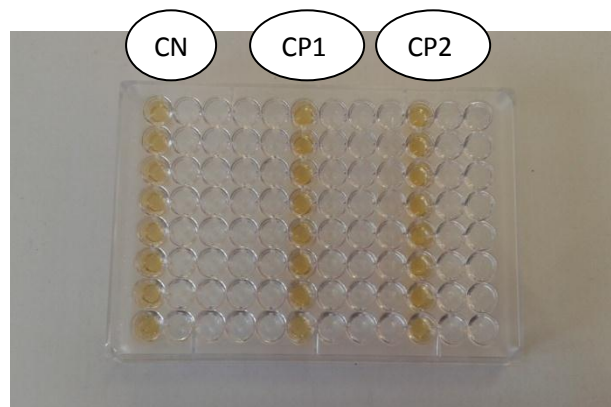
**-Inoculation sans les molécules AHLs** appelée : Contrôle Négatif (CN), chaque puits contient : 100 µL de la culture d'*E.faecalis* en bouillon M17 à 1 % glucose + 100 µL de bouillon M17 à 1 % glucose frais et stérile. La densité optique initiale mesurée à une longueur d'onde de 600 nm = 0,2.

**-Inoculation avec les molécules AHLs** appelée : Contrôle Positif (CP1 et CP2), chaque puits contient: 100 µL de la culture d'*E.faecalis* en bouillon M17 à 1 % glucose ( $DO_{600} = 0,2$ ) + 99 µL de bouillon M17 à 1 % glucose frais et stérile + 1 µL de la molécule AHL utilisée (C<sub>6</sub>-HSL ou C<sub>8</sub>-HSL) respectivement dans chaque puits [le contrôle positif 1 (CP1) contient la molécule C<sub>6</sub>-HSL et le contrôle positif 2 (CP2) contient la molécule C<sub>8</sub>-HSL].

**Tableau 1 :** Ensemencement de la microplaque en présence et en absence des molécules AHLs.

<b>Contrôle Négatif (CN)</b> <b>(sans AHLs)</b>	<b>Contrôle Positif 1 (CP1)</b> <b>(avec C6-HSL)</b>	<b>Contrôle Positif 2 (CP2)</b> <b>(avec C8-HSL)</b>
100 µL culture <i>E.faecalis</i> en bouillon M17 à 1 % glucose  + 100 µL de bouillon M17 à 1 % glucose stérile	100 µL culture <i>E.faecalis</i> en bouillon M17 à 1 % glucose  + 99 µL bouillon M17 à 1 % glucose stérile  + 1 µL C6-HSL	100 µL culture <i>E.faecalis</i> en bouillon M17 à 1 % glucose  + 99 µL bouillon M17 à 1 % glucose stérile  + 1 µL C8-HSL

La microplaque inoculée (figure 06) a été ensuite incubée pendant 48 heures à 37°C en anaérobiose en utilisant le système BD Gas Pak Anaerobe Generating System.

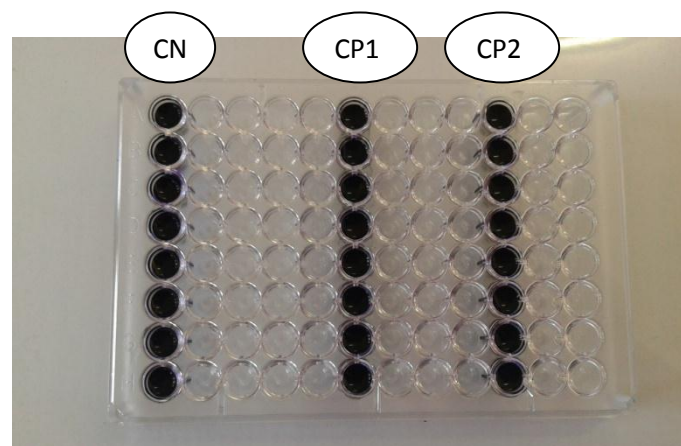


**Figure 06 :** Inoculation de la microplaque.

-Rinçage de la microplaque: Après incubation, les puits de la microplaque ont été vidés de la culture liquide d'*E.faecalis*, puis rincés trois (03) fois avec une solution saline stérile composée de (NaCl à 0,9 %).

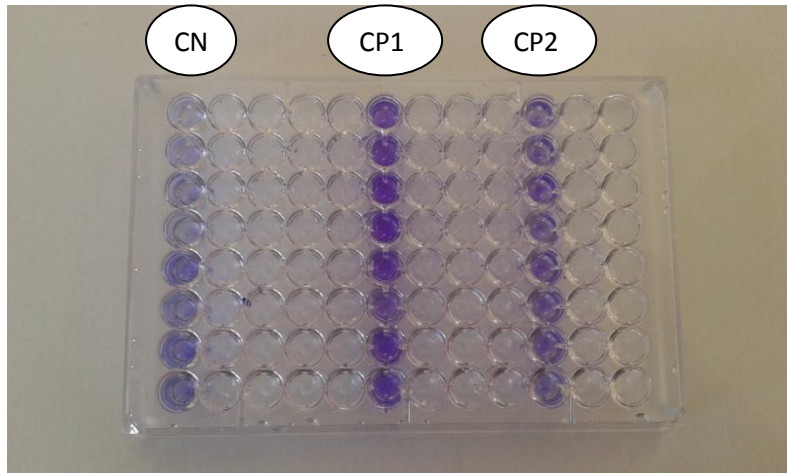
-Fixation du biofilm: Après le rinçage, les cellules bactériennes attachées ou adhérentes sur les parois des puits de la microplaque ont été fixées par séchage, en l'exposant à un air chaud à 56<sup>0</sup>C pendant 30 minutes.

-Coloration du biofilm: La couche de biofilm fixée et formée dans les parois et le fond des puits a été colorée (200 µL de cristal violet à 0,1 % dans chaque puits), (figure 07) et laisser réagir pendant 30 minutes à une température ambiante (Seneviratne *et al.*, 2013).



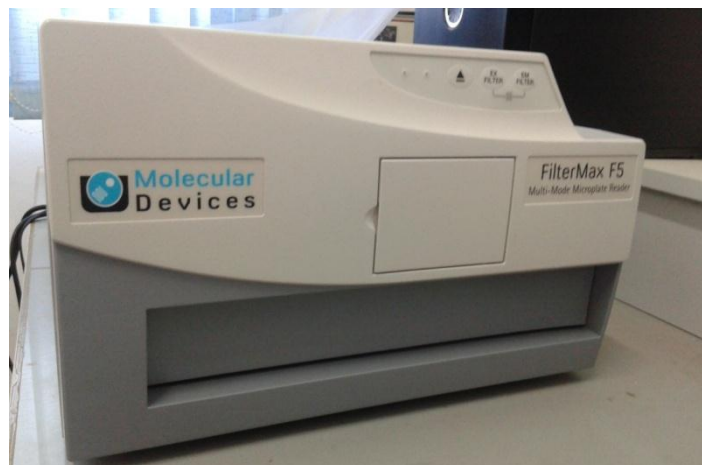
**Figure 07 :** Coloration du biofilm.

-Décoloration du biofilm: Après coloration, les puits ont été rincés en plaçant la microplaque sous l'eau courante du robinet jusqu'à disparition du colorant et la microplaque a été séchée à l'air libre et à température ambiante. Ensuite, le colorant attaché aux cellules du biofilm a été solubilisé avec de l'alcool à (95 % d'éthanol) en ajoutant 200 µL par puits (figure 08). Après avoir rempli les puits de la microplaque avec le solvant (éthanol), la microplaque a été couverte avec un couvercle afin de minimiser le phénomène d'évaporation du solvant et a été laissée au moins 30 minutes à une température ambiante (Branda *et al.*, 2005).



**Figure 08 :** Décoloration du biofilm.

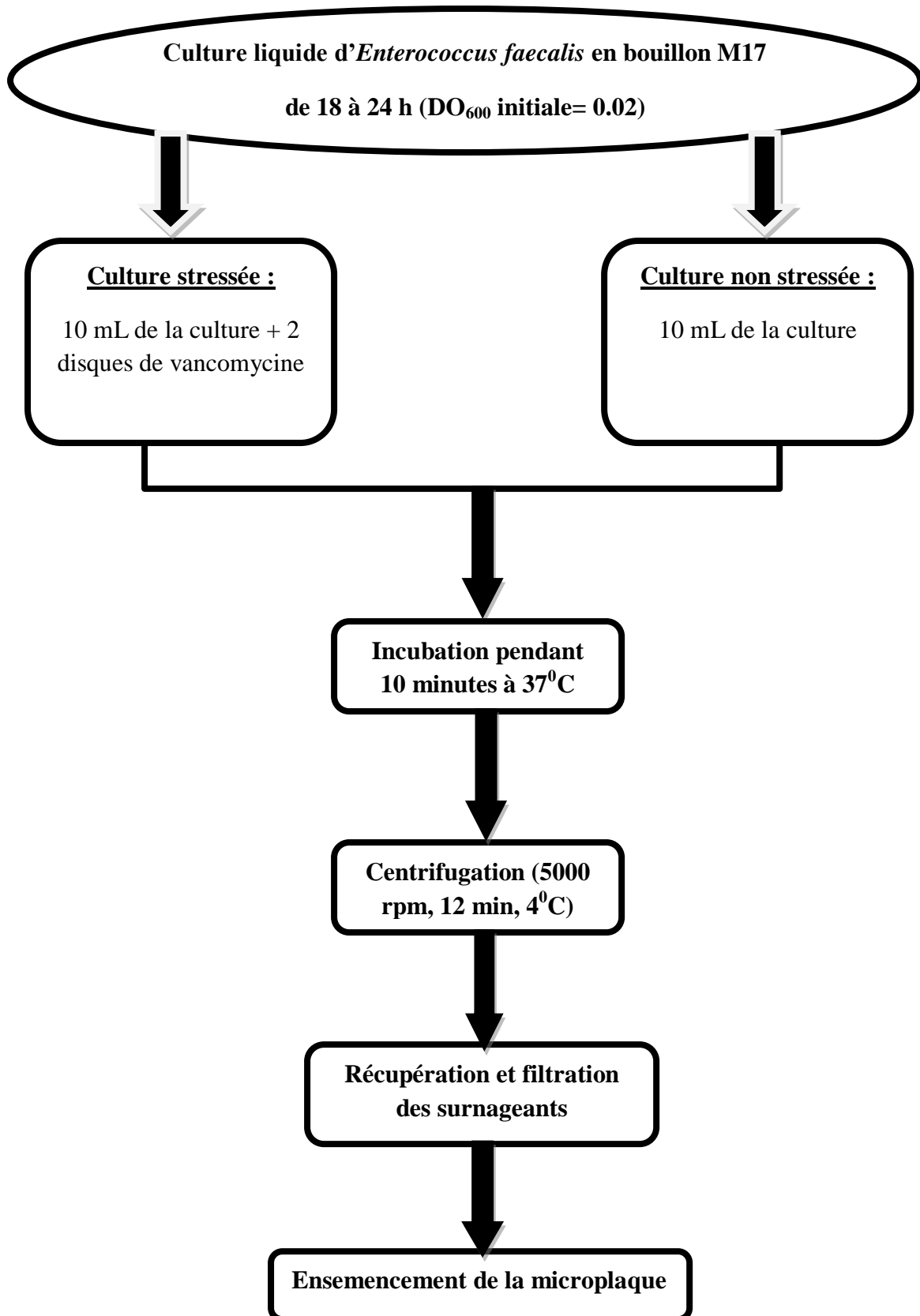
-Quantification du biofilm: à l'aide d'un lecteur automatique de microplaques (figure 09), la densité optique à 570 nm ( $DO_{570}$ ) a été mesurée dans chaque puits coloré avec le cristal violet. La ( $DO_{570}$ ) a été mesurée afin d'évaluer la capacité de la souche *E.faecalis* à former le biofilm dans chaque puits. De plus, la moyenne des valeurs de la ( $DO_{570}$ ) obtenue dans chaque ligne verticale de la microplaque (la ligne verticale dans la microplaque est composée de 8 puits) a été calculée.



**Figure 09 :** Lecteur de microplaques (Molecular Devices, USA).

### **3- Influence de la présence de la vancomycine (stress chimique) sur la formation de biofilm d'*E.faecalis*.**

Dans ce protocole expérimental, nous avons analysé l'effet d'un stress par un antibiotique (la vancomycine, la charge du disque de vancomycine était de 5 µg) sur une probable production de molécules signales par la souche *E.faecalis*. L'effet du stress sur la production de molécules de quorum sensing a été vérifié par mesure de la densité optique à 570 nm ( $DO_{570}$ ), c'est-à-dire par la quantification de la formation de biofilm de la souche *E.faecalis* en présence d'un surnageant de culture non stressée et en présence d'un surnageant de culture stressée (une culture d'*E.faecalis* ayant subi un stress chimique par l'antibiotique). La figure 10 résume le protocole expérimental et le tableau 02 détaille l'ensemencement de la microplaque par le surnageant de la culture non stressée et le surnageant de la culture stressée.



**Figure 10:** Protocole expérimental réalisé pour analyser l'effet du stress sur le système de quorum sensing et le mécanisme de formation de biofilm chez *E. faecalis*.

**Tableau 02:** Ensemencement de la microplaque par le surnageant de culture stressée et le surnageant de culture non stressée.

**Préparation d'une suspension d'*E.faecalis* en bouillon M17**

( $DO_{600} = 0,02$ )



Test	Témoin	Sans stress	Avec stress
Composition biochimique	50 µL suspension	50 µL suspension	50 µL suspension
		50 µL surnageant de culture non stressée	50 µL surnageant de culture stressée
		25 µL cocktail anti-protéasique	25 µL cocktail anti-protéasique
	100 µL bouillon M17	25 µL bouillon M17	25 µL bouillon M17

La microplaque a été incubée à 37<sup>0</sup>C pendant 24 heures et a été ensuite traitée selon le protocole des pages 46-47.

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

La technique de détection de molécule signal produite chez *E.faecalis* a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de microbiologie, Faculté de biologie, Université de Séville, 6-41012 Séville, Espagne.

### **4-1 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  $\beta$ -galactosidase. Lorsque cette souche *A.tumefaciens* (pZLR4) détecte une molécule AHL, la transcription du gène de la  $\beta$ -galactosidase est activée et l'enzyme  $\beta$ -galactosidase est produite, cette enzyme clive son substrat chromogène (X-Gal), cette dégradation du substrat se traduit par la libération d'une riche couleur bleue pouvant être détectée par vision du milieu.

### **4-2 Milieu de culture.**

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

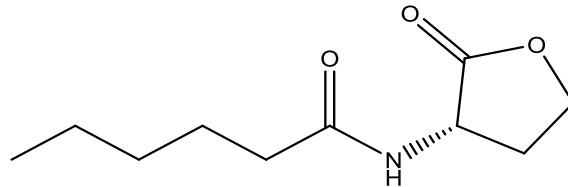
### **4-3 Le substrat chromogène (X-Gal).**

Le X-Gal est un substrat chromogène appelé : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside. Le X-Gal est un substrat chromogène pour l'enzyme  $\beta$ -galactosidase, ce substrat produit une riche couleur bleue pouvant être détectée facilement par vision du milieu.

### **4-4 La molécule signal AHL dite : témoin ou « *control* ».**

HHL50 : La ( $C_6$ -HSL) : N-hexanoyl-L-homoserine lactone (figure 11), cette molécule signal a été obtenue par extraction dans l'acétate d'éthyle et a été préalablement préparée. L'extraction des molécules AHLs a été réalisée comme décrit par Shaw *et al* à partir des

surnageants de culture de bactéries Gram-négatives avec 3 volumes d'acétate d'éthyle, ensuite les extraits ont été remis en suspension dans 500  $\mu\text{L}$  d'acétate d'éthyle (Nievas *et al.*, 2012). Cette molécule a été utilisée comme témoin pour la détection de la molécule AHL par la souche *biosensor A.tumefaciens* (pZLR4) se traduisant par la production d'un halo bleu dans la gélose.



**Figure 11** : Structure biochimique de la molécule C<sub>6</sub>-HSL (Chen *et al.*, 2013).

#### 4-5 Détection de la molécule signal produite par *E.faecalis*.

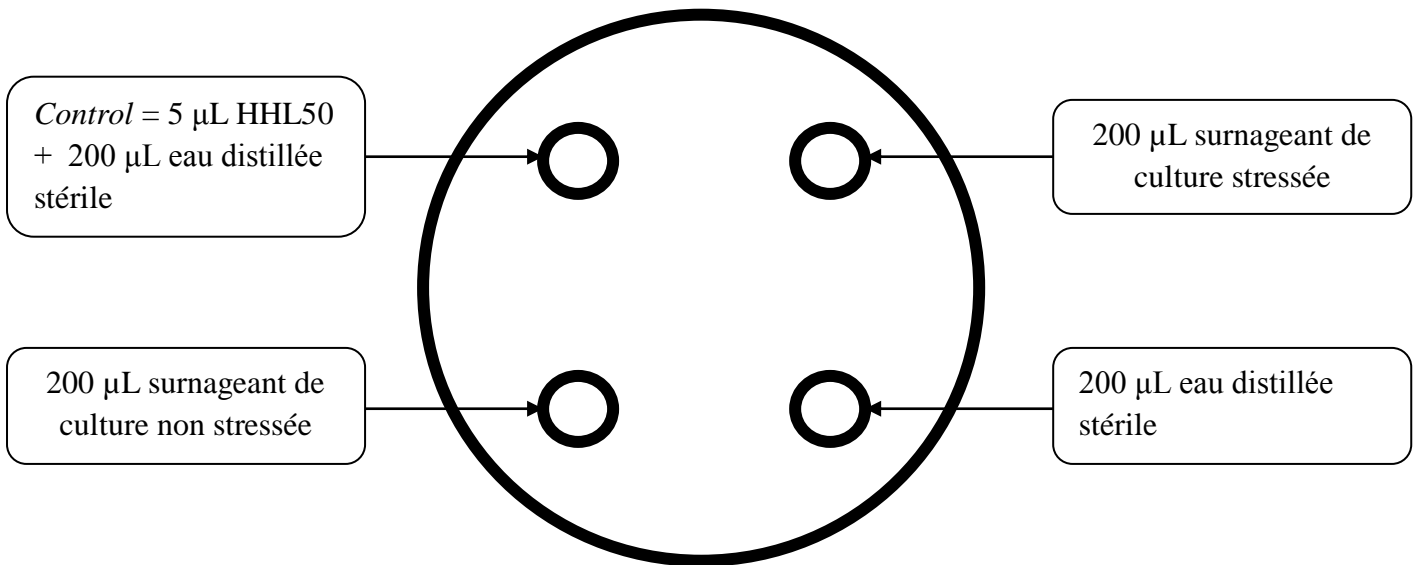
Deux essais ont été adoptés respectivement :

-un essai direct pour la détection de la molécule signal, 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:**

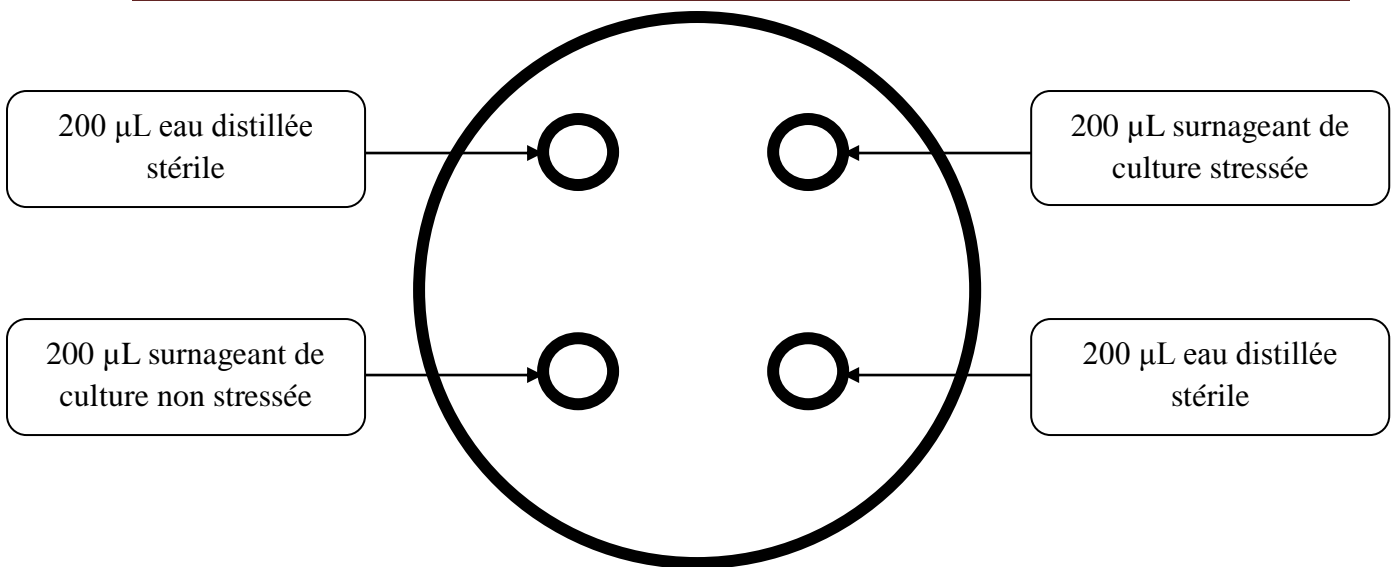
5 mL du milieu YM (0.8 % (w/v)) ont été mélangés avec 300  $\mu\text{L}$  de la souche *biosensor* et 40  $\mu\text{L}$  du substrat X-Gal, ce mélange liquide en surfusion a été ensuite coulé dans une boîte de Pétri, solidifié et refroidi. Quatre puits ont été formés dans la gélose à l'aide d'un anneau en métal stérile. Chaque puits a été rempli selon le protocole de la figure 12.



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

**\*Essai Indirect:**

5 mL du milieu YM ont été mélangés avec 300 µL de la souche *biosensor* et 40 µL du substrat X-Gal en plus de (5 µL de la molécule HHL50, puis 10 µL 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. La HHL50 a été ajoutée au mélange afin d'intensifier la couleur bleue préalablement détectée dans l'essai direct.

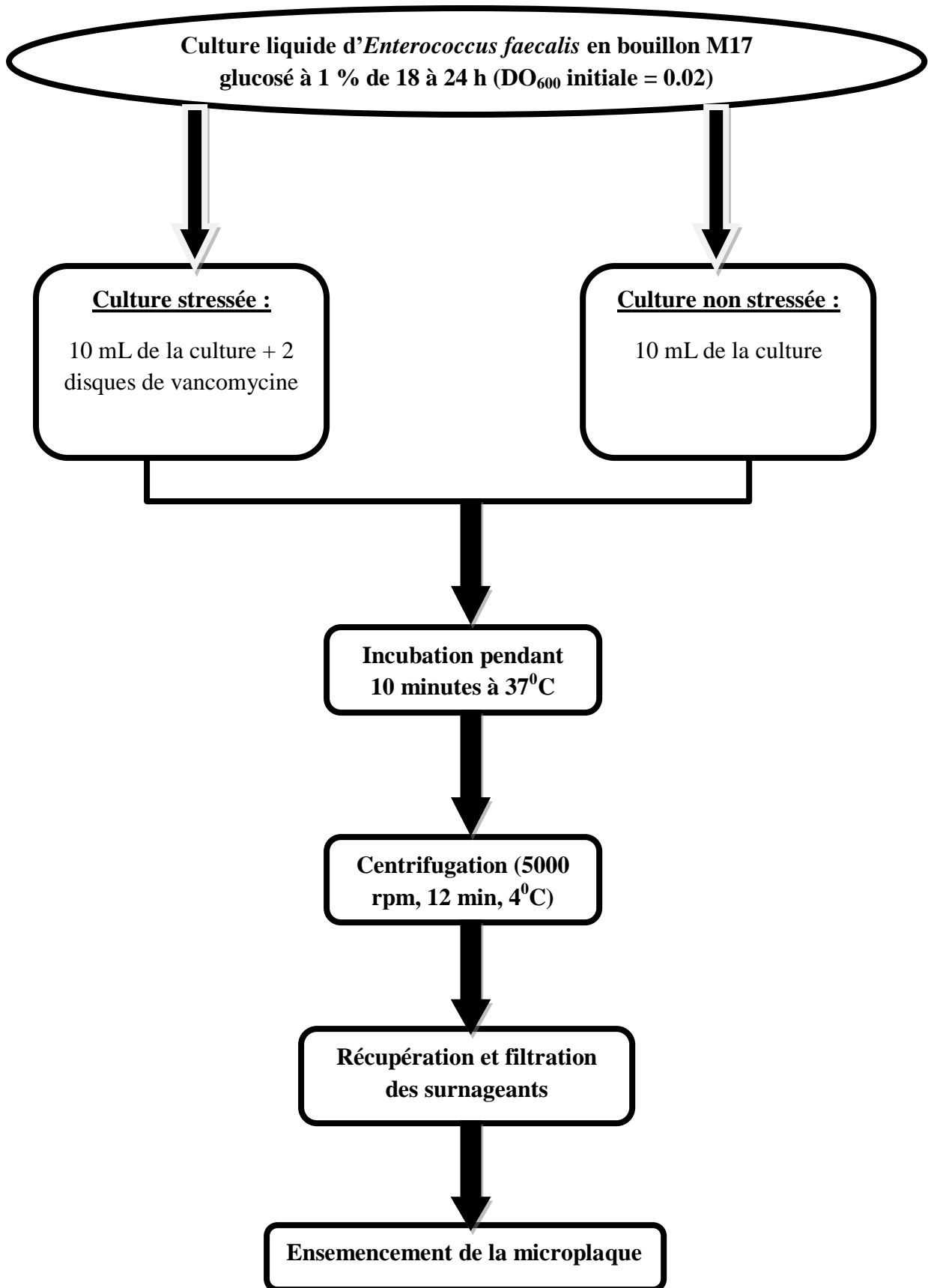


**Figure 13 :** Essai indirect pour la détection de molécules signales chez *E.faecalis*.

Le surnageant de culture non stressée a été obtenu après centrifugation (5000 rpm, 12 min, 4<sup>0</sup>C) d'une culture liquide d'*E.faecalis* en bouillon M17 de 24 heures et le surnageant de culture stressée a été obtenu après centrifugation (5000 rpm, 12 min, 4<sup>0</sup>C) d'une culture liquide de *E.faecalis* en bouillon M17 de 24 heures traité avec 02 disques de l'antibiotique vancomycine pendant 10 minutes à 37<sup>0</sup>C (voir figure 10 page 51). La charge du disque de vancomycine était de 5 µg. Mettre les boîtes de Pétri en incubation à 28<sup>0</sup>C pendant 24 heures. Ensuite, on analyse s'il y a une production d'une couleur bleue autour des puits dans la gélose.

### **5- Effet de l'insuline sur la formation de biofilm par la souche *E.faecalis*.**

Dans cette partie, nous avons recherché l'effet que peut jouer l'hormone (l'insuline) sur l'aptitude de la souche *E.faecalis* à former le biofilm. Nous avons testé l'effet de cette hormone en présence d'un surnageant de culture non stressée et en présence d'un surnageant de culture stressée. Le schéma ci-dessous (figure 14) résume le protocole expérimental réalisé au laboratoire et le tableau 03 détaille l'ensemencement de la microplaque.



**Figure 14 :** Protocole expérimental réalisé pour analyser l'effet de l'hormone (l'insuline) sur le mécanisme de formation de biofilm chez *E.faecalis*.

**Tableau 03:** Ensemencement de la microplaque par l'hormone (insuline) en présence d'un surnageant de culture non stressée et en présence d'un surnageant de culture stressée.

Préparation d'une suspension d'*E.faecalis* en bouillon M17 glucosé à 1 %

(DO<sub>600</sub> = 0,02)



Test	Témoin	En présence de l'insuline et le surnageant de la culture non stressée	En présence de l'insuline et le surnageant de la culture stressée
Composition biochimique	50 µL suspension	50 µL suspension	50 µL suspension
		50 µL surnageant de culture non stressée	50 µL surnageant de culture stressée
		25 µL cocktail anti-protéasique	25 µL cocktail anti-protéasique
	100 µL bouillon M17	25 µL insuline	25 µL insuline

La microplaque a été incubée à 37<sup>0</sup>C pendant 24 heures et a été ensuite traitée selon le protocole de la page 46-47.

*Résultats et  
Discussion*

## 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.

L'examen microscopique de la cellule bactérienne *E.faecalis* au microscope optique a donné les résultats suivants : cocci à Gram-positif isolés, en paires ou en courtes chainettes (figure 16).



**Figure 16 :** Observation microscopique après coloration de Gram (objectif X100).

## 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.

### 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 21<sup>ème</sup> 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).



**Lecture de la galerie API 20 Strep après 4 heures**



**Lecture de la galerie API 20 Strep après 24 heures**

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

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

La source d'ions de type MALDI permet la formation d'espèces ioniques principalement monochargées, la séparation des ions ne dépendant ainsi principalement que de leur masse. Parmi les nombreux pics produits, les principaux correspondent à des protéines ribosomales et semblent spécifiques d'espèce et peu influencés par les variations

intraspécifiques. Les spectres générés à partir de bactéries entières (colonies bactériennes d'*E.faecalis* cultivées sur gélose M17) ont été ensuite comparés aux spectres de référence présents dans la base de données d'un système expert. Ces spectres de référence ont été obtenus à partir des souches types et d'isolats cliniques issus de collections internationales.

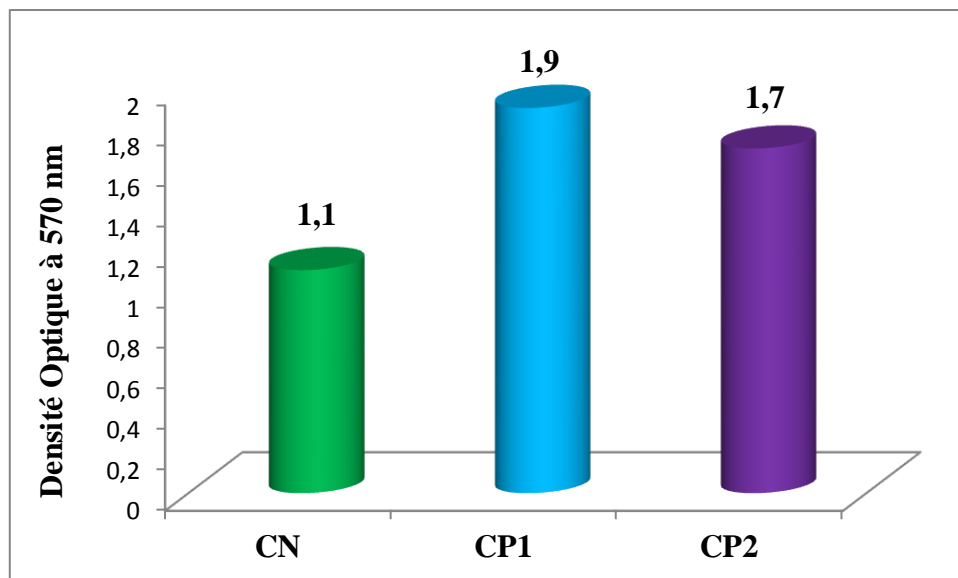
La concordance du spectre obtenu à partir de la bactérie étudiée (*E.faecalis*) avec ceux des souches de référence a été traduite par un score qui indique le degré de confiance à accorder à cette identification, le score ou log obtenu était supérieur à 2 (score > 2), ce qui signifie que l'espèce est *Enterococcus faecalis*.

L'identification de l'espèce bactérienne *E.faecalis* par spectrométrie de masse dépendait étroitement de la richesse et de la qualité de la base de données constituée des spectres de référence. Après la comparaison du spectre obtenu à partir de notre souche *E.faecalis* étudiée (précédemment identifiée par le système API 20 Strep) avec les milliers de spectres de référence existants dans la base de données d'un système expert. Le nom de la bactérie affiché sur l'écran a été comme suit : *Enterococcus faecalis*. Donc, grâce à cette technique de spectrométrie de masse, nous avons pu confirmer l'identification de l'espèce bactérienne *E.faecalis*.

## **2- Etude de l'effet de certaines molécules signales de quorum sensing appelées (AHLs) : N-Acyl Homoserine Lactones sur la formation de biofilm d'*E.faecalis*.**

### **2-1 Quantification du biofilm d'*E.faecalis* formé sur polystyrène en absence et en présence des molécules AHLs (C<sub>6</sub>-HSL et C<sub>8</sub>-HSL).**

Les résultats obtenus, ont montré que l'addition de 1  $\mu\text{L}$  des molécules AHLs testées dans cette étude (C6-HSL ou C8-HSL) à la culture d'*E.faecalis* dans le bouillon M17 à 1% glucose a favorisé la formation du biofilm par la souche *E.faecalis* sur polystyrène (figure 19 et tableau 4).



**Figure 19 :** Valeurs obtenues de la densité optique à 570 nm (DO570) de la formation de biofilm d'*E.faecalis* sur du polystyrène dans le contrôle négatif (CN) (sans les AHLs) et dans le contrôle positif 1 (CP1 : avec 1  $\mu\text{L}$  de C6-HSL) et (CP2 : avec 1  $\mu\text{L}$  de C8-HSL).

**Tableau 04 :** Calculs du taux d'augmentation de la formation de biofilm en présence des molécules AHLs par rapport au témoin en pourcentage (%).

Molécule AHL ajoutée	Volume de la molécule AHL	DO570 (formation de biofilm)	Taux d'augmentation de la formation de biofilm par rapport au témoin en pourcentage (%)
C6-HSL	1 $\mu\text{L}$	1.9	+ 42.10 %
C8-HSL	1 $\mu\text{L}$	1.7	+ 31.58 %

La communication inter-cellulaire chez les micro-organismes est basée sur la production de certaines molécules chimiques par ces micro-organismes, ces molécules sont connues sous le nom de (molécules signales), responsables du phénomène de quorum sensing (communication intercellulaire). Ce phénomène de QS est très répandu chez les communautés microbiennes (Safari *et al.*, 2014).

Il est connu que les bactéries utilisent un système de quorum sensing afin de réguler et de coordonner leur expression de gènes en contrôlant la concentration des molécules signales connues aussi sous le nom de « Autoinducteurs » ou (AI) (Shao *et al.*, 2012).

Les bactéries utilisent le mécanisme de QS pour la régulation d'une variété de phénotypes, comme celui de la formation de biofilm car cette formation de biofilm est essentielle pour l'établissement des relations symbiotiques ou pathogéniques avec les cellules hôtes eucaryotes (Fuqua *et al.*, 1994).

Les systèmes AHL-QS produisent les molécules AHLs et aussi répondent (reconnaissent) aux molécules AHLs grâce à deux protéines responsables de la production des molécules signales et aussi de la reconnaissance de ces molécules AHLs (Fuqua *et al.*, 1994).

Ces deux protéines sont : LuxI et LuxR respectivement (LuxI : responsable de la production des molécules AHLs, et LuxR : responsable de la reconnaissance de ces molécules AHLs) (Fuqua *et al.*, 1994).

Les protéines LuxR sont des régulateurs de la réponse (de la reconnaissance) des molécules AHLs, lorsque la protéine LuxR (récepteur) reconnaît son ligand (AHLs), cette réaction biochimique ligand-récepteur déclenche l'activation de l'expression des gènes impliqués dans le comportement de la communauté microbienne en réponse aux concentrations intracellulaires des molécules AHLs reconnues (Fuqua *et al.*, 1994).

Certains pathogènes bactériens sont capables de coloniser les sites de l'infection et d'employer des systèmes de QS basés sur les molécules signales AHLs dans le but de réguler la formation de biofilm (Shao *et al.*, 2012).

Dans la présente étude, nous avons confirmé que les molécules signales AHLs testées (C6-HSL et C8-HSL) ont favorisé considérablement la formation de biofilm par l'espèce bactérienne Gram-positif *E.faecalis* isolée à partir des infections endodontiques.

En 2012, une étude réalisée à *Beijing (China)* à (*Institute of disease control and prevention, Academy of military medical sciences*) a rapporté que le système de QS chez *E.faecalis* était basé sur la molécule signalée appelée : « Autoinducteur 2 » ou (AI-2) (Shao *et al.*, 2012).

Le rôle de la molécule (AI-2) dans la formation de biofilm par *E.faecalis* a été recherché, et les résultats de cette recherche ont démontré que l'addition de la molécule signalée (AI-2) aux cultures d'une souche *E.faecalis* V583 a entraîné une augmentation de la formation de biofilm (Shao *et al.*, 2012).

Donc, le système de QS chez *E.faecalis* est étroitement lié avec la formation de biofilm, autrement dit, le système de QS chez *E.faecalis* régule comme phénotype la formation de biofilm (Lu *et al.*, 2013).

D'après les résultats obtenus, nous avons suggéré que les molécules AHLs produites par les bactéries Gram-négatives peuvent interférer avec le système de QS d'une bactérie Gram-positif telle que *E.faecalis* et par conséquent réguler l'aptitude de cette souche à former le biofilm. Cette suggestion confirme la possibilité de la communication inter-espèces entre les bactéries Gram-positives et les bactéries Gram-négatives.

Les biofilms dentaires matures sont constitués de microcolonies dans lesquelles les cellules bactériennes existantes interagissent et communiquent entre elles en échangeant des messages sous la forme de molécules signales et de métabolites. Il est évident que les interactions bénéfiques entre les cellules microbiennes sont essentielles au développement des biofilms dans la cavité buccale (orale).

Donc, la présence des bactéries Gram-négatives dans les biofilms de la cavité buccale peut influencer la formation de biofilm et la croissance des bactéries Gram-positives existantes telle que l'espèce *E.faecalis*, et ceci par la production de molécules signales de quorum sensing (AHLs) et par conséquent favoriser et augmenter le développement d'infections endodontiques humaines.

En 2010, une étude réalisée à *Osaka (Japan)* à (*The Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry*), a rapporté que trois (03) molécules AHLs synthétiques (c-à-d molécules analogues aux molécules AHLs naturelles) nommées (N-acyl HSL) ont inhibé la formation de biofilm chez une espèce bactérienne Gram-négative *Porphyromonas gingivalis*, cette bactérie a été reconnue comme l'agent primaire et causal des maladies parodontales dans les biofilms de la cavité buccale (Asahi *et al.*, 2010).

D'après les informations citées ci-dessus, les effets des molécules AHLs sur la formation de biofilms bactériens sont différents et ceci dépend de la nature des bactéries, qu'elles soient Gram-positives ou Gram-négatives.

C'est-à-dire, que l'effet des molécules AHLs sur les biofilms bactériens change d'une bactérie à une autre, qu'elle soit cette bactérie Gram-positive ou Gram-négative. Ces différents effets que peuvent exercer les molécules signales AHLs sur la formation de biofilm de la souche bactérienne Gram-positive *E.faecalis* et de la souche bactérienne Gram-négative

*P.gingivalis* confirment que la différence dans la composition biochimique de la paroi cellulaire bactérienne entre les bactéries Gram-positives et les bactéries Gram-négatives joue un rôle important dans la reconnaissance et l'attachement de la molécule signal ou de l'autoinducteur et aussi dans les conséquences résultantes de la reconnaissance de cette molécule.

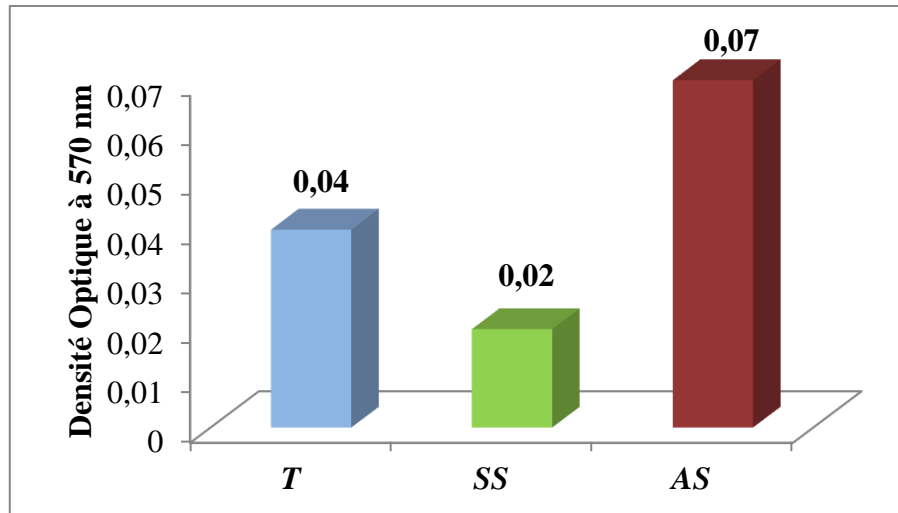
La composition biochimique de la paroi cellulaire de l'espèce bactérienne *E.faecalis* a montré que la cellule bactérienne a été enveloppée ou entourée d'une paroi résistante à la destruction mécanique, d'un peptidoglycane et des protéines appelées : *Penicillin Binding Proteins* (PBPs), de l'enzyme muramidase et des polymères de la paroi cellulaire tel que l'acide teichoïque et de l'acide lipoteichoïque (Signoretto *et al.*, 2000).

La composition biochimique de la paroi cellulaire bactérienne des bactéries Gram-positives a montré une grande proportion d'acides aminés tels que : l'alanine, l'acide glutamique, la lysine, l'acide diaminopimélique, l'acide aspartique et la glycine. Ces biomolécules étaient associées à des variations de molécules osidiques ou sucres (*sugars and amino-sugars*) (Cummins and Harris ,1956).

Les bactéries Gram-négatives possèdent une membrane externe riche en lipides, une membrane plasmique, ainsi qu'une couche fine de peptidoglycane. Sachant que, la paroi cellulaire bactérienne chez les bactéries Gram-positives est plus épaisse et résistante que celle des bactéries Gram-négatives (Beveridge, 1999).

### **3- Influence de la présence de la vancomycine sur la formation de biofilm d'*E.faecalis*.**

La figure 20 et le tableau 5 présentent les résultats de l'effet de la présence de l'antibiotique « la vancomycine » sur la formation de biofilm par *E.faecalis*.



**Figure 20 :** Effet de la présence de l’antibiotique « la vancomycine » sur la formation de biofilm par *E.faecalis*.

T : Témoin, SS : en absence de l’ATB, AS : en présence de l’ATB

(ATB : antibiotique)

**Tableau 05 :** Calculs du taux d’augmentation de la formation de biofilm en présence et en absence de la vancomycine par rapport au témoin en pourcentage (%).

Surnageant de culture ajouté	Volume du surnageant ajouté	DO570 (formation de biofilm)	Taux d’augmentation de la formation de biofilm par rapport au témoin en pourcentage (%)
En absence de la vancomycine	50 µL	0.02	- 28.57 %
En présence de la vancomycine	50 µL	0.07	+ 42.85 %

D’après les résultats obtenus dans cette étude, nous avons constaté que l’addition du surnageant de culture stressée a stimulé la formation de biofilm par la souche *E.faecalis*. Ceci nous a conduit à suggérer l’hypothèse que ce surnageant contient probablement des molécules

produites en réponse au stress chimique appliqué, ces molécules ont contribué à la régulation de l'expression des gènes de la souche *E.faecalis* responsables de la formation de biofilm.

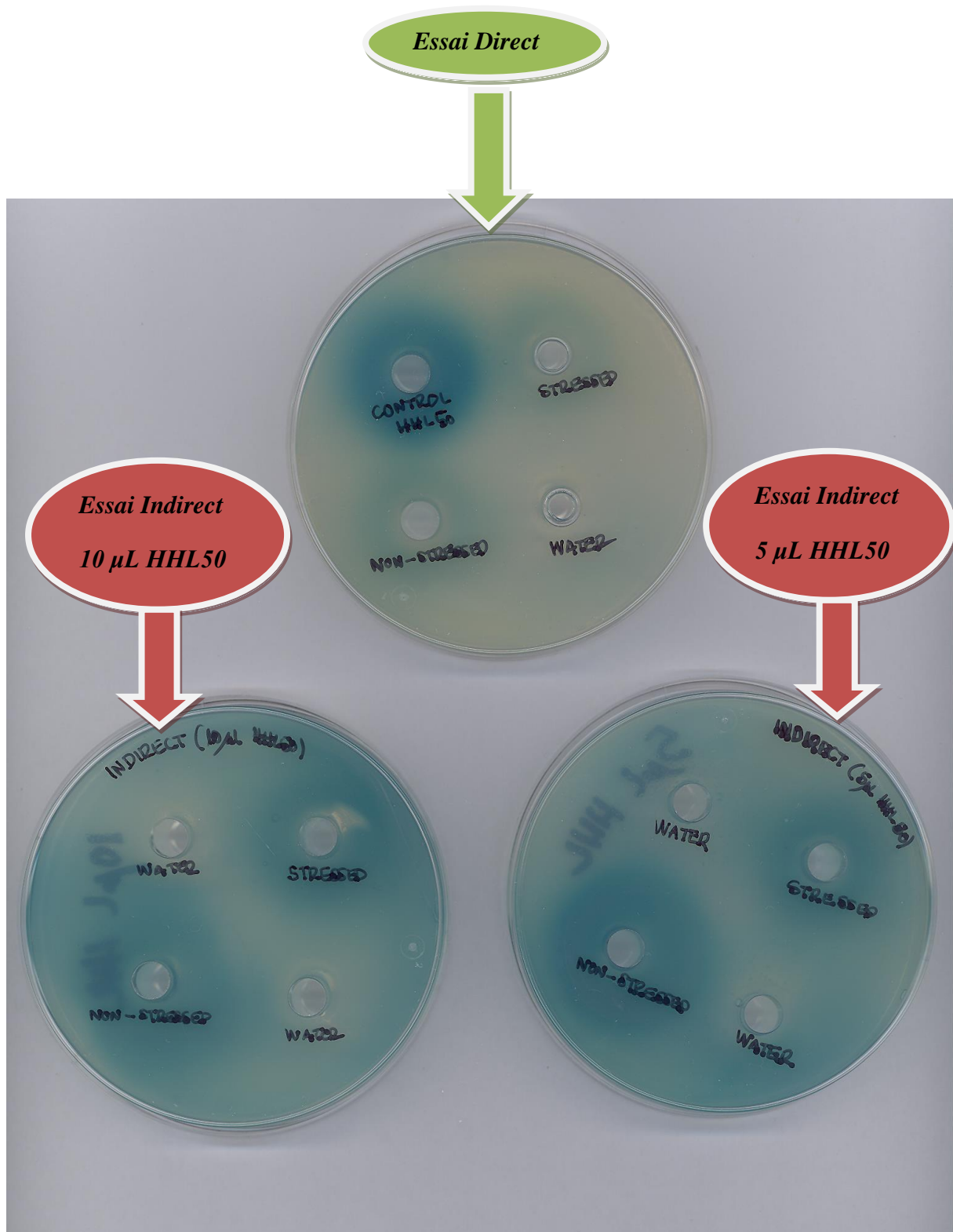
Donc, ces molécules « molécules signales » ont été produites en réponse au stress chimique appliqué dans le but de faciliter l'adaptation de la bactérie *E.faecalis* au stress environnemental. Cette manière d'adaptation s'est traduite par la stimulation de la formation de biofilm par la souche *E.faecalis*. Le quorum sensing est le déterminant de la densité cellulaire de la population bactérienne, ce système est un constituant intégral de la régulation globale des gènes bactériens, facilitant l'adaptation des bactéries au stress environnemental (Dunny et Winans, 1999 ; England *et al.*, 1999 ; Shapiro, 1998 ; Williams *et al.*, 2000 ; Withers *et al.*, 2001).

Les cellules bactériennes subissent une grande variété d'adaptations morphologiques et physiologiques en réponse aux changements chimiques et physiques dans leur environnement. La perception de l'information chimique à partir de l'environnement constitue une partie centrale de la régulation pour ces réponses d'adaptation. Les changements chimiques impliqués peuvent résulter des activités métaboliques des bactéries elles-mêmes (Dunny et Winans, 1999 ; England *et al.*, 1999 ; Shapiro, 1998 ; Williams *et al.*, 2000).

Il est important de connaître que certaines molécules régulatrices très actives générées par les bactéries ne sont pas simplement des produits du déchet métabolique mais sont spécialement produites comme des signaux diffusibles pour la communication cellulaire dans une population bactérienne. Dans la littérature, cette activité est principalement décrite pour les bactéries aux densités cellulaires élevées et a été appelée : « quorum sensing » (QS) (Dunny et Winans, 1999 ; England *et al.*, 1999 ; Shapiro, 1998 ; Williams *et al.*, 2000).

#### **4- 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 trou 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-positive *E. faecalis* en utilisant le biosensor *Agrobacterium tumefaciens* (pZLR4).

- **Essai direct**

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

<b>Composition des 4 trous dans la gélose</b>	<b>Production de la couleur bleue</b>
<i>Control</i> = 5 µL HHL50 + 200 µL eau distillée stérile	<b>(+) présence de couleur bleue intense</b>
200 µL surnageant de culture stressée	<b>(+) présence de couleur bleue</b>
200 µL surnageant de culture non stressée	<b>(+) présence de couleur bleue</b>
200 µL eau distillée stérile	<b>(-) absence de couleur bleue</b>

- **Essai indirect**

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

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

Une classe majeure des autoinducteurs est celle des AHLs : N-acyl homosérine 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  $\beta$ -galactosidase a été utilisée comme un indicateur spécifique de l'expression du gène (Luo *et al.*, 2001).

Cette méthode est souvent utilisée pour le screening de la production des molécules AHLs par les bactéries Gram-négatives. La souche bactérienne *biosensor Agrobacterium tumefaciens* (pZLR4) contient le gène  $\beta$ -galactosidase permettant la production de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase en présence des molécules signales de QS dites : « AHLs ». En présence du substrat chromogène « 5-bromo-4chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-Gal) », l'enzyme  $\beta$ -galactosidase clive (dégrade) son substrat (X-Gal), ce qui résulte en sa conversion en un précipité de couleur bleue lorsque des formes actives des AHLs sont présentes (Kawaguchi *et al.*, 2008).

La souche *biosensor Agrobacterium tumefaciens* (pZLR4) est utilisée pour la détection des molécules AHLs à longue chaîne d'acyle. Cette souche bactérienne « *biosensor* » porte le plasmide pZLR4, qui contient les gènes : traG :: lacZ et traR. En présence des molécules AHLs à longue chaîne d'acyle la protéine TraR est activée, et la transcription de la fusion traG :: lacZ est activée, et l'activité lacZ ( $\beta$ -galactosidase) est activée aussi (Cha *et al.*, 1998 ; Nievas *et al.*, 2012).

Un résultat positif de la détection des AHLs à longue chaîne d'acyle est confirmé par la présence d'un halo bleu autour du trou dans la gélose contenant des AHLs, cette couleur bleue résulte de l'hydrolyse du substrat X-Gal par l'enzyme  $\beta$ -galactosidase produite par *A.tumefaciens*. D'après les résultats obtenus au cours de cette étude, nous avons réussi à détecter la production des molécules signales suspectées d'être des molécules « AHLs » à longue chaîne d'acyle dans le surnageant de la culture stressée et aussi dans le surnageant de la culture non stressée d'*E.faecalis*. Cette détection a été traduite par la présence d'un halo bleu autour des 2 surnageants dans l'essai direct. Cette détection probable des AHLs a été confirmée dans l'essai indirect.

Cependant, l'identification exacte de ces molécules exige l'utilisation d'autres techniques d'investigation telles que la chromatographie en phase liquide à haute performance ou HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) couplée à la spectrométrie de masse ou MS (*Mass Spectrometry*).

Dans l'essai indirect, la couleur bleue est très intense [le diamètre de l'halo bleu a été plus important autour du surnageant de la culture non stressée (diamètre = 25 mm) qu'autour du surnageant de la culture stressée (diamètre = 20 mm). Ceci signifie que la concentration des molécules signales est plus importante dans le surnageant de la culture non stressée].

La souche Gram-positif mise en étude « *E.faecalis* » pourrait produire des molécules signales pouvant être de type « AHL » à longue chaîne d'acyle. Les *N*-acylated-L-homoserine lactones (AHLs) représentent la classe des autoinducteurs les plus répandus chez les bactéries Gram-négatives ; en effet le quorum sensing régulé par ce type de molécules représente l'un des systèmes bactériens qui sont les mieux connus au niveau moléculaire (Geske *et al.*, 2008).

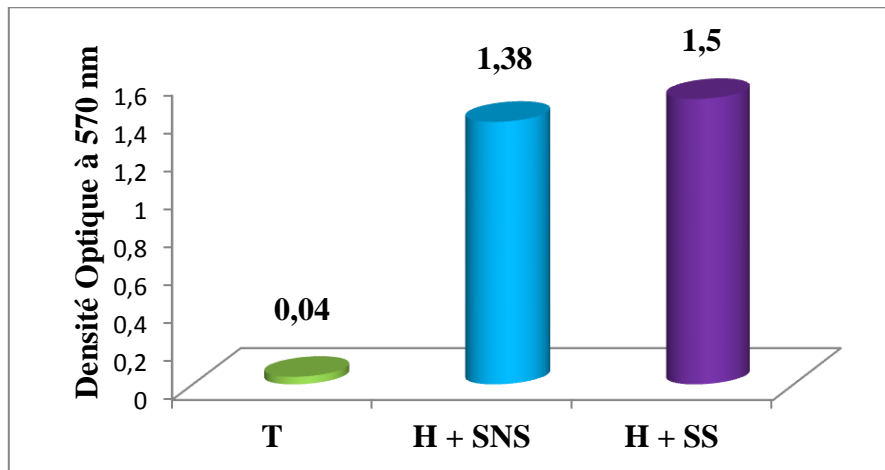
Le QS chez les bactéries Gram-positives est basé sur un système d'autoinduction de nature peptidique (molécules peptidiques) (Novick, 2003).

Le système de QS chez les bactéries Gram-positives est basé sur les peptides cycliques. Chez *E.faecalis*, la molécule signale appelée « *Gelatinase Biosynthesis Activating Pheromone* » ou (GBAP) est un peptide autoinducteur impliqué dans le système fsr de QS chez *E.faecalis*. Il existe un autre système de QS chez *E.faecalis* basé sur le gène luxS. Ce gène est impliqué dans la production d'une enzyme qui catalyse la production de la molécule signale AI-2 ou autoinducteur-2 (Shao *et al.*, 2012).

La détection de la production des molécules signales de type AHL chez les bactéries Gram-positives et spécifiquement chez *E.faecalis* n'est pas encore bien connue. Bien que, Biswa & Doble en 2013, ont réussi à identifier la production de molécule AHL chez une bactérie Gram-positive isolée de l'eau de mer (Biswa et Doble, 2013).

## 5- Effet de l'insuline sur la formation du biofilm par la souche *E.faecalis*.

Les résultats de l'effet de l'insuline sur la formation du biofilm par *E.faecalis* sont illustrés par la figure 22 et le tableau 8.



**Figure 22 :** Effets de l'insuline sur la formation de biofilm d'*E.faecalis*.

(T : Témoin, H : Hormone, SNS : Surnageant de culture Non Stressée, SS : Surnageant de culture Stressée).

**Tableau 08 :** Calculs du taux d'augmentation de la formation de biofilm en présence de l'insuline et le surnageant de culture stressée et non stressée par rapport au témoin en pourcentage (%).

Surnageant de culture et hormone ajoutés	DO570 (formation de biofilm)	Taux d'augmentation de la formation de biofilm par rapport au témoin en pourcentage (%)
En présence de l'insuline et le surnageant de culture non stressée	1.38	+ 89.33 %
En présence de l'insuline et le surnageant de culture stressée	1.50	+ 97.33 %

D'après les résultats obtenus, il semble que l'insuline a accéléré de manière significative la formation du biofilm par la souche *E.faecalis* [ $DO_{570} = 1.38$  ;  $DO_{570} = 1.50$ ], en comparaison à un test contrôle (témoin) [ $DO_{570} = 0.04$ ].

La combinaison de cette hormone (insuline) au surnageant de la culture non stressée d'*E.faecalis*, avait activé l'effet de l'insuline ( $DO_{570} = 1.38$ ).

La combinaison de cette hormone (insuline) au surnageant de la culture stressée d'*E.faecalis*, avait activé encore plus l'effet de l'insuline ( $DO_{570} = 1.50$ ).

Ce résultat nous a conduit à suggérer l'hypothèse suivante : le surnageant de culture stressée d'*E.faecalis* contient probablement des molécules « molécules signales de communication cellulaire », ces molécules ont été produites par la souche *E.faecalis* en réponse au stress appliqué (l'antibiotique), et donc ces molécules ont activé l'effet de cette hormone.

L'hormone (insuline) peut être plus efficace lorsqu'elle est combinée avec d'autres molécules (exemple : glucose, molécules protéiques de communication cellulaire, des produits du métabolisme secondaire de la bactérie appelés métabolites secondaires). On a pu démontrer récemment que les bactéries reçoivent les signaux via les hormones des vertébrés et (*hormonelike factors*), tels que : la sérotonine et la mélatonine. L'adrénaline et les catécholamines forment un groupe spécifique d'autoinducteurs responsables de la communication inter-cellulaire bactérienne (Bansal *et al.*, 2007 ; Kendall *et al.*, 2007 ; Shpakov, 2009).

Plotkin et Viselli en 2000, ont rapporté les résultats d'une étude menée sur l'effet de l'hormone (insuline) sur la croissance des micro-organismes : D'après cette étude, la capacité de l'insuline à influencer les cinétiques de croissance de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, et *Pseudomonas aeruginosa* a été mesurée. Pour tous les

micro-organismes, l'insuline, en absence d'une source de sucre à métaboliser, c'est-à-dire, le glucose ou l'amidon dans le milieu de Mueller-Hinton, n'exerce aucun effet sur le temps de génération (la croissance) en comparaison avec un contrôle homologue (Plotkin et Viselli, 2000 ; Beisel, 1984 ; Bray, 1985 ; Siperstein, 1985 ; Thornton, 1971).

La réponse à l'insuline, dans la forme d'une augmentation ou d'un fléchissement des temps de génération, chez les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, a été dépendante de la concentration de l'hormone (l'insuline), de la concentration du glucose présent, et de la concentration initiale des bactéries exposée au glucose et à l'insuline (Beisel, 1984 ; Bray, 1985 ; Siperstein, 1985 ; Thornton, 1971).

L'hyperinsulinémie est un phénomène commun chez l'être humain. Les niveaux élevés et anormaux de l'insuline sont associés non seulement avec l'anormalité métabolique du diabète de type II appelé aussi : *NIDDM (Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus)*, mais aussi avec le stress associé aux premiers stades des infections aiguës et durant la thérapie du diabète de type I appelé : *IDDM (Insulin-Dependent Diabetes Mellitus)* (Beisel, 1984 ; Bray, 1985 ; Siperstein, 1985 ; Thornton, 1971).

On ne connaît pas encore l'effet que peut avoir ces niveaux élevés d'insuline sur la croissance des bactéries ou comment ces taux élevés de l'insuline affectent la croissance bactérienne (Chandra, 1981 ; Kolterman *et al.*, 1980).

En 2006, Karolina Klosowska et Balbina J. Plotkin en USA (*Department of Microbiology and Immunology, Midwestern University, Downers Grove, IL USA*) ont rapporté les résultats d'une étude menée sur la recherche de l'effet de l'hormone (insuline humaine) sur la modulation de l'adhérence et du chimiotactisme des micro-organismes comme la bactérie *E.coli* :

Cette étude a démontré que la croissance d'*Escherichia coli* en présence d'une concentration d'insuline humaine de l'ordre de ( $2 \mu\text{U. mL}^{-1}$ ), avec une concentration de glucose de ( $100 \text{ mg. dL}^{-1}$ ), résulte en une augmentation de l'hydrophobicité de la souche lors de son adhésion aux cellules épithéliales (Plotkin et Bemis, 1984 ; Klosowska et Plotkin, 2006).

Cependant, la production de la capsule et l'hémagglutination n'ont pas été affectées par l'insuline et le glucose. L'attraction chimiotactique (chimiotactisme) de la cellule bactérienne aux molécules de glucose a été augmentée par la présence de l'insuline en comparaison avec la présence du glucose seul (Plotkin et Bemis, 1984).

La présence de l'insuline seule à une concentration de ( $200 \mu\text{U.mL}^{-1}$ ) avait un effet chimio-repoussant (répulsion) de l'adhésion de la cellule bactérienne et par conséquent cette concentration de l'hormone inhibait la fixation et l'attachement des flagelles des cellules de *E.coli* au verre. En résumé, les résultats de cette étude indiquent que l'insuline humaine peut moduler l'expression des facteurs d'*E.coli* associés avec la pathogénèse d'une façon modifiable par la présence du glucose (Plotkin et Bemis, 1984).

*E.coli* est l'agent causal le plus fréquent des bactériémies, des infections du tractus urinaire et des pyélonéphrites aiguës. Chaque micro-organisme causant des infections systémiques est exposé à une variété de facteurs de l'hôte (l'organisme humain) y compris les hormones. La plus fréquente et omniprésente de ces hormones est l'insuline (Plotkin et Bemis, 1984).

L'insuline humaine exerce un effet sur l'expression des facteurs d'*E.coli* associés avec sa capacité de colonisation, c'est-à-dire les facteurs de colonisation liés à l'adhésion et la mobilité (les flagelles) (Plotkin et Viselli, 2000).

L'insuline humaine en présence du glucose affecte l'expression des facteurs de colonisation. La combinaison de l'insuline avec le glucose augmente significativement l'adhésion, la formation du biofilm, ainsi que la réponse chimiotactique (*chemotactic response*) au glucose en comparaison avec le milieu/tampon seul ou le milieu/tampon avec le glucose (Lux et Shi, 2004 ; Szurmant et Ordal, 2004 ; Silversmith et Bourret, 1999).

Microscopiquement, les cellules d'*E.coli* récupérées pendant la phase semi-logarithmique de leur croissance, cultivées en présence de l'insuline et du glucose (200  $\mu\text{U.mL}^{-1}$  d'insuline ; 200  $\text{mg.dL}^{-1}$  de glucose), se présentaient sous forme allongée, apparaissaient attachées par leurs flagelles au verre et présentaient une rotation dans le sens des aiguilles d'une montre (Lux et Shi, 2004 ; Szurmant et Ordal, 2004 ; Silversmith et Bourret, 1999).

À l'exception de la répulsion chimique, l'insuline en absence du glucose n'exerçait pas d'effet mesurable sur les facteurs de virulence examinés (Plotkin et Viselli, 2000 ; Hardie *et al.*, 2003).

Similaire aux effets de l'insuline et du glucose sur le taux de croissance, les effets de l'insuline et du glucose sur l'expression des facteurs de virulence ont été dépendants et spécifiques de la concentration de l'insuline et du glucose (Plotkin et Viselli, 2000 ; Cloak *et al.*, 2002).

La production de la capsule et l'hémagglutination n'ont pas été affectés par l'insuline en présence ou en absence du glucose à toutes les concentrations et les combinaisons testées.

La présence de l'insuline et/ou le glucose peut altérer la production des facteurs de virulence chez *E.coli* (Plotkin et Viselli, 2000).

Ceci suggère que l'insuline et/ou le glucose peuvent avoir un effet indirect en inhibant (bloquer) la production des molécules signales appelées : « autoinducteurs » tels que l'autoinducteur AI-1 : homosérine lactone et l'autoinducteur AI-2 : *cyclic borate diester*. Ces molécules signales sont responsables d'un mécanisme de communication inter-bactérienne connu sous le nom de quorum sensing, ce dernier régule la production des facteurs de virulence chez *E.coli*. Cette hypothèse n'est pas encore vérifiée et le rôle de l'insuline dans l'inhibition de la production des molécules de quorum sensing n'est pas bien connu (Plotkin et Viselli, 2000 ; Hardie *et al.*, 2003 ; Cloak *et al.*, 2002).

En plus de l'effet que l'insuline exerce sur les caractéristiques de croissance, l'insuline en présence du glucose entraîne aussi une augmentation de l'adhésion des cellules bactériennes d'*E.coli* aux cellules épithéliales de l'hôte, cette caractéristique d'adhésion est considérée comme une étape primordiale pour la colonisation des surfaces muqueuses de l'hôte. Il est bien connu qu'*E.coli* cultivée dans un milieu contenant du glucose présente une grande capacité d'adhésion aux cellules uroépithéliales (Plotkin et Viselli, 2000 ; Geerlings *et al.*, 2001).

L'insuline augmente l'effet du glucose, et de ce fait augmente l'adhésion aux cellules épithéliales. Ce phénomène d'adhésion est assuré par une variété de facteurs adhésifs qui sont affectés par l'insuline tels que les fimbriae (Geerlings *et al.*, 2001, Jacobson *et al.*, 1992 ; Gross *et al.*, 2001).

Les examens microscopiques des cellules mobiles d'*E.coli* ont montré une fixation (attachement) des cellules au verre via leurs flagelles en présence de l'insuline et du glucose en non pas en présence de l'insuline seule (Geerlings *et al.*, 2001 ; Jacobson *et al.*, 1992 ; Gross *et al.*, 2001).

Lorsqu'on a une augmentation de l'adhésion au verre, sachant que la surface du verre est chargée négativement (-), ceci nous indique sur les interactions ioniques existant entre la surface du verre et la surface des cellules bactériennes d'*E.coli* en adhésion, en augmentant l'adhésion des cellules bactériennes dont la surface est chargée positivement car physiquement il existe une attraction entre deux surfaces ayant deux charges électriques différentes [l'une positive (+) et l'autre négative (-)] (Geerlings *et al.*, 2001 ; Jacobson *et al.*, 1992 ; Gross *et al.*, 2001).

Les surfaces des cellules bactériennes chargées positivement ont été corrélées avec une grande capacité d'interagir avec les surfaces des cellules des mammifères (tels que les cellules de l'être humain) qui sont chargées négativement (Healy *et al.*, 2004). L'attachement et le mouvement rotationnel des cellules peut être indicatif et reflète des changements localisés au niveau de la composition des flagelles résultant en des changements électrostatiques. Il est intéressant de connaître qu'en absence du glucose, une source d'énergie, l'insuline agit comme une molécule chimio-répulsive. Cependant, en présence du glucose l'insuline exerce un effet inverse, c'est-à-dire en augmentant l'attraction chimique au glucose. Ces résultats indiquent que l'insuline peut modifier le chimiotactisme des molécules au glucose (Taylor et Zhulin, 1998).

L'insuline humaine se présente comme étant une hormone qui régule différemment l'expression des facteurs de virulence, d'une manière dépendante de la présence du glucose. En absence du glucose, l'insuline agit comme une molécule chimio-répulsive, en signalant un environnement défavorable pour la colonisation et le développement d'une population planctonique. Au contraire, en présence du glucose l'insuline agit comme une molécule qui signale un environnement favorable pour la colonisation et la survie à long terme et ceci en augmentant l'expression des propriétés d'adhésion pour la formation ultérieure de biofilms (Suzuki *et al.*, 2002).

En 2010, Lois Baker et Paresh Dandona à New York (*University Buffalo Endocrinologists at Kaleida Health's Diabetes Endocrinology Center of Western New York*) ont rapporté des résultats menés sur l'étude de l'effet inhibiteur exercé par l'insuline sur les facteurs de l'inflammation provoqués par l'infection bactérienne (Cheung *et al.*, 2009 ; Zimmet *et al.*, 2001 ; Baker et Dandona, 2010).

Le traitement avec l'insuline des patients qui développent des infections bactériennes menaçant leur vie, ou une septicémie, pourrait réduire potentiellement leurs chances de succomber à l'infection. À l'évidence, l'insuline peut émerger avec de nouveaux rôles au-delà de ceux conçus lorsqu'elle a été découverte en 1921 comme une hormone du métabolisme, et depuis elle a été utilisée pour le traitement du diabète pour baisser et contrôler les concentrations du glucose dans le sang » (Cheung *et al.*, 2009 ; Zimmet *et al.*, 2001).

En 2012, Hidekazu Yano et ses collaborateurs au Japan (*Department of General Medicine, Department of Immunology and Microbiology, Division of Environmental Medicine, Research institute, Division of Traumatology, Research Institute, and Department of Basic pathology, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama, Japan*) ont rapporté l'effet positif et bénéfique de cette hormone (l'insuline) chez l'homme, ils ont pu démontrer que le traitement par l'insuline restaure la phagocytose par les neutrophiles et l'activité bactéricide chez des souris diabétiques et par conséquent améliore l'infection du site chirurgical par la bactérie *Staphylococcus aureus* (Hidekazu *et al.*, 2012).

Les infections bactériennes, y compris les infections des sites chirurgicaux, sont de sérieuses complications du diabète. *Staphylococcus aureus*, qui est éliminé principalement par les neutrophiles, est une cause majeure des infections des sites chirurgicaux chez les patients diabétiques (Cheung *et al.*, 2009 ; Zimmet *et al.*, 2001). Il est bien connu que les patients diabétiques sont plus prédisposés aux infections bactériennes, y compris les infections des

sites chirurgicaux (*surgical site infections SSI*), que les individus sains. Bien que plusieurs rapports cliniques ont démontré que le contrôle glycémique réduit le risque des infections, les mécanismes précis par lesquels le diabète prédispose aux infections ne sont pas bien compris (Ata *et al.*, 2010 ; King *et al.*, 2011 ; Sehgal *et al.*, 2011). Le contrôle des infections bactériennes est devenu plus important pour les patients diabétiques que dans le passé, à cause de l'augmentation du nombre de patients diabétiques et leur prédisposition aux infections. Les infections des pieds suivies par l'ulcération de la peau sont aussi des causes communes de l'hospitalisation des patients diabétiques (Boon *et al.*, 2008).

# *Conclusion & Perspectives*

## Conclusion et perspectives.

Les résultats de la présente étude ont démontré que :

\*Les molécules signales de QS nommées : « AHLs » (C6-HSL et C8-HSL), peuvent exercer un effet significatif sur le biofilm des bactéries Gram-positives de la cavité buccale et ceci en favorisant le développement de la formation de biofilm de ces bactéries Gram-positives telle que l'espèce : *E.faecalis* isolée des dents de patients ayant des infections endodontique en Algérie.

\*Le stress de nature chimique (la vancomycine) exerçait un effet important sur le système de QS de la bactérie. Cet effet important se traduisait par l'augmentation de la formation de biofilm (donc ce phénomène de formation de biofilm est une manière d'adaptation de la bactérie *E.faecalis* au stress chimique).

\*La souche *E.faecalis* produit une molécule signale 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-positive *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 signales déjà connues : AI-2 et les peptides cycliques.

\*L'hormone hypoglycémiant (insuline) testée dans cette étude, a pu jouer le rôle d'une molécule de signalisation et de communication intercellulaire bactérienne chez *E.faecalis* et par conséquent exerçait un effet important dans la stimulation et l'augmentation de la formation de biofilm par la bactérie *E.faecalis*.

Tous ces résultats obtenus peuvent servir d'avantage pour la communauté scientifique pour bien comprendre l'activité biologique de ces molécules signales (AHLs) sur la formation

de biofilms dentaires, dans le but de réduire les infections orales humaines et aussi de gérer l'alimentation humaine en sucre (glucose) afin de réduire la production d'insuline, car cette hormone peut jouer le rôle d'une molécule de signalisation intercellulaire bactérienne et par conséquent une molécule favorisant la formation de biofilm.

L'exploitation des résultats de ce travail de recherche nous permettront sans doute de bien gérer la formation de biofilm bactérien endodontique afin de minimiser les infections endodontiques dans l'avenir.

Il existe actuellement de nouvelles techniques microscopiques telles que : la SEM (*Scanning Electron Microscopy*) et la CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscopy*).

Ces deux dernières techniques nous permettront d'effectuer une étude plus approfondie sur la formation du biofilm par la souche *E.faecalis*.

De plus, la technique de MS (*Mass Spectrometry*) est aussi une technique exploitable pour l'identification exacte des molécules de quorum sensing produites dans le surnageant de culture bactérienne d'*E.faecalis*.

On peut suggérer la formation du biofilm d'*E. faecalis in vivo* au lieu que ça soit *in vitro*, c'est-à-dire sur des cellules vivantes au lieu que ça soit sur un support inerte en polystyrène.

Enfin, le *quorum quenching*, c'est le contraire du quorum sensing, ici on peut proposer de remplacer une antibiothérapie par la recherche et la prescription de molécules inhibant la production de molécules signales de quorum sensing responsables des infections bactériennes.

*Références*  
*Bibliographique*

**Références bibliographiques**

**A**

Ahmed, N.A.A.M., Petersen, F.C., Scheie, A.A. (2007) AI-2 quorum sensing affects antibiotic susceptibility in *Streptococcus anginosus*. *J.Antimicrob.Chemother.*, **60**, 49-53.

Ahmed, N. A., Petersen, F. C., Scheie, A. A. (2009) AI-2/LuxS is involved in increased biofilm formation by *Streptococcus intermedius* in the presence of antibiotics. *Antimicrob. Agents.Chemother.*, **53**, 4258-4263.

Arevalo-Ferro, C., Hentzer, M., Reil, G., Görg, A., Kjelleberg, S., Givskov, M., *et al.* (2003) Identification of Quorum sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. *Environ. Microbiol.*, **5**, 1350–69.

Armbuster, C. E., Wenzhou, H., Pang, B., Weimer, K. E. D., Juneau, R. A., Turner, J., Swords, W. E. (2010) Indirect Pathogenicity of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in Polymicrobial Otitis Media Occurs via Interspecies Quorum Signaling. *mBio.*, **1**, 00102-10.

Asahi, Y., Noiri, Y., Igarashi, J., Asai, H., Suga, H., Ebisu, S. (2010) Effects of N-acyl homoserine lactone analogues on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. *J. Periodontal. Res.*, **45**, 255-261.

Ata, A., Lee, J., Bestle, S.L., Desemone, J., Stain, S.C. (2010) Postoperative hyperglycemia and surgical site infection in general surgery patients. *Arch. Surg.*, **145**, 858–864.

Atkinson, S., Williams, P. J. R. (2009) Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J. R. Soc. Interface.*, **6**, 959-78.

**B**

Baker, L., Dandona.P. (2010) Insulin may lower risk of death from bacterial infections).

Balestrino, D., Haagenen, J. A. J., Rich, C., Forestier, C. (2005) Characterization of type 2 quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. *J.Bacteriol.*, **187**, 2870-80.

Bansal, T., Englert, D., Lee, J., Hedge, M., Wood, T.K., Jayaraman, A. (2007) Differential Effects of Epinephrine, Norepinephrine, and Indole on *Escherichia coli* O157:H7 Chemotaxis, Colonization, and Gene Expression. *Infect. Immun.*, **75**, 4597–4607.

Barber, C. E., Tang, J. L., Feng, J. X., Pan, M. Q., Wilson, T. J., Slater, H., Dow, J. M., Williams, P., Daniels, M.J. (1997) A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol. Microbiol.*, **24**, 555-66.

Barrett, A. J., Rawlings, N.D., Woessner.J.F. (1998) Handbook of nproteolytic enzymes. *Academic Press.*, 350–369.

Basarani, B., Tjaderhane, L., Santos, J.M., Pascon, E., Grad, H., Lawrence, H.P., Friedman, S. (2003) Efficacy of Chlorhexidine and Calcium hydroxide containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral.Radiol. Endod.*, **96**, 618 – 24.

Bassler, B.L., Wright, M., Silverman, M.R. (1993) Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of bioluminescence. *Mol. Microbiol.*, **9**, 773-786.

Bassler, B. L., Wright, M., Silverman, M. R. (1994) Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol. Microbiol.*, **13**, 273-86.

Bassler, B. L., Greenberg, E. P., Stevens, A. M. (1997) Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.*, **179**, 4043-5.

Bassler, B.L., Losick, R. (2006) Bacterially Speaking. *Cell.*, **125**, 237–246.

Bassler, B. L. (2009) Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu. Rev. Genet.*, **43**, 197-222.

- Beisel, W.R. (1984) Metabolic effects of infection. *Prog. Food. Nutr. Sci.*, **8**, 43–75.
- Beveridge, T.J. (1999) Structure of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.*, **181**, 4725-4733.
- Biswa, P., Doble, M. (2013) Production of acylated homoserine lactone by Gram-positive bacteria isolated from marine water. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **343** :34-41.
- Boon, C., Deng, Y., Wang, L. H., He, Y., Xu, J. L., Fan, Y., Pan, S. Q., Zhang, L. H. (2008) A novel DSF-like signal from *Burkholderia cenocepacia* interferes with *Candida albicans* morphological transition. *ISME. J.*, **2**, 27.
- Boulton, A.J., Kirsner, R.S., Vileikyte, L. (2004) Clinical practice. Neuropathic diabetic foot ulcers. *N. Engl. J. Med.*, **351**:48–55.
- Bourgogne, A., Hilsenbeck, S.G., Dunny, G.M., Murray, B.E. (2006) Comparison of OG1RF and an isogenic *fsrB* deletion mutant by transcriptional analysis: the *Fsr* system of *Enterococcus faecalis* is more than the activator of gelatinase and serine protease. *J. Bacteriol.* **188**: 2875-2884.
- Bowden, G.H., Hamilton, I.R. (1998) Survival of oral bacteria, *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, **9**, 54–85.
- Boyer, M., Wisniewski-Dye, F. (2009) Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum. *FEMS. Microbiol. Ecol.*, **70**, 1-19.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.*, **13**, 20-26.
- Bray, G.A. (1985) Complications of obesity. *Ann. Int. Med.*, **103**, 1052–1062.
- Busscher, H.J., Van der Mei, H.C. (1997) Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation, *Adv. Dent. Res.*, **11**, 24–32 and Rickard, A.H., Gilbert, P., High, N.J., Kolenbrander, P.E., Handley, P.S. (2003) Bacterial coaggregation: An integral process in the development of multi-species biofilms, *Trends. Microbiol.*, **11**, 94–100.

## C

Caldwell, D.E., Atuku, E., Wilkie, D.C., Wivcharuk, K.P., Karthikeyan, S., Korber, D.R., et al. (1997) Germ theory vs. community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms, *Adv. Dent. Res.*, **11**, 4–13.

Carbonnelle, E., Beretti, J.L., Cottyn, S., Quesne, G., Berche, P., Nassif, X., Ferroni, A. (2007) Rapid identification of Staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 2156-2161.

Carniol, K., Gilmore, M.S. (2004) Signal Transduction, Quorum-Sensing, and Extracellular Protease Activity in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *J. Bacteriol.*, **186**, 8161-8163.

Cetinkaya, Y., Falk, P., Glen Mayhall, C. (2000) Vancomycin-resistant Enterococci, *Clin. Microbiol. Rev.*, **13**, 686– 707.

Cha, C.E., Gao, O., Chen, Y.C., Shaw, P.D., Farrand, S.K. (1998) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, **11**, 1119–1129.

Chandra, R.K. (1981) Immune response in overnutrition. *Cancer. Res.*, **41**, 3795–3796.

Chavez de Paz, L.E. (2007) Redefining the persistent infection in root canals: Possible role of biofilm communities, *J. Endod.*, **33**, 652–62.

Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B. L., Hughson, F. M. (2002) Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, **415**, 545-549.

Chen, J.W., Koh, C.L., Sam, C.K., Yin, W.F., Chan, K.G. (2013) Short Chain N-acyl Homoserine Lactone Production by Soil Isolate Burkholderia sp. Strain A9, *Sensors.*, **13**, 13217-13227.

Cheung, B.M., et al. (2009) Diabetes prevalence and therapeutic target achievement in the United States. *Am. J. Med.*, **122**, 443– 453.

Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M. (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J.Clin.Microbiol.*, **22**, 996-1006.

Claydon, M.A., Davey, S.N., Edwards-Jones, V., Gordon, D.B. (1996) The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat.Biotechnol.*, **14**, 1584-1586.

Cloak, O.M., Solow, B.T., Briggs, C.E., Chen, C.Y., Fratamico, P.M. (2002) Quorum sensing and production of autoinducer-2 in *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteric serovar Typhimurium* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 4666-4671.

Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., et al. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease, *Annu. Rev. Microbiol.*, **41**, 435–64.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G. (1994) Biofilms, the customized microniche, *J. Bacteriol.*, **176**, 2137–42.

Cummins, C.S., Harris, H. (1956) The chemical composition of the cell wall in some Gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character. *J. Gen. Microbiol.*, **14**, 583-600.

## D

Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J.W., Greenberg, E. P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.*, **280**, 295–298.

Davies, D. G., Marques, C. N. (2009) A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J. Bacteriol.*, **191**, 1393-403.

De beer, D., Stoodley, P., Roe, F., Lewandowski, Z. (1994) Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport, *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 1131–8.

Degrassi, G., Aguilar, C., Bosco, M., Zahariev, S., Pongor, S., Venturi, V. (2002) Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. *Curr. Microbiol.*, **45**, 250-4.

De Keersmaecker, S. C. J., Sonck, K., Vanderleyden, J. (2006) Let LuxS speak up in AI-2 signaling. *Trends. Microbiol.*, **14**, 114-119.

De Kievit, T.R., Iglewski, B.H. (2000) Bacterial *Quorum sensing* in Pathogenic Relationships, *Infect. Immun.*, **68**, 4839-49.

Deng, Y., Wu, J., Eberl, L., Zhang, L. H. (2010) Structural and functional characterization of diffusible signal factor family quorum-sensing signals produced by members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 4675-83.

Deng, Y., Wu, J., Tao, F., Zhang, L.H. (2011) Listening to a New Language: DSF-Based Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria, *Chem. Rev.*, **111**, 160-173.

Diggle, S. P., Lumjiaktase, P., Dipilato, F., Winzer, K., Kunakorn, M., Barrett, D. A., Chhabra, S. R., Camara, M., Williams, P. (2006) Functional genetic analysis reveals a 2-Alkyl-4-quinolone signaling system in the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria. *Chem. Biol.*, **13**, 701-10.

Donlan, R. M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 881-890.

Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002) Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, **15**, 167-93.

Dow, J. M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y. Q., Feng, J. X., Tang, J. L. (2003) Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 10995-1000.

Duan, K. M., Dammel, C., Stein, J., Rabin, H., Surette, M. G. (2003) Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Mol. Microbiol.*, **50**, 1477-1491.

Duggan, J.M., Sedgley, C.M. (2007) Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*, *J. Endod.*, **33**, 815–8 and Al-Ahmad, A., Müller, N., Wiedmann-Al-Ahmad, M., Sava, I., Hübner, J., Follo, M., et al. (2009) Endodontic and salivary isolates of *Enterococcus faecalis* integrate into biofilm from human salivary bacteria cultivated *in vitro*, *J. Endod.*, **35**, 986–91.

Dunny, G.M., Winans, S.C. (1999) Cell–Cell Signaling in Bacteria. *DC: ASM Press*.

## *E*

Eberhard, A. (1972) Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis, *J. Bacteriol.*, **109**, 1101–5.

England, R., Hobbs, G., Bainton, N., Roberts, D.M. (1999) Microbial signalling and communication. Cambridge United Kingdom: University Press., 117–38 (**Dunny, G.M., Hirt, H., Erlandsen, S. Multiple roles for enterococcal sex pheromone peptides in conjugation, plasmid maintenance and pathogenesis**) and Kleerebezem, M., Quadri, L.E., Kuipers, O.P., De Vos, W.M. (1997) *Quorum sensing* by peptide pheromones and two component signal transduction systems in Gram positive bacteria, *Mol. Microbiol.*, **24**, 895–904).

## *F*

Federle, M. J., Bassler, B. L. (2003) Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Invest.*, **112**, 1291-9.

Fenselau, C., Demirev, P.A. (2001) Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass. Spectrom. Rev.*, **20**, 157-171.

Fuqua, W. C., Winans, S. C., Greenberg, E. P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.*, **176**, 269-75.

Fuqua, C., Parsek, M. R., Greenberg, E. P. (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu.Rev.Genet.*, **35**, 439-468.

## G

Galloway, W.R., Hodgkinson, J.T., Bowden, S.D., Welch, M., Spring, D.R. (2011) Quorum sensing in Gram-negative bacteria : small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem. Rev.*, **111**, 1432-1447.

Gao, Y., Song, J.X., Hu, B.S., Zhang, L., Liu, Q.Q., Liu, F.Q. (2009) The luxS gene is involved in AI-2 production, pathogenicity, and some phenotypes in *erwinia amylovora*. *Curr. Microbiol.*, **58**, 1-10.

Geerlings, S.E., Brouwer, E.C., Gaastra, W., Stolk, R., Diepersloot, R.J.A., Hoepelman, A.I.M. (2001) Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from urine of diabetic women with asymptomatic bacteriuria: correlation with clinical characteristics. *Nature.*, **80**, 119-127.

Geske, G. D., O'Neill, J. C., Miller, D. M., Mattmann, M. E., Blackwell, H. E. J. (2007) Modulation of bacterial quorum sensing with synthetic ligands: systematic evaluation of N-acylated homoserine lactones in multiple species and new insights into their mechanisms of action. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 13613-25.

Geske, G. D., O'Neill, J. C., Blackwell, H. E. (2008) Expanding dialogues: from natural autoinducers to non-natural analogues that modulate quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 1432-47.

Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P. D., Kjelleberg, S. J. (1996) Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signaling. *J. Bacteriol.*, **178**, 6618-22.

Grenier, D., Mayrand, D. (1986) Nutritional relationships between oral bacteria, *Infect. Immun.*, **53**, 616–20.

Gross, M., Cramton, S., Gotz, F. Peschel, A. (2001) Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.*, **69**, 3423-3426.

Gutschik, E., Moller, S., Christensen, N. (1979) Experimental endocarditis in rabbits. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.*, **87** :353-362.

## H

Haas, W., Shepard, B.D., Gilmore, M.S. (2002) Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature.*, **415**, 84-87.

Hancock, L. E., Perego, M. (2004) The *Enterococcus faecalis* fsr two component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J. Bacteriol.*, **186**, 5629–5639.

Hanzelka, B.L., Parsek, M.R., Val, D.L., Dunlap, P.V., Cronan, J.E., Greenberg, E.P. (1999) Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J.Bacteriol.*, **181**, 5766-5770.

Hardie, K.R., Cooksley, C., Green, A.D., Winzer, K. (2003) Autoinducer 2 activity in *Escherichia coli* culture supernatants can be actively reduced despite maintenance of an active synthase, LuxS. *Microbiol.*, **149**, 715-728.

He, Y. W., Xu, M., Lin, K., Ng, Y. J., Wen, C. M., Wang, L. H., Liu, Z. D., Zhang, H. B., Dong, Y. H., Dow, J. M., Zhang, L. H. (2006) Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. *Mol. Microbiol.*, **59**, 610-22.

Healy, K., Lom, B., Hockberger, P. (2004) Spatial distribution of mammalian cells dictated by material surface chemistry. *Biotechnol. Bioengin.*, **43**, 792-800.

Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M. A., Song, Z. J., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J. W., Molin, S.,

Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Hoiby, N., Givskov, M. (2003) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO. J.*, **22**, 3803-15.

Hidekazu, Y., Manabu, K., Keiichi, F., Masahiro, N., Yoritsuna, Y., Hiromi, M., Koji, H., Satoshi, O., Keiichi, I., Daizoh, S., Shuhji, S., Yuji, T. (2012) Insulin Treatment Directly Restores Neutrophil Phagocytosis and Bactericidal Activity in Diabetic Mice and Thereby Improves Surgical Site Staphylococcus aureus Infection. *Infect.Immun.*, **80**, 4409-4416.

Hodgkinson, J. T., Welch, M., Spring, D. R. (2007) Learning the language of bacteria. *ACS. Chem. Biol.*, **2**, 715-7.

Holden, M. T., Ram Chhabra, S., de Nys, R., Stead, P., Bainton, N. J., Hill, P. J., Manefield, M., Kumar, N., Labatte, M., England, D., Rice, S., Givskov, M., Salmond, G. P., Stewart, G. S., Bycroft, B. W., Kjelleberg, S., Williams, P. (1999) Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.*, **33**, 1254-66.

Hyunjoon, P., Kyuyeon, L., Soyoung, Y., Heun Kil, S., Wilhelm, H. H. (2017) Autoinducer-2 Quorum Sensing Influences Viability of *Escherichia coli* O157:H7 under Osmotic and In Vitro Gastrointestinal Stress Conditions. *Frontiers in Microbiology.*, **8**.

## I

Isabela, N. R., Jose, F.S., Katia, R.N.S. (2004) Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J.Endodon.*, **30**, 315 -320.

## J

Jacob, A.E., Hobbs, S.J. (1974) Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J.Bacteriol.*, **117**, 360-372.

Jacobson, S.H., Ostenson, C., Tullus, K., Brauner, A. (1992) Serum resistance in *Escherichia coli* strains causing acute pyelonephritis and bacteraemia. *APMIS.*, **100**, 147-153.

James, D., Shao, H., Lamont, R. J., Demuth, D. R. (2006) The *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ribose binding protein RbsB interacts with cognate and heterologous autoinducer 2 signals. *Infect. Immun.*, **74**, 4021-9.

Jett, B.D., Huycke, M.M., Gilmore, M.S. (1994) Virulence of Enterococci. *Clin. Microbiol.Rev.*, **7**, 462– 478.

Jiang, Y., Camara, M., Chhabra, S.R., Hardie, K.R., Bycroft, B.W., Lazdunski, A., Salmond, G.P.C., Stewart, G.S.A.B., Williams, P. (1998) In vitro biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-butanoyl-L-homoserine lactone. *Mol. Microbiol.*, **28**, 193-203.

Johnson-Green, P.C. (2000) Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, editors. Microbial Biosystems: New Frontiers: Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Halifax, Canada: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, 255–61.

## K

Kaufmann, G.F., Park, J., Mayorov, A.V., Kubitz, D.M., Janda, K.D. (2011) Generation of Quorum quenching antibodies, *Methods. Mol. Biol.*, **692**, 299–311.

Kawaguchi, T., Chen, Y.P., Norman, R.S., Decho, A.W. (2008) Rapid screening of quorum sensing signal N-acyl homoserine lactones by an in vitro cell-free assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 3667-71.

Kayaoglu, G., Orstavik, D. (2004) Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit.Rev.Oral. Biol. Med.*, **15**, 308 – 320.

Kendall, M.M., Rasko, D.A., Sperandio, V. (2007) Global Effects of the Cell-to-Cell Signaling Molecules Autoinducer-2, Autoinducer-3, and Epinephrine in a luxS Mutant of Enterohemorrhagic *Escherichia Coli*. *Infect. Immun.*, **75**, 4875–4884.

Kennedy, C.A., O’Gara, J.P. (2004) Contribution of culture media and chemical properties of polystyrene tissue culture plates to biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *J. Med Microbiol.*, **53**, 1171-1173.

Kenneth, L., Pinkston, Peng Gao, Daniel Diaz-Garcia, Jouko Sillanpa, Sreedhar, R., Nallapareddy, Barbara, E., Murray, Barrett, R., Harvey. (2011) The Fsr Quorum-Sensing System of *Enterococcus faecalis* Modulates Surface Display of the Collagen-Binding MSCRAMM Ace through Regulation of gelE. *J. Bacteriol.*, **193**, 4317-4325.

King, J.T., Goulet, J.L., Perkal, M.F., Rosenthal, R.A. (2011) Glycemic control and infections in patients with diabetes undergoing noncardiac surgery. *Ann. Surg.*, **253**, 158 –165.

Klibi, N., et al. (2007) Detection of virulence factors in high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from a Tunisian hospital. *Can. J. Microbiol.*, **53**, 372-379.

Klosowska, K.K., Plotkin, B.J. (2006) Human insulin modulation of *Escherichia coli* colonization-associated virulence factors. *Amer. J. Infect. Dis.*, **2**, 197-200.

Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N., Blehert, D.S., Eglund, P.G., Foster, J.S., Palmer, R.J. (2002) Communication among Oral Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **66**, 486–505.

Kolterman, O.G., Olefsky, J.M., Kurahara, C., Taylor, K. (1980) A defect in cell-mediated immune function in insulin-resistant diabetic and obese subjects. *J. Lab. Clin. Med.*, **96**, 535–543.

Kristich, C.J., Li, Y.H., Cvitkovitch, D.G., Dunny, G.M. (2004) Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.*, **186**, 154-163.

## L

Leclerc, H., Devriese, L.A., Mossel, D.A.A. (1996) Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci: and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J. Appl. Bacteriol.*, **81**, 459-466.

Li, M., Ni, N., Chou, H. T., Lu, C. D., Tai, P. C., Wang, B. (2008) Structure-based discovery and experimental verification of novel AI-2 quorum sensing inhibitors against *Vibrio harveyi*. *Chem. Med. Chem.*, **3**, 1242-9.

Lithgow, J.K., Wilkinson, A., Hardman, A., Rodelas, B., Wisniewski-Dye, F., Williams, P., Downie, J.A. (2000) The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing. *Mol. Microbiol.*, **37**, 81-97.

Loh, J., Lohar, D. P., Andersen, B., Stacey, G. (2002) A two component regulator mediates population-density-dependent expression of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *J.Bacteriol.*, **184**, 1759.

Lowery, C. A., Dickerson, T. J., Janda, K. D. (2008) Interspecies and inter kingdom communication mediated by bacterial quorum sensing. *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 1337-46.

Lu, Z.S., Meng, L., Liu, Z.H., Ren, G.H., Sun, A.J., Liu, X.M. (2013) Expression of quorum-sensing related genes during *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Europe Pubmed Central.*, **48**, 485-489.

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).

Lux, R., Shi, W. (2004) Chemotaxis-guided movements in bacteria. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, **15**, 207-220.

## M

Madsen, J.S., Burmølle, M., Hansen, L.H., Sørensen, S.J. (2012) The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer, *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.*, **65**,183–95.

Makinen, P. L., Clewell, D.B., An, F., Makinen, K.K. (1989) Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metallo endopeptidase (“gelatinase”) from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10). *J. Biol. Chem.*, **264**, 3325–3334.

Manero, A., Blanch, A.R. (1999) Identification of *Enterococcus spp.* With a biochemical key. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4425-4430.

McAleese, F.M., Walsh, E.J., Sieprawska, M., Potempa, J., Foster, T.J. (2001) Loss of clumping factor B fibrinogen binding activity by *Staphylococcus aureus* involves cessation of transcription, shedding, and cleavage by metalloprotease. *J. Biol. Chem.*, **276**, 29969-29978.

McGavin, M.J., Zahradka, C., Rice, K., Scott, J.E. (1997) Modification of the *Staphylococcus aureus* fibronectin binding phenotype by V8 protease. *Infect. Immun.*, **65**, 2621-2628.

McLean, R.J., Fuqua, C., Siegele, D.A., Kirkland, B.L., Adams, J.L., Whiteley, M. (2000) Biofilm growth and an illustration of its role in mineral formation. In: Bell C, Brylinsky M, Johnson-Green PC, editors. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, editors. Microbial Biosystems: New Frontiers: Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Halifax, Canada: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology; 2000. pp. 255–61.

McNab, R., Lamont, R.J. (2003) Microbial dinner-party conversations: the role of LuxS in interspecies communication. *J.Med. Microbiol.*, **52**, 541–545.

Megran, D.W.(1992) Enterococcal endocarditis. *Clin. Infect. Dis.*, **15**, 63-71.

Miller, S. T., Xavier, K. B., Campagna, S. R., Taga, M. E., Semmelhack, M. F., Bassler, B. L., Hughson, F. M. (2004) *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. *Mol. Cell.*, **15**, 677-87.

Miller, S. T., Xavier, K. B., Taga, M. E., Campagna, S. R., Semmelhack, M. F., Bassler, B. L., Hughson, F. M. (2009) AI-2 compounds and analogs based on *Salmonella typhimurium* LsrB structure. U. S. Patent 2009/0286873A1, 2009.

Mohamed, J. A., Huang, W., Nallapareddy, S.R., Teng, F., Murray., B.E. (2004) Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.*, **72**, 3658–3663.

Mohamed, J.A., Murray, B.E. (2005) Lack of correlation of gelatinase production and biofilm formation in a large collection of *Enterococcus faecalis* isolates, *J.Clin. Microbiol.*, **43**, 5405–7.

Moré, M.I., Finger, L.D., Stryker, J.L., Fuqua, C., Eberhard, A., Winans, S.C. (1996) Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science.*, **272**, 655-1658.

Mundy, L.M., Sahm, D.F., Gilmore, M. (2000) Relationships between Enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin.Microbiol.Rev.*, **13**, 513 – 522.

Muras, A., López-Pérez, M., Mayer, C., Parga, A., Amaro-Blanco, J., Otero, A. (2018) High Prevalence of Quorum-Sensing and Quorum-Quenching Activity among Cultivable Bacteria and Metagenomic Sequences in the Mediterranean Sea. *Genes.*, **9**, 1-20.

Murray, B, E. (1990) The Life and times of *Enterococcus*. *Clin.Microbiol.Rev.*, **3**, 46 – 65.

Murray, B.E., et al. (1993) Generation of restriction map of *Enterococcus faecalis* OG1 and investigation of growth requirements and regions encoding biosynthetic function. *J.Bacteriol.*, **175**, 5216-5223.

## N

Nagy, E., Maier, T., Urban, E., Terhes, G., Kostrzewa, M. (2009) Species identification of clinical isolates of Bacteroides by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.*, **15**, 796-802.

Nievas, F., Bogino, P., Sorroche, F., Giordano, W. (2012) Detection, Characterization, and Biological Effect of Quorum-Sensing Signaling Molecules in Peanut-Nodulating Bradyrhizobia, *Sensors.*, **12**, 2851-2873.

Nivens, D.E., Ohman, D.E., Williams, J., Franklin, M.J. (2001) Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J. Bacteriol.*, **183**, 1047–57 and Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation, *Science.*, **295**, 1487.

Novick, R.P. (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.*, **48**, 1429-1449.

## O

Ohtani, K., Hayashi, H., Shimizu, T. (2002) The luxS gene is involved in cell-cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*. *Mol. Microbiol.*, **44**, 171-9.

Orstavik, D., Haapasalo, M. (1990) Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod. Dent. Traumatol.*, **6**, 142-9.

**P**

Pei, D., Zhu, J. (2004) Mechanism of action of S-ribosylhomocysteinase (LuxS). *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8**, 492-497.

Plotkin, B., Bemis, D. (1984). Adherence of *Bordetella bronchiseptica* to hamster lung fibroblasts. *Infect. Immun.*, **46**, 697-702.

Plotkin, B.J., Viselli, S.M. (2000) Effect of insulin on microbial growth. *Curr. Microbiol.*, **41**, 60–64.

**Q**

Qin, X., Singh, K.V., Weinstock, G.M., and Murray, B.E. (2000) Effects of *Enterococcus faecalis* fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect. Immun.*, **68**, 2579–2586.

Qin, X., Singh, K.V., Weinstock, G.M., Murray, B.E. (2001) Characterization of fsr, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J. Bacteriol.*, **183**, 3372–3382.

**R**

Raina, S., De Vizio, D., Odell, M., Clements, M., Vanhulle, S., Keshavarz, T. (2009)

Microbial quorum sensing: a tool or a target for antimicrobial therapy? *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **54**, 65-84.

Rasmussen, T. B., Givskov, M. (2006) Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology.*, **152**, 895-904.

Reading, N.C., Sperandio, V. (2006) Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **254**, 1-11.

Richards, M. J., Edwards, J.R., Culver, D.H., Gaynes, R.P. (2000) Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, **21**, 510–515.

Ricucci, D., Siqueira, J.F. (2010) Biofilms and apical periodontitis: Study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings, *J. Endod.*, **36**, 1277–88.

Ryan, R. P., Fouhy, Y., Garcia, B. F., Watt, S. A., Niehaus, K., Yang, L., Tolker-Nielsen, T., Dow, J. M. (2008) Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*, **68**, 75-86.

### S

Safari, M., Amache, R., Esmaeillishirazifard, E., Keshavarz, T. (2014) Microbial metabolism of quorum-sensing molecules acyl-homoserine lactones,  $\gamma$ -heptalactone and other lactones. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 3401-3412.

Schafer, E., Bossmann, K. (2001) Antimicrobial efficacy of chloroxylenol and chlorhexidine in the treatment of infected root canals. *Am. J. Dent.*; **14**, 233- 7.

Schauder, S., Bassler, B. L. (2001) The languages of bacteria. *Genes. Dev.*, **15**, 1468–1480.

Schleifer, K.H., Kilpper-Bälz, R. (1984) Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom.rev.as *Enterococcus faecalis* comb.nov. and *Enterococcus faecium* comb.nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, **34**, 31-34.

Schleifer, K.H., Kilpper-Bälz, R. (1987) Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.*, **10**, 1-19.

Sedgley, C.M., Molander, A., Flannagan, S.E., Nagel, A.C., Appelbe, O.K., Clewell, D.B., et al. (2005) Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp, *Oral. Microbiol. Immunol.* **20**, 10–9.

Sehgal, R., et al. (2011) Risk factors for surgical site infections after colorectal resection in diabetic patients. *J. Am. Coll. Surg.*, **212**, 29 –34.

- Seneviratne, C.J., Yip, J.W.Y., Chang, J.W.W., Zhang, C.F., Samaranyake, L.P. (2013) Effect of culture media and nutrients on biofilm growth kinetics of laboratory and clinical strains of *Enterococcus faecalis*. *Arch.Oral.Biol.*, **58**, 1327-1334.
- Shao, C., Shang, W., Yang, Z., Sun, Z., Li, Y., Guo, J. et al. (2012) LuxS-dependent AI-2 regulates versatile functions in *Enterococcus faecalis* V583. *J. Proteome. Res.***11**, 4465-4475.
- Shapiro, J.A. (1998) Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol.*, **52**, 81-104.
- Shpakov, A.O. (2009) QS-Type Bacterial Signal Molecules of Nonpeptide Origin, *Microbiology.*, **78**, 133-143.
- Sifri, C.D. (2008) *Quorum sensing: Bacteria Talk Sense*, *Clin. Infect. Dis.*, **47**, 1070–6 and Arevalo-Ferro, C., Hentzer, M., Reil, G., Görg, A., Kjelleberg, S., Givskov, M., et al. (2003) Identification of *Quorum sensing* regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics, *Environ. Microbiol.*, **5**, 1350–69.
- Signoretto, C., Del Mar Lleò, M., Tafi, M.C., Canepari, P. (2000) Cell wall Chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but Nonculturable State. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1953-1959.
- Silversmith, R., Bourret, R. (1999) Throwing the switch in bacterial chemotaxis. *Trends. Microbiol.*, **7**, 16-22.
- Singh, K. V., Qin, X., Weinstock, G.M., Murray, B.E. (1998) Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J. Infect. Dis.*, **178**, 1416–1420.
- Siperstein, M.D. (1985) Type II diabetes: some problems in diagnosis and treatment. *Hosp. Pract.*, **20**, 55–63.
- Slater, H., Alvarez-Morales, A., Barber, C. E., Daniels, M. J., Dow, J. M. (2000) A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol. Microbiol.*, **38**, 986-1003.
- Steindler, L., Venturi, V. (2007) Detection of Quorum-Sensing N-Acyl Homocysteine Lactone Signal Molecules by Bacterial Biosensors, *FEMS. Microbiol. Letts.*, **266**, 1–9.

Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., Ruzicka, F. (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci. *APMIS.*, **115**, 891-899.

Stewart, P.S., Peyton, B.M., Drury, W.J., Murga, R. (1993) Quantitative observations of heterogeneities in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 327–9.

Sundqvist, G., Johansson, E., Sjögren, U. (1989) Prevalence of black pigmented Bacteroides species in root canal infections. *J. Endod.*, **15**, 13-19.

Sundqvist, G., Figdor, D., Persson, S., Sjögren, U. (1998) Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment, *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.*, **85**, 86–93 and Sedgley, C., Nagel, A., Dahlén, G., Reit, C., Molander, A. (2006) Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals, *J. Endod.*, **32**, 173–7.

Surette, M. G., Miller, M.B., Bassler, B.L. (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**, 1639–1644.

Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A., Georgellis, D. Babitzke, P., Romeo, T.(2002) Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **184**, 5130-5140.

Szurmant, H., Ordal, G. (2004). Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **68**, 301-319.

## T

Tao, F., Swarup, S., Zhang, L. H. (2010) Quorum sensing modulation of a putative glycosyltransferase gene cluster essential for *Xanthomonas campestris* biofilm formation. *Environ. Microbiol.*, **12**, 3159-70.

Taylor, K.G., Doyle, R.J. (1987) Energetics of the initial phase of adhesion of *Streptococcus sanguis* to hydroxyapatite, *J. Bacteriol.*, **169**, 2995–3000.

Taylor, B., Zhulin, I. (1998) In search of higher energy: metabolism-dependent behavior in bacteria. *Molec. Microbiol.*, **28**, 683-690.

Thiel, V., Vilchez, R., Sztajer, H., Wagner-Dobler, I., Schulz, S. (2009) Identification, quantification, and determination of the absolute configuration of the bacterial quorum-sensing signal autoinducer-2 by gas chromatography-mass spectrometry. *Chem.Bio.Chem.*, **10**, 479-85.

Thornton, G.F. (1971) Infections and diabetes. *Med. Clin. North. Am.*, **55**, 931–938.

Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M.J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penades, J.R., Lasa, I. (2001) The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**,4538–4545.

Torabinejad, M., Shabahang, S., Aprecio, R.M., Kettering, J.D. (2003) The antimicrobial effect of MTAD: an in vitro investigation. *J. Endodontics.*, **29**, 400–403.

## V

Vasil, M.L. (2003) NA Microarrays in Analysis of *Quorum sensing*: Strengths and Limitations, *J. Bacteriol.*, **185**, 2061–5.

Vendeville, A., Winzer, K., Heurlier, K., Tang, C. M., Hardie, K. R. (2005) Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 383-96.

## W

Wang, L. H., He, Y., Gao, Y., Wu, J. E., Dong, Y. H., He, C., Wang, S. X., Weng, L. X., Xu, J. L., Tay, L., Fang, R. X., Zhang, L. H. (2004) A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol. Microbiol.*, **51**, 903-12.

Wang, L., Dong, M., Zheng, J., Song, Q., Yin, W., Li, J., Niu, W. (2011) Relationship of biofilm formation and gelE gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. *J.Endod.*, **37**, 631-636.

Waters, C. M., Antiporta, M.H., Murray, B.E., Dunny., G.M. (2003) Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J. Bacteriol.*, **185**, 3613–3623.

Waters, C.M., Bassler, B.L. (2005) Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria, *Annu. Rev. Cell. Dev.Biol.*, **21**, 319–346.

Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J., Salmond, G.P. (2001) Quorum-Sensing in Gram-Negative Bacteria, *FEMS. Microbiol. Rev.*, **25**, 365–404.

Williams, P., Camara, M., Hardman, A., Swift, S., Milton, D., Hope, V.J, Winzer, K., Middleton, B., Pritchard, D.I., Bycroft, B.W. (2000) Quorum sensing and the population dependent control of virulence. *Philos. Trans. R. Soc.*, **355**, 667-680.

Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C. (1999) What are bacterial extracellular polymeric substances?. *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function. Springer Verlag.*, 1–19.

Winston, L.G., Pang, S., Haller, B.L., Wong, M., Chambers, H.F., Perdreau Remington, F. (2004) API 20 Strep identification system may incorrectly speciate enterococci with low level resistance to vancomycin. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **48**, 287-288.

Withers, H., Swift, S., Williams, P. (2001) Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr. Opin. In. Microbiol.*, **4**, 186–193.

## X

Xavier, K. B., Bassler, B. L. (2003) LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr. Opin.Microbiol.*, **6**, 191-7.

Xavier, K. B., Bassler, B. L. (2005) Interference with AI-2-Mediated Bacterial Cell-Cell Communication, *Nature.*, **437**, 750-753.

## Z

Zimmet, P. Alberti, K.G., Shaw, J. (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.*, **414**, 782–787.

Zoletti, G.O., Siqueira, J.F., Santos, K.R.N. (2006) Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and independent approaches, *J. Endod.*, **32**, 722-726.

*Publication  
Scientifique*

**Article publié**

- **Effect of N-acyl homoserine lactones (AHLs) quorum sensing signal molecules on *Enterococcus faecalis* biofilm formation.**

Karima Bensalem, Ryad Djeribi, and Francisco Javier López Baena. African Journal of Microbiology Research. August 20, 2014.

Nom du journal: **African Journal of Microbiology Research**

Pays du journal: NIGERIA

Impact Factor: 0.54

Academic Journals, Web of Science<sup>®</sup>, Science Citation Index Expanded<sup>™</sup> published by Thomson Reuters, 2012

Editor : Academic Journals

ISSN : 1996-0808

Online ISSN : /

Full Length Research Paper

## Effect of N-acyl homoserine lactones (AHLs) quorum sensing signal molecules on *Enterococcus faecalis* biofilm formation

Karima Bensalem<sup>1\*</sup>, Ryad Djeribi<sup>1</sup> and Francisco Javier López Baena<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar Annaba (UBMA), BP12 Sidi Amar, 23000 Annaba, Algeria.

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Seville (US), Avenue Reina Mercedes, 6-41012 Seville, Spain.

Received 3 June, 2014; Accepted 4 August, 2014

**The Gram-positive bacterium *Enterococcus faecalis* is an etiological agent of endodontic infections in oral biofilms. In the present study, we analyzed the effect of N-acyl homoserine lactones (AHLs) quorum sensing signal molecules on *E. faecalis* biofilm formation ability. Our results provide important effects of N-Hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) and N-octanoyl-L-homoserine lactone (C8-HSL) molecules on *E. faecalis* biofilm formation. These AHLs molecules promoted the biofilm formation of *E. faecalis*.**

**Key words:** N-acyl homoserine lactones (AHLs), bacterial communication, biofilm, *Enterococcus faecalis*, quorum sensing.

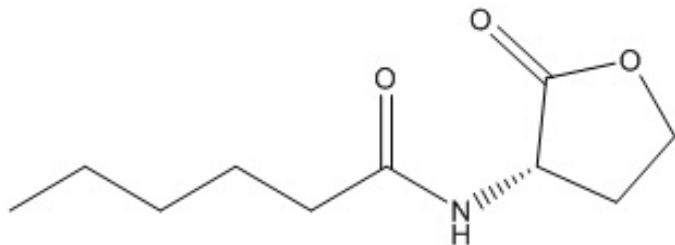
### INTRODUCTION

Several species of bacteria employ a mechanism of intercellular communication known as quorum sensing (QS). This signaling process allows the cells comprising a bacterial colony to coordinate their gene expression in a cell-density dependent manner (Fuqua et al., 2001; Bassler and Losick, 2006). Thus, quorum sensing enables the cells within a bacterial colony to act cooperatively, facilitating population-dependent adaptive behavior (Atkinson and Williams, 2009). Quorum sensing has been shown to play a critical role in pathogenic

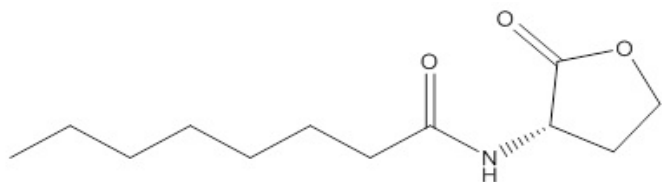
bacteria-host interactions (Boyer and Wisniewski-Dyé, 2009).

Bacterial intercellular communication relies on autoinducers (AI), endogenous chemical compounds which are synthesized intracellularly throughout the growth of the bacteria and secreted into the environment. Some AI are bound to the membrane receptors located on the cell surface, while others may penetrate the membrane and bind to the intracellular receptors. After binding with the receptors, AI activate a broad spectrum

\*Corresponding author. E-mail: karima.bensalem60@yahoo.com. Tel: 00 213-554-637-951.



**Figure 1.** The biochemical structure of C6-HSL.



**Figure 2.** The biochemical structure of C8-HSL.

of effector systems affecting the regulation of expression of a number of genes, including those encoding the synthesis and secretion of antibiotics, virulent factors, and formation of cell aggregates or surface biofilms (Whitehead et al., 2001; Sun et al., 2004; Waters and Bassler, 2005; Bassler and Losick, 2006; Camilli and Bassler, 2006; Steindler and Venturi, 2007).

The most widespread and important autoinducers are lactones of *N*-acylated homoserine (AI-1, AHL) (Galloway et al., 2011). AHLs are the most common class of autoinducer used by Gram-negative bacteria; indeed quorum sensing mediated by AHLs represents one of the best-understood bacterial systems at the molecular level (Geske et al., 2008).

Cyclic peptides are the major class of cell-cell signaling molecules in Gram-positive bacteria (Duan et al., 2003; Xavier and Bassler, 2003; Vendeville et al., 2005; De Keersmaecker et al., 2006). Furthermore, small-molecule effects can be controlled by altering the concentration of the small molecule, thereby allowing the generation of dose-response data (Geske et al., 2008; Galloway et al., 2011).

*E. faecalis* is a Gram-positive cocci; facultative anaerobic bacteria that is known to be the most frequently detected species in root canals with failed endodontic treatment (Wang et al., 2011). It has been reported that the quorum sensing system in *E. faecalis* is closely related to the biofilm formation (Lu et al., 2013). However, the effect of quorum sensing signal molecules *N*-Acyl homoserine lactones (AHLs) produced only by Gram-negative bacteria on biofilm formation of Gram-positive oral bacteria is not yet investigated and not well understood. The objective of this study was to investigate the effect of a quorum sensing signal molecules AHLs

produced by Gram-negative bacteria on biofilm formation of a Gram-positive bacterium which is *E. faecalis* recovered from root canals of patients with endodontic infections.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strain, growth conditions and identification

*E. faecalis* strain was isolated from clinical samples of teeth of patients with endodontic infections in the dental surgery service of the University Hospital of Annaba (Algeria). *E. faecalis* was grown anaerobically (BD Gas Pak Anaerobe Generating Container System) at 37°C on M17 agar plates. M17 broth medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 1% glucose was used for broth cultures (Kristich et al., 2004). Isolates, which were suspected as *Enterococcus* were immediately Gram stained to verify that they were Gram-positive, and analyzed for catalase-negative test (it is generally agreed that the genus *Enterococcus* comprises Gram-positive cocci that are catalase negative, usually facultative, anaerobic bacteria that grow in 6.5% NaCl, 40% bile salts. They grow at 10 and 45°C and can resist 30 min at 60°C) (Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984; Schleifer and Kilpper-Bälz, 1987; Leclerc et al., 1996; Manero and Blanch, 1999). Isolates were identified to species level according to the standard biochemical tests using the API 20Strep system (bioMérieux, USA) for the identification of *E. faecalis* strain (Winston et al., 2004; Zoletti et al., 2006). The identification of *E. faecalis* strain was also confirmed using the mass spectrometry (MALDI-TOF) analysis.

### AHLs molecules

The AHLs quorum sensing signal molecules used in this study were purchased from Sigma-Aldrich (Spain); they are commercially available. In the present study, we will investigate the effect of two AHLs molecules: *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) (Figure 1) and *N*-octanoyl-L-homoserine lactone (C8-HSL) (Figure 2) on biofilm formation of the Gram-positive bacterium *E. faecalis*. The concentration of each AHL molecule added to the M17 liquid culture of *E. faecalis* was 1 µL.

### Biofilm formation

An automatic microplate reader was used to investigate the biofilm formation ability of *E. faecalis* strain. The microplates for biofilm cultivation were sterile 96-well polystyrene (Sterilin Limited, U.K.). The inoculum was prepared from *E. faecalis* grown in M17 broth supplemented with 1% glucose (weight/volume), and 200 µL is poured into the well (Christensen et al., 1985; Kennedy and O'Gara, 2004; Stepanović et al., 2007). The negative control wells (NC) (without AHLs) contain only 100 µL of *E. faecalis* culture in M17 broth supplemented with 1% glucose (initial optical density OD<sub>600</sub> at 600 nm was OD<sub>600</sub> = 0.2 nm) + 100 µL of fresh and sterile M17 broth supplemented with 1% glucose per well. The positive control wells (PC1 and PC2) (with AHLs) contained 100 µL of *E. faecalis* culture in M17 broth supplemented with 1% glucose (OD<sub>600</sub> = 0.2 nm) + 99 µL of fresh and sterile M17 broth supplemented with 1% glucose + 1 µL of the AHL molecule used (C6-HSL and C8-HSL) respectively per well (the positive control PC1 with C6-HSL; and the positive control PC2 with C8-HSL). The inoculated microplate was covered with a lid and incubated for 48 h of growth at 37°C, anaerobically using BD Gas Pak Anaerobe Generating Container System. After incubation, the wells in the microplate were emptied

from the liquid culture of *E. faecalis*, then washed three times with a sterile saline solution of (NaCl 0.9 % weight/volume).

After washing, the remaining attached bacteria should be heat-fixed (drying completely) by exposing them to hot air at 56°C for 30 min; then the adherent biofilm layer formed on the bottom and walls of the well was stained; 200 µL of crystal violet 0.1% per well for 30 min at room temperature (Seneviratne et al., 2013). After staining, the wells were rinsed off by placing the microplate under running water. Washing was continued until the washings were free of the stain. Then, the microplate was air dried at room temperature. Then, the dye bound to the cells were resolubilized, that is eluted from attached cells with 95% ethanol (200 µL per well); ethanol was gently added and thereafter the microplate was covered with the lid (to minimize evaporation) and left at room temperature for at least 30 min without shaking (Branda et al., 2005). Finally, the optical density (OD) of each well stained with crystal violet was measured at 570 nm using the automatic microplatereader. Optical density at 570 nm (OD<sub>570</sub>) was measured to assess biofilm formation ability by the *E. faecalis* strain in each well. Then, the average in each lane (8 wells) of the microplate was calculated. This protocol was repeated three times to confirm the effect of AHLs used on *E. faecalis* biofilm formation.

## RESULTS

### Bacterial strain, growth conditions and identification

Mass spectrometry (MALDI-TOF) allowed the identification of *E. faecalis* strain by analysis of its protein content and study of ionic species moving in electromagnetic fields. The ions generated from the bacterial colony of *E. faecalis* spread on the steel metallic target, were separated according to their time of flight (TOF). It means the measurement of the time that ions took when they were subjected to an accelerating voltage to travel the length of the flight tube. The separation of ions depends mainly on their mass. For each group of ions that have the same ratio *m/z* (mass/charge), a signal was recorded in the detector as a time/intensity function. Thus, the set of peaks constituted a recorded mass spectrum. The spectra generated from the whole bacteria were then compared to reference spectra present in the data base of an expert system. Comparison of the spectrum of our strain *E. faecalis* (previously identified by the standard biochemical test using API 20 Strep system) was obtained from the mass spectrometer with thousands of reference spectra. The name of the bacterium displayed on the screen was: *E. faecalis*. The spectrum of *E. faecalis* was obtained after placing the plate containing the whole bacterial cells in the spectrometer.

### Quantification of *E. faecalis* biofilm formed on polystyrene

The results of the average of optical density at 570 nm (OD<sub>570</sub>) obtained were: In the negative control wells NC (without AHLs) OD<sub>570</sub> = 1.1 nm; in the positive control wells PC1 (with 1 µL of C6-HSL molecule) OD<sub>570</sub> = 1.9 nm; in the positive control wells PC2 (with 1 µL of C8-

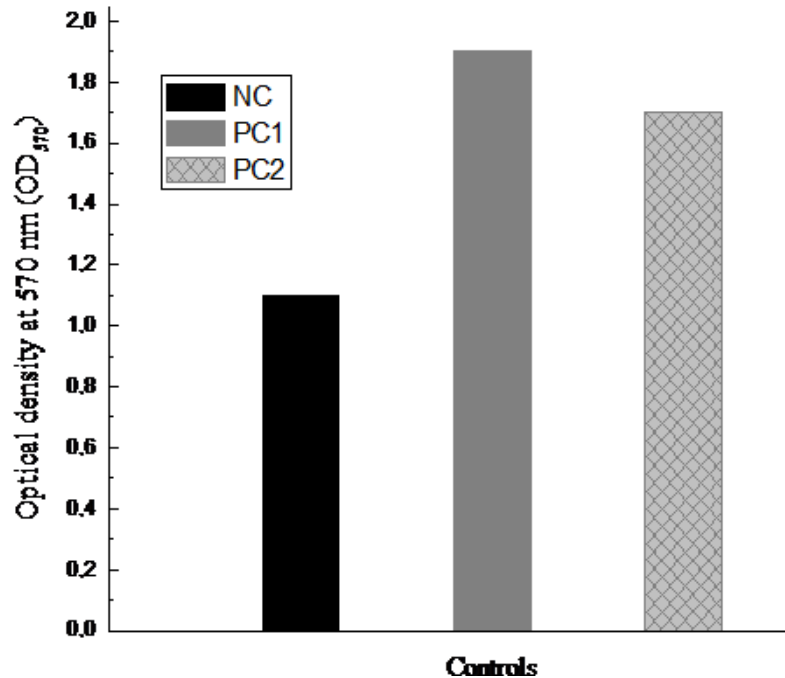
HSL molecule) OD<sub>570</sub> = 1.7 nm.

The results mentioned above have shown that the addition of 1 µL of the AHLs molecules tested in this study (C6-HSL or C8-HSL) to the culture of *E. faecalis* in M17 broth supplemented with glucose 1% promoted the biofilm formation ability of *E. faecalis* strain (Figure 3). The values of the optical density at 570 nm (OD<sub>570</sub>) obtained in the negative and positive controls were the same in the three repetitions.

## DISCUSSION

The *E. faecalis* bacteria have been identified as the most commonly recovered species from teeth with persistent endodontic infections (Martos et al., 2013). *E. faecalis* has also been implicated in persistent root canal infections (Preethee et al., 2012). Anaerobic bacteria, especially Gram-negative species of *Prevotella* and *Porphyromonas*, are frequently associated with signs and symptoms of endodontic origin (Haapasalo, 1989; Sundqvist et al., 1989; Hashioka et al., 1992), and facultative species such as *E. faecalis* have been isolated in high frequency from refractory cases (Hancock et al., 2001). The cell-to-cell communication of microorganisms is known to be via exertion of certain chemical compounds (signal molecules) and is referred to as quorum sensing. QS phenomenon is widespread in microbial communities (Safari et al., 2014). It is known that bacteria utilize a quorum sensing system to coordinate gene expression by monitoring the concentration of molecules known as AI (Shao et al., 2012). Bacteria use the QS mechanism to regulate a variety of phenotype, such as biofilm formation which is essential for the successful establishment of a symbiotic or pathogenic relationship with eukaryotic host cell (Myszka and Czaczyk, 2012). AHL-QS systems produce and respond to AHLs using two proteins that mediate signal production and response, LuxI and LuxR-like proteins, respectively (Nealson et al., 1970; Ruby, 1996). LuxR-like proteins are response regulators that mediate the expression of genes required for communal behavior in response to intracellular concentrations of cognate AHLs molecules (Fuqua and Winans, 1994; Fuqua et al., 1996; Cude and Buchan, 2013). Some bacterial pathogens are capable of colonizing infection sites and employing N-acyl homoserine lactones (AHLs) based quorum-sensing systems to co-ordinate biofilm formation (Bhargava et al., 2012). In the present study, we confirmed that the AHLs quorum sensing signal molecules (C6-HSL and C8-HSL) promoted the biofilm formation of the Gram-positive bacterium *E. faecalis* isolated from endodontic infections.

In 2012, a study realized in Beijing (China) at the institute of disease control and prevention, academy of military medical sciences, reported that the quorum sensing system in *E. faecalis* is based on AI-2 molecule.



**Figure 3.** Values of optical density at 570 nm (OD<sub>570</sub>) for *E. faecalis* biofilm formation on polystyrene obtained in negative and positive controls. NC, negative control (without AHLs). PC 1, positive control with 1 µL of C6-HSL; PC 2, positive control with 1 µL of C8-HSL.

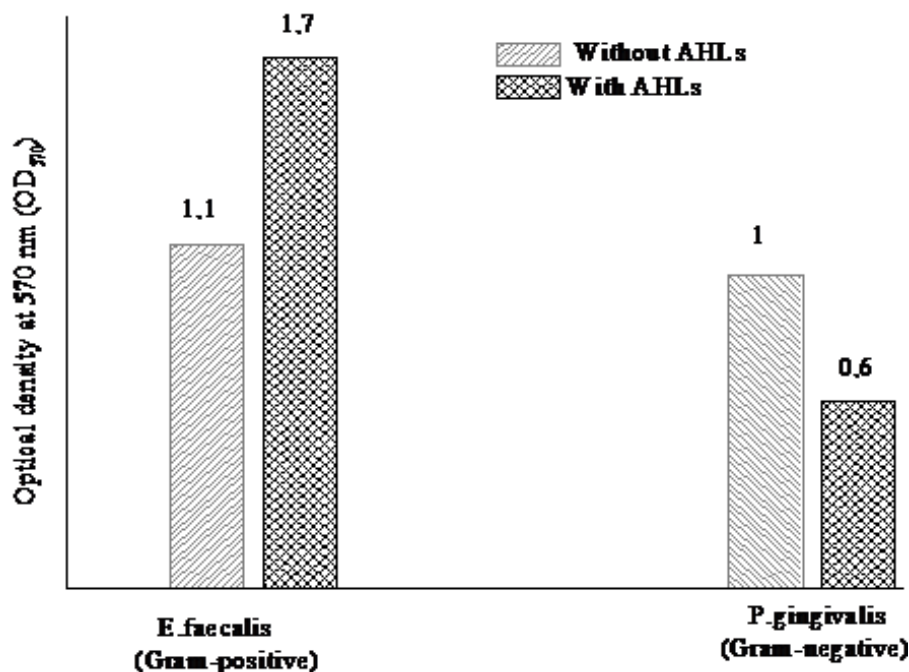
Further, the role of AI-2 in biofilm formation by *E. faecalis* was investigated, showing that the addition of AI-2 molecule to *E. faecalis* V583 cultures resulted in increased biofilm formation (Shao et al., 2012). Thus, the quorum sensing system in *E. faecalis* is closely related to the biofilm formation of this bacterium (Lu et al., 2013). From the results obtained in the present study, we suggest that the *N*-Acyl Homoserine Lactones AHLs molecules produced by Gram-negative bacteria can interfere with the quorum sensing system of a Gram-positive bacterium which is *E. faecalis* and consequently regulate the biofilm formation ability in *E. faecalis* strain. This suggestion confirms the possible interspecies communication between Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Mature dental biofilms consist of towering microcolonies in which the resident bacterial cells interact with one another and exchange messages in the form of signaling molecules and metabolites. It is evident that mutually beneficial interactions between microbial cells are essential to the development of biofilms in the oral cavity (Jakubovics, 2010). Thus, the presence of Gram-negative bacteria in oral biofilms can influence the biofilm formation and growth of Gram-positive bacteria like *E. faecalis* by producing quorum sensing signal molecules (AHLs) and consequently promoting the development of endodontic infections.

In 2010, a study realized in Osaka (Japan) at the

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University graduate school of dentistry, reported that three synthetic *N*-acyl homoserine lactones analogues (*N*-acyl HSL) inhibited the biofilm formation in the Gram-negative bacterium *Porphyromonas gingivalis* which is a primary agent of periodontal disease in oral biofilms (Asahi et al., 2010). Thus, the effects of *N*-acyl homoserine lactones molecules on bacterial biofilm formation are different depending on the Gram-positive or Gram-negative bacteria (Figure 4).

These different effects of the autoinducer molecules named AHLs on bacterial biofilm formation of the Gram-positive strain *E. faecalis* and the Gram-negative strain *P. gingivalis* confirms that the difference in biochemical composition of the bacterial cell wall between Gram-positive and Gram-negative bacteria plays a critical role in recognition and binding of the autoinducer molecule and also in the resulting effects of this molecule. The biochemical composition of the cell wall of *E. faecalis* strain has shown that the cell was endowed with a wall resistant to mechanical disruption, peptidoglycan, penicillin binding proteins (PBPs), muramidase enzyme and accessory wall polymers such as teichoic acid and lipoteichoic acid (Signoretto et al., 2000). The biochemical composition of cell-wall of Gram-positive bacteria has shown a very high proportion of the amino-acids such as: alanine, glutamic acid, lysine, diaminopimelic acid, aspartic acid and glycine. These



**Figure 4.** The different effects of AHLs molecules on bacterial biofilm formation of the Gram-positive bacterium *E. faecalis* and the Gram-negative bacterium *P. gingivalis*.

were associated with varying combinations of sugars and amino sugars (Cummins and Harris, 1956). The Gram-negative bacteria possess a lipid-rich outer membrane (as well as a plasma membrane) and a thin peptidoglycan layer. Gram-positive bacteria are enshrouded in thicker, more resilient cell walls (Beveridge, 1999).

## Conclusion

The present study has shown that quorum sensing signal molecules named “AHLs” can have a significant effect on oral Gram-positive bacteria by promoting the biofilm formation of *E. faecalis* strain isolated from teeth of patients with endodontic infections in Algeria. Furthermore, it was evident that these AHLs molecules act differently on biofilm formation of Gram-positive or Gram-negative oral bacteria. AHLs promoted the biofilm formation of the Gram-positive oral bacterium (*E. faecalis*) but inhibited the biofilm of the Gram-negative oral bacterium (*P. gingivalis*). Finally, we have to take advantage of these results to well understand the biological activity of these signal molecules in oral biofilms in order to minimize human oral infections.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Professor Jean Christophe Giard from the Laboratory Of Microbiology, Research Unit of Microbial Risks (U2RM), CHU Côte de Nacre, 14033 Caen Cedex, France for his technical assistance to identify the bacterial strain *E. faecalis* by MALDI-TOF (mass spectrometry) analysis.

## REFERENCES

- Asahi Y, Noiri Y, Igarashi J, Asai H, Suga H, Ebisu S (2010). Effects of N-acyl homoserine lactone analogues on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. J. Periodontal. Res. 45(2):255-261.
- Atkinson S, Williams P (2009). Quorum sensing and social networking in the microbial world. J. R. Soc. Interface. 6 (40):959-978.
- Bassler BL, Losick R (2006). Bacterially speaking. Cell. 125(2):237-246.
- Beveridge TJ (1999). Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. J. Bacteriol. 181(16):4725-4733.
- Bhargava N, Sharma P, Capalash N (2012). N-acyl homoserine lactone mediated interspecies interactions between *A. baumannii* and *P. aeruginosa*. Biofouling 28(8): 813-822.
- Boyer M, Wisniewski-Dyé F (2009). Cell-cell signalling in bacteria: Not simply a matter of quorum. FEMS. Microbiol. Ecol. 70(1):1-19.
- Branda SS, Vik A, Friedman L, Kolter R (2005). Biofilms: The matrix revisited. Trends Microbiol. 13 (1):20-26.
- Camilli A, Bassler BL (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. Science. 311(5764):1113-1116.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J. Clin. Microbiol. 22 (6):996-1006.
- Cude WN, Buchan A (2013). Acyl-homoserine lactone based quorum

- sensing in the Roseobacter clade: complex cell to cell communication controls multiple physiologies. *Front. Microbiol.* 4(336):1-12.
- Cummins CS, Harris H (1956). The chemical composition of the cell wall in some Gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character. *J. Gen. Microbiol.* 14(3):583-600.
- De Keersmaecker SC, Sonck K, Vanderleyden J (2006). Let LuxS speak up in AI-2 signaling. *Trends. Microbiol.* 14(3):114-119.
- Duan K, Dammel C, Stein J, Rabin H, Surette MG (2003). Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Mol. Microbiol.* 50(5):1477-1491.
- Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* 35 (1): 439-468.
- Fuqua C, Winans S, Greenberg EP (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 50(1):727-751.
- Fuqua WC, Winans SC (1994). A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J. Bacteriol.* 176(10):2796-2806.
- Galloway WR, Hodgkinson JT, Bowden SD, Welch M, Spring DR (2011). Quorum sensing in Gram-negative bacteria: Small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem. Rev.* 111(1):28-67.
- Geiske GD, O'Neill JC, Blackwell HE (2008). Expanding dialogues: From natural autoinducers to non-natural analogues that modulate quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chem. Soc. Rev.* 37(7):1432-1447.
- Haapasalo M (1989). *Bacteroides* spp. in dental root canal infections. *Endod. Dent. Traumatol.* 5(1):1-10.
- Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J (2001). Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a north american population. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.* 91(5):579-586.
- Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A, Horiba N, Nakamura H (1992). The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *J. Endod.* 18(11):558-561.
- Jakubovics NS (2010). Talk of the town: interspecies communication in oral biofilms. *Mol. Oral. Microbiol.* 25(1):4-14.
- Kennedy CA, O'Gara JP (2004). Contribution of culture media and chemical properties of polystyrene tissue culture plates to biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 53(11):1171-1173.
- Kristich CJ, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunne GM (2004). Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 186(1):154-163.
- Leclerc H, Devriese LA, Mossel DAA (1996). Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J. Appl. Bacteriol.* 81(5):459-466.
- Lu ZS, Meng L, Liu ZH, Ren GH, Sun AJ, Liu XM (2013). Expression of quorum-sensing related genes during *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Chin. J. Stomatol.* 48(8):485-489.
- Manero A, Blanch AR (1999). Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(10):4425-4430.
- Martos J, FerrerLuque CM, González-Rodríguez MP, Arias-Moliz MT, Baca P (2013). Antimicrobial activity of essential oils and chloroform alone and combined with cetrimide against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 3(1):44-48.
- Myszka K, Czaczyk K (2012). N-acyl homoserine lactones AHLs as phenotype control factors produced by Gram-negative bacteria in natural ecosystems. *Pol. J. Environ. Stud.* 21(1):15-21.
- Nealson K H, Platt T, Hastings JW (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* 104(1):313-322.
- Preethee T, Kandaswamy D, Hannah R (2012). Molecular identification of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen efaA in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *J. Conserv. Dent.* 15(4):319-322.
- Ruby EG (1996). Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 50(1):591-624.
- Safari M, Amache R, Esmaeilshirazifard E, Keshavarz T (2014). Microbial metabolism of quorum-sensing molecules acyl-homoserine lactones,  $\gamma$ -heptalactone and other lactones. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(8):3401-3412.
- Schleifer KH, Kilpper-Bälz R (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34(1): 31-34.
- Schleifer KH, Kilpper-Bälz R (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.* 10(1):1-19.
- Seneviratne CJ, Yip JWY, Chang JWW, Zhang CF, Samaranyake LP (2013). Effect of culture media and nutrients on biofilm growth kinetics of laboratory and clinical strains of *Enterococcus faecalis*. *Arch. Oral. Biol.* 58(10):1327-1334.
- Shao C, Shang W, Yang Z, Sun Z, Li Y, Guo J, Wang X, Zou D (2012). LuxS-dependent AI-2 regulates versatile functions in *Enterococcus faecalis* V583. *J. Proteome. Res.* 11(9):4465-4475.
- Signoretto C, Del Mar Lleò M, Tafi MC, Canepari P (2000). Cell Wall Chemical Composition of *Enterococcus faecalis* in the Viable but Nonculturable State. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(5):1953-1959.
- Steindler L, Venturi V (2007). Detection of quorum-sensing N-acyl homocysteine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS. Microbiol. Lett.* 266(1):1-9.
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, Ruzicka F (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci. *APMIS.* 115(8):891-899.
- Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U (1989). Prevalence of black pigmented *Bacteriodes* species in root canal infections. *J. Endod.* 15(1):13-19.
- Sun J, Daniel R, Wagner-Döbler I, Zeng AP (2004). Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC. Evol. Biol.* 4(36):1-11.
- Vendeville A, Winzer K, Heurlier K, Tang CM, Hardie KR (2005). Making sense of metabolism: Autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(5):383-396.
- Wang L, Dong M, Zheng J, Song Q, Yin W, Li J, Niu W (2011). Relationship of biofilm formation and gelE gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. *J. Endod.* 37(5):631-636.
- Waters CM, Bassler BL (2005). Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 21(1):319-346.
- Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmund GP (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* 25(4):365-404.
- Winston LG, Pang S, Haller BL, Wong M, Chambers HF, Perdreau-Remington F (2004). API 20 Strep identification system may incorrectly speciate enterococci with low level resistance to vancomycin. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 48(4):287-288.
- Xavier KB, Bassler BL (2003). LuxS quorum sensing: More than just a numbers game. *Curr. Opin. Microbiol.* 6(2):191-197.
- Zoletti GO, Siqueira JF, Santos KRN (2006). Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and independent approaches. *J. Endod.* 32(8):722-726.

# *Annexes*

## Composition des milieux de culture

### 1. Gélose BEA (Bile Esculine Azide) :

COMPOSITION	gramme/ Litre
<i>Tryptone</i>	17 g/L
<i>Peptone pepsique de viande</i>	3 g/L
<i>Extrait autolytique de levure</i>	5 g/L
<i>Bile de bœuf bactériologique</i>	10 g/L
<i>Chlorure de sodium</i>	5 g/L
<i>Esculine</i>	1 g/L
<i>Citrate ferrique ammoniacal</i>	0.50 g/L
<i>Azide de sodium</i>	0.15 g/L
<i>Agar agar bactériologique</i>	13 g/L

$pH = 7,1 \pm 0,2$

### 2. Gélose au Tellurite de Potassium :

COMPOSITION	gramme/Litre
<i>Extrait de viande</i>	10 g/L
<i>Extrait de levure</i>	3 g/L
<i>Peptone</i>	10 g/L
<i>Chlorure de sodium</i>	5 g/L
<i>Glucose</i>	5 g/L
<i>Agar</i>	20 g/L

$pH = 7.1$

### 3. Gélose M17 :

COMPOSITION	gramme/Litre
<i>Tryptone</i>	2.50 g/L
<i>Peptone pepsique de viande</i>	2.50 g/L
<i>Peptone papainique de soja</i>	5.00 g/L
<i>Extrait autolytique de levure</i>	2.50 g/L
<i>Extrait de viande</i>	5.00 g/L
<i>Lactose</i>	5.00 g/L
<i>Glycérophosphate de sodium</i>	19.00 g/L
<i>Sulfate de magnésium</i>	0.25 g/L
<i>Acide ascorbique</i>	0.50 g/L
<i>Agar agar bactériologique</i>	15.00 g/L

$pH = 7,1 \pm 0,2$

4. Bouillon M17 :

COMPOSITION	gramme/Litre
<i>Tryptone</i>	2.5 g/L
<i>Peptone pepsique de viande</i>	2.5 g/L
<i>Peptone papainique de soja</i>	5.0 g/L
<i>Extrait de viande</i>	5.0 g/L
<i>Extrait autolytique de levure</i>	2.5 g/L
<i>Acide ascorbique</i>	0.5 g/L
<i>Glycérophosphate de sodium</i>	19.00 g/L
<i>Sulfate de magnésium</i>	0.25 g/L

$pH = 7,1 \pm 0,2$

5. Gélose YM (Yeast Mold agar):

COMPOSITION	gramme/Litre
<i>Extrait de levure</i>	3.0 g
<i>Extrait de malt</i>	3.0 g
<i>Peptone</i>	5.0 g
<i>Dextrose(glucose)</i>	10.0 g
<i>Agar agar</i>	20.0 g

$pH = 6.2$

Les caractères biochimiques de la souche *E.faecalis* obtenus à partir du système API 20 Strep.

Tests	Réactions	Résultats
VP	Production d'acétoïne (VogesProskauer)	+
HIP	Hydrolyse (acide hippurique)	+
ESC	Hydrolyse $\beta$ -glucosidase (esculine)	+
PYRA	PyrrolidonylArylamidase	+
Alpha-GAL	Alpha-Galactosidase	-
$\beta$ GUR	$\beta$ -Glucuronidase	-
$\beta$ GAL	$\beta$ -Galactosidase	+
PAL	Phosphatase Alcaline	+
LAP	Leucine Amino Peptidase	+
ADH	Arginine DiHydrolase	+
RIB	Acidification (ribose)	+
ARA	Acidification (arabinose)	-
MAN	Acidification (mannitol)	+
SOR	Acidification (Sorbitol)	-
LAC	Acidification (lactose)	+
TRE	Acidification (trehalose)	+
INU	Acidification (inuline)	-
RAF	Acidification (raffinose)	-
AMD	Acidification (amidon)	+
GLYG	Acidification (glycogène)	-

Système d'identification des *Streptococcaceae* et germes apparentés

## INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

API 20 Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des streptocoques, entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'Identification en fin de notice.

## PRINCIPE

La galerie API 20 Strep comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres.

Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

## PRESENTATION (Coffret de 25 tests)

- 25 galeries API 20 Strep
- 25 boîtes d'incubation
- 25 ampoules d'API GP Medium
- 25 fiches de résultats
- 1 notice

## COMPOSITION

### Galerie

La composition de la galerie API 20 Strep est reportée dans le tableau de lecture de cette notice.

### Milieu

<b>API GP</b>	L-cystine	0,5 g
<b>Medium</b>	Tryptone (origine bovine/porcine)	20 g
2 ml	Chlorure de sodium	5 g
	Sulfite de sodium	0,5 g
	Rouge de phénol	0,17 g
	Eau déminéralisée	qsp 1000 ml
	pH : 7,4 - 7,6	

Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.

## REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

### Réactifs / Instrumentation

- API® Suspension Medium, 2 ml (Réf. 70 700)
- Réactifs :
  - NIN (Réf. 70 491)
  - VP 1 + VP 2 (Réf. 70 422)
  - ZYM A (Réf. 70 494)
  - ZYM B (Réf. 70 493)
- Huile de paraffine (Réf. 70 100)
- McFarland Standard (Réf. 70 900) point 4 ou DENSIMAT (Réf. 99 234)
- Catalogue Analytique API 20 Strep (Réf. 20 690) ou logiciel d'identification **apiweb™** (Réf. 40 011) (consulter bioMérieux)
- Gélose Columbia au sang (Réf. 43 041)
- Bouillon Schaedler (éventuellement)

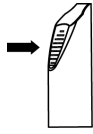
### Matériel

- Ecouvillons
- Pipettes ou PSlpettes
- Portoir pour ampoules
- Protège-ampoule
- Jarre anaérobie
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

## PRECAUTIONS D'UTILISATION

- **Pour diagnostic *in vitro* et contrôle microbiologique.**
- **Pour usage professionnel uniquement.**
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée par un personnel compétent et averti. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "CLSI® M29-A, *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline* - Révision en vigueur". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Dernière édition", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage et des composants.
- Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : cupule déformée, sachet déshydratant ouvert, ...
- Il est recommandé de réaliser un contrôle qualité avant d'utiliser chaque nouvelle ampoule de réactif ZYM B.

- Ouvrir les ampoules délicatement comme suit :
  - Placer l'ampoule dans le protège-ampoule.
  - Tenir l'ensemble verticalement dans une main (bouchon blanc vers le haut).
  - Bien enfoncer le bouchon.
  - Exercer une pression horizontale avec le pouce sur la partie striée du bouchon de façon à casser l'extrémité de l'ampoule.
  - Retirer l'ampoule du protège-ampoule et conserver le protège-ampoule pour une utilisation ultérieure.
  - Enlever délicatement le bouchon.
- Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique ou autre, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques de la souche et éventuellement des résultats d'autres tests, en particulier de l'antibiogramme.



## CONDITIONS DE STOCKAGE

Les galeries et milieux se conservent à 2-8°C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

## ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)

API 20 Strep ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements d'origine clinique ou autre.

Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté selon les techniques usuelles de bactériologie.

## MODE OPERATOIRE

### Sélection des colonies

Après isolement et vérification de l'appartenance de la souche à identifier à la famille des *Streptococcaceae* (réaction de Gram, catalase) :

- Noter le type d'hémolyse sur la fiche de résultats (21° test).
- Prélever une colonie bien isolée (Note 1) et la mettre en suspension dans 0,3 ml d'eau stérile. Bien homogénéiser.
- Inonder une boîte de gélose Columbia au sang de mouton (Note 2) avec cette suspension (ou écouillonner stérilement toute la surface de la gélose).
- Incuber la boîte 24 heures ( $\pm 2$  heures) à  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en anaérobiose.

**NOTE 1 :** Les Streptocoques  $\beta$ -hémolytiques et les Entérocoques donnent des colonies de taille suffisante après 24 heures d'incubation. Pour les autres Streptocoques, il est préférable de prélever des colonies de 48 heures. Pour les souches de culture difficile (très petites colonies à 48 heures) il est recommandé d'opérer de la manière suivante :

- Cultiver la colonie dans 1 ml de bouillon de Schaedler à  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 5 heures.
- Inonder une boîte de gélose Columbia au sang de mouton avec la totalité de cette culture. Eliminer l'excédent.
- Incuber la boîte 18 à 24 heures à  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en anaérobiose.

**NOTE 2 :** Pour obtenir une pousse suffisante, il est préférable de préparer 2 géloses quand la souche est susceptible d'être un Pneumocoque.

### Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex :  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{CO}_2$  ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation).
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

### Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API Suspension Medium (2 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" ou utiliser un tube contenant 2 ml d'eau distillée sans additif.
- A l'aide d'un écouvillon, prélever toute la culture préalablement préparée.
- Réaliser une suspension très dense : **opacité supérieure à 4 de McFarland**. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

### Inoculation de la galerie

- Dans la première moitié de la galerie (tests VP à ADH) répartir la suspension précédente en évitant la formation de bulles (pour cela, incliner la boîte d'incubation vers l'avant et placer la pointe de la pipette ou de la PSipette sur le côté de la cupule) :
  - pour les tests VP à LAP : environ 100  $\mu\text{l}$  dans chaque cupule.
  - pour le test ADH : remplir uniquement le tube.
- Dans la deuxième moitié de la galerie (tests RIB à GLYG) :
  - ouvrir une ampoule d'API GP Medium comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" et y transférer le reste de la suspension, soit 0,5 ml au minimum. Bien homogénéiser.
  - répartir cette nouvelle suspension dans les tubes uniquement.
- Remplir les cupules des tests soulignés ADH à GLYG avec de l'huile de paraffine en formant un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber à  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en aérobiose pendant 4H00 - 4H30 pour une première lecture et 24 heures ( $\pm 2$  heures) si nécessaire pour une deuxième lecture.

## LECTURE ET INTERPRETATION

### Lecture de la galerie

Après 4 heures d'incubation :

- Ajouter les réactifs :
  - test VP : 1 goutte de VP 1 et VP 2.
  - test HIP : 2 gouttes de NIN.
  - tests PYRA,  $\alpha$ GAL,  $\beta$ GUR,  $\beta$ GAL, PAL, LAP : 1 goutte de ZYM A et ZYM B (\*).

(\* **Il est recommandé de contrôler** chaque ampoule de réactif ZYM B avant la 1<sup>ère</sup> utilisation.

Pour cela, il est recommandé d'utiliser la **souche ATCC® 700400** mentionnée au paragraphe Contrôle Qualité afin d'exclure tout réactif défectueux.

- Attendre 10 minutes, puis lire toutes les réactions en se référant au Tableau de Lecture. Si nécessaire, exposer la galerie à une lampe forte (1000 W) 10 secondes pour décolorer le réactif en excès dans les tubes PYRA à LAP.

Une réincubation est nécessaire dans les cas suivants :  
 - faible discrimination ;  
 - profil inacceptable ou profil douteux ;  
 - si, pour le profil obtenu, la note suivante est indiquée :

IDENTIFICATION NON VALIDE  
 AVANT 24 H D'INCUBATION

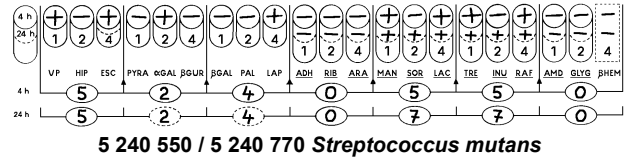
Alors, relire après 24 heures les réactions ESC, ADH et RIB à GLYG sans relire les réactions enzymatiques (HIP, PYRA, αGAL, βGUR, βGAL, PAL, LAP) et VP. Noter toutes les réactions sur la fiche de résultats.

**Interprétation**

L'identification est obtenue à partir du **profil numérique**.

- Détermination du profil numérique :  
 Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres qui constituent le profil numérique.

- Identification :  
 Elle est réalisée à partir de la base de données (V7.0)  
 \* à l'aide du Catalogue Analytique :  
 - Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.  
 \* à l'aide du logiciel d'identification **apiweb™** :  
 - Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.



**NOTE :** La réaction hémolytique constitue le 21° test ; la β-hémolyse est considérée comme positive et sa valeur numérique est 4. Toute autre réaction hémolytique est considérée comme négative et sa valeur numérique est 0. Toutefois, ces caractères ont une valeur indicative pour l'identification de certaines espèces.

**CONTROLE DE QUALITE**

Les galeries, milieux et réactifs font l'objet de contrôles de qualité systématiques à différentes étapes de leur fabrication. Le **Contrôle de Qualité Minimum** peut être utilisé pour vérifier que les conditions de stockage et de transport n'ont pas d'impact sur les performances de la galerie API 20 Strep. Ce contrôle peut être réalisé en suivant les instructions et critères attendus ci-dessus en lien avec le référentiel CLSI® M50-A Quality Control for Commercial Microbial Identification Systems.

Le Contrôle peut être fait en utilisant la souche **Streptococcus equi spp zoepidemicus ATCC® 700400** pour évaluer les performances du test ARA. Des études réalisées par bioMérieux ont montré que sur la galerie API 20 Strep, le test ARA est le test le plus sensible. Lors du contrôle, l'intégrité de la galerie peut être vérifiée en utilisant la souche **Streptococcus equi spp zoepidemicus ATCC 700400**.

Dans le cas où un **contrôle de Qualité Complet** exigé pour cette galerie, les deux souches suivantes devront être testées pour vérifier les réactions positives et négatives de la plupart des tests de la galerie API 20 Strep.

1. *Streptococcus equi spp zoepidemicus* ATCC 700400
2. *Streptococcus uberis* ATCC 700407

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

	VP	HIP	ESC	PYRA	αGAL	βGUR	βGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG
1.	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
2.	+	+	+	V	V	+	-	-*	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-

- \* Ce résultat peut varier en fonction du milieu de culture utilisé.
- Inoculum ajusté entre 4,5 et 5,5 McF avec DENSIMAT.
- Profils obtenus après : - 4 heures d'incubation pour les tests VP à LAP  
 - 24 heures d'incubation pour les tests ADH à GLYG.
- Souches cultivées sur gélose Columbia au sang de mouton.

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en oeuvre conformément à la législation locale en vigueur.

**LIMITES DU TEST**

- Le système API 20 Strep est destiné à l'identification des espèces présentes dans la base de données (voir Tableau d'Identification en fin de notice), et à elles seules. Il ne peut être utilisé pour identifier d'autres microorganismes ou exclure leur présence.
- Certaines souches de *Streptococcus porcinus* peuvent être identifiées à *Streptococcus agalactiae*.
- Seules des cultures pures contenant un seul type de microorganisme doivent être utilisées.

**RESULTATS ATTENDUS**

Se référer au Tableau d'Identification en fin de cette notice pour les résultats attendus des différentes réactions biochimiques.

**PERFORMANCES**

- Après 4 heures d'incubation :  
2336 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :
  - 87,9% des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
  - 5,7% des souches n'ont pas été identifiées.
  - 6,4% des souches ont été mal identifiées.

- Après 24 heures d'incubation :  
3782 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :
  - 93,4% des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
  - 3,2% des souches n'ont pas été identifiées.
  - 3,4% des souches ont été mal identifiées.

**ELIMINATION DES DECHETS**

Éliminer les réactifs utilisés ou non utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

## TABLEAU DE LECTURE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS			
				NEGATIF		POSITIF	
VP	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / jusqu'à 10 min (3) Incolore      Rose-Rouge			
HIP	acide hippurique	0,4	hydrolyse (acide HIPpurique)	NIN / jusqu'à 10 min Incolore/Bleu pâle Gris-bleuté      Bleu foncé/Violet			
ESC	esculine citrate de fer	1,16 0,152	hydrolyse β-glucosidase (ESCuline)	4 h	24 h	4 h	24 h
				Incolore Jaune pâle	Incolore Jaune pâle Gris clair	Noir Gris	Noir
PYRA	acide pyroglutamique- β-naphtylamide	0,0256	PYRolidonyl Arylamidase	ZYM A + ZYM B / 10 min (PYRA à LAP) (1) au besoin décoloré par éclaircissement intense Incolore ou Orange très pâle      Orange			
αGAL	6-bromo-2-naphtyl-αD- galactopyranoside	0,0376	α-GALactosidase	Incolore		Violet	
βGUR	acide naphthol-ASBI- glucuronique	0,0537	β-GIUcuRonidase	Incolore		Bleu	
βGAL	2-naphtyl-βD- galactopyranoside	0,0306	β-GALactosidase	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
PAL	2-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
LAP	L-leucine-β-naphtylamide	0,0256	Leucine AminoPeptidase	Incolore		Orange	
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	Jaune		Rouge	
RIB ARA MAN SOR LAC TRE INU RAF AMD	D-ribose L-arabinose D-mannitol D-sorbitol D-lactose (origine bovine) D-tréhalose inuline D-raffinose amidon (2)	1,4 1,4 1,36 1,36 1,4 1,32 5,12 3,12 2,56	acidification (RIBose) acidification (ARAbinose) acidification (MANnitol) acidification (SORbitol) acidification (LACtose) acidification (TREhalose) acidification (INUline) acidification (RAFFinose) acidification (AMiDon)	4 h	24 h	4 h	24 h
				Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
				Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
				Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
				Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
				Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
				Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
				Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
				Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
GLYG	glycogène	1,28	acidification (GLYcoGène)	Rouge ou Orange		Jaune franc	

(1) Lors d'une deuxième lecture après 24 heures d'incubation, on peut remarquer un dépôt dans les tubes où ont été ajoutés les réactifs ZYM A et ZYM B. Ce phénomène est normal et ne doit pas être pris en considération.

(2) L'acidification de l'amidon est fréquemment moins forte que celle des autres sucres.

(3) Une coloration rose pâle obtenue après 10 minutes doit être considérée négative.

- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale, notamment des peptones.

METHODOLOGIE p. I  
TABLEAU D'IDENTIFICATION p. II

BIBLIOGRAPHIE p. III  
TABLE DES SYMBOLES p. IV

BIOMERIEUX, le logo bleu, API et **apiweb** sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales.

CLSI est une marque appartenant à Clinical and Laboratory Standards Institute Inc.

ATCC est une marque appartenant à American Type Culture Collection.

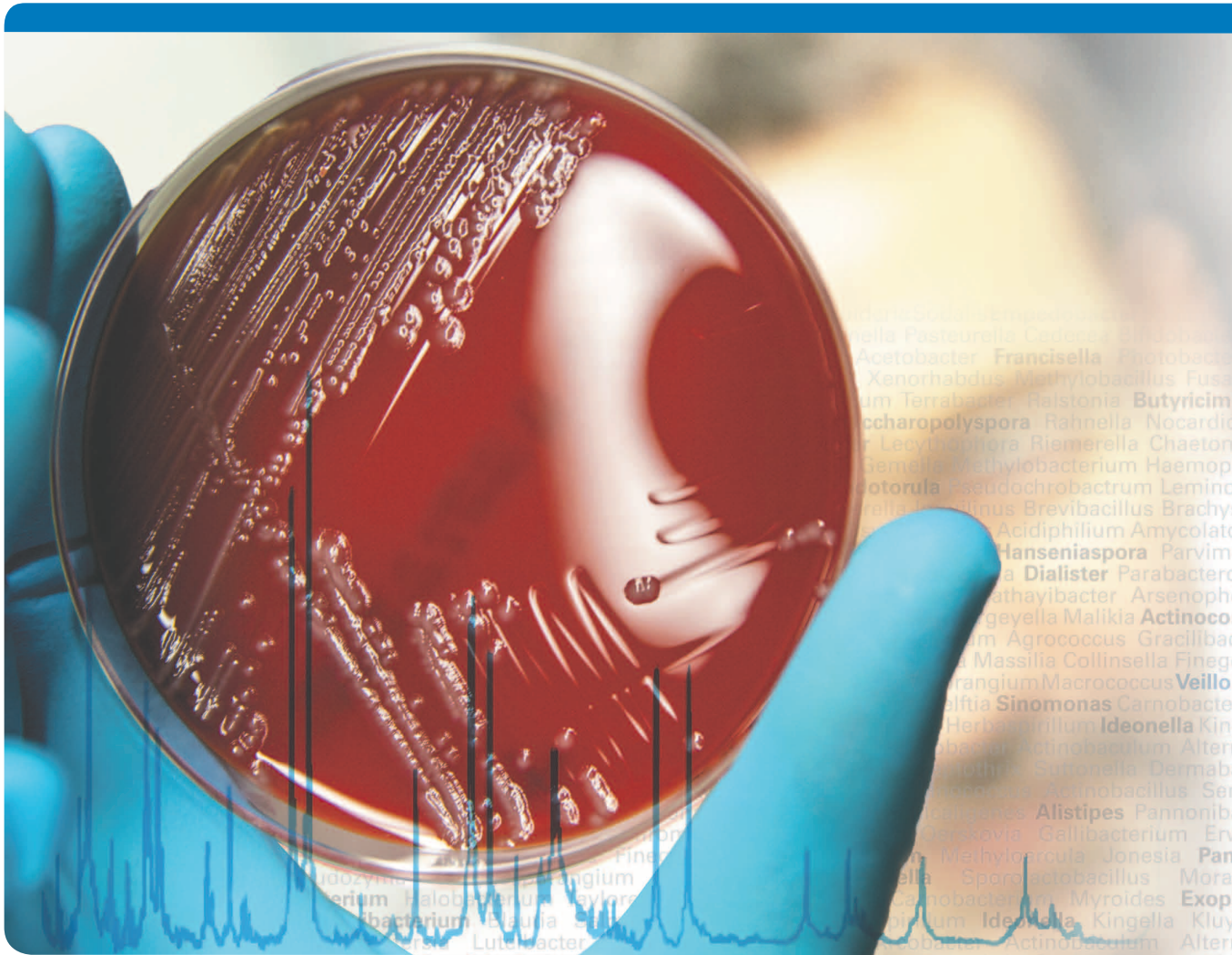
Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.



**bioMérieux SA**  
RCS LYON 673 620 399  
69280 Marcy-l'Etoile / France  
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00  
Fax 33 (0)4 78 87 20 90  
www.biomerieux.com


**bioMérieux, Inc**  
Box 15969,  
Durham, NC 27704-0969 / USA  
Tél. (1) 919 620 20 00  
Fax (1) 919 620 22 11  
Imprimé en France





# MALDI Biotyper CA System

- Clinical Application for Identification of Microorganisms



**In Microbiology,  
Every Minute Counts**

## The MALDI Biotyper CA System

### A powerful technology for better results

To help answer key challenges in Clinical Microbiology, Bruker has utilized its many years of experience to create the truly groundbreaking MALDI Biotyper CA System. With its combination of performance and utility, the MALDI Biotyper CA System will revolutionize the way microbial identification is performed in the clinical microbiology laboratory.

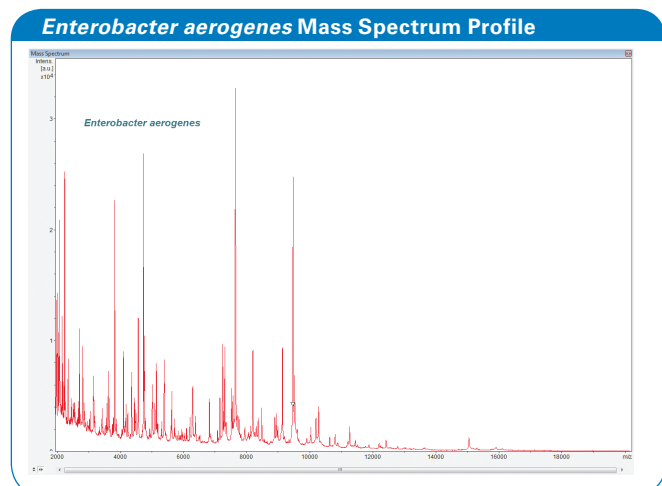
- Accuracy comparable to Nucleic Acid Sequencing
- Much faster than traditional methods
- Cost effective
- Robust and easy to use
- A true benchtop system

### Identifying microorganisms by their molecular fingerprint

The MALDI Biotyper CA System identifies microorganisms using MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight) Mass Spectrometry to measure a unique molecular fingerprint of an organism. Specifically, the MALDI Biotyper CA System measures highly

abundant proteins that are found in all microorganisms.

The characteristic patterns of these highly abundant proteins are used to reliably and accurately identify a particular microorganism by matching the respective pattern with an extensive FDA-cleared database to determine the identity of the microorganism.



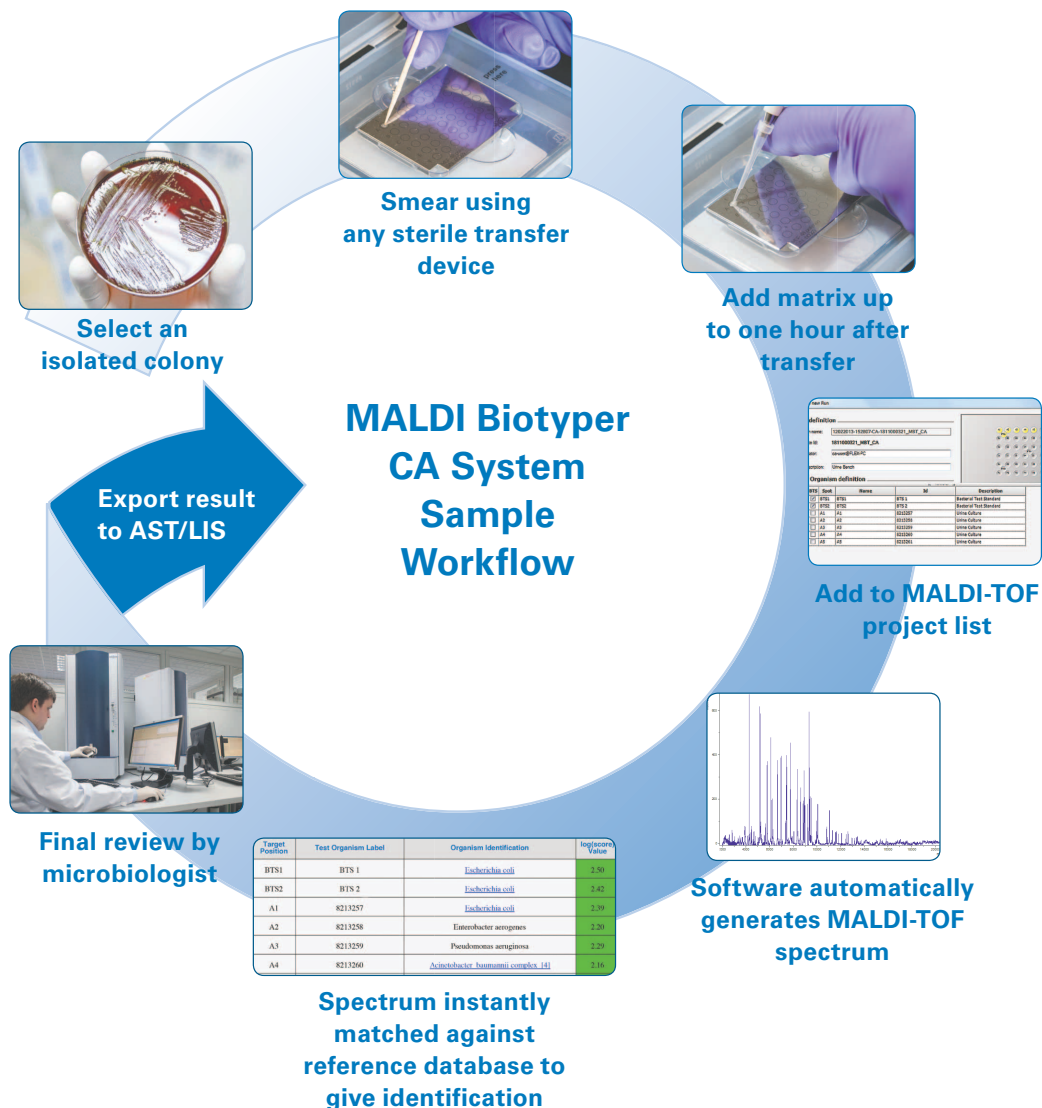
# A Simple Procedure for a Sophisticated Platform

## Innovative design leads to enhanced performance and productivity

The MALDI Biotyper CA System workflow has been designed to be as robust and easy to perform as possible. No previous experience with Mass Spectrometry is required. The workflow has been streamlined and requires only a few simple steps to generate high quality microorganism identifications. Our dedicated microbiology software

automates the process of acquiring the mass spectrum and performing the database matching. A report is then generated showing the microbial identification in a very easy to interpret “traffic light” color scheme.

Typically no more than an isolated single colony from a culture plate is required, the entire procedure requires only a few minutes to complete providing a report showing the closest matches to the extensive library of microorganisms.



# Easy to Use Software that is Dedicated to Microbiology

## The wizard

A simple to use Real Time Classification wizard guides you through setting up samples for analysis in just a few easy steps.

	BTS	Spot	Name	Id	Description
1	<input checked="" type="checkbox"/>	BTS1	BTS1	BTS 1	Bacterial Test Standard
2	<input checked="" type="checkbox"/>	BTS2	BTS2	BTS 2	Bacterial Test Standard
3	<input type="checkbox"/>	A1	A1	8213257	Urine Culture
	<input type="checkbox"/>	A2	A2	8213258	Urine Culture
	<input type="checkbox"/>	A3	A3	8213259	Urine Culture
	<input type="checkbox"/>	A4	A4	8213260	Urine Culture
7	<input type="checkbox"/>	A5	A5	8213261	Urine Culture

The MALDI Biotyper CA System microflex LT/SH mass spectrometer is automatically checked using US IVD BTS (Bacterial Test Standard) before each use. When the check is successful, the system automatically begins the measurement process.

Target Position	Test Organism Label	Organism Identification	log(score) Value
BTS1	BTS 1	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.50
BTS2	BTS 2	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.42
A1	8213257	<a href="#">Escherichia coli</a>	2.39
A2	8213258	Enterobacter aerogenes	2.20
A3	8213259	Pseudomonas aeruginosa	2.20
A4	8213260	<a href="#">Acinetobacter baumannii complex [4]</a>	2.16
A5	8213261	<a href="#">Proteus vulgaris_group</a>	2.45

After the acquisition of the spectral data has been completed, a Run Results Report can be generated. The resultant report for each sample shows the best match along with the respective matching score.

Organism identification hints can also be viewed via a hyperlink.

# Rigorous and Sophisticated Data Analysis Assures Accuracy

## Meaning of score values

The spectrum of the unknown test organism, acquired through the MALDI Biotyper CA System Software, is electronically transformed into the peak list. Using a biostatistical algorithm, this peak list is compared to reference peak lists of organisms in the reference database and a log(score) value between 0.00 and 3.00 is calculated.

The higher the log(score) value, the higher the degree of similarity to a given organism in the reference FDA-cleared database. A log(score) value of  $\geq 2.00$  can be considered an excellent probability for test organism identification at the species level.

## The main spectra concept: a reference database developed with the user in mind

Reference database entries in the MALDI Biotyper CA System are stored as Main Spectra (MSP). These MSPs are based on multiple measurements of a single defined strain to ensure that the true biological variability of an organism has been captured.

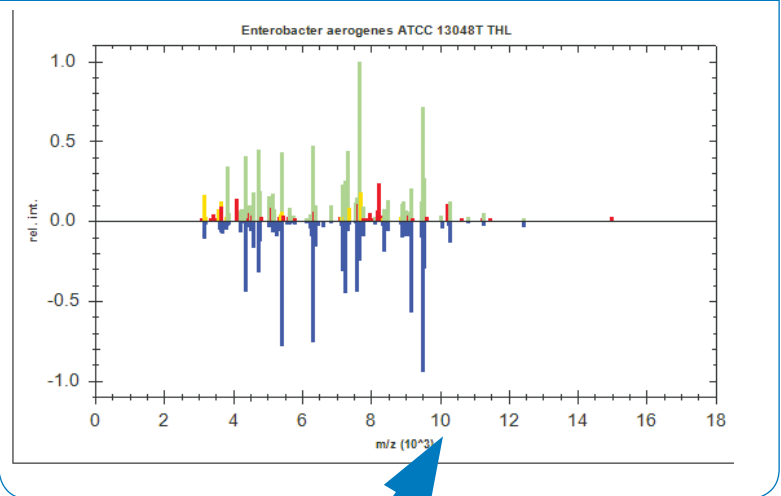
An unbiased sophisticated algorithm creates the MSP completely unsupervised by extracting information about peak position, intensity and frequency, while employing very effective de-noising and patented mass corrections to the peak data.

Unknowns are then compared to the MSP FDA-cleared database using a superior pattern-matching approach that is based on true statistical multi-variant analysis; and includes peak positions, intensities and frequencies ensuring the highest possible levels of accuracy and reproducibility across the complete range of microbes.

## Score Values

Range	Interpretation	Color
2.00 - 3.00	<b>High Confidence Identification</b>	Green
1.70 - 1.99	<b>Low Confidence Identification</b> 1. If this log(score) is obtained on a direct transfer, follow with extraction preparation [see User Manual] 2. If this log(score) is obtained on an extracted test organism, report sample as "Low Confidence Identification"	Yellow
< 1.70	<b>No Organism Identification Possible</b> [refer to troubleshooting section in User Manual] 1. If this log(score) is obtained on a direct transfer, follow with extraction preparation [see User Manual] 2. If this log(score) is obtained on an extracted test organism, report sample as "No Identification"	Red

## Reference Strain

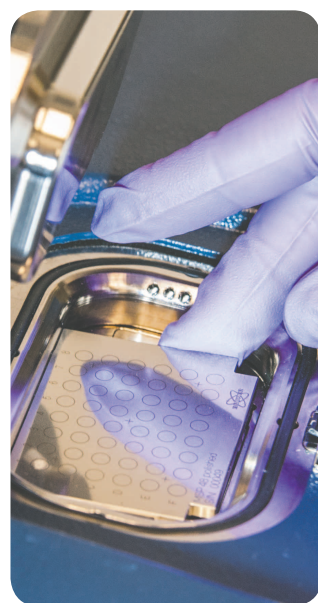


# The Best Technology from the Market Leader in MALDI-TOF



The MALDI Biotyper CA System was developed by Bruker, the industry leader in MALDI-TOF technology. These systems were designed as robust, compact, high performance platforms intended for extensive and routine usage. Many outstanding features have been incorporated into the MALDI Biotyper CA System to enhance performance, simplify operation, and extend system lifetime and utility.

- A true bench-top system—A smart compact design that packs a punch with a throughput of 192 samples an hour. The small access chamber allows for a rapid target insertion that eliminates waiting time between runs. Requires only a 110 V electrical outlet with very minimal heat output.
- Silent and pleasant operation—With WhisperMode™ you really have a system that can sit on a bench next to you almost silently. By eliminating noisy oil-based vacuum pumps, the vacuum system is not only quiet, but virtually maintenance free.
- Greatly enhanced sensitivity—With the most sensitive detector technology available (FlashDetector™) you will benefit from having the same high performance technology as large research grade instruments.



# Powerful and Reliable Performance— Benchtop Convenience

## microflex LT/SH Mass Spectrometer Dimensions and Operating Parameters

LxWxH:	510 x 680 x 1093 mm [20.1" x 26.8" x 43"]
Weight:	84 kg (185 lb) net weight
Noise:	< 30 dB under normal operating conditions
Temp Range:	10-30°C (50-86°F)
Operating Humidity:	15-85% non-condensing @ 30°C

### Full spectrum resolution

Patented, intelligent pulsed Ion Extraction across a wide protein mass range. This unique technology enhances peak

resolution and separation, and mitigates the need for unnecessarily long and bulky instrument flight tubes.

## MALDI Biotyper CA System and Components

### Components

The standard MALDI Biotyper CA System contains the following components:

- microflex LT/SH mass spectrometer [P/N: 269944]
- MALDI Biotyper CA System desktop computer running under Windows® 7 [P/N: 604941]
- MALDI Biotyper CA System software [P/N: 604512]
- US IVD 48 Spot Target [P/N: 604532]
- US IVD BTS [P/N: 604530]
- US IVD HCCA portioned [P/N: 604531]
- Package Insert, MALDI Biotyper CA System User Manual [P/N: 603291]
- Uninterruptible Power Supply (UPS) [P/N: 601463]

### Instrument: microflex LT/SH Mass Spectrometer

- Nitrogen Laser with 60Hz repetition rate
- Full Spectrum Resolution (FSR) with broadband focusing mode (PAN™)
- FlashDetector™
- WhisperMode™
- Oil-free membrane pre-vacuum pump and turbo pump

### Indication for use

The Bruker Daltonics, Inc. MALDI Biotyper CA System is a qualitative in vitro diagnostic mass spectrometer system for the identification of Gram-negative bacterial colonies cultured from human specimens using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry technology.

The MALDI Biotyper CA System is indicated for use in conjunction with other clinical and laboratory findings to aid in the diagnosis of Gram-negative bacterial infections.

## The following organisms are claimed:

*Achromobacter xylosoxidans*  
*Acinetobacter lwoffii*  
*Acinetobacter radiosistens*  
*Acinetobacter ursingii*

### **Acinetobacter baumannii complex**

*Acinetobacter baumannii*  
*Acinetobacter calcoaceticus*  
*Acinetobacter nosocomialis*  
*Acinetobacter pittii*

### **Aeromonas sp**

*Aeromonas allosaccharophila*  
*Aeromonas caviae*  
*Aeromonas culicicola*  
*Aeromonas hydrophila*  
*Aeromonas ichthiosmia*  
*Aeromonas veronii*  
*Aeromonas sobria*  
*Alcaligenes faecalis*  
*Burkholderia gladioli*  
*Burkholderia multivorans*

### **Burkholderia cepacia complex**

*Burkholderia ambifaria*  
*Burkholderia anthina*  
*Burkholderia cenocepacia*  
*Burkholderia cepacia*  
*Burkholderia diffusa*  
*Burkholderia dolosa*  
*Burkholderia lata*  
*Burkholderia latens*  
*Burkholderia metallica*  
*Burkholderia pyrrocinia*  
*Burkholderia seminalis*  
*Burkholderia stabilis*  
*Burkholderia vietnamiensis*

### **Citrobacter amalonaticus complex**

*Citrobacter amalonaticus*  
*Citrobacter farmeri*

### **Citrobacter freundii complex**

*Citrobacter braakii*  
*Citrobacter freundii*  
*Citrobacter gillenbergii*  
*Citrobacter murliniae*  
*Citrobacter werkmanii*  
*Citrobacter youngae*  
*Citrobacter rodentium*  
*Citrobacter sedlakii*

*Citrobacter koseri*

*Eikenella corrodens*

*Enterobacter aerogenes*

### **Enterobacter cloacae complex**

*Enterobacter asburiae*  
*Enterobacter cancerogenus*  
*Enterobacter cloacae*  
*Enterobacter hormaechei*  
*Enterobacter kobei*  
*Enterobacter ludwigii*

*Escherichia coli*

*Haemophilus influenzae*

*Haemophilus parainfluenzae*

*Hafnia alvei*

*Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella oxytoca* / *Raoultella ornithinolytica*

*Moraxella sg\_Branhamella catarrhalis*

*Moraxella sg\_Moraxella osloensis*

*Morganella morganii*

*Pantoea agglomerans*

*Pasteurella multocida*

*Proteus mirabilis*

### **Proteus vulgaris group**

*Proteus hauseri*

*Proteus penneri*

*Proteus vulgaris*

*Providencia rettgeri*

*Providencia stuartii*

*Pseudomonas aeruginosa*

### **Pseudomonas fluorescens group**

*Pseudomonas azotoformans*

*Pseudomonas brenneri*

*Pseudomonas cedrina*

*Pseudomonas congelans*

*Pseudomonas corrugata*

*Pseudomonas extremorientalis*

*Pseudomonas fluorescens*

*Pseudomonas gessardii*

*Pseudomonas libanensis*

*Pseudomonas mandelii*

*Pseudomonas marginalis*

*Pseudomonas migulae*

*Pseudomonas mucidolens*

*Pseudomonas orientalis*

*Pseudomonas poae*

*Pseudomonas rhodesiae*

*Pseudomonas synxantha*

*Pseudomonas tolaasii*

*Pseudomonas trivialis*

*Pseudomonas veronii*

### **Pseudomonas putida group**

*Pseudomonas fulva*

*Pseudomonas montellii*

*Pseudomonas mosselii*

*Pseudomonas plecoglossicida*

*Pseudomonas putida*

### **Salmonella sp**

*Salmonella enterica ssp arizonae*

*Salmonella enterica ssp bongori*

*Salmonella enterica ssp diarizonae*

*Salmonella enterica ssp enterica*

*Salmonella enterica ssp houtenae*

*Salmonella enterica ssp indica*

*Salmonella enterica ssp salamae*

*Serratia liquefaciens*

*Serratia marcescens*

*Stenotrophomonas maltophilia*

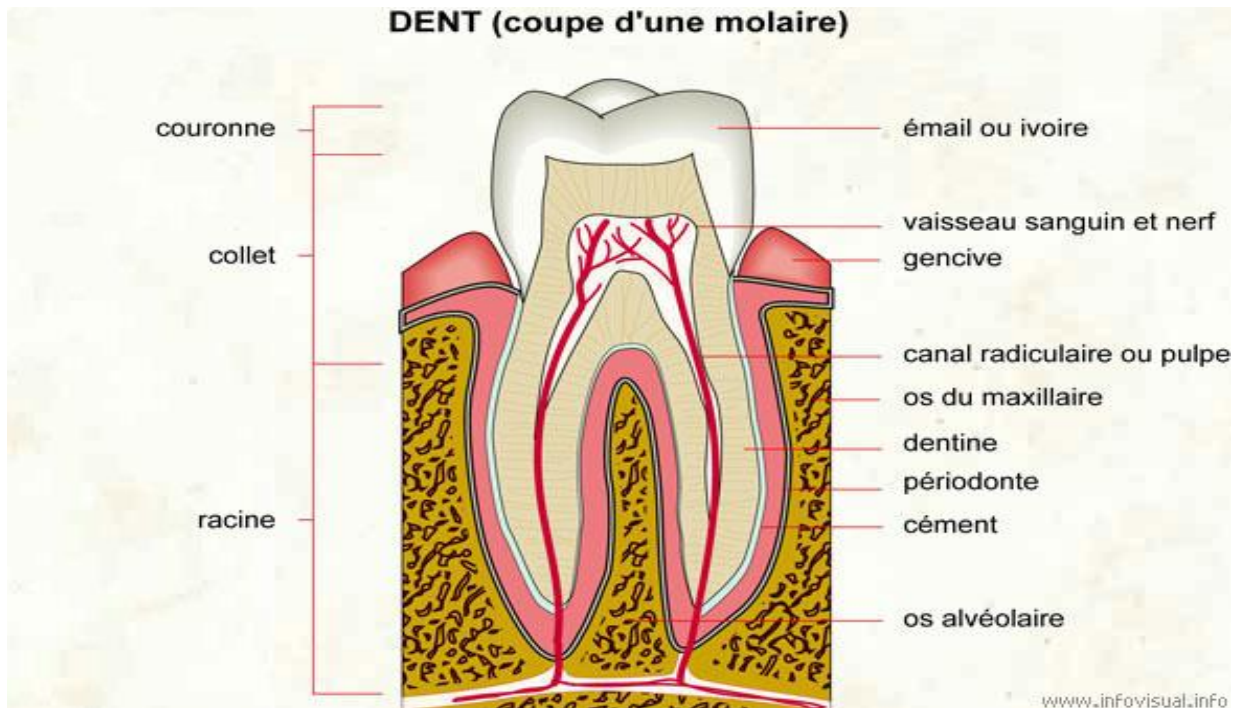
*Yersinia enterocolitica*

*Yersinia pseudotuberculosis*

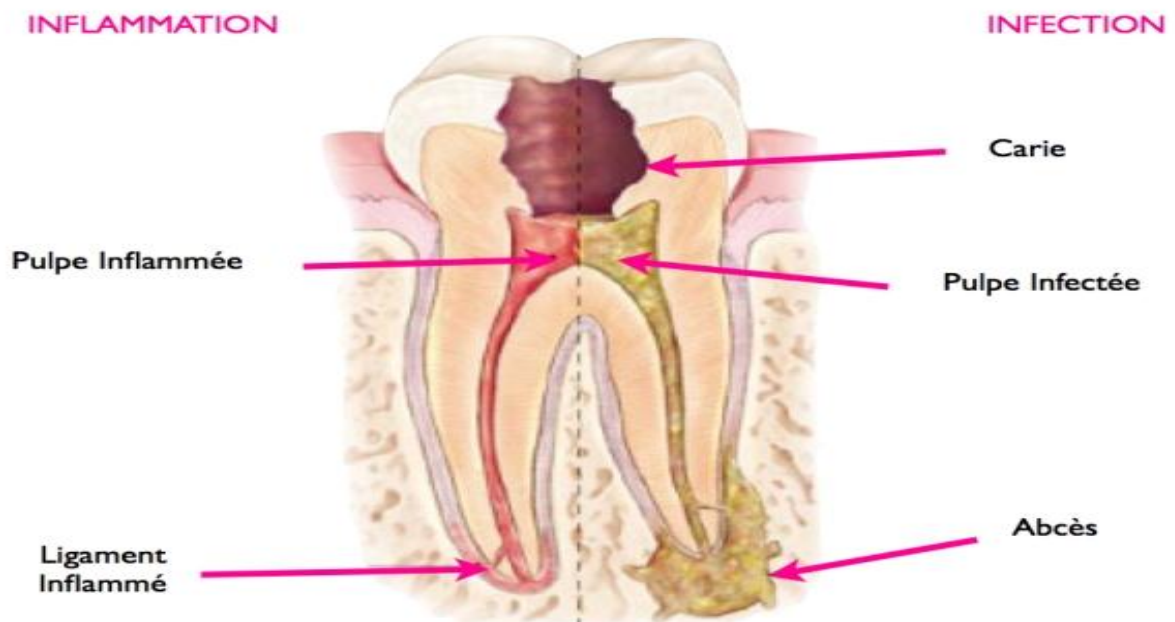
## ● Bruker Daltonics Inc.

Billerica, MA · USA  
Phone +1 (978) 663-3660  
Fax +1 (978) 667-5993  
ms-sales@bdal.com

[www.bruker.com](http://www.bruker.com)

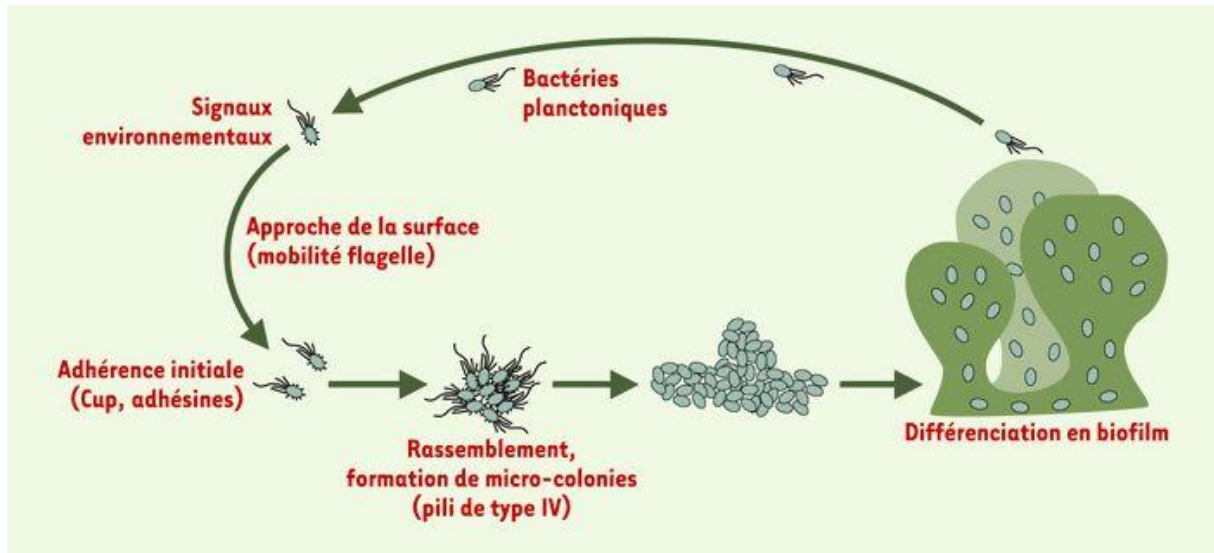


**Structure de la dent** (www.infovisual.info)



### Infection endodontique

(http://www.cabinetmaupassant.com/details  
les+traitements+canalaires+ou+endodontie-83.html).



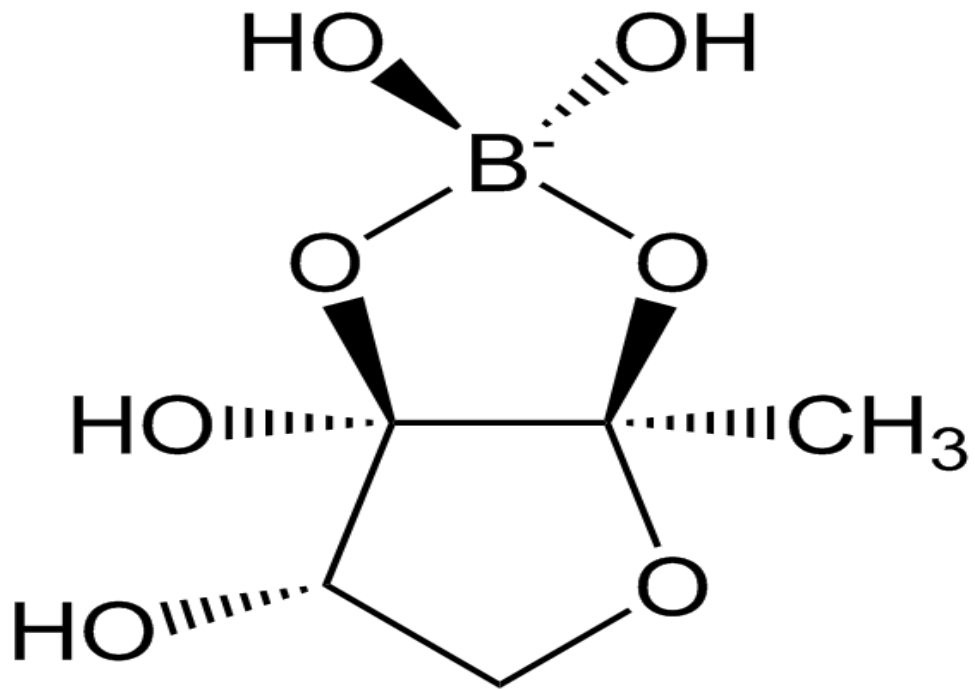
**Les étapes de la formation du biofilm**  
 (URI <http://id.erudit.org/iderudit/000760ar>)

+



**Insuline (une cartouche de 3 ml, 100 UI/ml = 3.5 mg/ml)**

(<https://diabetessource.ca/product/humalog-insulin-lispro-injection-cartridges/>)



Structure biochimique de la molécule AI-2 (*furanosyl borate diester*)

(<https://en.wikipedia.org/wiki/File:AI-2.png>)