



**HAL**  
open science

# Propriétés de surface et d'adhésion de *Parabacteroides distasonis*

Thibault Carlier

► **To cite this version:**

Thibault Carlier. Propriétés de surface et d'adhésion de *Parabacteroides distasonis*. Microbiologie et Parasitologie. 2019. hal-02548274

**HAL Id: hal-02548274**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-02548274>**

Submitted on 20 Apr 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Master Microbiologie (MIC)

2<sup>ème</sup> année

Orientation Microbiologie Environnementale et Sanitaire (MES)

Université de Lorraine

# Propriétés de surface et d'adhésion de *Parabacteroides distasonis*

Thibault CARLIER

Stage de fin d'études

Du 14 janvier 2019 au 12 juillet 2019

Encadrement :

Dr Catherine CAILLIEZ-GRIMAL (MCU)

Dr Corentine ALAUZET (MCU-PH)

Laboratoire SIMPA (Stress, IMMunité, PATHogènes)

9, avenue de la Forêt de Haye

54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY



## **Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier le laboratoire SIMPA, dirigé par le Pr. Jean-Pol Fripiat de m'avoir permis de réaliser mon stage de fin d'études au sein de leur équipe et de m'avoir donné l'opportunité de participer à ce projet de recherche.

Mes remerciements sont ensuite adressés à mes encadrantes, le Dr. Catherine Cailliez-Grimal et le Dr. Corentine Alauzet pour leur présence, leur patience et tous les précieux conseils qu'elles ont pu m'apporter durant toute la durée du stage pour mener cette étude à bien.

Je remercie également Lisiane Cunat, technicienne du laboratoire, ainsi que Pauline Gascht, ma co-stagiaire, étudiante à l'IUT pour toute l'aide qu'elles ont pu me fournir pour la mise en place et la réalisation de toutes les expériences, ce qui a grandement contribué à l'accomplissement des missions qui m'ont été attribuées.

Je souhaiterais également remercier les Dr. Laurence Mathieu du LCPME et le Dr. Céline Caillet du LIEC pour nous avoir permis de réaliser certaines expériences au sein de leur laboratoire et d'avoir ainsi contribué à cette étude.

Enfin, j'adresse une pensée particulière aux autres stagiaires et doctorants du laboratoire, Céline, Emma, Martin et Maurine, ainsi qu'à l'ensemble du personnel du laboratoire pour avoir contribué à maintenir une ambiance de travail très agréable.

## **Présentation du laboratoire**

Le laboratoire SIMPA est un laboratoire de recherche rattaché à l'Université de Lorraine et basé à Vandœuvre-Lès-Nancy. Le laboratoire rassemble 18 enseignants-chercheurs, ingénieurs d'études et membres associés, 1 responsable administratif, 4 techniciens en biologie et 4 doctorants. Les recherches menées par le laboratoire ont pour but de comprendre l'impact des stress (sociaux-environnementaux chroniques et gravitaires) rencontrés lors de missions spatiales sur le système immunitaire, les microbiotes humains et les interactions entre le système immunitaire et le système nerveux central. Les fruits de ces recherches contribueront à la préparation de futures missions spatiales, mais auront également un intérêt plus large dans la mesure où les stress sont prépondérants dans la société. Mon stage s'est déroulé au sein de l'équipe de bactériologie, dont le principal sujet d'étude est le microbiote intestinal.

## Sommaire

Remerciements .....	2
Présentation du laboratoire .....	2
Abréviations .....	5
Liste des figures .....	6
Liste des tableaux .....	7
Introduction .....	8
I- <i>Parabacteroides distasonis</i> .....	8
II- Propriétés de surface de <i>P. distasonis</i> .....	11
III- Adhésion bactérienne et formation de biofilms .....	14
IV- Impact d'un stress de l'hôte sur l'adhésion bactérienne : rôle des catécholamines ..	17
Objectifs de l'étude.....	18
Matériels et méthodes.....	19
I- Souches bactériennes et conditions de culture .....	19
II- Mesure des capacités d'auto-agrégation de <i>P. distasonis</i> .....	20
III- Evaluation des propriétés électrocinétiques de <i>P. distasonis</i> .....	20
IV- Détermination de l'adhésion de <i>P. distasonis</i> sur support inerte .....	21
1) Capacité d'adhésion : choix et optimisation de la technique.....	21
2) Comparaison méthode PBS turbidité / cristal violet par la méthode vapeur.....	21
3) Validation de la méthode PBS turbidité pour <i>P. distasonis</i> .....	22
4) Observation microscopique de l'organisation de <i>P. distasonis</i> .....	22
V- Adhésion de <i>P. distasonis</i> sur cellules intestinales et influence de la noradrénaline sur l'adhésion.....	23
VI- Analyse statistique .....	24
Résultats .....	25
I- Capacité d'auto-agrégation de <i>P. distasonis</i> .....	25
II- Caractérisation des propriétés électrocinétiques de <i>P. distasonis</i> .....	26

III-	Adhésion de <i>P. distasonis</i> sur support abiotique .....	27
1)	Choix et optimisation de la technique .....	27
2)	Capacité d'adhésion de <i>P. distasonis</i> sur support inerte .....	28
3)	Organisation de <i>P. distasonis</i> lors de l'adhésion .....	30
4)	Formation de biofilms par <i>P. distasonis</i> .....	31
IV-	Adhésion de <i>P. distasonis</i> sur cellules intestinales et effet de la noradrénaline .....	32
1)	Comparaison de la numération sur boîtes avec la quantification en qPCR.....	32
2)	Vérification de la pureté des échantillons utilisés en qPCR.....	33
3)	Capacité d'adhésion de <i>P. distasonis</i> sur cellules intestinales .....	34
4)	Effet de la noradrénaline sur l'adhésion de <i>P. distasonis</i> sur cellules intestinales....	35
	Discussion .....	36
	Perspectives.....	40
	Bibliographie.....	42
	Webographie .....	45
	Annexes.....	46

## **Abréviations**

**AC** : Coefficient d'autoagrégation  
**AMC** : Amoxicilline-acide clavulanique  
**AMX** : Amoxicilline  
**AP-PCR** : Arbitrary Primer Polymerase Chain Reaction  
**ARGs** : Gènes de résistance aux antibiotiques  
**ATCC** : American Type Culture Collection  
**BALB/c** : Souche albinos de souris domestique  
**BBA** : Brucella Blood Agar  
**CD25+** : Cluster de différenciation 25  
**CD4+** : Cluster de différenciation 4  
**CM** : Clindamycine  
**CV** : Cristal violet  
**DMEM** : Dubelcco Modified Eagle's Medium  
**DO** : Densité optique  
**Dr** : Opéron impliqué dans la synthèse de fimbriae chez *E. coli*  
**DSMZ** : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen  
**EDTA** : Éthylènediaminetétra-acétique  
**ERIC-PCR** : Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction  
**ETP** : Ertapénème  
**GC** : Guanine-Cytosine  
**IMP** : Imipénème  
**kDa** : Kilodalton

**LGG** : *Lactobacillus rhamnosus GG*  
**LIEC** : Laboratoire Interdisciplinaire des Environnement Continentaux  
**LPS** : Liposaccharides  
**Mb** : Mégabases  
**McF** : Mac Farland  
**MH** : Milieu Mueller-Hinton  
**MI** : Microbiote intestinal  
**MICI** : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin  
**MOC** : Moxifloxacine  
**MRS** : Milieu de Man, Rogosa & Sharpe  
**MTZ** : Métronidazole  
**MyD88** : Myeloid differentiation primary response 88  
**NCBI** : National Centre for Biotechnology Information  
**NE** : Noradrénaline  
**Ob/ob** : Souris obèse, mutante pour le gène Ob  
**pAkt** : Protéine Kinase B  
**PBS** : Phosphate Buffer Saline  
**pHi** : pH isoélectrique  
**qPCR** : quantitative Polymerase Chain Reaction  
**RA** : Rifampicine  
**SC** : Souche clinique  
**SIMPa** : Stress, IMMunité, Pathogènes  
**TZP** : Pipéracilline-tazobactam  
**UFC** : Unité Formant Colonies

## Liste des figures

Figure 1 - Arbre phylogénétique du genre <i>Parabacteroides</i> .....	8
Figure 2 - <i>P. distasonis</i> : Colonies sur gélose BBA (A) et Coloration de Gram observée au microscope optique (B) .....	9
Figure 3 -Paramètres physico-chimiques d'une bactérie .....	11
Figure 4 - Schéma de la structure de la paroi des bactéries à Gram négatif .....	12
Figure 5 - Structure de l'opéron codant pour la synthèse de pili de type I chez <i>Parabacteroides distasonis</i> .....	13
Figure 6 - Les différentes étapes de formation d'un biofilm bactérien .....	15
Figure 7 - Représentation schématique des adhésines, fimbriales ou afimbriales, impliquées dans la reconnaissance spécifique du substrat .....	15
Figure 8 - Abondance relative de <i>P. distasonis</i> dans des échantillons intra-caecaux de souris	17
Figure 9 - Schéma du dispositif de micro-électrophorèse .....	20
Figure 10 - Photographie (a) schéma du dispositif (b) et du principe (c) du système de lavage vapeur .....	21
Figure 11 - Coefficient d'auto-agrégation des différentes souches de <i>P. distasonis</i> étudiées et du témoin positif LGG. ....	25
Figure 12 - Profils de mobilité électrophorétique des souches de <i>P. distasonis</i> SC5, SC7, SC8, SC12 et de LGG .....	26
Figure 13 - Comparaison de la répétabilité de la quantification de la DO par méthode de coloration par cristal violet 0,1 % et méthode de PBS turbidité après le lavage à la vapeur des microplaques. ....	28
Figure 14 - Adhésion des différentes souches de <i>P. distasonis</i> sur microplaques 6 puits en polystyrène non traitées apyrogènes.....	29
Figure 15 - Observation microscopique de l'adhésion sur support abiotique à 48h pour LGG (1), organisation des bactéries (1a) et matrice extracellulaire + clusters (1b) et pour <i>P. distasonis</i> SC1 (2a, 2b).....	30
Figure 16 - Observation microscopique de l'organisation de <i>P. distasonis</i> SC6 (1) et SC7 (2) après 8 jours d'incubation sur microplaque .....	31
Figure 17 - Adhésion de <i>P. distasonis</i> SC1 et SC2, déterminée par numération et qPCR .....	32
Figure 18 - Comparaison de la quantification de <i>P. distasonis</i> SC1 et SC2 selon l'utilisation des amorces spécifiques <i>P. distasonis</i> ou panbactériennes (Eub).....	33

Figure 19 - Courbe de fusion de l'amplification de <i>P. distasonis</i> SC1 et SC2 avec utilisation des amorces Eub.....	33
Figure 20 - Adhésion des souches de <i>P. distasonis</i> sur cellules CaCo-2 différenciées. ....	34
Figure 21 - Adhésion sur cellules CaCo-2 différenciées des souches de <i>P. distasonis</i> cultivées en présence ou absence de 100 µM de noradrénaline (NE). ....	35

### Liste des tableaux

Tableau 1 - Caractéristiques culturales des différentes souches de <i>P. distasonis</i> et de LGG..	19
Tableau 2 - Protocoles des techniques PBS turbidité et coloration au cristal violet .....	22
Tableau 3 -Amorces utilisées en qPCR pour <i>P. distasonis</i> et LGG.....	24
Tableau 4 - Densité volumique de charge et perméabilité des souches DSM 20701T, SC1, SC2, SC3, SC5, SC7, SC8, SC12, SC13 et de LGG.....	27

## Introduction

### I- *Parabacteroides distasonis*

*Parabacteroides distasonis* est une espèce bactérienne appartenant à la famille des *Porphyromonadaceae* et au genre *Parabacteroides*. Ce genre bactérien comprend à l'heure actuelle dix espèces, la plupart d'origine intestinale, dont la plus récemment décrite est *Parabacteroides bouchesdurhonensis* ((Dione *et al.*, 2018), Figure 1).

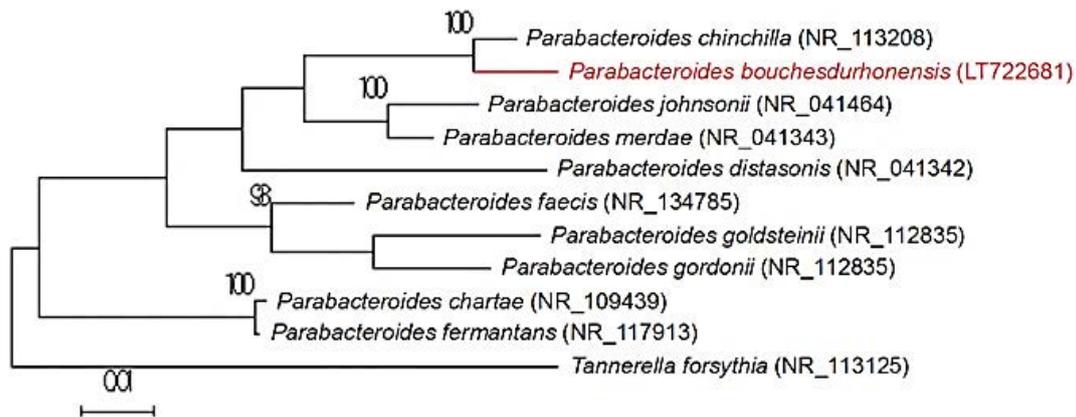


Figure 1 - Arbre phylogénétique du genre *Parabacteroides* (Dione *et al.*, 2018)

Les valeurs de bootstrap ont été obtenues par analyse répétée 500 fois. Seules les valeurs supérieures à 95 % sont représentées

*P. distasonis* fut isolée pour la première fois en 1933 par Eggerth et Gagnon, à partir de fèces humaines, et le nom d'espèce *distasonis* fut choisi en l'honneur du bactériologiste roumain A. Distaso. Initialement classifiée en tant que *Bacteroides distasonis*, car partageant toutes les caractéristiques métaboliques, culturelles et morphologiques de ce genre bactérien (Eggerth et Gagnon, 1933), cette bactérie a été reclassifiée en 2006 par Sakamoto et Benno dans le genre nouvellement créé *Parabacteroides*, regroupant *B. distasonis*, *B. merdae* et *B. goldsteinii* suite à l'analyse phylogénétique de leur séquence d'ADN ribosomique (ADNr) 16S qui les sortaient du genre *Bacteroides* et les montraient plus proches, bien que distincts, de l'espèce *Tannerella forsythia* (Sakamoto et Benno, 2006).

*P. distasonis* est décrite comme un bacille anaérobie strict aux extrémités arrondies, polymorphe, d'une taille comprise entre 0,8 et 1,6  $\mu\text{m}$  de large pour 1,2 à 12  $\mu\text{m}$  de long (Figure 2). Cette bactérie possède une paroi de type Gram-négative, est non mobile et non sporulante. Les colonies formées sur gélose ont une taille d'1 à 2 mm de diamètre et sont de couleur grise, circulaire, légèrement convexes et lisses (Sakamoto et Benno, 2006)

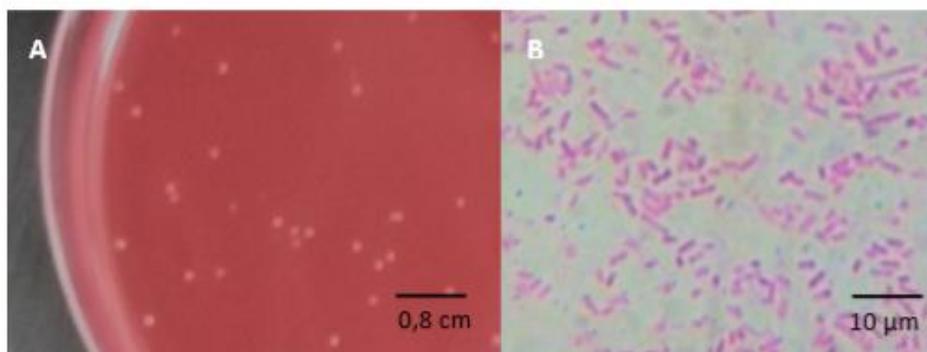


Figure 2 - *P. distasonis* : Colonies sur gélose BBA (A) et Coloration de Gram observée au microscope optique (B)  
Immersion à huile (X1000)

En laboratoire, ces bactéries sont cultivées en anaérobiose sur milieu Brucella Agar, en bouillon Brucella ou en bouillon Schaedler (Composition en annexe 1), qui sont des milieux riches adaptés à la croissance de bactéries anaérobies exigeantes. Les travaux réalisés par le laboratoire SIMPa en 2018 ont montré que cette espèce anaérobie stricte présentait cependant un temps de survie en eau physiologique d'une durée de six heures en aérobie (Pottier, 2018).

D'un point de vue métabolique, *P. distasonis* est uréase négative, catalase positive et ne liquéfie pas la gélatine. Elle est toutefois capable de fermenter de nombreux sucres comme le glucose, le lactose, le mannose, le raffinose, le L-rhamnose, le D-tréhalose, le mélézitose, le sucrose et le xylose, mais pas l'arabinose, le glycérol, le D-mannitol ou le D-sorbitol (Sakamoto et Benno, 2006). Elle possède donc dans son génome des gènes codant pour des enzymes de dégradation des sucres telles que des galactosidases, des glucosidases, mais aussi des arylamidases, enzymes de dégradation des protéines.

Ce génome a été séquencé pour la souche Type ATCC 8503 (génome de référence) par l'Université de Washington (*Parabacteroides distasonis* (ID 1272) - Genome - NCBI). Ce séquençage révèle un génome d'une taille de 4,81 Mb comprenant un total de 4081 gènes codant pour 3380 protéines, 7 opérons ribosomiques, 21 ARN ribosomiques (ARNr) et 82 ARN de transfert, avec un pourcentage de GC de 45.1 %. Cependant, les génomes de différentes souches de *P. distasonis* disponibles dans les bases de données montrent une variabilité de la taille du génome comprise entre 4,40 et 5,78 Mb. En outre, *P. distasonis* est une bactérie dont le taux de transferts de gènes est très élevé, du fait de la présence d'intégrases et de transposases dans son génome (Xu *et al.*, 2007). Une des principales conséquences de ces mécanismes est l'acquisition de gènes de résistances aux antibiotiques (ARGs) favorisée par la prévalence importante de cette espèce dans l'intestin, réservoir massif d'ARGs (Boente *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2007). Certaines études ont montré une résistance des souches testées envers les pénicillines (100%), le céfotétan (71%) et la clindamycine (64%)

(Byun *et al.*, 2019), mais également à l'amoxicilline (93,7%) et l'association amoxicilline-acide clavulanique (Boente *et al.*, 2010).

Par ailleurs, en comparaison avec les génomes des autres espèces de *Bacteroidetes* provenant du microbiote intestinal (MI), le génome de *P. distasonis* est plus petit, signifiant une adaptation de l'espèce à une niche écologique étroite (Xu *et al.*, 2007).

*P. distasonis* est, comme la plupart des espèces de *Parabacteroides*, issue de fèces humaines et animales, ce qui suggère que sa niche écologique préférentielle est le tractus intestinal des mammifères. Il est également décrit comme un pathogène chez l'homme et a été isolé de prélèvements d'origines diverses (sang, ostéo-articulaire, uro-génital) dans le cadre d'infection dont la porte d'entrée était intestinale. Une étude de la prévalence des bactéries dans le MI humain a retrouvé *P. distasonis* chez 91,7% des 396 individus étudiés, montrant l'appartenance de cette espèce bactérienne au *core microbiome* de l'Homme (Almeida, 2013). Cette prévalence peut s'expliquer par le fait qu'elle possède un arsenal d'enzymes de dégradation spécifique, notamment des enzymes de dégradation de l'amidon et de l'inuline, ce qui la qualifie de bactérie « fibrolytique spécialiste ». Cette capacité est en effet remarquable par rapport aux autres *Bacteroidetes* considérés comme des « fibrolytiques généralistes », suggérant un rôle important de *P. distasonis* dans la digestion (Xu *et al.*, 2007). Plus récemment, ce rôle digestif fut démontré par un traitement de souris ob/ob avec cette bactérie qui entraîna une atténuation drastique de l'hyperglycémie et de la prise de poids chez ces animaux via la transformation de l'acide biliaire et la production de succinate par *P. distasonis* (Wang *et al.*, 2019).

Outre ce rôle dans le métabolisme digestif, de nombreuses autres propriétés de cette espèce au sein du MI ont été démontrées. L'administration de fractions membranaires de *P. distasonis* à des souris BALB/c atteintes de colite expérimentale a permis d'atténuer les symptômes de cette pathologie (Kverka *et al.*, 2011). Le même type de traitement a également permis d'entraver la formation de tumeurs colorectales, les fractions membranaires de *P. distasonis* inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires par blocage des voies de signalisation MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) et pAkt (Protéine kinase B) impliquées dans les réponses immunitaires et l'inhibition de l'apoptose (Koh *et al.*, 2018). De plus, il a été prouvé que cette espèce avait un rôle inducteur de la différenciation des précurseurs immunitaires en lymphocytes TCD4+ et TCD25+ exprimant des interleukines-10, cytokines anti-inflammatoires chez les souris (Cekanaviciute *et al.*, 2017). Cette bactérie aurait donc un rôle anti-inflammatoire conséquent chez les mammifères. Cette hypothèse est

également appuyée par l'étude de Zitomersky *et al.* chez des patients atteints de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) qui montrait que *P. distasonis* était plus abondante dans les biopsies coliques des sujets sains et au niveau de sites coliques sains des patients MICI en comparaison aux sites inflammatoires chez ces mêmes patients (Zitomersky *et al.*, 2013).

Par ailleurs, une étude a démontré que certaines souches de *P. distasonis* pouvaient produire des bactériocines, composés antimicrobiens, suggérant un rôle de défense au sein du tractus digestif en empêchant l'implantation de microorganismes pathogènes (Nakano *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces données suggèrent que *P. distasonis*, espèce du *core microbiome* intestinal, apporte de nombreux rôles bénéfiques à son hôte. Il est donc important de comprendre les propriétés qui permettent son maintien dans l'intestin, notamment via ses propriétés de surface qui sont, encore à l'heure actuelle, peu caractérisées.

## II- Propriétés de surface de *P. distasonis*

D'un point de vue physique, les bactéries sont considérées comme des particules molles ou des colloïdes mous, perméables aux ions ( $1/\lambda_0$ ) et présentant une certaine densité volumique de charge ( $\rho_0$ ) due à la structure de leur surface, d'une épaisseur variable selon la bactérie ( $d$ ) (Figure 3 – (Grare *et al.*, 2007)).

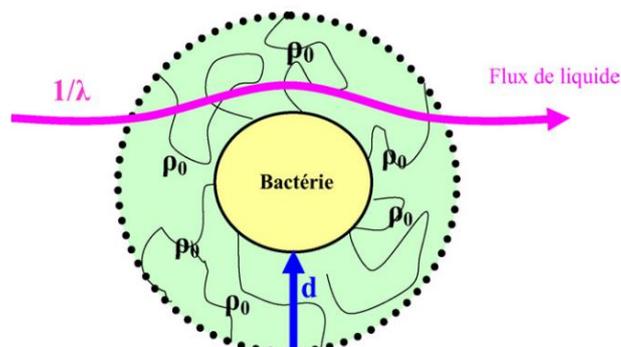


Figure 3 -Paramètres physico-chimiques d'une bactérie (Grare *et al.*, 2007)

Elles ne sont pas affectées par la gravité et seules les interactions de surface entrent en jeu. Ces interactions de surface sont localisées à une frontière entre le microorganisme et son milieu. On appelle cette zone l'interphase bactérienne. Les interactions ayant lieu dans cette zone sont régies par des forces de surface et des forces intermoléculaires (Francius, 2018)

Ces dernières correspondent principalement à des forces électrostatiques, des forces de Van der Waals, des forces ioniques, des forces hydrophobes, des forces stériques et permettent de stabiliser les suspensions colloïdales, mais ont également un rôle crucial lors des premières

étapes d'adhésion des bactéries à leur support, permettant l'initiation de la formation d'un biofilm et donc d'un maintien du microorganisme dans ce milieu. Leur prédominance dépend essentiellement de la nature du milieu, mais aussi des caractéristiques de la surface bactérienne.

En effet, selon la composition moléculaire de la surface bactérienne (paroi et structures facultatives), les propriétés physico-chimiques seront différentes d'une souche à l'autre, ce qui peut avoir un impact sur la capacité d'une bactérie à adhérer et à coloniser un milieu. Il est donc important de connaître la structure pariétale et les propriétés de surface des bactéries pour prédire leur capacité à se maintenir durablement dans un environnement donné.

*P. distasonis* est une bactérie de type Gram négatif. Elle possède donc deux membranes, interne et externe, séparées par l'espace périplasmique contenant la paroi qui est une fine couche de peptidoglycane, reliée à la membrane externe par la lipoprotéine de Braun ((Varki *et al.*, 2015) - Figure 4).

La membrane externe est en contact direct avec le milieu ou le support. Elle est composée d'une bicouche phospholipidique dans laquelle sont enchevêtrées des protéines intrinsèques, notamment des porines. Au niveau de cette membrane se présentent également des lipopolysaccharides (LPS). Ce sont de grosses molécules composées en trois parties :

- L'antigène O ou polysaccharide O, composé très antigénique
- Le core oligosaccharidique
- Le lipide A, enchâssé dans la membrane externe et très immunogène

Les LPS de *P. distasonis* ont pu être isolés par Kverka (Kverka *et al.*, 2011), mais leur structure n'a pas encore été caractérisée.

*P. distasonis* possède également dans son génome 13 locus codant pour des gènes participant à la biosynthèse d'une capsule (Xu *et al.*, 2007), suggérant la présence d'une capsule chez cette espèce bactérienne. Cette hypothèse a été confirmée par l'étude de Nakano,

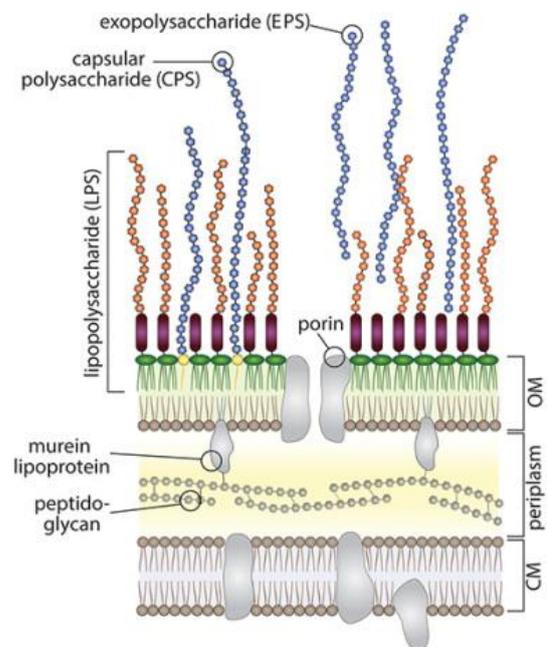


Figure 4 - Schéma de la structure de la paroi des bactéries à Gram négatif (Varki *et al.*, 2015)

qui a pu observer au microscope une capsule pour l'intégralité des souches testées dans son étude (Nakano *et al.*, 2008).

Une capsule est définie comme une couche de polymères polysaccharidiques assemblés par des forces électrostatiques (Beveridge et Graham, 1991). Composée en grande partie d'eau, la capsule est présente chez certaines bactéries en tant que facteur de virulence ou de résistance. Son rôle principal est en effet d'induire la formation de micro-colonies entre bactéries ou la liaison entre une bactérie et son substrat, pouvant conduire à la formation d'un biofilm et donc à la colonisation du milieu par la bactérie (Beveridge et Graham, 1991).

*P. distasonis* est également capable de synthétiser une couche S, composée de deux glycoprotéines majeurs de 140 et 90 kDa. L'expression des gènes responsables de la synthèse de cette couche S est régulée par le promoteur Dgp (Fletcher *et al.*, 2007). Cette couche S permet à la bactérie de s'adapter à son milieu en la protégeant des fluctuations de l'environnement (variations de pH, de force ionique...).

Le génome de *P. distasonis* comprend aussi un opéron, dont les gènes et la structure sont similaires à celui trouvé chez *Porphyromonas gingivalis*, codant pour la synthèse de pili communs ((Xu *et al.*, 2016) – Figure 5).

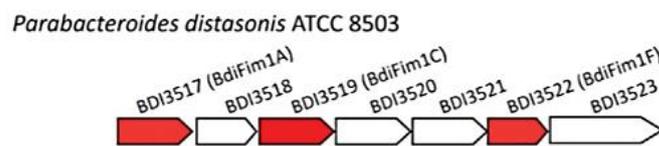


Figure 5 - Structure de l'opéron codant pour la synthèse de pili de type I chez *Parabacteroides distasonis* (Xu *et al.*, 2016)

Les pili communs sont des excroissances protéiques ancrées dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Ces appendices de 2 à 3 µm de long et d'un diamètre de 3 à 10 nm sont notamment impliqués dans l'adhésion des bactéries à un support, via des motifs moléculaires appelés adhésines. Les gènes codant pour les complexes pili-adhésines sont organisés en opéron (Morice). Il existe également des pili sexuels impliqués dans les mécanismes de transfert de gènes par conjugaison.

Les gènes les plus notables retrouvés chez *P. distasonis* sont les gènes BdiFim1A, codant pour une pré-piline, précurseur de piline, BdiFim1C, protéine chaperonne et BdiFim1F, protéine adaptatrice. Ces deux dernières protéines sont impliquées dans l'assemblage et la conformation du pilus de type I (Figure 5).

Bien que ces gènes soient présents chez *P. distasonis*, aucune structure de type pili ou fimbriae n'est détectée en microscopie pour cette bactérie.

Les flagelles sont également un autre type d'appendice pouvant modifier les propriétés de surface des bactéries. Il s'agit d'appendices filamenteux, composés exclusivement de sous-unités protéiques appelées les flagellines. Ces dernières sont spécifiques pour chaque espèce (Morice). Véritable organe de locomotion pour les bactéries mobiles, on distingue selon la disposition des flagelles : les bactéries monotriches (un seul flagelle polaire), lophotriches (nombreux flagelles polaires) ou péritriches (flagelles répartis sur toute la surface bactérienne) (Morice).

*P. distasonis* est une bactérie non mobile et ne possède par conséquent aucune structure de type flagelle à sa surface, bien que des gènes orthologues aux gènes de mobilité de *Flavobacterium johnsoniae* soient présents dans son génome (Sato *et al.*, 2010).

L'interphase bactérienne est donc une zone d'échange particulièrement complexe. Ceci est dû en grande partie à la diversité des structures présentes à la surface des bactéries, conditionnant ainsi les interactions des bactéries avec leur environnement. Ces différences d'interaction entre les bactéries peuvent se traduire par des capacités d'adhésion très différentes d'une espèce à l'autre, ce qui suggère un rôle capital de l'interphase bactérienne dans les phénomènes d'adhésion.

### **III- Adhésion bactérienne et formation de biofilms**

L'adhésion est une étape cruciale dans la colonisation d'un milieu, biotique ou abiotique, pour l'installation durable des micro-organismes dans un environnement donné. Elle conditionne en effet le substrat colonisé et l'état physiologique des bactéries pour aboutir à la formation d'un biofilm.

Un biofilm bactérien est « une communauté structurée de cellules bactériennes enrobées dans une matrice auto-produite, adhérentes les unes aux autres et/ou adhérant à une surface inerte ou vivante. » (Costerton, 1999). Il s'agit de la forme de vie majeure du monde microbien, concernant plus de 95 % de la vie microbienne selon Costerton. Ce mode de vie présente en effet de nombreux avantages comme le piégeage et la circulation des nutriments dans la matrice, l'optimisation des ressources par la diversité présente dans les biofilms multispèces ou encore effet barrière contre les agressions extérieures (les antibiotiques par exemple) (Jorand, 2018).

Le mécanisme général de développement d'un biofilm suit six étapes ((Dhahri, 2013)-Figure 6).

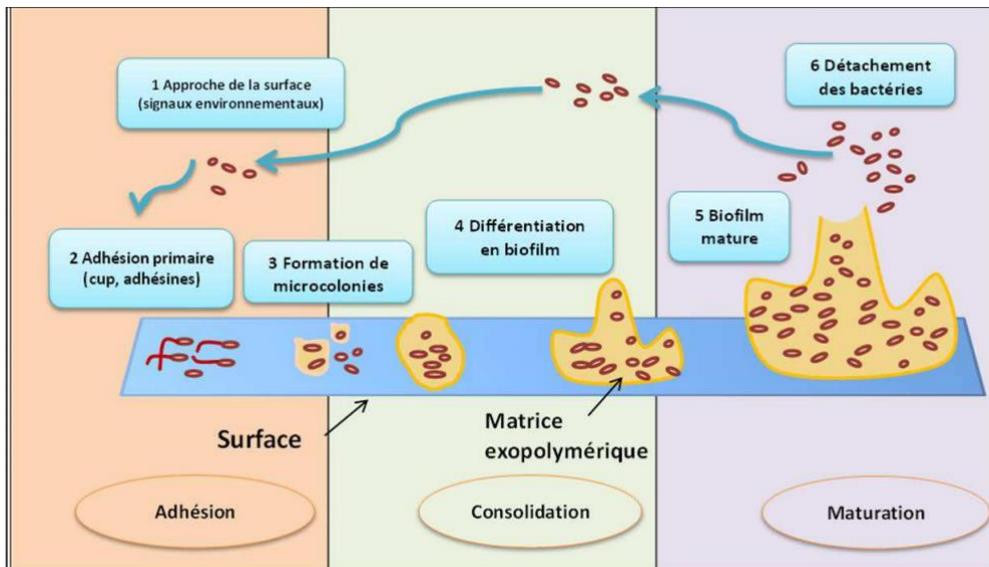


Figure 6 - Les différentes étapes de formation d'un biofilm bactérien (Dharhi, 2013)

La première étape correspond à l'approche de la surface par les bactéries planctoniques. Cette approche peut être favorisée par les mouvements browniens qui représentent les mouvements aléatoires d'une particule dans un fluide, par l'agitation, le flux hydrodynamique ou encore la mobilité des bactéries via les flagelles (chimio-tactisme).

Une fois en contact avec la surface, les bactéries vont interagir avec le support via des forces électrostatiques, de Van der Waals ou selon l'hydrophobicité de l'espèce bactérienne. Cette étape constitue une adhésion initiale réversible et non spécifique. C'est une phase très rapide qui peut se produire entre n'importe quelle bactérie et n'importe quel support via les forces de faible énergie citées précédemment.

Lorsque le substrat et le micro-organisme sont compatibles, ce dernier va réguler son expression génétique et exprimer un certain nombre de facteurs d'adhésion, notamment les adhésines. Ces motifs moléculaires

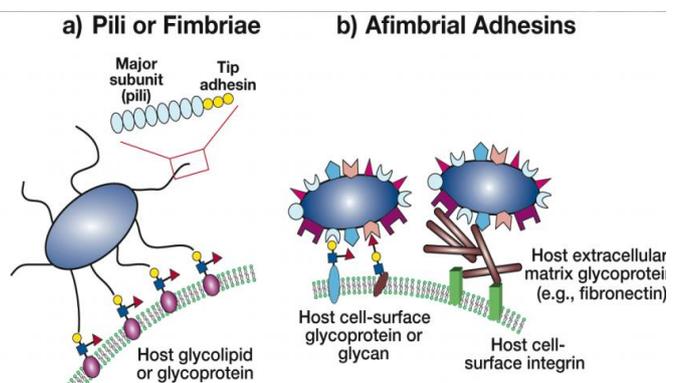


Figure 7 - Représentation schématique des adhésines, fimbriales ou afimbriales, impliquées dans la reconnaissance spécifique du substrat (Varki *et al.*, 2009)

vont permettre la reconnaissance d'un récepteur spécifique du support de la bactérie. Ces motifs peuvent être portés ou non par des pili ((Varki *et al.*, 2009) - Figure 7). Cette reconnaissance va aboutir à l'adhésion irréversible ce qui constitue un ancrage définitif de la bactérie sur son support. Cette étape requérant l'expression de facteurs d'adhésion, il est donc nécessaire que la bactérie soit viable pour s'implanter durablement sur son support.

Cette adhésion peut se réaliser sur support abiotique et dépend non seulement des propriétés de surface des bactéries (charge négative, structure de la membrane et de la paroi, pHi de 3 à 4, zones hydrophobes et hydrophiles) mais également du type de support (hydrophobicité, charge du matériau, porosité...). Dans certains cas, les bactéries adhérentes vont modifier elles-mêmes les surfaces afin de les rendre favorables à leur implantation. Ce processus est appelé le conditionnement des surfaces (Jorand, 2018). Une fois l'adhésion irréversible réalisée, le support abiotique sera colonisé consécutivement à la croissance des bactéries et à leur agrégation en micro-colonies. Cette organisation va entraîner la synthèse d'une matrice exopolymérique dont la structure va favoriser la vie microbienne, comme évoqué précédemment. Cette colonisation peut toutefois devenir un véritable problème de santé publique si celle-ci intervient sur des appareils médicaux, comme des cathéters ou des prothèses, entraînant des infections nosocomiales difficilement traitables (Merode *et al.*, 2006).

Les bactéries peuvent également adhérer sur des cellules vivantes et former des biofilms sur support biotique. Cette adhésion consiste en la reconnaissance d'un site spécifique de la cellule via les adhésines sécrétées par la bactérie. Cette adhésion peut être à bénéfices réciproques, comme dans le cas du microbiote intestinal, où l'adhésion des bactéries sur les cellules intestinales vont leur offrir un environnement optimal pour leur croissance. En échange, les bactéries vont avoir de nombreux rôles bénéfiques pour l'hôte, que ce soit au niveau métabolique, immunitaire ou anti-tumoral (Adak et Khan, 2019).

L'adhésion et la formation de biofilms sont donc des étapes clés dans l'installation durable des micro-organismes dans un environnement qui leur est favorable, comme par exemple le MI pour l'espèce *P. distasonis*. Cependant, divers facteurs sont capables de modifier l'homéostasie intestinale, impactant les bactéries s'y multipliant. Les plus connus sont l'alimentation ou la prise d'antibiotique mais des travaux récents suggèrent le rôle du stress de l'hôte sur l'équilibre intestinal.

#### IV- Impact d'un stress de l'hôte sur l'adhésion bactérienne : rôle des catécholamines

Le stress est une réponse non spécifique de l'organisme visant à rétablir l'homéostasie suite à un stimulus externe appelé agent stressant.

La réponse au stress est constituée de trois phases :

- la phase d'alarme : mobilisation de l'organisme pour lutter ou fuir face à l'agent stressant
- la phase de résistance : réponse adaptative au stimulus si ce dernier persiste
- la phase d'épuisement : l'organisme ne peut plus faire face au stress

Le laboratoire SIMPa où j'ai effectué mon stage a étudié l'impact du stress sur le MI dans différents modèles murins de stress chronique. Ces travaux ont montré un impact sur différents taxons intestinaux dont une perte significative de *P. distasonis* observée lors de différents type de stress (Figure 8).

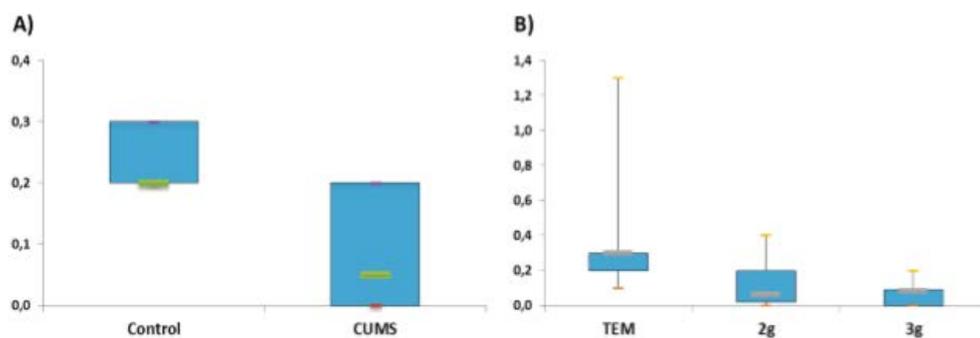


Figure 8 - Abondance relative de *P. distasonis* dans des échantillons intra-caecaux de souris Soumises (A) à un stress socio-environnemental (CUMS) ou (B) un stress hypergravitaire (2g et 3g) en comparaison à des souris contrôles (Control et TEM)

Plusieurs hypothèses peuvent s'appliquer pour expliquer cette diminution. Elle peut tout d'abord être liée aux modifications physiologiques rencontrées dans l'intestin suite à un stress (variations de pH et de motilité, modification de la muqueuse). Elle peut également être due à l'action inhibitrice d'autres espèces bactériennes s'exprimant suite au stress de leur hôte. Il pourrait aussi s'agir de l'activation d'une voie de signalisation chez *P. distasonis* qui provoquerait son éventuel décrochage de son substrat intestinal en réponse à l'agent stressant. Enfin, un individu stressé va activer certaines voies nerveuses réactionnelles, notamment celle entraînant une libération accrue de catécholamines dans le sang et la lumière intestinale.

Les catécholamines, dont l'adrénaline et la noradrénaline, sont des molécules synthétisées par les cellules de la médullo-surrénale et par les neurones postganglionnaires du système nerveux sympathique, jouant à la fois un rôle d'hormones et de neurotransmetteurs. Au-delà

de leurs rôles dans la mobilisation énergétique nécessaire à la réaction de l'hôte face à un stress, ces catécholamines peuvent avoir un impact direct sur les capacités d'adhésion et de maintien des bactéries intestinales. Il a en effet été démontré que la noradrénaline favorisait l'adhésion d'*Escherichia coli* O157:H7 au niveau de l'intestin de porc et de boeuf, notamment au niveau du mécanisme d'adhésion réversible (Vlisidou *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006). Il a également été démontré chez une souche d'*E. coli* pathogène que la noradrénaline induisait l'expression des gènes de l'opéron *dr*, impliqué dans la synthèse des fimbriae, augmentant ainsi son pouvoir d'adhésion sur cellules intestinales CaCo-2 (Diard *et al.*, 2009). A l'inverse, la noradrénaline a un effet inhibiteur sur l'adhésion de *Streptococcus* sur des cellules épithéliales pulmonaires en agissant comme sidérophore, par piégeage du fer, élément indispensable au mécanisme d'adhésion de cette espèce (Gonzales *et al.*, 2013).

### **Objectifs de l'étude**

Les résultats de l'équipe ont montré qu'un stress chronique induisait la perte d'un taxon bénéfique du *core microbiome* intestinal, *P. distasonis*. Il semble donc nécessaire de comprendre à quoi est liée cette perte afin de pouvoir envisager de la limiter. Pour cela, il est préalablement indispensable de comprendre ce qui contribue au maintien de *P. distasonis* dans son écosystème intestinal. Comme évoqué dans cette introduction, le maintien d'une bactérie dans son environnement est principalement lié à ses propriétés de surface. Or, très peu de données sont disponibles sur les propriétés de surface, d'adhésion (sur support abiotique et biotique) et d'auto-agrégation de cette espèce. Des travaux préliminaires ont été réalisés en 2018 sur quatre souches de cette espèce (Pottier, 2018). La variabilité intersouches des propriétés bactériennes étant bien connue, l'objectif de mon travail est d'élargir cette étude à quatorze souches afin d'être représentatif de l'espèce et de sa diversité. Caractériser ces propriétés et les mettre en lien entre elles permettront d'estimer la capacité de cette bactérie à coloniser durablement un environnement spécifique. Ceci pourrait expliquer à la fois le maintien et l'organisation de *P. distasonis* dans le MI, mais aussi ses effets bénéfiques sur son hôte ayant déjà été démontré.

## Matériels et méthodes

### I- Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches utilisées pour cette étude proviennent de collections publiques (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ, American Type Culture Collection ATCC) et de collections privées du laboratoire SIMPA et du laboratoire de bactériologie du CHU de Nancy. Les souches de *P. distasonis* sont conservées à -40°C dans un bouillon Brucella (Bru) à 15% de glycérol. Elles sont revivifiées à partir d'un aliquot congelé sur gélose Brucella (BBA) complémentée avec 5% de sang de mouton défibriné, 1% d'hémine et 1% de vitamine K1 et incubées à 37°C sous anaérobiose pendant 48h.

*Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 (LGG) est également utilisée comme témoin positif. A partir d'un aliquot congelé dans un bouillon DeMan, Rogosa & Sharpe (MRS) à 15% de glycérol à -40°C, la souche est repiquée sur gélose MRS et incubée à 37°C en aérobie pendant 24h. La composition des milieux de culture est donnée en annexe 1.

Les caractéristiques ainsi que les conditions de culture des différentes souches sont présentées dans le tableau 1. L'absence de lien clonal entre les 14 souches testées a été vérifié précédemment par AP-PCR et ERIC-PCR (Pottier, 2018).

Tableau 1 - Caractéristiques culturelles des différentes souches de *P. distasonis* et de LGG

Souche	Date d'isolement	Type de prélèvement	Milieu de culture	Sensibilité <i>in vitro</i> aux antibiotiques									
				AMX	AMC	TZP	IMP	ETP	CM	MOC	RA	MTZ	
DSM 20701 <sup>T</sup>	1933	Selles humaines	BBA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SC 1	22/01/2016	Liquide péritonéal	BBA	R	I	S	S	S	R	S	S	S	S
SC 2	04/03/2016	Liquide péritonéal	BBA	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
SC 4	09/06/2016	Vulvectomie	BBA	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S
SC 5	12/06/2016	Liquide péritonéal	BBA	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
SC 6	20/06/2016	Contrôle de stérilité - cellules souches mésenchymateuses	BBA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SC 7	30/06/2016	Liquide péritonéal	BBA	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S
SC 8	05/07/2016	Hémoculture	BBA	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
SC 12	20/09/2016	Os, sacrum	BBA	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
SC 13	29/09/2016	Liquide abdominal	BBA	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
SC 15	16/11/2016	Liquide péritonéal	BBA	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
SC 17	03/01/2017	Collection intestin grêle	BBA	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S
SC 18	02/01/2017	Abcès abdominal	BBA	R	R	S	S	S	R	I	S	S	S
SC 20	06/02/2017	Liquide abdominal	BBA	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	ATCC 53103	1983	Selles humaines	MRS	R	S	S	S	S	R	S	S	S

BBA : Brucella Blood Agar AMX : Amoxicilline AMC : Amoxicilline-Acide clavulanique TZP : Pipéracilline-tazobactam IMP : Imipénème ETP : Ertapénème CM : Clindamycine MOC : Moxifloxacine RA : Rifampicine MTZ : Métronidazole

## II- Mesure des capacités d'auto-agrégation de *P. distasonis*

La capacité d'auto-agrégation de *P. distasonis* est évaluée selon le protocole utilisé par Polak et son équipe (Polak-Berecka *et al.*, 2014). A partir de colonies obtenues en repiquage sur milieu BBA, une suspension bactérienne d'un Mac Farland (unité de turbidité utilisée pour standardiser les échantillons) de 1 (équivalent à  $10^8$  UFC/mL) est préparée en eau physiologique, milieu où *P. distasonis* est capable de survivre sans croître (Pottier, 2018). Cette suspension est ensuite répartie dans trois cuves de spectrophotométrie scellées avec du parafilm. La densité optique (DO) est ensuite mesurée à 600 nm à 0, 2, 3, 5 et 24h d'incubation à température ambiante. A partir des DO obtenues à 0 et 24h, le coefficient d'auto-agrégation est calculé comme suit :  $AC(t) = [1 - (DO_{600\ t24h} / DO_{600\ t0})] \times 100$ .

## III- Evaluation des propriétés électrocinétiques de *P. distasonis*

Les propriétés de surface de *P. distasonis* sont évaluées par micro-électrophorèse. L'appareil est calibré le jour même de la manipulation par le Dr. Céline Caillet du LIEC. Après 48h d'incubation sur gélose BBA, en anaérobiose et à 37°C, les colonies obtenues sont resuspendues dans du  $\text{NaNO}_3$  1 mM jusqu'à obtenir un Mac Farland de 1,75. Cette suspension est ensuite diluée au 1/100<sup>e</sup> dans une gamme de  $\text{NaNO}_3$  (1-2,5-5-7,5-10-25-50-75-100-250 mM) à un volume final de 60 mL pour chaque concentration. Trois passages sont réalisés pour chaque souche, selon le schéma ci-dessous (Figure 9). La mobilité électrophorétique ainsi que les paramètres de la suspension sont mesurés à l'aide du logiciel Zetaphotometer IV dont l'utilisation est expliquée en annexe 2.

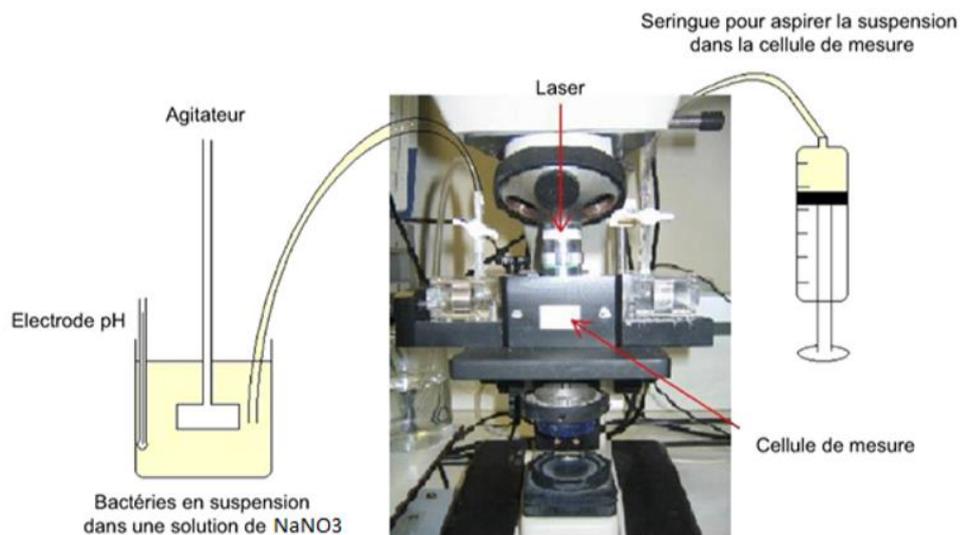


Figure 9 - Schéma du dispositif de micro-électrophorèse (d'après Grare *et al.*, 2007, Pottier, 2018)

#### IV- Détermination de l'adhésion de *P. distasonis* sur support inerte

##### 1) Capacité d'adhésion : choix et optimisation de la technique

Les tests d'adhésion se font à partir d'une suspension bactérienne d'un Mac Farland de  $3 \pm 0,05$  ( $10^9$  UFC/mL) réalisée dans du bouillon Muller Hinton (MH) 10% (milieu de culture de maintien, Pottier, 2018), deux microplaques 6 puits en polystyrène, non traitées et apyrogènes, sont ensemencées à raison de 4 mL par puits. Les microplaques sont incubées à 37°C pendant 48 h.

Une nouvelle méthode de quantification de l'adhésion bactérienne basée sur un lavage vapeur et la resuspension des bactéries adhérees dans du PBS (« PBS turbidité ») a été mise au point et son efficacité par rapport à la technique de coloration par cristal violet a été démontrée sur certaines bactéries (Tasse *et al.*, 2018). L'efficacité du lavage vapeur par rapport à la méthode de lavage par micropipette a été préalablement testée et validée sur LGG. Notre objectif est d'adapter et de valider la méthode « PBS turbidité » pour notre étude.

##### 2) Comparaison méthode PBS turbidité / cristal violet par la méthode vapeur

L'efficacité de la méthode PBS turbidité est testée par rapport au cristal violet.

Après 48h d'incubation à 37°C, les surnageants sont éliminés par retournement. Les puits sont ensuite lavés à la vapeur grâce à un bain-marie à 95°C pendant 40 minutes (Figure 10).

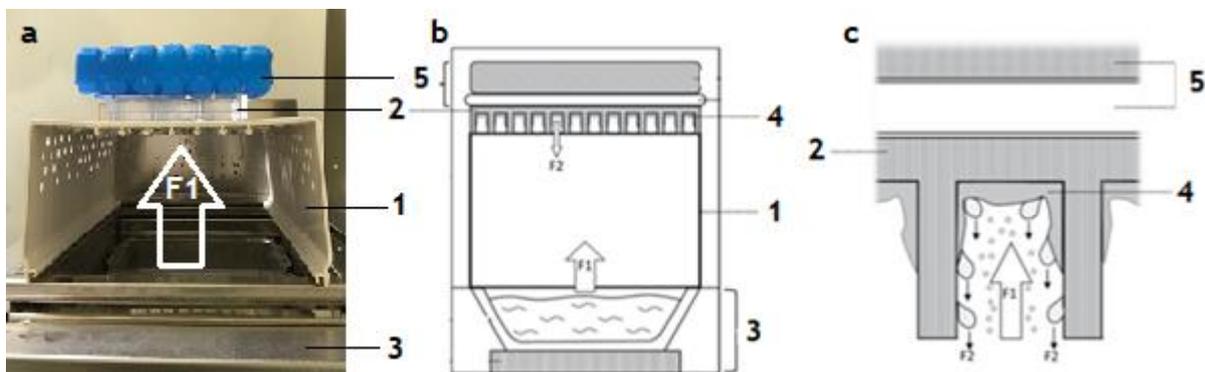


Figure 10 - Photographie (a) schéma du dispositif (b) et du principe (c) du système de lavage vapeur (Tasse *et al.*, 2018).

Le système est composé d'un support (1) sur mesure pour les microplaques (2). Le bain-marie (3) génère de la vapeur d'eau (F1), transformée en gouttelettes (F2) par condensation qui vont éliminer les bactéries non adhérees et le milieu résiduel pour ne garder que les bactéries adhérees (4). Un pain de glace (5) est mis en contact des microplaques pour favoriser la condensation de la vapeur d'eau et protéger les bactéries de la chaleur. L'utilisation d'un support semi-fermé favorise la condensation.

La capacité d'adhésion est ensuite évaluée selon l'un ou l'autre des protocoles suivants :

Tableau 2 - Protocoles des techniques PBS turbidité et coloration au cristal violet (Tasse *et al.*, 2018)

PBS turbidité	Cristal violet
Ajouter 2 mL de PBS par puits	Ajouter 2,7 mL de Cristal Violet 0.1 % très délicatement
Resuspendre les bactéries adhérentes à l'aide d'un grattoir à cellules	Incuber 45 min à température ambiante
Mesurer la DO à 490 nm	Eliminer le surnageant par retournement
Réaliser une numération de la dilution $10^{-4}$ à la dilution $10^{-7}$ sur gélose MRS	Effectuer un lavage vapeur pendant 30 minutes
Incuber les gélules à 37°C pendant 24h	Sécher les puits sous le PSM pendant 35 min
	Ajouter 2 mL d'acide acétique glacial 33% et homogénéiser
	Mesurer la DO à 540 nm

### 3) Validation de la méthode PBS turbidité pour *P. distasonis*

La méthode PBS turbidité est testée, avec lavage vapeur, sur *P. distasonis* DSM 20701<sup>T</sup>, bactérie anaérobie stricte, non testée dans l'étude de Tasse (Tasse *et al.*, 2018).

Après validation, les capacités d'adhésion des souches cliniques de *P. distasonis* sur matériau inerte sont évaluées. Afin d'éviter les risques de contamination croisée, les microplaques 6 puits sont réalisées en mono-souches, à raison de 3 puits (triplicat) par souche. Les microplaques sont mises à incuber 48h à 37°C sous atmosphère anaérobie. Le reste de l'expérimentation est réalisée selon le protocole décrit ci-dessus, à l'exception de la numération effectuée sur géloses BBA, de la dilution  $10^{-2}$  à la dilution  $10^{-5}$ . Les boîtes sont incubées 72h à 37°C en jarre anaérobie.

### 4) Observation microscopique de l'organisation de *P. distasonis*

Afin d'étudier l'organisation des différentes souches de *P. distasonis* lors de l'adhésion sur support inerte, des microplaques 6 puits réalisées de la même manière que décrite précédemment ont été marquées au SYBR Green I (Life Technologies). Après un premier lavage vapeur, 4 mL d'eau stérile apyrogène sont ajoutés dans chaque puits. 40 µL de SYBR Green I 100 X sont ensuite déposés dans chaque puits pour 15 minutes de mise en contact avec les bactéries, à l'abri de la lumière. Un second lavage vapeur est réalisé pendant 40 minutes, à l'obscurité. Les bactéries adhérentes et marquées sont ensuite immergées dans 2 mL d'eau stérile apyrogène, puis les microplaques sont observées au microscope à épifluorescence à l'aide d'un objectif X60 à immersion dans l'eau. Les mêmes tests sont réalisés sur des microplaques incubées 8 jours, dont le milieu MH est remplacé par du milieu Schaedler après 48h d'incubation. Les puits sont lavés avec 2 mL de PBS 1X et 4 mL de

Schaedler sont ajoutés pour chaque puits. Le milieu est renouvelé une nouvelle fois au bout de 3 jours.

#### V- Adhésion de *P. distasonis* sur cellules intestinales et influence de la noradrénaline sur l'adhésion

Les tests d'adhésion sur support biotique sont réalisés sur cellules CaCo-2 TC7 (ATCC HTB37 – Annexe 3) selon les protocoles de Guérin (Guerin *et al.*, 2018) et Gonzales (Gonzales *et al.*, 2013). Après décongélation (Protocole en annexe 4), les cellules sont mises en culture dans des flasques T75 en polystyrène (Sarstedt), en milieu Dublecco's modified Eagle Medium Essential Medium (DMEM, Sigma) complémenté à 10% en sérum de veau foetal décomplémenté (SVF, Gibco), 1% de L-glutamine (Gibco) et 1% d'un mélange antibiotique/antifongique 100X (Pénicilline, Streptomycine, Amphotéricine B, HyClone). Les flasques sont incubées à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont trypsinées à une confluence de 90 % avec de la Trypsine EDTA 1X (Gibco), puis resuspendues dans du DMEM complet (Protocole en annexe 5). La suspension cellulaire sert à inoculer des microplaques 12 puits (Sarstedt) à raison de  $6.10^4$  cellules par cm<sup>2</sup>, pour 1 mL de suspension cellulaire par puits (Comptage au Bleu trypan sur cellules de Kova expliqué en annexe 6). Le nombre de cellules par puits est également compté selon la même méthode. Le milieu (DMEM complet) est renouvelé tous les jours pendant 21 jours, à l'exception des deux derniers jours où les cellules sont mises en culture avec du DMEM complet sans antibiotique/antifongique. Le 21<sup>ème</sup> jour, les cellules sont mises en présence de deux suspensions bactériennes de *P. distasonis*

- *P. distasonis* cultivé dans 10 mL de bouillon Bru **sans noradrénaline** (NE) et incubé 24h à 37°C en anaérobiose
- *P. distasonis* cultivé dans 10 mL de bouillon Bru **avec noradrénaline 100 µM** (concentration physiologique intestinale, Boyanova *et al.*, 2017)

Ces deux suspensions sont ajustées à un Mac Farland de  $3 \pm 0.05$  dans du PBS puis resuspendues dans du DMEM complet sans antibiotique/antifongique :

Les essais sont testés en triplicat, à raison de 1 mL de suspension bactérienne par puits. Les plaques sont incubées 3h à 37°C sous atmosphère 5% de CO<sub>2</sub>. Les puits sont lavés 4 fois avec du PBS 1X, puis les cellules et les bactéries adhérentes resuspendues dans 1 mL de Triton 100X 0.1% à l'aide d'un grattoir à cellules. Les CaCo-2 sont cassées par aspiration/refoulement 3 fois à travers une aiguille (21G\*1 1/2 (0,8\*40 mm)) et mises à incuber 30 minutes à température ambiante. 100 µL de la suspension est utilisée pour la numération sur boîte (dilutions testées de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-4</sup>) et les 900 µL restants sont utilisés pour

extraire l'ADN de *P. distasonis* à l'aide du kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen – Annexe 7). Cet ADN est dosé à l'aide d'un NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific – Annexe 8) et utilisé pour une quantification bactérienne en qPCR.

1 µL de l'ADN extrait est ajouté à 24 µL d'un mix qPCR contenant 12.5 µL de Mesa Blue (Master Mix Plus for SYBR assay, Eurogentec), 10,5 µL d'eau stérile apyrogène et 0,5 µL (soit 10 µM) de chacune des amorces ciblant spécifiquement *P. distasonis* (Tableau 3). L'ADN est amplifié par l'appareil MyiQ™2 Two-Color (Bio-Rad) en suivant un programme de 40 cycles à 95°C pendant 5 minutes, 95°C pendant 15 secondes, 60°C pendant 1 minute. Afin de vérifier l'unique présence dans l'extrait de *P. distasonis*, une courbe de fusion est établie au passage 60°C – 95°C avec un intervalle de 0.5°C. Cette absence de contamination par d'autres espèces bactériennes est confirmée en comparant les quantifications obtenues avec ce couple d'amorces spécifiques de *P. distasonis* et un couple d'amorces panbactériennes amplifiant toutes les bactéries (Eub 1369F/ Eub 1492R). Ce couple est par ailleurs utilisé pour quantifier le nombre de LGG adhérents. Les résultats sont analysés par le logiciel BioRad iQ5. Les gammes utilisées pour la quantification sont présentées en annexe 9.

Tableau 3 -Amorces utilisées en qPCR pour *P. distasonis* et LGG

Nom de l'amorce	Sens de l'amorce	Séquence
<i>P. distasonis</i> 1115F	Sens	5' CTTGCCACTAGTTACTAACA 3'
<i>P. distasonis</i> 1277R	Antisens	5' CCCTGTCGCCAGGTG 3'
Eub 1369F	Sens	5' CGGTGAATACGTTCCCGG 3'
Eub 1492R	Antisens	5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'

## VI- Analyse statistique

Les données sont traitées statistiquement pour la capacité d'auto-agrégation par une analyse de la variance (ANOVA,  $p = 0.05$ ). Les résultats obtenus pour la comparaison PBS turbidité/Cristal violet, l'adhésion sur support inerte et l'adhésion sur cellules intestinales sont analysés par un test de Mann-Whitney ( $p = 0.05$ ).

## Résultats

### I- Capacité d'auto-agrégation de *P. distasonis*

Le coefficient d'auto-agrégation a été calculé selon la formule présentée dans la partie matériel et méthodes en prenant en compte les DO obtenues à 0 et 24h d'incubation (Figure 11). Cette auto-agrégation correspond à la capacité des bactéries à former des micro-colonies et à se déposer sur une surface, étapes cruciales dans la structuration d'un biofilm.

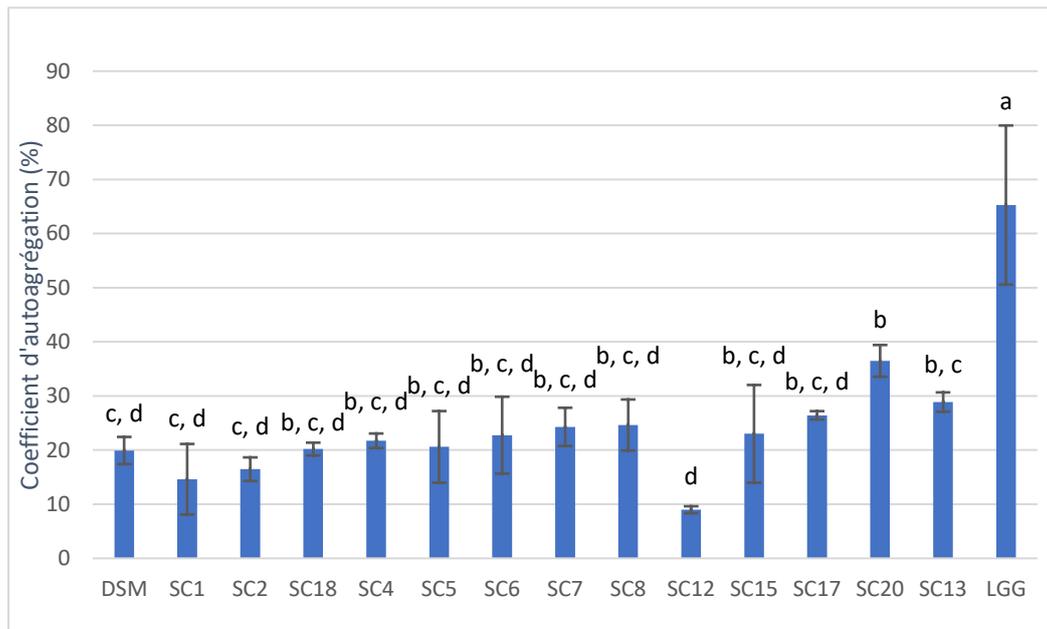


Figure 11 - Coefficient d'auto-agrégation des différentes souches de *P. distasonis* étudiées et du témoin positif LGG.

Les lettres représentent les différents groupes statistiques obtenus par test ANOVA ( $p = 0.05$ )

Dans leur globalité, les différentes souches de *P. distasonis* présentent toute une capacité d'auto-agrégation et ont un coefficient d'auto-agrégation inférieur à 40%. En comparaison, le témoin positif LGG possède un taux d'auto-agrégation de 65,3 %.

En comparant les souches de *P. distasonis*, plusieurs groupes statistiques se dégagent. Un premier groupe (c,d) comprend les souches DSM 20701<sup>T</sup>, SC1 et SC2, dont les taux d'auto-agrégation sont compris entre 15 et 20%. Le deuxième groupe (b,c,d) comprend les souches SC4, SC5, SC6, SC7, SC8, SC15, SC17 et SC18 avec des coefficients compris entre 20,2% (SC18) et 26,4% (SC17). Les souches SC13 et SC20 font partie du troisième et quatrième groupe statistique avec respectivement 28,8% et 36,5% d'auto-agrégation. Enfin, un cinquième groupe est représenté par SC12, qui possède le taux d'auto-agrégation le plus bas à 9%.

## II- Caractérisation des propriétés électrocinétiques de *P. distasonis*

Les propriétés électrocinétiques ont été étudiées chez les différentes souches de *P. distasonis*. Les résultats sont présentés sous forme de courbe de mobilité électrophorétique fittée pour les souches SC5, SC7, SC8, SC12 et LGG, selon le modèle d'Ohshima ((Ohshima and Kondo, 1991) - Figure 12) dont le principe est expliqué en annexe 10.

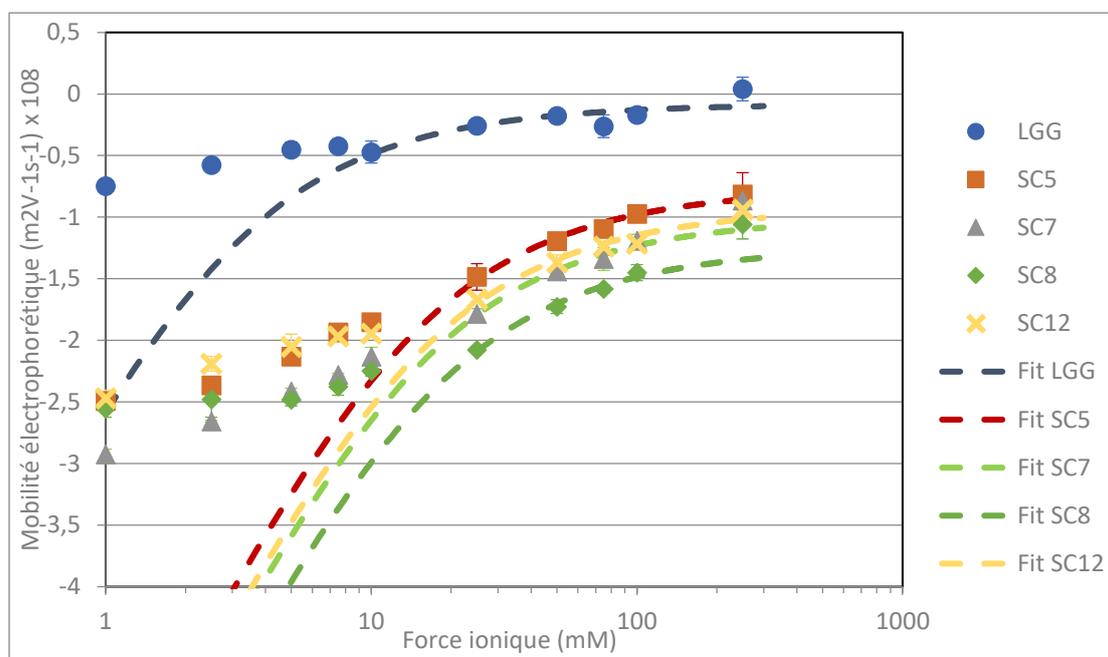


Figure 12 - Profils de mobilité électrophorétique des souches de *P. distasonis* SC5, SC7, SC8, SC12 et de LGG

L'ensemble des souches possède une mobilité électrophorétique négative sur toute la gamme de concentration de  $NaNO_3$ , avec une phase de ralentissement de la mobilité et sans atteindre la neutralité à la concentration la plus forte, ce qui est cohérent avec la charge négative de la surface des bactéries ainsi qu'avec leur caractère de particule « molle ».

Les courbes montrent que LGG possède une faible électronégativité de  $-0,74 \mu m/s/V/cm$  à 1 mM de  $NaNO_3$ . Sa mobilité devient même positive à 250 mM, avec  $0,11 \mu m/s/V/cm$ . En comparaison, la mobilité électrophorétique de l'espèce *P. distasonis* varie entre  $-2,47$  (SC12) et  $-2,92 \mu m/s/V/cm$  (SC7) à 1 mM et entre  $-0,81$  (SC5) et  $-1,05 \mu m/s/V/cm$  (SC8) à 250 mM. Il est donc à noter que *P. distasonis* est plus électronégative que LGG et que la mobilité électrophorétique varie entre les souches de *P. distasonis*.

A partir des valeurs de mobilité, la densité volumique de charge ( $\phi_0$ ) et la perméabilité ( $1/\lambda_0$ ) de LGG, SC1, SC5, SC7, SC8 et SC12 ont été obtenues (Tableau 4). Les valeurs obtenues préalablement pour DSM 20701<sup>T</sup>, SC2, SC3 et SC13 sont également présentées (Pottier, 2018).

Tableau 4 - Densité volumique de charge et perméabilité des souches DSM 20701T, SC1, SC2, SC3, SC5, SC7, SC8, SC12, SC13 et de LGG.

Souche	$\phi 0$	$1/\lambda 0$
LGG	-7,0	1,07
DSM 20701 <sup>T</sup>	-26,6	1,79
SC1 (pic 1)	-13,1	3,15
SC2	-37,0	1,60
SC3	-30,4	1,80
SC5	-28,2	1,64
SC7	-29,3	1,84
SC8	-31,3	1,98
SC12	-29,0	1,78
SC13	-32,3	1,80

Les souches de *P. distasonis* possèdent une densité volumique de charge comprise entre -26,6 et -38,8 mM et une perméabilité comprise entre 1,48 et 1,98 nm, ce qui signifie que les souches dont les courbes ont été fittées ont des propriétés de surface similaires. La souche SC2 se distingue par sa densité volumique de charge plus importante que les autres souches avec -37,0 mM. En comparaison, LGG possède un faible  $\phi 0$  et une perméabilité plus basse que *P. distasonis*. La valeur affichée pour SC1 n'a pris en compte qu'un seul des deux pics de mobilité observés (donnée non montrée). Or, les deux pics étaient présents en proportion équivalente, avec des valeurs de mobilité très éloignées les unes des autres. Ne sachant pas expliquer à l'heure actuelle l'origine de ces deux pics, il n'est pas possible de conclure sur cette souche.

### III- Adhésion de *P. distasonis* sur support abiotique

#### 1) Choix et optimisation de la technique

Après validation de la méthode de lavage vapeur au détriment de la méthode micropipette, les méthodes de coloration au cristal violet et PBS turbidité ont été comparées dans leur capacité à évaluer l'adhésion de la souche LGG sur support inerte, en présence d'un témoin négatif (milieu MH 10%). La comparaison de la répétabilité des techniques (Figure 13) est réalisée à partir des mesures de DO, respectivement à 540 nm (cristal violet) et 490 nm (PBS turbidité).

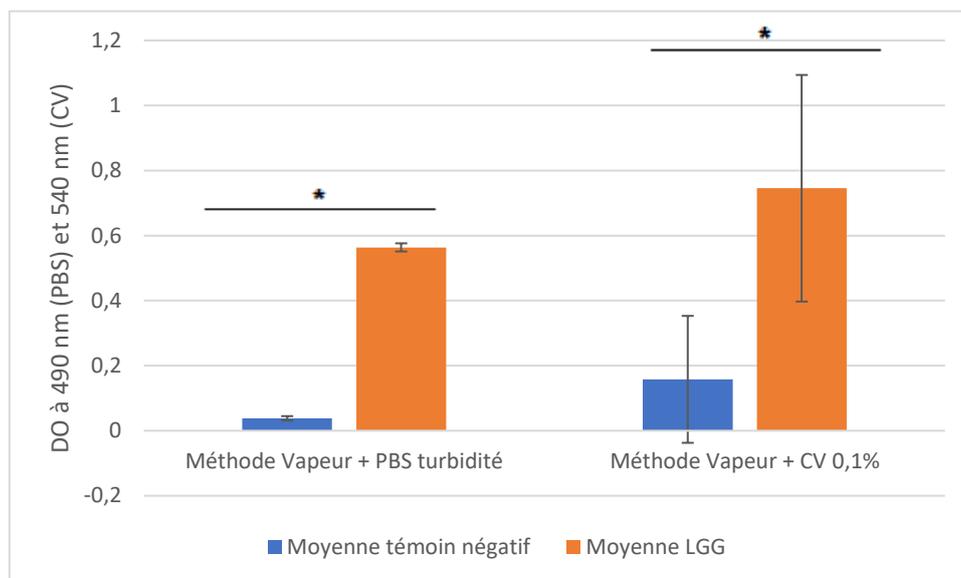


Figure 13 - Comparaison de la répétabilité de la quantification de la DO par méthode de coloration par cristal violet 0,1 % et méthode de PBS turbidité après le lavage à la vapeur des microplaques.

Les \* représentent les différences significatives entre les échantillons (Mann-Whitney  $p = 0,05$ )

L'expérience a été réalisée en triplicat pour chacune des techniques et l'erreur standard a été calculée à partir des résultats obtenus pour chacun des échantillons. Pour la méthode PBS turbidité, nous obtenons une erreur standard de 0,007 pour le témoin négatif et de 0,013 pour LGG. Concernant la méthode par coloration au cristal violet, les erreurs standards sont de respectivement 0,195 pour le témoin négatif et 0,348 pour LGG. Les valeurs d'erreur standard sont donc bien moins élevées pour l'utilisation de la méthode PBS turbidité que pour la coloration au cristal violet, et ce malgré l'application de lavage vapeur au détriment de lavages successifs à la pipette.

## 2) Capacité d'adhésion de *P. distasonis* sur support inerte

Les résultats sont obtenus pour une adhésion bactérienne à 48h d'incubation, par numération bactérienne et exprimés en UFC/puits (Figure 14).

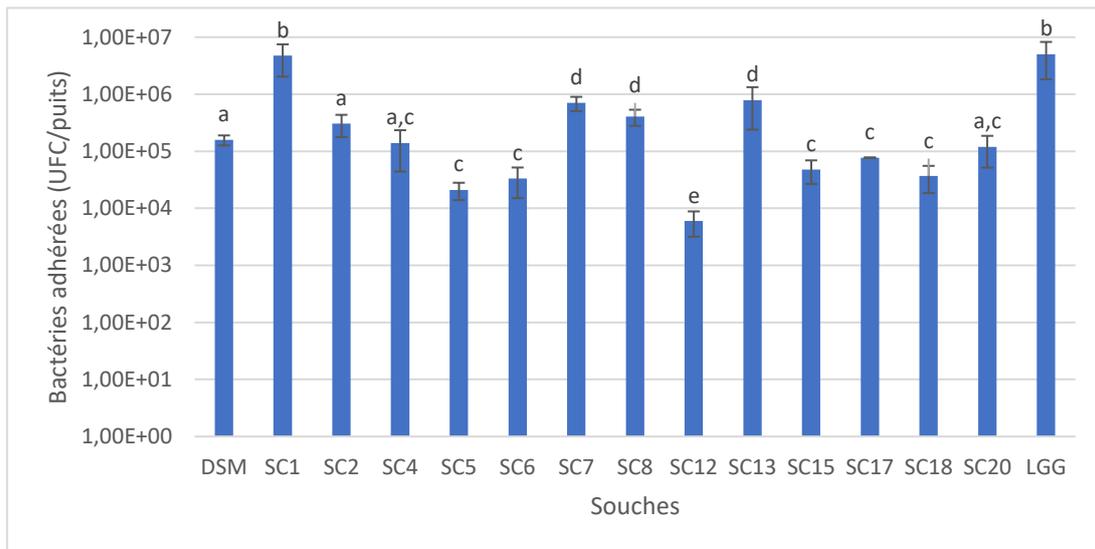


Figure 14 - Adhésion des différentes souches de *P. distasonis* sur microplaques 6 puits en polystyrène non traitées apyrogènes.

Les lettres représentent les différents groupes statistiques (Mann-Whitney  $p = 0,05$ )

Les tests d'adhésion sur support abiotique révèlent que chaque souche testée est capable d'adhérer à un support abiotique. Nous pouvons également noter des différences de capacité d'adhésion au sein de l'espèce. Six groupes statistiques significativement différents se distinguent. Un premier groupe statistique (a) comprend les souches DSM et SC2 avec une capacité d'adhésion comprise entre  $1,39.10^5$  et  $3,06.10^5$  UFC/puits. Le deuxième groupe statistique (b) comprenant LGG et SC1 montre une capacité d'adhésion de l'ordre de  $10^6$  UFC/puits. Le troisième groupe (a,c) est composé de SC4 et SC20, avec une adhésion comprise entre  $1,19.10^5$  et  $1,39.10^5$  UFC/puits. Le quatrième groupe (c) est constitué de SC5, SC6, SC15, SC17 et SC18, avec une capacité d'adhésion sur support inerte variant de  $2,10.10^4$  à  $7,70.10^4$  UFC/puits. SC7, SC8 et SC13 représentent le cinquième groupe (d) dont l'adhésion est comprise entre  $4,07.10^5$  et  $7,85.10^5$  UFC/puits. Enfin, le sixième groupe (e) est constitué de SC12 présentant la plus faible capacité d'adhésion sur support inerte ( $6,00.10^3$  UFC/puits).

Les résultats nous montrent donc une certaine variabilité inter-souches chez *P. distasonis* en ce qui concerne la capacité d'adhésion sur support abiotique. La prochaine étape était donc de savoir si ces variations d'adhésion entraînent également des variations d'organisation des bactéries sur support abiotique au niveau de l'adhésion et de la formation de biofilm.

### 3) Organisation de *P. distasonis* lors de l'adhésion

Après avoir évalué la capacité d'adhésion de *P. distasonis* sur support abiotique, l'organisation des bactéries adhérees sur ce support a été observée en microscopie à épifluorescence. En comparaison, la même expérience a été réalisée sur le témoin positif LGG.

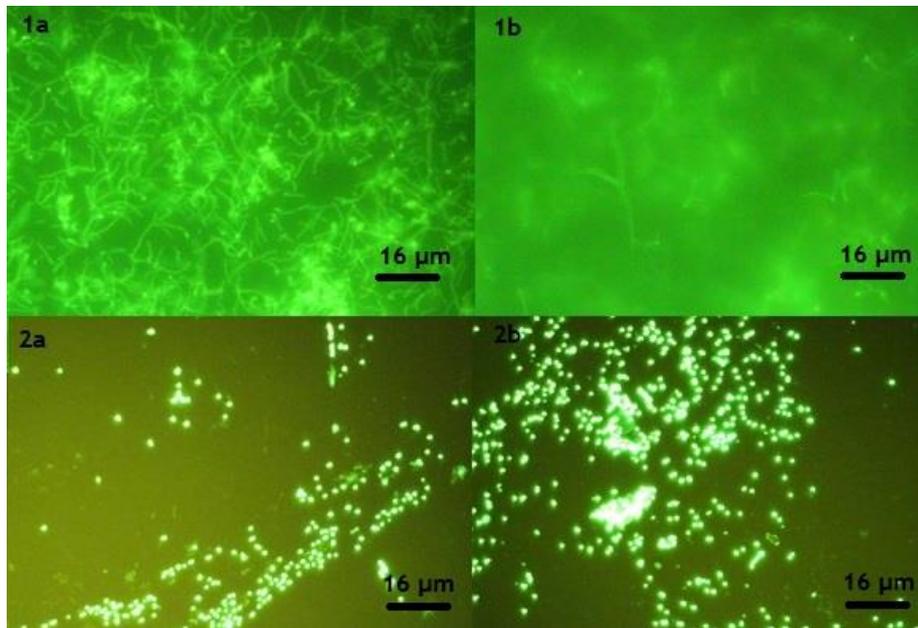


Figure 15 - Observation microscopique de l'adhésion sur support abiotique à 48h pour LGG (1), organisation des bactéries (1a) et matrice extracellulaire + clusters (1b) et pour *P. distasonis* SC1 (2a, 2b). Microscope à épifluorescence après marquage au SYBR Green I (x600)

L'organisation des bactéries adhérees à 48h varie en fonction de l'espèce étudiée. Chez LGG, nous pouvons observer une forte densité bactérienne (Figure 15, 1a), avec une organisation typique de *L. rhamnosus*, en chaînettes. Nous pouvons également remarquer, lorsque nous reculons l'objectif, la présence d'une matrice extracellulaire marquée également au SYBR Green I (Figure 15, 1b). Il est à noter que les bactéries sont enchevêtrées dans cette matrice, quel que soit le niveau d'immersion de l'objectif, ce qui signifie que LGG est déjà organisé en biofilm à 48h d'incubation.

En revanche, il est à noter chez *P. distasonis* SC1 que la densité bactérienne est bien moins importante et plus irrégulière que pour LGG (Figure 15, 2a et 2b). L'organisation semble se faire de façon aléatoire, même si une organisation en « bande » est récurrente (Figure 15, 1a). Enfin, contrairement à LGG, il n'y a pas de matrice visible, quel que soit le niveau d'immersion de l'objectif, ce qui signifie qu'à 48h, l'adhésion de *P. distasonis* SC1 est une monocouche bactérienne. Les observations réalisées sur 6 autres souches de *P. distasonis*

montrent une organisation similaire à celle de SC1 : monocouche, densité irrégulière et organisation aléatoire.

#### 4) Formation de biofilms par *P. distasonis*

La capacité de *P. distasonis* à former des biofilms a été observée au microscope à épifluorescence après marquage des bactéries, incubées 8 jours sur microplaque 6 puits, au SYBR Green I. Les résultats sont présentés dans la figure 16 pour SC6 et SC7.

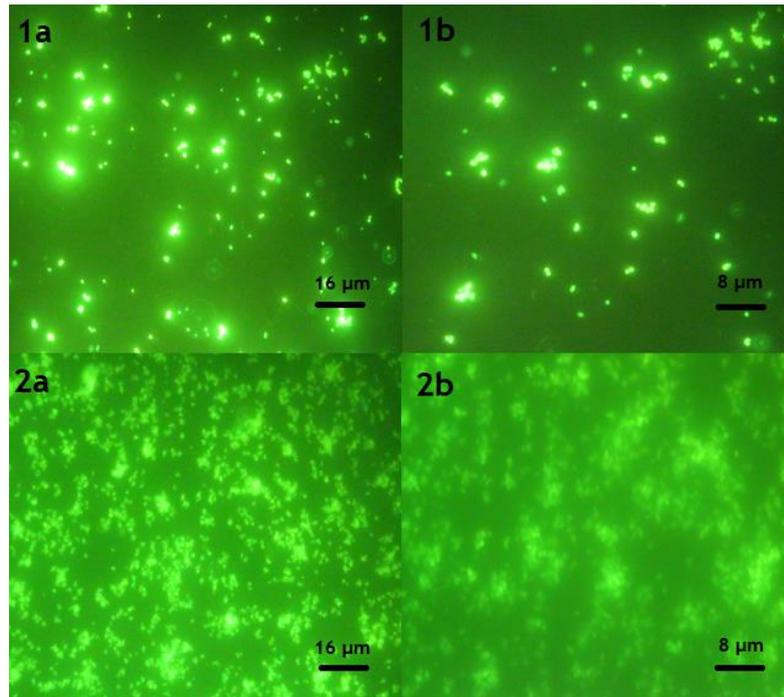


Figure 16 - Observation microscopique de l'organisation de *P. distasonis* SC6 (1) et SC7 (2) après 8 jours d'incubation sur microplaque. Microscope à épifluorescence après marquage au SYBR Green I (x600 : 1a, 2a / x1200 1b, 2b)

Deux types d'organisation sont observés après 8 jours d'incubation de *P. distasonis* sur microplaques. La première (Figure 16, 1a et 1b), qui est observée pour SC6 et la majorité des souches testées, montre des bactéries réparties aléatoirement et sur un seul plan, comme lors de l'observation de l'adhésion à 48h. La différence notable entre les deux temps d'incubation est la présence de bactéries organisées en microcolonies. Chaque microcolonie semble enchevêtrée dans une matrice localisée.

En revanche, la souche clinique 7 (Figure 16, 2a et 2b) montre une organisation très similaire à celle de LGG à 48h d'incubation. Les bactéries sont en effet organisées en clusters, avec une forte densité bactérienne. Ces clusters sont positionnés dans une matrice extracellulaire, et ce sur plusieurs plans (Figure 16, 2b). A 8 jours d'incubation, SC7 est donc

organisée en biofilm, contrairement aux autres souches testées qui semblent être à l'étape post-adhésion irréversible, lorsque le biofilm commence à se structurer.

*P. distasonis* présente donc une certaine variabilité inter-souche concernant son implantation sur support abiotique, au niveau de la capacité d'adhésion et de la formation de biofilms. Ce phénomène étant liée principalement à des phénomènes physico-chimiques, la suite des travaux réalisés a eu pour but de savoir si ces variations subsistaient lors de phénomènes d'adhésion spécifiques, notamment sur cellules intestinales.

#### IV- Adhésion de *P. distasonis* sur cellules intestinales et effet de la noradrénaline

##### 1) Comparaison de la numération sur boîtes avec la quantification en qPCR

Les techniques de numération sur boîtes et de quantification par qPCR ont été comparées pour la détermination du nombre de bactéries adhérees sur cellules CaCo-2 pour les souches de *P. distasonis* SC1 et SC2 (Figure 17).

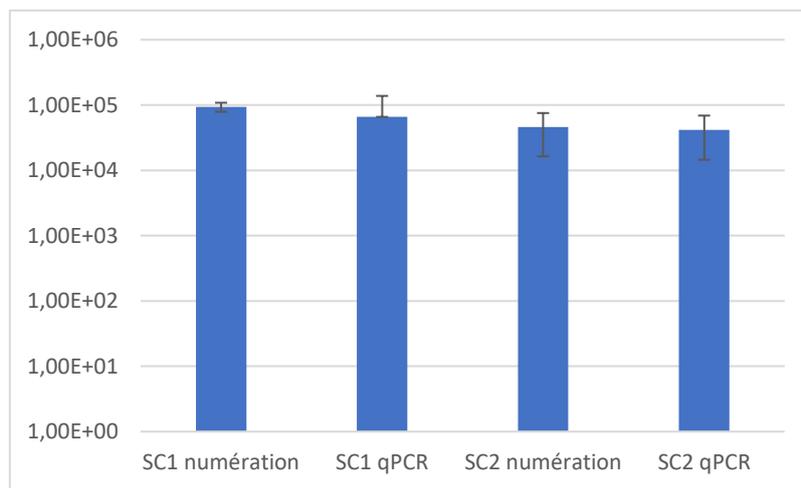


Figure 17 - Adhésion de *P. distasonis* SC1 et SC2, déterminée par numération et qPCR (Mann-Whitney p = 0,05)

Les résultats obtenus montrent une adhésion de  $9,36.10^4$  et  $6,58.10^4$  UFC/puits pour SC1 et  $4,59.10^4$  et  $4,17.10^4$  pour SC2, respectivement déterminée par numération sur boîtes et par qPCR. Les tests statistiques réalisés nous permettent de conclure qu'il n'y a pas de différence significative entre les résultats obtenus en numération sur boîte et ceux obtenus en qPCR, que ce soit pour SC1 ou SC2. Les deux techniques présentent donc des résultats cohérents l'une par rapport à l'autre et sont donc des techniques fiables pour estimer l'adhésion de *P. distasonis* sur cellules intestinales. La qPCR étant moins lourde à mettre en place que la numération étant donné le nombre important de tests réalisés, la qPCR a été utilisée par la suite pour quantifier les capacités d'adhésion sur Caco-2.

## 2) Vérification de la pureté des échantillons utilisés en qPCR

A l'inverse de la culture qui permet de visualiser les éventuels contaminants par observation des colonies, la pureté des échantillons est vérifiée en qPCR par comparaison entre les concentrations bactériennes obtenues avec les amorces spécifiques à *P. distasonis* (1115F et 1277R) et celles obtenues avec les amorces panbactériennes (Eub 1369F et 1492R). Ces résultats sont présentés pour les extraits d'ADN obtenus pour 2 souches dans la figure 18.

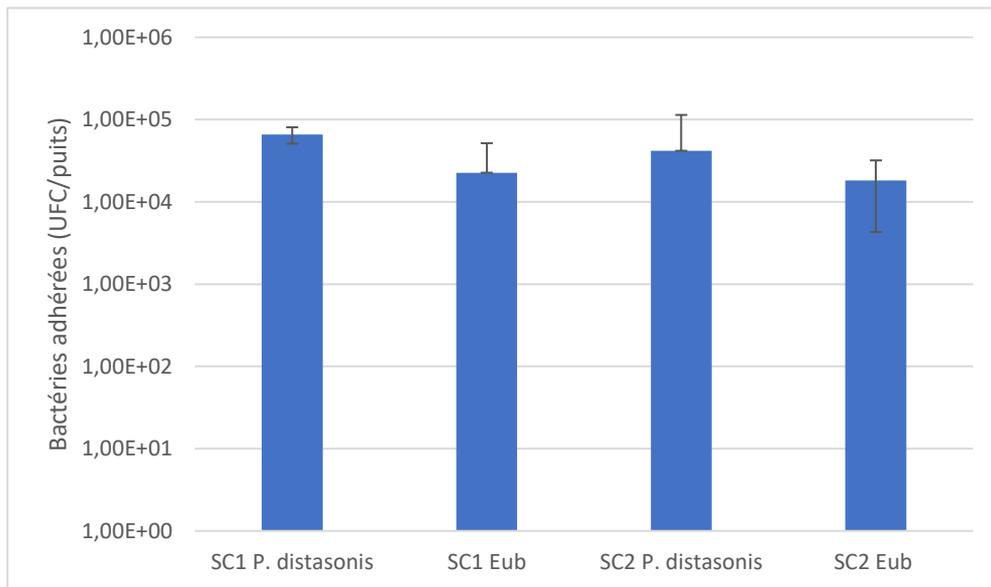


Figure 18 - Comparaison de la quantification de *P. distasonis* SC1 et SC2 selon l'utilisation des amorces spécifiques *P. distasonis* ou panbactériennes (Eub). (Mann-Whitney  $p = 0,05$ )

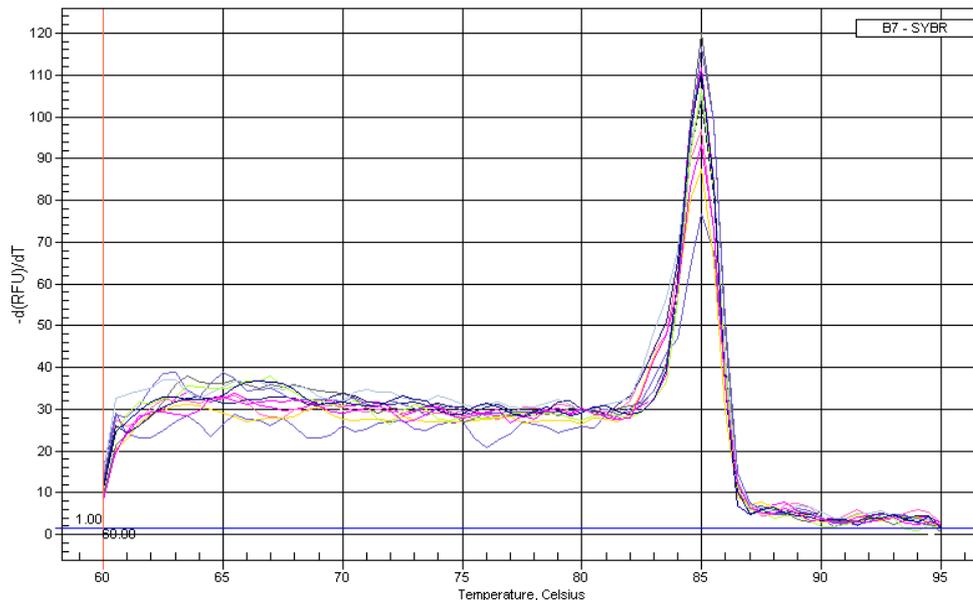


Figure 19 - Courbe de fusion de l'amplification de *P. distasonis* SC1 et SC2 avec utilisation des amorces Eub

Aucune différence significative n'est observée entre les deux types de qPCR pour SC1 et SC2. De plus, la courbe de fusion obtenue (figure 19) montre un seul pic de fusion à 85°C,

correspondant aux amplicons de *P. distasonis*. Les ADNs extraits correspondent donc uniquement à de l'ADN de *P. distasonis*, ce qui démontre la pureté des échantillons.

### 3) Capacité d'adhésion de *P. distasonis* sur cellules intestinales

Le nombre de cellules CaCo-2 par puits a été standardisé à  $1,346 \cdot 10^6 \pm 2,89 \cdot 10^5$  cellules. Les résultats sont présentés en nombre d'UFC par puits (Figure 20).

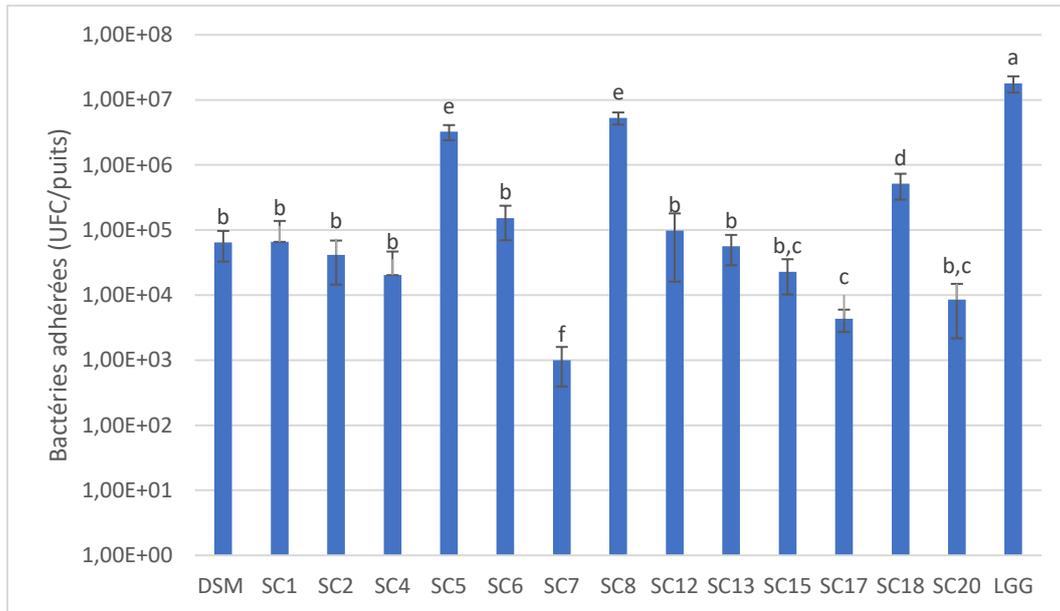


Figure 20 - Adhésion des souches de *P. distasonis* sur cellules CaCo-2 différenciées. Les lettres représentent les différents groupes statistiques (Mann-Whitney  $p = 0.05$ )

Chacune des souches testées possède la capacité d'adhérer sur cellules intestinales. Les tests statistiques révèlent que LGG possède une plus grande capacité d'adhésion sur cellules intestinales que n'importe quelle souche de *P. distasonis* avec  $1,80 \cdot 10^7$  bactéries adhérees par puits. Les deux souches de *P. distasonis* présentant la meilleure capacité d'adhésion sont SC5 et SC8 avec une adhésion respectivement de  $3,25 \cdot 10^6$  et  $5,29 \cdot 10^6$  bactéries adhérees par puits. A l'inverse, SC7 possède la plus faible adhésion avec de  $9,02 \cdot 10^2$  UFC par puits. SC18 adhère à raison de  $5,13 \cdot 10^5$  UFC par puits. Les autres souches ont une adhésion comprise entre  $1,63 \cdot 10^3$  et  $1,53 \cdot 10^5$  bactéries adhérees. Il y a donc également une variabilité inter-souche en ce qui concerne l'adhésion spécifique des bactéries sur cellules intestinales. Il est également à noter que pour les souches avec la capacité d'adhésion sur cellules intestinales la plus forte ne possèdent pas la capacité d'adhésion sur support inerte la plus élevée, et inversement.

#### 4) Effet de la noradrénaline sur l'adhésion de *P. distasonis* sur cellules intestinales

La même expérience d'adhésion sur CaCo-2 a été réalisée en cultivant les souches de *P. distasonis* dans un milieu à concentration physiologique intestinale (100  $\mu$ M) de noradrénaline. Les résultats sont présentés pour LGG et 5 souches de *P. distasonis* dans la figure 21 ci-dessous.

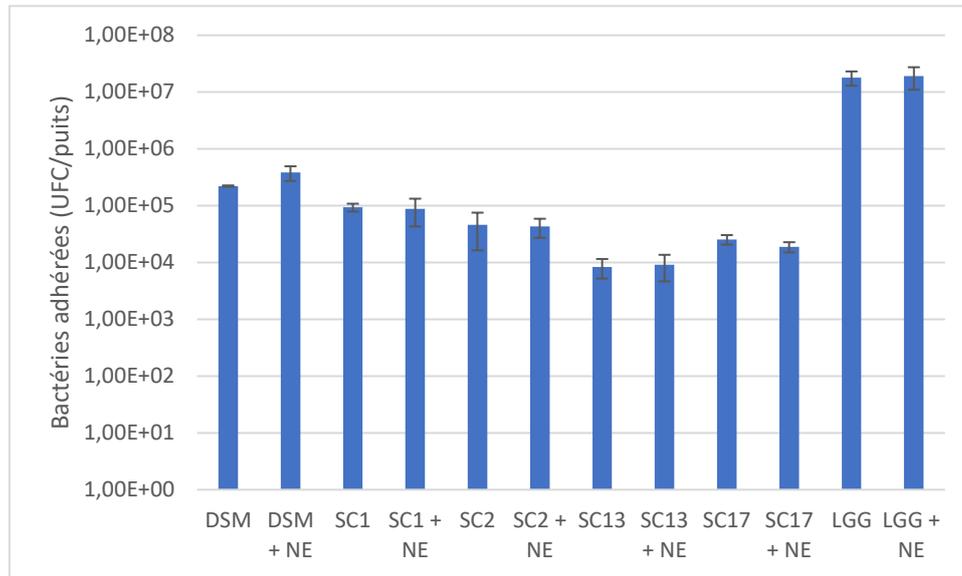


Figure 21 - Adhésion sur cellules CaCo-2 différenciées des souches de *P. distasonis* cultivées en présence ou absence de 100  $\mu$ M de noradrénaline (NE).  
(Mann-Whitney  $p = 0.05$ )

Les tests statistiques réalisés pour comparer les souches cultivées avec et sans noradrénaline révèlent qu'il n'existe aucune différence significative entre les deux conditions. Le développement de *P. distasonis* en présence d'une concentration physiologique de noradrénaline n'aurait aucun effet sur l'adhésion spécifique de l'espèce sur cellules intestinales.

La capacité d'adhésion de *P. distasonis* est donc variable entre les souches. De plus, cette capacité d'adhésion spécifique est différente de la capacité d'adhésion sur support inerte. Cette variabilité traduit des différences au sein de l'espèce dans la capacité à coloniser un milieu, tout du moins pour les étapes d'adhésion primaire.

## Discussion

*P. distasonis* est une espèce bactérienne qui fait partie du *core microbiome* du tractus digestif de l'Homme et qui présente de nombreuses propriétés bénéfiques pour son hôte, à la fois sur le plan métabolique et immunitaire (Xu et al., 2007; Cekanaviciute et al., 2017). Cette forte prévalence suggère un maintien durable de ce taxon dans cet environnement complexe. Le mécanisme principal de colonisation d'un milieu par une bactérie est la formation d'une communauté bactérienne sous forme de biofilms (Costerton, 1999). Le passage à ce mode de vie est dépendant des capacités d'interaction de la bactérie avec son substrat, influencées par ses propriétés de surface et de sa compatibilité avec son substrat, nécessaire à l'adhésion. Peu d'informations sont disponibles quant aux propriétés d'adhésion de *P. distasonis*. Or les rôles positifs que semblent exercer cette espèce chez son hôte soulignent l'importance de comprendre les mécanismes impliqués dans son maintien dans l'environnement intestinal. Les études débutées au laboratoire SImPA en 2018 sur quatre souches de *P. distasonis* ont montré, par rapport à LGG connue pour ses propriétés d'adhésion, une capacité d'adhésion modérée, ponctuée par une variabilité entre les souches étudiées (Pottier, 2018). Notre étude s'est élargie à quatorze souches représentant des clones distincts, permettant ainsi d'obtenir des résultats représentatifs de la diversité de l'espèce. Chacune des étapes de colonisation du milieu a été étudiée, de la rencontre de la bactérie avec son substrat jusqu'à la mise en place du biofilm.

Avant de pouvoir interagir avec un support, les bactéries doivent rentrer en contact avec celui-ci et donc se déposer. Le coefficient d'auto-agrégation est une estimation de la capacité d'une bactérie à former des micro-colonies avec d'autres bactéries de la même espèce dans un environnement donné. Plus des microorganismes s'agrègent, plus ils sédimentent et donc se déposent sur un support (Pérez *et al.*, 1998). Les résultats de l'étude sur les différentes souches de *P. distasonis* montrent un potentiel d'auto-agrégation modéré au sein de l'espèce, ce qui signifie que chacune des souches possède la capacité de se déposer sur un support par sédimentation, ce qui en fait toutes de potentielles bactéries capables d'adhérer à un substrat. Malgré des coefficients modérés, certaines valeurs sont notables notamment pour la souche SC12 dont la capacité à auto-agrégation est la plus faible et la seule inférieure à 10%, ou encore SC20, qui est la seule souche dont le coefficient dépasse les 30%. Ces variations inter-souches peuvent s'expliquer par des différences au niveau des propriétés de surface. Ces propriétés de surface étant impliquées dans les phénomènes d'auto-agrégation, certaines études ont montré une corrélation entre les propriétés d'auto-agrégation et la capacité

à adhérer à un support pour *Bifidobacterium suis* (Del Re *et al.*, 1998, 2000). L'étude réalisée en 2018 sur *P. distasonis* a montré des différences significatives au niveau des coefficients d'auto-agrégation selon la force ionique du milieu où se trouve la bactérie. En effet, plus la force ionique augmente, plus les charges de surface sont écrantées et moins les bactéries sont capables d'interagir ensemble (Pottier, 2018).

L'étude des propriétés de surface révèle pour l'ensemble des souches un profil de mobilité électrophorétique typique des bactéries. Dans sa globalité, *P. distasonis* est plus électronégative que LGG. Ceci est cohérent avec une étude de la mobilité électrophorétique déjà réalisée sur LGG, où ce dernier présentait une faible électronégativité à pH neutre. Il a été démontré par cette même étude que cette faible électronégativité était due à la présence d'une couche perméable d'exopolysaccharides (Burgain *et al.*, 2015), montrant l'importance des structures présentes en surface des bactéries dans la détermination de leurs propriétés de surface. Ces propriétés ont été déterminées durant ce stage pour les souches présentant une capacité d'adhésion particulière sur support biotique ou abiotique.

Les souches testées ont toutes montré une capacité à adhérer à un support de type abiotique ou biotique, ce qui montre que chaque souche possède des propriétés de surface leur permettant d'interagir de façon plus ou moins spécifique avec leur substrat. En ce qui concerne l'adhésion sur support inerte, six groupes statistiques se dégagent, ce qui révèle une certaine variabilité au sein de l'espèce *P. distasonis*. La souche SC1 est la souche présentant la meilleure capacité d'adhésion, étant équivalente à celle de LGG, témoin positif d'adhésion. A l'inverse SC12 est la souche possédant le niveau d'adhésion le plus faible. Celle-ci présentait le taux d'auto-agrégation le plus faible parmi les souches étudiées, ce qui est cohérent avec l'hypothèse émise par Del Re *et al.* En revanche, la souche la plus adhérente présente un faible taux d'auto-agrégation, et la souche SC20 possédant le meilleur coefficient parmi les souches de *P. distasonis* ne montre qu'une capacité d'adhésion modérée.

Lorsque nous comparons ces résultats avec ceux obtenus pour l'adhésion sur cellules intestinales, une variabilité similaire se dessine, avec deux souches présentant un fort taux d'adhésion (SC5 et SC8) et une souche se démarquant avec une adhésion bien plus faible que les autres singletons (SC7). Cette variabilité intra-souche avait déjà été observée lors de tests d'adhésion de différentes souches de *P. distasonis* extraites de fèces de personnes saines ou malades sur des cellules épithéliales laryngées (Nakano *et al.*, 2008), ce qui confirme l'importante diversité présente au sein de cette espèce. Comme pour l'adhésion sur support abiotique, la capacité d'adhésion des souches ne semble pas correspondre à la faculté d'auto-

agrégation préalablement évaluée. De plus, il est intéressant de noter que les souches ayant le meilleur pouvoir d'adhésion sur support inerte ne sont pas celles qui possèdent le meilleur taux d'adhésion sur cellules intestinales, et inversement. Il ne semble donc pas y avoir de corrélation entre les différents paramètres évalués. Des tests statistiques de corrélation, comme une corrélation de Spearman ou une analyse en composante principale pourront être effectués afin de confirmer ou d'infirmer l'indépendance des paramètres précédemment évalués. Cette absence de corrélation peut traduire des mécanismes différents entrant en jeu non seulement en fonction du type de substrat abordé par les bactéries, mais aussi selon les propriétés physiologiques des bactéries. L'adhésion sur support abiotique est en effet fonction des propriétés physico-chimiques du support et de celles de l'interphase bactérienne, mais les interactions des bactéries avec un tissu vivant sont bien plus spécifiques et complexes. L'adhésion bactérienne sur support biotique repose en effet sur la reconnaissance de sites spécifiques des cellules via des récepteurs présents sur la surface bactérienne (Polak-Berecka *et al.*, 2014). C'est le cas chez LGG, dont l'implantation au niveau de l'intestin repose sur la présence de protéines de surface et d'acides gras spécifiques. Il s'agit d'un des critères de sélection de futures souches probiotiques (Tuomola et Salminen, 1998). Les souches de *P. distasonis* présentant des capacités d'adhésion spéciales pourraient se distinguer, par rapport aux souches modérément adhérentes, au niveau de ces récepteurs spécifiques, ce qui implique des propriétés de surface différentes.

Les souches les plus adhérentes et les moins adhérentes présentent en effet des propriétés différentes qui pourraient expliquer leur capacité singulière à coloniser un milieu biotique ou abiotique. Premièrement, ces souches présentent toutes une densité de charge et une perméabilité plus importantes que LGG, qui est une bactérie très peu chargée. Les valeurs obtenues pour ces paramètres sont plutôt faibles pour des bactéries à Gram négatif, malgré une grande diversité de charge ou de perméabilité pour ce type de bactéries (Duval et Gaboriaud, 2010). Les profils de mobilité présentent un plateau peu marqué et n'atteignent pas la neutralité, ce qui montre la perméabilité de la bactérie envers le flux d'ions et la présence d'une couche chargée à la surface de la bactérie. Ceci serait dû à la présence d'une couche « molle » entourant la bactérie, comme une capsule ou des LPS, dont la présence a déjà été démontrée chez *P. distasonis* (Fletcher *et al.*, 2007; Nakano *et al.*, 2008). Ce serait la présence de ces structures qui donnerait une charge plus importante à *P. distasonis* qu'à LGG. Ceci expliquerait également l'adhésion plus faible de *P. distasonis* sur cellules intestinales. En effet, la présence d'une capsule masquerait les récepteurs spécifiques de *P. distasonis* envers

les cellules intestinales voire inhiberait la production de fimbriae, comme cela a déjà pu être démontré pour des bactéries à Gram négatif possédant une capsule comme *Klebsiella pneumoniae* (Schembri *et al.*, 2004). En revanche, les souches de *P. distasonis* testées possèdent des propriétés de surface très similaires malgré un pouvoir d'adhésion différent. Ceci suggère que ces variations ne sont pas dues à des structures de surface différentes, mais plutôt à des différences au niveau de la reconnaissance du récepteur cellulaire, la corrélation entre auto-agrégation et adhésion ne semblant pas effective pour *P. distasonis*. Les résultats obtenus traduisent donc une certaine variabilité de colonisation d'un milieu, au niveau moléculaire, au sein de cette espèce. Dans le cas où une utilisation de *P. distasonis* en tant que probiotique serait envisagée, cette variabilité inter-souche devra être prise en compte afin d'administrer seulement des souches capables de se maintenir dans l'intestin.

En revanche, l'organisation des bactéries adhérees sur le support varie très peu d'une souche à l'autre. Après 48 h de contact avec le support, chaque souche présente le même profil organisationnel sur le support, à savoir une monocouche de bactéries individualisées, sans organisation spécifique. Ceci suppose que l'adhésion des bactéries au support relève d'un caractère aléatoire, favorisé ou non par les forces exercées par le milieu sur les bactéries. Ceci est cohérent avec le fait que *P. distasonis* est une bactérie non mobile (Sakamoto et Benno, 2006). Au bout de 8 jours, les bactéries commencent seulement à s'organiser en micro-colonies et une faible quantité de matrice extracellulaire est synthétisée autour de ces micro-colonies. Une seule exception est observée pour la souche SC7 qui forme dès 8 jours un véritable biofilm. Bien que présentant une capacité d'adhésion sur support inerte modérée, cette souche était cependant la moins adhérente sur cellules intestinales. La capacité d'adhésion et la capacité de formation de biofilms sont donc deux paramètres distincts, mais complémentaires. En effet, l'adhésion est un processus indispensable à la formation de biofilm. Mais une faible capacité d'adhésion n'influe en rien la capacité de la bactérie à former un biofilm, une fois l'adhésion réalisée.

Cette étude a permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur les propriétés d'adhésion de *P. distasonis* et d'émettre des hypothèses sur les facteurs mis en jeu lors de ce processus, notamment sur le rôle des structures de l'interphase bactérienne impliquées dans les interactions physico-chimiques avec le support, mais également dans les interactions spécifiques de la bactérie avec les cellules intestinales. Ces propriétés permettent de supposer la manière dont va s'implanter *P. distasonis* dans le tractus intestinal de l'Homme, via des interactions aspécifiques dues à la charge des bactéries et à des interactions spécifiques via

des récepteurs sans doute localisés sur ses pili, interactions cependant possiblement inhibées par la capsule entourant la bactérie. Cependant, comme démontré par les travaux du laboratoire SImPA, cette implantation dans le MI va être significativement impactée lors de stress socio-environnementaux ou hypergravitaires. Une des principales réponses au stress de l'hôte est la libération de catécholamines dans le sang et la lumière intestinale, dont l'effet sur l'adhésion bactérienne a plusieurs fois été démontrée, principalement pour la noradrénaline (Vlisidou *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Diard *et al.*, 2009; Gonzales *et al.*, 2013). Dans le cas de *P. distasonis*, plusieurs souches ont été cultivées en présence de noradrénaline à concentration physiologique de l'intestin. Les résultats n'ont montré aucun impact de cette catécholamine sur l'adhésion des souches aux cellules intestinales. La concentration utilisée étant celle de l'intestin (Boyanova, 2017), ceci nous laisse penser que la noradrénaline n'a pas de rôle dans l'implantation de *P. distasonis* au sein du MI. Des tests d'adhésion avec présence de noradrénaline à différentes concentrations, pendant la culture de *P. distasonis* ou au moment de l'incubation des bactéries avec les cellules pourront être effectués afin de déterminer si cette catécholamine a un effet sur l'adhésion à un niveau basal ou si son impact n'est effectif que pour des concentrations similaires à celles rencontrées lors de stress de l'hôte.

### **Perspectives**

Les hypothèses formulées grâce à cette étude à propos des mécanismes d'adhésion pourront être vérifiées par une étude plus approfondie de l'ultrastructure de la surface de *P. distasonis*. Une meilleure connaissance de ces structures permettra ensuite d'étudier leur impact sur les processus d'adhésion, par la création de mutants de délétion pour ces structures par exemple. Connaître les mécanismes d'adhésion permettra d'avoir une meilleure idée de comment ce taxon se maintient au niveau de l'épithélium intestinal. Cependant, ces mécanismes ne sont pas uniquement dépendant de la bactérie mais également du support et de son environnement. Afin de se rapprocher au maximum des conditions réelles de l'intestin humain, des tests d'adhésion sur cellules HT29-MTX, cellules intestinales sécrétrices de mucus, pourront être effectués. Le mucus intestinal joue en effet un rôle crucial dans les processus d'adhésion des bactéries dans le MI, particulièrement pour la persistance des taxons de l'ordre des *Bacteroidales*, dont la complémentarité entre les espèces au niveau nutritionnel explique également leur maintien au sein du MI (Goyal *et al.*, 2018). Enfin, le tractus intestinal étant continuellement parcouru par un flux exercé sur le bol alimentaire via la motilité intestinale, il serait intéressant d'étudier la formation et le maintien de biofilms de *P.*

*distasonis* dans un système *in vitro* mimant la motilité intestinale pour se rapprocher des conditions physiologiques. La caractérisation, dans sa totalité, du maintien de *P. distasonis* dans le MI pourrait permettre de sélectionner, au sein de cette espèce aux multiples rôles bénéfiques pour l'Homme, quelles seraient les souches potentiellement utilisables en tant que probiotiques ou dans des consortium bactériens permettant des approches de type transplantation fécale, comme cela est recommandé actuellement dans le traitement des colites à *Clostridium difficile* réfractaires aux traitements de première ligne (Petrof *et al.*, 2013).

## Bibliographie

- Adak, A., and Khan, M.R. (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences* 76, 473–493.
- Almeida, M. (2013). Caractérisation de flores microbiennes intestinale humaine et fromagère par méthode de métagénomique quantitative. Thèse de doctorat de l'Université Paris Sud XI Orsay.
- Beveridge, T.J., and Graham, L.L. (1991). Surface Layers of Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 55, 684–705.
- Boente, R.F., Ferreira, L.Q., Falcão, L.S., Miranda, K.R., Guimarães, P.L.S., Santos-Filho, J., Vieira, J.M.B.D., Barroso, D.E., Emond, J.-P., Ferreira, E.O., et al. (2010). Detection of resistance genes and susceptibility patterns in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains. *Anaerobe* 16, 190–194.
- Boyanova, L. (2017). Stress hormone epinephrine (adrenaline) and norepinephrine (noradrenaline) effects on the anaerobic bacteria. *Anaerobe* 44, 13–19.
- Burgain, J., Scher, J., Lebeer, S., Vanderleyden, J., Corgneau, M., Guerin, J., Caillet, C., Duval, J.-F.L., Francius, G., and Gaiani, C. (2015). Impacts of pH-mediated EPS structure on probiotic bacterial pili–whey proteins interactions. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 134, 332–338.
- Cekanaviciute, E., Yoo, B.B., Runia, T.F., Debelius, J.W., Singh, S., Nelson, C.A., Kanner, R., Bencosme, Y., Lee, Y.K., Hauser, S.L., et al. (2017). Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 10713–10718.
- Chen, C., Lyte, M., Stevens, M.P., Vulchanova, L., and Brown, D.R. (2006). Mucosally-directed adrenergic nerves and sympathomimetic drugs enhance non-intimate adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to porcine cecum and colon. *European Journal of Pharmacology* 539, 116–124.
- Costerton, J. (1999). Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents* 11, 217–221.
- Del Re, B., Busetto, A., Vignola, G., Sgorbati, B., and Palenzona, D.L. (1998). Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain. *Letters in Applied Microbiology* 27, 307–310.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., and Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology* 31, 438–442.
- Dhahri, S. (2013). Analyse topographique, mécanique et électrochimique à l'échelle sub-micrométrique de processus pilotes par les bactéries : Utilisation combinée de techniques de microscopie à sonde locale AFM - Microscopie à force atomique - et SECM - Microscopie électrochimique. Thèse de doctorat de l'Université de Montpellier.

Diard, S., Liévin-Le Moal, V., Toribio, A.L., Boum, Y., Vigier, F., Servin, A.L., and Bouvet, O. (2009). Norepinephrine-dependently released Dr fimbriae of diffusely adhering *Escherichia coli* strain IH11128 promotes a mitogen-activated protein kinase ERK1/2-dependent production of pro-inflammatory cytokine, IL-8 in human intestinal Caco-2/TC7 cells. *Microbes and Infection* 11, 886–894.

Dione, N., Ngom, I.I., Valles, C., Cadoret, F., Fournier, P.E., Raoult, D., and Lagier, J.C. (2018). ‘*Collinsella provencensis*’ sp. nov., ‘*Parabacteroides bouchedurhonensis*’ sp. nov. and ‘*Sutterella seckii*’ sp. nov., three new bacterial species identified from human gut microbiota. *New Microbes and New Infections* 23, 44–47.

Duval, J.-F.L., and Gaboriaud, F. (2010). Progress in electrohydrodynamics of soft microbial particle interphases. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 15, 184–195.

Eggerth, A.H., and Gagnon, B.H. (1933). The *Bacteroides* of human feces. *Journal of Bacteriology* 4, 389–413.

Fletcher, C.M., Coyne, M.J., Bentley, D.L., Villa, O.F., and Comstock, L.E. (2007). Phase-variable expression of a family of glycoproteins imparts a dynamic surface to a symbiont in its human intestinal ecosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 2413–2418.

Francius, G. (2018). Caractérisation physico-chimique des surfaces microbiennes. Cours magistral de Master 2 Microbiologie (Nancy).

Gonzales, X.F., Castillo-Rojas, G., Castillo-Rodal, A.I., Tuomanen, E., and Lopez-Vidal, Y. (2013). Catecholamine norepinephrine diminishes lung epithelial cell adhesion of *Streptococcus pneumoniae* by binding iron. *Microbiology* 159, 2333–2341.

Goyal, A., Dubinkina, V., and Maslov, S. (2018). Multiple stable states in microbial communities explained by the stable marriage problem. *BioRxiv*.

Grare, M., Dague, E., Mourer, M., Regnouf-de-Vains, J.-B., Finance, C., Duval, J.-F.L., Duval, R.-E., and Gaboriaud, F. (2007). Microélectrophorèse et microscopie à force atomique: deux nouveaux outils d'évaluation de l'effet pariétal d'antibactériens. *Pathologie Biologie* 55, 465–471.

Guerin, J., Soligot, C., Burgain, J., Huguet, M., Francius, G., El-Kirat-Chatel, S., Gomand, F., Lebeer, S., Le Roux, Y., Borges, F., et al. (2018). Adhesive interactions between milk fat globule membrane and *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibit bacterial attachment to Caco-2 TC7 intestinal cell. *Colloids Surf B Biointerfaces* 167, 44–53.

Jorand, F. (2018). Introduction." Biofilm et" adhésion des microorganismes : une stratégie du vivant ? Cours magistral de Master 2 Microbiologie (Nancy).

Koh, G.Y., Kane, A., Lee, K., Xu, Q., Wu, X., Roper, J., Mason, J.B., and Crott, J.W. (2018). *Parabacteroides distasonis* attenuates toll-like receptor 4 signaling and Akt activation and blocks colon tumor formation in high-fat diet-fed azoxymethane-treated mice: *Parabacteroides distasonis* and colon tumorigenesis. *International Journal of Cancer* 143, 1797–1805.

- Kverka, M., Zakostelska, Z., Klimesova, K., Sokol, D., Hudcovic, T., Hrncir, T., Rossmann, P., Mrazek, J., Kopecny, J., Verdu, E.F., et al. (2011). Oral administration of *Parabacteroides distasonis* antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition. *Clinical & Experimental Immunology* 163, 250–259.
- Merode, A.E.J. van, Mei, H.C. van der, Busscher, H.J., and Krom, B.P. (2006). Influence of Culture Heterogeneity in Cell Surface Charge on Adhesion and Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* 188, 2421–2426.
- Nakano, V., Ignacio, A., Fernandes, M.R., Fukugaiti, M.H., and Avila-Campos, M.J. (2006). Intestinal *Bacteroides* and *Parabacteroides* species producing antagonistic substances. *Current Trends in Microbiology* 1–4.
- Nakano, V., Piazza, R.M.F., Cianciarullo, A.M., Bueris, V., Santos, M.F., Menezes, M.A., Mendes-Ledesma, M.R.B., Szulczewski, V., Elias, W.P., Pumbwe, L., et al. (2008). Adherence and invasion of *Bacteroidales* isolated from the human intestinal tract. *Clinical Microbiology and Infection* 14, 955–963.
- Ohshima, H., and Kondo, T. (1991). On the electrophoretic mobility of biological cells. *Biophysical Chemistry* 39, 191–198.
- Pérez, P.F.P., Minnaard, Y., Disalvo, E.A., and Antoni, G.L.D. (1998). Surface Properties of Bifidobacterial Strains of Human Origin. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 21–26.
- Petrof, E.O., Gloor, G.B., Vanner, S.J., Weese, S.J., Carter, D., Daigneault, M.C., Brown, E.M., Schroeter, K., and Allen-Vercoe, E. (2013). Stool substitute transplant therapy for the eradication of *Clostridium difficile* infection: ‘RePOOPulating’ the gut. *Microbiome* 1, 1–12.
- Polak-Berecka, M., Waśko, A., Paduch, R., Skrzypek, T., and Sroka-Bartnicka, A. (2014). The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 106, 751–762.
- Pottier, V. (2018). Propriétés bactériologiques de *Parabacteroides distasonis*. Rapport de Master 2 de l’Université de Lorraine.
- Sakamoto, M., and Benno, Y. (2006). Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology* 56, 1599–1605.
- Sato, K., Naito, M., Yukitake, H., Hirakawa, H., Shoji, M., McBride, M.J., Rhodes, R.G., and Nakayama, K. (2010). A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 276–281.
- Schembri, M., Blom, J., Krogfelt, K., and Klemm, P. (2004). Sci-Hub | Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity* 73, 4626–4633.
- Tasse, J., Cara, A., Saglio, M., Villet, R., and Laurent, F. (2018). A steam-based method to investigate biofilm. *Scientific Reports* 8.

Tuomola, E.M., and Salminen, S.J. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology* 41, 45–51.

Vlisidou, I., Lyte, M., van Diemen, P.M., Hawes, P., Monaghan, P., Wallis, T.S., and Stevens, M.P. (2004). The Neuroendocrine Stress Hormone Norepinephrine Augments *Escherichia coli* O157:H7-Induced Enteritis and Adherence in a Bovine Ligated Ileal Loop Model of Infection. *Infection and Immunity* 72, 5446–5451.

Wang, K., Liao, M., Zhou, N., Bao, L., Ma, K., Zheng, Z., Wang, Y., Liu, C., Wang, W., Wang, J., et al. (2019). *Parabacteroides distasonis* Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids. *Cell Reports* 26, 222–235.

Xu, J., Mahowald, M.A., Ley, R.E., Lozupone, C.A., Hamady, M., Martens, E.C., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Minx, P., Latreille, P., et al. (2007). Evolution of Symbiotic Bacteria in the Distal Human Intestine. *PLoS Biology* 5, 1574–1586.

Xu, Q., Shoji, M., Shibata, S., Naito, M., Sato, K., Elsliger, M.-A., Grant, J.C., Axelrod, H.L., Chiu, H.-J., Farr, C.L., et al. (2016). A Distinct Type of Pilus from the Human Microbiome. *Cell* 165, 690–703.

Zitomersky, N.L., Atkinson, B.J., Franklin, S.W., Mitchell, P.D., Snapper, S.B., Comstock, L.E., and Bousvaros, A. (2013). Characterization of Adherent Bacteroidales from Intestinal Biopsies of Children and Young Adults with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE* 8, 1–11.

(2009). *Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press).

(2015). *Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press).

### **Webographie**

Morice, <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.1.2.5.html> date de consultation : 9 mai 2019

NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1272> date de consultation : 9 mai 2019

## **Annexes**

### **Annexe 1 – Composition des milieux de culture**

Tous les milieux sont préparés à partir de poudres prêtes à l'emploi et d'eau distillée, pour un volume final de 500 mL, dans des bouteilles en verre de 1 L. Les milieux sont ensuite stérilisés à l'autoclave (121°C, 15 minutes) et stockés en chambre froide à -4°C.

Le milieu Brucella agar (BBA) (43 g/L) est composé de digestion pancréatique de caséine (10 g), de digestion peptique de tissu animal (10 g), de dextrose (4 g), d'extrait de levure (2 g), de chlorure de sodium (5 g), de bisulfite de sodium (0.1 g) et d'agar (15 g). Après autoclavage, le milieu est mis à refroidir jusqu'à une température de 45°C, avant d'ajouter du sang de mouton défibriné (50 mL), de l'hémine (10 mL) et de la vitamine K1 (0,5 g/L) (10 mL). Le milieu complétement est coulé en boîtes de Petri (13 mL/boîte).

Le milieu Brucella liquide (28 g/L) est composé de digestion pancréatique de caséine (10 g), de digestion peptique de tissu animal (10 g), de dextrose (1 g), d'extrait de levure (2 g), de chlorure de sodium (5 g) et de bisulfite de sodium (0,1 g). Le milieu est distribué à raison de 10 mL par tube.

Le milieu MRS agar (62 g/L) est composé de peptone (10 g), d'extrait de viande (8 g), d'extrait de levure (4 g), de glucose (20 g), d'acétate de sodium trihydraté (5 g), de citrate d'ammonium (2 g), de polysorbate 80 (1 g), d'hydrogénophosphate de potassium (2 g), de sulfate de magnésium heptahydraté (0.2 g), de sulfate de manganèse tétrahydraté (0.05 g) et d'agar (10 g). Après autoclavage, le milieu est mis à refroidir jusqu'à une température de 45°C et est coulé en boîtes de Petri (13 mL/boîte).

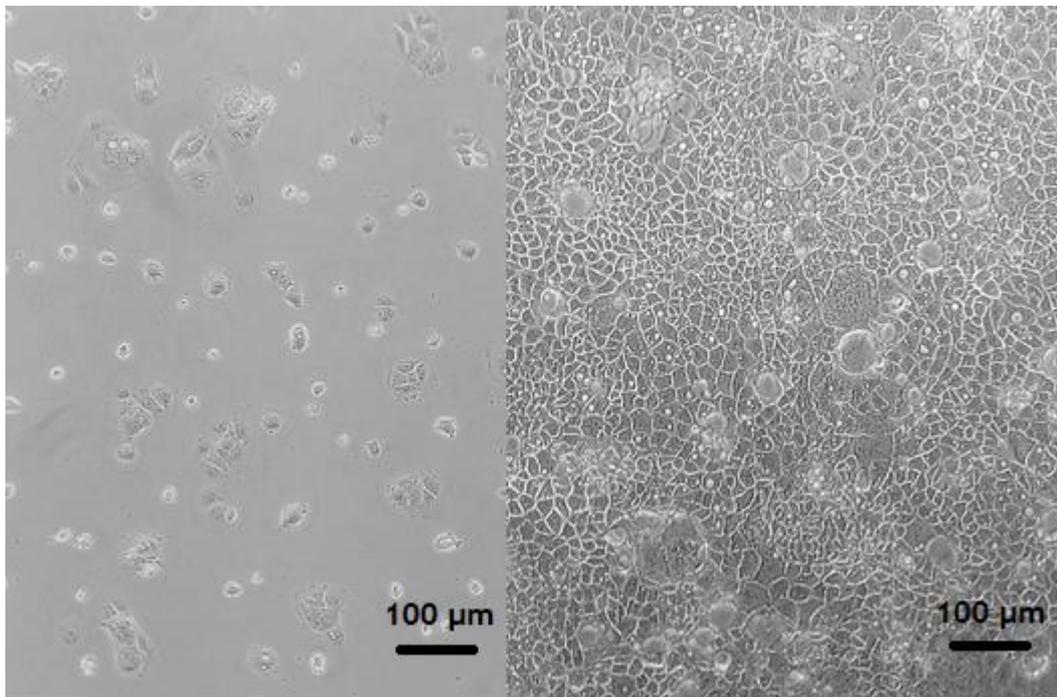
Le milieu MRS liquide (55 g/L) est composé de peptone (10 g), d'extrait de viande (8 g), d'extrait de levure (4 g), de glucose (20 g), d'acétate de sodium trihydraté (5 g), de citrate d'ammonium (2 g), de polysorbate 80 (1 g), d'hydrogénophosphate de potassium (2 g), de sulfate de magnésium heptahydraté (0.2 g) et de sulfate de manganèse tétrahydraté (0.05 g).

Le milieu MH liquide (21 g/L) est composé d'extrait de bœuf (21 g), d'hydrolysate acide de caséine (17,5 g) et d'amidon (1,5 g).

## Annexe 2 – Utilisation du logiciel Zetaphotometer IV

- Mettre l'échantillon à analyser en agitation puis mesurer le pH
- Ouvrir les deux robinets de chaque côté de la chambre et aspirer à la sortie de la chambre 20 mL à l'aide d'une seringue, puis refermer les robinets de la chambre
- Refermer le robinet de la seringue
- Faire la mesure de mobilité avec le logiciel ZetaCompact 5 (calibration par le LIEC) :
  - o Measurement → Single → Petite fenêtre AVIFilename → Nommer « pDist-NaNO<sub>3</sub>-1mM-1/2/3 » → OK
  - o Fenêtre Zetaphotometer-Video capture → Capture → Attendre la mesure
  - o Fenêtre Video analyse → Start analysis → Visualiser la séquence 1 et la séquence 2 → Show spectrum → Validate
  - o Fenêtre Save in Database → Remettre le même nom qu'à la fenêtre Zeta → Appliquer le filtre (si nécessaire) → Clic droit → Mobility/Zeta Filter → Show Filter (se placer entre les 2 flèches) → Mobility Zeta Filter → Apply Filter
  - o Noter les résultats sur le tableau de résultats
  - o Fermer la fenêtre [x] du bas (pas celle du logiciel)
  - o « The graph parameters.... Do you want to save ? » No

## Annexe 3 – Cellules CaCo-2 ATCC HTB37 (Perquin, 2018)



#### Annexe 4 – Décongélation des cellules CaCo-2 et ensemencement des flasques

- Décongélation au dernier glaçon sous agitation légère dans bain marie à 37°C
- Ajouter 1mL de milieu DMEM complet
- Transférer la totalité du cryotube dans le Falcon contenant les 10 mL de milieu DMEM complet.
- Centrifugation 5 min à 200g
- Ensemencement de la flask
  - o Jeter le surnageant
  - o Reprendre le culot dans 4,1 mL du milieu DMEM
  - o Flusher 8 à 10 fois o Ajouter 2 mL de suspension cellulaire dans la flask T 75
  - o Regarder au microscope (X10) : aspect des cellules doivent être rondes
  - o Incuber à l'étuve à 5% CO<sub>2</sub> à 37°C

#### Annexe 5 – Trypsination des cellules CaCo-2 et renouvellement du milieu

Flacons T75	Procédure	Flacons T25
Préchauffer les solutions nécessaires 15 minutes à 37°C (Maximum 30 minutes) (DMEM + 10% SVF + 1 % ABQ ; PBS ; Trypsine)		
Observation macroscopique (couleur et limpidité du milieu : OK si rouge/orange) Observation microscopique des cellules		
Retirer l'ancien DMEM (pipetage ou transvasement)		
Volume PBS = 6 mL	Rinçage de la culture avec D-PBS	Volume PBS = 2 mL
Verser sur les cellules avec la pipette Agiter doucement le flacon à plat Retirer le D-PBS (pipetage ou transvasement)		
Volume trypsine = 3 mL	Ajouter la trypsine 025 %	Volume trypsine l = 1 mL
Incuber à 37°C et vérifier que les cellules se décollent (maximum 10 minutes de contact avec la trypsine) Tapoter le flacon dans la paume de la main		
Volume DMEM = 6-9 mL	Ajouter DMEM pour arrêter la trypsination (2 à 3 x le vol de trypsine)	Volume DMEM = 2-3 mL
Flusher pour dissocier les cellules		
Mettre la totalité du DMEM avec les cellules dans un Falcon Centrifuger à 800 tours/min pendant 5 minutes		
Culot = cellules Eliminer le surnageant à la pipette		
Volume DMEM = 6-10 mL	Reprendre le culot avec le DMEM en flushant	Volume DMEM = 3-4 mL
Volume DMEM = 18 mL + Volume cellules = 2 mL	Ensemencer les nouveaux flacons	Volume DMEM = 9 mL + Volume cellules = 1 mL
Mettre à étuve 37°C avec 5 % CO <sub>2</sub>		

Flacons T75	Procédure	Flacons T25
Préchauffer le milieu 15 minutes à 37°C (Maximum 30 minutes) (DMEM + 10% SVF + 1 % ABQ)		
Observation macroscopique (couleur et limpidité du milieu : OK si rouge/orange) Observation microscopique des cellules		
Retirer l'ancien DMEM (pipetage ou transvasement)		
Volume DMEM = 15-20 mL	Ajouter le DMEM	Volume DMEM = 7-8 mL
Mettre à étuve 37°C avec 5 % CO2		

#### Annexe 6 – Comptage de CaCo-2 sur cellules de Kova

- Diluer 30µL de la suspension cellulaire au demi avec du bleu trypan 0,4 %
- Homogénéiser par aspiration/refoulement
- Ajouter 15 µL de la solution dans une cellule de Kova
- Dénombrer au microscope. Les cellules mortes sont colorées en bleu

#### Annexe 7 – Extraction d'ADN par le kit QiaAmp® DNA MiniKit (Qiagen)

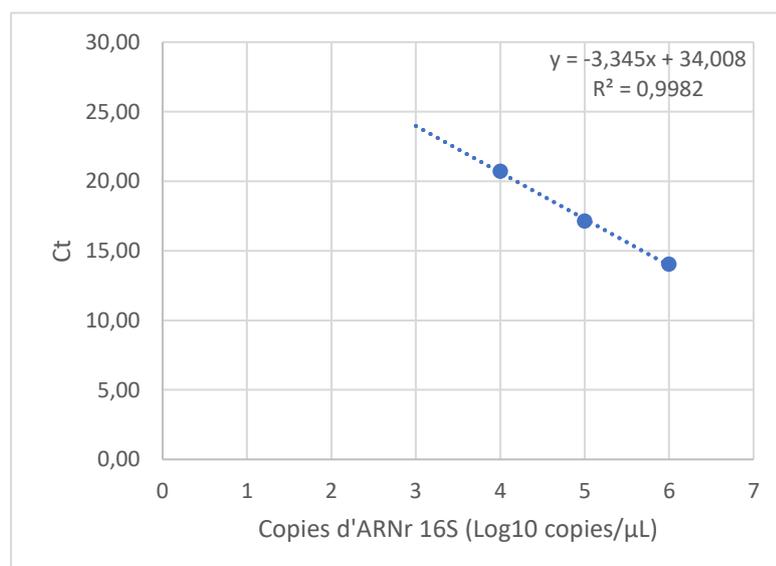
- Centrifuger l'échantillon 15 minutes à 13000 tour.min<sup>-1</sup>
- Eliminer le surnageant à la micropipette
- Homogénéiser dans 180 µl de tampon ATL dans un Eppendorf 2mL.
- Ajouter 20 µl de Protéinase K → vortexer 15 sec et incubé 60 minutes à 56°C (vortexer toutes les 15 minutes).
- Centrifuger brièvement à 3000 t.min<sup>-1</sup>
- Ajouter 200 µl de tampon AL → vortexer 15 sec et incubé 10 minutes à 70°C.
- Centrifuger brièvement à 3000 t.min<sup>-1</sup>
- Ajouter 200 µl d'éthanol → vortexer 15 secondes.
- Centrifuger brièvement à 3000 t.min<sup>-1</sup>
- Déposer la solution (et le précipité s'il existe) au centre de la colonne dans un nouveau tube.
- Centrifuger brièvement à 8000 t.min<sup>-1</sup> pendant une minute puis placer la colonne dans un nouveau tube.
- Ajouter 500 µl de tampon AW1 → centrifuger à 8000 t.min<sup>-1</sup> pendant 1 minute puis placer la colonne dans un nouveau tube.
- Ajouter 500 µl de tampon AW2 → centrifuger à 14000 t.min<sup>-1</sup> pendant 3 minutes puis placer la colonne dans un nouveau tube.

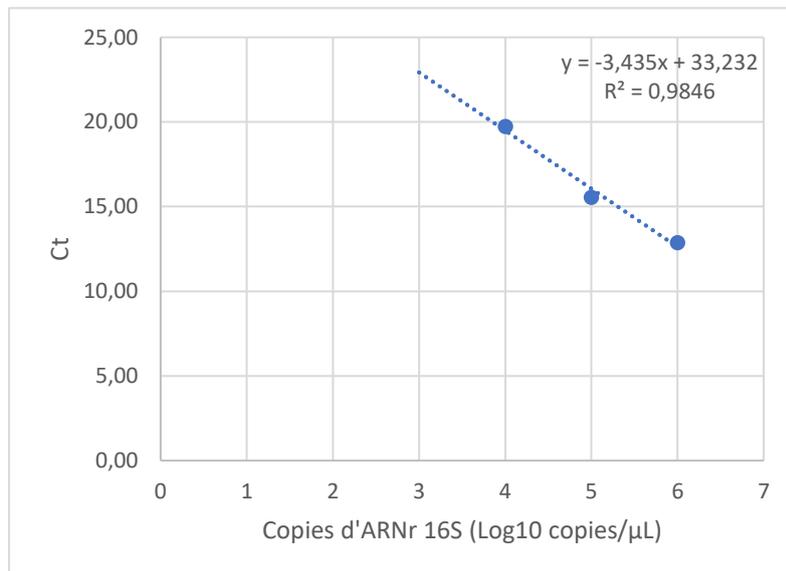
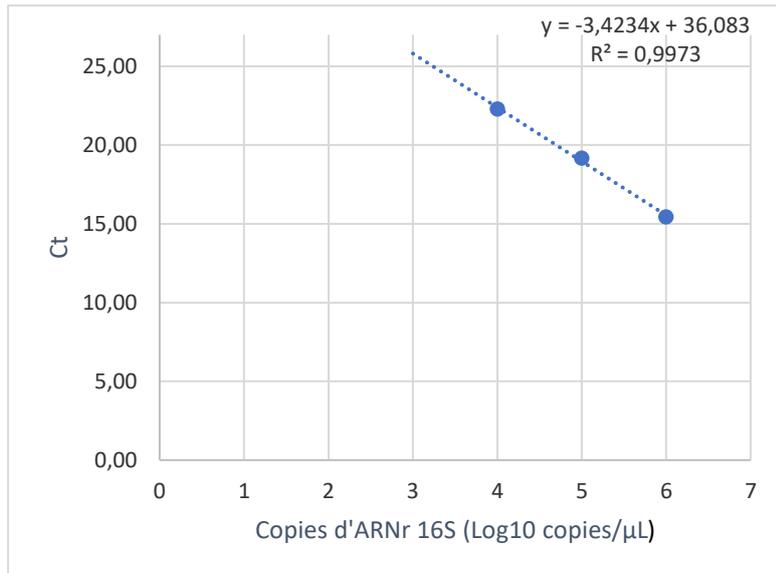
- Centrifuger à 14000 t.min<sup>-1</sup> pendant 1 minute puis placer la colonne dans un nouveau tube (Eppendorf 2 mL).
- Ajouter 200 µl de tampon AE et incuber 5 minutes a température ambiante puis centrifuger à 8000 t.min<sup>-1</sup> pendant 1 minute.
- Récupérer l'éluat = ADN.
- Conserver l'ADN et la souche à -80°C.

### Annexe 8 – Dosage de l'ADN au NanoDrop

- Déposer 2 µL de tampon AL sur la cellule de mesure, la refermer et cliquer sur « Blank » pour faire le blanc
- Cliquer sur « Measure ». Le logiciel doit indiquer 0 ng/µL d'ADN
- Ouvrir la cellule de mesure et la nettoyer à l'aide d'un papier Joseph
- Déposer 2 µL d'échantillon préalablement homogénéisé
- Refermer la cellule et cliquer sur « Measure »
- Noter la concentration en ADN de l'échantillon, l'absorbance à 260 et 280 nm, le rapport 260/280 et le rapport 260/230. Le rapport 260/280 doit être compris entre 1,8 et 2 pour confirmer la pureté de l'ADN. Si le rapport est inférieur à 1,8, il s'agit d'une contamination protéique. S'il est supérieur à 2, il signifie une contamination par des ARNs.

### Annexe 9 – Gammes utilisées pour la quantification en qPCR





## Annexe 10 – Principe du modèle d’Ohshima

Le modèle d’Ohshima est une théorie de mesure des paramètres électrocinétique adaptée aux particules molles(Ohshima and Kondo, 1991). La mobilité électrophorétique des

particules ( $\mu$ ) est calculée selon l’expression 
$$\mu = \frac{\rho_o}{\eta \lambda_o^2} + \frac{\varepsilon \psi^o / \kappa_m + \psi^D / \lambda_o}{1 / \kappa_m + 1 / \lambda_o}$$

Où  $\rho_o$  représente la densité volumique de charge de surface de la bactérie,  $\kappa_m$  la longueur de Debye,  $\lambda_o$  la perméabilité de la particule,  $1 / \lambda_o$  la longueur de penetration du flux hydrodynamique à l’intérieur de la sur-structure de la surface bactérienne,  $\psi^o$  le potentiel de surface et  $\psi^D$  le potentiel de Donnan. Les paramètres  $\rho_o$  et  $\lambda_o$  sont obtenus

informatiquement par fit des courbes de mobilité électrophorétique, réalisés par le Dr. Céline Caillet.

## Résumé

*Parabacteroides distasonis* est une bactérie du microbiote intestinal dont les rôles bénéfiques pour l'hôte, au niveau métabolique et immunitaire, suggèrent son importance au niveau du *core microbiome*. Des études montrent une perte significative de ce taxon à la suite d'un stress socio-environnemental ou hypergravitaire appliqué sur son hôte. L'objectif de cette étude est de déterminer certaines propriétés de surface et d'adhésion de cette espèce, notamment sur support abiotique et sur cellules intestinales CaCo-2. Les résultats obtenus montrent un pouvoir d'adhésion modéré sur les deux types de support, avec une souche adhérant fortement sur support inerte et deux souches adhérant fortement sur cellules intestinales. Cette adhésion modérée semble être due à une perméabilité moyenne et une faible électronégativité conséquentes à la présence d'une capsule et de lipopolysaccharides à la surface de ces bactéries. Ces résultats constituent un point de départ dans l'étude des mécanismes précis de ces phénomènes, dans le but de lutter contre la perte de cette espèce au sein du microbiote intestinal.

Mots clés : *Parabacteroides distasonis*, adhésion, propriétés de surface, CaCo-2, microbiote intestinal

## Abstract

*Parabacteroides distasonis* is a bacterium of the gut microbiota whose beneficial roles for the host, at metabolic and immune level, suggest its importance in the *core microbiome*. Previous studies show a significant loss of this taxon as a result of socio-environmental or hypergravity stress applied to its host. The purpose of this study is to determine some surface and adhesion properties of this species, particularly on abiotic support and CaCo-2 intestinal cell line. Results show a moderate adhesion power on both types of support, with one strain strongly adhering on an inert support and two strains strongly adhering on gut cells. This moderate adhesion seems to be due to a moderate permeability and a low electronegativity due to the presence of a capsule and lipopolysaccharides on the surface of these bacteria. These results provide a starting point for studying the precise mechanisms of these phenomena, with the aim of preventing the loss of this species within the intestinal microbiota.

Keywords : *Parabacteroides distasonis*, adhesion, surface properties, CaCo-2, gut microbiota