

50376
1992
93

62187

50376
1992
93

N° d'ordre : 898

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

THESE

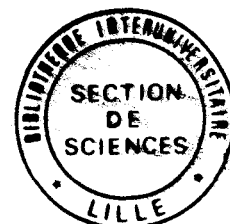
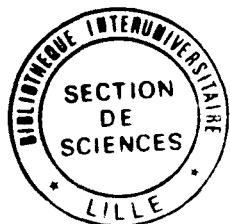
de

DOCTORAT D'UNIVERSITE

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

AMEUR Rabha



**ETUDE CINETIQUE DE LA CROISSANCE DES BACTERIES DU
GROUPE *Bacteroides fragilis*
ET COMPARAISON DE LEURS MECANISMES
DE TRANSPORT DU GLUCOSE**

Soutenue le 15 Avril 1992 devant la Commission d'examen :

Président : J.-B. GUILLAUME

Rapporteurs : J.-C. DERIEUX
D. IZARD

Examineurs : J. KREMBEL
G. PRENSIER
J.-P. HORNEZ



à ma famille, ma défunte sœur et
son regretté époux pour leur
soutien et leurs encouragements.
Avec ma sincère gratitude

Rabha

REMERCIEMENTS

- o O o -

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, sous la direction de Monsieur le Professeur J.B. GUILLAUME. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir permis, par ses conseils, de réaliser ce Mémoire et je le remercie vivement d'être Président de ce Jury.

Toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur J.C. DERIEUX pour m'avoir intégrée dans son équipe et pour être Rapporteur de cette Thèse.

Ma sincère gratitude au Docteur D. IZARD pour avoir accepté d'être Rapporteur de ce travail malgré ses nombreuses occupations.

Que les Professeurs J. KREMBEL et G. PRENSIER soient remerciés pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur J.P. HORNEZ pour la qualité de son encadrement ainsi que pour son aide et ses conseils scientifiques que j'ai beaucoup appréciés durant ces années de Thèse.

Je dois également remercier chaleureusement :

- Frédérique GANCEL pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail et son aide précieuse à la réalisation de ce manuscrit ;
- M. M. BECHET pour sa gentillesse et ses nombreux conseils ;
- Michèle DELECOURT pour l'efficacité, le soin et la qualité qu'elle a apportés à la dactylographie de ce Mémoire sans oublier sa disponibilité souriante.

Je n'oublie, certes pas, tous les membres du Laboratoire de Microbiologie, en particulier, M. C. DEFIVES, qui m'ont apporté aide et sympathie.

Je tiens enfin à exprimer ma profonde reconnaissance à toute ma famille pour son soutien financier et moral tout au long de mes études.

A B R E V I A T I O N S

AMPc	:	Adénosine 3'-5' monophosphate cyclique.
BHi	:	Bouillon coeur-cerveau.
CM	:	Milieu de Caspari et Macy (1983).
CRP	:	Protéine réceptrice de l'AMPc.
DNP	:	2,4-dinitrophénol.
D.O.	:	Densité optique.
FAD	:	Flavine adénine dinucléotide.
Fru	:	Fructose.
Gal	:	Galactose.
Glc	:	Glucose.
Lac	:	Lactose.
Mal	:	Maltose.
NAD	:	Nicotinamide adénine dinucléotide.
NADP	:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.
NEM	:	N-éthyl maléimide.
PEP	:	Phosphoénol pyruvate.
PGA	:	Acide polygalacturonique.
PTS	:	Système phosphotransférase.
TPY	:	Tryptone-peptone-extrait de levure.

T A B L E D E S M A T I E R E S

- 0 0 0 -

AVANT - PROPOS	1
I N T R O D U C T I O N	
I. - EVOLUTION DE LA TAXONOMIE DU GENRE <u>BACTEROIDES</u> ..	3
II. - ECOLOGIE ET PRESENTATION GENERALE DU GENRE <u>BACTEROIDES</u> DEFINI DANS LE MANUEL DE BERGEY	12
A. - <u>Généralités</u>	12
1 - Le modèle compétitif	12
2 - Le modèle coopératif	13
3 - Le modèle combiné compétitif/coopératif	13
B. - <u>Les Bacteroides du tractus digestif de l'homme</u>	14
1 - Les <u>Bacteroides</u> de la flore buccale	14
2 - Les <u>Bacteroides</u> du côlon	15
3 - La résistance aux antibiotiques	16
C. - <u>Les Bacteroides du rumen</u>	17
III. - LE CATABOLISME GLUCIDIQUE DES BACTERIES DU COLON	21
A. - <u>Le métabolisme des polysaccharides</u>	21
B. - <u>Le métabolisme des monosaccharides</u>	22
C. - <u>La phosphorylation oxydative</u>	25

IV. - LES BESOINS NUTRITIONNELS PARTICULIERS	26
A. - <u>Besoins en CO₂</u>	26
B. - <u>Besoins en hémine et en vitamine B₁₂</u>	28
C. - <u>Autres besoins nutritionnels</u>	28
V. - L'EFFET DE L'OXYGENE	28
VI. - LA PERMEABILITE DE LA MEMBRANE EXTERNE DES BACTERIES A GRAM-NEGATIF	30
A. - <u>Les canaux de diffusion non spécifique : les porines</u>	31
B. - <u>Les canaux de diffusion spécifique</u>	33
1 - Exemple du maltose et dérivés	33
2 - Exemple du glucose	33
C. - <u>Conclusion</u>	34
VII. - LE TRANSPORT DES HYDRATES DE CARBONE A TRAVERS LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE ET SA REGULATION	34
A. - <u>La diffusion facilitée</u>	34
B. - <u>Les systèmes à protéines périplasmiques</u>	36
C. - <u>Les systèmes à transporteur mobile</u>	41
1 - La perméase du lactose	41
2 - La perméase à mélibiose	42
D. - <u>Le système phosphotransférase</u>	45

E. - <u>La régulation de systèmes perméasiques</u>	50
1 - "Les effets glucose"	50
a) <u>L'exclusion d'inducteur</u>	50
b) <u>La répression catabolique</u>	50
c) <u>La relation entre répression catabolique</u> <u>et exclusion d'inducteur</u>	51
2 - La régulation de la perméation non-PTS des hydrates de carbone et de l'adénylate cyclase par le système PTS	55
 VIII. - BUT DU TRAVAIL	 58
 M A T E R I E L E T M E T H O D E S	
I. - SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES	60
II. - MILIEUX ET TECHNIQUES DE CULTURE	60
A. - <u>Culture d'E. coli</u>	60
B. - <u>Culture de Bacteroides</u>	60
1 - Composition des milieux de culture	60
a) <u>Bouillon cerveau-coeur</u>	60
b) <u>Milieu tryptone-peptone-extrait de levure</u>	61
c) <u>Milieu de Caspari et Macy (1983)</u>	61
2 - Préparation des milieux de cultures	62
3 - Conditions de cultures	62
III. - TAMPONS ET SOLUTIONS REDUITS	63
IV. - CULTURE EN BIOPHOTOMETRE	64
A. - <u>Préparation de l'inoculum</u>	64
B. - <u>Constante de croissance</u>	66

V. -	DOSAGE DE PROTEINES	67
VI. -	ETUDE DU TRANSPORT DU GLUCOSE A TRAVERS LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE	67
A. -	<u>Préparation des cellules pour des essais d'accumulation du sucre</u>	67
B. -	<u>Produits radiomarqués</u>	67
C. -	<u>Accumulation des substrats</u>	68
	1 - En aérobiose	68
	2 - En anaérobiose	68
D. -	<u>Mesure de la phosphorylation ATP ou PEP dépendante</u>	69
	1 - Perméabilisation des cellules au toluène	69
	2 - Mesure de la phosphorylation des hexoses	69
E. -	<u>Accumulation du glucose par les sphéroplastes</u>	70
	1 - Préparation des sphéroplastes	70
	2 - Accumulation du glucose	71

RESULTATS ET DISCUSSION

I. -	CROISSANCE DES ESPECES DU GROUPE <u>B. FRAGILIS</u>	72
A. -	<u>Cinétiques de croissance sur milieu empirique</u>	72
	1 - BHI	72
	2 - TPY	74
B. -	<u>Cinétiques de croissance sur milieu synthétique</u>	77
C. -	<u>Cinétiques de croissance sur différentes concentrations en substrat carboné (glucose)</u>	80

D. - <u>Cinétiques de croissance sur mélange de glucose</u> <u>et d'un autre substrat carboné</u>	86
1 - Galactose, fructose ou lactose	87
2 - Maltose, acide polygalacturonique	90
E. - <u>Conclusion</u>	93
II. - <u>ETUDE DU TRANSPORT DU GLUCOSE CHEZ BACTEROIDES</u> .	96
A. - <u>Etude du transport du glucose chez B. thetaio-</u> <u>taomicron souche 489 : nature, détermination des</u> <u>constantes cinétiques et régulations</u>	96
1 - Le choix des conditions de mise en oeuvre du procédé d'accumulation du glucose	96
a) <u>L'effet de l'oxygène sur le transport du glucose</u>	96
b) <u>L'effet de la concentration cellulaire</u> <u>relative sur le transport du glucose</u>	102
2 - La cinétique comparée d'accumulation du glucose et d'un analogue : α -méthyl glucose	104
3 - La nature du transport	104
a) <u>L'effet de la concentration en substrat</u> <u>sur la vitesse de transfert</u>	104
b) <u>La nature d'énergisation du transport</u>	109
c) <u>La recherche du système à protéine périplasmique</u>	111
d) <u>La recherche de l'existence de la</u> <u>phosphorylation du substrat durant le transport</u>	112
e) <u>Conclusion</u>	120
4 - <u>Spécificité du système perméasique</u>	122
a) <u>Préincubation des cellules 10 min avec le</u> <u>compétiteur avant l'addition du glucose</u>	123
b) <u>Addition du compétiteur 2 min après</u> <u>l'initiation du transport du glucose</u>	123
5 - <u>Etude de l'induction du système</u>	125
6 - <u>Conclusion</u>	125
B. - <u>La nature du transport du glucose chez les autres</u> <u>espèces du groupe B. fragilis</u>	128
1 - <u>L'effet de l'oxygène sur la capacité</u> <u>d'accumulation du glucose</u>	128

2 - La cinétique d'accumulation du glucose	131
3 - La nature du transport	135
a) <u>La nature d'énergisation du transport</u>	135
b) <u>La recherche du système à protéine périplasmique</u>	138
c) <u>La recherche de l'existence de la phosphorylation du substrat durant le transport</u>	140
d) <u>L'effet des cations monovalents</u>	146
4 - Conclusion	148
 C. - <u>Conclusion</u>	 149
 CONCLUSION GENERALE	 152
 BIBLIOGRAPHIE	 154
 ANNEXE 1	 169
 ANNEXE 2	 174
 ANNEXE 3	 181
 ANNEXE 4	 188
 ANNEXE 5	 194

A V A N T - P R O P O S

Bacteroides est un des genres bactériens prédominants de la flore gastro-intestinale. Chez l'Homme, ces bactéries se développent essentiellement dans le côlon. Il représente entre 10^9 et 10^{10} bactéries/g de matière fécale sèche. Ces bactéries sont saccharolytiques, elles dégradent les polysaccharides végétaux non assimilés par l'être humain. Il a été montré que plus de la moitié des sucres totaux des cellules végétales que l'hôte ingère est dégradée durant le passage dans le côlon (SALYERS, 1984).

Dans le genre **Bacteroides**, 54 espèces différentes étaient répertoriées (Tab. 2 et 3). Mais récemment, il s'est restreint à une espèce type **Bacteroides fragilis** et aux espèces apparentées : **Bacteroides thetaiotaomicron**, **Bacteroides distasonis**, **Bacteroides vulgatus**, **Bacteroides merdae**, **Bacteroides caccae**, **Bacteroides uniformis**, **Bacteroides stercoris**, **B. ovatus** et **Bacteroides eggerthii** (SHAH et COLLINS, 1989).

Depuis quelques années, notre Laboratoire s'intéresse particulièrement aux bactéries anaérobies strictes. Les techniques d'isolement, d'identification et d'entretien des souches sont parfaitement maîtrisées et sont appliquées à l'étude du genre **Bacteroides**, source potentielle d'hydrolases très performantes. Les travaux concernent à la fois des études physiologiques et des études génétiques. Ces dernières ont récemment permis le clonage et l'expression chez **Escherichia coli** de gènes de **B. thetaiotaomicron** codant pour des activités enzymatiques impliquées dans la dégradation des polysaccharides tels que la pectine et le dextran (JONCQU'ERT et coll., 1991 ; TIERNY, 1992). Elles se poursuivent par le clonage de ces mêmes activités chez **Bacillus**. Par ailleurs, différentes activités polysaccharidiques, cellulase, dextranase, pectinase et inulinase sont systématiquement recherchées

dans toutes les souches de **Bacteroides** de notre collection. Puis, les gènes codant pour ces activités sont localisés par hybridation qualitative sur membrane avec des sondes radioactives dans le but d'études de dispersion génique.

Les études physiologiques portent à la fois sur l'aspect cinétique de développement totalement méconnu chez **Bacteroides** et sur le mode du transport membranaire des sucres. En effet, on a pu constater que les activités enzymatiques impliquées dans la dégradation des polysaccharides sont intracellulaires et surtout périplasmiques (ANDERSON et SALYERS, 1989). Les macromolécules y sont dégradées en petites unités saccharidiques qui doivent traverser la membrane cellulaire pour être utilisées. Le mécanisme et la régulation du transport de ces unités saccharidiques (oses, holosides) sont mal connus.

Nous avons réalisé des cinétiques de développement de **Bacteroides** sur des hexoses, des disaccharides et des polysaccharides. Nous avons pu constater que les hexoses sont d'excellents substrats pour la multiplication de ces bactéries. Si les voies de dégradation de ces molécules sont connues, par contre la première étape de leur utilisation, leur transport, a été très peu décrite. Nous avons donc choisi de préciser le (ou les) mécanisme(s) impliqué(s) chez **B. thetaiotaomicron** et d'en aborder la régulation. Nous avons ensuite étendu la recherche du mécanisme du transport du glucose à d'autres espèces de l'ensemble de **B. fragilis** (**B. fragilis**, **B. distasonis**, **B. vulgatus**) afin de vérifier l'homogénéité de ce groupe taxonomique nouvellement décrit.

INTRODUCTION

I. - EVOLUTION DE LA TAXONOMIE DU GENRE BACTEROIDES

Selon le Manuel Systématique de Bactériologie de Bergey (HOLDEMAN et coll., 1984), le genre **Bacteroides** appartient à la famille des Bacteroidaceae. Les bactéries de cette famille sont anaérobies strictes, Gram-négatives, non sporulantes, mobiles ou immobiles. On les rencontre sous forme de bacilles droits, courbés ou en spirale. Elles sont toutes chimioorganotrophes (tirent leur énergie anabolique à partir de l'oxydation des molécules organiques). Elles métabolisent les sucres simples ou polymérisés et les peptones en produisant des acides organiques tels que l'acide succinique, l'acide acétique, l'acide lactique, l'acide propionique ou encore l'acide formique.

Dans la famille des Bacteroidaceae, HOLDEMAN et coll. (1984) ont défini 13 genres dont les noms et les principales caractéristiques sont regroupés dans le tableau 1. Le genre le plus représenté en nombre et le plus connu est **Bacteroides**. Les bactéries de ce genre sont des bacilles droits, avec un GC % compris entre 28 % et 60 % et qui produisent, par fermentation des sucres et des peptones, du succinate, du propionate et de l'acétate.

Le genre **Bacteroides** renferme 39 espèces subdivisées en deux groupes : asaccharolytiques (9 espèces) et saccharolytiques (30 espèces) dont le nom, le G.C. % et l'habitat sont donnés dans le tableau 2.

Dans la littérature, on trouve régulièrement des espèces nouvellement caractérisées. De 1981 à 1986, 15 espèces nouvelles, découvertes dans différents habitats, ont été classées dans le genre **Bacteroides** (Tab. 3).

Les différentes espèces du genre **Bacteroides** ont des caractéristiques très hétérogènes du point de vue de leurs voies métaboliques, de leur composition chimique et de leurs acides nucléiques (Tab. 2 et 3). L'homologie ADN/ADN des différentes souches et certains critères biochimiques ont permis de restreindre le genre **Bacteroides** à 2 groupes (COLLINS et SHAH, 1987) :

- le groupe **B. fragilis** comprenant **B. fragilis**, **B. thetaiotaomicron**, **B. caccae**, **B. distasonis**, **B. eggerthii**, **B. merdae**, **B. ovatus**, **B. stercoris**, **B. uniformis** et **B. vulgatus** ;

Genre	Mobilité, Ciliature	Métabolites produits
Bacteroides	immobile ou mobile péritriche	succinate, acétate
Fusobacterium	non mobile péritriche	butyrate
Leptotrichia	non mobile péritriche	lactate
Butyrivibrio	mobile monotriche	butyrate
Succinimonas	mobile flagelle polaire	succinate, acétate
Succinivibrio	mobile flagelle polaire cellule en spirale	succinate, acétate
Anaerobiospirillum	mobile avec flagelle bipolaire en touffes cellule en spirale	succinate, acétate
Wolinella	mobile flagelle polaire	formate
Selenomonas	mobile flagelles en touffes	propionate, acétate
Anaerovibrio	mobile flagelle polaire	propionate, acétate
Pectinatus	mobile flagelle latéral	propionate, acétate
Acetivibrio	mobile flagelle latéral	acétate, éthanol, H ₂ , CO ₂
Lachnospira	mobile flagelle polaire	acétate, éthanol, H ₂ , CO ₂ , formate, lactate

Tableau 1 - Famille des Bacteroidaceae (HOLDEMAN et coll., 1984).

	Espèces	% GC	Habitat naturel
Asaccharolytiques	<i>B. asaccharolyticus</i>	50-52	Cavité buccale
	<i>B. coagulans</i>	37	Tractus digestif et uréogénital
	<i>B. gingivalis</i>	46-48	Abcès dentaires
	<i>B. gracilis</i>	44-46	Crevasses gingivales
	<i>B. nodosus</i>	45	Pied du mouton
	<i>B. pneumosintes</i>	-	Pharynx
	<i>B. praeacutus</i>	28	Intestin humain
	<i>B. putredinis</i>	-	Côlon du mouton
	<i>B. ureolyticus</i>	28-30	Cavité orale et intestin
Saccharolytiques	<i>B. amylophilus</i>	40-42	Rumen
	<i>B. bivius</i>	40	Flore normale du vagin
	<i>B. buccae</i>	50-52	Poches gingivales
	<i>B. capillosus</i>	60	Côlon humain et porc
	<i>B. corporis</i>	43-46	Cas cliniques humains
	<i>B. denticola</i>	49-51	Poches gingivales
	<i>B. disiens</i>	40-42	Flore normale du vagin
	<i>B. distasonis</i>	43-45	Côlon humain
	<i>B. eggerthii</i>	44-46	Côlon humain
	<i>B. fragilis</i>	41-44	Côlon humain
	<i>B. furcosus</i>	34	Abcès intestinaux
	<i>B. hypermegas</i>	35	Côlon humain, volaille, chien
	<i>B. intermedius</i>	41-44	Crevasses gingivales
	<i>B. levii</i>	48	Rumen des bovins
	<i>B. loescheii</i>	46-48	Poches gingivales
	<i>B. macacae</i>	43-44	Cavité buccale des macaques
	<i>B. melaninogenicus</i>	36-40	Poches gingivales
	<i>B. microfusis</i>	60-61	Fèces du veau, caecum du poulet
	<i>B. multiacidus</i>	56-58	Côlon humain et porc
	<i>B. oralis</i>	43	Poches gingivales
	<i>B. oris</i>	42-46	Intestin du poulet, abcès
	<i>B. ovatus</i>	39-43	Côlon humain
	<i>B. ruminicola</i>		
	ssp. <i>brevis</i>	50	Réticulo-rumen bovins, moutons
	ssp. <i>ruminicola</i>	49	Réticulo-rumen bovins, moutons
	<i>B. splanchnicus</i>	-	Côlon humain et vagin
	<i>B. succinogenes</i>	47-49	Rumen des bovins et moutons
	<i>B. termitidis</i>	34-36	Intestin des termites
	<i>B. thetaiotaomicron</i>	40-43	Côlon humain
	<i>B. uniformis</i>	45-48	Côlon humain
<i>B. vulgatus</i>	40-42	Côlon humain	
<i>B. zoogloformans</i>	47	Cavité buccale humaine	

Tableau 2 - Genre Bacteroides (HOLDEMAN et coll., 1984).

Nouvelles espèces de <i>Bacteroides</i>	Origine	% GC	Référence
<i>B. buccalis</i> <i>B. denticola</i> <i>B. pentosaceus</i>	bouche	-	Shah et Collins, 1981
<i>B. veroralis</i>	bouche	42	Watabe et coll., 1983
<i>B. polypragmatus</i>	vase d'égout	61	Patel, 1983
<i>B. cellulosolvens</i>	vase d'égout	-	Murray et coll., 1984
<i>B. heparinolyticus</i>	vase d'égout	-	Okuda et coll., 1985
<i>B. endodontalis</i>	bouche	-	Van Winkelhoff et coll., 1985
<i>B. oulorum</i>	cavité orale	-	Shah et coll., 1985
<i>B. pectinophilus</i> <i>B. galacturonicus</i>	tractus digestif de l'homme	45 36	Jensen et Canale-Parola, 1986
<i>B. caccae</i> , <i>B. merdae</i> , <i>B. stercosis</i>	féces de l'homme	-	Johnson et coll., 1986
<i>B. xylanolyticus</i>	fumier de bovin	34-36	Scholten-Koerselman et coll., 1986

Tableau 3 - Les nouvelles espèces du genre *Bacteroides*.

- le groupe *B. melaninogenicus* - *B. oralis* constitué de *B. bivius*, *B. buccae*, *B. buccalis*, *B. denticola*, *B. disiens*, *B. intermedius*, *B. corporis*, *B. heparinolyticus*, *B. loescheii*, *B. melaninogenicus*, *B. oralis*, *B. oris*, *B. oulorum*, *B. ruminicola*, *B. veroralis* et *B. zoogloformans*.

Actuellement, les bactéries du deuxième groupe (*B. melaninogenicus* - *B. oralis*) sont reclassées dans un nouveau genre, *Prevotella* (SHAH et COLLINS, 1990). Le genre *Bacteroides* est donc restreint à l'espèce *fragilis* et aux espèces apparentées (SHAH et COLLINS, 1989). Les espèces du groupe *B. fragilis* forment un groupe génétiquement homogène et distinct des autres espèces du genre *Bacteroides*, ont un GC % compris entre 40 et 48 % ; elles sont saccharolytiques et produisent de l'acide acétique, de l'acide succinique et de l'acide propionique comme produits finaux du métabolisme du glucose (HOLDEMAN et coll., 1984). Elles sont différentes des autres espèces du genre *Bacteroides* par la possession des enzymes : glucose-6-phosphate déshydrogénase et 6-phosphogluconate déshydrogénase permettant de mettre en évidence au moins le début de la voie de Dickens et Horecker (Fig. 1). Elles possèdent la malate et la glutamate déshydrogénases (réactions 1 et 2) des acides gras à longue chaîne méthylée, des sphingolipides et des ménaquinones comme quinone respiratoire (SHAH et COLLINS, 1983 ; COLLINS et SHAH, 1987). La structure de ces deux dernières molécules est représentée dans la figure 2. La présence de sphingolipides chez *Bacteroides* est inhabituelle puisque chez les eubactéries Gram négatif on trouve surtout les glycérophospholipides comme lipides polaires. Ces bactéries sont résistantes aux sels biliaires et à une exposition d'oxygène relativement longue.

Les autres espèces ont été reclassées en genre nouveau ou sont en attente de position taxonomique (Tab. 4). Récemment, HAN et coll. (1991) ont démontré que *B. gracilis* et *B. ureolyticus* ne sont pas des anaérobies strictes, ce sont des microaérophiles.

Cette nouvelle classification est récente ; dans notre étude bibliographique qui suit, nous avons respecté les appellations données par les auteurs.

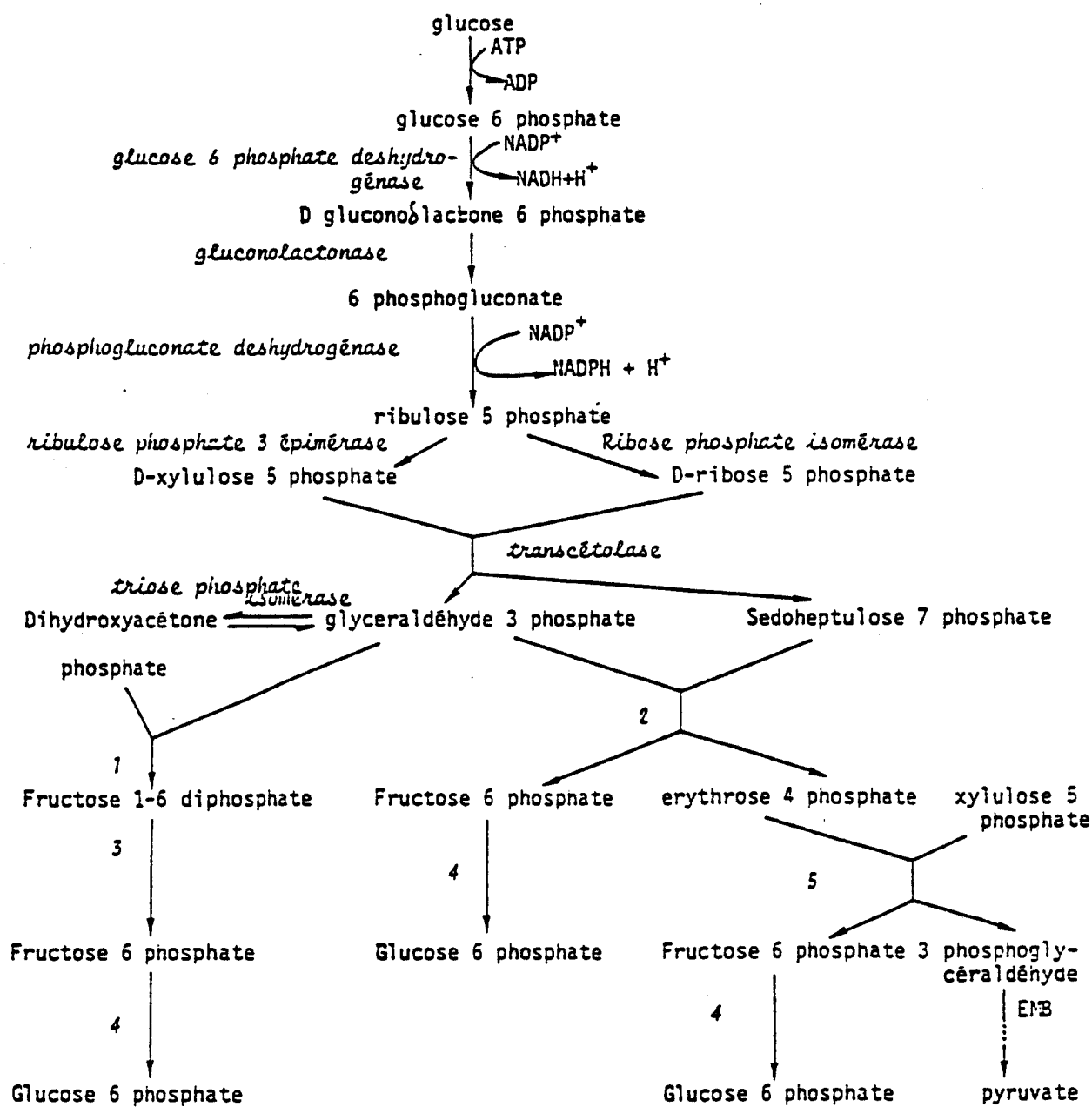
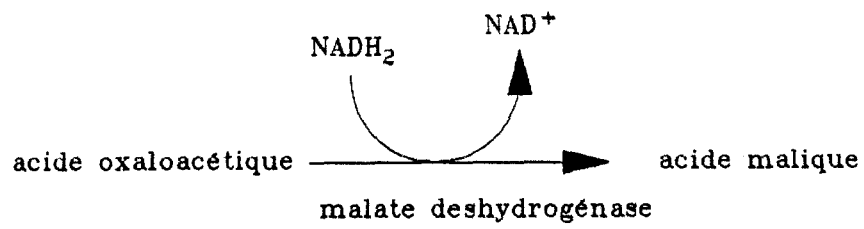
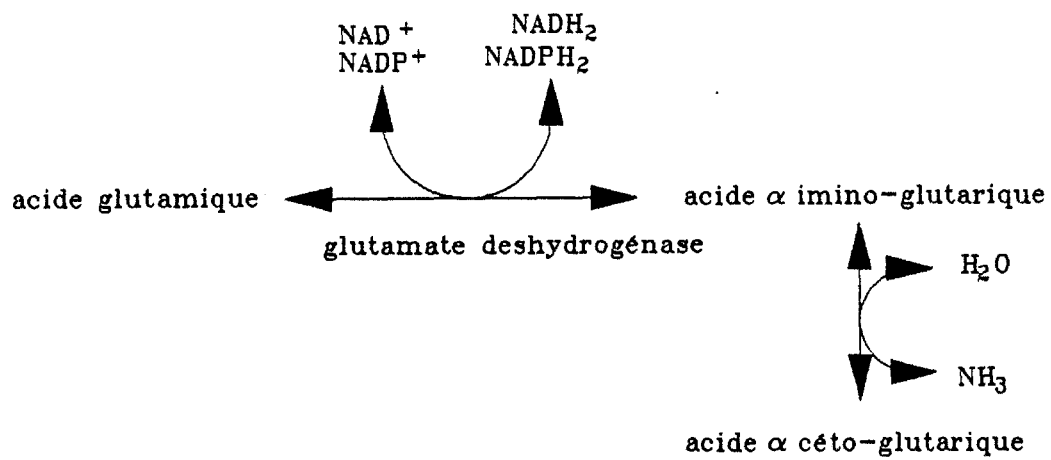


Figure 1 - La voie de Dickens et Horecker.

- 1 - Fructose 1-6 diphosphate aldolase.
- 2 - Transaldolase (E.C. 2.2.1.2.).
- 3 - Hexose diphosphatase.
- 4 - Glucose phosphate isomérase.
- 5 - Transcétolase.



Réaction 1



Réaction 2

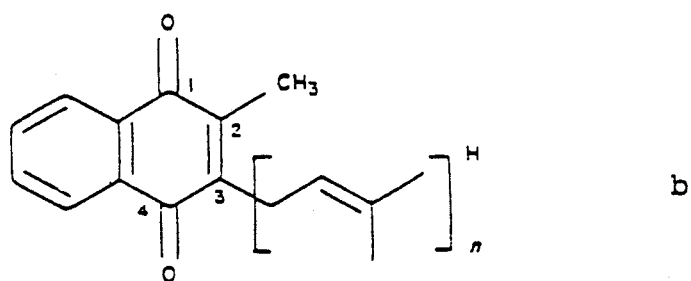
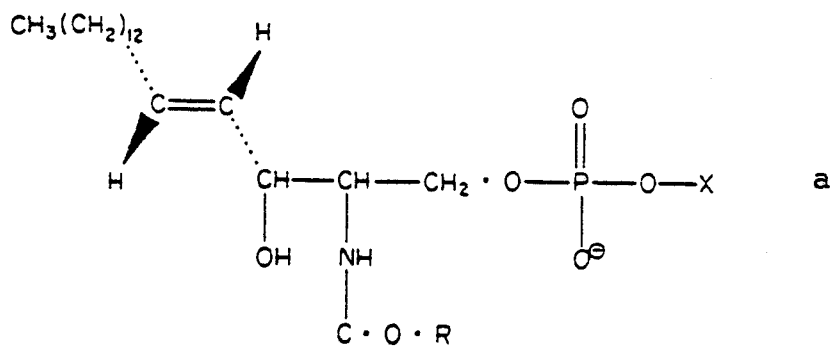


Figure 2 - Structure des sphingolipides (a) et des ménaquinones (b).

R : acide gras.

X : choline.

Ancienne appellation	Nouvelle appellation	Références
B. levii, B. macacae, B. salivosis (relation possible avec <i>Porphyromonas</i>)		
B. ureolyticus, B. gracilis (relation possible avec <i>Campylobacter</i> ou <i>Wolinella</i>)		
B. capillosus		
B. cellulosolvens		
B. coagulans - B. forsythus		
B. galacturonicus		
B. helcogenes	position taxonomique incertaine	Collins et Shah, 1989
B. pectinophilus		
B. pneumosintes		
B. polypragmatus		
B. putredinis		
B. pyogenes		
B. splanchnicus		
B. suis		
B. tectum		
B. xylanolyticus		
B. hypermegas	<i>Megamonas hypermegas</i>	Shah et Collins, 1982a
B. multiacidus	<i>Mitsuokella multiacidus</i>	Shah et Collins, 1982b
B. microfusus	<i>Rikenella microfusus</i>	Collins et coll., 1985
B. amylophilus	<i>Ruminobacter amylophilus</i>	Stackebrandt et Hippe, 1986
B. furcosus	<i>Anaerorhabdus furcosus</i>	Shah et Collins, 1986
B. termiditis	<i>Sebaldella termiditis</i>	Collins et Shah, 1986a
B. praecutus	<i>Tissierella praecutus</i>	Collins et Shah, 1986b
B. asaccharolyticus	<i>asaccharolyticus</i>	
B. endodontalis	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	Shah et Collins, 1988
B. gingivalis	<i>gingivalis</i>	
B. succinogenes	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Montgomery et coll., 1988
B. melaninogenicus - B. oralis	<i>Prevotella melaninogenica</i> (espèce type)	Shah et Collins, 1990
B. nodosus	<i>Dichelobacter nodosus</i>	Dewhirst et coll., 1990

Tableau 4 - Les espèces du genre Bacteroides reclassées en genre nouveau ou en attente de position taxonomique.

II. - ECOLOGIE ET PRESENTATION GENERALE DU GENRE BACTEROIDES DEFINI DANS LE MANUEL DE BERGEY

A. - Généralités

Les habitats dans lesquels les espèces du genre **Bacteroides** vivent et évoluent sont des milieux réducteurs, principalement le tractus digestif des animaux. La température y est relativement haute et constante (37°C-40°C), l'oxygène est absent et l'animal y maintient un approvisionnement en eau et substrats nutritifs.

La symbiose **Bacteroides**/animaux et le commensalisme **Bacteroides**/homme s'établissent selon trois modèles :

- le modèle compétitif,
- le modèle coopératif,
- le modèle combiné compétitif/coopératif.

1 - Le modèle compétitif

Dans ce modèle, il y a compétition entre l'hôte et la bactérie pour les nutriments. La nourriture est principalement d'origine animale et peut être digérée par l'hôte. Ce dernier secrète au niveau stomacal, juste avant l'entrée des aliments dans l'intestin grêle, de l'acide chlorhydrique en concentration bactéricide et des protéases telle que la pepsine. A ce niveau, beaucoup de cellules bactériennes sont tuées. Les bactéries survivantes vont traverser le duodénum et l'intestin grêle et se trouvent dans le gros intestin en compétition avec la flore intestinale déjà implantée. Malgré les conditions de développement favorables dans le duodénum et dans l'intestin grêle, les bactéries sont incapables d'y proliférer car leur nombre est insuffisant pour effectuer une fermentation avant que l'hôte absorbe les produits de dégradation de ses enzymes. Ceci est lié au fait que le passage de la nourriture dans l'intestin grêle est relativement rapide (son diamètre est faible).

Les bactéries du côlon vont se développer en dégradant les mucines et les cellules desquamées dans l'intestin et en fermentant les fibres végétales. Durant leur croissance, les vitamines, dont l'hôte profite, sont sécrétées.

Ce modèle est rencontré chez l'homme, les carnivores, les pinnipèdes, les insectivores, les chiroptères, la plupart des primates, certains marsupiaux et beaucoup d'oiseaux, de reptiles, d'amphibiens et de poissons.

2 - Le modèle coopératif

Le modèle coopératif existe chez la plupart des animaux herbivores qui sont incapables de digérer leur nourriture. En effet, ces animaux sont incapables de synthétiser les enzymes permettant de dégrader, en éléments assimilables, les composés majeurs des végétaux : la cellulose, l'hémicellulose ou la pectine. Leur dégradation dépend certainement de la présence de bactéries qui possèdent un grand nombre d'enzymes hydrolytiques. Ces bactéries agissent, avant l'entrée de la nourriture dans l'estomac acide, au niveau d'une chambre de fermentation. Ceci permet au microorganisme d'être suffisamment longtemps en présence du substrat, afin de les convertir en composés simples assimilables.

Le modèle coopératif avec chambre de fermentation est une caractéristique des ruminants, de l'hippopotame, des marsupiaux herbivores, de l'ai et probablement du panda.

3 - Le modèle combiné compétitif/coopératif

Ce modèle existe chez le reste des animaux herbivores. Chez ceux-ci, la digestion se fait, premièrement, par l'action des acides et des enzymes de l'hôte et, ensuite, par les activités bactériennes. L'hôte absorbe donc les éléments digérés par ses propres enzymes et les produits de fermentation issus des dégradations bactériennes.

Le modèle combiné est rencontré chez le cheval, l'éléphant, les rongeurs, les termites et la plupart des invertébrés se nourrissant de végétaux. Les termites sont des consommateurs et des digesteurs actifs de bois.

B. - Les Bacteroides du tractus digestif de l'homme

Les bactéries du genre **Bacteroides** représentent 80 à 99 % de la flore bactérienne fécale de l'homme, et ce genre anaérobie est le plus fréquemment isolé en clinique humaine lors de septicémies secondaires ou primaires chez les sujets immunodéprimés. Les bactéries du genre **Bacteroides** sont présentes dans la quasi totalité du tractus digestif : la bouche, l'intestin grêle et le côlon. En revanche, aucune espèce n'a été isolée de l'estomac en raison de son acidité élevée.

1 - Les Bacteroides de la flore buccale

Les **Bacteroides** isolés de la gencive ou de la plaque dentaire, sont : **B. gingivalis**, **B. endodontalis**, **B. melaninogenicus** et **B. oralis**. Seul **B. oralis** est saccharolytique, les trois autres sont asaccharolytiques, protéolytiques, pigmentées en noir et responsables de nombreuses infections (MAYRAND et coll., 1984 ; MAYRAND et HOLT, 1988). Toutes les 4 se fixent sur les cellules épithéliales de la gencive et elles présentent une résistance à la phagocytose cellulaire car elles sont capsulées. De plus, elles sécrètent des substances leucotoxiques inhibant les leucocytes polynucléaires et elles sont capables de dégrader des protéines anti-inflammatoires comme les immunoglobulines.

La présence de **B. gingivalis** semble être associée à plusieurs maladies. En effet, cette espèce est habituellement absente des gencives saines alors qu'elle représente 1 à 5 % de la microflore gingivale en cas de parodontite (affectation des tissus de soutien de la dent). Selon certains auteurs (VAN STEENBERGEN et DE GRAAFF, 1986 ; OTSUKA et coll., 1987 ; BIRKEDAL-HANSEN et coll., 1988 ; MAYRAND et HOLT, 1988 ; NAITO et GIBBONS, 1988 ; VAN WINKELHOFF et coll., 1988 ; FUJIMURA et NAKAMURA, 1989), la pathogénicité de cette souche pourrait être due à ses activités protéolytiques, surtout collagénasique.

B. oralis est une bactérie saccharolytique synthétisant des dextranases. Les enzymes hydrolysent des dextrans (TAKAHASHI, 1982 ; TAKAHASHI et coll., 1985) qui sont les principaux polysaccharides de la plaque dentaire et qui sont

synthétisés à partir du saccharose par *Streptococcus mutans*, microorganisme saprophyte de la bouche (MOOSER et IWAOKA, 1989).

2 - Les Bacteroides du côlon

Le côlon est le segment du gros intestin qui héberge un nombre maximum de bactéries. D'énormes populations microbiennes se développent dans le gros intestin parce que c'est une zone de relative stagnation. La vitesse de passage du contenu luminal n'excède pas le temps de doublement des bactéries. Parmi les 400 espèces de bactéries qui y vivent, 5 genres représentent environ 70 % de la population totale. *Bacteroides* est un des 5 genres prédominants avec 30 % de la flore du côlon. Les espèces de *Bacteroides*, les plus importantes en nombre, sont *B. vulgatus*, *B. distasonis* et *B. thetaiotaomicron* (10^{10} bactéries/g de matière fécale sèche). *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. eggerthii* et *B. uniformis* ne représentent que 10^9 bactéries/g de matière fécale sèche. Le contenu luminal comprend les substances non assimilées par l'homme (polysaccharides complexes des parois des cellules végétales comme pectine, xylane, etc...) ou les sécrétions de la muqueuse intestinale (chondroïtine sulfate). *Bacteroides* possède une grande variété d'enzymes capables de dégrader les polysaccharides complexes, donc il s'implante facilement dans cette zone. Il a été montré que plus de la moitié des polysaccharides des cellules végétales que l'hôte ingère est dégradée durant le passage dans le côlon (SALYERS, 1984).

L'hydrolyse de ces polysaccharides est accompagnée d'une production d'acides gras volatils et de vitamines qui sont assimilés par l'hôte au niveau de la muqueuse intestinale. Pour ces différentes raisons, on peut dire que *Bacteroides* est une bactérie du côlon dont la présence est avantageuse à l'hôte.

Malheureusement, certains *Bacteroides* peuvent synthétiser des composés carcinogènes à partir des produits issus de l'alimentation ou à partir de molécules excrétées par l'hôte. Il a été ainsi démontré que des produits cancérigènes sont générés par l'action de certaines bactéries intestinales sur les sels biliaires excrétés dans l'intestin suite à une alimentation riche en graisses (MACY et PROBST, 1979). Il est, en effet, possible que certains

Bacteroides déconjuguent les sels biliaires primaires en sels biliaires secondaires cancérigènes. Certains produits du métabolisme des acides aminés et des protéines sont apparemment impliqués dans la carcinogénèse. Par exemple, le métabolisme de la tyrosine entraîne la formation de dérivés phénoliques et celui du tryptophane entraîne la formation des composés possédant un noyau indole. **Bacteroides** peut aussi métaboliser et synthétiser des dérivés polycycliques aromatiques hydrocarbonés cancérigènes (MACY et PROBST, 1979).

Cependant, il est intéressant de noter que **Bacteroides** peut inactiver des substances mutagènes par des nitropyrènes-réductases comme **B. fragilis**.

Le genre **Bacteroides** est impliqué dans la formation des composés cancérigènes dans le côlon mais il faut bien reconnaître que son rôle exact dans l'apparition du cancer du côlon n'est pas connu. Il est pourtant acquis qu'il existe une corrélation entre le régime alimentaire et l'apparition du cancer.

Les **Bacteroides** du côlon sont des opportunistes dès que les conditions écologiques du côlon ne sont plus normales. Ce déséquilibre peut être la cause de plusieurs infections telles que des septicémies ou des oedèmes pulmonaires au cerveau ou à l'abdomen. C'est le cas de **B. fragilis** et des espèces apparentées. Ces infections sont très difficiles à soigner du fait des nombreuses résistances aux antibiotiques que présentent ces souches (SALYERS, 1984 ; SALYERS et coll., 1987).

3 - La résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est difficile à estimer car il existe une réelle différence entre les sensibilités **in vitro** et **in vivo**. Pour les bactéries anaérobies, la seule méthode de mesure reconnue est basée sur l'étude de la culture de la souche testée sur des dilutions d'antibiotiques en milieu gélosé (ALDRIDGE et SANDERS, 1987).

Les **Bacteroides** sont résistants à une très grande variété d'antibiotiques, ce qui pose des problèmes dans le traitement des infections dans lesquelles ces bactéries sont impliquées (HORN et coll., 1987).

Les bactéries sont résistantes aux aminoglycosides comme la kanamycine et l'acide nalidixique car leur membrane est imperméable à ces molécules. Elles possèdent également des β -lactamases localisées dans l'espace périplasmique qui constituent ainsi une barrière à l'entrée des β -lactames. Cette résistance peut être portée par un plasmide conjugatif (YAMAOKA et coll., 1990). 15 % des souches sont résistantes à la tétracycline. Cette insensibilité est due à l'acquisition d'une imperméabilité vis-à-vis de cet antibiotique (SALYERS et coll., 1987) conférée par des gènes chromosomiques et conjugatifs.

La quasi-totalité des **Bacteroides** est sensible à la clindamycine qui est donc l'antibiotique de choix dans le traitement des infections à **Bacteroides**. 8 % des souches sont actuellement résistantes à cet antibiotique, ce nombre paraît en augmentation (SALYERS, 1984) en raison des transferts conjugatifs de ces gènes plasmidiques. La résistance à la clindamycine serait due à une mono ou une di-méthylation des résidus adénine de rRNA des sous-unités 50S (MACRINA et coll., 1986).

C. - Les Bacteroides du rumen

L'estomac des ruminants est divisé en 4 compartiments qui sont le rumen (ou panse), le bonnet, le feuillet et la caillette. La panse représente 80 % du volume total de l'estomac et atteint des valeurs d'environ 250 l chez la vache. Dans le rumen, les débris végétaux sont broyés et désolidarisés par les actions conjuguées de la mastication et de la rumination. Les papilles, qui tapissent sa paroi interne, augmentent la surface de cet organe. C'est à son niveau que s'effectue l'absorption d'eau et de métabolites essentiels comme les acides gras volatils, l'ammoniaque résultant de la fermentation microbienne.

Chez les ruminants, l'hydrolyse des polysaccharides pariétaux des cellules végétales comme la cellulose, l'hémicellulose et la pectine non hydrolysés par le ruminant se fait avant le passage dans l'intestin grêle. Cela se passe dans

le rumen et la totalité de la dégradation est due à l'action des microorganismes. La digestion des polysaccharides pariétaux présente des limites parce que les microorganismes sont incapables d'hydrolyser la lignine qui est un polymère de cellules végétales. Chez un ruminant adulte, la population microbienne du rumen se compose de 10^6 protozoaires et 10^{10} bactéries par gramme de contenu gastrique. Un certain nombre de bactéries est digéré par le ruminant, ce qui lui assure un approvisionnement en protéines et en vitamines.

Le rumen constitue une parfaite chambre de culture pour les bactéries et les protozoaires qui s'y trouvent en abondance. La prise fréquente de nourriture assure un substrat nourricier permanent et les produits solubles absorbés ne peuvent donc s'accumuler et inhiber l'activité enzymatique.

Le rumen est parfaitement anaérobie : son atmosphère est constituée de 60 à 70 % de CO_2 , de 25 à 35 % de CH_4 , d'un faible pourcentage de N_2 et de traces d'hydrogène et de H_2S . Sa température est stable autour de 40°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) et le pH reste constant (6 à 7) ainsi que la concentration ionique, ceci grâce à une énorme quantité de salive excrétée par jour : environ 50 à 80 l. L'oxygène qui pénètre dans la panse lors de la mastication et de la rumination est très rapidement réduit par les microorganismes anaérobies facultatifs.

Entre les différents microorganismes du rumen, il existe des relations symbiotiques ou des compétitions car chacun d'eux a besoin pour se développer de substances synthétisées par les autres espèces. Les bactéries du rumen sont surtout des **Streptococcus**, des **Lactobacillus** et de nombreuses bactéries cellulolytiques des genres **Bacteroides**, **Clostridium**, **Ruminococcus**, **Ruminobacter**, etc... Ces dernières étant responsables des processus de fermentation permettant à la cellulose d'être dégradée en produits assimilables. Dans le rumen, 200 espèces bactériennes vivent et coexistent mais seules 30 espèces sont spécifiques du rumen (HUNGATE, 1985). Le tableau 5 donne les substrats utilisés par les bactéries du rumen.

Les glucides du rumen sont classés en 3 catégories :

- les glucides simples (glucose, saccharose) qui sont utilisés immédiatement par les bactéries pour leur métabolisme ;

Substrat	Bactéries utilisatrices
Cellulose, Xylane	Bacteroides succinogenes, Butyrivibrio fibrisolvens, Ruminococcus flavefaciens et R. albus, quelques protozoaires
Amidon	Bacteroides amylophilus, Streptococcus bovis, Succinimonas amylolytica
Pectine, Saccharose	Bacteroides ruminicola, Lachnospira multiparus
Hémicellulose	Bacteroides ruminicola, Ruminococcus albus et R. flavefaciens, Butyrivibrio fibrisolvens
CO ₂	Tous les Bacteroides, Methanobacterium spp.
Lipides	Anaerovibrio lipolytica
Ac. lactique, succinique	Selenomonas ruminantium, Veillonella spp.

Tableau 5 - Substrats utilisés par les bactéries du rumen (HUNGATE, 1985 ; LIN et coll., 1985 ; PATTERSON, 1989).

- les polysaccharides cytoplasmiques comme l'amidon qui sont dégradés par **Bacteroides amylophilus** qui est une bactérie amylolytique ;
- les polysaccharides pariétaux comme la cellulose, l'hémicellulose ou les pectines.

La cellulose et ses produits d'hydrolyse seront fermentés par des bactéries comme **Bacteroides succinogenes**, **Ruminococcus albus** et **R. flavefaciens**. **Bacteroides succinogenes** serait la souche cellulolytique la plus active (LIN et coll., 1985). L'hémicellulose et les pectines sont hydrolysés par **Bacteroides rumenicola**.

Ces espèces s'attachent aux fibres qu'elles dégradent ; ainsi **B. succinogenes** adhère aux parois des cellules végétales et les hydrolyse en y creusant des cavités. Ce **Bacteroides** est capable d'hydrolyser un grand nombre de polymères du fait qu'il possède un complexe multienzymatique formé de 19 protéines différentes ayant une activité β -endoglucanasique (FORSBERG et GROLEAU, 1982 ; SCHELLHORN et FORSBERG, 1984).

Il existe, parfois, une coopération entre les enzymes provenant de plusieurs bactéries pour aboutir à une digestion totale des structures complexes. En effet, il a été démontré que l'on obtient une meilleure dégradation lorsque les souches sont cultivées en cultures mixtes plutôt qu'en culture pure (OSBORNE et DEHORITHY, 1989). Ainsi **B. rumenicola** (hémicellulolytique) utilise mieux l'hémicellulose lorsqu'il est combiné avec **B. succinogenes**. **B. succinogenes** dégrade l'hémicellulose mais ne l'utilise pas. De plus, ces auteurs ont montré que l'isolement et la caractérisation des bactéries du rumen sur des substrats purifiés peuvent induire en erreur sur leurs rôles dans la fermentation du rumen.

Les **Bacteroides** du rumen sont résistants aux antibiotiques comme les autres **Bacteroides**. Ils sont tous résistants à la kanamycine et à l'acide nalidixique. La majorité des souches est sensible à la clindamycine, à la tétracycline et à l'ampicilline (FLINT et STEWART, 1987).

III. - LE CATABOLISME GLUCIDIQUE DES BACTERIES DU COLON

Dans les intestins, *Bacteroides* hydrolyse les polysaccharides végétaux non assimilés par l'homme et il peut s'adapter très rapidement aux variations de régime alimentaire de son hôte car la plupart de ses enzymes sont inductibles et ne sont donc produits qu'en présence de leur substrat. Cette induction est rapide (SALYERS et coll., 1977 ; SALYERS et KOTARSKI, 1980), par exemple, en présence de chondroïtine sulfate, *B. thetaiotaomicron* commence à synthétiser l'enzyme après 30 min et atteint le maximum d'activité spécifique au bout de 2 h (SALYERS et KOTARSKI, 1980).

A. - Le métabolisme des polysaccharides

Le côlon humain contient des quantités faibles en monosaccharides et disaccharides car ceux-ci sont absorbés durant le transit à travers l'intestin grêle. Ainsi, la source principale de carbohydrates pour les espèces saccharolytiques de *Bacteroides* est probablement les polysaccharides végétaux. Des études nutritionnelles ont montré que plus de la moitié des polysaccharides végétaux ingérés par l'homme est dégradée dans le côlon par les bactéries en petites unités glucidiques de 5 ou 6 carbones (SALYERS, 1984).

Quelques espèces de *Bacteroides* peuvent fermenter une variété de polysaccharides provenant des parois des cellules végétales ou des sécrétions humaines (chondroïtine sulfate et mucine). Les mutations affectant l'utilisation de ces composés seraient léthales pour la bactérie.

Les enzymes qui dégradent les polysaccharides sont inductibles. En effet, les activités des polysaccharidases sont détectées seulement lorsque la bactérie est dans un milieu contenant des polysaccharides (SALYERS et KOTARSKI, 1980). Cette induction est inhibée par le glucose. Cependant, l'existence d'une répression catabolique par le glucose n'est pas démontrée de façon certaine puisque l'addition de l'AMPc ou de dibutyryl AMPc reste sans effet, vraisemblablement en raison de l'imperméabilité de la bactérie à ces substances (SALYERS, 1984).

Les enzymes dégradant les polysaccharides peuvent être associés à la cellule ou libres dans le milieu extracellulaire (SALYERS et coll., 1977 ; SALYERS et O'BRIEN, 1980).

B. - Le métabolisme des monosaccharides

Une activité fructose-1,6-diphosphate aldolase a été détectée chez les espèces de *Bacteroides* examinées (MACY et PROBST, 1979) : *B. eggerthii*, *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ruminicola*, *B. splanchnicus* et *B. succinogenes*. Il semble donc que le glucose soit dégradé chez *Bacteroides* par la voie d'Embden-Meyerhoff-Parnas (Fig. 3) en pyruvate.

Les voies métaboliques des sucres chez *B. fragilis* (MACY et PROBST, 1979) sont indiquées sur la figure 4.

Chez *B. fragilis* et *B. ruminicola*, le PEP subit deux voies métaboliques. La première est une déphosphorylation du PEP en pyruvate qui donne, par décarboxylation, de l'acétate. La deuxième correspond à la production du succinate et du propionate par une série d'étapes : la carboxylation du phosphoénol-pyruvate en oxaloacétate par une PEP-carboxykinase ADP ou GDP dépendante (ADP : *B. fragilis*, GDP : *B. thetaiotaomicron*) avec libération de l'ATP ou du GTP. Ensuite, le malate, formé à partir de l'oxaloacétate sous l'action d'une malate déshydrogénase, donne le fumarate. Le fumarate à son tour est réduit en succinate par la NADH-fumarate-oxydoréductase qui libère de l'ATP et qui est liée au système primitif de transport d'électrons.

Certaines espèces de *Bacteroides* sont capables de former l'acide propionique à partir du succinate, ceci en passant d'abord par le succinyl-CoA, ensuite par le méthyl-malonyl-CoA grâce à la méthyl malonyl-CoA mutase, vitamine B₁₂-dépendante qui catalyse le transfert intramoléculaire d'un groupement méthyl. En plus du succinate et du propionate, d'autres produits de fermentation peuvent être formés : le formate, le lactate et l'acétate. Le lactate est produit par réduction du pyruvate catalysé par une lactate déshydrogénase à NAD. L'acétate est formé à partir de l'acétyl-CoA qui est synthétisé par décarboxylation oxydative du pyruvate. La flavine, réduite lors

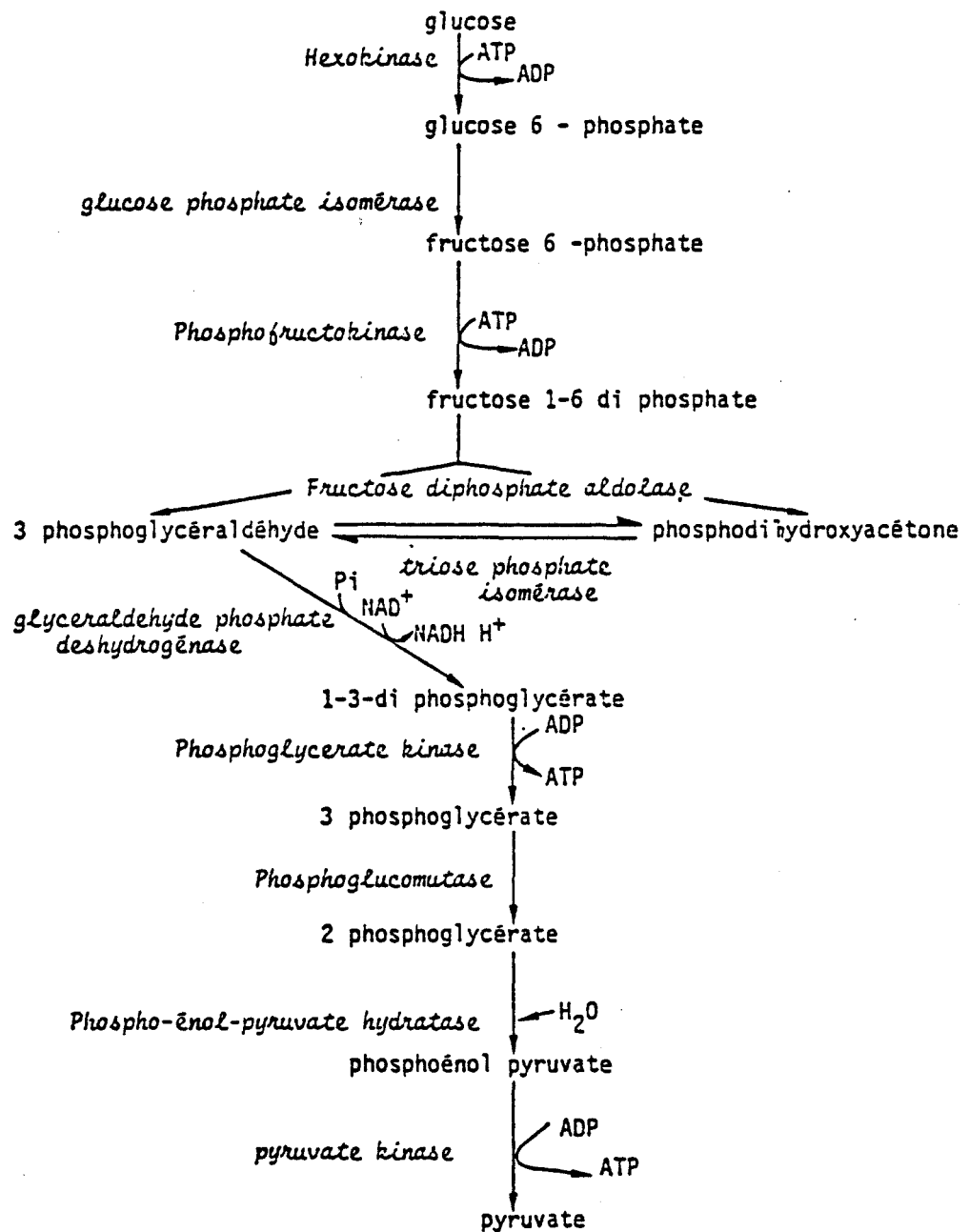


Figure 3 - La voie d'Embden-Meyerhoff-Parnas.

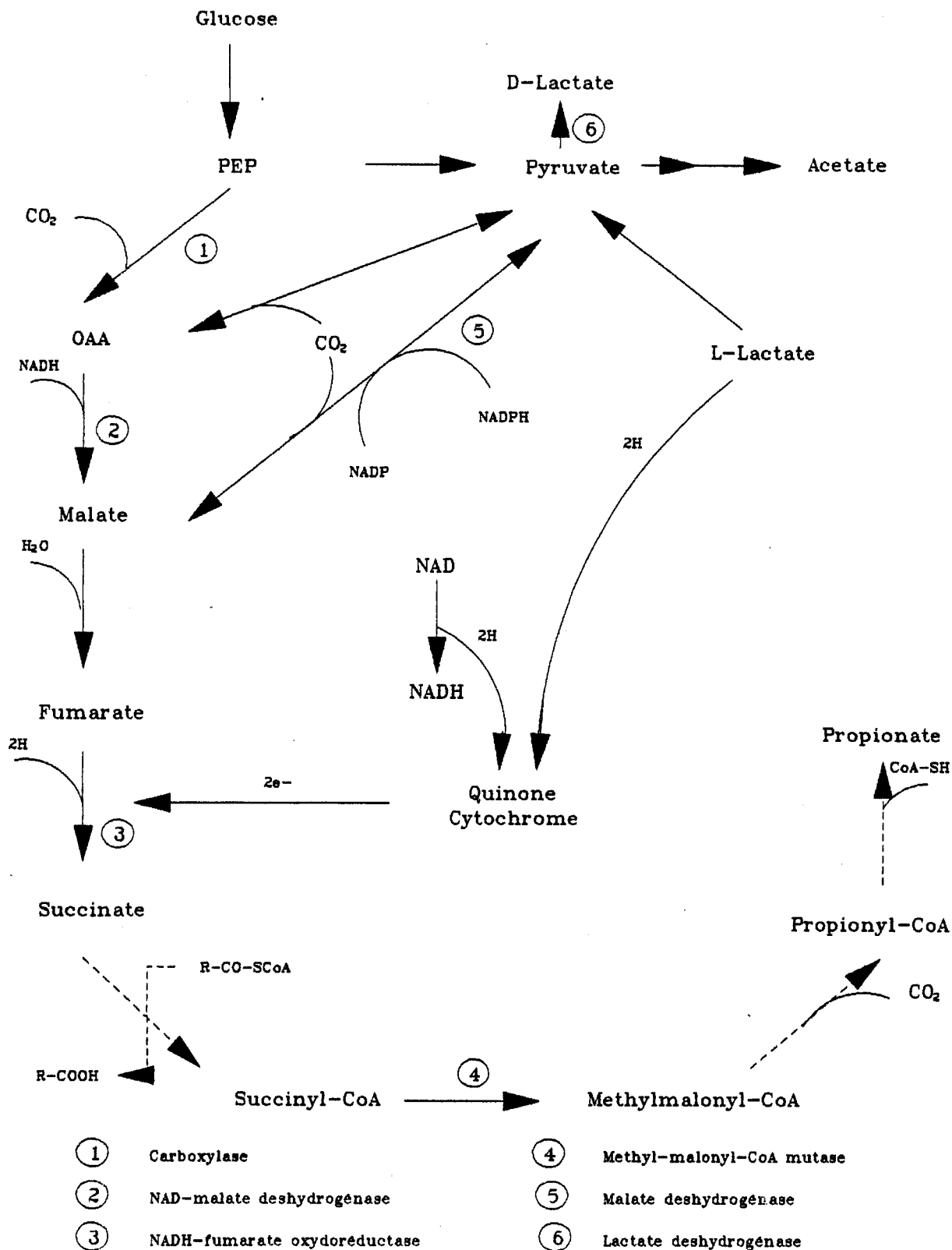


Figure 4 - La voie de dégradation du glucose chez *B. fragilis* (MACY et PROBST, 1979).

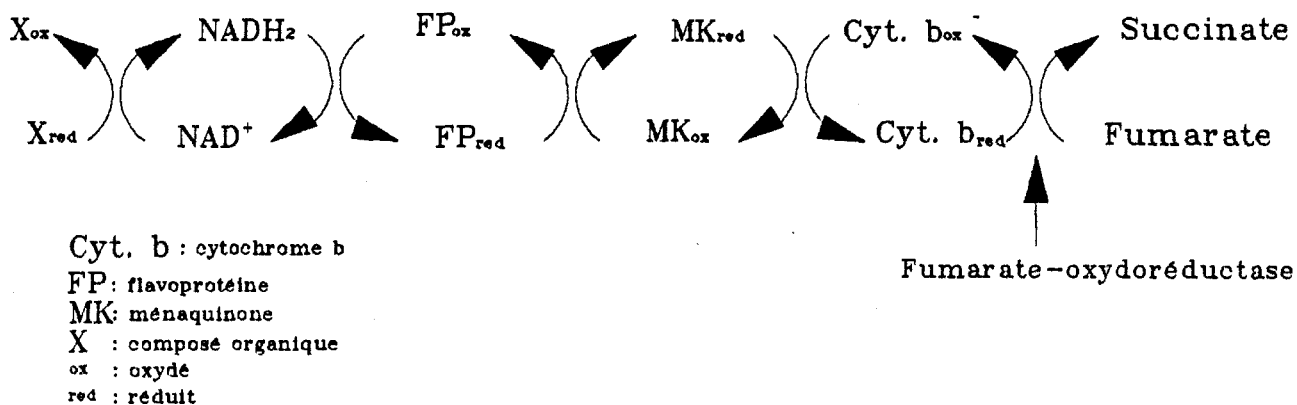
de cette réaction, est utilisée pour la réduction du fumarate en succinate. Le mécanisme de la formation du formate chez les espèces de *Bacteroides* est encore inconnu.

Le glucose peut être aussi incorporé dans des polyglucoses (HYLEMON et coll., 1977 ; MOUNTFORT et ROBERTON, 1978).

Le métabolisme de certains pentoses a été également étudié. Chez *B. fragilis* et *B. vulgatus*, les métabolismes du D-ribose et du D-arabinose sont différents. Le D-arabinose est dégradé par un mécanisme qui coupe le sucre au niveau de la liaison C3-C2 et qui entraîne la formation de l'acétate, du succinate et du propionate (CALDWELL et NEWMAN, 1986 ; NEWMAN et CALDWELL, 1987). Mais ce mécanisme n'est pas identique chez toutes les espèces du genre *Bacteroides*. En effet, le métabolisme de D- et L-arabinose par *B. ruminicola* fait intervenir la resynthèse d'hexose couplée à la voie d'Embden-Meyerhof (TURNER et ROBERTON, 1979 ; CALDWELL et NEWMAN, 1986).

C. - La phosphorylation oxydative

Chez *Bacteroides*, l'énergie provient des réactions de la phosphorylation oxydative par un système primitif transporteur d'électrons faisant intervenir le NADH, des flavoprotéines, des quinones et des cytochromes (HARRIS et REDDY, 1977) :



Système du transport d'électrons chez *B. fragilis*
(HARRIS et REDDY, 1977)

B. ruminicola et **B. fragilis** ont un cytochrome de type b qui possède un noyau porphyrinique contenant un atome de fer (WHITE et coll., 1962 ; MACY et coll., 1975 ; MACY et PROST, 1979). La synthèse de ce cytochrome nécessite un apport d'hémine dans le milieu de culture. Le cytochrome b est impliqué dans la formation du succinate à partir du fumarate par la NADH-fumarate-oxydoréductase. L'accepteur final des électrons provenant du catabolisme est donc l'acide fumarique (HARRIS et REDDY, 1977). L'enzyme catalysant la réduction forme un complexe au niveau de la membrane cytoplasmique lié au cytochrome b (YAMAMOTO et coll., 1988).

Le donneur d'électrons le plus commun est NADH, H^+ mais il existe d'autres donneurs qui sont indiqués dans le tableau 6.

IV. - LES BESOINS NUTRITIONNELS PARTICULIERS

Les températures de croissance de **Bacteroides** sont comprises entre 25 et 45°C selon leur origine. Les bactéries synthétisent des acides gras volatils à faible nombre de carbones. Ces acides diminuent le pH des cultures de 7,2 à 5,0, d'où la nécessité de tamponner le milieu.

A. - Besoins en CO_2

Le CO_2 est nécessaire à la voie de fermentation des hydrates de carbone qui produit du succinate ; il participe à la synthèse de l'acide oxaloacétique.

B. fragilis, en présence d'une concentration limitante en CO_2 , augmente l'activité de la PEP carboxylation et le recyclage du CO_2 par décarboxylation du succinate en propionate (CASPARI et MACY, 1983). Les enzymes clefs de ce mécanisme sont la PEP-carboxykinase et la méthyl-malonyl-CoA décarboxylase. Ces deux enzymes sont liés à la membrane et catalysent un transport actif du sodium vers l'extérieur à travers la membrane cellulaire. Un gradient électrochimique du sodium est régénéré, ensuite il pourrait être converti en gradient de protons, qui permet la synthèse de l'ATP, grâce à un antiport Na^+/H^+ (DIMROTH, 1982). Cet ajustement métabolique augmente donc la synthèse d'ATP et par conséquent augmente le rendement de la

Souche	Cytochromes	Donneurs d'électrons
<i>B. amylophilus</i>	-	NADH
<i>B. ureolyticus</i>	b, c	H ₂ , formate
<i>B. succinogenes</i>	b	FMN, FAD
<i>B. fragilis</i>	b, o	NADH, H ₂ , L-(-)-lactate
<i>B. ruminicola</i>	b, o	NADH, H ₂
<i>B. melaninogenicus</i>	b, o c, o	NADH
<i>B. oralis</i>	b, o	ND

Tableau 6 - Quelques caractéristiques de la chaîne du transport d'électrons chez les espèces de Bacteroides (MACY et PROBST, 1979).

croissance. Ceci est bénéfique pour le développement de **Bacteroides** dans leur habitat naturel où la concentration de CO₂ disponible pour la croissance est faible. En principe, le côlon est un milieu riche en CO₂ mais cette quantité est réduite par les autres bactéries qui s'y trouvent.

B. - Besoins en hémine et en vitamine B₁₂

Les **Bacteroides** issus du côlon sont faciles à cultiver sur milieu riche complétement en vitamine B₁₂ et en hémine. Cette dernière stimule la croissance. En effet, en présence d'hémine, le temps de génération passe de 8 h à 2 h avec une augmentation du rendement de la croissance ; le poids sec maximum passe de 4,7 g à 17,9 g/mole du glucose (MACY et coll., 1975). Donc l'hémine est importante, permet la formation du cytochrome b et le bon fonctionnement de la NADH-fumarate-oxydoréductase (MACY et coll., 1978) qui catalyse la synthèse d'acide succinique à partir d'acide fumarique.

La vitamine B₁₂ est nécessaire à la synthèse du propionate car le coenzyme de la méthyl-malonyl-CoA mutase qui catalyse le transfert intramoléculaire d'un groupement méthyl du succinyl-CoA est du type cobamide, dérivé de la vitamine B₁₂.

C. - Autres besoins nutritionnels

Ces besoins sont présentés dans le tableau 7. Les espèces de **Bacteroides** utilisent l'ammoniaque comme une seule source d'azote. Mais, en absence de celui-ci, **B. fragilis** est capable d'utiliser des acides aminés ou des peptides. La cystéine ou les sulfides constituent la principale source de soufre pour **Bacteroides**.

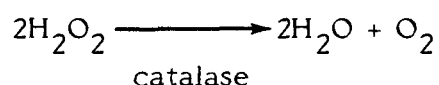
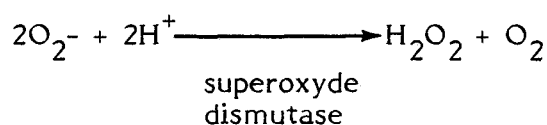
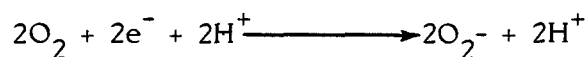
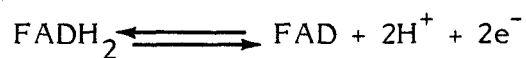
V. - L'EFFET DE L'OXYGENE

Ces bactéries sont anaérobies strictes (HOLDEMAN et coll., 1984) mais elles peuvent néanmoins survivre à des expositions à l'air pendant 6 à 8 h. Ceci serait dû à la présence de catalase et superoxyde-dismutase. La superoxyde-dismutase est une apoprotéine (métalloenzyme) fer-dépendante en anaérobiose

Organisme	Fermentation CO ₂ -dépendante	Source(s) d'azote	Source(s) de soufre	Besoin en vitamines	Stimulation par l'hémine
B. distasonis	+	NH ₃	cystéine sulfure	B ₁₂	+
B. fragilis	+	NH ₃ peptides	cystéine sulfure thioglycolate	B ₁₂	+
B. thetaiotaomicron	+	NH ₃	cystéine sulfure	B ₁₂	+
B. vulgatus	+	NH ₃	cystéine	B ₁₂	+

Tableau 7 - Caractéristiques nutritionnelles pour sélectionner Bacteroides (d'après MACY, 1979 ; modifié).

et magnésium-dépendante en aérobiose (GREGORY, 1985 ; PENNINGTON et GREGORY, 1986) qui catalyse la dismutation du superoxyde (O_2^-) en O_2 et H_2O_2 . Le superoxyde est plus toxique que H_2O_2 , il provient de la réduction univalente de l'oxygène par les transporteurs d'électrons de chaîne d'oxydation cellulaire : flavoprotéines, quinones (GOTTSCHALK, 1986). Les réactions qui détoxifient l'oxygène sont les suivantes :



La superoxyde dismutase est induite par l'oxygène (GREGORY, 1985) et protège *Bacteroides* des dégâts provoqués par la présence d'oxygène : cassures occasionnelles des enveloppes, dégâts au niveau de la membrane cytoplasmique (apparition du vide entre le cytoplasme et les enveloppes, surtout au niveau des pôles) et augmentation de la sensibilité des cellules aux UV en agissant sur le système de réparation des dégâts causés par cette lumière (HASSAN et FRIDOVICH, 1977 ; SALYERS, 1984). La superoxyde dismutase permet à la bactérie de survivre lors du transfert du réservoir à l'hôte. On trouve cet enzyme chez *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. gingivalis* (GREGORY, 1985 ; PENNINGTON et GREGORY, 1986), *B. distasonis* (GREGORY et coll., 1977) et *B. vulgatus* (PRIVALLE et GREGORY, 1979).

VI. - LA PERMEABILITE DE LA MEMBRANE EXTERNE DES BACTERIES A GRAM-NEGATIF

La paroi des bactéries Gram-négatif est constituée d'une couche de muréine et d'une couche supplémentaire située à l'extérieur de celle-ci, la membrane externe. Cette membrane joue un rôle important dans la physiologie de ces

bactéries. En effet, elle confère une résistance à différents agents comme le lysozyme et elle permet l'entrée plus ou moins spécifique des nutriments et l'efflux des produits biosynthétiques.

Il existe deux types de diffusion à travers la membrane externe : diffusion non spécifique et diffusion spécifique. Tous les deux sont effectués par l'intermédiaire des protéines, dont l'arrangement spatial forme des pores ou canaux.

A. - Les canaux de diffusion non spécifique : les porines

Ce sont des pores non spécifiques qui permettent le passage à travers la membrane externe de petites molécules hydrophiles de dimension inférieure à 600 daltons (NAKAE et NIKAIDO, 1975 ; DECAD et NIKAIDO, 1976). Les porines sont constituées de trois protéines. Sur le dessin de la figure 5, les trois canaux situés au niveau de la surface externe émergent en un canal unique au niveau de l'espace périplasmique.

En 1985, ALVES et coll. ont observé que les porines interviennent dans le transport des peptides à travers la membrane externe, elles facilitent la diffusion de ces composés lors du transport. Ces porines sont OmpF, OmpC et PhoE.

Le fonctionnement de ces canaux est lié à la présence, d'une part des lipopolysaccharides (LPS) et, d'autre part, des protéines périplasmiques. Ces dernières sont situées dans l'espace périplasmique délimité par la membrane cytoplasmique et la paroi. En ce qui concerne les LPS, les porines ont une très forte affinité pour ces macromolécules. Celles-ci peuvent jouer un rôle important au niveau de l'ouverture et de la fermeture de ces canaux (SCHINDLER et ROSENBUSCH, 1978 ; FURUKAWA et coll., 1979 ; OVERBEEKE et coll., 1980).

En ce qui concerne les protéines périplasmiques, cette diffusion non spécifique du canal emprunté semble, en général, favorisée par l'activité de protéine de liaison spécifique d'un substrat et dont la fixation sur la porine réorganise le canal en faveur d'un passage accéléré de ce substrat (LO et SANWAL, 1975 ; LO et BEWICK, 1981).

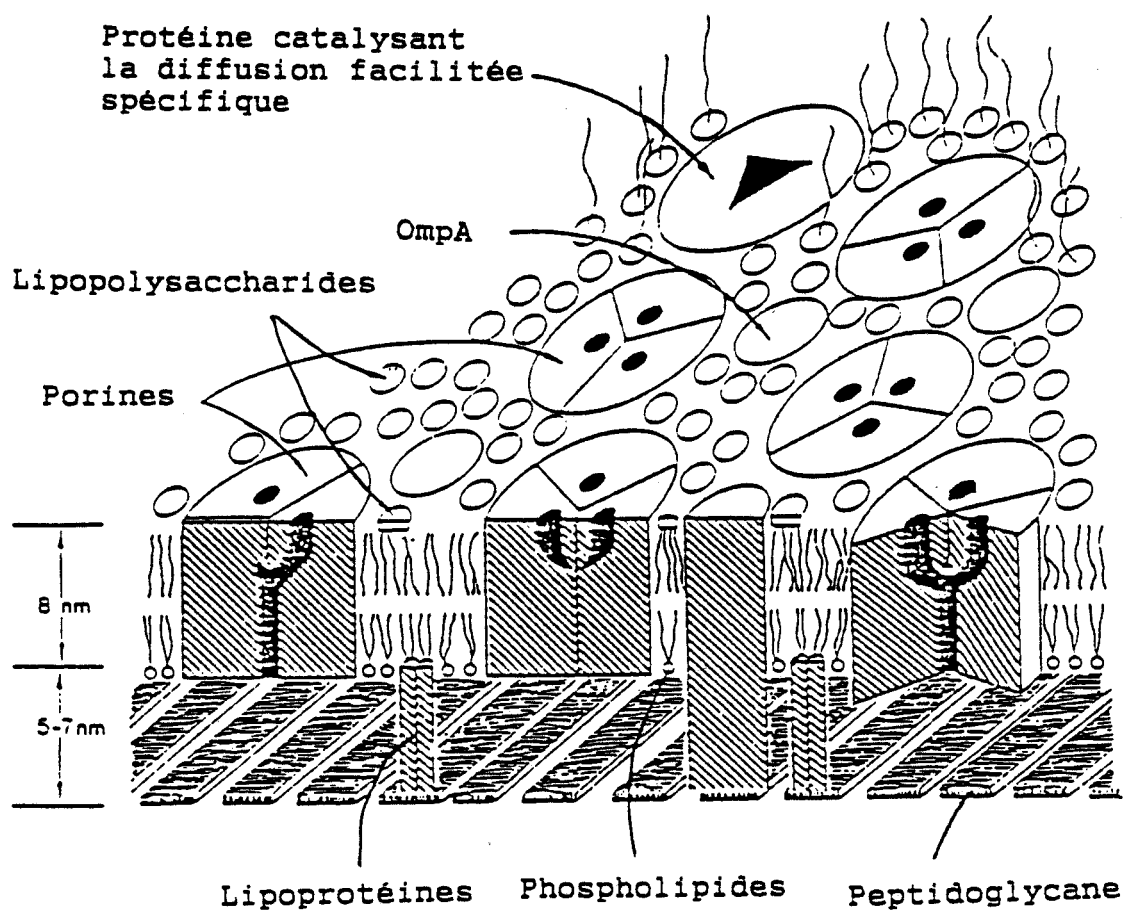


Figure 5 - Modèle schématique de la membrane externe d'*Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* (d'après NIKAIDO et VAARA, 1985).

OmpA : Outer membrane protein A.

B. - Les canaux de diffusion spécifique

Ils sont responsables de la perméabilité sélective des substances telles que le maltose et les maltodextrines, les nucléosides et la vitamine B₁₂.

1 - Exemple du maltose et dérivés

Le maltose et les maltodextrines diffusent chez les entérobactéries par un canal formé par la protéine LamB : protéine réceptrice du phage λ (NIKAIDO et VAARA, 1985).

Le canal est appelé aussi maltoporine car il achemine également d'autres substances comme les aminoacides et d'autres hydrates de carbone (LO et SANWAL, 1975 ; LUCKEY et NIKAIDO, 1980). En effet, le canal LamB laisse diffuser facilement des monosaccharides mais il est plus discriminatoire pour les saccharides de plus en plus grands. Néanmoins, le canal est complètement spécifique pour les trisaccharides. Par exemple, le maltotriose diffuse 100 fois plus vite que d'autres trisaccharides comme le raffinose (LO et SANWAL, 1975).

OVERBEEKE et coll. (1980) ont montré que l'interaction physique entre la protéine LamB et les protéines périplasmiques (maltose "binding protein") joue un rôle important et nécessaire pour le transport "efficace" des maltodextrines à travers le canal.

2 - Exemple du glucose

MIZUMO et KAGEYAMA (1978) ont remarqué que *Pseudomonas aeruginosa*, cultivé en présence du glucose, produit une protéine D, située au niveau de la membrane externe. L'analyse de cette protéine a montré qu'elle est constituée de deux éléments appelés D₁ et D₂. Seul D₁ permet le passage spécifique du glucose au travers du canal de diffusion qu'il présente (HANCOCK et CAREY, 1980).

C. - Conclusion

Mis à part le transport du glucose ou de certains trisaccharides, il semble que, d'une façon générale, les différents nutriments et, en particulier, les monosaccharides, atteignent l'espace périplasmique par diffusion passive non spécifique au travers de la membrane externe.

VII. - LE TRANSPORT DES HYDRATES DE CARBONE A TRAVERS LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE ET SA REGULATION

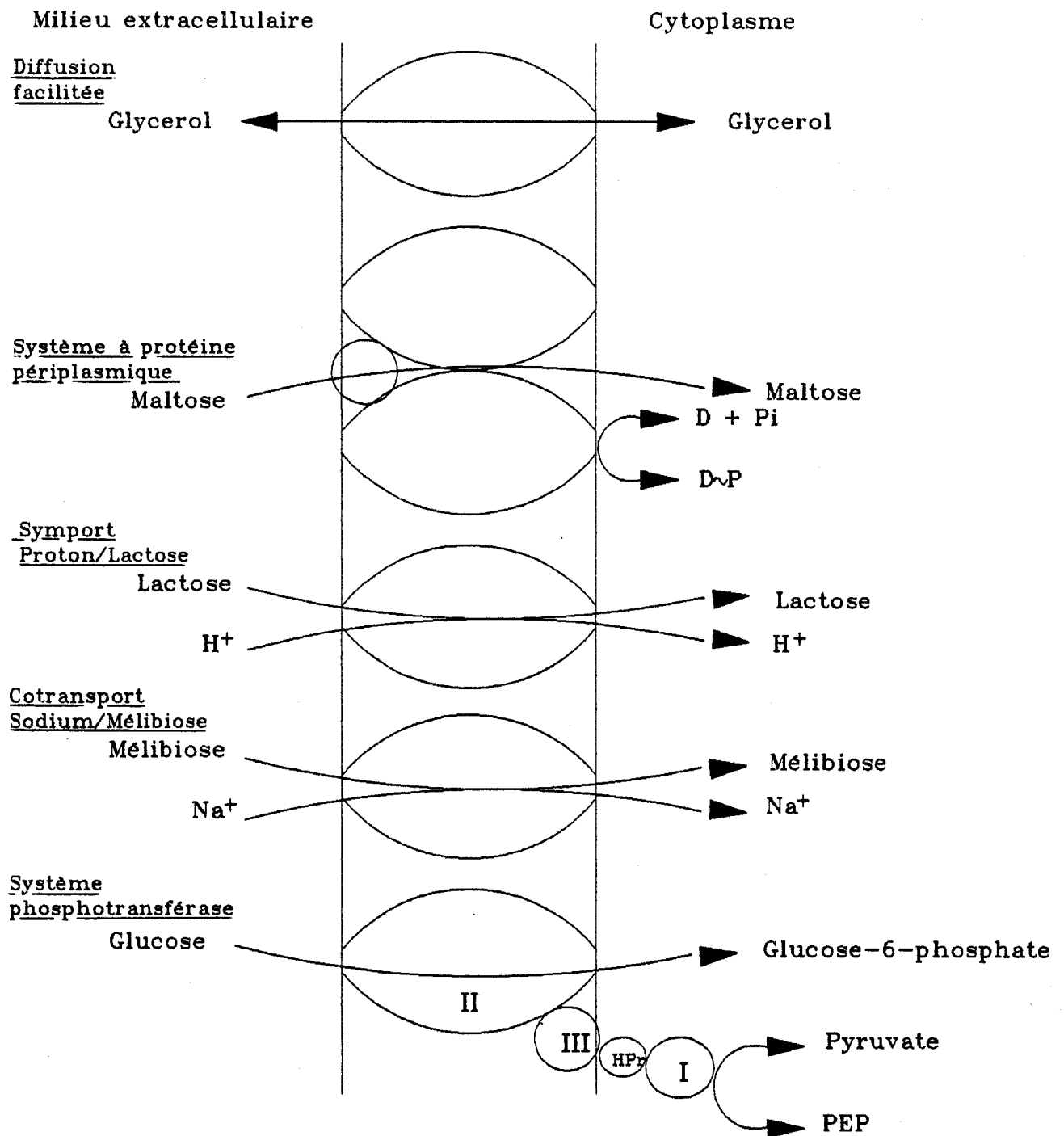
La membrane cytoplasmique est une barrière de protection cellulaire qui empêche d'une part la fuite des composés intracytoplasmiques, quel que soit leur poids moléculaire, d'autre part les pénétrations anarchiques de constituants extracellulaires. Elle absorbe cependant les éléments utiles au métabolisme, excrète d'autres molécules ou élimine les déchets. Elle régit donc l'entrée et la sortie des métabolites.

L'acquisition des nutriments est une fonction primordiale de tous les organismes vivants car la plupart des activités cellulaires sont dirigées à travers celle-ci. Une étape essentielle de cette acquisition est leur transport du milieu extérieur vers le cytoplasme où le métabolisme a lieu.

Les systèmes de transport des hydrates de carbone ont été largement étudiés chez les bactéries et, en particulier, chez *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Bacillus subtilis*. On connaît, actuellement, 5 systèmes de transport de carbohydrates chez les microorganismes. Ces 5 systèmes sont schématisés dans la figure 6.

A. - La diffusion facilitée

Dans ce cas, il y a diffusion à travers la membrane jusqu'au moment où les concentrations en substrats sont identiques dans les deux compartiments intra- et extracellulaire. Ce processus ne nécessite pas un apport d'énergie.



I, HPr, III, II : protéines du système phosphotransférase

Figure 6 - Les 5 mécanismes du transport des hydrates de carbone chez les bactéries (DILLS et coll., 1980).

Les seuls hydrates de carbone accumulés par diffusion facilitée, et actuellement connus, sont le maltose chez *Staphylococcus aureus* (BUTTON et coll., 1973) et le glycérol. Le transport de ce dernier a été étudié chez *E. coli* et *S. typhimurium*. Il a été également étudié chez *Pseudomonas* (TSAY et coll., 1971), *Klebsiella* (SANNON et coll., 1968), *Shigella* (RICHEY et LIN, 1972), *Bacillus* (SAHEB, 1972) et *Nocardia* (CALMES et DEAL, 1972). Des études effectuées chez *E. coli* (HAYASHI et LIN, 1965 ; SANNON et coll., 1968) ont montré que la "capture" du glycérol est réalisée par une protéine membranaire qui fonctionne en association avec une kinase cytoplasmique (Fig. 7).

Le transporteur du glycérol est induit lors des cultures sur ce substrat et la glycérokinase, qui est le premier enzyme de la dégradation, joue un rôle très important lors du transport du glycérol. En effet, des mutants qui ne possèdent pas cet enzyme sont incapables d'accumuler le glycérol. D'autre part, le Km de la glycérokinase pour son substrat et le Km du système de transport pour le glycérol sont très proches, indiquant ainsi que l'accumulation de ce substrat est liée à l'action de la glycérokinase. La diffusion facilitée fournit à la glycérokinase une concentration saturante en glycérol. L'excès de glycérol est expulsé du cytoplasme par une diffusion passive à travers la bicouche lipidique membranaire puisque le glycérol est liposoluble.

B. - Les systèmes à protéines périplasmiques

Ces systèmes font appel à des protéines de liaisons libres dans l'espace périplasmique, porteuses de sites d'affinité pour le substrat transporté. Ils sont mis en évidence chez les bactéries Gram-négatives par désagrégation de la paroi qui aboutit à la perte de l'activité perméasique. En effet, sous l'action de différents traitements, il y a libération dans le milieu des protéines périplasmiques (LEINE, 1965 ; NEU et HEPPEL, 1965 ; STINSON et coll., 1976). Les perméases étudiées chez *E. coli* sont données en exemple dans le tableau 8.

Le mode d'énergisation de ces systèmes perméasiques a été déterminé en utilisant les inhibiteurs métaboliques. Deux modèles d'énergisation sont envisageables :

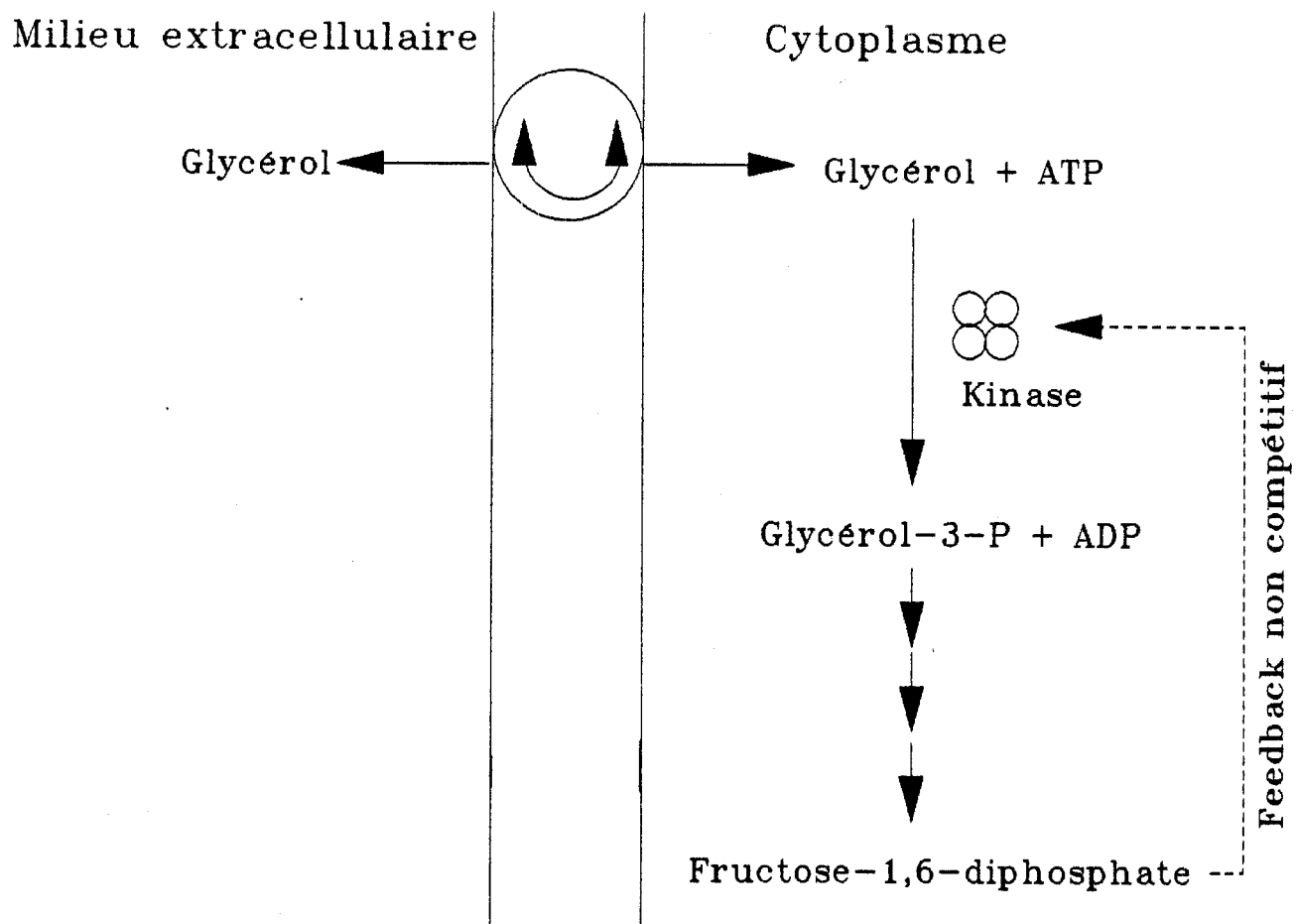


Figure 7 - Le système de transport du glycérol d'après ANDREWS et LIN (1976)

Système	Substrats	Locus génétique	Binding protein (M.M.)
arabinose	L-arabinose, D-fucose, D-galactose, β -méthyl-L-arabinoside, D-xylose, β -méthyl-D-galactoside, lactose	<u>araE</u>	38 000
maltose	maltose, maltotriose et maltodextrines	<u>malE</u>	37 000
méthyl- β -galactose	D-glucose, D-galactose, β -glycérol-galactoside, L-arabinose, 6-déoxy-D-glucose, D-fucose, β -méthylgalactoside xylose	<u>mglA</u> , <u>mglB</u> , <u>mglC</u>	35 000
ribose	ribose, ribulose	<u>rbsP</u>	30 000
xylose	xylose	<u>xylT</u>	ND

Tableau 8 - Les systèmes de transport à protéines périplasmiques des hydrates de carbone chez E. coli (d'après DILLS et coll., 1980).

ND : Non Déterminé.

- énergisation par le flux protons,
- énergisation par l'hydrolyse de l'ATP.

Les découplants énergétiques (2,4-Dinitrophénol, azide et carbonyl cyanurée-m-chlorophényl hydrazone) inhibent partiellement l'accumulation du maltose (FERENCI et coll., 1977).

L'arséniate inhibe fortement le fonctionnement de ce système (PARNES et BOOS, 1973 ; FERENCI et coll., 1977) par une réduction importante du "pool" intracellulaire de l'ATP (KLEIN et BOYER, 1972).

Il semble donc que tous les systèmes de transport à protéines périplasmiques soient énergisés par l'ATP. Mais, en 1979, HONG et coll. ont montré que ces systèmes tirent leur énergie de l'hydrolyse de l'acétyl-phosphate, composé très énergétique, dont la synthèse dépend de l'ATP.

La reconstitution des protéoliposomes, à partir de la perméase purifiée et des phospholipides bactériens, a permis de déterminer que c'est l'hydrolyse de l'ATP qui fournit l'énergie nécessaire à la perméation (AMES, 1990).

Les systèmes à protéines périplasmiques chez *E. coli* sont constitués d'un complexe membranaire de 4 protéines membranaires (2 hydrophobes et 2 hydrophiles portant des sites de fixation de l'ATP) et d'une protéine périplasmique (AMES, 1990 ; DAVIDSON et NIKAIDO, 1991). Dans le cas du maltose, les 4 protéines membranaires sont : 2 MalK, 1 MalF et 1 MalG. Au cours du transport, ces protéines subissent une série de changements conformationnels initiés par la fixation du substrat sur la protéine périplasmique. Ceci est illustré dans le modèle de la figure 8 proposé par AMES (1990). La protéine périplasmique, portant le substrat, change sa conformation pour pouvoir se fixer sur le complexe membranaire. La conformation de ce dernier est modifiée de façon à hydrolyser de l'ATP qui ouvrira le pore. Ainsi, une diffusion unidirectionnelle du substrat vers l'intérieur se fera. Une fois que le substrat est libéré dans le cytoplasme, un changement conformationnel fermera le pore et rend la protéine périplasmique moins affine pour le complexe membranaire ; elle se détache. Le complexe fixe, par la suite, de l'ATP pour démarrer un autre cycle d'accumulation du substrat.

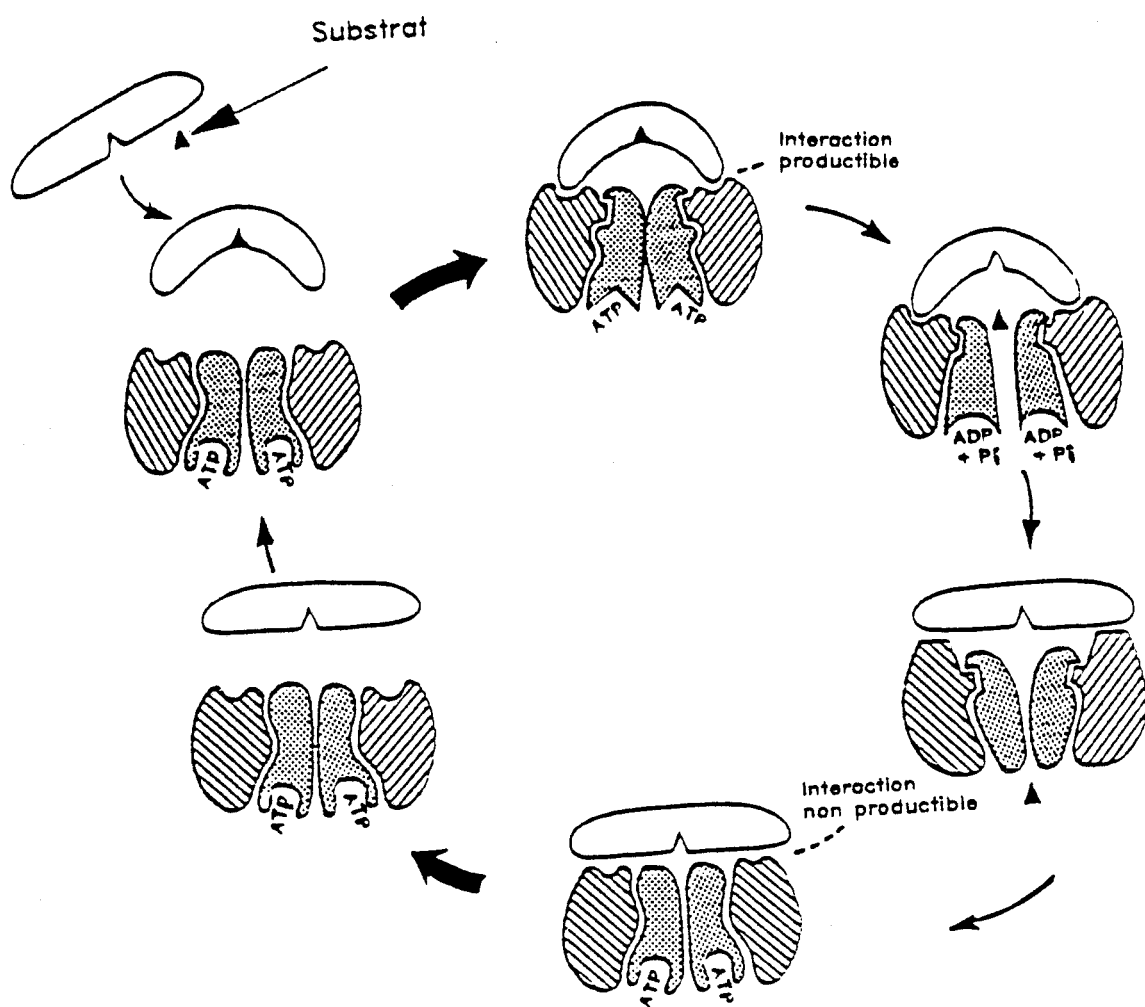


Figure 8 - Modèle général des systèmes à protéine périplasmique (AMES, 1990).

C. - Les systèmes à transporteur mobile

Ces systèmes ne font intervenir qu'une seule protéine membranaire qui est responsable à la fois de la reconnaissance des substrats et de leur translocation à travers une membrane énergisée par un gradient de protons.

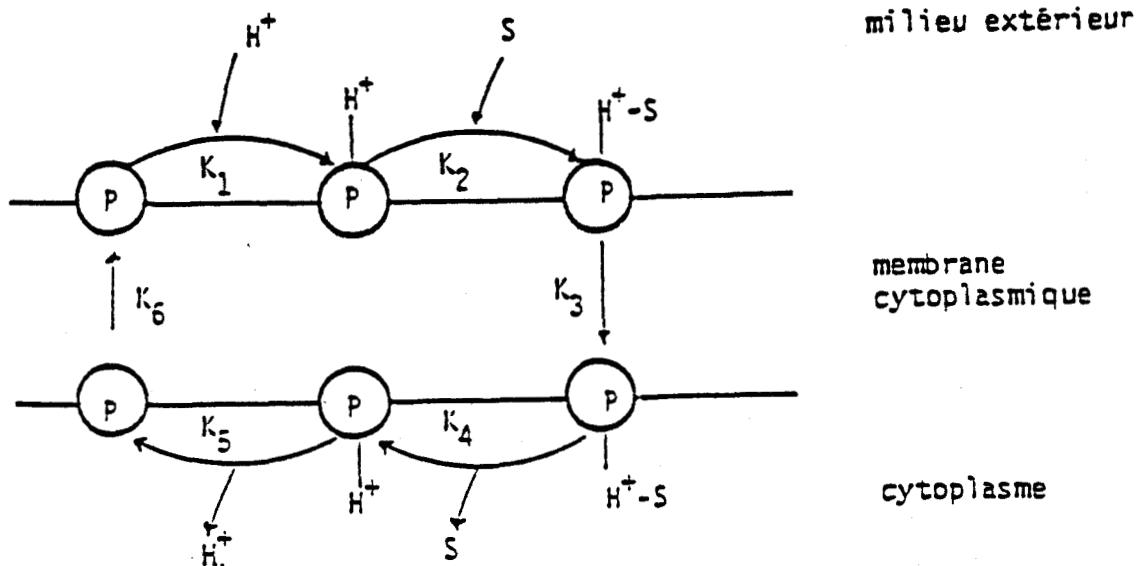
I - La perméase du lactose

La perméase du lactose, appelée aussi symport lactose-proton, est le premier système de transport décrit chez *E. coli* (COHEN et RICKENBERG, 1955).

Cette perméase peut également transporter le mélibiose et une variété de galactosides. Il a une affinité plus grande pour les liaisons α que pour les liaisons β (OLSEN et BROOKER, 1989).

Cette unique protéine membranaire, appelée protéine M, est codée par le gène lacY et fonctionne différemment en fonction de la disponibilité de l'énergie dans la cellule. En absence d'énergie, elle assure un transport passif du substrat à travers la membrane cytoplasmique. Par contre, dans des conditions favorables, résultant de la formation d'un gradient de pH à travers la membrane cellulaire, le substrat s'accumule selon la figure 9 (HAROLD, 1972 ; KABACK, 1974). L'affinité perméase-substrat augmente quand la membrane est protonée. La protéine change de conformation et présente le substrat et le proton au niveau de la face interne de la membrane cytoplasmique pour les relarguer dans le cytoplasme.

Les étapes de ce mécanisme sont représentées par l'équation suivante :



où P, représente la perméase ; H^+ , le proton ; S, le substrat : un galactoside.

Ce système nécessite une sortie de protons qui se réalise par deux mécanismes différents selon les conditions d'oxygénation (Fig. 9).

Dans les conditions d'aérobiose, le flux de protons est lié à la fois au système de transport d'électrons et au complexe ATPasique, et, dans les conditions d'anaérobiose, il est lié soit à l'activité du complexe ATPasique, soit à un gradient des produits finaux lors de leur excrétion dans le milieu extérieur.

L'énergie qui permet d'accumuler une molécule de substrat est équivalente à la moitié de l'énergie d'une liaison pyrophosphate (SIMONI et ROSEMAN, 1973). En effet, l'hydrolyse d'une molécule d'ATP est capable de transférer dans le milieu extracellulaire deux protons et l'entrée d'une molécule de substrat est accompagnée d'un proton.

Le symport lactose-proton est inhibé par :

- un substrat compétitif,
- un découplant énergétique qui dissipe l'énergie créée par le flux d'électrons,
- des agents chimiques complexants, tel que le N-éthylmaléimide (NEM) qui bloque les fonctions -SH libres du système de transport du lactose.

2 - La perméase à mélibiose

Il s'agit en fait d'un cotransport sodium-mélibiose, inductible et décrit pour la première fois chez *S. typhimurium* (STOCK et ROSEMAN, 1971) par utilisation d'un analogue structural non métabolisable. Le mécanisme de ce transport est indiqué par l'équation suivante :

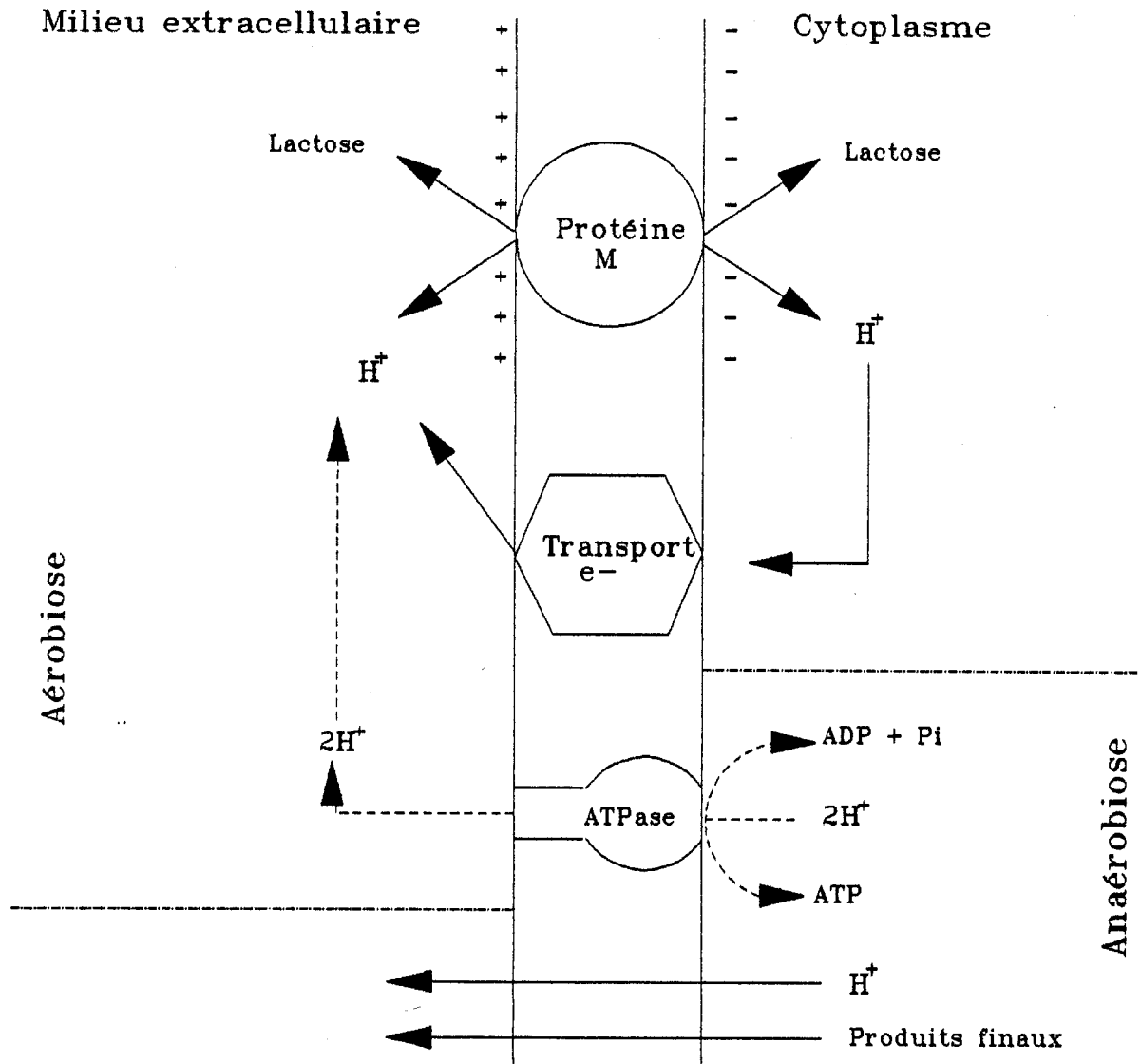
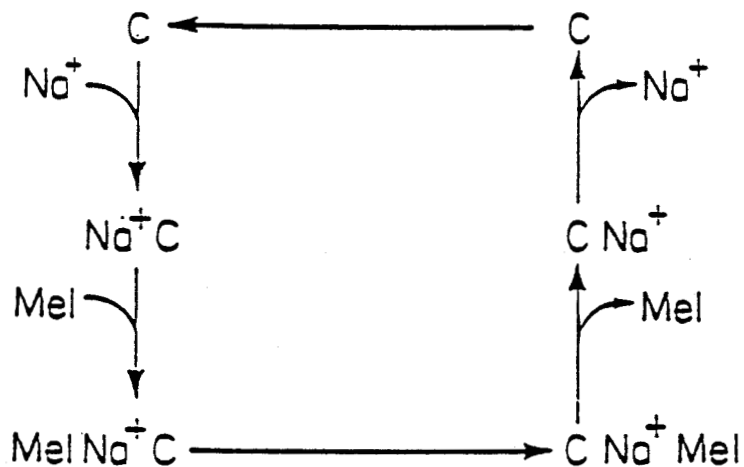


Figure 9 - La lactose perméase.

milieu extérieur

membrane
cytoplasmique

cytoplasme



où C, représente la perméase ; Mel, mélibiose ; Na⁺, sodium (POURCHER et coll., 1989).

Ce système est différent de la perméase du lactose par le fait qu'il dépend de la présence d'ions sodium (Na⁺) ou lithium (Li⁺) et du pH extracellulaire. Il est sensible au chauffage (BURSTEIN et KEPES, 1985). Cette perméase, chez *E. coli*, est capable de transporter un grand nombre d'autres substrats : des α -galactosides, des β -galactosides et quelques monosaccharides. Les β -galactosides sont transportés avec Na⁺ et non avec Li⁺ (WILSON et WILSON, 1987).

La nature de l'énergisation de la mélibiose perméase a été déterminée par l'effet des inhibiteurs métaboliques en utilisant des cellules entières ou des vésicules membranaires d'*E. coli* ne possédant pas la lactose perméase (LOPILATO et coll., 1978). Ce système est fortement inhibé par le N-Ethyl Maléimide et le Carbonyl Cyanurée-m-chlorophényl hydrazone démontrant ainsi que la perméase possède à son site actif des groupements -SH et que le transport est énergisé par un gradient de protons. Les inhibiteurs de la glycolyse, comme l'iodoacétate, n'affectent pas l'accumulation de Thio-Méthyl-Galactoside.

Le gradient de protons joue donc un rôle très important au niveau de la création de l'énergie nécessaire pour effectuer l'accumulation du Thio-Méthyl-Galactoside et des ions sodium. La sortie de protons est réalisée, en partie, par le système ATPasique (VAN THIENEN et coll., 1978).

D. - Le système phosphotransférase

Le système PEP-PTS des carbohydrates est très répandu chez les bactéries (Tab. 9).

C'est un système particulier puisque le substrat accumulé est modifié dans le cytoplasme. Il apparaît, à sa place, un hexose phosphate dans le cas d'un système hexose phosphotransférase (KUNDING et coll., 1964). Il fait intervenir un certain nombre d'enzymes protéiques solubles et membranaires (Fig. 10).

Le schéma proposé par DILLS et coll. (1980), dans la figure 9, a été récemment complété par LENGELER (1990) (Fig. 11).

Ces protéines catalysent le transfert d'une molécule de phosphate du phosphoénol-pyruvate (PEP) à l'hydrate de carbone en présence d'ions Mg^{2+} et les produits formés sont le pyruvate et le substrat phosphorylé. Le groupement phosphate se fixe sur un résidu de cystéine ou un résidu d'histidine selon l'enzyme impliqué.

Les deux premières protéines qui interviennent dans ce mécanisme, l'enzyme I et une protéine de faible poids moléculaire, l'Hpr, ne sont pas spécifiques de chaque substrat. Elles ont été purifiées et caractérisées chez plusieurs souches bactériennes (POSTMA et ROSEMAN, 1976). La seconde étape du transfert est effectuée par les enzymes II et III, qui sont spécifiques de chaque hydrate de carbone et qui sont considérés comme une seule unité chez *E. coli* dans le cas de la perméase aux β -galactosides (SAIER et coll., 1988). L'enzyme III est situé sur la face interne de la membrane et l'enzyme II y est totalement intégré renfermant une partie hydrophobe et une partie hydrophile qui porte le site de phosphorylation et le site de fixation du substrat (LENGELER, 1990).

Genres	Réaction Gram	Substrats
Rhodopseudomonas	-	fructose
Rhodospirillum	-	fructose
Thiocapsa	-	fructose
Thiocystis	-	fructose
Ancalomicrobium	-	général
Spirochaeta	-	mannitol
Pseudomonas	-	fructose
Alcaligenes	-	fructose
Beneckea	-	général
Escherichia	-	général
Klebsiella	-	général
Photobacterium	-	général
Salmonella	-	général
Serratia	-	général
Fusobacterium	-	fructose
Megasphaera	-	glucose, fructose
Staphylococcus	+	général
Streptococcus	+	général
Bacillus	+	général
Clostridium	+	fructose, mannitol
Brochotrix	+	général
Lactobacillus	+	général
Arthrobacter	+	fructose, rhamnose
Mycoplasma		général

Tableau 9 - Distribution du système de transport PTS chez les procaryotes (d'après DILLS et coll., 1980).

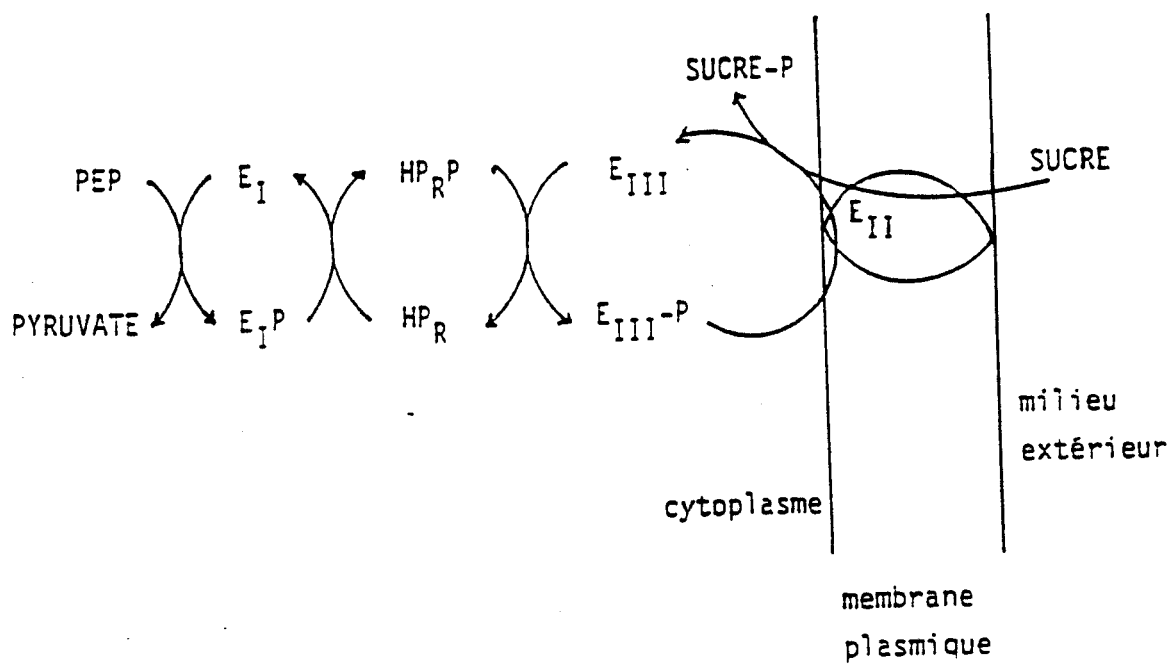


Figure 10 - Le système hexose-PTS chez *E. coli* et *S. typhimurium* (d'après DILLS et coll., 1980).

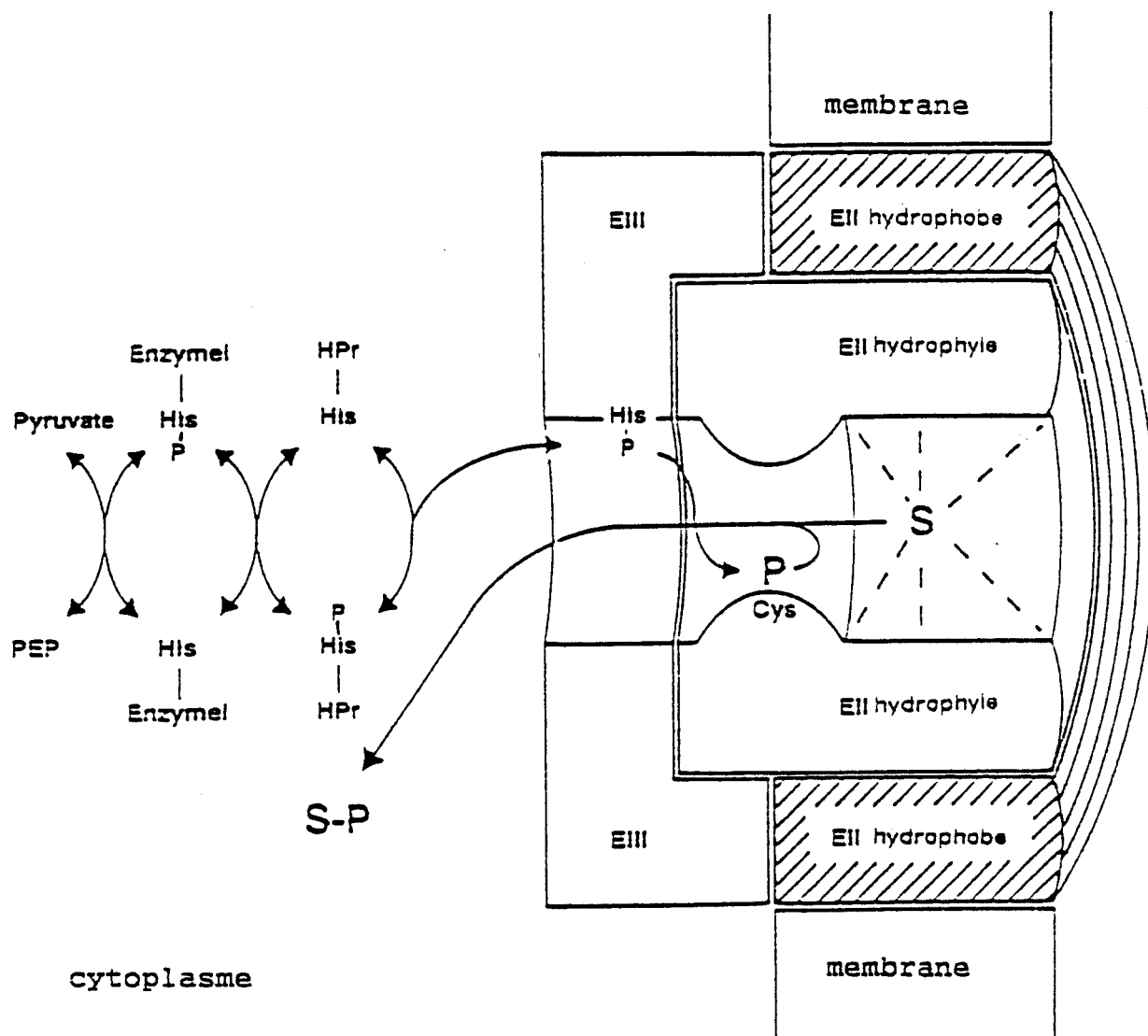


Figure 11 - Vue schématique du système phosphotransférase PEP-dépendant selon LENGELER (1990).

S : substrat.

P : groupement phosphate.

L'effet des inhibiteurs sur ce système de transport est différent de celui décrit pour les autres systèmes perméasiques puisque les découplants énergétiques stimulent l'accumulation des substrats (HAGUENAUER et KEPES, 1971 ; REIDER et coll., 1979). Il est possible que l'enzyme II soit une pompe à protons dépendante de la présence du sucre et du potentiel redox positif du milieu extracellulaire. Plus la positivité est importante, plus l'accumulation du sucre est élevée (ERNI, 1990). L'énergie utilisée pour faire sortir des protons provient de la première réaction de ce système : déphosphorylation du PEP en pyruvate.

Le fluorure, inhibiteur de la synthèse du PEP, est également inhibiteur du transport dans certaines conditions (HAGUENAUER et KEPES, 1972).

L'énergisation de ce système se fait donc par la déphosphorylation du PEP en pyruvate. Cette réaction est exergonique, libère 14,7 kcal/mol. Le transport du sucre n'utilise qu'une partie de cette énergie, le reste permettrait le flux de protons vers l'extérieur ou/et interviendrait dans la régulation de l'accumulation. En effet, lorsque la concentration en substrat phosphorylé est proche de la concentration limite de solvatation dans le cytoplasme, il y a ainsi une expulsion active du substrat en excès (WEIGEL et coll., 1982). Cette sécrétion est la seule voie pour maintenir la concentration intracellulaire (THOMPSON, 1988).

Ce système existe de façon prédominante chez les bactéries anaérobies qui métabolisent l'hydrate de carbone par la voie d'Embden-Meyerhof pour fournir deux molécules de PEP par molécule d'hexose utilisée. D'autre part, chez les bactéries aérobies strictes, il y a métabolisation des hexoses par la voie d'Entner-Doudoroff et le système PEP-PTS est rare. La voie d'Entner-Doudoroff libère de l'énergie sous forme d'ATP ou de gradient électrochimique de protons. Il est donc avantageux, pour ces souches, d'utiliser directement cette forme d'énergie pour réaliser le transport plutôt que le mécanisme qui fait appel à la voie métabolique de la synthèse de PEP.

Certaines exceptions existent : quelques espèces de **Bacillus** et d'**Arthrobacter** dégradent les hydrates de carbone par glycolyse et développent des systèmes de transport PEP-PTS.

E. - La régulation des systèmes perméasiques

Le transport est la première étape de l'utilisation d'un hydrate de carbone ; il est en général assuré par des protéines enzymatiques, qui, comme les autres enzymes, sont régulées génétiquement au niveau de leur synthèse ou chimiquement au niveau de leur fonctionnement.

Deux aspects de régulation sont possibles : l'un est commun à l'ensemble des systèmes enzymatiques (effets glucose), l'autre est spécifique de la régulation des perméases autres que les PTS.

1 - "Les effets glucose"

Chez de nombreux genres bactériens, le glucose joue un rôle régulateur métabolique important. Il peut inhiber l'utilisation de divers substrats selon deux mécanismes :

- l'exclusion d'inducteur,
- la répression catabolique.

a) L'exclusion d'inducteur

C'est le mécanisme selon lequel le glucose inhibe l'entrée de substrats dont l'utilisation nécessite la synthèse d'enzymes inductibles.

b) La répression catabolique

Il existe deux types de répression catabolique : la répression catabolique permanente et la répression catabolique transitoire.

La répression catabolique permanente est une répression plus ou moins sévère des enzymes cataboliques par le glucose, l'autre est une inhibition immédiate et transitoire de la synthèse enzymatique au moment de l'addition du glucose à une culture sur un substrat consommé plus lentement. La répression catabolique n'est pas un phénomène du "tout ou rien". Certains opérons sont plus réprimés que d'autres.

Les substrats, rapidement métabolisables, provoquent une diminution de l'AMPc intracellulaire, ce qui entraîne une inhibition de l'expression de gènes inductibles ou constitutifs. Cette inhibition est levée par l'addition de l'AMPc qui s'associe avec la protéine CRP (Fig. 12). Ce complexe agit au niveau de l'ADN, facilite la fixation de l'ARN polymérase et, par conséquent, la transcription. Cependant, l'AMPc n'est pas le seul modulateur : il existe d'autres intermédiaires cataboliques. En effet, les taux intracellulaires de ce nucléotide AMPc sont plutôt la conséquence et non la cause de la répression catabolique (ULLMAN, 1985). Ainsi, ULLMAN propose que l'expression des gènes est régulée soit négativement par des catabolites, soit positivement par le complexe AMPc-CRP (Fig. 13).

c) La relation entre répression catabolique et exclusion d'inducteur

L'inhibition de l'expression des gènes cataboliques peut être également effectuée par un mécanisme d'exclusion d'inducteur du cytoplasme. Certains auteurs (DILLS et coll., 1980) ont pensé que la répression des enzymes cataboliques par le glucose devrait être due, en premier lieu, à un manque d'entrée de substrat inducteur dans la cellule. Ceci est exact pour des enzymes inductibles et non pour les systèmes constitutifs. En effet, la comparaison des systèmes constitutifs et inductibles (Tab. 10) a permis de dissocier les deux phénomènes de l'inhibition de l'expression des gènes (HEFFERMAN et coll., 1976 ; TAYLOR et YUDKIN, 1978 ; JOSEPH et coll., 1981).

Lorsque les pourcentages d'inhibition provoqués par le glucose sont très proches, quelle que soit la souche étudiée, on parle de répression catabolique. C'est le cas de la β -galactosidase et de la tryptophanase. Par contre, l'amylomaltase et l'UDP-Gal-épimérase ont des pourcentages d'activités enzymatiques très différents chez les deux types de souches : l'inhibition provoquée par le glucose chez les souches inductibles est en grande partie ou totalement levée chez les souches constitutives. On conclut donc que le seul "effet glucose" est l'exclusion d'inducteur. L'expression de l'opéron arabinose (L-arabinose épimérase) implique certainement les deux phénomènes précédents.

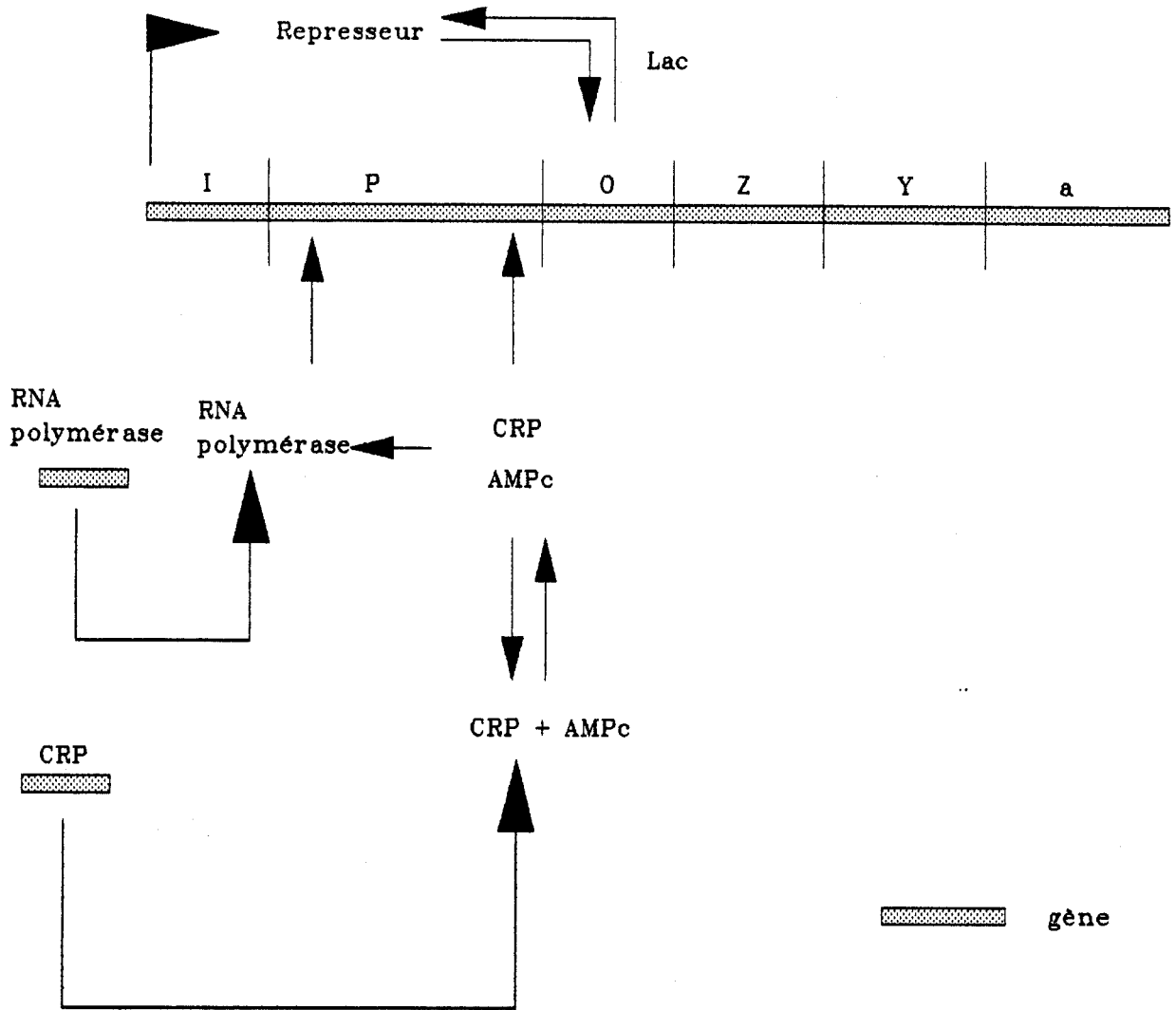
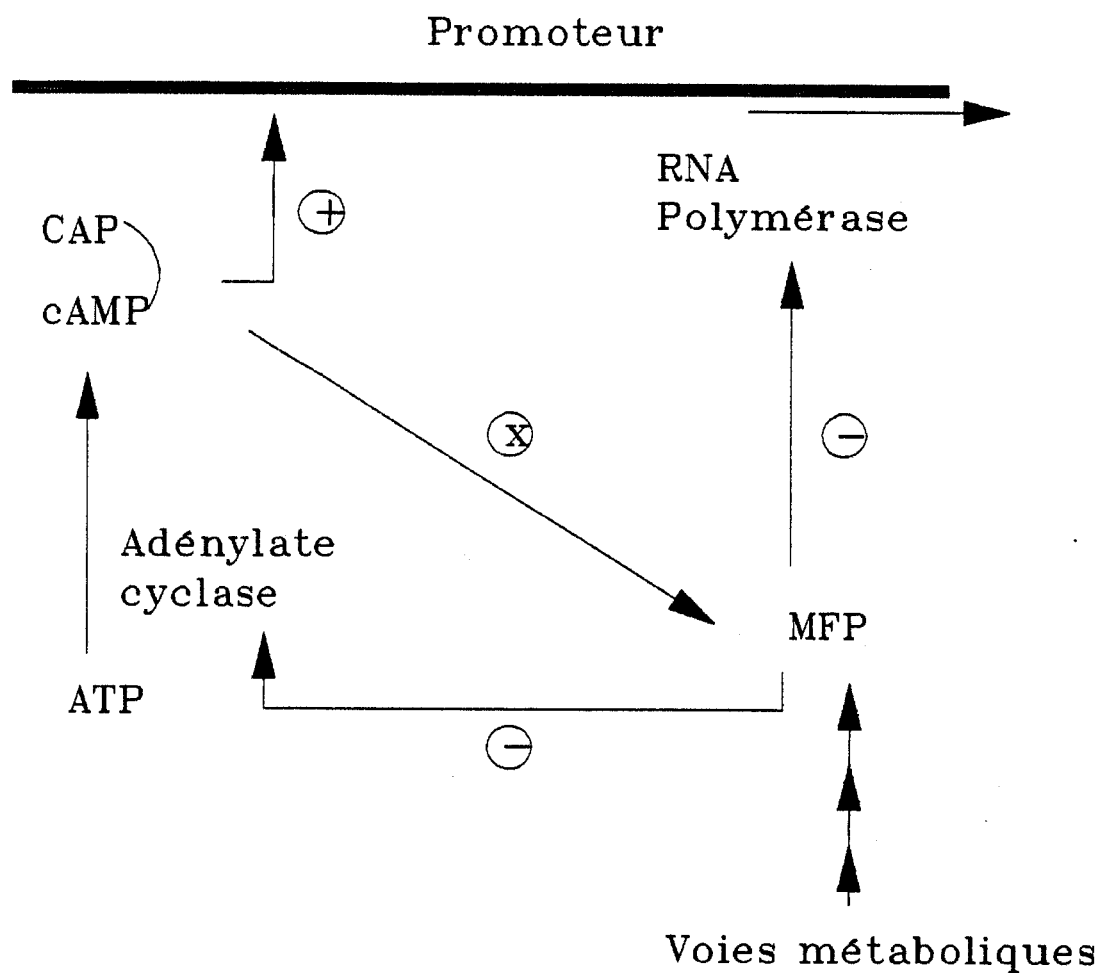


Figure 12 - Modèle d'action de l'AMPc sur l'opéron lactose (PASTAN et PERLMAN, 1970).



MFP : Protéine Facteur Modulateur

Figure 13 - Modèle schématique de la relation entre le contrôle positif de l'expression des gènes et la régulation négative de la répression catabolique (ULLMANN, 1985).

	Souche sauvage (inductible)	Souche constitutive	Nature de l'inhibition
β -galactosidase	(lac) 40	40	répression catabolique
Amylomaltase	(mal) 4	60	exclusion d'inducteur
UDP-Gal-épimérase	(gal) 35	100	exclusion d'inducteur
Tryptophanase	(tna) 3,7	3,2	répression catabolique
L-arabinose-épimérase	(ara) 25	60	répression catabolique et exclusion d'inducteur

Tableau 10 - Comparaison des quelques activités enzymatiques chez des souches sauvages et constitutives d'E. coli.

Les résultats sont exprimés en % de l'activité enzymatique chez des cellules cultivées sur glucose par rapport à l'activité mesurée chez les cellules cultivées sur glycérol (d'après ULLMANN, 1985, modifié).

2 - La régulation de la perméation non-PTS des hydrates de carbone et de l'adénylate cyclase par le système PTS

Le système PTS intervient dans la régulation du transport des hydrates de carbone qui ne sont pas accumulés par ce système (SAIER, 1977 ; DILLS et coll., 1980).

L'enzyme III^{Glc} du système PTS joue un rôle fondamental dans cette régulation. En effet, la forme phosphorylée de cette enzyme est nécessaire pour assumer la pleine activité de l'adénylate cyclase. Par ailleurs, il a été montré, tant *in vitro* qu'*in vivo*, que la forme non-phosphorylée inhibait les perméases des sources de carbone ne dépendant pas du PTS (Fig. 14).

Lorsque les bactéries croissent en présence de glucose, l'entrée du sucre conduit immédiatement à une diminution de la concentration intracellulaire de la forme phosphorylée de l'enzyme III^{Glc} , ce qui diminue la synthèse d'AMP cyclique (et diminue donc l'expression des opérons cataboliques) ; par ailleurs, la concentration de la forme non-phosphorylée croît, ce qui inhibe les autres perméases et explique ainsi directement l'exclusion des substrats autres que le glucose.

Un autre modèle a été proposé par OSUMI et SAIER (1982). Il représente l'interaction allostérique entre les constituants du PTS et la perméase à lactose chez *E. coli* (Fig. 15). L'enzyme III^{Glc} phosphorylé ou déphosphorylé forme un complexe avec la lactose perméase et l'Hpr du système PTS. A l'état non phosphorylé, le lactose se fixe sur sa perméase, il altère la conformation de celle-ci qui devient plus affine pour l'enzyme III^{Glc} . Ce changement conformationnel induit alors une nouvelle conformation de l'enzyme III^{Glc} dont l'affinité pour l'Hpr diminue. Dans ce cas, le complexe lactose-lactose perméase-enzyme III^{Glc} est moins actif que le complexe lactose-lactose perméase. Par contre, la phosphorylation de l'enzyme III^{Glc} modifie sa conformation de telle sorte que son affinité pour la lactose perméase diminue et l'effet inhibiteur se trouve ainsi réduit.

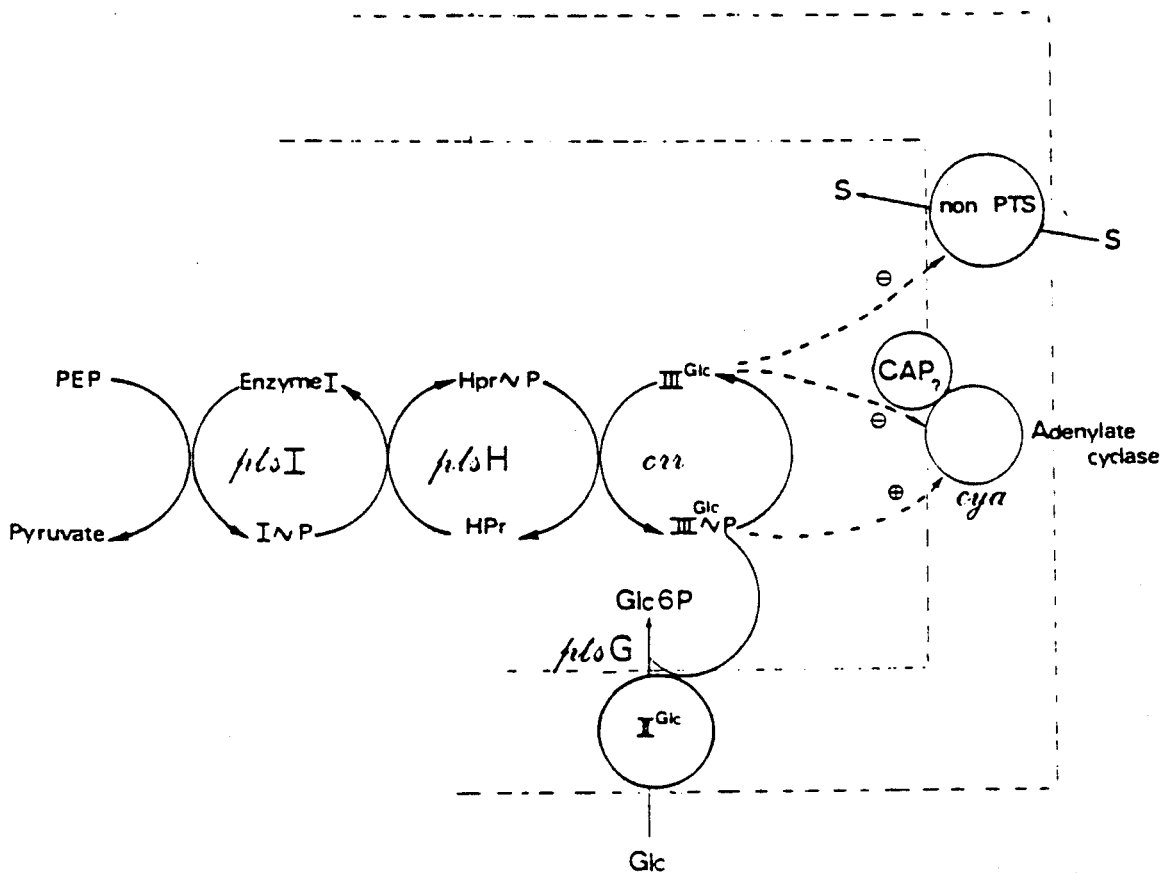


Figure 14 - Modèle de régulation de l'adénylate cyclase et de la perméation des hydrates de carbone par le système de phosphotransférase (d'après ULLMANN et DANCHIN, 1983).

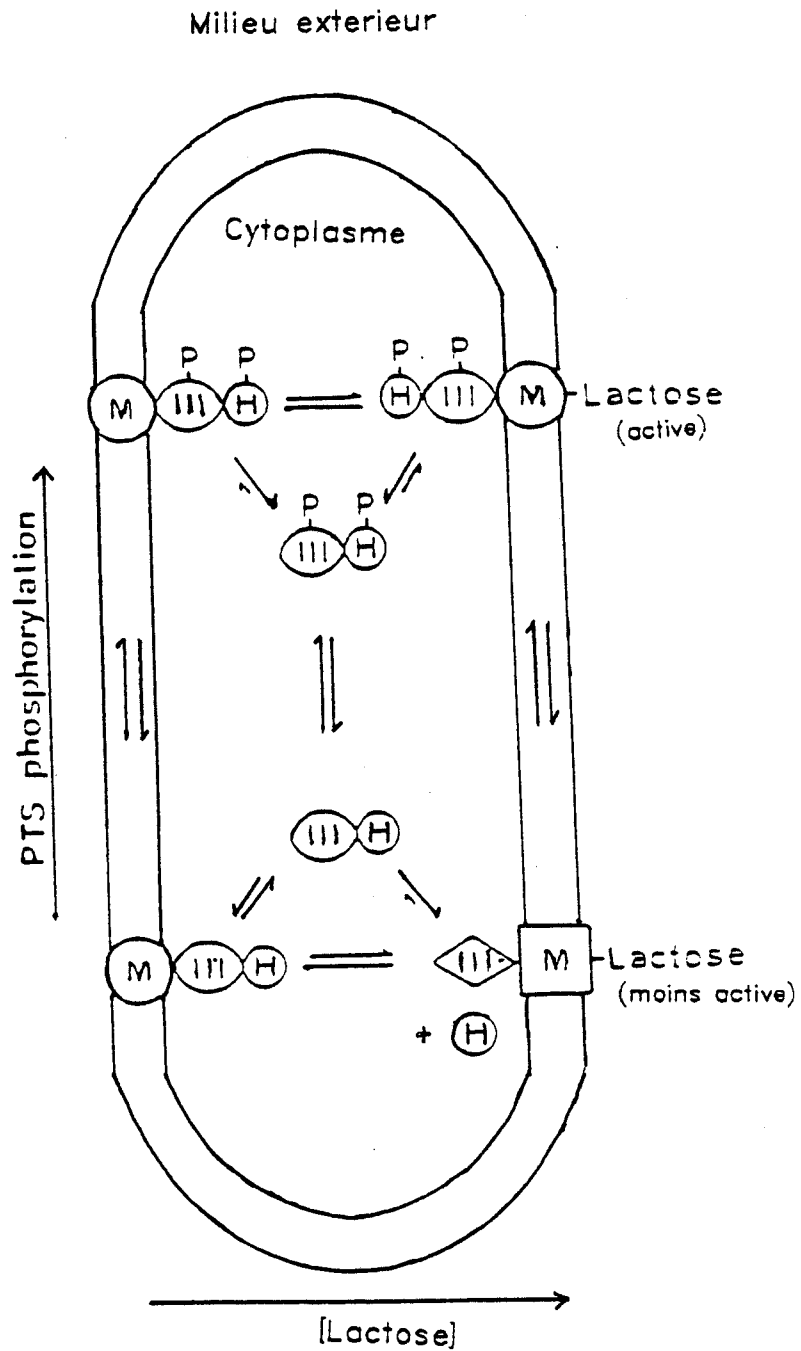


Figure 15 - Interaction allostérique entre composants du système PTS et la lactose perméase chez *E. coli* (d'après OSUMI et SAIER, 1982).

Les symboles M, III et H indiquent respectivement la lactose perméase, l'enzyme III^{Glc} et l'Hpr.

VIII. - BUT DU TRAVAIL

Notre travail a été limité aux souches du **Bacteroides** vrai, c'est-à-dire au groupe **Bacteroides fragilis**. Au niveau du côlon, ces bactéries dégradent les substances non assimilées par l'homme comme les polysaccharides complexes des parois des cellules végétales (xylane, pectine) ou les sécrétions de la muqueuse intestinale (chondroïtine sulfate). La physiologie des cinétiques de croissance de **Bacteroides** sur des polysaccharides ou des monosaccharides n'a jamais été étudiée. Ce qui a été réalisé, ce sont les cinétiques de croissance sur des concentrations variables de certains facteurs de croissance. En effet, en 1975, MACY et coll. avaient réalisé des cinétiques de croissance de **B. fragilis** avec ou sans hémine et en 1983, CASPARI et MACY avaient effectué des cinétiques de croissance sur des concentrations de CO₂ variables. Nous avons ainsi étudié les cinétiques de croissance sur des polysaccharides, des disaccharides et des monosaccharides chez les espèces du groupe **B. fragilis**.

Nous avons, par la suite, étudié la première étape d'utilisation des sucres : le transport à travers la membrane cytoplasmique qui a été peu décrit. Sur le peu d'informations, il y en a qui sont contradictoires.

MARTIN et RUSSEL (1986) ont montré une faible activité PTS-glucose chez **B. ruminicola** et **Fibrobacter (Bacteroides) succinogenes**. Chez ce dernier, on a démontré, en 1987 (FRANKLUND et GLASS) un transport actif du glucose énergisé par un gradient de protons et l'absence totale du système PTS et, en 1991 (MAAS et GLASS) un transport actif de cellobiose, inhibé par les composés interférant avec le transport des électrons ou le maintien des gradients ioniques transmembranaires. Par contre, **B. thetaiotaomicron** pourrait accumuler le glucose par diffusion facilitée et la présence d'un PTS ne peut être absolue (HYLEMON et coll., 1977). Ce doute nous a poussé à approfondir l'étude de la nature du transport du glucose chez **B. thetaiotaomicron**.

Nous avons utilisé un analogue du glucose tel que l' α -méthyl glucose. Nous avons constaté qu'il est métabolisé par 2 espèces du groupe **B. fragilis** : **B. thetaiotaomicron** et **B. distasonis**. En conséquence, et en absence de mutants métaboliques, la plupart de nos travaux ont été réalisés avec le glucose lui-même. Les paramètres du transport dépendent non seulement du système

perméasique mais aussi de la dégradation du substrat dès son entrée dans le cytoplasme. Par ailleurs, le transport du glucose a été étudié sous des conditions aérobies en présence de la catalase qui sont très différentes de celles du milieu naturel de *Bacteroides*. De ce fait, les paramètres du transport sont des valeurs apparentes.

Sur le plan taxonomique, le genre *Bacteroides* est restreint à l'espèce type *B. fragilis* et aux espèces apparentées (*B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *B. distasonis*, *B. caccae*, *B. eggerthii*, *B. merdae*, *B. ovatus*, *B. stercoris* et *B. uniformis*). Nous avons donc recherché s'il existait une homogénéité dans ce groupe du point de vue du mode de transport des sucres.

Nous mettons ainsi en évidence l'hétérogénéité du groupe *B. fragilis* vis-à-vis de la nature du transport du glucose.

MATERIEL ET METHODES

I. - SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES

Nous avons travaillé sur une souche d'*E. coli* LE392 rif et 6 souches du groupe *B. fragilis* dont 5 proviennent de chez Monsieur le Professeur ROMOND de l'U.F.R. de Pharmacie de Lille : *B. fragilis* 440, *B. fragilis* 290, *B. distasonis* 462, *B. vulgatus* 154 et *B. thetaiotaomicron* 489. La sixième est une souche de collection : *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148. Les profils biochimiques ont été systématiquement réalisés, ils sont présents dans l'Annexe 1. Ils permettent de vérifier régulièrement l'état de nos souches.

II. - MILIEUX ET TECHNIQUES DE CULTURE

A. - Culture d'*E. coli*

E. coli a été cultivé sur milieu LB (LURIA et BERTANI, 1957) ; c'est un milieu riche dont la composition est la suivante :

- Extrait de levure	5	g
- Tryptone	10	g
- NaCl	10	g
- Eau distillée qsp	1	l

Le pH de ce milieu est ajusté à 7,2 par NaOH ou HCl selon le pH initial.

B. - Culture de Bacteroides

I - Composition des milieux de cultures

a) Bouillon cerveau-coeur (BHI)

C'est un milieu riche, composé de :

- protéase peptone	10	g
- infusion :		
. cervelle de veau	12,5	g
. coeur de boeuf	5	g

- NaCl	5	g
- Na ₂ HPO ₄	2,5	g
- glucose	2	g

Il se prépare en dissolvant 37 g de BHI prêt à l'emploi dans 1 l d'eau distillée.

Il est conditionné en flacons de type pénicilline de 20 ml (10 ml/flacon).

b) Milieu tryptone-peptone-extrait de levure (TPY)

C'est un milieu empirique renfermant :

- Tryptone	10	g
- Peptone	10	g
- Extrait de levure	5	g
- NaCl	0,5	g
- Résazurine	0,001	g
- Eau distillée qsp	1	l

Ce milieu est conditionné dans des flacons de pénicilline de 20 ml (10 ml par flacon) ou des tubes 16 x 125 de culture anaérobie de type HUNGATE (5 ml par tube).

c) Milieu de CASPARI et MACY (1983) (CM)

C'est un milieu synthétique composé de :

- KH ₂ PO ₄	0,450	g
- K ₂ HPO ₄	0,450	g
- NaCl	0,900	g
- (NH ₄) ₂ SO ₄	0,900	g
- CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,025	g
- MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,020	g
- MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,010	g
- COCl ₂ , 6H ₂ O	0,010	g
- Résazurine	0,001	g
- Eau distillée qsp	1	l

Le milieu est conditionné dans :

- des flacons de pénicilline de 20 ml (10 ml par flacon),
- des flacons de 100 ml,
- des tubes 16 x 125 de culture anaérobie de type HUNGATE (5 ml par tube).

Au moment de l'utilisation, ce milieu est complété par la source de carbone qui peut être le glucose ou un autre sucre.

2 - Préparation des milieux de cultures

Les milieux de culture de **Bacteroides** sont préparés de la façon suivante :

- dissoudre les constituants de chaque milieu dans 1 l d'eau distillée,
- ajouter 0,5 ml d'une solution de résazurine à 1 mg/ml (utilisée comme indicateur de potentiel Red-Ox),
- porter à ébullition 15 min afin d'éliminer l'oxygène dissous,
- refroidir jusqu'à 45°C sous azote,
- ajouter 10 ml de solution d'hémine à 0,5 mg/ml et 100 µl de solution de vitamine B₁₂ à 0,1 mg/ml,
- refroidir ensuite sous atmosphère N₂/CO₂ (85/15, V/V) jusqu'à 35°C,
- dissoudre 0,5 g de cystéine,
- ajuster le pH à 7,2 avec KHCO₃.

Ensuite, les milieux sont conditionnés en flacons ou en tubes sous atmosphère N₂/CO₂.

Tous ces milieux sont autoclavés à 120°C pendant 20 min. Ils peuvent être tous gélosés en ajoutant 15 g d'agar par litre. Dans ce cas, nous n'avons pas besoin de les dégazer.

3 - Conditions de cultures

Les **Bacteroides** sont cultivés sous atmosphère anaérobie. L'ensemencement des flacons ou des tubes se fait par des seringues réduites à la cystéine à 2 % (P/V), sous atmosphère aérobie. La solution de cystéine à 0,2 % est préparée

de la façon suivante : est elle portée à ébullition ensuite refroidie sous azote et conditionnée dans des flacons de pénicilline de 20 ml (10 ml par flacon) sous la même atmosphère. L'ensemencement des boîtes de Pétri est effectué en station anaérobie sous atmosphère $N_2/CO_2/H_2$: 75/15/10. Les bactéries sont incubées à 37°C en station ou en jarres dont l'anaérobiose est réalisée chimiquement par utilisation d'Anaerocult de Merck qui donne une atmosphère de 100 % en CO_2 .

III. - TAMPONS ET SOLUTIONS REDUITS

Ce sont :

- tampon phosphate de potassium 50 mM (pH 7,2), composé de :
 - KH_2PO_4 100 mM 28 ml
 - $KHPO_4$ 100 mM 72 ml
 - eau distillée qsp 200 ml
- tampon Tris-HCl 0,2 mM (pH 8,0) ; à une solution Tris 0,2 M on ajoute de l'HCl concentré pour atteindre le pH 8,0,
- solution EDTA 100 mM (pH 7,6) dans du tampon Tris-HCl 0,2 mM (pH 8,0),
- solution de saccharose 1,5 M dans du tampon Tris-HCl 0,2 mM (pH 8,0),
- solution $MgCl_2$ 0,4 M dans du tampon Tris-HCl 0,2 mM (pH 8,0).

La réduction est réalisée comme suit :

- porter à ébullition,
- refroidir sous azote jusqu'à 35°C,
- ajouter de la cystéine 0,5 g,
- ajuster le pH avec $KHCO_3$ si c'est nécessaire,
- conditionnement sous azote dans des flacons de pénicilline de 20 ml ou des flacons de 100 ml.

Ces tampons et solutions sont autoclavés à 120°C pendant 20 min ou à 105°C pendant 30 min pour améliorer la réduction.

IV. - CULTURE EN BIOPHOTOMETRE

Les cultures en biophotomètre sont réalisées dans des tubes en incubant 5 ml du milieu à 37°C sous une agitation de 250 rpm (vitesse minimale qui empêche les cellules de se déposer au fond du tube). Les 5 ml du milieu sontensemencés à 2 % (V/V). Le biophotomètre S.L.E.L. 02 V1 est un appareil qui permet de saisir automatiquement la densité optique à des intervalles de temps donnés en vue d'établir les courbes de croissance.

Cet appareil est un bain-marie à sec, constitué de 2 blocs identiques portant chacun 4 tubes (Fig. 16), agités par un seul moteur (l'agitation est de type "vortex"). Chaque bloc dispose de sa propre régulation de température, ce qui permet de travailler à deux températures différentes. Devant chaque tube, une source de lumière monochromatique (longueur d'onde 630 nm) et un photodétecteur et son amplificateur sont montés face à face. La lumière captée par le photodétecteur est convertie en densité optique et stockée ensuite en mémoire à l'intérieur du biophotomètre.

A la fin de la manipulation, les valeurs de la densité optique sont transférées sur disquette grâce à un logiciel de dialogue avec un ordinateur extérieur du type PC. Les courbes de croissance et les différentes constantes de croissance sont effectuées sur logiciel approprié : Lotus.

A. - Préparation de l'inoculum

L'inoculum est réalisé à partir d'une préculture homologue effectuée sur BHI ou milieu synthétique CM additionné d'acide polygalacturonique. Après centrifugation (4 000 tours/min, 20 min à 4°C), les cellules sont lavées dans le milieu CM sans source de carbone, centrifugées à nouveau et reprises dans le même milieu.

Les milieux sont inoculés avec 2 % (V/V) afin d'obtenir une suspension cellulaire de 18.10^7 cellules/ml.

Ordinateur du
type PC

Boutons régulateurs
de la température et
de l'agitation



Bloc A

Bloc B

Afficheur à cristaux

Touches utilisées
pour lancer la croissance

Figure 16 - Photographie du biophotomètre S.L.E.L. 01V2.

B. - Constantes de croissance

Les cultures sont réalisées dans les tubes 16 x 125 mm de culture anaérobie de type HUNGATE, à 37°C et sous une agitation de 250 rpm.

Les DO, mesurées automatiquement à 630 nm toutes les 30 min, sont converties en nombre de cellules/ml grâce à une courbe de référence : nombre de cellules/ml = f (DO à 630 nm), pour pouvoir présenter les cinétiques de croissance en log du nombre de cellules.

Les paramètres de croissance déterminés sont les suivants :

- μ : taux de croissance.
C'est le nombre de divisions cellulaires par unité de temps. Il est déterminé à partir de la pente de la droite de la phase exponentielle de la courbe de croissance. Il est exprimé en h^{-1} .
- G : temps de génération.
C'est le temps en h nécessaire au doublement de la population ($\log 2/\mu$).
- μ_{\max} : taux de croissance maximal en h^{-1} déterminé à partir de la représentation $\mu = f([\text{substrat}])$.
- k_s : constante de saturation en mM = 1/affinité de la cellule pour le substrat.
Elle est déduite à partir des mêmes représentations que μ_{\max} . Elle correspond à la concentration du substrat pour $\mu_{\max}/2$.
- y : rendement en nombre de cellules/mmole de substrat.
C'est la pente de la courbe/nombre de cellules à la fin de la croissance = f (concentration du substrat)
- q : quotient métabolique à $\mu_{\max} = \mu_{\max}/y$.
C'est la quantité du substrat utilisée par une cellule et par unité de temps (mmole/h).

V. - DOSAGE DE PROTEINES

Il est effectué par la méthode de LOWRY et coll. (1951). La suspension cellulaire a été diluée au 1/2 par la soude 2N et incubée à 22°C pendant 24 h (FRANKLUND ET GLASS, 1987). La sérum albumine bovine, traitée de la même façon, a été utilisée comme standard dans la gamme étalon.

VI. - ETUDE DU TRANSPORT DU GLUCOSE A TRAVERS LA MEMBRANE CYTOPLASMIQUE

A. - Préparation des cellules pour des essais d'accumulation du sucre

Les cellules utilisées sont obtenues à partir des cultures, en fin de phase exponentielle de croissance, sur 100 ml du milieu CM additionnés du glucose 0,2 % (P/V).

Cette suspension cellulaire est centrifugée dans des pots à centrifugation préréduits avec des joints, pour maintenir l'anaérobiose, à 15 000 g pendant 20 min et à 20°C (toutes ces manipulations se font dans la station anaérobiose). Le culot est lavé 2 fois dans du tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,0 réduit et repris par un volume de tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,0 non réduit pour avoir une concentration de protéines de 0,55 mg/ml pour *B. fragilis* 440, *B. fragilis* 290, *B. distasonis* 462 et *B. vulgatus* 154 ou de 1,1 mg/ml pour *B. thetaiotaomicron* 489 et *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148. Ensuite, les cellules sont incubées à 37°C pendant 3 h en présence de la catalase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) à 4 000 UI/ml de cellules. Certains essais sont effectués en anaérobiose et en absence de la catalase ; dans ce cas, les cellules sont lavées et resuspendues dans le tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,0 réduit (le tout s'effectue dans la station).

B. - Produits radiomarqués

Nous avons obtenu les produits radiomarqués auprès du Centre Radiochimique Amersham. Les produits sont :

- le D-(U-¹⁴C) glucose a une activité spécifique de 286 $\mu\text{Ci}/\text{mmole}$;
- le méthyl(α -D-(U-¹⁴C) glucopyranoside a une activité spécifique de 279 $\mu\text{Ci}/\text{mmole}$.

Ces solutions-mères sont diluées avec le substrat non radioactif correspondant à une concentration de 10 mM et 50 mM.

C. - Accumulation des substrats

Il s'agit de mesurer, en scintillation liquide, la quantité de substrat radiomarqué retenue par les cellules bactériennes au cours du temps.

1 - En aérobiose

500 μl de la suspension bactérienne sont transférés dans un tube à hémolyse renfermant 490 μl de tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,0 non réduit. Les essais anaérobies sont effectués dans des flacons de pénicilline sertis. Les cellules sont préincubées à 37°C pendant 15 min avant l'addition du substrat radioactif à une concentration finale de 0,1 mM et une radioactivité totale de 0,055 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$. Des prélèvements de 100 μl sont effectués, filtrés immédiatement sur membrane de nitrocellulose (Sartorius) de 0,45 μm , humidifiée par de l'eau, et rincés par 2 ml de tampon phosphate de potassium 20 mM pH 7,0 à 37°C. Les filtres sont séchés sous lampe infrarouge pendant 30 min puis déposés dans des pots à scintillation. Après addition de 7,5 ml de liquide à scintillation (Ready solv HP, Beckman), on compte le nombre de coups par min sur le compteur à scintillation liquide Beckman LS 2800.

2 - En anaérobiose

Dans la station, 500 μl de la suspension bactérienne sont transférés dans un flacon de pénicilline préréduit renfermant 450 μl du tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,2 réduit. En dehors de la station, on ajoute 50 μl de glucose radioactif 2 mM à une radioactivité totale de 0,055 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ par une seringue réduite à la cystéine à 2 % et on incube à 37°C. Des prélèvements de 100 μl , effectués par des seringues réduites, permettent de mesurer la

radioactivité accumulée à l'intérieur de la cellule comme l'accumulation en aérobiose.

Les résultats sont exprimés en nmoles de substrat accumulé par mg de protéines totales de la suspension cellulaire.

D. - Mesure de la phosphorylation ATP ou PEP dépendante

La technique utilisée est celle de MARTIN et RUSSELL (1986). Elle a comme principe de traiter les cellules au toluène qui provoque la fuite de tous les métabolites intermédiaires de telle sorte que la biosynthèse du phosphoénolpyruvate cesse immédiatement. Par contre, le PEP ajouté au milieu est capable d'accéder au site d'utilisation pour former du P-Hpr à partir de Hpr. Les molécules de EI et de Hpr sont incapables de franchir la membrane toluénisée.

1 - Perméabilisation des cellules au toluène

La croissance des cellules est arrêtée lorsqu'on atteint une DO de 1,0 (600 nm) ; elles sont centrifugées à 2 500 g pendant 20 min à 4°C, lavées dans du tampon phosphate sodium-potassium 100 mM pH 7,2 renfermant du $MgCl_2$ 5 mM et du dithiothréitol 1 mM. Elles sont reprises par du tampon de façon à concentrer la culture de départ 4 fois. Les cellules sont bloquées dans cette phase de croissance dans de la glace.

1 ml de suspension glacée est mis dans un tube à hémolyse en verre et agité au vortex d'une façon continue. Après l'addition de 100 μ l du mélange toluène/éthanol (1/9, V/V), on continue l'agitation pendant 60 sec et on remet le tube scellé avec du parafilm dans de la glace.

2 - Mesure de la phosphorylation des hexoses

Elle consiste à doser le glucose ou α -méthyl-glucose phosphorylé précipité par $BaBr_2$. Le mélange de la réaction (1 ml) comprend le tampon phosphate de sodium-potassium 100 mM pH 7,2, $MgCl_2$ 5 mM, dithiothréitol 1 mM, PEP ou ATP 10 mM, fluorure de sodium 10 mM et 100 μ l des cellules traitées au toluène.

La réaction est initiée par l'addition du glucose ou α -méthyl-glucose radiomarqué pour avoir une concentration finale de 1 mM et une radioactivité totale de 0,1 μ Ci par ml. Après incubation à 37°C, pendant 30 min, les produits phosphorylés sont séparés par précipitation avec 10 ml de BaBr_2 30 mM à 4°C préparés dans de l'éthanol à 90 % (V/V). Après une incubation de 20 min à 0°C, la suspension est filtrée sur membrane en nitrocellulose à 0,45 μ m et lavée avec de l'éthanol 80 % (V/V). Les filtres sont séchés sous lampe infrarouge pendant 30 min, déposés dans des pots à scintillation puis on ajoute le liquide scintillant et on compte le nombre de coups par min dans le compteur à scintillation liquide. La phosphorylation endogène du glucose est estimée à partir du contrôle sans ATP et PEP. Les résultats sont exprimés en nmoles du glucose phosphorylé par mg de protéines totales pendant 30 min.

E. - Accumulation du glucose par les sphéroplastes

Des cellules, à la phase stationnaire (croissance sur milieu CM avec du glucose 0,2 %), sont récupérées par centrifugation à 2 500 g pendant 20 min à 20°C, lavées avec le tampon Tris-HCl 0,2 M pH 8,0 réduit et recentrifugées. Le culot est resuspendu dans le même tampon pour avoir une DO de 2,0 à 600 nm (1 mg de protéines cellulaires/ml).

1 - Préparation des sphéroplastes

La préparation des sphéroplastes est faite en anaérobiose. Ils sont obtenus par addition de 1 ml de cellules au mélange contenant de l'EDTA 2 mM pH 7,6, du sucrose 0,5 mM pH 8,0 et du tampon Tris-HCl 0,2 M pH 8,0. On laisse agir 15 min avant d'ajouter 12 mg de lysozyme (SERVA) dans un volume final de 2 ml. L'essai témoin ne renferme pas de lysozyme. Ensuite, on ajoute MgCl_2 à une concentration finale de 10 mM pour stabiliser les sphéroplastes, on dilue au 2/3 avec de l'eau distillée. Toutes ces opérations sont réalisées dans des flacons de pénicilline de 10 ml au niveau de la station anaérobie et avec des solutions réduites. A la fin, les flacons sont incubés à 23°C en dehors de la station. La formation des sphéroplastes est suivie par mesure de la diminution de l'absorbance (600 nm), par des prélèvements de 100 μ l dilués au 1/20 avec de l'eau distillée et par microscopie à contraste de phase.

2 - Accumulation du glucose

L'accumulation du glucose chez les sphéroplastes est réalisée en aérobiose.

Des doubles essais sont effectués pour comparer l'accumulation du glucose chez des cellules intactes. Ils nécessitent 2 paires de flacons de pénicilline. Une paire de flacons (cellules intactes et sphéroplastes) est utilisée pour poursuivre la formation des sphéroplastes ; une fois que ces derniers sont formés, l'accumulation du glucose est initiée dans la seconde paire.

La deuxième paire de flacons, utilisée pour mesurer l'accumulation, est préparée comme précédemment sauf le volume du tampon Tris-HCl 0,2 M pH 8,0 qui est réduit de 10 μ l pour compenser le glucose radioactif ajouté (concentration finale de 0,1 mM). 5 min après l'addition du glucose marqué à ces cellules, on prélève 100 μ l que l'on filtre sur membrane nitrocellulose 0,45 μ m. Les filtres sont lavés avec du tampon phosphate de potassium 20 mM pH 7,0, séchés sous infrarouge pendant 30 min, déposés dans des pots à scintillation ; ensuite, la radioactivité est mesurée par le compteur à scintillation liquide (Beckman) après avoir ajouté le liquide scintillant. Les résultats sont exprimés en nmoles de glucose accumulé par mg de protéines totales par 5 min.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. - CROISSANCE DES ESPECES DU GROUPE B. FRAGILIS

Les espèces du groupe *B. fragilis*, surtout *B. thetaiotaomicron*, sont capables de dégrader un grand nombre de polysaccharides comme les polymères d'ose ou les polymères d'acide uronique. Ces polymères sont convertis en disaccharides, en oses ou en acides uroniques qui sont, par la suite, utilisés par ces bactéries.

Nous avons donc étudié la croissance du groupe *B. fragilis* (chez les espèces les plus représentatives de ce groupe) sur quelques composés saccharidiques. Les cinétiques de croissance de *B. fragilis* sont peu connues. Quelques travaux ont été réalisés dans deux buts bien précis : étude de l'effet du CO₂ (CASPARI et MACY, 1983) et de l'hémine (MACY et coll., 1975). Nous avons tracé les courbes de croissance de ces souches sur un milieu empirique, ensuite sur un milieu synthétique. Ce dernier nous a permis d'étudier le comportement de ces bactéries vis-à-vis d'autres paramètres : concentration et nature de la source de carbone. Par ailleurs, certains auteurs (SALYERS, 1984 ; ANDERSON et SALYERS, 1989) ont mis en évidence le caractère répressif du glucose vis-à-vis des enzymes de dégradation de certains sucres. Cette répression catabolique n'est pas démontrée d'une façon certaine puisque d'une part elle n'est pas levée par l'addition de l'AMPc et, d'autre part, aucune recherche de diauxie n'a été effectuée. De ce fait, nous avons réalisé des cinétiques de croissance en présence de mélange de glucose en concentration limitante et d'un autre substrat carboné.

Toutes ces cinétiques de croissance sont réalisées au biophotomètre et sont données en variation de la DO 630 nm de la culture en fonction du temps. Par la suite, ces DO 630 nm sont converties en nombre de cellules/ml grâce à la courbe de référence (Fig. 17) : nombre de cellules/ml = f (DO 630 nm). Les résultats donnés sont ceux des essais répétés 3 fois.

A. - Cinétiques de croissance sur milieu empirique

1 - BHI

Le suivi du développement de *B. thetaiotaomicron*, souche 489, choisi à titre d'exemple, est effectué sur BHI. Les précultures sont réalisées sur le même

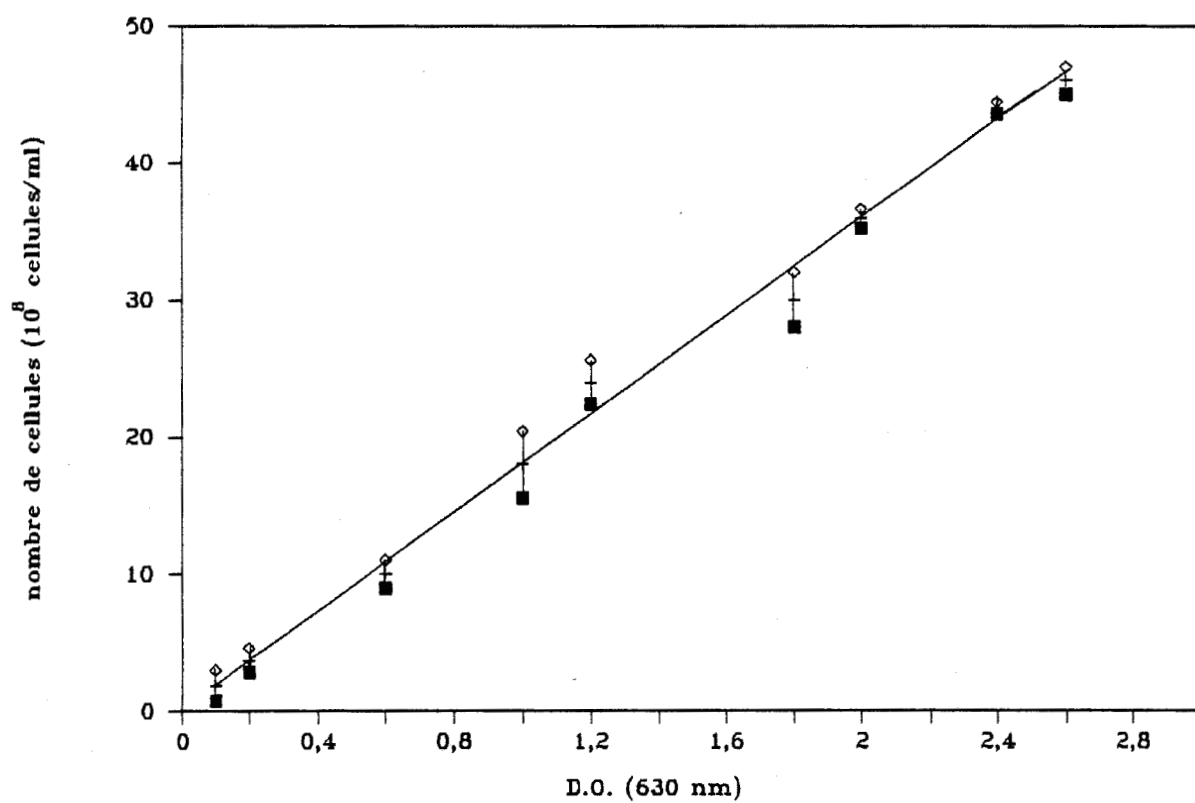


Figure 17 - Courbe de référence pour convertir les DO 630 nm des suspensions cellulaires en nombre de cellules par ml.

Le nombre de cellules a été déterminé par dénombrement par dilution.

milieu. Les DO à 630 nm sont prises toutes les 30 min. Les résultats, reportés dans la figure 18, montrent que la croissance de cette souche démarre avec un taux de croissance de $0,32 \text{ h}^{-1}$ maintenu pendant 4 h. Cette phase exponentielle est suivie d'une phase de ralentissement de 5 h et d'une phase stationnaire de 6 h. Pendant cette dernière, le nombre de cellules atteint est de $4,2 \cdot 10^9$ cellules/ml de culture. La phase de déclin commence au bout de 15 h et elle s'accroît après 34 h. Le BHI permet, comme il est montré sur la figure 18, un bon développement de **Bacteroides**. Le milieu est complet et renferme du glucose à 0,2 % (P/V) et d'autres composés : protéase-peptone et infusion cerveau-cœur. Nous allons voir si **Bacteroides** est capable de tirer son énergie des peptones. Nous avons donc cultivé ces bactéries sur un milieu ne renfermant pas de glucose : le milieu TPY.

2 - TPY

Le TPY est un milieu empirique composé de tryptone, peptone et extrait de levure. Sur ce milieu, nous avons suivi la culture de **B. thetaiotaomicron**, souche 489, avec ou sans glucose afin d'étudier l'effet de ce substrat carboné (Fig. 19). Les précultures sont faites sur BHI puisqu'il assure un bon développement, on atteint un nombre de cellules important rapidement. Le glucose est utilisé à une concentration de 0,2 % (P/V) qui est celle du milieu BHI.

D'après la figure 19, nous remarquons :

- l'absence de la phase de latence malgré que la préculture soit faite sur BHI,
- que la présence ou l'absence du glucose dans le milieu TPY modifie le taux de croissance, la biomasse obtenue et la durée des différentes phases de croissance.

En absence du glucose, la croissance démarre avec un taux de croissance de $0,27 \text{ h}^{-1}$ constant pendant 2h30. Les autres phases, phase de ralentissement et phase stationnaire sont plus longues ; elles durent respectivement 11 et 3 h. Après 16h30 d'incubation, la dernière phase, phase de déclin, commence.

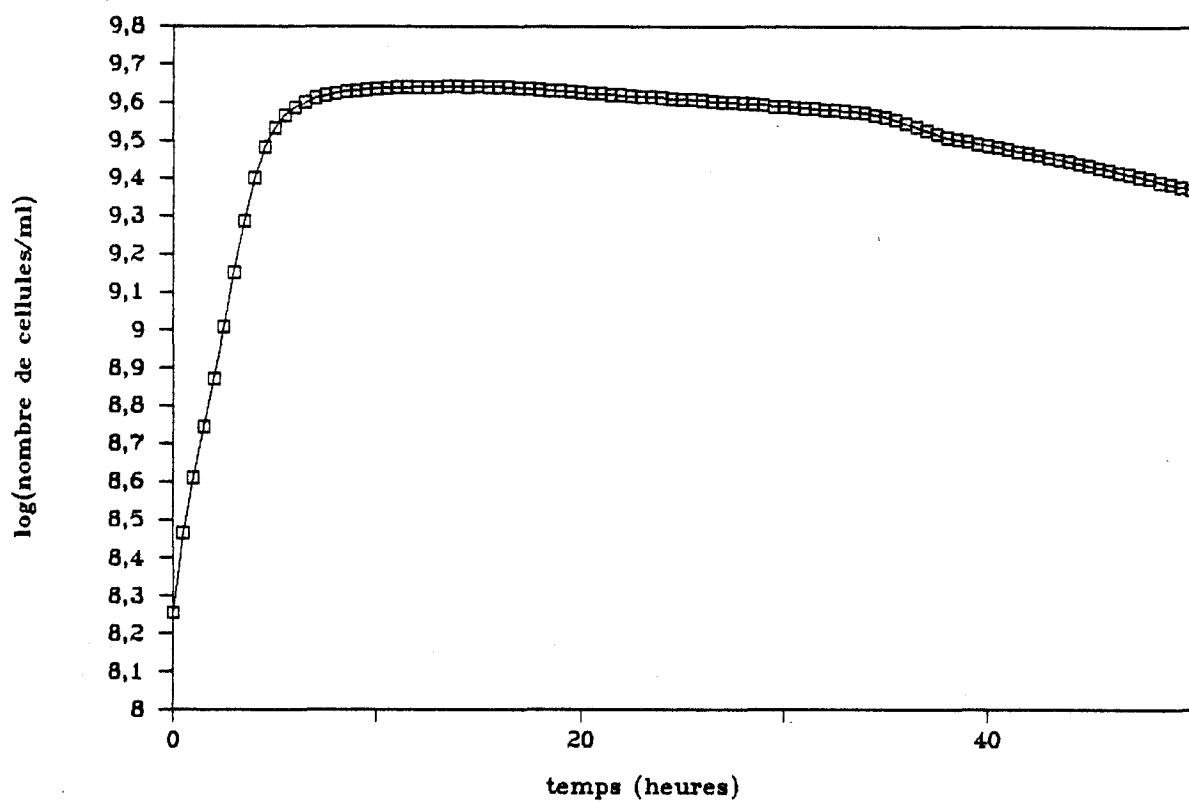


Figure 18 - Cinétiques de croissance de *B. thalotomum* souche 489 sur milieu empirique BHI (bouillon cervelle - coeur).

Les DO sont prises toutes les 30 min à 630 nm. La préculture est faite sur BHI.

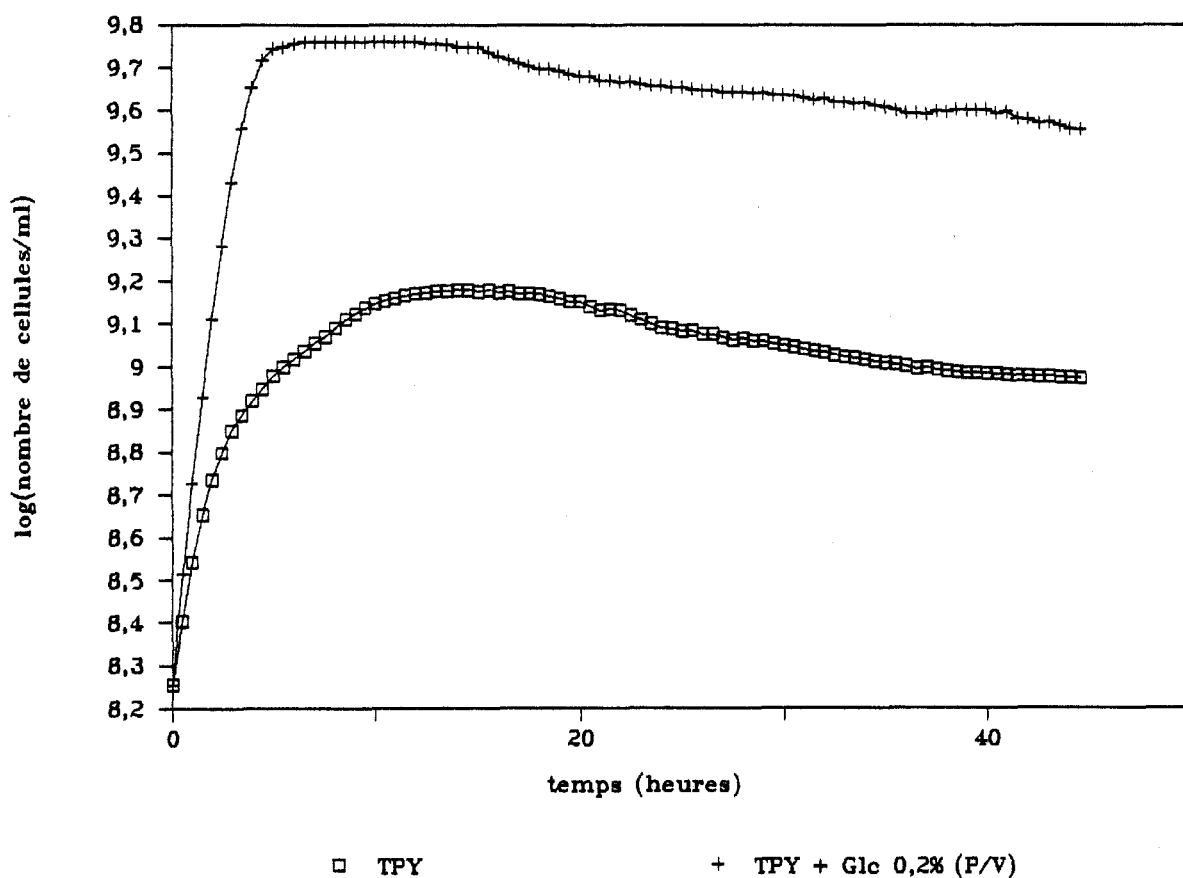


Figure 19 - Cinétiques de croissance de *B. thetaiotaomicron* souche 489 sur TPY ou sur TPY + glucose 0,2 % (P/V).

Les DO ont été prises toutes les 30 min. La préculture est faite sur BHI.

TPY : Tryptone, Peptone, Extrait de levure.

En présence du glucose, le taux de croissance augmente, il est de $0,37 \text{ h}^{-1}$ pendant une durée plus longue, 3h30. Cette phase exponentielle est suivie d'une phase de ralentissement très courte, 2h30, et une phase stationnaire longue, 6 h.

Donc, le glucose ajouté au TPY augmente le taux de croissance et la durée de la phase de division cellulaire.

B. thetaiotaomicron, souche 489, est capable de croître sur TPY sans sucre, il tire son énergie soit de la tryptone et la peptone ou soit de l'extrait de levure. De ce fait, des essais de croissance de cette souche sur TPY, dépourvu de l'extrait de levure, et sur milieu CM (milieu synthétique), complémenté par des tryptones et des peptones, ou l'extrait de caséine et du tryptophane, ont montré que **B. thetaiotaomicron** est incapable de se développer aux dépens exclusivement des composés protéiques. La croissance de cette bactérie sur TPY est due à la présence des mannanes en quantité importante dans l'extrait de levure (HUMPHREY et coll., 1974) qui sont utilisés à la fois comme source de carbone et source d'énergie.

B. - Cinétiques de croissance sur milieu synthétique

Nous avons étudié le développement de **B. thetaiotaomicron**, souche 489, sur le milieu CM additionné du glucose 0,2 % (P/V).

La préculture est faite sur BHI et les cellules sont lavées une fois avant ensemencement pour éliminer toute trace éventuelle de facteurs de croissance du milieu BHI.

Les résultats, présentés dans la figure 20, nous montrent que la croissance démarre par une phase d'accélération de 1 h, suivie d'une phase de croissance de 2h30 avec un taux de croissance de $0,21 \text{ h}^{-1}$. Ensuite, la phase de ralentissement dure 6 h tandis que la phase stationnaire ne dure même pas 30 min. La phase de déclin commence après 10 h de croissance. La biomasse obtenue est de $2,5 \cdot 10^9$ cellules/ml de culture. Ces résultats sont comparés à ceux de la croissance sur les autres milieux empiriques (BHI, TPY). Ceci est présenté dans le tableau 11. Nous remarquons aussi l'absence de la phase de

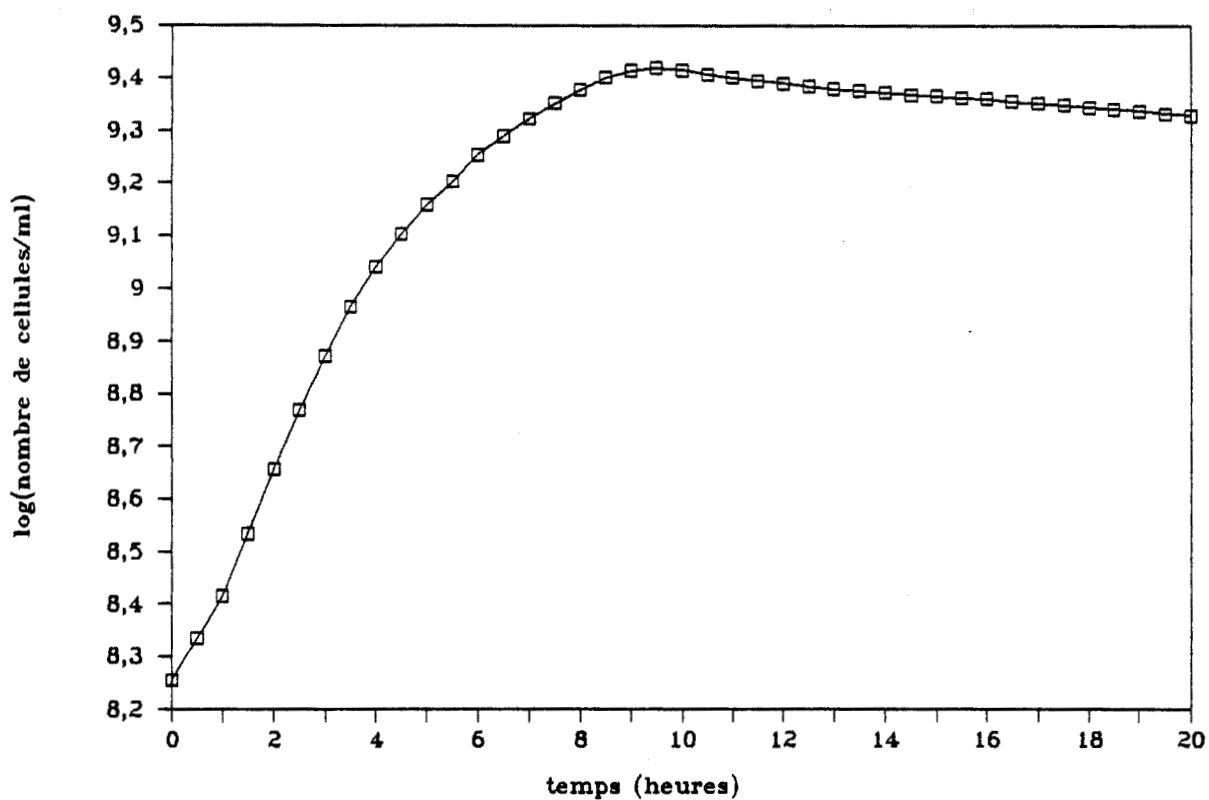


Figure 20 - Cinétiques de croissance de *B. thetaiotaomicron* souche 489 sur milieu synthétique CM additionné du glucose à 0,2 % (P/V).

Les DO 630 nm sont prises toutes les 30 min. La préculture est faite sur BHI.

Caractéristiques	Milieux			
	BHi	TPY	TPY Glc	CM
Taux maximal de croissance (h^{-1})	0,32	0,27	0,37	0,21
Biomasse à la fin de la croissance (cellules/ml)	$4,2 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^9$	$2,5 \cdot 10^9$
Phase d'accélération*	0	0	0	1
Phase exponentielle*	4	2,5	3,5	2,5
Phase de ralentissement*	5	11	2,5	6
Phase stationnaire*	6	3	6	$\approx 0,5$

Tableau 11 - Caractéristiques de la croissance de B. thalictoides souche 489 sur différents milieux. La préculture est faite sur BHI.

TPY : tryptone-peptone-extrait de levure.

BHI : bouillon coeur-cerveau.

CM : milieu de CASPARI et MACY (1983) renfermant du glucose à 0,2 % (P/V).

* : durée en heures.

latence comme dans les deux cas précédents (croissances sur BHI et sur TPY) et pourtant, la préculture est faite sur le milieu empirique BHI. MACY et coll. (1975) ont observé des courbes de croissance sans phase de latence. Cette croissance est faite sur milieu synthétique dont la composition est proche de celle du milieu CM, l'hémine est présente à une concentration de 2 mg/l. Ce milieu est complété par du glucose à 0,2 % (P/V). Dans ce cas, l'absence de la phase de latence semblerait normale puisque les cellules sont précultivées sur le même milieu en présence du glucose 0,5 % (P/V). Par contre, dans notre cas, le milieu de la préculture (BHI) et le milieu de la culture (CM + Glc 0,2 %, P/V) sont différents sauf que tous les deux renferment du glucose 0,2 %. Nous avons donc refait la culture en utilisant des cellules précultivées sur le milieu CM renfermant un substrat carboné très différent du glucose : l'acide polygalacturonique à 0,2 % (P/V). Nous avons suivi le début de la croissance en prenant les DO toutes les 5 min. D'après les résultats, reportés sur la figure 21, on constate d'une part l'absence totale de la phase de latence et, d'autre part, un développement rapide pendant les 30 premières minutes avec une vitesse de croissance supérieure à la vitesse maximale du développement ultérieur. Ceci est difficile à expliquer, on peut dire qu'il est dû à des traces de facteurs de croissance présents à l'intérieur de la cellule.

C. - Cinétiques de croissance sur différentes concentrations en substrat carboné (glucose)

Nous avons déterminé les paramètres de la croissance des espèces du groupe *B. fragilis* en réalisant des cinétiques de croissance des souches : *B. thetaiotaomicron* souche 489, *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148, *B. fragilis* souche 440, *B. fragilis* souche 290, *B. distasonis* souche 462 et *B. vulgatus* souche 154, sur milieu CM additionné du glucose à des concentrations variant de 0,1 % à 2 %.

D'autres concentrations en-dessous de 0,1 % ont été testées mais les souches du groupe *B. fragilis* n'y poussent pas. La préculture est faite sur BHI. Les DO à 630 nm sont prises toutes les 30 min. L'ensemble des différentes courbes obtenues est présenté en Annexe 1. Leur observation et leur interprétation nous permettent de préciser quelques paramètres

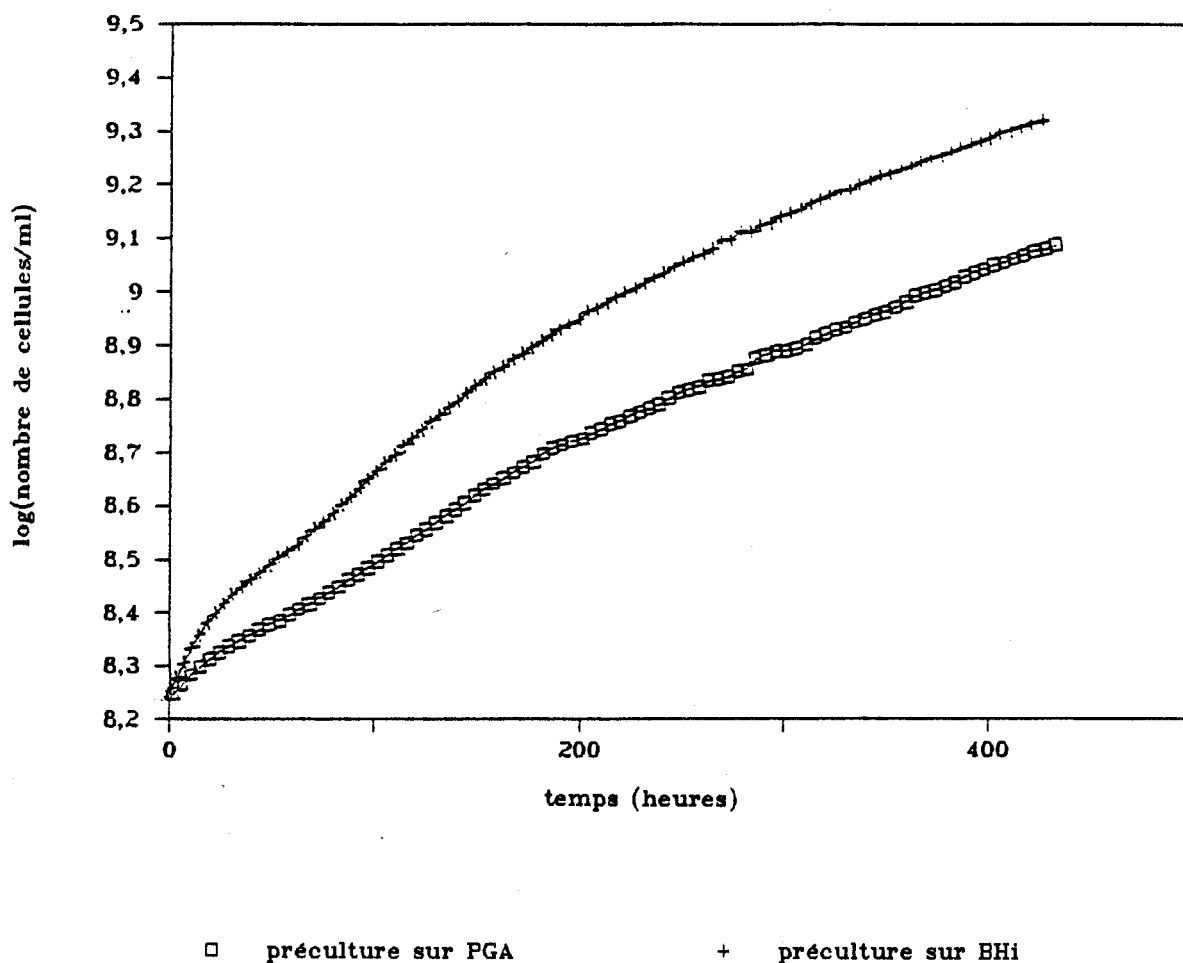


Figure 21 - Cinétiques de croissance de *B. thetaiotaomicron* souche 489 sur le milieu CM additionné de glucose à 0,2 % (P/V).

Les bactéries ont été précultivées sur acide polygalacturonique (PGA) ou sur BHI.

Les DO sont prises toutes les 5 min.

caractéristiques de la croissance des bactéries du groupe *B. fragilis* en présence du glucose :

- Détermination de μ_{\max} et K_s :

évolution du taux de croissance observé en fonction de la concentration initiale en glucose (Fig. 22). Ceci nous permet de définir expérimentalement μ_{\max} ainsi que K_s (concentration en S pour $\mu = \mu_{\max}/2$). K_s déduite de la figure 21 est en %, nous l'avons convertie par la suite en mM. Nous pouvons également déterminer la concentration critique (concentration en S pour laquelle μ diminue) pour les souches étudiées ainsi que le temps de génération ($\log 2/\mu_{\max}$).

- Détermination de Y (rendement de la croissance) :

biomasse obtenue à la fin de la croissance en fonction de la concentration du substrat énergétique (Fig. 23). A partir de cette courbe, nous avons déterminé le rendement de la croissance (Y). Le calcul de cette valeur nous permet de déduire la valeur du quotient métabolique (taux d'activité métabolique) : $q = \mu/Y$.

Pour chacune des souches, les différents calculs réalisés précisent les valeurs μ_{\max} , K_s , Y et q (Tab. 12). Les cinétiques ont été répétées 3 fois, les résultats donnés sont des résultats moyens. Par contre, dans l'Annexe 1, les résultats sont donnés à titre d'exemple.

D'après l'ensemble de ces résultats, nous remarquons :

- une inhibition de la croissance de toutes les souches testées, à l'exception de *B. thetaiotaomicron*, par des concentrations du glucose supérieures à 1 % (P/V) qui est donc la concentration critique. Il s'agit d'une inhibition non compétitive. Le modèle de ce phénomène peut correspondre à l'inhibition par le substrat des activités enzymatiques (PIRT, 1974). Si X et S représentent la biomasse et le substrat, nous avons la réaction :



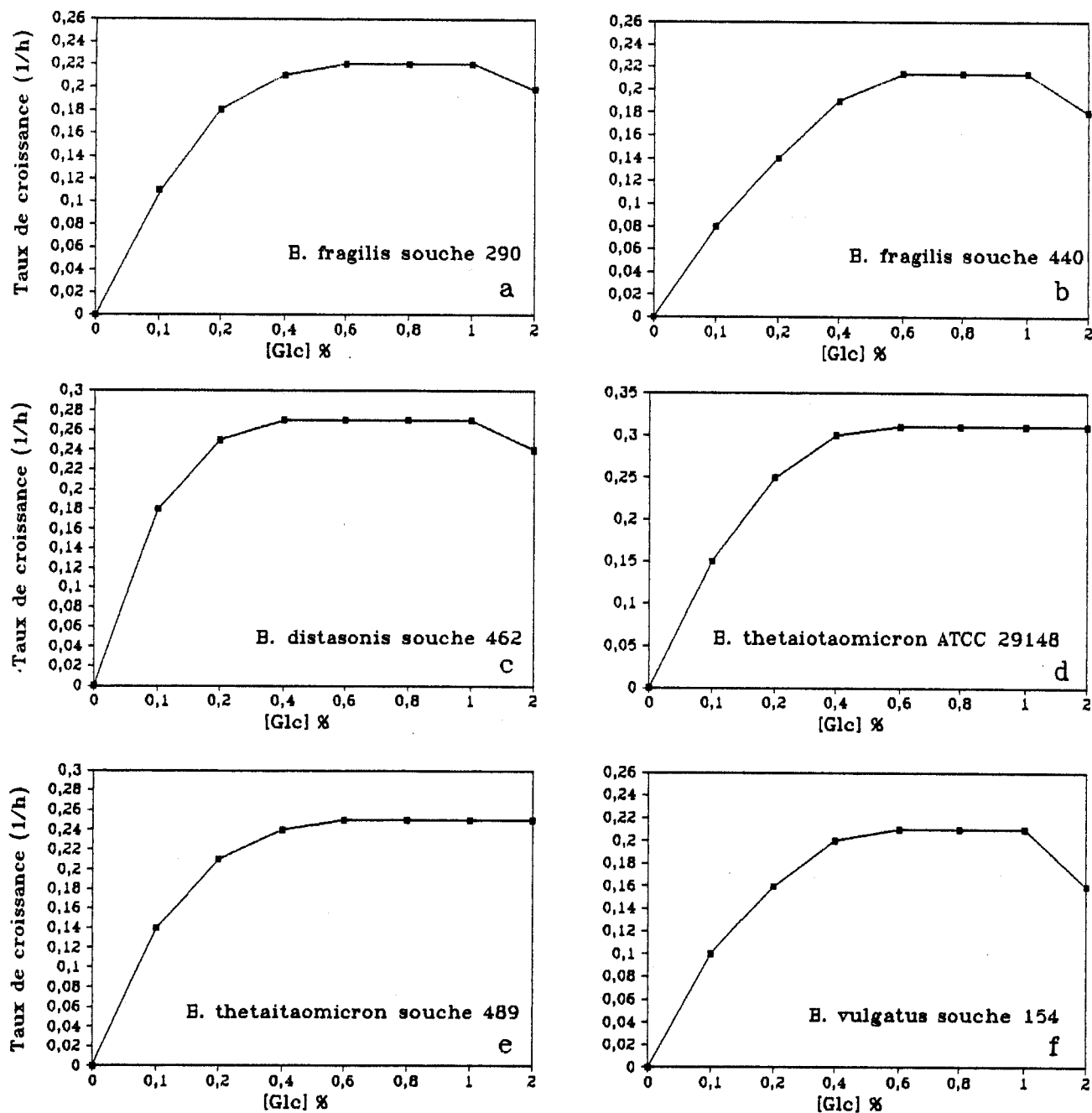


Figure 22 - La variation du taux de croissance des espèces de *B. fragilis* en fonction de la concentration du glucose.

- (a) *B. fragilis* souche 290
- (b) *B. fragilis* souche 440
- (c) *B. distasonis* souche 462
- (d) *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148
- (e) *B. thetaiotaomicron* souche 489
- (f) *B. vulgatus* souche 154

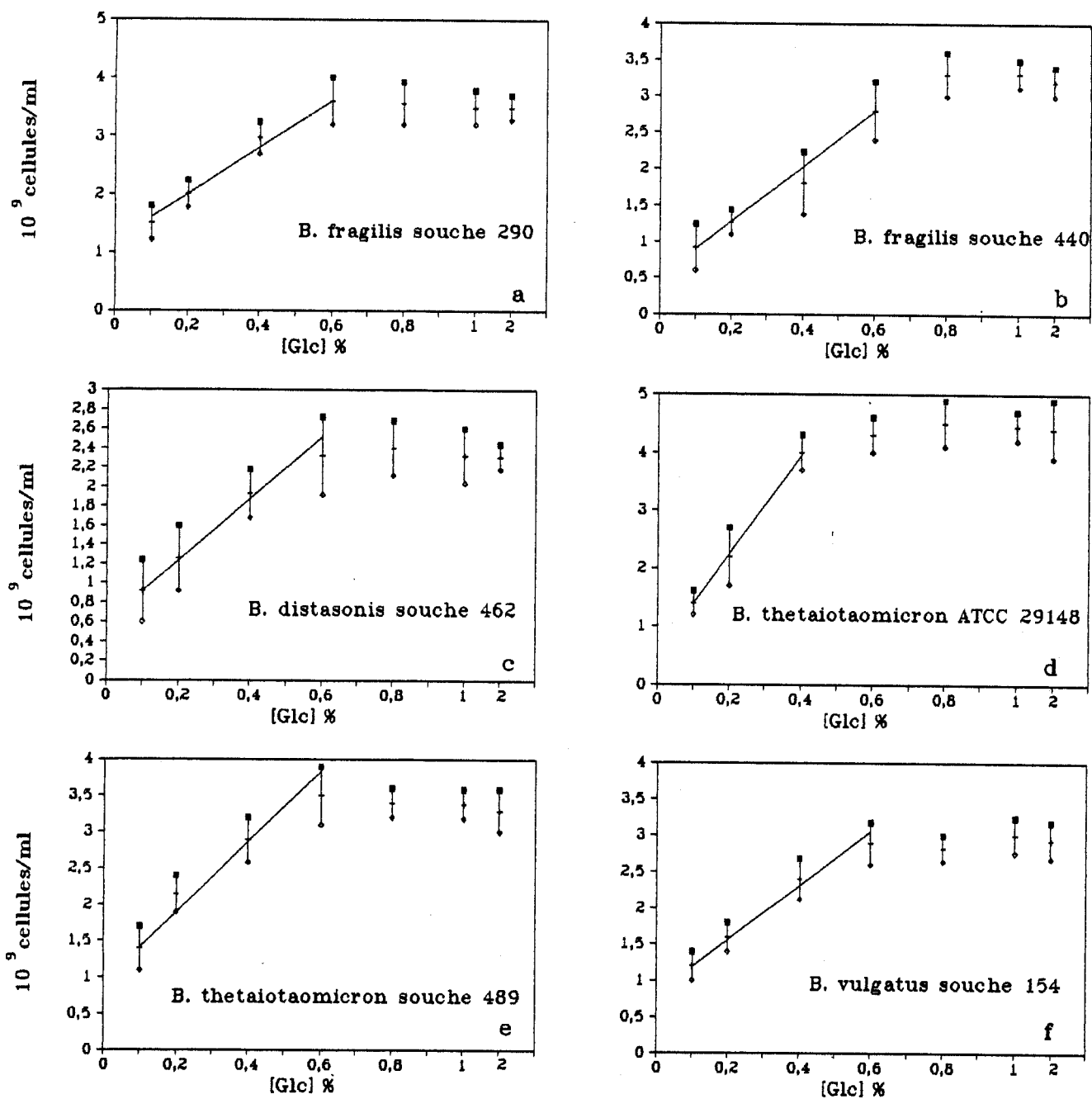


Figure 23 - La variation du nombre de cellules des espèces du groupe *B. fragilis* obtenues à la fin de la croissance en fonction de la concentration du glucose.

- (a) *B. fragilis* souche 290
- (b) *B. fragilis* souche 440
- (c) *B. distasonis* souche 462
- (d) *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148
- (e) *B. thetaiotaomicron* souche 489
- (f) *B. vulgatus* souche 154

Paramètres	Souches					
	<i>B. thetaiotaomicron</i> ATCC 29148	<i>B. thetaiotaomicron</i> souche 489	<i>B. distasonis</i> souche 462	<i>B. fragilis</i> souche 440	<i>B. fragilis</i> souche 290	<i>B. vulgatus</i> souche 154
$\mu_{\max} \text{ h}^{-1}$	0,33	0,25	0,27	0,21	0,22	0,21
G	0,9	1,2	1,1	1,4	1,4	1,4
Ks mM	6,0	5,0	4,2	8,0	5,5	6,0
Y 10^{10} cellules/ mmole	13,0	8,6	5,5	6,8	7,3	6,3
$10^{-2} q$ mmole/h	2,5	3,0	5,0	3,0	3,0	3,3

Tableau 12 - Les paramètres de croissance des différentes souches du groupe *B. fragilis* sur milieu de CASPARI et MACY (1983) additionné du glucose comme source de carbone.

μ_{\max} : taux de croissance maximal.
 G : temps de génération en heure.
 Y : rendement de la croissance.
 q : quotient métabolique.
 Ks : constante de saturation.

Lorsque la concentration du glucose est élevée, une seconde molécule du substrat va venir se fixer sur le complexe biomasse-substrat (XS) :



Cette réaction est inhibitrice puisque le complexe XSS est non productible. Dans ce cas, le taux de croissance diminue.

Cette inhibition pourrait être due également à l'augmentation de la pression osmotique à l'extérieur de la cellule (LEVEAU et BOUIX, 1988) ;

- que la concentration limitante en substrat est inférieure ou égale à 0,4 % chez *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148 et inférieure ou égale à 0,6 % chez les autres souches ;
- que ces souches n'ont pas la même affinité pour le glucose (affinité correspond à $1/K_s$). *B. distasonis* souche 462 est la plus affine et *B. fragilis* souche 440 est la moins affine ;
- que le rendement Y passe du simple au double pour *B. vulgatus* souche 154 et *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148 ;
- que la croissance rapide de ces souches ne correspond pas à une assimilation rapide du substrat. En effet, *B. vulgatus* souche 154 a la vitesse de croissance (proportionnelle à μ_{max}) la plus faible ($\mu_{max} = 0,25 \text{ h}^{-1}$) avec une assimilation du substrat (q pour une cellule = $3,3 \cdot 10^{-12} \text{ mmol/h}$) plus rapide que *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148 qui a un μ_{max} de $0,33 \text{ h}^{-1}$. *B. fragilis* souche 290, *B. fragilis* souche 440 et *B. thetaiotaomicron* souche 489 consomment le substrat carboné à la même vitesse mais leurs taux maximaux de croissance sont différents.

D. - Cinétiques de croissance sur mélange de glucose et d'un autre substrat carboné

Nous avons regardé l'effet du glucose sur l'utilisation du galactose, du fructose, du lactose, du maltose et de l'acide polygalacturonique. Nos résultats peuvent être regroupés en 2 types d'observations différentes selon l'autre substrat carboné ajouté au glucose :

- galactose, fructose ou lactose,
- maltose ou acide polygalacturonique.

1 - Galactose, fructose ou lactose

Nous avons effectué des cinétiques de croissance sur ces sucres séparés, ensuite sur mélange de deux sucres que l'on a comparées aux premières. Les sucres du mélange sont à la même concentration : 0,2 % (P/V). Cette concentration a été choisie du fait qu'elle est une concentration du glucose limitante de la croissance de ces souches. En aucun cas n'a été observée de croissance diauxique, les substrats du mélange semblent utilisés simultanément.

A partir de ces cinétiques de croissance (Annexe 2), on a déterminé les taux de croissance et le nombre de cellules à la fin de la croissance (Tab. 13 et 14). Comme dans le cas précédent, ces résultats sont les résultats moyens des essais répétés 3 fois. Par contre, dans l'Annexe 2, les résultats sont donnés à titre d'exemple.

Lorsque l'on compare les taux de croissance des mélanges des sucres et celui du glucose seul, nous constatons trois comportements différents :

- le taux de croissance reste le même chez **B. fragilis** souche 440 et **B. thetaiotaomicron** ATCC 29148 ;
- le taux de croissance diminue chez **B. vulgatus** souche 154 et **B. distasonis** souche 462 ; ceci serait dû au changement de la pression osmotique par l'augmentation de la concentration en substrat ;
- le taux de croissance augmente chez **B. fragilis** souche 290 et **B. thetaiotaomicron** souche 489.

Nous remarquons aussi que :

- à l'exception de la croissance sur le fructose, chez la même souche telle que **B. thetaiotaomicron** ATCC 29148, **B. distasonis** souche 462 ou **B. fragilis** souche 290, les taux de croissance sur les sucres séparés sont identiques ;

Souches	Sucres						
	Glc	Gal	Fru	Lac	Glc/Gal	Glc/Fru	Glc/Lac
B. thetaiotaomicron ATCC 29148	0,26	0,27	0,14	0,26	0,26	0,26	0,26
B. thetaiotaomicron souche 489	0,20	0,26	0,11	0,26	0,30	0,22	0,30
B. distasonis souche 462	0,25	0,25	0,12	0,25	0,21	0,18	0,21
B. fragilis souche 440	0,15	0,19	0,16	0,19	0,16	0,17	0,16
B. fragilis souche 290	0,18	0,18	0,18	0,17	0,36	0,28	0,25
B. vulgatus souche 154	0,16	0,22	0,17	0,22	0,13	0,13	0,14

Tableau 13 - Les taux de croissance en h^{-1} des bactéries du groupe B. fragilis sur des sucres simples ou mélange de deux sucres chacun à une concentration de 0,2 % (P/V).

Souches	Sucres						
	Glc	Gal	Fru	Lac	Glc/Gal	Glc/Fru	Glc/Lac
B. thetaiotaomicron ATCC 29148	2,6	2,6	1,6	2,6	3,2	3,5	3,2
B. fragilis souche 440	1,3	2,1	2,1	2,0	2,6	2,5	2,6
B. thetaiotaomicron souche 489	2,2	2,3	1,5	2,3	3,0	2,0	3,0
B. fragilis souche 290	2,0	2,0	1,4	2,0	3,0	2,2	2,5
B. distasonis souche 462	1,3	1,3	1,4	1,5	2,0	1,4	2,0
B. vulgatus souche 154	1,6	1,6	1,8	1,6	2,6	3,2	2,6

Tableau 14 - Nombre de cellules en 10^9 cellules/ml de culture à la fin de la croissance des bactéries du groupe B. fragilis sur des sucres simples ou mélange de deux sucres chacun à une concentration de 0,2 % (P/V).

- le fructose n'est pas le bon substrat des souches de **Bacteroides thetaiotaomicron** et **distasonis**. La vitesse de croissance sur cet hydrate de carbone est faible par rapport aux autres sucres testés ;
- la croissance de **B. vulgatus** souche 154 sur les mélanges de deux sucres est ralentie par rapport à la croissance sur ces sucres séparés.

D'après le tableau 14, nous constatons que le nombre de cellules/ml des mélanges de sucres est identique ou supérieur au nombre de cellules/ml obtenu à la fin de la croissance sur le glucose seul.

2 - Maltose, acide polygalacturonique

B. thetaiotaomicron est capable de dégrader une grande variété de polysaccharides. Il possède un nombre important de polysaccharidases qui sont toutes intracellulaires. De ce fait, les polysaccharides doivent traverser la paroi pour se trouver en contact avec les polysaccharidases, ceci grâce à des protéines de fixation situées à la surface de la paroi. Les polysaccharidases et les protéines de fixation sont inductibles. Cette induction est inhibée par le glucose (SALYERS et KOTARSKI, 1980 ; ANDERSON et SALYERS, 1989). Cette répression catabolique n'est pas démontrée d'une façon incertaine puisqu'elle n'est pas levée par l'AMPc et aucune cinétique diauxique n'a été mise en évidence. Donc nous avons réalisé des cinétiques de croissance de **B. thetaiotaomicron** souche 489 (mêmes espèces que les autres auteurs) sur des mélanges du glucose et un polysaccharide tel que l'acide polygalacturonique (PGA) ou un disaccharide tel que le maltose. Les enzymes de dégradation et les protéines de fixation du maltose sont aussi réprimés par le glucose (ANDERSON et SALYERS, 1989). Ces cinétiques sont comparés à des cinétiques de croissance sur ces sucres séparés (Figs 24 et 25). Tous ces sucres sont ajoutés au milieu CM à une concentration de 0,2 %. Les cellules sont précultivées sur BHI.

D'après ces résultats, aucune croissance diauxique n'a été observée. Mais, nous remarquons un phénomène surprenant : ralentissement de la croissance sur le mélange par rapport aux sucres séparés.

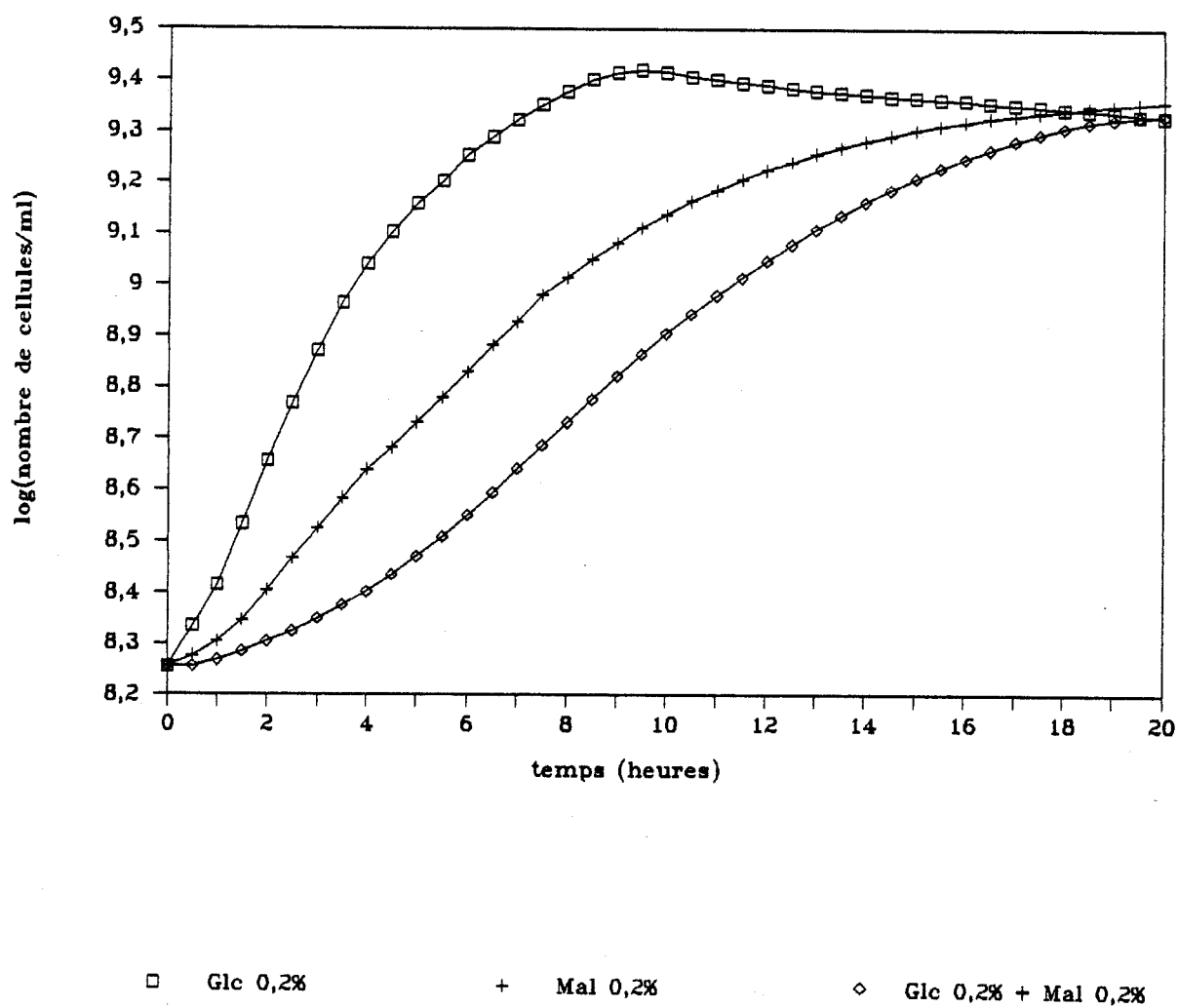


Figure 24 - Croissance de *B. thetaiotaomicron* souche 489 sur : Glc 0,2 % (P/V) ; Mal 0,2 % (P/V) ; Glc 0,2 % (P/V) + Mal 0,2 % (P/V).

Les DO sont prises toutes les 30 min à 630 nm. La préculture est faite sur BHI.

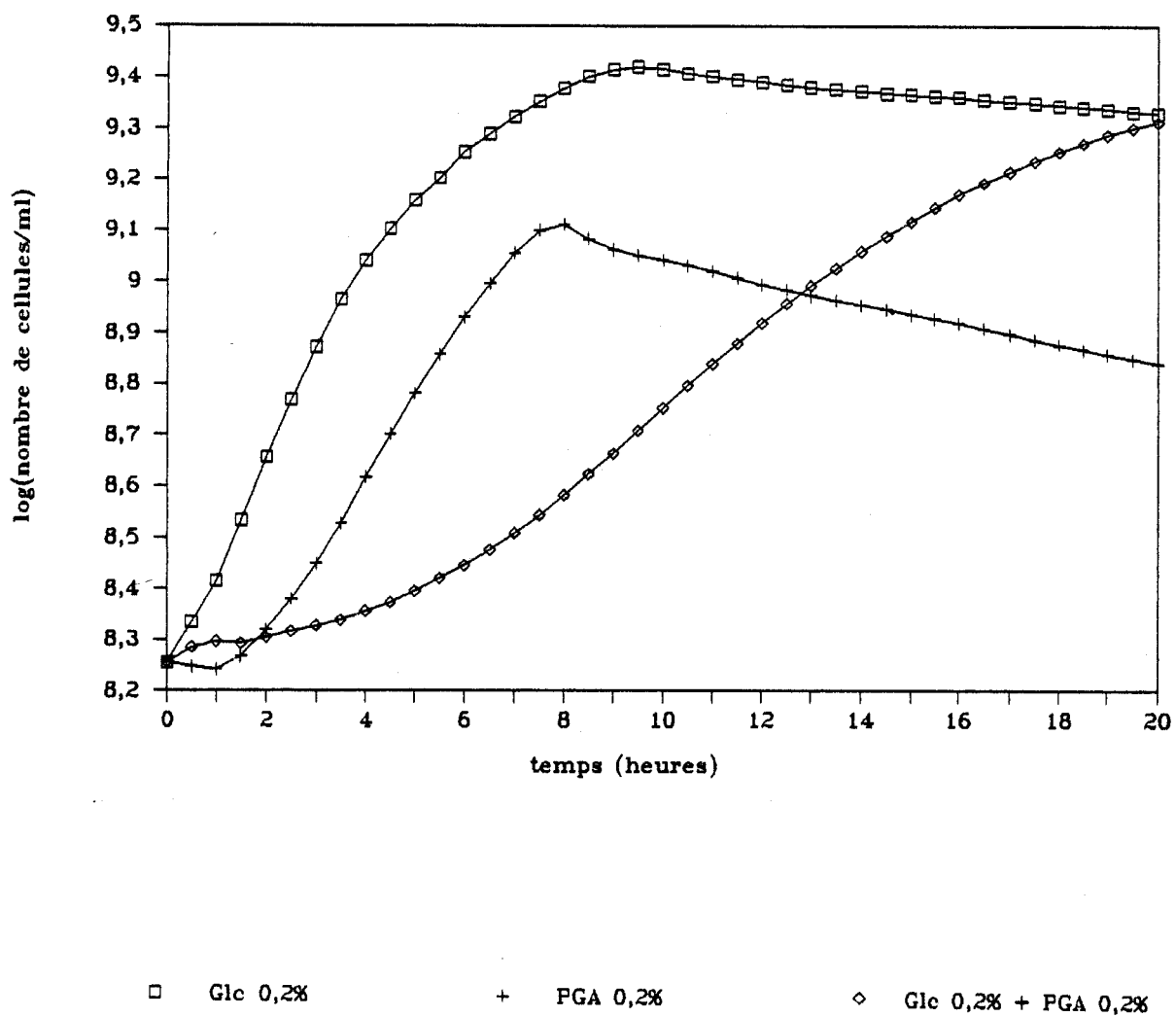


Figure 25 - Croissance de *B. thetaiotaomicron* souche 489 sur : Glc 0,2 % (P/V) ; PGA 0,2 % (P/V) ; Glc 0,2 % (P/V) + PGA 0,2 % (P/V).

Les DO sont prises toutes les 30 min à 630 nm. La préculture est faite sur BHI.

La croissance sur le maltose présente une phase d'accélération de 2 h suivie d'une phase exponentielle de 5h30 avec un taux de croissance de $0,13 \text{ h}^{-1}$. Dans le cas du mélange (Glc/Mal), la croissance est ralentie avec l'apparition d'une courte phase de latence (30 min) ; la phase d'accélération dure 5 h. Le taux de croissance est le même que la croissance sur le maltose seul mais la phase de croissance ne dure que 4h30. A la fin de la croissance, soit sur les sucres séparés, soit sur le mélange, on atteint la même quantité de biomasse ($2,2 \cdot 10^9$ cellules/ml).

La croissance sur PGA est différente de celle sur le maltose, elle démarre après 2 h d'incubation et le nombre de cellules atteint à la fin de la croissance est divisé par 2. La phase d'accélération dure 2 h, la phase exponentielle a un taux de croissance de $0,18 \text{ h}^{-1}$ pendant 3 h. La croissance sur mélange (Glc/PGA) est ralentie avec disparition de la phase de latence. La phase d'accélération est très longue, elle est de 8 h. La phase exponentielle dure 4 h avec un taux de croissance faible par rapport aux sucres séparés : $0,08 \text{ h}^{-1}$. Dans le cas du mélange, on rejoint le nombre de cellules obtenu pour le glucose seul. La limitation du développement des bactéries sur PGA seul pourrait être due à une baisse du pH. En effet, l'hydrolyse de cette macromolécule libère des molécules acides (acide galacturonique) qui modifient le pH.

Un résumé de l'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 15. Nous remarquons que le taux de croissance dans le cas des mélanges est plus faible que celui des sucres séparés. Ceci serait dû au changement de la pression osmotique par l'augmentation de la concentration en substrats.

E. - Conclusion

Les cinétiques de croissance sur milieux empirique et synthétique ont montré que :

- la croissance de **Bacteroides** démarre rapidement sans phase de latence, à l'exception de la croissance sur l'acide polygalacturonique et pourtant le milieu de la préculture est très différent de celui de la culture ;

Paramètres	Sucres				
	Glc	Mal	PGA	Glc/Mal	Glc/PGA
μ (h^{-1})	0,25	0,13	0,18	0,08	0,08
nombre de cellules à la fin de la croissance (10^9 cellules)	2,8	2,8	1,2	2,9	3,0

Tableau 15 - La vitesse de croissance et le nombre de cellules à la fin de la croissance de B. thetaiotaomicron souche 489 sur mélange de deux sucres chacun à 0,2 % (P/V) ou sucres séparés à 0,2 % (P/V). La préculture est faite sur BHI.

- le milieu empirique BHI assure un bon développement de **B. thetaiotaomicron** souche 489. En 9 h de croissance, on atteint une biomasse maximale de $4,2 \cdot 10^9$ cellules/ml de culture ;
- **B. thetaiotaomicron** souche 489 est incapable de se développer aux dépens exclusivement des composés protéiques ;
- des concentrations élevées en glucose (supérieures à 1% P/V) inhibent la croissance de **Bacteroides** sauf celle de **B. thetaiotaomicron** ;
- **B. distasonis** souche 462 possède la plus grande affinité pour le glucose tandis que **B. fragilis** souche 440 est la moins affine ;
- **B. vulgatus** souche 154 a la plus faible vitesse de croissance mais elle assimile mieux le substrat que **B. thetaiotaomicron** ATCC 29148 qui a le μ_{max} le plus important ;
- aucune croissance diauxique sur mélange de deux substrats n'a été observée. Le glucose ne rentre donc pas dans les systèmes complexes de régulation ;
- la croissance de **B. thetaiotaomicron** souche 489 sur les mélanges PGA/Glc ou Mal/Glc est ralentie par rapport à la croissance sur ces sucres séparés. De même, **B. vulgatus** souche 154 et **B. distasonis** souche 462 poussent moins bien sur les mélanges de deux sucres que sur les sucres séparés.

Finalement, le groupe **B. fragilis** assimile les hexoses tels que le glucose et le galactose aussi bien que le dissaccharide lactose qui, après dégradation, fournit deux molécules de sucres simples et beaucoup mieux que le disaccharide maltose et le polysaccharide acide polygalacturonique. Donc, les hexoses sont des excellents substrats ; ils permettent un bon développement des espèces du groupe **B. fragilis** et ils ne rentrent pas dans des systèmes complexes de régulation métabolique comme le glucose chez **E. coli**. Les hexoses, chez les espèces du groupe **B. fragilis**, sont dégradés par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas suivie d'une voie de fermentation qui libère du succinate et du propionate. Le transport des hexoses à travers la membrane cytoplasmique chez ces cellules est très peu connu. En effet, jusqu'à maintenant, une seule équipe de

chercheurs (HYLEMON et coll., 1977) avait déterminé d'une façon incertaine le système de transport du glucose chez *B. thetaiotaomicron* : il pourrait être une diffusion facilitée et l'absence d'un système phosphotransférase PEP-dépendant n'est pas absolue. Donc, il est intéressant d'étudier comment ces excellents substrats pénètrent dans la cellule. Nous avons effectué cette étude d'abord chez *B. thetaiotaomicron* souche 489, ensuite chez les autres espèces du groupe *B. fragilis*. Cette étude avait aussi comme but de vérifier l'homogénéité du groupe du point de vue du mécanisme du transport du glucose.

II. - ETUDE DU TRANSPORT DU GLUCOSE CHEZ BACTEROIDES

A. - Etude du transport du glucose chez *B. thetaiotaomicron* souche 489 : nature, détermination des constantes cinétiques et régulation

L'étude est réalisée chez *B. thetaiotaomicron* souche 489. Les essais sont répétés 3 fois. Les résultats exprimés sont les résultats moyens. La sensibilité de cette manipulation est de l'ordre de 8 %.

1 - Le choix des conditions de mise en oeuvre du procédé d'accumulation du glucose

In vitro, la quantité du glucose accumulé dans la cellule peut être affectée par les conditions expérimentales comme la présence d'oxygène et la concentration cellulaire.

a) L'effet de l'oxygène sur le transport du glucose

Les espèces *Bacteroides* sont des bactéries anaérobies strictes. Chez ces bactéries, l'aération entraîne l'apparition d'un nouvel enzyme : la superoxyde dismutase qui a un rôle fondamental dans la détoxification de l'oxygène par formation de H_2O_2 qui est dégradée par la catalase. L'aération provoque également des modifications de certaines activités biochimiques comme le système de réparation des dégâts provoqués par les ultraviolets (SALYERS, 1984) et l'activité perméasique à travers la membrane cellulaire (HYLEMON et coll., 1977).

- La capacité d'accumulation du glucose

Nous avons donc mesuré l'accumulation du glucose par des cellules préincubées dans trois conditions :

- anaérobiose,
- aérobie,
- aérobie en présence de catalase (4000 UI/ml de suspension cellulaire).

Les cellules sont lavées et suspendues dans du tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7,0. La DO à 600 nm est ajustée à 2,5. Elle correspond à une concentration de protéines totales du lysat de 1,1 mg/ml déterminée à partir de la courbe de la figure 26. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C dans les conditions précitées. Toutes les heures, 500 µl d'une suspension cellulaire de 10 ml sont prélevés, transférés dans un tube renfermant 490 µl de tampon phosphate. L'accumulation est initiée en ajoutant 10 µl du glucose 10 mM. Les conditions expérimentales de cette accumulation en aérobie et en anaérobiose sont expliquées respectivement dans les paragraphes VI, C, 1 et VI, C, 2 du Matériel et Méthodes. Les résultats sont exprimés en nanomoles de glucose accumulées/mg de protéines cellulaires pendant 5 min.

Nous remarquons, à partir de la figure 27, que les cellules préincubées en anaérobiose pendant au moins 5 h gardent la même capacité d'accumulation. Pour les cellules maintenues à l'air, on constate qu'après 2 h d'exposition les capacités d'accumulation diminuent régulièrement. Après 5 h, la réduction est de 28 %. L'addition de la catalase aux échantillons incubés à l'air maintient la capacité d'accumulation durant 1 h puis stimule le transport du glucose pour atteindre un palier, après 3 h d'incubation, de 35 % supérieur à la capacité initiale.

Cette activation est surprenante, elle a été constatée également par HYLEMON et coll. (1977) chez *B. thetaiotaomicron* NCTC 10852. Ce phénomène pourrait être considéré comme paradoxal puisque les espèces *Bacteroides* utilisent le fumarate comme accepteur final d'électrons et sont incapables a priori d'utiliser l'oxygène (HARRIS et REDDY, 1977). Par ailleurs, *B. thetaiotaomicron*, comme *B. fragilis*, *B. distasonis*, *B. gingivalis* et

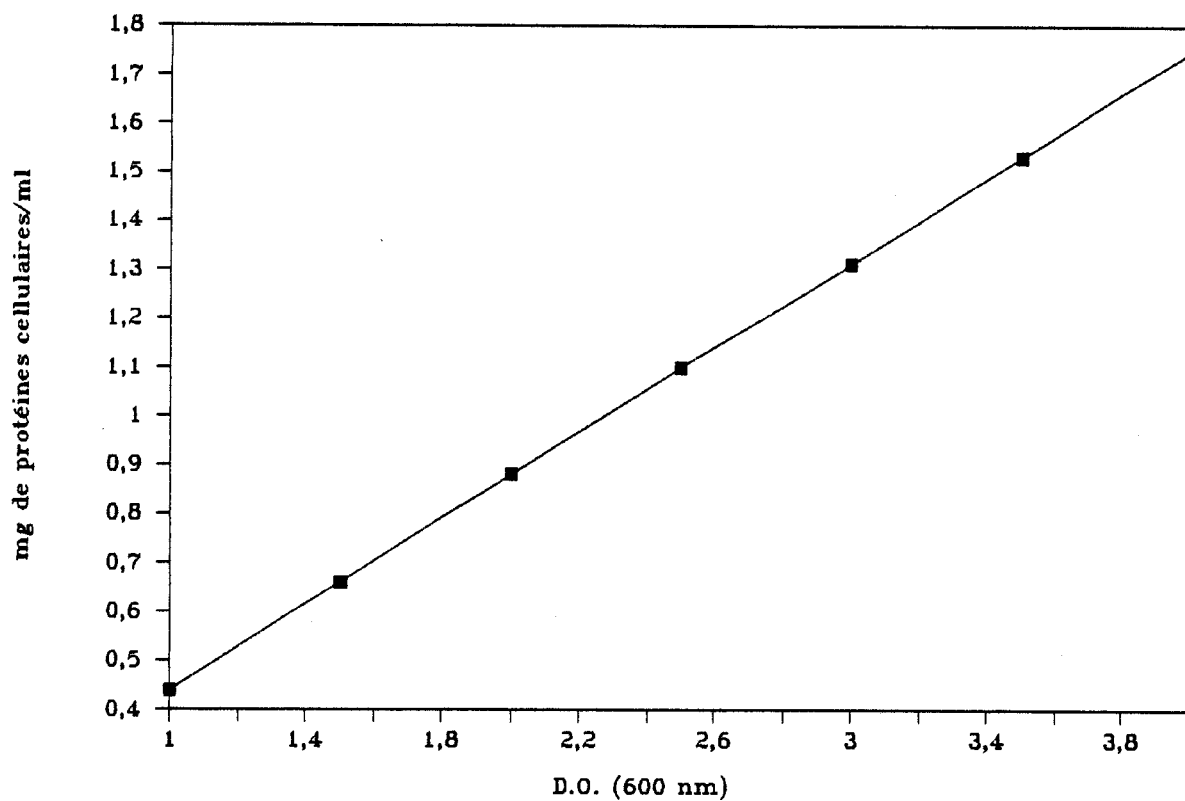


Figure 26 - Dosage de protéines totales des lysats cellulaires bruts à des différentes DO 600 nm.

Les cellules sont lysées par NaOH 2N à température ambiante pendant 24 h.

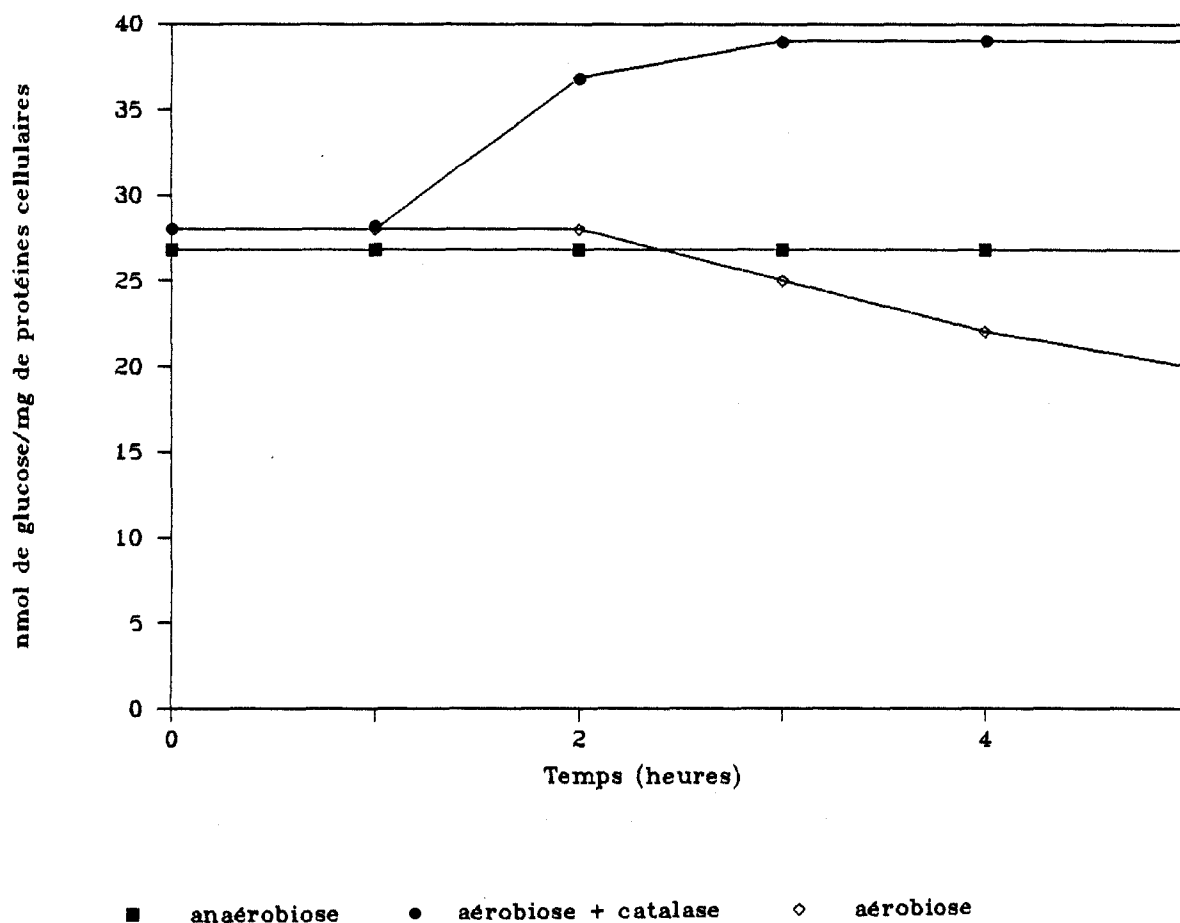


Figure 27 - Comparaison des capacités d'accumulation du glucose de *B. thetaiotaomicron* souche 489 (résultats en nmoles du glucose/mg de protéine obtenus après 5 min d'incubation) en fonction des temps d'incubation préalable des cellules suspendues en tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7.0 à 37°C en :

- anaérobiose
- aérobiose
- aérobiose en présence de catalase (4000 UI/ml de cellules).

B. vulgatus, produit une superoxyde dismutase (SOD) (GREGORY et coll., 1977, PRIVALL et GREGORY, 1979 ; PENINGTON et GREGORY, 1986 ; AMANO et coll., 1990) qui protège la bactérie de l'action létale de l'oxygène. En effet, ce dernier est capable de prendre les électrons de la chaîne d'oxydation cellulaire pour donner le superoxyde, composé très toxique (GOTTSHALK, 1986). La SOD catalyse sa dismutation en H_2O_2 et O_2 . Le H_2O_2 , par la suite, peut être réduit par la catalase, existante chez **Bacteroides**, ou libéré dans le milieu extracellulaire où il est dégradé par d'autres composants (GREGORY et coll., 1977). Cet enzyme est cependant inhibé par des concentrations élevées en H_2O_2 (GREGORY et DAPPER, 1980). En ajoutant de la catalase au milieu, on réduit la quantité de H_2O_2 directement par action de l'enzyme sur le substrat ; on déréprime ainsi la superoxyde dismutase.

La variation de la quantité du glucose accumulé sous ces trois différentes conditions ne peut être qu'apparente. En effet, HYLEMON et coll. (1977) ont montré que **B. thetaiotaomicron** synthétise un polyglucose qui s'accumule dans le cytoplasme. Ils signalent que 50 à 80 % du glucose incorporé sont utilisés à la formation du polyglucose. *In vitro*, cette biosynthèse pourrait être inhibée par ADP, AMP et Pi (PREISS et coll., 1976). Les capacités cellulaires de synthèse de polysaccharides peuvent modifier le transport du glucose.

- La cinétique d'accumulation du glucose

Après 3 heures de préincubation à 37°C en :

- anaérobiose,
- aérobie,
- aérobie en présence de catalase (4000 UI/ml de cellules),

nous avons prélevé 500 μ l de la suspension cellulaire et nous avons effectué l'accumulation du glucose 0,1 mM dans les mêmes conditions que précédemment (1,1 mg de prot./ml). D'après les cinétiques de la figure 28, nous avons déterminé les vitesses initiales d'accumulation du glucose. Elles correspondent à la pente de la courbe au temps 0.

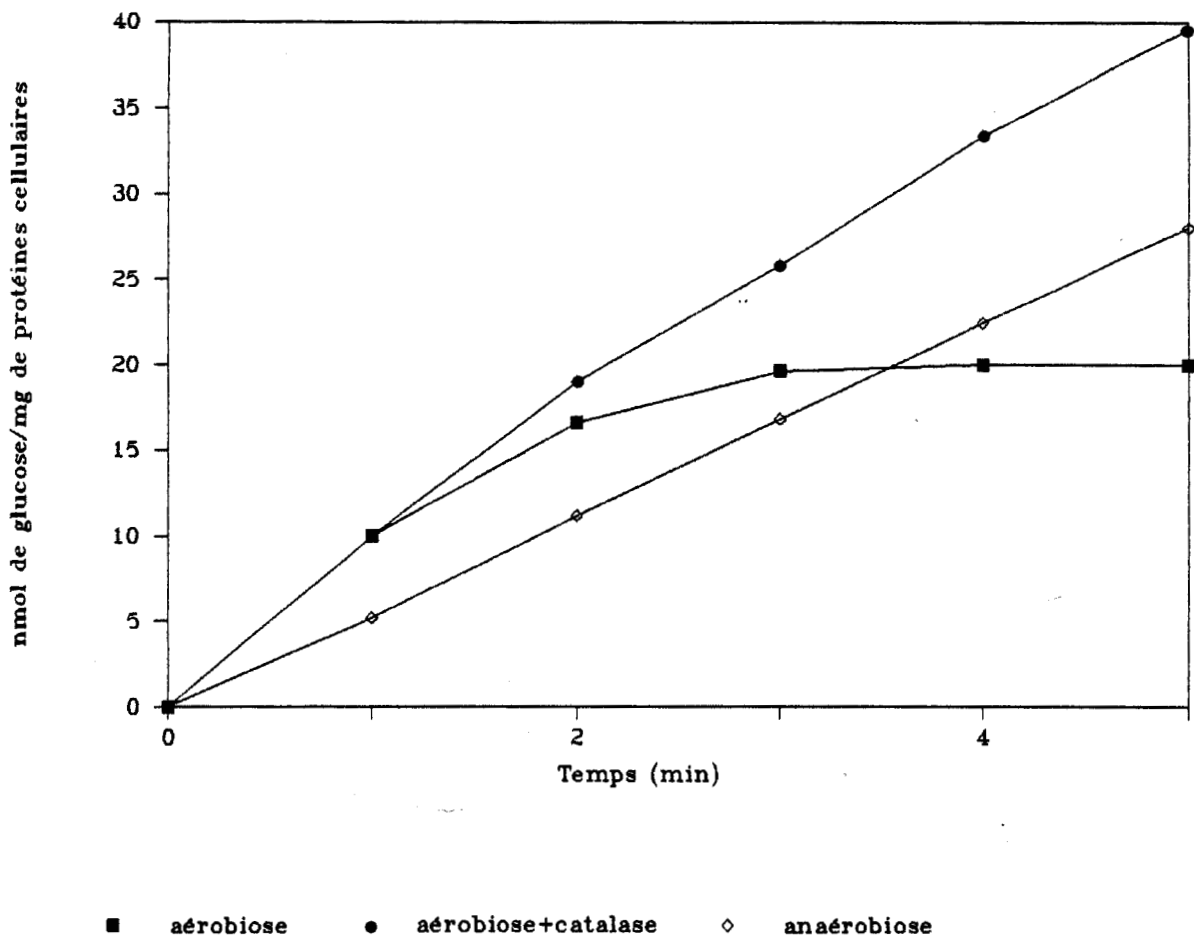


Figure 28 - Cinétiques d'accumulation du glucose 0,1 mM de *B. thetaio-taomicron* souche 489 préincubé pendant 3 h à 37°C sous différentes conditions :

- anaérobiose
- aérobiose
- aérobiose + catalase (4000 UI/ml de cellules).

La concentration cellulaire est de 1,1 mg de protéines totales/ml.

En anaérobiose et en aérobose avec catalase, les cinétiques sont presque linéaires avec des vitesses initiales respectives de 6 et 9 nmoles de glucose accumulées/mg de protéines cellulaires x min.

En aérobose, la cinétique n'est pas linéaire; on atteint un plateau 3 min après l'initiation de l'accumulation. La vitesse initiale est de 9 nmoles de glucose accumulées/mg de protéines cellulaires x min.

Pour le reste du travail, nous avons le choix entre 2 protocoles : anaérobiose et aérobose avec catalase. Nous avons choisi le dernier puisqu'il est facile à mettre en oeuvre et donne des résultats maximaux.

b) L'effet de la concentration cellulaire relative sur le transport du glucose

Lorsque l'on utilise une suspension cellulaire de concentration importante pour l'accumulation du glucose, on obtient des cinétiques d'accumulation non linéaires puisque les cellules accumulent très rapidement tout le glucose disponible. Dans le cas contraire, avec des concentrations cellulaires faibles, on observe des phénomènes d'adsorption du substrat sur la cellule qui se traduisent par une surestimation du substrat accumulé durant les premières secondes.

Afin de diminuer, le plus possible, ces interférences, on a cherché une concentration cellulaire pour laquelle on obtient des cinétiques linéaires. A cet effet, nous avons étudié l'accumulation du glucose par des suspensions cellulaires de DO variables (DO = 1 ; DO = 2 ; DO = 2,5 ; DO = 3 ; DO = 5).

D'après les cinétiques de la figure 29, nous constatons que les vitesses d'accumulation du glucose sont linéaires durant au moins 5 min avec une suspension cellulaire de DO = 2,5 (1,1 mg de protéines/ml).

Nous avons donc choisi le protocole aérobie en présence d'une concentration cellulaire de 1,1 mg de protéines/ml, de la catalase à 4000 UI/ml de suspension cellulaire et du glucose à 0,1 mM.

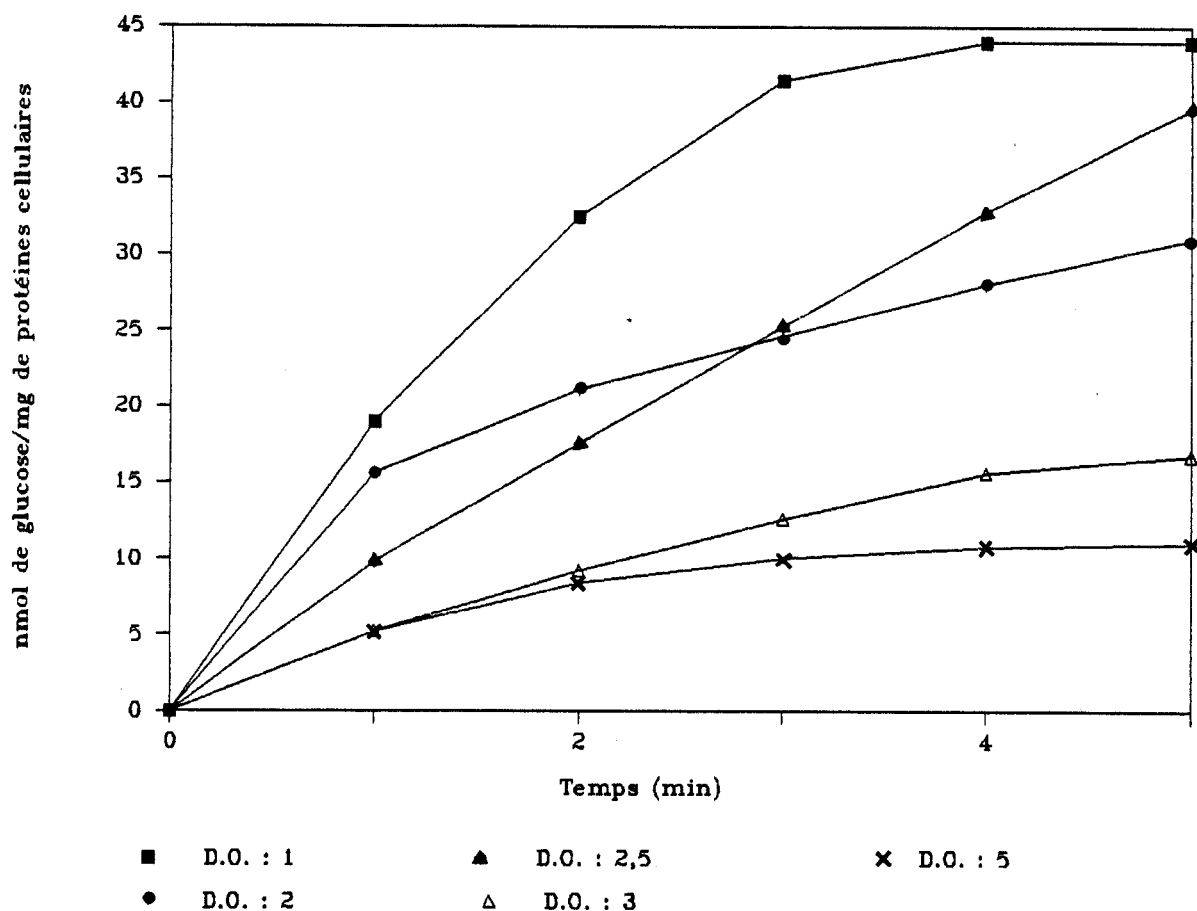


Figure 29 - Accumulation en aérobiose du glucose 0,1 mM par des suspensions de *B. thalioaomicron* souche 489, à différentes concentrations, préincubées 3 h à 37°C en aérobiose avec catalase (4000 UI/ml de cellules).

Les concentrations cellulaires sont exprimées en DO 600 nm.

2 - La cinétique comparée d'accumulation du glucose et d'un analogue : α -méthylglucose

L' α -méthylglucose est un analogue structural du glucose réputé non métabolisable. L'étude de son accumulation nous permettrait de déterminer la nature du transport avec rigueur et de déduire les constantes cinétiques les plus justes possibles. Mais, en cherchant les capacités de croissance de *B. thetaiotaomicron* souche 489 sur ce substrat, nous avons remarqué que cette souche s'y développe après 5 jours d'incubation. Nous avons donc affaire à un substrat peu métabolisable dont on peut étudier l'accumulation puisque cette étude s'effectue en temps bref (5 min). Nous avons ainsi effectué la cinétique d'accumulation de l' α -méthylglucose (0,1 mM).

Les résultats de la figure 30 montrent que l' α -méthylglucose est accumulé avec une vitesse initiale de 3,2 nmoles de glucose accumulées/mg de protéines x min, beaucoup plus faible que celle du glucose (9 nmoles de glucose accumulées/mg de protéines x min). De ce fait, l' α -méthylglucose possède une faible affinité pour le système du transport du glucose ou un système qui lui est propre mais moins performant. Dans le doute, et à cause de la faible vitesse d'accumulation de l' α -méthylglucose, nous avons utilisé pour le reste du travail le glucose : toutes les constantes cinétiques sont donc des constantes relatives.

3 - La nature du transport

a) L'effet de la concentration en substrat sur la vitesse de transfert

La concentration du substrat a une influence sur la cinétique d'accumulation du glucose. Lorsque la concentration en cellules est maintenue constante et que l'on fait varier la concentration en substrat [S], on constate d'abord une augmentation rapide de la vitesse ; mais si [S] continue à croître, la courbe s'infléchit et pour les valeurs élevées de [S] il n'y a plus d'augmentation de la vitesse. La cinétique est dite donc de type Michaelien. Dans le cas contraire (cinétique non michaelienne), l'augmentation de [S] active d'une façon continue l'accumulation.

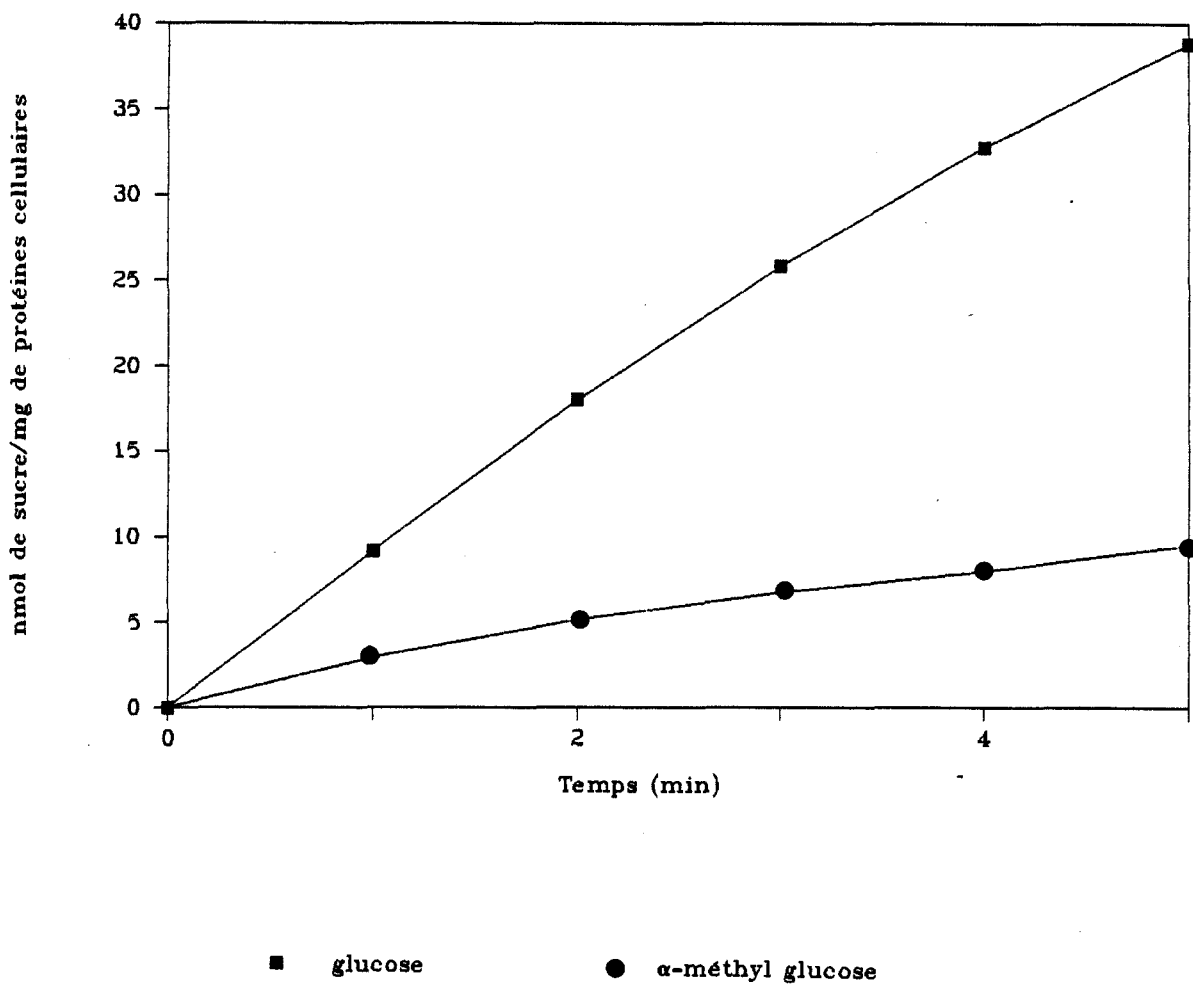


Figure 30 - Cinétiques d'accumulation du glucose 0,1 mM et de l' α -méthyl glucose 0,1 mM en aérobiose par une suspension de B. thetaotaomicron souche 489 (1,1 mg de protéines cellulaires/ml) préincubée 3 h à 37°C en aérobiose avec catalase (4000 UI/ml de cellules).

Nous avons donc étudié la vitesse d'accumulation à des concentrations du glucose différentes pour déterminer le type de cinétique d'accumulation.

La suspension cellulaire est incubée avec des concentrations du glucose variant de 0,1 mM à 4 mM. Pour chaque concentration, des cinétiques d'accumulation de 5 min sont réalisées et les vitesses initiales d'accumulation (V_i) sont calculées (Fig. 31, a-b). Nous remarquons que la variation de V_i , en fonction de la concentration du glucose, est biphasique :

- une phase saturable (Fig. 31a),
- une phase insaturable (Fig. 31b).

Le même type de cinétique a été observé chez *Nocardia asteroides* et chez *Pseudomonas aeruginosa* au niveau du système de transport respectivement du glycérol et du glucose (EAGON et PHIBBS, 1971 ; CALMES et DEAL, 1972),

Chez *B. thetaiotaomicron* souche 489, le glucose serait donc transporté par au moins deux types de mécanismes très différents :

- un mécanisme de type michaélien (actif),
- un mécanisme de type non michaélien (passif).

Les deux systèmes de transport peuvent fonctionner en même temps sauf si l'un masque l'activité de l'autre. En effet, le système actif est dominant à des concentrations en substrat comprises entre 0,1 et 0,6 mM tandis que le système passif est dominant pour des concentrations supérieures à 0,6 mM.

Les valeurs de la constante d'affinité relative (K_m) et la vitesse maximale relative d'accumulation (V_{max}) sont obtenues en exprimant les résultats selon la représentation en double réciproque de Lineweaver-Burk (Fig. 32). Elles sont respectivement de 0,27 mM et de 33 nmoles de glucose accumulées/mg de protéines x min. Le K_m est très élevé par rapport à celui des autres organismes. En effet, chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Spirochaeta aurantia* et *Rhizobium meliloti*, le K_m du transport du glucose est, respectivement, de $1,1 \cdot 10^{-2}$ mM, de $1 \cdot 10^{-3}$ mM et de $0,68 \cdot 10^{-3}$ mM (EAGON et Phibbs, 1971 ; ROBERTS et coll., 1984 ; THEODOROPOULOS et coll., 1985).

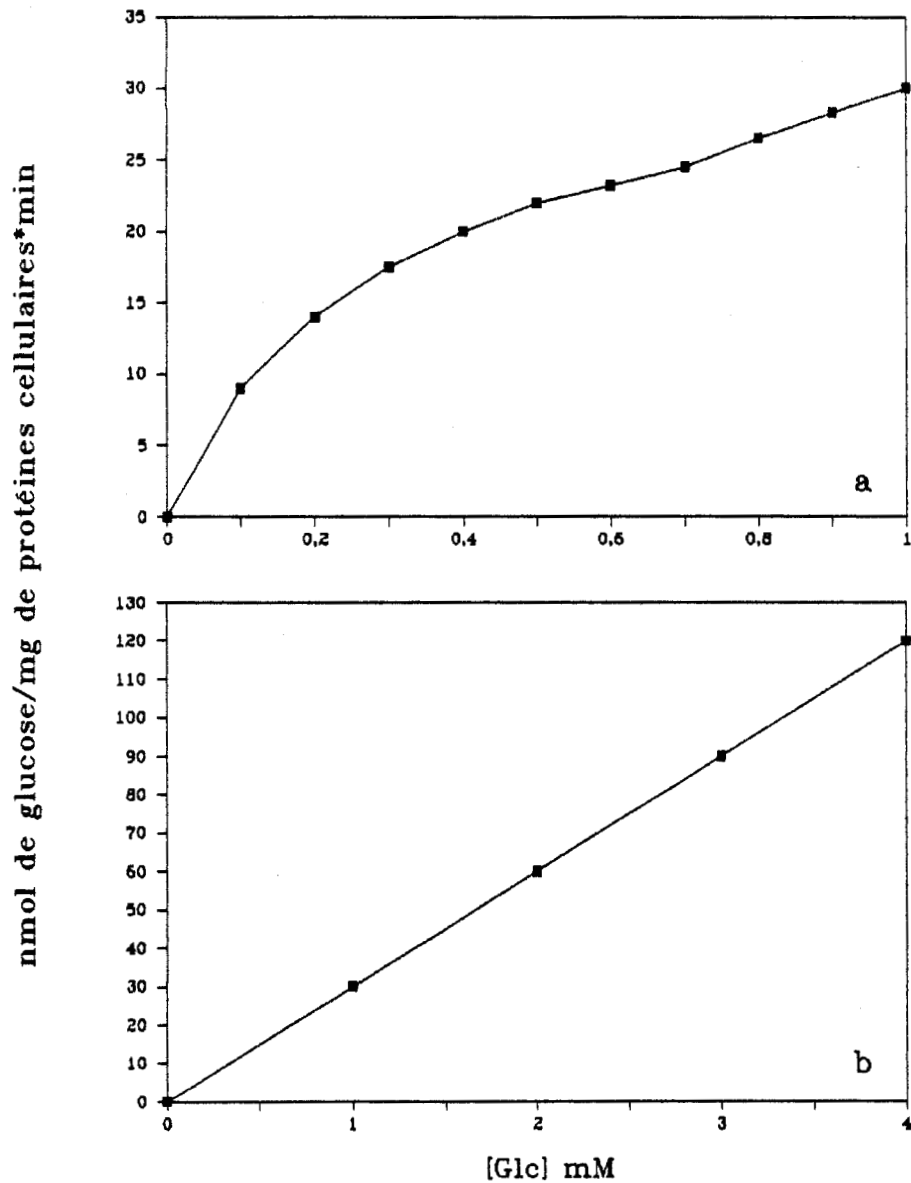


Figure 31 - Représentation michaélienne de la variation de la vitesse initiale relative d'accumulation du glucose en aérobiose chez B. thetaiotaomicron, en fonction de la concentration de ce substrat.

Les cellules (1,1 mg de protéines cellulaires/ml) ont été préincubées 3 h à 37°C en aérobiose avec catalase (4000 UI/ml de cellules).

- (a) $0,1 \text{ mM} \leq [\text{Glc}] \leq 1 \text{ mM}$
 (b) $1 \text{ mM} \leq [\text{Glc}] \leq 4 \text{ mM}$

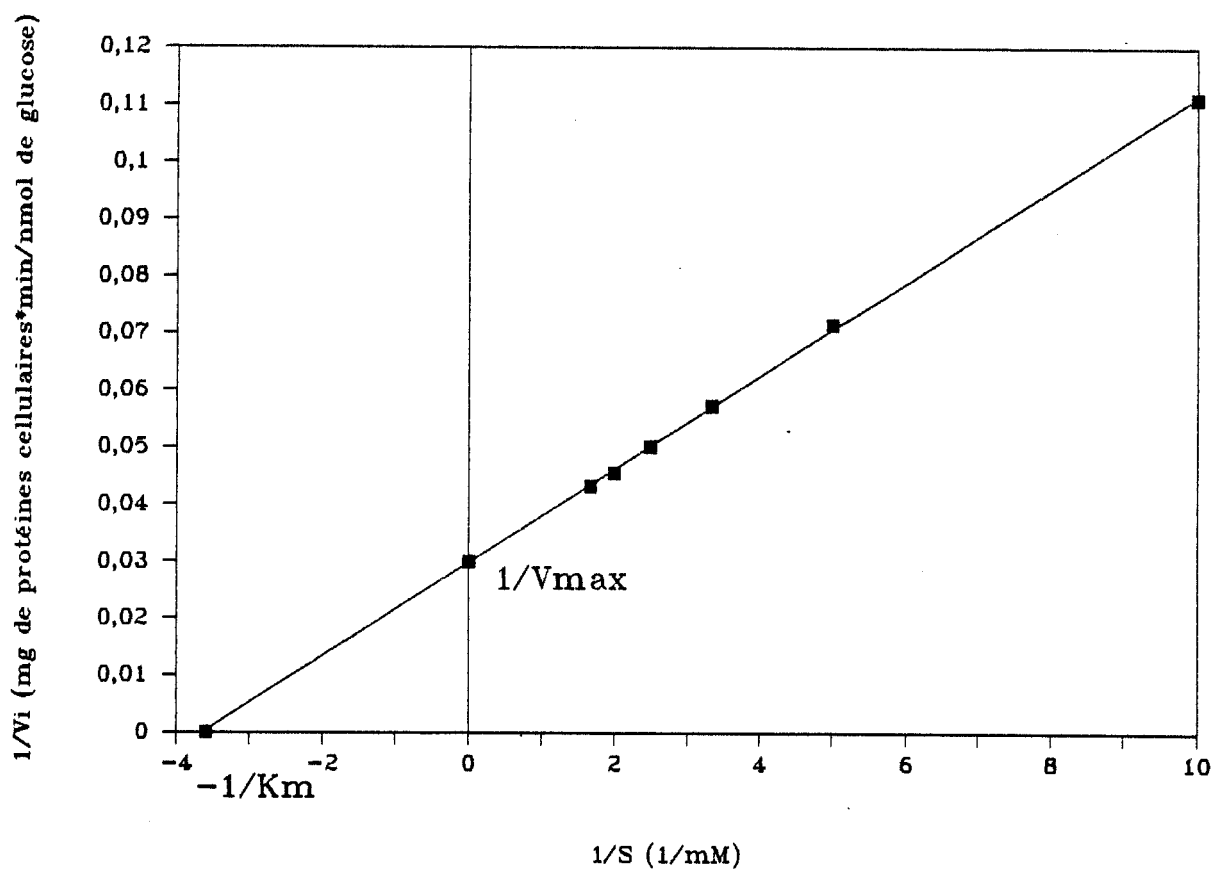


Figure 32 - Représentation en double réciproque de LINEWEAVER et BURK de la variation de la vitesse initiale relative d'accumulation en aérobiose, en fonction de la concentration du glucose chez B. thetaiotaomicron souche 489.

Les cellules (1,1 mg de protéines cellulaires/ml) ont été préincubées 3 h à 37°C en aérobiose avec catalase (4000 UI/ml de cellules).

b) La nature d'énergisation du transport

L'action des inhibiteurs métaboliques lors de l'accumulation du glucose nous renseigne sur le besoin énergétique des cellules pour réaliser ce processus et, éventuellement, sur la nature des donateurs énergétiques impliqués.

Pour cette étude, nous avons réalisé des mesures d'accumulation du glucose en présence de concentrations variables d'inhibiteur. L'inhibiteur est ajouté 15 min (FRANKLUND et GLASS, 1987) avant le substrat marqué. Comme inhibiteurs, nous avons utilisé :

- le cyanure de potassium (KCN) : il inhibe la chaîne d'oxydation cellulaire. Il piège les électrons au niveau du cytochrome b ;
- le 2,4-dinitrophénol (DNP) : c'est un découplant énergétique, il agit sur FoF₁-ATPase en activant l'hydrolyse de l'ATP. FoF₁-ATPase est un enzyme qui synthétise de l'ATP à partir de l'énergie provenant de la chaîne d'oxydation cellulaire ;
- l'azide de sodium (NaN₃) : même effet que DNP ;
- le fluorure de sodium (NaF) : il bloque la synthèse du PEP qui est à l'origine du fonctionnement du système PTS. Il inhibe l'énolase, enzyme de la dernière étape de la formation du PEP ;
- le N-éthyl maléimide (NEM) : il bloque les groupements -SH libres ;
- le chlorure de mercure (HgCl₂) : même effet que le NEM.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité relative résiduelle déterminé après 5 min d'accumulation et par rapport à des mesures témoins sans inhibiteur (Fig. 33, a-b-c-d-e-f).

Les concentrations d'inhibiteurs utilisés sont du même ordre que celles de l'étude de la nature du transport du glucose chez *Fibrobacter succinogenes* (FRANKLUND et GLASS, 1987) à l'exception du DNP. Nous avons utilisé ce dernier à une concentration 30 fois plus élevée.

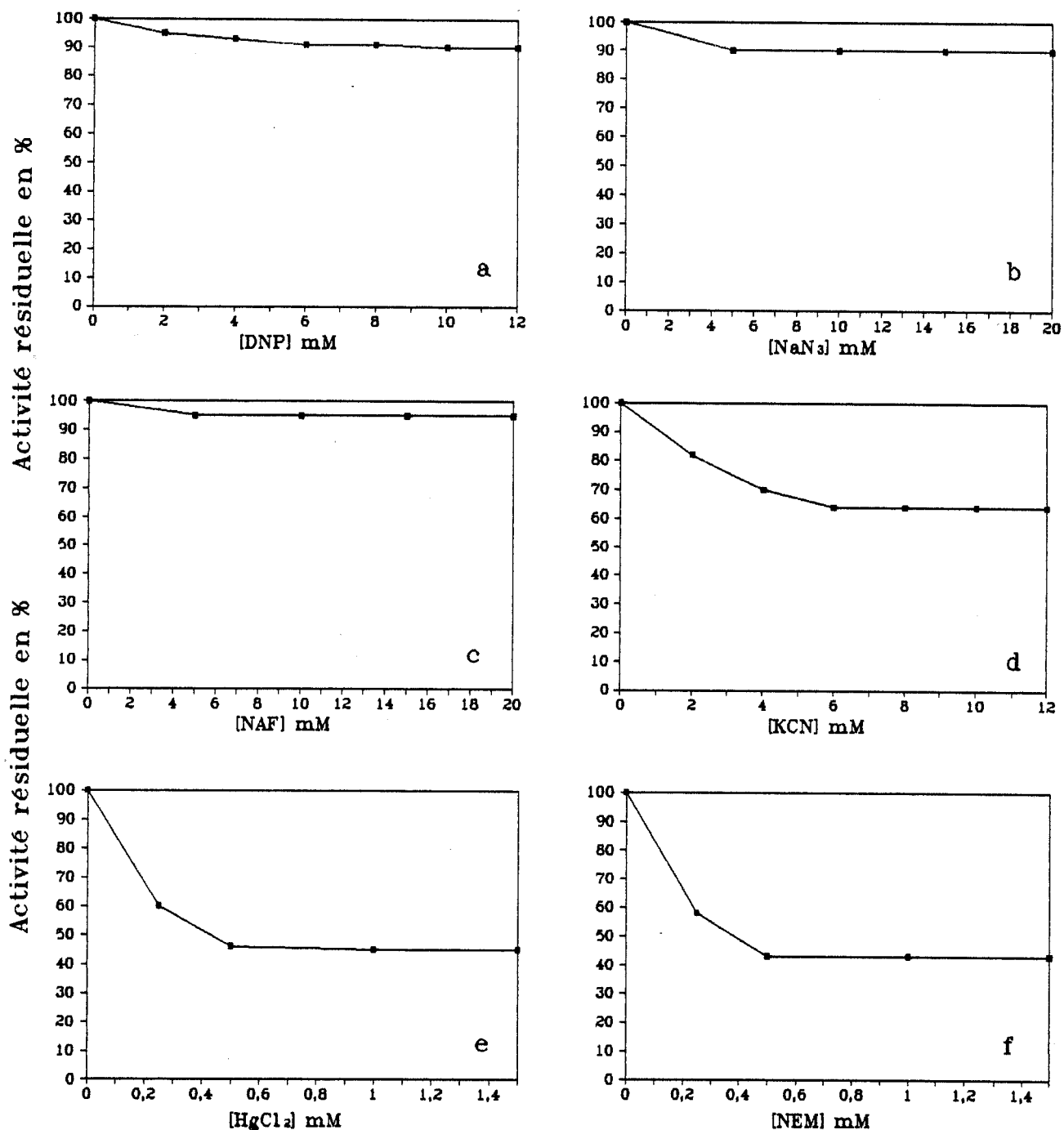


Figure 33 - Action des inhibiteurs métaboliques à concentrations variables sur l'accumulation en aérobiose du glucose chez *B. thetaio-taomicron* souche 489.

Les inhibiteurs sont ajoutés 15 min avant l'addition du glucose 0,1 mM. Les cellules (1,1 mg de protéines cellulaires/ml) ont été préincubées 3 h à 37°C en aérobiose avec catalase (4000 UI/ml de cellules). Le pourcentage de l'activité résiduelle est déterminé après 5 min d'accumulation et par rapport à des mesures témoins.

D'après la figure 33, nous remarquons que l'accumulation du glucose est réduite de moitié et d'une façon rapide en présence des composés qui complexent les groupements -SH libres et en faible concentration tels que HgCl_2 et NEM.

KCN, inhibiteur de la chaîne respiratoire, réduit le transport du 1/3. Par contre, les découplants énergétiques et NaF n'ont pratiquement pas d'action sur la perméabilité de la cellule au glucose. Ces inhibiteurs bloquent, habituellement, le système perméasique du glucose chez *Fibrobacter succinogenes* (FRANKLUND et GLASS, 1987).

De l'utilisation des inhibiteurs, il y a une chose qu'on peut retenir : c'est la présence des fonctions thiols au niveau du site actif. Ces fonctions doivent rester libres pour maintenir la totalité de l'activité perméasique comme chez *F. succinogenes* (FRANKLUND et GLASS, 1987) et *B. thetaiotaomicron* NCTC 10852 (HYLEMON et coll., 1977).

Il est difficile de tirer une conclusion concernant la nature de l'énergie utilisée dans ce système de transport puisque KCN agit de 36 % et les découplants énergétiques et NaF n'ont pas d'effet. Ceci est en faveur d'une diffusion facilitée. Dans ces conditions, la démonstration du transport actif passe par la recherche de l'existence de marqueurs telles que les protéines de liaisons périplasmiques ou la recherche de substrat phosphorylé cytoplasmique.

c) La recherche du système à protéine périplasmique

L'aptitude des sphéroplastes à transporter le glucose a été comparée à celle des cellules de façon à pouvoir mettre en évidence l'existence de protéines périplasmiques impliquées dans les phénomènes d'accumulation du glucose.

- Formation des sphéroplastes

Les sphéroplastes sont préparés par le traitement des cellules à EDTA-lysozyme. Leur formation est suivie par l'appréciation de la sensibilité cellulaire à la pression osmotique, ceci en suivant la diminution de la DO des échantillons dans un milieu hypotonique. En effet, des échantillons sont

prélevés toutes les heures dans le milieu protégé puis dilués rapidement au 1/20 par de l'eau. La DO de la suspension est mesurée à 600 nm. Dans la figure 34, nous avons ainsi représenté la variation de la DO en fonction du temps d'incubation avec le mélange EDTA-lysozyme. Au bout de 5 h, nous obtenons 80 % de forme sensible à la pression osmotique. La formation de sphéropastes a été également suivie par microscopie à contraste de phase (Fig. 35).

- Transport du glucose par les sphéropastes

Sur des sphéropastes de 5 h, nous avons réalisé des cinétiques d'accumulation du glucose (Fig. 36). Ces cinétiques ont été comparées à des cinétiques témoins (cellules traitées à l'EDTA seul).

Nous remarquons que les deux cinétiques ont la même V_i relative. Elle est de 6,32 nmoles de glucose accumulées/mg de protéines x min. Mais, après 5 min d'accumulation, la quantité de glucose incorporée diminue de 5 % chez les sphéropastes. Cette diminution est très faible par rapport à celle des cellules qui transportent le glucose par un système à protéine périplasmique. En effet, chez *Spirochaeta aurantia*, le choc osmotique provoque une perte de la capacité d'accumuler le glucose de 80 % (ROBERTS et coll., 1984). Donc, le système de transport du glucose de *B. thetaiotaomicron* souche 489, comme celui de *F. succinogenes* (FRANKLUND et GLASS, 1987), ne fait pas intervenir des protéines périplasmiques.

d) La recherche de l'existence de la phosphorylation du substrat durant le transport

Le système glucose phosphotransférase phosphoénolpyruvate- dépendant (PTS) est en général limité aux bactéries qui métabolisent le glucose au moins par voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (ROMANO et coll., 1970, 1979). Par cette voie, une molécule du glucose donne deux molécules du PEP. Une molécule peut être utilisée pour le transport d'une molécule du glucose via PTS, l'autre régénère de l'ATP par la pyruvate kinase (MARTIN et RUSSEL, 1986). Ce système de transport phosphorylatif du glucose est énergiquement important chez les microorganismes anaérobies qui ont un faible taux d'ATP. Cet ATP

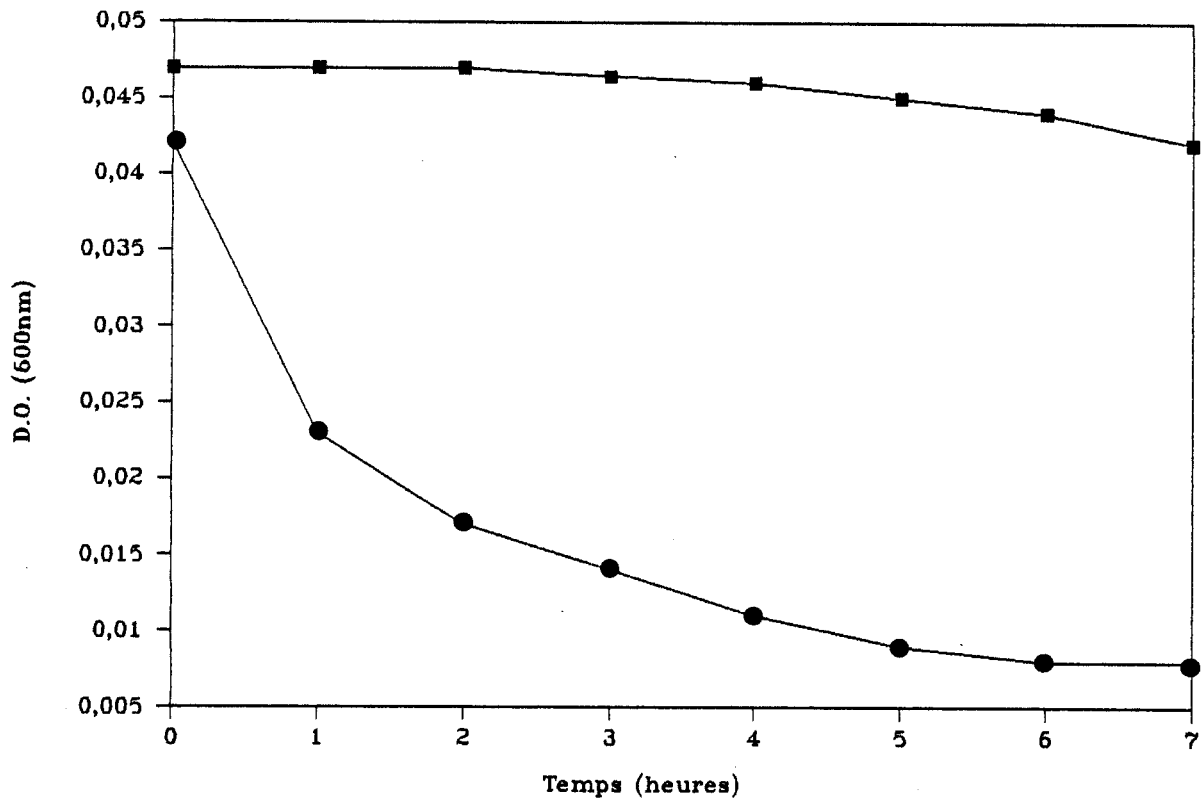


Figure 34 - Formation des sphéropastes chez *B. thetaiotaomicron* souche 489 indiquée par l'augmentation de la sensibilité osmotique des cellules traitées (●), comparée au témoin (■) en fonction du temps d'incubation avec le mélange EDTA-lysozyme.

Dans le témoin, il n'y a que l'EDTA.

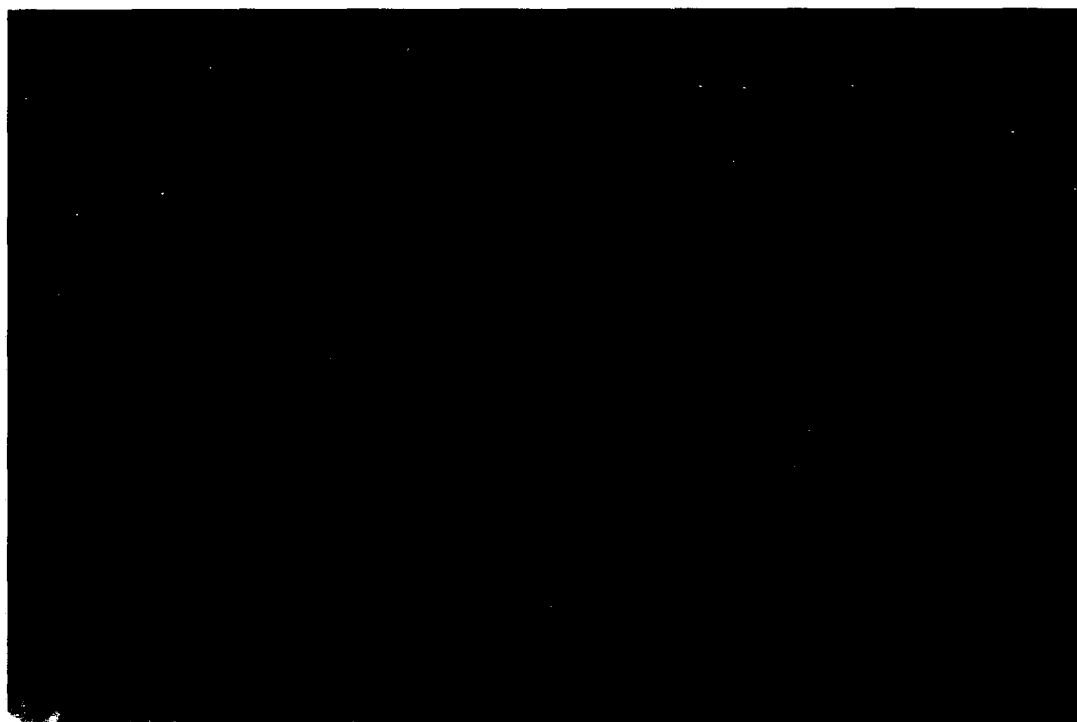


Figure 35 - Photographie des sphéroplastes faite au microscope à contraste de phase.

Les sphéroplastes sont fixés dans de l'agar à 0,8 % additionné du saccharose à 1,5 M.
G : 1000.

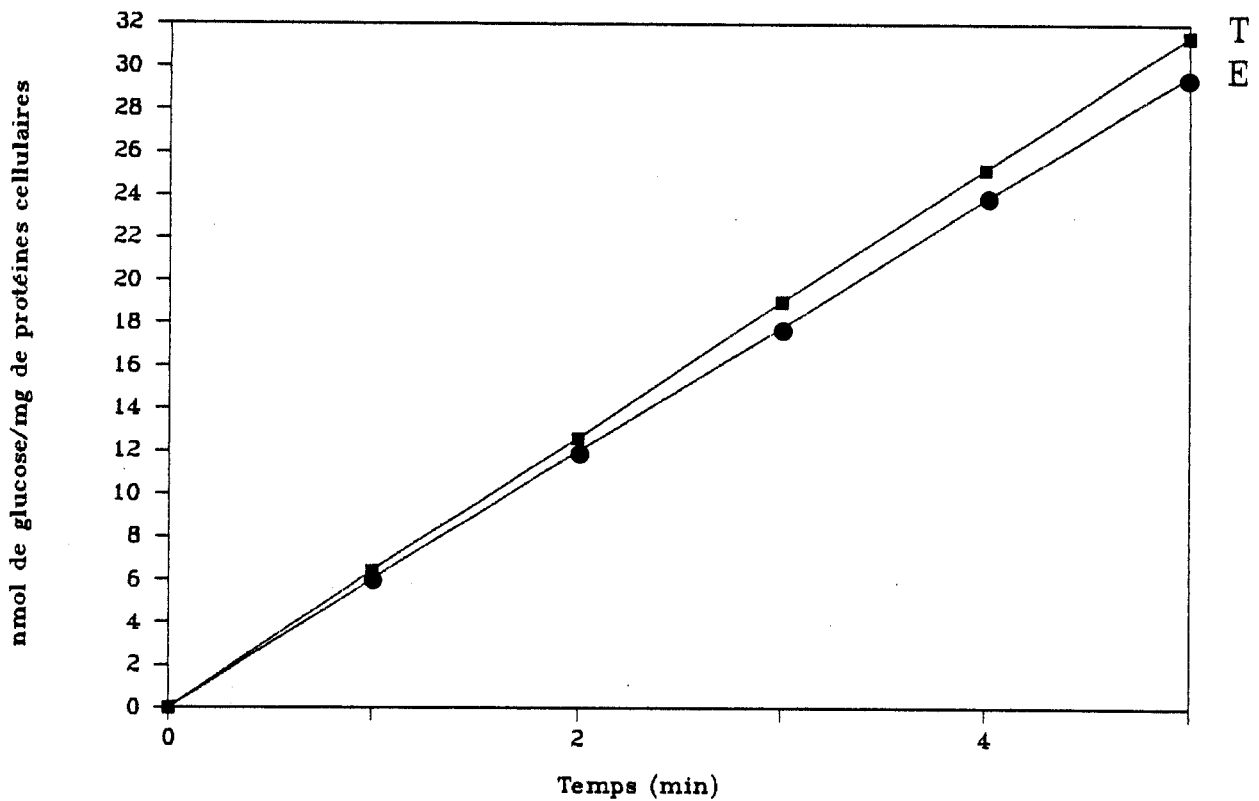


Figure 36 - Cinétiques d'accumulation du glucose chez *B. thetaiotaomicron* souche 489 en aérobiose par des cellules intactes (T) et des sphéroplastés (E).

Les sphéroplastés sont obtenus par le traitement au mélange EDTA-lysozyme. Cette accumulation est initiée après 5 h d'incubation avec ce mélange.

ne sera donc pas épuisé dans la réaction de glucokinase ou d'hexokinase (MARTIN et RUSSEL, 1986).

Nous avons recherché, chez *B. thetaiotaomicron* souche 489, l'existence de substrat phosphorylé sur des cellules perméabilisées au toluène et additionné de PEP et d'ATP comme donneurs de groupements phosphate.

- Principe général de phosphorylation chez des cellules toluénisées

Les cellules toluénisées sont perméables aux solutés à petites molécules. Ce traitement au toluène provoque la fuite de tous les métabolites intermédiaires de telle sorte que la biosynthèse du PEP donneur d'énergie et de phosphate cesse immédiatement. Par contre, le PEP, ajouté au milieu, est capable d'accéder au site d'utilisation pour former avec Hpr le complexe P-Hpr. Les molécules de EI et de Hpr (2 constituants du système PTS) sont, par contre, incapables de franchir la membrane toluénisée (Fig. 37). Dès que le glucose se trouve phosphorylé, il s'échappe librement du cytoplasme et ne reste pas soumis à l'action de la phosphatase. La réaction de phosphorylation continuerait donc linéairement en fonction du temps. Le glucose peut être considéré comme un substrat non métabolisable.

- Préparation des cellules toluénisées

Les cellules ont été traitées par deux concentrations différentes du mélange toluène-éthanol (1/9, V/V) : 3 et 10 % (V/V). Ensuite,ensemencées sur milieu empirique BHI gélosé, seules les cellules traitées par le mélange à 3 % génèrent des colonies après 48 h à 37°C.

Nous avons donc choisi de traiter les cellules par la concentration 10 % du mélange toluène-éthanol qui bloque apparemment la division cellulaire.

- L'effet du PEP ou de l'ATP sur la phosphorylation du glucose

Le mélange réactionnel est constitué de cellules toluénisées, de NaF, d'ATP ou de PEP et de glucose (1 mM). Les résultats obtenus (Tab. 16) ont été comparés à un témoin ne renfermant que les cellules toluénisées, le NaF et le

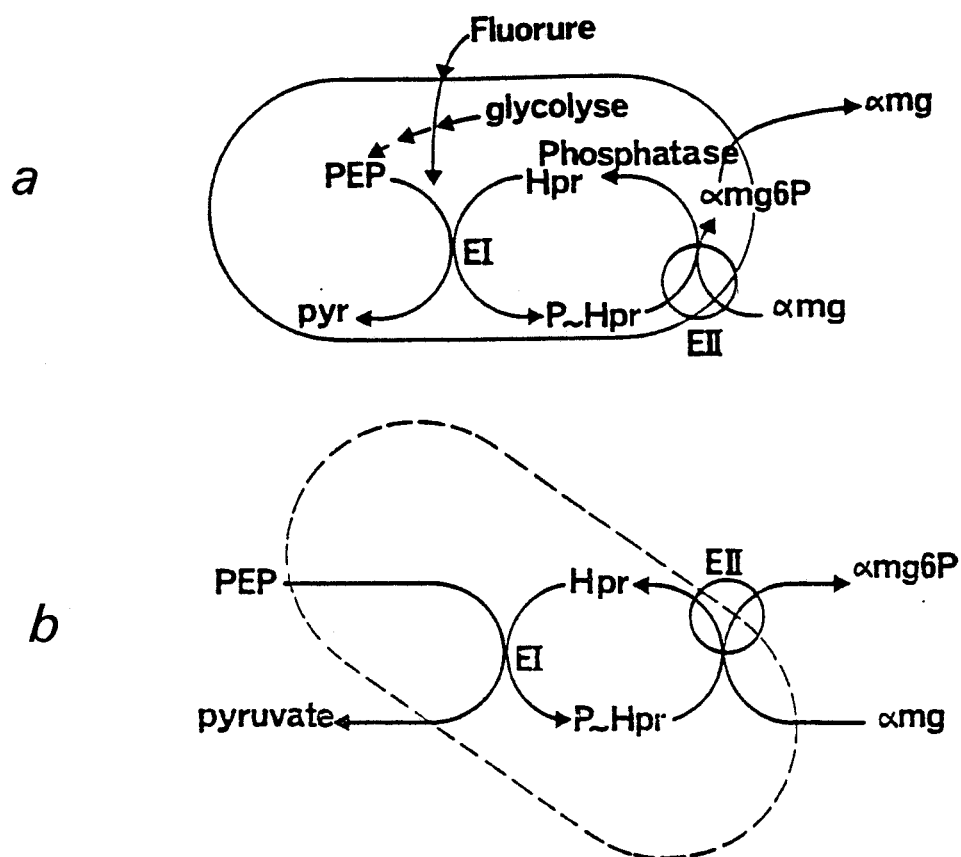


Figure 37 - Phosphorylation de l' α -méthyl glucose par le système PTS (KEPES, 1978).

EI, EII et HPr sont des constituants de ce système. EI et HPr sont cytoplasmiques.

EII est membranaire.

pyr : pyruvate ; PEP : phosphoénol pyruvate ; αmg : α méthyl glucose ; $\alpha\text{mg}6\text{P}$: α méthyl glucose-6-phosphate.

(a) réaction de phosphorylation de l' αmg par les bactéries entières.

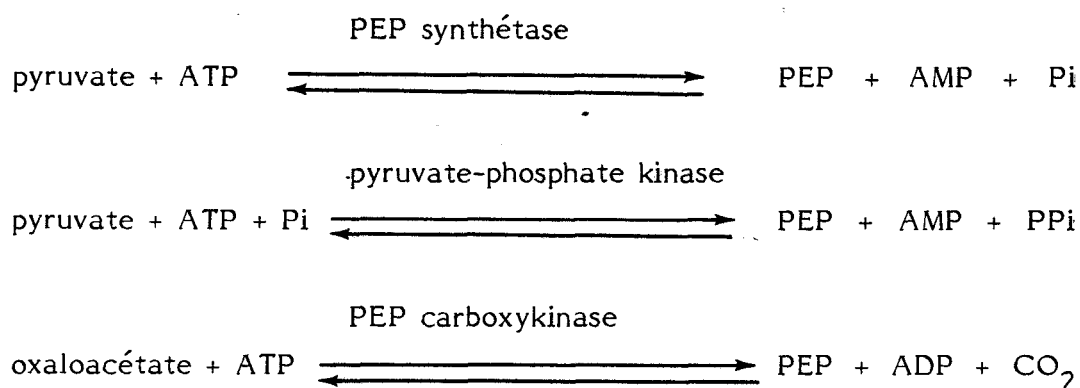
(b) réaction de phosphorylation de l' αmg par des bactéries toluénisées, le PEP accède à EI intracellulaire et $\alpha\text{mg}6\text{P}$ d'échappe librement.

Souche	Témoin	PEP	ATP
<i>B. thetaiotaomicron</i> souche 489	44	7	162
<i>E. coli</i> LE392 rif	21	1 543	508

Tableau 16 - Activité de la phosphorylation du glucose avec ATP ou PEP comme donneur de phosphate, en nanomoles de glucose phosphorylées/mg de protéines, pendant 30 min, chez des cellules traitées par 10 % du mélange toluène/éthanol (1/9, V/V).

Les essais sont réalisés en présence de NaF.
 Dans le témoin il n'y a ni de PEP, ni d'ATP.

glucose. *E. coli* a été utilisé comme témoin positif du bon fonctionnement de la manipulation. Chez *E. coli*, on remarque que l'effet du PEP est important (PEP active la phosphorylation) et l'effet de l'ATP est loin d'être négligeable. Les auteurs expliquent ceci par effet indirect : la synthèse du PEP à partir de l'ATP qui se fait chez les bactéries par trois enzymes (PEP carboxykinase, PEP synthétase et pyruvate-phosphate-dikinase) (GOTTSCHALK, 1986 ; MARTIN et RUSSEL, 1986). Les réactions catalysées par ces enzymes sont les suivantes :



Dans notre cas, PEP inhibe la synthèse du glucose 6P de 84 % peut-être par rétroinhibition.

- L'effet du NaF sur la phosphorylation du glucose

Un essai, réalisé sans NaF, montre une augmentation de la quantité du glucose phosphorylé. Elle passe de 44 à 235 nanomoles du glucose phosphorylés/mg de protéines x 30 min. Ceci montre que les cellules sont sensibles au NaF et que l'activité phosphorylative du glucose serait PEP-dépendante.

- L'effet du PEP et de l'ATP sur la phosphorylation de l' α -méthyl glucose

Dans le mélange réactionnel, nous avons bloqué la synthèse du PEP par NaF, mais il est impossible d'exclure celle de l'ATP (MARTIN et RUSSEL, 1986) ; nous avons examiné la phosphorylation d'un analogue du glucose : α -méthyl glucose. Ce substrat est peu dégradable. En effet, *B. thetaiotaomicron* souche 489 pousse sur milieu CM renfermant de l' α -méthyl glucose à 1 % après 5 jours à 37°C.

Le dosage de la phosphorylation de l' α -méthyl glucose, effectué sur ces cellules toluénisées et en présence du NaF et de l'ATP ou du PEP, est présenté dans le tableau 17. Ces résultats sont comparés à un témoin sans ATP et PEP. D'après ce tableau, nous remarquons que le PEP ainsi que l'ATP activent la phosphorylation de l' α -méthyl glucose. Cette activation est respectivement de 30 % et de 100 %. Nous avons donc une activité phosphorylative ATP-dépendante et PEP-dépendante. L'activité PEP-dépendante est plus faible que l'activité ATP-dépendante. Ceci veut dire que le système α -méthyl glucose phosphotransférase PEP-dépendant n'est probablement pas le mécanisme du transport de l' α -méthyl glucose le plus important sous ces conditions (MARTIN et RUSSEL, 1986). Donc, l' α -méthyl glucose chez *B. thetaiotaomicron* souche 489 est transporté par 2 systèmes différents : un PTS et un non-PTS. Une fois dans le cytoplasme, l' α -méthyl glucose, qui pénètre dans la cellule par le mécanisme non PTS, est phosphorylé par une hexokinase ou une glucokinase ATP-dépendante.

Lorsqu'on compare l'activité phosphorylative de l' α -méthyl glucose à celle du glucose, nous remarquons que :

- l'activité de la phosphorylation de l' α -méthyl glucose est 7 fois plus élevée que l'activité de la phosphorylation du glucose. Ceci pourrait être dû à la dégradation lente de l' α -méthyl glucose ;
- le PEP inhibe la phosphorylation du glucose et non celle de l' α -méthyl glucose. Cette inhibition pourrait être une rétroinhibition par un excès de PEP.

e) Conclusion

Nous avons pu montrer que *B. thetaiotaomicron* souche 489, bactérie anaérobie stricte, voit son système de transport du glucose activé par l'oxygène. Le respect de certaines conditions expérimentales, en particulier l'addition de la catalase, nous a permis d'étudier en conditions aérobies le fonctionnement de ce transport.

Deux systèmes semblent être empruntés par le glucose :

Témoin	PEP	ATP
293	386	593

Tableau 17 - Activité de la phosphorylation de l' α -méthyl glucose avec ATP ou PEP comme donneur de phosphate, en nanomoles de α -méthyl glucose phosphorylées/mg de protéines, pendant 30 min, chez des cellules de B. thetaiotaomicron souche 489 traitées par 10 % du mélange toluène/éthanol (1/9, V/V).

Les essais sont réalisés en présence de NaF.
Dans le témoin il n'y a ni de PEP, ni d'ATP.

- la diffusion facilitée,
- le système phosphotransférase PEP-dépendant.

Le glucose accumulé par diffusion facilitée, une fois dans le cytoplasme, va être phosphorylé par une hexokinase ou une glucokinase ATP-dépendante. Le glucose phosphorylé va emprunter ainsi la voie de la glycolyse.

Ces deux systèmes ou l'un des deux possèdent des groupements -SH libres nécessaires à leur fonctionnement. Le transport du glucose est inhibé par le KCN. Cette inhibition serait due à la modification du potentiel électrochimique membranaire. En effet, l'activité du système PTS dépend de ce potentiel (ERNI, 1990). Le fluorure de sodium agit sur la phosphorylation du glucose chez les cellules toluénisées mais il n'a aucun effet sur l'accumulation du glucose chez les cellules intactes. Ceci pourrait être dû à l'imperméabilité de ces cellules à cet inhibiteur.

Nos résultats concordent avec ceux d'HYLEMON et coll. (1977) qui, outre la diffusion facilitée, ils ont mis en évidence une faible activité PTS. Cette multiplicité de systèmes de transport n'est pas spécifique que de **Bacteroides**. Il existe d'autres bactéries qui ont plus d'un système pour transporter les substrats carbonés. **Nocardia asteroides** accumule le glycérol par un système actif et un système passif (CALMES et DEAL, 1972). **Streptococcus mutans** et **E. coli** utilisent 3 systèmes pour accumuler respectivement le sucrose et le glucose : deux systèmes PTS et un système non-PTS. Pour d'autres souches, comme **Rhizobium leguminosarum** et d'autres espèces de **Rhizobium**, ils ont décrit un seul système et plusieurs perméases à caractères cinétiques différents (DE VRIES et coll., 1982 ; BIGWANEZEA et coll., 1990). Le fonctionnement de ces deux systèmes dépend de la concentration du substrat. A une concentration donnée, l'un des deux systèmes domine l'activité de l'autre.

4 - Spécificité du système perméasique

La spécificité du système de transport est examinée en étudiant la compétition éventuelle de divers composés avec le glucose.

a) Préincubation des cellules 10 min avec le compétiteur avant l'addition du glucose

Les cellules, préalablement cultivées sur le glucose, sont préincubées avec les compétiteurs potentiels à des concentrations de 4, 10 ou 20 mM. La préincubation est faite 10 min avant l'addition du glucose 0,1 mM (FRANKLUND et GLASS, 1987).

Les résultats sont déterminés après 5 min d'accumulation et ils sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'accumulation de ce substrat lors d'une manipulation témoin (Tab. 18).

L'inhibition de l'accumulation du glucose est observée avec le galactose, le mannose et l' α -méthyl glucose. Cette inhibition pourrait être entraînée par :

- le compétiteur
et/ou
- un métabolite intermédiaire issu du métabolisme du compétiteur.

Pour tester ces hypothèses, nous avons ajouté le compétiteur 2 min après l'initiation de l'accumulation du glucose (FRANKLUND et GLASS, 1987).

b) Addition du compétiteur 2 min après l'initiation du transport du glucose

Nous avons réalisé des cinétiques d'accumulation du glucose de 5 min. Au temps de 2 min, on ajoute un des compétiteurs suivants :

- fructose,
- lactose,
- galactose,
- mannose,
- α -méthyl glucose

à la concentration finale de 20 mM.

Concentration	Composés						
	glucose	galactose	mannose	fructose	xylose	lactose	α -méthyl glucose
4 mM	76 ^a	53	26	106	3	15	45
10 mM	77	69	56	110	4	26	49
20 mM	77	70	54	6	2	30	53

Tableau 18 - Action des divers hydrates de carbone sur l'accumulation du glucose chez B. thetaiotaomicron souche 489 (1,1 mg de protéines cellulaires/ml) préincubé 3 h à 37°C en aérobiose avec catalase (4000 UI/ml de cellules).

Les différents hydrates de carbone sont ajoutés 10 min avant l'addition du glucose marqué à 0,1 mM.

a : pourcentage d'inhibition par rapport à un témoin (glucose marqué seul).

Les résultats, présentés dans la figure 38, montrent que les hexoses comme le galactose, le mannose et l' α -méthyl glucose inhibent immédiatement et d'une façon importante (80 %, 100 % et 94 %) l'accumulation du glucose après leur addition dans le milieu réactionnel.

Ces résultats sont identiques à ceux obtenus par HYLEMON et coll. (1977) à l'exception de l' α -méthyl glucose. Le système d'accumulation du glucose ne lui est pas spécifique ; le galactose, le mannose ainsi que l' α -méthyl glucose utilisent ce système.

5 - Etude de l'induction du système

L'inductibilité du système perméasique est étudiée par la mesure de l'accumulation du glucose par des cellules cultivées en présence de différents substrats tels que le glucose, le fructose, le galactose, le lactose ou le xylose à 0,2 % (P/V).

D'après les résultats du tableau 19, nous constatons que, quel que soit le sucre présent dans le milieu de culture, la vitesse d'accumulation du glucose varie très peu. Ceci indique que le système de transport du glucose est :

- soit induit par chacun de ces substrats avec une efficacité peu variable,
- soit constitutif.

6 - Conclusion

Les caractéristiques du transport du glucose étudié en aérobiose et en présence de catalase, chez *B. thetaiotaomicron* souche 489, sont les suivantes :

- le transport du glucose est réalisé par 2 systèmes distincts dépendant de la concentration en glucose ; aucun d'eux ne fait intervenir des protéines périplasmiques :
 - . diffusion facilitée dominante pour des concentrations de glucose supérieures à 0,6 mM,

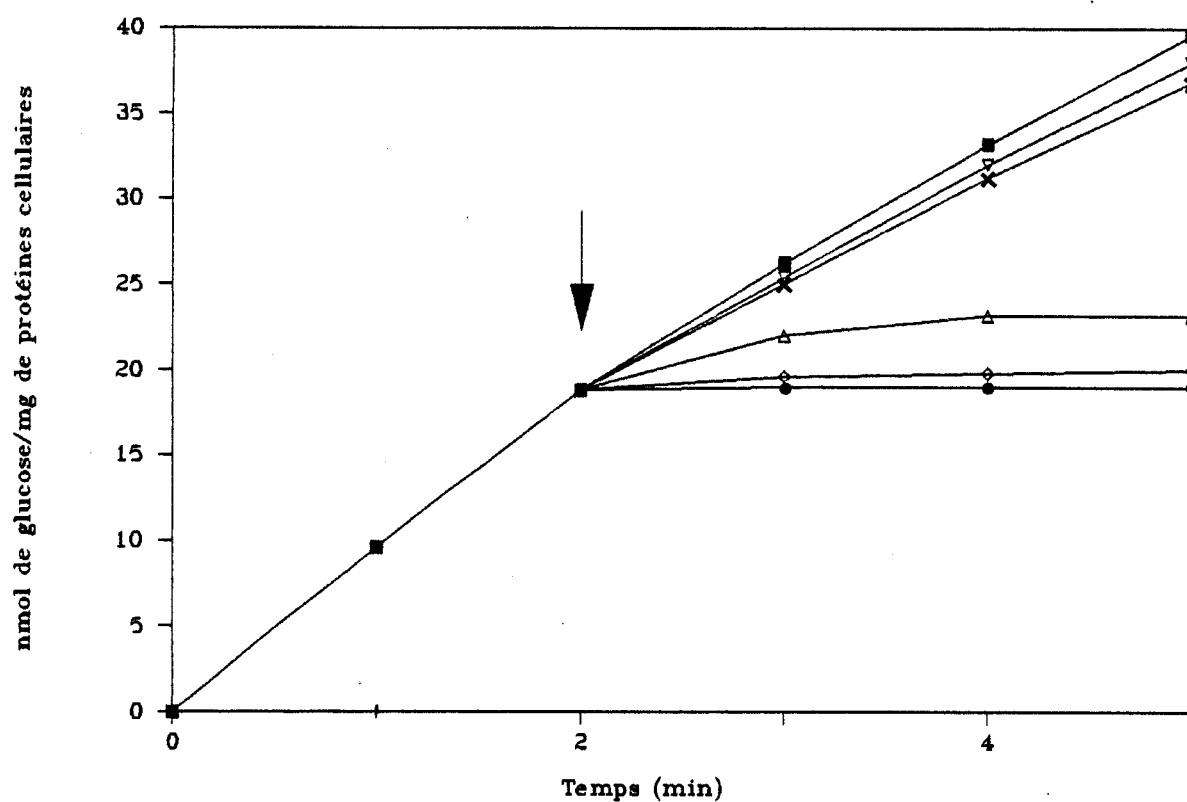


Figure 38 - Inhibition de l'accumulation aérobie du glucose 0,1 mM (■) chez *B. thetaiotaomicron* souche 489 (1,1 mg de protéines cellulaires/ml) par le fructose (▽), le lactose (×), le galactose (△), le mannose (•) et l'α-méthyl glucose (◇) à 20 mM, additionnés 2 min après l'initiation de la réaction.

La flèche indique le moment de l'addition des sucres inhibiteurs. Les cellules ont été préincubées 3 h à 37°C en aérobie avec catalase (4000 UI/ml de cellules).

Croissance sur	Activité mesurée
glucose	41
galactose	40
fructose	31
lactose	39
xylose	40

Tableau 19 - Accumulation du glucose 0,1 mM chez *B. thetaiotaomicron* souche 489 (1,1 mg de protéines cellulaires/ml) en nanomoles de glucose/mg de protéines, pendant 5 min, par des cellules cultivées sur plusieurs substrats à 0,2 %.

Les cellules ont été préincubées 3 h à 37°C en aérobiose avec catalase (4000 UI/ml de cellules).

- système phosphotransférase PEP-dépendant dominant pour des concentrations du glucose inférieures ou égales à 0,6 mM. Les K_m et V_{max} sont respectivement de 0,2 mM et de 33 nmoles de glucose accumulées/mg de protéines cellulaires x min ;
- des fonctions thiols libres sont nécessaires au fonctionnement du système de transport ;
- le système de transport n'est pas spécifique du glucose. En effet, d'autres hexoses (mannose, galactose et α -méthyl glucose) utilisent le même système de transport que le glucose ;
- le système du transport du glucose peut être considéré comme constitutif. En effet, il pourrait être induit par les sucres testés.

B. - La nature du transport du glucose chez les autres espèces du groupe *B. fragilis*

Le groupe *B. fragilis*, étant homogène du point de vue de l'hybridation quantitative ADN-ADN et de quelques caractères biochimiques, nous avons testé l'homogénéité du groupe du point de vue du système d'accumulation du glucose.

Les souches testées sont :

- *B. fragilis* souche 290,
- *B. fragilis* souche 440,
- *B. distasonis* souche 462,
- *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148,
- *B. vulgatus* souche 154.

I - L'effet de l'oxygène sur la capacité d'accumulation du glucose

Comme précédemment (paragraphe II.A.1.a de Résultats et Discussion), des suspensions cellulaires de 10 ml ont été incubées à 37°C en anaérobiose, aérobiose et aérobiose avec catalase (4000 UI/ml de cellules). Toutes les

heures, on prélève 500 µl de suspension cellulaire que l'on transfère dans un tube renfermant 490 µl de tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7.0. L'accumulation est initiée en ajoutant 10 µl de glucose 10 mM. L'accumulation du glucose par des cellules préincubées en aérobiose est mesurée en aérobiose et celle des cellules préincubées en anaérobiose est déterminée en anaérobiose (VI.C.1. et VI.C.2. de Matériel et Méthodes). Les résultats sont exprimés en nanomoles de glucose accumulées/mg de protéines cellulaires pendant 5 min.

Toutes les cellules sont utilisées à une concentration de 0,55 mg de protéines totales/ml, sauf *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148. La concentration de ce dernier est de 1,1 mg de protéines totales/ml. Avec ces deux concentrations, on obtient des cinétiques d'accumulation du glucose presque linéaires.

Les résultats de la figure 39 montrent que :

- l'allure des courbes est différente d'une souche à une autre. Donc, l'effet de l'oxygène et de la catalase sur le transport du glucose n'est pas le même chez toutes les souches de *B. fragilis*. Nous remarquons ainsi une hétérogénéité au sein du groupe *B. fragilis* ;
- le transport du glucose est stable durant la préincubation en anaérobiose pendant au moins 5 h ;
- les systèmes de transport du glucose de toutes les souches sont sensibles à l'oxygène. Après 5 h de préincubation en aérobiose, la quantité du glucose accumulée diminue de :
 - . 78 % chez *B. fragilis* souche 290,
 - . 72 % chez *B. fragilis* souche 440,
 - . 78 % chez *B. distasonis* souche 462,
 - . 84 % chez *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148,
 - . 88 % chez *B. vulgatus* souche 154 ;
- la catalase améliore le transport par rapport à l'aérobiose seule. En effet, après 5 h, l'activité perméasique augmente de 26 % chez *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148 par contre elle ne diminue que de 22 %, 36 %, 25 %

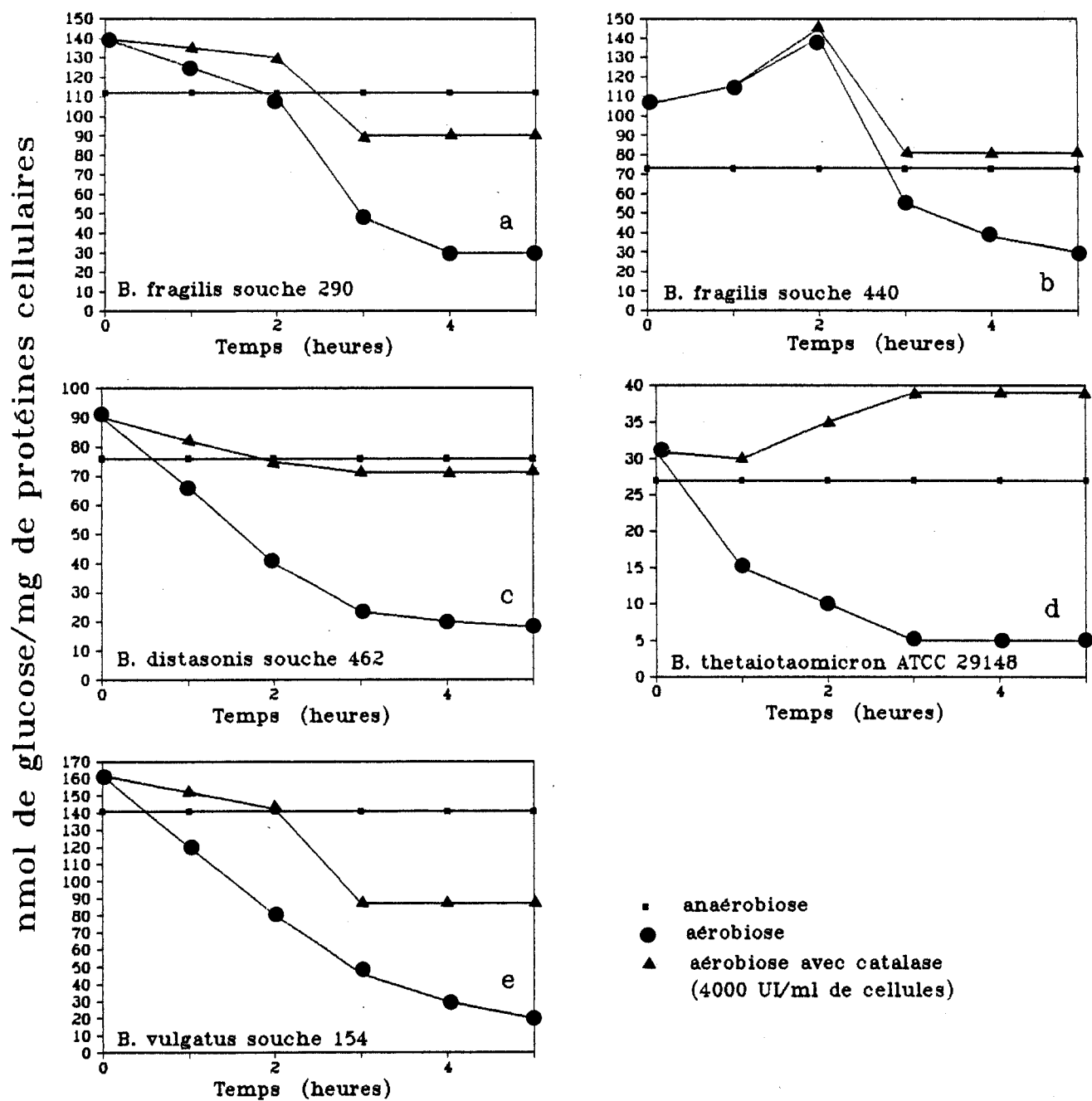


Figure 39 - Comparaison des capacités d'accumulation du glucose 0,1 mM des espèces de *B. fragilis* (résultats en nanomoles du glucose/mg de protéines totales obtenus après 5 min d'incubation) en fonction des temps d'incubation préalable des cellules suspendues en tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7,0 à 37°C en :

- anaérobiose
- aérobiose
- aérobiose avec catalase (4000 UI/ml de cellules)

- (a) *B. fragilis* souche 290
- (b) *B. fragilis* souche 440
- (c) *B. distasonis* souche 462
- (d) *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148
- (e) *B. vulgatus* souche 154

et 46 % respectivement chez *B. distasonis* souche 462, *B. fragilis* souche 290, *B. fragilis* souche 440 et *B. vulgatus* souche 154. Ceci est comparé au transport du glucose au temps 0 ;

- en aérobiose et en présence de la catalase, l'activité perméasique du glucose devient constante après 3 h de préincubation. Cette activité est plus importante que celle de l'aérobiose (Tab. 20). Elle est 1,5 (*B. fragilis* groupe 440), 2 (*B. fragilis* souche 290 et *B. vulgatus* souche 154), 3 (*B. distasonis* souche 462) et 8 fois plus élevée (*B. thetaiotaomicron* ATCC 29148).

Pour l'étude de la nature du transport du glucose chez ces souches, nous avons donc choisi, comme chez *B. thetaiotaomicron* souche 489, le procédé aérobie avec la catalase à 4000 UI/ml de suspension cellulaire, le glucose 0,1 mM et une concentration cellulaire de 1,1 mg de protéines totales/ml (*B. thetaiotaomicron* ATCC 29148) ou 0,55 mg de protéines totales/ml pour les autres souches ;

- *B. fragilis* souche 440 présente un maximum d'accumulation après 2 h de préincubation en aérobiose avec ou sans catalase. Donc, nous avons une activation du transport du glucose avec de l'oxygène qui est difficile à expliquer comme chez *B. thetaiotaomicron* souche 489 et *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148 qui ne dure pas longtemps.

2 - La cinétique d'accumulation du glucose

Après 3 h de préincubation à 37°C en aérobiose avec catalase (4000 UI/ml de cellules), nous avons réalisé les cinétiques d'accumulation du glucose 0,1 mM par les différentes souches du groupe *B. fragilis*. Les cinétiques de la figure 40 nous ont permis de déterminer les vitesses initiales relatives du transport du glucose (Tab. 21).

Nous remarquons que les souches de ce groupe, en aérobiose, n'accumulent pas le glucose avec le même V_i . En effet, selon la valeur de V_i , on distingue 3 groupes : le groupe qui a le V_i le plus fort (*B. fragilis* souche 290 et *B. vulgatus* souche 154), le groupe avec le V_i le plus faible (*B. distasonis* souche 462 et *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148) et le groupe intermédiaire qui a le V_i moyen (*B. fragilis* souche 440).

Souches	Préincubation en	
	Aérobiose	Aérobiose + Catalase
<i>B. thetaiotaomicron</i> 489	20	38
<i>B. thetaiotaomicron</i> ATCC 29148	5	39
<i>B. distasonis</i> 462	23,4	71
<i>B. fragilis</i> 440	55	81
<i>B. fragilis</i> 290	48	90
<i>B. vulgatus</i> 154	46	87

Tableau 20 - Les capacités d'accumulation du glucose 0,1 mM chez les souches de *B. fragilis* préincubées 3 h sous différentes conditions.

Les résultats sont exprimés en nanomoles du glucose accumulé/mg de protéines cellulaires après 5 min d'accumulation.
La catalase est ajoutée à 4000 UI/ml de suspension cellulaire.

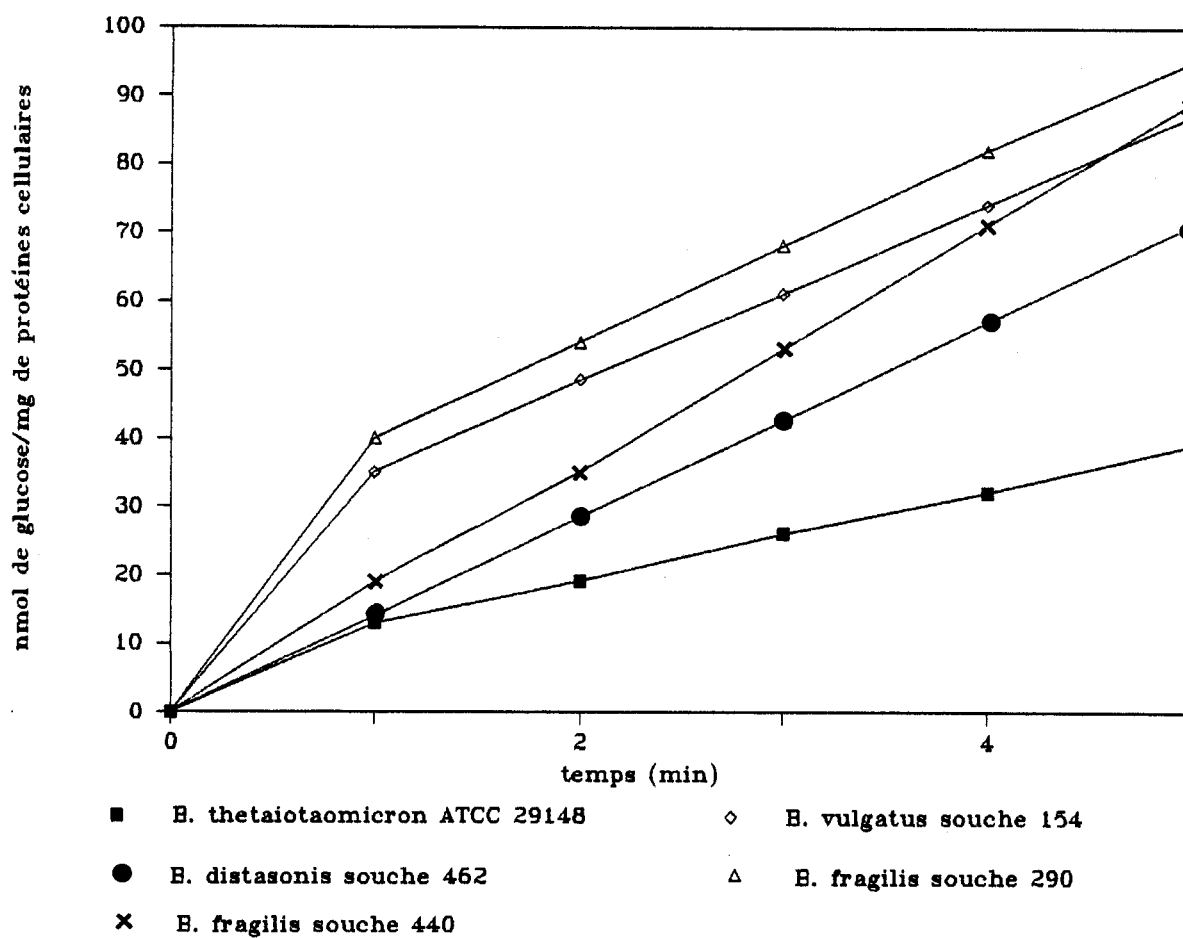


Figure 40 - Cinétiques d'accumulation en aérobiose du glucose 0,1 mM chez les espèces de *B. fragilis* préincubées 3 h à 37°C avec catalase (4000 UI/ml de cellules).

Souches	Vi
B. fragilis souche 290	40
B. vulgatus souche 154	32
B. fragilis souche 440	23
B. distasonis souche 462	14
B. thetaiotaomicron ATCC 29148	14

Tableau 21 - Vitesses initiales relatives (Vi) de l'accumulation en aérobiose du glucose 0,1 mM en nmoles du glucose accumulées/mg de protéines cellulaires x min.

Les cellules ont été préincubées 3 h à 37°C en aérobiose avec catalase (4000 UI/ml de cellules).

3 - La nature du transport

a) La nature d'énergisation du transport

L'action des inhibiteurs métaboliques lors de l'accumulation du glucose nous renseigne sur le besoin énergétique des cellules pour réaliser ce processus et sur la nature des donateurs énergétiques impliqués. Nous avons utilisé les inhibiteurs métaboliques qui ont précédemment servi à l'étude du transport chez *B. thetaiotaomicron* souche 489 : KCN, DNP, NaN_3 , NaF, NEM et HgCl_2 .

Le mode d'action de ces inhibiteurs est cité dans le paragraphe II.A.3.b de Résultats et Discussion.

Nous avons mesuré l'accumulation du glucose en présence d'inhibiteurs en concentration variable. Les inhibiteurs sont ajoutés 15 min avant l'addition du substrat. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité relative résiduelle déterminé après 5 min d'accumulation et par rapport à des mesures témoins sans inhibiteur (Annexe 4). Dans le tableau 22, nous avons reporté la plus faible concentration de l'inhibiteur provoquant la plus forte inhibition. Ces concentrations sont du même ordre que celles utilisées précédemment dans l'étude de la nature du transport du glucose chez *B. thetaiotaomicron* souche 489.

D'après le tableau 22, nous remarquons que l'accumulation du glucose est réduite presque de moitié en présence du composé qui complexe les groupements -SH (HgCl_2) chez toutes les souches. NEM qui a le même effet que HgCl_2 n'inhibe que le système de transport du glucose de *B. fragilis* souche 440 et *B. fragilis* souche 290.

Le cyanure de potassium (inhibiteur de la chaîne respiratoire) réduit également, presque de moitié, la quantité du glucose accumulé chez toutes les souches sauf chez *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148.

Les découplants énergétiques, comme DNP et NaN_3 , inhibent le système du transport du glucose chez quelques souches. En effet, NaN_3 agit sur le

Inhibiteur	DNP	NaN ₃	KCN	NaF	NEM	HgCl ₂
B. distasonis - souche 462	4 mM ^a	10 mM	6 mM	15 mM	1,0 mM	1,5 mM
	35 % ^b	70 %	45 %	10 %	20 %	47 %
B. vulgatus - souche 154	4 mM	5 mM	6 mM	5 mM	1,5 mM	1,5 mM
	55 %	0 %	62 %	0 %	13 %	56 %
B. fragilis - souche 440	8 mM	15 mM	6 mM	15 mM	1,0 mM	1,5 mM
	70 %	42 %	40 %	49 %	72 %	59 %
B. fragilis - souche 290	6 mM	5 mM	6 mM	5 mM	1,5 mM	1,5 mM
	52 %	0 %	45 %	0 %	54 %	48 %
B. thetaiotaomicron ATCC 29148	6 mM	15 mM	6 mM	15 mM	1,0 mM	1,5 mM
	14 %	14 %	4 %	33 %	15 %	63 %

Tableau 22 - Effet des inhibiteurs métaboliques sur l'accumulation en aérobiose du glucose 0,1 mM chez les souches du groupe B. fragilis.

L'inhibiteur est ajouté 15 min avant l'addition du glucose marqué. Les cellules sont préincubées 3 h à 37°C en aérobiose avec catalase (4000 UI/ml de cellules).

a : la plus faible concentration en inhibiteur qui provoque la plus grande inhibition.

b : pourcentage d'inhibition déterminé après 5 min d'accumulation et par rapport à des mesures témoins sans inhibiteur.

La fourchette des concentrations utilisées est donnée en Annexe 4.

système de **B. distasonis** souche 462 et **B. fragilis** souche 440 ; DNP agit sur celui de **B. fragilis** souche 440, **B. vulgatus** souche 154 et **B. fragilis** souche 290. Cet inhibiteur a une action moins importante sur l'accumulation du glucose de **B. distasonis** souche 462 (35 %).

Le fluorure de sodium, inhibiteur de la synthèse du PEP, interagit avec le système de transport du glucose de **B. fragilis** souche 440 et réduit de 49 % la quantité du glucose accumulé chez **B. thetaiotaomicron** ATCC 29148.

De l'utilisation de ces inhibiteurs, on peut dire que :

- les systèmes de transport du glucose chez toutes ces souches possèdent des fonctions thiols libres nécessaires pour maintenir la totalité de l'activité perméasique. Ceci a été démontré précédemment chez **B. thetaiotaomicron** souche 489 ;
- l'action des découplants énergétiques et de l'inhibiteur de la chaîne d'oxydation cellulaire suggère la présence d'un système du transport du glucose actif énergisé par un gradient de protons chez **B. fragilis** souche 440, **B. fragilis** souche 290, **B. distasonis** souche 462 et **B. vulgatus** souche 154. Le même système a été trouvé chez **F. succinogenes** (FRANKLUND et GLASS, 1987) ;
- il est difficile de tirer une conclusion concernant la nature de l'énergie utilisée dans le système de transport chez **B. thetaiotaomicron** ATCC 29148, puisque NaF n'agit que de 33 % et KCN, DNP et NaN_3 n'ont pas d'effet. Ceci serait en faveur d'une diffusion facilitée. La nature de l'énergie du système de transport du glucose de **B. thetaiotaomicron** ATCC 29148 reste indéfinie. Le fluorure de sodium inhibe l'accumulation du glucose de **B. fragilis** souche 440. De ce fait, nous avons recherché l'existence de marqueurs tels que les protéines de liaisons périplasmiques ou de substrat phosphorylé cytoplasmique. Nous avons fait la même recherche chez les autres souches pour voir si elles utilisent plus qu'un système pour transporter le glucose comme **B. thetaiotaomicron** souche 489.

b) La recherche du système à protéine périplasmique

L'aptitude des sphéroplastes à transporter le glucose a été comparée à celle des cellules de façon à pouvoir mettre en évidence l'existence de protéine périplasmique impliquée dans les phénomènes d'accumulation du glucose.

- Préparation des sphéroplastes

La préparation des sphéroplastes est identique à celle décrite pour *B. thetaiotaomicron* souche 489. Leur formation a été suivie par l'augmentation de la sensibilité des cellules, traitées au mélange EDTA-lysozyme, à la pression osmotique, ceci en suivant la diminution de la DO des échantillons dans un milieu hypotonique. En effet, des échantillons sont prélevés toutes les heures dans le milieu protégé puis dilués rapidement au 1/20 par de l'eau. La DO de la suspension est mesurée à 600 nm. Dans l'Annexe 5, nous avons représenté ainsi la variation de la DO en fonction du temps d'incubation avec le mélange EDTA-lysozyme. La formation des sphéroplastes a été également suivie par microscope à contraste de phase.

Nous avons obtenu des sphéroplastes pour toutes les souches testées. Les pourcentages de formes "sphéroplastiques" varient de 47 à 73 % après 5 h d'incubation.

- Transport du glucose par les sphéroplastes

Nous avons réalisé des mesures d'accumulation du glucose 0,1 mM en aérobiose par ces sphéroplastes. Dans le tableau 23, nous avons indiqué le nombre de nanomoles du glucose accumulées/mg de protéines cellulaires pendant 5 min.

D'après ces résultats, nous remarquons que :

- pour les souches *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148, *B. fragilis* souche 440 et *B. vulgatus* souche 154, les résultats d'accumulation du glucose par le témoin et l'essai (sphéroplastes) sont les mêmes ;

Souche	B. thetaiotaomicron ATCC 29148	B. distasonis souche 462	B. fragilis souche 290	B. fragilis souche 440	B. vulgatus souche 154
Témoin	32,4	25,0	20,4	28,5	30,6
Essai	30,0	38,4	32,2	30,2	31,7

Tableau 23 - Accumulation en aérobiose du glucose 0,1 mM des souches de B. fragilis par des cellules entières (témoin) et des sphéroplastes (essai).

Les sphéroplastes sont obtenus par le traitement au mélange EDTA-lysozyme. L'accumulation du glucose est initiée après 5 h d'incubation avec ce mélange. Les résultats sont donnés en nanomoles du glucose accumulées/mg de protéines totales pendant 5 min.

- pour les souches **B. distasonis** souche 462 et **B. fragilis** souche 290, la quantité du glucose accumulée par les sphéroplastés est supérieure à celle du témoin,

d'où on déduit que la libération des protéines du périplasma n'affecte pas le système du transport du glucose. Ce système est indépendant des protéines périplasmiques.

L'augmentation de l'activité du système du transport du glucose chez certains sphéroplastés serait due au contact direct du substrat avec le site actif de ce système ; la paroi et les constituants périplasmiques ne présentent plus d'interférence.

c) La recherche de l'existence de la phosphorylation du substrat durant le transport

Nous avons recherché l'existence de substrat phosphorylé sur des cellules traitées au toluène et additionné de PEP et d'ATP comme donneurs de groupements phosphate. Le principe de cette technique est décrit dans le paragraphe II.A.3.d. de Résultats et Discussion.

Les cellules ont été traitées par 2 concentrations différentes du mélange toluène-éthanol (1/9, V/V) : 3 et 10 % (V/V), ensuite ensemencées sur milieu empirique BHI gélosé. Seules les cellules traitées par le mélange à 3 % génèrent des colonies après 48 h à 37°C. Nous avons donc choisi de traiter les cellules par la concentration 10 % du mélange toluène-éthanol qui bloque, apparemment, la division cellulaire.

- L'effet du PEP ou de l'ATP sur la phosphorylation du glucose

Le mélange réactionnel est constitué de cellules toluénisées, de NaF, de PEP ou d'ATP et de glucose (1 mM). Les résultats obtenus ont été comparés à un témoin ne renfermant que les cellules toluénisées, le NaF et le glucose 1 mM (Tab. 24).

Souche	Glucose		
	Témoïn	PEP	ATP
<i>B. thetaiotaomicron</i> ATTC 29148	0,2	373	14
<i>B. distasonis</i> - souche 462	67	27	190
<i>B. fragilis</i> - souche 440	80	15	240
<i>B. fragilis</i> - souche 290	19	0	260
<i>B. vulgatus</i> - souche 154	29	7	270

Tableau 24 - Activité phosphorylative du glucose, en nanomoles du glucose phosphorylées/mg de protéines totales pendant 30 min, chez des cellules de *B. fragilis* traitées par 10 % du mélange toluène/éthanol (1/9, V/V).

Le témoin correspond à un essai sans ATP et PEP.
Les essais sont réalisés en présence de NaF.

Chez *B. distasonis* souche 462, *B. fragilis* souche 440, *B. fragilis* souche 290 et *B. vulgatus* souche 154, la phosphorylation du glucose est activée par de l'ATP entre 3 et 13 fois par rapport aux témoins respectifs mais l'addition du PEP diminue la phosphorylation de 2 à 5 fois et elle s'annule pour *B. fragilis* souche 290. La phosphorylation du glucose de *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148 est activée par de l'ATP et par du PEP. Cette activation est respectivement de 70 à 1800 fois comme chez *E. coli*.

Donc, nous avons une activité phosphorylative ATP et PEP-dépendante chez *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148 et une activité phosphorylative ATP-dépendante chez les autres souches.

- L'effet du NaF sur la phosphorylation du glucose

Un essai, réalisé sans NaF (Tab. 25), montre une diminution de la quantité du glucose phosphorylé chez toutes les souches sauf chez *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148. Cette diminution est de 73-77 % chez *B. fragilis* souche 440 et *B. vulgatus* souche 154 et de 53-55 % chez *B. fragilis* souche 290 et *B. distasonis* souche 462. Par contre, l'activité phosphorylative de *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148 augmente, elle est 40 fois plus importante.

Donc, chez *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148 l'activité phosphorylative du glucose est sensible au fluorure de sodium, elle serait PEP-dépendante. L'activation de la phosphorylation du glucose par l'ATP dans le paragraphe précédent pourrait correspondre à une glucokinase ou une hexokinase ATP-dépendante qui phosphoryle le glucose entrant dans la cellule par un système non-PTS comme *B. thetaiotaomicron* souche 489 (diffusion facilitée) ou encore à la synthèse du PEP à partir de l'ATP par les enzymes : PEP-carboxykinase, PEP-synthétase et pyruvate dikinase (le mécanisme de ces enzymes est indiqué dans le paragraphe II.A.3.d.) (GOTTSCHALK, 1986 ; MARTIN et RUSSEL, 1986).

Chez les autres souches, la glycolyse est encore fonctionnelle ; une fois que le glucose-6-phosphate est formé, il serait dégradé par la glycolyse avant qu'il n'ait le temps de s'échapper dans le milieu extérieur.

Souche	B. thetaiotaomicron ATCC 29148	B. distasonis souche 462	B. fragilis souche 290	B. fragilis souche 440	B. vulgatus souche 154
sans NaF	9,0	31	8	22	7
avec NaF	0,2	67	19	80	29

Tableau 25 - Activité de la phosphorylation du glucose avec ou sans NaF et en absence de donneur de groupements phosphate, en nanomoles du glucose phosphorylées/mg de protéines pendant 30 min, chez les cellules de B. fragilis traitées par 10 % du mélange toluène/éthanol (1/9, V/V).

- L'effet du PEP et de l'ATP sur la phosphorylation de l' α -méthyl glucose

Dans le mélange réactionnel utilisé pour doser le glucose phosphorylé, nous avons bloqué la synthèse du PEP par NaF mais il est impossible d'exclure celle de l'ATP (MARTIN et RUSSEL, 1986) ; nous avons donc examiné la phosphorylation d'un analogue du glucose : l' α -méthyl glucose. Cet analogue est assimilé lentement par **B. thetaiotaomicron** ATCC 29148 et **B. distasonis** souche 462. Les deux bactéries poussent sur milieu CM renfermant l' α -méthyl glucose à 1 % après 5 jours à 37°C. Le dosage de la phosphorylation de l' α -méthyl glucose, effectué sur des cellules toluénisées et en présence de NaF et de l'ATP ou du PEP, est présenté dans le tableau 26. Le témoin ne renferme que du NaF. On distingue 2 types d'activation de la phosphorylation de l' α -méthyl glucose : l'ATP active la phosphorylation de l' α -méthyl glucose chez toutes les souches. Elle augmente de 2 à 5 fois. Le PEP active cette phosphorylation chez les souches qui métabolisent l' α -méthyl glucose : **B. distasonis** souche 462 et **B. thetaiotaomicron** ATCC 29148. Cette activation est respectivement de 3 et 7 fois.

Ceci correspond à 2 types de phosphorylation :

- une phosphorylation ATP-dépendante chez **B. fragilis** souche 290, **B. fragilis** souche 440 et **B. vulgatus** souche 154 ;
- une phosphorylation ATP et PEP-dépendante chez **B. distasonis** souche 462 et **B. thetaiotaomicron** ATCC 29148.

B. thetaiotaomicron ATCC 29148 et **B. distasonis** 462 ont un système glucose phosphotransférase PEP-dépendant qui n'est probablement pas le seul mécanisme du transport du glucose puisqu'ils ont une phosphorylation ATP-dépendante. L' α -méthyl glucose qui pénètre dans la cellule par un mécanisme différent du système PTS va être phosphorylé par une hexokinase ou une glucokinase ATP-dépendante. L'activité ATP-dépendante peut correspondre également à la synthèse du PEP à partir de l'ATP par les trois enzymes suivantes : PEP-carboxykinase, PEP-synthétase et pyruvate-phosphate dikinase (GOTTSCHALK, 1986 ; MARTIN et RUSSEL, 1986). Le mécanisme de ces enzymes est cité dans le paragraphe II.A.3.d. de Résultats et Discussion.

Souche	α -méthyl glucose		
	Témoin	PEP	ATP
B. thetaiotaomicron ATTC 29148	59	431	284
B. distasonis - souche 462	195	527	352
B. fragilis - souche 440	300	272	483
B. fragilis - souche 290	309	291	468
B. vulgatus - souche 154	228	214	372

Tableau 26 - Activité phosphorylative de l' α -méthyl glucose, en nanomoles de α -méthyl glucose phosphorylées/mg de protéines pendant 30 min, chez des cellules de B. fragilis traitées par 10 % du mélange toluène/éthanol (1/9, V/V).

Le témoin correspond à un essai sans ATP et PEP.
Les essais sont réalisés en présence de NaF.

Dans ces conditions expérimentales, le système non-PTS a une activité moins importante que le système phosphotransférase. En effet, le PEP active la phosphorylation plus que l'ATP. Chez les autres souches, la phosphorylation de l' α -méthyl glucose est une activité ATP-dépendante qui correspond à une hexokinase ou une glucokinase.

Lorsqu'on compare l'activité phosphorylative de l' α -méthyl glucose et celle du glucose, nous remarquons, comme pour *B. theta* souche 489, que :

- l'activité de la phosphorylation de l' α -méthyl glucose est plus élevée que celle du glucose. Ceci pourrait être dû à la non dégradation ou à la dégradation lente de cet analogue chez les souches capables de l'assimiler ;
- le PEP inhibe la phosphorylation du glucose et non celle de l' α -méthyl glucose. Il s'agit peut-être, dans le cas du glucose, d'une rétroinhibition par un excès du PEP.

d) L'effet des cations monovalents

FRANKLUND et GLASS (1987) ainsi que MAAS et GLASS (1990) ont démontré que les cations Na^+ et Li^+ activent le transport du glucose énergisé par un gradient de protons chez *F. succinogenes*. Nous avons donc testé l'effet de ces cations monovalents sur l'accumulation du glucose chez les souches du groupe *B. fragilis* qui possèdent ce système de transport : *B. distasonis* souche 462, *B. fragilis* souche 290, *B. fragilis* souche 440 et *B. vulgatus* souche 154.

Pour cette étude, nous avons réalisé des mesures d'accumulation du glucose en présence de NaCl ou de LiCl à des concentrations variant de 0 à 100 mM. Ces cations monovalents sont ajoutés 10 min avant l'addition du glucose à une concentration de 0,1 mM. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle déterminé après 5 min d'accumulation et par rapport à des mesures témoins (Fig. 41).

On remarque que les ions sodium n'affectent le transport dans aucune des souches testées. Les ions lithium le réduisent considérablement (55 à 75 %).

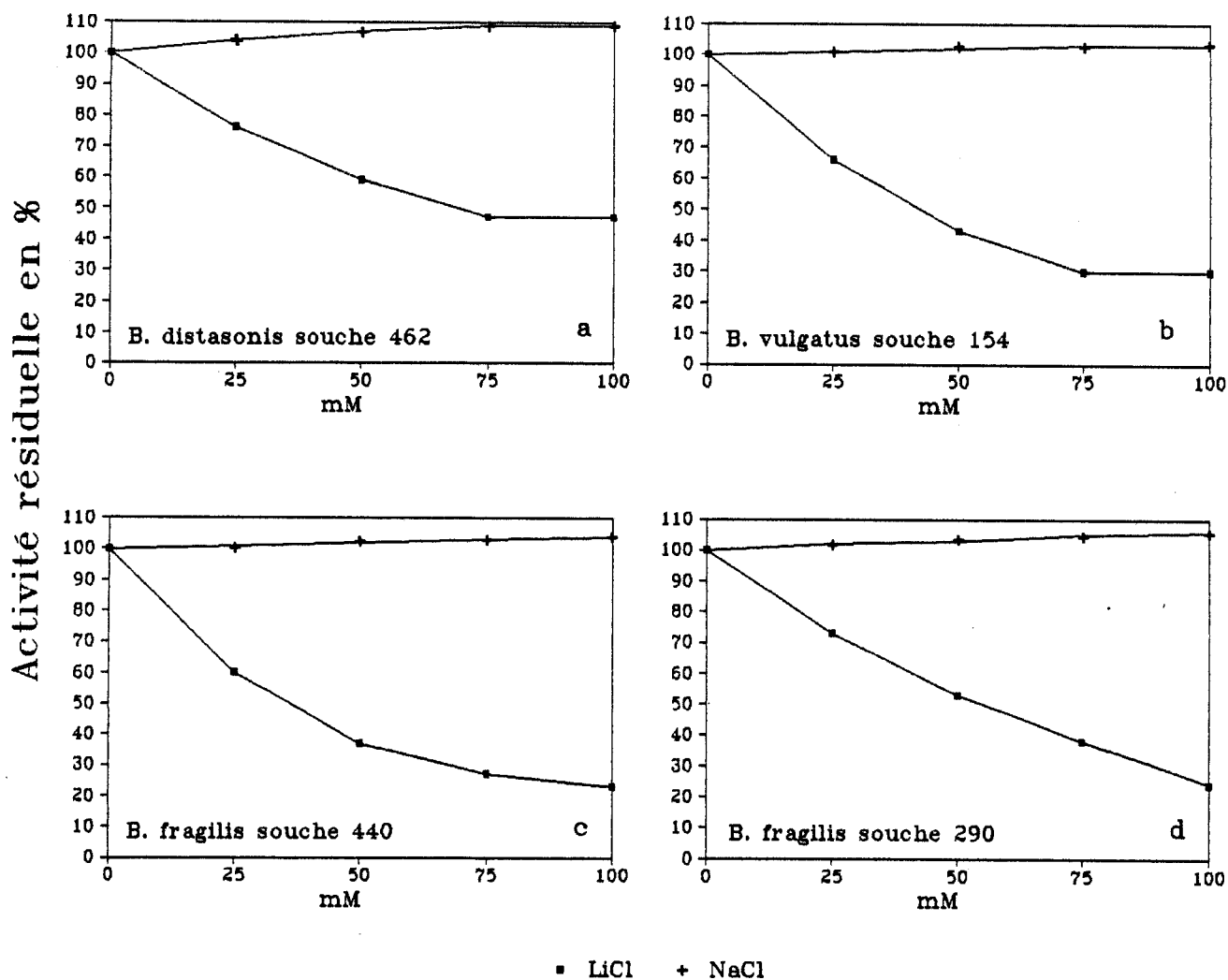


Figure 41 - Action des ions monovalents sur le transport en aérobose du glucose chez *B. fragilis*.

Ils sont ajoutés 10 min avant l'addition du glucose 0,1 mM. Le pourcentage d'activité résiduelle est déterminé après 5 min d'accumulation et par rapport à des mesures témoins (sans cations).

- (a) *B. distasonis* souche 462
- (b) *B. vulgatus* souche 154
- (c) *B. fragilis* souche 440
- (d) *B. fragilis* souche 290

Ceci n'est pas dû à l'inhibition de l'accumulation mais à la toxicité des ions lithium lorsqu'ils sont présents à concentration élevée dans le cytoplasme (TANAKA et coll., 1980). Donc, le transport du glucose chez ces souches du groupe *B. fragilis* est indépendant des cations monovalents comme Na^+ et Li^+ . La présence du cotransport Na^+ /glucose chez les bactéries du rumen est sûrement liée à leur environnement riche en Na^+ (RUSSEL et coll., 1988). Ce cotransport est couramment rencontré chez les bactéries qui vivent en présence des concentrations importantes en Na^+ , comme les bactéries marines (DRONIUK et coll., 1987).

4 - Conclusion

Nous avons montré que l'effet d'oxygène sur le transport du glucose chez les souches du groupe *B. fragilis*, bactéries anaérobies strictes, est différent d'une souche à une autre et que la présence de la catalase améliore l'activité perméasique. L'addition de la catalase nous a permis d'étudier en conditions aérobies le fonctionnement de ce transport. Deux mécanismes semblent être empruntés par le glucose pour traverser la membrane cytoplasmique de *B. distasonis* souche 462 et de *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148. Ces systèmes sont le système phosphotransférase PEP-dépendant et le système énergisé par un gradient de protons indépendant des ions sodium ou lithium (*B. distasonis* souche 462) ou diffusion facilitée (*B. thetaiotaomicron* ATCC 29148). Les résultats de *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148 concordent avec les résultats précédents donnés par *B. thetaiotaomicron* souche 489 et ceux d'HYLEMON et coll. (1977). Dans nos conditions expérimentales, l'activité du système PTS est plus faible que le deuxième système.

Les autres souches testées, *B. fragilis* souche 290, *B. fragilis* souche 440 et *B. vulgatus* souche 154, transportent le glucose par un seul système : c'est le système énergisé par un gradient de protons indépendant des ions sodium ou lithium. L'accumulation du glucose de *B. fragilis* souche 440 est inhibée d'une façon inattendue par le fluorure de sodium. Ceci pourrait être dû à l'inhibition de la synthèse du fumarate qui est l'accepteur final des électrons au niveau de la chaîne d'oxydation cellulaire (FRANKLUND et GLASS, 1987). Il empêche ainsi la création du gradient de protons qui est nécessaire au fonctionnement du système de transport du glucose de cette bactérie. Le

glucose accumulé par la diffusion facilitée ou par le système énergisé par un gradient de protons va être phosphorylé par une hexokinase ou une glucokinase ATP-dépendante. Le glucose phosphorylé va emprunter ainsi la voie de la glycolyse.

Ces deux systèmes ou l'un des deux possèdent des groupements -SH libres nécessaires à leur fonctionnement.

C. - Conclusion

Les résultats de cette étude montrent une hétérogénéité dans le groupe taxonomique **B. fragilis** vis-à-vis de l'effet d'oxygène sur l'accumulation du glucose et de la nature du transport de ce substrat dans des conditions aérobies. Selon ce dernier caractère biochimique, nous distinguons deux sous-groupes :

- le sous-groupe des bactéries qui possèdent deux systèmes de transport. Ces bactéries sont **B. distasonis** souche 462, qui accumule le glucose par deux mécanismes actifs : le système phosphotransférase et le système énergisé par un gradient de protons; **B. thetaiotaomicron** ATCC 29148 et **B. thetaiotaomicron** souche 489 qui ont un système passif (diffusion facilitée) et un système actif (PTS). Le fonctionnement de ces deux systèmes dépend de la concentration du substrat. A une concentration donnée, l'un des deux systèmes domine l'autre système ;
- le sous-groupe des bactéries qui ne possèdent qu'un seul système de transport du glucose : un système actif énergisé par un gradient de protons. Ces bactéries sont : **B. fragilis** souche 290, **B. fragilis** souche 440 et **B. vulgatus** souche 154. Aucune de ces souches ne fait intervenir des cations monovalents tels que Na^+ et Li^+ comme les bactéries du rumen (RUSSEL et coll., 1988). Ces deux cations n'ont, non plus, aucun effet sur le transport du glucose chez **B. distasonis** souche 462.

Le glucose qui pénètre dans la cellule par un système non-PTS est phosphorylé par une glucokinase ou une hexokinase ATP-dépendante pour emprunter la voie de la glycolyse.

L'hétérogénéité, vis-à-vis du transport d'un substrat carboné, a été observée également chez d'autres genres comme *Lactobacillus* et *Streptococcus*. En effet, les Streptocoques n'utilisent pas le même mécanisme pour transporter le lactose : *S. mutans* et *S. salivarius* utilisent un système PTS (CALMES, 1978 ; HAMILTON et LO, 1978) tandis que *S. lactis* utilise un système énergisé par un gradient de protons (KASHKET et WILSON, 1973). De même *Lactobacillus* : *L. casei* et *L. plantarum* accumulent le lactose par un système PTS par contre, *L. brevis* et *L. buchneri* l'accumulent par un système non-PTS (ROMANO et coll., 1979).

D'autres hétérogénéités existent dans le groupe taxonomique de *Bacteroides* :

- seuls *B. thetaiotaomicron* et *B. ovatus* dégradent la plupart des polysaccharides (Tab. 27) et produisent de l'indole (HOLDEMAN et coll., 1984) ;
- seul *B. fragilis* est capable de croître sur le plasma ;
- les profils des lipopolysaccharides des bactéries du groupe *B. fragilis* par plusieurs méthodes d'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) est différente d'une souche à une autre. En effet et par exemple, le profil en migration dénaturante en gel de polyacrylamide est mal défini (les bandes ne sont pas claires) chez *B. fragilis*, *B. distasonis* et *B. uniformis*. Par la même technique, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. caccae* et *B. vulgatus* ont des profils d'électrophorèse clairs mais différents (MASKELL, 1991) ;
- la plupart des bactéries du groupe *Bacteroides* possède un plasmide par cellule. Chez certaines, le nombre de plasmides peut atteindre 5 par cellule. Ces plasmides ont des poids moléculaires différents (NAGY et coll., 1990) ;
- seules *B. fragilis* et *B. thetaiotaomicron* sont entourées d'une capsule. La présence de cette dernière chez *B. distasonis* est incertaine (JOTWANI et GUPTA, 1991).

Sucres	Souches				
	<i>B. fragilis</i>	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. distasonis</i>	<i>B. ovatus</i>	<i>B. thetaiotaomicron</i>
Amylopectine	+	+	-	d	+
Amylose	+	+	-	d	+
Chondroïtine sulfate	-	-	-	+	+
Dextran	-	-	-	+	+
Pectine	-	d	-	+	+
Acide polygalacturonique	-	d	-	+ -	+

Tableau 27 - Les caractères saccharolytiques des espèces du groupe *B. fragilis* selon HOLDEMAN et coll. (1984) modifié.

- + : plus de 90 % des souches sont capables de croître.
- d : 11 à 89 % des souches sont capables de croître.
- : moins de 10 % des souches sont capables de croître.

CONCLUSION GENERALE

Notre travail a consisté à étudier la physiologie de la croissance de **Bacteroides** et leur mécanisme du transport du glucose.

De l'étude de la physiologie de la croissance, il ressort que :

- la croissance de **Bacteroides** démarre rapidement, sans phase de latence, à l'exception de la croissance sur l'acide polygalacturonique, et pourtant le milieu de la préculture est très différent de celui de la culture ;
- le milieu empirique BHI assure le bon développement de **B. thetaiotaomicron** souche 489 ;
- **B. thetaiotaomicron** souche 489 est incapable de se développer aux dépens exclusivement des composés protéiques ;
- des concentrations élevées en glucose (supérieures à 1 %, P/V) inhibent la croissance de **Bacteroides** sauf celle de **B. thetaiotaomicron** ;
- les souches de **Bacteroides** n'ont pas la même affinité pour le glucose, **B. distasonis** souche 462 est la plus affine et **B. fragilis** souche 440 est la moins affine ;
- le taux de croissance n'est pas proportionnel à la vitesse d'assimilation des sucres. En effet, **B. vulgatus** souche 154 a la plus faible vitesse de croissance mais elle assimile mieux le substrat que **B. thetaiotaomicron** ATCC 29148 qui a le μ_{max} le plus important ; **B. fragilis** souche 440, **B. fragilis** souche 290 et **B. thetaiotaomicron** souche 489 consomment le substrat carboné à la même vitesse mais leurs taux de croissance maximaux sont différents ;
- aucune croissance diauxique sur mélange de deux substrats n'a été observée. Le glucose ne rentre donc pas dans les systèmes complexes de régulation ;
- la croissance de **B. thetaiotaomicron** souche 489 sur mélange PGA/Glc ou Mal/Glc est ralentie par rapport à la croissance sur ces sucres séparés. De même, **B. vulgatus** souche 154 et **B. distasonis** souche 462 qui se développent moins bien sur les mélanges de deux sucres que les sucres séparés.

Les résultats de l'étude de la nature du transport du glucose chez **Bacteroides** montrent que :

- **B. thetaiotaomicron** souche 489 utilise deux systèmes pour accumuler le glucose : diffusion facilitée et système phosphotransférase PEP-dépendant. Les constantes cinétiques relatives K_m et V_{max} sont respectivement 0,27 mM et 33 nmoles de glucose accumulées/mg de protéines cellulaires x min. Ce mécanisme n'est pas spécifique du glucose. D'autres hexoses (mannose et galactose) l'utilisent. Il peut être considéré comme constitutif ;
- les souches **Bacteroides** ne font pas intervenir des protéines périplasmiques pour accumuler le glucose ;
- les mécanismes du transport du glucose chez toutes les souches utilisées sont sensibles à l'oxygène ;
- toutes les souches testées présentent des fonctions thiols libres au niveau du site actif du système du transport ;
- les espèces **Bacteroides** n'accumulent pas le glucose de la même façon, certaines souches utilisent plus d'un mécanisme. On distingue ainsi deux groupes :
 - * le sous-groupe des bactéries qui possèdent deux systèmes de transport. Ces bactéries sont **B. distasonis** souche 462, qui accumule le glucose par deux mécanismes actifs : le système phosphotransférase et système énergisé par un gradient de protons, **B. thetaiotaomicron** ATCC 29148 et **B. thetaiotaomicron** souche 489 qui ont un système passif (diffusion facilitée) et un système actif (système phosphotransférase). Le fonctionnement de ces deux systèmes dépend de la concentration du substrat. A une concentration donnée, l'un des deux systèmes domine l'autre système ;
 - * le sous-groupe des bactéries qui ne possèdent qu'un seul système de transport actif énergisé par un gradient de protons. Ces bactéries sont : **B. fragilis** souche 290, **B. fragilis** souche 440 et **B. vulgatus** souche 154. Aucune de ces souches ne fait intervenir des cations monovalents tels que Na^+ et Li^+ . Ces deux cations n'ont, non plus, aucun effet sur le transport du glucose chez **B. distasonis** souche 462.

B I B L I O G R A P H I E

- ALDRIDGE K.E. and C.V. SANDERS
Antibiotic- and method-dependent variation in susceptibility testing results of *Bacteroides fragilis* group isolates.
J. Clin. Microbiol., 1987, 25 : 2317-2321.
- ALVES R.A., J.J. GLEAVES and J.W. PAYNE
The role of outer membrane proteins in peptide uptake by *Escherichia coli*.
FEMS Microbiol. Lett., 1985, 27 : 333-338.
- AMANO A., S. SHIZUKUISHI, H. TAMAGAWA, K. IWAKURA, S. TSUNASAWA and A. TSUNEMITSU
Characterization of superoxide dismutase purified from either anaerobically maintained or aerated *Bacteroides gingivalis*.
J. Bacteriol., 1990, 172 : 1457-1463.
- AMES G.F.L.
Energy coupling in periplasmic permeases : the histidine permease as a model system.
Res. Microbiol., 1990, 141 : 341-348.
- ANDERSON K.L. and A.A. SALYERS
Biochemical evidence that starch breakdown by *Bacteroides thetaiotaomicron* involves outer membranes starch binding sites and periplasmic starch degrading enzymes.
J. Bacteriol., 1989, 171 : 3192-3198.
- ANDREWS K.J. and E.C.C. LIN
Selective advantage of various bacterial carbohydrate transport mechanisms.
Fed. Proc., 1976, 35 : 2185-2189.
- BIGWANEZA P.C., D. PREVOST, L.M. BORDELEAU and H. ANTOUN
Glucose transport by an arctic and a temperate strain of *Rhizobia*.
Can. J. Microbiol., 1990, 37 : 105-109.
- BIRKEDAL-HANSEN H., R.E. TAYLOR, J.J. ZAMBON, P.K. BARWA and M.E. NEIDERS
Characterization of collagenolytic activity from strains of *Bacteroides gingivalis*.
J. Periodont. Res., 1988, 23 : 258-264.
- BURSTEIN C. and A. KEPES
The melibiose permease system of *Escherichia coli* K-12.
Biochimie, 1985, 67 : 59-67.
- BUTTON D.K., J.B. EGAN, W. HENGSTENBERG and M.L. MORSE
Carbohydrate transport in *Staphylococcus aureus*. IV - Maltose accumulation and metabolism.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, 52 : 880-885.
- CALDWELL D.R. and K. NEWMAN
D-arabinose metabolism by *Bacteroides fragilis* strain 2044.
Curr. Microbiol., 1986, 14 : 55-59.

- CALMES R. and S.J. DEAL
Glycerol transport by *Nocardia asteroides*.
Can. J. Microbiol., 1972, 18 : 1703-1708.
- CALMES R.
Involvement of phosphoenol pyruvate in the catabolism of caries-conductive disaccharides by *Streptococcus mutans* : lactose transport.
Infect. Immun., 1978, 19 : 934-942.
- CASPARI D. and J.M. MACY
The role of carbon dioxide in glucose metabolism of *Bacteroides fragilis*.
Arch. Microbiol., 1983, 135 : 16-24.
- COHEN G.N. et H.V. RICKENBERG
Etude directe de la fixation d'un inducteur de la β -galactosidase par les cellules d'*Escherichia coli*.
C. R. Acad. Sci., 1955, Ser. D, 240 : 466-468.
- COLLINS M.D., H.N. SHAH and T. MITSUOKA
Reclassification of *Bacteroides microfusum* (Kaneuchi and Mitsuoka) in a new genus *Rikenella*, as *Rikenella microfusum* comb. nov.
Syst. Appl. Microbiol., 1985, 6 : 79-81.
- COLLINS M.D. and H.N. SHAH
Reclassification of *Bacteroides termiditis* Sebald (Holdeman and Moore) in a new genus *Sebaldella*, as *Sebaldella termiditis* comb. nov.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1986a, 36 : 349-350.
- COLLINS M.D. and H.N. SHAH
Reclassification of *Bacteroides praeacutus* Tissier (Holdeman and Moore) in a new genus, *Tissierella*, as *Tissierella praeacuta* comb. nov.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1986b, 36 : 461-463.
- COLLINS M.D. and H.N. SHAH
Recent advances in the taxonomy of the genus *Bacteroides*.
In : "Recent advances in anaerobic bacteriology". BORRIELLO S.P., J.M. HARDIE, B.S. DRASAR, B.I. DUERDEN, M.J. HUDSON and R.J. LYSON (Eds), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht (The Netherlands), 1987, pp. 249-258.
- COLLINS M.D. and H.N. SHAH
Proposal to restrict the genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and closely related species.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1989, 39 : 85-87.
- DAVIDSON A.L. and H. NIKAIDO
Purification and characterization of the membrane associated components of maltose transport system from *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem., 1991, 266 : 8946-8951.
- DE VRIES G.E., A.A.N. VAN BRUSSEL and A. QUISPTEL
Mechanism and regulation of glucose transport in *Rhizobium leguminosarum*.
J. Bacteriol., 1982, 149 : 872-879.

- DECAD G.M. and H. NIKAIDO
Outer membrane of Gram-negative bacteria. XII - Molecular sieving function of cell wall.
J. Bacteriol., 1976, 128 : 325-336.
- DEWHIRST F.E., B.J. PASTER, S. LA FONTAINE and J.I. ROOD
Transfer of *Kingella indologenes* (Snel and Lapage 1976) to the genus *Suttonella* gen.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1990, 40 : 426-433.
- DILLS S.S., A. APPERSON, M.R. SCHMIDT and M.H. SAIER Jr.
Carbohydrate transport in bacteria.
Microbiol. Rev., 1980, 44 : 385-418.
- DIMROTH P.
The generation of an electrochemical gradient of sodium ions upon decarboxylation of oxaloacetate by the membrane-bound and Na⁺-activated oxaloacetate decarboxylase from *Klebsiella aerogenes*.
Eur. J. Biochem., 1982, 121 : 443-449.
- DRONIUK R., P. WONG, G. WISSE and R. MacLEOD
Variation in quantitative requirements for Na⁺ for transport of metabolizable compounds by the marine bacteria *Alteromonas haloplanktis* 214 and *Vibrio fischeri*.
Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53 : 1487-1495.
- EAGON R.G. and P.V. PHIBBS Jr.
Kinetics of transport of glucose, fructose and mannitol by *Pseudomonas aeruginosa*.
Can. J. Biochem., 1971, 49 : 1031-1041.
- ERNI B.
Coupling of energy to glucose transport by the bacterial phosphotransferase system.
Res. Microbiol., 1990, 141 : 360-364.
- FERENCI T., W. BOOS, M. SCHWARTZ and S. SZMELCMAN
Energy coupling of the transport system of *Escherichia coli* dependent on maltose binding protein.
Eur. J. Biochem., 1977, 75 : 187-193.
- FLINT H.J. and C.S. STEWART
Antibiotic resistance patterns and plasmids of ruminal strains of *Bacteroides ruminicola* and *Bacteroides multiacidus*.
Appl. Microbiol. Biotechnol., 1987, 26 : 450-455.
- FORSBERG C.W. and D. GROLEAU
Stability of the endo- β -1-4-glucanase and β -1-4-gucosidase from *Bacteroides succinogenes*.
Can. J. Microbiol., 1982, 28 : 144-148.
- FRANKLUND C.V. and T.L. GLASS
Glucose uptake by the cellulolytic ruminal anaerobe *Bacteroides succinogenes*.
J. Bacteriol., 1987, 169 : 500-506.

- FUJIMURA S. and T. NAKAMURA
Multiple forms of proteases of *Bacteroides gingivalis* and their cellular location.
Oral Microbiol. Immunol., 1989, 4 : 227-229.
- FURUKAWA H., YAMADA H. and MIZUSHIMA S.
Interaction of bacteriophage T4 with reconstituted cell envelopes of *Escherichia coli* K-12.
J. Bacteriol., 1979, 140 : 1071-1080.
- GOTTSCHALK G.
Bacterial metabolism.
Springer Verlag, New-York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, 1986, pp. 12-35 ; 105-140.
- GREGORY E.M., J.B. KOWALSKI and L.V. HOLDEMAN
Production and some properties of catalase and superoxide dismutase from the anaerobe *Bacteroides distasonis*.
J. Bacteriol., 1977, 129 : 1298-1302.
- GREGORY E.M. and C.H. DAPPER
Chemical and physical differentiation superoxide dismutase in anaerobes.
J. Bact., 1980, 144 : 967-974.
- GREGORY E.M.
Characterization of the O₂-induced manganese-containing superoxide dismutase from *Bacteroides fragilis*.
Arch. Biochem. Biophys., 1985, 238 : 83-89.
- HAGUENAUER R. and A. KEPES
The cycle of renewal of intracellular α -methyl glucoside accumulated by the glucose permease of *Escherichia coli*.
Biochimie, 1971, 53 : 99-105.
- HAGUENAUER R. and A. KEPES
NaF inhibition of phosphorylation involved in α -methyl-D-glucoside transport in *Escherichia coli* K-12. A pH dependent phenomenon sensitive to uncoupling agents.
Biochimie, 1972, 54 : 505-512.
- HAMILTON I.R. and G.C.Y. LO
Co-induction of β -galactosidase and the lactose-P-enolpyruvate phosphotransferase system in *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus mutans*.
J. Bacteriol., 1978, 136 : 900-908.
- HAN Y.H., R.M. SMIBERT and N.R. KRIEG
Wolinella recta, *Wolinella curva*, *Bacteroides ureolyticus* and *Bacteroides gracilis* are microaerophiles, not anaerobes.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1991, 41 : 218-222.
- HANCOCK R.E.W. and A.M. CAREY
Protein D1- a glucose -inducible, pore-forming protein from the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*.
FEMS Microbiol. Lett., 1980, 8 : 105-109.

- HAROLD F.M.
Conservation and transformation of energy by bacterial membrane.
Bacteriol. Rev., 1972, 36 : 172-230.
- HARRIS M.A. and C.A. REDDY
Hydrogenase activity and the H₂-fumarate electron transport system in
Bacteroides fragilis.
J. Bacteriol., 1977, 131 : 922-928.
- HASSAN H. and I. FRIDOVICH
Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in
Escherichia coli.
J. Bacteriol., 1977, 129 : 1574-1783.
- HAYASHI S. and E.C.C. LIN
Product induction of glycerol kinase in **Escherichia coli**.
J. Mol. Biol., 1965, 14 : 515-521.
- HEFFERMAN L., R. BASS and E. ENGLESBERG
Mutations affecting catabolite repression of the L-arabinose regulon in
Escherichia coli B/2.
J. Bacteriol., 1976, 126 : 1119-1131.
- HOLDEMAN L.V., R.W. KELLY and W.E.C. MOORE
Family I. **Bacteroidaceae**.
In : "Bergey's Manual". KRIEG N.R., J.G.E. MURRAY, D.J. BRENNER,
M.P. BRYANT, J.W. MOULDER, N. PFENNIG, P.H.A. SNEATH and J.T.
STALEY (Eds), Williams and Wilkins, Baltimore/London, 1984, pp. 602-662.
- HONG J.S., A.G. HUNT, P.S. MASTERS and M.A. LIEBERMAN
Requirement of acetyl phosphate for the binding protein-dependent
transport systems in **Escherichia coli**.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76 : 1213-1217.
- HORN R., A.M. BOURGAULT and F. LAMOTHE
Disk diffusion susceptibility testing of the **Bacteroides fragilis** group.
Antimicrob. Agents Chemother., 1987, 31 : 1596-1599.
- HUMPHREY B., M. EDGLEY and J.M. VINCENT
Absence of mannose in the extracellular polysaccharide of fast growing
Rhizobia.
J. Gen. Microbiol., 1974, 81 : 267-270.
- HUNGATE R.E.
Anaerobic transformation of organic matter.
In : "Bacteria in nature". LEADBETTER E.R. and J.S. POINDEXTER (Eds),
Plenum Publishing Corporation, 1985, 1 : 39-95.
- HYLEMON P.B., J.L. YOUNG, R.F. ROADCAP and P.V. PHIBBS
Uptake and incorporation of glucose and mannose by whole cells of
Bacteroides thetaiotaomicron.
Appl. Environ. Microbiol., 1977, 34 : 488-494.

- JENSEN N.S. and E. CANALE-PAROLA
Bacteroides pectinophilus sp. nov. and **Bacteroides galacturonicus** sp. nov. :
 two pectinolytic bacteria from the human intestinal tract.
Appl. Environ. Microbiol., 1986, 52 : 880-887.
- JOHNSON J.C., W.E.C. MOORE and L.V.H. MOORE
Bacteroides caccae sp. nov., **Bacteroides merdae** sp. nov., and **Bacteroides**
stercosis sp. nov. isolated from human feces.
Int. J. Syst. Bact., 1986, 36 : 499-501.
- JONCQUIERT J.C., M. BECHET, Y. TIERNY, J. COURTOIS, H.C.
 DUBOURQUIER and J.B. GUILLAUME
 Cloning and expression in **Escherichia coli** of dextranase genes from
Bacteroides thetaiotaomicron.
FEMS Microbiol. Lett., 1991, 84 : 273-278.
- JOSEPH E., A. DANCHIN and A. ULLMAN
 Regulation of galactose operon expression : glucose effects and role of
 cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate.
J. Bacteriol., 1981, 146 : 149-154.
- JOTWANI R. and U. GUPTA
 Virulence factors in **Bacteroides fragilis** group.
Indian J. Med. Res., 1991, [A] 93 : 232-235.
- KABACK H.R.
 Transport studies in bacterial membrane vesicles.
Science, 1974, 186 : 882-892.
- KASHKET E.R. and T.H. WILSON
 Proton-coupled accumulation of accumulation of galactoside in **Strepto-**
coccus lactis 7962.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, 70 : 2866-2869.
- KEPES A.
 Aspects moléculaires des fonctions membranaires.
 Ed. Masson, Paris, New-York, Barcelone, Milan, 1978, pp. 151-168.
- KLEIN W.L. and P.D. BOYER
 Energization of active transport by **Escherichia coli**.
J. Biol. Chem., 1972, 147 : 7257-7265.
- KUNDIG W., S. GHOSH and S. ROSEMAN
 Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel
 phosphotransferase system.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1964, 52 : 1067-1074.
- LEINE L.
 A non specific increase in permeability in **Escherichia coli** produced by
 EDTA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1965, 53 : 745-750.
- LENGELER J.W.
 Molecular analysis of the enzyme II-complexes of the bacterial phospho-
 transferase system (PTS) as carbohydrate transport systems.
Biochim. Biophys. Acta, 1990, 1018 : 155-159.
- LEVEAU J.Y. et M. BOUIX
 Biotechnologie. Partie II : Le génie microbiologique, cinétiques micro-
 biennes.
 Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 1988, pp. 203-232.

- LIN K.W., J.A. PATTERSON and M.R. LADISCH
Anaerobic fermentation : microbes from ruminants.
Enz. Microb. Technol., 1985, 7 : 98-107.
- LO C.Y. and B.D. SANWAL
Isolation of the soluble substrate recognition component of the dicarboxylate transport system of *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem., 1975, 250 : 1600-1602.
- LO T.C.Y. and M.A. BEWICK
Use of a non-penetrating substrate analog to study the molecular mechanism of the outer membrane dicarboxylate transport system in *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem., 1981, 256 : 5511-5517.
- LOPILATO J., T. TSUCHIA and T.H. WILSON
Role of Na⁺ and Li⁺ in thiomethyl galactoside transport by the melibiose transport system of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol., 1978, 134 : 147-156.
- LOWRY O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 1951, 193 : 265-275.
- LUCKEY M. and H. NIKAIDO
Specificity of diffusion channels produced by λ phase receptor protein of *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, 77 : 167-171.
- LURIA S.E. and J.W. BERTANI
Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*.
J. Bacteriol., 1957, 74 : 461-476.
- MAAS L.K. and T.L. GLASS
Cellobiose uptake by the cellulolytic ruminal anaerobe *Fibrobacter (Bacteroides) succinogenes*.
Can. J. Microbiol., 1991, 37 : 141-147.
- MACRINA F.L., J.L. RASMUSSEN, W.H. TINNEL and D.A. ODELSON
Molecular genetics of clindamycin resistance in *Bacteroides*.
In : "Biology of anaerobic bacteria". DUBOURGUIER H.C. et al. (Eds), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1986, pp. 165-173.
- MACY J.M., I. PROBST and G. GOTTSCHALK
Evidence for cytochrome involvement in fumarate reduction and adenosine 5'-triphosphate synthesis in *Bacteroides fragilis* grown in the presence of hemin.
J. Bacteriol., 1975, 123 : 436-442.
- MACY J.M., I. YU, C. CALDWELL and R.E. HUNGATE
Reliable sampling method for analysis of the ecology of the Human Alimentary Tract.
Appl. Environ. Microbiol., 1978, 35 : 113-120.

- MACY J.M. and I. PROBST
The biology of gastrointestinal **Bacteroides**.
Annu. Rev. Microbiol., 1979, 33 : 561-594.
- MARTIN S.A. and J.B. RUSSELL
Phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation of hexoses by ruminal bacteria : evidence for the phosphotransferase transport system.
Appl. Environ. Microbiol., 1986, 52 : 1348-1352.
- MASKELL J.P.
The resolution of **Bacteroides** lipopolysaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Med. Microbiol., 1991, 34 : 253-257.
- MAYRAND D., G. BOURGEOU, D. GRENIER and J.M. LACROIX
Properties of oral asaccharolytic black-pigmented **Bacteroides**.
Can. J. Microbiol., 1984, 30 : 1133-1136.
- MAYRAND D. and S.C. HOLT
Biology of asaccharolytic black-pigmented **Bacteroides** species.
Microbiol. Rev., 1988, 52 : 134-152.
- MIZUMO T. and KAGEYAMA
Separation and characterization of the outer membrane of **Pseudomonas aeruginosa**.
J. Biochem., 1978, 84 : 179-191.
- MONTGOMERY L., B. FLESHER and D. STAHL
Transfer of **Bacteroides succinogenes** (Hungate) to **Fibrobacter** gen. nov. as **Fibrobacter succinogenes** comb. nov. and description of **Fibrobacter intestinalis** sp. nov.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1988, 38 : 430-435.
- MOOSER G. and K.R. IWAOKA
Sucrose 6- α -D-glycosyltransferase from **Streptococcus sobrinus** : characterization of a glucosyl-enzyme complex.
Biochemistry, 1989, 28 : 443-449.
- MOUNTFORD D.O. and A.M. ROBERTON
Origins of fermentation products formed during growth of **Bacteroides ruminicola** on glucose.
J. Gen. Microbiol., 1978, 106 : 353-360.
- MURRAY W.D., L.C. SOMDEN and J.R. COLVIN
Bacteroides cellulosolvens sp. nov., a cellulolytic species from sewage sludge.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1984, 34 : 185-187.
- NAGY E., E. DANYI and J. FOLDES
Plasmid analysis of clinical isolates of **Bacteroides fragilis** group strains.
Acta Microbiol. Hung., 1990, 37 : 367-373.
- NAITO Y. and R.J. GIBBONS
Attachment of **Bacteroides gingivalis** to collagenous substrata.
J. Dent. Res., 1988, 67 : 1075-1080.

- NAKAE T. and H. NIKAIDO
Outer membrane as a diffusion barrier in *Salmonella typhimurium*. Penetration of oligo- and polysaccharides into isolated outer membrane vesicles and cells with degraded peptidoglycan layer.
J. Biol. Chem., 1975, 250 : 7359-7365.
- NEU H.C. and L.A. HEPPEL
The release of enzymes from *Escherichia coli* during the formation of spheroplasts.
J. Biol. Chem., 1965, 240 : 3685-3692.
- NEWMAN K. and D.R. CALDWELL
D-pentose metabolism by *Bacteroides vulgatus* strain 8482.
Curr. Microbiol., 1987, 15 : 51-56.
- NIKAIDO H. and M. VAARA
Molecular basis of bacterial outer membrane permeability.
Microbiol. Rev., 1985, 49 : 1-32.
- OKUDA K., T. KATO, J. SHIOZU, I. TAKAZOE and T. NAKAMURA
Bacteroides heparinolyticus sp. nov. isolated from humans with periodontitis.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1985, 35 : 438-442.
- OLSEN S.G. and R.J. BROOKER
Analysis of the structural specificity of the lactose permease toward sugars.
J. Biol. Chem., 1989, 264 : 15982-15987.
- OSBORNE J.M. and B.A. DEHORITY
Synergism in degradation and utilization of intact forage cellulose, hemicellulose, and pectin by three pure cultures of ruminal bacteria.
Appl. Environ. Microbiol., 1989, 55 : 2247-2250.
- OSUMI T. and M.H. SAIER Jr.
Mechanism of regulation of the lactose permease by the phosphotransferase system in *Escherichia coli* : evidence for protein-protein interaction.
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur Paris), 1982, 133A : 269-273.
- OTSUKA M., J. ENDO, D. HINODE, A. NAGATA, R. MAEHARA, M. SATO and R. NAKAMURA
Isolation and characterization of protease from culture supernatant of *Bacteroides gingivalis*.
J. Periodont. Res., 1987, 22 : 491-498.
- OVERBEEKE N., G. VAN SCHARRENBURG and B. LUGTENBERG
Antigenic relationships between pore proteins of *Escherichia coli* K-12.
Eur. J. Biochem., 1980, 110 : 247-254.
- PARNES J.R. and W. BOOS
Energy coupling of the β -methylgalactose transport system of *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem., 1973, 248 : 4429-4435.

- PASTAN I. and R.L. PERLMAN
Cyclic adenosine monophosphate in bacteria.
Science, 1970, 169 : 340-344.
- PATEL G.B.
Fermentation of lactose by *Bacteroides polypragmatus*.
Can. J. Microbiol., 1983, 29 : 120-128.
- PATTERSON J.A.
Prospects for establishment of genetically engineered microorganisms in the rumen.
Enz. Microb. Technol., 1989, 11 : 1187-1189.
- PENNINGTON C.D. and E.M. GREGORY
Isolation and reconstitution of iron- and manganese-containing superoxyde dismutase from *Bacteroides thetaiotaomicron*.
J. Bacteriol., 1986, 166 : 528-532.
- PIRT S.J.
Principles of microbe and cell cultivation.
Ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Paloalto, Melbourne, 1974, pp. 170-185.
- POSTMA P. and S. ROSEMAN
The bacterial phosphotransferase system.
Biochim. Biophys. Acta, 1976, 457 : 213-257.
- POURCHER T., M. BASSILANA, H.K. SARKAR, R.H. KABACK and G. LEBLANC
Na⁺/melibiose symport mechanism of *Escherichia coli* : kinetic and molecular properties.
Phil. Trans. Royal Soc. London, 1989.
- PREISS J., C. LAMMEL and E. GREENBURG
Biosynthesis of bacterial glycogen. Kinetic studies of glucose-1-P adenylyltransferase (EC 2.7.7.27) from a glycogen-excess mutant of *Escherichia coli* B.
Arch. Biochem. Biophys., 1976, 174 : 105-119.
- PRIVALLE C.T. and E.M. GREGORY
Superoxide dismutase and O₂ lethality in *Bacteroides fragilis*.
J. Bacteriol., 1979, 138 : 139-145.
- REIDER E., E.F. WAGNER and M. SCHWEIGER
Control of phosphoenol pyruvate-dependent phosphotransferase-mediated sugar transport in *Escherichia coli* by energization of the cell membrane.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76 : 5529-5533.
- RICHEY D.P. and E.C.C. LIN
Importance of facilitated diffusion for effective utilization of glycerol by *Escherichia coli*.
J. Bacteriol., 1972, 112 : 784-790.

- ROBERTS S., C.A. PADEN and E.P. GREENBERG
Uptake of D-xylose and D-glucose by *Spirochaeta aurantia*.
J. Bacteriol., 1984, 159 : 427-428.
- ROMANO A.H., S.J. EBERHARD, S.L. DINGLE and T.D. McDOWELL
Distribution of phosphoenol pyruvate : glucose phosphotransferase system
in bacteria.
J. Bacteriol., 1970, 104 : 808-813.
- ROMANO A.H., J.D. TRIFONE and M. BRUSTOLON
Distribution of the phosphoenol pyruvate : glucose phosphotransferase
system in fermentative bacteria.
J. Bacteriol., 1979, 139 : 93-97.
- RUSSEL J., H. STROBEL, A. DRIESSEN and W. KONINGS
Sodium-dependent transport neutral aminoacids by whole cells and
membrane vesicles of *Streptococcus bovis*, a ruminal bacterium.
J. Bacteriol., 1988, 170 : 3531-3536.
- SAHEB S.A.
Perméation du glycérol et sporulation chez *Bacillus subtilis*.
Can. J. Microbiol., 1972, 18 : 1307-1313.
- SAIER M.H. Jr.
Bacterial phosphoenol pyruvate : sugar phosphotransferase system :
structural, functional and evolutionary interrelation-ships.
Bacteriol. Rev., 1977, 41 : 856-871.
- SAIER M.H. Jr., M. YAMADA, B. ERNI, K. SUDA, J. LENGELER, R.
EBRIER, P. AREGOS, B. RAK, K. SCHNETZ, C.A. LEE, G.C. STEWART,
F. BREIDT Jr., E.B. WAYGOOD, K.G. PERI and R.F. DOOLITTLE
Sugar permeases of the bacterial phosphoenol-pyruvate-dependent
phosphotransferase system : sequence comparisons.
FASEB J., 1988, 2 : 199-208.
- SALYERS A.A., J.K. PALMER and T.D. WILKINS
Laminarase (β -glucanase) activity in *Bacteroides* from the human colon.
Appl. Environ. Microbiol., 1977, 33 : 1118-1124.
- SALYERS A.A. and M. O'BRIEN
Cellular location of enzymes involved in chondroitin sulfate breakdown
by *Bacteroides thetaiotaomicron*.
J. Bacteriol., 1980, 143 : 772-780.
- SALYERS A.A. and S.F. KOTARSKI
Induction of chondroitin sulfate lyase activity in *Bacteroides thetaio-*
taomicron.
J. Bacteriol., 1980, 143 : 781-788.
- SALYERS A.A.
Bacteroides of the human lower intestinal tract.
Annu. Rev. Microbiol., 1984, 38 : 293-313.
- SALYERS A.A., N.B. SHOEMAKER and E.P. GUTHRIE
Recent advances in *Bacteroides* genetics.
CRC Crit. Rev. Microbiol., 1987, 14 : 49-70.

- SANNO Y., T.H. WILSON and E.C.C. LIN
Control of permeation to glycerol in cells of *Escherichia coli*.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1968, 32 : 344-349.
- SCHELLHORN H.E. and C.W. FORSBERG
Multiplicity of extracellular β -(1,4)-endoglucanases of *Bacteroides succinogenes* S85.
Can. J. Microbiol., 1984, 30 : 930-937.
- SCHINDLER H. and J.P. ROSENBUSCH
Matrix protein from *Escherichia coli* outer membranes forms voltage-controlled channels in lipid bilayers.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, 75 : 3751-3755.
- SCHOLTEN-KOERSELMAN I., F. HOUWAARD, P. JANSSEN and A.J.B. SEHNDER
Bacteroides xylanolyticus sp. nov., a xylanolytic bacterium from methane producing cattle manure.
Antonie Van Leeuwenhoek, 1986, 52 : 543-554.
- SHAH H.N. and M.D. COLLINS
Bacteroides buccalis sp. nov., *Bacteroides denticola* sp. nov., *Bacteroides pentosaceus* sp. nov., new species of genus *Bacteroides* from the oral cavity.
Zentralbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Originalarbeiten, 1981, C2 : 235-241.
- SHAH H.N. and M.D. COLLINS
Reclassification of *Bacteroides hypermegas* (Harrison and Hansen) in new genus *Megamonas*, as *Megamonas hypermegas* comb. nov.
Zentralbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Originalarbeiten, 1982a, C3 : 394-398.
- SHAH H.N. and M.D. COLLINS
Reclassification of *Bacteroides multiacidus* (Mitsuoka, Terada, Watanabe and Uchida) in a new genus *Mitsuokella*, as *Mitsuokella multiacidus* comb. nov.
Zentralbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Originalarbeiten, 1982b, C3 : 491-494.
- SHAH H.N. and M.D. COLLINS
Genus *Bacteroides* : a chemotaxonomical perspective.
J. Appl. Bacteriol., 1983, 55 : 403-416.
- SHAH H.N., M.D. COLLINS, J. WATNABE and T. MITSUOKA
B. oulorum sp. nov., a non pigmented saccharolytic species from the oral cavity.
Int. J. Syst. Bact., 1985, 35 : 193-197.
- SHAH H.N. and M.D. COLLINS
Reclassification of *Bacteroides furcosus* Veillon and Zuber (Hauduroy, Ehringer, Urbain, Guillot and Magron) in a new genus *Anaerorhabdus*, as *Anaerorhabdus furcosus* comb. nov.
Syst. Appl. Bacteriol., 1986, 8 : 86-88.

- SHAH H.N. and M.D. COLLINS
Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides endodontalis* in a new genus *Porphyromonas*.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1988, 38 : 128-131.
- SHAH H.N. and M.D. COLLINS
Proposal to restrict genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and closely related species.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1989, 39 : 85-87.
- SHAH H.N. and M.D. COLLINS
Prevotella, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1990, 40 : 205-208.
- SIMONI R.D. and S. ROSEMAN
Sugar transport. VII - Lactose transport in *Staphylococcus aureus*.
J. Biol. Chem., 1973, 248 : 966-974.
- STACKEBRANDT E. and H. HIPPE
Transfer of *Bacteroides amylophilus* to a new genus *Ruminobacter* gen. nov., nom. rev. as *Ruminobacter amylophilus* comb. nov.
Syst. Appl. Microbiol., 1986, 8 : 204-207.
- STINSON M.W., M.A. COHEN and J.M. MERRICK
Isolation of dicarboxylic acid and glucose binding proteins from *Pseudomonas aeruginosa*.
J. Bacteriol., 1976, 128 : 573-579.
- STOCK J. and S. ROSEMAN
A sodium dependent sugar co-transport system in bacteria.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, 44 : 132-138.
- TAKAHASHI N.
Isolation and properties of dextranases from *Bacteroides oralis* Ig4a.
Microbiol. Immunol., 1982, 26 : 375-386.
- TAKAHASHI N., Y. SATOH and K. TAKAMORI
Subcellular localization of D-glucanase in *Bacteroides oralis* Ig4a.
J. Gen. Microbiol., 1985, 131 : 1077-1082.
- TANAKA K., S. NUYA and T. TSUCHIYA
Melibiose transport in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol., 1980, 141 : 1031-1036.
- TAYLOR H.V. and M.D. YUDKIN
Synthesis of tryptophanase in *Escherichia coli* : isolation and characterization of a structural gene mutant and two regulatory mutants.
Mol. Gen. Genet., 1978, 165 : 95-102.
- THEODOROPOULOS P.A., J.P. HORNEZ, B. COURTOIS and J.C. DERIEUX
Evidence of an active glucose uptake system in *Rhizobium meliloti*.
Ann. Inst. Pasteur/Microbiol., 1985, 136A : 261-269.

- THOMPSON J.
Lactic acid bacteria : model systems for *in vivo* studies of sugar transport and metabolism in Gram-positive organisms.
Biochimie, 1988, 70 : 325-336.
- TIERNY Y.
Clonage et expression chez *Escherichia coli* de gènes de *Bacteroides thetaiotaomicron* impliqués dans la dégradation des pectines.
Doctorat d'Université, 1992, n° d'ordre 852, Université des Sciences et Technologies de Lille.
- TSAY S.S., K.K. BROWN and T.H. WILSON
Transport of glycerol by *Pseudomonas aeruginosa*.
J. Bacteriol., 1971, 108 : 82-88.
- TURNER K.W. and A.M. ROBERTON
Xylose, arabinose and rhamnose fermentation by *Bacteroides ruminicola*.
Appl. Environ. Microbiol., 1979, 38 : 7-12.
- ULLMAN A. and A. DANCHIN
Role of cyclic AMP in bacteria.
Adv. Cyclic Nucl. Res., 1983, 15 : 1-53.
- ULLMAN A.
Catabolite repression.
Biochimie, 1985, 67 : 29-34.
- VAN STEENBERGEN T.J.M. and J. DE GRAAFF
Proteolytic activity of black-pigmented *Bacteroides* strains.
FEMS Microbiol. Lett., 1986, 33 : 219-222.
- VAN THIENEN G.M., P.W. POSTMA and K. VAN DAM
Na⁺-dependent methyl- α -thiogalactoside transport in *Salmonella typhimurium*.
Biochim. Biophys. Acta, 1978, 513 : 395-400.
- VAN WINKELHOFF A.J., T.J.M. VAN STEENBERGEN, N. KIPPUW and J. DE GRAAFF
Further characterization of *Bacteroides endodontalis*, an asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species from the oral cavity.
J. Clin. Microbiol., 1985, 22 : 75-79.
- VAN WINKELHOFF A.J., T.J.M. VAN STEENBERGEN and J. DE GRAAFF
The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections.
J. Clin. Periodont., 1988, 15 : 145-155.
- WATABE J., Y. BENNO and T. MITSUOKA
Taxonomic study of *Bacteroides oralis* and related organisms and proposal of *Bacteroides veroralis* sp. nov.
Int. J. Syst. Bacteriol., 1983, 33 : 57-64.
- WEIGEL N., M.A. KUKURUZINSKA, A. NAKAZAWA, E.B. WAYGOOD and S. ROSEMAN
Transport the bacterial phosphotransferase system. Phosphoryl transfer reactions catalyzed by enzyme I of *Salmonella typhimurium*.
J. Biol. Chem., 1982, 257 : 14477-14491.

- WHITE D.C., M.P. BRYANT and D.R. CALDWELL
Cytochrome-linked fermentation in **Bacteroides ruminicola**.
J. Bacteriol., 1962, 84 : 822-828.

- WILSON D.M. and T.H. WILSON
Cation specificity for sugar substrates of the melibiose carrier in
Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta, 1987, 904 : 191-200.

- YAMAMOTO I., T. ASOU and M. ISHIMOTO
Cell growth and electron transport in fumarate reduction of **Bacteroides ureolyticus**.
J. Gen. Appl. Microbiol., 1988, 34 : 85-93.

- YAMAOKA K., K. WATANABE, Y. MUTO, N. KATOH, K. UENO and F.P. TALLY
R-plasmid mediated transfer of β -lactam resistance in **Bacteroides fragilis**.
J. Antibiot., 1990, 43 : 1302-1306.

A N N E X E 1

Identification présomptive rapide des souches
du groupe Bacteroides fragilis
par microgaleries API 20 Anaérobies

- o O o -

PRINCIPE

Les microméthodes API (Appareils et Procédés d'Identification) utilisent le principe d'identification numérique des bactéries.

Le système API 20 A permet de rechercher rapidement et facilement vingt et un caractères pour l'identification biochimique des bactéries anaérobies.

Ce système se compose de 20 microtubules contenant des substrats déshydratés. La suspension bactérienne, répartie selon les prescriptions du fabricant dans des tubes, dissout les substrats. Les métabolites produits sont mis en évidence par différents indicateurs de pH ou par addition de réactifs après 24 ou 48 h d'incubation à 37°C.

Les tests de la galerie sont séparés par groupes de 3 et on attribue à chaque réaction positive une valeur égale à 1, 2 ou 4 selon la position du test dans son groupe respectivement 1e, 2e ou 3e. L'addition des 3 valeurs retenues (0 pour réactions négatives) donne le chiffre compris entre 0 et 7. La galerie comporte 20 tests séparés en 7 groupes. Ainsi, les résultats se traduisent par un nombre de 7 chiffres. Ce nombre permet de transcrire l'ensemble des résultats et de les comparer à ceux qui figurent dans le Catalogue Analytique ou une banque de données informatisée pour préciser le genre et l'espèce de la bactérie étudiée, avec un pourcentage de certitude.

Nous avons donc appliqué ce concept à l'identification présomptive et rapide du genre **Bacteroides**. Six souches du groupe **Bacteroides fragilis** ont été utilisées. L'incubation a été effectuée à 37°C dans les jarres anaérobies.

6 souches du groupe **B. fragilis** ont été caractérisées :

- **B. fragilis** souche 290,
- **B. fragilis** souche 440,
- **B. distasonis** souche 462,
- **B. thetaiotaomicron** ATCC 29148,
- **B. thetaiotaomicron** souche 489,
- **B. vulgatus** souche 154.

RESULTATS

Nous donnons, ci-dessous, l'exemple de la fiche d'identification de **B. fragilis** 290 :

-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
IND	URE	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA	GEL	ESC	GLY	CEL	MNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE	CAT	SPOR	GRAM	COCC			
○		○		○		○		○		○		○		○		○		○		○		○		○		
4		6		5		4		4		2		4		0		0		0		0		0		0		

<p>- spores : forme / shape</p> <p>- taille des cellules / cell size</p> <p>- mobilité / motility</p>	<table border="1" style="width: 100%; height: 40px;"> <tr><td style="width: 50%;"></td><td style="width: 50%;">- pigmentation</td></tr> <tr><td style="width: 50%;"></td><td style="width: 50%;">- hémolyse / haemolysis</td></tr> <tr><td style="width: 50%;"></td><td style="width: 50%;"></td></tr> </table>		- pigmentation		- hémolyse / haemolysis		
	- pigmentation						
	- hémolyse / haemolysis						

<p>api 20 A</p> <p>... : 290</p> <p>Patient :</p> <p>Origine/Source :</p> <p>Service/Dept :</p>	<p>Identification :</p> <p style="text-align: center;"><u>Bacteroides fragilis</u> 99,9%</p>
--	---

L'ensemble des résultats est consigné dans le tableau I.

En conclusion, l'utilisation des microgaleries API 20 Anaérobies permet une identification présomptive rapide de **Bacteroides**. Les résultats obtenus étant à rapprocher des caractères cultureux de la souche étudiée ; la microméthode s'avère suffisante pour vérifier rapidement, lorsque c'est nécessaire, l'identité de la souche utilisée.

Souche	IND	URE	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA	GEL	ESC	GLY	CEL	MNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE	CAT
154	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
290	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
440	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
462	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
489	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
ATCC 29148	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+

Souche	SPOR	GRAM	COCC	%	Espèce bactérienne correspondante	Numéro
154	-	-	-	84,3	<i>Bacteroides vulgatus</i>	4 651 425 - 0
290	-	-	-	99,9	<i>Bacteroides fragilis</i>	4 654 424 - 0
440	-	-	-	99,9	<i>Bacteroides fragilis</i>	4 654 424 - 0
462	-	-	-	99,6	<i>Bacteroides distasonis</i>	4 674 427 - 0
489	-	-	-	89,9	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	5 651 637 - 0
ATCC 29148	-	-	-	98,2	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	5 655 425 - 0

Tableau 1 - Résultats des galeries API 20 A.

Abréviations des tests utilisés

IND	: production d'indole.
URE	: uréase.
GLU	: glucose.
MAN	: mannitol.
LAC	: lactose.
SAC	: saccharose.
MAL	: maltose.
SAL	: salicine.
XYL	: xylose.
ARA	: arabinose.
GEL	: gélatine.
ESC	: esculine.
GLY	: glycérol.
CEL	: cellobiose.
MNE	: mannose.
MLZ	: mélézitose.
RAF	: raffinose.
SOR	: sorbitol.
RHA	: rhamnose.
TRE	: tréhalose.
CAT	: catalase.
SPOR	: spores
GRAM	: coloration de Gram.
COCC	: coccus

A N N E X E 2

Croissance à 37°C des souches du groupe
Bacteroides fragilis
sur différentes concentrations du glucose

- o o o -

- Figure 1 : *B. fragilis* souche 290.
Figure 2 : *B. fragilis* souche 440.
Figure 3 : *B. distasonis* souche 462.
Figure 4 : *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148.
Figure 5 : *B. thetaiotaomicron* souche 489.
Figure 6 : *B. vulgatus* souche 154.

Les concentrations du glucose sont en % (P/V).

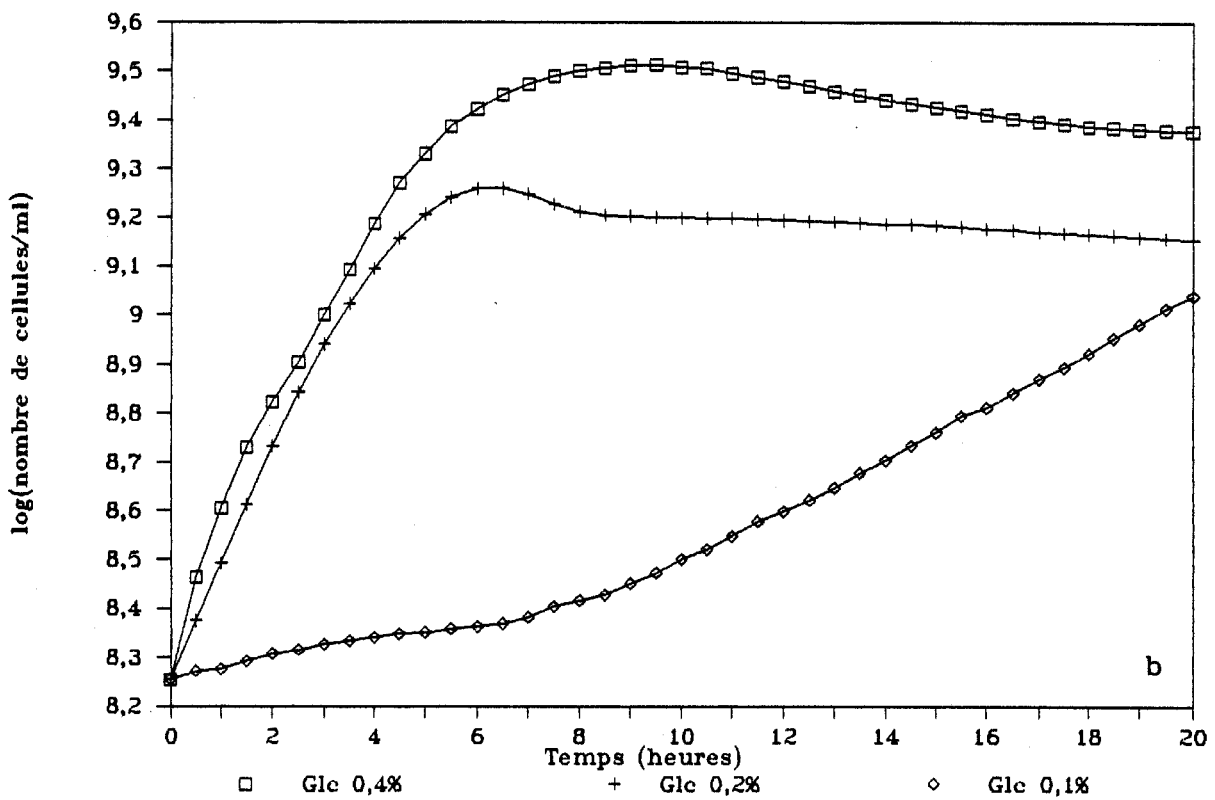
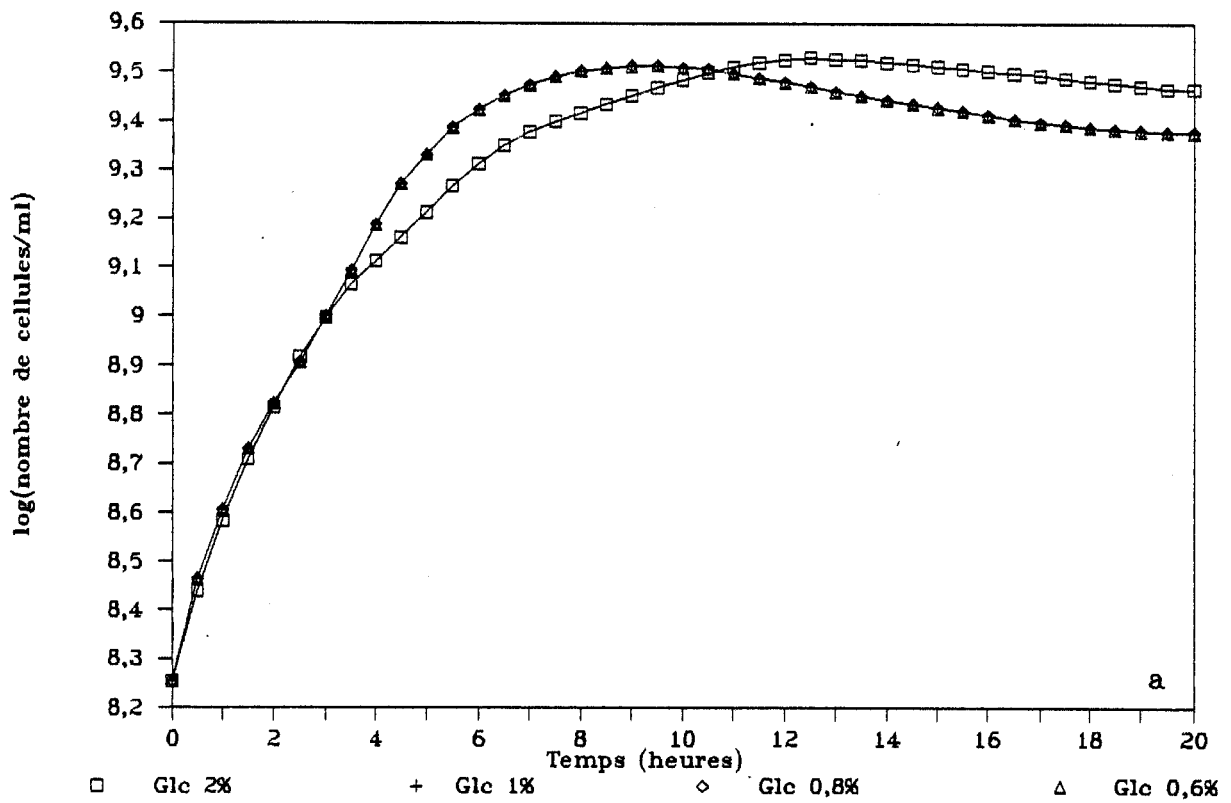


Figure 1 - Croissance de *B. fragilis* souche 290 sur différentes concentrations du glucose.

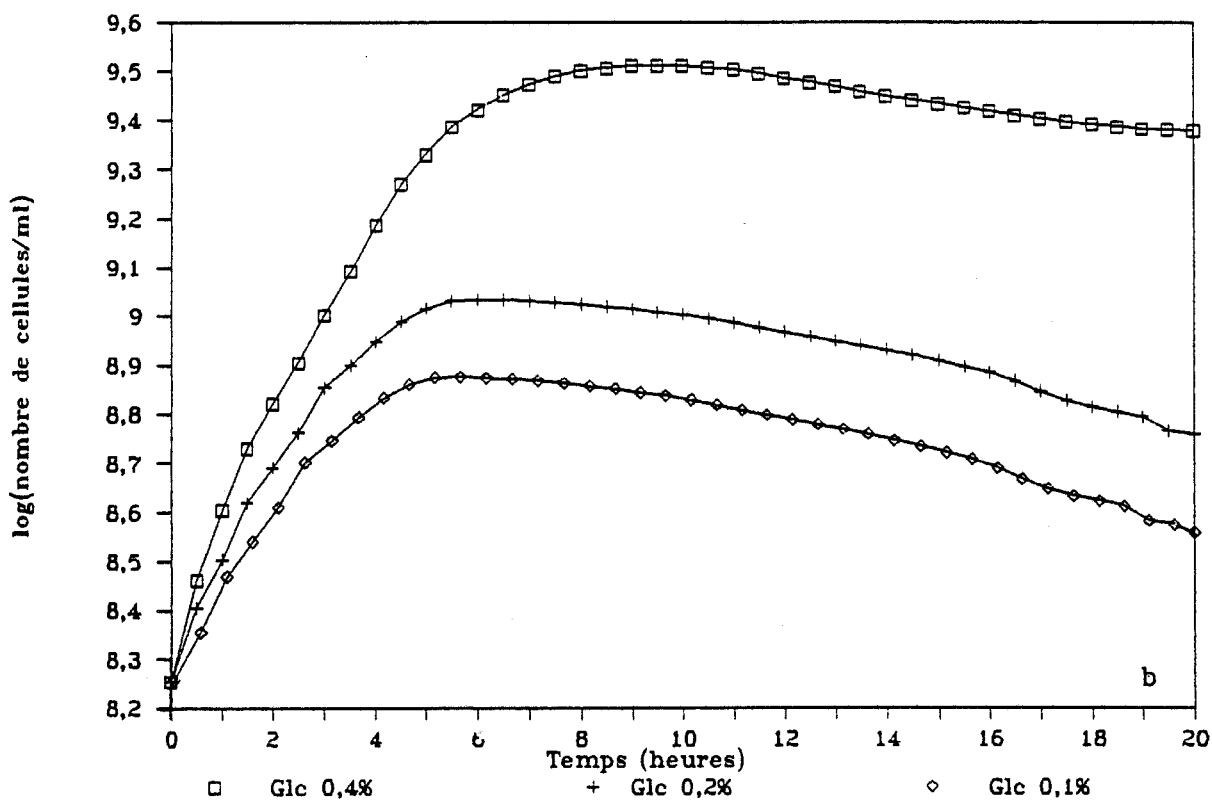
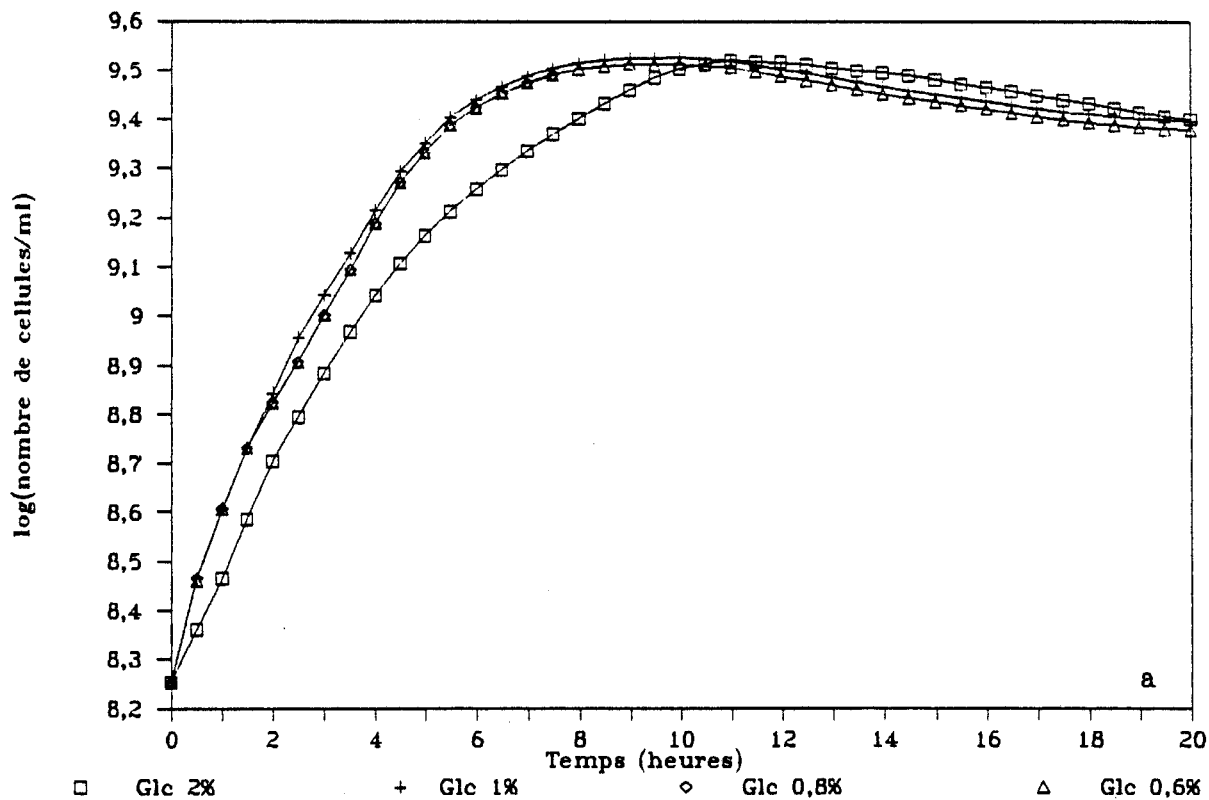


Figure 2 - Croissance de *B. fragilis* souche 440 sur différentes concentrations du glucose.

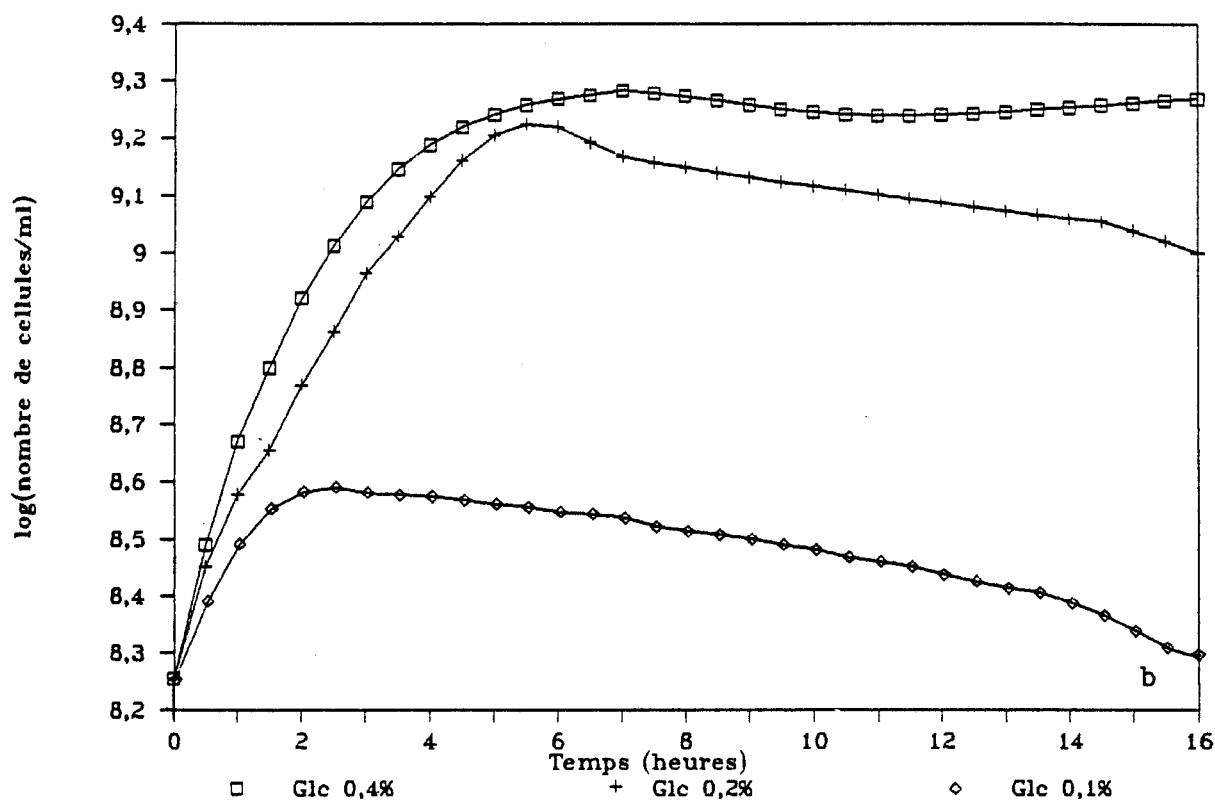
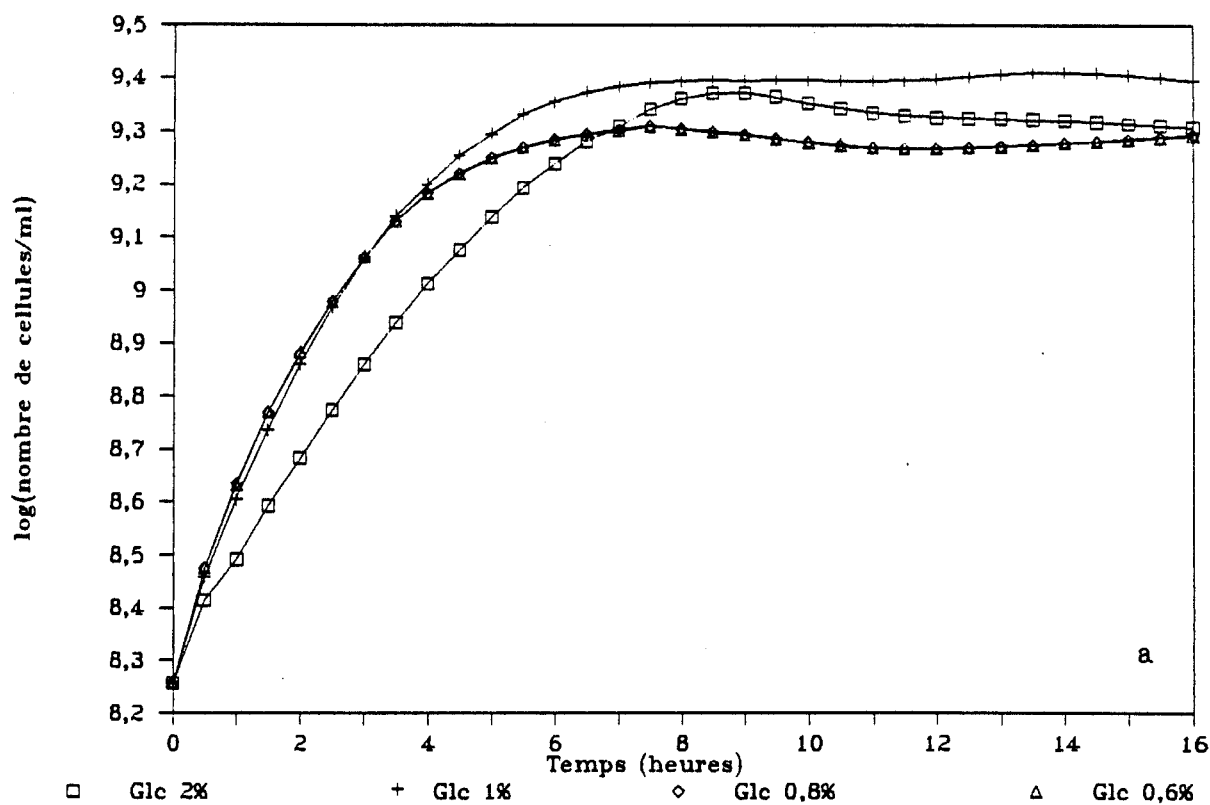


Figure 3 - Croissance de *B. distasonis* souche 462 sur différentes concentrations du glucose.

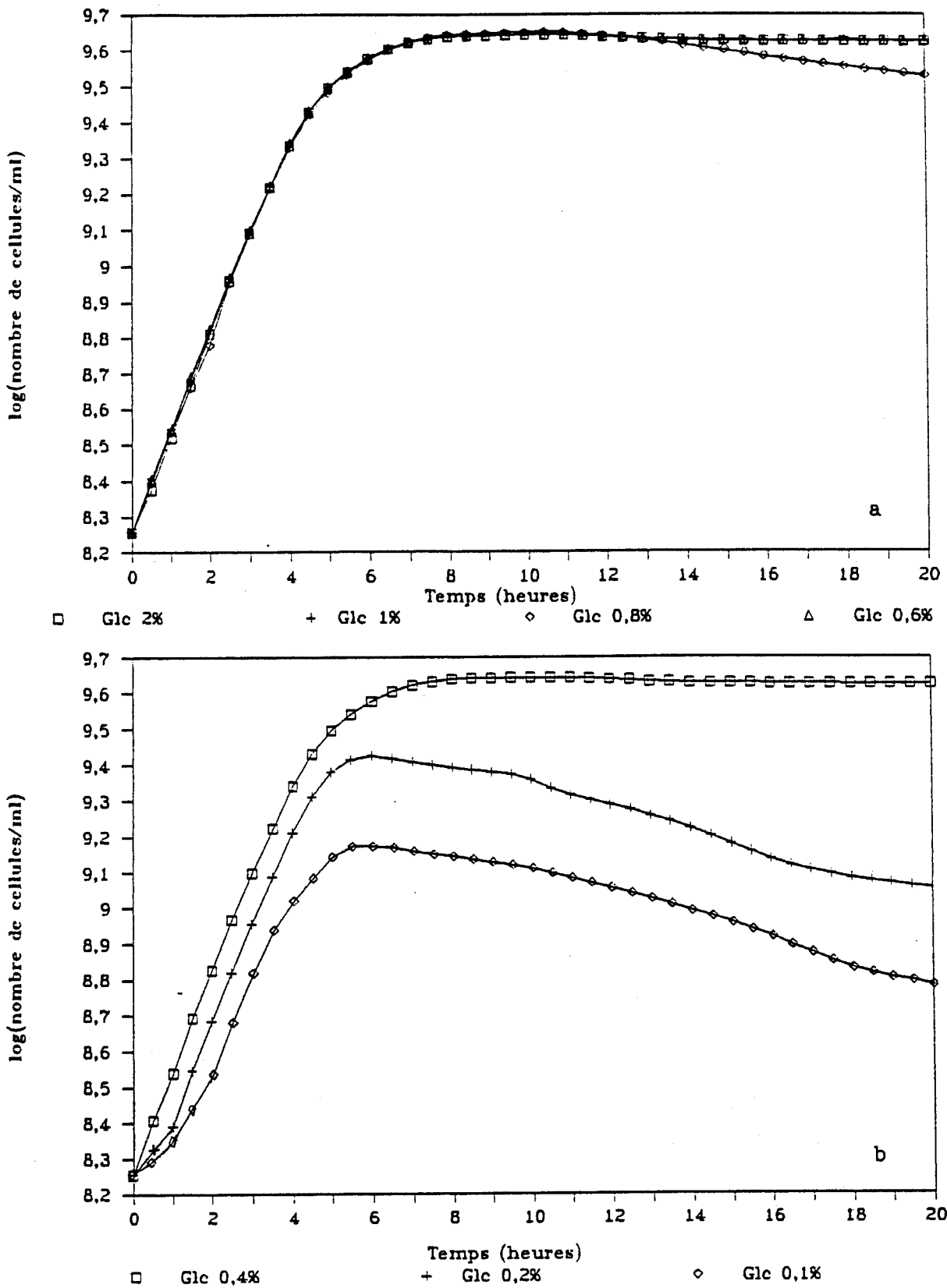


Figure 4 - Croissance de *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148 sur différentes concentrations du glucose.

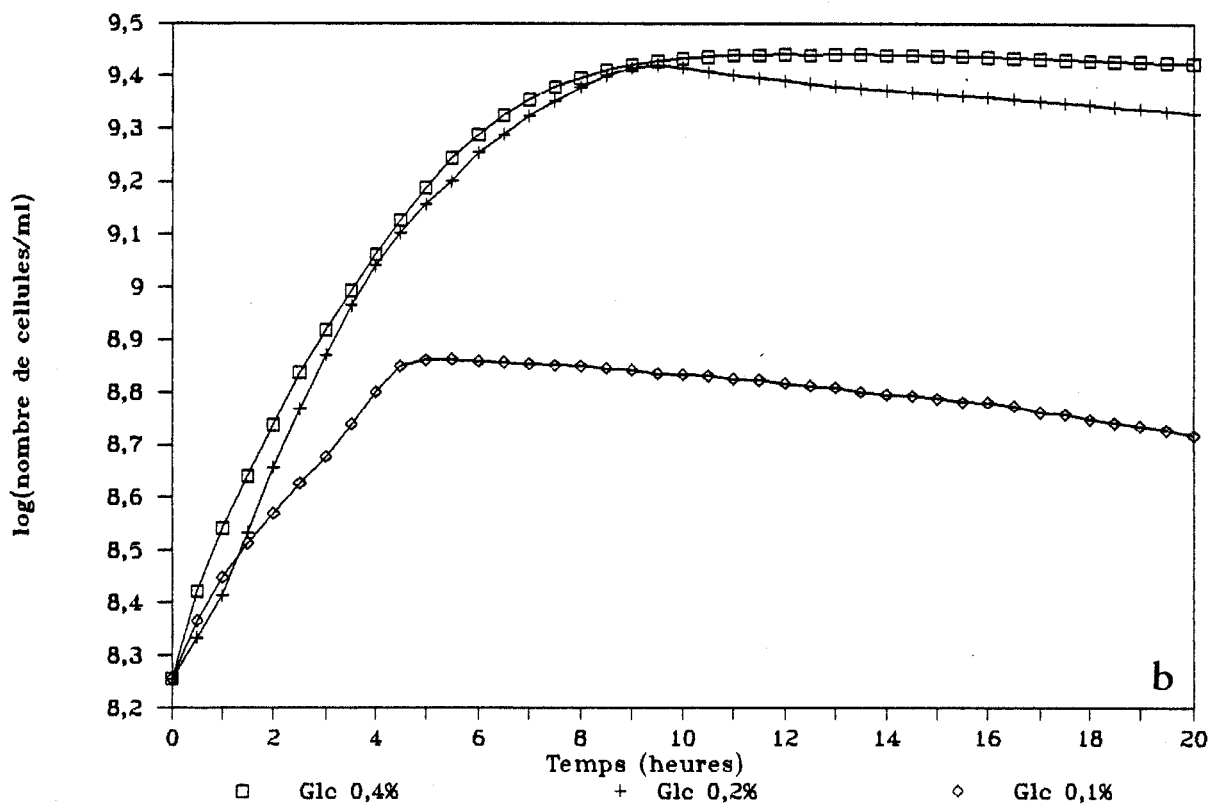
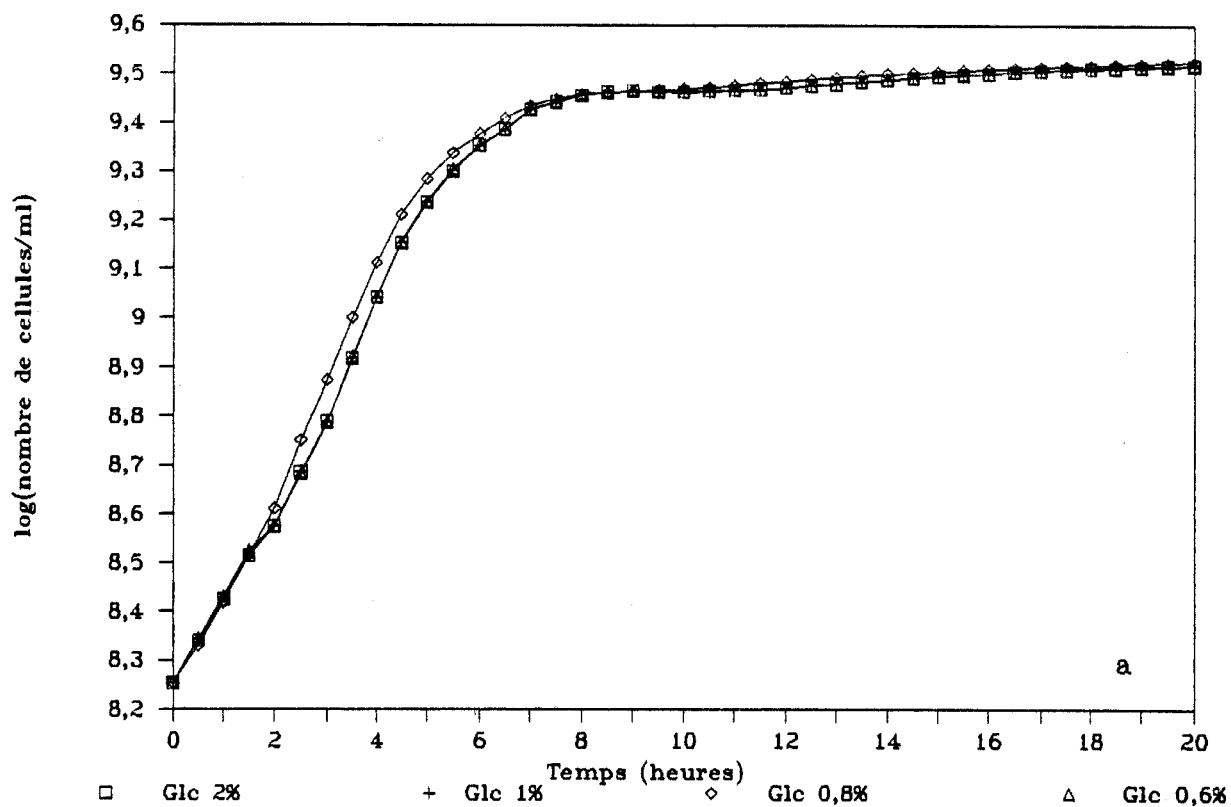


Figure 5 - Croissance de *B. thetaiotaomicron* souche 489 sur différentes concentrations du glucose.

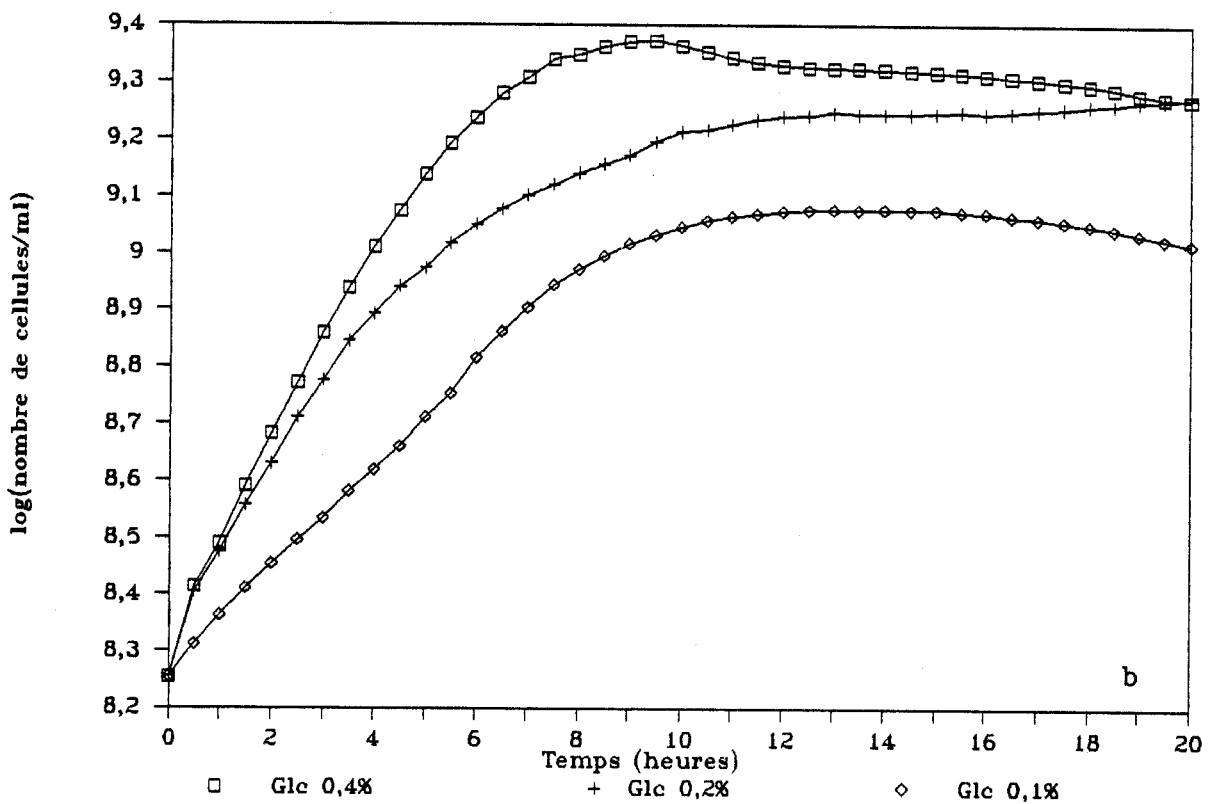
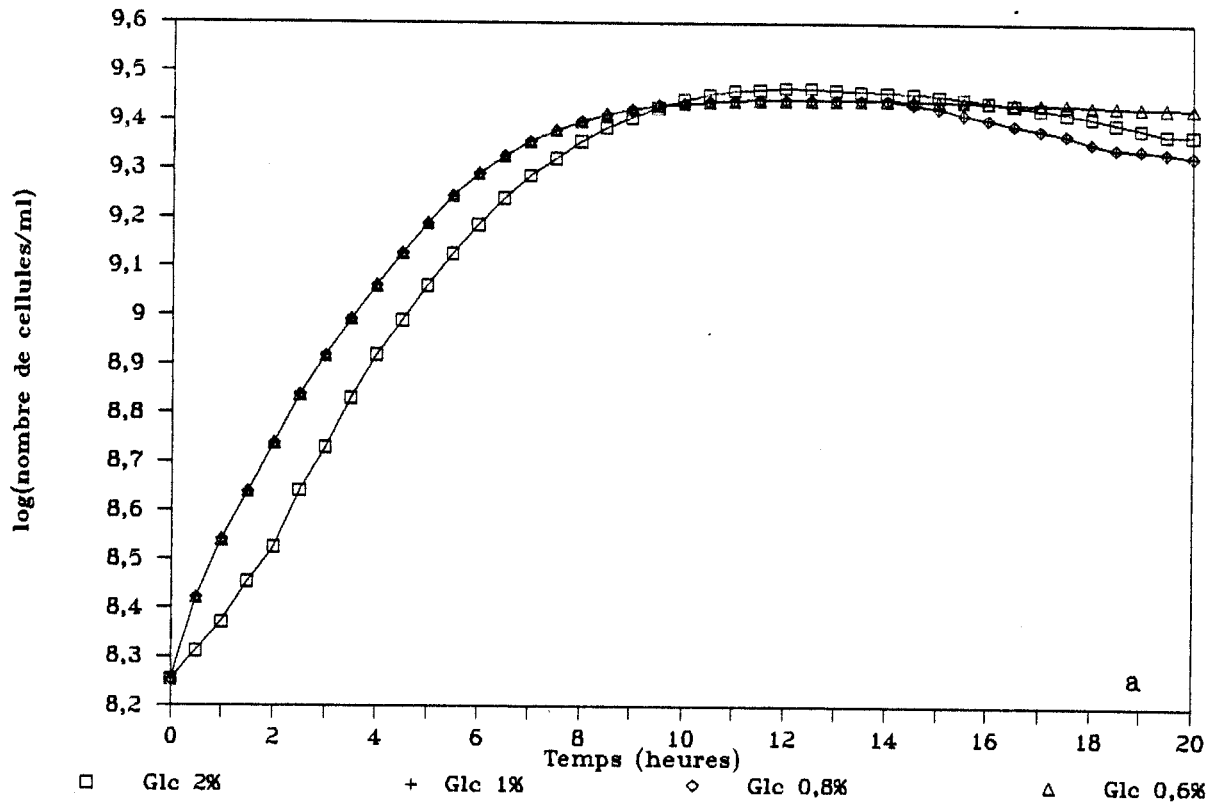


Figure 6 - Croissance de *B. vulgatus* souche 154 sur différentes concentrations du glucose.

ANNEXE 3

Croissance à 37°C des souches du groupe
Bacteroides fragilis sur des mélanges de deux sucres
et sur des sucres séparés

- o O o -

Ces cinétiques ont été comparées à des cinétiques témoins faites sur ces sucres séparés.

- Figure 1 : *B. fragilis* souche 290.
Figure 2 : *B. fragilis* souche 440.
Figure 3 : *B. distasonis* souche 462.
Figure 4 : *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148.
Figure 5 : *B. thetaiotaomicron* souche 489.
Figure 6 : *B. vulgatus* souche 154.

Les sucres sont utilisés chacun à 0,2 % (P/V).

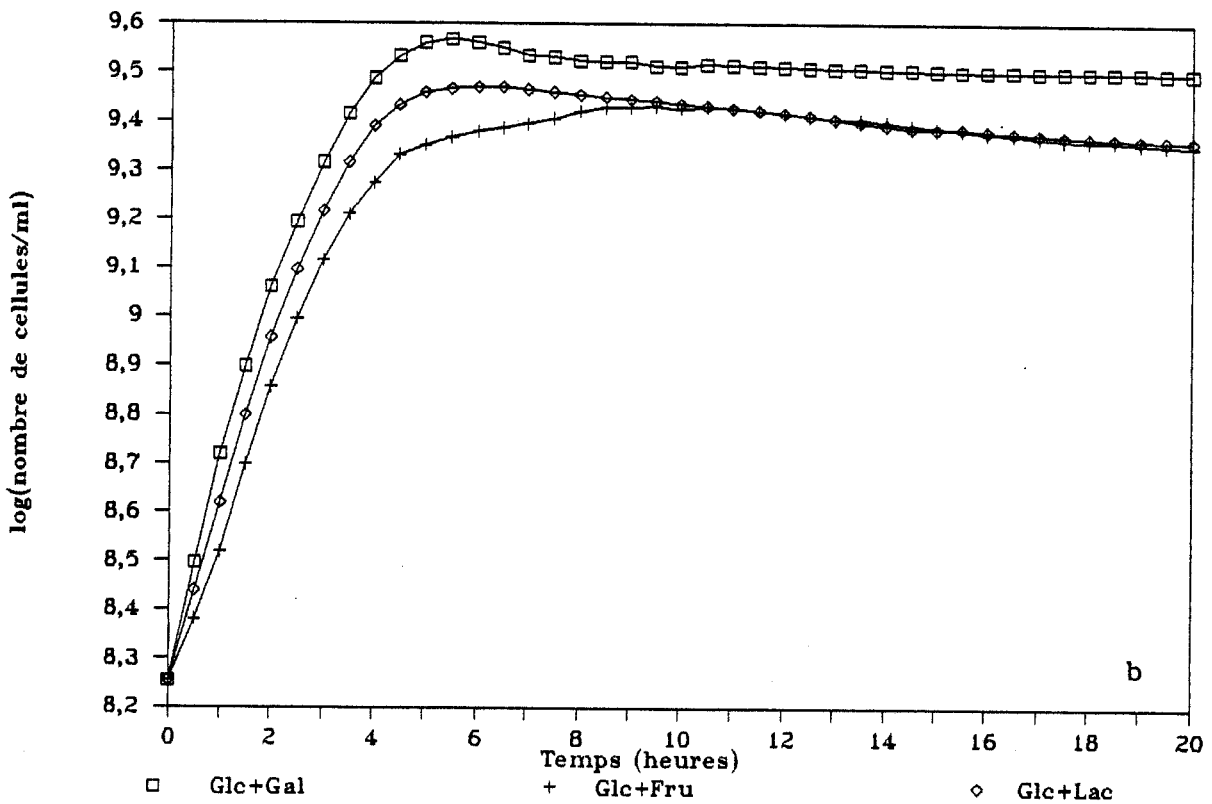
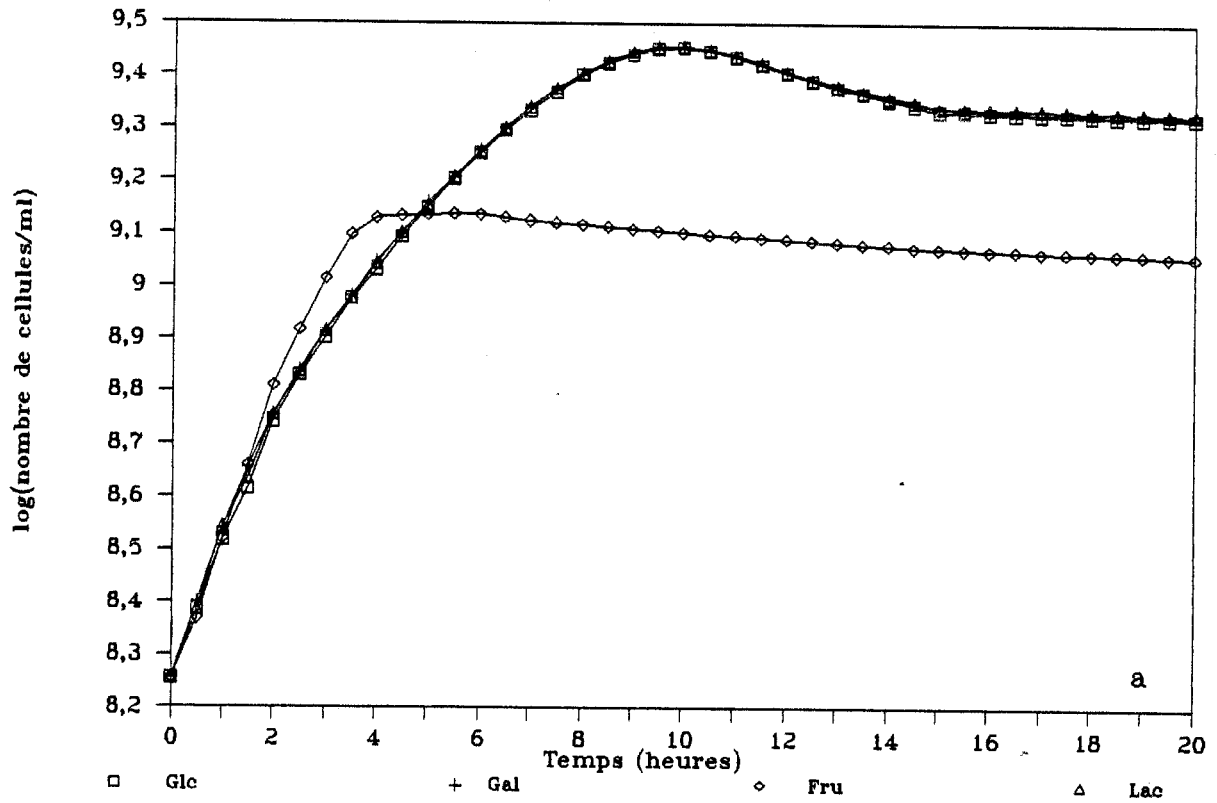


Figure 1 - Croissance de *B. fragilis* souche 290 sur des mélanges de deux sucres et sur des sucres séparés.

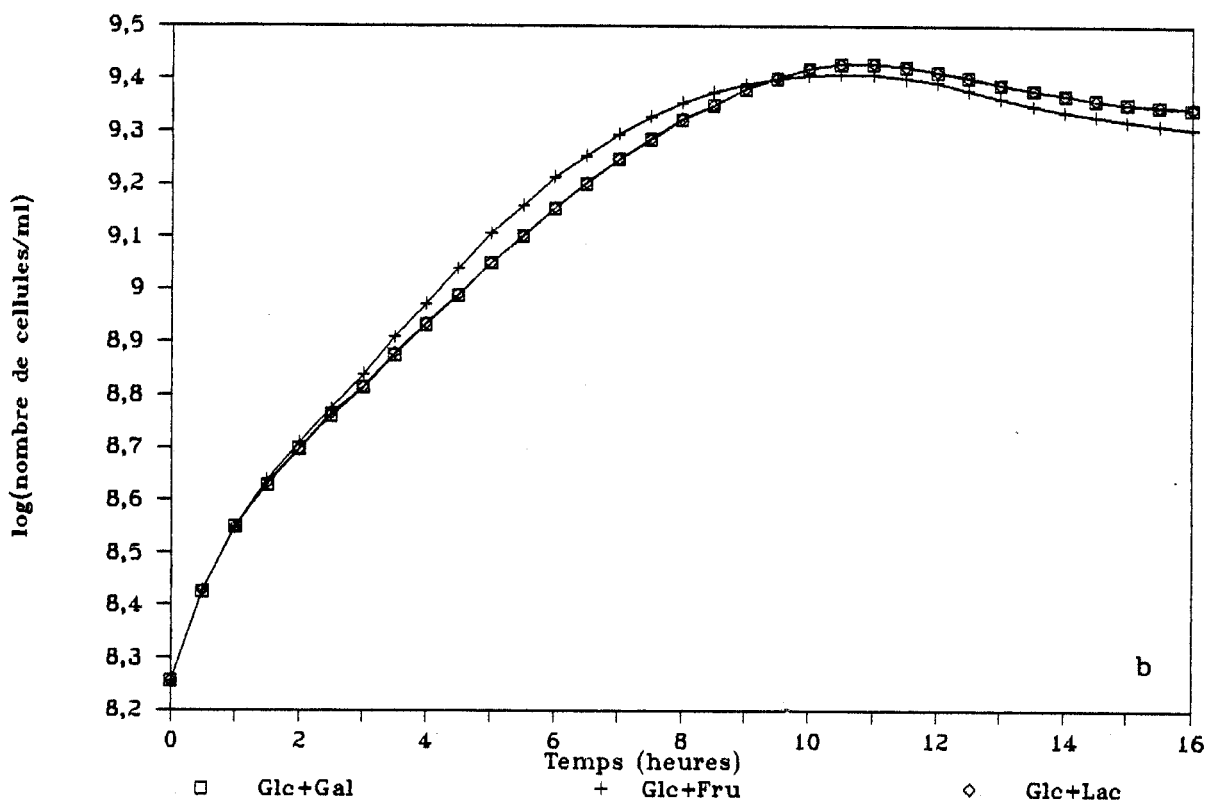
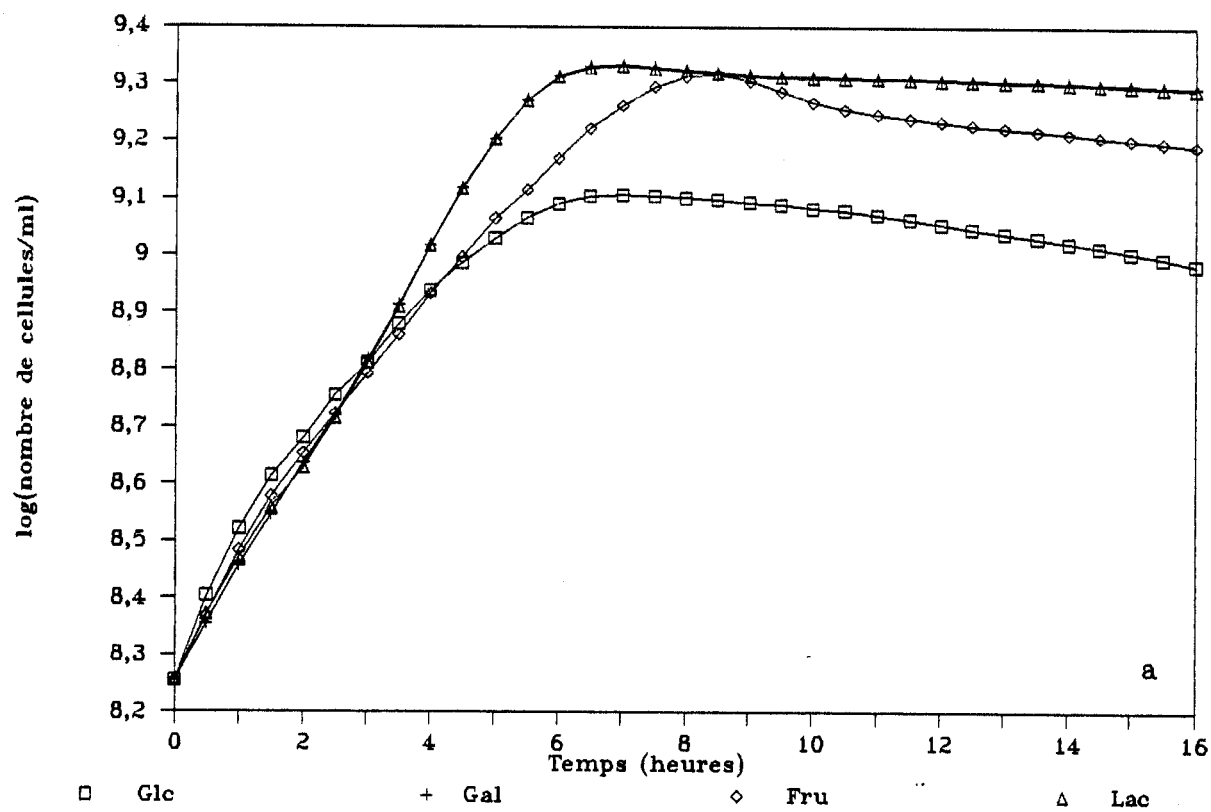


Figure 2 - Croissance de *B. fragilis* souche 440 sur des mélanges de deux sucres et sur des sucres séparés.

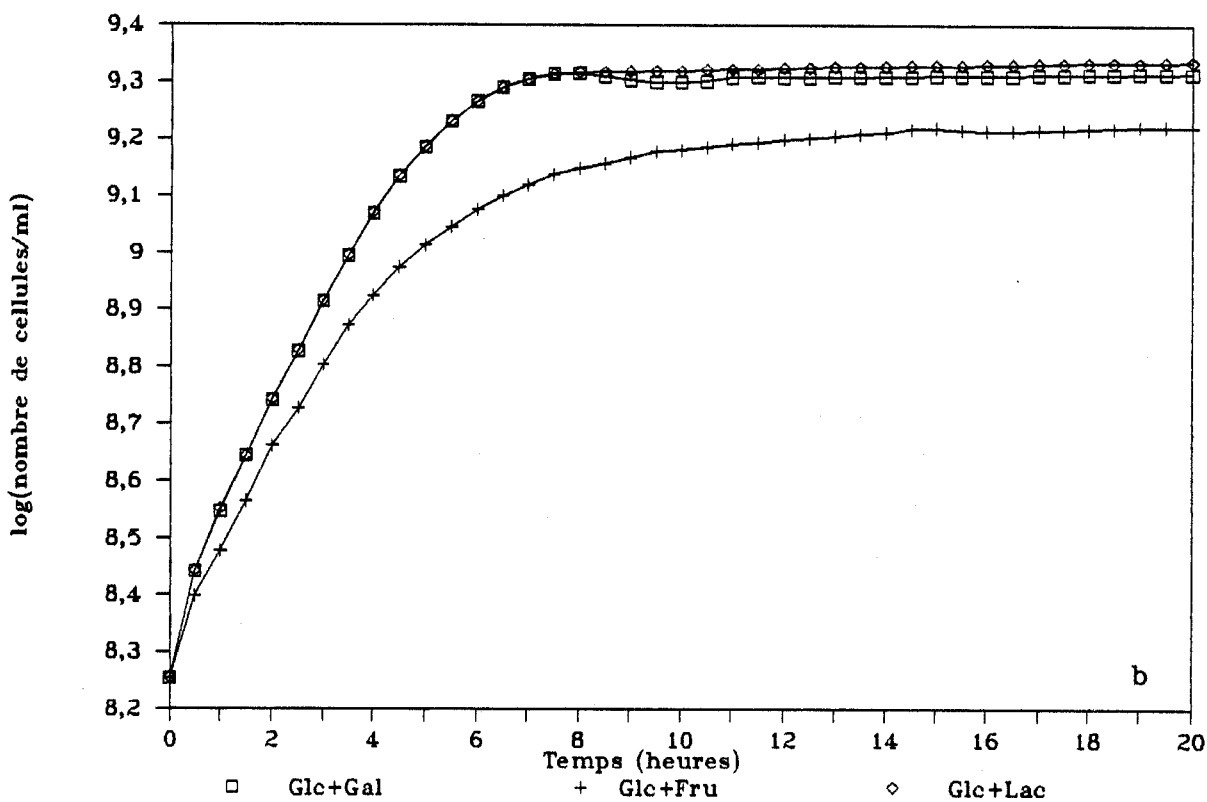
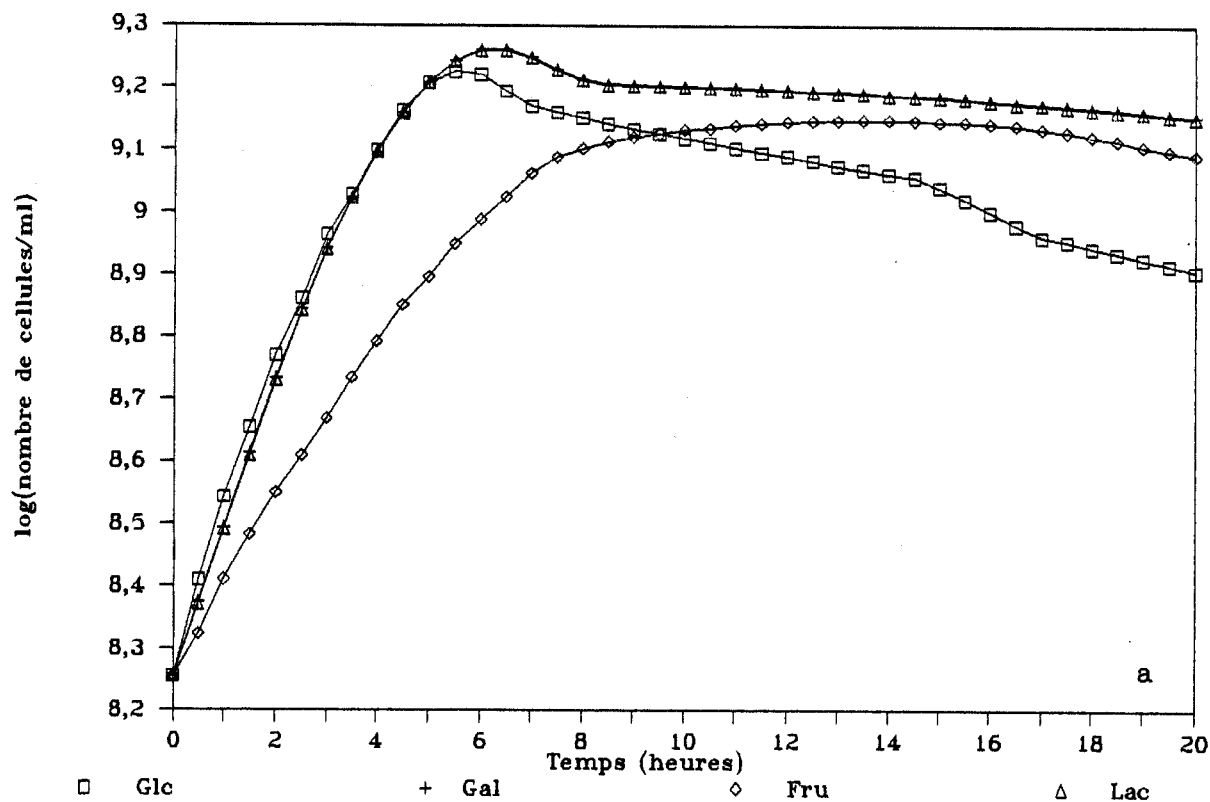


Figure 3 - Croissance de *B. distasonis* souche 462 sur des mélanges de deux sucres et sur des sucres séparés.

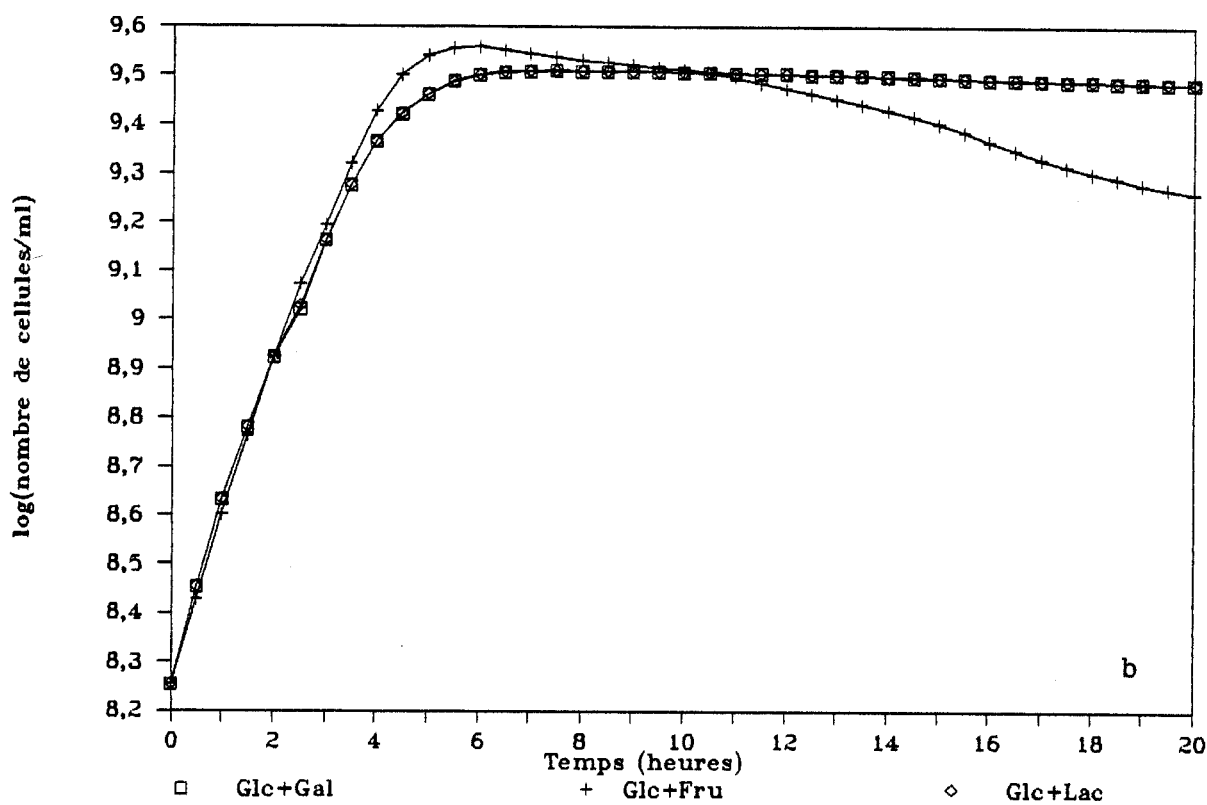
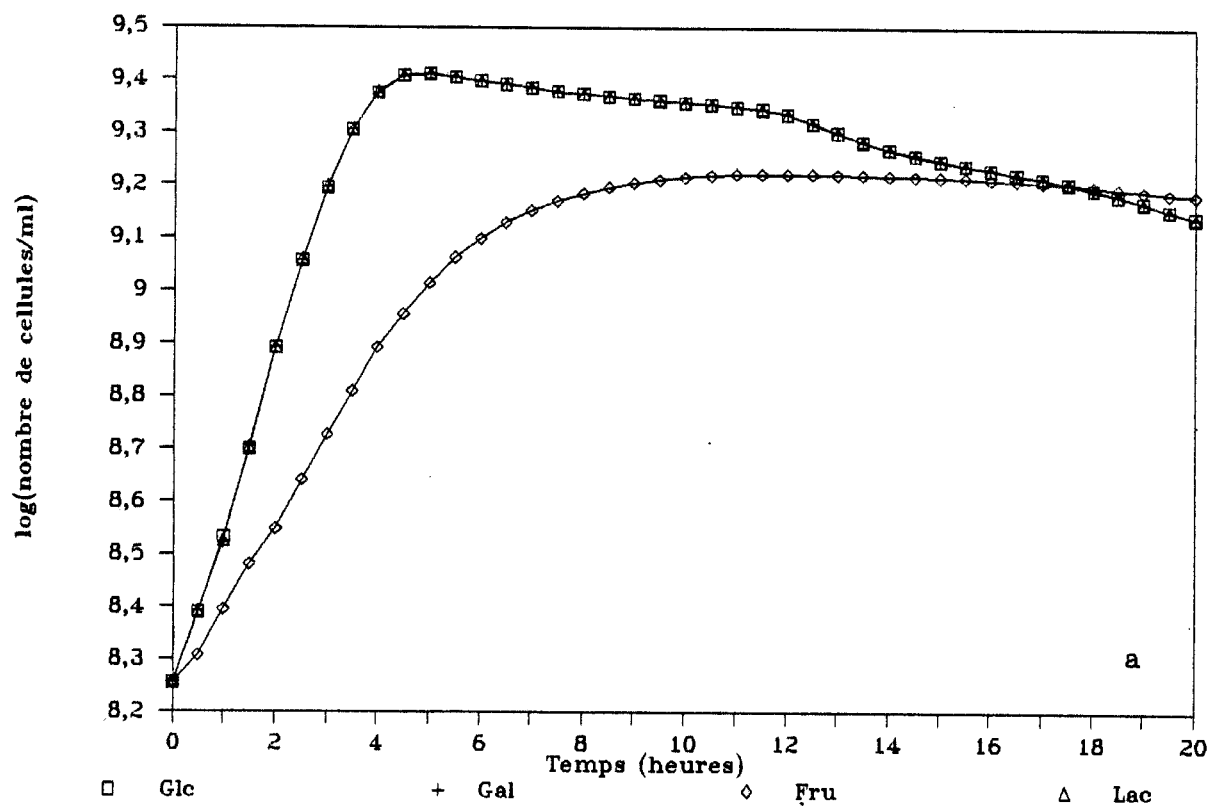


Figure 4 - Croissance de *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148 sur des mélanges de deux sucres et sur des sucres séparés.

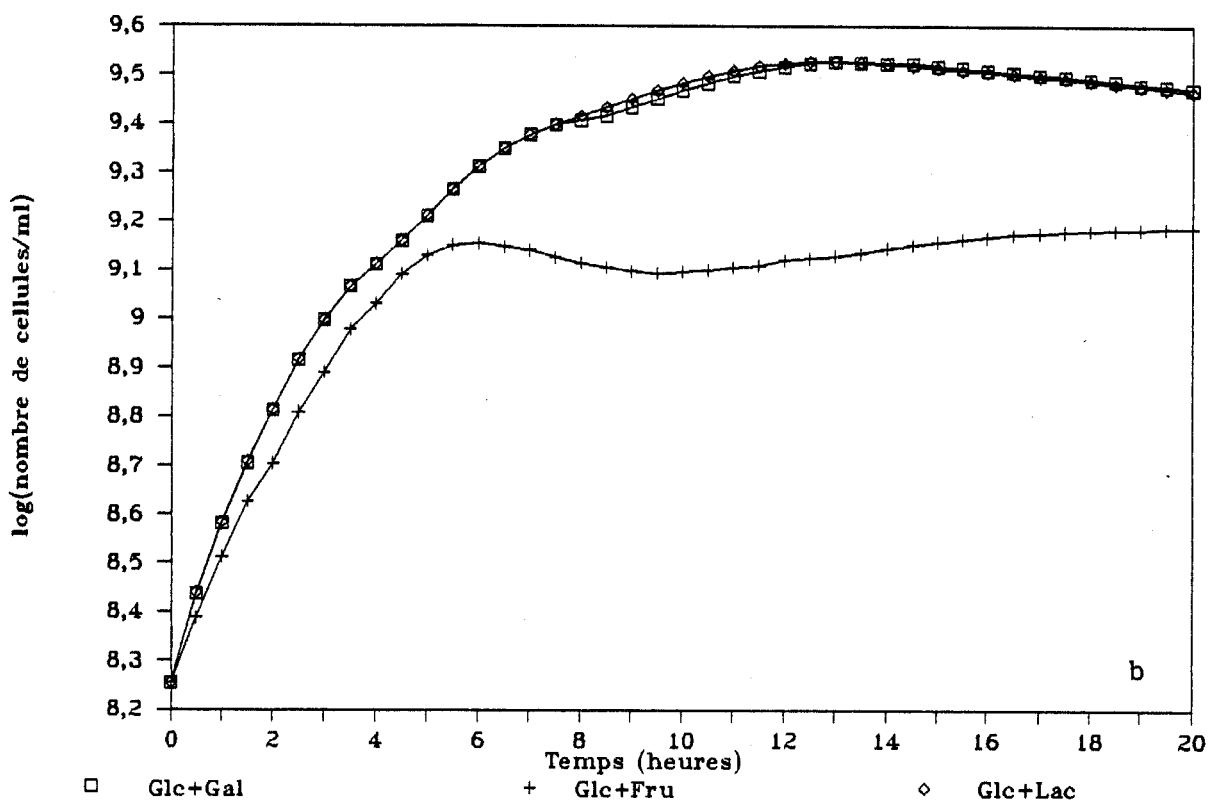
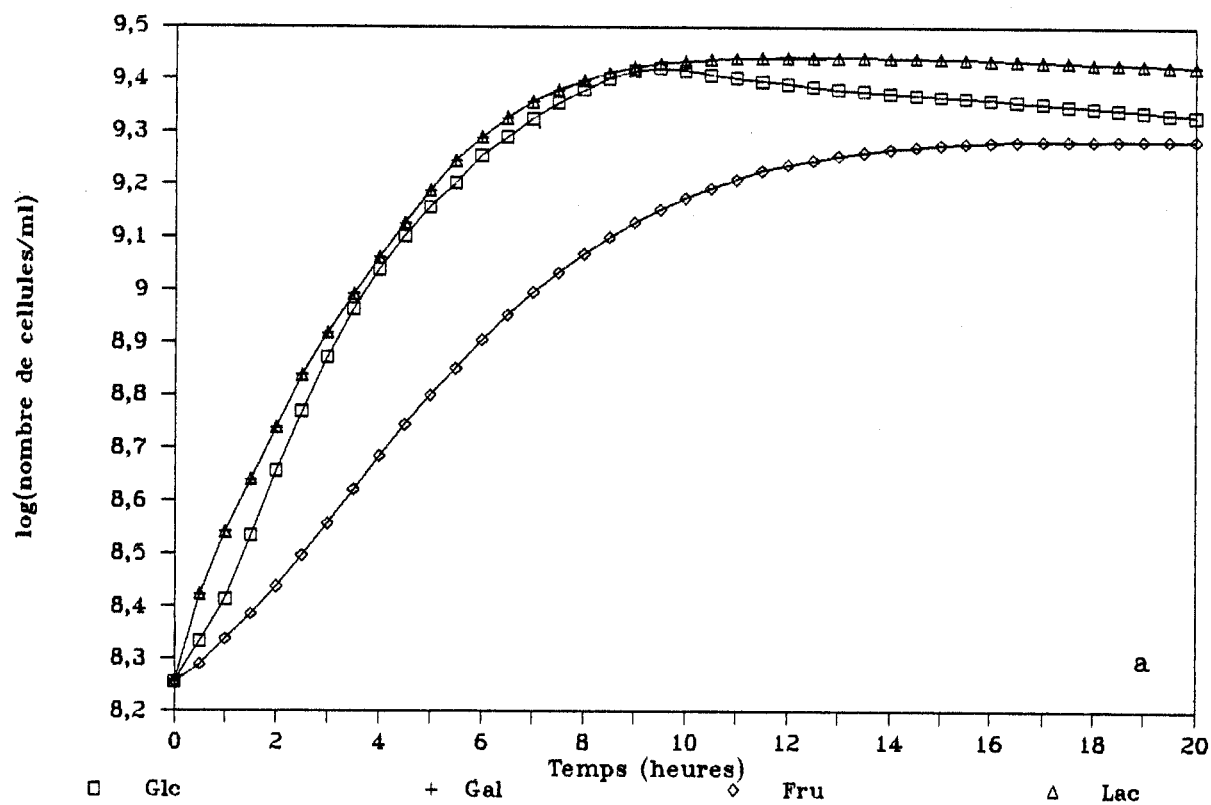


Figure 5 - Croissance de *B. thetaiotaomicron* souche 489 sur des mélanges de deux sucres et sur des sucres séparés.

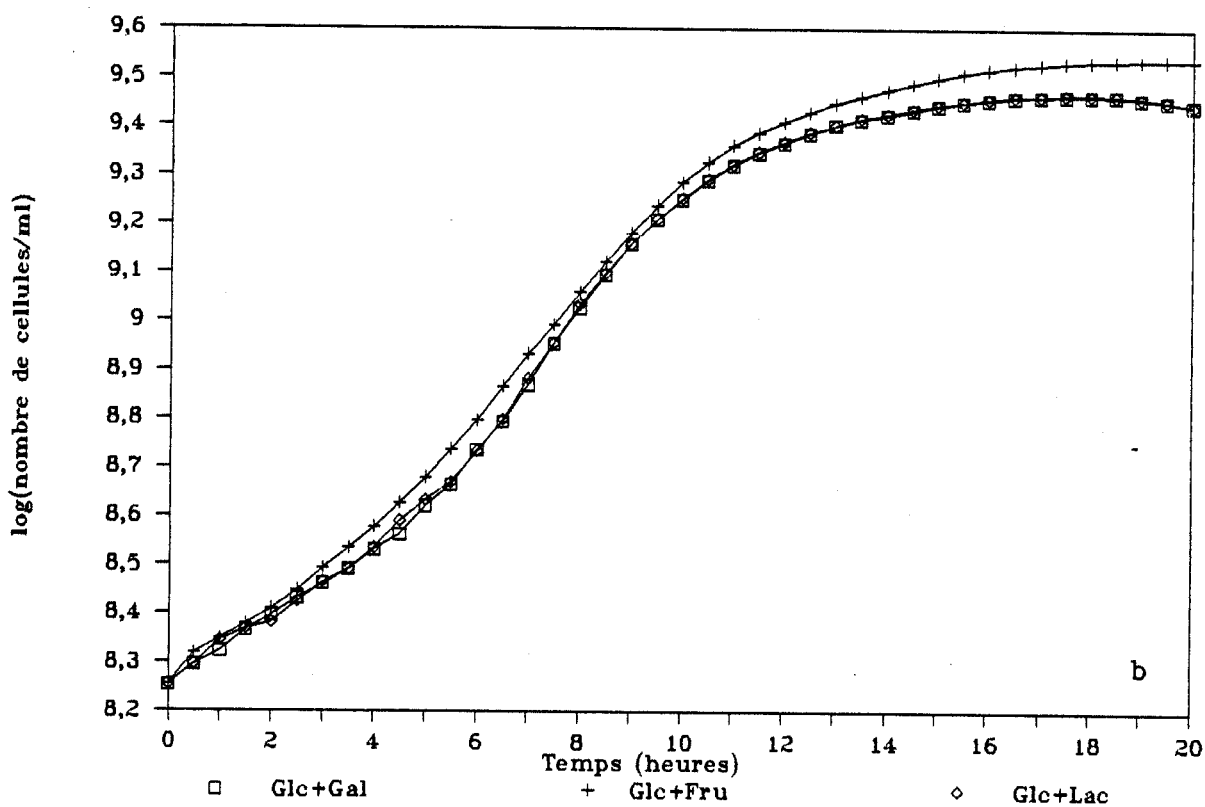
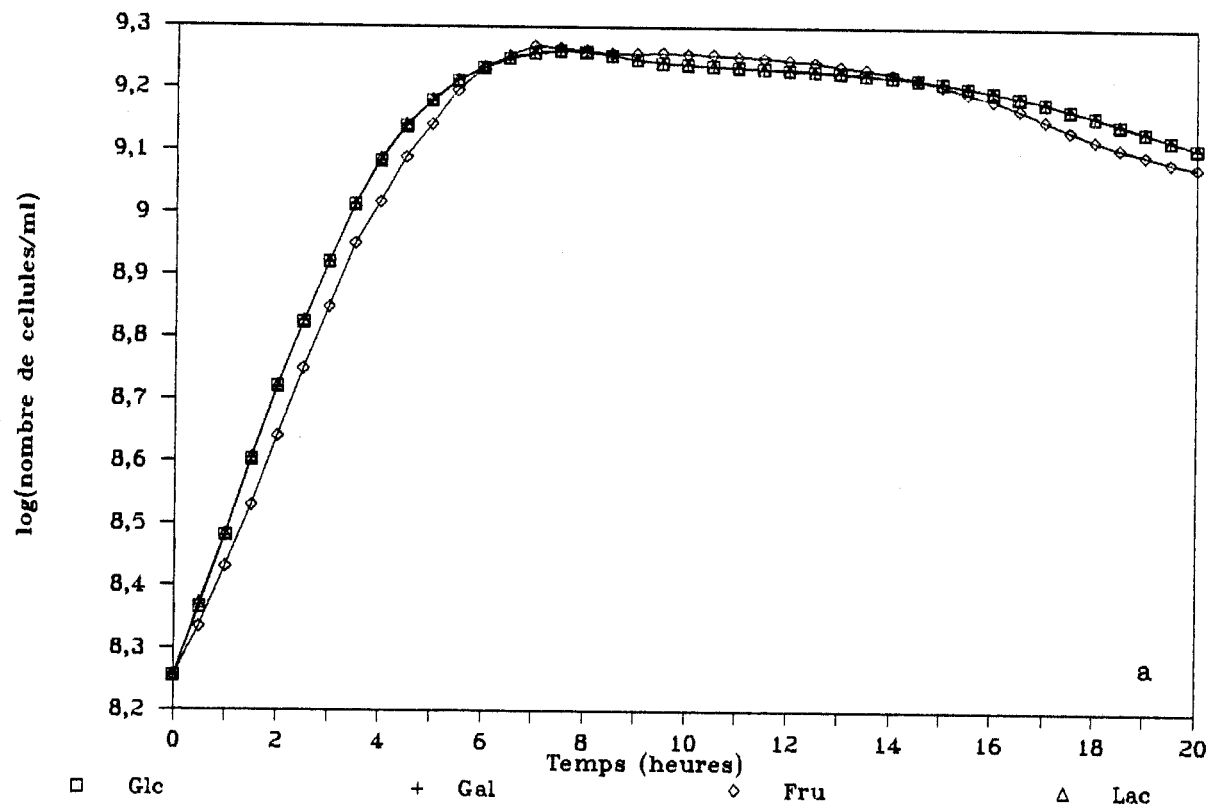


Figure 6 - Croissance de *B. vulgatus* souche 154 sur des mélanges de deux sucres et sur des sucres séparés.

A N N E X E 4

Action des inhibiteurs métaboliques
sur le transport du glucose

- o o o -

Les inhibiteurs sont utilisés à des concentrations variables. Ils sont ajoutés 15 min avant l'addition du ^{14}C -Glc 0,1 mM. Le pourcentage d'activité résiduelle est déterminé après 5 min d'accumulation et par rapport à des cinétiques témoins.

- Figure 1 : **B. fragilis** souche 290.
- Figure 2 : **B. fragilis** souche 440.
- Figure 3 : **B. distasonis** souche 462.
- Figure 4 : **B. thetaiotaomicron** ATCC 29148.
- Figure 5 : **B. vulgatus** souche 154.

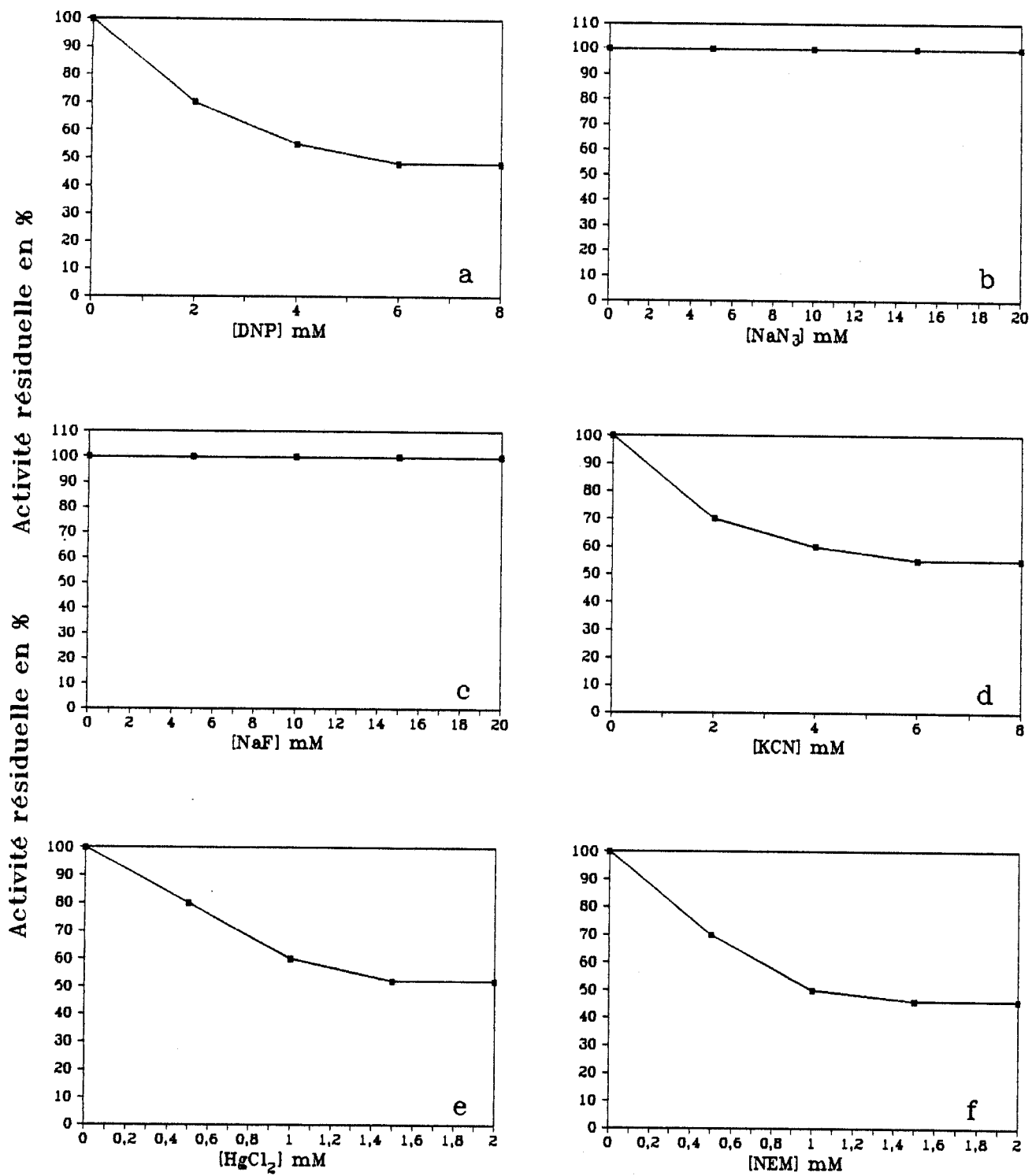


Figure 1 - Effet des inhibiteurs métaboliques sur l'accumulation du glucose chez *B. fragilis* souche 290.

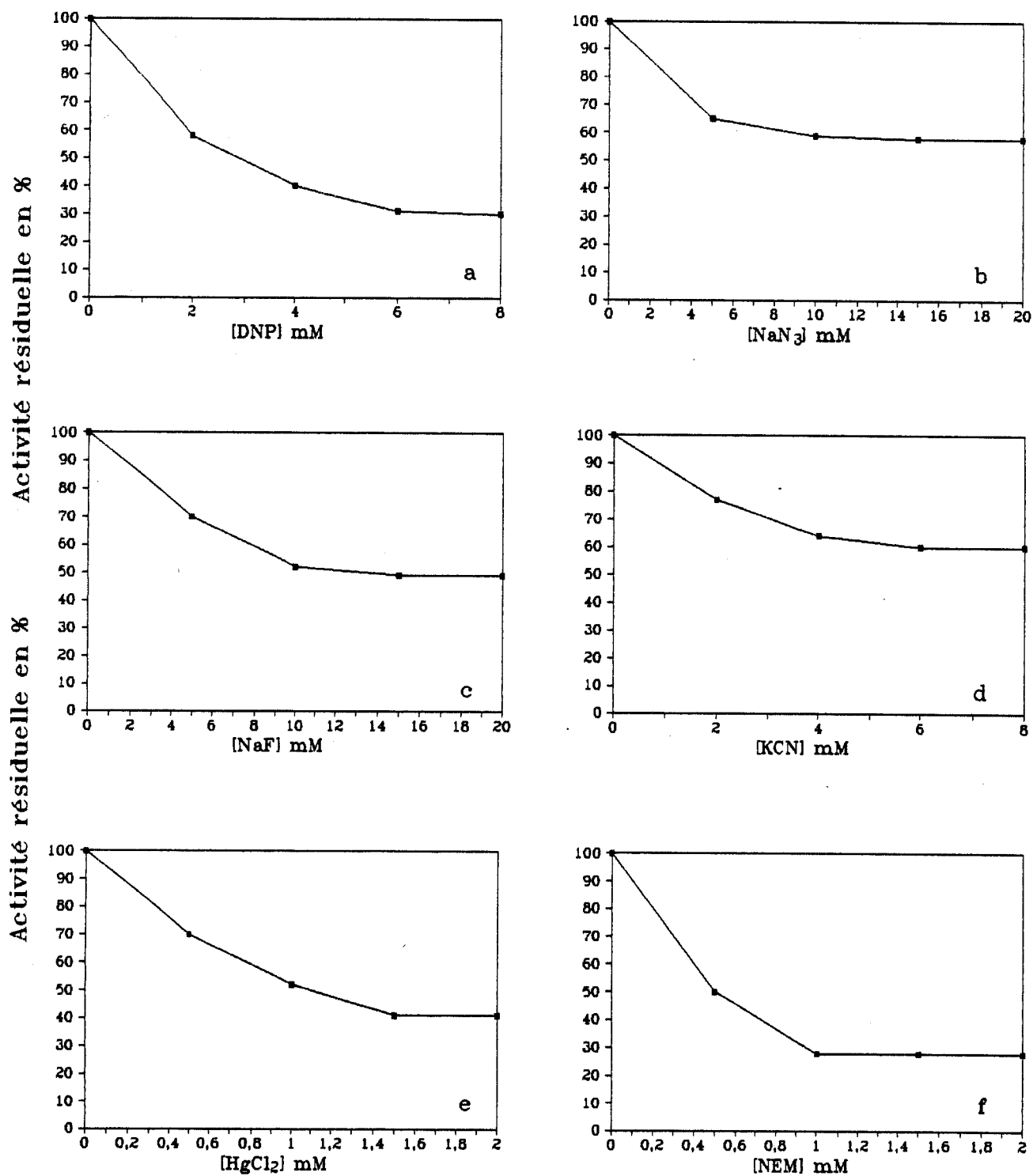


Figure 2 - Effet des inhibiteurs métaboliques sur l'accumulation du glucose chez *B. fragilis* souche 440.

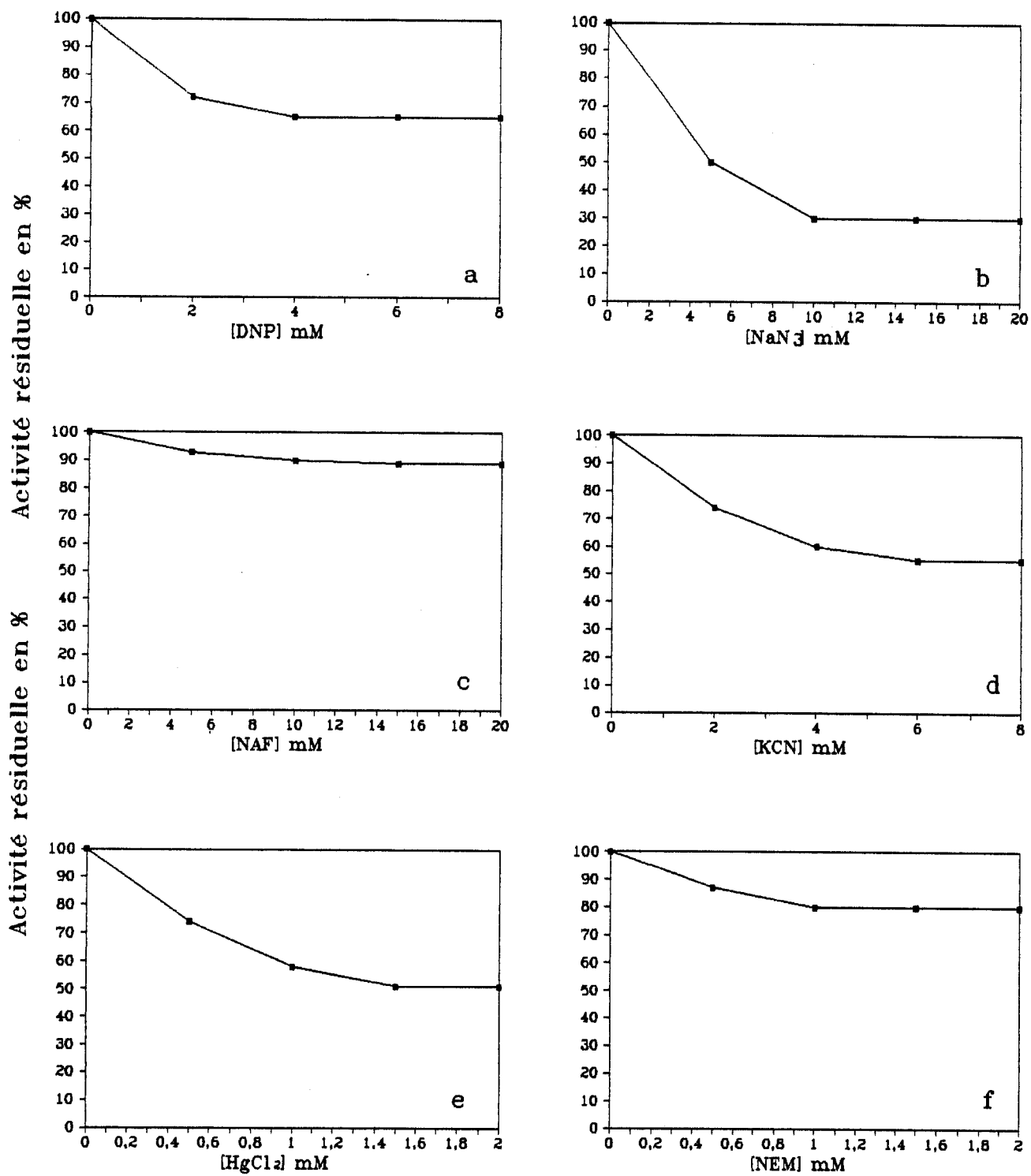


Figure 3 - Effet des inhibiteurs métaboliques sur l'accumulation du glucose chez *B. distasonis* souche 462.

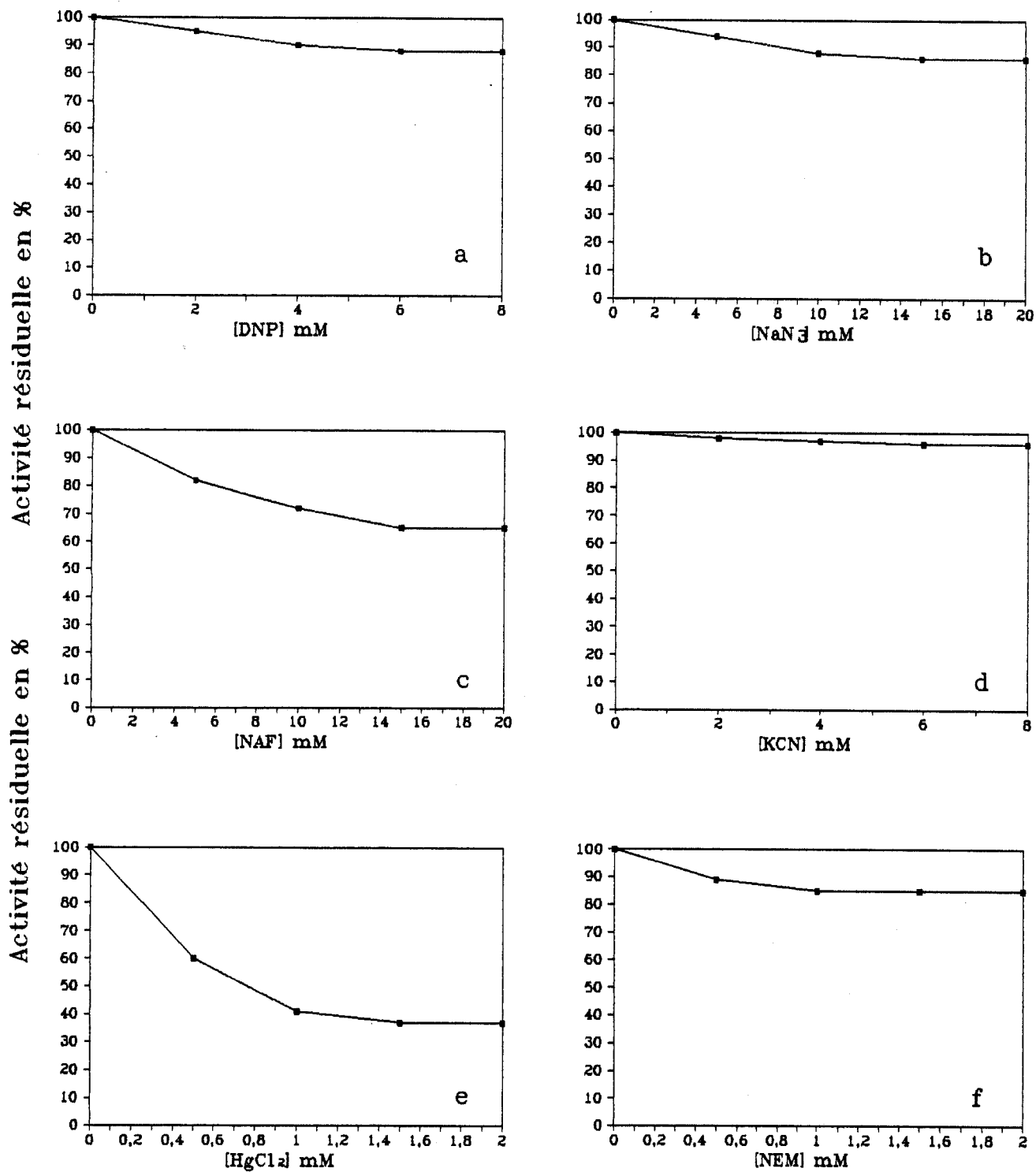


Figure 4 - Effet des inhibiteurs métaboliques sur l'accumulation du glucose chez *B. thetaiotaomicron* ATCC 29148.

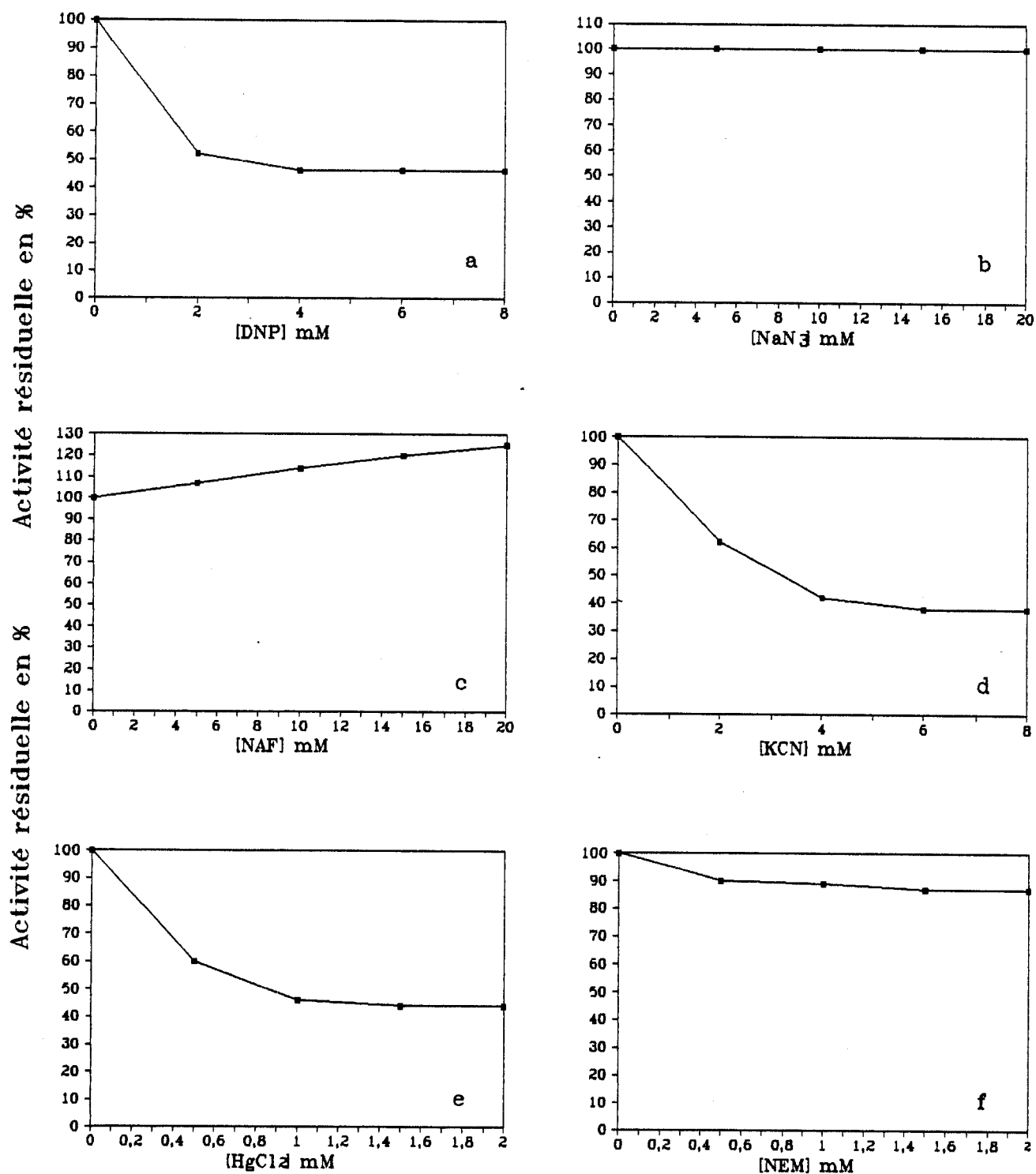


Figure 5 - Effet des inhibiteurs métaboliques sur l'accumulation du glucose chez *B. vulgatus* souche 154.

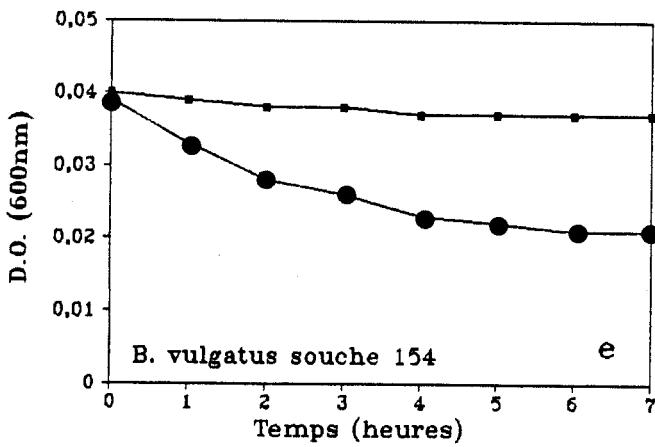
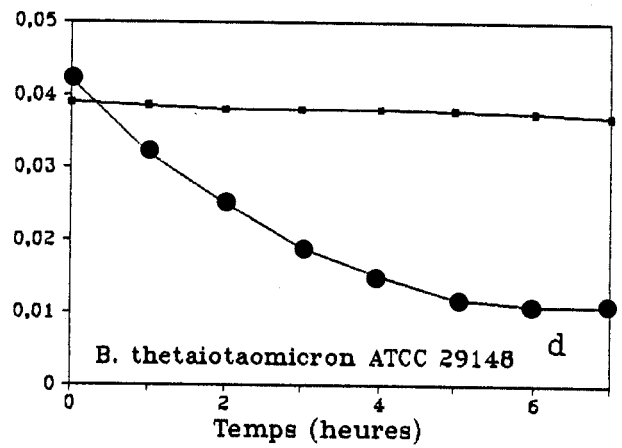
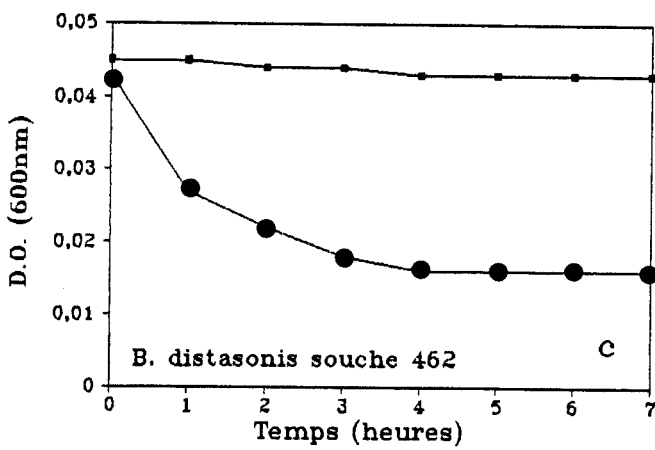
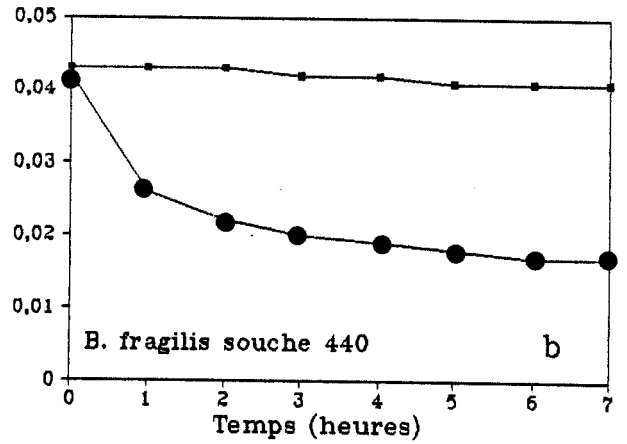
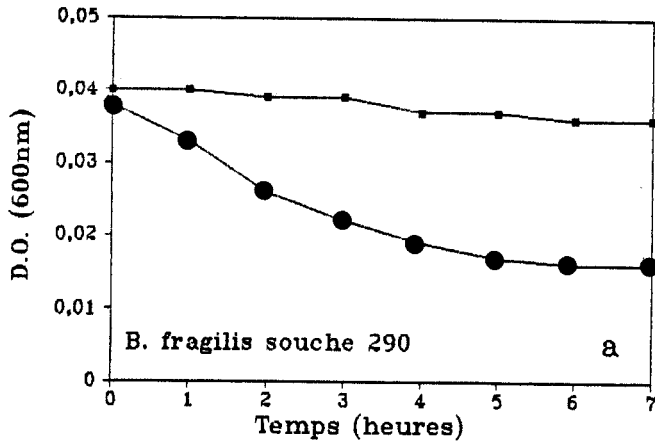
ANNEXE 5

Formation des sphéroplastes

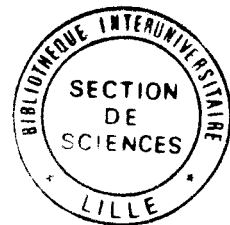
- o o o -

Formation des sphéroplastes indiquée par l'augmentation de la sensibilité osmotique des cellules traitées comparée au témoin en fonction du temps d'incubation avec le mélange EDTA-lysozyme. Dans le témoin, il n'y a que de l'EDTA.

- a : **B. fragilis** souche 290.
- b : **B. fragilis** souche 440.
- c : **B. distasonis** souche 462.
- d : **B. thetaiotaomicron** ATCC 29148.
- e : **B. vulgatus** souche 154.



- temoin
- cellules traitées à l'EDTA/lysozyme



SUMMARY

Bacteria of the genus *Bacteroides* are strict anaerobes and saccharolytic. In the human colon, they develop in great numbers from plant polysaccharides which are not degraded by the host. By biophotometer studies of several species development in different medium conditions, we specified the kinetic constants of their growth. We could establish that under strict anaerobiosis, the studied species develop very quickly face to monosaccharides which, when mixed, are simultaneously used. Then we studied more particularly the first step of these substrates breakdown : their uptake across the cytoplasmic membrane. This was thoroughly studied in *B. thetaiotaomicron*. Using the metabolic inhibitors and the search for substrate phosphorylation during the uptake, two systems were distinguished : facilitated diffusion and phosphotransferase system (PTS). The K_m and the V_{max} relative kinetic constants were determined. Moreover the comparison of uptake in both spheroplasts and cells did not reveal binding proteins. This mechanism seems to be constitutive and no specific to glucose.

Recently the genus *Bacteroides* has been restricted to *Bacteroides fragilis* type species and to related species. We searched the glucose uptake system in the more representative species of this group. With the same methods, we detected two systems in *Bacteroides distasonis* : one system energized by a proton gradient and one PTS ; in *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides vulgatus*, we detected only one active mechanism energized by proton gradient.

Thus the glucose uptake mechanisms in *Bacteroides* are numerous and different, and the homogeneity of *B. fragilis* group seems not to be verified at least towards this criterion.



RESUME

Les bactéries du genre *Bacteroides* sont anaérobies strictes et saccharolytiques. Dans le côlon humain, elles se développent en très grand nombre à partir des polysaccharides végétaux non dégradés par l'hôte. L'étude au biophotomètre du développement de plusieurs espèces dans différentes conditions de milieux nous a permis de préciser les constantes cinétiques de leur croissance. Nous avons pu constater qu'en conditions d'anaérobiose stricte, les espèces étudiées se développent très rapidement avec un rendement élevé en présence de monosaccharides qui, en mélange, sont utilisés simultanément. Nous avons ensuite étudié plus particulièrement la première étape de la dégradation de ces substrats : leur transport au travers de la membrane cytoplasmique. Cette étude a été approfondie chez *Bacteroides thetaiotaomicron*. L'utilisation des inhibiteurs métaboliques et la recherche de phosphorylation du substrat durant le transport nous ont permis de mettre en évidence deux systèmes : diffusion facilitée et système phosphotransférase. Les constantes cinétiques apparentées K_m et V_{max} ont été déterminées. Par ailleurs la comparaison du transport chez les sphéroplastes et les cellules entières montre qu'il n'y a pas de protéines de liaisons impliquées. Ce mécanisme semble être constitutif et il n'est pas spécifique du glucose.

Récemment le genre *Bacteroides* a été restreint à l'espèce type *Bacteroides fragilis* et aux espèces apparentées. Nous avons cherché le système du transport du glucose chez les espèces les plus représentatives de ce groupe. Avec les mêmes méthodes, nous avons détecté deux systèmes chez *Bacteroides distasonis* : un système énergisé par un gradient de protons et un système phosphotransférase ; chez *B. fragilis* et *Bacteroides vulgatus* nous n'avons détecté qu'un seul mécanisme actif, énergisé par un gradient de protons.

Les mécanismes du transport du glucose chez *Bacteroides* sont donc nombreux et différents en fonction des espèces ; l'homogénéité du groupe *B. fragilis* ne semble pas être respectée au moins vis-à-vis de ce critère.