

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE
PRÉSENTÉE À
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN
MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

LOREDANA VALEANU

ÉLUCIDATION DE LA RÉSISTANCE AUX PARABENS CHEZ
ENTEROBACTER GERGOVIAE ET *ENTEROBACTER CLOACAE*.

OCTOBRE 1993

A ma chère maman, pour son amour et sa tendresse ainsi
que pour sa sagesse qui me guida tout au long de ma vie.

Je ne t'oublierais jamais...

A papa, pour son affection et ses encouragements
incessants,

A Richard, pour son amour, sa présence à mes côtés et
sa foi en ma réussite.

Table des matières

Dédicace	i
Table des matières	ii
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	viii
Sommaire	xii
Introduction	2
Revue de littérature	6
1 Les méthodes de stabilisation des produits alimentaires	7
1.1 Les parabens	8
2 Mécanismes de résistance aux agents antibactériens	12
2.1 Résistance intrinsèque	13
2.1.1 Composition en acides gras des lipides cellulaires	13
2.1.2 Composition en lipopolysaccharides des parois cellulaires	20
2.1.3 Synthèse d'enzymes hydrolysant les agents antibactériens	25
2.2 Résistance acquise	26
2.2.1 Résistance plasmidique	26
2.2.2 Résistance due à une mutation	27
Matériel et méthodes	28
1 Caractérisation des différentes souches	29
1.1 Origine des souches utilisées	29
1.2 Détermination de la température optimale de croissance	29
1.3 Courbes de croissance	30
1.4 Courbes de croissance en milieu TSB supplémenté en propyl parabens à différentes concentrations	31
1.5 Courbes de croissance en milieu TSB supplémenté en méthyl parabens à différentes concentrations	31
1.6 Importance de l'inoculum nécessaire pour la croissance bactérienne en milieu TSB supplémenté avec des parabens aux concentrations utilisées dans le supplément minéral	31
1.7 Influence des sels minéraux contenus dans le supplément minéral	32
1.8 Antibiogramme	33
1.9 Aspect des souches au microscope électronique à transmission	33
2 Extraction des acides gras	34
2.1 Extraction des acides gras totaux	34
2.2 Extraction des acides gras membranaires	36

2.3	Séparation des différentes familles d'acides gras par chromatographie en couche mince (TLC).	37
2.4	Programme utilisé pour la chromatographie en phase gazeuse	38
3	Extraction des lipopolysaccharides (LPS) des cellules GMR et GMS	41
4	Mise en évidence de la présence d'un ou de plusieurs enzymes dégradant les parabens	42
4.1	Préparation du milieu de culture	42
4.2	Mise en évidence de l'activité enzymatique ...	42
4.3	Préparation d'une solution concentrée d'enzymes	43
4.4	Mise au point d'un test colorimétrique mesurant l'activité estérasique	46
4.5	Enzymes intra- ou extracellulaires? Présentes chez toutes les souches?	48
4.6	Inductibilité de l'enzyme	49
4.7	Détermination des conditions optimales permettant l'adsorption de ou des enzymes sur des résines pour HPLC	50
4.7.1	Détermination à l'aide de mini-colonnes	50
4.7.2	Détermination des conditions optimales d'adsorption à l'aide de mini-colonnes échangeuses d'ions commerciales (Sep-Pak)	52
4.8	Essais de purification de l'enzyme dégradant les parabens	53
4.8.1	Essais préliminaires de purification	53
4.8.2	Essai de purification de l'enzyme par HPLC ...	54
4.9	Substances pouvant améliorer l'activité enzymatique	55
5	Détection de la présence d'un plasmide dans les différentes souches	56
5.1	Digestion des plasmides par les enzymes de restriction BamH1 et EcoR1	58
5.2	Séparation des fragments d'ADN plasmidique ainsi que des plasmides non digérés par électrophorèse sur un gel d'agarose	58
	Résultats	59
1	Caractérisation des différentes souches	60
1.1	Identification des différents isolats bactériens	60
1.2	Détermination de la température optimale de croissance	61
1.3	Courbes de croissance des différentes souches .	70
1.4	Courbes de croissance des différentes souches en TSB supplémenté en propyl parabens à différentes concentrations	74
1.5	Courbes de croissance des différentes souches en TSB supplémenté avec différentes concentrations de méthyl parabens	79
1.6	Importance de la taille de l'inoculum sur la croissance en milieu TSB supplémenté avec des parabens aux concentrations utilisées dans le supplément minéral	82

1.7	Croissance des différentes souches en milieu minimal Davis contenant les sels minéraux retrouvés dans le supplément minéral	85
1.8	Étude des différentes souches en microscopie électronique à transmission (MET)	86
1.9	Résistance aux antibiotiques	89
2	Composition en acides gras des souches GMR et GMS	96
2.1	Composition en acides gras totaux des cellules GMR et GMS	97
2.2	Différences entre les acides gras saturés totaux et les acides gras insaturés totaux pour les cellules L et R	97
2.3	Répartition des différentes familles de lipides totaux contenus dans les cellules L et R	102
2.4	Répartition des acides gras dans les différentes familles lipidiques des cellules L	102
2.5	Répartition des acides gras dans les différentes familles lipidiques des cellules R	108
2.6	Répartition des acides gras saturés et des acides gras insaturés dans les familles lipidiques des cellules L et R	112
2.7	Répartition des acides gras saturés et insaturés dans les lipides totaux membranaires des cellules L et R	115
2.8	Composition des membranes cellulaires, des cellules L et R, en acides gras	115
3	Purification des lipopolysaccharides des souches GMR et GMS	120
4	Activité estérasique	120
4.1	Mise en évidence du ou des enzymes dégradant les parabens sur les géloses TSA contenant du Propyl parabens précipité	120
4.2	Préparation d'une solution concentrée d'enzymes	120
4.3	Mesure de l'activité estérasique par un test colorimétrique et détermination des limites de détection	120
4.4	Enzymes intra ou extracellulaires? Produits par toutes les souches?	124
4.5	Inductibilité enzymatique	127
4.6	Conditions optimales pour l'absorption des enzymes sur des résines échangeuses d'ions	132
4.7	Conditions d'élution des enzymes	132
5	Détection de la présence d'un plasmide chez les souches d' <i>Enterobacter</i>	133
	Discussion	136
1	Caractérisation des différentes souches	137
1.1	Température optimale	137
1.2	Courbes de croissance	138
1.3	Antibiogramme	139

2	Composition en lipides et acides gras des souches GMR et GMS	140
2.1	Composition en lipides totaux	140
2.2	Composition en acides gras totaux et membranai- res	140
3	Composition en LPS des parois cellulaires des souches GMR et GMS	141
4	Enzyme dégradant les parabens	144
5	Présence de plasmides de résistance	146
	Conclusion	148
	Annexe	152
	Remerciements	153
	Bibliographie	155

Liste des tableaux

Tableau I	:	Résistance des souches G, GM, GMR, GMS, E et EM vis-à-vis différents antibiotiques d'usage médical. (Antibiogramme)	94
Tableau II	:	Pourcentage des acides gras contenus dans les lipides totaux des cellules L (GMR) et R (GMS)	98
Tableau III	:	Pourcentage des acides gras saturés par rapport aux acides gras insaturés contenus dans les lipides totaux des cellules L (GMR) et R (GMS)	100
Tableau IV	:	Pourcentage des différentes familles de lipides totaux contenues dans les cellules L (GMR) et R (GMS)	103
Tableau V	:	Pourcentage des acides gras contenus dans les différents groupes de lipides totaux des cellules L (GMR)	105
Tableau VI	:	Pourcentage des acides gras contenus dans les différentes familles de lipides totaux des cellules R (GMS)	109
Tableau VII	:	Pourcentage des acides gras saturés et insaturés contenus dans les différents groupes de lipides totaux des cellules L (GMR) et R (GMS)	113
Tableau VIII	:	Pourcentage des acides gras saturés par rapport aux acides gras insaturés contenus dans les lipides membranaires des cellules L (GMR) et R (GMS)	116
Tableau IX	:	Pourcentage des acides gras contenus dans les lipides membranaires des cellules L (GMR) et R (GMS)	118
Tableau X	:	Détermination de l'activité estérasique intracellulaire versus extracellulaire produite par les différentes souches en milieu Davis et Davis avec parabens	128
Tableau XI	:	Croissance de la souche EM lors de plusieurs passages en milieu Davis et Davis avec deux concentrations de parabens. Densité optique en fonction du temps	130

Tableau XII :	Activités estérasiques produites par la souche EM après deux passages en milieu Davis et Davis avec deux concentrations de parabens. Lysat cellulaire par rapport à un surnageant de culture	130
---------------	--	-----

Liste des figures

Figure 1	: Les esters de l'acide para-hydroxy-benzoïque	9
Figure 2	: Les principaux phospholipides retrouvés dans les cellules bactériennes	15
Figure 2	: (Suite)	17
Figure 3	: Représentation schématique d'une molécule de lipopolysaccharide (LPS)	22
Figure 4	: Localisation, des phospholipides standards retrouvés dans les cellules bactériennes, sur une plaque chromatographique sur couche mince (TLC)	39
Figure 5	: Représentation schématique du fonctionnement du système de filtration Pellicon.	44
Figure 6	: Détermination de la température optimale de croissance de <i>Enterobacter cloacae</i> isolé à partir du supplément minéral (EM), en milieu TSB et TSB avec un mélange de méthyl et propyl parabens, à 22, 30 et 37°C	62
Figure 7	: Détermination de la température optimale de croissance de <i>Enterobacter cloacae</i> LSPQ 3022 (E), en milieu TSB et TSB avec un mélange de méthyl et propyl parabens, à 22, 30 et 37°C	62
Figure 8	: Détermination de la température optimale de croissance de <i>Enterobacter gergoviae</i> résistant (GMR) isolé à partir du supplément minéral, en milieu TSB et TSB avec un mélange de méthyl et propyl parabens, à 22, 30 et 37°C	65
Figure 9	: Détermination de la température optimale de croissance de <i>Enterobacter gergoviae</i> sensible (GMS) isolé à partir du supplément minéral, en milieu TSB et TSB avec un mélange de méthyl et propyl parabens, à 22, 30 et 37°C	65
Figure 10	: Détermination de la température optimale de croissance de <i>Enterobacter gergoviae</i> LSPQ 3347 (G), en milieu TSB et TSB avec un mélange de méthyl et propyl parabens, à 22, 30 et 37°C	68

- Figure 11 : Courbes de croissance des différentes souches en milieu TSB et TSB avec un mélange de méthyl et propyl parabens, incubées à 30°C. Ufc/ml en fonction du temps 71
- Figure 12 : Courbes de croissance des différentes souches en milieu TSB et TSB avec un mélange de méthyl et propyl parabens, incubées à 30°C. Densité optique en fonction du temps 71
- Figure 13 : Courbes de croissance de *Enterobacter cloacae* LSPQ 3022 (E), en milieu TSB supplémenté avec différentes concentrations de propyl parabens. Densité optique en fonction du temps 75
- Figure 14 : Courbes de croissance de *Enterobacter gergoviae* LSPQ 3347 (G), en milieu TSB supplémenté avec différentes concentrations de propyl parabens. Densité optique en fonction du temps 75
- Figure 15 : Courbes de croissance de *Enterobacter gergoviae* isolé à partir du supplément minéral (GM), en milieu TSB additionné avec différentes concentrations de propyl parabens. Densité optique en fonction du temps 77
- Figure 16 : Courbes de croissance de *Enterobacter gergoviae* résistant (GMR), isolé à partir du supplément minéral, en milieu TSB additionné avec différentes concentrations de propyl parabens. Densité optique en fonction du temps 77
- Figure 17 : Courbes de croissance de *Enterobacter gergoviae* résistant (GMR), isolé à partir du supplément minéral, en milieu TSB auquel il fut ajouté différentes concentrations de méthyl parabens. Densité optique en fonction du temps 80
- Figure 18 : Importance de la taille de l'inoculum bactérien pour la croissance d'*Enterobacter gergoviae* LSPQ 3347 (G), en milieu TSB supplémenté en méthyl et propyl parabens. Densité optique en fonction du temps 83

- Figure 19 : Importance de la taille de l'inoculum bactérien pour la croissance d'*Enterobacter gergoviae* résistant (GMR), isolé à partir du supplément minéral, en milieu TSB additionné en méthyl et propyl parabens. Densité optique en fonction du temps 83
- Figure 20 : Courbes de croissance de *Enterobacter cloacae* LSPQ 3022 (E) et de *Enterobacter cloacae* isolé à partir du supplément minéral (EM), en milieu minimal Davis et Davis additionné en sels minéraux. Densité optique en fonction du temps 87
- Figure 21 : Courbes de croissance de *Enterobacter gergoviae* LSPQ 3347 et *Enterobacter gergoviae* sensible (GMS) et résistant (GMR) isolés à partir du supplément minéral, en milieu minimal Davis et Davis additionné en sels minéraux. Densité optique en fonction du temps 87
- Figure 22 : Apparence des souches d'*Enterobacter gergoviae* observées au microscope électronique à transmission 90
- Figure 23 : Apparence des souches d'*Enterobacter cloacae* observées au microscope électronique à transmission 92
- Figure 24 : Histogramme représentant le pourcentage des acides gras contenus dans les lipides totaux des cellules L et R 98
- Figure 25 : Histogramme représentant le pourcentage des acides gras saturés par rapport aux acides gras insaturés contenus dans les lipides totaux des cellules L et R 100
- Figure 26 : Histogramme représentant le pourcentage des différentes familles de lipides totaux contenues dans les cellules L et R 103
- Figure 27 : Histogramme représentant le pourcentage des acides gras contenus dans les différents groupes de lipides totaux des cellules L 105
- Figure 28 : Histogramme représentant le pourcentage des acides gras contenus dans les différentes familles de lipides totaux des cellules R 109

- Figure 29 : Histogramme représentant le pourcentage des acides gras saturés et insaturés contenus dans les différents groupes de lipides totaux des cellules L et R 113
- Figure 30 : Histogramme représentant le pourcentage des acides gras saturés par rapport aux acides gras insaturés contenus dans les lipides membranaires des cellules L et R. 116
- Figure 31 : Histogramme représentant le pourcentage des acides gras contenus dans les lipides membranaires des cellules L et R 118
- Figure 32 : Hydrolyse des cristaux de propyl parabens précipités par un filtrat de culture de EM versus le même filtrat porté à ébullition 122
- Figure 33 : Action des filtrats de culture des différentes souches vis-à-vis des cristaux de propyl parabens précipités 122
- Figure 34 : Courbe déterminant la limite de détection du test colorimétrique permettant de mesurer l'activité estérasique 125
- Figure 35 : Détection d'un plasmide de haut poids moléculaire dans la souche EM 134

SOMMAIRE.

Des souches d'*Enterobacter gergoviae* et *cloacae* furent isolées à partir d'un supplément minéral (vendu commercialement) stabilisé par des esters de l'acide para-hydroxybenzoïque (parabens). Ces souches possèdent un ou des mécanismes de résistance vis-à-vis des parabens leur permettant de se multiplier et d'entraîner la dénaturation du produit contaminé. Le but du travail fut de tenter d'élucider le ou les mécanismes de résistance face aux parabens pour permettre la mise au point d'un système de conservation efficace.

Pour ce faire, les conditions optimales de croissance des différentes souches furent déterminées. Une étude de la résistance face à différents antibiotiques et un examen en microscopie électronique furent également effectuées. Dans un deuxième temps les acides gras totaux et membranaires des souches GMR (résistant) et GMS (sensible) furent extraits et comparés. D'autre part, un enzyme de type estérase produit principalement par la souche EM (résistant) fut mis en évidence. Finalement une tentative fut effectuée pour extraire les lipopolysaccharides des souches GMR et GMS.

En ce qui concerne la résistance face aux antibiotiques, une corrélation semble exister entre la résistance aux parabens et à l'ampicilline. L'examen en microscopie électronique démontra la présence d'un espace périplasmique caractéristique des bâtonnets Gram négatifs ainsi qu'une différence significative de l'aspect des

parois des souches GMR (lisse) et GMS (rugueux).

L'étude des acides gras totaux et membranaires de ces deux souches démontra que la souche lisse possédait 35% de plus d'acides gras saturés par rapport à la souche rugueuse. Cette forte concentration en acides gras saturés rend la membrane cellulaire moins perméable aux petites molécules hydrophobes telles les parabens et augmente donc la résistance de la bactérie face à l'agent de conservation.

L'extraction des lipopolysaccharides ne donna pas les résultats escomptés à cause des faiblesses de la méthode utilisée.

L'enzyme de type estérase produit par la souche *Enterobacter cloacae* (EM) semble posséder la capacité de transformer les parabens et de permettre leur utilisation comme source de carbone par les bactéries. Des travaux préliminaires de purification et de caractérisation furent entrepris mais ne purent être achevés à cause des contraintes de temps.

Finalement, un plasmide de haut poids moléculaire fut mis en évidence chez la souche EM. Ce plasmide, seulement présent chez la souche EM, pourrait jouer un rôle dans la résistance face aux parabens en augmentant la production estérasique chez cette souche.

Deux mécanismes de résistance furent donc mis en évidence chez les souches d'*Enterobacter*. La connaissance de ces mécanismes facilitera le choix ou la mise au point

d'un système de conservation efficace qui pourra stabiliser à long terme le supplément minéral.

INTRODUCTION.

Les esters de l'acide para-hydroxybenzoïque, plus communément appelés parabens, sont, depuis plusieurs décennies, reconnus pour leur pouvoir bactériostatique. Ces substances sont couramment utilisées dans l'industrie alimentaire (stabilisation de jus de fruits, bière, suppléments minéraux etc.), ainsi que dans les industries cosmétique et pharmaceutique.

Les parabens furent découverts en 1924 par Sabalitschka et reconnus officiellement comme agents de conservation en 1934 (Haag et al. 1984). Le mode d'action des parabens n'est pas encore totalement connu mais il semble que ceux-ci agissent au niveau des membranes cellulaires. Ils semblent également interférer avec la synthèse protéique et la répllication de l'ADN et de l'ARN (Nes et al. 1983).

La résistance bactérienne vis-à-vis des parabens fut surtout rapportée durant les dernières années. Cette résistance, observée surtout dans l'industrie alimentaire, entraîna des pertes économiques élevées.

O'Neil et Mead (1981) démontrèrent que *Escherichia coli* s'adapte facilement au propyl parabens ce qui n'est pas le cas pour le méthyl parabens. Ce type de résistance n'est pas encore bien compris. Plusieurs mécanismes de résistance aux parabens furent proposés. Par exemple,

Zedan et Serry (1984) rapportèrent que *Pseudomonas aeruginosa* pouvait croître dans un milieu ayant des parabens comme seule source de carbone. Ils démontrèrent que les parabens étaient hydrolysés en acide parahydroxybenzoïque, puis ce dernier était utilisé comme source de carbone par le microorganisme. D'autre part, les lipopolysaccharides, les lipides et les acides gras contenus dans la paroi et la membrane bactérienne pourraient jouer un rôle important dans la résistance bactérienne en modifiant la perméabilité cellulaire (Keweloh et al. 1991, Komagata et al. 1987, Nikaido et al. 1985, Russell 1989, Russell et al. 1985, Tsuchido et al. 1988). Par ailleurs, un plasmide pourrait être à l'origine des différents types de résistance aux parabens, comme ce fut signalé pour d'autres substances antimicrobiennes (Russell 1985). En effet, les travaux de Russell démontrent que la résistance aux antibiotiques et aux agents antibactériens est reliée à la présence de plasmides spécifiques (Russell 1985).

Les microorganismes appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* sont des contaminants d'origine entérique souvent rencontrés dans l'industrie alimentaire. Récemment des souches de *Enterobacter gergoviae* et *Enterobacter cloacae* furent isolées à partir d'un supplément minéral fabriqué par une importante société. Ce produit était stabilisé avec du propyl et du méthyl

parabens :

L'objectif de ce travail est de comprendre le ou les mécanismes impliqués dans la résistance aux parabens chez les souches d'*Enterobacter* contaminant la supplémentation minérale en vue de développer un système de stabilisation pleinement efficace. Pour ce faire, les souches bactériennes isolées furent caractérisées et leurs conditions optimales de croissance étudiées. L'apparence morphologique des différentes souches fut d'autre part observée en microscopie optique et en microscopie électronique à transmission. Puis, les lipopolysaccharides contenus dans la paroi cellulaire, ainsi que les lipides et les acides gras totaux de *Enterobacter gergoviae* furent extraits, analysés et comparés. Dans un deuxième temps, des recherches furent entreprises pour déterminer si la résistance bactérienne était due à la présence d'un enzyme de type estérase. Les travaux de caractérisation et de purification de l'enzyme furent amorcés. Finalement, une extraction plasmidique eut lieu sur toutes les souches pour déterminer si un plasmide pouvait être impliqué dans la résistance aux parabens.

REVUE DE LITTÉRATURE.

1. LES MÉTHODES DE STABILISATION DES PRODUITS ALIMENTAIRES

Il existe deux types de méthodes de conservation: les méthodes physiques et les méthodes chimiques.

Les méthodes physiques impliquent la stérilisation, la congélation, la modification du pH, l'atmosphère contrôlée, l'irradiation, l'activité spécifique de l'eau (A_w), etc.

Les méthodes chimiques impliquent l'ajout d'agents de conservation qui vont stabiliser les produits en interférant avec le métabolisme des microorganismes. Ces agents, peuvent être de diverses origines. Signalons par exemple la vitamine C (empêche l'oxidation du produit); des acides organiques tels que l'acide acétique, l'acide benzoïque, l'acide propionique ou l'acide sorbique; des sels etc.

De plus en plus, les méthodes de conservation sont utilisées en combinaison pour optimiser les résultats. Des méthodes physiques et chimiques sont souvent combinées et il n'est pas rare qu'un produit contienne plusieurs agents de conservation chimiques (Roberts 1989, Wagner *et al.* 1989).

1.1 LES PARABENS

Plusieurs catégories de produits fabriqués à grande échelle ne sauraient exister sans l'utilisation d'agents de conservation ou de stabilisation.

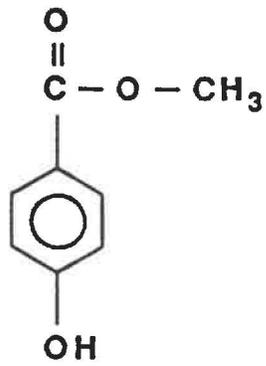
Les esters de l'acide para-hydroxybenzoïque, communément appelés parabens, furent initialement reconnus pour leurs propriétés fongistatiques. Ils furent depuis largement utilisés dans l'industrie alimentaire, pour stabiliser les produits tels les jus de fruits, la bière etc. Actuellement ils sont surtout utilisés dans les industries cosmétique (crèmes, savons, shampoing) et pharmaceutique.

Il existe quatre esters de l'acide para-hydroxybenzoïque (le méthyl, éthyl, propyl et butyl) (Figure 1) (Haag et al. 1984). La combinaison la plus fréquemment utilisée renferme le méthyl et le propyl parabens.

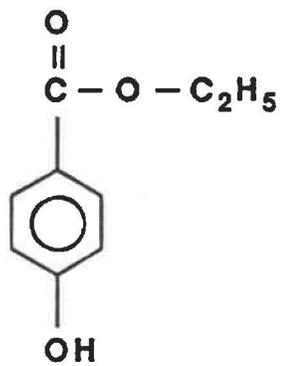
Au moment de leur découverte les parabens furent utilisés pour combattre les moisissures et les levures contre lesquelles ils sont très efficaces. Progressivement, leur utilisation se diversifia et ils furent confrontés aux bactéries. Les parabens sont relativement efficaces contre les bactéries Gram positives;

Figure 1:

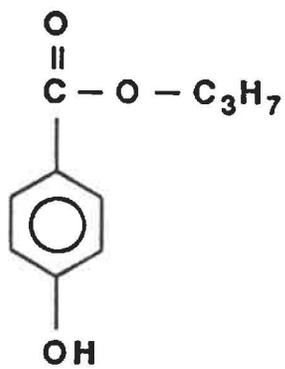
Les esters de l'acide para-hydroxybenzoïque.



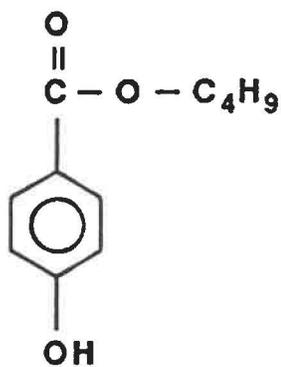
Méthyl



Éthyl



Propyl



Butyl

cependant leur pouvoir diminue lorsqu'ils sont en présence de bactéries Gram négatives.

Les parabens sont très peu solubles dans l'eau. Plus la chaîne latérale de l'ester est longue, plus son pouvoir bactériostatique est important, malheureusement, moins l'hydrosolubilité est grande (Haag *et al.* 1984).

La stabilité maximale de ces produits se situe à la valeur acide du pH: soit entre 4 et 5. À ces valeurs de pH peu d'hydrolyse se produit même aux températures voisines de l'ébullition. L'hydrolyse est de plus en plus importante à mesure que le pH augmente.

Les esters de l'acide para-hydroxybenzoïque sont habituellement utilisés en combinaison. C'est-à-dire que plusieurs esters sont incorporés simultanément dans un même produit. Ceci a pour but d'augmenter le pouvoir bactériostatique car les parabens se solubilisent indépendamment les uns des autres. Donc, la concentration en parabens du produit est plus élevée et son pouvoir antibactérien en sera amélioré, l'activité des différents parabens étant additive (Haag *et al.* 1984).

Plusieurs hypothèses sont proposées, toutefois le mode d'action des parabens n'est pas encore complètement connu. Les parabens agiraient au niveau de la membrane

cellulaire en inhibant les mécanismes d'absorption de la cellule (Eklund 1980, Tatsugushi et al. 1991). L'entrée des acides aminés et d'autres petites molécules serait considérablement ralentie entraînant la mort de la cellule. Une autre hypothèse soutient que les parabens détruiraient la membrane cellulaire, dénatureraient les protéines contenues dans celle-ci et interféreraient avec la replication de l'ADN et de l'ARN (Nes et al. 1983).

2. MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX AGENTS ANTIBACTÉRIENS.

De plus en plus de cas de résistance aux agents antibactériens sont rapportés dans la littérature. Les microorganismes semblent devenir de plus en plus résistants vis-à-vis plusieurs types de substances antimicrobiennes, tels les antibiotiques, les ions métalliques, les agents de conservation, etc. (Russell et al. 1988).

Ces multiples cas de résistance posent des problèmes importants tant dans le domaine médical (résistance aux antibiotiques) que dans l'industrie alimentaire ou pharmaceutique. Ces dernières doivent faire face à la perte de lots entiers de produits altérés par les microorganismes, entraînant des pertes économiques élevées. D'autre part, les produits contaminés représentent une menace pour la santé des consommateurs comme le démontrent

les statistiques gouvernementales.

Malgré des normes de plus en plus sévères et un contrôle de la qualité omniprésent, des produits contaminés, par des microorganismes résistants aux agents de conservation, se retrouvent parfois sur le marché, comme en font preuve les rapports trimestriels de Santé Bien-Être Canada.

2.1 RÉSISTANCE INTRINSÈQUE

La résistance intrinsèque est définie comme étant une caractéristique naturellement retrouvée chez un microorganisme donné. C'est un caractère toujours retrouvé dans une espèce bactérienne donnée car ceci fait partie du génotype de la cellule.

2.1.1 Composition en acides gras des lipides cellulaires

Les acides gras contenus dans les lipides cellulaires jouent un rôle primordial dans la fluidité membranaire. En effet, les acides gras sont composés de chaînes de carbones plus ou moins longues, saturées ou insaturées. Ces chaînes de carbones interagissent entre elles, et, selon leur longueur et/ou leur degré d'insaturation, vont influencer, moduler en quelque sorte, la fluidité de la membrane

cellulaire (Komagata *et al.* 1987, Nikaido *et al.* 1985).

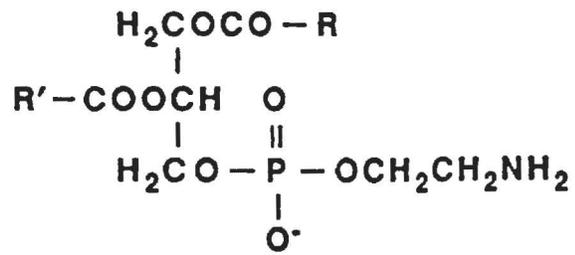
En effet, plus les chaînes de carbone contenues dans les membranes cellulaires sont longues et plus les membranes seront fluides. Il en est de même pour le degré d'insaturation de ces chaînes. Plus il y a de liens insaturés et plus la fluidité membranaire augmente. Le contraire est également vrai, c'est-à-dire que plus les chaînes sont courtes ou saturées et plus les membranes seront rigides.

Plus une membrane est fluide et plus elle sera perméable aux petites molécules hydrophobes telles que les parabens. La réciproque est vraie.

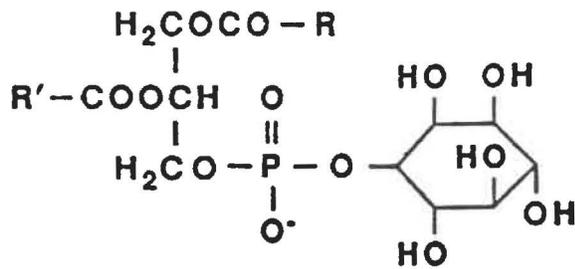
Les membranes cellulaires sont composées d'un pourcentage important d'acides gras. Des groupements lipidiques et des protéines y sont également retrouvés. Les groupements lipidiques, auxquels sont rattachés les acides gras, jouent également un rôle dans la fluidité membranaire, cependant ce rôle n'est pas encore bien compris. Chez les bactéries Gram négatif il existe principalement six groupes lipidiques: le phosphatidyl inositol, la phosphatidyl choline, la phosphatidyl éthanolamine, le phosphatidyl glycérol, la cardiolipine et les lipides neutres (Figure 2) (Komagata *et al.* 1987).

Figure 2:

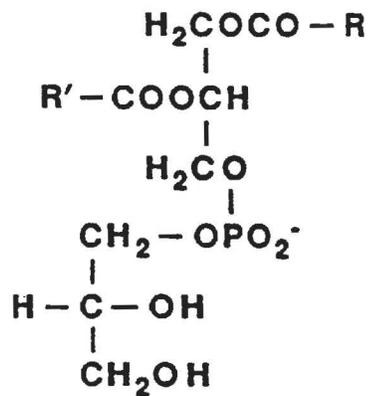
Les principaux phospholipides retrouvés dans les
cellules bactériennes.



Phosphatidyléthanolamine



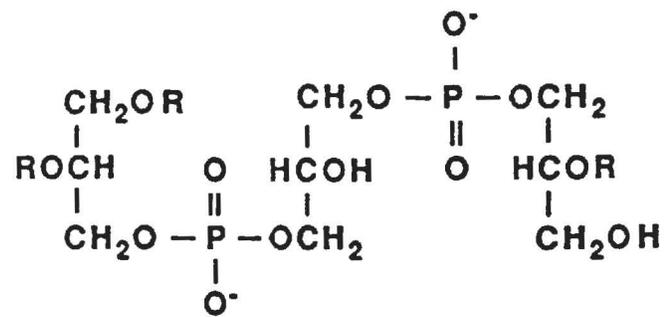
Phosphatidylinositol



Phosphatidylglycérol

Figure 2 (suite):

Les principaux phospholipides retrouvés dans les
cellules bactériennes.



R= groupement acyl gras

Cardiolipin (CL)

Les bactéries possédant des membranes rigides seront moins vulnérables aux parabens car ceux-ci ne pourront pas pénétrer dans la cellule.

La fluidité membranaire est influencée, entre autre, par la température. En effet, plus la température ambiante augmente, plus les membranes auront tendance à devenir fluides et plus leur perméabilité deviendra importante. Inversement, si la température baisse, les membranes deviendront plus rigides et la perméabilité ira en diminuant (Nikaido *et al.* 1985).

Pour compenser ces effets, les bactéries auront tendance à modifier la composition en acides gras des membranes. Pour ce faire, des modifications seront apportées dans la longueur des chaînes de carbones ou dans leur degré d'insaturation. Les modifications au niveau des acides gras sont facilement réalisables. Des modifications pourraient être également apportées à la composition en groupements lipidiques cependant ces changements sont moins courants. En effet, il est métaboliquement moins difficile de modifier les chaînes de carbones alors que la synthèse de groupements lipidiques nouveaux et différents nécessite la présence de systèmes enzymatiques supplémentaires (Keweloh *et al.* 1991, Nikaido *et al.* 1985).

Donc, lorsque des changements sont nécessaires pour

stabiliser la fluidité membranaire, la composition en acides gras sera altérée sans vraiment modifier la composition en groupements lipidiques.

Les bactéries modifient la composition en acides gras membranaires selon les besoins pour conserver leur intégrité face aux changements des conditions de culture.

L'intégrité membranaire peut également être modifiée par des agents chélateurs, des phénols ou des antibiotiques (Keweloh *et al.* 1991, Moir *et al.* 1992).

Donc, un des types de résistance intrinsèque repose sur la composition en acides gras membranaires, influençant directement la perméabilité cellulaire.

2.1.2 Composition en lipopolysaccharides des parois cellulaires

Les lipopolysaccharides (LPS), composant la structure des parois cellulaires des bâtonnets Gram négatifs, confèrent aux cellules leur aspect lisse. Les LPS possèdent de multiples fonctions. Entre autre, ils limitent la perméabilité cellulaire à l'égard des petites molécules hydrophobes en empêchant celles-ci d'atteindre la paroi. Ne pouvant pas atteindre la paroi, les parabens ne pourront donc pas toucher leur cible que constitue

la membrane cellulaire. De plus, ils protègent la bactérie contre certains antibiotiques lipophiles et contre la phagocytose ou la lyse. Ils jouent également un rôle important dans l'antigénicité de la cellule. Cependant, vu leur localisation, ils sont aussi souvent utilisés comme récepteurs par les bactériophages et les bactériocines (colicines) (Komagata et al. 1987, Mayer et al. 1985, Russell 1989, Russell et al. 1985).

Les LPS sont composés de trois sous-unités distinctes (Figure 3) (Mayer et al. 1985). La première, appelée chaîne O, est composée d'unités successives d'oligosaccharides. La séquence des oligosaccharides ainsi que leur diversité sont spécifiques à chaque espèce et sous-espèce et sont largement utilisées pour la taxonomie (exemple: *Salmonella*). Ces oligosaccharides confèrent le pouvoir antigénique à la bactérie.

La seconde sous-unité est dénommée noyau R. Ce noyau est également constitué d'oligosaccharides et peut être plus ou moins complexe dépendant de l'espèce étudiée. Un sucre, le 2-keto-3-deoxy-D-mannoctonate (KDO) semble commun à toutes les souches étudiées.

Finalement, la troisième sous-unité est le lipide A. Ce lipide, situé dans la paroi cellulaire sert de point d'attache au reste de la molécule. C'est l'élément qui

Figure 3:

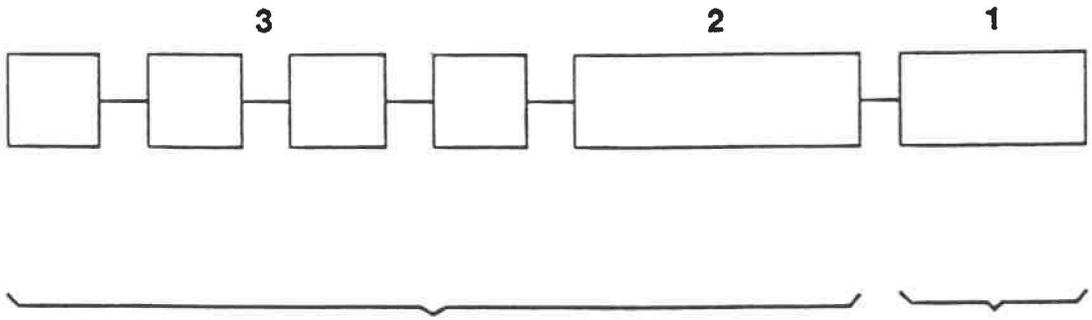
Représentation schématique d'une molécule de lipopolysaccharide (LPS).

Légende:

1 : Lipide A

2 : Noyau R

3 : Chaîne O



varie le moins d'une souche à l'autre.

Beaucoup de mutations, affectant les deux premières sous-unités, furent étudiées. Ainsi, il existe des bactéries qui synthétisent des chaînes O incomplètes, plus ou moins longues. Des mutations peuvent aussi apparaître au niveau du noyau R. Celui-ci peut être tronqué et donc différent de celui de la souche sauvage. Cependant, très peu de mutations furent répertoriées sur le lipide A (Mayer et al. 1985, Russell 1989, Russell et al. 1985).

Une souche sauvage, Gram négatif, possédant une chaîne O d'une certaine longueur aura un aspect lisse. Cependant, une souche mutante ne synthétisant pas de chaîne O présentera un aspect rugueux. Entre ces deux extrêmes, tout un éventail de nuances est retrouvé. Ainsi il existe des souches semi-rugueuses synthétisant des chaînes O partielles (Russell et al. 1985).

Il en est de même pour le noyau R. Les cellules lisses, possédant des LPS entiers, sont donc moins perméables aux petites molécules hydrophobes. Cependant les mutants, ayant un aspect plus ou moins rugueux, ne possédant pas de LPS complets, seront plus exposés aux éléments du milieu tels les antibiotiques, le parabens etc... (Russell et al. 1985).

Il existe donc une très grande variété de LPS qui selon leur structure, vont influencer le degré de perméabilité cellulaire. Une cellule lisse sera donc beaucoup plus résistante par rapport à une cellule rugueuse face aux agents antibactériens.

D'autre part, il faut ajouter que la paroi cellulaire constitue un moyen de résistance intrinsèque. En effet, elle agit comme une sorte de bouclier, protégeant la cellule contre les agents antibactériens. Cette paroi douée d'une perméabilité très sélective limite donc l'accès à beaucoup de petites molécules.

2.1.3 Synthèse d'enzymes hydrolysant les agents antibactériens.

Un troisième système de résistance aux agents antibactériens est la synthèse d'enzymes hydrolytiques plus ou moins spécifiques à ces produits. De tels enzymes sont couramment mis en évidence dans des cas de résistance aux antibiotiques (Russell et al. 1988).

Le phénomène a été également observé chez *Pseudomonas aeruginosa* (Zedan et al. 1984). Cette espèce bactérienne synthétise un ou des enzymes intra ou extra cellulaires hydrolysant le propyl-paraben. Celui-ci est transformé en acide para-hydroxybenzoïque puis en cathécol

ou en protocatéchol. Ces dernières molécules pouvant être utilisées comme source de carbone pour la croissance bactérienne.

Ce mode de résistance est très efficace car non seulement la molécule de parabens ne peut agir mais en plus elle sert de source de carbone à la bactérie!

2.2 RÉSISTANCE ACQUISE

La résistance acquise est définie comme étant l'ajout de caractères nouveaux au génotype de la cellule. Cet ajout peut se faire lors de l'acquisition d'un plasmide ou lors d'une mutation.

2.2.1 Résistance plasmidique

Un plasmide, acquis lors d'une transformation, peut apporter des caractères nouveaux rendant une cellule résistante à certains agents antibactériens. Ce phénomène est fréquemment signalé dans le cas de résistance aux antibiotiques (Russell 1985, Russell et al. 1988).

Un plasmide peut entre autre apporter l'information génétique nécessaire à la synthèse d'un enzyme hydrolysant l'agent antibactérien. Il peut

également induire des transformations dans la composition en acides gras membranaires ou des LPS situés sur la paroi cellulaire.

2.2.2 Résistance due à une mutation

Une mutation est un phénomène relativement rare dont la fréquence naturelle est de 1 par 10^5 à 10^7 . Une telle mutation peut également induire des modifications dans le contenu en acides gras ou en LPS des cellules et provoquer ainsi une résistance accrue face à certains produits antibactériens.

À long terme la bactérie résistante va se multiplier et former toute une population de cellules résistantes (sélection naturelle). Cependant ce phénomène est assez rarement rencontré dans l'industrie alimentaire ou cosmétique car pour observer une mutation il faudrait une contamination assez importante du produit et des conditions permettant une croissance abondante. Étant donné que les systèmes de contrôle de la qualité sont de plus en plus sévères, un tel degré de contamination est facilement repérable. Le produit altéré est donc éliminé à la source.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1. CARACTÉRISATION DES DIFFÉRENTES SOUCHES

1.1 Origine des souches utilisées

Les souches *Enterobacter gergoviae* (GM) et *Enterobacter cloacae* (EM) furent isolées par le Dr. Gilles Paquette à partir du supplément minéral contaminé. La souche GM fut par la suite scindée en deux autres souches soient GMR et GMS, respectivement résistante et sensible aux parabens. L'identification de ces souches fut confirmée à l'aide de galeries A.P.I. au début du présent travail. D'autre part, les souches *Enterobacter gergoviae* (G) et *Enterobacter cloacae* (E) provenaient du Laboratoire de Santé Publique du Québec (LSPQ) et correspondaient aux souches LSPQ 3347 et LSPQ 3022.

Pour faciliter leur conservation, les souches furent lyophilisées et conservées à -20°C .

1.2 Détermination de la température optimale de croissance

Les souches lyophilisées furent reconstituées, puis striées sur des géloses TSA (Trypticase Soy Agar, Difco) pour en vérifier la pureté et obtenir des cultures jeunes. Les milieux TSB (Trypticase Soy Broth, Difco) et TSB supplémenté en parabens (0,18 g/l de propyl et 1,73 g/l de méthyl parabens) ont été inoculés avec les cultures jeunes

(24h) de façon à obtenir une densité optique variant de 0,02 à 0,05 à une longueur d'onde de 650 nm sur un spectrophotomètre Coleman Junior II A (Spectrophotomètre à absorbance linéaire) Modèle 6/20A. Les tubes furent placés à trois températures soit 22, 30 et 37⁰C et des lectures de densité optique ont été prises à des intervalles de temps réguliers.

1.3 Courbes de croissance

Des milieux TSB et TSB-parabens furentensemencés avec des cultures jeunes de façon à obtenir une densité optique variant de 0,02 à 0,05 à une longueur d'onde de 650 nm. Les tubes furent par la suite incubés à 30⁰C. À des intervalles de temps réguliers, des lectures de densité optique et des dénombrements sur pétris furent effectués. Pour les dénombrements, une série de dilutions décimales, fut d'abord effectuée. Un volume de 100 µl de chacune des dilutions (10^{-1} à 10^{-9}) fut étalé sur des géloses TSA pour déterminer le nombre d'unités formant des colonies (UFC) par ml de culture. Après incubation à 30⁰, les pétris contenant entre 30 et 300 colonies furent pris en compte. L'expérience fut effectuée en duplicata.

1.4 Courbes de croissance en milieu TSB supplémenté en propyl parabens à différentes concentrations

Le propyl parabens en poudre est ajouté au milieu TSB à sa sortie de l'autoclave. Les concentrations en propyl parabens utilisées furent les suivantes: 0,25 g/l, 0,18 g/l (concentration utilisée dans le supplément minéral) et 0,15 g/l. Les milieux inoculés comme précédemment, furent incubés à la température de 30⁰C. À des intervalles de temps réguliers, des lectures de densités optiques furent prises à 650 nm.

1.5 Courbes de croissance en milieu TSB supplémenté en méthyl parabens à différentes concentrations

La technique utilisée fut la même qu'en 1.3. Les concentrations de méthyl parabens testées furent les suivantes: 2,5 g/l, 1,73 g/l (concentration utilisée dans le supplément minéral) et 1,5 g/l.

1.6 Importance de l'inoculum nécessaire pour la croissance bactérienne en milieu TSB supplémenté en parabens

Les concentrations de parabens utilisées, retrouvées dans le supplément minéral, furent utilisées soient respectivement 1,73 g/l et 0,18 g/l de méthyl et de propyl parabens. Des tubes, contenant du milieu TSB, supplémenté

en parabens, furent inoculés avec 0,1 ml de dilutions de cultures jeunes de souches G et GMR allant de 10^{-1} à 10^{-9} . Un volume de 0,1 ml de ces mêmes dilutions, étalé sur des géloses TSA, servi à déterminer le compte initial en ufc/ml. Les géloses contenant entre 30 et 300 colonies furent dénombrées. Des lectures de densité optique, prises à des intervalles de temps réguliers, sur les tubes incubés à 30°C , permirent de suivre la croissance des différentes cultures bactériennes (Gilliland *et al.* 1992, Gilliland *et al.* 1992).

1.7 Influence des sels minéraux contenus dans le supplément minéral

Pour cette expérience le milieu minimal Davis w/o Dextrose (Difco) additionné de 1% de glucose fut utilisé. Deux séries de tubes, les uns contenant du milieu Davis et les autres contenant du milieu Davis additionné en sels minéraux (glycerophosphate ferreux 0,62 g/l; mono-citrate de potassium 71,3 g/l; glycerophosphate de potassium 75% 0,825 g/l; glycerophosphate de magnésium 8,0 g/l; glycerophosphate de calcium 10,925 g/l; iodide de potassium 0,002 g/l; hydroxide de potassium 1,3 g/l) ont été inoculées avec des bactéries provenant de cultures jeunes (24h TSA). La densité optique initiale était de 0,02 à une longueur d'onde de 650 nm. Les tubes furent incubés à 30°C et des lectures de densité optique effectuées à des

intervalles de temps réguliers permirent de suivre l'évolution de la croissance bactérienne.

1.8 Antibiogramme

Toutes les souches furent testées pour établir leur profil de résistance vis-à-vis différents antibiotiques d'usage médical courant, soient: la penicilline (2 µg), le chloramphénicol (30 µg), la gentamycine (15 µg), l'ampicilline (10 µg), la streptomycine (10 µg), l'érytromycine (15 µg) et la tétracycline (5 µg).

Des géloses Mueller-Hinton (Quélab) (15 cm de diamètre) furent ensemencées avec 0,1 ml de bouillon de culture jeune. Le bouillon fut étalé à l'aide d'une tige en verre recourbée, puis les disques d'antibiotiques placés à la surface des géloses.

Le diamètre des zones d'inhibition de croissance bactérienne est proportionnelle à la susceptibilité des bactéries face à l'antibiotique.

1.9 Aspect des souches au microscope électronique à transmission

Les échantillons furent préparés selon la méthode décrite par Alain et al (1989). Les colonies bactériennes,

prélévées directement du pétri (gélose TSA), subirent une double fixation. La première fixation fut faite à la glutaraldéhyde et la seconde au tétroxyde d'osmium. Le tétroxyde d'osmium colore et fixe les composantes lipidiques cellulaires. Une déshydratation à l'acétone fut ensuite effectuée, puis le spécimen fut enrobé dans une résine d'époxy (SPURR). Des coupes ultra-minces furent effectuées à l'aide d'un ultramicrotome. Une coloration supplémentaire, au citrate de plomb, eut lieu sur les coupes ultra-minces pour en augmenter le contraste. Les préparations furent finalement examinées au microscope électronique à transmission (MET) à différents grossissements avec la collaboration de Robert Alain, Service de microscopie électronique, Centre de Virologie, Institut Armand-Frappier.

2. EXTRACTION DES ACIDES GRAS

2.1 Extraction des acides gras totaux

Les acides gras furent extraits selon la méthode de Blight et Dyer (1959).

Pour ce faire, 0,1 g de cellules lyophilysées a été resuspendu dans 3,2 ml d'une solution d'EDTA (Na₂ EDTA 100 mMol + 8 g de NaOH/100ml). Le NaOH facilite la

solubilisation de l'EDTA. La suspension cellulaire fut passée deux fois à la French Press (4138 kPa) pour briser les cellules. Un volume de 4 ml de chloroforme et 8 ml de méthanol y fut ajouté puis le tout fut vigoureusement agité (Vortex) durant 30 sec. Le tout a été centrifugé 15 min à 2000 x g (centrifugeuse IEC International refrigerated Modèle PR-6) pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant, contenant les lipides dissous, est conservé. Des volumes de 4 ml de chloroforme et de 4 ml de EDTA y sont rajoutés, puis le tout fut fortement agité jusqu'à l'obtention d'une phase homogène. Le mélange a été centrifugé 15 min à 2000 x g pour séparer les phases. La phase chloroformique (inférieure) est conservée et évaporée sous azote. Les lipides furent alors resuspendus dans 2 ml de trifluorure de bore, agités et chauffés au bain-marie à 85°C durant 15 min. Des tubes vissés doivent être préférablement utilisés pour cette étape afin d'éviter l'évaporation du trifluorure de bore. La solution fut refroidie sur la glace, puis 2 ml de EDTA et 4 ml d'éther de pétrole y furent rajoutés. Bien agiter le tout jusqu'à l'obtention d'une phase homogène (≈ 45 sec) (très important). Les acides gras se solubilisent alors dans l'éther de pétrole tandis que les lipides précipitent. Après décantation, la phase supérieure est récupérée et un volume de 4 ml d'éther de pétrole est rajouté au précipité. Le tout est bien mélangé comme précédemment, puis le surnageant est récupéré et ajouté au premier. Cette étape

peut être répétée une troisième fois pour s'assurer que tous les acides gras sont solubilisés. L'éther de pétrole est alors évaporé sous azote. Les acides gras sont récupérés dans 150 μ l de chloroforme auquel un standard interne fut ajouté. Les acides gras sont analysés sur un chromatographe en phase gazeuse (GLC) modèle 5890 A (Hewlett-Packard) comportant une colonne capillaire de type phényl-méthyl-silicone de 25 mètres de longueur et de 0,2 mm de diamètre interne. L'azote sert de gaz vecteur à un débit de 20 ml/min. Le chromatographe est muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID).

2.2 Extraction des acides gras membranaires

Un poids de 0,1 g de cellules lyophilysées fut resuspendu dans 5 ml de solution de EDTA. Les cellules, brisées par deux passages à la French Press (voir détails plus haut), furent centrifugées 20 min à 2000 x g (centrifugeuse IEC International refrigerated Modèle PR-6). Le surnageant est alors décanté et le culot resuspendu dans 5 ml d'EDTA. La solution fut centrifugée comme précédemment puis le surnageant décanté à nouveau. Le culot, contenant les membranes cellulaires, fut alors resuspendu dans 3,2 ml de solution d'EDTA. Par la suite, le cheminement est le même qu'en 2.1.

2.3 Séparation des différentes familles d'acides gras par chromatographie en couche mince (TLC)

Après la première évaporation, les lipides ont été resuspendus dans 150 μ l de chloroforme. Les lipides seront séparés par chromatographie en couche mince (TLC) selon la méthode de Ames (1968). La séparation est meilleure si la plaque est d'abord activée 1h à 100°C. Environ 25 μ l de l'échantillon fut appliqué en un point d'origine sur la plaque. Le reste de la solution étant appliqué en une ligne d'approximativement 5 cm sur le reste de la plaque. Pour la phase mobile, un mélange de chloroforme-méthanol-eau (65/25/4) fut utilisé. Pour avoir une séparation optimale, la migration se poursuit jusqu'à la fin de la plaque. Lorsque la migration fut complétée, la languette, ayant les 25 μ l d'échantillon, fut détachée et mise dans un bocal contenant des cristaux d'iode. La révélation des taches sur cette languette confirma que la migration s'était bien effectuée. La plaque contenant le reste de l'échantillon (100 μ l) fut ensuite brièvement exposée aux cristaux d'iode. Dès que les différentes taches devinrent visibles, la plaque fut retirée de l'atmosphère iodée, et les taches encerclées. Il est très important de localiser rapidement les différents lipides car l'effet révélateur de l'iode est de courte durée. De plus, l'iode dénature les lipides lors d'un contact prolongé. Par la suite, la silice et les lipides migrés correspondant aux différentes

taches furent récupérés par grattage et mis dans des tubes coniques vissés. Un volume de 2 ml de trifluorure de bore fut ajouté aux différents tubes puis la technique se poursuit telle que décrite en 2.1.

Pour différencier et localiser les taches correspondant aux différentes familles lipidiques, un mélange standard composé de lipides (PE, PI, PG et CL) commerciaux (Sigma) fut d'abord étudié. Les taches correspondantes furent également mises en évidence avec des cristaux d'iode (Figure 4).

2.4 Programme utilisé pour la chromatographie en phase gazeuse

La séparation au chromatographe en phase gazeuse (GLC) fut effectuée à l'aide du programme suivant: 4 min à 150°C, puis monter jusqu'à 250°C à raison de 4°C/min. La température est par la suite maintenue à 250°C. Temps total: 55 min.

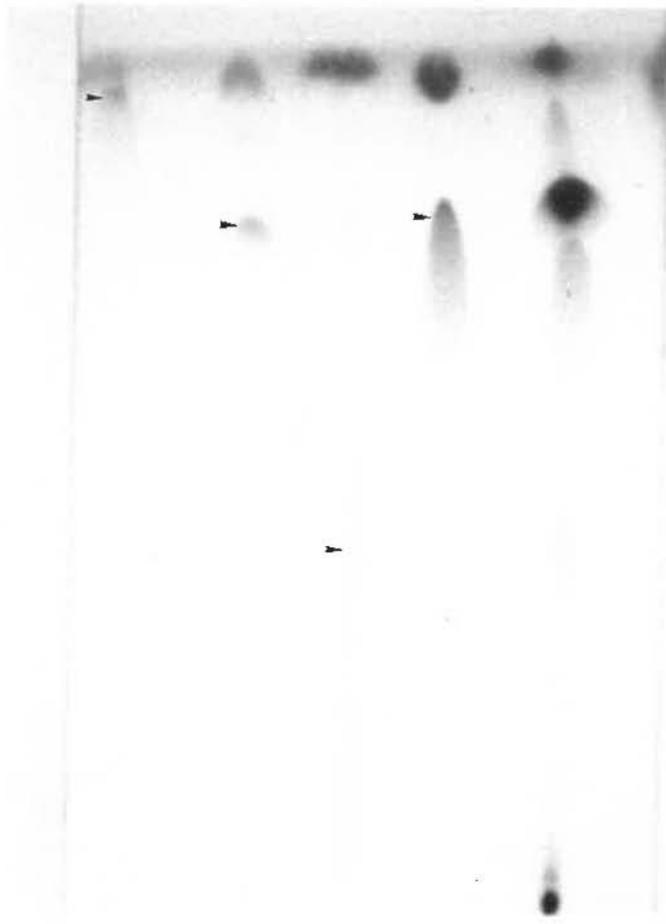
Pour séparer les acides gras contenus dans les familles lipidiques, l'atténuation utilisée était de 4.

Figure 4:

Localisation, des phospholipides standards
retrouvés dans les cellules bactériennes, sur
une plaque chromatographique sur couche mince (TLC).

Identification des phospholipides de gauche à droite:

CL; PE; PI; PG; Échantillon.



3. EXTRACTION DES LIPOPOLYSACCHARIDES (LPS) DES CELLULES GMR ET GMS

L'extraction fut effectuée suivant la méthode de Darveau et Hancock (1983).

C'est une méthode qui procède par élimination. Il y a tout d'abord la digestion des acides nucléiques par des enzymes spécifiques, puis le peptidoglycan est isolé par centrifugation. À ce dernier, de la protéinase K fut ajoutée pour éliminer les protéines contaminantes. Les LPS sont par la suite précipités avec de l'éthanol et le précipité obtenu est récupéré par centrifugation. Les protéines résistantes au SDS sont dénaturées par la chaleur et de la protéinase K est ajoutée pour une seconde fois au mélange. Les LPS sont précipités à nouveau (comme décrit plus haut). Le culot est resuspendu dans un tampon puis lyophilisé. Les LPS sont ensuite séparés sur un gel SDS-page 12% et révélés avec une coloration au nitrate d'argent selon la méthode de Tsai and Frasch (1982).

4. MISE EN ÉVIDENCE DE LA PRÉSENCE D'UN OU DE PLUSIEURS ENZYMES DÉGRADANT LES PARABENS

4.1 Préparation du milieu de culture

Du milieu TSA autoclavé et toujours chaud ($\approx 100^{\circ}\text{C}$) fut supplémenté avec 1 g/l de propyl parabens. Le milieu fut maintenu à une température d'environ 90°C et agité jusqu'à la solubilisation complète du propyl parabens, puis réparti dans des pétris à raison de 20 ml par boîte. Les pétris furent par la suite placés à 4°C pour la nuit. À basse température, le propyl parabens précipite et il y a formation de cristaux répartis uniformément dans la gélose.

4.2 Mise en évidence de l'activité enzymatique

Des cultures bactériennes jeunes (24h) en milieu TSB sont centrifugées. Une partie du surnageant fut chauffée à 100°C durant 3 min tandis que l'autre partie fut gardée telle quelle. Puis un volume de 100 μl de ces deux préparations ont été placés dans des puits pratiqués dans la gélose. Comme contrôle négatif, 100 μl de milieu TSB stérile fut utilisé. Les géloses furent incubées à 30°C pour la nuit.

4.3 Préparation d'une solution concentrée d'enzymes

Pour déterminer à quel moment il y a un maximum de protéines dans le milieu, des dosages protéiques selon la méthode de Lowry (Stauffer 1975) furent effectués à des intervalles de temps réguliers.

Pour obtenir une solution ayant une plus grande activité enzymatique, une concentration et une dialyse sur Pellicon furent effectuées. Pour ce faire, 2 l de milieu Davis additionné de 1% de glucose furentensemencés avec 10 ml d'une solution concentrée de bactéries de la souche EM et placés à 40°C (sans agitation) durant 6h. La culture obtenue fut centrifugée 30 min à 11 000 x g (centrifugeuse Beckman Modèle J-21B).

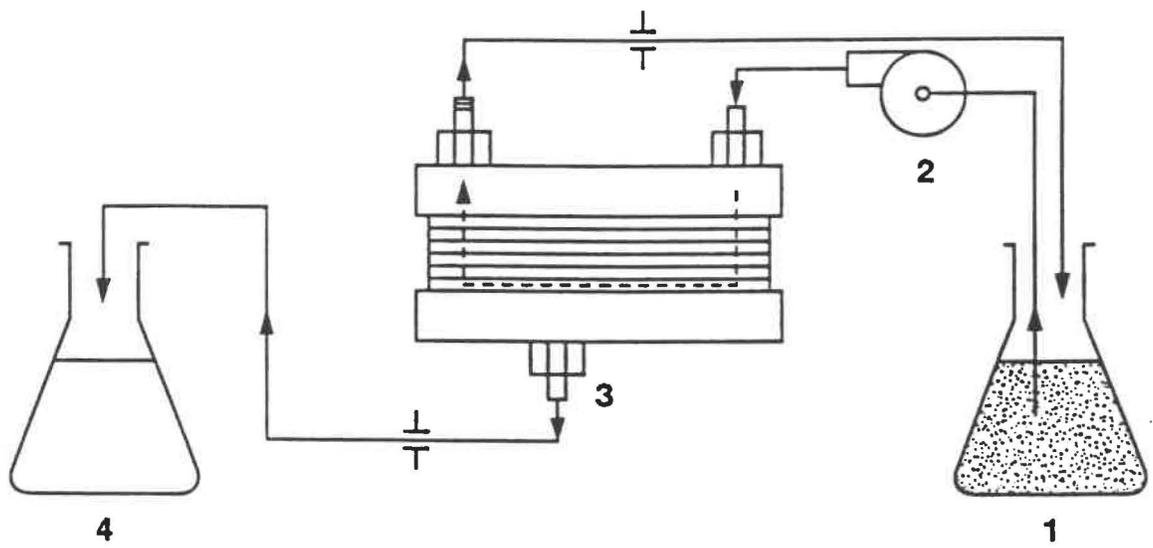
Le Pellicon est un système permettant la filtration et la dialyse d'une solution donnée. Un filtre en polysulfone ayant une porosité de 10⁴ daltons est placé entre deux plaques métalliques. La plaque inférieure est percée de petits trous. Grâce à une pompe péristaltique, le surnageant sous pression circule entre les deux plaques (Figure 5). Toutes les molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 10⁴ daltons (ex: les électrolytes) passent à travers le filtre avec les molécules d'eau. Le volume initial diminue progressivement, et seules les molécules ayant un poids moléculaire supérieur à 10⁴ daltons

Figure 5:

Représentation schématique du fonctionnement du système de filtration Pellicon.

Légende:

- 1 : Solution à concentrer
- 2 : Pompe péristaltique
- 3 : Filtre
- 4 : Solution rejetée



se retrouveront concentrées dans le volume final.

Le surnageant fut concentré à l'aide d'un appareil Pellicon jusqu'à obtention d'un volume de 500 ml. Du tampon phosphate de sodium 0,02M et à pH 7,5 (NAP) (Baker) fut utilisé pour la dialyse. Du tampon fut rajouté en cours de dialyse tant et aussi longtemps que la conductivité de la solution n'était pas égale à celle du tampon. Lorsque la conductivité fut équilibrée, la concentration fut poursuivie jusqu'à un volume final d'environ 200 ml.

Des échantillons du filtrat furent régulièrement prélevés et testés (sur pétris et avec le test au p-nitrophényl acétate) pour s'assurer que le ou les enzymes dégradant les parabens étaient bien retenus par le filtre.

La solution enzymatique concentrée fut répartie dans des tubes à congélation (Snap Caps) et conservée à -80°C .

4.4 Mise au point d'un test colorimétrique mesurant l'activité estérasique:

Pour tester l'activité estérasique des solutions possédant la propriété de dégrader les parabens, le test du p-nitrophényl acétate fut utilisé (Bergmann et al. 1958).

Principe: Le p-nitrophénol acétate (incolore) est clivé en p-nitrophényl (jaune) par des enzymes de type estérase.

Le test fut effectué dans 1,2 ml de tampon phosphate de sodium (NAP) 0,02M, pH 7,5 , 40⁰C. Un volume de 760 µl d'une solution de p-nitrophénol acétate (Aldrich) à 0,2 mM (supplémentée de 20 µl de p-dioxane / 100 ml) et 40 µl de l'échantillon à tester furent ajoutés. Le tout fut incubé 5 min à 40⁰C puis la densité optique fut mesurée à 348 nm sur un spectrophotomètre de type Milton Roy Spectronic (modèle 1001 plus). Le p-dioxane aide à la solubilisation du p-nitrophénol acétate dans l'eau (en ralentissant la polymérisation).

La densité optique a été déterminée par comparaison avec un témoin composé de 40 µl de milieu Davis supplémenté avec 1% de glucose au lieu de l'échantillon. Une courbe standard fut effectuée avec une solution de p-nitrophényl (Aldrich) à 1 mM/ml.

Pour nos besoins, une unité enzymatique a été définie comme étant 1 µM/ml de p-nitrophényl par unité de temps.

Une courbe a été effectuée pour déterminer les limites de détection du test. Pour ce faire, une solution possédant une bonne activité enzymatique fut diluée 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 etc. jusqu'à ce que le test ne soit

plus reproductible et significatif. L'expérience fut effectuée en triplicata.

4.5 Enzymes intra- ou extra-cellulaires? Présentes chez toutes les souches?

Deux séries de tubes contenant d'une part du milieu minimal Davis additionné de 1% de glucose et d'autre part du milieu Davis supplémenté avec du glucose et des parabens furent préparées. Les deux séries de tubes furent ensemencées avec les souches EM, G et GMR. Les souches sensibles E et GMS servirent seulement à inoculer le milieu sans parabens.

Les tubes, ayant une densité optique de départ variant entre 0,06 et 0,08 à une longueur d'onde de 650 nm furent incubés à 35°C durant 48h.

Après 48h les tubes furent centrifugés 30 min à 860 x g dans une centrifugeuse de table Sorvall Modèle GLC 2B. La moitié du surnageant fut prélevée et conservée à basse température. Les bactéries, resuspendues dans le restant du milieu de culture furent passées à la French Press (4138 kPa) puis centrifugées à nouveau. Le surnageant recueilli fut également conservé au froid.

L'activité estérasique des différentes solutions fut testée à l'aide du test enzymatique (p-nitrophényl acétate) et en pétri (Voir section 3.2).

4.6 Inductibilité de l'enzyme

Pour déterminer si la production enzymatique était un caractère inductible et si la présence du substrat parabens était nécessaire, la souche EM fut incubée à 30⁰C, dans différents milieux, une première fois durant 24h, puis une seconde fois durant 48h. Les milieux utilisés furent du Davis + 1% glucose, Davis + 1% glucose avec 1/5 de la concentration de parabens utilisée dans le supplément minéral (soit: 0,346 g/l de méthyl et 0,036 g/l de propyl parabens) et du Davis + 1% glucose avec 1/10 de la concentration en parabens (soit: 0,173 g/l de méthyl et 0,018 g/l de propyl parabens). Les faibles concentrations de parabens furent utilisées pour tenter d'induire la production enzymatique. Après les premiers 24h, les cultures (4 tubes de chaque milieu) furent centrifugées 20 min à 550 x g (Sorvall Modèle GLC 2B), puis les cellules furent lavées avec une solution physiologique stérile et centrifugées à nouveau. Finalement, les culots servirent à réinoculer des milieux frais. À la fin de la deuxième incubation, deux tubes de chaque milieu furent passés à la French Press (4138 kPa) puis centrifugés 30 min à 11 000 x g. Les tubes restants furent seulement centrifugés selon

les mêmes conditions. L'expérience eut donc lieu en duplicata.

Des tests de l'activité estérasique furent ensuite effectués sur les surnageants et les résultats comparés les uns aux autres.

4.7 Détermination des conditions optimales permettant l'adsorption de ou des enzymes sur des résines pour HPLC:

4.7.1 Détermination à l'aide de mini-colonnes

Des pipettes de 5 ml furent transformées en mini-colonnes échangeuses d'ions. Pour ce faire, 0,5 g de résine QMA ou CM (Waters, Division of Millipore) ont été mis dans des pipettes, puis les poudres furent lavées avec différents tampons à différents pH. Les tampons utilisés étaient du tampon NAP 0,05M pH 6,3; 6,7; 7,2 et 7,6 ainsi que du tampon Bis-Tris Propane 0,02M dont le pH fut ajusté avec du HCl 3N aux mêmes valeurs. Les 4 mini-colonnes contenant de la résine CM furent lavées avec du tampon NAP et les 4 autres avec du tampon Bis-Tris Propane. Environ 10 ml de tampon furent utilisés pour laver et équilibrer les mini-colonnes. Les résines, équilibrées, furent transférées dans des éprouvettes.

L'échantillon possédant l'activité enzymatique fut

préparé de la manière suivante: 500 ml d'une culture de 48h de EM en milieu Davis + 1% de glucose furent centrifugés. Le surnageant fut décanté et les bactéries furent resuspendues dans 80 ml de surnageant. Le tout fut passé à la French Press comme décrit précédemment, puis centrifugé 1h à 11 000 x g à 0°C. L'activité estérasique contenue dans le surnageant fut déterminée selon le test du p-nitrophényl acétate.

D'autre part, des tests enzymatiques eurent lieu sur le surnageant, dilué 1/12, avec le tampon correspondant à chaque éprouvette. Des lectures de pH et de conductivité furent prises sur les tampons, l'échantillon non dilué et sur l'échantillon dilué. Le pH et la conductivité des tampons et des échantillons dilués devaient être les mêmes. Puis, 2 ml des échantillons, dilués dans du tampon, furent rajoutés aux éprouvettes correspondantes, contenant les résines, et le tout fut agité durant 10 min. Lorsque la poudre fut déposée au fond du tube, des tests enzymatiques furent effectués sur les surnageants. Le ou les tubes n'ayant presque plus d'activité enzymatique indiquent les conditions optimales pour l'absorption de ou des enzymes hydrolysant les parabens. Comme aucune activité estérasique n'est détectée dans la solution tampon, il est supposé que les enzymes sont adsorbées sur la résine.

Lorsque le tube possédant les bonnes conditions pour

l'adsorption fut trouvé, une tentative eut lieu pour éluer l'enzyme adsorbé. Pour ce faire, le tampon à pH 6,3 fut remplacé par du tampon à pH 7. Puis, celui-ci fut remplacé à son tour par du tampon à pH 6,9 + 0,5 M de NaCl et agité. Finalement, le tampon fut remplacé par du tampon à pH 7,3 et 1M de NaCl. Des tests enzymatiques furent effectués entre chaque étape.

Cette expérience avait pour but de permettre la détermination des bonnes conditions d'absorption et d'élution pour ensuite passer l'échantillon au HPLC et purifier l'enzyme responsable de la dégradation des parabens.

4.7.2 Détermination des conditions optimales d'absorption à l'aide de mini-colonnes échangeuses d'ions commerciales (Sep-Pak)

Des Sep-Pak (Waters, Division of Millipore) contenant des résines Accell Plus QMA et Accell Plus CM furent équilibrés avec les mêmes tampons utilisés pour l'expérience décrite en 3.7.1. Des solutions enzymatiques provenant de cultures cellulaires brisées (expérience décrite en 3.5) furent diluées 1/12 dans les tampons de lavage correspondants. Ainsi les conductivités du tampon et de l'échantillon furent équilibrées. Un volume de 0,5 ml de l'échantillon fut passé sur les Sep-Pak, puis

l'activité estérasique, contre le p-nitrophényl acétate, fut mesurée sur la solution non adsorbée.

Par la suite, du tampon ayant des pH de plus en plus élevés (voir 3.7.1) servirent pour tenter d'éluer l'enzyme adsorbé sur la résine. Des déterminations de l'activité estérasique eurent lieu après chaque étape.

4.8 Essais de purification de l'enzyme dégradant les parabens

4.8.1 Essais préliminaires de purification

Une solution brute provenant d'un lysat cellulaire centrifugé de EM montre une forte activité estérasique. Malheureusement, cette solution contient également plusieurs autres protéines inutiles dont il faut se débarrasser. Dans ce travail, une étape de pré-purification a été tentée avant d'entreprendre la purification des enzymes dégradant les parabens. Pour ce faire, une colonne chromatographique contenant 10 g de résine Accell Plus CM (20 mm x 70 mm) fut équilibrée avec du tampon NAP 0,05M pH 6,3. Puis un volume de 20 ml d'une solution de lysat cellulaire, préparée comme décrit plus haut, ayant un pH de 6,3 fut passé sur la colonne avec un débit de 1 ml/min. Des échantillons furent régulièrement prélevés à la sortie et des tests enzymatiques de l'activité estérasique

(p-nitrophényl acétate) furent effectués.

Lorsque l'absorption fut terminée, la colonne fut lavée avec 10 volumes de tampon NAP toujours à un débit de 1 ml/min. Puis un gradient linéaire de NaCl (0 à 1M) et de pH (6,3 à 7,4) fut appliqué avec un tampon NAP 0,05M pH 7,4 + 1M de NaCl avec un débit de 1,5 ml/min.

Les fractions collectées furent testées pour détecter l'activité estérasique.

Les fractions possédant de l'activité devaient par la suite être analysées sur un HPLC (Waters 650 Advanced protein purification system) pour tenter de séparer les différentes composantes et purifier le ou les enzymes dégradant les parabens.

4.8.2 Essai de purification de l'enzyme par HPLC

Parallèlement à l'expérience décrite en 3.8.1 des essais pour purifier directement l'enzyme à l'aide d'un HPLC (Waters 650) furent effectués à une longueur d'onde de 280 nm.

Pour ce faire une colonne Protein-Pak SP 5PW 8mm x 75 mm (Waters) fut équilibrée toute une nuit avec du tampon NAP 0,05M pH 6,3 à un débit de 0,2 ml/min. Puis 80 ml du surnageant d'une culture bactérienne de 48h fut passé dans

la colonne à un débit de 1,5 ml/min. La colonne fut ensuite lavée avec le tampon NAP 0,05M pH 6,3 jusqu'à l'obtention d'une ligne de base stable.

Différentes approches furent tentées pour éluer le ou les enzymes dégradant les parabens, gradient linéaire ou par étapes passant de 0 à 1 M de NaCl, gradient de pH allant de 6,3 à 7,4 ainsi qu'un gradient combiné de NaCl et de pH.

Dans un deuxième temps, 10 ml d'un surnageant de lysat cellulaire (voir 3.7.1) fut adsorbé et élué selon les mêmes conditions.

Toutes les fractions recueillies (différents pics) furent testées à l'aide du test au p-nitrophényl acétate.

4.9 Substances pouvant améliorer l'activité enzymatique

Différents co-facteurs ont été testés pour tenter d'augmenter l'activité enzymatique, des fractions recueillies à l'élution de la colonne CM.

Les différents essais eurent lieu sur des Sep-Pak contenant des résines QMA et CM. Les Sep-Pak furent équilibrés avec 10 ml de tampon NAP 0,05M pH 6,3. Puis 2 ml d'une solution enzymatique provenant d'un lysat

cellulaire dilué 1/12 (1 ml de lysat + 11 ml de NAP) furent passés sur la colonne. Celle-ci fut ensuite lavée avec 2 ml de NAP. L'éluat fut réalisée avec différentes solutions du tampon NAP à différents pH. Le pH passa à 7 puis à 7,2; 7,4 et 7,6 par ajout, à chaque étape, de 2 ml de NAP au pH correspondant. L'éluat recueilli à chaque étape fut divisé en trois fractions auxquelles il fut ajouté les co-facteurs suivants: ATP + MgCl₂ (175 mg/l; 6,7 mg/l), le NAD (1mM/L) et le CaCl₂ (67 mg/l).

Le tout fut délicatement mélangé et des tests de l'activité estérasique (p-nitrophényl acétate) eurent lieu sur les différentes fractions.

Parallèlement, un test fut effectué pour déterminer si l'enzyme était sensible au NaCl. Pour ce faire, une solution provenant d'un lysat cellulaire non dilué fut supplémentée avec des concentrations de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 et 1 M de NaCl. Des mesures d'activité furent effectuées pour chaque concentration de NaCl étudiée.

5. DÉTECTION DE LA PRÉSENCE D'UN PLASMIDE DANS LES DIFFÉRENTES SOUCHES

L'extraction plasmidique fut effectuée selon la méthode commerciale de lyse alcaline basée sur la méthode de Birnboim et Doly (Sigma).

Cette méthode d'extraction plasmidique consiste à prendre une culture bactérienne jeune et de la centrifuger. Le culot est resuspendu dans 0,2 ml d'une solution fraîche de lysozyme (5 mg/ml lysozyme, 50 mM glucose, 10 mM EDTA et 25 mM Tris-HCl) à pH 8,0 et placé dans le glace durant 5 min. Ceci altérera les parois cellulaires.

Puis 0,4 ml d'une solution alcaline (pH 12) contenant 0,2 N NaOH et 1% de sodium dodecyl sulfate (SDS) sont ajoutés à la préparation. Cette deuxième solution va lyser les cellules et libérer l'ADN. Le tout est placé dans la glace pendant 5 min.

L'ADN, l'ARN ainsi que les protéines bactériennes seront précipitées avec une solution saline concentrée contenant 60 ml de potassium acétate 5M, 28,5 ml d'acide acétique glacial et 11,5 ml d'eau (pH 4,8). Pour ce faire, 0,3 ml de cette solution sont ajoutés au mélange. Cette troisième solution va également neutraliser le NaOH.

Le mélange est ensuite centrifugé 10 min. dans une microfuge (12 000 x g) et le surnageant, contenant l'ADN plasmidique, est transféré dans un tube Eppendorf propre.

Un volume de 0,5 ml d'isopropanol froid est ajouté à la préparation pour précipiter l'ADN plasmidique. Le tout fut bien mélangé puis centrifugé durant 15 min (18 000 x g). Le surnageant fut rejeté et le culot asséché.

Trois tubes Eppendorf furent préparée pour chaque souche.

5.1 Digestion des plasmides par les enzymes de restriction BamH1 et EcoR1

Un volume de 2 μ l de la solution concentrée de l'enzyme de restriction BamH1 (Pharmacia) fut ajouté à un tube et le même volume de l'enzyme EcoR1 (Pharmacia) fut ajouté au deuxième tube. Les deux tubes furent placés dans un bain-marie à 37⁰ C durant 1h pour accélérer la digestion.

5.2 Séparation des fragments d'ADN plasmidique ainsi que des plasmides non digérés par électrophorèse sur un gel d'agarose

Le gel contenait une concentration de 0,7 % d'agarose et 0,5 μ g/ml de bromure d'éthidium. Le tampon utilisé fut de Tris Acétate (40 mM) EDTA (2mM).

Un standard de poids moléculaire (1 KB Ladder BRL) allant de 1 à 12 KB fut utilisé pour déterminer le poids moléculaire du plasmide.

Lorsque la migration fut terminée les différentes bandes obtenues furent mises en évidence avec une lampe UV et le gel photographié.

RÉSULTATS.

1. CARACTÉRISATION DES DIFFÉRENTES SOUCHES

Cette partie du travail traite de l'étude des principales caractéristiques physiologiques des souches lorsque cultivées en présence et en absence de parabens.

1.1 Identification des différents isolats bactériens

Toutes les souches appartiennent au groupe bâtonnet Gram négatif. Le genre et l'espèce des différentes souches furent déterminés à l'aide de galeries API 20E.

Au début du projet trois souches étaient disponibles: *Enterobacter gergoviae* isolée à partir du supplément minéral (GM), *Enterobacter gergoviae* LSPQ 3347 (G) et *Enterobacter cloacae* LSPQ 3022 (E). Ces deux dernières provenant de la collection du Laboratoire provincial de Santé publique.

Basé sur l'apparence des colonies sur milieu gélosé, GM fut séparée en deux souches, l'une donnant des colonies lisses et démontrant une résistance aux parabens (GMR) et l'autre donnant des colonies rugueuses et se révélant sensible aux parabens (GMS).

Une souche d'*Enterobacter cloacae* fut également isolée à partir du supplément minéral stabilisé avec des parabens.

Cette souche (EM) démontre une résistance accrue aux parabens.

1.2 Détermination de la température optimale de croissance

Trois températures, soient 22, 30 et 37°C, furent étudiées pour déterminer l'optimum de croissance des différentes souches. Les milieux utilisés furent du TSB et du TSB supplémenté avec un mélange de méthyl et propyl parabens selon les concentrations retrouvées dans le supplément minéral.

Une bonne croissance fut observée pour les trois températures dans le cas d'*Enterobacter cloacae* isolée à partir du supplément minéral (EM) (Figure 6). La croissance la plus rapide fut obtenue en TSB à 37°C où la phase stationnaire fut atteinte au bout de 48 heures. À 30°C la croissance en TSB est plus lente et le maximum de population bactérienne (mesurée en densité optique, D.O.) est atteint au bout d'une semaine, tandis qu'à 22°C, la croissance est nettement inférieure. Pour les trois températures, la plus grande variation de densité optique fut observée dans les premiers 24h, suivi d'un ralentissement progressif.

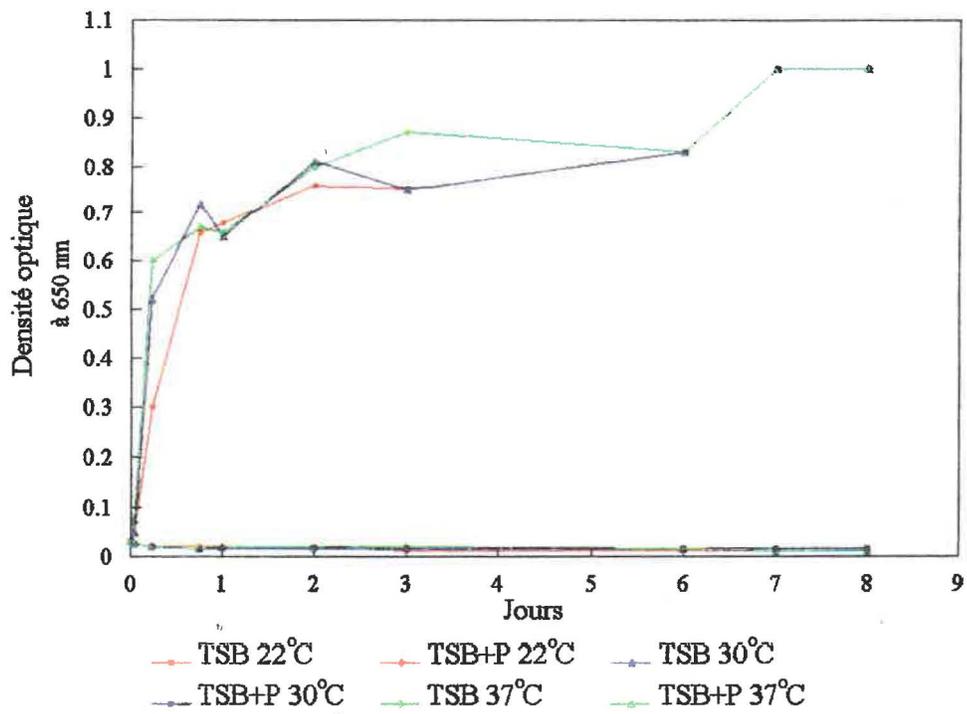
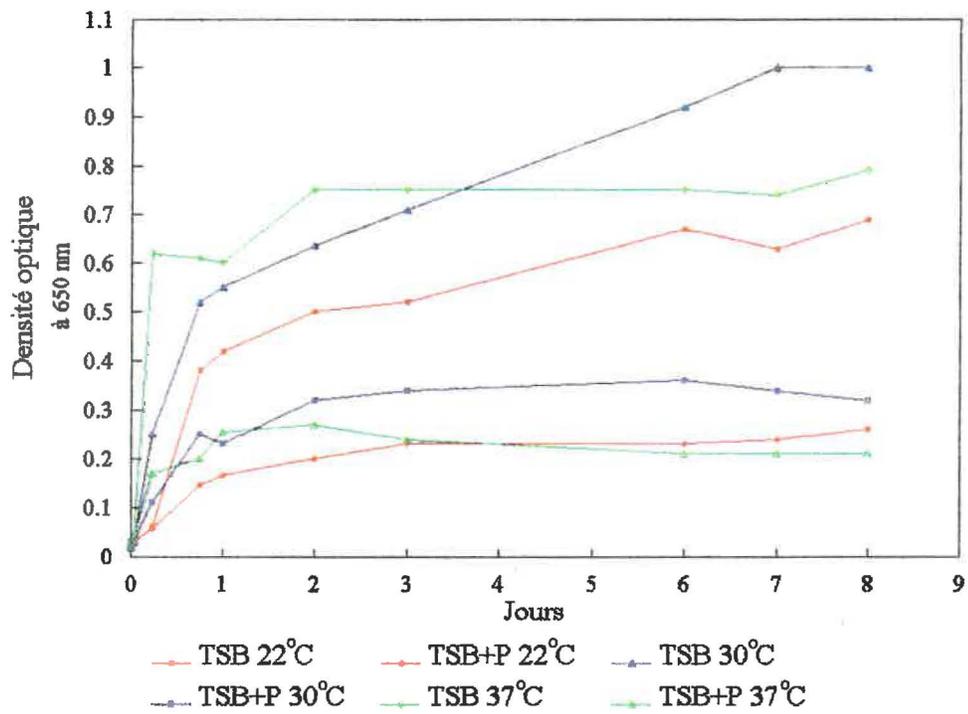
Les croissances bactériennes observées à 37 et à 22°C en TSB parabens sont très semblables et inférieures à

Figure 6:

Détermination de la température optimale de croissance de *Enterobacter cloacae* isolé à partir du supplément minéral (EM), en milieu TSB et TSB avec un mélange de méthyl et propyl parabens, à 22, 30 et 37°C.

Figure 7:

Détermination de la température optimale de croissance de *Enterobacter cloacae* LSPQ 3022 (E), en milieu TSB et TSB avec un mélange de méthyl et propyl parabens, à 22, 30 et 37°C.



celles obtenues à 30⁰C.

Dans le cas d'*Enterobacter cloacae* LSPQ 3022 (E) (Figure 7) une croissance semblable pour les trois températures fut obtenue dans le bouillon TSB. Pour les trois températures le maximum de densité optique fut atteint au bout d'une semaine. La variation de densité optique s'avèra très importante dans les premières 24h, passant de 0,02 à environ 0,6 (37⁰C) 0,7 (30⁰C) et 0,65 (22⁰C) puis ralentit progressivement.

En présence de parabens, aucune croissance ne fut observée chez cette souche sensible.

La meilleure croissance en TSB pour *Enterobacter gergoviae* résistant isolé à partir du supplément minéral (GMR) (Figure 8) fut observée à 30⁰C. Cependant la croissance la plus rapide eut lieu à 37⁰C pour les premiers 24h.

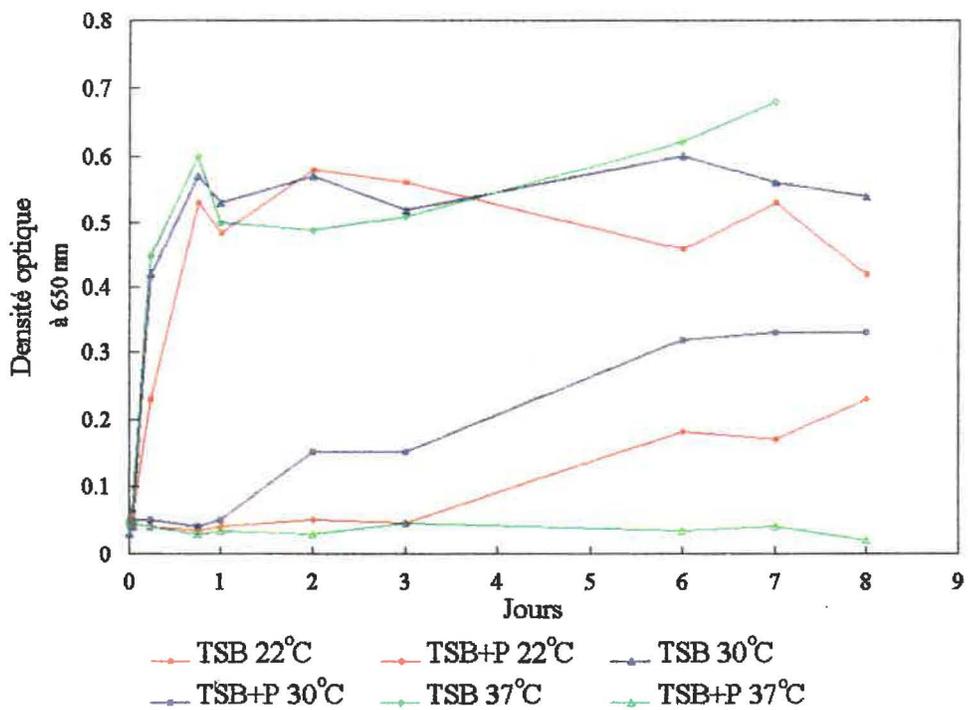
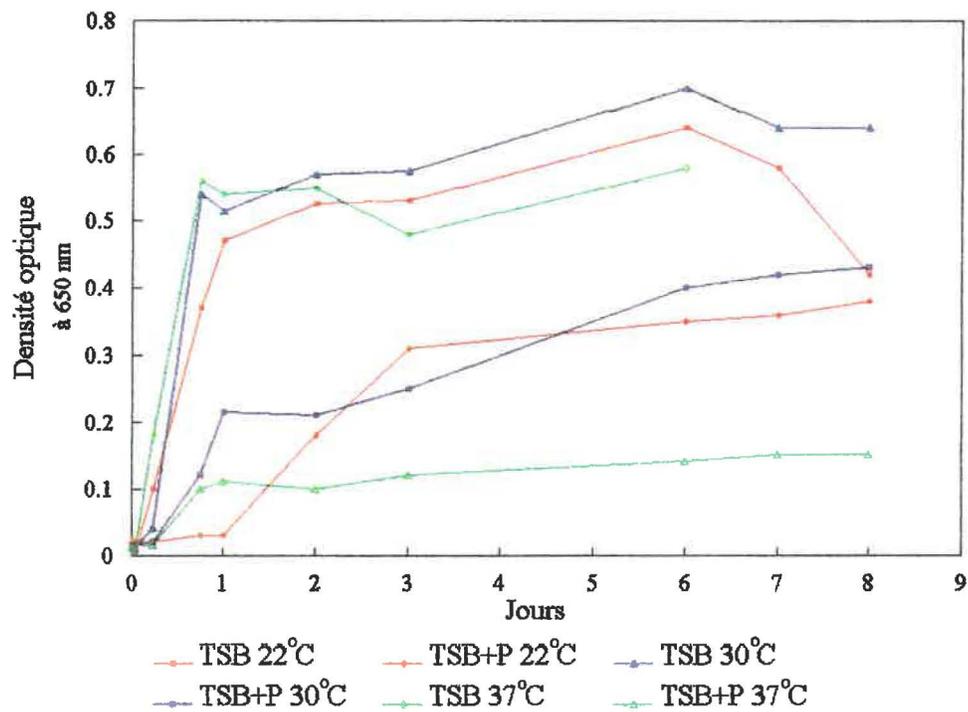
Une bonne prolifération bactérienne fut également obtenue en TSB supplémenté en parabens. La meilleure croissance eut lieu à 30⁰C dans les premiers 24h. À 22⁰C il y a une phase de latence de 24h puis une variation rapide de densité optique de 48h ralentissant par la suite pour atteindre son maximum au bout de huit jours. La moins bonne croissance, en présence de parabens, est observée à 37⁰C en présence de parabens.

Figure 8:

Détermination de la température optimale de croissance de *Enterobacter gergoviae* résistant (GMR) isolé à partir du supplément minéral, en milieu TSB et TSB avec un mélange de méthyl et propyl parabens, à 22, 30 et 37°C.

Figure 9:

Détermination de la température optimale de croissance de *Enterobacter gergoviae* sensible (GMS) isolé à partir du supplément minéral, en milieu TSB et TSB avec un mélange de méthyl et propyl parabens, à 22, 30 et 37°C.



Les croissances obtenues, aux différentes températures, en TSB, chez *Enterobacter gergoviae* sensible isolé à partir du supplément minéral (GMS) (Figure 9) sont très semblables les unes par rapport aux autres. La croissance la plus rapide est obtenue dans les premiers 24h puis elle ralentit progressivement.

La meilleure prolifération bactérienne fut observée à 30°C après une phase de latence de 24h en TSB parabens. Il n'y a pas de croissance à 37°C. Une phase de latence de 3 jours a lieu avant qu'une croissance ralentie ne débute à 22°C.

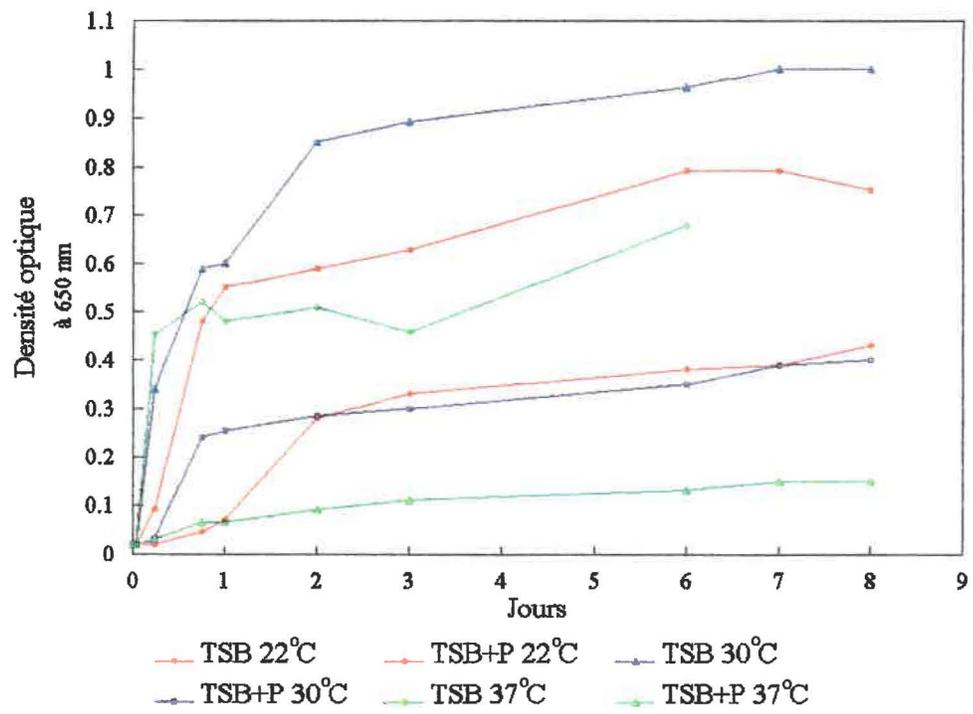
Chez *Enterobacter gergoviae* LSPQ 3347 (Figure 10) la croissance en TSB est très bonne pour les trois températures. Cependant dans les premiers 24h la meilleure croissance est à 37°C puis à 30 et finalement à 22°C. Par la suite, la meilleure croissance observée est à 30°C et la moins bonne à 37°C.

La meilleure croissance, en milieu TSB parabens, est obtenue à 30°C. Une courte phase de latence de 24h est observée à 22°C puis la croissance est semblable à celle obtenue à 30°C. Presque pas de variation de densité optique n'est observée à 37°C.

Les croissances obtenues en TSB sont très bonnes pour

Figure 10:

Détermination de la température optimale de croissance de *Enterobacter gergoviae* LSPQ 3347 (G), en milieu TSB et TSB avec un mélange de méthyl et propyl parabens, à 22, 30 et 37°C.



toutes les températures et semblables pour toutes les souches. La prolifération bactérienne observée est de plus en plus rapide au fur et à mesure que la température augmente, mais les différences observées ne sont pas très importantes. Cependant en TSB additionné en parabens la meilleure croissance observée pour la plupart des souches, à l'exception de E, est à une température de 30⁰C.

Étant donné que les études vont porter sur la résistance aux parabens des différentes souches, il est important de pouvoir observer la croissance en milieu supplémenté en parabens. À 22⁰C la phase de latence est trop longue et à 37⁰C la croissance observée n'est pas suffisante.

Donc la température de 30⁰C permettant de comparer la croissance de souches en milieux avec et sans parabens a été retenue comme étant optimale.

1.3 Courbes de croissance des différentes souches

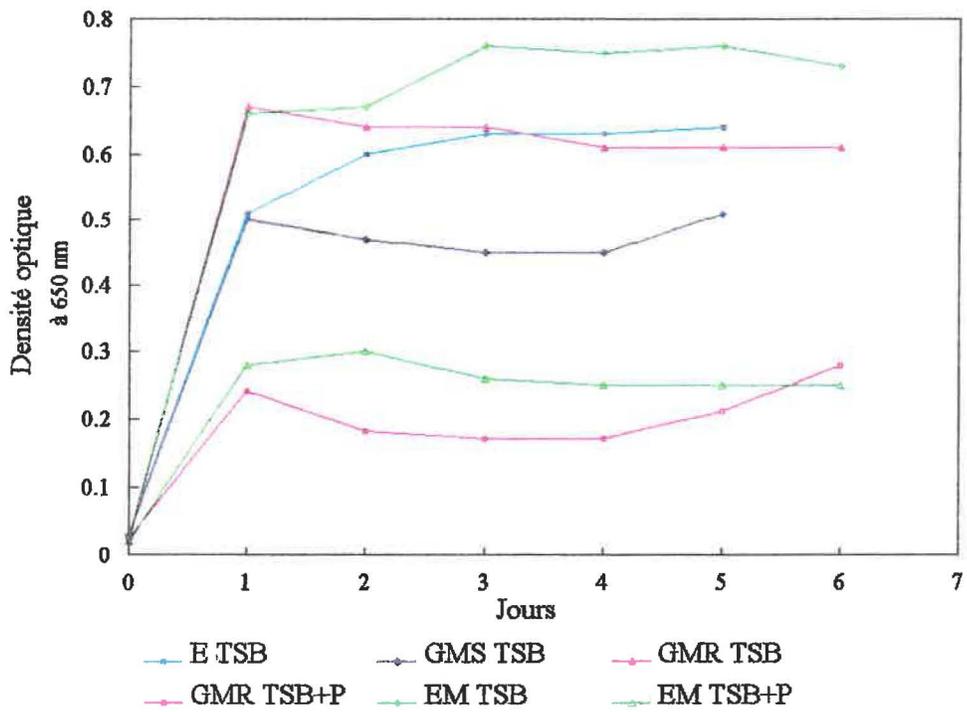
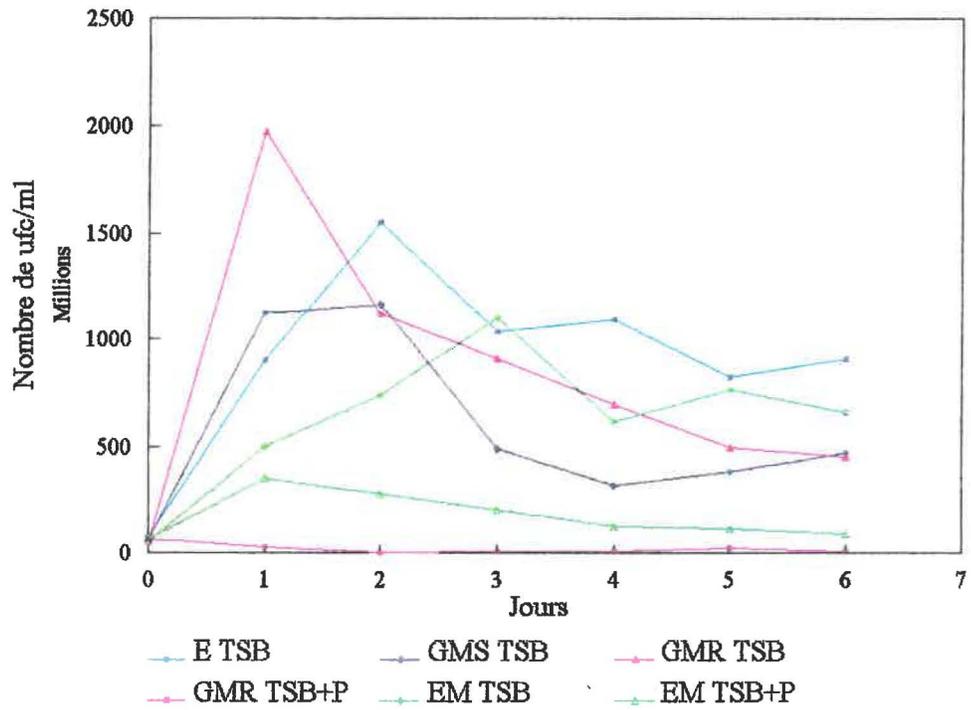
Les courbes de croissances furent déterminées en milieu TSB et TSB additionné d'un mélange de méthyl et propyl parabens (Figure 11). La phase logarithmique dura 48h pour la souche E puis la population se stabilisa pour ensuite graduellement décliner entre les jours 3 à 6. La phase logarithmique de GMS pris fin au bout de 24h. Cette

Figure 11:

Courbes de croissance des différentes souches en milieu TSB et TSB avec un mélange de méthyl et propyl parabens, incubées à 30°C. Ufc/ml en fonction du temps.

Figure 12:

Courbes de croissance des différentes souches en milieu TSB et TSB avec un mélange de méthyl et propyl parabens, incubées à 30°C. Densité optique en fonction du temps.



phase fut suivie d'une phase plateau de 24h, puis le nombre de ufc se mit à décroître progressivement. Dans le cas de GMR en TSB, le nombre maximal de colonies fut atteint en 24h tandis qu'aucune croissance significative ne fut observée en TSB parabens. Finalement, en ce qui concerne EM, une croissance dans le nombre de ufc est observée pendant trois jours en TSB tandis que le maximum de ufc en TSB parabens est atteint en 24h.

Il est à observer que la croissance est beaucoup moins importante en TSB parabens par rapport au TSB seul, pour un même nombre de jours.

D'autre part, les valeurs de densité optique, lues à 650 nm, des différentes souches correspondent à l'augmentation du nombre de ufc (Figure 12). En effet, la densité optique passe de 0,02 à un maximum de 0,65 en 24h pour la souche GMR (TSB) puis reste stable; ce qui correspond au maximum de ufc qui fut atteint en 24h, après quoi la population décroît. Il en est de même pour les souches GMS (TSB) et EM (TSB parabens). En ce qui concerne la souche EM (TSB) la densité optique maximale est atteinte au troisième jour ce qui correspond à la fin de sa phase logarithmique (Figure 11). Il en est de même pour la souche E (TSB) pour laquelle la densité optique maximale fut atteinte en 48h.

Une fois que la densité optique maximale a été atteinte, elle ne décroît plus ou très peu. Ceci est dû au

fait que les bactéries ne se multiplient plus (phase plateau) et meurent (phase de lyse) mais restent dans le milieu de culture donc la densité optique ne décroît pas.

1.4 Courbes de croissance des différentes souches en TSB supplémenté en propyl parabens à différentes concentrations

Différentes concentrations de propyl parabens furent ajoutées au milieu TSB pour déterminer la concentration qui inhibe le mieux les différentes souches bactériennes. Un contrôle positif (TSB sans propyl parabens) sert de référence (Marwan *et al.* 1986).

Toutes les souches croissent dans le TSB supplémenté en propyl parabens. Cependant on observe une phase de latence de plus en plus longue au fur et à mesure que la concentration en parabens croît chez les souches E et G (Figures 13 et 14). Pour la souche E, la croissance est inversement proportionnelle à la concentration de propyl parabens. Ce qui n'est pas le cas pour la souche G ou les densités optiques sont très semblables à toutes les concentrations au bout de 48h, malgré une phase de latence différente.

Chez les souches GM (desquelles dérivent les souches GMR et GMS) et GMR, la croissance en milieu TSB avec propyl parabens est très semblable au contrôle positif et même parfois supérieure (Figures 15 et 16).

Figure 13:

Courbes de croissance de *Enterobacter cloacae* LSPQ 3022 (E), en milieu TSB supplémenté avec différentes concentrations de propyl parabens. Densité optique en fonction du temps.

Légende:

C+ : Contrôle positif, culture en milieu TSB

Figure 14:

Courbes de croissance de *Enterobacter gergoviae* LSPQ 3347 (G), en milieu TSB supplémenté avec différentes concentrations de propyl parabens. Densité optique en fonction du temps.

Légende:

C+ : Contrôle positif, culture en milieu TSB

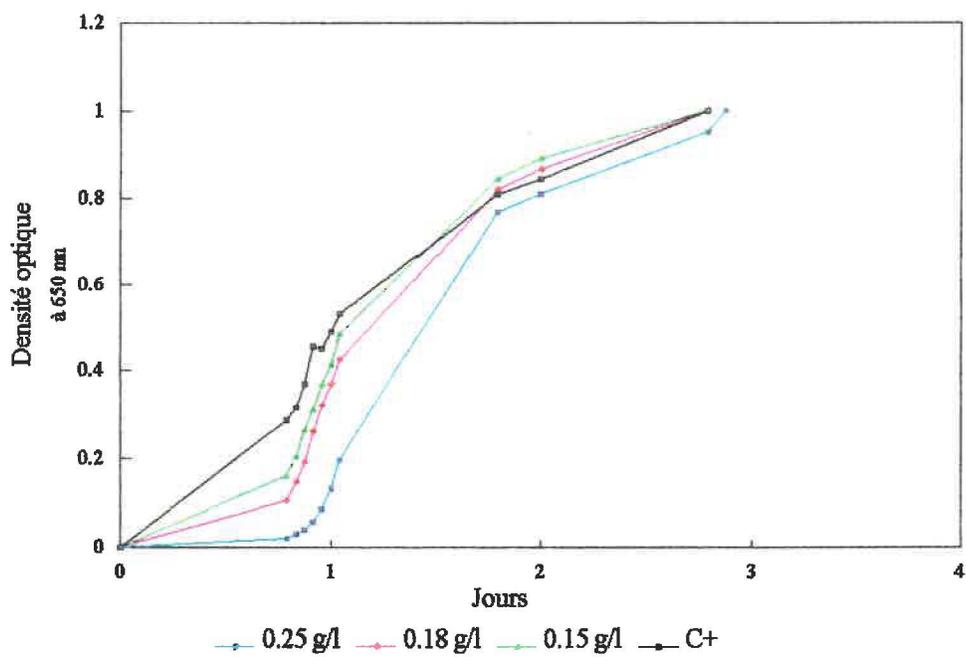
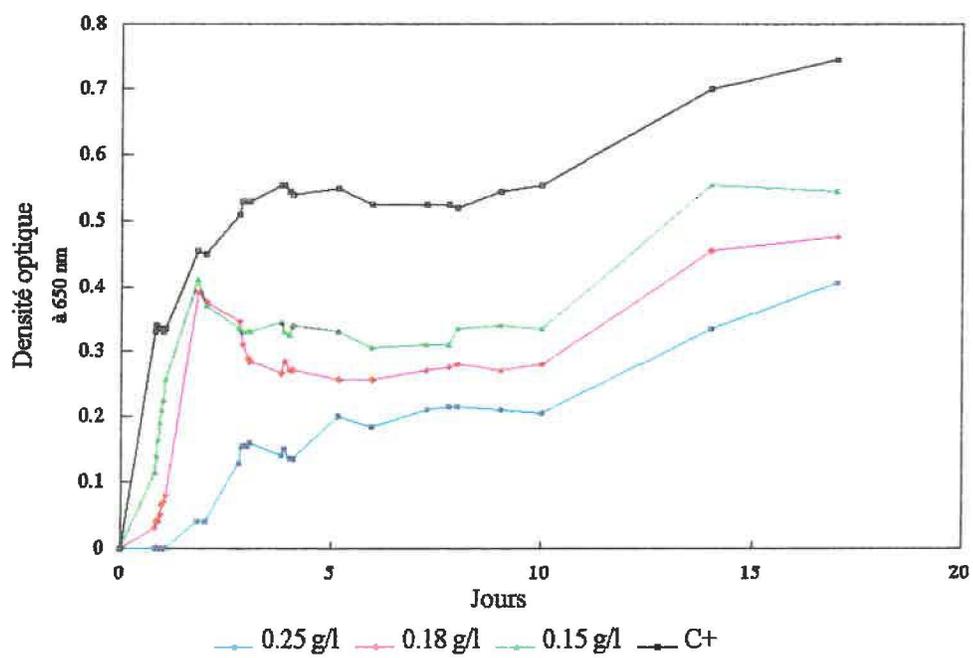


Figure 15:

Courbes de croissance de *Enterobacter gergoviae* isolé à partir du supplément minéral (GM), en milieu TSB additionné avec différentes concentrations de propyl parabens. Densité optique en fonction du temps.

Légende:

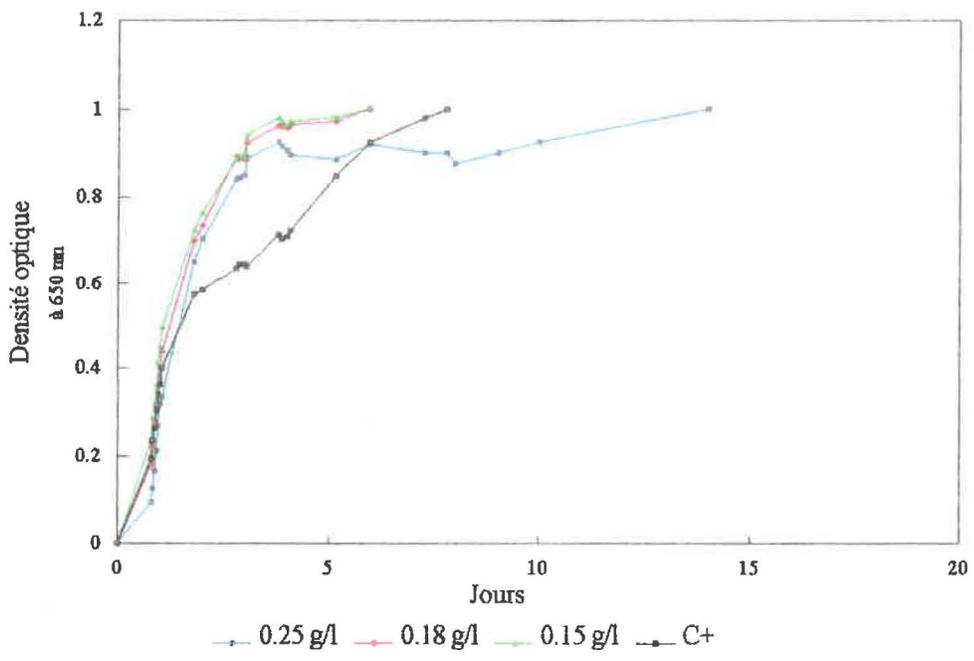
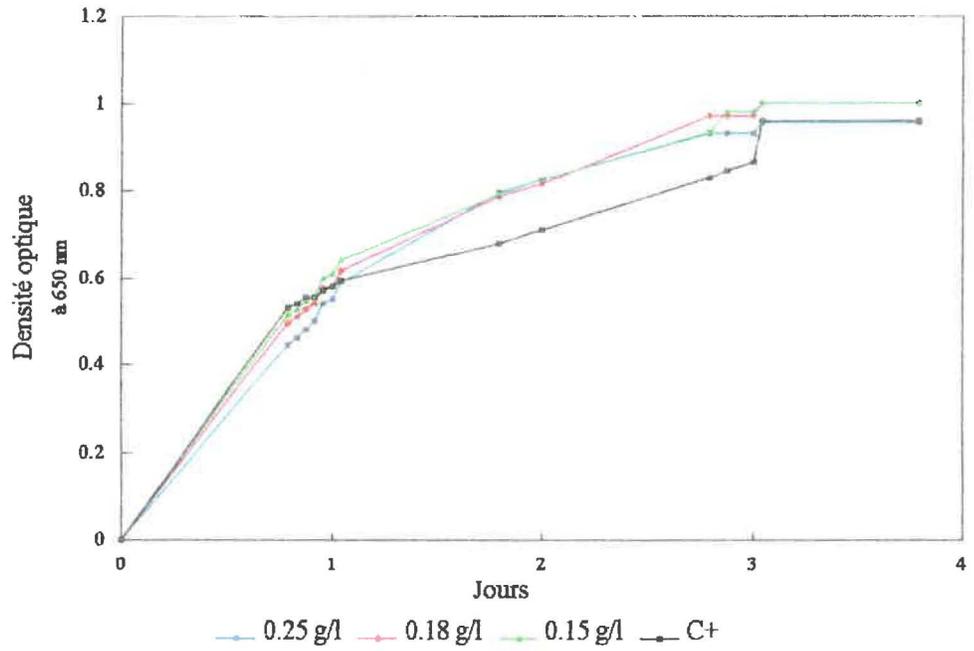
C+ : Contrôle positif, culture en milieu TSB

Figure 16:

Courbes de croissance de *Enterobacter gergoviae* résistant (GMR) isolé à partir du supplément minéral, en milieu TSB additionné avec différentes concentrations de propyl parabens. Densité optique en fonction du temps.

Légende:

C+ : Contrôle positif, culture en milieu TSB



1.5 Courbes de croissance des différentes souches en TSB supplémenté avec différentes concentrations de méthyl parabens

Différentes concentrations de méthyl parabens furent ajoutées au milieu TSB pour déterminer la concentration qui inhibe le mieux les différentes souches bactériennes. Un contrôle positif (TSB sans méthyl parabens) sert de référence (Marwan *et al.* 1986).

En milieu TSB additionné de méthyl parabens toutes les souches sont inhibées (résultats non présentés) à l'exception de GMR (Figure 17). La croissance observée fut inversement proportionnelle à la concentration en parabens contenue dans le milieu. Une croissance moyenne eut lieu à 1,5 g/l de parabens. La croissance fut légèrement inférieure à la précédente avec une concentration de 1,73 g/l et nulle pour une concentration de 2,5 g/l, même après 18 jours d'incubation.

Le méthyl parabens semble plus efficace que le propyl parabens pour inhiber la croissance bactérienne.

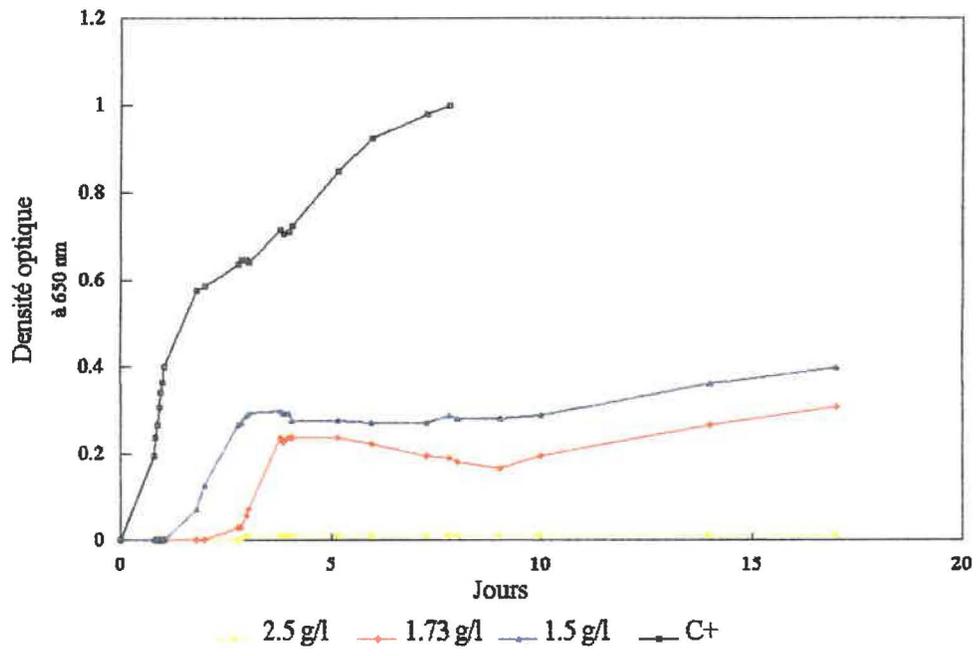
Aucune croissance significative ne fut observée lorsque le milieu TSB fut supplémenté avec une combinaison de méthyl et propyl parabens. Ceci est probablement dû au fait que l'inoculum initial ne fut pas assez fort ou bien

Figure 17:

Courbes de croissance de *Enterobacter gergoviae* résistant (GMR) isolé à partir du supplément minéral, en milieu TSB auquel il fut ajouté différentes concentrations de méthyl parabens. Densité optique en fonction du temps.

Légende:

C+ : Contrôle positif, culture en milieu TSB



que les deux types de parabens combinés possèdent une activité synergique (Gilliland et al. 1992).

1.6 Importance de la taille de l'inoculum sur la croissance en milieu TSB supplémenté avec des parabens aux concentrations utilisées dans le supplément minéral

Différents inoculums de *Enterobacter gergoviae* LSPQ 3347 (G) furent ajoutés à du TSB supplémenté en parabens (Figure 18).

Ainsi, pour un inoculum de 24×10^7 ufc/ml, la phase de latence est pratiquement inexistante. Puis la phase logarithmique s'étend sur environ 48h. C'est durant cette phase que la plus grande variation de densité optique est observée. La phase stationnaire dure approximativement du 5e au 15e jour. Entre le 15e jour et le 20e une autre augmentation de la densité optique apparaît qui est probablement due à la lyse des bactéries.

Lorsqu'un inoculum de 24×10^4 ufc/ml est ajouté, la phase de latence dure environ 48h puis la multiplication bactérienne débute. Le reste de la courbe est semblable à la précédente, cependant la densité optique finale est légèrement inférieure.

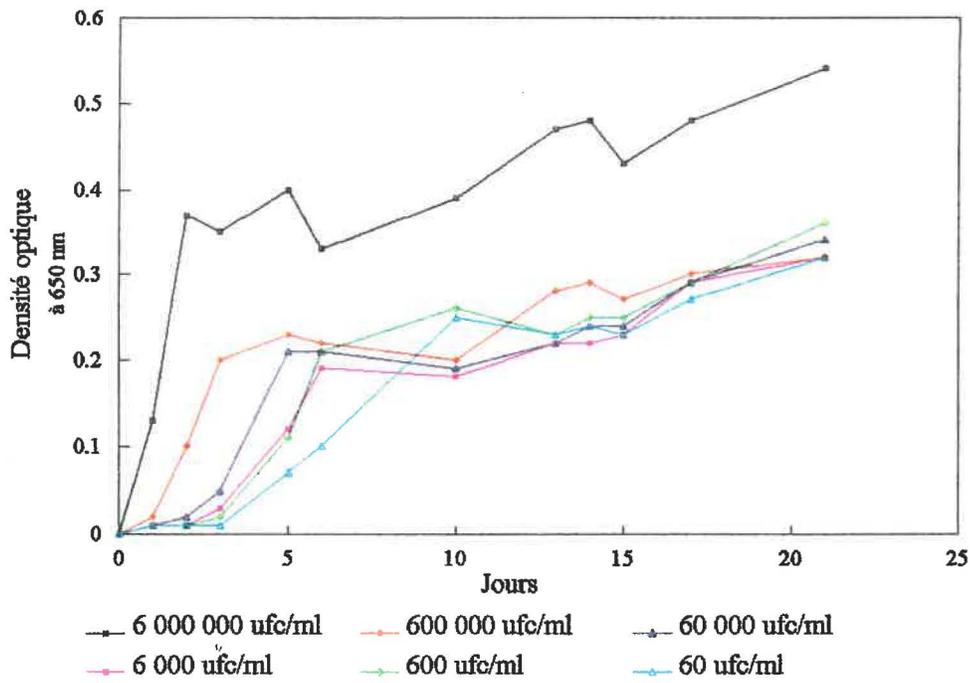
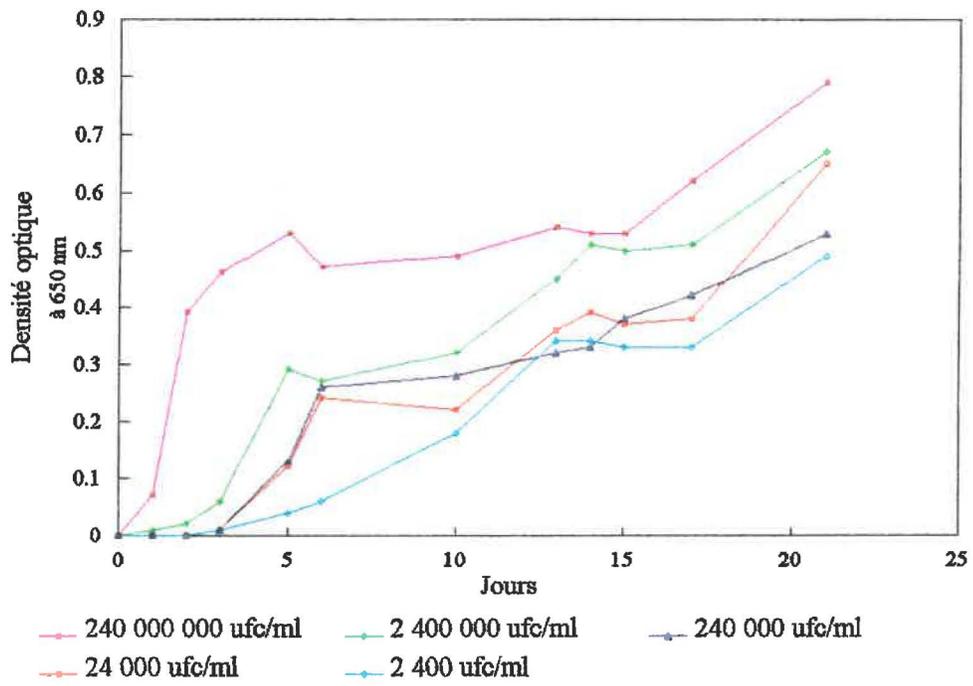
Pour les trois autres inoculums, respectivement 24×10^4 , 24×10^3 et 24×10^2 ufc/ml les phases de latence sont de trois jours et la croissance progresse plus lentement. La phase logarithmique de la dernière culture (24×10^2

Figure 18:

Importance de la taille de l'inoculum bactérien pour la croissance d'*Enterobacter gergoviae* LSPQ 3347 (G), en milieu TSB supplémenté en méthyl et propyl parabens. Densité optique en fonction du temps.

Figure 19:

Importance de la taille de l'inoculum bactérien pour la croissance d'*Enterobacter gergoviae* résistant (GMR), isolé à partir du supplément minéral, en milieu TSB additionné en méthyl et propyl parabens. Densité optique en fonction du temps.



ufc/ml) fut moins prononcée et plus étalée dans le temps.

Donc la croissance bactérienne observée est proportionnelle aux nombres de ufc/ml initialement présents dans le milieu de culture. Pour la souche G l'inoculum minimal permettant une croissance bactérienne est d'environ 24×10^2 ufc/ml.

Le même phénomène décrit plus haut est retrouvé dans le cas de la souche résistante GMR (Figure 19). La croissance observée est proportionnelle au nombre de ufc/ml initialement présent dans le milieu. Une phase de latence de plus en plus longue est observée au fur et à mesure que la concentration en ufc diminue. Cependant pour GMR un inoculum initial de seulement 60 ufc/ml suffit pour permettre une croissance bactérienne notable et comparable aux cultures obtenues avec les autres souches.

1.7 Croissance des différentes souches en milieu minimal Davis contenant les sels minéraux retrouvés dans le supplément minéral

Des tubes de milieu minimal Davis et du Davis supplémenté en sels minéraux, contenus dans le supplément minéral, furent inoculés avec les différentes souches pour déterminer l'effet potentiel des sels minéraux sur la croissance des contaminants bactériens.

La souche *Enterobacter cloacae* isolée à partir du supplément minéral (EM) (Figure 20) semble sensible aux sels minéraux. En effet, une phase de latence de trois jours est observée dans le milieu Davis avec sels minéraux tandis qu'en milieu Davis sans sels minéraux la phase de latence dure seulement 24h.

Toutes les autres souches (E, G, GMR et GMS) démontrent une légère sensibilité aux sels minéraux (Figures 20 et 21). En effet, une phase de latence de 24h est observée en milieu Davis additionné de sels minéraux tandis qu'en milieu Davis seul la phase logarithmique débute presque immédiatement.

Les sels minéraux contenus dans le supplément minéral semblent donc posséder un certain pouvoir bactériostatique qui retarde la croissance de toutes les souches bactériennes (résistantes ou non).

1.8 Étude des différentes souches en microscopie électronique à transmission (MET)

Les examens en microscopie électronique démontrent que les souches possèdent une paroi et un espace périplasmique caractéristique des bâtonnets Gram négatifs.

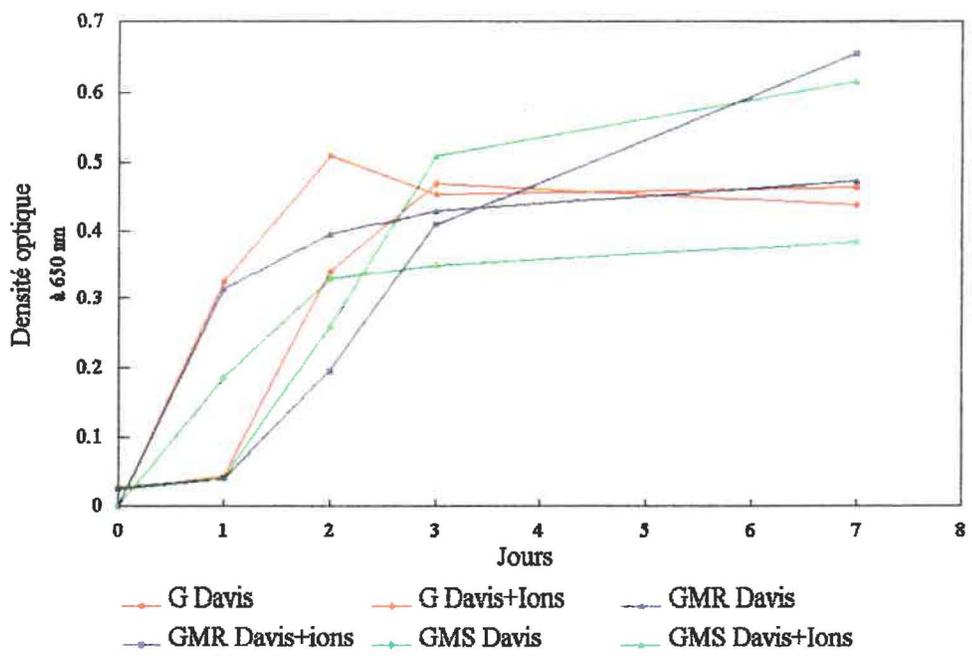
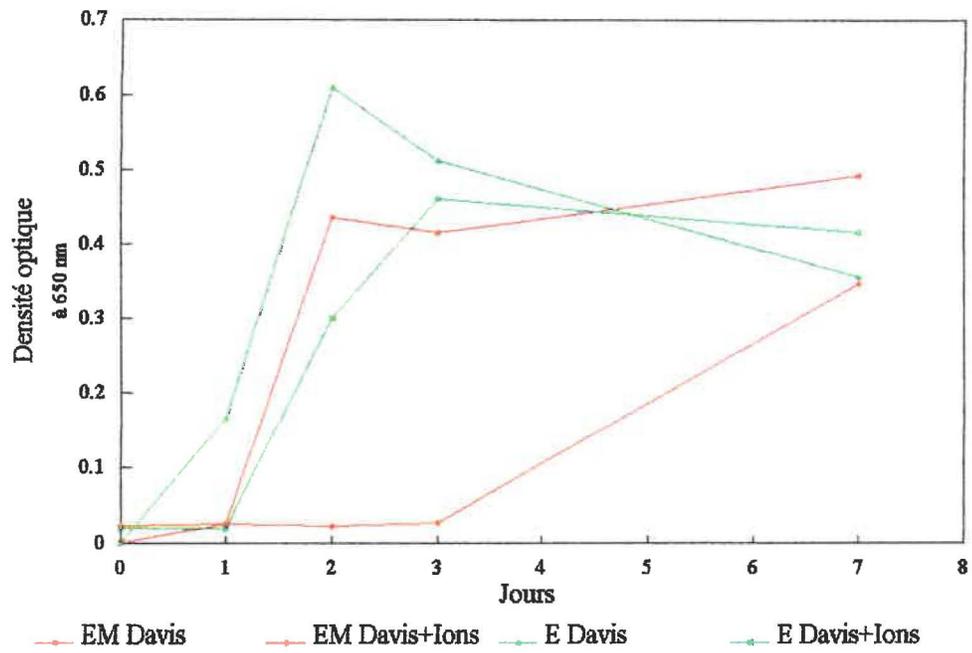
La souche GMR (résistante) démontre des parois

Figure 20:

Courbes de croissance de *Enterobacter cloacae* LSPQ 3022 (E) et de *Enterobacter cloacae* isolé à partir du supplément minéral (EM), en milieu minimal Davis et Davis additionné en sels minéraux. Densité optique en fonction du temps.

Figure 21:

Courbes de croissance de *Enterobacter gergoviae* LSPQ 3347 et *Enterobacter gergoviae* sensible (GMS) et résistant (GMR) isolés à partir du supplément minéral, en milieu minimal Davis et Davis additionné en sels minéraux. Densité optique en fonction du temps.



régulières et un espace périplasmique bien visible (Figure 22).

Inversement, la souche GMS (Figure 22) possède des parois irrégulières et semble beaucoup plus opaque aux électrons. L'espace périplasmique est également moins apparent. Les photos démontrent que la souche GMS (sensible aux parabens) n'est pas composée à 100% de bactéries rugueuses mais possède également un faible pourcentage de bactéries lisses probablement des GMR.

Les trois autres souches bactériennes soient G, E et EM possèdent l'aspect caractéristique des bâtonnets Gram négatif (Figures 22, 23).

Il est à noter que toutes les souches à l'exception de GMS donnent des colonies rondes et lisses sur des géloses TSA. La souche GMS donne des colonies rugueuses au contour légèrement irrégulier.

1.9 Résistance aux antibiotiques

Toutes les souches sont sensibles à la streptomycine, au chloramphénicol et à la gentamycine. Elles sont cependant toutes résistantes à la péniciline (Tableau I).

La souche E est sensible à la tétracycline

Figure 22:

Apparence des souches d'*Enterobacter gergoviae* observées au microscope électronique à transmission.

Légende:

Photo du haut : G
Photo du bas, gauche : GMR
Photo du bas, droite : GMS

Échelle:

1.1 cm = 300 nm

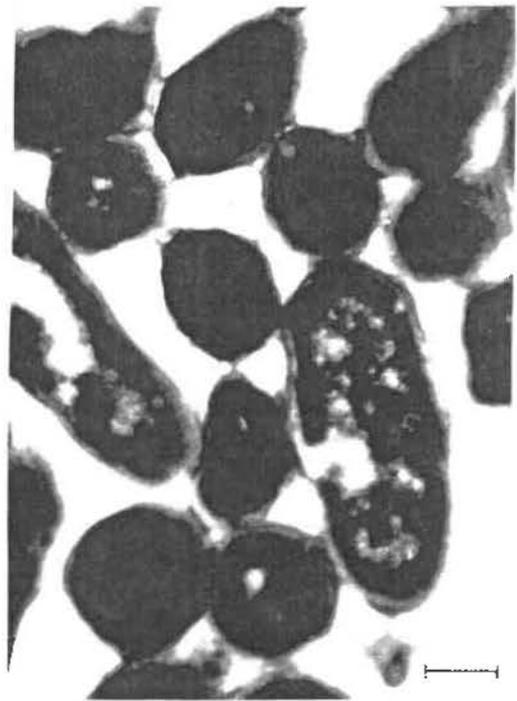
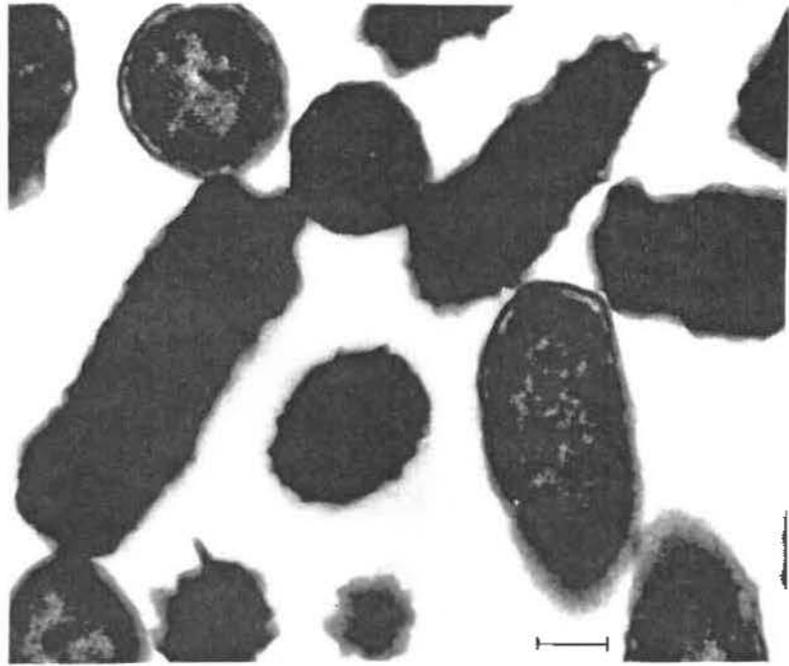


Figure 23:

Apparence des souches d'*Enterobacter cloacae* observées
au microscope électronique à transmission.

Légende:

Photo supérieure : E
Photo inférieure : EM

Échelle:

1.1 cm = 300 nm

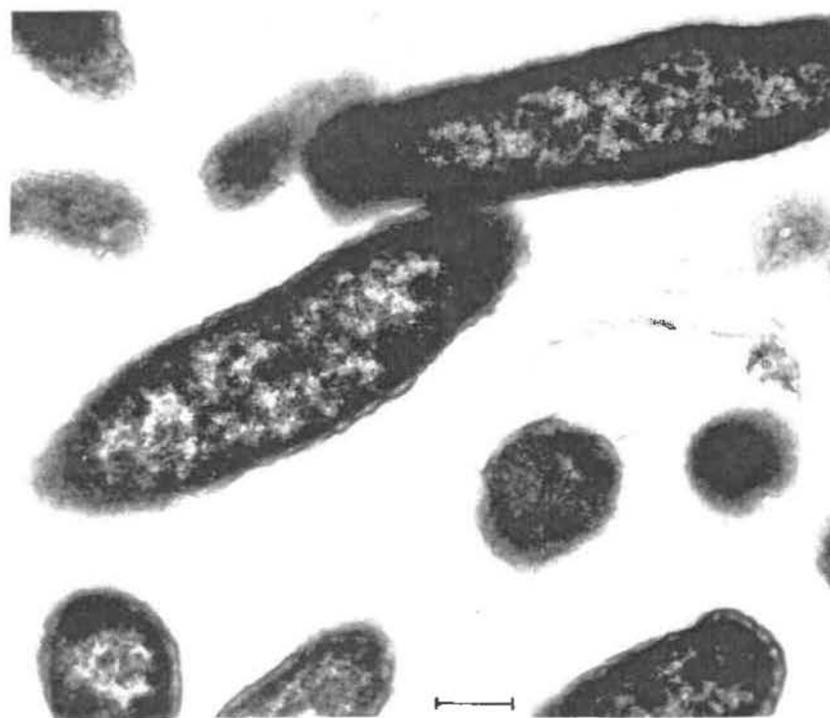
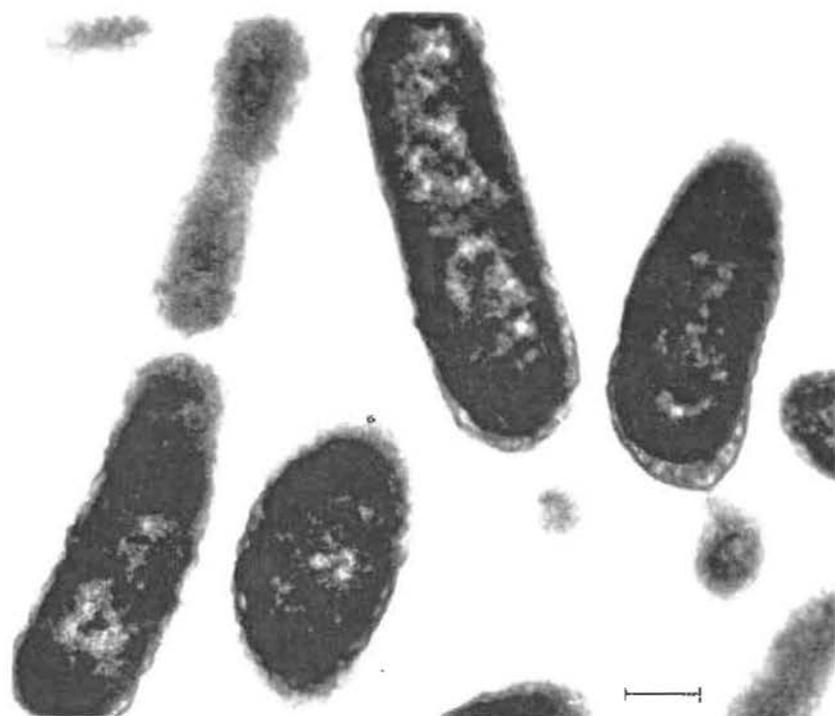


Tableau I:

Résistance des souches G, GM, GMR, GMS, E et EM
vis-à-vis différents antibiotiques d'usage médical.
(Antibiogramme)

Légende:

Para	:	Parabens	E15	:	Érythromycine
P2	:	Pénicilline	GM10	:	Gentamycine
S10	:	Streptomycine	TE5	:	Tétracycline
C30	:	Chloramphénicol	AM10	:	Ampicilline

R : Résistant
S : Sensible
I : Intermédiaire

		Antibiotiques						
Souches	Para.	P2	S10	C30	E15	GM10	TE5	AM10
GM	R	R	S	S	I	S	-	R
GMR	R	R	S	S	R	S	-	R
GMS	S	R	S	S	I	S	-	S
G	R	R	S	S	I	S	-	I
E	S	R	S	S	R	S	S	S
EM	R	R	S	S	R	S	R	R

contrairement à la souche EM qui y est résistante.

En ce qui concerne l'érythromycine, les souches GMR, E et EM sont résistantes, tandis que les souches GM, GMS et G sont classées de sensibilité intermédiaire.

Une corrélation semble exister entre la résistance aux parabens et à l'ampicilline. En effet, les souches GM, GMR et EM (toutes résistantes aux parabens) sont résistantes à l'antibiotique, tandis que les souches GMS et E (sensibles aux parabens) sont sensibles au même antibiotique. La souche G semble être de sensibilité intermédiaire.

2. COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES SOUCHES GMR ET GMS

La composition en acides gras peut influencer la perméabilité cellulaire et donc avoir un effet sur la résistance des souches GMR et GMS vis-à-vis les parabens. Dans cette section, la composition en acides gras, des souches précédemment mentionnées, sera étudiée pour en vérifier le rôle dans la résistance observée chez la souche GMR.

2.1 Composition en acides gras totaux des cellules GMR et GMS

Les cellules des souches GMR (L) et GMS (R) possèdent une composition en acides gras totaux assez semblable (Tableau II et Figure 24). La longueur de la chaîne de carbone des acides gras varie entre 14 et 19 unités. Les acides gras principalement retrouvés sont les 16:0, 17:0 Δ , 18:1⁹+ 18:1¹¹ et 19:0 Δ .

L'acide gras majoritaire demeure le 16:0. Il existe une différence entre les cellules L et R en ce qui concerne les acides gras 18:1⁹ + 18:1¹¹. Les cellules R possèdent beaucoup plus de ces acides gras par rapport aux cellules L.

2.2 Différences entre les acides gras saturés totaux et les acides gras insaturés totaux pour les cellules L et R

Les cellules L possèdent plus d'acides gras saturés (7,94%) par rapport aux cellules R (Tableau III et Figure 25). Inversement, les cellules R possèdent plus d'acides gras insaturés (33,70%) par rapport aux cellules L.

Tableau II:

Pourcentage des acides gras contenus dans les lipides totaux des cellules L (GMR) et R (GMS).

Figure 24:

Histogramme représentant le pourcentage des acides gras contenus dans les lipides totaux des cellules L et R.

	CELLULES	
	Lisses	Rugueuses
14:0	6.33	4.33
16:1 ⁹	1.13	1.25
16:0	37.48	33.38
17:0 Δ	17.14	17.70
18:1 ⁹	4.20	3.83
18:1 ⁹ + 18:1 ¹¹	10.25	18.42
18:0	1.71	1.43
19:0 Δ	13.96	13.70
Inconnu	7.80	5.96

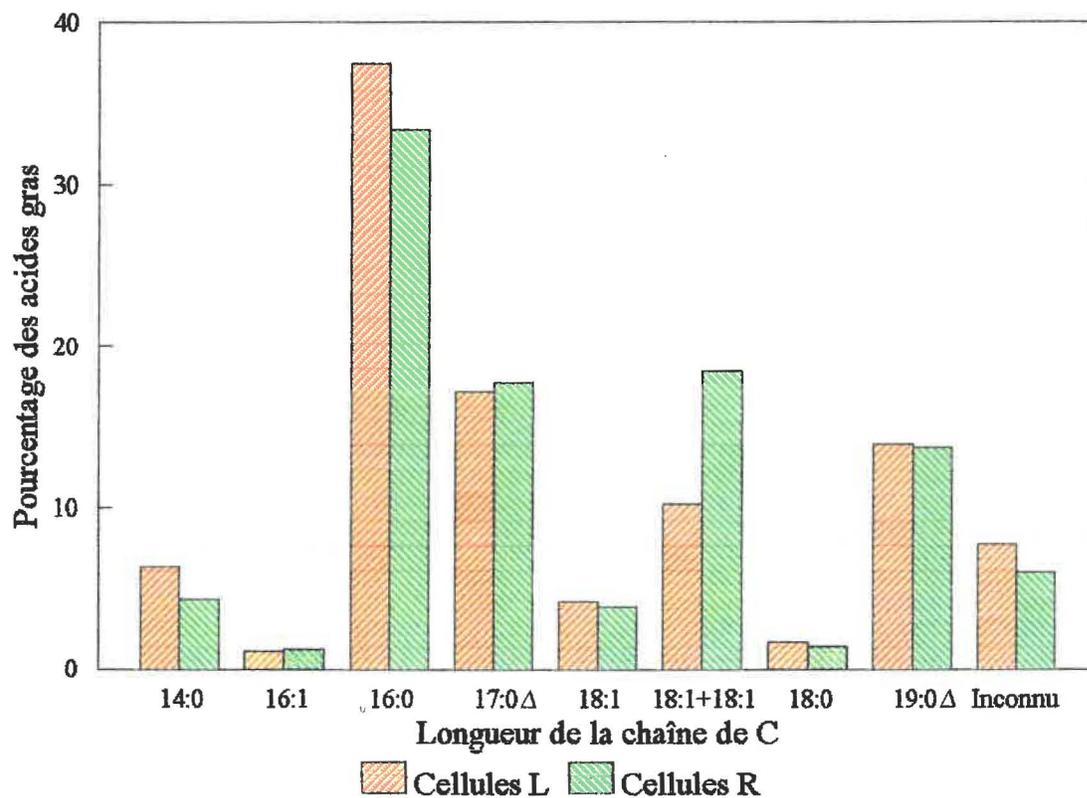


Tableau III:

Pourcentage des acides gras saturés par rapport aux acides gras insaturés contenus dans les lipides totaux des cellules L (GMR) et R (GMS).

Légende:

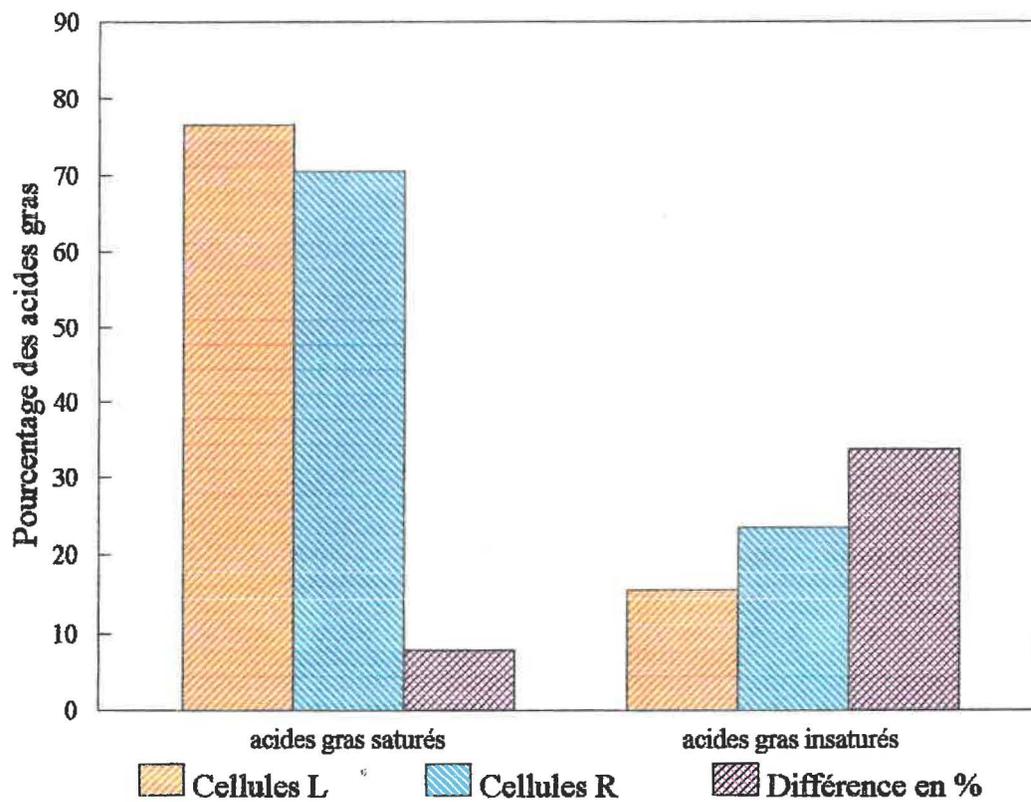
* : $((L-R)/L) \times 100$

** : $((R-L)/R) \times 100$

Figure 25:

Histogramme représentant le pourcentage des acides gras saturés par rapport aux acides gras insaturés contenus dans les lipides totaux des cellules L et R.

	CELLULES		DIFFÉRENCE
	L	R	en %
ACIDES GRAS SATURÉS	76.62	70.54	7.94 *
ACIDES GRAS INSATURÉS	15.58	23.50	33.70 **



2.3 Répartition des différentes familles de lipides totaux contenus dans les cellules L et R

La famille lipidique retrouvée majoritairement dans les deux types cellulaires est le phosphatidyl éthanolamine (PE) (Tableau IV et Figure 26), suivi par les lipides neutres (LN) et le phosphatidyl glycérol (PG). Les autres familles soient la cardiolipine (CL), le phosphatidyl inositol (PI), le phosphatidyl choline (PC) ainsi que les inconnus sont minoritaires. L'étude des teneurs des différentes familles lipidiques des cellules L et R montre des similitudes et des différences importantes. La teneur en PG est significativement plus grande dans les cellules R. Ces dernières, possèdent 43,71% de plus de PG ainsi que 22,34% de plus de CL par rapport aux cellules L. Les cellules L possèdent quant à elles, plus de PE et de LN, respectivement 8,87% et 13,05 % par rapport aux cellules R.

2.4 Répartition des acides gras dans les différentes familles lipidiques des cellules L

La longueur des chaînes de carbone des acides gras varie entre 14 et 20 unités (Tableau V et Figure 27) .

Le 14:0 est majoritaire dans la famille PG avec 11,67%, tandis que le 14:1 n'a été retrouvé dans aucune famille.

Tableau IV:

Pourcentage des différentes familles de lipides totaux
contenues dans les cellules L (GMR) et R (GMS).

Figure 26:

Histogramme représentant le pourcentage des différentes
familles de lipides totaux contenues dans les cellules
L et R.

	CELLULES	CELLULES	DIFFÉRENCE
	L	R	en %
PC.	< 1	< 1	< 1
PG.	9.13	16.22	43.71
PI.	3.44	3.58	3.91
PE.	63.73	58.08	8.87
CL.	5.91	7.61	22.34
LN.	16.47	14.32	13.05
Inconnu	< 1	< 1	< 1

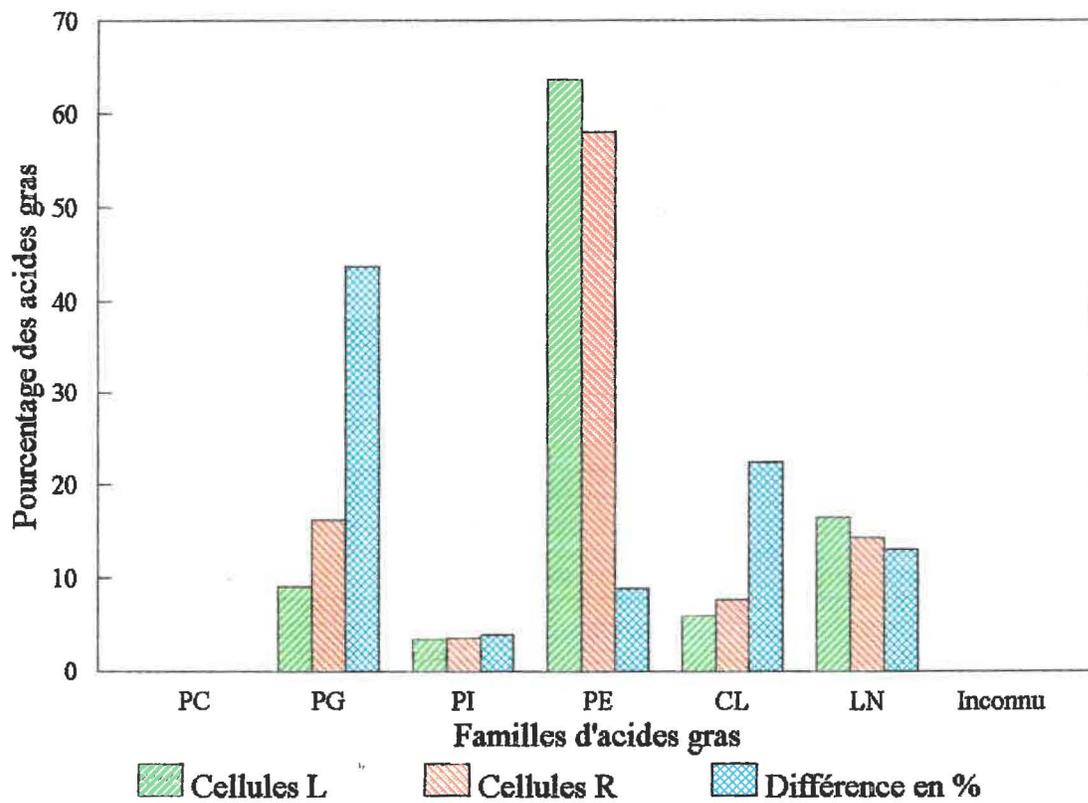


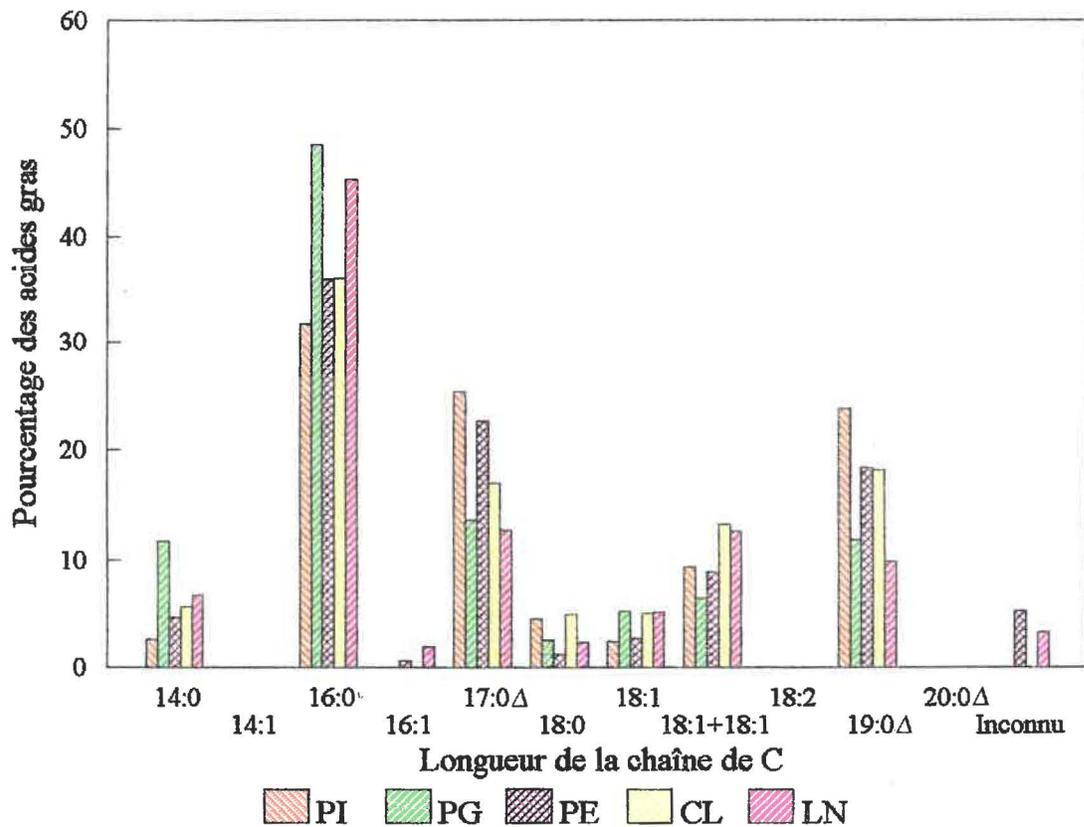
Tableau V:

Pourcentage des acides gras contenus dans les différents groupes de lipides totaux des cellules L (GMR).

Figure 27:

Histogramme représentant le pourcentage des acides gras contenus dans les différents groupes de lipides totaux des cellules L.

	PI.	PG.	PE.	CL.	LN.
14:0	2.71	11.67	4.73	5.71	6.75
14:1	ND	ND	ND	ND	ND
16:0	31.66	48.58	35.85	35.98	45.27
16:1 ⁹	ND	ND	0.61	ND	1.95
17:0 Δ	25.35	13.55	22.58	16.88	12.70
18:0	4.63	2.59	1.33	5.08	2.39
18:1 ⁹	2.51	5.33	2.78	5.10	5.22
18:1 ⁹ + 18:1 ¹¹	9.32	6.51	8.87	13.18	12.56
18:2	ND	ND	ND	ND	ND
19:0 Δ	23.82	11.77	18.26	18.07	9.81
20:0 Δ	ND	ND	ND	ND	ND
Inconnu	ND	ND	5.31	ND	3.37



Le 16:0 est majoritaire dans le PG et légèrement inférieur dans le LN avec respectivement 48,58 et 45,27%.

Le 16:1⁹ est retrouvé en très petites quantités seulement dans les familles PE et LN.

Le 17:0 Δ est majoritaire dans le PI suivi par le PE avec respectivement 25,35 et 22,58%. Le 17:1 n'a été détecté dans aucune des familles.

Le 18:0 est réparti assez régulièrement dans les différentes familles avec un léger pic dans la CL (5,08%). Par ailleurs, le 18:1⁹ est minoritaire dans les familles de PI et PE (2,51, 2,78%) et légèrement supérieur dans les autres familles. Cependant, le 18:1⁹ + 18:1¹¹ est retrouvé principalement dans les familles CL et LN (13,18 et 12,56%). Le 18:2 n'a été détecté dans aucune des familles étudiées.

Un pourcentage de 23,82 de 19:0 Δ fut retrouvée dans le PI. Sa concentration est semblable dans les familles PE et CL (18,26 et 18,07) et légèrement inférieure dans les PG et LN (11,77 et 9,81%).

Le 20:0 Δ n'a pu être détecté dans aucune des familles. Cependant un léger pourcentage d'acides gras inconnus fut retrouvé dans le PE et le LN.

2.5 Répartition des acides gras dans les différentes familles lipidiques des cellules R

La longueur des chaînes de carbone des acides gras varie entre 14 et 20 unités (Tableau VI et Figure 28) .

L'acide gras 14:0 est majoritaire dans la famille PG (8,96%) minoritaire dans le PE (2,34%) et absent dans le PI. Du 14:1 fut retrouvé en très petite quantité dans les LN (2,74%) et n'a pu être détecté ailleurs.

Le 16:0 est majoritaire dans le PG et également réparti dans les autres familles. Du 16:1⁹ fut détecté en de très faibles quantités dans les familles PE et LN (0,92 et 1,45%) et n'a pu être détecté ailleurs dans les autres groupes.

Le 17:0 Δ est également réparti dans toutes les familles, avec une légère majorité dans le PE. Il n'y a pas eut de 17:1 de détecté.

Le 18:0 est majoritaire dans le PI et le CL (7,85 et 6,89%) et retrouvé en de très petites quantités dans les autres familles. Le 18:1⁹ est surtout retrouvé dans le PI. Il est aussi retrouvé en des quantités moindres dans le CL et LN. Les familles PG et PE possèdent très peu (3,66 et 3,35%) de cet acide gras. Le 18:1⁹ + 18:1¹¹ est réparti

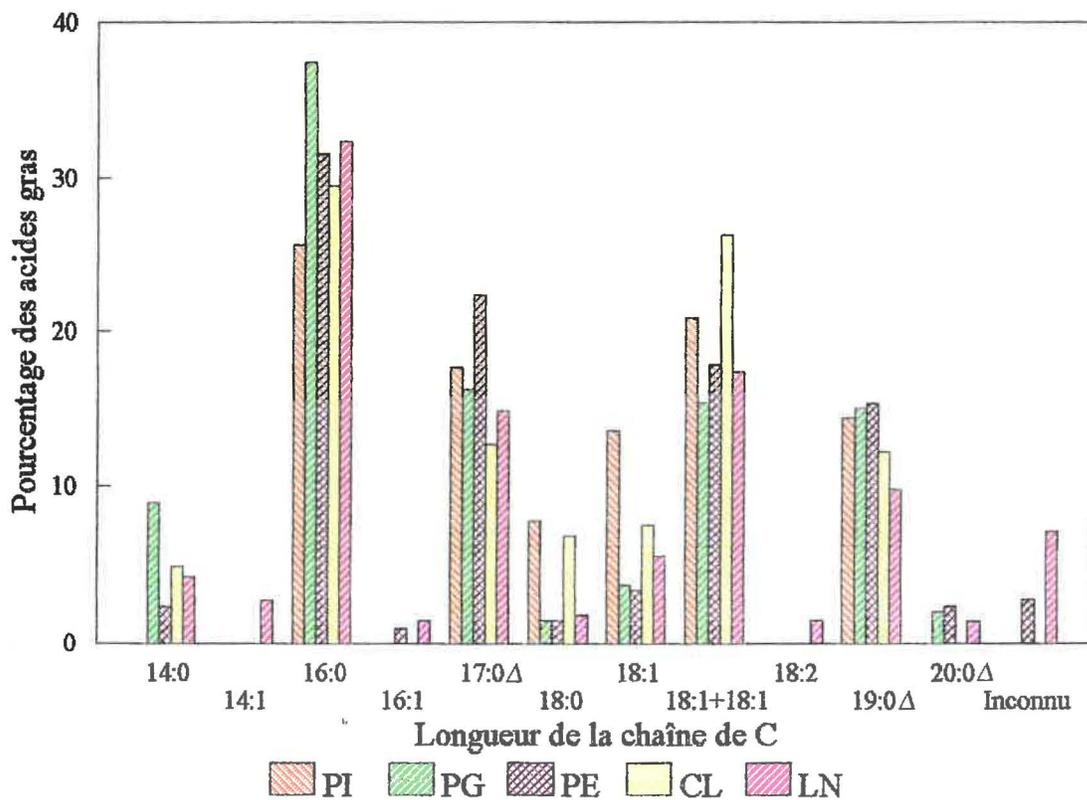
Tableau VI:

Pourcentage des acides gras contenus dans les différentes familles de lipides totaux des cellules R (GMS).

Figure 28:

Histogramme représentant le pourcentage des acides gras contenus dans les différentes familles de lipides totaux des cellules R.

	PI.	PG.	PE.	CL.	LN.
14:0	ND	8.96	2.34	4.91	4.25
14:1	ND	ND	ND	ND	2.74
16:0	25.70	37.44	31.56	29.50	32.38
16:1 ⁹	ND	ND	0.92	ND	1.45
17:0 Δ	17.62	16.22	22.33	12.65	14.82
18:0	7.85	1.44	1.46	6.89	1.78
18:1 ⁹	13.55	3.66	3.35	7.54	5.52
18:1 ⁹ + 18:1 ¹¹	20.92	15.32	17.79	26.37	17.30
18:2	ND	ND	ND	ND	1.42
19:0 Δ	14.37	14.97	15.25	12.15	9.81
20:0 Δ	ND	2.00	2.31	ND	1.37
Inconnu	ND	ND	2.70	ND	7.18



également dans les familles PG, PE et LN et, est retrouvé majoritairement dans les familles PI et CL (20,92 et 26,37%). Du 18:2 fut retrouvé en très petite quantité dans les LN et n'a pu être détecté ailleurs.

Le 19:0 Δ est réparti uniformément dans les différentes familles de lipides.

Le 20:0 Δ fut détecté en faibles quantités dans les familles PG, PE et LN. Il ne fut pas détecté dans les groupes PI et CL.

Un faible pourcentage d'acides gras inconnu fut retrouvé dans les familles PE et LN.

Lorsque les répartitions en acides gras des différentes familles lipidiques des cellules L et R sont comparées, quelques différences apparaissent.

Les quantités de 14:0 et de 16:0 sont légèrement supérieures dans toutes les familles lipidiques des cellules L. La répartition des 17:0 Δ et 18:0 est semblable chez les deux types cellulaires avec une petite différence dans le 18:0 contenu dans le PI des cellules R. Il en est de même pour le 19:0 Δ où la quantité de cet acide gras est seulement supérieure dans les familles PI et CL des cellules L.

La différence majeure entre les deux types cellulaires réside dans la concentration en acides gras 18:1⁹ + 18:1¹¹. Ces acides gras sont contenus en beaucoup plus grande quantité dans les cellules R pour toutes les familles étudiées. D'autres part, chez les cellules R, sont retrouvés des acides gras insaturés qui n'apparaissent pas chez les cellules L, tels que les 14:1, et 18:2.

2.6 Répartition des acides gras saturés et des acides gras insaturés dans les familles lipidiques des cellules L et R

Les cellules L possèdent un plus grand pourcentage d'acides gras saturés dans toutes les familles lipidiques étudiées. Principalement pour la famille PI (L) où un surplus de 25,67% d'acides gras saturés est retrouvé par rapport au PI des cellules R. Il en est de même pour les familles CL et LN (L) où respectivement 19,13 et 16,26% d'acides gras supplémentaires sont retrouvés (Tableau VII et Figure 29).

Inversement, les cellules R sont composées de plus d'acides gras insaturés. Principalement la famille PI (R) qui possède 65,67% d'acides gras insaturés de plus que le PI (L).

Tableau VII:

Pourcentage des acides gras saturés et insaturés contenus dans les différents groupes de lipides totaux des cellules L (GMR) et R (GMS).

Légende:

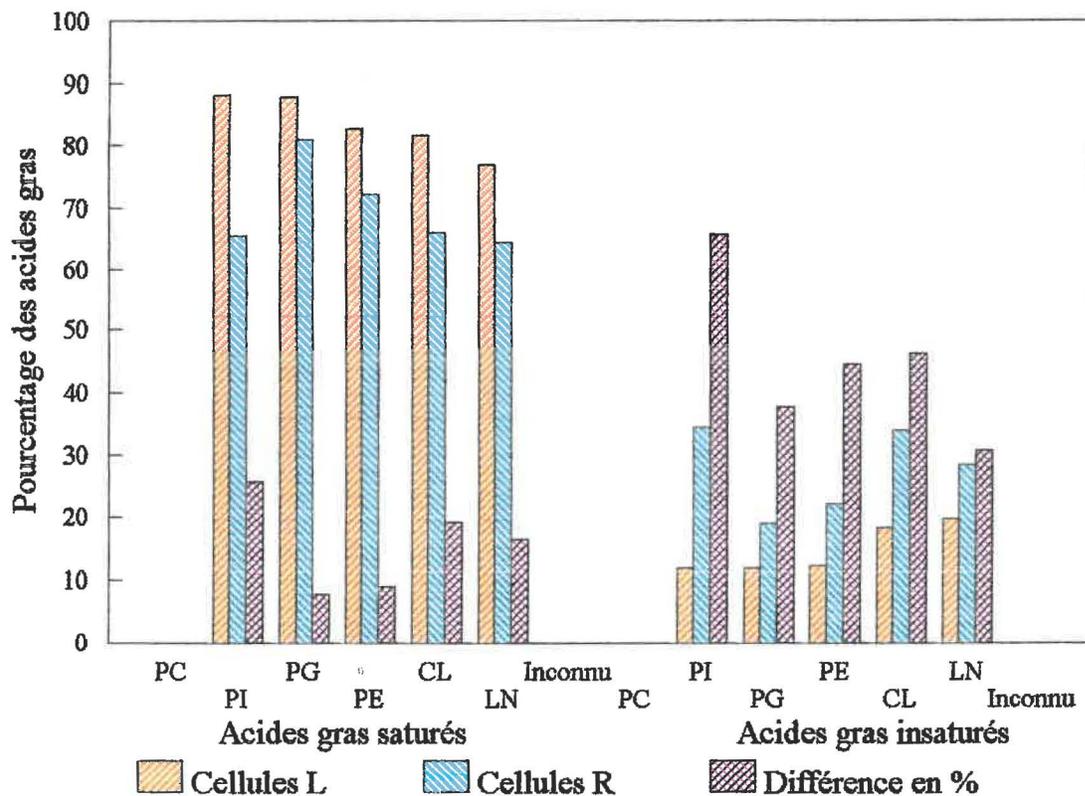
* : $((L-R)/L) \times 100$

** : $((R-L)/R) \times 100$

Figure 29:

Histogramme représentant le pourcentage des acides gras saturés et insaturés contenus dans les différents groupes de lipides totaux des cellules L et R.

	LIPIDES	CELLULES LISSES	CELLULES RUGUEUSES	DIFFÉRENCE en %
ACIDES GRAS SATURÉS	PC.	< 1	< 1	< 1 *
	PI.	88.17	65.54	25.67
	PG.	87.96	81.02	7.89
	PE.	82.75	72.25	9.07
	CL.	81.72	66.09	19.13
	LN.	76.91	64.41	16.26
	Inconnu	< 1	< 1	< 1
ACIDES GRAS INSATURÉS	PC.	< 1	< 1	< 1 **
	PI.	11.83	34.46	65.67
	PG.	11.84	18.98	37.61
	PE.	12.26	22.06	44.42
	CL.	18.28	33.91	46.09
	LN.	19.72	28.41	30.59
	Inconnu	< 1	< 1	< 1



2.7 Répartition des acides gras saturés et insaturés dans les lipides totaux membranaires des cellules L et R

Lorsque les acides gras membranaires sont comparés, les différences sont légèrement plus marquées (Tableau VIII et Figure 30). Ainsi, les cellules L possèdent 7,1% d'acides gras saturés de plus que les cellules R. Inversement, les membranes des cellules R sont composées de 35,89% d'acides gras insaturés de plus que les cellules L.

2.8 Composition des membranes cellulaires, des cellules L et R, en acides gras

Chez *Enterobacter*, selon nos déterminations, la longueur de la chaîne de carbone varie entre 14 et 19 unités (Tableau IX et Figure 31).

Les acides gras retrouvés principalement sont les 16:0, 17:0 Δ , 18:1⁹ + 18:1¹¹ et 19:0 Δ . Ces acides gras sont en grande partie les mêmes que ceux précédemment retrouvés dans les acides gras totaux.

Deux nouveaux acides gras sont retrouvés dans les membranes: soient le i-15:0 et le i-17:0. Leur quantité est relativement minime et aurait possiblement passé inaperçue lors de l'extraction des acides gras totaux.

Tableau VIII:

Pourcentage des acides gras saturés par rapport aux acides gras insaturés contenus dans les lipides membranaires des cellules L (GMR) et R (GMS).

Figure 30:

Histogramme représentant le pourcentage des acides gras saturés par rapport aux acides gras insaturés contenus dans les lipides membranaires des cellules L et R.

	CELLULES		DIFFÉRENCE
	L	R	en %
ACIDES GRAS SATURÉS	72.81	67.13	7.81
ACIDES GRAS INSATURÉS	19.10	29.79	35.89

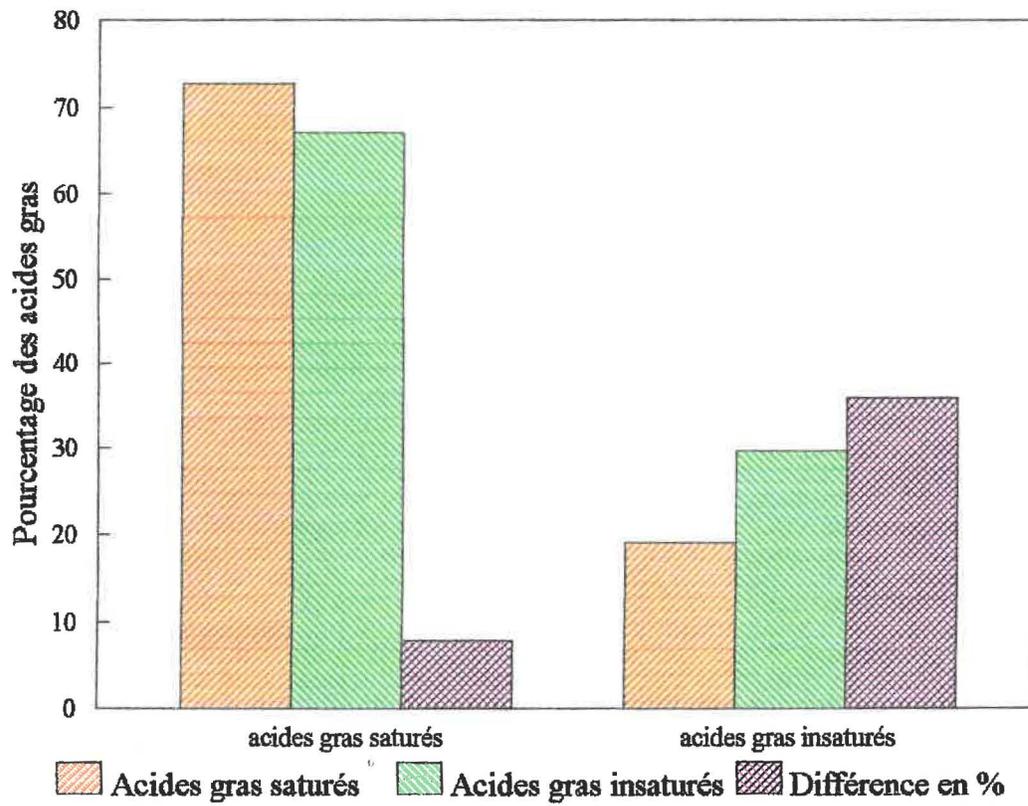


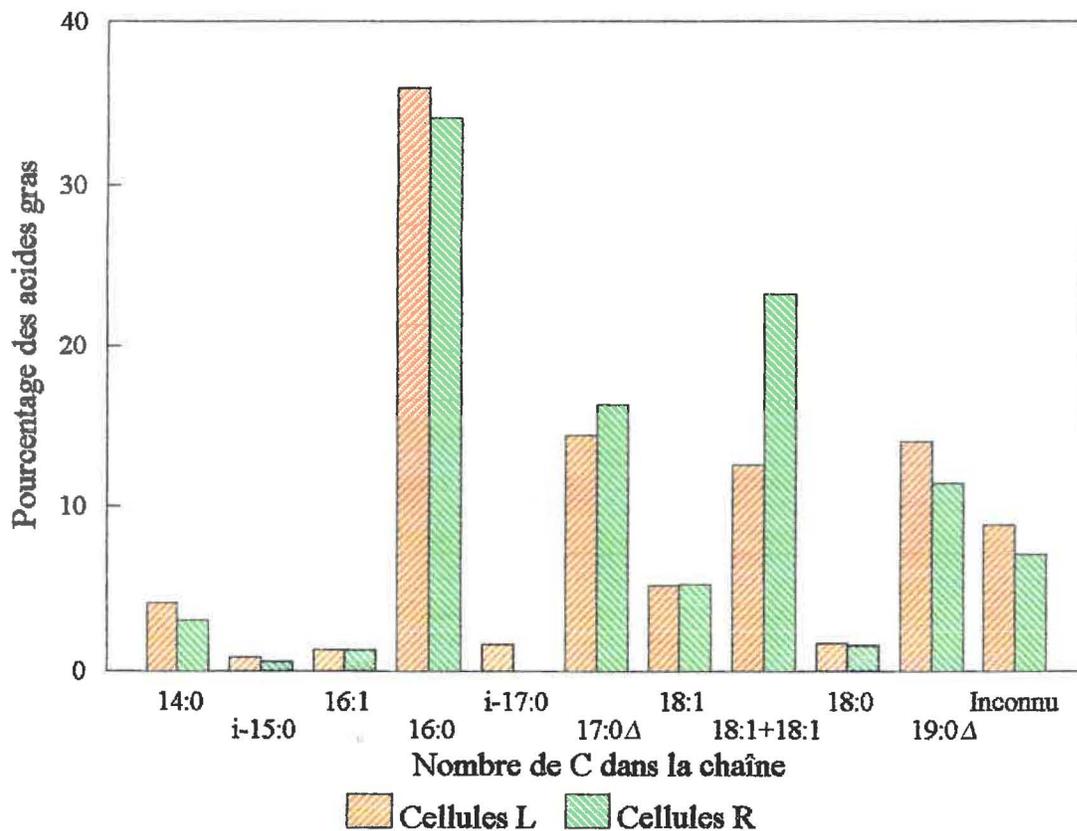
Tableau IX:

Pourcentage des acides gras contenus dans les lipides membranaires des cellules L (GMR) et R (GMS).

Figure 31:

Histogramme représentant le pourcentage des acides gras contenus dans les lipides membranaires des cellules L et R.

	CELLULES	
	Lisses	Rugueuses
14:0	4.12	3.1
i-15:0	0.87	0.62
16:1 ⁹	1.31	1.30
16:0	35.94	34.16
i-17:0	1.68	ND
17:0Δ	14.43	16.22
18:1 ⁹	5.2	5.26
18:1 ⁹ +18:1 ¹¹	12.60	23.23
18:0	1.74	1.57
19:0Δ	14.03	11.46
Inconnu	8.94	7.18



3. PURIFICATION DES LIPOPOLYSACCHARIDES DES SOUCHES GMR ET GMS

Étant donné les faiblesses de la méthode d'extraction utilisée la quantité de LPS obtenue fut minime. La séparation des LPS du être effectuée sur des mini-gels grâce au système Phast-System car il n'y avait pas assez de matériel pour une électrophorèse conventionnelle. Les gels obtenus ne permirent de démontrer aucune différence dans le contenu en LPS des souches GMR et GMS. Aucun résultat valable ne fut donc obtenu dans cette expérience.

4. ACTIVITÉ ESTÉRASIQUE

La production d'estérases hydrolysant les parabens fut rapportée chez *Pseudomonas aeruginosa*. Cette section est consacrée aux travaux visant la mise en évidence de cette activité et aux essais préliminaires de purification et de caractérisation des estérases hydrolysant les parabens, observées chez *Enterobacter*.

4.1 Mise en évidence du ou des enzymes dégradant les parabens sur les géloses TSA contenant du Propyl parabens précipité

La préparation (filtrat de culture) enzymatique,

ajoutée dans les puits, provoque, dépendant de la souche étudiée, des zones de disparition plus ou moins prononcées des parabens précipités (Figure 32 et 33) après une incubation de 24h à 30°C. Les puits contenant de la préparation enzymatique portée à ébullition ne montre aucune hydrolyse des parabens. Il en est de même pour les puits contrôles contenant seulement du milieu de culture. Ceci suggère donc que la dégradation des parabens chez la souche EM serait attribuable à une action enzymatique thermolabile contenue dans le filtrat de culture.

4.2 Préparation d'une solution concentrée d'enzymes

Des dosages protéiques (tests de Lowry) furent effectués à des intervalles de 30 min sur le surnageant d'une culture en milieu Davis supplémenté avec 1% de glucose, depuis son inoculation originale et jusqu'à 7h d'incubation à 40°C. Il fut déterminé que la plus grande concentration protéique dans le milieu survient vers la 6ième heure d'incubation à 40°C. Une culture de 2l en milieu Davis avec 1% de glucose, de EM incubée à 40°C durant 6 h qui fut concentrée au Pellicon.

4.3 Mesure de l'activité estérasique par un test colorimétrique et détermination des limites de détection

La concentration enzymatique est proportionnelle à la

Figure 32:

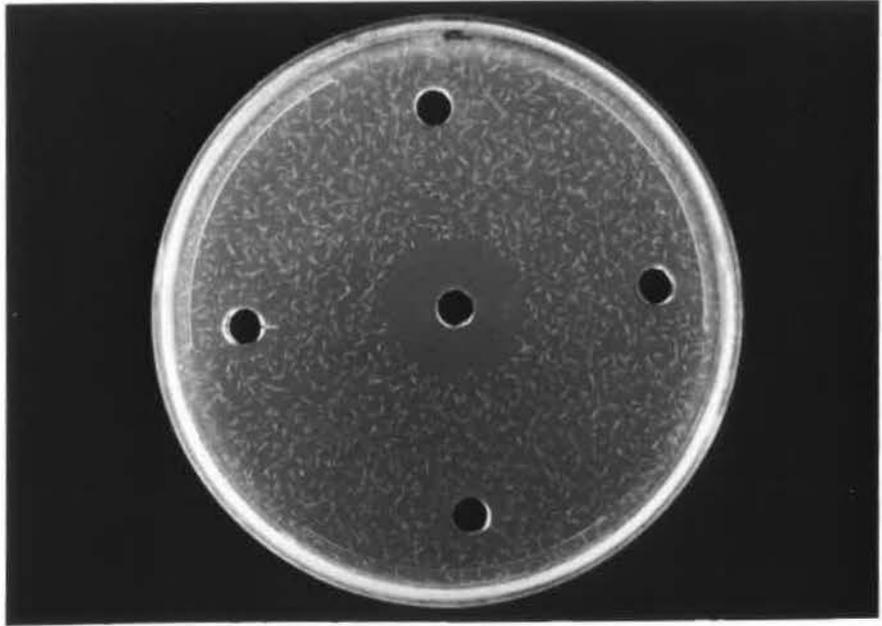
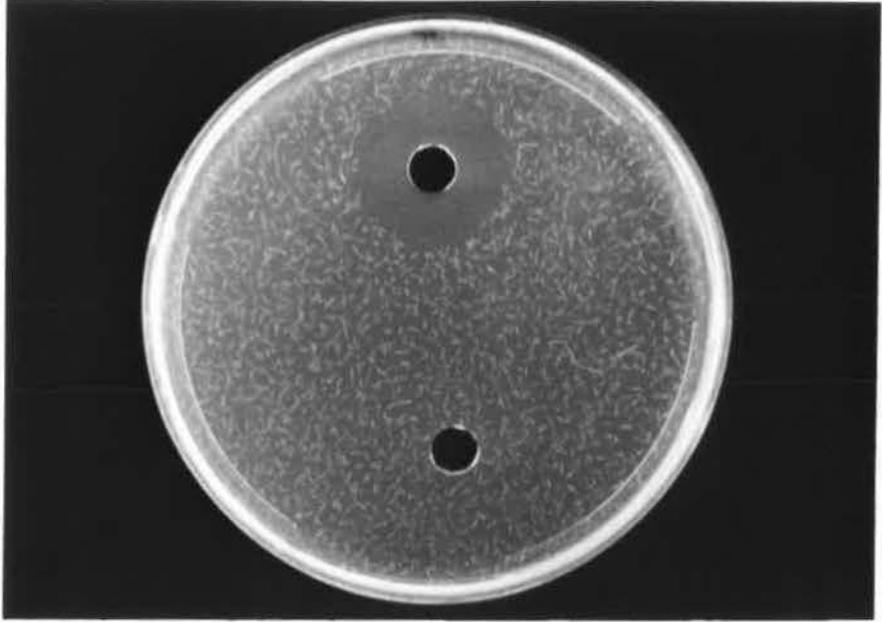
Hydrolyse des cristaux de propyl parabens précipités,
par un filtrat de culture de EM versus le même filtrat
porté à ébullition.

Figure 33:

Action des filtrats de culture des différentes souches
vis-à-vis des cristaux de propyl parabens précipités.

Légende:

Puit supérieur	:	E
Puit de droite	:	GMR
Puit inférieur	:	G
Puit de gauche	:	GMS
Puit central	:	EM



quantité de molécules de p-nitrophénol acétate apparue dans la solution après 5 min d'incubation à 40°C.

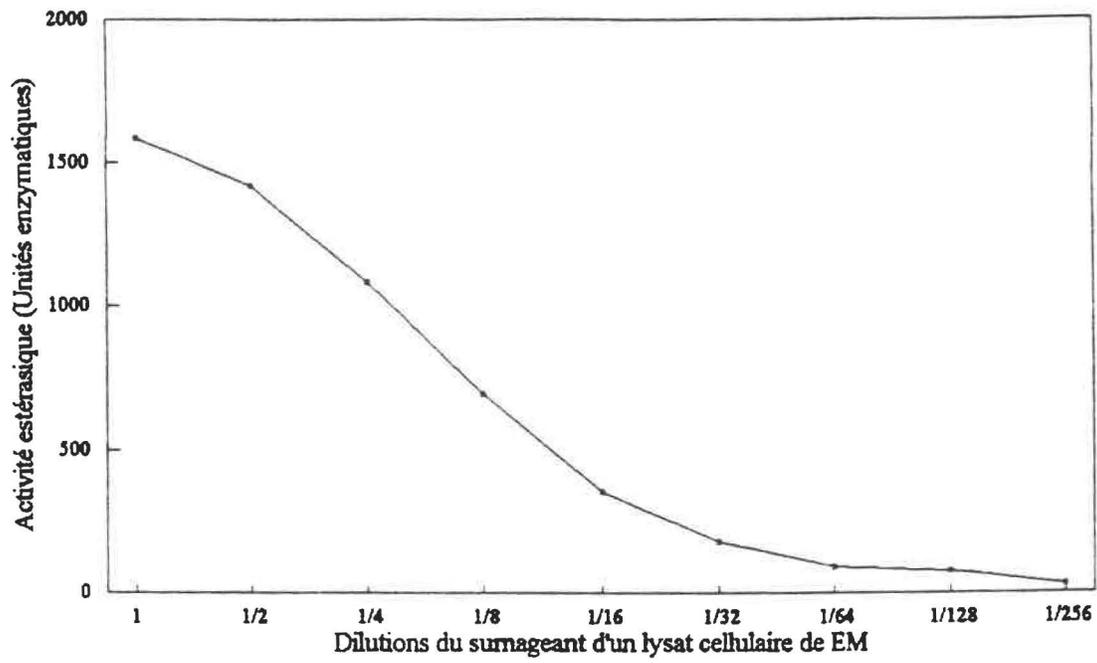
La limite de détection (Figure 34) du test fut établie comme étant la plus petite concentration de p-nitrophénol acétate détectée consécutivement dans trois essais différents. Lorsque le test n'était plus reproductible la valeur détectée était considérée comme non valide. La limite de détection fut donc établie à 40 µmol/ml. Toutes les valeurs inférieures à cette concentration furent considérées non significatives.

4.4 Enzymes intra ou extra-cellulaires? Produits par toutes les souches?

L'activité estérasique responsable de la dégradation des parabens semble n'être synthétisées que par la souche EM (Tableau X), selon le test enzymatique (au p-nitrophényl acétate). Toutes les autres souches se révélèrent négatives à ce test. Cependant, chez les souches E et G, une faible activité estérasique fut retrouvée dans les lysats cellulaires. La concentration était trop faible pour être détectable par le test enzymatique. Cependant, une très faible zone d'hydrolyse apparait au pourtour des puits correspondants sur les géloses contenant des cristaux de propyl parabens. Il est à noter que ces faibles zones d'hydrolyse ne sont pas présentes lorsque la solution

Figure 34:

Courbe déterminant la limite de détection du test colorimétrique permettant de mesurer l'activité estérasique.



enzymatique est chauffée.

Selon le Tableau X, il apparaît donc que seule la souche EM produit probablement une estérase en quantités appréciables. Les souches E et G semblent en produire à l'état de traces tandis que les souches GMR et GMS ne semblent pas en produire en quantités détectables.

4.5 Inductibilité enzymatique

Les densités optiques retrouvées après 24h et après 48h sont semblables dans toutes les cultures bactériennes. Donc, les parabens n'ont pas inhibé la croissance bactérienne (Tableau XI).

Cette activité enzymatique ne semble pas dépendre de la présence de parabens (Tableau XII). En effet, la même concentration enzymatique fut retrouvée dans les cellules ayant poussé en milieu Davis et en milieu supplémenté d'une petite quantité de parabens. Donc cette activité enzymatique serait constitutive ou induite par un autre substrat chez la souche EM étant donné que le substrat (parabens) n'est pas nécessaire pour qu'il y ait synthèse de l'enzyme.

Tableau X:

Détermination de l'activité estérasique intracellulaire
versus extracellulaire produite par les différentes
souches en milieu Davis et Davis avec parabens.

Légende:

L : Lysat cellulaire

NL : Surnageant de culture

Hydrolyse : Rayon de la zone de d'hydrolyse (cm)

Souches	Milieu		Enzymes Unités/ml	Zone d' Hydrolyse	DO Initiale à 650 nm	DO Finale à 650 nm
E	Davis	L	0	0.5	0.075	0.323
		NL	0	0		
	Davis+P	L	0	0.5	0.071	0.02
		NL	0	0		
EM	Davis	L	260.5	1	0.066	0.331
		NL	64.4	1		
	Davis+P	L	45.8	1	0.076	0.113
		NL	0	0		
G	Davis	L	0	0.5	0.069	0.29
		NL	0	0		
	Davis+P	L	0	0.5	0.067	0.05
		NL	0	0		
GMR	Davis	L	0	0.3	0.067	0.313
		NL	0	0		
	Davis+P	L	0	0	0.067	0.036
		NL	0	0		
GMS	Davis	L	0	0	0.073	0.222
		NL	0	0		
	Davis+P	L	0	0	0.065	0.023
		NL	0	0		

Tableau XI:

Croissance de la souche EM lors de plusieurs passages en milieu Davis et Davis avec deux concentrations de parabens. Densité optique en fonction du temps.

Tableau XII:

Activités estérasiques produites par la souche EM après deux passages en milieu Davis et Davis avec deux concentrations de parabens. Lysat cellulaire par rapport à un surnageant de culture.

Milieux	DO 1	DO 2	DO 3	DO 4
	à 650 nm 0h	à 650 nm 24h	à 650 nm 0h	à 650 nm 48h
Davis	0.077	0.314	0.071	0.613
Davis	0.076	0.334	0.076	0.575
1/10 M+P	0.078	0.316	0.077	0.673
1/10 M+P	0.073	0.345	0.075	0.585
1/5 M+P	0.075	0.283	0.078	0.541
1/5 M+P	0.077	0.306	0.077	0.666

	Lysat cellulaire (Unités/ml)	Surnageant de culture (Unités/ml)
Davis	1068.3	124.1
Davis + 1/10 M+P	1011.6	75.8
Davis + 1/5 M+P	1048.8	79.3

4.6 Conditions optimales pour l'absorption des enzymes sur des résines échangeuses d'ions

Selon les tests enzymatiques effectués, il semble que la résine qui adsorbe le plus le ou les enzymes responsables de la dégradation des parabens soit la CM. Le tampon utilisé fut du NAP à 0,05M et pH 6,3.

4.7 Conditions d'élution des enzymes

Les conditions d'élution ne pûrent pas être déterminées car l'activité estérasique ne fut jamais retrouvée à la sortie de la colonne. Les conditions testées ne permettaient apparemment pas de maintenir l'activité et de la retrouver lors de l'élution.

Les différents co-facteurs testés pouvant potentiellement améliorer la stabilité de l'activité enzymatique n'ont donné aucun résultat.

Par ailleurs, l'activité enzymatique ne diminue pas lors de l'ajout de quantités, mêmes importantes, de NaCl.

Les auteurs des futurs travaux de purification devront tenir compte de ces résultats préliminaires.

5. DÉTECTION DE LA PRÉSENCE D'UN PLASMIDE CHEZ LES SOUCHES D'*Enterobacter*

Un plasmide de haut poids moléculaire (environ 12 KB) est très probablement présent chez la souche EM (Figure 36, puit 7). Les autres souches ne montrent aucun fragment pouvant être associé à une présence plasmidique.

Figure 35:

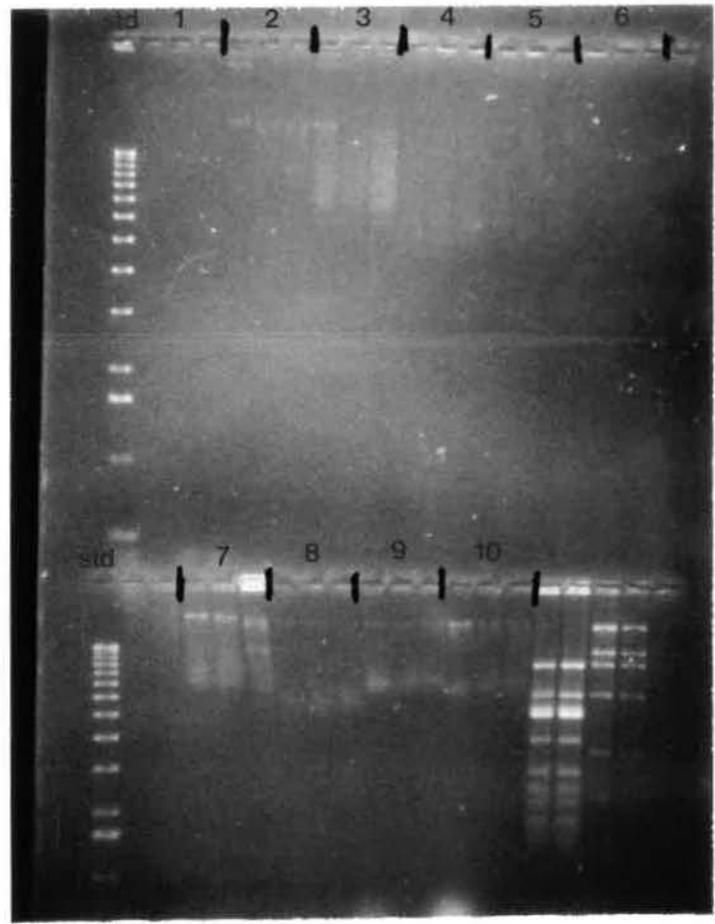
Détection d'un plasmide de haut poids moléculaire dans la souche EM.

Légende:

Puits 1 : Souche E	6 : Souche E 2x
2 : Souche EM	7 : Souche EM 2x
3 : Souche G	8 : Souche G 2x
4 : Souche GMR	9 : Souche GMR 2x
5 : Souche GMS	10 : Souche GMS 2x

2x: Les puits furent chargés avec deux fois plus de matériel.

Std: 1KB Ladder. Les poids moléculaires vont de 1 à 12 KB



DISCUSSION.

1. CARACTÉRISATION DES DIFFÉRENTES SOUCHES

1.1 Température optimale

La détermination de la température optimale de croissance des différentes souches, permet d'en sélectionner une et de l'utiliser durant toutes les expériences. La température de 30°C fut choisie car la croissance bactérienne s'avéra trop lente à la température de la pièce (22°C), bien que le développement des *Enterobacter* dans le supplément minéral, se produise à cette température. D'autre part, la température de la pièce n'était pas constante, des variations de plusieurs degrés pouvant survenir de temps à autre. La température de 37°C fut également éliminée même si, selon la littérature, celle-ci est la température optimale de croissance pour le groupe des *Enterobacteriaceae*, car la température de conservation du supplément minéral est d'environ 20-22°C. D'autre part, à 37°C, l'effet des parabens semble accru et les souches résistantes se multiplient difficilement.

Donc, 30°C étant la température de compromis se rapprochant des conditions de conservation du produit tout en permettant aux souches résistantes de croître en milieu supplémenté en parabens, elle fut retenue pour la présente étude.

1.2 Courbes de croissance

Les courbes de croissance en milieux différents permirent de déterminer la durée relative des différentes phases de la croissance bactérienne.

En milieu TSB, il n'y a pratiquement pas de phase de latence pour un inoculum moyen, la phase logarithmique dure environ 48h puis la phase stationnaire est atteinte. Lorsque le milieu est supplémenté en méthyl- uniquement, ou méthyl- et propyl parabens, seules les souches résistantes (EM, G et GMR) parviennent à s'y multiplier. La croissance a lieu après une phase de latence plus ou moins longue, dépendant de la concentration en parabens ou la taille de l'inoculum. Le propyl parabens semble moins efficace que le méthyl parabens aux concentrations utilisées dans le supplément minéral. En effet, toutes les souches, même les sensibles, peuvent se multiplier en TSB supplémenté en propyl parabens. Ceci est probablement dû au fait qu'il est utilisé à des concentrations trop faibles (concentrations limitées par la faible solubilité du produit).

Les parabens possèdent donc un bon pouvoir bactériostatique vis-à-vis *Enterobacter*. Ce pouvoir semble s'accroître en fonction de la température. Ceci peut être dû au fait que les membranes bactériennes, sont plus

fluides et plus perméables à des températures plus élevées (Nikaido *et al.* 1985). L'action des parabens serait donc accrue puisque ceux-ci pourront pénétrer plus facilement à travers les membranes.

Les sels minéraux contenus dans le supplément minéral semblent également posséder un certain pouvoir bactériostatique. En effet, une phase de latence prolongée est observée lors de la croissance bactérienne en milieu minimal Davis supplémenté en ions. Il n'y a pas de phase de latence en milieu minimal seul.

1.3 Antibiogramme

Une corrélation positive semble apparaître entre la résistance aux parabens et l'ampicilline. Toutes les souches résistantes aux parabens le sont également vis-à-vis de l'ampicilline. La présence d'un plasmide pourrait être à l'origine de ces deux résistances (Russell 1985).

2. COMPOSITION EN LIPIDES ET ACIDES GRAS DES SOUCHES GMR ET GMS

2.1 Composition en lipides totaux

Les différentes familles lipidiques sont réparties plus ou moins également entre les souches GMR et GMS. Des différences apparaissent cependant dans la concentration en PG et PE. Le rôle de ces différents groupes lipidiques n'est pas encore bien connu et les différences observées peuvent être dues à un problème de métabolisme de la part des souches. Au niveau cellulaire les groupements lipidiques servent de point d'attache aux acides gras. Étant donné qu'il n'y a pas eu de différences marquées, au niveau de la concentration lipidique entre les deux souches étudiées, on peut supposer que seule la composition en acides gras est à l'origine de la différence de perméabilité membranaire observée.

2.2 Composition en acides gras totaux et membranaires

Au niveau membranaire, la souche GMR contient beaucoup plus d'acides gras saturés par rapport à la souche GMS. Les acides gras saturés sont majoritaires dans toutes les familles lipidiques de la souche GMR. Ceci rend les membranes de celle-ci plus rigides (ou moins fluides) et subséquemment moins perméables aux petites molécules

hydrophobes dont les parabens. La souche GMR sera donc plus résistante aux parabens par rapport à la souche GMS. La souche GMS est, quant à elle, composée essentiellement d'acides gras insaturés. Les parabens et autres molécules hydrophobes pourront donc pénétrer assez facilement à l'intérieur de la cellule pour affecter la synthèse protéique et autres mécanismes vitaux tels la synthèse de l'ARN et de l'ADN.

Ces résultats supportent l'hypothèse voulant que la cible cellulaire des parabens soit effectivement la synthèse protéique et la réplication de l'ADN et de l'ARN.

3. COMPOSITION EN LPS DES PAROIS CELLULAIRES DES SOUCHES GMR ET GMS

L'extraction des LPS n'a pas donné les résultats escomptés. Selon la littérature, les cellules rugueuses (sensibles aux parabens) ne devraient pas posséder la chaîne O composante des LPS (Russell et al. 1985). Cette carence permettrait aux parabens d'atteindre facilement la paroi, de la traverser puis de déstabiliser la membrane bactérienne. Lorsque la membrane est traversée, l'agent bactériostatique empêchera la synthèse protéique et pourra interférer avec d'autres mécanismes cellulaires (tel que décrit plus haut). Les parois des cellules lisses

(résistantes aux parabens) devraient contenir ces chaînes d'oligosaccharides. Ceux-ci seraient comme une barrière protectrice empêchant les parabens d'atteindre les parois et les membranes bactériennes.

La technique utilisée fut celle de Darveau et Hancock (1983). Malgré les tentatives répétées, il s'avéra impossible d'obtenir les mêmes résultats que les auteurs. Les pertes que nous avons obtenues suite aux différentes manipulations ont été très importantes et les résultats obtenus n'ont pas été reproductibles. En effet, la méthode d'extraction utilisée procède par élimination (digestion de l'ARN et de l'ADN par des enzymes, élimination du peptidoglycan par centrifugation, digestion des protéines par des protéases, lyophilisation du produit final, mise en évidence des chaînes O par des gels de polyacrilamide, etc.). Chaque étape donne lieu à des pertes de matériel à cause des manipulations. Étant donné que le matériel de départ est peu concentré en LPS ces pertes peuvent sérieusement influencer la validité des résultats.

De plus, les protéines contenues dans les échantillons ne sont jamais totalement éliminées. Lorsque les gels de polyacrylamide sont colorés au nitrate d'argent (méthode très sensible) la moindre contamination protéique apparaît et fausse les résultats. D'autre part, les cellules rugueuses ne sont pas supposées contenir de chaînes O.

Étant donné que la technique utilisée prévoit purifier les chaînes O contenues dans les LPS il ne devrait pratiquement rien rester dans le flacon des cellules GMS après la lyophilisation finale. Dans les résultats, les auteurs démontrent qu'aucune bande n'est visible dans les puits chargés avec des LPS provenant des cellules rugueuses. Si les cellules rugueuses ne possèdent pas de chaînes O (but de la purification) avec quel matériel les auteurs ont-ils rempli les puits du gel de polyacrilamide?

Malheureusement, à notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature une autre méthode permettant d'extraire efficacement les LPS des deux types cellulaires (lisses et rugueux) à la fois. La méthode la plus communément utilisée est celle mise au point par Westphal *et al.* (1952, 1965). La méthode est basée sur l'extraction au phénol à chaud. Cependant elle ne semble pas extraire complètement les LPS des mutants rugueux.

Une autre méthode d'extraction permet d'obtenir les LPS hydrophobes contenus dans les mutants rugueux. Cette méthode est une extraction au phénol-chloroforme-ether de pétrole mise au point par Galanos *et al.* (1969).

Il est très difficile de comparer les résultats de deux extraction de LPS obtenues suivant deux méthodes différentes car les pertes en cours d'extraction différent

de façon significative selon les méthodes. La méthode de Darveau et Hancock fut choisie car elle permettait, selon les auteurs, d'extraire les chaînes O des LPS simultanément dans les deux types bactériens.

Finalement, les contraintes du temps n'ont pas permis de procéder à une étude comparative et exhaustive des méthodes d'extraction des LPS. Ce qui d'ailleurs n'était pas dans les objectifs principaux du présent travail.

4. ENZYMES DÉGRADANT LES PARABENS

La souche EM semble être la seule à synthétiser, en quantité appréciable, un ou des enzymes de type estérase hydrolysant les parabens. Des traces d'enzymes furent également détectées chez les souches GMR, G et E. Cet enzyme intracellulaire, dont la synthèse ne semble pas inductible par la présence de molécules de parabens, est toujours retrouvé à l'état de traces dans les cellules, plus particulièrement dans la souche EM. Cette estérase aurait entre autres la capacité d'hydrolyser les parabens, toutefois sa spécificité envers les parabens n'a pas été démontrée.

Les tentatives préliminaires en vue de purifier l'estérase n'ayant pas abouti, rien n'est encore connu sur

les caractéristiques moléculaires de cet enzyme. Par ailleurs, les recherches de Zedan et Serry (1984) rapportent l'existence d'un enzyme semblable chez *Pseudomonas aeruginosa*, mais aucune étude publiée ne fait état de la caractérisation d'un tel enzyme.

Dans un projet futur dont l'objectif principal serait l'étude de cet enzyme, il faudrait tenter de purifier l'enzyme à partir d'un volume important de préparation cytoplasmique. Les protéines, présentes dans la fraction cytoplasmique, pourraient être précipitées au sulfate d'ammonium à différentes concentrations. Après l'ajout de chaque concentration, le précipité obtenu devrait être dialysé et resuspendu dans un tampon adéquat et testé pour vérifier la présence de l'activité estérasique. Ceci permettrait de fractionner la préparation cytoplasmique et d'éliminer rapidement les protéines inutiles. Lorsque la préparation serait assez purifiée elle devrait contenir des quantités appréciables d'estérases. Cette préparation pourrait, par la suite, être utilisée pour des essais de purification sur HPLC.

D'autre part, il faudrait absolument résoudre le problème de la perte de l'activité estérasique observée lors de l'absorption des protéines sur les colonnes échangeuses d'ions du HPLC. Pour ce faire, il faudrait trouver une façon de stabiliser l'activité estérasique de

la préparation enzymatique. Si ce problème n'est pas résolu, la purification de cette estérase pourrait s'avérer très problématique. Il est cependant probable que les problèmes rencontrés durant les travaux préliminaires de purification de l'enzyme soient dus au fait que la solution de départ ne fut pas assez concentrée. Dès lors, la moindre perte d'activité pouvait engendrer des résultats non significatifs.

5. PRÉSENCE DE PLASMIDES DE RÉSISTANCE

Des plasmides de résistance peuvent être à l'origine de la résistance vis-à-vis aux parabens. En effet, les travaux de Russell (1985) démontrent que des plasmides peuvent être à l'origine de plusieurs cas de résistance face aux antibiotiques.

Lors de l'extraction plasmidique, un plasmide de très haut poids moléculaire fut mis en évidence chez la souche EM. Cette souche est par ailleurs résistante à plusieurs antibiotiques.

Étant donné que seule la souche EM synthétise des quantités appréciables d'enzymes, il se pourrait que le plasmide détecté améliore la synthèse existant normalement dans la cellule. Ceci aurait pour effet de rendre les

cellules d'*Enterobacter cloacae* isolées dans le supplément minéral, résistantes aux parabens. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait extraire une bonne quantité de plasmides puis en cliver une partie avec des enzymes de restriction. Le plasmide ainsi que chaque fragment (circulaire) obtenu serait introduit dans une souche de *Escherichia coli* sensible aux parabens. La souche ainsi transformée serait testée en vue de vérifier sa capacité de résistance aux parabens. Si sa résistance vis-à-vis des parabens augmente, ceci suggérerait que le fragment de plasmide incorporé coderait pour la synthèse d'un enzyme impliqué dans la résistance aux parabens.

Par la suite, des études pourraient être entreprises pour séquencer le fragment d'ADN codant pour l'estérase clivant les parabens. Là encore, ces travaux futurs pourraient certainement faire l'objet d'un travail de maîtrise.

CONCLUSION .

La particularité de ce travail fut de partir d'un problème actuellement présent dans l'industrie et de tenter de l'élucider non pas par des recherches empiriques mais par la recherche fondamentale.

L'objectif principal de ce travail fut d'élucider les différents mécanismes impliqués dans la résistance aux parabens rapportée chez *Enterobacter gergoviae* et *Enterobacter cloacae* isolés à partir d'un supplément minéral.

Deux mécanismes de résistance furent mis en évidence, soient: la modification de la composition en acides gras et la synthèse d'un ou plusieurs enzymes dégradant les parabens.

Les souches d'*Enterobacter gergoviae* semblent résister à l'action des parabens en modifiant la composition en acides gras des membranes cellulaires, rendant celle-ci moins perméables aux petites molécules hydrophobes et limitant ainsi l'action des parabens sur les mécanismes de synthèse des protéines et sur la réplication des acides nucléiques.

D'autre part, la souche *Enterobacter cloacae* (EM) démontre la capacité de synthétiser, en quantités appréciables, un enzyme de type estérase pouvant hydrolyser

les parabens. L'acide para-hydroxybenzoïque, provenant du clivage du lien ester des parabens, est rapidement métabolisé lors de la croissance bactérienne. Étant donné les limites de temps, la caractérisation poussée de l'enzyme n'a pu être poursuivie. Néanmoins, les tentatives préliminaires de purification, serviront lors de la poursuite des travaux par un autre étudiant.

L'extraction des LPS ne fut pas concluante étant donné les faiblesses de la méthode utilisée. Pour arriver à des résultats valables il serait probablement souhaitable d'effectuer une étude comparative des différentes techniques connues d'extraction des LPS puis d'en sélectionner une adéquate. Ce genre d'étude ne fait en aucun cas partie des objectifs principaux de ce travail.

Finalement, un plasmide de haut poids moléculaire fut mis en évidence chez la souche EM. Ce plasmide pourrait améliorer la production d'estérases de cette souche et ainsi la rendre résistante aux parabens. Des études pourraient être entreprises ultérieurement pour déterminer le rôle exact du plasmide et séquencer la partie codant pour l'enzyme si celui-ci s'avère porter cette information.

La compréhension des différents mécanismes régissant la résistance aux parabens pourra faciliter la mise au point de nouveaux systèmes de conservation qui pourront

stabiliser, à long terme, les produits actuellement stabilisés par l'addition de parabens.

ANNEXELocalisation des différent fournisseurs cités dans le
texte:

Aldrich chemical company, Milwaukee, WI., États-Unis

BDH (Distributeur de Difco), St-Laurent, Qué., Canada

J.T. Baker chemical company, Phillipsburg, NJ., États-Unis

Millipore Waters Chromatography, Milford, Mas., États-Unis

Pharmacia, Baie d'Urfe, Qué. Canada

Quélab, Laval, Qué., Canada

Sigma Chemical company, St-Louis, MO, États-Unis

REMERCIEMENTS.

Je remercie sincèrement mon directeur de recherche, le Dr. Gilles Paquette, pour son support moral et financier et pour ses conseils toujours judicieux qui ont su m'inspirer et me guider tout au long de ma maîtrise.

Je remercie aussi Louise Labrie, Guy McSween, et Yves Hurtubise pour leur aide technique qui fut grandement appréciée.

Je voudrais également remercier Rita Piché, Annic Charest et Stéphane La Roche pour leur amitié et leur confiance qui restèrent fidèles quelles que soient les circonstances.

Finalement, je remercie tout le personnel et les étudiants qui ont contribué de près ou de loin à rendre mon séjour agréable à l'Institut Armand-Frappier et facilité la réalisation de mon projet de maîtrise.

BIBLIOGRAPHIE.

- ALAIN, R., L. BERTHIAUME et M. TRUDEL. 1989. "Microscopie électronique", dans Payment, P et M, Trudel: Manuel de Techniques Virologiques. Québec, Presse Université du Québec: 107-119
- AMES, G.F. 1968. Lipids of *Salmonella typhimurium* and *Eschericia coli*: Structure and Metabolism. J. Bacteriol. 95: 833-843.
- BERGMANN, F., S. RIMON and R. SEGAL. 1958. Effect of pH on the Activity of Eel Esterase towards Different Substrates. Biochem. J., London 68: 493-499.
- BEVERIDGE, E.G. and A. HART. 1970. The Utilisation for Growth and the Degradation of P-Hydroxybenzoate Esters by Bacteria. Int Biotetn. Bull. 6:9-12.
- BLIGH, E.G. and W.J. DYER. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37:911-917.
- DARVEAU, R.P. and R.E.W. HANCOCK. 1983. Procedure for Isolation of Bacterial Lipopolysaccharides from Both Smooth and Rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. J. Bacteriol. 155: 831-838.
- EKLUND, T. 1980. Inhibition of Growth and Uptake Processes in Bacteria by Some Chemical Food Preservatives. J. Appl. Bacteriol. 48: 423-432.
- EKLUND, T. 1985. Inhibition of microbial growth at different pH levels by benzoic and propionic acids and esters of *p* - hydroxybenzoic acid. Int. J. Food Microbiol. 2: 159-167.
- GALANOS, C., O. LÜDERITZ and WESTPHAL, O. 1969. Extraction of R Lipopolysaccharides. Eur. J. Biochem. 9: 245-249.
- GILLILAND, D., A. LI WAN PO and E. SCOTT. 1992. The bactericidal activity of a methyl and propyl parabens combination: isothermal and non-isothermal studies. J. Appl. Bacteriol. 72: 252-257.
- GILLILAND, D., A. LI WAN PO and E. SCOTT. 1992. Kinetic evaluation of claimed synergistic parabens combination using a factorial design. J. Appl. Bacteriol. 72: 258-261.
- HAAG, T.E. and D.F. LONCRINI. 1984. Esters of Para-Hydroxybenzoic acid. Cosmet. Sci. Technol. Ser. (Cosmet. Drug. Preserv.) 1: 63-77.

- KEWELOH, H., R. DIEFENBACH and H-J. REHM. 1991. Increase of phenol tolerance of *Escherichia coli* by alterations of the fatty acid composition of the membrane lipids. Arch. Microbiol. 157: 49-53.
- KOMAGATA, K. and K.I. SUZUKI. 1987. Lipid and Cell-Wall Analysis in Bacterial Systematics. Methods in Microbiol. 19: 161-207.
- MANNING, P.J., M.A. NAASZ, D. DELONG and S.L. LEARY. 1986. Pasteurellosis in Laboratory Rabbits: Characterization of Lipopolysaccharides of *Pasteurella multocida* by Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Immunoblot Techniques, and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Infect. and Immun. 53: 460-463.
- MARWAN, A.G. and C.W. NAGEL. 1986. Quantitative Determination of Infinite Inhibition Concentrations of Antimicrobial Agents. Appl. Environ. Microbiol. 51: 559-561.
- MAYER, H., R.N. THARANATHAN and J. WECKESSER. 1985. Analysis of Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria. Methods in Microbiol. 18: 157-207.
- MOIR, C.J. and M.J. EYLES. 1992. Inhibition, Injury, and Inactivation of Four Psychrotrophic Foodborne Bacteria by the Preservatives Methyl *p*-Hydroxybenzoate and Potassium Sorbate. J. Food Protection. 55: 360-366.
- NES, I.F. & T. EKLUND. 1983. The effect of parabens on DNA, RNA and protein synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol. 54: 237-242.
- NIKAIDO, H. and M. VAARA. 1985. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability. Microbiol. Rev. 49: 1-32.
- O'NEIL, J. and MEAD, C. 1981. The parabens: bacterial adaptation and preservatives capacity, presentation made to the Society of Cosmetic Chemists, Washington, D. C.
- ROBERTS, T.A. 1989. Combination of Antimicrobials and Processing Methods. Food Technol. 43: 156-163.
- RUSSELL, A.D. 1985. The role of plasmids in bacterial resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives. J. Hosp. Infect. 6: 9-19.
- RUSSELL, N.J. 1989. Functions of lipids: Structural roles and membrane functions. Microbial Lipids. 2: 279-365.

- RUSSELL, A.D., J.R. FURR and W.J. PUGH. 1985. Susceptibility of porin- and lipopolysaccharide-deficient mutants of *Escherichia coli* to a homologous series of esters of *p*-hydroxybenzoic acid. *Internat. J. Pharm.* 27: 163-173
- RUSSELL, A.D. & G.W. GOULD. 1988. Resistance of Enterobacteriaceae to preservatives and disinfectants. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.*, pp. 167S-195S
- STAUFFER, C.E. 1975. A linear standard curve for the Folin Lowry determination of protein. *Anal. Biochem.* 69: 646-648.
- TATSUGUCHI, K., S. KUWAMOTO, M. OGOMORI, IDE and T. WATANABE. 1991. Membranes Disorders of *Escherichia coli* and Liposomes Induced by *p*-Hydroxybenzoic Acid Esters (The Antimicrobial Action of *p*-Hydroxybenzoic Acid Esters.V). *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 32: 121-127.
- TSAI, C.M. and C.E. FRASCH. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 119: 115-119.
- TSUCHIDO, T. and M. TAKANO. 1988. Sensitiation by Heat Treatment of *Escherichia coli* K-12 Cells to Hydrophobic Antimicrobial Compounds. *Antimicrob. Agents and Chemot.* 32: 1680-1683.
- WAGNER, M.K. and L.J. MOBERG. 1989. Present and Future Use of Traditional Antimicrobials. *Food Technol.* 43: 143-147, 155
- WESTPHAL, O., O. LÜDERITZ and F. BISTER. 1952. Extraction of bacteria with phenol/water. *Z. Naturforsch.* 7b: 148-155.
- WESTPHAL, O. and K. JANN. 1965. Bacterial Lipopolysaccharides. Extraction with Phenol-Water and Further Applications of the Procedure. *Methods Carbohydr. Chem.* 5: 83-91.
- ZEDAN, H.H. and FATHY M. SERRY. 1984. Metabolism of Esters of *p*-Hydroxybenzoic Acid by a Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Egypt. J. Microbiol.* 19: 41-54.