

Constat de décès chez les bactéries

30 octobre 2018 | Mirella Wepf

Catégories: Eau potable | Polluants | Société

La médecine place de grands espoirs dans l'utilisation thérapeutique des probiotiques, capables d'influencer positivement la santé humaine. Mais ces bactéries survivent-elles à la congélation ou à la lyophilisation employées pour les conserver ? L'Eawag a mis son savoir-faire en matière de microbiologie de l'eau potable au service d'un projet de recherche de l'EPF de Zurich sur les bactéries intestinales – une excursion dans le monde de la médecine et des sciences de la nutrition.

La composition de la flore intestinale a une forte influence sur les défenses immunitaires et la nutrition de l'être humain. Il est par ailleurs apparu que la flore – ou le microbiote intestinal, comme l'appellent les spécialistes – se modifiait pendant l'évolution de beaucoup de maladies intestinales.

Actuellement, les possibilités d'utilisation thérapeutique des micro-organismes de l'intestin humain sont ainsi intensément étudiées, notamment à l'Institut de recherche sur l'alimentation, la nutrition et la santé (IFNH) de l'EPF de Zurich. Dans la thèse qu'elle vient de publier, la doctorante Lea Bircher s'est concentrée sur la conservation des entérobactéries. Pour que ces micro-organismes vivants puissent être utilisés en tant qu'auxiliaires thérapeutiques ou que compléments alimentaires, il importe en effet qu'ils traversent cette phase transitoire sans subir aucun dommage. La chercheuse a sélectionné six souches bactériennes remplissant différentes fonctions et a observé la façon dont elles supportaient trois mois de congélation à -80 °C ou de lyophilisation lorsque différents produits antigel leur étaient administrés.

Transfert de savoir méthodologique

Frederik Hammes, du département de microbiologie de l'environnement de l'Eawag a apporté son soutien au projet par son savoir-faire en matière de cytométrie en flux, une technique de mesure qui

permet notamment des analyses beaucoup plus rapides que la culture de colonies en boîte de Pétri ou que les techniques de biologie moléculaire.

«La cytométrie en flux ne nous était pas totalement inconnue, signale Clarissa Schwab, qui a encadré la thèse de Lea Bircher à l'IFNH. Mais nous ne l'avions plus employée depuis des années dans notre laboratoire et nous avons donc été très heureux de pouvoir profiter de l'expérience de l'Eawag.»

Frederik Hammes utilise cette technique depuis très longtemps pour analyser l'eau de boisson et les eaux usées et il dispose d'une grande expérience en matière de mise en évidence de la viabilité des bactéries vivant dans l'eau. Bircher et Hammes ont sélectionné ensemble la méthode la mieux adaptée pour évaluer l'état des bactéries intestinales après la conservation. Ils ont assez rapidement opté pour une coloration au SYBR green I et à l'iodure de propidium (SGPI) qui permet de reconnaître si la membrane des bactéries est intacte ou non. Les bactéries indemnes apparaissent en vert dans le cytomètre en flux tandis que les cellules endommagées sont colorées en rouge.

La raison de leur choix ? La grande expérience de l'Eawag avec la technique de marquage au SGPI : cette méthode a été optimisée pour la cytométrie en flux par l'équipe de Frederik Hammes et finalement standardisée en 2016. Son adéquation pour les entérobactéries sélectionnées par Bircher a été démontrée dans plusieurs essais menés dans le laboratoire de l'Eawag. Après une phase d'instruction à l'Eawag, la jeune chercheuse a pu réaliser ses propres analyses de cytométrie en flux dans les laboratoires de l'EPFZ.

Effet bénéfique des produits antigél

Afin d'évaluer le taux de survie des probiotiques à la conservation, Bircher a développé des cultures des différentes souches avant et après le traitement. La méthode au SGPI lui a livré des informations complémentaires précieuses sur la viabilité des différents échantillons. Elle a ainsi pu montrer dans son travail que l'ajout de substances antigél telles que le sucre, l'inuline ou le glycérol pouvait faire fortement augmenter le taux de survie des bactéries. L'efficacité de chacun de ces produits antigél variait cependant en fonction des micro-organismes et des techniques de conservation considérés.

Toutes les bactéries étudiées par Bircher suscitent de grands espoirs parmi les spécialistes ; elles sont considérées comme des «probiotiques de nouvelle génération». Mais de nombreux essais seront encore nécessaires avant qu'elles apparaissent réellement sur le marché.

Tout a débuté lors d'une conférence

L'idée d'une collaboration entre Clarissa Schwab et Frederik Hammes est née en 2015, lors d'une conférence de l'Eawag. Intitulé «How Dead Is Dead», ce colloque portait sur les limites de la vie bactérienne : à partir de quel moment une cellule bactérienne peut-elle être considérée comme morte et comment peut-on mettre cet état en évidence ? Les cellules bactériennes peuvent en effet entrer en dormance en ralentissant leurs processus métaboliques et physiologiques jusqu'à un niveau de non détectabilité. De telles cellules peuvent-elles être «réanimées» ? Ces questions continuent d'occuper les scientifiques – aussi bien dans le domaine médical que dans celui de l'eau potable.

Les travaux de Lea Bircher ont été financés par le Fonds national suisse (Sinergia 35150) et l'EPF de Zurich.

Publications

.extbase-debugger-tree{position:relative}.extbase-debugger-tree input{position:absolute !important;float: none !important;top:0;left:0;height:14px;width:14px;margin:0

closure{color:#9BA223;}Extbase Variable Dumparray(2 items) publications => '17239,14046'
 (11 chars) libraryUrl => '' (0 chars) Extbase Variable Dumparray(2 items) 0 =>
 Snowflake\Publications\Domain\Model\Publicationprototypepersistent entity (uid=17239,
 pid=124) originalId => protected17239 (integer) authors => protected'Bircher, L.;
 Geirnaert, A.; Hammes, F.; Lacroix, C.; Sch

wab, C.' (88 chars) title => protected'Effect of cryopreservation and lyophilization
 on viability and growth of str

ict anaerobic human gut microbes' (108 chars) journal => protected'Microbial
 Biotechnology' (23 chars) year => protected2018 (integer) volume => protected11 (integer)
 issue => protected'4' (1 chars) startpage => protected'721' (3 chars) otherpage =>
 protected'733' (3 chars) categories => protected'' (0 chars) description => protected'Strict
 anaerobic gut microbes have been suggested as 'next-generation probio

tics' for treating several intestinal disorders. The development of preserva
 tion techniques is of major importance for therapeutic application. This stu
 dy investigated cryopreservation (?80°C) and lyophilization survival and
 storage stability (4°C for 3 months) of the strict anaerobic gut microbes <
 i>Bacteroides thetaiotaomicron, Faecalibacterium prausnitzii, Roseburia inte
 stinalis, Anaerostipes caccae, Eubacterium hallii</i> and <i>Blautia obeum.<
 /i> To improve preservation survival, protectants sucrose and inulin (both 5
 % w/v) were added for lyophilization and were also combined with glycerol (1
 5% v/v) for cryopreservation. Bacterial fitness, evaluated by maximum growth
 rate and lag phase, viability and membrane integrity were determined using
 a standardized growth assay and by flow cytometry as markers for preserva
 tion resistance. Lyophilization was more detrimental to viability and fitness t
 han cryopreservation, but led to better storage stability. Adding sucrose an
 d inulin enhanced viability and the proportion of intact cells during lyophi
 lization of all strains. Viability of protectant-free <i>B. thetaiotaomicron
 </i>, <i>A. caccae</i> and <i>F. prausnitzii</i> was above 50% after cryopre
 servation and storage and increased to above 80% if protectants were present
 . The addition of glycerol, sucrose and inulin strongly enhanced the viabili
 ty of <i>B. obeum</i>, <i>E. hallii</i> and <i>R. intestinalis</i> from 0.03
 –2% in protectant-free cultures to 11–37%. This is the first study that
 quantitatively compared the effect of cryopreservation and lyophilization an
 d the addition of selected protectants on viability and fitness of six stric
 t anaerobic gut microbes. Our results suggest that efficiency of protectants

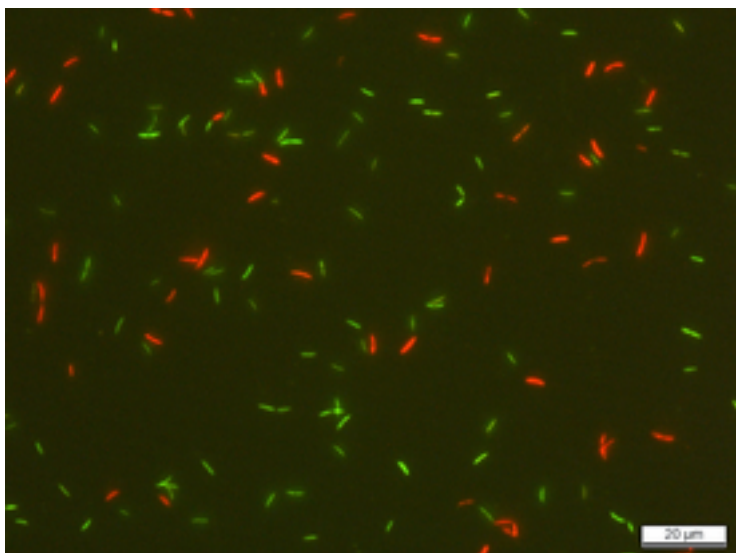
is process- and species-specific.' (1858 chars) serialnumber => protected'1751-7907' (9
 chars) doi => protected'10.1111/1751-7915.13265' (23 chars) uid => protected17239 (integer)
 _localizedUid => protected17239 (integer)modified _languageUid => protectedNULL
 _versionedUid => protected17239 (integer)modified pid => protected124 (integer) 1 =>
 Snowflake\Publications\Domain\Model\Publicationprototypepersistent entity (uid=14046,
 pid=124) originalId => protected14046 (integer) authors => protected'Nescerecka, A.;
 Hammes, F.; Juhna, T.' (52 chars) title => protected'A pipeline for developing and
 testing staining protocols for flow cytometry,

demonstrated with SYBR Green I and propidium iodide viability staining' (147 chars)
 journal => protected'Journal of Microbiological Methods' (34 chars) year => protected2016
 (integer) volume => protected131 (integer) issue => protected'' (0 chars) startpage =>
 protected'172' (3 chars) otherpage => protected'180' (3 chars) categories =>
 protected'bacteria; propidium iodide; flow cytometry; disinfection; viability; optimiz

ation' (81 chars) description => protected'The increasing use of flow cytometry (FCM) for analyses of environmental sam

ples has resulted in a large variety of staining protocols with varying results and limited comparability. Viability assessment with FCM is in this context of particular interest because incorrect staining could severely affect the outcome/interpretation of the results. Here we propose a pipeline for the development and optimization of staining protocols for environmental samples, demonstrated with the common viability dye combination of SYBR Green I (SG) and propidium iodide (PI). Optimization steps included the assessment of dye solvents, determination of suitable PI concentration, and determining the optimal staining temperature and staining time. We demonstrated that dimethyl sulfoxide (DMSO) could impair membrane integrity, when used for SGPI stock solution preparation, and TRIS buffer was chosen as an alternative. Moreover we selected 6 μ M as optimal PI final concentration: less than 3 μ M resulted in incomplete staining of damaged cells, while concentrations higher than 12 μ M resulted in false PI-positive staining of intact cells. Low temperatures (25 °C) resulted in a slow reaction and did not enable the staining of all bacteria, while high temperatures (44 °C) caused damage to cells and false PI-positive results. Hence, 35 °C was selected as optimal staining temperature. We further showed that a minimum of 15 min were necessary to obtain stable staining results. Moreover, we showed that addition of EDTA resulted in 1–39% more PI-positive results compared to an EDTA-free sample, and argue that insufficient evidence currently exist in favor of adding EDTA to all samples in general. Altogether, the data clearly shows the need to be careful, precise and reproducible when staining cells for flow cytometric analyses, and the need to assess and optimize staining protocols with both viable and non-viable bacteria.' (1929 chars) serialnumber => protected'0167-7012' (9 chars) doi => protected'10.1016/j.mimet.2016.10.022' (27 chars) uid => protected14046 (integer) _localizedUid => protected14046 (integer)modified _languageUid => protectedNULL _versionedUid => protected14046 (integer)modified pid => protected124 (integer) Bircher, L.; Geirnaert, A.; Hammes, F.; Lacroix, C.; Schwab, C. (2018) Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes, *Microbial Biotechnology*, 11(4), 721-733, doi:10.1111/1751-7915.13265, [Institutional Repository](#) Nescerecka, A.; Hammes, F.; Juhna, T. (2016) A pipeline for developing and testing staining protocols for flow cytometry, demonstrated with SYBR Green I and propidium iodide viability staining, *Journal of Microbiological Methods*, 131, 172-180, doi:10.1016/j.mimet.2016.10.022, [Institutional Repository](#)

Photo



Bactéries intestinales de l'espèce Roseburia intestinalis colorées au SYBR green I et à l'iodure de propidium (SGPI). Seul le SYBR green I peut pénétrer dans les bactéries aux membranes intactes qui apparaissent donc en vert. Les membranes endommagées laissent également pénétrer l'iodure de propidium qui présente une fluorescence rouge.
(Photo : EPF Zurich, Lea Bircher)

Contact



Frederik Hammes

Tel. +41 58 765 5372

frederik.hammes@eawag.ch



Andri Bryner

Responsable médias

Tel. +41 58 765 5104

andri.bryner@eawag.ch

<https://www.eawag.ch/fr/portail/dinfo/actualites/news-archives/detail-de-larchive/constat-de-deces-chez-les-bacteries>