

PROGRAMME NATIONAL D'OCEANOGRAPHIE COTIERE

(P.N.O.C.)

VOLET "MICROBIOLOGIE SANITAIRE"

Synthèse des travaux

Octobre 1995



IFREMER Bibliotheque de BREST



0EL05580

Coordination : *Monique POMMEPUY*

IFREMER - DEL

Laboratoire Microbiologie

B.P. 70

29280 PLOUZANE

E.mail : pommepuy@ifremer.fr



PLAN

INTRODUCTION	4
Problématique générale	4
But du programme.....	4
Mise en oeuvre du programme.....	5
A - MISE AU POINT DE METHODES DE QUANTIFICATION DE BACTERIES PATHOGENES DANS LES ECOSYSTEMES COTIERS.....	5
1. Détection et dénombrement des salmonelles dans les eaux marines	5
<i>a) Mise au point d'une méthode de quantification par immunofluorescence</i>	<i>5</i>
<i>b) Détection de Salmonella par Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	<i>6</i>
<i>Mise au point de la technique.....</i>	<i>7</i>
<i>Etude de la persistance d'ADN en eau de mer naturelle.....</i>	<i>7</i>
2. Mise en évidence d' <i>E. coli</i> toxinogène par hybridation	8
3. Conclusion.....	9
B. ETUDE DES MECANISMES DE SURVIE DES BACTERIES CONTINENTALES DANS LES EAUX MARINES.....	9
1. Caractérisation de différentes étapes cellulaires au cours de la survie bactérienne	9
2. Etude des mécanismes de l'halotolérance chez <i>E. coli</i> et <i>Salmonella Spp.</i> en milieux naturels	12
3. Etude du transport actif et de l'adaptation des entérobactéries	14
4. Etude des mécanismes de la photooxydation chez <i>Escherichia coli</i> en eau de mer	15
5. Appréciation du maintien du pouvoir pathogène des micro-organismes dans l'environnement	17
C. MODELISATION DU DEVENIR DES BACTERIES ENTERIQUES EN MER.....	18
1. Les stratégies mises en place en réponse aux stress et le modèle "adaptations physiologiques"	20
2. Etude de la prédation.....	21

D. DETERMINATION DE LA QUALITE DU MILIEU SUR L'INACTIVATION DES VIRUS EN MER	21
1. Influence des paramètres du milieu sur l'inactivation des virus en mer	22
<i>a) Survie du poliovirus I et du virus de l'hépatite A en eau de mer</i>	<i>22</i>
<i>b) Influence de la présence de matières en suspension sur le devenir du poliovirus en eau de mer</i>	<i>23</i>
2. Validation des outils de biologie moléculaire : Recherche du rotavirus par PCR.....	25
CONCLUSIONS.....	28
LISTE DES RAPPORTS PNOC	32
LISTE DES PUBLICATIONS DU PNOC	34

Photo page de garde : bactéries colorées au DAPI-CTC. Les cristaux rouges signalent une respiration bactérienne.

INTRODUCTION

Problématique générale

Les zones marines côtières reçoivent des rejets d'eaux usées urbaines et agricoles qui contiennent de très grandes quantités de micro-organismes dont certains sont pathogènes pour l'homme (par ex. Salmonelles, virus de l'hépatite A...).

Dans des environnements hostiles, la dispersion et les conditions de survie défavorables (énergie lumineuse importante, eau oligotrophe...) font que les bactéries disparaissent très rapidement ou évoluent vers un état non cultivable. Par contre, certains milieux comme les sédiments, les eaux turbides ou eutrophisées, présentent des conditions favorables à la survie des bactéries d'origine entérique et à la protection physique des particules virales. Dans les écosystèmes perturbés par de nombreux apports anthropiques, la présence notamment de matière organique assimilable et de composés osmo-protecteurs peut permettre à la flore bactérienne allochtone ou entérique de s'implanter.

Le devenir des micro-organismes d'origine continentale dans les écosystèmes marins soumis à ces rejets présente théoriquement deux aspects : (i) **une disparition à plus ou moins brève échéance ou tout au moins une dérive vers un état de dormance** et (ii) **une colonisation temporaire de tout ou partie des compartiments de l'écosystème.**

But du programme

Le but du programme était de développer et d'appliquer des techniques nouvelles afin d'évaluer les conséquences écologiques et sanitaires du devenir des micro-organismes d'origine entérique en mer, pour aborder les questions suivantes :

Dans les écosystèmes naturels, les bactéries d'origine entériques ont-elles encore une activité métabolique importante ? Est ce que leur pouvoir pathogène est maintenu ? Quel est le devenir des virus entériques en mer ?

Ces questions ont été abordées, à partir de modèles bactériens les mieux connus : *Escherichia coli* et *Salmonella*. Ces travaux mettent en oeuvre des méthodologies qui peuvent s'appliquer à d'autres espèces bactériennes plus répandues dans l'environnement côtier. Ces résultats doivent contribuer ainsi, à moyen terme, à l'étude de la dynamique de l'ensemble des populations, notamment allochtones, dont le rôle écologique (chaînes trophiques, cycles biogéochimiques) en milieu côtier est très peu connu.

En ce qui concerne les virus pathogènes pour l'homme, qui eux ne sont pas capables de se développer en milieu naturel mais peuvent y persister, les modèles choisis sont **les virus entériques** (poliovirus, rotavirus, virus de l'hépatite A) dont le pouvoir infectieux et la persistance sont étudiés dans des conditions marines en comparant les techniques par culture cellulaire et par biologie moléculaire. Un effort méthodologique important a été réalisé.

Mise en oeuvre du programme

Les résultats présentés ci-dessous correspondent à l'ensemble du travail qui a été réalisé pendant le PNOC. Le programme a comporté trois volets :

- La mise au point de méthodes de quantification des bactéries pathogènes dans les eaux marines côtières.
- L'étude des mécanismes de survie des bactéries telluriques dans les eaux marines et la modélisation du comportement des bactéries entériques en mer.
- La détermination de la qualité du milieu sur l'inactivation des virus en mer.

A - MISE AU POINT DE METHODES DE QUANTIFICATION DE BACTERIES PATHOGENES DANS LES ECOSYSTEMES COTIERS

L'appréciation du devenir des bactéries en mer passe par une approche méthodologique permettant d'adapter certaines techniques développées dans d'autres disciplines (recherche médicale, pharmaceutique...), à l'étude des environnements naturels. Dans ce volet nous sommes particulièrement intéressés à *Salmonella* et à *E. coli* enterotoxinogène.

1. Détection et dénombrement des salmonelles dans les eaux marines

a) Mise au point d'une méthode de quantification par immunofluorescence*.

Ce travail a été présenté dans le rapport de synthèse (PNOC - Microbiologie sanitaire, 1994) auquel on se reportera pour les compléments d'information, ainsi qu'au rapport de synthèse (Gales *et al.*, 1993).

La méthode de marquage des salmonelles par immunofluorescence présente plusieurs avantages : un gain de temps (les méthodes classiques permettent d'obtenir un résultat en 4 à 5 jours) et une identification directe et spécifique des salmonelles parmi une flore complexe (eaux usées, eau de lagune...). D'autre part, l'utilisation de la microscopie assistée par analyseurs d'image ou cytométrie en flux permet d'envisager une analyse qualitative et quantitative des salmonelles stressées dans les milieux extérieurs.

Les résultats obtenus montrent :

- La spécificité du sérum polyclonal (ORMT 11 - Berhingwerke - Marburg) - Immunofluorescence directe à deux anticorps (IFI).
- La limite de détection est comprise entre 72 et 144 cellules de salmonelles pour 10^6 cellules de flore compétitive, entre 50 et 70 pour 10^4 , et inférieure à 20 pour 10^2 de flore associée.

* B. Baleux, P. Gales, P. Got, P. C. Courtis, URA CNRS 1355, Montpellier

- La cytométrie de flux permet de discriminer une salmonelle marquée parmi 1000 autres cellules.

L'observation microscopique en épifluorescence assistée par analyse d'image permet un gain de temps de 24 à 48 heures par rapport à la méthode culturale par marquage IFI des salmonelles dès mise en culture.

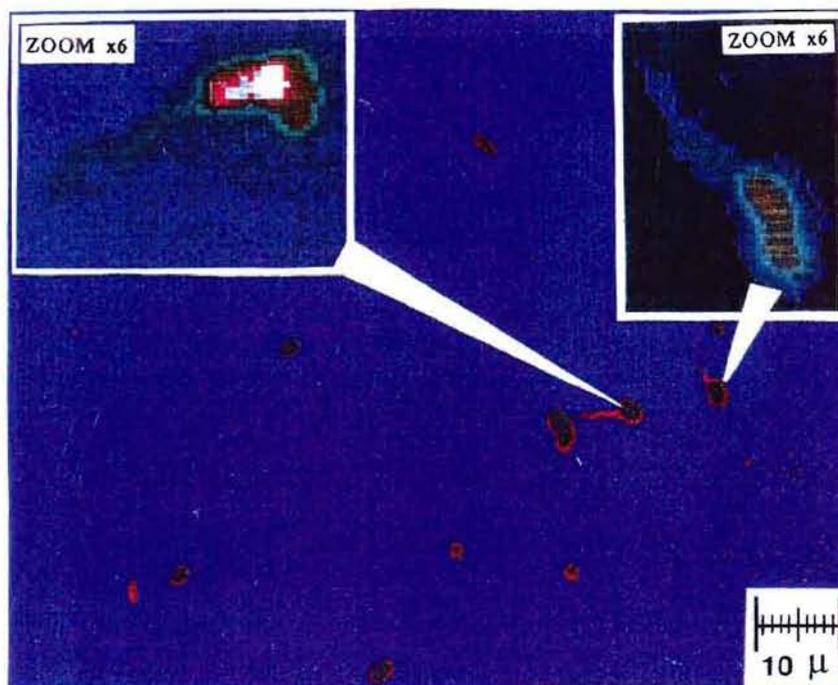


Figure 1 : Marquage des cellules d'une suspension de *Salmonella typhimurium* par le sérum polyclonal (ORMT 11) ; observation microscopique en épifluorescence assistée par analyse d'images (Mudicam®) Photo P. Got.

*b) Détection de Salmonella par Polymerase Chain Reaction (PCR) **

Depuis quelques années, on assiste au développement de méthodes d'amplification génique (PCR) visant à détecter l'ADN bactérien, dans les prélèvements cliniques, environnementaux ou alimentaires. La PCR consiste à amplifier de manière exponentielle une séquence d'ADN (ou d'ARN) par action cyclique d'une polymérase thermo-résistante. En théorie, une molécule unique d'ADN peut être détectée.

L'étude de détection directe par PCR de *Salmonella* dans les coquillages a été réalisée en collaboration avec le laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire (CNEVA/Paris). La persistance d'ADN en eau de mer naturelle a également été recherchée.

* M.P. Caprais, E. Dupray, A. Derrien, Ifremer, Brest.

La mise au point de la technique

La technique dérivée de celle de Jones *et al.* (1993 J. Food Science, 58, 1191-1202) a été retenue après plusieurs essais d'extraction d'ADN de *Salmonella* à partir d'un broyat d'huîtres : lyse par le thiocyanate de guanidine, traitement par de la Chelex ® (résine piégeant d'éventuels inhibiteurs), extraction de l'ADN au phénol/chloroforme, puis purification par double précipitation de l'ADN par de l'éthanol.

Les deux dernières étapes ont été ajoutées au protocole original, de façon à purifier au maximum l'extrait d'ADN. L'extrait d'ADN est ensuite soumis à une PCR utilisant des amorces VIR sélectionnées dans le plasmide de virulence de *S. typhimurium*. Le fragment est visualisé par électrophorèse en présence de bromure d'éthydiium. Des témoins positif et négatif, d'extraction d'ADN et d'amplification sont traités de la même manière.

La sensibilité de cette technique n'étant que de 10^5 salmonelles par gramme de broyat, une $\frac{1}{2}$ **nested PCR**, amplifiant de nouveau le fragment obtenu à l'aide d'une amorce interne est ensuite réalisée. On augmente la spécificité et la sensibilité de la réaction, puisque **1 à 10 salmonelles par gramme ont pu être détectées**.

Des amorces choisies dans le gène chromosomique *inv A* de *S. typhimurium* (Rahn *et al.*, 1992, Mol. Cell. Probes, 6, 271-279) codant pour un facteur d'invasion des cellules épithéliales de l'intestin ont également été testées. Une amorce interne a été sélectionnée et synthétisée. La recherche des gènes codant pour des facteurs de pathogénicité des salmonelles permettent de mieux appréhender le risque sanitaire.

Les premières applications sur deux lots d'huîtres naturellement contaminées ont donné les résultats suivants :

- 4 échantillons négatifs par PCR et par culture,
- 4 échantillons positifs sur 5 par PCR : pour ce lot, seul l'hépto-pancréas a été analysé. Cet organe concentre les bactéries de l'environnement, mais sa dissection est longue et délicate. En fait, la sensibilité de recherche sur le broyat de la chair entière du coquillage est satisfaisante.

En conclusion, cette technique est capable de détecter les salmonelles, quel que soit leur état physiologique dans l'environnement et un gain de temps est réalisé (résultats en deux jours et demi). Cependant, sa sensibilité est telle qu'il est important d'en connaître les limites, et notamment les risques de faux-positifs, engendrés par la détection d'ADN de *Salmonella* mortes ou d'ADN libre.

Etude de la persistance d'ADN en eau de mer naturelle

Des microcosmes d'eau de mer naturelle, prélevée en différentes saisons en rade de Brest, ont étéensemencés soit par des salmonelles vivantes, soit par des salmonelles tuées, soit par de l'ADN libre. Dans tous les cas, la persistance de la réponse par PCR a été recherchée pendant plusieurs semaines. L'objectif de l'étude est d'évaluer les temps de dégradation d'acides nucléiques dans une eau de mer naturelle ayant conservé sa microflore bactérienne et planctonique.

Les résultats montrent tout d'abord la nécessité de filtrer sur 3 µm les échantillons d'eau de mer, de façon à éliminer des inhibiteurs de PCR. A 10 °C, **la survie de *S. typhimurium* atteint 20 jours** (forme cultivable). Par contre l'ADN est mis en évidence jusqu'à 87 jours : l'écart correspond à des bactéries viables non cultivables, mais peut-être aussi à des bactéries mortes. A 20 °C, l'ADN est détecté seulement pendant 21 jours : l'activité physiologique des organismes planctoniques étant plus intense à cette température.

Lorsque des **Salmonelles tuées** (10^5 /ml) sont inoculées en eau de mer, la PCR donne une réponse positive pendant 55 jours à 10 °C et 11 jours à 20 °C. D'autre part, plus les concentrations en Salmonelles sont faibles, plus les temps de persistance sont courts : 2 jours à 10 °C, pour 10^3 Salm. tuées/ml.

Lorsque les bactéries sont lysées, l'ADN peut être détecté par PCR pendant 3 à 8 jours en eau de mer naturelle maintenue à 10 °C, et pendant 2 à 4 jours à 20 °C.

En conclusion, **la persistance d'ADN apparaît limitée dans des conditions réalistes d'environnement marin**, et ne semblerait pas provoquer de fausses réactions positives lors de la recherche de *Salmonella* par PCR : les amplifications positives correspondraient en majorité à des bactéries cultivables, ou viables mais non cultivables. Cependant, dans des situations de rejets importants par exemple suite à des procédés de désinfection dans les stations d'épuration en zone côtière, des réactions positives pourraient être enregistrées, dues à des salmonelles mortes ou à de l'ADN libre persistant une à plusieurs semaines à 10 °C.

2. Mise en évidence d'*E. coli* toxigène par hybridation *

Ce travail a été résumé dans le rapport PNOC 1994. On se reportera donc à ce texte ainsi qu'aux rapports de fin de travaux pour un complément d'information (Tamanai-Shacoori *et al.*, 1992, Thamin-Dakar *et al.*, 1993).

Dans ce travail **la recherche d'*E. coli* par hybridation sur colonie a été réalisée**. Les résultats montrent sur des prélèvements réalisés dans la région de Granville la présence d'*E. coli* (67 souches isolées des sédiments et des moules) ; 30 % de ces souches sont entérotoxigènes - donc - pathogènes - (hybridation avec la sonde Ltp). La recherche de la production de la toxine LT a ensuite été réalisée par deux tests (GMI Elisa et RPLA) ; les résultats sont complémentaires et cohérents : deux groupes d'*E. coli* ont pu être ainsi mis en évidence :

- un premier groupe de 47 souches non productrices de toxine LT (auquel correspondent des $DO_{485} < 1,2$),
- un second groupe de souche productrices de la toxine LT ($DO_{485} > 1,2$), avec différents types de production : forte (9 souches), moyenne (6 souches) et faible (2 souches).

* M. Cormier, A. Gougeon, Tamanai-Shacoori et M. Arturo, Univ. de Rennes.

En conclusion, 70 % des souches testées sont négatives en hybridation et s'avèrent négative en production de toxine alors que les autres souches hybridant avec la sonde LTP s'avèrent productrices de la toxine.

La localisation du gène elt par hybridation avec la sonde Ltp a ensuite été réalisée. Dans un premier temps, l'extraction plasmidique est réalisée sur toutes les souches, les plasmides obtenus sont séparés sur gel d'agarose, transférés sur une membrane nylon par "Southern Blot" puis hybridés. **Les souches non productrices de toxines s'avèrent non porteuses de plasmides.** Pour les souches productrices, le gène est retrouvé dans la majorité des cas sur un plasmide d'environ 60 kb.

3. Conclusion

Les travaux sur la détection de pathogènes dans les milieux littoraux ont donné lieu à des avancées méthodologiques intéressantes. Par immunofluorescence ou avec des outils de biologie moléculaire il est possible de détecter *Salmonella* et *E. coli* enterotoxinogènes dans des échantillons naturels. Les temps de détection s'en trouvent améliorés par rapport aux techniques classiques par culture, puisqu'en 1 ou 2 jours une réponse peut être donnée ; d'autre part, la spécificité de ces outils permet de rechercher la bactérie pathogène dans des milieux où la flore est abondante. Les travaux sur l'abaissement du seuil de détection sont particulièrement intéressants car souvent les pathogènes se trouvent en nombre limité dans les milieux extérieurs. Enfin ces techniques permettent de détecter des bactéries stressées ce qui est très important au plan sanitaire puisqu'elles ne peuvent être mise en évidence par des techniques classiques après un séjour en milieu hostile. Néanmoins des développements méthodologiques restent à poursuivre ou sont en cours, afin d'optimiser leur application.

B. ETUDE DES MECANISMES DE SURVIE DES BACTERIES CONTINENTALES DANS LES EAUX MARINES

Des études *in vitro* ont été conduites dans des microcosmes soumis aux effets de certains facteurs environnementaux contrôlés. Les modèles bactériens utilisés sont : une souche bactérienne témoin de contamination fécale (*E. coli*) et une souche bactérienne pathogène (*Salmonella*).

Plusieurs actions de recherche complémentaires ont été réalisées dans ce thème afin d'évaluer les processus principaux impliqués dans la réponse adaptative d'*E. coli* et *Salmonella* en milieu marin.

1. Caractérisation de différentes étapes cellulaires au cours de la survie bactérienne *

Lorsqu'une population d'entérobactéries parvient dans le milieu marin, elle est confrontée à des stress de différentes origines. De façon inévitable, il existe un stress osmotique et nutritionnel auquel se surajoute de façon plus ou moins systématique selon les conditions de rejet, les effets photochimiques et (ou) photobiologiques consécutifs à l'exposition des cellules au rayonnement solaire.

* P. Le Baron¹, M. Troussellier², F. Joux¹, C. Courties², ¹ URA 117 CNRS Banuyls sur Mer, ²URA 1355 CNRS Montpellier.

L'application successive ou simultanée de ces stress conduit à une altération plus ou moins progressive des caractéristiques structurales et fonctionnelles des cellules. La succession des états cellulaires qui peut en découler et leur caractérisation sont difficiles à prévoir et à évaluer car les propriétés cellulaires affectées peuvent l'être plus ou moins simultanément et une grande diversité de propriétés physiologiques, métaboliques et structurales peuvent être concernées.

Cependant, que ce soit pour valider les concepts et les processus sous-jacents relatifs au devenir de ces bactéries dans l'environnement marin, que ce soit pour apprécier de façon plus réaliste les effets des différents stress " naturels " ou artificiels (procédés de traitement des eaux usées) ou encore pour évaluer le maintien ou non du pouvoir pathogène d'une cellule, la définition et la caractérisation de la succession des états cellulaires est fondamentale.

L'objectif principal de cette étude a donc été d'évaluer l'évolution des cellules de leur état " normal ", i.e. possédant une intégrité structurale et fonctionnelle complète, vers celui qui précède la mort cellulaire et la lyse. Le modèle biologique qui a été le support principal de ces travaux est *Salmonella typhimurium*. Le contexte expérimental général repose sur la simulation en microcosmes d'un stress salin et nutritionnel (eau de mer artificielle sans matière organique) reproductible. Au plan du contexte méthodologique permettant d'accéder à la mesure des caractéristiques cellulaires bactériennes, la **cytométrie en flux** a été choisie. L'analyse bibliographique et des essais préliminaires permettaient d'envisager son application à notre problématique (Troussellier *et al.*, 1993).

De plus, cette technique offrait à terme, au delà de la réalisation de mesures à l'échelle cellulaire sur un grand nombre de cellules, la possibilité de pouvoir accéder à des opérations de tri cellulaires sur la base de leurs caractéristiques reconnues au moyen de molécules fluorescentes.

Lors d'une première étape **l'évolution de l'ADN des cellules** pendant la période de survie a été abordée (Lebaron and Joux, 1994). Deux fluorochromes spécifiques des acides nucléiques ont été testés : le 4', 6-diamidino 2-phenylindole (DAPI) et le Hoechst 33342. Ce dernier s'est avéré être le plus performant en terme de spécificité pour différencier les contenus cellulaires en ADN. Placée pendant 35 jours en situation de survie en eau de mer artificielle la population de *S. typhimurium* montre, outre une perte de cultivabilité, une diminution d'environ 35 % de l'intensité de fluorescence correspondant à un génome. Un apport de matière organique en fin de survie conduit rapidement à un rétablissement du contenu en ADN apparent équivalent à celui de l'inoculum. Aucune synthèse ou dégradation d'ADN ne semble avoir eu lieu durant la survie (35 jours). Les changements dans la distribution de l'ADN des cellules individuelles pourraient être attribués à des changements de la topologie de l'ADN conduisant à une modification de l'accessibilité du marqueur aux sites cibles de la molécule. Ainsi, la réponse à une condition de carence et de choc osmotique pourrait induire chez les bactéries entériques deux états successifs dans la topologie de la molécule : une forme sur-enroulée durant la première phase de stress, puis une forme relâchée apparaissant avec la diminution de l'activité métabolique des cellules puisque la topologie de l'ADN est principalement sous contrôle enzymatique.

Dans une deuxième phase différents marqueurs d'activité cellulaire ont été définis et testés. Ils permettent de préciser les éventuelles étapes métaboliques succédant à la perte du pouvoir de cultiver. L'analyse cellulaire par cytométrie de l'activité métabolique, de **l'activité respiratoire** réelle et potentielle, de la **perméabilité membranaire** et du **contenu en ADN** a permis de

formuler un schéma conceptuel sur l'évolution et la succession des états cellulaires au cours de la survie (Joux *et al.*, 1996). La perte de différentes fonctions physiologiques semble hiérarchisée dans le temps. La perte de perméabilité membranaire conduit rapidement à une dégradation de l'ADN qui elle même conduit rapidement vers la lyse cellulaire. Il semble que l'atteinte de la perméabilité de la membrane cytoplasmique soit une étape irréversible dans l'évolution d'une cellule vers la lyse.

D'autre part, l'existence d'une **très forte hétérogénéité des états cellulaires** au sein d'une population bactérienne soumise à des conditions de stress a été démontrée. Cette hétérogénéité doit se traduire par une hétérogénéité des comportements cellulaires lorsque cette population se trouve en conditions favorables pour une reprise des activités métaboliques.

Cependant, l'analyse cellulaire du comportement démographique d'une population placée dans des conditions de revivification suppose que l'on soit en mesure d'analyser finement le processus de multiplication cellulaire. En d'autres termes, si une population hétérogène sur le plan des états cellulaires est placée en condition de croissance, il est nécessaire d'identifier la fraction des cellules qui entrent en division. A cet effet, une méthodologie originale a été développée permettant de marquer les cellules bactériennes après une période de stress de manière à analyser par cytométrie en flux la capacité de ces cellules à se diviser. L'application de cette méthodologie est encore en phase d'expérimentation.

Des essais préliminaires ont également été réalisés afin d'évaluer **la faisabilité du tri cellulaire** sur une population de *Salmonella typhimurium* en situation de survie en eau de mer artificielle. Les fractions triées issues de la population de *Salmonella typhimurium* marquée au HO342 présentent des proportions de cellules cultivables comparables à celles des échantillons témoins. L'évolution des cellules de *Salmonella typhimurium* dans le microcosme n'induit pas une fragilisation des cellules par rapport aux opérations de tri. Ces résultats montrent que la cultivabilité est maintenue durant la procédure de tri cellulaire.

Par ailleurs, l'absence de contamination durant l'opération de tri cellulaire a été vérifiée sur la base de l'observation morpho-macroscopique des colonies sur gélose. Ces premiers résultats indiquent que le tri cellulaire en cytométrie en flux peut être appliqué aux cellules bactériennes avec de bons résultats en terme de pureté des fractions triées. La dilution apportée par la formation des gouttelettes peut constituer une limitation à l'analyse subséquente de constituants cellulaires des fractions triées. En revanche, l'absence d'impact sur la viabilité cellulaire et de contamination durant l'opération de tri cellulaire permet d'envisager sur des fractions triées des expérimentations pour évaluer la réversibilité de certains états cellulaires. **Cette ouverture méthodologique, couplée aux acquis relatifs à la caractérisation des états cellulaires précédemment décrits, offre notamment un support pour aborder la question fondamentale de la nature stochastique (toutes les cellules étant égales face au stress) ou déterministe (seules certaines cellules ont la capacité de les surmonter) du devenir des entérobactéries dans le milieu marin.**

2. Etude des mécanismes de l'halotolérance chez *E. coli* et *Salmonella Spp.* en milieux naturels *

L'objectif de l'étude a été de déterminer si des bactéries comme *Salmonella* et *E. coli* peuvent mettre en place des mécanismes d'osmorégulation dans des environnements et des conditions naturelles. En effet, la capacité des Entérobactéries à répondre à un stress osmotique a été bien décrite, lorsque celles-ci sont dans des conditions optimales de croissance, mais peu d'études ont pris en compte les conditions naturelles. Dans ce travail, le rôle de la matière organique d'environnements littoraux (estuaires) a été particulièrement étudié en conservant au maximum son intégrité chimique et physique grâce à l'utilisation de tubes à dialyse, dans certaines expérimentations.

Les survies enregistrées en terme de bactéries cultivables, à une salinité de 35 ‰, en présence de sédiments vaseux prélevés dans différents petits estuaires à marée du Nord Finistère, n'ont pas montré d'écart par rapport au témoin eau de mer oligotrophe, à 20 °C excepté pour deux sédiments sur sept.

La matière organique environnementale ne fournit donc pas toujours les substrats assimilables ou les composés osmoprotecteurs favorables à une survie des bactéries d'origine entérique. La présence de composés toxiques peut être envisagée.

Il paraît cependant difficile de déterminer quantitativement et qualitativement les éléments de la matière organique qui interviennent. Ces résultats vont dans le sens de ceux précédemment obtenu sur l'augmentation de la teneur en sel supportée par *E. coli* et *Salmonella* en présence d'eaux d'estuaire.

S. manhattan a ensuite été mis en contact d'eaux usées, de façon à reproduire un transit en station d'épuration avant son séjour en mer oligotrophe, ou eau de mer chargée en matière organique. On observe alors une résistance immédiate au stress salin, quelle que soit la nature de l'eau de mer. L'hypothèse avancée, compte tenu des composés chimiques (tréhalose) intrabactériens identifiés par spectroscopie ¹H-RMN, après séjour en eau de mer est la suivante : une induction des systèmes de synthèse du tréhalose aurait lieu, dans les eaux usées, via l'activation de gènes de "survie" ou de "stress" (*kat F*) en réponse à une baisse de température, à une diminution des substrats assimilables, paramètres rencontrés dans cet environnement.

Ces enzymes de synthèse seraient opérationnelles dès le rejet en mer, et le tréhalose synthétisé ne serait plus dégradé car une tréhalase bactérienne est réprimée par une élévation de la pression osmotique. Le dissaccharide non métabolisé est alors utilisé comme osmoprotecteur en étant accumulé dans la bactérie. La régulation du métabolisme du tréhalose, surtout décrite chez *E. coli* demeure cependant complexe et n'est pas totalement explicitée.

* Dupray E.¹, Derrien A.¹, Pichon R.². ¹Ifremer Brest, ²Laboratoire RMN, Univ. Bretagne Occidentale, Brest

Ces résultats sont importants, car la survie en mer de *Salmonella*, bactérie potentiellement pathogène pour l'homme, est donc fonction, non seulement des conditions de l'environnement marin, mais aussi des conditions de son transit préalable dans les eaux usées. Le protocole utilisé, avec 24 heures de transit, est calculé pour tenir compte du cheminement dans un réseau d'assainissement, puis dans une station d'épuration.

Ces résultats concordent avec ceux trouvés par Gauthier *et al.* (1993) à savoir le rôle des gènes *kat F* lors de l'adaptation préalable d'*E. coli* au milieu marin.

De plus, en réponse à un stress osmotique, et en fonction de la nature chimique de son environnement, *Salmonella* met en place des mécanismes différents d'osmorégulation (composés osmoprotecteurs identifiés par spectroscopie ^1H -RMN). Ainsi, *S. manhattan* accumule majoritairement, dans trois environnements estuariens différents : tréhalose et x (composé non identifié présentant un signal en spectroscopie ^1H -RMN à 3,36 ppm), tréhalose et acide glutamique, glycine-bétaïne et x (un exemple est donné sur la figure 2). Les processus d'osmorégulation interviennent préférentiellement à 20 °C, plutôt qu'à 10 °C, ce qui est compatible avec des situations naturelles.

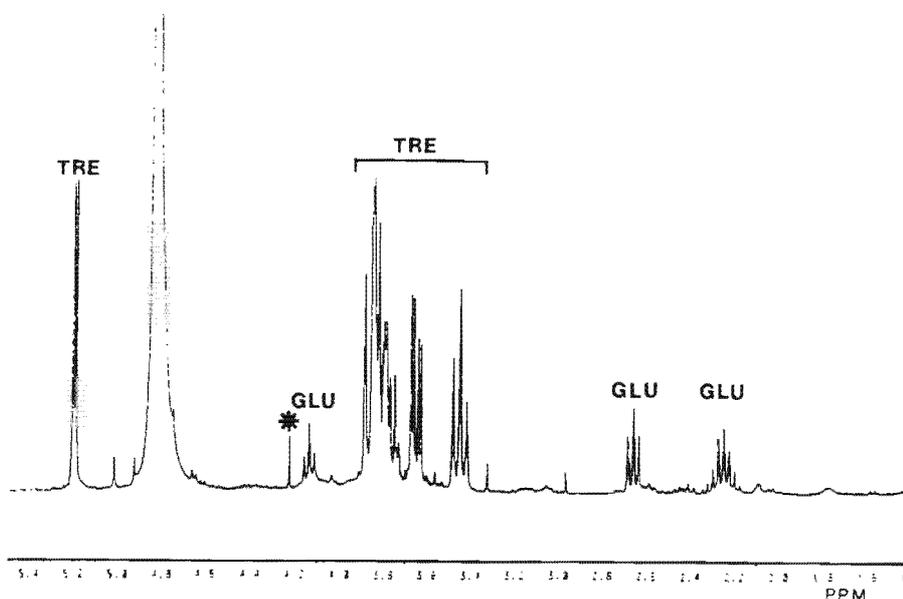


Figure 2 : Spectre RMN ^1H d'un extrait de *S. typhimurium* après 6 jours en eau d'estuaire (28.6.1993) additionnée de proline à 20 °C.

Dans les mêmes conditions, un autre sérotype, *S. typhimurium*, présente des mécanismes qui ne sont pas identiques, ce qui rend complexe l'élaboration d'un schéma des réponses bactériennes face à un stress salin.

Cette variété de mécanismes mis en place, traduit une capacité d'adaptation et donc de survie de *Salmonella* en milieu marin littoral, d'autant plus importante à considérer qu'il s'agit d'une bactérie potentiellement pathogène pour l'homme. Bien que d'autres facteurs de

l'environnement, comme la dilution, l'hydrodynamique, la prédation, l'action bactéricide de la lumière solaire... interviennent dans le devenir des bactéries rejetées en mer, ces capacités physiologiques restent importantes à prendre en compte.

En conclusion, il convient de noter que, à côté de l'étude du rôle de la matière organique naturelle sur la réponse de *Salmonella* à un stress osmotique, des mécanismes non encore décrits ont été mis en évidence, par exemple l'utilisation de la proline comme source de carbone et d'énergie pour la synthèse du tréhalose accumulé, et la probable dégradation de la glycine-bétaïne.

3) Etude du transport actif et de l'adaptation des entérobactéries *

La capacité des bactéries entériques à survivre dans l'eau de mer dépend très largement de la présence d'éléments nutritifs. Le maintien d'un transport actif des hydrates de carbone et des acides aminés est donc essentiel à leur adaptation dans ce milieu. Dans ce travail, l'effet de l'augmentation de la pression osmotique subie par les cellules dans l'eau de mer sur le flux transmembranaire de certains sucres et acides aminés a été étudié : tout d'abord les effets à court terme (de l'ordre d'une heure) puis à long terme (après plusieurs semaines).

Ces expérimentations ont été réalisées à l'aide de ^{14}C substrats. Elles ont concerné les quatre grandes voies de transport des substrats : la translocation de glucose, le symport proton-substrat (lactose), le co-transport sodium-substrat (mélitiose, proline) et le système à protéines affines (maltose, listidine).

Les **effets à court terme** montrant que le rejet d'*E. coli* dans l'eau de mer peut provoquer une diminution très importante de son potentiel d'adsorption des substrats, indépendamment du niveau énergétique ; cependant cette inhibition n'est jamais totale, les cellules conservant un potentiel résiduel de transport qui a paru, dans la plupart des cas, augmenter graduellement avec le temps.

Les **effets à long terme** ont été analysés plus particulièrement sur les transports par protéines affines (histidine, maltose), les plus sensibles au choc hyperosmotique subi dans l'eau de mer. L'accumulation intracellulaire de ^{14}C -histidine s'est avérée faible mais constante pendant toute la période d'incubation (1 mois environ). Par contre, la capacité de transport du maltose, bien que très fortement inhibée (99,9 %) dès le contact des cellules avec l'eau de mer, a augmenté ensuite progressivement pendant deux semaines jusqu'à environ 25 % du niveau initial. Ceci montre que les cellules d'*E. coli* sont capables de récupérer, partiellement mais de façon très significative, le potentiel d'utilisation de certains substrats organiques qu'elles perdent au moment de leur transfert dans l'eau de mer.

L'influence de la préadaptation d'*E. coli* à divers stress sur sa survie dans l'eau de mer, et la régulation de l'effet protecteur de cette préadaptation par le facteur RpoS a ensuite fait l'objet d'expérimentations. La survie dans l'eau de mer des cellules d'*E. coli* portant ou non le gène *rpoS* à l'état fonctionnel a été analysée après leur avoir fait subir pendant 0,5, 1, 2, 3 et 4 h divers stress : thermique (48 °C), acide (pH 5), oxydatif (H_2O_2 1 mM), nutritionnel (carence en C, N et P) et osmotique (NaCl, 0,5 M). Une forte résistance à l'eau de mer a été acquise après chacun de ces traitements, la viabilité des cellules étant plus élevée pour les cellules préalablement soumises aux stress acide, oxydatif, nutritionnel et osmotique.

* Gauthier M., G. Flatau, Munro P., Clément R., INSERM, Nice.

L'effet de RopS sur l'évolution des cellules d'*E. coli* MC4100 et *S. typhimurium* vers l'état non cultivable (réponse VNC) dans l'eau de mer a ensuite été étudié, également à l'aide de sets isogènes de ces espèces possédant (RpoS+) ou non (RpoS-) le gène rpoS à l'état fonctionnel.

Cette étude a montré que RpoS, favorise le maintien de ces bactéries à l'état cultivable dans l'eau de mer oligotrophe. Cette influence dépend cependant des conditions dans lesquelles les cellules étaient cultivées avant leur transfert à l'eau de mer.

Un dernier volet d'études a été développé pour examiner les conséquences sanitaires possibles de ces réponses anti-stress croisées et de la résistance à l'eau de mer qu'elles induisent chez les entérobactéries. L'induction de résistance à l'acide est 2 à 4 fois plus élevée dans l'eau de mer. Cette résistance acquise est perdue après subculture des cellules. Elle est partiellement dépendante du gène rpoS et de la protéosynthèse. Un processus analogue a été observé avec les coliformes fécaux des matières fécales humains et ceux des eaux usées.

4) Etude des mécanismes de la photooxydation chez *Escherichia coli* en eau de mer *

L'étude d'*Escherichia coli* en microcosmes d'eau de mer à 34 ‰ de salinité, exposé à la lumière visible montre que cette bactérie évolue en quelques heures vers un état viable non cultivable tandis qu'à l'obscurité, la capacité à cultiver se maintient plus longtemps. Puis, les bactéries perdent progressivement leur viabilité (mise en évidence par le DVC).

Deux facteurs principaux semblent déterminer la survie de *Escherichia coli* dans l'eau de mer lors de l'exposition à la lumière visible : **l'état de la bactérie au moment du rejet et la qualité du milieu récepteur.**

L'état de la bactérie avant exposition à la lumière visible joue un rôle important dans sa survie : en effet, la perte de cultivabilité est significativement plus faible ($p < 0,05$) quand la souche *E. coli* MP180 est en début de phase stationnaire avant d'être immergée dans l'eau de mer qu'en phase exponentielle.

Cette meilleure survie en phase stationnaire lors de l'exposition à la lumière visible est due, au moins en partie, au facteur KatF (RpoS, σ^S , σ^{38}), facteur d'initiation de la transcription sigma alternatif de la phase stationnaire. Cette protéine contrôle de façon positive de nombreux gènes dépendant de la phase stationnaire. Nos résultats ont montré que cet effet protecteur est du, en partie, à une synthèse des catalases HPI et HPII (qui dépend du facteur KatF). Par contre, l'exonucléase III, ou les enzymes de synthèse du tréhalose ne semblent pas être impliquées dans cette protection par le facteur KatF.

L'eau de mer, par sa haute teneur en sels et son caractère oligotrophique, joue un rôle non négligeable dans la sensibilité de la bactérie à la phototoxicité.

Quand la salinité est abaissée à 20 ‰ (eau de mer estuarienne) ou mieux à 10 ‰, l'entérobactérie survit beaucoup mieux au stress lumineux (fig. 3).

* Gourmelon M., Pommepuy M., IFREMER Brest.

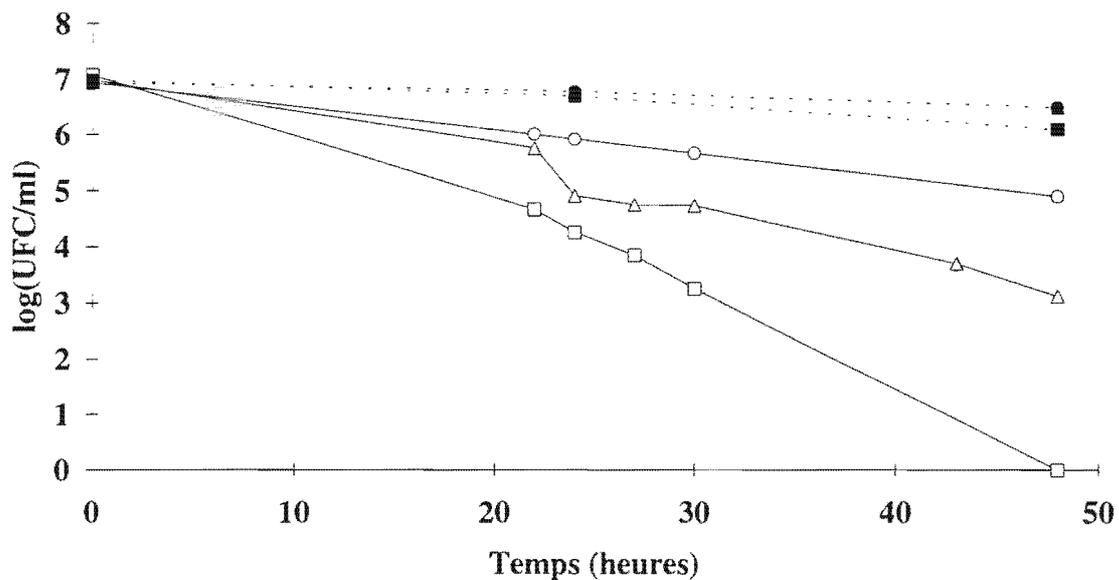


Figure 3 : Effet de la salinité de l'eau sur la survie de *E. coli* UM122 *katF* exposé à la lumière visible. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Salinité de 34 ‰ (□, ■) ; salinité de 20 ‰ (Δ, ▲) ; salinité de 10 ‰ (○, ●) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ).

L'apport d'une faible quantité de nutriments (glucose à $18 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ par exemple) dès l'immersion dans l'eau de mer permet à *Escherichia coli* de mieux résister à la phototoxicité. Lorsque l'addition est retardée de 24 ou 48 heures, la protection est beaucoup plus faible, la bactérie ayant déjà subi des dommages. De plus, quand les bactéries sont placées 24 ou 48 heures à l'obscurité dans l'eau de mer, elles survivent mieux ensuite à l'exposition à la lumière visible dans l'eau de mer.

Les expériences montrent que la lumière visible agit sur les bactéries immergées dans l'eau de mer, en présence d'oxygène, par un phénomène de photosensibilisation endogène.

En supprimant une source potentielle de photosensibilisateur (par exemple, les intermédiaires de synthèse de l'hème), la survie de *E. coli* peut être améliorée. La mutation *hemA* en empêchant la synthèse de l'acide aminolévulinique précurseur des intermédiaires de synthèse de l'hème diminue la sensibilité à la lumière de *E. coli* dans l'eau de mer. En effet, la perte de cultivabilité de *E. coli hemA* (QC 2430) est plus faible lors de l'exposition à la lumière visible que celle de la souche parentale (QC2438).

De même, en supprimant l'oxygène dans l'eau de mer, *E. coli* survit mieux à la lumière visible. L'utilisation de piègeurs d'espèces oxygénées réactives (ROS) et la comparaison de la survie à la lumière du double mutant catalase (piégeant le peroxyde d'hydrogène) ou du double mutant SOD (piégeant l'anion superoxyde) à leur souche parentale respective ont permis de mettre en

évidence l'intervention des espèces oxygénées réactives notamment l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène dans la phototoxicité.

Ces composés peuvent ensuite endommager des composés cellulaires tels que les ADN plasmidiques, par exemple. Par contre, l'exposition à la lumière visible ne conduit pas à une modification importante du profil des acides gras membranaires.

5. Appréciation du maintien du pouvoir pathogène des micro-organismes dans l'environnement *

En matière de santé publique, l'une des questions les plus importantes concernant la survie des bactéries pathogènes en mer est celle du maintien de leur pouvoir pathogène.

Chez les bactéries entériques, ce pouvoir dépend de différents mécanismes intrinsèques : capacité d'adhérence aux entérocytes, possibilité de multiplication et/ou d'invasion tissulaire, synthèse de toxines, d'hémolysines, de sidérophores, etc. Différentes voies d'approche peuvent être choisies pour évaluer les modifications de ces mécanismes (diminution, conservation ou augmentation) dans les cellules d'espèces test (*E. coli* ECET, ECEI, ECEA, ECEP ; *Salmonella*) incubées dans l'eau de mer : expérimentation animale, tests cellulaires, sondes génétiques, etc.

Dans le cadre du PNOG, ces travaux ont été initiés très tardivement (1 novembre 1994), seuls les premiers résultats sont disponibles à cette date ainsi qu'une revue bibliographique détaillée sur les méthodes d'études *in vivo* et *in vitro* de la pathogénicité de *Salmonella typhimurium*. C'est en effet cette bactérie qui a été retenue pour l'étude du maintien du pouvoir pathogène. Plusieurs raisons à ce choix : il s'agit d'un modèle bien étudié, sa virulence est codée par un gros plasmide (90 kb) et elle est particulièrement virulente pour la souris (d'où le choix du modèle animal), enfin ce serotype est dominant parmi ceux isolés des eaux de l'étang de Thau.

Les objectifs de l'étude sont :

- d'obtenir expérimentalement la perte du pouvoir de cultiver de la totalité des cellules au sein d'une population bactérienne de façon à être sûr que si pathogénicité il y a, elle ne sera pas due à une partie infime de la population ayant résisté au stress. La perte de cultiver est obtenue par application simultanée de deux facteurs stressant (choc salin brutal - salinité 37 ‰ et rayonnement solaire ou UV) en absence de nutriments.

- D'évaluer les états physiologiques dans lesquels se trouvent les cellules bactériennes non cultivables lors des différents stades de conditions stressantes.

Différents marquages sont utilisés : marquage DAPI (dénombrement total, taille de la cellule, intensité moyenne de fluorescence/DNA) ; marquage "live and Dead bacteria" (baclight Viability kit) de façon à évaluer l'intégrité cellulaire ; marquage au CTC pour apprécier

* M. Baleux¹, J. Lesne², B. Delpuech², ¹ URA 1355 CNRS Montpellier, ² ENSP Rennes

l'activité respiratoire ; marquage DAPI/cephalexine/nutriments pour mettre en évidence une activité métabolique. L'observation des cellules marquées est faite par microscopie à fluorescence assistée par un analyseur d'image,

- d'évaluer le devenir des déterminants plasmidiques et chromosomique de virulence bactériens en parallèle avec la perte du pouvoir de cultiver et ceci selon l'évolution des états physiologiques cellulaires subséquents. La recherche du plasmide de virulence (90 kb), la vérification de la région de virulence (VIRA) ainsi que la détection de mutations ponctuelles sont effectuées à chaque étape du stress.

- d'évaluer le maintien ou non de la virulence de *Salmonella typhimurium* (C52) en fonction de différents états physiologiques. Le modèle animal choisi est la souris adulte (lignée C57B1/6J/RJ) très sensible à *S. typhimurium*. Deux voies d'inoculation ont été retenues pour cette étude : la voie intrapéritoneale et la voie per os.

Les premiers résultats peuvent être résumé ainsi :

Un protocole permettant d'obtenir la perte du pouvoir de cultiver ou le "zéro cultivabilité" a été mis au point. De même le protocole du test souris a été établi.

Le modèle intrapéritoneal du couple *S. typhimurium* (C52/C57 B 1/6) montre une grande sensibilité ($DL_{100} \leq 10^2$) et une meilleure reproductivité dans les fortes doses que le modèle per os. Le temps de réponse du modèle est rapide (1 semaine), la dose de réponse maximale est faible, ce qui permet de diminuer la probabilité de présence de bactéries cultivables dans l'inoculum des bactéries stressés viables non cultivables. Enfin ce test est d'une très grande sensibilité permettant de détecter la pathogenicité d'un faible nombre de bactéries encore virulentes après le stress.

De plus, en supprimant le passage de la barrière gastrique et la compétition de flore intestinale, il offre des conditions optimales de développement pour les salmonelles stressées. Ce modèle a donc été sélectionné pour tester la pathogenicité des salmonelles viables non cultivables.

Salmonella C52 soumis à la combinaison de 3 stress environnementaux (oligotrophie, salinité et UV) quel que soit le temps d'exposition (24 h, 1 h, 30 mn) perd rapidement et massivement sa capacité de cultiver sur gélose nutritive. L'inoculation intrapéritoneale de 1000 de ces bactéries viable non cultivables (VNC) à des souris montre qu'elles ne sont plus pathogènes. Les premières expérimentations ne sont pas suffisantes pour conclure à la non pathogenicité de tous les états VNC. Elle confirme néanmoins le rôle majeur des UVB - germicides - du rayonnement solaire sur l'élimination des bactéries entériques dans le milieu marin, notamment dans les milieux à faible teneur en matière organique. Ces expérimentations se poursuivront jusqu'à mi-1996. Elles permettront de confirmer ou d'infirmer ces premiers travaux.

C. MODELISATION DU DEVENIR DES BACTERIES ENTERIQUES EN MER *

Les données recueillies dans le cadre du PNOC, permettent de modéliser les effets de certains facteurs responsables du devenir des bactéries en mer (température, salinité, oxygène, privation

de nourriture) en considérant, dans un premier temps, deux méthodes d'observation : le nombre total de bactéries (total count) et le nombre de bactéries cultivables (CFU).

Pour illustrer à la fois l'état des connaissances et des simulations du devenir de ces deux variables, une situation de rejet urbain en mer Méditerranée a été choisie. Le but est de comparer, par rapport à la norme en vigueur, le devenir des abondances d'*E. coli* (bactéries témoins de contamination fécale) mesurés par ces deux méthodes. Deux modèles ont été construits correspondant chacun à une méthode de dénombrement, et comprenant chacun deux sous modèles relatifs aux deux saisons étudiées (hiver, été). Un exemple de modèle est présenté figure 4.

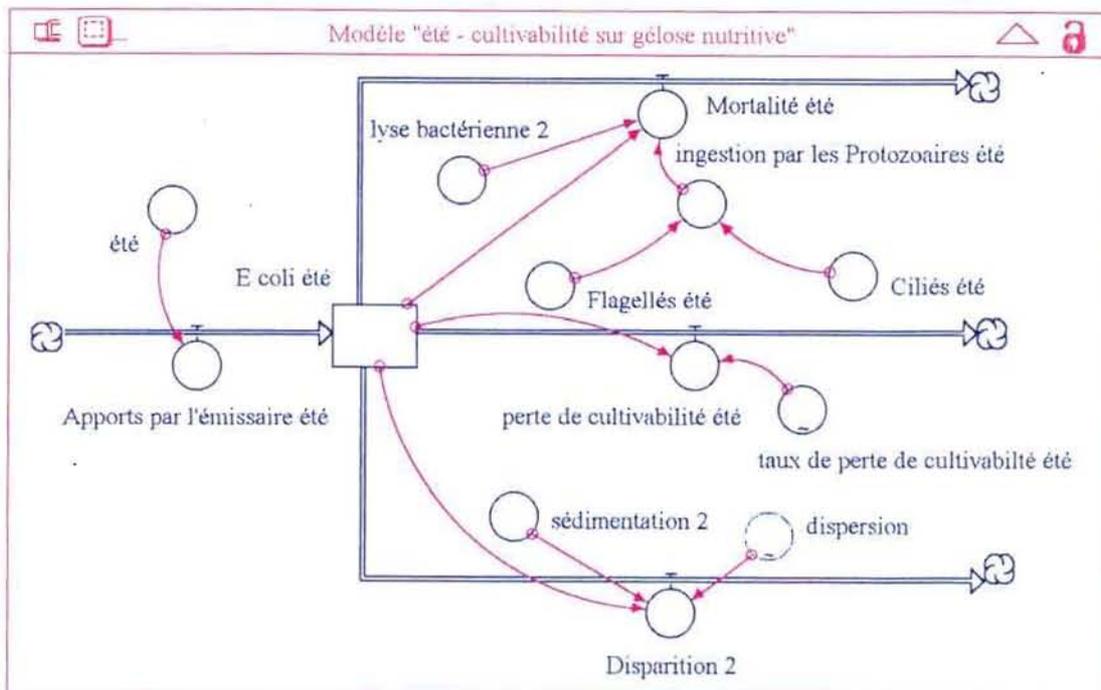


Figure 4 : Représentation symbolique de Stella II du modèle basé sur le comptage des UFC (Unité Formant Colonie) sur gélose nutritive. Modèle "été".

Les résultats obtenus montrent :

- que l'évolution des abondances appréciées par la technique de CFU conduit à une diminution rapide (plus rapide en été) des *E. coli* et à un niveau de contamination qui devient rapidement inférieur à la norme,
- que l'évolution des abondances totales ne révèle qu'une lente diminution des *E. coli* et que le niveau de contamination reste dans ce cas supérieur à la norme pendant un temps important.

* Y. Martin¹, M. Troussellier², P. Menon¹, J.L. Bonnefont¹, A. Hellies¹, ¹ Inst. Oc. P. Ricard, Les Embiez, ² URA 1355 CNRS Montpellier.

Ceci pose clairement les problèmes qui ont été abordés par différentes équipes dans le cadre du volet "microbiologie sanitaire" du PNOG, à savoir la définition des processus physiologiques qui conduisent à la perte de la cultivabilité et la caractérisation des états cellulaires...

Pour répondre à ces questions, deux démarches ont été adoptées :

- d'une part l'élaboration d'un modèle plus complet visant à décrire les stratégies adaptatives des cellules en réponse aux stress a été réalisé,
- d'autre part l'appréciation expérimentale de la réalité de la disparition de ces cellules due au phénomène d'ingestion par les microprédateurs par des études en microcosmes. Les résultats expérimentaux des différentes équipes impliquées dans les projets PNOG ont été intégrés, ainsi que ceux issus des expérimentations concertées réalisées à Banyuls ou aux Embiez.

1. Les stratégies mises en place en réponse aux stress et le modèle "adaptations physiologiques"

Un modèle des adaptations physiologiques développées par *E. coli* en eau de mer a été élaboré. Les principales hypothèses de ce modèle sont résumées ci-dessous.

1. Le devenir des bactéries dépend de l'état d'un compartiment interne (fraction cellulaire métabolisable, FCM) dans lequel l'énergie est accumulée et puisée. Il existe un niveau seuil de ce compartiment en dessous duquel la cellule ne peut se reproduire. La latence nécessaire à la sortie de cet état viable non cultivable est d'autant plus longue que le niveau de ce compartiment est bas. Les demandes d'entretien (maintenance) sont également régulées par ce niveau.
2. L'agression initiale représentée par un stress (carence alimentaire mais surtout salinité et lumière) conduit à différentes catégories de cellules selon que celles-ci ont eu la possibilité de mettre en place des réponses physiologiques adaptatives : cellules viables cultivables, cellules VNC capables de revivification (état de dormance) ou non (lésions définitives ne conduisant pas forcément immédiatement à des cellules mortes).
3. La réponse aux stress comporte deux niveaux successifs :
 - **une première réponse de type "résister, réparer, adapter"** que nous avons nommée "stratégie rempart" et qui se met en place rapidement quel que soit le stress impliqué et notamment dès le début de la phase stationnaire,
 - **une réponse ultérieure** de mise en place plus lente, qui conduit à l'**état de dormance** et dont l'objectif serait de préserver l'ADN des cellules à plus long terme "stratégie donjon". La sortie de cet état en conditions devenues plus favorables nécessite la répression des promoteurs de cette réponse (phase de latence).

Le modèle qui en découle comporte 8 fonctions biologiques (pompage des substrats, assimilation, croissance et maintenance, état du compartiment interne, réponses anti-stress,

transformation VNC, réversibilité, réparation, autolyse cellulaire). Les simulations réalisées montrent une dynamique générale cohérente mais certaines divergences avec les résultats expérimentaux (probablement liées au choix des valeurs de certaines variables ou à la formulation de certaines fonctions) qu'il sera nécessaire d'améliorer. Il demeure également essentiel de confirmer la validité de certaines hypothèses du modèle, en particulier concernant l'existence des trois catégories cellulaires considérées et la réversibilité (ou non) de certains états qui demeure le point clé du problème sur le plan fondamental comme appliqué.

2. Etude de la prédation

Le facteur prédation, tenu pour l'une des causes principale de la disparition physique à court ou moyen terme des cellules a également été abordée d'une façon théorique et d'une façon expérimentale (Mesplé *et al.*, 1994 ; Menon *et al.*, 1995), en mesurant les taux d'ingestion de bactéries marquées par des fluorochromes (FLB) et les taux de prédation par la disparition éventuelle des cellules marquées à la thymidine tritiée. Les taux d'ingestion des bactéries (FLB) s'avèrent comparables à ceux que nous avons utilisés dans le modèle théorique initial (Mesplé *et al.*, 1994). On constate cependant des phénomènes qui mériteraient d'être mieux analysés :

- il semble exister des variations saisonnières et/ou locales de l'abondance des prédateurs. Leur absence ne conduit à aucune disparition de ces bactéries ce qui minimise l'importance de la lyse ou d'autres facteurs biotiques (phages...) pour ces essais à court terme (3 à 5 jours).
- en présence de microprédateurs, les taux de disparition des *E. coli* marqués à la thymidine tritiée sont également nuls pour les essais réalisés entre janvier et juin 1995, dans des microcosmes d'eau de mer comportant leur propre microflore.

Ce dernier point ne contredit pas forcément ces résultats obtenus avec les FLB. Il révèle peut être que le taux de prédation de *E. coli* n'est pas suffisamment important pour conduire à une disparition décelable de ces cellules.

Quoiqu'il en soit, l'association du facteur prédation au modèle "adaptations physiologiques" devrait permettre de mieux évaluer le comportement de ces bactéries dans différentes conditions environnementales et éventuellement, d'élargir ce type d'investigations à d'autres catégories bactériennes intéressantes d'un point de vue sanitaire ou écologique.

D. DETERMINATION DE LA QUALITE DU MILIEU SUR L'INACTIVATION DES VIRUS EN MER

Les particules virales rejetées en mer, contrairement aux bactéries, sont inertes et vont au même titre que certains contaminants suivre la masse d'eau, sédimenter, ou être remis en suspension lors des divers épisodes saisonniers. Leur persistance dans l'environnement a été abordé ici sous deux angles :

- étude du rôle des différents paramètres du milieu sur leur persistance en mer et en particulier l'influence de la température, de la salinité, de la lumière, des ultraviolets et des matières en suspension,

- validation des outils de biologie moléculaire. Avec l'apparition actuelle de techniques moléculaires telles que la PCR (polymerase chain reaction) et de ses dérivés, une ouverture s'est faite en virologie ; dans le cadre du PNOG nous avons choisi d'explorer cette technique et de la valider sur des échantillons naturels.

1. Influence des paramètres du milieu sur l'inactivation des virus en mer *

a) Survie du poliovirus I et du virus de l'hépatite A en eau de mer

L'objectif était de déterminer l'influence de quatre paramètres sur la survie dans l'eau de deux virus entériques-tests : le poliovirus et le virus de l'hépatite A (VHA). Deux paramètres naturels, la température, la salinité ont été étudiés pour les 2 virus. L'influence de la lumière et l'action des ultraviolets, souvent utilisés en désinfection, notamment des coquillages, ont été envisagés pour le seul poliovirus.

Influence de la température

Les résultats concernant l'influence de la température montrent que, dans les conditions expérimentales, le devenir des virus en eau de mer est largement dépendant de la température. En effet pour le poliovirus une augmentation de température de +4°C à +25°C entraîne une chute des T90 et des T99 d'un facteur 20 environ. Il faut aussi souligner la remarquable stabilité du virus à +4°C puisqu'à cette température, le T90 est de 731 jours alors qu'il est de 32,4 jours à +25°C.

En ce qui concerne le VHA, l'évolution en fonction de la température, de l'antigène lié au VHA mesuré par RIA a été étudié. La stabilité de l'antigène VHA apparaît nettement fonction de la température de l'eau de mer. L'antigène du VHA est extrêmement stable à +4°C puisque, sur la durée de l'expérimentation, aucune diminution significative n'a été décelée. Pour les températures de 19 °C et 25 °C la quantité d'antigène diminue. Il faut cependant noter que pour l'antigène du VHA il n'y a pas de différence significative entre les deux températures de 19 °C et 25 °C, contrairement à ce qui est observé avec le poliovirus.

Influence de la salinité

La salinité apparaît comme un paramètre peu important. Pour le poliovirus, le passage de 14 g/l à 33 g/l provoque une diminution des T90 et des T99 d'un facteur 1,5 alors que pour l'antigène du virus de l'hépatite A, la diminution de la quantité d'antigène détectable est la même quelle que soit la salinité étudiée.

* Schwartzbrod L.¹, Deloince J.M.², Dincher M.L.², Crance J.M.², Gantzer¹, Univ. de Nancy -
² Hôpital des Armées.

Influence de la lumière

En ce qui concerne l'influence de la lumière sur l'inactivation du poliovirus, celle-ci semble, dans cette expérimentation, inexistante. Ceci peut en partie être expliqué par le fait que, lors des expériences, l'eau de mer contaminée par le poliovirus se trouvait à l'intérieur de flacons en verre, matériau qui ne laisse pas passer les rayons ultraviolet. D'autre part les flacons étaient placés dans le laboratoire où les intensités lumineuses sont très faibles par rapport à celles mesurées en mer.

Influence du rayonnement ultraviolet

En ce qui concerne le poliovirus, l'action du rayonnement ultraviolet testé en pilote expérimental est extrêmement importante. En effet, les T90 et les T99 qui pour tous les autres paramètres sont exprimés en jours, se comptent dans le cas présent en minutes.

L'étude de l'évolution du poliovirus dans une eau de mer de salinité 24 g L^{-1} à 19°C montre que le titre viral chute de 100 % en 9 minutes lors d'expériences réalisées avec une dose de $8,5 \text{ mW.s/cm}^2$ et en 4 minutes et 30 secondes pour une dose de 42 mW.s/cm^2 .

En ce qui concerne le virus de l'hépatite A, comme dans le cas du poliovirus, l'effet virucide des UV est extrêmement important puisque le VHA qui résiste à de nombreux agents chimiques et physiques et présente une grande stabilité dans l'eau est inactivé en quelques minutes dans les conditions expérimentales décrites. La détection de l'ARN viral du VHA a montré que la quantité d'ARN détectable par RT-PCR diminuait en fonction du temps d'irradiation. On peut supposer que l'effet virucide constaté est en partie lié à ces modifications de l'ARN qui pourrait de même ne plus être reconnu par les enzymes cellulaires ou virales intervenant dans la réplication.

b) Influence de la présence de matières en suspension sur le devenir du poliovirus en eau de mer

Compte tenu du fait que la majorité des virus entériques est associée à des matières en suspension (MES), le travail a consisté à :

- étudier l'influence des M.E.S. sur le devenir du polio-virus de type 1,
- étudier les phénomènes d'adsorption du virus sur la Na-montmorillonite,
- étudier trois méthodes d'élution des virus adsorbés.

L'étude est réalisée en eau de mer synthétique stérile, filtrée, en présence de Na-montmorillonite purifiée de façon à travailler dans un milieu parfaitement connu et d'éviter le plus possible l'existence de biais.

Etude de l'adsorption du poliovirus I sur de la Na- Montmorillonite en eau de mer (33 g L^{-1}) à 25°C

- **A faible concentration de Montmorillonite** : Les expériences de cinétique d'adsorption montrent une adsorption virale rapide (30 min.) pour des concentrations de Na-

montmorillonite ($< 3,15$ et 500 mg L^{-1}). Par contre, les pourcentages d'adsorption varient en fonction de la concentration d'argile. Ils sont respectivement de 71 %, 95 % et $> 99,9$ % pour 3, 15 et 500 mg/l de Na-montmorillonite après une minute d'agitation.

En présence de 15 et 500 mg L^{-1} , les pourcentages d'adsorption sont maximaux dès la première minute d'agitation. Par contre pour 3 mg/litre , le pourcentage augmente de 71 % après 1 minute d'agitation pour atteindre 87 % après 60 minutes d'agitation. Ceci peut être expliqué par le fait que l'adsorption virale dépendrait de la probabilité de rencontre virus-particule. Des virus libres après resuspension ont pu être remis en évidence. Il y aurait un phénomène de désorption naturelle au niveau de l'argile mais ce phénomène apparaît faible (1 %).

- **A forte concentration de Montmorillonite** : Pour une concentration de 2000 mg L^{-1} de Na-Montmorillonite, l'adsorption du poliovirus 1 est rapide comme pour les plus faibles concentration et le pourcentage d'adsorption est en moyenne de 99,49 %. Ce pourcentage est indépendant de la quantité de virus introduit dans l'eau de mer.

Elution des poliovirus adsorbés sur la Na-Montmorillonite

- **A faible concentration de Montmorillonite** : L'étude de l'élution est réalisée en eau de mer (33 g L^{-1}) avec du poliovirus 1 adsorbé sur de la Na-Montmorillonite à la concentration de 15 mg L^{-1} . Trois méthodes d'élution ont été envisagées : la désorption par du tampon borate-extrait de boeuf pH9, l'ultrasonication et la désorption par de l'eau désionisée. Dans ces conditions expérimentales, la meilleure méthode est celle qui utilise le tampon borate-extrait de boeuf pH9 puisqu'elle permet une désorption d'environ 76 %, alors qu'en présence d'eau désionisée, ce pourcentage est seulement de 46 %.
- **A forte concentration de Montmorillonite** : L'étude est réalisée en eau de mer de salinité 33 g L^{-1} avec du poliovirus 1 adsorbé sur de la Na-Montmorillonite aux concentrations de 500 et 2000 mg L^{-1} . Le tampon utilisé est du tampon borate pH 9,5 et l'élution est réalisée par agitation (ultraturax : 1 min. et vortex : 1 min.). Les pourcentages de désorption sont de 90,02 % en présence de 500 mg L^{-1} de Montmorillonite et de 80,83 % en présence de 2000 mg L^{-1} . Compte tenu des écarts-types les pourcentages de désorption ne diffèrent pas significativement ni en fonction de la concentration en Montmorillonite, ni en fonction de la quantité de virus adsorbés.

Influence de la Na-Montmorillonite sur la survie du poliovirus 1 en eau de mer (33 g L^{-1}) à $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Les concentrations en Na-montmorillonite étudiées sont de 3, 15 et 500 mg L^{-1} , et sont comparées à un témoin sans argile. Quel que soit le milieu, une chute rapide du titre viral a été observée. Ainsi, les T90 du témoin, 3, 15 et 500 mg L^{-1} de Na-montmorillonite sont respectivement de 27,8 ; 26,1 ; 31,0 et 35,5 jours. Il existe donc une différence significative de la durée de survie du virus en présence de 500 mg L^{-1} de Na-montmorillonite.

2. Validation des outils de biologie moléculaire : recherche du rotavirus par PCR *

Les travaux entrepris dans le cadre du PNOC constituent une première approche pour comprendre le devenir d'un virus en milieu marin littoral et surtout pour interpréter les résultats obtenus par biologie moléculaire à partir des prélèvements naturels. Certains facteurs susceptibles d'interférer dans les processus d'inactivation des virus entériques en milieu marin ont été analysés.

La présence de génomes de rotavirus dans l'environnement a été recherchée par RT-PCR.

La séquence du gène de la protéine VP7 a été choisie comme cible pour l'amplification. En effet, cette séquence était parfaitement connue pour de nombreuses souches ou isolats de rotavirus. Ceci avait permis d'identifier différentes amorces susceptibles d'être utilisées pour la rétrotranscription (RT) de l'ARN bicaténaire viral en ADN complémentaire et pour l'amplification de l'ADN (PCR) à partir de l'ensemble des rotavirus du groupe A. Les amorces R1 et R2 décrites par Flores *et al.* (1990) ont été utilisées en combinaison avec l'amorce Beg9 décrite par Gouvea *et al.* (1990). La RT-PCR réalisée avec Beg9 et R1 permet d'amplifier une séquence qui correspond aux 392 premiers nucléotides du gène. La sensibilité de cette méthode a été évaluée à $1,8 \cdot 10^4$ virus infectieux en culture cellulaire par millilitre (ff/ml). La réalisation d'un second cycle d'amplification, seminested PCR, ceci grâce au nouveau couple d'amorces R1 et R2 qui amplifie une séquence de 342 paires de bases, permet d'augmenter la sensibilité d'un facteur 10. Ainsi, environ 2 000 ff/ml pouvaient alors être détectés dans les eaux. Cette technique, combinée à des procédés d'extraction et de purification des acides nucléiques, permet de déceler 500 ff/g dans la chair de coquillages artificiellement contaminés. La spécificité de la détection peut être confirmée par une réaction d'hybridation moléculaire à l'aide d'une sonde S, reconnaissant une portion de séquence du génome ubiquitaire seulement aux rotavirus.

Cette technique de détection du génome viral fut validée sur des prélèvements naturels d'eaux de surface et de coquillages. Sur 19 prélèvements d'eau de rivières et d'effluents de stations d'épuration effectués en Martinique, 8 contenaient de l'ARN viral. De même, la présence de contamination virale fut mise en évidence par RT-seminested PCR dans 20 % des prélèvements de coquillages de la région du Morbihan. Aucune corrélation n'a été mise en évidence avec la contamination bactérienne. La méthode a été également utilisée pour suivre sur une année l'évolution de la contamination de coquillages et d'eaux de stations d'épuration et également pour étudier les relations qu'il pouvait exister entre ces contaminations et la présence d'infections au niveau de la population locale.

L'analyse du polymorphisme de restriction des séquences de rotavirus amplifiées par RT-PCR avait été utilisée pour distinguer les souches responsables d'infections humaines mais aussi pour établir leur origine. Cette technique a été appliquée à l'étude de la contamination de prélèvements de coquillages effectués sur une plage de Loire-Atlantique (Figure 5).

* Dubois E.¹, Le Guyader F.¹, Billaudel J.², Kopecka H.³, Haugarreau L.¹, Ménard D.¹,
¹IFREMER Nantes, ²Univ. de Nantes, ³Institut Pasteur

Au cours de l'année 1993, 12 prélèvements de moules (*Mytilus edulis*) et de coques (*Cerastoderma edule*) ont été analysés par RT-seminested PCR. Aucun des échantillons de coques n'a permis d'identifier la présence d'ARN de rotavirus. En revanche, dans 7 prélèvements de moules le génome de rotavirus était détecté. Les échantillons de moules contaminés étaient considérés comme salubres sur le plan bactériologique (< 300 coliformes fécaux pour 100 ml). L'analyse du polymorphisme de restriction a permis de distinguer 3 séquences virales. Deux séquences ont été caractérisées à partir d'un seul échantillon de moules. **Ce résultat met en évidence la diversité des rotavirus à l'origine de la contamination, sur le plan génotypique, présents dans le milieu marin.** L'analyse, par la même méthode, des prélèvements d'eaux d'une station d'épuration, située à proximité des gisements de coquillages, montre également une contamination fréquente (8 prélèvements contaminés sur 12) des effluents destinés à être rejetés en mer. La diversité des séquences virales était importante. Ainsi, 8 séquences différentes ont été caractérisées. L'une d'entre elles avait un profil de restriction parfaitement identique à l'une des séquences identifiée à partir des coquillages. A la différence des effluents, la fréquence de contamination était moins importante dans les eaux brutes qui arrivaient dans la station (4 prélèvements positifs sur 12 analysés). De même la diversité était plus réduite. La diversité saisonnière trouvée dans les eaux épurées a pu être rapprochée d'une diversité des séquences de rotavirus isolées à partir de selles d'enfants malades, lors de la période de recrudescence des gastro-entérites à rotavirus. En effet, l'analyse de 40 prélèvements cliniques montre une importante diversité des séquences caractérisés lors des mois d'hiver et du printemps. La majorité d'entre elles avait des profils semblables à ceux caractérisés à partir des séquences isolée dans les effluents.

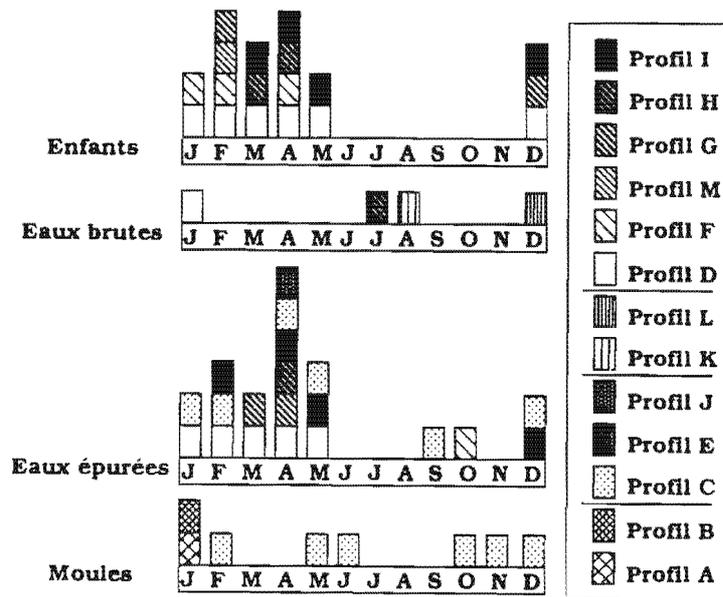


Figure 5 : Distribution sur l'année 1993 des profils de restrictions obtenus à partir des prélèvements de coquillages, d'eaux de station et des prélèvements cliniques effectués dans la région Bauloise.

Ces résultats apportent des arguments en faveur de la recrudescence saisonnière des infections à rotavirus qui s'accompagne d'une dégradation de la qualité des eaux de surface. L'impact de la dissémination des rotavirus dans le milieu marin sur la qualité des coquillages est

moins précise. Ainsi il n'a pas été établi d'homologies entre les séquences isolées à partir des coquillages et celles de rotavirus humain.

Lors de la recherche d'ARN bicaténaire de rotavirus, dans des prélèvements de l'environnement, *des résultats négatifs pourraient être attribués à la présence d'inhibiteurs*. Ainsi, même après purification sur cellulose granulaire, 13 % et 24 % (respectivement) des extraits négatifs de coquillages et d'eaux brutes présentaient une inhibition plus ou moins importante, mise en évidence par addition d'ARN viraux. L'utilisation d'un contrôle interne (Steffan et Atlas, 1991) permet de caractériser la présence d'inhibiteur mais présente plusieurs contraintes : utiliser les mêmes amorces, être différenciable de la séquence virale à l'issue de l'analyse, mais surtout permettre le contrôle de toutes les étapes de la réaction. Seule une structure ARN bicaténaire permet de tenir compte de l'étape de dénaturation préalable à la rétrotranscription.

L'ARN d'une souche de collection (SA11) a été amplifié par RT-PCR. Le produit d'amplification (nucléotides 1 à 392 du gène de la protéine VP7) a été tronqué de 104 paires de bases, puis cloné dans un vecteur de transcription (pCR-Script SK(+)) [Stratagene]. Après synthèse des deux molécules d'ARN complémentaires et réassemblage des brins complémentaires et purification, le contrôle interne a été inclus dans des réactions d'amplification. Les deux molécules virales et contrôle interne (différentielles par leur taille) au début de la réaction, ne doivent pas être à une concentration trop différente l'une de l'autre. En effet, si l'une d'elles est 100 fois plus abondante que la seconde, l'amplification de la séquence majoritaire se fait aux dépens de la séquence minoritaire. **Les premiers résultats, sur des échantillons naturels, montrent que l'emploi du contrôle interne est adapté au dépistage d'inhibiteur de la réaction d'amplification.** Cependant, les concentrations virales dans l'environnement étant faibles, il convient d'ajuster la quantité de contrôle interne introduite dans la réaction, de façon à ne pas masquer l'amplification de la séquence virale.

CONCLUSION

Au terme de ce travail, il est nécessaire de faire le point sur les travaux réalisés ; les faits marquants qui relèvent de ce programme sont les suivants :

- Le PNOC a permis de fédérer la communauté scientifique française sur les problèmes posés par la dissémination de microorganismes, essentiellement pathogènes pour l'homme, dans les zones côtières. Lors de réunions chacun a pu exposer ses travaux, confronter ses idées, ses références. Des expérimentations communes ont été réalisées, des projets d'études communs sont en cours.

- Des avancées en matière de techniques (sondes, recherche par biologie moléculaire, immunofluorescence), des résultats sur le devenir en mer des virus et de la réponse physiologique des bactéries aux stress naturels (salinité, lumière...) sont à porter au bénéfice du PNOC. Elles ont donné lieu chaque année à des rapports d'avancement, à des publications (cf. liste ci-après), à des présentations lors de congrès nationaux et internationaux.

Adéquation objectifs - résultats principaux

Les moyens mis en oeuvre lors du PNOC (tableau 1) ont permis d'aborder pratiquement tous les objectifs avancés (Pommepuy, 1992) à l'exception des travaux qui devaient être réalisés dans les sédiments et les coquillages. Seule la recherche de virus et salmonelles par PCR a donné lieu à des applications dans les coquillages.

Pour ce qui concerne la bactériologie nous avons voulu favoriser les travaux sur l'eau, de façon à optimiser les recherches analytiques (cytométrie de flux). De plus l'étude des mécanismes de stress est suffisamment complexe dans ce compartiment pour justifier une pleine application des efforts des équipes. Cependant, ultérieurement des recherches devront être effectuées pour tenir compte en particulier du rôle des sédiments et des coquillages sur le maintien des bactéries entériques en zone littorale et leur implication dans le risque sanitaire.

TABLEAU 1
BILAN BUDGETAIRE PNOC MICROBIOLOGIE SANITAIRE

Responsables Contrats	Crédits 1991	Crédits 1992	Crédits 1993-1994	Crédits * 1995
B. BALEUX ¹	70	30	186	
M. CORMIER ²	70	80	80	
P. LE BARON ³	70			
M. TROUSSELLIER ¹		100	100	75
M. GAUTHIER ⁴	40	58	59	
L. SCHWARTZBROD ⁵	120	120	100	
H. KOPECKA ⁶			80	
J. BILLAUDEL ⁷		40		
Y. MARTIN ⁸		55	195	75
M. POMMEPUY ⁹	70	120	200	150
TOTAL	440	603	1 000	400

* Non encore affectés (retard de la mise en place budgétaire 1995).

- ¹ URA CNRS 1355, Montpellier
- ² Univ. Rennes
- ³ URA 117 CNRS, Banuyls-Sur-Mer
- ⁴ INSERM Nice
- ⁵ Univ. Nancy
- ⁶ Institut Pasteur Paris
- ⁷ Univ. Nantes
- ⁸ Institut Océanographique Ricard
- ⁹ IFREMER

De façon plus précise, ces avancées concernent :

➤ *l'aspect méthodologique*

Sur le plan bactériologique, par immunofluorescence ou avec des outils de biologie moléculaire il est possible de détecter *Salmonella* et *E. coli* enterotoxinogènes dans des échantillons naturels. Les temps de détection s'en trouvent améliorés par rapport aux techniques

classiques par culture, puisqu'en 1 ou 2 jours une réponse peut être donnée ; d'autre part, la spécificité de ces outils permet de rechercher la bactérie pathogène dans des milieux où la flore est abondante. Les travaux sur l'abaissement du seuil de détection sont particulièrement intéressants car souvent les pathogènes, se trouvent en nombre limité dans les milieux extérieurs. Enfin ces techniques permettent de détecter des bactéries stressées ce qui est très important au plan sanitaire puisqu'elles ne peuvent être mise en évidence par des techniques classiques après un séjour en milieu hostile.

Sur le plan virologique

Les mêmes outils de biologie moléculaire ont été utilisés pour la détection des rotavirus. Lorsque ces travaux ont débuté, cette méthode n'avait fait l'objet d'aucune application pour la recherche d'une contamination dans des échantillons de l'environnement. La détection du génome viral est maintenant réalisée sur des prélèvements naturels (eaux, coquillages) ; l'analyse du polymorphisme de restriction des séquences de rotavirus amplifiées par RT-PC a permis de distinguer les différentes souches et de mettre en évidence la diversité des rotavirus à l'origine de la contamination ainsi que la recrudescence saisonnière des infections. L'emploi d'un contrôle interne permet de déceler les inhibiteurs de la méthode mais surtout de quantifier l'analyse.

➤ *L'aspect étude des mécanismes*

L'utilisation de la cytométrie de flux a permis d'acquérir des informations relatives à la caractérisation des états cellulaires (évolution de l'ADN, des activités respiratoires, du contenu en ADN et de la perméabilité cellulaire). Ces acquis couplés à une ouverture méthodologique basée sur le tri cellulaire offre un support intéressant pour aborder la question fondamentale de la nature stochastique ou déterministe du devenir des entérobactéries en milieu marin.

De plus, à côté de la mise en évidence du rôle de la matière organique naturelle sur la réponse de *Salmonella* à un stress osmotique, des mécanismes non encore décrits tel que l'utilisation de la proline comme source de carbone et d'énergie pour la synthèse du tréhalose accumulé et la probable dégradation de la glycine-bétaïne ont été démontré. La matière organique joue également un rôle déterminant dans le stress oxydatif auquel est soumis *E. coli* en mer (effet des rayons lumineux). L'implication du gène *kat F* dans ces phénomènes est évoqué. Des travaux complémentaires se développeront dans cette nouvelle voie de recherche.

Qu'en est-il du maintien du pouvoir pathogène sous l'effet du stress ? Si nous ne possédons pas encore toutes les réponses à ce jour, les travaux débutés dans le cadre du PNOG nous permettent d'établir un protocole d'obtention de la perte du pouvoir de cultiver ou l'"état zéro" indispensable dans cette approche. De plus le modèle permettant d'évaluer le maintien ou la perte de virulence de *Salmonella typhimurium* à partir d'un test souris a été mis au point.

➤ *L'aspect conceptuel*

A partir des démarches méthodologiques et des travaux sur les mécanismes un modèle conceptuel du devenir des bactéries en mer a été établi ; il tient compte des résultats analytiques des différentes équipes travaillant sur le PNOC et met en évidence les deux niveaux successifs de réponse de la bactérie au stress :

- une première réponse de type "résister, réparer, adapter" qui se met en place rapidement quel que soit le stress impliqué et notamment dès le début de la phase stationnaire,
- une réponse ultérieure de mise en place plus lente, qui conduit à l'état de dormance et dont l'objectif serait de préserver l'ADN des cellules à plus long terme.

Le modèle qui en découle comporte 8 fonctions biologiques (pompage des substrats, assimilation, croissance et maintenance, état du compartiment interne, réponses anti-stress, transformation VNC, réversibilité, réparation, autolyse cellulaire). Les simulations réalisées montrent une dynamique générale cohérente. Il demeure essentiel de confirmer la validité de certaines hypothèses du modèle, en particulier concernant les trois états cellulaires et leur réversibilité.

LISTE DES RAPPORTS PNOG

Baleux B. Contrat 94.2.43.6410. Rapport d'activité Juillet 1995.

Bonnefont J.L. et Martin Y. Modélisation du devenir des bactéries entériques en mer, Rapport d'avancement, avril 1993, 10 p.

Bonnefont J.L., Martin Y., Troussellier M., Cahet G. Modélisation du devenir des bactéries entériques en mer. Rapport d'avancement, juin 1994, 26 p.

Crance J.M., Leveque F. et Deloince R. Effet virucide du rayonnement ultraviolet sur le virus de l'hépatite A. Rapport Ifremer, février 1994, 14 p.

Derrien A., Dupray E., Pichon R. Halotolérance en milieux naturels : mécanismes et osmoprotecteurs accumulés par *Salmonella spp.* Rapport d'activité, Ifremer 1993, 36 P.

Dubois E., 1994. Devenir des rotavirus dans les écosystèmes marins. Rapports d'activité. Avril 1994, 30 p.

Dupray E., Caprais M.P., Dreau A. Recherche de *Salmonella* dans le milieu marin par PCR, Rapport d'activité, Ifremer 1994, 26 p.

Dupray E., Derrien A., Pichon R. Etude des mécanismes d'halotolérance de *E. coli* et *Salmonella* en milieux naturels. Rapport Ifremer 1992, 25 p.

Gales P., Baleux B., Got P., Courties C. Méthodologie de quantification par immunofluorescence des salmonelles dans les eaux d'écosystèmes côtiers. Contrat Ifremer 91.2.43.0430 Del, 1993, 28 p. + annexes.

Gantzer C. et Schwartzbrod L. Adsorption des virus entériques en eau de mer : cas du poliovirus et de la Na-Montmorillonite. Rapport Ifremer, Fév. 1994, 28 p.

Gauthier M.J., Flatau G.N., Munro P.M. et Clément R.L. Influence des mécanismes d'adaptation aux stress sur le potentiel de survie d'*Escherichia coli* en eau de mer, 1993, 41 p.

Gauthier M.J., Flatau G.N., Munro P.M. et R.L. Clément. Influence des mécanismes d'adaptation aux stress sur le potentiel de survie d'*Escherichia coli* et de *Salmonella typhimurium* en eau de mer. Rapport final 1994, 44 p.

Gourmelon M., Cillard J., Pommepuy M. Etude de la toxicité de la lumière visible sur *E. coli* en eau de mer : rôle des espèces réactives de l'oxygène. Rapport Ifremer, Nov. 1992, 34 p + annexes.

Gourmelon M., Pommepuy M. Effet de la lumière visible sur *Escherichia coli* en eau de mer. Rapport d'activité 1994-1995.

Gourmelon M., Pommepuy M. Etude du mécanisme de phototoxicité sur *Escherichia coli* dans l'eau de mer. Rapport d'activité, Ifremer 1993, 29 p.

Le Guyader F, Ménard D., Billaudel S., Marchais V. Détermination de la qualité du milieu sur l'inactivation des virus en mer. Analyse par biologie moléculaire. Rapport Ifremer, Mai 1993, 13 p.

Le Guyader F. et Billaudel S. Détection des entérovirus dans le milieu extérieur par biologie moléculaire, contrat Ifremer 91-2430425 DEL, Nov. 1993, 39 p.

Lebaron P. et Troussellier M. Caractérisation de différentes étapes cellulaires au cours de la survie d'*Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* en eau de mer. Contrat 91.2.43.0428/Del. Rapport d'activité 1992, 24 p.

Lebaron P., Troussellier M., Joux F., Courties C. Caractérisation des états cellulaires au cours de la survie des entérobactéries dans le milieu marin. Rapport d'activité 1995, 22 p.

Martin Y., Bonnefont J.L., Troussellier M. Modélisation du devenir des bactéries en mer. Contrat Ifremer 94.2.43.6405 DEL, 1995, 34 p.

Menon P., Martin Y., Bonnefont J.L., Hellies A., Troussellier M. Activité d'ingestion des protozoaires vis-à-vis de la bactérie *E. coli* en zone littorale du Var. Contrat 94.2.43.6 Del-Ifremer, Juin 1995, 24 p.

Mesplé F., Troussellier M., Martin Y., Bonnefont J.L. Effet de la prédation sur le devenir des bactéries entériques en mer. Modélisation. Rapport d'activité 1994, 50 p.

Pommeuy M., 1992. PNOC- Microbiologie sanitaire, 54 p.

Pommeuy M., 1994. Programme National d'Océanographie Côtière. Microbiologie sanitaire. Résumé des activités et des travaux, 75 p.

Schwartzbrod L., Dincher M.L., Deloince R. et Crance J.M. Détermination de la qualité du milieu sur l'inactivation des virus en mer. Rapport Ifremer, Contrat Ifremer 91.2.43.0437 DEL, décembre 1992, 41 p.

Tamanai-shacoori Z., Jolivet-Gougeon A. et M. Cormier. Facteurs de pathogénicité et activité physiologique chez les bactéries, par mise en évidence de gènes amplifiés et reconnus spécifiquement par sondes. Contrat Ifremer 91/2430438, 1992, 32 p.

Thaminy-Dekar A., Jolivet-Gougeon A., Minet J., Cormier M. Mise en évidence par biologie moléculaire de *Escherichia coli* enterotoxinogène et de *Salmonella enterica* dans les eaux de station d'épuration et le milieu marin, 1993, Contrat CNRS-PNOC, 44 p.

Troussellier M., lebaron P., Joux P., Courties C. Caractérisation des états cellulaires au cours de la survie des entérobactéries dans le milieu marin. Rapport d'activité 1993-1994, 32 p.

LISTE DES PUBLICATIONS DU PNOC

Dincher M.L. Survie du poliovirus dans l'eau de mer D.E.A. Chimie et Microbiologie de l'Eau (Nancy, Pau, Poitiers), Juillet 1992.

Dupray E. Derrien A., Pichon R.. Osmoregulation by trehalose synthesis in *Salmonella manhattan* after exposure to waste waters. Letters in Applied Microbiology, 1995, 20, 148-151.

Flatau G.N., Clément R.L. et Gauthier M.J. Influence of carbohydrates on survival of *Escherichia coli* K-12 in seawater, with a special reference to trehalose (soumis à FEMS Microbiol. Ecol.).

Flatau G.N., Gauthier M.J., Martinez-Manzanares E., and Clément R.L. Effects of osmotic shock on uptake and release of carbohydrates and amino acids by *Escherichia coli* resting cells in seawater. Syst. Appl. Microbiol., 7 p, sous presse.

Gantzer C. Influence de la Montmorillonite sur le comportement du poliovirus en eau de mer. D.E.A. Chimie et Microbiologie de l'Eau (Nancy, Pau, Poitiers), Juin 1993.

Gantzer C., Quignon F. and Schwartzbrod L. Poliovirus 1 adsorption onto and desorption from montmorillonite in seawater. Survival of the adsorbed virus. Environ. Tech., 1994, 15, 271-278.

Gauthier M.J. and Clément R.L. Effect of a short period of starvation in oligotrophic waters on the resistance of enteric bacterial pathogens to gastric pH conditions. FEMS Microbiol. Ecol., 9 p., sous presse.

Gauthier M.J., Benson S.A., Flatau G.N., Clément R.L. Breittmayer V.A. and Munro P.M. OmpC and OmpD porins influence viability and culturability of *Escherichia coli* incubated in seawater. Microb. Releases, 1992, 1: 47-50.

Gauthier M.J., Flatau G.N., LeRudulier D., Clément R.L. and Combarro M.P. Intracellular accumulation of potassium and glutamate specifically enhances survival of *Escherichia coli* in seawater. Appl. Environ. Microbiol., 1991, 57 : 272-276.

Gougeon A., Tamanai-Shacoori Z. and M. Cormier. Synthesis of a digoxigenin-labelled DNA probes as a way of detecting gene expression by RNA hybridization in enterotoxigenic *Escherichia coli*. Soumis pour publication in J. Microbiol. Methods.

Gourmelon M., Cillard J. et Pommepuy M., 1994. Visible light damage on *Escherichia coli* in seawater : oxidative stress hypothesis. J. Appl. Bacteriol., 77, 105-112.

Gourmelon M., Touati D., Pommepuy M. et Cormier M. Influence of KatF sigma factor (RpoS) on the survival of *Escherichia coli* exposed to visible light in seawater (en préparation).

Joux F., Lebaron P., Troussellier M. and Courties C., Characterization of different cellular states of *Salmonella typhimurium* during starvation in seawater using flow cytometric and microscopic methods. Appl. Environ. Microbiol. (soumis).

Le Guyader F., Dincher M.L., Ménard D., Schwartzbrod L. and Pommepuy M. Comparative study of the behavior in sterile seawater using RT-PCR and cell culture. Mar. Poll. Bull., 1994, 28, 723-726.

Lebaron P. and Joux F., 1994. Flow cytometric analysis of the cellular DNA content of *Salmonella typhimurium* and *Alteromonas haloplanktis* during the starvation and recovery in seawater. Appl. Environ. Microbiol. 60, 4345-4350.

Leveque F., Crance J.M., Beril C. and Schwartzbrod L. Virucidal effect of UV light on hepatitis A virus in seawater : evaluation with cell culture and RT-PCR. Wat. Sci. Technol., 1995, 31, 157-160."

Munro P.M, Flatau G.N., Clément R.L. and Gauthier M.J. Influence of the Rpos (KatF) sigma factor on maintenance of viability and culturability of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in seawater (soumis à Appl. Environ. Microbiol.).

Munro P.M., Clément R.L., Flatau G.N. and Gauthier M.J. Effect of thermal, oxidative, acidic, osmotic, or nutritional stresses on subsequent culturability of *Escherichia coli* in seawater. Microb. Ecol., 1994, 27 : 57-63.

Tamanai-Shacoori Z., Gougeon A., Pommepuy M., Cormier M., R.R. Colwell. Detection of enterotoxigenic *E. coli* in water by polymerase chain reaction amplification and hybridation. Can. J. Microbiol., 1994, 40 : 243-249.

Troussellier M., Courties C. and Vaquer A., 1993. Recent applications of flow cytometry in microbial ecology. Biol. Cell. 111-121.

Vincent R. D.E.A. Chimie et Microbiologie de l'Eau (Nancy, Pau, Poitiers) Soutenance prévue : Juillet 1996.