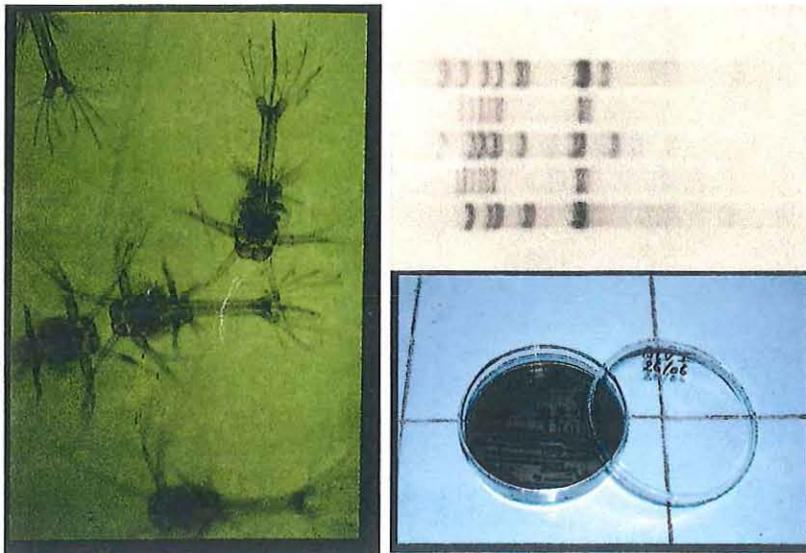


GRENON Karine

Lycée J. Bujault
79500 Melle

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

Typage d'une population de bactéries du genre *Vibrio* associée à un élevage de crevettes péneïdes



66270.
EGLO. GNE
T

Stage effectué au Laboratoire de
Génétique et Pathologie de l'IFREMER
Ronce-les-Bains (17)

2623

Brevet de Technicien Supérieur Agricole
D'Analyses Biologiques et Biotechnologies

Session 1997-1999



RESUME

Ce rapport fait état d'une étude réalisée au laboratoire de Génétique et Pathologie de l'IFREMER dans le cadre de l'analyse d'épisodes de mortalité anormale survenue en éclosion privée de crevettes pénéides. Plusieurs hypothèses ont été avancées. La présence de *Vibrio harveyi* a amené à constituer une collection de 40 souches à partir desquelles une identification bactériologique a été effectuée. Elle montre en effet une dominance de souches appartenant à un groupe homogène de *Vibrio harveyi*. La technique de ribotypage (digestion d'ADN génomique, transfert de Southern-blot et hybridation avec une sonde spécifique) est alors mise en place. Plusieurs difficultés techniques ont ralenti l'analyse et n'ont donc pas permis d'avoir des résultats assez avancés pour résoudre le problème de la mortalité. Cependant cette technique a montré son intérêt pour le typage des souches impliquées dans les épisodes de mortalité. Il est ainsi apparu qu'une même espèce pouvait être divisée en sous-groupes qui pourraient ne pas avoir le même pouvoir pathogène.

L'étude préliminaire réalisée durant ce stage a donc été positive même s'il reste au laboratoire à optimiser la technique pour l'utiliser en routine.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier André Gérard et Jean-Pierre Flassch pour m'avoir accueilli dans leur station.

Je remercie également Franck Berthe, mon maître de stage, qui par sa gentillesse et sa patience m'a soutenu durant mon étude et pour la rédaction de ce rapport.

Je remercie tout particulièrement Magali Waechter, ma charmante collègue, ainsi que Frédérique Le Roux pour m'avoir encadrer durant ce stage. C'est avec beaucoup de savoir-faire, de disponibilité et de soutien qu'elles m'ont tout appris des bactéries et de leur ADN. Je leur souhaite une bonne continuation.

Je remercie aussi Corinne, Arnaud, Christophe, Isabelle ainsi que tous les autres stagiaires et titulaires qui m'ont apporté leur aide et leur sympathie. Ils m'ont permis d'effectuer ce stage dans la bonne humeur et je ne l'oublierais pas.

PLAN

INTRODUCTION.....	p. 1
1. PRESENTATION.....	p. 2
11. L'IFREMER	
111. L'IFREMER en France	
112. La station de Ronce-les-Bains	
12. Pathologie des crevettes	
121. Les crevettes	
122. Les maladies d'origine bactérienne	
123. Les <i>Vibrio</i>	
13. L'écloserie	
131. Etude bactériologique des différents compartiments identifiés	
132. Flux et charges bactériennes au cours du fonctionnement de l'écloserie	
14. Principe de l'étude	
2. MATERIELS ET METHODES.....	p. 7
21. Identification phénotypique	
211. Culture et conservation	
212. Tests d'identification	
a. Croissance sur gélose	
b. Coloration de Gram	
c. Mobilité / flagelle	
d. Métabolisme respiratoire	
e. Citrate de Simmons	
f. Kligler-hajna	
g. Gélatinase	
h. Galerie « maison »	
i. Acidification des sucres	
j. « croissance sur »	
k. Température	
l. Antibiogramme	
213. Exploitation des données	
22. Typage moléculaire	
221. Culture des bactéries	
222. Extraction des acides nucléiques	
2221. Lyse cellulaire	
2222. Extraction	
2223. Dégradation des ARN	

- 2224. Contrôle de l'ADN
 - a. Spectrophotométrie
 - b. Minigel de contrôle
- 223. Digestion de l'ADN
- 224. Gel analytique
- 225. Southern blot
 - 2251. Transfert
 - 2252. Marquage de la sonde
 - a. Marquage des oligonucléotides
 - b. Contrôle du marquage de la sonde
 - 2253. Hybridation
 - 2254. Lavage
 - 2255. Détection des hybrides

3. RESULTATS..... p. 15

- 31. Identification phénotypique
 - 311. Caractérisation des souches
 - 312. Identification des souches

- 32. Typage moléculaire
 - 321. Résultats
 - 322. Interprétation

4. DISCUSSION.....p. 19

- 41. Problèmes rencontrés
 - 411. Pour l'identification phénotypique
 - 4111. La pureté
 - 4112. La lecture des tests
 - 4113. L'identification
 - 412. Pour le typage moléculaire
 - 4121. La quantité et la qualité de l'ADN
 - 4122. La digestion
 - 4123. Le marquage de la sonde
 - 4124. L'hybridation et la révélation de la membrane
 - 4125. La lecture des profils
 - 413. Pour le rapprochement de l'identification et du typage

- 42. Application à l'écloserie

CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... p. 24

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Le laboratoire de Génétique et Pathologie est hébergé par la station IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) de Ronce-les-Bains qui est située sur la côte atlantique en Charente-Maritime. Les principaux objectifs du laboratoire visent essentiellement à développer des programmes chez les invertébrés marins dans les domaines de la pathologie et de la génétique.

Depuis le 1^{er} trimestre 1997, plusieurs épisodes récurrents de mortalité anormale ont été observés et étudiés dans une éclosérie privée de crevettes pénéides. L'IFREMER a entrepris d'identifier les causes probables des épisodes de mortalité et de proposer des mesures à même de rétablir des conditions de production normales pour cette éclosérie. De multiples hypothèses ont déjà été envisagées dont la présence d'une bactérie pathogène, *Vibrio harveyi*. Le but de mon stage est donc de localiser la source de contamination ainsi que les souches contaminantes au sein de l'éclosérie. A cet effet, je dois identifier des échantillons prélevés par une personne de L'IFREMER à différents points de l'éclosérie. Cette reconnaissance comprend des observations microscopiques, des tests biochimiques et un typage moléculaire par ribotypie.

Cette étude a été réalisée de Juin à Août 1998.

1. PRESENTATION

11. L'IFREMER

111. L'IFREMER en France

L'IFREMER gère un budget de près d'un milliard de francs, dont l'origine provient en majeure partie de la subvention que lui verse l'Etat et à laquelle s'ajoutent des ressources propres que son statut d'EPIC (Etablissement Public à caractère Industriel et Commercial) lui permet de développer.

Un peu plus de 1200 ingénieurs, chercheurs, techniciens et administratifs participent aux multiples missions de l'IFREMER. Ces personnels travaillent au siège social à Issy-les-Moulineaux, dans quatre centres (Boulogne-sur-Mer, Nantes, Toulon, Tahiti), des stations réparties le long du littoral français, et des délégations Outre-mer.

Mais l'IFREMER, c'est aussi un groupe : en effet, à ces 1200 personnes, il faut ajouter environ 600 personnes qui travaillent dans des filiales pour valoriser la politique de recherche de l'Institut auprès, notamment, des professionnels de la mer et gérer les moyens de la flotte océanographique.

112. La station de Ronce-les Bains

Le Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP) de Ronce-les Bains a été créé fin 1994, suite à une réorganisation de l'ancien laboratoire des Ressources Aquacoles de La Tremblade, puis remanié en 1996.

La direction de ce laboratoire a été confiée à André Gérard. Les principaux objectifs du LGP visent essentiellement à développer des programmes sur les mollusques bivalves, dans le domaine de :

- la pathologie : surveillance des ressources conchylicoles, identification des agents pathogènes, description de leur cycle de développement, mise au point des techniques de reproduction expérimentale de maladies, développement d'outils performants de diagnostic utilisables à des fins de recherche ou de contrôle, étude de l'impact de ces maladies et de leur évolution géographique et temporelle, étude des mécanismes cellulaires de défense mis en jeu par les mollusques dans certaines maladies.
- la génétique : obtention de souches résistantes ou tolérantes aux maladies pour essayer d'apporter des réponses aux épizooties qui remettent en cause les productions; création de souches ou de lignées présentant de meilleures performances de croissance, de qualité de chair, une meilleure adaptation aux conditions de milieu d'élevage ou éventuellement de faibles besoins métaboliques.

La station emploie une trentaine de personnes dont les cadres, les techniciens, les doctorants, les post-doctorants et le personnel administratif et logistique. Elle accueille également beaucoup de stagiaires tout au long de l'année.

Le laboratoire LGP est réparti sur deux bâtiments. Le premier est principalement constitué de :

- 6 salles de laboratoire (1 salle des centrifugeuses, 1 salle d'histologie, 1 salle de préparation des échantillons pour la microscopie électronique, 1 salle de cultures cellulaires, 1 salle de bactériologie / électrophorèse et 2 salles réservées à la biologie moléculaire).

- 1 salle de manipulation de radioéléments.
- 1 salle climatisée pour le microscope électronique à transmission.
- 1 laboratoire photo, 1 salle de rangement des produits, 1 laverie.
- 8 bureaux, 1 salle de réunion et 1 bibliothèque.

Le deuxième bâtiment de 1200 m², est principalement constitué de :

- 7 salles humides.
- 2 salles de production de phytoplancton et une laverie.
- 1 laboratoire de biométrie et une salle informatique.
- 1 laboratoire de physiologie pour le CREMA l'Houmeau et l'URAPC.
- 8 annexes techniques.

Le laboratoire a également en charge la gestion et l'entretien de tout le circuit hydraulique qui se compose de :

- 4 bassins de 300 m³ de réserve d'eau de mer.
- 23 pompes de 10 à 300 m³/h.
- plusieurs kilomètres de tuyauterie.
- 1 station de stérilisation au chlore des eaux de rejet.
- 4 bassins de 20 m³ pour la production en masse de phytoplancton.

Mon étude s'est déroulée dans le cadre spécial d'un contrat avec une éclosérie privée. J'ai donc seulement utilisé les laboratoires de bactériologie et de biologie moléculaire de la station IFREMER de Ronce-les-Bains.

12. Pathologie des crevettes

121. Les crevettes

La production mondiale de crevettes est passée de 1 080 000 tonnes en 1970 à 2.100 000 tonnes en 1987. On observe donc, depuis plusieurs années, une augmentation spectaculaire de la production de crevettes d'élevage. Les pénéides (dont *Penaeus monodon*) notamment font l'objet d'élevage intensif. Elles sont surtout destinées à l'exportation. Le marché de la crevette est donc un enjeu important pour les producteurs (Calvas, 1989). Aussi, si les techniques existent et permettent des productions économiquement viables, elles restent à optimiser. Les producteurs peuvent être fréquemment confrontés à un problème de mortalité parfois difficile à identifier qui ferait effondrer leur production. Les difficultés apparaissent dès les premiers stades du cycle de reproduction des crevettes (doc 1).

122. Les maladies d'origine bactérienne des crevettes

La croissance rapide de la culture industrielle de crevettes s'est accompagnée de l'impact négatif des maladies dans ce type de production. Beaucoup de bactéries sont à l'origine de ces maladies mais les infections les plus nombreuses sont dues aux *Vibrio*. Ces bactéries sont présentes en majorité dans la microflore des cultures de crevettes pénéides. Dans de nombreuses recherches, les *Vibrio* ont été trouvés dans l'hépatopancréas de leur hôte

malade. Il n'est donc pas surprenant que les études concluent que certaines espèces de *Vibrio* soient pathogènes pour les crevettes pénéides (Leano *et coll.*, 1998).

123. Les *Vibrios*

Le genre *Vibrio* est classé dans la famille des *Vibrionaceae* qui représente un groupe important au sein de la branche des Proteobacteria. Les bactéries du genre *Vibrio* sont des bacilles à Gram négatif en forme de bâtonnets droits ou incurvés. Elles ont des dimensions de l'ordre de 0,5 à 0,8 μm , et sont mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires. La plupart sont oxydases positifs. Toutes fermentent le glucose et l'utilisent comme source principale de carbone et d'énergie avec acidification mais sans émission de gaz. Les ions sodium stimulent leur croissance et sont même indispensables au développement de certaines espèces. Anaérobies facultatifs, ces micro-organismes sont très répandus en milieu aquatique selon un large spectre de salinité et très fréquents dans la flore bactérienne marine. On peut également les trouver à la surface du tégument ou au niveau du tractus digestif de certains animaux marins.

Les *Vibrio* sont des bactéries aquatiques, océaniques ou non que l'on trouve sous forme libre ou fixée sur des supports comme les exosquelettes de chitine, la cellulose, les carbonates de calcium, le zooplancton ou autres particules en suspension.

Une douzaine d'espèces sont pathogènes chez l'homme, mais un nombre encore plus important de vibrions sont responsables de graves maladies chez les vertébrés et les invertébrés marins.

13. L'écloserie

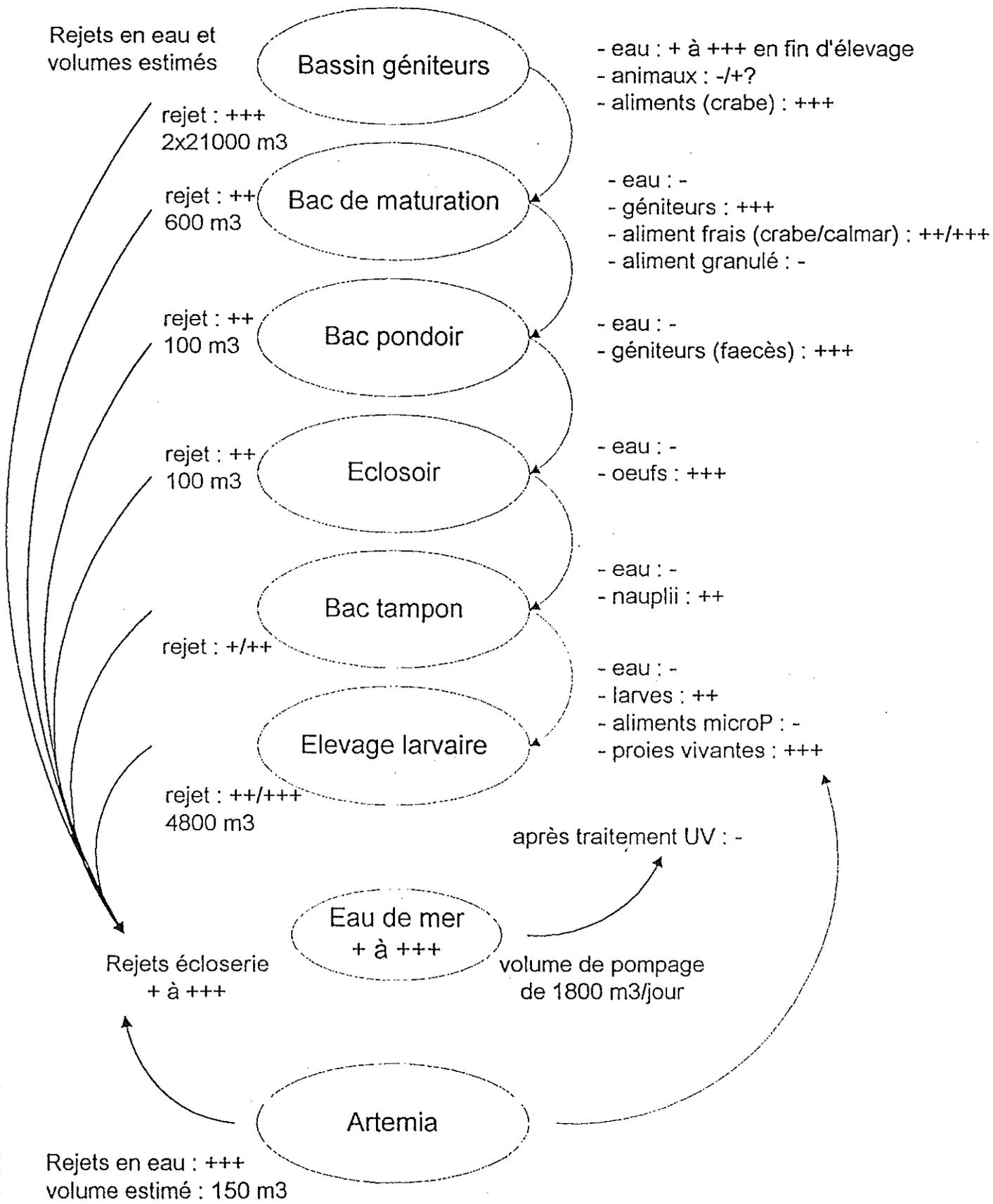
131. Etude bactériologique des différents compartiments identifiés

Six compartiments successifs ont été identifiés au cours de la production de post-larves, qui sont : bassins de géniteurs, maturation, ponte, éclosion, élevage larvaire et nurserie. Les divers prélèvements à étudier ont été réalisés sur les intrants (essentiellement l'eau, les animaux et les aliments), considérés comme sources potentielles de contamination et sur les sortants, source de contamination pour les compartiments suivants (Origine des prélèvements en annexe 1). Les examens réalisés sont donnés par le document 2. Les dénombrements réalisés sur milieux gélosés (Marine agar ou Zobell, pour la flore hétérotrophe totale et TCBS pour la flore vibronacée) permettent d'évaluer la charge bactérienne des différents intrants étudiés.

132. Flux et charges bactériennes au cours du fonctionnement de l'écloserie

Une quantification de la contamination bactérienne sur l'écloserie a été estimée (doc 3).

Schématisation des flux et charges bactériennes au cours du fonctionnement de l'écloserie

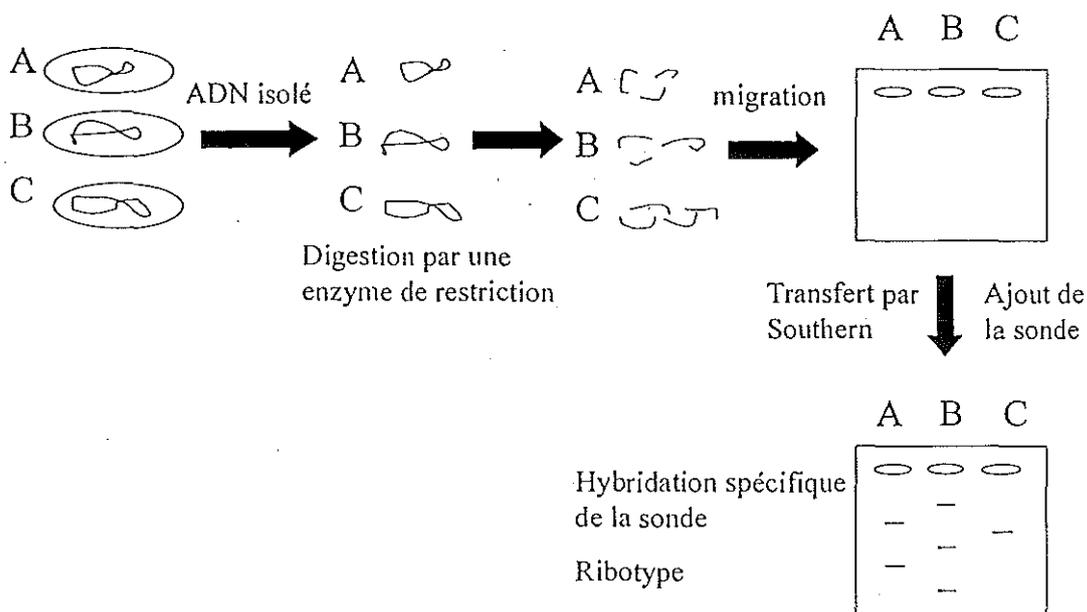


14. Principe de l'étude

L'objectif est d'identifier des souches par deux méthodes :

- une identification phénotypique à partir de tests bactériologiques et biochimiques qui ont déjà été mis en place au laboratoire

et - un typage par ribotypie qui n'a pas encore été mis en place au laboratoire. Cette méthode comporte deux étapes importantes : la digestion de l'ADN et le Southern blot avec le transfert sur membrane et le marquage de l'ADN (doc 4).

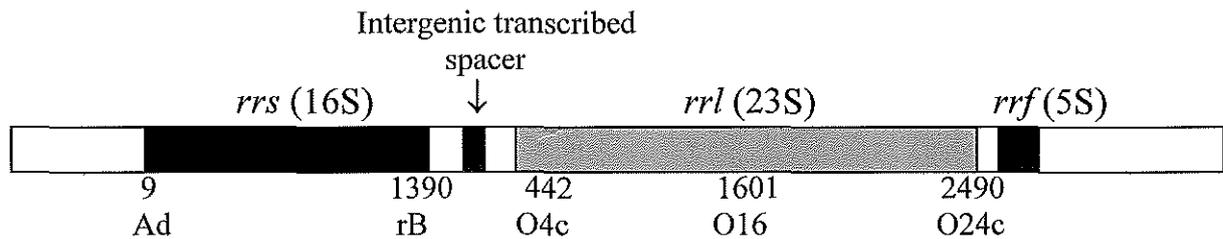


Doc 4 : Schéma du ribotypage effectué .

La longue molécule d'ADN a des fonctions universelles donc elle possède beaucoup de zones différentes. Ainsi, dans la séquence de gènes qui codent pour les ARN, il y a des parties conservées et des parties variables. Ces dernières marquent la distance pour les espèces vis à vis d'un ancêtre commun. Ces zones variables sont donc comme des signatures qui permettent d'établir la phylogénie des organismes. Sur cette base, l'ARNr 16 et 23S d'*E. coli* est utilisé comme sonde universelle pour révéler un polymorphisme de restriction de l'ADN (Grimont & Grimont, 1986). Cependant en ribotypie, certains problèmes sont dus au fait que la sonde (ARNr 16+23S d'une bactérie) ne réagit pas avec la même intensité lorsque les ADN proviennent d'espèces d'origines phylogénétiques variées. Pour résoudre ce problème, un ensemble de cinq oligonucléotides appelé OligoMix5 (B. Regnault *et coll.*, 1997) est utilisé pour réagir avec des séquences conservées présentes près des extrémités du gène *rrs* (codant l'ARNr 16S) et près des extrémités et au milieu du gène *rri* (codant l'ARN 23S) (doc 5).

Le polymorphisme des ribotypes provient essentiellement de la variabilité des séquences encadrant les opérons *rrn* (gènes codant pour la sous unité 30S précurseur des

ARNr 5S, 16S et 23S) de chaque espèce bactérienne.



Doc 5 : représentation schématique d'un opéron *rrnB* d'*E. coli* montrant les positions des oligonucléotides.

Le but de la digestion est de couper la longue molécule d'ADN native en fragments de restriction. Ils permettent de caractériser et de regrouper chaque type de bactérie selon le nombre et la taille des fragments. L'ADN est digéré par Mlu I (choix d'après S.Koblavi, 1996), enzyme de restriction reconnaissant un site à six paires de bases (A[↓]CGCGT).

Le Southern blot est le transfert d'un ADN sur une membrane. Il est la technique principale du ribotypage dans notre étude. Tout d'abord, il y a un transfert des fragments de restriction générés par Mlu I sur membrane. Ensuite, il y a hybridation de la sonde sur la membrane. Puis des profils de restriction apparaissent propres à chaque souche. Ils sont révélés par immunodétection avec le DIG Oligonucleotide Tailing Kit (Boehringer Mannheim) (doc 6). Ce sont les différences de nombre ou de taille des fragments composant le profil qui montrent le polymorphisme des différentes souches.

2. MATERIELS ET METHODES

21. Identification phénotypique

La composition de tous les milieux utilisés pour l'identification est donnée en annexe 2.

211. Culture des bactéries et conservation des souches

A partir des prélèvements conservés en tube Pasteur, les souches sont remises en culture par un ajout d'eau peptonnée et incubées pendant 24 à 48 h. Elles sont ensuite étalées sur une gélose Zobell et mises à incuber pendant 24 à 48 h à 20°C. Enfin, à partir d'une colonie prélevée sur la gélose de Zobell, 10 ml d'un bouillon coeur-cerveau (cc) sont ensemencés et placés pendant 4 à 8 h en chambre d'incubation avec plateau agitateur à 25°C. Une gélose TCS est ensemencée à partir du bouillon cc et est utilisée pour effectuer les différents tests.

Les souches sont stockées en tube de conservation à - 80°C et ensemencée à partir de colonies prélevées sur la gélose Zobell précédente.

212. Tests d'identification

Les résultats des différents tests de l'identification des souches sont reportés sur une fiche d'identification individuelle (doc p.8).

a. Croissance sur gélose

- Zobell glycérol

Ce test permet de mettre en évidence le caractère luminescent de certaines souches. La révélation de ce test s'effectue à l'obscurité.

- TCBS

L'ensemencement de la gélose TCBS (thiosulfate-citrate-sel biliaire-sucrose-agar) permet de connaître la morphologie de la colonie sur ce milieu et de savoir si la souche utilise ou pas le saccharose : sacc + = colonie jaunée , sacc - = colonie verte. Le TCBS est un milieu sélectif pour les Vibrionacées.

b. Coloration de Gram

Cette coloration est réalisée selon le protocole de R. N. Doetsch (1981). Les lames sont observées au microscope optique (× 1000, immersion).

La coloration de Gram permet de différencier deux grands groupes de bactéries : les Gram + (violet) et les Gram - (rose).

Elle est aussi très intéressante pour observer la morphologie des bactéries : bacille, coque...

FICHE D'IDENTIFICATION DES SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES

N° d'identification :

Date du test : / / 1998

Morphologie de l'UFC :

- sur **Zobell** (j à 20 °C)
 taille : contour : R / I opacité : O / T
 profil : B / P couleur :
 - sur **TCBS** (j à 20 °C)
 taille : contour : R / I opacité : O / T
 profil : B / P couleur :

Luminescence : + / -

Gram : + / -

Morphologie des bactéries : C B CB autre

Mobilité : + / -

Présence de flagelles : + / - 1 flagelle polaire : autre :

Oxydase : + / -

MEVAG : F O I Al Gaz

Gélose V F : AÉS AAF AnS Maé Gaz

Citrate de Simmons : + / -

Kligler-Hajna : H₂S + / - Glu + / - Lact + / -

Gélatinase : + / -

Galerie "maison" :

Lecture	Salinité	ADH	LDC	ODC	Temoin
h					
h					
Lecture	Indole	VP	Nitrate	ONPG	
h					
h					

c. Mobilité / flagelle

La réalisation de ces deux tests se fait sur le culot de condensation d'une gélose de Zobell en pente. Une goutte de cette suspension est montée entre lame et lamelle avec une goutte de colorant (composition en annexe 1) qui diffuse par capillarité. La lame est observée au microscope optique ($\times 1000$, immersion) dans la partie sans colorant (où les bactéries sont encore vivantes) pour la mobilité et dans la partie avec colorant pour les flagelles.

d. Métabolisme respiratoire

- Oxydase

La recherche de l'oxydase se fait à partir de disques imprégnés d'oxalate de diméthyl-paraphénylène-diamine sur lequel une colonie de bactéries prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée est déposée :

Oxy + = violet

- Voie d'attaque des glucides

Ce test est réalisé sur milieu MEVAG (Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides) adapté aux souches marines (préparé en eau de mer artificielle). Deux tubes sont nécessaires pour chaque souche : un tube en aérobie qui vire du rouge au jaune si la bactérie utilise la voie oxydative en présence de glucose et un tube en anaérobie (couche d'huile de paraffine empêchant la diffusion de l'air) qui subit le même changement de couleur si la bactérie utilise la voie fermentative.

- Type respiratoire

Ces caractères (AÉS : aérobie strict, AAF : aéro-anaérobie facultative...) sont étudiés sur milieu semi-solide Viande-Foie.

e. Citrate de Simmons

L'ensemencement de cette gélose en pente verte met en évidence l'utilisation du citrate de sodium comme seule source de carbone.

Cit + = bleu, cit - : vert

f. Kligler-hajna

L'ensemencement de cette gélose en pente rouge donne trois résultats :

- le culot de la gélose vire au jaune si le glucose est acidifié,
- la pente de la gélose vire au jaune si le lactose est acidifié,
- l'apparition d'un anneau noir autour de la gélose s'il y a production d' H_2S .

g. Gélatinase

La présence de la gélatinase est mise en évidence par la liquéfaction du milieu inoculé après passage du tube 10 mn à $4^{\circ}C$.

h. Galerie "maison"

- salinité

La croissance sur NaCl est testée à différentes concentrations : 0, 6, 8 et 10 %.

- ADH, LDC, ODC

Ces tests permettent respectivement la recherche de l'arginine-dihydrolase, de la lysine-décarboxylase et de l'ornithine-décarboxylase.

Le témoin est positif quand il vire du violet au jaune. Les trois tests sont positifs quand le milieu est violet et négatifs quand il vire au jaune.

- Indole

Ce test met en évidence la production d'indole à partir du tryptophane. Il est positif lorsqu'un anneau rouge se forme après ajout d'une goutte de réactif de Kovacks.

- V.P

La réaction du Voges-Proskauer est positive lorsqu'il y a production d'acétoïne à partir du pyruvate. Le test est positif quand une coloration rouge apparaît 10 mn après l'ajout de 7 gouttes des réactifs VP1 et VP2.

- Nitrate

Cette réaction met en évidence la réduction des nitrates en nitrites. Si celle-ci se fait, le milieu jaune vire au rouge après ajout d'une goutte des réactifs NIT1 et NIT2.

- ONPG

Cette réaction permet la recherche de la β -galactosidase. La mise en évidence s'effectue par d'un $\frac{1}{4}$ de disque ONPG dans une solution bactérienne concentrée. Le résultat est positif si la solution vire au jaune.

i. Acidification des sucres

Il y a acidification de l'arabinose et du mannitol quand le milieu inoculé correspondant vire du rose au jaune.

j. "Croissance sur"

Ces tests montrent l'utilisation des composés carbonés (L-Arabinose, D-Glucosamine, α -Kétoglutarate, Urée) comme source d'énergie. La réaction est positive s'il y a apparition d'un trouble du milieu après incubation.

k. Température de croissance

Ces tests s'effectuent en tubes d'eau peptonnée qui sont placés à 4, 20, 35 et 40 °C.

1. Antibiogramme

Les tests de sensibilité aux antibiotiques s'effectuent sur une gélose Mueller-Hinton sur laquelle est étalée une suspension bactérienne peu concentrée. Les disques correspondant au composé O129 et à l'ampicilline y sont disposés. Les bactéries sont sensibles, intermédiaires ou résistantes suivant la mesure du diamètre de la zone où les colonies n'ont pas poussées.

213. Exploitation des données

. Pour cette étude, la base de données choisie pour l'identification est spécifique aux *Vibrio* (Alsina, 1994). Elle utilise un système de dichotomie avec un classement basé sur les tests de présence d'enzymes de dégradation d'acides aminés. A partir de ces résultats, des arbres de dichotomie sont mis en place permettant de suivre les différents tests et leurs résultats afin de retrouver la souche testée (annexe 3). Ainsi on peut retrouver six arbres dichotomiques retrouvant les six possibilités de résultats aux tests d'utilisation des trois enzymes que sont l'arginine dihydrolase (ADH), l'ornithine et la lysine décarboxylase (ODC et LDC).

22. Ribotypage

221. Culture des bactéries

Les bactéries sont cultivées de la même façon que pour les tests biochimiques. Le bouillon coeur-cerveau est centrifugé à 3500 g pendant 10 mn et le culot est récupéré. L'extraction de l'ADN peut se faire à partir de bactéries fraîchement centrifugées ou à partir du culot congelé à - 20°C.

222. Extraction des acides nucléiques

Les acides nucléiques cellulaires totaux (ADN+ARN) sont extraits suivant plusieurs étapes chronologiques qui sont la lyse, l'extraction, la déprotéinisation et la précipitation.

2221. Lyse cellulaire

Deux ml de solution d'extraction (100mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 25 mM EDTA pH 8, 0.5 % SDS, 0.2 mg/ml Proteinase K) est ajouté au culot précédemment obtenu. Le mélange est incubé 3 h à 50 °C

2222. Extraction des acides nucléiques

Le lysat est dilué dans un volume de Tris EDTA (TE). Un volume (V : volume final de dilution du culot) de phénol est ajouté puis le mélange est centrifugé pendant 10 mn à 3 500 g. Trois phases sont alors mises en évidence : la phase phénolique au fond du tube, l'interphase formant une galette blanche contenant les protéines retenues par le phénol et la phase aqueuse contenant les acides nucléiques qui est prélevée puis transférée dans un nouveau tube. Cette manipulation est répétée une fois avec un volume de phénol et un volume de chloroforme/alcool isoamylique puis une autre fois seulement avec un volume de chloroforme/alcool isoamylique (pour éliminer les traces de phénol). Cette phase aqueuse prélevée est précipitée avec 0.1 V d'acétate de Na 3 M pH 5.4 et 2.5 V d'éthanol absolu. Les tubes sont mélangés puis une méduse d'acides nucléiques est récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur, lavée dans de l'éthanol 70 % et séchée. Le bout de la pipette est alors placé dans un tube Eppendorf de 1.5 ml dans lequel est ajouté 500 µl de TE. La dissolution se fait sur un agitateur à 4 °C pendant la nuit (O/N).

2223. Dégradation des ARN

Les acides nucléiques sont soumis à une RNase (100 µg/ml) afin d'éliminer les ARN (acide ribonucléique) et d'avoir uniquement de l'ADN (acide désoxyribonucléique). Après une incubation à 37 °C pendant 15 mn et une nouvelle déprotéination avec 500 µl de phénol et de chloroforme, une centrifugation est effectuée puis la phase aqueuse récupérée est précipitée. Si celle-ci n'est pas propre, d'autres phénol / chloroforme peuvent être réalisés. Ensuite, l'ADN est lavé à l'éthanol 70 et 100 %, séché puis repris par 200 µl d'eau sur un rotor O/N.

2224. Contrôle de l'ADN

a. Spectrophotométrie

Le but de cette technique est de quantifier l'ADN et de déterminer la contamination en protéine. La densité optique (DO) à 260 nm correspondant à la quantité d'ADN et la DO à 280 nm correspondant à la quantité de protéines, sont mesurées. Le rapport de ces DO représentant la contamination en protéine doit être idéalement compris entre 1,7 et 2. La concentration (C) en ADN de l'échantillon est calculée en µg/ml selon la formule sachant que le coefficient 50 (en µg/ml d'ADN) correspond à une DO.

$$C = DO_{260} \times 50 \times (1/\text{dilution})$$

b. Minigel de contrôle

La qualité de l'ADN est analysée par électrophorèse en gel d'agarose. Pour cela 1 µg d'ADN est mélangé à 2 µl de tampon bleu de coloration puis ce mélange est déposé dans un gel d'agarose 0,8 % contenant du bromure d'éthidium (agent intercalant de l'ADN) qui permet de visualiser l'ADN aux UV. La migration s'effectue dans du tampon TAE 1 X pendant 1 h à 80 Volts.

223. Digestion de l'ADN

L'enzyme Mlu I est fournie avec le tampon adéquat (composition en annexe 2), concentré 10 fois. Dix µg d'ADN sont digérés avec un dixième du volume final de tampon de restriction, de la BSA à 10 µg/µl et 5 unités de l'enzyme Mlu I par µg d'acide nucléique. La réaction est réalisée à 37 °C pendant 1 h.

La digestion est contrôlée sur minigel d'agarose à 0,8 %. Si celle-ci est correcte, les différents ADN digérés sont précipités, centrifugés puis le culot est séché avant d'être repris dans 30 µl d'eau distillée. La reprise du culot est également contrôlée par un minigel d'agarose à 0,8 % puis normalisée si nécessaire.

224. Gel analytique

Le but du gel analytique est la séparation plus fine des fragments de restriction. Pour cela, un grand gel d'agarose à 0,8 % est préparé afin de faire migrer l'ADN plus loin pour obtenir une bonne résolution.

A 25 µl d'ADN digéré et normalisé, 5 µl de bleu de dépôt sont ajoutés puis deux dépôts de 15 µl peuvent être effectués. La migration s'effectue en tampon TAE 1X pendant 16 h à 40 volts.

Le gel obtenu est alors traité pendant 30 minutes avec une solution de HCl 0,25 M afin de couper les gros fragments d'ADN, rincé à l'eau et enfin immergé dans un bain de NaOH 0,4 N pendant 30 minutes pour dénaturer l'ADN (séparation du double brin en simples brins).

225. Southern blot

2251. Transfert

Un dispositif permettant le transfert du gel sur une membrane de nylon est mis en place (doc 7). Pour le résultat du transfert, la membrane est lavée dans du SSC 2X, séchée entre deux feuilles de papier Whatman puis elle est cuite au four à 80 °C pendant 2 h afin de fixer de manière irréversible l'ADN sur la membrane.

2252. Marquage de la sonde

La sonde est, en fait, un ensemble de cinq oligonucléotides (Regnault *et coll.*, 1997) (doc 8).

Zone	Oligo	Séquence de la sonde	Taille	Position
rrs	Ad	AGA GTT TGA TC(A,C) TGG CTC AG	58-60	08-28
rrs	rB	TGA CGG GCG GTG TGT ACA A	60	1408-1390
rrl	O4c	ACC GAT AGI GAA CCA CCA GTA CCG TG	68	442-466
rrl	O16	GTA CCI CAA ACC GAC ACA GGT IG	66	1601-1623
rrl	O24c	TTT GGC ACC TCG ATG TCG GCT	66	2490-2512

Doc 8 : Oligosondes utilisés pour la détection des gènes ARNr.

a. marquage des oligonucléotides

Les oligonucléotides sont utilisés à une concentration finale de 100 $\mu\text{mol/l}$. Cent pM soit 1 μl de chaque oligonucléotide est marqué avec le DIG Oligonucleotide Tailling Kit (Boehringer Mannheim). Les oligonucléotides marqués sont ensuite précipités avec 2,5 μl d'acétate de sodium et 75 μl d'éthanol absolu et placés à -20°C sur la nuit.

b. contrôle du marquage de la sonde

Les oligonucléotides précipités sont lavés à l'éthanol 70 %, séchés puis les culots sont repris par 40 μl d'eau. Pour chaque oligonucléotide (plus un contrôle fourni dans le kit), des dilutions sont effectuées au 1/10 et au 1/100. Un μL de chaque dilution (C_0 , $C_{1/10}$, $C_{1/100}$) est déposé sur une membrane de nylon qui est exposée aux UV pendant 3 mn afin de fixer les acides nucléiques sur la membrane de manière covalente. Elle est ensuite révélée de la même façon que le Southern (cf. § 2255). La qualité du marquage peut alors être juger en comparant l'intensité du marquage des oligonucléotides avec celui du contrôle positif.

2253. Hybridation

Une pré-hybridation est effectuée pour saturer la membrane. Celle-ci est placée dans le four à hybridation à 50°C pendant 1 h avec une solution de pré-hybridation.

La sonde marquée est ensuite rajoutée au milieu de pré-hybridation et l'hybridation a lieu pendant une nuit à 50°C .

2254. Lavage

La membrane est lavée à 50°C dans le four à hybridation par des bains de stringence croissante (car plus on diminue les sels, mieux on lave) : deux lavages de 5 mn avec du SSC 2X, SDS 0,1 %, puis deux autres avec du SSC 0,1X, SDS 0,1 %.

2255. Détection des hybrides

La révélation est préparée dans différents tampons (DIG 1 à 4 : cf. annexe 2 pour la composition) à température ambiante dans une cuve sur un plateau à agitation : 2 mn dans du DIG 1, 30 mn dans du DIG 2, rinçage au DIG 1, 30 mn avec de l'anticorps dilué au 1/5000 dans du DIG 2, 2×15 mn dans du DIG 1, 5 mn dans du DIG 3 et enfin dans une solution de révélation (200 μl de BCIP/NBT pour 10 ml de DIG 3) à l'abri de la lumière jusqu'à l'apparition complète des signaux. La réaction est stoppée dans un bain de DIG 4.

3.RESULTATS

31. Identification phénotypique

311. Caractérisation des souches

Les résultats des tests phénotypiques et biochimiques effectués sont regroupés dans le tableau 1 et 2.

N°	4°C	20°C	35°C	40°C	Mobilité	Sacc	Gram	Ox	ONPG	Glu	Lact	H ₂ S	VF
2NB1	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	AAF
2NB2	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	AAF
2NB3	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	AAF
2NB4	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	AAF
2NB5	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB7	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB8	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	AAF
2NB9	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB10	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB11	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB12A	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	AAF
2NB12B	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB14	-	+	+	+	ND	+	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB15	-	+	+	-	ND	-	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB16	-	+	+	+	ND	-	-	+	+	+	-	-	AAF
2NB17	-	+	+	+	ND	-	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB18	-	+	+	+	ND	-	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB19	-	+	+	-	ND	-	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB20	-	+	+	+	ND	+	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB21	-	+	+	+	ND	+	-	+	-	+	+	+	AAF
2NB22A	-	+	+	+	ND	+	-	+	-	+	+	-	AAF
2NB22B	-	+	+	+	ND	-	-	+	-	+	+	-	AAF
2NB23	-	+	+	+	ND	+	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB24	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	AAF
2NB25	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	AAF
2NB26	-	+	+	+	ND	-	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB27	-	+	+	+	ND	+	-	+	-	+	-	+	AAF
2NB28	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	AAF
2NB29	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB30	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB31	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB32	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	AAF
2NB33	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB34	-	+	+	+	ND	-	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB36	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB37	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	AAF
2NB39	-	+	+	+	ND	+	-	+	+	+	-	+	AAF
2NB40	+	+	+	+	ND	+	-	+	-	+	-	+	AAF
3NB41	-	+	+	+	ND	+	-	+	-	+	-	-	AAF

N°	4°C	20°C	35°C	40°C	Mobilité	Sacc	Gram	Ox	ONPG	Glu	Lact	H ₂ S	VF
3NB42	-	+	+	+	ND	+	-	+	+	+	-	+	AAF
3NB44	-	+	+	+	ND	+	-	+	+	+	-	-	AAF
3NB45	-	+	+	+	ND	-	-	+	+	+	-	-	AAF
3NB46	-	+	+	+	ND	-	-	+	+	+	-	-	AAF
3NB47	-	+	+	+	ND	-	-	+	-	-	-	+	AAF
3NB48	-	+	+	+	ND	+	-	+	-	+	-	+	AAF

Sacc + : acidification du saccharose (colonies jaunes) sur TCBS

- : pas d'acidification (colonies vertes) sur TCBS

AAF : Aérobie-Anaérobie facultatives

ND : non déterminé

tableau 1

N°	0%	6%	8%	10%	Ind	VP	Nit	Témoin	ADH	LDC	ODC	Gélat	Lumines
2NB1	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
2NB2	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
2NB3	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-
2NB4	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
2NB5	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
2NB7	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
2NB8	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
2NB9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
2NB10	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
2NB11	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
2NB12A	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
2NB12B	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
2NB14	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
2NB15	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
2NB16	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
2NB17	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
2NB18	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
2NB19	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
2NB20	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
2NB21	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
2NB22A	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
2NB22B	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
2NB23	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
2NB24	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
2NB25	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
2NB26	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
2NB27	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
2NB28	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
2NB29	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
2NB30	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
2NB31	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
2NB32	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
2NB33	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
2NB34	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+

N°	0%	6%	8%	10%	Ind	VP	Nit	Témoin	ADH	LDC	ODC	Gélat	Lumines
2NB36	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
2NB37	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
2NB39	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
2NB40	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
3NB41	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
3NB42	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
3NB44	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
3NB45	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
3NB46	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
3NB47	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
3NB48	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-

tableau 2

Les tableaux 1 et 2 sont la base de l'identification. Ils vont permettre de révéler les espèces des prélèvements étudiés selon la classification d'Alsina *et coll.* (1994).

312. Identification des souches

Les différents prélèvements sont regroupés selon les espèces de *Vibrio* après identification. Des résultats incohérents ont amené à relativiser sur le nom de l'espèce obtenue. Certains échantillons sont donc classés dans une espèce autre que celle trouvée par la classification mais très proche tout de même.

Vibrio harveyi : 2NB7, 2NB16, 2NB17, 2NB18, 2NB19, 2NB22B, 2NB30, 2NB33, 2NB34, 2NB36, 2NB37, 3NB42, 3NB45, 3NB46, 3NB47, 3NB48

Vibrio parahaemolyticus : 2NB14, 2NB26, 2NB27, 2NB39, 2NB40

Vibrio alginolyticus : 2NB20, 2NB21, 2NB23, 2NB31, 2NB41

Vibrio campbellii : 2NB1, 2NB3, 2NB15, 2NB32, 2NB44

Vibrio proteolyticus : 2NB10, 2NB11

Vibrio vulnificus : 2NB2, 2NB4

Plesiomonas shigelloides : 2NB8

Vibrio orientalis : 2NB22A

Vibrio aestuarinus : 2NB12B

Vibrio pelagius II : 2NB24

Vibrio metschnikovii : 2NB28

Vibrio mimicus : 2NB25, 2NB29

Les prélèvements 2NB5 et 2NB9 ne sont pas admis dans la classification car les résultats de leurs tests ADH, LDC, ODC ne sont pas pris en compte. 2NB12A n'est pas un *Vibrio* puisqu'il s'agit d'un coque à Gram +.

32. Typage moléculaire

321. Résultats

Après révélation, la membrane fait apparaître des profils de restriction (doc 9). Afin d'exploiter ces résultats, les signaux sont retranscrits en respectant le plus possible la position et la largeur des bandes (doc 9). Par comparaison entre eux, les différents profils peuvent alors être regroupés et assimilés aux espèces qui composent les différents groupes en s'aidant des résultats obtenus en biochimie et du profil de la souche type de *Vibrio harveyi* (CRL 30).

322. Interprétation

Après le regroupement, il apparaît plusieurs groupes homogènes dans lesquels, on distingue des sous-groupes.

Ainsi, 2NB7, 2NB16, 2NB17, 2NB22B, 2NB32, 2NB34, 2NB36, 2NB37, 2NB39 et 3NB42 appartiennent à la population de *Vibrio harveyi* avec une petite sous-population (2NB32 et 3NB42) et une grosse sous-population (les autres). De même, 2NB9, 2NB10 et 2NB11 forment le groupe des *Vibrio proteolyticus*, 2NB20, 2NB21 et 2NB23, celui des *Vibrio alginolyticus* et 2NB30 et 3NB48, celui des *Vibrio campbellii*. Certains profils ne sont pas assez distincts ou trop différents des autres profils pour être analysés.

4. DISCUSSION

La méthode de typage par ribotypie par marquage chaud (en utilisant le ^{32}P) ou par marquage froid (en utilisant un marquage non radioactif) a déjà été établie à plusieurs reprises. Mais la technique de B. Regnault *et al.* (1997) donne une méthode valable pour les typages de toutes les bactéries. Au cours de notre étude, cette technique a pu être appliquée mais pas avec le succès attendu. En effet, l'interprétation a été difficile à cause d'une lecture finale délicate. De plus, la méthode a été confrontée à divers problèmes plus ou moins bien résolus.

41. Problèmes rencontrés

411. Pour l'identification phénotypique

L'étude en bactériologie demande beaucoup de rigueur, notamment par rapport aux problèmes de la stérilité. Ce problème étant bien maîtrisé, l'identification biochimique n'a pas engendré de problèmes techniques majeurs. Cependant, quelques difficultés se sont posées mais ont été vite rétablies.

4111. La pureté

Tout d'abord, la pureté des souches est nécessaire aussi bien pour l'identification biochimique que pour le ribotypage. Cette pureté peut être visible de suite sur la gélose de Zobell. Si plusieurs formes de colonies poussent sur cette gélose, c'est une contamination c'est-à-dire qu'il y a présence d'au moins deux bactéries différentes. Ce genre de contamination vient du fait que lors d'un prélèvement sur l'écloserie, deux souches ont été isolées et conservées dans le même tube Pasteur. Ce problème est arrivé pour le prélèvement 2NB22 de l'étude. Il a fallu isoler deux souches (nommées 2NB22A et 2NB22B) à partir de la gélose de Zobell, les conserver et les identifier séparément.

4112. La lecture des tests

Un autre problème technique est la difficulté de lecture de certains tests. Ce problème concerne notamment les tests de "croissance" en microplaque et le test de croissance à 4°C. En effet, il est parfois difficile de faire la distinction entre une vraie croissance et la présence d'une colonie due à l'ensemencement. Pour cela, on laisse incubé plus longtemps et on homogénéise le milieu à l'aide d'un cure-dent stérile pour la microplaque et du vortex pour le tube à 4°C.

4113. L'identification

Enfin, un problème plus important est lié à l'identification : la classification d'Alsina *et coll.* (1994) ne s'avère pas assez discriminante. Elle est rapide mais elle se base sur peu de tests qui ne sont pas assez discriminants. De plus, la fragilité de certains tests

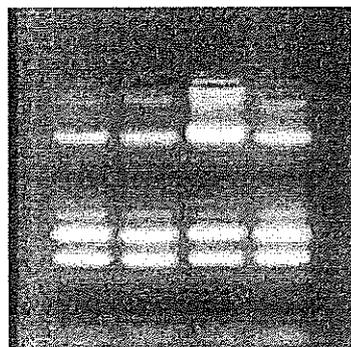
biochimiques font qu'une seule erreur d'interprétation peut changer le nom d'espèce de la souche étudiée. Aussi, il faut émettre des réserves sur les identifications. Par exemple, il y a incohérence si une souche est identifiée par la classification d'Alsina comme *Vibrio parahaemolyticus* et qu'elle est luminescente (ce qui est souvent le cas dans notre étude). *Vibrio parahaemolyticus* ne possède pas ce caractère (Holt *et al.*, 1994). Il semblerait que la souche soit plutôt *Vibrio harveyi*. Il faut donc vérifier les résultats de tous les tests pour chaque souche afin d'éviter les incohérences d'identification.

412. Pour le typage moléculaire

Dans cette partie de l'étude, des problèmes plus importants et difficiles à résoudre sont survenus.

4121. La quantité et la qualité de l'ADN

Tout d'abord, après l'extraction des acides nucléiques, un contrôle de la qualité sur un minigel d'agarose s'est avéré surprenant (doc 10). En effet, une bande d'ADN était bien distincte mais il y avait également deux bandes plus basses qui ne semblaient pas correspondre à de l'ARN. Elles ont pourtant disparu après un traitement RNase. Un problème de quantité est aussi apparu, sûrement lié au culot de bactéries de taille différente qui donnait donc plus ou moins d'ADN. Même avec le spectrophotomètre, une bonne quantification n'a pas pu être effectuée mais cela n'a pas entravé le reste de la manipulation.



Doc 10 : Photo d'une migration d'acides nucléiques sur gel d'agarose.

4122. Digestion

La digestion a posé un problème important. Après une digestion parfaite, à plusieurs reprises, l'enzyme Mlu I n'a pas digéré l'ADN. Il a fallu remettre en cause plusieurs paramètres :

- La BSA et l'enzyme utilisées lors de la première tentative de digestion avaient déjà servi. Un mauvais conditionnement (décongélation, stockage à température ambiante, recongélation...) de ces produits est envisagé. Une enzyme neuve est donc testée sans résultats satisfaisants.

- Une contamination d'une des solutions (l'acétate de sodium notamment) est suspectée. L'extraction d'ADN est donc réalisée avec d'autres solutions mais la digestion est toujours négative.
- L'enzyme Eco RI (souvent utilisée donc disponible au laboratoire) est testée sans réussite. Une remarque de Promega (fournisseur d'enzymes) sur les fiches d'information de Mlu I et d'Eco RI montre une sensibilité à la méthylation. Aussi, l'enzyme Tru 9I (non sensible) est testé et la digestion a lieu. Cependant, aucune technique de déméthylation simple et rapide n'est connue. De plus, la digestion ayant déjà eu lieu avec Mlu I montre que toutes les bactéries ne sont pas sensibles à la méthylation et surtout pas systématiquement.
- La propreté de l'ADN extrait est aussi suspecté. Une nouvelle RNase et une nouvelle protéinase K sont préparées et utilisées, et plusieurs phénol/choroforme sont effectués sans changement pour la digestion.
- Enfin, le milieu de culture des bactéries lors de ces tentatives de digestion était différent du milieu utilisé lorsque la digestion avait eu lieu. En effet, une culture sur gélose avait amélioré la quantité de bactéries culottées et donc d'ADN extrait par rapport à une culture en bouillon. Lors du dernier essai de digestion, la majorité des bactéries est de nouveau cultivée en bouillon et la digestion a lieu. Mais les ADN des quelques bactéries qui avaient été cultivées sur gélose sont également digérés.

La digestion a finalement eu lieu mais on ne peut pas déterminer la cause du problème posé pendant un long moment. Plusieurs difficultés ont pu être accumulés.

4123. Le marquage de la sonde

Les résultats du marquage des oligonucléotides se sont révélés tout d'abord médiocre. Il y avait une nette différence de concentration d'un facteur 10 environ entre l'intensité du signal des oligonucléotides et celle du signal du contrôle. Une nouvelle enzyme terminal transferase est testée et le problème est résolu (doc 11).

AD	O4C	O16	RB	O24C	Cont
●	●	●	●	●	●
●	●	●	●	●	●
○	○	○	○	○	○

Doc 11 : Membrane contrôlant l'intensité du marquage de la sonde

4124. L'hybridation et la révélation de la membrane

La révélation de la première membrane pose quelques problèmes :

- les profils ne sont pas tous révélés,
- les signaux présents ont une faible intensité,
- un grand bruit de fond est présent.

Pour la deuxième membrane, la température de pré-hybridation et d'hybridation est ramenée de 53°C à 50°C. Le résultat est alors satisfaisant même si l'intensité des signaux est encore un peu faible.

Enfin, pour la dernière membrane, les rinçages et la révélation sont effectués dans des grands volumes sur la table agitée. La membrane montre encore un grand bruit de fond. Les signaux ont une bonne intensité mais ils ne sont pas nettement séparés, si bien que parfois un problème de lecture se pose.

4125. La lecture des profils

Il est parfois difficile de différencier deux bandes rapprochées et une bande épaisse, tout comme un signal faible et un bruit de fond. Il est donc nécessaire de rassembler des profils qui ne sont pas exactement identiques en émettant des réserves.

413. Pour le rapprochement de l'identification et du typage

Lorsqu'un rapprochement entre les identifications biochimiques et les identifications ribotypiques on note une différence entre le nombre de souches identifiées en bactériologie (p 17) et le nombre de profils relevés en ribotypie. Cette différence montre qu'il existe une diversité génomique plus importante que ce que l'on voit en bactériologie. Il est également important de noter qu'à l'intérieur d'une espèce bactérienne, un ou plusieurs profils de restriction des ADN_r peuvent être observés (Grimont & Grimont, 1986). Les résultats biochimiques ne sont donc pas spécialement en contradiction avec les ribotypes obtenus. Il se peut qu'il y ait une légère différence entre deux profils de restriction d'une même espèce. Par exemple, une population importante de *Vibrio harveyi* est divisée en deux sous-populations car deux groupes de profils sont proches.

42. Application à l'écloserie

D'après les résultats de l'identification biochimique et de la ribotypie, il est confirmé que des *Vibrio* sont présents dans tous les compartiments de l'écloserie. On retrouve notamment la présence majoritaire de *Vibrio harveyi* (due à l'échantillonnage) qui est à l'origine de certaines maladies de crevettes (Bower *et al*, 1994). On ne peut pas aller plus loin dans l'analyse car il s'agit d'une étude préliminaire.

Cependant l'identification bactériologique et la mise en place de la technique de ribotypie pour cette étude a permis de montrer que plusieurs outils pouvaient être utilisés. Le problème est de savoir lequel est le mieux adapté pour résoudre le problème de l'écloserie.

Le premier outil, qui est l'identification bactériologique, est le plus grossier. Elle est pourtant très utilisée car assez simple en pratique. Les résultats sont d'ailleurs satisfaisants quand les identifications portent sur des espèces qui sont différenciées par un nombre suffisant de tests reproductibles. Malheureusement quelques groupes de bactéries, spécialement en biologie marine, se distinguent par très peu de tests comme *Vibrio harveyi* et *Vibrio parahaemolyticus* par exemple. Dans notre étude en effet, ce problème a rendu difficile l'identification de certaines souches mais des groupes d'espèces ont quand même pu être constitués.

Le deuxième outil, qui est le ribotypage, semble plus intéressant. Il apporte en effet plus de détails dans l'identification de nos souches. Par exemple, en phénotypic, toutes les souches qui poussent sur TCBS sans acidifier le saccharose et qui sont luminescentes sont classées dans le groupe *Vibrio harveyi*. En ribotypie ce groupe n'apparaît pourtant pas homogène.

Deux groupes de profils pouvant être assimilés à *Vibrio harveyi* sont constitués. Cette méthode a donc l'avantage de plus détailler les groupes de *Vibrio*. C'est très intéressant puisque ces sous-groupes n'ont peut-être pas la même virulence vis à vis des crevettes. Il reste au laboratoire à optimiser cette technique et l'appliquer à une étude plus complète.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Tout d'abord cette étude a permis de mettre en place au laboratoire de Génétique et Pathologie de l'IFREMER, la technique de ribotypage. De plus, cette méthode en complément de l'identification bactériologique a montré la complexité des communautés bactériennes impliquées dans des épisodes de mortalité au sein de l'écloserie de crevettes pénéides. Même si les résultats obtenus durant ce stage ne sont pas assez complets pour résoudre le problème, ils ont montré l'intérêt de l'apport de la technique de ribotypage pour obtenir une image plus juste des phénomènes bactériens.

Une étude du même type mais plus complète devra être envisagée. Notamment, une nouvelle collection avec un nombre plus important de souches représentatives de tous les points de l'écloserie devra être constituée puis étudiée avec les techniques de typage vus précédemment. Enfin le laboratoire doit optimiser le ribotypage pour qu'il puisse être utilisé en routine.

ANNEXES

ANNEXE 1

Liste des souches incluses dans cette étude :

- 2NB1 = bassin géniteurs
- 2NB2 = bassin géniteurs
- 2NB3 = eau du bac de maturation n°2
- 2NB4 = eau du bac de maturation n°2
- 2NB5 = hémolymph de géniteur n°2
- 2NB6 = eau du bac de maturation n°2
- 2NB7 = eau de rejet
- 2NB8 = eau de rejet
- 2NB9 = eau de rejet
- 2NB10 = eau de rejet
- 2NB11 = hémolymph de géniteurs, 8 femelles
- 2NB12A = hémolymph de géniteurs, 8 femelles
- 2NB12B = hémolymph de géniteurs, 19 mâles
- 2NB13 = hémolymph de géniteurs, 4 femelles
- 2NB14 = hémolymph de géniteurs, 15 mâles
- 2NB15 = hémolymph de géniteurs, 15 mâles
- 2NB16 = eau de pompage avant filtration
- 2NB17 = eau de bac pondoir
- 2NB18 = hémolymph de géniteur
- 2NB19 = eau d'arrivée après filtre à sable
- 2NB20 = calmar
- 2NB21 = eau de maturation
- 2NB22A = eau de maturation
- 2NB22B = eau de maturation
- 2NB23 = nauplii (1^{er} stade larvaire de crevettes)
- 2NB24 = nauplii (1^{er} stade larvaire de crevettes)
- 2NB25 = eau de pompage
- 2NB26 = ponte 21
- 2NB27 = broyat de zoé (stade larvaire de crevettes)
- 2NB28 = eau d'élevage d'Artémia (proies vivantes de crevettes)
- 2NB29 = broyat de zoé (stade larvaire de crevettes)
- 2NB30 = Artémia (proies vivantes de crevettes)
- 2NB31 = crabe
- 2NB32 = calmar
- 2NB33 = Elevage larvaire (EL)5 broyat
- 2NB34 = EL5 broyat
- 2NB35 = EL4 broyat
- 2NB36 = station de pompage
- 2NB37 = station de pompage
- 2NB38 = rivière
- 2NB39 = rivière
- 2NB40 = station de pompage

ANNEXE 2

Composition des solutions et tampons

DIG 1 :

Acide malique 0,1 M
NaCl 0,15 M
Ajuster à pH 7,5

DIG 2 :

10 g de blocking reagent (stocké à - 20°C)
100 ml de DIG 1
Chauffer pour diluer et stocker en aliquot de 10 ml à - 20°C.
Diluer au $\frac{1}{10}$ ème avant utilisation.

DIG 3 :

Tris 0,1 M
NaCl 0,1 M
MgCl₂ 0,05 M
Ajuster à pH 9,5

DIG 4 :

Tris pH 8 ; 0,01 M
EDTA pH 8 ; 0,001 M

Tampon de l'enzyme MluI :

Tris-HCl pH 7,9 ; 6mM
NaCl 150 mM
MgCl₂ 6mM
DTT 1mM

Composition des milieux

Les géloses

Zobell :

Pastone.....4 g
Extrait de levure.....1 g
Agar.....15 g
Eau de mer artificielle à 2% (E.D.M.A).....1 L
pH ajusté à 7,4 avant autoclavage.

TCBS :

Thio-Citrate-Bile-Saccharose sec.....88 g
Eau Distillée (E.D).....1 L
Ne pas autoclaver.

TCS salé :

Tripto-caséine-soja sec.....40 g
NaCl.....15 g
E.D.....1 L
pH ajusté à 7,4 avant autoclavage.

Mueller-Hinton salé :

Milieu déshydraté.....35 g
NaCl.....15 g
E.D.....1 L
pH ajusté à 7,4 avant autoclavage.

Zobell + Glycérol :

Ajouter 10% (v/v) de glycérol au milieu de Zobell.

Les bouillons

Eau peptonée salée :

Peptone.....15 g
E.D.M.A.....1 L
pH ajusté à 7,4 avant autoclavage.

Bouillon coeur-cerveau salé :

Milieu sec.....37 g
NaCl.....15 g
E.D.....1 L
pH ajusté à 7,4 avant autoclavage.

Les géloses en tubes**MEVAG adapté aux souches marines :**

Extrait de viande.....15 g
Agar.....3 g
Rouge de phénol.....0,01 g
E.D.M.A.....1 L
pH ajusté à 7,4 avant autoclavage

Ajouter le glucose dans la gélose liquide à 50°C pour obtenir une concentration finale de 1% (50 ml par litre d'une solution de glucose stérile à 20%).

10 ml par tube

Gélose Viande-Foie salé :

Milieu sec.....38 g
NaCl.....15 g
E.D.....1 L
pH ajusté à 7,4 avant autoclavage.

8 ml par tube

Citrate de Simmons salé :

Milieu sec.....23 g
NaCl.....15 g
E.D.....1 L
pH ajusté à 6,8-7 avant autoclavage.

10 ml par tube

Milieu de Kligler-Hajna :

Milieu sec.....53,5 g
NaCl.....15 g
E.D.....1 L
pH ajusté à 7,4 avant autoclavage.

10 ml par tube

Gélatinase salé :

Milieu sec.....128 g

E.D.M.A.....1 L

pH ajusté à 7,4 avant autoclavage.

2 ml par tube

Galerie "maison"**Croissance sur NaCl :**

Peptone.....15 g

E.D.....1 L

NaCl.....QSP

Préparer des bouillons à 0, 6, 8 et 10 % de NaCl.

PH ajusté à 7,4 avant autoclavage.

A.D.H., L.D.C., O.D.C. :*** Témoin :**

Extrait de levure.....3 g

NaCl.....5 g

Glucose.....1 g

Bromocrésol pourpre (1,6 g / 100 ml alcool 95°).....1 ml

E.D.....1 L

pH ajusté à 7,2.

Filtration sur membrane 0,22 µm.

*** A.D.H., L.D.C., O.D.C. :**

Témoin additionné de :

Alanine.....5 g

ou

Lysine.....5 g

ou

Ornithine.....5 g

pH ajusté à 7,2.

Filtration sur membrane 0,22 µm

Indole :

Peptone exempte d'indole.....10 g

E.D.M.A.....1 L

pH ajusté à 7,4 avant autoclavage.

Voges-Proskauer (V.P.) :

Milieu de Clark et Lubs :

Peptone.....	5 g
Phosphate dipotassique.....	5 g
NaCl.....	10 g
Glucose.....	5 g
E.D.....	1 L

pH ajusté à 7,2. Filtration sur membrane 0,22 µm.

Nitrite-Nitrate :

Peptone.....	10 g
Extrait de levure.....	1 g
NaCl.....	10 g
Nitrate de potassium.....	1 g
E.D.....	1 L

pH ajusté à 7,4 avant autoclavage.

Tests effectués sur microplaque

Acidification des sucres :

Pastone.....	5 g
Extrait de viande.....	5 g
NaCl.....	5 g
Rouge de phénol.....	0,018 g
E.D.....	1 L

pH ajusté à 7,4 avant autoclavage.

Ajouter le sucre dans le milieu pour obtenir une concentration finale de 1% (50 ml par litre d'une solution de glucose stérile à 20%).

Utilisation des composés carbonés comme source d'énergie :

Le milieu de base est adapté à l'étude des Vibrionaceae :

NaCl.....	2%
MgCl ₂	0,02%
Biotype Medium 1.....	60 ml

Les solutions stériles des composés carbonés sont obtenues par filtration sur membrane 0,22µm et ajoutées au milieu de base à raison de 0,1%.

- * L-Arabinose
- * D-Glucosamine
- * α-Kétoglutarate
- * Urée

Coloration des flagelles

Solution A : à rajouter à froid dans l'ordre indiqué

Phénol (pour analyse, Carlo Erba).....	5 g
Alcool.....	5 ml
Violet cristallisé (Merck).....	3 g
E.D.....	100 ml
Tannin purifié (Sigma).....	20 g

Solution B : Solution saturée à 50°C

Aluminium potassium sulfate dodécahydrate (Labosi).....	50 g
E.D.....	100 ml

Mélanger à volume égal les solutions A et B à 60-70°C. Laisser reposer 24 h. Conserver à l'abri de la lumière à température ambiante.

Conservation à - 80°C

Pastone.....	1 g
MgSO ₄ -7H ₂ O.....	0,1 g
Glycérol.....	10% = 11.1 ml
E.D.M.A.....	100 ml

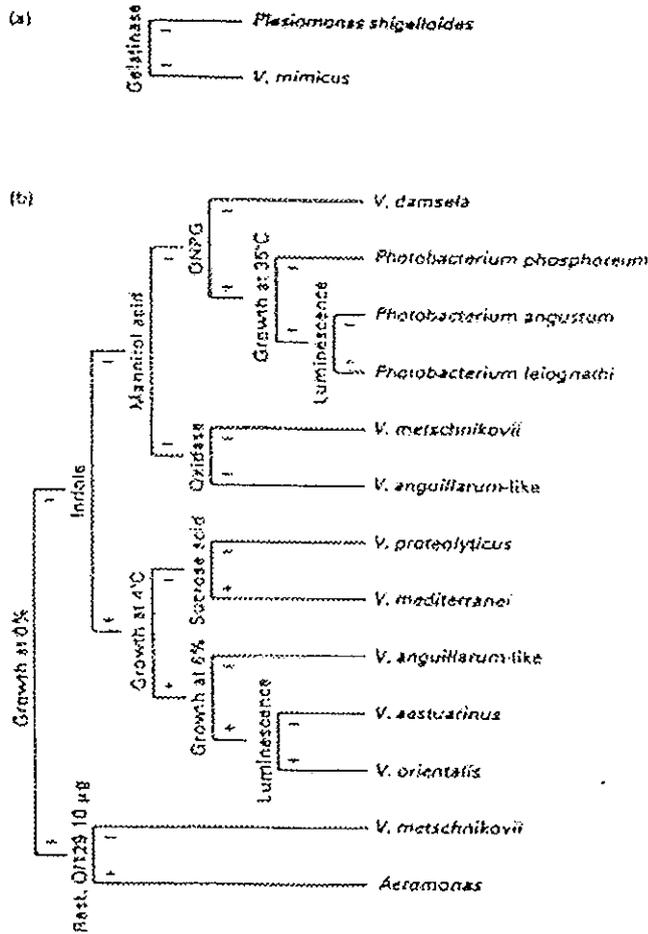
pH ajusté à 7,2.

Filtration sur membrane 0,22 µm.

1 ml par cryotube.

ANNEXE 3

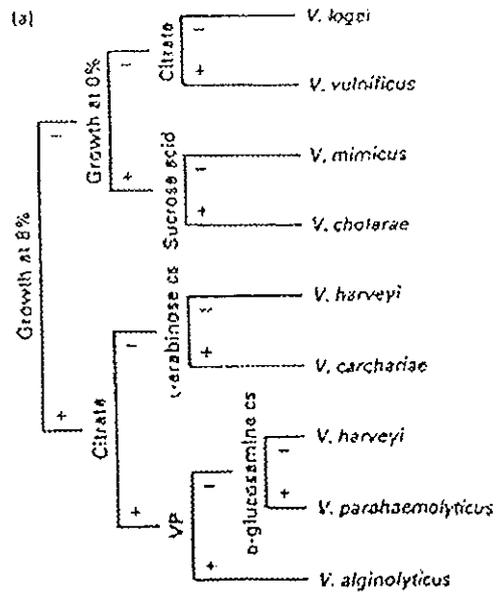
La classification dichotomique d'Alsina *et coll.*(1994)

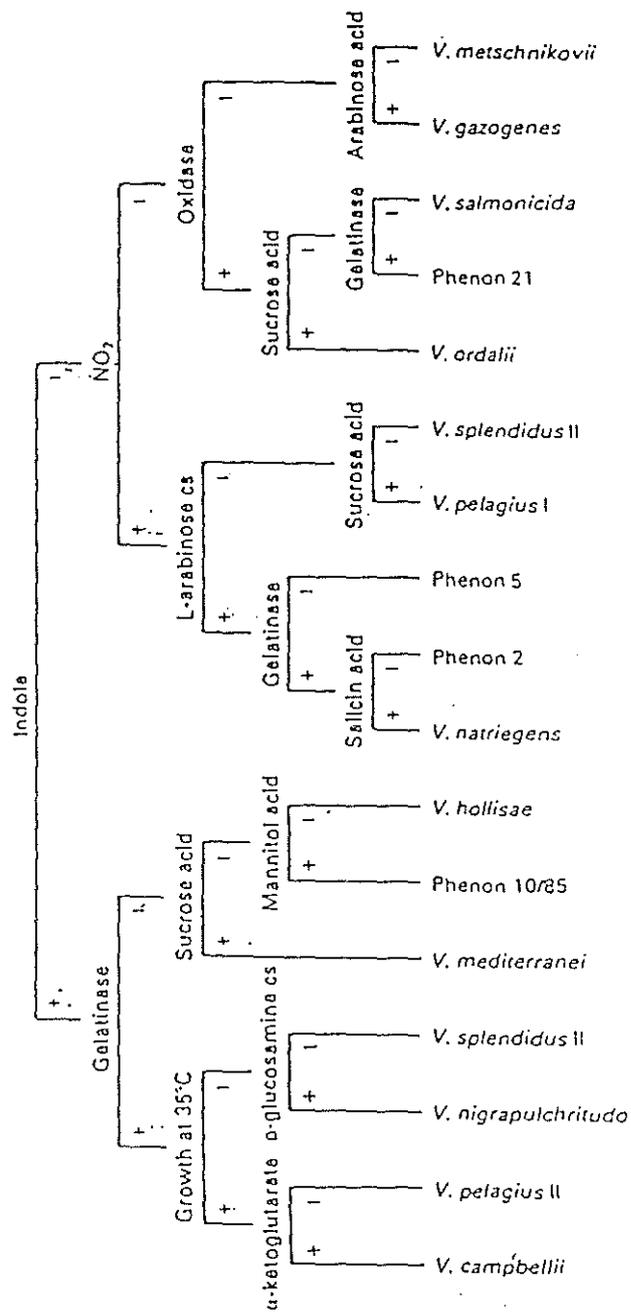


L'arbre (a) permet d'identifier les souches A+/L+/O+

L'arbre (b) permet d'identifier les souches A+/L+/O-

Cet arbre permet d'identifier les souches A-/L+/O+





Cet arbre permet d'identifier les souches A-/L-/O-

BIBLIOGRAPHIE

ALSINA, M. & BLANCH, A.R.. Improvement and update of a set keys for biochemical identification of *Vibrio* species. *Journal Applied Bacteriology*, 1994, 76 : 79-85.

BOWER, S.M., McGLADDERY, S.E. & PRICE, I.M.. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annual Review of Fish Diseases*, 1994, 4 : 133-171.

CALVAS, J.. Aquaculture des crevettes pénéides tropicales. Rapport interne de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER, octobre 1989, 11-13.

DOETSCH, R.N.. Determinative Methods of Light Microscopy. *Manual of Methods for General Bacteriology*. Washington : GERHARDT, P., 1981, 26-27.

GRIMONT, F. & GRIMONT, P.A.D.. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.*, 1986, 137 B : 165-175.

HOLT, J.G., KRIEG, N.R. & SNEATH, P.H.A.. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore : WILLIAMS and WILKINS, 1994, 259-274.

KOBLAVI, S.. Identification et typage moléculaire des Vibrionaceae. Thèse de doctorat de l'Université Paris VII, 1996, 61-62, 129-131.

LEANO, E.M., LAVILLA-PITOGO. C.R. & PANER, M.G.. Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. *Aquaculture*, 1^{er} mai 1998, 164 : 367-368.

REGNAULT, B., GRIMONT, F. & GRIMONT, P.A.D.. Universal ribotyping method using a chemically labelled oligonucleotide probe mixture. *Research in Microbiology*, 1997, 148 : 649-659.

