

**PROGRAMME NATIONAL D'OCEANOGRAPHIE COTIERE
(P.N.O.C.)**

VOLET "MICROBIOLOGIE SANITAIRE"

Résumé des activités et des travaux

Septembre 1994

Coordination : Monique POMMEPUY
IFREMER - DEL
Laboratoire Microbiologie
B.P. 70
29280 PLOUZANE

PLAN

INTRODUCTION

Résumé des activités et des travaux par laboratoires :

- Université de Montpellier (*Pr B. Baleux*)
- Université de Rennes (*Pr M. Cormier*)
- INSERM Nice (*M. Gauthier*)
- Fondation Ricard (*Y. Martin*) Université de Montpellier (*M. Trousselier*)
- Université Pierre et Marie Curie (*P. Lebaron*)
- Fondation Océanographique Ricard Ile des Embiez (*Y. Martin*)
- IFREMER DEL/MIC (*M. Pommepuy*)
- Université de Nancy (*Pr Schwartzbrod*)

CONCLUSION

PLAN NATIONAL D'OCEANOGRAPHIE COTIERE

MICROBIOLOGIE SANITAIRE

RESUME DES ACTIVITES ET DES TRAVAUX

Septembre 1994

Coordinateur Monique POMMEPUY

INTRODUCTION : *Rappel de la problématique*

Les zones marines littorales reçoivent des rejets d'eaux usées d'origine urbaine et agricole qui contiennent de très grandes quantités de micro-organismes dont certains sont pathogènes pour l'homme ; dans des environnements hostiles, la dispersion et les conditions de vie défavorables font que ces bactéries et virus disparaissent rapidement ou évoluent vers un état non cultivable. Cependant, certains milieux - sédiments, eaux turbides ou eutrophisées - présentent des conditions favorables à la survie des bactéries entériques et à la protection des particules virales.

Les travaux réalisés ces dernières années ont apporté la preuve que les bactéries sont capables de survivre dans l'environnement, d'adapter leur métabolisme aux conditions naturelles et ceci sur de très longues périodes ; dans ces conditions elles évoluent vers des états de dormance où elles ne sont plus cultivables ; ce constat attire les questions suivantes :

Dans les écosystèmes naturels, les bactéries d'origine entérique ont-elles encore une activité métabolique importante ? La compétition avec la flore autochtone existe-t-elle ? Est-ce que leur pouvoir pathogène est maintenu ? Enfin sont-elles capables d'échanger leur matériel génétique et de modifier ainsi très profondément la flore autochtone ?

La réponse à ces questions passe obligatoirement par un effort important méthodologique, les techniques traditionnelles de reconnaissance des micro-organismes ne permettant d'étudier qu'une partie de la population non stressée : la flore cultivable.

Dans le cadre du PNOC, les travaux réalisés cette première année ont eu pour but de développer et d'adapter des techniques nouvelles appliquées à trois objectifs :

1. La mise en évidence de bactéries stressées : pour ce faire des méthodes d'immunofluorescence impliquant des réactions antigéniques et des techniques de biologie moléculaire ont été testées et appliquées à des échantillons naturels.

2. L'évaluation de la physiologie des bactéries en situation de stress : détermination des différentes étapes cellulaires au cours de la survie, des mécanismes de l'adaptation (halotolérance, étude des systèmes de transport) et du stress (photo-oxydation).

3. La détermination du rôle de certains paramètres (température, salinité, lumière, U.V.) sur les processus d'inactivation des virus en mer.

RESUME DES ACTIVITES ET DES TRAVAUX - SEPTEMBRE 1994

La comité scientifique du PNOC nous ayant demandé de présenter pour septembre 1994, le résumé des activités et des travaux, la présentation choisie a été de réaliser ces résumés par laboratoire ; chacun rappelant :

- les objectifs de sa recherche,
- les résultats obtenus,
- le personnel engagé dans le programme : noms, qualification, implication en mois,
- les publications réalisées dans le cadre du PNOC,
- le montant et l'utilisation du financement reçu depuis le début du projet,

enfin, les problèmes rencontrés ou soulevés et les perspectives pour 1995.

UNIVERSITE DE MONTPELLIER II
LABORATOIRE D'HYDROBIOLOGIE

URA CNRS 1355

Professeur B. BALEUX

P.N.O.C

Microbiologie sanitaire

Recherche et dénombrement des Salmonelles dans les eaux marines.

Mise au point d'une méthode de quantification par immunofluorescence des salmonelles dans les eaux d'écosystèmes côtiers.

Responsabilité scientifique : Bernard BALEUX

OBJECTIFS DE L'ETUDE :

La méthodologie de recherche des Salmonelles par les techniques indirectes sur milieu de culture actuellement très largement utilisée est d'une mise en oeuvre fastidieuse. Ces dix dernières années se sont développées des méthodes de détection rapide (hybridation DNA, PCR, conductance et Test ELISA) permettant de réduire de façon considérable le temps nécessaire à l'obtention de résultats en donnant un diagnostic rapide. Le gain est de l'ordre de 1 à 2 jours sur les 4 à 5 jours nécessaires à l'analyse pour les méthodes traditionnelles. Ces techniques se sont révélées à l'heure actuelle pas totalement fiables et ne permettent pas la récupération des souches pour l'identification comme le font les techniques traditionnelles.

Il est apparu intéressant d'essayer de mettre au point une méthode de marquage des Salmonelles par immunofluorescence qui semble présenter plusieurs avantages :

- Le premier concerne toujours le gain de temps qui est un paramètre important pour la recherche de bactéries pathogènes dans le cadre d'un contrôle sanitaire.

- Le second permet dans le cas d'analyse d'eaux usées essentiellement, d'identifier spécifiquement les Salmonelles pouvant être masquées par le développement d'une flore compétitive qui persiste sur le milieu d'isolement malgré l'étape

d'enrichissement sur milieu sélectif et ainsi fausser le dénombrement.

Le troisième est lié à l'existence d'un état physiologique des bactéries viable mais non cultivable actuellement débattu dans la littérature. La méthodologie de recherche et de quantification des Salmonelles par culture très largement utilisée actuellement est particulièrement sélective ; elle est donc de nature à inhiber la croissance des cellules stressées.

Cette étude a pour objectif de diminuer d'une manière significative le temps de la quantification et la qualification des Salmonelles présentes dans les milieux aquatiques, entre autres dans les zones et écosystèmes côtiers, en faisant appel à des marqueurs immunologiques fluorescents au niveau cellulaire et détection soit en microscopie en épifluorescence assistée ou non par analyse d'image soit par cytométrie en flux.

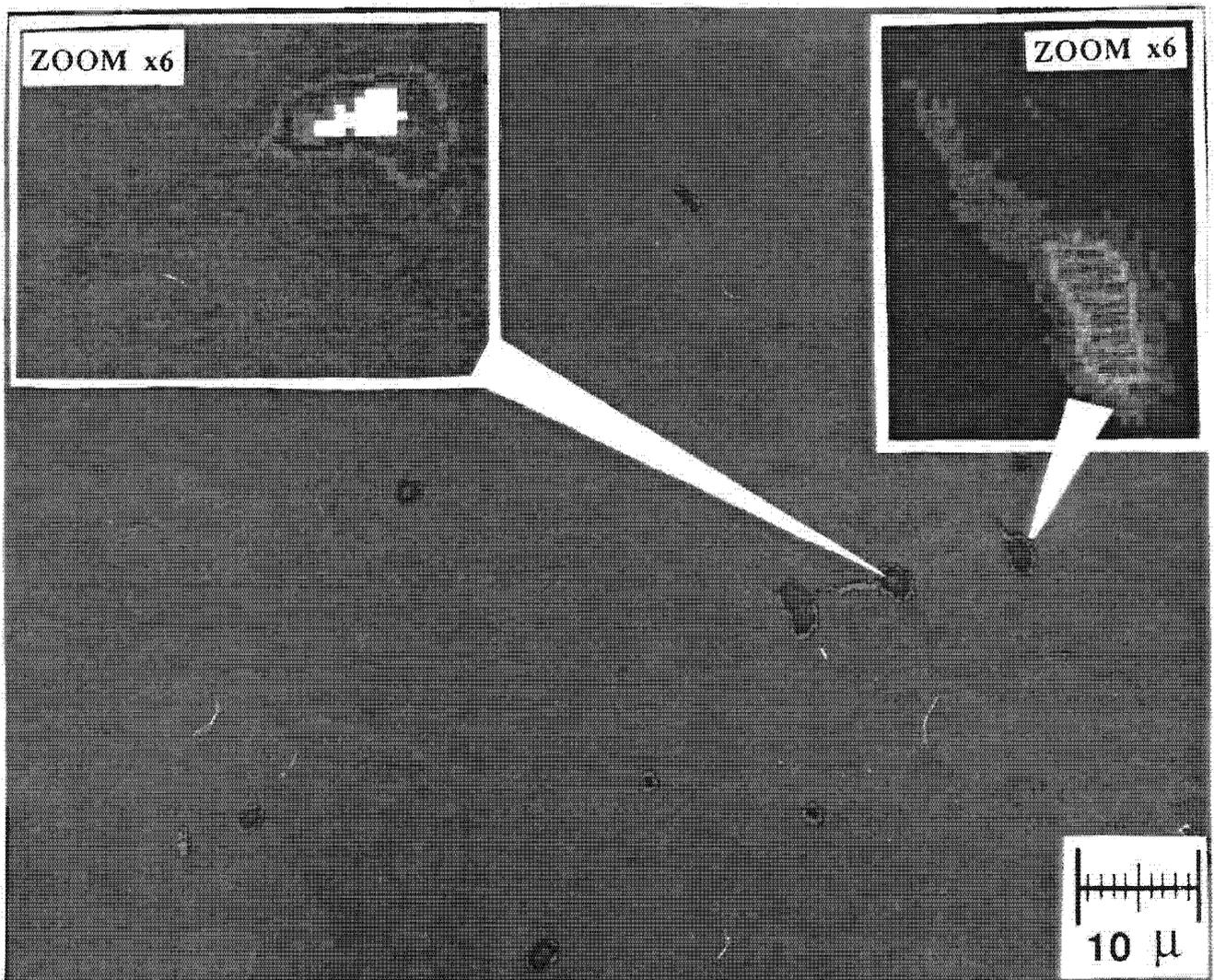
RESULTATS OBTENUS :

Les travaux entrepris dans cette étude ont permis de montrer que :

- le sérum polyclonal (ORMT 11 - Berhingwerke - Marburg) utilisé est très spécifique et permet lors de marquage sur filtre de détecter des cellules de Salmonelles (Photographie) alors que la méthode culturale avait donné un résultat négatif. On a donc un gain de sensibilité dans la détection par la méthode d'immunofluorescence indirecte à deux anticorps (IFI).

- Avec les protocoles expérimentaux de marquage en milieu liquide optimisés, la détection par épifluorescence assistée ou non par analyse d'image et par cytométrie en flux est une réalité.

- La limite de détection des Salmonelles par la méthode indirecte de culture est variable en fonction de l'abondance de la flore associée présente. Ces valeurs limites de détection sont comprises entre 72 et 144 cellules de Salmonelles pour 10^6 cellules de flore compétitive, entre 50 et 72 pour 10^4 et inférieure à 20



Marquage des cellules d'une suspension de *Salmonella typhimurium* (souche de référence) par le sérum polyclonal (ORMT 11) par observation microscopique en épifluorescence assistée par analyse d'images (Mudicam®).

pour 10^2 ou pour une flore associée naturelle. L'utilisation de la méthodologie de marquage IFI sur filtre doit permettre de diminuer notablement ces limites de détection et d'avoir ainsi des valeurs de dénombrements plus proche de la réalité.

- Les potentialités offertes par la cytométrie en flux en terme de recherche d'une population spécifiquement marquée au sein d'un peuplement sont remarquables, cette technique permet de discriminer une *Salmonelle* spécifiquement marquée parmi 1000 autres cellules.

- Après filtration et marquage IFI des bouillons d'enrichissement utilisés dans la méthode culturale largement répandue, les cellules de *Salmonella typhimurium* sont parfaitement détectées par observation microscopique en épifluorescence assistée par analyse d'image, ce qui permet un gain de temps et de sensibilité non négligeable de 24 à 48 heures (photographie).

Une standardisation dans le déroulement du protocole de marquage devrait permettre de donner des résultats reproductibles utilisables pour la détection par microscopie en épifluorescence assistée par analyse d'image.

Les capacités analytiques de la Cytométrie en flux de discriminer une population dans un peuplement offre des potentialités remarquables.

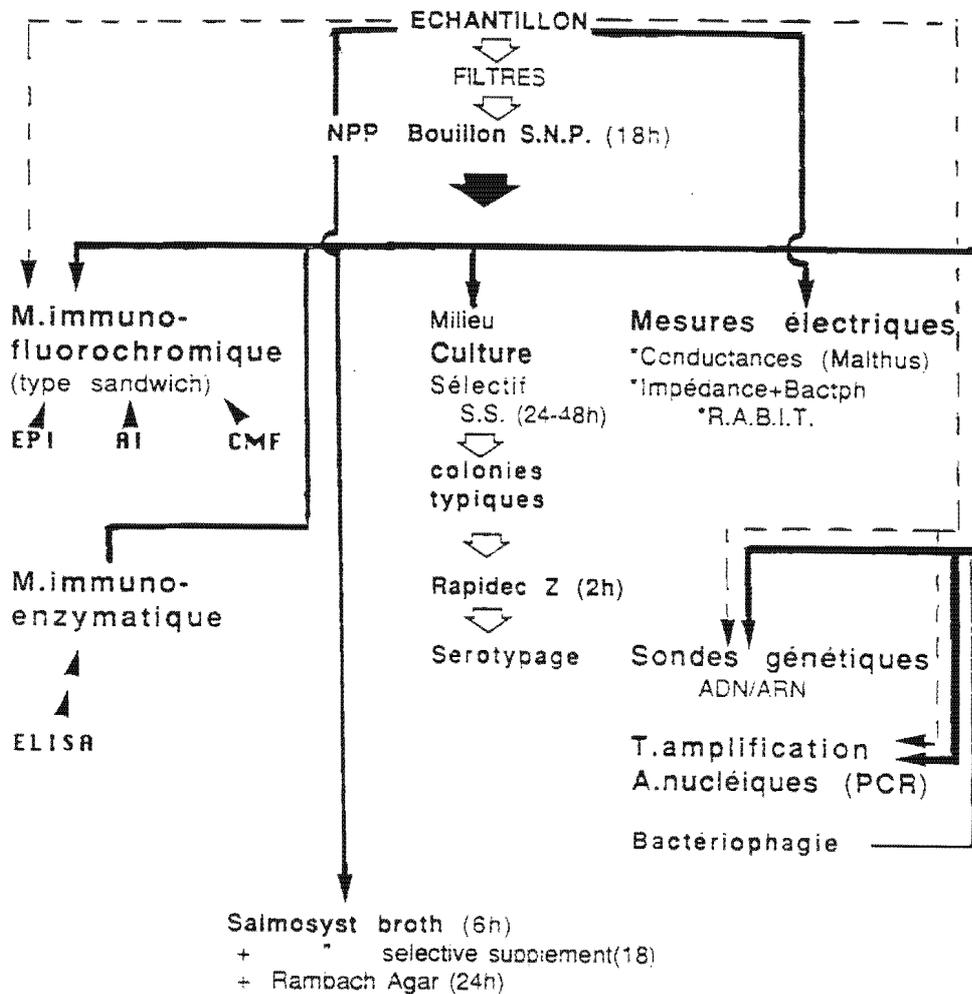
Toutefois, compte-tenu de l'extrême diversité des bactéries rencontrées dans l'environnement on ne pourra jamais écarter l'éventualité d'une réaction croisée.

Ainsi, la recherche des *Salmonelles* par immunofluorescence (IF) nécessite une confirmation par une méthode culturale traditionnelle. Son utilisation doit être envisagée en terme d'indication présomptive de la présence de pathogènes qui entraînerait la mise en place de mesures particulières qui pourraient être :

+ en cas de réponse IF négative : arrêt de l'analyse au niveau de l'étape d'enrichissement ou même de pré-enrichissement.

+ en cas de réponse IF positive : poursuite de l'analyse par la méthode culturale.

A la fin de cette étude il parait utile de rappeler les possibilités méthodologiques actuellement exploitables pour la détection des Salmonelles dans les milieux aquatiques. Ce rappel est schématisé dans la figure ci-dessous :



Polymerase Chain Reaction (PCR)

Rapid Automated Bacterial Impedance Technique (RABIT)

Enzyme Linked ImmunoSorbant Assays (ELISA)

PERSONNES ENGAGEES SUR CETTE ETUDE :

Philippe GALES, Diplôme d'Etudes approfondies Chimie et Microbiologie de l'eau, 3 mois.

PUBLICATIONS :

Les travaux entrepris dans cette étude représentent, en partie, ceux d'un diplôme de doctorat intitulé "Origine et devenir des Salmonelles dans les différents compartiments (eau, sédiment, coquillages filtreurs) de l'étang de Thau qui sera soutenu en décembre 1994.

FINANCEMENT RECU POUR CETTE ETUDE :

Contrat 91 2 43 04 30 DEL d'un montant de 70 000 FF HT, notifié le 12/11/1991 réparti comme suit :

Personnel : 32.500 FF

Fonctionnement : 37.500 FF.

Rapport final remis en février 1993 : 28 pages + 9 pages d'annexes.

PERSPECTIVES :

Dans le cadre du PNOG, Microbiologie Sanitaire, il serait souhaitable de développer des recherches telles que prévues dans le Programme de Février 1992 à savoir : "l'appréciation du maintien du pouvoir pathogène des micro - organismes dans l'environnement". Ces recherches pourraient être menées conjointement par l'Equipe d'Ecologie bactérienne des milieux aquatiques du Laboratoire d'Hydrobiologie et URA-CNRS 1355 de l'Université de Montpellier II, l'Unité de Microbiologie du Laboratoire d'Etudes et de Recherche en Environnement et Santé de l'Ecole Nationale de Santé Publique, Rennes, le Laboratoire de Microbiologie Pharmaceutique, Université de Rennes I.

Un financement incitatif pour la 1ère année (1994) de 100.000 FF HT permettrait de développer des recherches sur une 2ième année (1995) dont le montant prévisible serait de l'ordre de 300.000 FF HT.

**LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE
PHARMACEUTIQUE**

**UER DES SCIENCES MEDICALES ET
PHARMACEUTIQUES (RENNES I)**

Professeur M. CORMIER

RAPPORT P N O C
Laboratoire de Microbiologie Pharmaceutique
Université de RENNES I
Responsable : Pr M. CORMIER
Septembre 1994

Mise en évidence par la technique de biologie moléculaire de *Escherichia coli* entérotoxigène et de *Salmonella* dans les eaux d'épuration et le milieu marin littoral.

1- Prélèvements

Lors d'une première campagne de prélèvements d'eau, les *Escherichia coli* ont été recherchés en onze points différents dans la région de Saint Marin-de-Bréhal (près de Granville) : 8 sites de prélèvements de sédiments, 2 sites de prélèvements de fèces de moules et 1 site où sont effectués les deux types de prélèvements.

Après évaluation des coliformes fécaux par incubation de Drigalski à 42°C ou par la méthode de NPP, 40 souches d'*Escherichia coli* ont été mises en évidence à partir d'échantillons de sédiments et 27 souches ont été isolées à partir de fèces de moules prélevées dans cette même zone littorale.

2- Hybridation sur colonies

L'hybridation sur colonies effectuée sur 67 souches d'*Escherichia coli* révèle 20 souches entérotoxigènes (30%) hybridant avec la sonde LTp. Dans le sédiment, 15 souches d'*Escherichia coli*/40 (37,5%) sont définies comme des ETEC, alors que seulement 5 souches/27 (18,5%) le sont dans les fèces de moules. Les prélèvements effectués au niveau du site 8 montre une nette contamination de cette zone par les ETEC qui sont retrouvés dans les sédiments (1/1 *Escherichia coli*) et les fèces (1/9 *Escherichia coli*) malgré une faible contamination par les coliformes fécaux (18/100ml).

3- Recherche immunologique de la production de la toxine LT

La production de toxine LT par ces 67 souches a été recherchée par deux tests (GMI ELISA et RPLA) sur le surnageant d'une culture de 48 heures incubée en milieu de Mundell. La méthode de GMI ELISA comme le test au latex ont donné des résultats superposables après 48 ou 72 heures d'incubation. Pour le GMI ELISA, la densité optique a été mesurée à 405nm (DO₄₀₅) en point final et une moyenne de deux mesures a été prise en compte.

Des témoins positifs producteurs de toxine LT PEWD299 et H10407 ainsi que des témoins négatifs ont été inclus à plusieurs reprises, répartis de façon aléatoire sur les plaques de

GM1 ELISA. Il a ensuite été possible de regrouper les souches sous forme d'un histogramme en fonction de l'intensité de la DO mesurée à 405nm.

- Un premier groupe de 47 souches non productrices de toxine LT auquel correspondent des $DO_{405} > 1,2$ où sont retrouvés les témoins négatifs.

- Un second groupe de souches productrices de toxine LT, auquel correspondent des $DO_{405} > 1,2$ et pour lequel 3 pics de fréquence se sont détachés correspondant à ce que l'on pourrait arbitrairement classer en fortes, moyennes et faibles productrices de toxine LT.

- . Production forte (9 souches)
- . Production moyenne (6 souches)
- . Production faible (2 souches)

Ces résultats permettent les conclusions suivantes :

. Pour les 47 souches négatives en hybridation sur colonies, la recherche de toxine s'est toujours avérée négative, ce qui représente environ 70% des souches testées.

. Pour les 20 souches hybridant avec la sonde LTp, la recherche de la production de toxine LT a été menée dans les mêmes conditions : pour 17 souches (85%) la production de toxine a pu être mise en évidence par GM1 ELISA et RPLA, avec 100% de corrélation entre les deux méthodes, et pour 3 souches (n°16, 37 et 42) (15%), cette production s'est confirmée être négative ou en dessous du seuil de sensibilité de la technique. Ces 3 souches ont été récoltées à 3 sites différents ce qui tend à éliminer un facteur favorisant purement local.

Ceci nous a amené à tenter de localiser plus précisément le gène *elt*, en étudiant le contenu plasmidique des différentes souches.

4- Extraction des plasmides et localisation du gène *elt* par hybridation avec la sonde LTp

Dans un troisième temps, une extraction plasmidique a été effectuée sur toutes les souches. Les plasmides obtenus ont ensuite été séparés sur gel d'agarose, puis transférés sur une membrane de Nylon par "Southern blotting" avant d'être hybridés avec la sonde LTp.

. Pour les souches non productrices, aucune hybridation des plasmides n'a été observée. A l'exception des trois souches (n°16, 37 et 42) pour lesquelles un plasmide d'environ 60Kb est hybridé avec la sonde LTp. Ce plasmide peut donc être porteur du gène *eltB* ou d'un gène homologue. L'hypothèse d'avoir une production de toxine de type LTII a été exclue du fait de la nature chromosomique du gène codant ainsi que l'absence d'homologie au niveau de la sous-unité B.

. Pour les souches productrices, le gène est retrouvé dans la majorité des cas sur un plasmide d'environ 60Kb. L'image d'hybridation de ces plasmides apparaît donc assez homogène mais rend aléatoire l'interprétation de la nature des profils plasmidiques obtenus (Figure n°1).

Pour les 3 souches (n°7, 11 et 58) productrices de toxine LT et présentant une hybridation sur colonies positives, aucune hybridation plasmidique n'a été observée alors qu'elles hébergeaient des plasmides de poids moléculaires voisins de 60Kb.

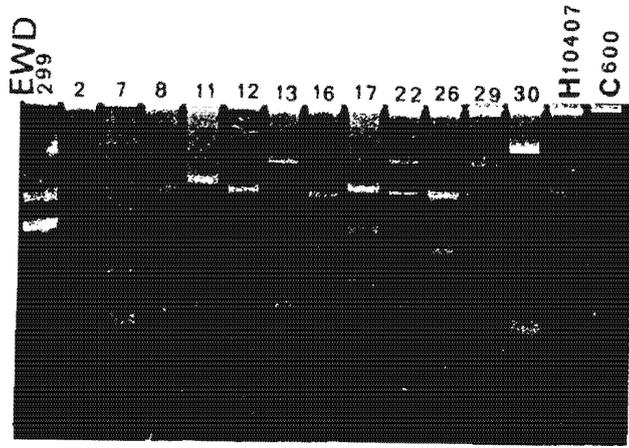
Afin d'analyser le problème posé par ces souches, il a été effectué une extraction plasmidique couplée à une extraction des acides nucléiques totaux selon la méthode de Boom et coll. (1990). Les ADN extraits ont été fixés sur membrane de Nylon par "dot blot" puis hybridés comme précédemment avec la sonde LTp (Figure n°2).

. Pour 3 souches non productrices, choisies au hasard, (n°8, 30 et 60) de même que pour la souche LT⁻ (C600), aucun marquage n'a été observé.

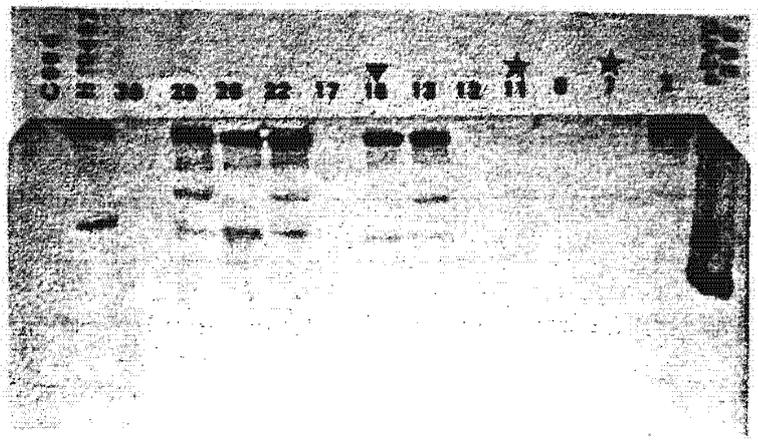
. Pour 3 souches productrices (n°13, 26 et 49) et pour les souches de référence LT⁺ H10407 et EW299, l'ADN plasmidique et l'ADN total ont été marqués.

. Pour les souches n°7, 11 et 58, seul l'ADN total présente un marquage, ce qui peut laisser supposer une localisation du gène elt sur le chromosome ou éventuellement sur un plus grand plasmide qui n'aurait pas pu être extrait par la méthode utilisée (Birnboim et Doly 1979).

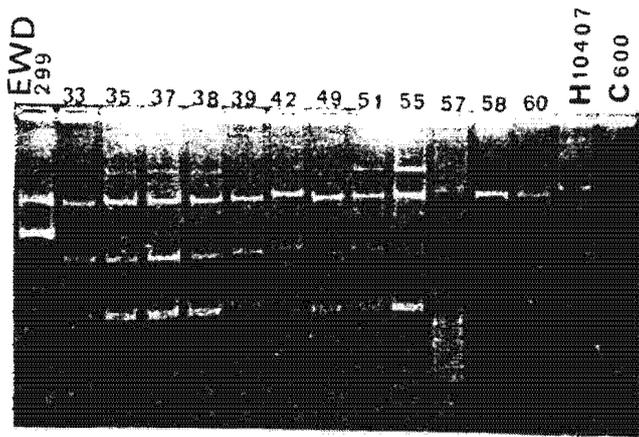
Il est également intéressant de noter que les souches n°7 et 11, prélevées au site 1, sont classées fortes productrices alors que la souche n°58, prélevée au niveau des fèces de moules du site 19, est classée faible productrice.



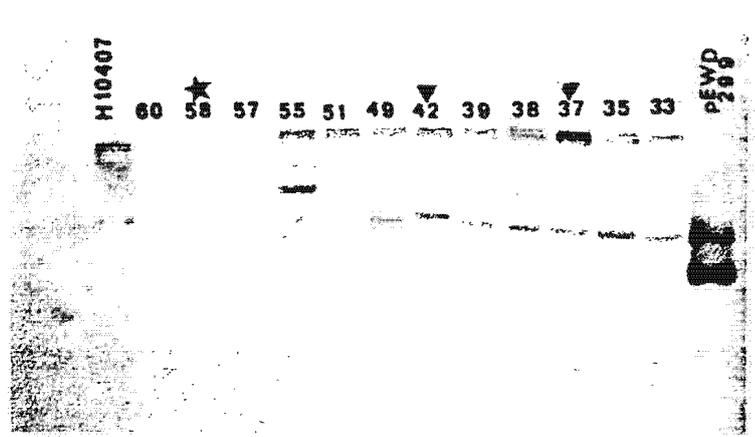
A



B



A bis



B bis

Figure n° 1 : Profils plasmidiques de souches d'*Escherichia coli* isolées de sédiments ou de feces de moules analysés sur gel d'agarose à 0,8% (A et A bis). Après transfert par Southern blot, les plasmides ont été hybridés avec la sonde LTp (B et B bis).

- ★ Souches porteuses d'un gène *elt* détecté sur l'ADN total.
- ▼ Souches possédant le gène *elt* sur un plasmide mais ne produisant pas, (ou produisant à un niveau indétectable par les techniques utilisées), de la toxine LT.

	A	B	
1	—	—	EWD299
2		—	7
3		—	11
4		—	58
5	—	—	H10407
6			C600
7	—	—	13
8	—	—	26
9	—	—	49
10			8
11			30
12			60

Figure n° 2 : Dot blots d'ADN plasmidiques (extraction d'après Ish Horowicz et Burke, 1981)(A) et d'ADN totaux (extraction selon Boom et coll., 1990)(B). L'hybridation a été effectuée à l'aide de la sonde LTp :

- souches n°7, 11 et 58 : le gène *elt* est mis en évidence sur l'ADN total
- souches d'*Escherichia coli* EWD299 et H10407 : le gène *elt* est localisé sur un plasmide
- souches n°13, 26 et 49 : souches pour lesquelles le gène *elt* est situé sur un plasmide
- souches n°8, 30 et 60 : souches pour lesquelles le gène *elt* n'a été retrouvé ni sur l'ADN total ni sur un plasmide
- souche K12-C600 : contrôle négatif : souche LT⁻ sans plasmide

Publications depuis 1992

DESMONTS C., MINET J., COLWELL R., CORMIER M.

An improved filter method for direct viable count of *Salmonella* in seawater
J. Microbiol. Meth., 1992, **16** : 195-201

POMMEPUY M., GUILLAUD J.F., DUPRAY E., DERRIEN A., LE GUYADER F.,
CORMIER M.

Enteric bacteria survival factors
Wat. Sci. Tech., 1992, **25** (12) : 93-103

ARTURO M., TAMANAI-SHACOORI Z., MAMEZ C., POMMEPUY M.,
CORMIER M.

Two-dimensional electrophoresis method used for determination of plasmid profiles of
Escherichia coli isolated from a sewage treatment plant
Can. J. Microbiol., 1993, **39** : 990-993

DUPRAY E., POMMEPUY M., DERRIEN A., CAPRAIS M.P., CORMIER M.

Use of the Direct Viable Count (D.V.C.) for the assessment of the survival of *E.coli* in
marine environments.
Wat. Sci. Tech., 1993, Vol. 27, n°3-4, 395-399

POMMEPUY M., CORMIER M., AUDIC J.M., LE GUYADER F., GUILLAUD J.F.

Le devenir des microorganismes rejetés en mer : des programmes d'étude se mettent en
place.
Equinoxe spécial environnement , 1993, 4p.

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

TAMANAI-SHACOORI Z., ARTURO M., MAMEZ C., POMMEPUY M., M.
CORMIER

Conjugal transfer of natural plasmid between *Escherichia coli* strains in sterile
environmental water
soumis pour publication in FEMS Microbiology Ecology

GOUGEON A., TAMANAI-SHACOORI Z. and M. CORMIER

Synthesis of a digoxigenin-labelled DNA probe as a way of detecting gene expression by
RNA hybridization in enterotoxigenic *Escherichia coli*
soumis pour publication in J. Microbiol. Methods

TAMANAI-SHACOORI Z., ARTURO M., POMMEPUY M., MAMEZ C. and M.
CORMIER

Conjugal transfer of natural plasmids between *Escherichia coli* strains in sterile
environmental water
accepté in Current Microbiology

En cours :

ARTURO-SCHAAN M., TAMANAI-SHACOORI Z., D. THOMAS and M. CORMIER
 Evolution of plasmid-DNA concentration and stability of plasmid-borne resistance to antibiotics during starvation of *Escherichia coli* in raw and treated wastewater and brackish water

Communications-posters

TAMANAI-SHACOORI Z., ARTURO M., POMMEPUY M., MAMEZ C., M. CORMIER

Genetic rearrangement during conjugation of natural plasmids in environmental water
 Symposium "Bacterial Genetics and Ecology", novembre 1993, Pays-Bas, poster

ARTURO M., TAMANAI-SHACOORI Z., POMMEPUY M., MAMEZ C., M. CORMIER

Determination of plasmid profiles by two-dimensional electrophoresis in *Escherichia coli* isolated from a sewage-treatment plant

Symposium "Bacterial Genetics and Ecology", novembre 1993, Pays-Bas, poster

POMMEPUY M., LE GUYADER F., MENARD D., LE HIR P., CORMIER M.

Behavior of health related microorganisms in sediments : effect of resuspended sediments of shellfish contamination

Workshop franco-japonais on "Recent Progress on knowledge of the behavior of contaminants in sediments and their toxicity to aquatic organisms

Kyoto du 7 au 11 février 1994

POMMEPUY M., FIKSDAL L., CAPRAIS M.P., MELIKECHI H. and CORMIER M.

Evaluation of activity of *E. coli* by a colimetric β -D-galactosidase assay

94th general meeting of American Society for Microbiology, Las Vegas, 23-27 may 1994

GOURMELON M., POMMEPUY M., FERRAND F., CORMIER M.

Role of bacterial defense enzymes and nutrients to protect *E. coli* from visible light effect in seawater

IAWQ, 17th Biennial International Conference, Budapest, 23-30 july 1994, poster

FINANCEMENT reçu dans le cadre du PNOC**Contrat universitaire 1991**

Etude de facteurs de pathogénicité et de l'activité physiologique chez les bactéries par mise en évidence de gènes amplifiés et reconnus spécifiquement par sondes.

Contrat n°91-2-43-0438 DEL

Montant total : 90.000,00F

Contrat 1993 - Convention CNRS

Mise en évidence par la technique de biologie moléculaire de *Escherichia coli* entérotoxigène et de *Salmonella* dans les eaux d'épuration et le milieu marin littoral

Montant total : 80.000,00F

Personnes engagées sur ce programme

- Anne GOUGEON - Doctorat d'état
- Zohreh SHACOORI - Doctorat d'état
- Cécile MAMEZ - Technicienne

Perspective pour l'année à venir

La mise en évidence d'un gène bactérien par hybridation moléculaire, à partir de bactéries extraites, semble cependant présenter certaines limites. En effet, si les bactéries présentes sont en faible quantité ou à l'état viable non cultivable, leur détection est impossible par ces méthodes. La "Polymerase Chain Reaction" (PCR) présente donc l'avantage d'augmenter la sensibilité de la détection en conservant une excellente spécificité.

Cependant, si cette technique présente de nombreux avantages, elle est limitée par la présence d'inhibiteurs de PCR dans les milieux naturels, ce qui nécessite la présence d'un témoin interne, et son rendement est légèrement diminué par le NaCl. L'ADN libre est également amplifié, ce qui ne donne aucun renseignement sur la virulence réelle du milieu testé.

Cette méthode très (trop ?) sensible répond donc à la loi du tout ou rien, sans prévaloir du bon fonctionnement du gène détecté. Cependant, elle permet de mettre en évidence rapidement la présence d'ADN en très faible quantité dans un milieu complexe tel que le milieu marin.

Demande de financement

- matériel - équipement	20.000,00
- consommable	50.000,00
- missions	10.000,00
TOTAL :	80.000,00F

Rennes, le 14 septembre 1994

Pr M. CORMIER

GROUPE DE BACTERIOLOGIE MARINE
INSERM NICE

Michel GAUTHIER

Objectif des recherches

Les travaux effectués par le Groupe INSERM U303 dans le cadre du P.N.O.C. participent à l'élaboration d'un **modèle de survie de l'espèce *Escherichia coli* dans l'eau de mer** fondé sur l'hypothèse d'une régulation de cette survie par le niveau intracellulaire de substrats organiques assurant le maintien du métabolisme et de la charge énergétique. Ce modèle intègre les mécanismes physiologiques et biochimiques considérés comme les plus significatifs à la fois au cours de la croissance et pendant la survie. Il a été développé conjointement par les équipes suivantes:

Observatoire de la Mer, Ile des Embiez (Y. Martin, Coordonnateur, responsable de la modélisation proprement dite)

U.S.T.L., Montpellier, Laboratoire d'Hydrobiologie, (M. Troussellier)

Station Marine de Banyuls/sur/Mer (P. Lebaron)

INSERM U303, Nice (M. Gauthier)

L'équipe INSERM a participé à ce programme de deux manières complémentaires:

- 1: Par des recherches de laboratoire, effectuées à l'aide de microcosmes d'eau de mer inoculés par des souches pures et incubées dans des conditions contrôlées, visant à préciser l'importance et la variabilité des propriétés intrinsèques de la bactérie (produits de certains gènes, potentiel de transport de certains substrats à long terme, mécanismes de résistance induits par les facteurs de stress, etc...) les plus directement impliquées dans la survie et pouvant, de ce fait, aider à une meilleure compréhension du modèle.

Ces recherches ont concerné

a) Certains mécanismes dont pourrait dépendre directement et rapidement la réponse adaptative des bactéries entériques (*Escherichia coli*) dans l'eau de mer, à savoir

- le maintien de l'état énergétique des cellules,
- le potentiel de transport des substrats nutritifs à partir de l'eau de mer, à court ou à long terme.

b) L'influence des réponses anti-stress sur le potentiel de survie des entérobactéries (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) dans l'eau de mer. Il s'agissait en particulier de savoir:

- si la sensibilité des bactéries à l'eau de mer est influencée par l'induction préalable de mécanismes d'adaptation aux situations de stress (osmotique, alimentaire, oxydatif, acide, thermique),

- dans quelle mesure les stress successifs subis par les cellules depuis le milieu entérique jusqu'au milieu marin (hyperoxydatif, hypothermique, hypo et hyperosmotique, peut être alimentaire), peuvent modifier leur comportement dans l'eau de mer.

- 2: Par une participation directe aux expériences de mise au point du modèle, réalisées dès Janvier 1993 à Banyuls, puis sur l'Ile des Embiez, par les équipes citées ci-dessus.

Résultats obtenus

Pour des raisons d'homogénéité, les résultats des mesures effectuées par l'équipe INSERM lors des expériences concernant la mise au point du modèle ont été inclus dans le rapport établi à ce sujet par Y. Martin, M. Troussellier et P. Lebaron.

Résultats des travaux de laboratoire

Dans le but de garantir l'homogénéité de ces études et afin de pouvoir profiter d'un très important fond de connaissances fondamentales (structure, physiologie, biochimie, génétique et biologie moléculaires) (1), il a été décidé de réaliser toutes les expériences à l'aide de deux souches de référence souvent considérées comme modèles :

- *Escherichia coli* K12 MC4100
- *Salmonella typhimurium* LT2

1° *Transport des substrats nutritifs par Escherichia coli dans l'eau de mer*

La capacité des bactéries entériques à survivre dans l'eau de mer dépend très largement de la présence d'éléments nutritifs (2,3,4). Le maintien d'un transport actif des hydrates de carbone et des acides aminés est donc essentiel à leur adaptation dans ce milieu. Or il a été montré chez *E. coli* que ce transport est inhibé par un choc hyperosmotique brutal (5,6) Le but du travail a été d'analyser les effets 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, à court terme d'abord (de

¹Neidhardt F.C., 1987. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology. American Society for Microbiology

²Van Donsel D.J., and Geldreich E.E., 1971. *Water Res.* 5:1079-1087

³Gerba C.P., and McLeod J.S., 1976. *Appl. Environ. Microbiol.* 32:114-120

⁴Hood M.A., and Ness G.E., 1982. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:578-584

⁵Roth W.G., Leckie M.P., and Dietzler D.N., 1985. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 126:434-441

⁶Houssin C., *et al.*, 1990. *Biochem. Biophys. Acta* 1056:76-84

l'ordre de l'heure), puis à long terme (après plusieurs semaines d'incubation en eau de mer).

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

Les effets à court terme ont été recherchés en faisant subir aux cellules un choc hyperosmotique en milieu tamponné ou en eau de mer, ou bien en leur appliquant un choc hypoosmotique après culture à haute osmolarité. Dans les deux cas, les effets ont été recherchés lorsque le choc était appliqué 1 heure avant l'addition des substrats, ou 1 heure après celle-ci.

Lorsque le **choc hyperosmotique** a été appliqué avant le contact avec les substrats marqués, le taux de transport initial de tous les substrats testés était inhibé, l'effet inhibiteur étant particulièrement drastique dans le cas des transports par protéines affines. Une plus grande inhibition par l'eau de mer était observée, signant un "effet eau de mer" dû essentiellement à son pH légèrement alcalin. Quand l'augmentation de la pression osmotique était appliquée après l'addition des substrats, seul le lactose (symport proton) était significativement relargué par les cellules.

Le **choc hypoosmotique** appliqué aux cellules avant leur contact avec les substrats n'a provoqué qu'une faible diminution du transport. Ce choc a, par contre, été suivi d'un important efflux de tous les substrats testés (indépendamment de la nature du système de transport), lorsque qu'il a été appliqué après l'addition de ces substrats (donc après que ceux-ci aient été accumulés par les cellules).

Ces résultats montrent donc que le rejet d'*E. coli* dans l'eau de mer peut provoquer une diminution très importante de son potentiel d'absorption des substrats, indépendamment du niveau énergétique (5). Il faut noter cependant que cette inhibition n'était jamais totale, les cellules conservant un potentiel résiduel de transport des substrats qui a paru, dans la plupart des cas, augmenter graduellement avec le temps. Cette restauration progressive du transport des substrats à plus long terme a justifié la réalisation de tests complémentaires présentés ci-après.

Ces résultats ne sont extrapolables aux conditions naturelles que si les bactéries ont été cultivées à basse osmolarité, ou ont transité par les eaux usées. Ce choc n'existe vraisemblablement pas dans le cas des coliformes naturels dans les matières fécales ou les urines rejetées directement à la mer, leur croissance dans l'intestin ou le tractus urinaire se faisant à haute osmolarité (7).

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 et

⁷Gauthier M.J., *et al.*, 1994. Marine Life. Sous presse.

constante pendant toute la période d'incubation (1 mois environ) et était probablement liée à des mécanismes indépendants de l'énergie. 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. La question reste de savoir si ce potentiel résiduel est suffisant pour assurer à ces bactéries une bonne compétitivité par rapport à la microflore marine autochtone. Ce point devra faire l'objet de recherches complémentaires.

2° *Relations entre les mécanismes d'adaptation aux stress et la survie d'Escherichia coli et de Salmonella typhimurium dans l'eau de mer*

Les données les plus récentes de la littérature suggèrent fortement que la survie des bactéries entériques en milieu marin dépend de leur capacité intrinsèque à surmonter les situations de stress qu'elles y rencontrent (oxydatif, thermique, nutritionnel, acide, alcalin etc..). Ces réponses ne sont pas totalement spécifiques de chaque type de stress (8, 9, 10, etc...). Il semble exister un ensemble de mécanismes fondamentalement ubiquistes, régulés par des gènes "supérieurs", qui permettent, après induction par un facteur de stress particulier, une adaptation des cellules à des stress multiples. Le stress nutritionnel, par exemple, génère chez ces bactéries un fort état de résistance à la carence alimentaire, mais aussi à de nombreux autres facteurs d'agression (11), sous le contrôle du facteur sigma σ^s (KatF ou RpoS) qui module l'expression de nombreux gènes, osmorégulés ou non, impliqués dans diverses réponses anti-stress (12,13).

Dans ce cadre, l'équipe INSERM a, dans un premier temps, analysé 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.

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 (H₂O₂ 1mM), 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

⁸ Farr S.B., and Kogoma T., 1991. Microbiol. Rev. 55: 561-585

⁹ Schultz J.E., and Matin A., 1991. J. Mol. Biol. 218: 129-140

¹⁰ Rowbury, R.J., et al., 1992. J. Appl. Bacteriol. 72: 233-243

¹¹ Nyström, T., et al., 1992. Appl. Environ. Microbiol. 58: 55-65

¹² Hengge-Aronis, R., et al., 1993. J. Bacteriol. 175:259-265

¹³ Hengge-Aronis, R., 1993. In: Starvation in bacteria, S. Kjelleberg (ed.), Plenum Press

osmotique. La protection croisée induite dépendait du facteur RpoS, à l'exception du stress osmotique (Fig. 1). Cet effet protecteur était généralement plus élevé lorsque le facteur de stress était appliqué à 37°C plutôt qu'à 20°C.

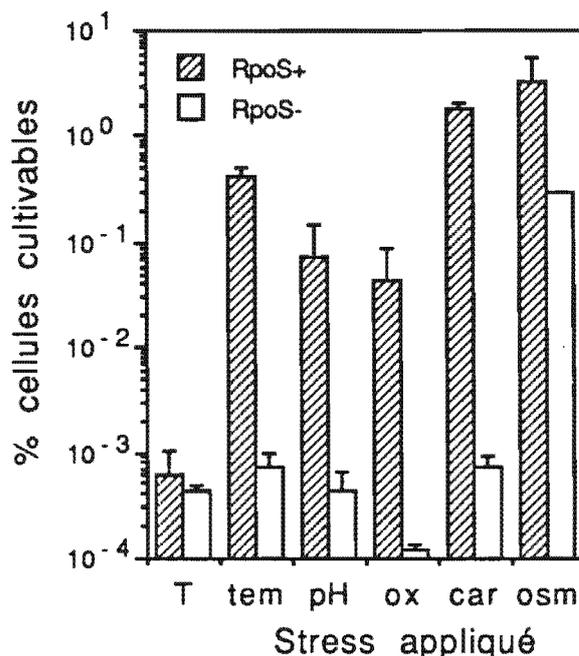


Fig. 1. Viabilité des cellules d'*E. coli* MC4100 (RpoS+) et d'*E. coli* RH90 (RpoS-) dans l'eau de mer préalablement soumises à un stress thermique (tem)(48°C), acide (pH)(pH 5), oxydatif (ox)(H₂O₂ 1mM), nutritionnel (carence en C, N et P) ou osmotique (NaCl, 0,5 M). T, cellules de référence, non soumises à un stress avant transfert à l'eau de mer.

L'effet de RpoS 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, probablement via la régulation du niveau intracellulaire de ppGpp (guanosine 3',5'-bispyrophosphate) (14), favorise le maintien de ces bactéries à l'état cultivable dans l'eau de mer oligotrophe. Cette influence dépendait cependant des conditions dans lesquelles les cellules étaient cultivées avant leur transfert à l'eau de mer. Leur état de croissance était particulièrement critique, l'effet de RpoS n'étant observé qu'avec les cellules récoltées en phase stationnaire, qu'elles aient été cultivées à basse ou haute osmolarité (Fig. 2). La culture à haute osmolarité a eu une très forte incidence sur l'effet protecteur de RpoS, les cellules RpoS- étant incapables d'acquérir la résistance à l'eau de mer décrite antérieurement (15). La culture en anaérobiose a également modifié l'action de RpoS sur la réponse VNC. Le fait le plus marquant a été observé avec les cellules cultivées en anaérobiose et à haute

¹⁴ Gentry, D.R., et al., 1993. J. Bacteriol. 175:7982-7989

¹⁵ Munro, P.M., et al., 1989. Appl. Environ. Microbiol. 55:2017-2024

osmolarité : dans ce cas (le plus proche des conditions naturelles entériques), les cellules RpoS+ comme les cellules RpoS- ont totalement évité l'évolution vers l'état VNC pendant toute la durée des expériences (8 jours), donc par un (ou plusieurs) mécanisme(s) RpoS-indépendant(s).

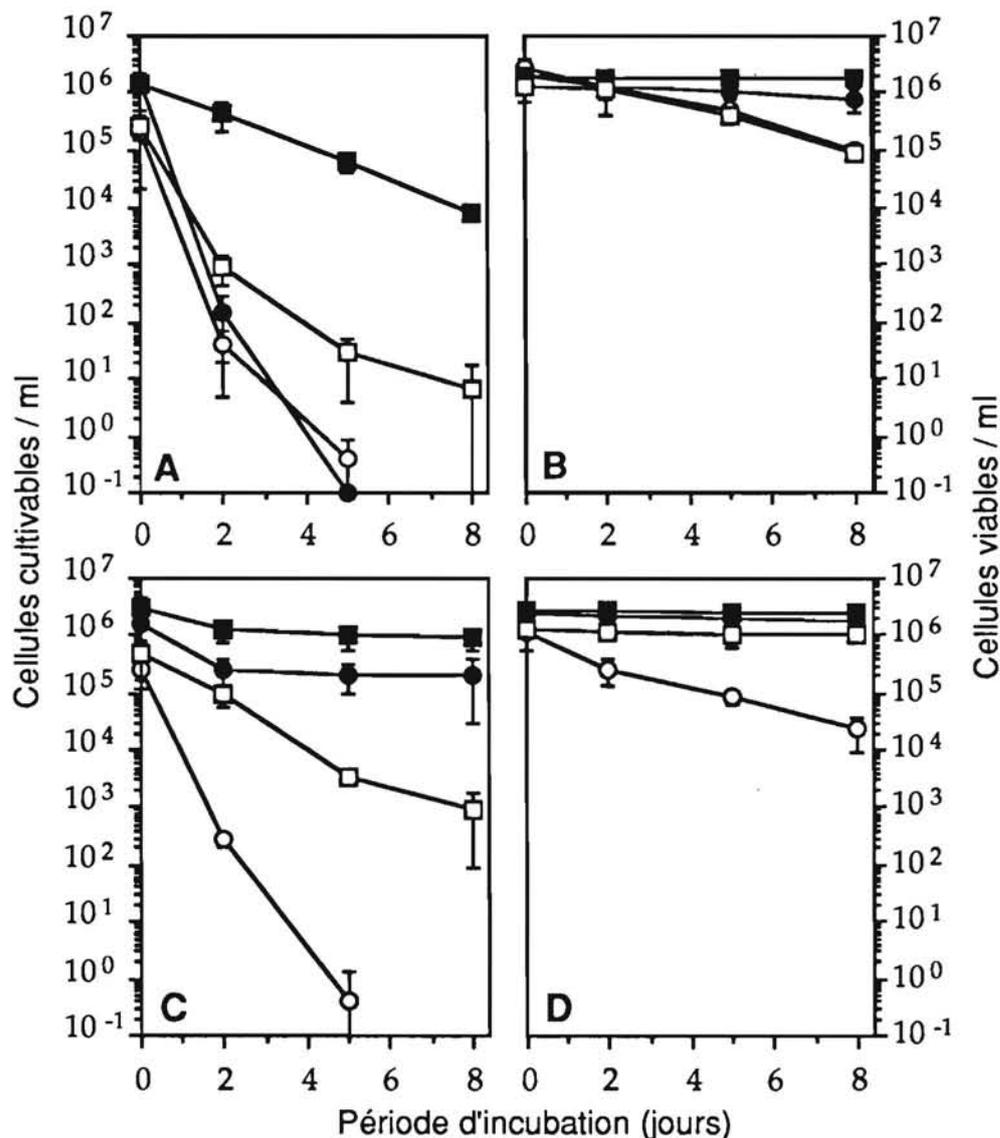


Fig. 2. Evolution dans l'eau de mer du nombre de cellules cultivables (Nutrient Agar Difco) (A et C) et de cellules viables (Lebaron *et al.*, 1993,¹⁶) (B et D) d'*E. coli* MC4100 (symboles noirs) et RH90 (symboles blancs), cultivées en aérobiose en bouillon LB à basse (A et B) ou haute (C et D) osmolarité et récoltées en phase exponentielle (cercles) ou en phase stationnaire (carrés).

Un troisième 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. Au cours de l'année 1993, l'équipe INSERM a étudié l'influence des stress subis en eau de mer par de nombreuses entérobactéries pathogènes, sur leur résistance aux conditions d'acidité gastrique, en

¹⁶Lebaron P., *et al.*, 1993. *Microb. Releases* 2:127-133

relation avec le facteur RpoS. Les bactéries entériques pathogènes pour l'homme qui sont rejetées en mer suivent en effet une voie d'infection orale et doivent franchir la barrière gastrique pour développer leur pouvoir pathogène au niveau intestinal. Compte tenu de la protection croisée qu'induisent le choc osmotique et la carence alimentaire vis à vis de divers stress environnementaux (chaleur, oxydation, acidité), l'étude visait à mettre en évidence la capacité que peuvent avoir diverses entérobactéries, et plus particulièrement celles des genres *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella* et *Yersinia*, d'acquérir une forte résistance aux conditions d'acidité de l'estomac (pH 2,5 pendant 2h en moyenne) (17) après incubation dans l'eau de mer. Chez *E. coli*, *Salmonella typhimurium* et les shigelles, cette résistance à l'acide était amplifiée plusieurs milliers à plusieurs millions de fois après un temps de séjour de 100 minutes dans l'eau de mer. Cet effet s'est avéré fortement dépendant de l'âge des cellules (phase de croissance) et était, pour l'essentiel, induit par la carence alimentaire car un effet analogue a été obtenu en incubant les cellules dans l'eau distillée ou des tampons phosphate à basse ou haute osmolarité (Fig. 3A).

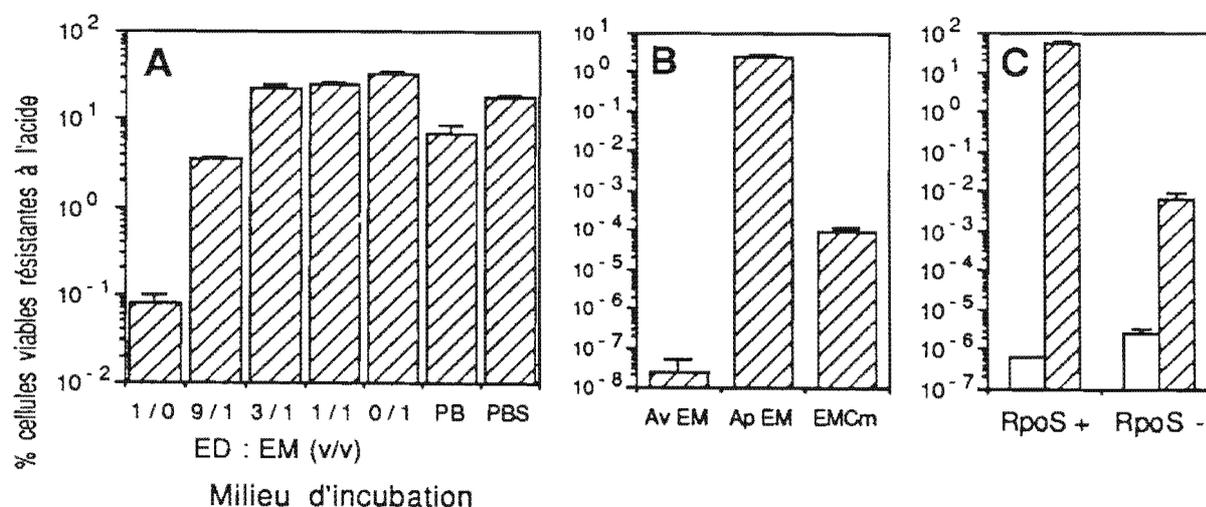


Fig. 3. (A) Résistance à l'acide des cellules d'*E. coli* MC4100 avant et après une incubation de 100 minutes en eau distillée (ED), en tampon phosphate à basse (PB) ou haute (PBS) osmolarité, et en eau de mer diluée ou non (EM). Le pourcentage de cellules résistantes à l'acide non soumises à cette incubation était de 2.4×10^{-6} . (B) Effet du chloramphénicol (Cm, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sur l'induction par l'eau de mer de la résistance à l'acide dans les cellules d'*E. coli* MC4100 (AvEM, cellules résistantes à l'acide avant incubation dans l'eau de mer; ApEM, résistance après 100 minutes dans l'eau de mer; EMCm, résistance après 100 minutes dans l'eau de mer + Cm). (C) Résistance à l'acide des cellules d'*E. coli* MC4100 (RpoS+) et RH90 (RpoS-) avant (colonnes blanches) et après (colonnes hachurées) l'incubation de 100 minutes en eau de mer.

L'induction de résistance à l'acide était cependant 2 à 4 fois plus élevée dans l'eau de mer. Cette résistance acquise était perdue après subculture des cellules. Elle était partiellement dépendante du gène *rpoS* et de la protéosynthèse (Fig. 3B, 3C). Un processus analogue a été observé avec les coliformes fécaux des matières fécales

17 Gorden J., and Small, P.L.C., 1993. *Infect. Immun.* 61:364-367

humaines et ceux des eaux usées. Une telle augmentation du niveau de résistance à l'acidité gastrique des bactéries entériques pathogènes dans les eaux côtières marines ou saumâtres, tout comme dans les eaux douces naturelles, pourrait avoir d'intéressantes implications sanitaires et épidémiologiques.

Deux autres études sont en cours sur ce programme, dont les résultats seront développés dans le prochain rapport. L'une concerne l'influence des hydrates de carbone (et plus particulièrement le tréhalose) sur le potentiel de survie d'*E. coli* dans l'eau de mer est en cours. L'autre concerne l'analyse des protéines néosynthétisées ans l'eau de mer, par électrophorèse bi-dimensionnelle en gel d'acrylamide.

Personnel participant au programme

Les recherches réalisées par le groupe INSERM de Nice dans le cadre du P.N.O.C. ont été effectuées par le personnel INSERM suivant:

Michel Gauthier, DR2 INSERM, Doctorat d'Etat (3 mois/an)

Gilles Flatau, CR1 INSERM, Doctorat de l'Université de Nantes (6 mois/an)

Patrick Munro, CR1 INSERM, Doctorat de l'Université de Marseille (6 mois/an)

René Clément, Ingénieur INSERM, Diplôme Universitaire de Recherche (4 mois/an)

Aucun personnel supplémentaire n'a été engagé (techniciens, étudiants, etc..) pour effectuer des travaux dans le cadre de ce Programme.

Publications réalisées dans le cadre du PNOG (aide financière PNOG mentionnée sur la publication)

1991:

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. 57: 272-276.

1992:

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

1994:

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.* 27: 57-63.

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.

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.

Soumises :

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.*).

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.*).

Montant et utilisation du financement reçu depuis le début du projet

Montants (FF HT):

1992: 40.000 F

1993: 58.000 F

1994: 59.000 F

Utilisation :

Les crédits perçus en 1992 et 1993 ont été en totalité utilisés pour l'achat de matériels de fonctionnement et pour diverses missions. Les crédits attribués au titre du deuxième semestre 1994 seront vraisemblablement utilisés de la même manière.

Problèmes rencontrés ou soulevés

L'efficacité des collaborations au sein du groupe de Microbiologie sanitaire travaillant dans le cadre du PNOC nécessite la diffusion la plus rapide possible des résultats des travaux de chaque équipe auprès de l'ensemble des autres équipes collaborantes, ce qui, autant que l'on puisse en juger, n'est pas le cas pour l'instant. Nous suggérons donc que la liste des publications et rapports de chaque équipe sur les thèmes PNOC (non nécessairement restreinte à celles financées par ce Programme) soit, chaque année, collectée par le Coordonnateur et diffusée auprès de tous les autres groupes engagés sur le Programme.

Perspectives pour 1995

Programme

Il prolonge directement les lignes d'activité de l'équipe développées antérieurement dans le cadre de ce Programme :

1°) Poursuite de la collaboration directe aux expériences de calage du modèle de survie, réalisées à Montpellier ou aux Embiez. Le calendrier de ces expériences pour 1995 est en cours d'élaboration.

2°) Poursuite des recherches concernant l'implication des réponses anti-stress dans les processus permettant l'adaptation des bactéries entériques (*E. coli*, *S. typhimurium*) aux conditions marines.

Compte tenu de l'importance des protéines de stress au cours de la phase d'adaptation de ces bactéries dans l'eau de mer, particulièrement significatives dans le cadre de la modélisation de la survie, il est maintenant intéressant d'analyser plus directement les liens entre la capacité de survie des bactéries (modèle *E. coli*) et le turn-over de leurs protéines. Suite aux études préliminaires effectuées par l'équipe INSERM dans ce domaine en 1994, il est donc envisagé d'examiner de manière parallèle:

- l'évolution de l'activité protéolytique des cellules d'*E. coli* et de *S. typhimurium* en fonction du temps d'incubation dans l'eau de mer, en mesurant à la fois leur teneur en protéines totales (Méthode de Lowry), et leur activité protéolytique spécifique (méthode enzymatique).

- la modification de leur neo-synthèse protéique après différentes périodes de contact avec l'eau de mer, par électrophorèse bi-dimensionnelle des extraits protéiques de cellules marquées ("pulse") par la ³⁵S-méthionine. Cette méthode devrait permettre

d'analyser les variations qualitatives du "pool" protéique des cellules dans différentes conditions expérimentales et pour diverses souches mutantes des deux espèces sélectionnées:

- cellules en phase exponentielle ou stationnaire
- cellules cultivées à basse ou haute osmolarité
- cellules RpoS+ ou RpoS-
- eau de mer oligotrophe ou additionnée de nutriments

Financement

Etablissement du modèle de survie :

Réactifs	4500 F. HT
Verrerie, plastique UU	5500 F. HT
Coût total :	10.000 F HT
Demandé au PNOC : 100%, soit :	10.000 F HT

Etudes complémentaires au laboratoire :

Réactifs, produits chimiques	15.000 F. HT
Milieux de culture	31.000 F. HT
Verrerie, plastique UU	36.000 F. HT
Coût total :	82.000 F HT
Demandé au PNOC : 50%, soit :	41.000 F HT

Financement demandé au PNOC : 51.000 F. HT

FONDATION OCEANOGRAPHIQUE RICARD

ILE DES EMBIEZ

Y. MARTIN

LABORATOIRE D'HYDROBIOLOGIE, URA CNRS 1355

UNIVERSITE DE MONTPELLIER II

M. TROUSSELLIER

Institut Océanographique Paul Ricard
Département Recherches
Ile des Embiez
83140 Six-Fours-les-Plages

Laboratoire d'Hydrobiologie marine
URA CNRS 1355
Université Montpellier II
34095 Montpellier Cedex 05

PROGRAMME NATIONAL D'OCEANOGRAPHIE COTIERE

Effet de la prédation sur le devenir des bactéries entériques en mer

Rapport d'activité 1994

OBJECTIF DE RECHERCHE

Evaluation des effets de la prédation sur les abondances des bactéries entériques rejetées dans le milieu marin par rapport à ceux des autres facteurs environnementaux.

RÉSULTATS OBTENUS

I- Etude bibliographique

L'examen de la littérature consacrée au devenir des entérobactéries dans le milieu marin révèle que leurs abondances évoluent sous l'action de différents facteurs.

Les rejets d'eaux usées et les bactéries qu'ils contiennent sont tout d'abord soumis à des **phénomènes physiques** (dilution, sédimentation). Si l'on considère les seules bactéries libres qui ont des vitesses de sédimentation négligeable, les effets de la dilution sur la concentration bactérienne peuvent être très importants (Salomon & Pommeypuy, 1990) ou négligeables (Bravo & Vicente, 1992), selon le type de rejet et la zone de mélange considérée.

Les facteurs conduisant à une inactivation ou à une perte de l'**intégrité biologique** sont plus nombreux :

- la **température**, agissant vraisemblablement de façon plus indirecte (Barcina et al., 1991) que directe sauf si elle présente de grandes fluctuations dans le milieu récepteur (Rhodes & Kator, 1988).
- les **nutriments** disponibles dont la carence affecte le potentiel de survie de façon très diverse (Gauthier et al., 1993).
- l'accroissement de la **salinité** (Solic & Krstulovic, 1992) qui induit un choc osmotique.
- le **rayonnement solaire** qui agit principalement par les UV-B et les UV-A provoquant respectivement des dommages photobiologiques et photochimiques (Sinton et al., 1994), ces derniers pouvant être amplifiés par de fortes concentrations en oxygène dissous (Curtiss et al., 1992).
- la **prédation** qui peut être exercée par différents types d'organismes marins et en particulier par les flagellés et les ciliés (Barcina et al., 1991; Garcia-Lara et al., 1991).

Les **conditions expérimentales** des études menées sur les causes de la décroissance des entérobactéries peuvent conduire à négliger certains facteurs ou à en privilégier d'autres. C'est notamment le cas pour la prédation, dont les effets ne sont pas pris en compte dans les travaux utilisant de l'eau de mer stérilisée par filtration comme support expérimental ou deviennent dominants lorsque les expériences sont conduites à l'obscurité. Quoiqu'il en soit, la prédation est le seul facteur qui puisse conduire à court terme à l'élimination "physique" des cellules d'entérobactéries en suspension.

Les **méthodes de dénombrement** utilisées, ou plus justement les catégories cellulaires étudiées, conditionnent également la perception du rôle des différents facteurs. Ainsi, la seule observation des abondances des cellules cultivables (CFU) aboutira à mettre davantage en évidence des facteurs

qui entraîne la perte du pouvoir de cultiver, alors que l'utilisation des techniques de comptage direct (microscopie en épifluorescence) des cellules donne des estimations plus justes des effets de la prédation.

En conséquence, l'évolution de la problématique relative au rôle des facteurs environnementaux et notamment de la prédation sur le devenir des entérobactéries ne relève pas tant, de notre point de vue, d'études expérimentales complémentaires pour obtenir des mesures spécifiques des effets de tel ou tel facteur, mais plutôt de se donner les moyens de comparer le "poids" respectif des différents facteurs.

II- Modélisation

Nous avons donc tenté d'établir un premier modèle mathématique basé sur les données de la littérature afin de simuler l'action de différents facteurs sur les évolutions d'abondance des entérobactéries. La catégorie d'entérobactérie considérée est les coliformes fécaux (CF) choisis de par leur utilisation dans l'établissement des normes sanitaires et de par l'abondance des travaux qui leur est consacré dans la littérature.

L'évolution des concentrations bactériennes est modélisée suivant l'équation générale :

$C(t) = C_0 e^{-m(t-t_0)}$ avec m , le taux de décroissance instantanée, qui peut être considéré comme la somme du taux de décroissance dû aux effets physiques (p) et de celui dû aux effets biologiques (b), d'où :

$$C(t) = C_0 e^{-p(t-t_0)} e^{-b(t-t_0)}$$

Le poids des effets physiques par rapport aux effets biologiques peut donc être mesuré par le rapport p/b .

Les effets physiques ne prennent en compte que le taux de dilution (T) ($p = -\ln T$). Les effets biologiques sont considérés comme la somme des taux de décroissance dû aux différents facteurs considérés : $b = \sum k_i$. Les données disponibles de la littérature nous ont conduit à ne prendre en compte que :

- k_{ray} (taux de décroissance dû au rayonnement solaire, selon une combinaison des équations de Auer & Niehaus (1993) et de Curtis et al. (1992)).
- k_s (taux de décroissance dû à l'accroissement de la salinité, selon l'équation de Mancini (1978)).
- $k_{préd}$ (taux de décroissance dû à la prédation par les ciliés et microflagellés, établis d'après une compilation des données existant sur leurs abondances et leurs taux de clearance).

Le poids des facteurs environnementaux autre que la prédation par rapport à la prédation est mesuré par le rapport $(b - k_{préd}) / k_{préd}$.

Nous avons également considéré distinctement les abondances en bactéries cultivables (CFU) et les abondances totales (TC). Pour ces dernières, du fait que la littérature montre que leurs valeurs sont quasiment constantes dans l'eau de mer (Garcia-Lara et al., 1991) et ne sont pas significativement modifiées par les variations du rayonnement solaire (Gourmelon et al., 1994), nous n'avons considéré que le seul effet de la prédation. Par construction le rapport $(b - k_{préd}) / k_{préd}$ est donc toujours égal à 0.

Les simulations sont réalisées pour différentes conditions de dilution des eaux usées dans l'eau de mer ($T = 1; 0,1; 0,01; 0,001$) et de temps de séjour ($t = 1; 2,4; 12; 24; 36; 48; 120; 240$ heures) des bactéries à ces différentes dilutions. La calibration du modèle a été réalisée d'après les données de Martin et al. (1984).

En ne considérant que les cas de figure réalistes (i.e., des combinaisons de dilution et de temps de séjour compatibles avec la réalité) les simulations conduisent aux résultats suivant :

- Effets de la dilution par rapport aux facteurs biologiques (rapport p/b):
 - Pour les comptages CFU, les effets de la dilution sur la décroissance des CF l'emportent sur les facteurs biologiques pour des temps de séjour courts ($t < 12$ heures). Ces effets deviennent du

même ordre de grandeur dès que $t > 12$ heures. Le rapport p/b ne devient inférieur à 1 et minimum (dominance des facteurs biologiques) que pour des taux de dilution $> 0,001$ et des temps de séjour ≥ 5 jours.

-Pour les TC, s'il existe une diminution progressive du rapport p/b lorsque la dilution et le temps de séjour s'accroissent, toutes les conditions simulées aboutissent à une dominance des effets de la dilution sur les facteurs biologiques ($p/b \gg 1$). Rappelons que dans le cas des TC seule la prédation agit sur les abondances et ce par construction du modèle.

-Effets de la prédation par rapport aux facteurs biologiques:

Les simulations permettant de calculer le rapport $(b - k_{\text{préd}}) / k_{\text{préd}}$ n'ont été réalisées que pour les CFU. Ce rapport n'a été calculé que pour les cas de figure où $p/b < 10$. Les simulations réalisées montrent que le rapport est toujours $\geq 12,2$, c'est à dire que les effets des facteurs autres que la prédation sont toujours au moins 12,2 fois supérieur à celle ci.

A partir de ces résultats théoriques, l'on ne doit s'attendre à des effets prédominants des facteurs biologiques par rapport aux effets de la dilution que lorsque les temps de séjour des cellules dans l'eau de mer sont suffisamment longs et ce uniquement pour les CFU. Dans ces cas de figure, et pour les conditions de simulation définies, les effets autre que la prédation (i.e., salinité et rayonnement) seraient plus importants que celle ci.

III- Expérimentations

Pour éprouver ces conclusions, et tenter de valider le modèle qui les soutend, nous avons débuter une phase expérimentale.

Cette phase de validation expérimentale a été initiée sur des bases classiques, c'est à dire en mettant en oeuvre des flacons, remplis d'eau de mer brute ou filtrée sur $0,22 \mu\text{m}$ pour éliminer les prédateurs, dans lesquels une souche pure d'*Escherichia coli* a été inoculée en quantité telle qu'elle reproduise les concentrations en CF que l'on peut rencontrer pour une dilutions au 1/100 d'eau usée dans de l'eau de mer. Ces flacons ont été incubés dans des enceintes extérieures non couvertes mais thermostatées ($\approx 20^\circ\text{C}$). La moitié d'entre eux (2) ont été ainsi exposés au rayonnement solaire naturel et l'autre moitié (2) protégé par une enveloppe opaque. Des numérations ont été effectuées sur milieu sélectif TTC-Tergitol (Diagnostic Pasteur) et par comptage en microscopie en épifluorescence après marquage des échantillons à l'Acridine Orange à différents temps (0, 2, 4, 6, 24, 48, 120, 168, 312 heures).

Le calcul des taux de décroissance associées à chacun de ces quatre flacons a permis ensuite d'estimer les rapports p/b et $(b - k_{\text{préd}}) / k_{\text{préd}}$ et de les comparer à leurs équivalents simulés par le modèle dans les conditions expérimentales utilisées.

Les valeurs de ces rapports sont reportées dans le tableau suivant :

	CFU		TC	
	expérience	simulation	expérience	simulation
p/b	4,14	27,1 < < 28,7	200,4	10,8 < < 19,3
$(b - k_{\text{préd}}) / k_{\text{préd}}$	1,75	6,9 < < 12,4	0,92	0 (par construction)

Les valeurs du rapport p/b simulés et déduits de l'expérience sont > 1 , et indiquent donc des effets de dilution supérieurs aux effets biologiques. Cependant pour les CFU, la valeur simulée est nettement supérieure à la valeur observée, et pour les TC c'est l'inverse. Le modèle sous-estime donc les effets des facteurs biologiques pour les CFU (la valeur de p ($p = -\ln T$) est en effet la même pour l'expérience et la simulation). En ce qui concerne les TC, les raisons de l'écart entre

valeurs observées et simulées sont relatives à l'estimation de l'effet de la prédation puisque c'est le seul facteur biologique compris dans le modèle. Des mesures ponctuelles sur l'eau de mer utilisée pour l'expérience ont révélé que la concentration en flagellés était nettement inférieure à celle utilisée pour réaliser les simulations. Sur la base des estimations d'abondance initiales (flagellés $\approx 10^4 \text{ l}^{-1}$ au lieu de 10^6 l^{-1}) les valeurs de p/b simulées pour les TC sont comprises entre 72,4 et 533, intervalle qui comprend la valeur observée (200,4).

Les résultats concernant le rapport $(b - k_{\text{préd}}) / k_{\text{préd}}$ montre que celui-ci est sur-estimé par le modèle pour les CFU, ce qui signifie qu'il sur-estime les effets des variables salinité et rayonnement (il ne sous-estimerait pas les effets du zooplancton compte tenu des commentaires précédents). En ce qui concerne les TC alors que par construction le modèle n'admet que les effets de la prédation, i.e. $(b - k_{\text{préd}}) / k_{\text{préd}} = 0$, l'expérimentation conduit à une valeur de 0,92. Ce qui indique que d'autres variables que la prédation contribueraient de façon significative à la diminution des TC.

Les écarts observés entre les valeurs simulées et observées à l'issue de cette première expérimentation pourraient provenir de la façon dont sont gérés les effets de plusieurs variables dans le modèle. Actuellement, comme dans le cas des modèles présentés dans la littérature, c'est une loi additive qui est utilisée. Or, en examinant les valeurs des taux de décroissance des CF obtenus soit en ne considérant qu'un seul facteur (lumière, prédation) ou les deux facteurs contrôlés, il est apparu que cette loi n'est pas respectée. Une amélioration du modèle devrait essayer de prendre en compte les interactions entre variables. Sur le plan expérimental, il serait également nécessaire d'apporter des améliorations. L'examen des intervalles de confiance associés aux taux de décroissance montre que la précision de leur estimation est très sensible au nombre de points expérimentaux considérés.

Bibliographie succincte

- Auer M.T. & Nichols S.L. 1993. Modeling fecal coliform bacteria - I. Field and laboratory determination of loss kinetics. *Water Research* 27, 4: 693-701.
- Barcina I., Gonzalez J.M., Iriborri J. & Egea L. 1991. Role of protozoa in the regulation of enteric bacteria populations in seawater. *Marine Microbial Food Webs* 5, 2: 179-187.
- Bravo J.M. & De Vicente A. 1992. Bacterial die-off from sewage discharged through submarine outfalls. *Water Science and Technology* 25, 9: 411-52.
- Curtis T.P., Mara D.D. & Silva S.A. 1992. Influence of pH, oxygen, and humic substances on ability of sunlight to damage fecal coliforms in waste stabilization pond water. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 4: 1335-1343.
- García-Lara J., Menon P., Servais P. & Billen G. 1991. Mortality of fecal bacteria in seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 3: 885-888.
- Gauthier M.J., Munro P.M., Platau G.N., Clément R.L. & Breittmayer V.A. 1993. Nouvelles perspectives sur l'adaptation des entérobactéries dans le milieu marin. *Mar. Life* 3, 1-2: 1-18.
- Gourmelon M., Cillard J. & Pommepuy M. 1994. Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. *Journal of Applied Bacteriology*, 77: 105-112.
- Mancini J.L. 1978. Numerical estimates of coliform decay rates under various conditions. *J. Water Poll. Control Fed.* 50: 2477-2484.
- Martin Y.P., Lelong P., Tanguy B., Magurno C., Bonnefont J.L. & Equel J.C. 1984. Qualité des eaux territoriales. Disparition des coliformes fécaux d'un effluent urbain en milieu marin. *Vie Marine*, Hors Série n°4, 81 pp
- Rhodes M.W. & Kator H. 1988. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in estuarine environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 12: 2902-2907.
- Salomon J.C. & Pommepuy M. 1990. Mathematical model of bacterial contamination of the Morlaix estuary (France). *Water Research* 24, 8: 983-994.

Sinton L.W., Davies-Colley R.J. & Bell R.G. 1994. Inactivation of enterococci and faecal coliforms from sewage and meatworks effluents in seawater chambers. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, C:2040-2043.

Solic M. & Krstulovic N. 1992. Separate and combined effects of solar radiation, temperature, salinity, and pH on the survival of faecal coliforms in seawater. *Marine Pollution Bulletin* 24, 8: 411-416.

PERSONNES ENGAGEES DANS LE PROGRAMME

Nom	Diplôme	Mois consacrés/an
Mesplé Fabrice	Docteur	6 mois/6 mois
Troussellier Marc	Docteur d'Etat	1 mois/6 mois
Martin Yvan	Docteur d'Etat	1 mois/6 mois
Bonnefont Jean-Luc	Docteur	1 mois/6 mois

FINANCEMENT RECU ET UTILISATION

Financement reçu : 70 000,00 F. (H.T.)

Utilisation :

Personnel : 47 807,92
Equipement : 5 602,33
Fonctionnement : 18 054,77

Financement : 70 KF +100 KF

- personnel : 0 KF
- équipement : 60 KF
- fonctionnement : 110 KF

Perspectives pour l'année à venir :

La poursuite du travail réalisé à ce jour doit nous permettre de tester d'autres marqueurs d'activités cellulaires (potentiel membranaire, intégrité de la membrane cytoplasmique, activité enzymatique). Lorsque cette étape sera achevée (fin 1994), des expérimentations seront réalisées en microcosmes afin de déterminer l'hétérogénéité des états cellulaires dans une population soumise à des conditions de carence et de recharge énergétique. Un effort sera accompli afin d'évaluer d'une manière plus précise quel est la part réelle de resuscitation de cellules non-cultivables en opposition à la croissance de quelques cellules cultivables résiduelles.

Programme :

- Essais de marqueurs complémentaires d'activités cellulaires: marquage des cellules non-viables par un marqueur d'exclusion (iodure de propidium), mesure du potentiel membranaire (Rhodamine 123), mesure de l'activité enzymatique (Chemunex).
- Mesure de la capacité des cellules à reprendre une activité de division (intérêt durant le suivi après addition de nutriments): mise au point d'un marquage membranaire uniforme et stable à l'aide d'un fluorochrome vital (PKH-26 GL, Sigma).
- Expérimentations en microcosmes:
 - * comportement des cellules en condition de stress nutritionnel et de récupération en eau de mer.
 - * mesure d'activités cellulaires réelles et potentielles (DVC et respiration): intérêts et inconvénients des deux types de mesures.
 - * estimation de la part de cellules "resuscitables".
 - * perspectives de tri cellulaire et analyse des fractions subséquentes.

Financement demandé : 100 KF

LABORATOIRE ARAGO, UNIVERSITE DE PARIS VI
BANYULS-SUR-MER

P. LEBARON

Objectif de recherches :

Caractérisation des états cellulaires au cours de la survie des entérobactéries dans le milieu marin.

Résultats obtenus :

Dans le cadre du Programme National d'Océanographie Côtière "Microbiologie sanitaire", les travaux que nous avons effectués ont essentiellement consisté en un approfondissement des méthodes de caractérisation des états cellulaires des entérobactéries au moyen de la cytométrie en flux (CMF).

Pour tenter d'évaluer une 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, nous avons considéré dans un premier temps des caractéristiques générales comme le contenu en ADN (cf. section I), l'activité respiratoire (section II) ou plus spécifique comme l'activité enzymatique (section III).

A terme, la CMF offre la possibilité de pouvoir accéder à des opérations de tri cellulaires dont nous avons testé la faisabilité (section VI) sur la base des caractéristiques cellulaires reconnues au moyen de molécules fluorescentes.

I - Analyse du contenu relatif en ADN cellulaire de *Salmonella typhimurium* en période de survie et de récupération en eau de mer

La survie de *S. typhimurium* en eau de mer artificielle (salinité 35g/l, 20-25 °C, faible éclaircissement) a été étudiée durant une période de 35 jours. Alors que la viabilité estimée par la méthode standard de comptage sur milieu de culture (CFU) diminue de manière logarithmique, le comptage direct reste constant durant la période expérimentale, indiquant que la perte de viabilité estimée par CFU ne s'accompagne pas d'une lyse cellulaire. Par cytométrie en flux (marquage au Hoechst 33342), il a été montré que les cellules prélevées en fin de phase de croissance exponentielle, ayant servi d'inoculum au microcosme, contiennent 1 ou 2 génomes complètement répliqués. Après l'entrée en survie, l'hétérogénéité dans la distribution de l'ADN cellulaire est maintenue, signalant que les cellules n'évoluent pas dans leur cycle cellulaire et qu'une fraction de 40% de cellules se situent en phase pré-divisionnelle. La distribution de l'ADN cellulaire s'altère progressivement à partir du 7ème jour de survie, avec une diminution (35% en fin d'expérimentation) de la fluorescence liée à l'ADN et un élargissement des pics.

Alors que le rapport de cellules cultivables/cellules totales est de $6,6 \times 10^{-6}:1$ (40 CFU/ml) après 28 jours de survie, un apport de peptone à une concentration finale de 50 mg/l est réalisé. Au bout de 60 h, le nombre de cellules cultivables atteint 60% du nombre total de cellules qui a été multiplié par 2,4 durant le même temps. Cette augmentation des CFU peut refléter la croissance de quelques cellules cultivables restantes, ou bien la revivification de cellules non-cultivables. La distribution de l'ADN cellulaire 60 h après apport, est presque similaire à celle de l'inoculum. Ces modifications semblent

indiquer que la plupart des cellules répondent aux nutriments ajoutés (hypothèse d'une revivification) et que la dégradation du signal cytométrique observée durant la survie est réversible. Cette dernière observation suggère que les modifications du contenu en ADN cellulaire mesuré par marquage fluorescent résultent de changements topologiques de l'ADN plutôt que d'une dégradation du génome.

II - Mesure cellulaire de l'activité réelle respiratoire par le CTC au moyen de la cytométrie en flux

Le CTC est une sonde redox fluorescente compétiteur avec l'oxygène en tant qu'accepteur d'électrons artificiel. Le potentiel réducteur généré lorsque le système transporteur d'électrons est actif (cellules métaboliquement actives) convertit alors le CTC en cristaux de formazan insolubles et fluorescents. Les informations apportées par cette méthode en terme de détermination des états cellulaires des entérobactéries dans le milieu marin, ont été évaluées sur *E. coli* K12 placé dans différentes conditions expérimentales (croissance, carence nutritive, stress osmotique, rayonnement solaire) simples ou additives. La mesure correspond à une activité respiratoire réelle et non potentielle, car elle est réalisée sur un échantillon incubé en présence de CTC, sans ajout de substrat ou d'un transporteur d'électrons exogène.

Les résultats obtenus en conditions de croissance tendent à montrer que l'utilisation conjointe du CTC et de la cytométrie en flux apparaît comme une méthode intéressante pour déterminer la proportion de cellules ayant une activité respiratoire (équivalence entre le nombre de cellules cultivables et le nombre de cellules fluorescentes). Lorsque les cellules sont soumises à un stress osmotique et/ou à une carence nutritive seule ou accompagnée du rayonnement solaire, l'activité respiratoire est très réduite (diminution de l'intensité de fluorescence) et le nombre de cellules respirantes apparaissent inférieures au nombre de cellules cultivables. Ces stress conduisent au cours des premières 24 heures à une diminution plus rapide des activités (et non des potentialités) métaboliques que celle de la perte de cultivabilité et donc à la formation de cellules non actives cultivables. Ces résultats, rejoignant ceux de la littérature, semblent indiquer que l'état hypothétique de bactéries viables mais non cultivables, ne peut être décelé dans certains types de stress par la mesure seule de l'activité respiratoire réelle.

III - Essai de mesure de l'activité enzymatique en cytométrie en flux par le BCECF-AM

L'activité physiologique de *S. typhimurium* a été estimée en utilisant la sonde fluorescente BCECF qui est libérée à l'intérieur de la cellule si une activité enzymatique de type estérasique y est maintenue. La perméabilité membranaire vis-à-vis de l'ester acétoxyméthyl BCECF-AM (substrat pour estérases non-spécifiques), a permis l'introduction de la sonde dans la bactérie. La fluorescence cellulaire liée au BCECF détectée dans les cellules viables (estimées par CFU) peut être attribuée à

une activité métabolique réelle de la bactérie car aucune fluorescence n'a été détectée chez les cellules mortes (traitement au formol). La fuite de la sonde BCECF hors de la cellule, représente une limitation de la méthode de mesure de l'activité, en raison de l'instabilité du marquage qui en résulte.

IV - Faisabilité du tri cellulaire en cytométrie en flux

Le tri cellulaire en cytométrie en flux conduit à la séparation physique de cellules d'un échantillon mélangé sur la base d'une ou plusieurs caractéristiques cellulaires. Ce procédé novateur en bactériologie a été testé sur la base d'un tri de cellules ayant un contenu en ADN différent (1 ou 2 génomes), après un marquage vital au Hoechst 33342. Les premiers résultats indiquent une bonne qualité de tri (non-recouvrement des fluorescences associées aux deux fractions triées), le maintien de la viabilité cellulaire lors de l'opération de tri (faible puissance du laser), et l'absence de contamination des échantillons triés.

Personnes engagées :

N. Batailler (1)	T3	1 mois/an
F. Joux (1)	Thésard	6 mois/an
Ph. Lebaron (1)	MC2	1 mois/an
M. Troussellier (2)	CR1	1 mois/an
C. Courties (2)	IRX	1 mois/an

(1): Observatoire Océanologique de Banyuls. UPMC Paris VI. CNRS UA117.
66650 Banyuls-sur-mer.

(2): Laboratoire d'Hydrobiologie Marine et Continentale. USTL. CNRS URA 1355.
34095 Montpellier.

Publications réalisées dans le cadre du PNOC :

Troussellier, M., Courties, C., and Vaquer, A. 1993. Recent applications of flow cytometry in aquatic microbial ecology. *Biol. Cell* 78:11-121.

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

FONDATION OCEANOGRAPHIQUE RICARD

ILE DES EMBIEZ

Y. MARTIN

département "Recherches"

PROGRAMME NATIONAL D'OCEANOLOGIE COTIERE
Modélisation du devenir des bactéries entériques en mer

OBJECTIFS

Modéliser le devenir d'une population d'E.coli soumise au jeûne, en eau douce et eau de mer, à l'obscurité ou en présence de lumière dans un second temps.

En effet, la plupart des modèles concernent des bactéries proliférantes et il n'y a pas, à notre connaissance, de modèles concernant la survie. Compte tenu de la complexité du problème, il nous a paru préférable de procéder pas à pas, en analysant tout d'abord des systèmes relativement simples.

L'hypothèse générale (fig.1) est que le devenir est d'abord conditionné par la teneur en nutriment et par l'état énergétique des cellules éventuellement modulées par des facteurs internes (préadaptation, facteurs génétiques).

Les facteurs de l'environnement modulent le comportement des cellules en agissant plus ou moins spécifiquement sur certaines variables ou constantes physiologiques.

Des données bibliographiques conduisent à admettre différentes catégories cellulaires dans une même culture (cellules viables cultivables, capables ou non d'ajuster les besoins d'entretien, cellules viables incapables de se reproduire pouvant ou non ajuster leurs besoins, cellules mortes)

RESULTATS OBTENUS

En 1993-1994, les études réalisées ont porté sur le devenir d'une population d'E.Coli K12 soumise au jeûne et à différentes conditions de stress dans des expériences à court terme (50 h et dans un cas 146 h).

Le protocole expérimental comporte généralement huit flacons étudiés simultanément dérivant de la combinaison des trois stress étudiés: Carence en matière organique (MO-), salinité (S+) et lumière (L+).

Les expériences réalisées et l'examen des données bibliographiques conduisent aux conclusions générales suivantes (pour des essais de 50 h à 6 jours).

1. Il n'y a pas d'évolution significative du "Total count". Il n'y a donc pas de mortalité durant cette période, ni de lyse cellulaire bien démontrée (même si celle-ci peut survenir plus tard).

2. La demande énergétique d'entretien se traduit pas une réduction lente de la taille des cellules et donc de la biomasse, sans forcément affecter les effectifs. Il ne semble pas y avoir d'effet particulier de stress sur l'énergie de maintenance si ce n'est une augmentation de la demande initiale (ATP dans nos essais).

Connaître, protéger la mer / To know and protect the sea

3. La réponse aux stress se traduit immédiatement par une diminution du confort métabolique cellulaire (charge énergétique) d'autant plus accusée que le stress est important avec : Réponse MO- < MO- S+ < MO- L+ < MO- S+ L+

Cette phase initiale est suivie d'une période plus ou moins longue d'adaptation selon la nature du stress administré.

4. il en est de même en ce qui concerne la perte de viabilité (fig. 2 et 3) : hormis pour le stress MO- où après une phase initiale où le T90 est très long on a une augmentation par la suite, on observe généralement l'inverse pour les autres cas avec une réduction des effectifs cultivables importants au début (surtout avec lumière), plus faible ensuite, et même suivie de revivification ou d'adaptation bien démontrées avec le stress L+.

5. L'effet des stress sur les paramètres critiques ^{du} modèle dépend de leur nature :

. MO- conduit à une perte de viabilité très lente

. S+ a un effet important sur la vitesse ou pompage (nulle mais réversible quand MO+) et sur la perte de viabilité (T90 = 48 à 70 h).

. L+ limite également le pompage mais son effet est surtout net sur la perte de viabilité (T90 = 1 h avec S+) attestant un effet spécifique sur le génôme.

6. Dans tous les cas l'apport de matière organique augmente les T90 observés, voire permet la croissance si la quantité de MO est suffisante.

Ces différents points sont à considérer dans la construction et dans l'évolution du modèle conceptuel.

L'hypothèse des différentes catégories cellulaires a été prise en compte dans le modèle initial. Cependant, il se pourrait que les capacités d'adaptation intéressent toutes les catégories cellulaires, même à des degrés divers.

PERSONNES ENGAGEES DANS LE PROGRAMME

NOM	DIPLOME	MOIS PAR AN
BONNEFONT Jean-Luc	Docteur	3 1/2
MARTIN Yvan	Docteur d'Etat	2
BESSOUAT Rémy	Technicien	1
Personnel d'autres laboratoires participant aux essais concertés..... épisodique		

FINANCEMENTS RECUS ET UTILISATION

1992-1993

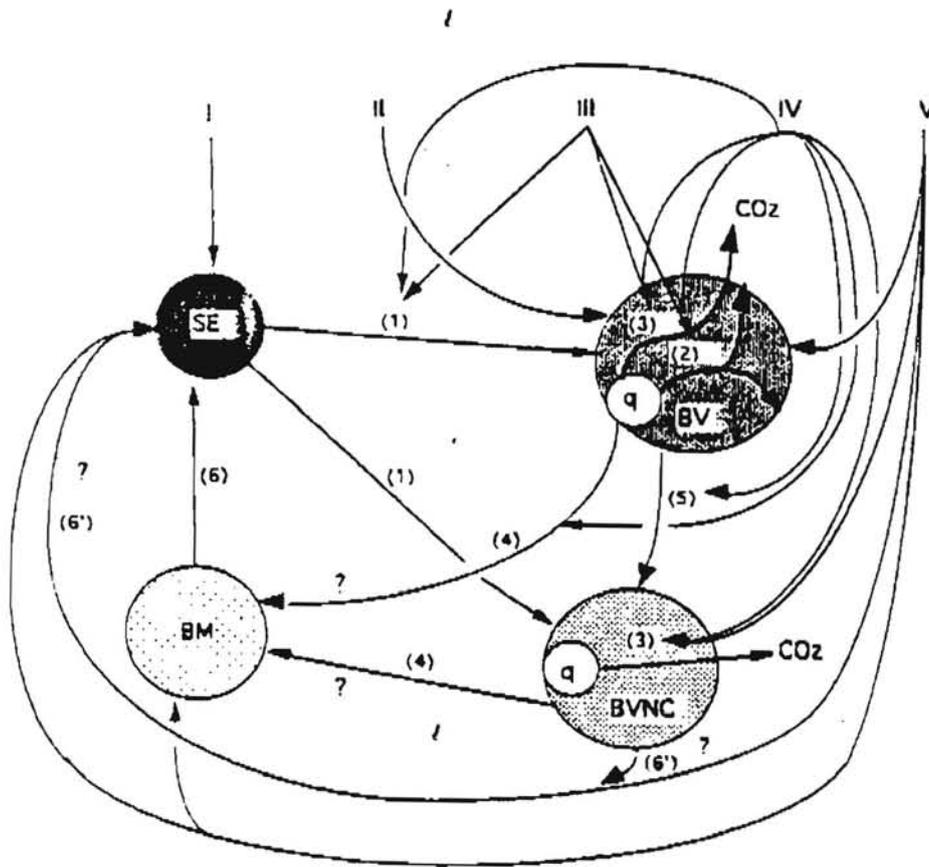
Total	45.000, 00 F H.T.
dont personnel	25.000, 00 F
fonctionnement	20.000, 00 F

1993-1994

Total	46.400,00 F
dont personnel	20.200,00 F
fonctionnement	20.000, 00 F
matériel	6.200,00 F

Fig 1: EVOLUTION DU MODELE

Le schéma conceptuel initial est résumé ci-dessous.



Fonctions biologiques

- (1) Pompage
- (2) Assimilation et croissance
- (3) Maintenance
- (4) Mortalité
- (5) Transformation
- (6) Autolyse

Variables forcantes

- I Matières organiques assimilables
- II Conditions antérieures, préadaptation
- III Salinité, température
- IV Lumière
- V Facteurs biotiques

EVOLUTION MOYENNE DES CFU A L' OBSCURITE . ("MO+"=0,1g/l de glucose):

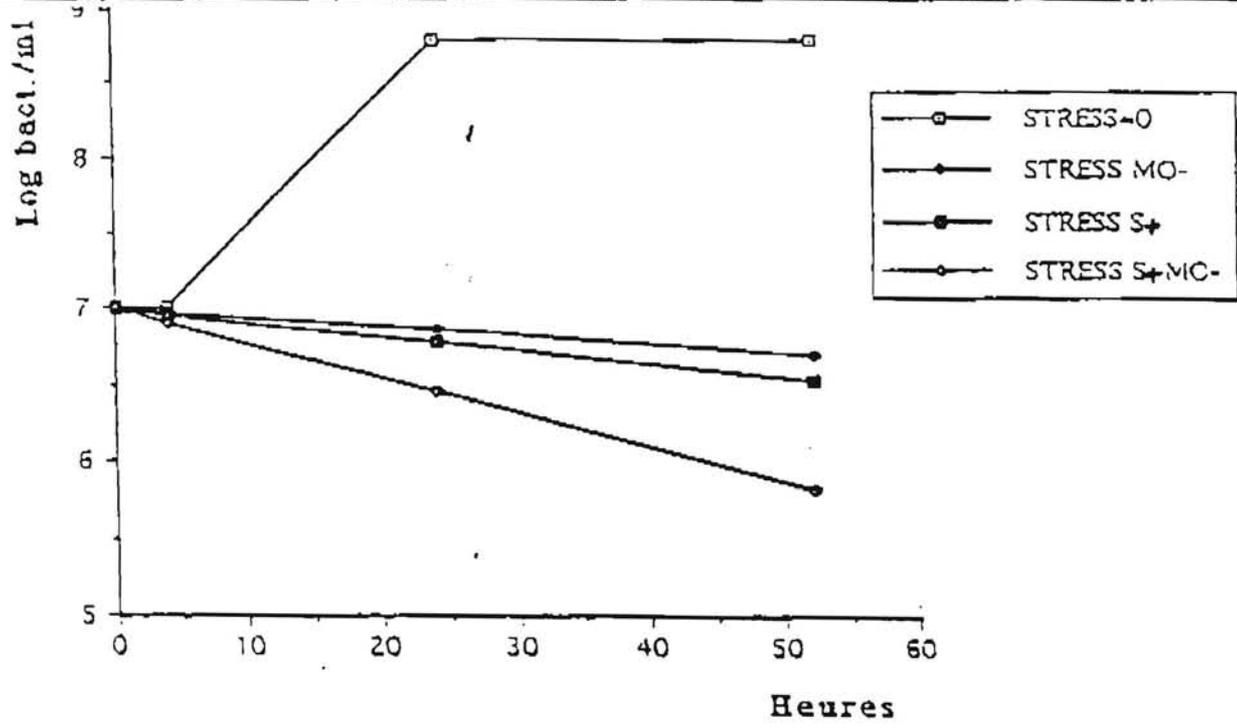


Fig. 2

EVOLUTION MOYENNE DES CFU EN PRESENCE DE LUMIERE SOLAIRE . ("MO+"=0,1g/l de glucose)

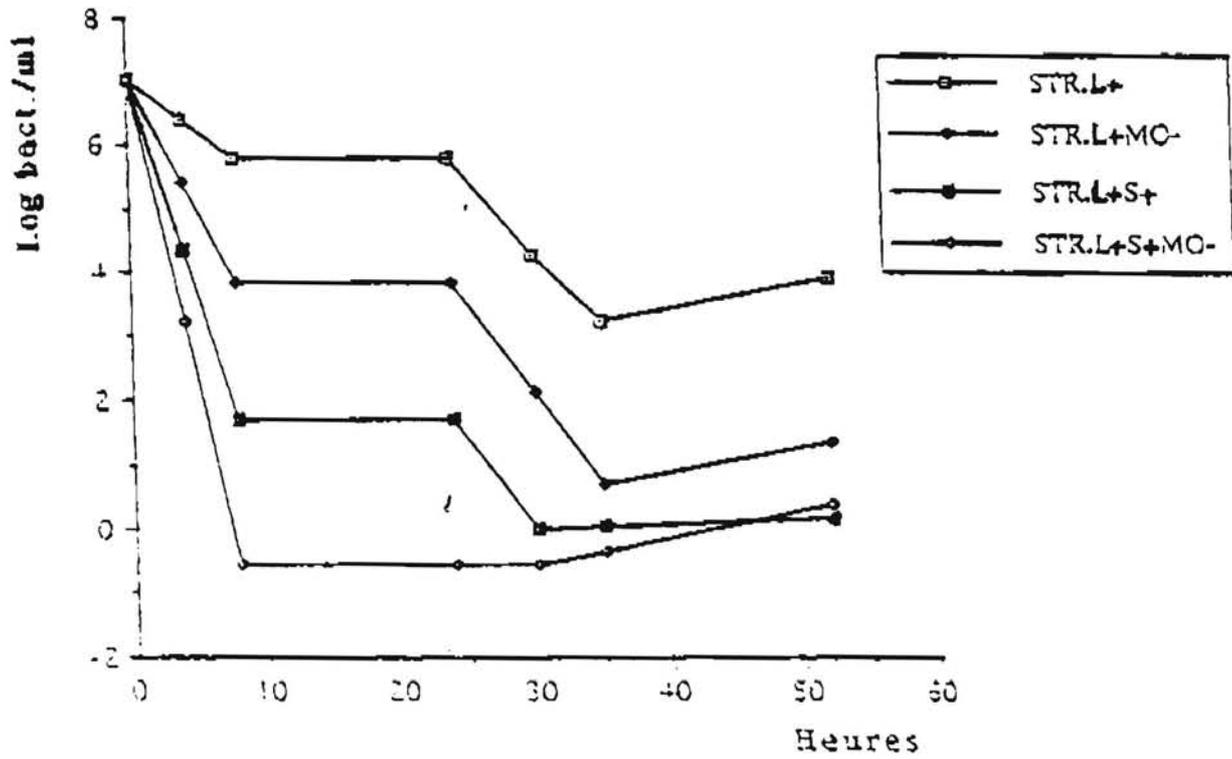


Fig. 3

LABORATOIRE MICROBIOLOGIE
IFREMER - DEL

Monique POMMEPUY

OBJECTIF DES ETUDES

Les travaux effectués par le laboratoire en Bactériologie (Brest) et en Virologie (Nantes) avaient pour objectifs :

➤ *en bactériologie :*

- la détermination de la capacité d'*E. coli* et *Salmonella* de répondre au stress osmotique dans des environnements marins naturels, en mettant en place des mécanismes d'autorégulation,

- la mise en évidence des mécanismes de photooxydation chez *E. coli* toujours en milieu marin,

➤ *en virologie :*

- l'étude du devenir de virus entérique dans les eaux littorales. Dans un premier temps l'influence de la salinité et de la lumière sur le devenir de l'ARN d'un enterovirus en eau de mer a été évalué par PCR (Polymerase Chain Reaction) ; la seconde partie des travaux avait pour but la mise au point de la PCR pour la recherche des rotavirus et l'étude de la stabilité des protéines capsidales de ce virus en milieu marin.

RESULTATS OBTENUS

I - ETUDE DES MECANISMES D'HALOTOLERANCE DE *E. COLI* ET *SALMONELLA* SPP. EN MILIEUX NATURELS

DUPRAY E.¹, DERRIEN A.¹, PICHON R.²

¹ IFREMER - DEL Laboratoire Microbiologie, B.P. 70, 29280 PLOUZANÉ

² Service RMN Faculté des Sciences, Université de Bretagne Occidentale 6 avenue Le Gorgeu 29287 BREST CEDEX

Nos études sur l'halotolérance de *Salmonella* et *E. coli* ont pour but de déterminer si ces bactéries sont capables de 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 des conditions naturelles. Il nous semblait pourtant important de les tester. Le rôle de la matière organique d'environnements littoraux (estuaires) a été particulièrement investigué, et nous avons tenu à conserver au maximum son intégrité chimique et physique grâce à l'utilisation de tubes à dialyse, dans certaines expérimentations.

Les survies enregistrées en termes 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 deux sédiments sur les 7 et l'eau d'estuaire testés.

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 toxiques doit également être envisagée, compte-tenu des apports terrestres auxquels sont soumis ces zones côtières. Il serait cependant difficile de déterminer quantitativement et qualitativement les éléments de la matière organique qui interviennent favorablement. Notre équipe avait déjà conclu dans ce sens en ce qui concerne l'augmentation de la teneur en sel supportée par *E. coli* et *Salmonella* en présence d'eaux d'estuaire.

Toujours dans le souci de reproduire la réalité, nous avons fait transiter *S. manhattan* dans des eaux usées avant son séjour en mer oligotrophe, ou 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 donc 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.

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 que nous avons utilisé, avec 24 heures de transit est réaliste, compte tenu du cheminement dans le réseau d'assainissement, puis dans une station d'épuration.

Il est à noter qu'une autre équipe travaillant dans le cadre du PNOC, est arrivée à des conclusions complémentaires des nôtres sur le rôle des gènes *kat F* dans l'adaptation préalable d'*E. coli* au milieu marin (Munro *et al.*, 1993).

La troisième information importante apportée par cette étude concerne les composés osmoprotecteurs identifiés par spectroscopie ¹H-RMN. 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.*** Ainsi, *S. manhattan* accumule majoritairement, dans trois environnements différents : tréhalose et x, tréhalose et acide glutamique, glycine-bétaine et x (figures 21, 22, 23).

Les mécanismes d'un autre sérotype, *S. typhimurium*, dans les mêmes conditions, sont parfois différents, ce qui rend complexe l'élaboration d'un schéma des réponses bactériennes face à un stress salin.

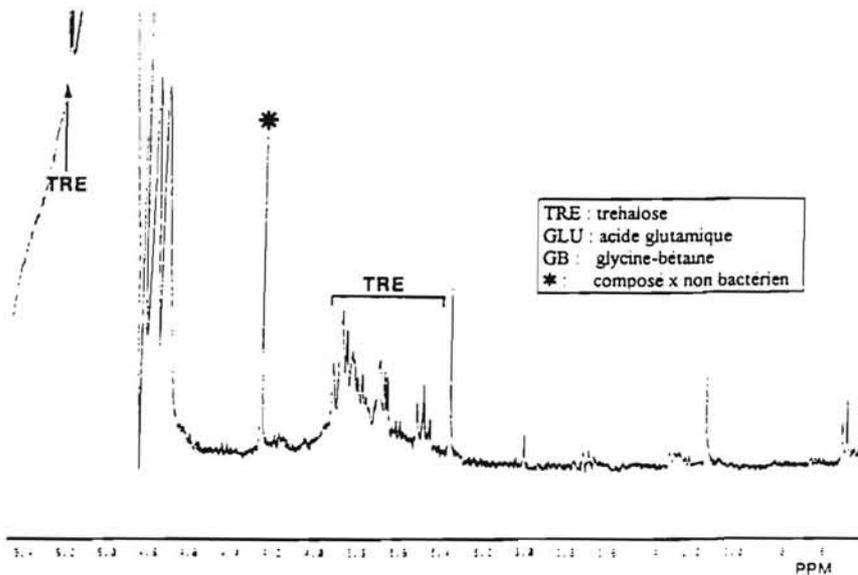


Figure 21 : Spectre RMN-¹H d'un extrait de *S. manhattan* après 6 jours en eau d'estuaire (28.6.1993) à 20 °C.

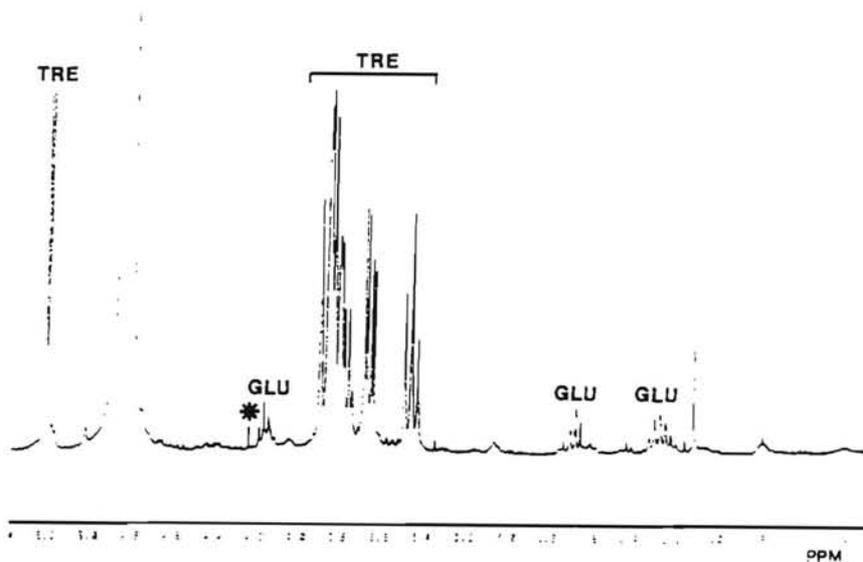


Figure 22 : Spectre RMN-¹H d'un extrait de *S. manhattan* après 6 jours en eau d'estuaire (28.6.1993) additionnée de proline à 20 °C.

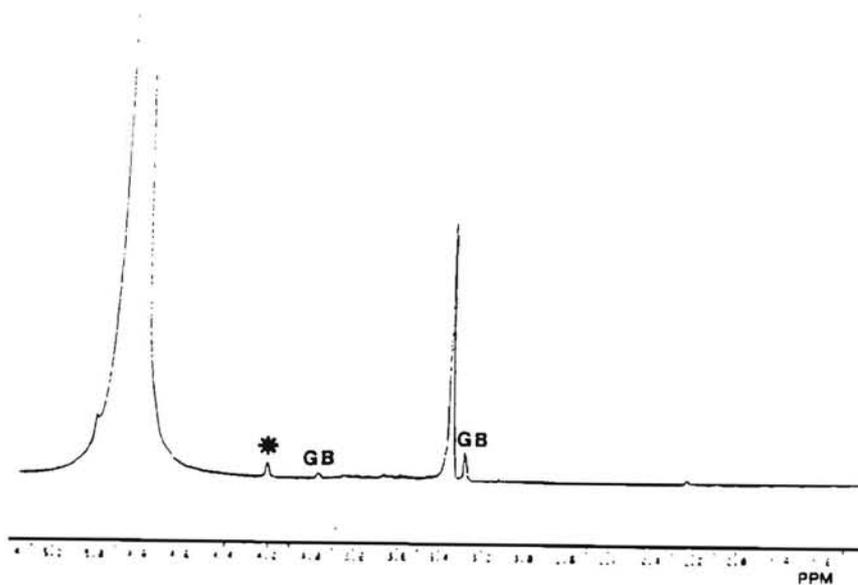


Figure 23 : spectre RMN-¹H d'un extrait de *S. manhattan* après 6 jours en eau d'estuaire (28.6.1993) additionnée de glycine-bétaine à 20 °C.

Cette variété des mécanismes mis en place traduit une capacité d'adaptation et donc de survie de *Salmonella* en milieu marin littoral, d'autant plus inquiétante qu'il s'agit d'une bactérie potentiellement pathogène pour l'homme, via la consommation de coquillages.

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 sont importantes à connaître.

Une autre information retirée de cette étude concerne la température : les processus d'**osmorégulation interviennent préférentiellement à 20 °C, plutôt qu'à 10 °C**, ce qui reste néanmoins compatible avec des situations naturelles.

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, nous avons pu mettre en évidence des mécanismes non encore décrits comme 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. Ces observations nécessitent des études complémentaires.

Enfin, la conclusion que l'on peut tirer de cette étude, et qui vient tout naturellement à l'esprit, réside dans la nécessité de réduire les apports bactériens anthropiques au milieu marin, puisque la capacité d'adaptation de bactéries d'intérêt sanitaire est grande. Une épuration renforcée des rejets terrestres serait donc souhaitable et à étudier.

II - ETUDE DU MECANISME DE PHOTOTOXICITE SUR *ESCHERICHIA COLI* DANS L'EAU DE MER

GOURMELON M.¹, M. POMMEPUY¹, D. TOUATI²

¹ IFREMER - DEL Laboratoire Microbiologie, B.P. 70, 29280 PLOUZANÉ

² Institut Jacques Monod, Laboratoire de Génétique Moléculaire 2 Place Jussieu 75251 PARIS CEDEX 05

RAPPEL DE LA PROBLEMATIQUE

Le rejet des bactéries entériques en mer pose des problèmes sanitaires et économiques importants : contamination des coquillages, pollution des eaux de baignades nécessitant l'implantation de stations de traitement des eaux.

De nombreuses études ont été menées afin d'évaluer le devenir des entérobactéries en mer. Elles ont permis de dégager les différents paramètres permettant de limiter la survie des bactéries entériques : la température, la salinité, l'ensoleillement, le manque de nutriments, la prédation..., etc. La lumière solaire est connue comme étant l'un des facteurs les plus actifs pour limiter la survie des bactéries entériques en mer. Les rayonnements ultra-violetts étant arrêtés très rapidement dans l'eau de mer, la lumière visible serait responsable de la perte de cultivabilité des coliformes.

L'effet toxique de la lumière visible semble être du à un phénomène de photo-oxydation. Deux types de réactions de photo-oxydations existent :

- le type I est caractérisé par un transfert d'électron vers ou provenant d'un photosensibilisateur excité conduisant à la formation de radicaux libres,

- le type II est caractérisé par un transfert d'énergie à partir du photosensibilisateur excité. Le type II comprend la réaction entre le photosensibilisateur excité et l'oxygène produisant l'oxygène singulet 1O_2 .

Des auteurs ont suggéré un possible processus de photo-oxydation soit par les photosensibilisateurs exogènes comme les substances humiques dans l'eau de mer ou soit par les photosensibilisateurs endogènes, localisés dans la bactérie : les porphyrines, les flavines et les cytochromes.

L'exposition à la lumière visible pourrait aboutir à la production d'oxygène singulet (1O_2), d'anion superoxyde (O_2^-), de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et de radical hydroxyle ($^{\circ}OH$).

Le but de cette étude est de déterminer le mécanisme d'action de la lumière visible sur *E. coli* en absence de photosensibilisateurs exogènes (phénomène encore peu étudié). Dans un premier temps, l'éventuelle formation des espèces oxygénées réactives (ROS) lors de l'exposition d'*E. coli* dans l'eau de mer a été étudiée par l'utilisation de piègeurs de ces différents composés. Dans un deuxième temps, l'intervention des ROS a été appréhendée par :

- l'étude de deux systèmes de défense bactériens contre le stress oxydatif : la superoxyde dismutase, piégeant l'anion superoxyde et la catalase détruisant le peroxyde d'hydrogène,

- l'étude de l'état physiologique (gene *kat F*) et de l'apport de nutriments sur la survie d'*E. coli*.

RESULTATS

L'étude d'*Escherichia coli*, en eau de mer, exposé à la lumière visible montre que cette bactérie évolue rapidement (en quelques heures) vers un état viable non cultivable. Dans ce cas, *E. coli* ne peut plus être retrouvé par culture bien qu'il présente encore une activité métabolique mise en évidence par la technique du Direct Viable Count (DVC) (assimilation d'extrait de levure et d'acide nalidixique). Nous avons observé aussi, dans ces conditions, une perte de l'assimilation de la 3H méthyl-thymidine de la synthèse d'ADN et des protéines. Par contre, nous n'avons pas pu mettre en évidence de modifications du profil des acides gras membranaires ni du taux de protéines totales par exposition à la lumière visible.

Le mécanisme de phototoxicité impliquerait l'oxygène. Les espèces oxygénées réactives sembleraient intervenir également dans ce processus. Cependant, l'étude indirecte par utilisation de piègeurs de ces substances ne semble pas être la meilleure approche (faible protection). La différence d'efficacité des piègeurs du radical OH° entre les expériences de Martin et Burch, en 1988 et les nôtres pourraient s'expliquer par le fait que la pénétration de ces composés dans la bactérie nécessiterait de l'énergie et donc un apport de matière organique.

Pour appréhender le rôle des ROS dans la phototoxicité, d'autres techniques peuvent être utilisées : le dosage des enzymes de défense contre le stress oxydatif : superoxyde dismutase et catalase avec ou sans illumination, ou l'étude de la survie de bactéries déficientes en ces enzymes exposées à la lumière visible.

L'activité SOD ou catalase /mg de protéines dans les bactéries n'est pas modifiée entre l'exposition à la lumière visible et l'incubation à l'obscurité. La lumière visible ne provoque donc pas une attaque de ces enzymes. L'exposition à la lumière ne conduit pas non plus à la synthèse de ces enzymes bactériennes pour lutter contre la phototoxicité. Ceci peut s'expliquer par le fait que la bactérie est en suspension dans de l'eau de mer, milieu oligotrophe et hyperosmotique et ne peut donc pas induire la synthèse de protéines de défense contre le stress oxydatif.

Lorsque *E. coli* est totalement déficient dans les deux types de superoxyde dismutase, il est plus sensible à l'effet de la lumière visible surtout après 24 heures d'exposition (fig. 1). Dans un premier temps, la bactérie pourrait utiliser d'autres systèmes de défense disponibles dans la cellule, puis l'absence de SOD la rendrait plus sensible à l'illumination. La suppression d'un seul type de catalase ne modifie pas de façon significative la survie à la lumière visible ; la bactérie pouvant sans doute compenser la perte d'une catalase par l'autre. Il aurait été intéressant de tester un mutant totalement déficient en catalase.

L'anion superoxyde semble donc être produit lors de l'exposition à la lumière visible. La perte de cultivabilité des bactéries sans superoxyde dismutase étant importante surtout après 24 heures, il semblerait donc que les dommages cellulaires dus à la production de l'anion superoxyde ou à d'autres espèces dérivées apparaissent progressivement et conduisent à une perte de cultivabilité. L'absence de différence de survie des bactéries simple mutant en superoxyde dismutase ou en catalase suggère une production faible d'espèces oxygénées réactives mais qui peut être continue dans nos expériences. Cette absence de différence dans

l'évolution de la cultivabilité peut aussi s'expliquer par la non-synthèse de nouvelles protéines en raison du milieu oligotrophe.

L'état de la bactérie avant exposition à la lumière joue un rôle important dans sa survie future : en effet, quand il est en début de phase stationnaire avant son séjour en eau de mer, *E. coli* survit mieux au stress lumineux que lorsqu'il est en phase exponentielle de croissance. La suppression du gène *kat F* dont le produit régule la synthèse de nombreuses protéines de la phase stationnaire rend très sensible la bactérie à l'illumination (fig. 2). La perte rapide de cultivabilité de la bactérie déficiente en gène *kat F* à la lumière visible n'est pas due à l'absence de synthèse de l'exonucléase III ni de la catalase HPII. En effet, la suppression du gène codant pour l'exonucléase III ou pour la catalase HPII ne rend pas la bactérie plus sensible à l'effet de la lumière visible. Cette sensibilité de la bactérie déficiente en *kat F* peut être levée par un apport de glucose à faible concentration. L'apport de glucose même en faible quantité permet de protéger *E. coli* de type sauvage ou *E. coli* déficient en *kat F* face à l'effet toxique de la lumière visible (fig. 3). La survie d'*E. coli* face au stress lumineux est meilleure quand l'apport de glucose a lieu dès l'immersion des bactéries dans l'eau de mer plutôt que 24 ou 48 heures plus tard (cellules déjà altérées par l'exposition à la lumière visible).

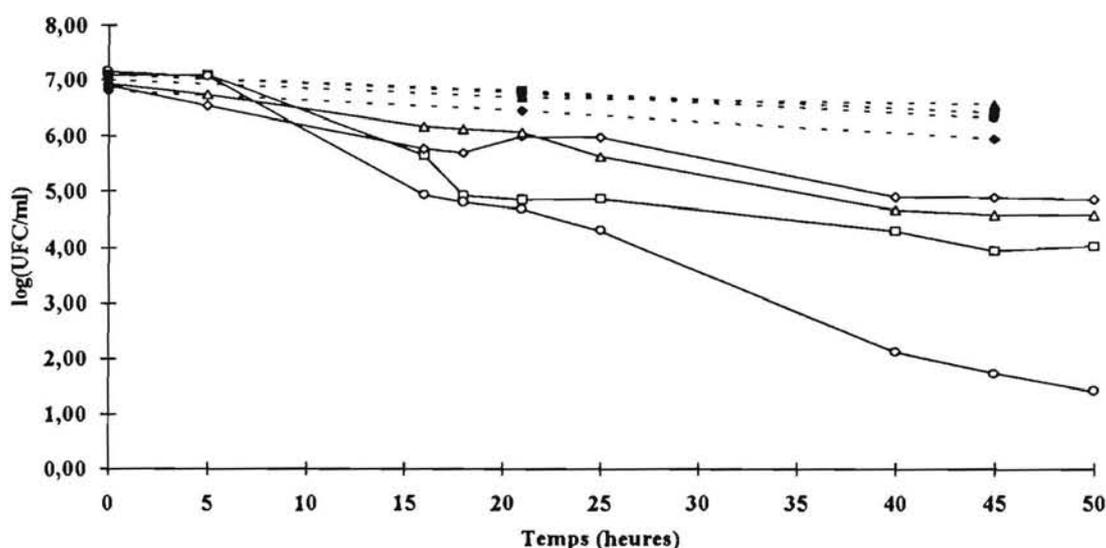


Figure 1 : Effet de la lumière visible sur *E. coli* déficient en superoxyde dismutase dans l'eau de mer. Lumière (traits pleins et sigles vides), Obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Souche témoin QC771 (□, ■), QC772 (- *sodA*) (△, ▲), QC773 (- *sodB*) (○, ●), QC774 (-*sodA sodB*) (○, ●).

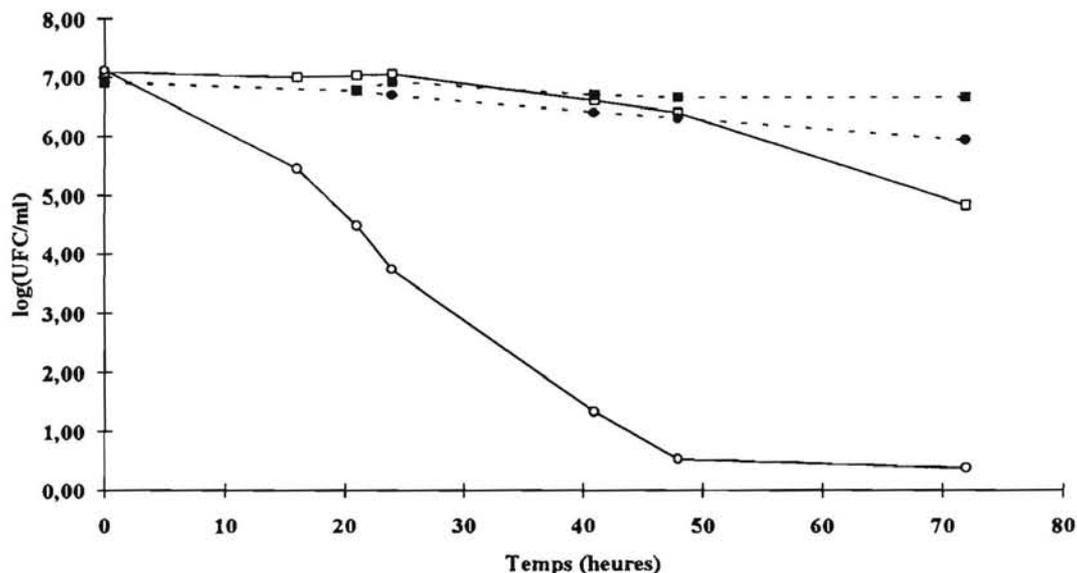


Figure 2 : Effet de la lumière visible sur *E. coli* dans l'eau de mer (en début de phase stationnaire). Lumière (traits pleins et sigles vides), Obscurité (traits pointillés et sigles pleins). MP180 (*kat F*+) (□, ■), UM 122 (*kat F*-) (○, ●).

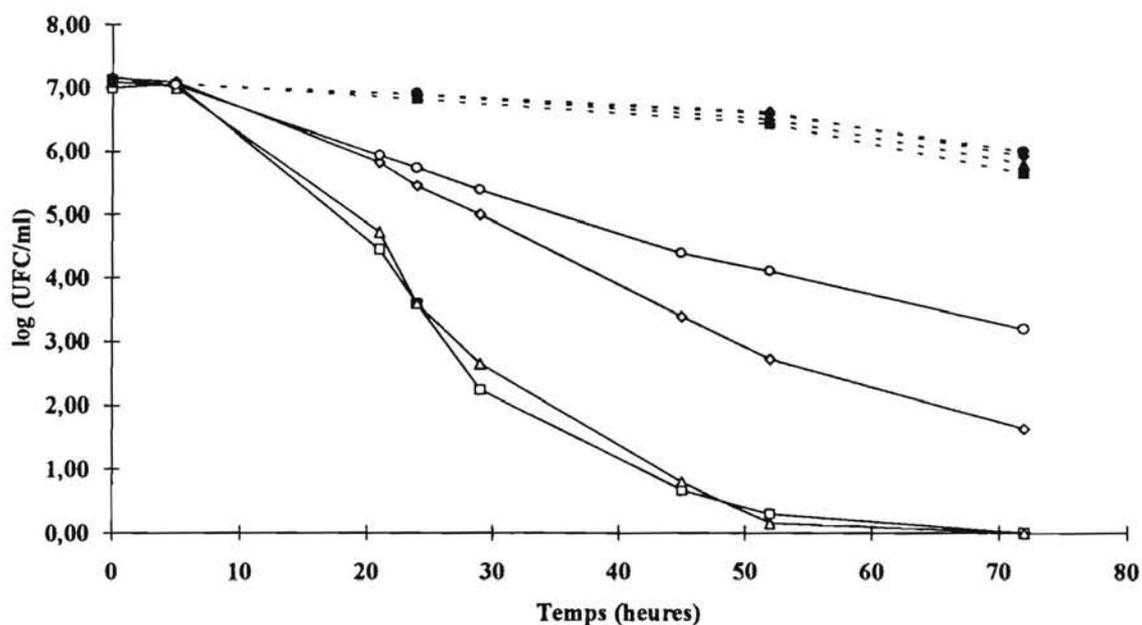


Figure 3 : Effet de la lumière visible sur *E. coli* UM 122 (*- kat F*) dans l'eau de mer avec ou sans nutriments. Lumière (traits pleins et sigles vides), Obscurité (trait pointillés et sigles pleins). Sans apports (□, ■); M63 à 1% (Δ, ▲); glucose 18 mg/l (, ◆); M63 à 1% + glucose 18 mg/l (○, ●).

III - DEVENIR DES VIRUS DANS LES MILIEUX NATURELS (ANALYSE PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE)

F. LE GUYADER¹, E. DUBOIS¹, D. MENARD¹, S. BILLAUDEL², V. MARCHAIS²

¹ IFREMER - DEL Laboratoire Microbiologie, Rue de l'île d'Yeu, B.P. 1049, 44037 NANTES CEDEX 01

² Laboratoire de Virologie-Bactériologie, Faculté de Pharmacie, Université de Nantes, 1 rue Gaston Veil, B.P. 1024 44035 NANTES CEDEX

La détection des virus dans les échantillons cliniques ou de l'environnement s'est effectué pendant longtemps par isolement sur culture cellulaire. Cette technique présente divers inconvénients tels qu'une sensibilité limitée, un délai de résultat pouvant atteindre plusieurs semaines, un coût onéreux... D'autre part certains virus ne peuvent être obtenus sur culture de cellules. La toxicité de certains prélèvements du milieu extérieur envers les cellules en culture rend encore plus difficile la mise en évidence des particules virales. Cependant la culture cellulaire permet d'affirmer le caractère infectieux des virus et est considérée comme la technique de référence.

Le développement de la biologie moléculaire permet d'envisager l'application de techniques rapides spécifiques et très sensibles telles que l'hybridation moléculaire ou l'amplification génique (PCR) pour l'analyse de la contamination du milieu extérieur. Ces méthodologies mettent en évidence la présence de l'acide nucléique viral mais ne permettent pas de différencier les particules infectieuses des non infectieuses.

Les travaux entrepris dans le cadre du PNOC constituent une première approche pour comprendre le devenir d'un virus en milieu marin littoral mais surtout pour interpréter les résultats obtenus par biologie moléculaire à partir des prélèvements naturels et environnementaux. Ils permettent aussi de tenter d'évaluer les techniques PCR sur le plan de l'analyse virologique du milieu hydrique et des risques viraux dans le cadre de la santé publique. Dans un premier temps, l'influence de la salinité et de la lumière sur le devenir de l'ARN d'un enterovirus en eau de mer stérile a été évaluée par PCR. La seconde partie des travaux réalisés avait pour objectifs la mise au point de la PCR pour la recherche des rotavirus et l'étude de la stabilité des protéines capsidales de ce virus en milieu marin.

Concernant la première partie, l'étude réalisée sur les entérovirus (en collaboration avec le laboratoire du Pr Schwartzbrod) avait pour but d'évaluer la persistance de l'ARN du poliovirus de type 1 en eau de mer artificielle stérile à différentes salinités (14 g.l⁻¹, 24 g.l⁻¹ et 33 g.l⁻¹) et à différentes températures (4 °C ou 25 °C). La mise en évidence de l'ARN a été réalisée par rétro-transcription RT-PCR après extraction au phénol-chloroforme et purification par précipitation éthanolique. Les résultats obtenus ont montré une stabilité très importante de l'ARN viral quelque soit les conditions de température ou de salinité. En effet si l'on prend l'exemple de salinité 24 g.l⁻¹ et 33 g.l⁻¹, l'ARN viral est encore détecté après 148 et 154 jours. L'interprétation de ces résultats doit cependant tenir compte des limites de la réponse obtenue par RT-PCR qui est uniquement qualitative et donc ne donne aucune indication sur une diminution éventuelle de la quantité d'ARN viral. De part la sensibilité extrême de cette technique les quantités détectées en fin d'expérimentation sont peut être très faibles. Enfin cette étude s'est déroulée en eau de mer synthétique stérile sans prédateur susceptible de détruire les capsides ou les génomes viraux.

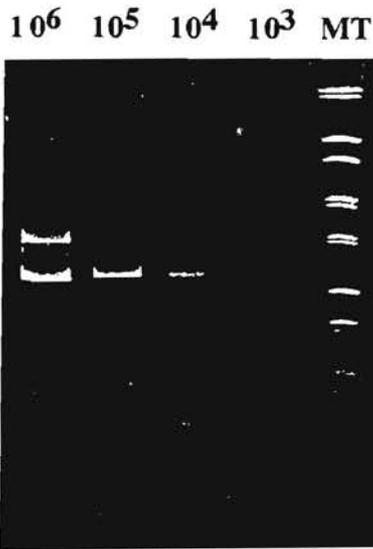


Figure 1: Etude de sensibilité. Des dilutions de rotavirus simien (de 10^6 à 10^3 ff/ml) ont été réalisées dans de l'eau. Les acides nucléiques extraits ont été analysés par RT seminested PCR. Les produits d'amplification ont été séparés en gel d'acrylamide et colorés au bromure d'éthidium. La flèche indique la séquence recherchée d'une taille de 342 paires de bases. Colonne MT: marqueur de taille. Une séquence amplifiée est visible jusqu'à la dilution 10^4 ff/ml.

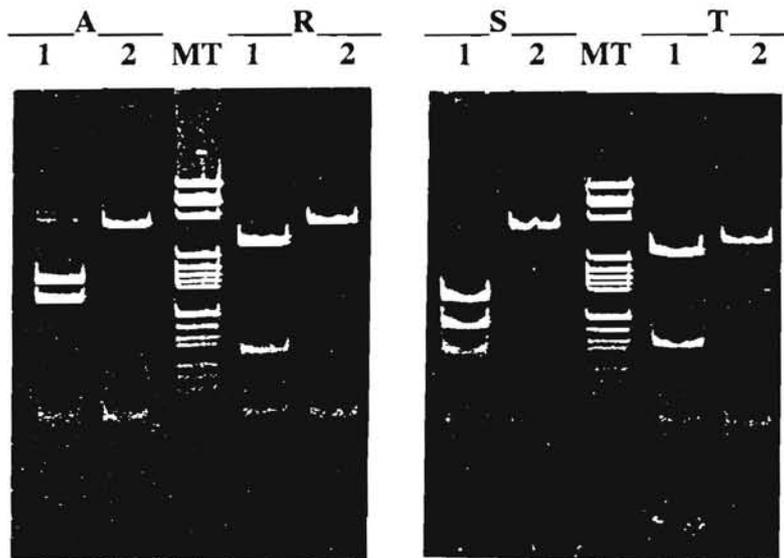


Figure 2: Analyse du polymorphisme de restriction sur des séquences amplifiées. Les séquences amplifiées à partir d'eaux de la Martinique (colonnes 1 et 2) ont été digérées par quatre enzymes de restriction: AluI (A), RsaI (R), Sau3AI (S) et TaqI (T). Les produits d'amplification ont été séparés en gel d'acrylamide et colorés au bromure d'éthidium. Colonne MT: marqueur de taille. Les différences dans les niveaux de migration des segments permettent de distinguer et de caractériser les séquences initialement amplifiées.

La seconde partie des travaux a concerné les rotavirus, autre genre viral susceptible de persister dans le milieu extérieur. Jusqu'à présent, la mise en évidence des rotavirus par biologie moléculaire a rarement été effectuée dans l'environnement et il existe très peu de données sur leur dissémination dans les milieux naturels.

Une technique de RT seminested PCR a été mise au point en fonction des travaux réalisés auparavant pour le diagnostic médical. Les amorces sélectionnées dans la littérature permettent d'amplifier une partie du gène d'une protéine de la capsid (VP7). La structure particulière du génome (ARN bicaténaire) de ces virus a nécessité l'optimisation de l'étape de dénaturation préalable à la RT afin d'augmenter la sensibilité. Pour cela l'effet de deux agents dénaturants (le diméthylsulfoxyde et l'hydroxy-méthylmercure) a été comparé. Les résultats ont montré une sensibilité accrue d'un facteur 10 lors de l'utilisation de l'hydroxy-méthylmercure. Cependant la réalisation d'un second cycle d'amplification à l'aide d'une amorce interne a été nécessaire pour obtenir une sensibilité compatible avec les concentrations virales trouvées dans l'environnement (fig. 1).

Cette technique a ensuite été appliquée avec succès à des prélèvements d'eaux de surface, d'eaux usées ou de coquillages. Ainsi par exemple 40 % des prélèvements d'eau de rivières ou d'eaux usées réalisés en Martinique contenaient de l'ARN de rotavirus. L'analyse de coquillages prélevés dans le golfe du Morbihan a montré la contamination de 20 % des échantillons. Par contre en Loire Atlantique le suivi d'un gisement coquiller n'a pas donné de résultats positifs malgré la détection de l'ARN dans la station d'épuration la plus proche.

Les divers produits d'amplification obtenus ont été analysés par l'étude du polymorphisme de restriction afin d'établir la diversité des souches présentes (fig. 2). La comparaison avec des séquences obtenues à partir d'isolats cliniques n'a pas permis à l'heure actuelle d'établir de lien précis entre les contaminations.

Pour apporter des éléments de compréhension au devenir de ces virus dans l'eau de mer, nous nous sommes intéressés aux modifications des protéines de capsid, à la stabilité du génome et enfin à la conservation du pouvoir infectieux d'une souche en eau de mer stérile. L'analyse des protéines capsidales a été réalisée par western blot après électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS PAGE), la conservation du pouvoir infectieux par inoculation des particules virales sur culture cellulaire (MA 104) et la stabilité du génome par RT seminested PCR. Les résultats préliminaires montrent une stabilité pendant au moins 6 jours des 3 variables étudiées. Ces résultats sont en accord avec ceux observés pour le poliovirus, cette première étude ayant été réalisée également en milieu stérile. Par contre l'ARN nu dilué dans une eau de mer contenant moins de 8 coliformes fécaux pour 100 ml n'est plus amplifié après 48 h.

L'acquisition d'outils pour la détection des virus entériques en mer est primordiale non seulement pour l'évaluation de la contamination mais aussi pour le développement de la recherche fondamentale des virus en milieu extérieur. Par exemple dans le cas des rotavirus, à notre connaissance aucune étude dans des coquillages n'a été publiée à ce jour. Cependant la mise en évidence de l'acide nucléique doit être interprétée avec précautions et il est important d'évaluer l'évolution de la pathogénéicité du virion en milieu extérieur.

PERSONNES ENGAGEES DANS LE PROGRAMME

Bactériologie

DERRIEN Annick
Technicienne (DUT Génie de l'environnement) 7,5 mois/an

DUPRAY Elisabeth
Chercheur (Doctorat de l'Université de Paris-Sud) 6 mois/an

PICHON Roger
Chargé de recherche CNRS 0,5 mois/an

GOURMELON Michèle
Boursier IFREMER 8 mois/an

POMMEPUY Monique
Responsable Laboratoire 1 mois/an

Virologie

DUBOIS Eric
Boursier IFREMER/Région Pays de Loire 8 mois/an

MENARD Dominique
Technicien (DUT) 1,5 mois/an

LE GUYADER Françoise
Chercheur (Doctorat Univ. Paris Sud) 2,5 mois/an

PUBLICATIONS REALISEES DANS LE CADRE DU PNOG

Dupray E., Derrien A. and Pichon R.
Osmoregulation by trehalose synthesis in *Salmonella manhattan* after exposure to waste waters. Soumis à *Letters in Applied Microbiology*.

Dupray E. *et al.*
Manuscript en cours de préparation pour publication dans *Journal of Applied Bacteriology*.

Gourmelon M., Cillard J., M. Pommepuy, 1994.
Visible light damage to E. coli in seawater : oxidative stress hypothesis. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 105-112.

Gourmelon M., Pommepuy M., Ferrand F., Cormier M.
Role of bacterial defense enzymes and nutrients to protect E. coli from visible light effect in sea water. Soumis à *Water Sciences and Technology*.

- Le Guyader F., Dubois E., Menard D. and Pommepuy M., 1994.
Detection of hepatitis A virus, Rotavirus and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-nested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (10).
- Le Guyader F., Dincher M.L., Menard D., Schwartzbrod L. and Pommepuy M.
Comparative study of the behavior in sterile seawater using RT-PCR and cell culture. *Mar. Poll. Bull.* accepté pour publication.
- Pommepuy M., Derrien A., Le Guyader F., Menard D., Caprais M.P., Dubois E., Dupray E. and Gourmelon M.
Microbial water quality on a Caribbean island (Martinique). *American Geographical Union's Coastal and Estuarine Studies*. Accepté pour publication.
- Communications orales ou affichées*
- Dubois E., Le Guyader F. and Pommepuy M.
Detection par amplification génique de contaminations de l'environnement par les rotavirus et corrélation avec des souches d'origine humaine. Communication orale.
- Dupray E., Derrien A. et Pichon R.
Composés osmoprotecteurs accumulés par *Salmonella spp.* dans différents environnements estuariens. Communication orale au colloque SFM "Le point sur la microbiologie de l'environnement", Paris, 7-8 décembre 1994.
- Gourmelon M., Pommepuy M., Ferrand F., Cormier M.
Role of bacterial defense enzymes and nutrients to protect *E. coli* from visible light effect in sea water. IAWPC'94 Budapest, juillet 1994.
- Gourmelon M., Pommepuy M., Touati D., Cormier M.
Etude de l'exposition à la lumière visible de *Escherichia coli* immergé dans l'eau de mer. Colloque SFM "Le point sur la microbiologie de l'environnement", Paris : 7-8 décembre 1994 (communication orale).
- Gourmelon M., Cillard J., Pommepuy M., Caprais M.P., Cahet G., Cormier M.
Toxicity of visible light on *Escherichia coli* involvement of reactive oxygen species. 6th International Symposium on Microbial Ecology. Barcelone, septembre 1994.
- Le Guyader F., Dubois E., Menard D. and Kopecka H., 1994.
Detection of human enteric viruses by PCR in shellfish. American Society for Microbiology, Washington D.C. Abstr. 94th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.
- Le Guyader F., Dubois E., Kopecka H., Menard D., Camus P. and M. Pommepuy.
Détection des virus entériques humains dans l'environnement par RT-nested PCR et hybridation. Colloque SFM, "Le point sur la microbiologie de l'environnement", Paris, 7-8 déc. 1994.

MONTANT ET UTILISATION DU FINANCEMENT RECU DANS LE CADRE DU PNOG

		Bacteriologie	Virologie
1992	Fonctionnement	45 000 F	20 000 F
	Contrat sous-traitance *	15 000 F	-
	Total : 80 kF		
1993/1994	Fonctionnement	47 000 F	50 000 F
	Missions	3 000 F	-
	Equipement	20 000 F	-
	Total : 120 kF		

* PICHON R. (analyses RMN)

PERSPECTIVES POUR 1995

Le laboratoire, dans le cadre du PNOG, développera les actions suivantes :

1) Recherche de Salmonelles par PCR dans le milieu marin : Dupray E., Caprais M.P. IFREMER Brest, collaboration CNEVA-LCHA (P. Fach)

Liée aux rejets d'origine terrestre, la présence de salmonelles dans l'environnement marin représente un risque sanitaire. En effet, le milieu marin littoral peut constituer, dans certains cas, un écosystème favorable à la survie de bactéries allochtones potentiellement pathogènes pour l'homme, via la consommation de coquillages contaminés. Des études récentes ont montré l'effet protecteur que peut avoir la matière organique présente dans les eaux ou sédiments, notamment en estuaire. Les bactéries trouvent alors des substrats nutritifs et des composés osmoprotecteurs leur permettant de maintenir un métabolisme vital et de résister à de fortes salinités.

Mais le métabolisme bactérien peut être fortement réduit, lorsque les conditions sont moins favorables : les bactéries sont alors en état de "dormance" et ne sont plus mises en évidence par les techniques classiques de culture. Elles sont dites "viables non cultivables" mais leur activité physiologique peut être observée, lors d'études *in vitro* de survie en milieu salé. Cependant, reste posée la question de la conservation du pouvoir pathogène bactérien ou tout au moins, de son expression lorsque les conditions redeviennent favorables : par exemple dans un tube digestif humain...

Ce constat de la perte de la cultivabilité de bactéries d'importance sanitaire fait rechercher des techniques directes, sans phase de culture.

Nous envisageons donc de développer des techniques de biologie moléculaire et notamment de PCR (Polymerase Chain Reaction) ou amplification génique pour la recherche de Salmonelles dans le milieu marin.

La chronologie des actions sera la suivante :

- test de la spécificité des amorces vis-à-vis de souches bactériennes isolées du milieu marin,
- mise au point d'un protocole d'extraction d'ADN à partir d'échantillons naturels (coquillages, eau...)
- application de la PCR et détermination d'éventuels inhibiteurs dans des échantillons naturels.

Une recherche classique par culture sera menée en parallèle sur les mêmes échantillons pour comparaison, afin d'évaluer la contamination par *Salmonella* de différentes zones littorales par deux techniques.

2) Photooxydation : M. Gourmelon, M. Pommepuy, IFREMER Brest, Collaboration D. Touati (CNRS)

L'exposition à la lumière visible de bactéries entériques dans l'eau de mer a un effet drastique sur leur survie : perte de cultivabilité, évolution vers un état viable non cultivable.

La lumière visible agirait par l'intermédiaire de l'oxygène et des espèces oxygénées réactives données : oxygène singulet, anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle. Pour compléter cette étude, nous envisageons de tester l'effet de la lumière visible sur un *E. coli* totalement déficient en catalase (étude du rôle du peroxyde d'hydrogène). La lumière visible et les espèces oxygénées réactives de l'oxygène pourraient ensuite attaquer différents constituants de la cellule tels que les acides nucléiques, les systèmes de transports... Pour appréhender les conséquences de l'illumination de *E. coli* sur les acides nucléiques, nous allons suivre le devenir de 3 plasmides de tailles différentes après un séjour de durée variable de *E. coli* HB101 dans l'eau de mer.

De plus, deux facteurs principaux semblent déterminer la survie dans l'eau de mer : l'état physiologique des bactéries au moment du rejet et la qualité du milieu récepteur :

1) Quand *E. coli* est en phase stationnaire avant son séjour dans l'eau de mer, il supporte beaucoup mieux le stress lumineux que lorsqu'il est en phase exponentielle.

La suppression du facteur sigma Kat F dans les bactéries en phase stationnaire les rend très sensibles à l'illumination. Nous allons poursuivre l'étude des protéines dont la synthèse est dépendante de ce facteur afin d'expliquer cette sensibilité des bactéries déficientes en Kat F : protéines protégeant l'ADN en phase stationnaire codées par le gène *dps*, ou protéines permettant la synthèse du tréhalose (osmoprotecteur) codées par les gènes *Ots A* et *Ots B*...

2) Nous avons vu que l'eau de mer par son côté oligotrophique joue un rôle non négligeable dans la sensibilité de la bactérie à la phototoxicité. Aussi, nous envisageons

d'étudier le rôle de la salinité. Ceci, en plaçant *E. coli* à la lumière visible dans une eau de mer diluée afin de passer d'une salinité de 34 ‰ à 20 et 10 ‰. Une préincubation des bactéries dans l'eau de mer pendant 24 et 48 heures avant exposition à la lumière visible devrait permettre de montrer l'importance du milieu récepteur dans la survie.

Ces expériences complémentaires aideront à mieux connaître un des facteurs prédominant limitant la survie des entérobactéries rejetées en mer.

3) Devenir des virus dans les milieu naturels : F. Le Guyader, E. Dubois (Ifremer DEL, Nantes)

Grâce au travail réalisé, un outil performant et rapide pour la détection des rotavirus en milieu extérieur a été mis au point. Cependant certains problèmes méthodologiques persistent tels que la présence d'inhibiteurs, l'absence de quantification... nous nous proposons donc de poursuivre le travail débuté sur les rotavirus par le développement d'un contrôle interne d'amplification. Ce contrôle pourrait être constitué d'un fragment du génome du rotavirus, amplifiable par les amorces utilisées dans la réaction d'amplification mais pouvant être différencié soit par la taille de l'amplicon soit par une séquence variable reconnaissable par une sonde. L'utilisation d'un tel contrôle pourrait présenter plusieurs avantages :

- connaissance du rendement de l'extraction à partir du prélèvement : des essais seront réalisés par inoculation du contrôle dans le coquillage avant ou après la concentration des particules et l'extraction des acides nucléiques,

- détection d'inhibiteurs ou de la perte du matériel à amplifier : l'absence d'amplification du contrôle permettra de détecter les résultats faussement négatifs,

- quantification de la contamination virale : l'introduction d'une quantité connue de contrôle devrait permettre d'évaluer la concentration virale initiale de l'échantillon.

D'autre part, nous nous proposons de poursuivre les travaux débutés sur la stabilité des protéines virales et du génome ainsi que sur le devenir du pouvoir infectieux. En effet, les essais préliminaires ont été réalisés en eau de mer stérile et il semble important d'évaluer l'effet d'une flore marine ou de contamination sur le devenir du virus.

**FACULTE DES SCIENCES MEDICALES
ET PHARMACEUTIQUES
UNIVERSITE NANCY I**

Professeur L. SCHWARTZBROD

**UNITE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE
CRSSA, GRENOBLE**

Dr R. DELOINCE

PROGRAMME PNOC

Objectifs de recherche

** Laboratoire de Virologie - Faculté de Pharmacie - Nancy*
** Unité de Biologie Moléculaire - CRSSA - Grenoble*

Les virus sont rejetés en quantité considérable dans le milieu aquatique et ce par le biais des eaux usées urbaines fortement chargées en microorganismes. Le traitement de ces eaux n'étant pas d'une efficacité parfaite en ce qui concerne les virus, une quantité non négligeable de ces derniers persiste dans les eaux épurées qui sont rejetées dans les eaux superficielles et en particulier dans les mers.

En zones conchylicoles côtières, la présence de virus dans l'eau de mer constitue un risque potentiel de contamination des coquillages. En effet, pour leur nutrition, ceux-ci filtrent de grandes quantités d'eau et retiennent les éléments particuliers parmi lesquels les microorganismes présents dans l'eau. Compte tenu du fait que ces mollusques sont la plupart du temps consommés à l'état cru, il existe un risque pour la santé des consommateurs.

Dans ces conditions, il est fondamental de pouvoir déterminer le devenir des virus dans l'eau de mer.

Dans un premier temps, le travail a eu pour objectif l'étude de l'influence de la température, la salinité, la lumière, sur le devenir du poliovirus de type 1 en eau de mer synthétique stérile et dépourvue de matières en suspension.

Dans un deuxième temps, compte-tenu du fait que la majorité des virus entériques est associée à des matières en suspension (MES), le travail a consisté, le poliovirus de type 1 étant pris comme exemple de virus entérique et la Na-montmorillonite comme exemple de M.E.S. à :

- étudier l'influence de M.E.S. sur le devenir du virus,
- 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 et 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.

Dans un troisième temps, il a été procédé à une étude concernant l'influence du rayonnement ultra-violet sur la survie du poliovirus et du virus de l'hépatite A en eau de mer synthétique stérile dépourvue de MES.

PROGRAMME PNOG

Résultats obtenus

** Laboratoire de Virologie - Faculté de Pharmacie - Nancy*

L'objectif de la première partie du travail était de déterminer l'influence de trois paramètres sur la survie dans l'eau de deux virus entériques-tests : le poliovirus et le virus de l'hépatite A (HAV). Deux paramètres naturels, la température et la salinité ont été étudiés pour les 2 virus. L'influence de la lumière a été envisagée pour le seul poliovirus.

Les résultats concernant l'influence de la température montrent que, dans les conditions expérimentales utilisées, 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. L'inactivation de 90% de la population virale initiale est donc 20 fois plus rapide à +25°C qu'à +4°C. 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.

Ces résultats rejoignent ceux obtenus par BIZIAGOS *et al* (1988) qui démontrent également un effet négatif de la température sur la persistance du poliovirus mais cette fois-ci en eau minérale. L'augmentation de température de +4°C à +23°C n'entraîne dans ce cas qu'une chute du T90 d'un facteur 6 environ, ce qui montre bien que la survie est dépendante du milieu dans laquelle elle est réalisée.

En ce qui concerne le VHA, il a été envisagé l'évolution en fonction de la température, de l'antigène lié au VHA mesuré par RIA. Cette mesure était la seule à pouvoir être appliquée d'une façon systématique pour la détection du VHA dans les échantillons de l'environnement. Les résultats obtenus ne peuvent en aucun cas être assimilés à une étude du virus infectieux. La mesure du titre infectieux en cultures cellulaires, méthode longue et délicate (plusieurs semaines de culture) reste nécessaire pour l'étude de la survie du virus infectieux. 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 de la quantité d'antigène n'a été décelée. De ce fait le T90 et même le T50 n'ont pu être déterminés. Pour les températures de 19°C et 25°C la quantité d'antigène diminue et le T90 varie respectivement de 146 à 133 jours. Il faut cependant noter que pour l'antigène du VHA il n'y a pas de différence significative entre les deux températures de 19° et 25°C, contrairement à ce qui est observé avec le poliovirus.

La salinité apparaît par contre 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. Ces résultats se rapprochent ainsi de ceux trouvés par KATZENELSON (1978) pour qui la salinité n'a aucune influence sur la survie des virus.

En ce qui concerne l'influence de la lumière sur l'inactivation du poliovirus, celle-ci semble, dans notre expérimentation, inexistante. En effet, les T90 et les T99 varient seulement d'un facteur 1,2 lorsque l'expérience est réalisée à l'obscurité ou sous l'action de la lumière. Ceci est en contradiction avec l'idée généralement admise et rapportée notamment par KAPUCINSKI et MITCHELL (1983), selon laquelle la lumière constituerait un facteur défavorable aux virus.

En fait, cette faible influence de la lumière peut en partie être expliquée par le fait que, lors de nos 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 ultra-violet.

La deuxième partie du travail consistait à déterminer l'influence de la Na-montmorillonite sur la survie du poliovirus 1 en eau de mer de salinité 33 g/l à 25°C.

Les concentrations en Na-montmorillonite étudiées sont de 3, 15 et 500 mg/l, et sont comparées à un témoin sans argile. Il faut rappeler que les concentrations de 3 et 15 mg/l ont été choisies, parce qu'elles sont représentatives de la densité de matières en suspension d'une eau de mer naturelle.

Quel que soit le milieu, une chute rapide du titre viral a été observée. Ainsi, les T90 du témoin, 3, 15 et 500 mg/litre de Na-montmorillonite sont respectivement de 27,8 ; 26,1 ; 31,0 et 35,5 jours. Il apparaît qu'il existe une différence significative de la durée de survie du virus en présence de 500 mg/litre de Na-montmorillonite. Par contre, en présence de 3 et 15 mg/l, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.

L'analyse des résultats montre que dans les conditions expérimentales, la présence de faibles concentrations (3 et 15 mg/l) de Na-montmorillonite n'a pas d'influence sur l'inactivation virale. Par contre, en présence de concentrations beaucoup plus importantes (500 mg/l), le T90 est augmenté d'environ 8 jours.

Ces résultats sont en accord avec ceux donnés dans la littérature. En effet, de nombreux auteurs ont montré qu'en présence de concentrations importantes de matières en suspension, la durée de survie était augmentée. Ainsi, LANDRY et al.(1983), travaillant à des concentrations de 1,2 g/litre de sédiments naturels, observent une augmentation de 11 jours du T90 du poliovirus 1 en eau de mer naturelle à 14°C en présence de sédiments par rapport au T90 en eau de mer seule.

Par contre pour les faibles concentrations, nous n'observons aucune augmentation de la durée de survie du poliovirus 1 dans l'eau de mer artificielle, contrairement à GERBA et al. (1975) qui constatent qu'au bout de 6 jours, pour une même quantité de virus initiale, la quantité de virus survivants est 10 fois supérieure en présence de 5mg/l de kaolinite par rapport à la quantité de virus dans l'eau de mer seule.

En ce qui concerne l'étude de l'adsorption des virus en présence de 3, 15 et 500 mg/litre de Na-montmorillonite.

Les expériences de cinétique d'adsorption montrent une adsorption virale rapide (< 30 min.) quelle que soit la concentration de Na-montmorillonite. 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, 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.

Ces résultats sont en accord avec ceux de ARMON et al.(1988) qui observent une adsorption de 93 à 99,7 % du bactériophage f2 sur de l'argile en moins de 30 minutes.

Au cours de ces expériences d'adsorption, nous nous sommes d'autre part intéressés au devenir du virus libre non associé à la Na-montmorillonite. Ainsi pour une concentration de 500 mg/litre de Na-montmorillonite, aucun virus libre n'a pu être détecté dans l'eau surnageante. Par contre si la préparation est agitée 1 heure, on retrouve après centrifugation des virus libres dans le surnageant. Ces virus libres semblent évoluer, en fonction du temps, de la même manière que les virus du témoin.

L'existence de ces virus libres après resuspension de l'argile peut être expliquée par l'hypothèse selon laquelle, il y aurait un phénomène de désorption naturelle au niveau de l'argile. Dans notre expérimentation, ce phénomène apparaît faible (1 %), mais METCALF et al. (1984) ont montré qu'en alternant agitation de 12 heures et repos de 12 heures, il était possible au bout de la 5ème agitation, d'observer des pourcentages de désorption du poliovirus 1 des sédiments naturels de 48 %. En fait, il semble exister pour une faible proportion, des phénomènes permanents non seulement de désorption, mais aussi d'adsorption. Ainsi, en présence de 15 mg/litre, nos expériences montrent que la survie du virus libre est apparemment d'une durée plus courte que celle observée dans le témoin. Ce qui n'est explicable qu'en faisant l'hypothèse d'une adsorption de virus libres au niveau de l'argile.

Enfin il a été procédé à l'étude de l'éluion du virus. Trois méthodes ont été envisagées : la désorption par du tampon borate-extrait de boeuf pH9, l'ultrasonication et la désorption par de l'eau désionisée.

Les résultats montrent que l'ultrasonication apparaît être la plus mauvaise méthode car, d'une part on observe un phénomène d'inactivation qui est de l'ordre de 17 % pour 150 W, et que d'autre part la désorption est faible, de l'ordre de 8 %, pour la même dose d'ultrasons. Dans nos 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 %.

Ceci tendrait à prouver que la désorption est favorisée pour des pH élevés (9) en présence de matières organiques, et dans une moindre proportion par une baisse de la salinité. Ceci est en accord avec GERBA et al. (1975) qui ont déterminé des pourcentages de désorption du poliovirus 1 de la kaolinite de 70 % en présence de 800 mg/l de matières organiques à pH 8,1.

Après congélation des culots de Na-montmorillonite, le pourcentage de désorption apparaît invariant pour la méthode utilisant l'eau désionisée (52,8 %), mais inférieure pour celle utilisant le tampon borate-extrait de boeuf pH 9 (50,3 %).

D'autres expériences fondées sur une double congélation ont montré que les pourcentages de désorption sont beaucoup plus faibles, puisqu'ils sont de 21,8 % en présence de tampon borate-extrait de boeuf pH9 et de 5 % en présence d'eau désionisée. Il apparaît donc que la congélation ne peut pas être considérée comme un bon adjuvant pour la désorption.

La troisième partie du travail est consacrée à l'étude de l'influence du rayonnement ultra-violet sur la survie du poliovirus et du virus de l'hépatite A.

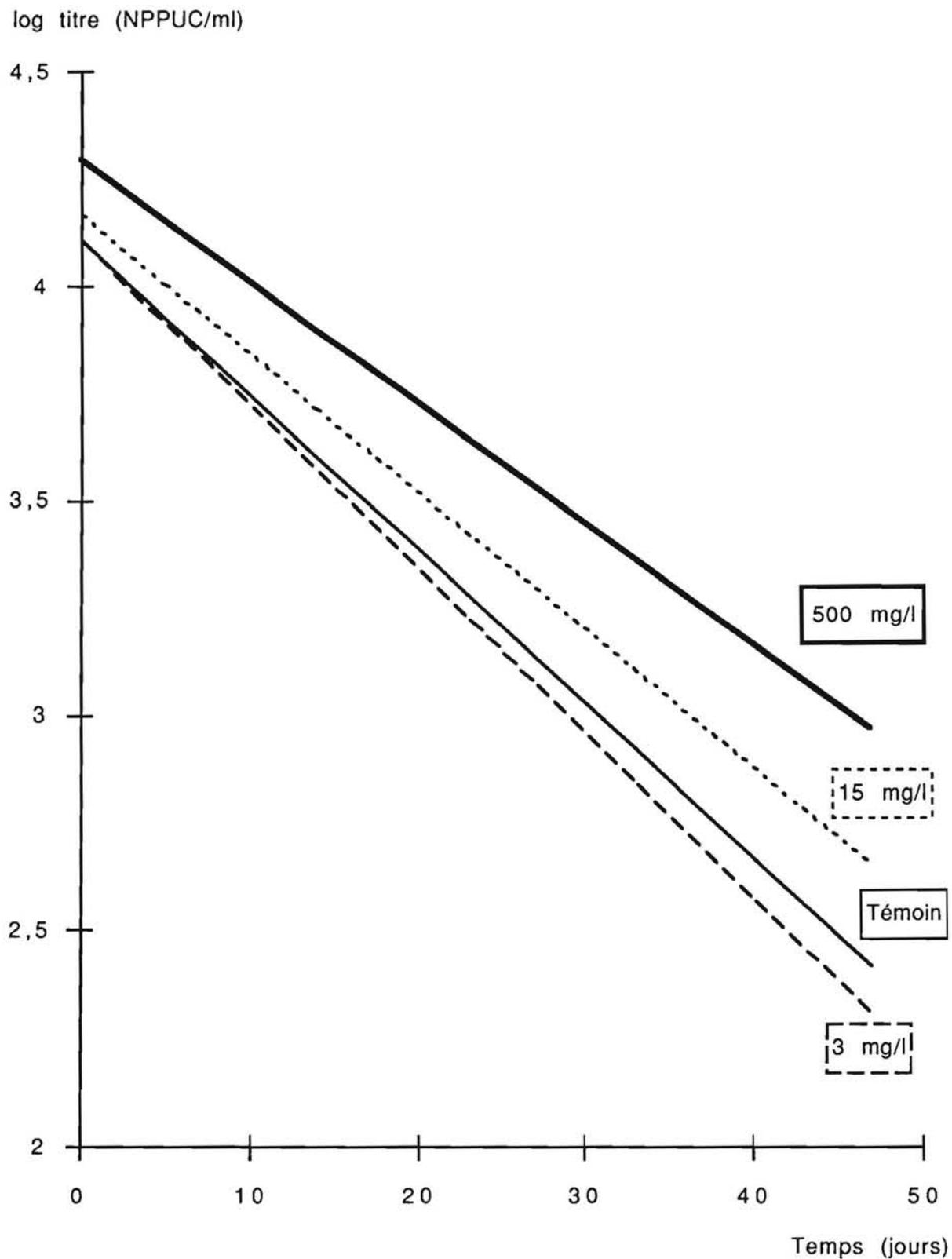
L'action du rayonnement ultra-violet testé en pilote expérimental est extrêmement importante. En effet, les T90 et les T99 qui, pour tous les autres paramètres, sont exprimés en jours, se comptent dans le cas présent en minutes.

La dose germicide requise pour obtenir une efficacité totale vis à vis du poliovirus est de 45 mW.s/cm² alors que CHANG et al. (1985) ont déterminé que la dose nécessaire pour produire une chute de 3 log du titre du poliovirus devait être de 30 mW.s/cm².

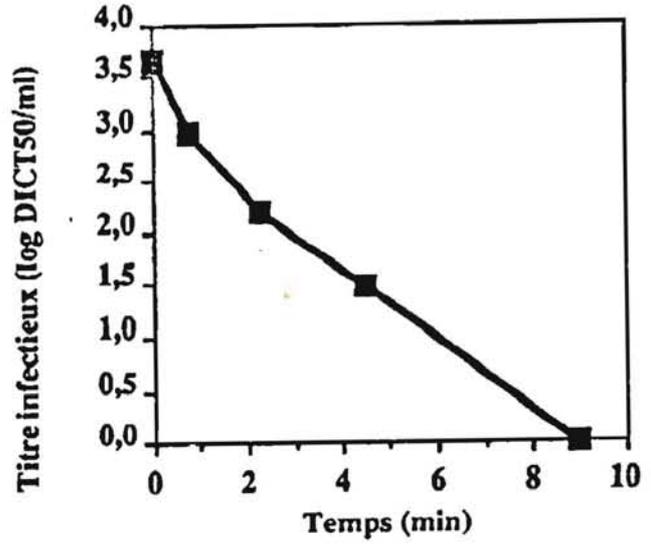
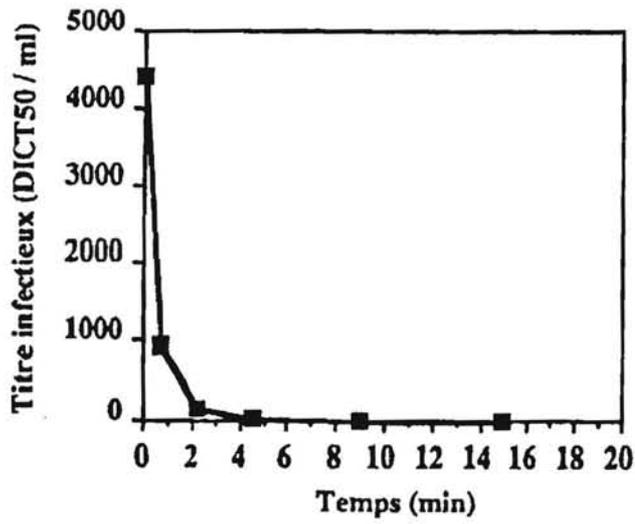
En ce qui concerne le virus de l'hépatite A (HAV) il a été montré que dans une eau de mer contenant 4425 DICT₅₀/ml de HAV, le titre n'est plus que de 30 DICT₅₀/ml après 4 min 30 d'irradiation et de 1 DICT₅₀/ml après 9 min d'irradiation. Il n'est plus détecté de virus infectieux après 15 min d'irradiation.

Pour le HAV, le T90 est de 2,6 min et le T 99 de 5,2 min. Les valeurs correspondantes pour le poliovirus sont de 1,5 min et 2,9 min respectivement soit environ 1,7 fois plus faibles.

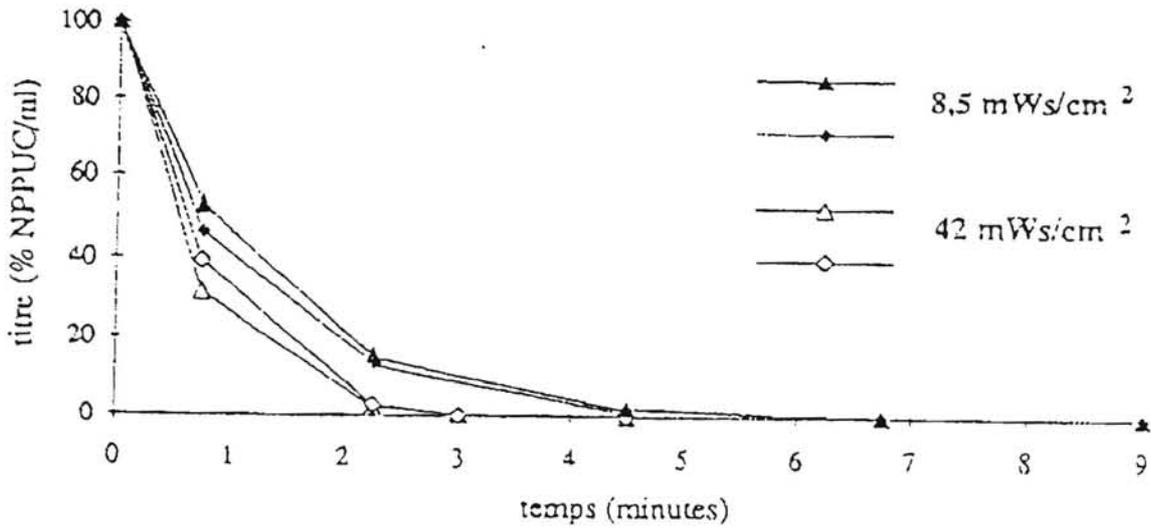
Le travail de détection de l'ARN viral a montré que la quantité d'ARN détectable par RT-PCR diminuait en fonction du temps d'irradiation. Ce résultat indique que des modifications sont apparues au niveau de l'ARN viral ne permettant plus son utilisation comme matrice par l'AMV reverse transcriptase et la TAq polymérase. 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 mais des modifications au niveau de la capsid ne sont pas à exclure.



Régression linéaire de la survie du poliovirus 1 adsorbé en présence de 3, 15 ou 500 mg/l de Na-montmorillonite en eau de mer de salinité 33 g/l à 25°C par rapport au témoin.



Evolution du titre infectieux du VHA en fonction du temps d'irradiation aux UV



Evolution comparée du titre du poliovirus sous l'influence des rayons ultra-violet dans une eau à 24 g/l et à 19°C

Projet de Programme de Recherche dans le Cadre du PNOC (1994-1995)

Compte-tenu des résultats obtenus précédemment (rapports Ifremer, décembre 1992 et février 1994) il est proposé pour 1994-1995 un programme axé d'une part sur des études comparatives de comportement dans l'eau de mer du virus de l'hépatite A (HAV) et du poliovirus de type 1 (Polio 1) et d'autre part, un travail plus spécifiquement axé sur le virus de l'hépatite A.

I - Comparaison simultanée de la survie du HAV et du Polio 1 en eau de mer artificielle stérile à 25°C. Des expérimentations effectuées préalablement d'une manière non simultanée ayant donné des résultats très surprenants, il paraît indispensable de réaliser une nouvelle expérimentation en utilisant la culture cellulaire et la PCR.

II - Comportement du HAV et du Polio 1 en présence de fortes doses de Montmorillonite. Nous avons montré au cours des études précédentes (rapport Ifremer, février 1994) que, pour une concentration de 500 mg l⁻¹ de montmorillonite dans l'eau de mer, la durée de survie du polio 1 était significativement augmentée alors (l'étude n'a pas été réalisée pour le HAV voir point II) que la présence de 15 mg l⁻¹ de montmorillonite n'avait aucune influence sur le devenir du poliovirus à 25°C en fonction du temps.

Dans ces conditions il nous paraît fondamental d'essayer de déterminer d'une part si la présence de fortes doses d'argile (situation rencontrée dans les sédiments) apporte une protection très accrue de ces 2 virus et donc une survie très nettement augmentée, d'autre part si, les 2 virus réagissent de la même façon.

III - Cinétique d'adsorption.

Devenir du HAV en présence de 3, 15 et 500 mg l⁻¹ de Montmorillonite. Ce travail a déjà été réalisé précédemment pour le Polio 1, il paraît indispensable de le réaliser pour le HAV en liaison avec le point II.

PERSONNES ENGAGEES SUR LE PROGRAMME PNOC

** Laboratoire de Virologie - Faculté de Pharmacie - Nancy*

- Aucun personnel n'a été rémunéré sur financement PNOC.
- Les personnes qui ont travaillé sur le programme PNOC sont :

*** Laboratoire de Virologie - Nancy :**

- Marie-Laure DINCHER
 - . Maîtrise de Sciences
 - . DEA "Chimie et Microbiologie de l'Eau"
(a effectué son DEA sur le programme scientifique PNOC)
 - . Temps consacré au travail : 8 mois temps plein de recherche PNOC
 - . Est actuellement en poste au Centre de Recherche de la CGE (Anjou-Recherche)

- Christophe GANTZER
 - . Maîtrise de Sciences
 - . DEA "Chimie et Microbiologie de l'Eau"
(a effectué son DEA sur le programme Scientifique PNOC)
 - . Temps consacré au travail de recherche PNOC : 8 mois temps plein
 - . Est actuellement boursier Cifre (Lyonnaise des Eaux- CIRSE)

- Marie-Laure DINCHER et Christophe GANTZER ont été dirigés, encadrés et aidés par le personnel permanent du laboratoire. Il est extrêmement difficile de chiffrer en mois ce travail de direction et d'encadrement.

- Unité de biologie Moléculaire - CRSSA - La Tronche.

- * Aucun personnel n'a été rémunéré sur financement PNOC.
- * Les personnes qui ont travaillé sur le programme PNOC sont :

- Jean Marc GRANCE, Ingénieur ETCA, CRSSA B.P. 87 38702 La Tronche Cedex
- Françoise LEVEQUE, Ingénieur (Polytechnique - Corps de l'armement)
Actuellement en poste à : DRET/SDR Groupe 9 00460 Armées.

III. RAPPORTS

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, Décembre 1992.

GANTZER C. et SCHWARTZBROD L.

Adsorption des virus entériques en eau de mer : cas du poliovirus et de la Na-Montmorillonite.

CRANCE J.M., LEVEQUE F. et DELOINCE R.

Effet virucide du rayonnement ultraviolet sur le virus de l'hépatite A.

Rapport Ifremer, février 1994.

Publications réalisées dans le cadre du PNOC

Laboratoire de Virologie - Faculté de Pharmacie - Nancy

I. PUBLICATIONS

LE GUYADER F., DINCHER M.L., MENARD D., SCHWARTZBROD L. and POMMEPUY M.

Comparative study of the behavior of poliovirus in stérile seawater using RT-PCR and cell culture.

Marine Poll. Bull. Accepté pour publication 1994.

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.

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.

Soumis pour publication à "Water Science Technology".

II. COMMUNICATIONS

GANTZER C., QUIGNON F., THOMAS F. et SCHWARTZBROD L.

Survie du poliovirus 1 adsorbé sur la Na-Montmorillonite en eau de mer : Etude des phénomènes d'adsorption et de désorption.

Communication orale à la 3ème réunion européenne "Adhésion des microorganismes aux surfaces" Chatenay-Malabry - Juin 1994.

LEVEQUE F., CRANCE J.M., BERIL C. and SCHWARTZBROD L.

Virucidal effect of UV light on HAV in sea water : Evaluation with cell culture and RT-PCR.

Communication affichée à symposium "Health Related Water Microbiology" IAWQ. Budapest, Juillet 1994.

FINANCEMENT - PNOC

** Laboratoire de Virologie - Nancy*

1991

Contrat universitaire n° 91 2430437 DEL (09/12/91)

"Détermination de la qualité du milieu sur l'inactivation des virus en mer"

Montant global : 80 000 francs H.T.

60 000 francs de fonctionnement

20 000 francs d'équipement

1993

Convention CNRS (Délégation régionale Bretagne - Pays de Loire) (07/07/93)

"Influence des matières en suspension sur l'inactivation des virus entériques dans l'eau de mer"

Montant global : 120 000 francs H.T.

70 000 francs de fonctionnement

50 000 francs d'équipement

N.B. : Ces financements concernent le laboratoire de virologie de Nancy (L. Schwartzbrod) et l'Unité de Biologie Moléculaire du CRSSA de Grenoble (R. Deloince)

CONCLUSION

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

Au terme de deux ans et demi de travail sur le PNOC, 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. Les réunions ont permis à chacun d'exposer ses travaux, de confronter ses idées, ses références. Des expérimentations communes ont/et vont être 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, à des présentations lors de congrès nationaux et internationaux.

Cependant le groupe "Microbiologie" s'est heurté au principal problème du manque d'effectif disponible dans les laboratoires pour réaliser les études. La communauté scientifique - comme pour bien d'autres disciplines - est limitée à une poignée de chercheurs déjà engagés dans leur programme propre, sollicités par des demandes extérieures ou l'enseignement et très fortement incités par leur propre direction à participer, voire à prendre la direction de programmes internationaux dans le cadre des appels d'offre de la CEE. Dans ce contexte, et étant donné la limitation des financements et des Bourses PNOC (ou autres) accordées, malgré la motivation et les efforts de tous les chercheurs engagés dans le PNOC, ce programme n'a pu prendre l'ampleur qu'il méritait et a été souvent une préoccupation marginale de certains laboratoires.

Diverses solutions existent à cet état de chose, par exemple une consisterait à positionner le programme PNOC au niveau CEE ; la plus efficace serait de mettre un potentiel plus important de chercheurs sur le sujet, thésards et - pourquoi ne pas rêver - chercheurs titulaires dans les laboratoires.