

# Étude de la capacité de toxicogénèse de la souche d'*Escherichia coli* H10407 introduite en eau de mer synthétique

Anne JOLIVET-GOUGEON <sup>\*\*,</sup> Zohreh TAMANAI-SHACOORI <sup>a,</sup> Monique POMMEPUY <sup>b,</sup> Michel CORMIER <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de microbiologie, faculté de sciences pharmaceutiques et biologiques, université de Rennes-I, 2, avenue du Professeur Léon-Bernard, 35043 Rennes, France

<sup>b</sup> Ifremer, Centre de Brest, BP 70 29280 Plouzané, France

Reçu le 4 juin 1999; reçu en forme révisée le 30 septembre 1999; accepté le 4 octobre 1999

**Abstract – Study of enterotoxigenesis in *Escherichia coli* H10407 strain inoculated in artificial seawater.** Survival of *Escherichia coli* H10407 strain, introduced into artificial seawater during exponential and stationary growth phases, was studied for seven days. Pathogenicity of stressed bacteria in these conditions was estimated by detection of the thermolabile toxin LT (excreted in situ in artificial seawater) and the *elt*-coding gene (always detected). Emergence of viable but non-culturable bacteria appeared as an important stage in the pathogenic evolution of this strain; resuscitation experiments were attempted to confirm the expression of the *elt*-gene of virulence. This resuscitation was only possible during the first two or three days after stress when the bacteria are still virulent. More than three days after the stress, the bacteria were not able to recover their ability to grow again in rich medium, and consequently their virulence could not be proven. © 2000 Ifremer/CNRS/IRD/Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

**enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) / PCR / digoxigenin / elt gene / viable non-culturable bacteria**

**Résumé –** La survie de la souche d'*Escherichia coli* H10407, introduite en eau de mer synthétique au cours de la phase exponentielle et de la phase stationnaire de croissance, a été étudiée pendant une semaine. L'évolution de la pathogénicité des bactéries stressées dans ces conditions a été mesurée par la mise en évidence de la toxine thermolabile LT (sécrétée in situ dans l'eau de mer) et du gène *elt* codant (toujours détecté). L'apparition de bactéries viables non cultivables est apparue être une étape importante dans l'évolution de la pathogénicité de cette souche; des expériences de reviviscence ont été tentées pour confirmer l'expression du gène *elt* de virulence. Cette reviviscence est possible durant les deux ou trois premiers jours du stress où les bactéries conservent leur caractère de virulence, ce qui n'a pu être prouvé ultérieurement car les bactéries n'ont pu récupérer leur capacité à croître en milieu enrichi. © 2000 Ifremer/CNRS/IRD/Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

***Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC) / PCR / digoxigénine / gène *elt* / bactéries viables non cultivables**

## 1. INTRODUCTION

En milieu marin les bactéries entériques doivent s'adapter aux facteurs ambiants, tant physiques (dis-

persion, hyper-osmolarité et hypo-osmolarité) que biologiques (oligotrophie), afin de survivre dans un milieu hostile. Le passage à l'état viable non cultivable (VNC) constitue une alternative d'adaptation, et les bactéries sont alors incapables de croître sur les milieux usuels de culture, tout en continuant à respirer et, dans certaines conditions, peuvent

\* Correspondance et tirés à part

recupérer leur capacité à croître en milieux de culture [18]. Ce mécanisme d'adaptation permettrait aux bactéries de garder un pouvoir pathogène potentiel capable d'être activé dans des conditions particulières encore très mal définies [25]. Ceci remet en cause la recherche d'agents pathogènes par simple culture sur milieux gélosés qui sous-estime le nombre des coliformes fécaux contenus dans l'échantillon, en ne mettant pas en évidence les bactéries VNC. En effet, leur nombre paraît directement corrélé au risque sanitaire que présentent les eaux de baignades ou les produits d'origine aquatique. Les souches d'*Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC) constituent un modèle intéressant pour l'évolution de la capacité de virulence de bactéries soumises à un double stress oligotrophique et salin. La survie des agents pathogènes en eau de mer a été largement étudiée afin de mieux comprendre la persistance de certaines espèces et leur résurgence sous forme d'épidémies localisées [1, 2, 5, 14, 19, 23, 32]. La détection du gène *elt* codant pour la toxine LT (toxine thermolabile) des ETEC, par la technique de PCR, est intéressante car tout en augmentant la sensibilité, elle conserve la spécificité des tests immunologiques classiques de détection de la toxine.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. Souche bactérienne de référence

La souche de référence d'*Escherichia coli* entérotoxigène H10407 (*E. coli* H10407) (sérotypage O78:K80:H11) isolée de selles diarrhéiques à Dacca, Bangladesh [7] a été utilisée au cours de ce travail. Elle renferme quatre plasmides dont le plasmide pJY11 (63 Kb) codant la production des toxines LT et STIa.

### 2.2. Culture et dénombrement des bactéries

Un inoculum correspondant à environ  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> de la souche d'*E. coli* H10407 est ensemencé dans 10 mL de milieu de Mundell [16] et préincubé à 37 °C sous agitation, considérant ce milieu comme riche en nutriments et contenant une faible concentration en chlorure de sodium (2,5 g·L<sup>-1</sup> de NaCl

soit 0,042 M). Cette pré-culture est diluée au 1/100 dans 100 mL du même milieu, ce qui correspond au temps zéro de l'expérience réalisée en milieu de Mundell. Aux temps choisis (5 h pour la phase exponentielle et 24 h pour la phase stationnaire), un échantillon est centrifugé pendant 10 min à la vitesse de 5 000 g et le culot obtenu est lavé deux fois par un volume équivalent d'eau de mer synthétique (ASW) (*Instant Ocean*, Aquarium System) autoclavée et préalablement stérilisée par filtration sur une membrane de porosité 0,22 µm. Le culot bactérien est alors inoculé dans 1 000 mL d'ASW stérile, homogénéisé par agitation douce pendant quelques minutes et incubé à l'obscurité à  $16 \pm 3$  °C. Pour étudier l'influence du stress infligé à ces bactéries, plusieurs prélèvements sont effectués immédiatement après l'inoculation, ainsi qu'après 12 h, 24 h, 48 h et 72 h. Un comptage des bactéries cultivables est effectué par étalement sur un milieu LB gélosé (LB *broth*, Sigma L3022) additionné de 1,5 % d'agar, (AES laboratoires réf. 175006) et incubé 18 h à 37 °C. Un dénombrement des bactéries totales par la méthode d'Acridine Orange Direct Count (AODC) [9] ainsi qu'un essai de dénombrement des bactéries viables non cultivables par la technique de *Direct Viable Count* (DVC) [13] ont été effectués en parallèle.

### 2.3. Influence du chlorure de sodium sur la survie de la souche d'*E. coli* H10407

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) du chlorure de sodium vis-à-vis de la souche d'*E. coli* H10407 ont été étudiées selon la méthode de dilution en milieu liquide [6]. La CMI et la CMB du NaCl ont été évaluées en bouillon de Mundell et en milieu minimum M63 glucosé [15].

### 2.4. Mise en évidence de la toxine LT

Des tubes de verre à vis de 30 mL sont ensemencés à raison d'une colonie pour 10 mL de milieu nutritif de Mundell, afin de favoriser l'excrétion de la toxine LT dans le milieu. Les tubes sont donc mis à incuber 48 h au bain-marie à 37 °C sous agitation. Après une centrifugation à 6 000 g à 4 °C pendant 20 min et/ou filtration sur membrane 0,22 µm, les surnageants ou

filtrats de milieux de Mundell ou d'échantillons d'eau de mer prélevés à différents temps sont immédiatement testés ou conservés à  $-70^{\circ}\text{C}$ . La technique de GM1 Elisa [26] est utilisée, conjointement à la méthode d'agglutination passive inverse de particules de latex (VET-RPLA) (TD-920, Oxoïd) pour rechercher la toxine LT dans les surnageants d'eau de mer ou filtrats.

### 2.5. Technique rapide d'extraction de plasmides et Southern blotting

Le plasmide hébergeant le gène *elt*, codant la toxine LT, est extrait par une technique d'extraction rapide basée sur le principe d'une lyse [10]. Après migration en gel d'agarose à 0,8 % et transfert par Southern blot [28] sur une membrane de Nylon<sup>®</sup> (Hybond N, Amersham). Les membranes sont préhybridées pendant 1 h à  $42^{\circ}\text{C}$ , puis hybridées, avec  $25\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de sonde LTB marquée à la digoxigénine par PCR, à  $42^{\circ}\text{C}$  pendant une nuit. Deux lavages sont ensuite effectués pendant 5 min chacun à température ambiante dans  $2 \times \text{SSC}-0,1\%$  SDS, suivis de deux autres lavages à  $55^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min chacun dans  $0,1 \times \text{SSC}-0,1\%$  SDS.

### 2.6. PCR (Polymerase Chain Reaction) et préparation de la sonde LTB

La réaction de PCR s'est effectuée en utilisant les amorces préconisées par Olive [20]:

LT<sub>R</sub>: 5' CCATACTGATTGCCGCAAT 3'  
LT<sub>L</sub>: 5' TCTCTATGTGCATACGGAGC 3'

L'utilisation des amorces permet d'amplifier une séquence de 322 pb du gène *eltB* selon les conditions définies par Tamanai-Shacoori et al. [29]. L'ADN ajouté est constitué par 10  $\mu\text{L}$  d'une suspension bactérienne à 0,5McF en ASW préalablement dénaturée à  $95^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min puis placée 5 min dans la glace. L'amplification s'effectue ensuite pendant 30 cycles, comprenant chacun 30 s de dénaturation à  $95^{\circ}\text{C}$ , 30 s d'hybridation à  $55^{\circ}\text{C}$  et 1 min d'extension à  $72^{\circ}\text{C}$ .

La synthèse par PCR de la sonde LTB marquée à la digoxigénine, ainsi que l'hybridation spécifique avec

le gène *elt* ont été réalisées selon la méthode utilisée par Jolivet-Gougeon et al. [12]. Une détection colorimétrique de la réaction a été effectuée à l'aide de la trousse « Dig DNA Labelling and Detection kit » (Boehringer Mannheim).

### 2.7. Protocole expérimental et expériences de « reviviscence »

Divers inoculums ( $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) ont été ensemencés en ASW ( $33\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de NaCl, soit 0,56 M), après avoir fait varier la durée de préculture en milieu de Mundell (5 h et 24 h). Une température de  $16 \pm 3^{\circ}\text{C}$  ainsi qu'une agitation permanente ont été maintenues dans tous les cas. L'évolution de divers paramètres a été suivie, au cours du temps pendant une semaine, chez ces bactéries en ASW : le nombre de bactéries cultivables sur milieu LB gélosé au bout de 24–72 h d'étuve à  $37^{\circ}\text{C}$  (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ), la présence ou l'absence du gène *elt* (mis en évidence par extraction plasmidique ou par PCR, puis évalué par hybridation avec la sonde LTB) et la production de toxine LT dans le surnageant du milieu (évaluée par GM1 Elisa et RPLA).

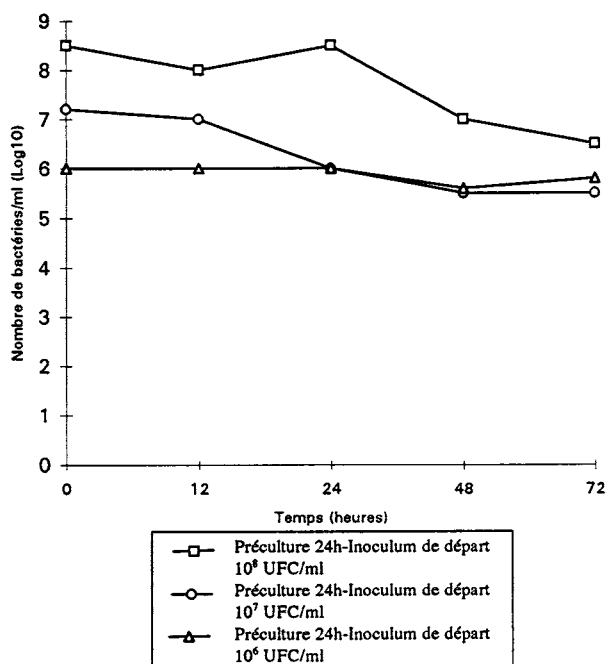
Pour les expériences de reviviscence, des aliquotes de 0,1 mL de la suspension d'*E. coli* H10407 en ASW ont été prélevées après 24 h, 48 h, 72 h et 7 j de contact, inoculées dans 10 mL de bouillon de Mundell d'une part, et étalées au râteau sur milieu gélosé LB d'autre part. Les deux milieux ont été mis à incuber à  $37^{\circ}\text{C}$  et les cultures observées toutes les 24 h pendant 3 j. L'opacification du milieu associée à la croissance de la souche sur gélose LB a permis de mettre en évidence les bactéries cultivables. La présence du gène *elt* a été recherchée par PCR directe sur les colonies et la production de toxine LT a été mesurée sur les surnageants de culture du bouillon de Mundell comme décrit précédemment.

## 3. RÉSULTATS

### 3.1. Dénombrement des bactéries

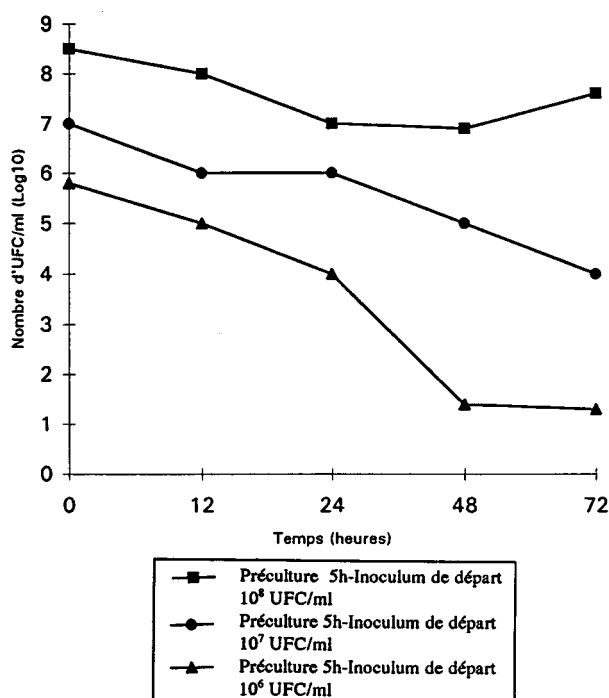
La souche d'*E. coli* H10407, précultivée 24 h en bouillon nutritif, puis introduite en ASW demeure cultivable durant les 3 j de l'étude (figure 1).

Lorsque les bactéries sont introduites en ASW au cours de leur phase exponentielle de croissance, le passage à l'état VNC s'effectue d'autant plus vite que l'inoculum introduit en ASW est faible ( $\leq 10^7$  UFC·mL<sup>-1</sup>) (figure 2), alors que le nombre total de bactéries effectué en parallèle en utilisant la technique AODC reste constant. Au cours des trois premiers jours de stress, on peut constater une chute du nombre initial de bactéries, cultivables sur milieux usuels, d'environ quatre unités de log<sub>10</sub>. Cependant, lorsque ces bactéries VNC sont réintroduites en milieu favorable, elles sont capables de recroissance, après une longue phase de latence pouvant excéder 8 h. Au-delà de cette période de 3 j, les bactéries semblent incapables de croître et se multiplier dans les conditions utilisées (résultats non présentés).



**Figure 1.** Influence de l'inoculum sur la survie de la souche d'*E. coli* H10407 pré-cultivée pendant 24 h en bouillon de Mundell, puis introduite en eau de mer synthétique.

**Figure 1.** Influence of inoculum on survival curves of *E. coli* H10407 strain, preincubated for 24 h in Mundell broth and then introduced into artificial seawater.



**Figure 2.** Influence de l'inoculum sur la survie de la souche d'*E. coli* H10407 pré-cultivée pendant 5 h en bouillon de Mundell, puis introduite en eau de mer synthétique.

**Figure 2.** Influence of inoculum on survival curves of *E. coli* H10407 strain, preincubated for 5 h in Mundell broth and then introduced into artificial seawater.

### 3.2. Influence de la salinité sur la survie de la souche d'*E. coli* H10407

Pour évaluer la tolérance de la souche d'*E. coli* H10407 au NaCl, une mesure de la CMI a été effectuée en milieu minimum M63 additionné de glucose (22 mM) : elle est de 35 g·L<sup>-1</sup> de NaCl ce qui implique la survie possible de cette souche en eau de mer sans multiplication significative de celle-ci. La CMB en revanche est beaucoup plus élevée (de l'ordre de 200 g·L<sup>-1</sup> de NaCl), ce qui traduit une adaptation possible de cette souche au milieu marin sans réel effet létal de celui-ci. Une étude identique, effectuée en milieu complexe a permis de montrer que la CMI au NaCl mesurée en milieu de Mundell avoisine 85 g·L<sup>-1</sup> de NaCl avec une CMB supérieure à 200 g·L<sup>-1</sup> de NaCl ce qui montre une adaptation plus aisée de la souche d'*E. coli* H10407 au chlorure de sodium en milieu riche en nutriments.

### 3.3. Mise en évidence de la toxine LT

En milieu de Mundell, la concentration de la toxine LT augmente progressivement au cours de la phase exponentielle. Elle est maximale dans les surnageants de culture après 24 h d'incubation (*tableau I*).

Si la souche d'*E. coli* H10407 est introduite en ASW durant la phase stationnaire de croissance, la production de toxine LT dans le surnageant d'eau de mer demeure positive durant les 7 j de l'étude. La recherche par GM1 Elisa est apparue préférable car une agglutination faussement positive a été observée entre le latex et l'eau de mer pure. Les différents résultats obtenus par GM1 Elisa sont présentés, sur la *figure 3*. La production de toxine LT n'a été nettement décelable que si les bactéries étaient introduites en ASW avec un inoculum  $\geq 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Avec des inoculums plus faibles, les bactéries demeurant cultivables, celles-ci sont cependant capables de restaurer immédiatement leur capacité de toxinogénèse dès qu'elles sont réintroduites en bouillon nutritif et incubées à 37 °C.

Lorsque les bactéries sont introduites en ASW au cours de leur phase exponentielle de croissance en

bouillon nutritif, la DO<sub>405nm</sub> mesurée sur les surnageants d'eau de mer reste toujours proche de celle du témoin négatif mesuré dans les mêmes conditions et ceci est d'autant plus net que l'inoculum de départ est faible et que la durée de préculture est courte, mais le manque de sensibilité et la mauvaise reproductibilité de la méthode de GM1 Elisa n'ont pas permis de mettre indiscutablement en évidence la production de toxine LT in situ.

La production de toxine LT semble corrélée à la cultivabilité de la souche. Les bactéries devenues VNC au cours des trois premiers jours de contact en ASW (capables de redevenir cultivables en conditions favorables) pourront alors produire de la toxine LT, mais seulement lorsque les bactéries auront atteint leur phase exponentielle de croissance, soit environ 8 h plus tard qu'une bactérie n'ayant pas subi ce stress.

### 3.4. Mise en évidence du gène *elt*

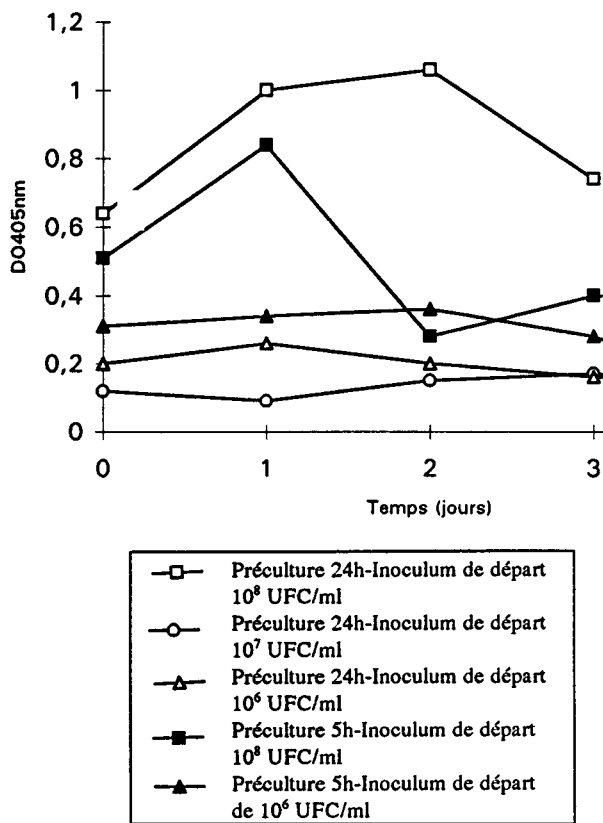
La mise en évidence du gène *elt* codant la toxine LT, effectuée par PCR directe sur l'eau de mer ou après extraction de l'ADN plasmidique et hybridation du

**Tableau I.** Numérations bactériennes de la souche d'*E. coli* entérotoxigène H10407 en milieu de Mundell pendant 3 j : nombre de bactéries cultivables sur milieu LB gélosé (UFC mL<sup>-1</sup>, après 18 h d'incubation à l'étuve à 37 °C) et densité optique mesurée à 600 nm (DO<sub>600nm</sub>). La production de toxine LT dans le surnageant de culture (GM1 Elisa, DO<sub>405nm</sub>), et la présence (+) ou l'absence (-) de mise en évidence du gène *elt* plasmidique codant ont été recherchés parallèlement.

**Table I.** Bacterial curves of enterotoxigenic *Escherichia coli* H10407 strain in Mundell broth for three days: enumerations of cultivable bacteria on agar LB medium (CFU mL<sup>-1</sup>, incubated for 24 h at 37 °C) and optical density measured at 600 nm (OD<sub>600nm</sub>). Production of LT toxin in culture supernatant (GM1 ELISA, OD<sub>405nm</sub>), and the presence (+) or absence (-) of plasmidic *elt*-coding gene detection were studied simultaneously.

Temps (heures)	DO <sub>600nm</sub>	Nombre d'UFC mL <sup>-1</sup>	DO <sub>405nm</sub> (GM1 Elisa)	Mise en évidence <sup>a</sup> de l'ADN plasmidique
0	0,000	2,4·10 <sup>5</sup>	0,53	ne
1	0,010	1,8·10 <sup>5</sup>	0,48	ne
2	0,016	3·10 <sup>5</sup>	0,48	+
3	0,017	6·10 <sup>5</sup>	0,53	ne
4	0,088	3·10 <sup>7</sup>	0,94	ne
5	0,580	5·10 <sup>7</sup>	1,18	+
6	1,127	4,8·10 <sup>8</sup>	1,15	ne
7	1,480	7·10 <sup>8</sup>	1,12	ne
8	1,525	2,5·10 <sup>8</sup>	1,28	ne
24	2,050	2,6·10 <sup>8</sup>	1,40	+
48	2,275	1,6·10 <sup>8</sup>	1,35	+
72	2,221	1,1·10 <sup>8</sup>	1,32	+

<sup>a</sup> ne : non effectué. + : L'ADN plasmidique est mis en évidence après extraction ou directement par PCR, puis hybridation avec la sonde LTB spécifique du gène *eltB*.



**Figure 3.** Mesure de la production de toxine LT par la souche d'*Escherichia coli* H10407 dans les surnageants d'eau de mer, par la mesure de la  $DO_{405nm}$  après GM1 Elisa, en fonction de l'inoculum et de la durée de préculture en milieu de Mundell. La  $DO_{405nm}$  pour le témoin négatif de la série = 0,15 (ASW) et pour le témoin positif = 1,2 (*E. coli* H10407 incubé en milieu de Mundell pendant 24 h à 37 °C).

**Figure 3.** Assessment of LT enterotoxin production by the *Escherichia coli* H10407 strain in the artificial seawater supernatants, by measurement of  $OD_{405nm}$ , after GM1 ELISA, according to inoculum and preincubation time in Mundell broth.  $OD_{405nm}$  for negative control = 0.15 (artificial seawater) and for positive control = 1.2 (*E. coli* H10407 incubated in Mundell broth for 24 h at 37 °C).

gène *elt* avec la sonde spécifique LTB, s'est révélée possible au cours des 7 j de l'étude. L'amplification génique a permis d'améliorer la sensibilité de la détection du gène *elt* chez des bactéries introduites au cours de leur phase exponentielle de croissance ou de bactéries VNC (avec un inoculum initial  $\leq 10^4$  UFC·mL<sup>-1</sup>) [30]. La croissance tardive de colonies (48 h) est observée à partir de bactéries VNC apparues précocement puis cultivées sur milieu nutri-

tif. Les PCR effectuées directement à partir de ces colonies donnent des résultats variables (peut-être dus à un nombre trop faible de copies plasmidiques dans chaque bactérie ou à une mauvaise récupération et dispersion de ces très petites colonies), mais qui redeviennent toujours positifs après repiquage de ces colonies sur un milieu gélosé, ce qui confirme l'observation précédente. Si les bactéries VNC sont conservées plus de 4 j en ASW, aucune colonie n'apparaît sur milieu gélosé et le gène n'a donc pas été recherché.

#### 4. DISCUSSION

Les coliformes fécaux ont souvent été utilisés comme témoins de contamination des eaux, et une grande attention a été appliquée à leur détection. En effet, malgré une diminution rapide du nombre de bactéries cultivables, il est maintenant établi qu'une large proportion des bactéries totales constitue la population des bactéries VNC, mises en évidence par les méthodes de fluorescence [5, 32]. Cependant, les délais d'obtention de bactéries VNC varient selon les espèces et les souches bactériennes [3, 32]. Gauthier et al. [8] soulignent l'importance de l'état physiologique des bactéries, en accord avec les constatations d'Oliver et al. [21] pour qui une différence significative a essentiellement été observée entre les cellules inoculées durant leur phase de croissance exponentielle et celles inoculées lors de leur phase stationnaire, en accord avec nos résultats concernant la souche d'*Escherichia coli* H10407. Dans le cas des ETEC, il est apparu intéressant d'étudier la pathogénicité de ces bactéries introduites en ASW, en particulier lors de leur passage à l'état VNC.

La synthèse des ARN spécifiques de la toxine LT est maximale en phase exponentielle de croissance [12] ce qui rejoint les résultats obtenus en milieu de Mundell concernant la synthèse de cette toxine. Tant que les bactéries demeurent cultivables en ASW, une fraction de la population est capable de synthétiser de faibles quantités de toxine. Cette production est d'ailleurs plus aisément mesurable si les bactéries sont introduites en ASW avec un fort inoculum, les bactéries mortes s'accumulant progressivement dans le milieu de culture pouvant servir de nutriments. Il faut aussi faire l'hypothèse de l'accumulation de faibles quantités de toxine LT au cours du temps, car la toxine

CT, antigéniquement et génétique proche, est connue pour rester stable pendant plus de six mois dans un milieu de forte salinité [31]. Lorsque les bactéries passent à l'état VNC, la détection de la toxine devient plus délicate, vraisemblablement pour des raisons de sensibilité de la technique utilisée. Pommepeuy et al. [24] ont réussi à mettre en évidence la production de toxine LT par des *E. coli* H10407, devenus VNC après exposition à la lumière, par les techniques de GM1 Elisa et anses ligaturées de lapin. Rahman et al. [25] ont montré la présence de toxine dans des sur-nageants d'eau de mer contenant des bactéries VNC, mais seulement après concentration des extraits, ce qui est en accord avec la possibilité d'une synthèse faible de toxine en milieu marin.

Si les bactéries demeurent cultivables, l'extraction de l'ADN plasmidique est toujours possible, ce n'est plus le cas lorsque les bactéries deviennent VNC. Des variations physiologiques, notamment au niveau de la membrane, pourraient rendre moins facile l'obtention de l'ADN plasmidique à partir des bactéries VNC. Byrd et Colwell [3] proposent une méthode de filtration pour récolter les bactéries VNC qui seraient mal récupérées lors de la centrifugation et qui, de plus, contiendraient un faible nombre de copies plasmidiques [4] et un plasmide qui serait assez instable [17]. La complexité de la méthodologie tend à limiter son utilisation, c'est pourquoi l'amplification directe du gène *elt* à partir d'un échantillon d'eau de mer est plus aisée et plus sensible pour détecter des bactéries cultivables et/ou VNC en eau de mer, malgré une légère inhibition de la réaction par le sel [30]. Palmer et al. [22], après avoir évoqué la possible élimination des plasmides de virulence non indispensables en cas de privation, montrent la réapparition de ces plasmides si les bactéries stressées sont réintroduites en milieux liquides enrichis, sans toutefois prouver que toute la population des bactéries VNC est concernée.

Il est apparu utile de tenter de restaurer la cultivabilité des bactéries VNC afin de constater la perte ou la conservation de leur pathogénicité au cours du stress. Certains auteurs attestent que la température serait prépondérante [11, 18, 21], d'autres utilisent des milieux riches en osmoprotecteurs de type glycine bêtaïne [27]. Cet état VNC est réversible durant les trois premiers jours du stress et les bactéries sont capables de resynthétiser de la toxine LT si elles sont réintroduites en milieu nutritif incubé à 37 °C sous

agitation. Leur courbe de croissance est alors modifiée, avec une augmentation de la durée de la phase de latence, ce qui pourrait correspondre à la stimulation ou l'inhibition de facteurs génétiques de régulation impliqués dans la résistance au stress. Une prolongation du stress, au-delà de 4 à 5 j, rend les bactéries de la souche d'*Escherichia coli* H10407 incapables de croissance sur les milieux gélosés usuels. Les mécanismes impliqués dans ce stress tardif semblent différents, ce qui correspond probablement à une autre forme d'adaptation des bactéries à la privation. La détection du gène *elt* de virulence par PCR ne présage pas de sa capacité d'expression. Cependant, la réactivation de ce gène est possible si le milieu redevient favorable. La virulence potentielle de ces bactéries VNC constitue donc une préoccupation essentielle pour la surveillance des flores bactériennes côtières.

### Remerciements

Ce travail correspond à une synthèse des essais effectués dans le cadre du Programme national d'océanographie côtière (Pnoc), microbiologie sanitaire, contrat CNRS n°94-2-436411 DEL.

### RÉFÉRENCES

- [1] Amy P.S., Pauling C., Morita R.Y., Starvation-survival processes of a marine *Vibrio*, *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (1983) 1041–1048.
- [2] Baleux B., Trousselier M., Got P., Monfort P., Alibou J., Mezriouni N., Devenir des bactéries « témoins de contamination » et des germes pathogènes d'origine continentale dans les eaux, les sédiments et les productions conchylicoles d'un étang saumâtre, *Oceanis* 14 (1988) 61–70.
- [3] Byrd J.J., Colwell R.R., Maintenance of plasmids pBR322 and pUC8 in non culturable *Escherichia coli* in the marine environment, *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 2104–2107.
- [4] Byrd J.J., Leahy J.G., Colwell R.R., Determination of plasmid DNA concentration maintained by nonculturable *Escherichia coli* in marine microcosms, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 2266–2270.
- [5] Colwell R.R., Brayton P.R., Grimes D.J., Roszak D.B., Huq S.A., Palmer L.M., Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms, *Bio/Technology* 3 (1985) 817–820.
- [6] Courvalin P., Goldstein F., Philippon A., Sirot J., L'antibiogramme, 1<sup>re</sup> éd. MPC-Videom (éd.), 1985, pp. 191–193.

- [7] Evans D.J. Jr., Evans D.G., Three characteristics associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man, *Infect. Immun.* 8 (1973) 322–328.
- [8] Gauthier M.J., Munro P.M., Breittmayer V.A., Influence of prior growth conditions on low nutrient response of *Escherichia coli* in seawater, *Can. J. Microbiol.* 35 (1989) 379–383.
- [9] Hobbie J.E., Daley R.J., Jasper S., Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy, *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (1977) 1225–1228.
- [10] Ish-Horowicz D., Burke J.F., Rapid and efficient cosmid vector cloning, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 2989–2993.
- [11] Jiang X., Chai T.J., Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, non culturable cells, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 1300–1305.
- [12] Jolivet-Gougeon A., Tamanai-Shacoori Z., Cormier M., Synthesis of a digoxigenin-labelled probe as a way of detecting gene expression by RNA hybridization in enterotoxigenic *Escherichia coli*, *J. Microbiol. Methods* 21 (1995) 67–74.
- [13] Kogure K., Simidu U., Taga N., A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria, *Can. J. Microbiol.* 25 (1979) 415–420.
- [14] Martin Y.P., Bonnefont J.L., Conditions de décroissance en milieu marin des bactéries fécales des eaux usées urbaines, *Oceanis* 12 (1986) 403–418.
- [15] Miller J.H., Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1972, p. 431.
- [16] Mundell D.H., Anselmo C.R., Wishnow R.M., Factors influencing heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin activity, *Infect. Immun.* 14 (1976) 383–388.
- [17] Neill R.J., Twiddy E.M., Holmes R.K., Synthesis of plasmid coded heat-labile enterotoxin in wild-type and hypertoxygenic strains of *Escherichia coli* and in other genera of *Enterobacteriaceae*, *Infect. Immun.* 41 (1983) 1056–1061.
- [18] Nilsson L., Oliver J.D., Kjelleberg S., Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state, *J. Bacteriol.* 173 (1991) 5054–5059.
- [19] Novitsky J.A., Morita R.Y., Possible strategy for the survival of marine bacteria under starvation conditions, *Mar. Biol.* 48 (1978) 289–295.
- [20] Olive D.M., Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase, *J. Clin. Microbiol.* 27 (1989) 261–265.
- [21] Oliver J.D., Nilsson L., Kjelleberg S., Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 2640–2644.
- [22] Palmer L.M., Baya A.M., Grimes D.J., Colwell R.R., Molecular genetic and phenotypic alteration of *Escherichia coli* in natural water microcosms containing toxic chemicals, *Fems Microbiol. Lett.* 21 (1984) 169–173.
- [23] Pommepuy M., Guillaud J.F., Martin Y., Dupray E., Derrien A., L'Yavanc J., Cormier M., Le devenir des bactéries en zone littorale, in : La mer et les rejets urbains, Bendor, 13–15 juin 1990, Ifremer, actes de colloques 11 (1991) 89–99.
- [24] Pommepuy M., Butin M., Derrien A., Gourmelon M., Colwell R.R., Cormier M., Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 4621–4626.
- [25] Rahman I., Shahamat M., Chowdhury M.A.R., Colwell R.R., Potential virulence of viable but not culturable *Shigella dysenteriae* type I, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 115–120.
- [26] Ristaino P.A., Levine M.M., Young C.R., Improved GM1 – enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, *J. Clin. Microbiol.* 18 (1983) 808–815.
- [27] Roth W.G., Leckie M.P., Dietzler D.N., Restoration of colony-forming activity in osmotically stressed *Escherichia coli* by betaine, *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1988) 3142–3146.
- [28] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [29] Tamanai-Shacoori Z., Jolivet-Gougeon A., Pommepuy M., Cormier M., Colwell R.R., Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in water by polymerase chain reaction amplification and hybridization, *J. Microbiol. Methods* 26 (1994) 21–26.
- [30] Tamanai-Shacoori Z., Jolivet-Gougeon A., Cormier M., Comparison of direct PCR and PCR amplification after DNA extraction for the detection of viable enterotoxigenic *Escherichia coli* in laboratory microcosms, *Can. J. Microbiol.* 42 (1996) 60–65.
- [31] Tamplin M.L., Colwell R.R., Effects of microcosm salinity and organic substrate concentration on production of *Vibrio cholerae* enterotoxin, *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (1986) 297–301.
- [32] Xu H.S., Roberts N., Singleton F.L., Attwell A.W., Grimes D.J., Colwell R.R., Survival and viability of non culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment, *Microb. Ecol.* 8 (1982) 313–323.