

Détection de *Vibrio cholerae* dans un écosystème marin par hybridation moléculaire après culture sur un milieu sélectif

Specific detection of Vibrio cholerae in marine ecosystem by a colony hybridization assay after culture on selective medium

Annick Robert-Pillot⁽¹⁾, Sandrine Baron⁽²⁾, J. Lesne⁽²⁾, J.-M. Fournier⁽¹⁾, Marie-Laure Quilici⁽¹⁾

⁽¹⁾ Unité du Choléra et des Vibrions, Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France
arp@pasteur.fr

⁽²⁾ Laboratoire d'Études et de Recherches en Environnement et Santé, École Nationale de la Santé Publique, Avenue du Pr. Léon Bernard, 35043 Rennes, France

Résumé – Une technique moléculaire d'hybridation sur colonies bactériennes a été développée pour rechercher les souches de *Vibrio cholerae* dans l'eau de l'estuaire de la Rance. Une séquence de 22 nucléotides sélectionnée à l'extrémité de la région 16S de l'espace intergénique 16S-23S de l'ADN de *V. cholerae* a été marquée à la digoxygénine (DIG). La spécificité et la sensibilité de la sonde ont été démontrées d'une part par hybridation avec des souches de *V. cholerae* provenant de la Collection de l'Institut Pasteur et de la collection du Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra, d'autre part par l'absence d'hybridation avec des souches appartenant à 31 autres espèces du genre *Vibrio* et à 5 autres genres bactériens. L'hybridation sur colonies permet une détection spécifique de *V. cholerae* dans des échantillons d'eau parmi une population microbienne hétérogène, après enrichissement puis isolement sur milieux sélectifs, la gélose TCBS classiquement utilisée pour la recherche des vibrions ou un milieu mANA, non inhibiteur mais favorisant la croissance de cette espèce. Elle permet aussi de détecter *V. cholerae* après étalement direct de l'échantillon d'eau sur le milieu GNAm, sans étape préalable d'enrichissement, ce qui améliore la sensibilité de la détection de *V. cholerae* d'un facteur 10. Cette méthode pourrait s'appliquer à la surveillance microbiologique de l'environnement marin et des produits qui en sont issus.

Mots clés – Sonde, milieu sélectif, hybridation sur colonies, échantillon environnemental, *V. cholerae*

Abstract – A rapid and efficient molecular method based on culture selective medium and colony hybridization assay was developed to identify *V. cholerae* in water samples of Rance estuary. A 22 nucleotide sequence of the 16S-23S rDNA region was labeled with digoxigenin and evaluated for specificity and sensitivity by dot blot and colony

hybridization with strains from the Collection de l'Institut Pasteur and environmental and clinical isolates of *V. cholerae* from the collection of the Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra. The probe hybridized with all strains of *V. cholerae*. No isolates of species other than *V. cholerae* or other genera hybridized with the probe. This molecular technique allows specific detection of *V. cholerae* strains in mixed microbial populations from water samples, after enrichment procedure and growth on selective culture media, TCBS agar or mGNA, less selective but favoring the growth of this species. Moreover, this method increases the recovery of *V. cholerae* (10-fold higher) and can be used for its detection in natural samples after direct plating on mGNA, without prior enrichment. By this way, the laborious classic approach to control bacteria contamination in environmental marine water and seafood could be simplified.

Key words – Probe, selective medium, colony hybridization assay, environmental sample, *V. cholerae*

1 INTRODUCTION

L'implication des vibrions en pathologie humaine est surtout due à l'existence du vibriion cholérique, agent du choléra, appartenant aux sérogroupes O1 et O139 de l'espèce *Vibrio cholerae*. Certaines souches appartenant aux autres sérogroupes, appelées *V. cholerae* non-O1/non-O139, également pathogènes pour l'homme, sont à l'origine de gastro-entérites, de lésions cutanées, d'otites et plus rarement de septicémies dont l'évolution peut être fatale chez les sujets immunodéprimés. Ces infections font suite à un contact avec une eau douce ou saumâtre, ou sont associées à une consommation de fruits de mer (Lesne et Fournier, 1998; Geneste *et al.*, 2000). En France, le nombre de cas demeure peu élevé, mais il est probable que le rôle de *V. cholerae* non-O1/non-O139 dans le déclenchement de gastro-entérites soit sous-estimé.

Les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 sont adaptées aux conditions halophiles du milieu marin. Elles sont donc constamment rencontrées dans l'eau de mer, les sédiments

et les coquillages des estuaires et du littoral français. Leur prévalence et leur concentration sont étroitement liées à la température de l'eau, le développement de cette espèce étant important en période estivale (Crocchi *et al.*, 2001).

Outre la variation saisonnière prévisible, plusieurs facteurs peuvent être aujourd'hui à l'origine du développement de cette espèce bactérienne et faire craindre, par voie de conséquence, une augmentation de l'exposition de la population à *V. cholerae* non-O1/non-O139. Le réchauffement planétaire, l'anthropisation du milieu littoral due au rejet des matières organiques, aux effluents des stations d'épuration (Baron *et al.*, 2002; Quilici *et al.*, 2002) et au réchauffement de l'eau par certaines activités industrielles participent à la contamination bactérienne et font craindre une augmentation des infections à *V. cholerae* non-O1/non-O139. De plus, la modification de l'équilibre naturel de la flore bactérienne marine telle qu'elle est observée actuellement pourrait être préjudiciable au développement de l'aquaculture. Les coquillages, de par leur fonction de nutrition et de

filtration d'importants volumes d'eau, concentrent les polluants bactériens et, de toute évidence, la flore bactérienne des bivalves est le reflet de la flore marine environnante (Lesne, 1992 ; Feldhusen, 2000). La consommation de ces produits, de plus en plus appréciés en raison de leur qualité diététique, peut présenter d'autant plus de risques sanitaires que les habitudes alimentaires incitent à consommer ces aliments à l'état cru ou peu cuit. Enfin, comme les souches de *V. cholerae* appartenant aux sérogroupes O1 et O139 partagent la même niche écologique que les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139, le développement ou l'installation de populations bactériennes toxigènes dans l'environnement marin français ne peut être totalement exclu (Ruiz *et al.*, 2000).

Les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 pourraient devenir des pathogènes importants en santé publique et, à ce jour, l'impact de l'exposition de la population à ces agents infectieux n'est pas connu avec précision. Aussi, une surveillance microbiologique de la mer et des produits qui en sont issus présente donc le double intérêt d'assurer un contrôle sanitaire au niveau de la consommation des produits de la mer et un contrôle écologique de l'évolution de la flore bactérienne marine.

Actuellement, aucune méthode de référence n'est disponible pour la détection et/ou le dénombrement de *V. cholerae* non-O1/non-O139. Dans la mesure où les indicateurs de pollution fécale traditionnellement utilisés pour le contrôle sanitaire des eaux ne renseignent pas sur l'importance quantitative de la contamination par les vibrions, il faut utiliser des

techniques adaptées à leur détection. Aussi, la recherche et le dénombrement de *V. cholerae* s'effectuent selon les méthodes bactériologiques conventionnelles qui consistent à revivifier les bactéries dans un milieu d'enrichissement, tout en favorisant la croissance sélective des *Vibrio* par rapport aux autres espèces bactériennes présentes dans l'échantillon. Après isolement du milieu d'enrichissement sur gélose sélective TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose), l'appartenance des colonies suspectes fermentant le saccharose à l'espèce *V. cholerae* est confirmée par l'étude complète des caractères cultureux et biochimiques. La concentration bactérienne est déterminée par la méthode du nombre le plus probable (Sakazaki, 1992 ; Elliot *et al.*, 1995), à partir des bouillons d'enrichissement dans lesquels la présence de l'espèce *V. cholerae* a été confirmée. Cette technique classique est longue à mettre en œuvre et le milieu TCBS présente de nombreux inconvénients de par la variation de sa composition d'un fabricant à l'autre, voire d'un lot à l'autre pour un même fabricant. En outre, le choix des colonies fermentant le saccharose a un caractère aléatoire. Ce milieu ne permet de repérer ni la totalité des souches de *V. cholerae* présentes dans l'échantillon étudié, ni les isolats de cette espèce ne fermentant pas le saccharose et donc considérés comme non suspects (Desmarchelier and Reichelt, 1984).

En alternative à cette démarche bactériologique longue et fastidieuse, il s'avère nécessaire aujourd'hui de disposer de méthodes moléculaires visant à améliorer tant la sensibilité de la détection que le délai de réponse.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Origine des souches étudiées

Les souches proviennent de la Collection de l'Institut Pasteur, du Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra ou du Laboratoire d'Études et de Recherches en Environnement et Santé de l'École Nationale de la Santé Publique à Rennes. Un total de 59 souches de *V. cholerae* a été étudié. Douze souches sont d'origine humaine et 47 souches ont été isolées d'échantillons d'eaux douces, saumâtres ou marine collectés dans l'estuaire de la Rance (Bretagne, France), de mai à octobre 2000. Par ailleurs, 68 souches appartenant à 31 autres espèces du genre *Vibrio*, comprenant la souche type de chaque espèce, ont été associées à l'étude. Huit souches appartenant aux genres *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Shewanella* et *Sphingomonas*, fréquemment rencontrés en milieu aquatique, ont également fait partie de l'étude.

2.2 Identification de *V. cholerae* par une technique d'hybridation moléculaire

Une méthode moléculaire d'hybridation *in situ* sur colonies bactériennes a été mise au point pour détecter les souches de *V. cholerae* présentes dans l'eau. Le protocole expérimental est présenté dans la figure 1.

2.3 Choix de la sonde

Chez les bactéries, il existe 3 gènes ribosomiques (5'-16S-23S-5S-3') séparés par des espaces intergéniques.

Le groupe de Rita Colwell aux États-Unis (Chun *et al.*, 1999) a étudié la région qui sépare les gènes ribosomiques 16S et 23S de *V. cholerae*. À l'intérieur de cette région, une séquence oligonucléotidique, prVC-F, complémentaire de l'espace intergénique situé du côté 3' de l'ADN ribosomique 16S, a été sélectionnée. Cette séquence de 22 nucléotides a été marquée à la digoxygénine à son extrémité 5' et utilisée comme sonde (Fig. 2).

3 RÉSULTATS

3.1 Vérification de la spécificité et de la sensibilité de la sonde prVC-F

Aucune des souches de *Vibrio* appartenant à une espèce autre que *V. cholerae*, et aucune des souches appartenant à un autre genre bactérien, n'a hybridé avec la sonde utilisée. En revanche, les 59 souches appartenant à l'espèce *V. cholerae*, quelle que soit leur origine, humaine ou environnementale, ont hybridé avec la sonde. Ces résultats montrent que la séquence recherchée par hybridation est, d'une part, très spécifique de l'espèce *V. cholerae* et permet, d'autre part, la détection de toutes les souches appartenant à l'espèce (Tab. 1). La mise en évidence de cette séquence permet donc d'identifier aussi bien les souches de vibriens cholériques, responsables du choléra et dont l'origine est le plus souvent humaine, que les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 largement distribuées dans l'environnement marin.

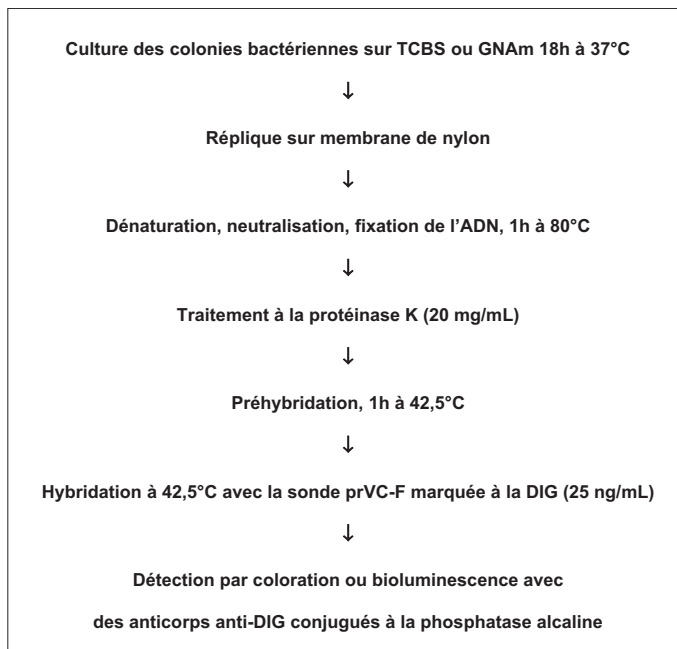
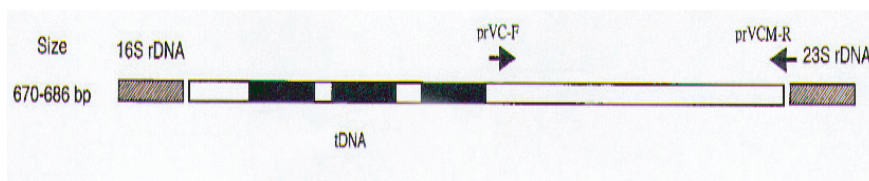


Fig. 1. Méthode moléculaire d'hybridation sur colonies bactériennes.

Fig. 1. Molecular method of colony hybridization assay.



5'-(DIG)TTA AGC STT TTC RCT GAG AAT G-3'

Fig. 2. Représentation schématique de l'espace intergénique ribosomique 16S-23S de *V. cholerae* et séquence de la sonde prVC-F utilisée.

Fig. 2. Schematic representation of 16S-23S rRNA intergenic spacer region of *V. cholerae* and sequence of the probe prVC-F used.

Tableau 1. Hybridation sur colonies de souches de *Vibrio species* et de souches appartenant à d'autres genres bactériens avec de la sonde prVC-F.

Table 1. Colony hybridization of strains of *Vibrio species* and strains of other genera with the prVC-F probe.

Microorganisme	Origine	Nombre de souches étudiées	Hybridation avec la sonde
<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139	Homme	4	Positive
	Environnement	47	Positive
<i>V. cholerae</i> O1	Homme	8	Positive
<i>V. cholerae</i> O139	Homme	1	Positive
Autres espèces de <i>Vibrio</i> (31)	Homme ou	68	Negative
	Environnement		
Autres genres bactériens	Environnement	8	Negative

3.2 Application de l'hybridation *in situ* à l'étude des prélèvements d'eau saumâtre après enrichissement et culture sur milieux TCBS et gna modifiée (GNAm)

L'estuaire de la Rance, situé dans le Nord-ouest de la France, a été le site choisi pour l'application de la technique d'hybridation *in situ* à l'étude de prélèvements d'eau saumâtre.

L'hybridation avec la sonde prVC-F a été réalisée sur membrane de nylon, à partir de la réplique des colonies bactériennes isolées après enrichissement sur gélose TCBS ou Gélose Nutritive Alcaline (Dodin and Fournier, 1992) modifiée par la suppression de NaCl (GNAm). Ce milieu de culture est moins inhibiteur que le milieu TCBS pour la croissance des vibriens mais reste sélectif par sa composition pour l'espèce *V. cholerae*, qui a la capacité de croître en l'absence de sel, contrairement à la plupart des espèces de *Vibrio*, qui sont halophiles.

L'identification biochimique des colonies hybridées et non hybridées a confirmé que seules les souches de *V. cholerae* sont reconnues spécifiquement par la sonde prVC-F. Par ailleurs, la comparaison des résultats obtenus sur milieu GNAm d'une part, et sur milieu TCBS d'autre part montre que le nombre de colonies hybridées sur la membrane provenant du milieu GNAm est très supérieur au nombre de colonies hybridées sur la membrane provenant du milieu TCBS (respectivement 4 et 47 colonies hybridées), bien que ces 2 milieux de culture aient été ensemencés avec le même bouillon d'enrichissement et à la même dilution (Fig. 3). Cette observation révèle le caractère moins inhibiteur du milieu GNAm pour la croissance de *V. cholerae*. De plus, le rapport du nombre de colonies hybridées sur le nombre total de colonies présentes sur chacun des deux milieux est identique, ce qui montre que les milieux TCBS et GNAm ont le même caractère de sélectivité vis-à-vis de *V. cholerae*.

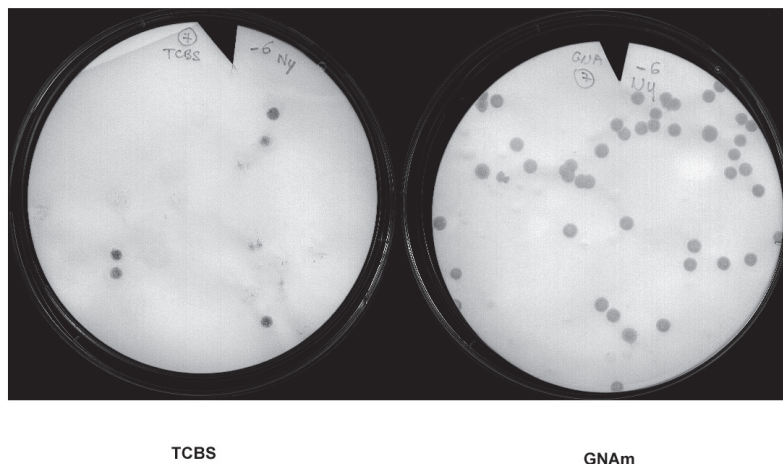


Fig. 3. Hybridation de colonies de *V. cholerae* avec la sonde prVC-F après culture sur milieux TCBS (gauche) et GNAm (droite).

Fig. 3. Colony hybridization of *V. cholerae* with the prVC-F probe after growth on TCBS (left) and mANA (right).

3.3 Détection de *V. cholerae* par hybridation sur colonies après étalement direct des prélèvements d'eau saumâtre sur GNAm

L'examen d'échantillons collectés dans l'environnement est délicat car la flore bactérienne associée aux vibriens est abondante et il importe de détecter, parmi toutes les colonies qui ont poussé, celles qui appartiennent à l'espèce *V. cholerae* (Oliver *et al.*, 1983). Des essais ont été réalisés sur GNAm après étalement direct d'eau saumâtre prélevée dans l'estuaire de la Rance, sans étape préalable d'enrichissement. La révélation de l'hybridation de la sonde avec les souches de *V. cholerae* a été améliorée en remplaçant les substrats enzymatiques chromogènes, donnant des produits colorés de trop faible inten-

sité pour être utilisés en routine, par un substrat bioluminescent permettant ainsi d'améliorer le seuil de détection.

L'hybridation de la sonde avec les souches de *V. cholerae* a été révélée par un signal très intense (fig. 4). Cependant, une mise au point de la détection avec ce type de marquage utilisant la bioluminescence s'avère nécessaire, la grande sensibilité du système pouvant favoriser l'apparition de réactions faussement positives. Cette technique est actuellement étendue à la recherche de *V. cholerae* dans des échantillons d'eau de mer prélevés sur le site de Gravelines (Nord).

4 CONCLUSION

La technique d'hybridation *in situ* s'avère intéressante pour la détection

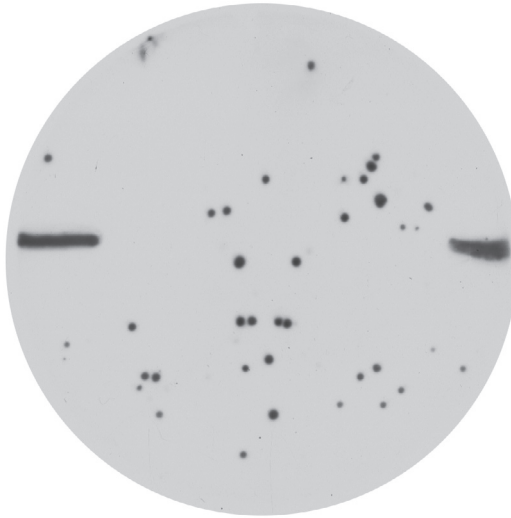


Fig. 4. Hybridation de colonies de *V. cholerae* avec la sonde prVC-F après étalement direct d'eau saumâtre sur GNAm, sans étape préalable d'enrichissement.

Fig. 4. Colony hybridization of *V. cholerae* with the prVC-F probe after growth on mANA without prior enrichment.

spécifique de *V. cholerae* parmi une flore associée importante dans les échantillons d'eau. Le remplacement de la gélose TCBS par la gélose GNAm permet la détection de *V. cholerae* après étalement direct d'échantillons d'eau saumâtre ou d'eau de mer, sans étape préalable d'enrichissement. Enfin, l'application de cette technique réduit à quelques jours les délais de réponse qui sont actuellement de l'ordre de 2 semaines avec les techniques bactériologiques classiques.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une aide de la direction des Études et Recherches d'EDF.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Baron S., Quilici M.L., Gueune H., Castel N., Fournier J.M. and Lesne J., 2002. Genetic relatedness among *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 isolates from wastewater and shellfish in river Rance (Brittany-France) determined by ribotyping. 7th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology, 15-19 juin 2002, Bergen, Norvège.
- Chun J., Huq A. and Colwell R.R., 1999. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl Environ Microbiol*, **65** (5), 2202-2208.
- Croci L., Serratore P., Cozzi L., Stacchini A., Milandri S., Suffredini E. and Toti L., 2001. Detection of *Vibrionaceae* in mussels and in their seawater growing area. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**, 57-61.
- Desmarchelier P.M. and Reichelt J.L., 1984. A phenotypic and genetic study

- of sucrose nonfermenting strains of *Vibrio mimicus* and *Vibrio cholerae*. *Curr. Microbiol.* 10, 41-48.
- Dodin A. et Fournier J.M., 1992. Méthodes de laboratoire pour le diagnostic du vibriion cholérique et autres vibriions. Institut Pasteur, Paris, France.
- Elliot E.L., Kaysner C.A., Jackson L. and Tamplin M.L., 1995. *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and other *Vibrio* spp. In: Bacteriological analytical manual, 8th edition, pp. 9.01-9.27. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD.
- Feldhusen F., 2000. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes Infect.* 2, 1651-1660.
- Geneste C., Dab W., Cabanes P.A., Vaillant V., Quilici M.L. & Fournier J.M., 2000. Les vibrioses non cholériques en France : cas identifiés de 1995 à 1998 par le Centre National de Référence. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, n° 9, 38-40.
- Lesne J. & Fournier J.M., 1998. *Vibrio*. in "Manuel de Bactériologie alimentaire", Coordonnateurs : L. Sutra, M. Federighi & J.-L. Jouve. Polytechnica, Paris. pp. 261-304.
- Lesne J., 1992. coordonnateur dans "Coquillages et Santé Publique, Du Risque à la Prévention". Editions Ecole Nationale de la Santé Publique, Rennes.
- Oliver J.D., Warner R.A. and Cleland D.R., 1983. Distribution of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting vibrios in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 985-998.
- Quilici M.L., Le Berre D., Fournier J.M. and Lesne J., 2002. Study of clonal diversity of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 in waste stabilization ponds (Marrakesh – Marocco) by using ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. 7th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology, 15-19 juin 2002, Bergen, Norvège.
- Robert-Pillot A., Baron S., Lesne J., Fournier J.M. and Quilici M.L., 2002. Improved specific detection of *Vibrio cholerae* in environmental water samples by culture on selective medium and colony hybridization assay with an oligonucleotide probe. *FEMS Microbiol. Ecology* 40: 39-46.
- Ruiz G.M., Rawlings T.K., Dobbs F.C., Drake L.A., Mullady T., Huq A. and Colwell R.R., 2000. "Global spread of microorganisms by ships – Ballast water discharged from vessels harbours a cocktail of potential pathogens." *Nature* 408 (6808): 49-50.
- Sakazaki R., 1992. Bacteriology of *Vibrio* and related organisms. In: *Cholera* (Barua, D. and Greenough, W.B., Ed.), pp. 37-55. Plenum Medical Book Company, New York.