

Molécules de communication chez les vibrios
et
Outils innovants de détection des contaminants
microbiologiques pour l'ostréiculture

Julia Baudart

Observatoire Océanologique de Banyuls sur mer
Sorbonne Université-LBBM

Etudes menées sur la lagune de Salses Leucate entre 2015
et 2021

LBBM –Laboratoire de Biodiversité et de Biotechnologies Microbiennes

- **Unité Mixte de Recherche et de Service de Sorbonne Universités (Paris VI) et du CNRS(InEE)**

Comprendre les interactions entre les microorganismes et autres (micro)organismes et leur environnement



- **Comprendre le devenir et les effets des contaminants chimiques et biologiques dans les milieux aquatiques par le développement de systèmes de détection sensibles**
- **Etudier leurs impacts écologiques**

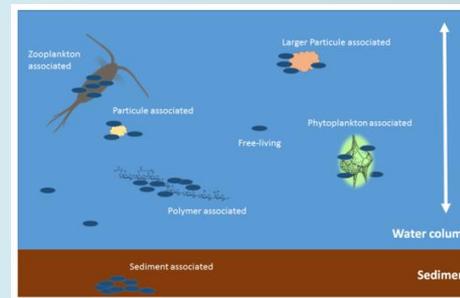
Décrire et explorer la biodiversité microbienne et de développer de nouveaux produits biotechnologiques à partir de microorganismes

Fournir des services pour répondre aux besoins des partenaires industriels, des agences environnementales et autres

Ecologie des pathogènes dans les environnements aquatiques: sources, réservoirs, dynamique et interactions avec l'environnement

Réservoirs environnementaux

- Abondance
- Diversité
- Distribution
- Réservoirs
- Dynamique



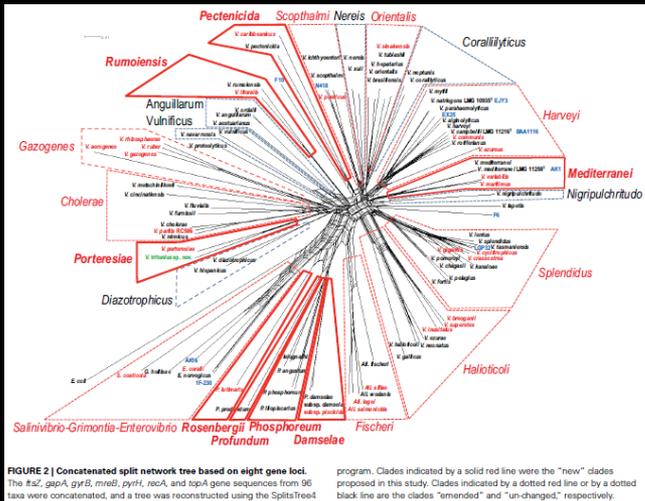
Outils

- Culture, génomique comparative
- Empreinte moléculaire
- Métagénomique
- qPCR, digital PCR....
- Détection *in situ*, capteurs moléculaires automatisés

Plasticité phénotypique

- Plasticité environnementale
- Régulation génétique et épigénétique

Contexte des vibrios



140 espèces identifiées

Diversifiés et ubiquistes dans les milieux aquatiques marins

Santé Humaine

~ 12 espèces connues
Toxi-infection Alimentaire (TIAC)

V. cholerae
V. vulnificus
V. parahaemolyticus

Santé Animale

~ 24 espèces connues

V. ordalii / *alginolitycus* : majorité des poissons marins

V. corallyticus : Corail
V. harveyi : crevettes, requins, poissons

V. aesturianus
Super Clade Splendidus
V. crassostreae
Mollusques (Huîtres)

Molécules de communication chez les vibrios

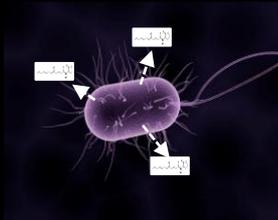
- Thèse de Léa Girard (2015-2018) ED 227 SU-MNHN



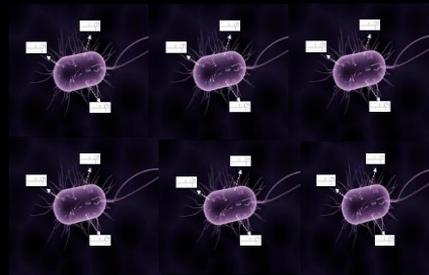
- Encadrement : Marcelino Suzuki, Raphael Lami, Didier Stien, Julia Baudart
- **Etude de la communication cellulaire chez les vibrios en lagune méditerranéenne**

Comment et pourquoi les bactéries communiquent t'elles ?

Faible densité
Comportement individuel



Haute densité
Comportement collectif
(cohésif, « social » en harmonisant l'expression de leurs gènes)

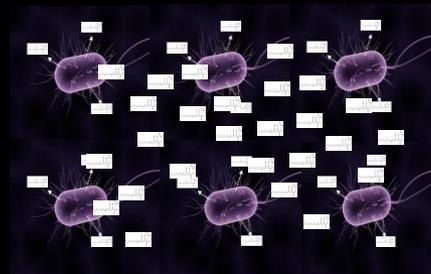
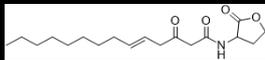


quorum



auto-induction

Molécules de communication
Auto-Inducteurs



Virulence
Toxicité
Mobilité
Biofilm
Bioluminescence

SURVIE

Exemple de la bioluminescence induite par *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri



Sépiole

Euprymna scolopes



Faible densité

Haute densité

pas de production
de luciférine

Production de
luciférine

Quelles sont les molécules de communication connues chez les vibrios?

Deux grandes familles de molécules de communication

Communication intra-spécifique

Molécule de communication de **type 1** : AI1

AHL: N- Acyl Homosérine lactone

CAI Cholera autoInducteur1

DPO : 3,5-dimethylpyrazin-2-ol

Communication « universelle »

Molécule de communication de **type 2** : AI2

Furanosyl Diester borate

Voies de signalisation bien décrites chez certaines espèces :

V. cholerae : pathogène pour l'homme (choléra)

V. fischeri : Bioluminescent

V. harveyi : Bioluminescent et pathogène des poissons

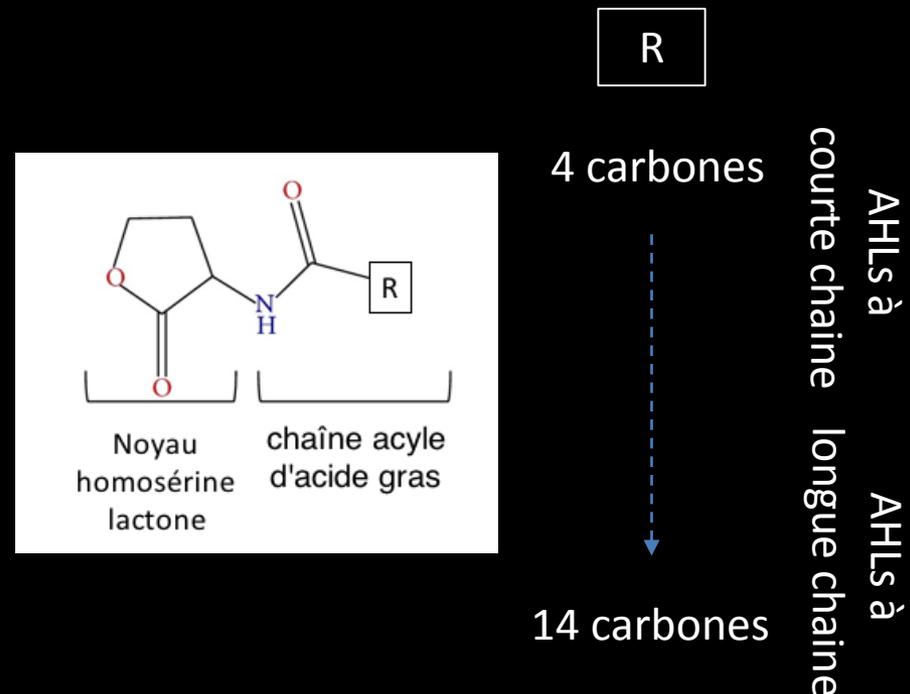
V. anguillarum : pathogène des poissons

V. fluvialis pathogène émergent pour l'homme (épidémies diarrhéiques)

Diversité des AHLs chez les vibrios

91 espèces étudiées : 34 espèces produisent des AHLs

Espèces	nb d'AHLs différentes connues chez les représentant des espèces
<i>V. anguillarum</i>	8
<i>V. aesturianus</i>	2
<i>V. fluvialis</i>	9
<i>V. fischeri</i>	12
<i>V. corallyticus</i>	1
<i>V. alginolyticus</i>	11
<i>V. splendidus</i>	1



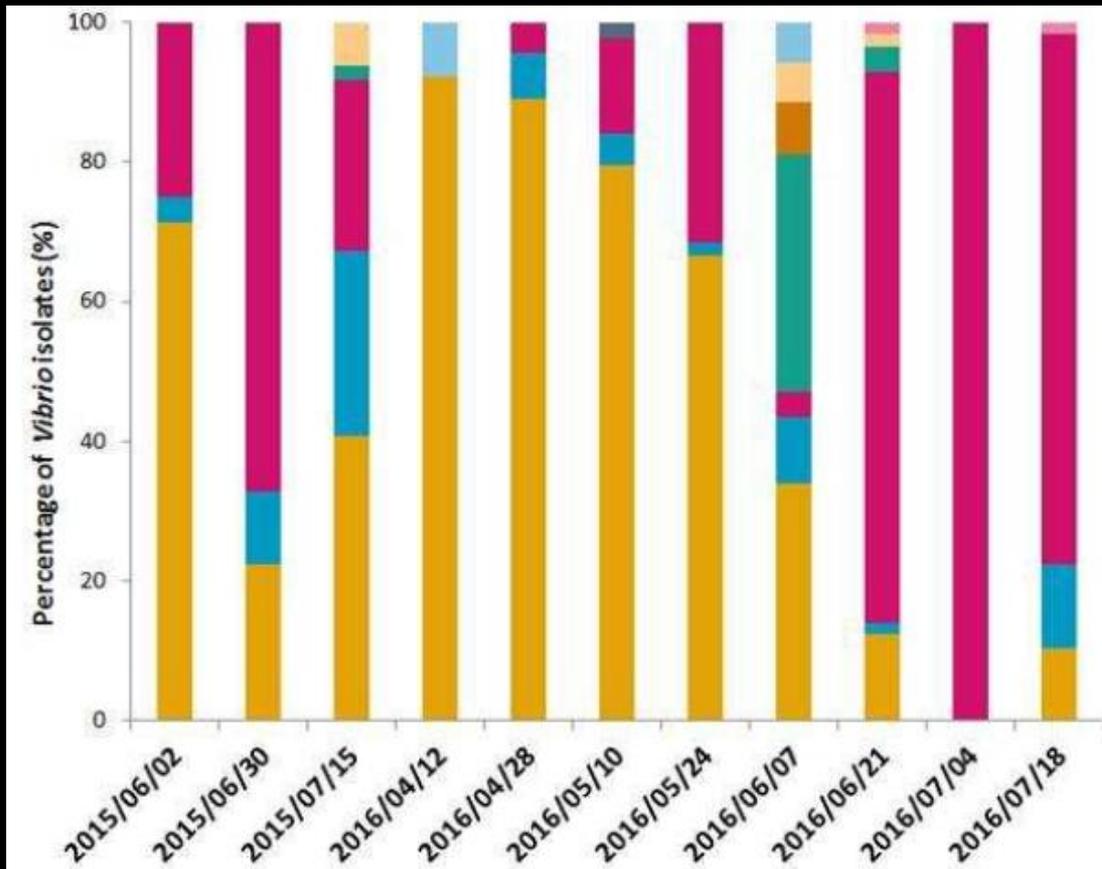
Contexte et objectif de l'étude

- Etudier la diversité des souches environnementales de *Vibrio* spp productrices d'AHLs
- Caractériser la diversité des AHLs
- Comprendre les facteurs qui contrôlent la diversité des AHLs produites



Juin 2015-juillet 2016

Diversité des vibrios cultivables sur la période d'étude



501 isolats
9 clades

Diversité des clades et espèces importantes

Variation saisonnière

+ abondant

- Clade Splendidus (36,7%)
- Clade Mediterranei (32,5%)
- Clade Harveyi (9,4%)
- Clade Coralliilyticus (1,9%)
- Clade Orientalis (0,3%)
- Clade Anguillarum
- Clade Halioticoli
- Clade Scopthalmi
- Clade Fischeri

- abondant



Quelles sont les espèces qui produisent des AHLs ?

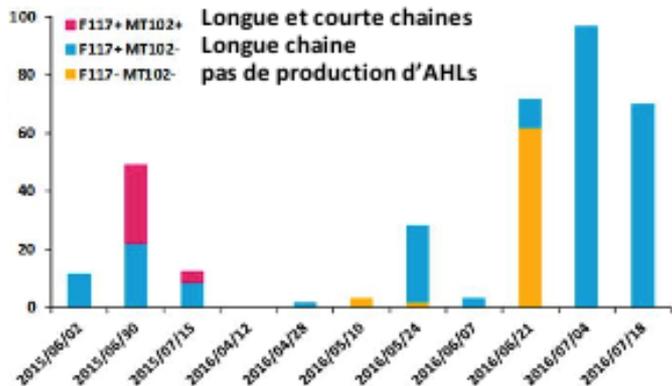
501 isolats  168 producteurs d'AHLs

Pas de production d'AHLs détectées chez les représentants du clade Splendidus

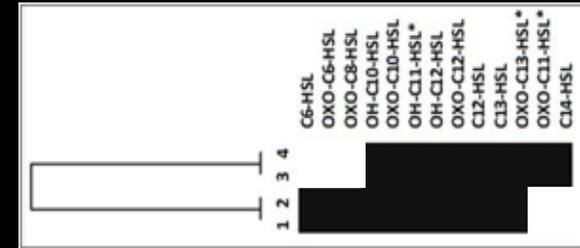
Espèces	Nb de représentants isolés	% de représentants AHL+
<i>V. aesturianus</i>	6	100
<i>V. harveyi</i>	35	11
<i>V. anguillarum</i>	5	60
<i>V. corallilyticus</i>	1	100
<i>V. mediterranei</i>	189	80
<i>V. scopthalmii</i>	1	100
<i>V. holisae</i>	1	100

Existe t'il un lien entre diversité génétique et diversité des AHLs chez *V. mediterranei* ?

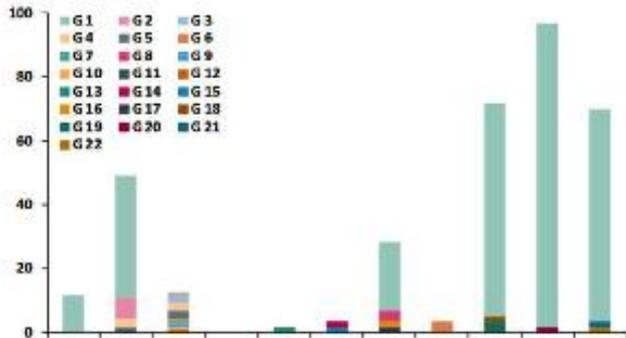
Hypothèse : les représentants montrant un génome identique doivent produire des AHLs identiques



Diversité des AHLs
(courte et longue chaînes)



Pas de lien



Diversité génétique
(génotype)
Méthode d'empreinte moléculaire du génome



Plasticité phénotypique

7 variables environnementales expliqueraient 83,4% de la variation phénotypique de G1 (Phosphates 37,4%)

Projet EPIQS, un projet émergence financé par Sorbonne Université

Comprendre l'origine de cette plasticité phénotypique

- **Mécanismes génétiques** ?
 - A priori non car les gènes impliqués dans la synthèse des AHLs et les génomes sont 100% identiques
- **Mécanismes épigénétiques** sous contrôle de variables environnementales ?
 - Processus rapide d'adaptation aux variations environnementales sans modifier les gènes pour améliorer la survie des bactéries dans leur environnement changeant



Développement d'outils analytiques innovants pour le suivi des populations de vibrios dans les environnements aquatiques

- Thèse de Elise da-Silva (2015-2018) ED UPVD Energie et Environnement

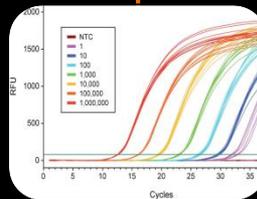


- Encadrement : Lise Barthelmebs et Julia Baudart
- **Des capteurs moléculaires pour un auto-contrôle des contaminants microbiologiques pour l'ostréiculture**

Les outils de détection et d'identification des vibrios pour un auto-contrôle

Microorganisms

Bacteria



Méthodes de mise en culture

- ✓ Faible coût
- ✓ Facile
- ✓ Viables
- ✗ Manipulation labo
- ✗ Longues
- ✗ Sensibilité (VBNC et spécificité)
- ✗ Analyse en temps réel

Méthodes moléculaires (qPCR)

- ✓ Sensible et spécifique
- ✓ Rapide
- ✗ Préparation des échantillons
- ✗ Faux négatifs
- ✗ ne distinguent pas les mortes des vivantes
- ✗ Analyse en temps réel

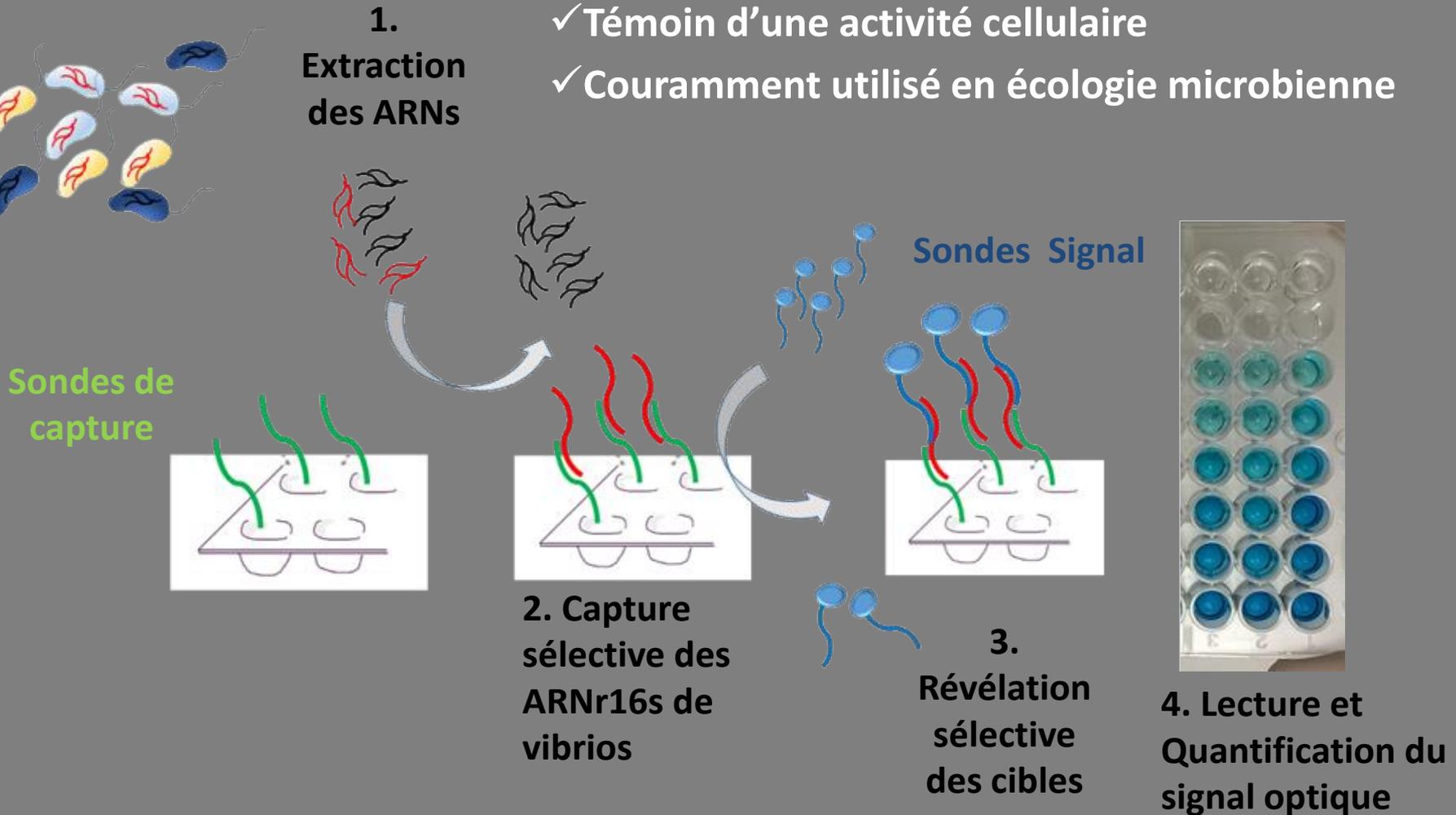
Biocapteurs

- ✓ Spécifique
- ✓ Facile
- ✓ Faible coût
- ✓ portable
- ✓ Analyse en temps réel possible
- ✗ Limite de détection
- ✗ Préparation des échantillons

Biocapteur moléculaire à ARN

Cible : **ARNr16S**

- ✓ marqueur moléculaire génétique : identification des espèces
- ✓ Siège des synthèses protéiques
- ✓ Témoin d'une activité cellulaire
- ✓ Couramment utilisé en écologie microbienne



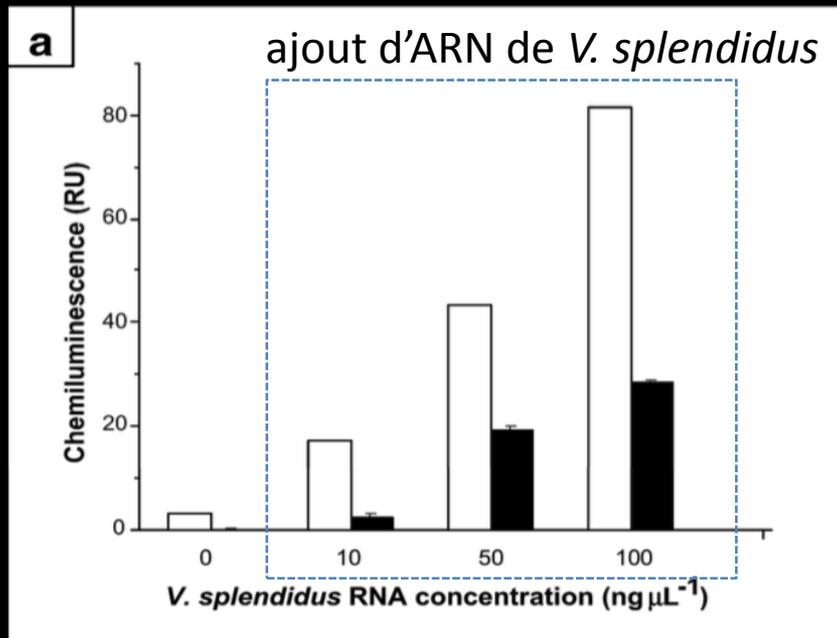
Test de spécificité

Genre et espèce bactérienne	Souche	Réponse du Capteur
<i>Vibrio aesturianus</i>	subp aesturianus ATCC 35048	+
<i>V. aesturianus</i>	subp francensis CIP 109791	+
<i>V. alginolyticus</i>	ATCC 17749	+
<i>V. campbelli</i>	ATCC 25920	+
<i>V. crassostreae</i>	CIP 108327	+
<i>V. crassostreae</i>	CIP 108329	+
<i>V. fortis</i>	CIP 108196	+
<i>V. gigantis</i>	CIP 108656	+
<i>V. haliotocoli</i>	CIP 106283	+
<i>V. harveyi</i>	ATCC 14126	+
<i>V. lentus</i>	CIP 107166	+
<i>V. littoralis</i>	CIP 109585	+
<i>V. mediterranei</i>	ATCC 43341	+
<i>V. natriegens</i>	ATCC 14048	+
<i>V. neptunius</i>	CIP 108274	+
<i>V. pomeroyi</i>	CIP 108273	+
<i>V. rumoiensis</i>	CIP 109752	+
<i>V. splendidus</i>	ATCC 33125	+
<i>V. splendidus</i>	CIP 107715	+
<i>V. tasmaniensis</i>	CIP 108272	+
<i>Aeromonas media</i>	BBCC	-
<i>Alteromonas macleodii</i>	BBCC	-
<i>Citrobacter freundii</i>	BBCC	-
<i>Colwellia polaris</i>	BBCC	-
<i>Escherichia coli</i>	BBCC	-
<i>Photobacterium lutimaris</i>	BBCC	-
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	BBCC	-
<i>Pseudomonas pachastrelia</i>	BBCC	-

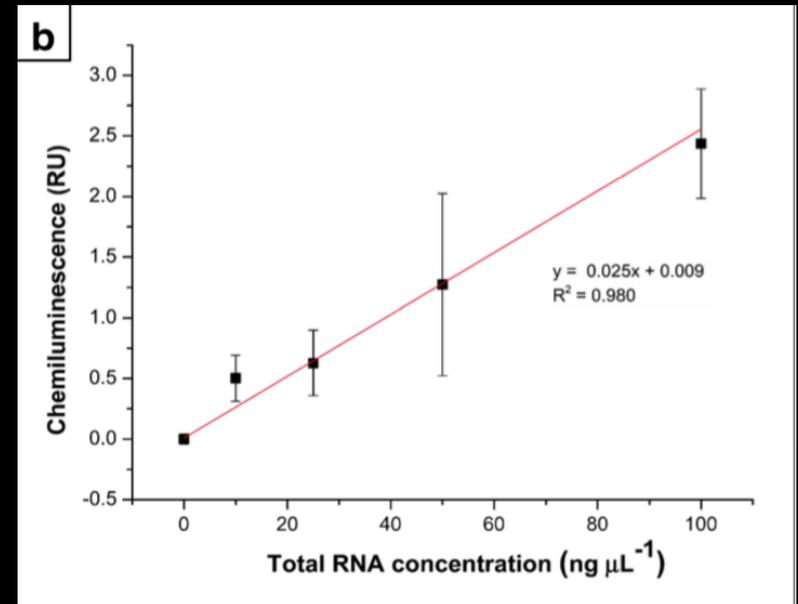
Vibrio spp.

Non-*Vibrio*

Détection – quantification dans l'eau et le phytoplancton



détection dans l'eau de mer
100 UFC/L



détection dans le phytoplancton (lagune)
(filet à plancton)
1000 UFC/L

Perspective de développement du capteur *Vibrio*

- Automatisation du système de détection
- Intégration à un système de collecte de l'eau et d'extraction de l'ARN
- Adapter le format à d'autre cible bactérienne
 - *V. aesturianus*, Super clade Splendidus.....
- Outil portatif pour une aide à l'autocontrôle des contaminants bactériens

Remerciements

- Syndicat Rivage
- Syndicat des ostréiculteurs de Leucate
- Mairie et Capitainerie de Leucate (accès anneau au port)
- UPVD-BAE
 - Florence Vouvé (analyses physicochimiques)
 - Christophe Canal: campagnes d'échantillonnage
- Observatoire Océanologique de Banyuls sur mer
 - FR 3724 de l'OOB (Services Plateforme SOLA analyses physicochimiques, Plateforme Bio2Mar de l'Observatoire de Banyuls sur mer, Moyens à la mer)
 - François Lantoine-LECOB pour les analyses du phytoplancton (abondance et diversité)
 - Collaborateurs du LBBM

