

Survie et maintien de la virulence de *Salmonella Typhimurium* VNC exposée simultanément à trois facteurs stressants expérimentaux



The release of enteric pathogenic bacteria in aquatic environments poses the problem of the fate of these bacteria under the effects of environmental factors (solar radiation, salt concentration, temperature, nutrient level, pH, competition). Frequently, these bacterial cells, potentially pathogenic, enter into a non-culturable state on routine bacteriological plating media. However, the use of direct detection methods (DAPI stained cells) allows the visualization of these Viable but Non Culturable cells (VNC). But, beyond the characterization of the viability of the cells (electron transport activity, metabolic activity, membrane integrity, structure and/or quantity of DNA), what happens with the virulence of these cells? This problem was experimentally investigated according to the bacterial model *Salmonella Typhimurium*. The virulence of this strain, which is the agent of the murine typhoid, was evaluated on a mouse model. Experimentally, the effects of some environmental factors on the survival and on the maintenance of virulence of *Salmonella Typhimurium* were measured in microcosms exposed to UV radiation (four germicidal lamps 8 mW s(-1) cm(-2), wave length: 254 nm), salt concentration (Sea Salt Sigma, 37), nutrient starvation. The microcosms were simultaneously submitted to these three factors, with variable exposure times. For each of those times, the viability of the nonculturable cells (which became nonculturable because of the exposure to the three factors) was measured through different physiological states notable in the cells, after using different fluorescent dyes. The stained cells were observed by epifluorescence microscopy and analysed by image cytometry. So, the cellular populations are characterised by enumeration of respiring bacteria (CTC, [39]), metabolising bacteria (YEK, [22] modified), bacteria owning an undamaged cytoplasmic membrane (LD, Live/Dead BacLight Viability Kit. Molecular Probes Inc.); we also determined the quantity and/or structure of DNA of the cells (fluorescence level of DAPI stained cells). After exposure to the three factors for one hour (13.56 J cm(-2)), while the plate count cell density rapidly decreased from #10(7) cells mL(-1) to < 0.1 cell mL(-1), physiological states of these viable but non-culturable cells are similar to those of nonexposed cells. On the other hand, after exposure for three hours, only 10 % of the cells deposit a CTC formazan-crystal and 20 % are substrate responsive cells (enlarged cells in presence of Yeast Extract and Cephalixin: YEC). Half of the cellular population presents an undamaged cytoplasmic membrane and the level of fluorescence of DAPI stained cells is close to 85 %, which shows that the DNA of these cells is weakly damaged. After exposure to the three experimental factors for 24 hours (315 J cm(-2)), weak replies to the physiological tests used in this study to characterize the viability of the non-culturable cellular population are observed (CTC: 4 %; YEC: 2 %; LD: 11.8 %) while the fluorescence level of DAPI stained cells remains firm at 80 %. At the same time, the virulence expression of VNC cells of *Salmonella Typhimurium*, evaluated by intraperitoneal injection to the mouse (route which excludes uncontrolled parameters, unlike the per os route) does not seem to be correlated with the cellular viability such as it has been evaluated in this study. A 30 min exposure (6.73 J cm(-2)) to the three environmental factors, leading to the non-culturability of almost the entire exposed cell population (0.08 culturable cell mL(-1)) whereas the level of viability of those culturable cells is closed to the one of non-exposed cells. The injection of 1000 of those cells (<0.001 culturable cells in 100 µL inoculated) into the mouse (a group of ten mice) does not cause any mortality four weeks post-inoculation, whereas the injection of the same dose of nonexposed cells leads to the death of all mice in the group one week post-inoculation. According to our preliminary experiments on *Salmonella Typhimurium*, the loss of the state of culturability and the loss of virulence towards mice by intraperitoneal route, because of the exposure to associated effects of UV irradiation (254 nm), salinity (37) and nutrient starvation, seem to be concomitant. Le rejet de bactéries entériques pathogènes dans l'environnement aquatique pose le problème du devenir de ces microorganismes sous les effets des facteurs environnementaux (rayonnement solaire, salinité, température, oligotrophie, pH, compétition). L'évolution fréquente de ces cellules bactériennes potentiellement pathogènes vers un état non cultivable implique l'absence de détection de celles-ci par des méthodes traditionnelles. Cependant, l'utilisation des méthodes de détection directes permet de visualiser ces cellules non cultivables. Au stade suivant, il est nécessaire de caractériser le niveau de viabilité de ces cellules non cultivables. Mais au-delà de la caractérisation de l'état viable de la cellule (activité des chaînes respiratoires, activité métabolique, intégrité membranaire, structure et/ou quantité d'ADN) se pose parallèlement le problème du maintien du pouvoir pathogène de ces bactéries. Cette problématique a été abordée expérimentalement sur le modèle bactérien *Salmonella Typhimurium*. Pour évaluer le pouvoir pathogène de cette souche, il est fait appel au modèle souris, *Salmonella Typhimurium* étant l'agent de la typhoïde murine. Pour évaluer les effets de certains facteurs environnementaux sur cette souche pathogène, il a été fait appel sur le plan expérimental en microcosmes au rayonnement UV (quatre lampes germicides 8 mW s(-1) cm(-2) à 254 nm), à la salinité (SeaSalt Sigma, 37) et à l'oligotrophie. Ces trois facteurs sont appliqués simultanément avec des temps d'exposition variables. Pour chaque temps d'exposition, le niveau de viabilité des cellules qui ont perdu le pouvoir de cultiver sous les effets de ces facteurs est mesuré à travers différents états physiologiques, au moyen de marqueurs fluorochromiques. La réaction marqueur-cellule est observée par microscopie en épifluorescence et analysée par cytométrie en images. Ainsi, les populations cellulaires sont caractérisées sur le plan de la respiration (CTC, [39]), de la capacité à métaboliser un nutriment (YEC, [22] modifié), de l'intégrité membranaire (LD, Kit Live/Dead BacLight-Molecular Probes Inc) et de la structure et/ou quantité d'ADN [36]. Alors que la disparition du pouvoir de cultiver de toutes les cellules exposées (zéro cultivabilité) se réalise en 1 h (13,56 J cm(-2)), les états physiologiques que présentent ces cellules non cultivables sont proches de ceux présentés par les cellules d'une culture non exposée. Par contre, après 3 h d'exposition, 10 % seulement des cellules présentent une activité de leur chaîne respiratoire (CTC) et 20 % présentent une activité métabolique (extrait de levure en présence de céphalexine). La moitié

des cellules présente une atteinte de la membrane cytoplasmique et le niveau de fluorescence de la population cellulaire est voisin de 85 % montrant par là que ces cellules ne présentent à ce stade qu'une faible atteinte de l'ADN. Après 24 h d'exposition (315 J cm^{-2}) à ces trois facteurs stressants expérimentaux, les tests physiologiques appliqués dans cette étude sur les cellules non cultivables sont quasiment négatifs alors que le niveau de fluorescence de leur ADN marqué se maintient à 80 %. En parallèle, le suivi du pouvoir pathogène de ces cellules de Salmonella Typhimurium, évalué par injection intrapéritonéale à la souris (voie permettant de s'affranchir de paramètres non contrôlés comme la voie per os), ne paraît pas évoluer en fonction de la disparition de la viabilité cellulaire mesurée par les tests utilisés dans cette étude. Une exposition de 30 min ($6,73 \text{ J cm}^{-2}$) aux trois facteurs stressants expérimentaux fait disparaître le pouvoir de cultiver de la quasi-totalité des cellules exposées ($0,08 \text{ cellules cultivables mL}^{-1}$) alors que ces cellules présentent un état de viabilité proche de celui d'une souche non exposée. L'injection de 1000 de ces cellules ($0,001 \text{ cellule cultivable dans } 100 \mu\text{L}$ injecté) à la souris (un lot de dix souris) n'entraîne aucun état pathologique ni mortalité sur quatre semaines d'observations alors que l'injection du même nombre de cellules non exposées aux trois facteurs stressants entraîne la mort du lot de souris en une semaine. D'après ces quelques expérimentations préliminaires sur Salmonella Typhimurium, la perte du pouvoir de cultiver paraît s'accompagner de la perte de la virulence testée chez la souris par voie intrapéritonéale après exposition aux effets associés de l'irradiation UV, de la salinité 37 et de l'oligotrophie.

Auteurs du document : Baleux, B, Caro, A, Lesne, J, Got, P, Binard, S, Delpeuch, B

Obtenir le document : Gauthier-villars/editions Elsevier

Mots clés : Salmonella, survie, virulence, VNC, stress, Salmonella, survival, virulence, VNC, stress

Thème (issu du Text Mining) : SANTE - HYGIENE - MICROORGANISME PATHOGENE, MILIEU NATUREL

Date : 1998-11

Format : text/xml

Source : Oceanologica Acta (0399-1784) (Gauthier-villars/editions Elsevier), 1998-11 , Vol. 21 , N. 6 , P. 939-950

Langue : Inconnu

Droits d'utilisation : Elsevier, Paris, info:eu-repo/semantics/openAccess, restricted use

Télécharger les documents : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00325/43645/43245.pdf>

<https://archimer.ifremer.fr/doc/00325/43645/>

Permalien : <https://www.documentation.eauetbiodiversite.fr/notice/survie-et-maintien-de-la-virulence-de-salmonella-typhimurium-vnc-exposee-simultanement-a-trois-facte0>

Evaluer cette notice:



Ce portail, créé et géré par l'Office International de l'Eau (OIEau), est géré avec l'appui de l'Office français de la biodiversité (OFB)

