



Appel à projets 'soutien à l'innovation' 2002
Programme terminé en juin 2004

OPTIMISATION ET VALIDATION DE METHODES D'IDENTIFICATION MOLECULAIRE DES BACTERIES LACTIQUES DES POISSONS

Chef de file : GDSAA Groupement de Défense Sanitaire Aquacole d'Aquitaine
1 rue Marcel David – BP 219 – 40004 MONT-DE-MARSAN cedex
tel 05 58 06 88 62 ; fax : 05 58 75 85 89 ; gdsaa@wanadoo.fr
Contact : Diane-Gaëlle Douet

Partenaires : Laboratoire Départemental des Landes (LD 40)
INRA, Unité de Virologie et d'Immunologie moléculaires (INRA-VIM)

■ Objectifs du programme

Ce programme visait à valider et optimiser une technique moléculaire utilisée en routine en laboratoire par le laboratoire des Landes, pour l'identification des souches de bactéries à Gram positif dites lactiques, isolées de poissons en conditions de maladie ou de portage asymptomatique.

Un protocole complet a été appliqué pour mener à bien ce travail :

- Collecte d'un grand nombre de souches, d'origines variées (laboratoires, isolats de terrain, pays étrangers) ;
- Comparaison entre les résultats obtenus par la méthode du LD 40, appliquant la PCR-RFLP¹ à la sous-unité 16s du gène de l'ADN ribosomal (ARDRA²) et ceux de l'ARDRA portant sur la totalité du gène, telle que pratiquée à l'INRA sur les bactéries du lait ; le traitement de l'information requiert dans ce dernier cas l'emploi d'un logiciel d'analyse, dit « GelCompar » ,
- Séquençage du gène de l'ADNr 16s sur des souches représentatives de groupes non identifiés,
- Séquençage d'une autre cible génétique (gène de la superoxyde-dismutase SodA) pour comparaison,
- Criblage avec enzymes de restriction diverses sur l'ensemble des souches et comparaison des profils observés, pour la recherche d'éventuelles enzymes pouvant améliorer l'identification,
- Validation de la justesse, la spécificité et la fidélité de la technique optimisée,
- Création d'une banque de données des profils de restriction, élargie aux bactéries identifiées dans le cadre de l'étude.

¹ PCR-RFLP : réaction de polymérisation en chaîne - polymorphisme de la longueur des fragments de restriction.

² ARDRA : « amplified RDNA restricted analysis » = PCR-RFLP portant sur tout ou partie du gène d'ADNr.

■ Résultats obtenus

D'une manière générale, la méthode développée par le LD40 a été validée avec succès et a bien résisté à la diversification des bactéries-cibles. Le LD40 dispose dorénavant de données techniques et d'une banque de données élargie comprenant les informations originales sur les différentes souches isolées et identifiées.

La séquence et les enzymes utilisées se sont révélées être le meilleur compromis entre la précision nécessaire à l'identification nécessaire de tous les isolats de terrain et l'utilisation en routine en laboratoire. Deux enzymes de restriction suffisent en général, une troisième est nécessaire pour distinguer trois espèces.

Les profils inconnus à l'origine ont pu être associés à des genres, voire à des espèces de bactéries, grâce au séquençage ; les résultats de leur traitement par PCR-RFLP ont alors été intégrés dans les banques de données, ce qui permettra de les identifier au cours des possibles isolements de terrain dans le futur.

La technique a été validée sur trois principes :

- Justesse de la méthode : les résultats obtenus sont bien exacts (comparaison entre souches de terrain et souches de références identifiées)
- Spécificité de la méthode : à un résultat obtenu par PCR-RFLP ne correspond qu'une espèce bactérienne. La méthode a été appliquée sur plusieurs isolats préidentifiés : isolats de terrain, souches provenant d'un autre laboratoire français (INRA), souches recueillies dans des laboratoires étrangers (Israël, Espagne).
- Fidélité de la méthode :
 - Répétabilité intralaboratoire : analyses en doublons au sein du LD 40 ;
 - Reproductibilité intralaboratoire : répétition des analyses en faisant varier les conditions expérimentales au LD 40 (personnel, matériel, réactifs) ;
 - Reproductibilité interlaboratoire : comparaison entre les résultats du LD 40 et de l'INRA.

Par ailleurs les essais d'application de la technique de séquençage au gène de l'enzyme SodA ont donné des résultats concordants avec ceux obtenus sur le gène de l'ADNr 16s, constituant ainsi un complément potentiel aux techniques d'identification déjà disponibles.

Ce programme a également permis de dégager d'intéressantes observations en matière d'épidémiologie, telles que la présence fréquente de *Lactococcus lactis* spp dans les isolats de terrain, et la relation récurrente entre *Streptococcus dysgalactiae* et les esturgeons ou entre *Streptococcus parauberis* et les poissons marins.