

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة باجي مختار عنابة



FACULTE DES SCIENCES

Département de Biochimie

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de
Magister

Option : Microbiologie

Thème :

**Identification des bactéries du genre
Aeromonas et significations pathologiques
des souches d'*Aeromonas* isolées en clinique**

Présenté par : CHERNINE Saoussene

Devant le jury:

Présidente :	Mme Kirane Djamila	Pr. Université d'Annaba
Directrice de thèse :	Mme Laouabdia Sellami Nadjette	M.C. Université d'Annaba
Examinatrice :	Mme Abbaci Nafissa	Pr. Université d'Annaba
Examineur	Mr Merad Tarek	M.C. Université d'Annaba

Juin 2010

Remerciements

Le plus grand merci à Dieu tout puissant qui a seul le pouvoir de nous guider durant notre vie.

Un grand et particulier remerciement à mon maître de stage Mme LAOUABDIA SELLAMI Nadjette qui m'a permis de faire ce stage, pour son aide, ses conseils et ses orientations dans ce travail.

Merci aux membres de jury d'avoir accepté de juger mon travail.

A tout le personnel du laboratoire de microbiologie infectiologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Un grand merci à Céline, Françoise, Evelyne et Laurence pour leurs aides surtout techniques, leurs conseils, gentillesse et sympathie et aussi leur bon accueil dans le laboratoire, je resterai toujours reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi durant toute la durée de mon stage

Merci à Laurence LOISEAU pour sa disponibilité les jours de mes manipulations au PARMIC sur le site de la doua à l'université Claude BERNARD Lyon1

*A Fouzia et Sameh de l'université de Skikda pour leurs aides
A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*

TABLE DES MATIERES

Introduction.....	1
-------------------	---

Partie bibliographique :

I. Taxonomie.....	4
II.1. Identifications phénotypiques	4
II.2. Identifications génotypiques	6
II.2.1. L'hybridation ADN/ADN.....	6
II.2.2. Les gènes: <i>16S</i> , <i>gyrB</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoD</i> , <i>dnaJ</i>	7
II. Facteurs de virulence	13
III.1. Facteurs d'adhérence.....	13
III.2. <i>Pili</i>.....	14
III.3. OMP et flagelles.....	15
III.4. Système de sécrétion de type III (TTSS).....	16
III.5. Les hémolysines	17
III.6. Les entérotoxines.....	17
III.7. Les enzymes extracellulaires.....	19
III.7.1. Les protéases	19
III.7.2. Les lipases.....	19

Partie expérimentale :

I. Matériel et méthodes.....	20
I.1. Collection des souches, culture, et conservation	20
I.1.1. Souches d'origine clinique	20
I.1.2. Souches d'origine environnementale	21
I.2. Identification des souches	21
I.2.1. Identification par la galerie Api20E	21
I.2.2. Identification des souches par Omnilog ID.....	21
I.2.3. Identification par le séquençage du gène <i>rpoB</i>	22
I.3. Extraction d'ADN génomique	24

I.4. Détection des gènes de virulence par PCR.....	25
I.4.1. PCR et choix des amorces.....	25
I.4.2. Conditions de PCR.....	25
I.4.3. Confirmation par le séquençage.....	26
II. Résultats	26
II.1. Identification par galerie Api20E.....	26
II.2. Identification par Omnilog ID.....	26
II.3. Identification par le séquençage du gène <i>rpoB</i>	28
II.4. Comparaison: séquençage du gène <i>rpoB</i> -galerie Api20E- OmnilogID	29
II.5. Détection des gènes de virulence.....	29
II.5.1. Souches cliniques	31
II.5.2. Souches environnementales.....	32
III. Discussions	33
III.1. Souches cliniques.....	33
III.2. Souches environnementales	34
III.3. Comparaison Omnilog ID– séquençage <i>rpoB</i>	34
III.4. Comparaison Omnilog ID - galerie Api20E.....	35
III.5. Détection des gènes de virulence.....	36
IV. Conclusion	39
V. Références bibliographiques	40
VI. Annexes.....	45

Liste des abréviations

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

BET: Bromure d'Ethidium

CECT: Coleccion Espanola de Cultivos Tipo

CNRS: Centre National de Recherches Scientifiques

***dnaJ*:** gène codant la protéine HSP 40

ENVL: Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

GN-NENT: Gram Négatif - Non Entérobactéries Test oxydase positif

***gyrB*:** sous unité β de l'ADN gyrase, type II d'ADN topoisomérase

min: minute

mM: milliMolaire

ml: millilitre

pb: paires de base

PCR: Polymerase Chain Reaction ou amplification en chaîne de la polymérase

PSM: Poste de Sécurité en Microbiologie

RNase: RiboNucléase

***rpoB*:** sous unité β de l'ARN polymérase

***rpoD*:** sous unité de facteur σ^{70} , un des facteurs sigma qui confère un promoteur de transcription spécifique à l'initiation sur l'ARN polymérase

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

sec: seconde

TAE: Tris Acétate EDTA

TES: Tris EDTA Sel

UCBL : Université Claude BERNARD Lyon 1

UV: Ultra Violet

μ l: microlitre

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
1	Caractères différentiels phénotypiques des <i>Aeromonas</i> d'intérêt clinique	5
2	Classification des <i>Aeromonas</i> en fonction de leurs groupes d'hybridation	7
3	Distribution des gènes putatifs de virulence dans des isolats cliniques d'<i>Aeromonas</i>	18
4	Contexte clinique des 108 souches d'<i>Aeromonas</i> d'origine clinique	21
5	Gènes de virulence étudiés, amorces et taille des fragments	23
6	comparaison entre les 3 techniques utilisées pour l'identification des <i>Aeromonas</i> d'origine clinique	27
7	comparaison entre les 3 techniques utilisées pour l'identification des <i>Aeromonas</i> d'origine environnementale	28
8	Principales (102/108) souches d'origine clinique et profil des gènes de virulence	29
9	Souches d'origine environnementales (50/51) et gènes de virulence	30
10	Fréquence de chacun des gènes de virulence potentiels chez les souches cliniques et environnementales des principales espèces d'<i>Aeromonas</i> et comparaison statistique (test student) de ces fréquences	38

Liste des figures

Figures	Titres	Pages
1	Arbre phylogénétique neighbour-joining non enraciné des espèces <i>Aeromonas</i> basé sur la séquence du gène de l'ADNr16S	9
2	Arbre phylogénétique neighbour-joining non enraciné des espèces <i>Aeromonas</i> basé sur les séquences des gènes <i>rpoB</i> et <i>gyrB</i>	12
3	Adhésion d'<i>A. hydrophila</i> aux cellules intestinales 407 humaines	14
4	Photographie d'un gel de migration des produits d'amplification du gène <i>aerA</i> chez 19 souches d'<i>Aeromonas</i> d'origine clinique	30
5	Photographie d'un gel de migration des produits d'amplification des gènes <i>AHCYTOEN</i> chez 19 souches d'<i>Aeromonas</i> d'origine clinique et environnementale	31

Introduction

Aeromonas : Bactéries en forme de bacilles, extrémités arrondies, Gram négatif (Hochedez et al. 2009). Ce sont des aéro-anaérobies facultatifs, positifs au test à l'oxydase (Abbot et al. 2003 ; Harf-Monteil et Monteil, 2007 ; Bin Kingombe et al. 2004 ; Laganowska et Kaznowski, 2004 ; Recule et Hirtz, 1994) et parfois mobiles (Laganowska et Kaznowski, 2004). Les premières souches de *Aeromonas* ont été isolées en 1890 par Sanarelli (Harf-Monteil et Monteil, 2007). Depuis, le genre *Aeromonas* appartient à la famille des *Aeromonadaceae* de la classe des γ -protéobactéries (Harf-Monteil et Monteil, 2007). Le genre de *Aeromonas* comprend 17 espèces réparties en 20 groupes de hybridations (Casco et al. 2000 ; Harf-Monteil et Monteil, 2007 ; Harf-Monteil et al. 2004 ; Minana-Galbis et al. 2007). Au cours de ces dernières années, beaucoup de scientifiques orientent leurs recherches en ce sens. Les espèces de *Aeromonas* sont largement distribuées dans les environnements aquatiques et terrestres (Abbey et Etang, 1988 ; Abbey et Etang, 1991 ; Nam et Joh, 2007 ; Minana-Galbis et al. 2007). Les *Aeromonas* prolifèrent dans l'eau douce (Wu et al. 2007), les eaux usées (Shannon et al. 2007 ; Sechi et al. 2002), les eaux marines et l'eau potable (Sechi et al. 2002), ainsi que dans les sols (Wu et al. 2007). Ce genre de bactéries peut être également détecté dans différents aliments dont principalement les crustacés, les poissons, les viandes, le lait cru et les crudités (Clity et al. 2003).

Certaines espèces du genre *Aeromonas* sont des agents pathogènes des poissons (Yogananth et al. 2009) notamment *Aeromonas salmonicida* qui peut parfois être la cause des furunculoses chez cette espèce animale. Elles sont aussi des agents pathogènes des animaux poïkilothermes tels que les reptiles et les amphibiens (Abbey et Etang, 1988 ; Abbey et Etang, 1991 ; Krovacek et al. 1994). Certaines d'autres sont des pathogènes stricts ou des pathogènes opportunistes chez l'homme (Tena et al. 2009 ; Laganowska et Kaznowski, 2004 ; Nam et Joh, 2007 ; Sechi et al. 2002 ; Shannon et al. 2007 ; Minana-Galbis et al. 2007). Chez l'homme, certaines espèces de *Aeromonas* sont responsables de différentes maladies et infections. Ces espèces sont *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii* bv *sobria*, *Aeromonas veronii* bv *veronii*, *Aeromonas jandaei* et *Aeromonas shubertii* (Harf-Monteil et Monteil, 2007). Toutefois, les trois principales

espèces d'intérêt clinique demeurent *A. hydrophila*, *A. caviae* et *A. veronii* bv *sobria* qui sont responsables de plus de 85% des *Aeromonoses* (Harf-Monteil et Monteil, 2007 ; Janda, 1991 ; Janda et Abbott, 1998), elles causent principalement des gastroentérites et des infections cutanées (Tena et al. 2009 ; Janda et Abbott, 1998 ; Sinha et al. 2004), des infections des tissus mous (Hochedez et al. 2009 ; Bin Kimgombe et al. 2004 ; Laganowska et Kaznowski, 2004 ; Wu et al. 2007), des infections hépatobiliaires (Laganowska et Kaznowski, 2004 ; Wu et al. 2007) et plus rarement des bactériémies et des méningites surtout chez les immunodéprimés (Hochedez et al. 2009 ; Janda et Abbott, 1998).

Au cours de ces dernières années et en raison de leur rôle non négligeable dans les infections chez l'homme et les animaux (Hochedez et al. 2009 ; Wu et al. 2007 ; Janda, 1991), les espèces de *Aeromonas* et particulièrement celles qui sont pathogènes ont suscité un intérêt croissant. Cependant, leur rôle n'est pas toujours clair, compte tenu de la complexité de leur taxonomie et du rôle encore incertain de leurs facteurs de virulence potentiellement associés aux infections humaines et animales. En effet, la taxonomie du genre *Aeromonas* a été fréquemment soumise à des changements du fait de la description de nouvelles espèces nouvellement décrites (Küpfer et al. 2006). Les facteurs de virulence essentiellement étudiés chez les *Aeromonas* et plus particulièrement *A. hydrophila*, *A. caviae* et *A. veronii* bv *sobria* sont (i) deux entérotoxines cytotoxiques ; l'une thermostable codée par le gène *ast*, l'autre thermolabile codée par le gène *alt*, (ii) des entérotoxines cytotoxiques codées par les gènes *AHCYTOEN* et (iii) deux hémolysines ; l'hémolysine codée par le gène *aerA* et l'hémolysine codée par le gène *hlyA* (Wu et al. 2007). D'après certaines études, la présence de ces facteurs de virulence majeurs chez certaines espèces de *Aeromonas* n'a pas été toujours corrélée aux infections cliniques, telles que les infections invasives ou la bactériémie (Wu et al. 2007 ; Yu et al. 2004). Cependant, certaines d'autres (Tena et al. 2009) trouvent que les *aeromonoses* sont des infections nosocomiales dans la majorité des cas des patients de leurs études. Tandis que d'autres études (Yogananth et al. 2009) montrent une forte relation entre la présence de ces facteurs de virulence et la pathogénicité des *Aeromonas* qui les contiennent.

L'intérêt de la partie bibliographique du présent mémoire est d'établir un bilan des connaissances et des limites de la taxonomie des espèces du genre *Aeromonas* ainsi que l'état de la description des facteurs de virulence des *Aeromonas* associés aux espèces cliniquement importantes. Partant de ce constat, l'objectif de notre travail est de déterminer le danger associé aux espèces d'*Aeromonas*, en recherchant la présence des principaux gènes de virulence. Au total, 159 souches d'origines clinique et environnementale ont été collectées. Leur identification a été effectuée sur des bases biochimiques grâce à la galerie api20E (BioMérieux, Marcy l'étoile, France) et le système Omnilog ID (BIOLOG, Hayward CA, U.S.A) ainsi qu'une identification génotypique basée sur le séquençage de gène *rpoB*. La détection des gènes de virulence chez ces souches a été réalisée par PCR.

I. Taxonomie

Taxonomie "polyphasique" : méthode très utilisée actuellement vue qu'elle prend en compte le maximum de techniques possibles pour obtenir une résolution fine des différents groupes bactériens. Cette taxonomie a à la fois le phénotype et les informations génomiques.

I.1. Identifications phénotypiques

Selon un article assez récent de Renaud F (Renaud et Aubel, 2007), l'histoire de la taxonomie était clairement décrite : En 1923 est paru le premier ouvrage "moderne" de classification, avec le *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. Ensuite, dans les années 1950, est née la taxonomie numérique qui permettait la manipulation de grandes tables numériques correspondant à des caractères physiologiques, biochimiques ou autres des bactéries. Le phénotype fait référence à la manière dont le génotype est exprimé.

L'identification phénotypique des *Aeromonas* est basée sur un nombre de tests biochimiques. Par exemple, dans le tableau 1, les trois espèces d'intérêt clinique: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* biogroupe Sobria sont distinguées sur la base de 15 caractères biochimiques dont 4 sont invariablement positifs et 2 sont invariablement négatifs (ressemblance phénotypiques dans 40% des tests entre ces espèces). De même, les espèces *A. veronii* biogroupe Veronii et *A. jandaei* ont montré sur ces 15 caractères biochimiques, 6 positifs et 3 négatifs (représentant 60% de ressemblance phénotypique).

Tableau1. Caractères différentiels phénotypiques des *Aeromonas* d'intérêt clinique ^a.

	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. veronii</i> biovar Sobria	<i>A. veronii</i> biovar Veronii	<i>A. jandaei</i>	<i>A. schubertii</i>	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. trota</i>
Caractères phénotypiques								
Indole	+	+	+	+	+	-	+	+
Gaz de glucose	+	-	+	+	+	-	+	+
ADH ^b	+	+	+	-	+	+	+	+
LDC ^c	+	-	+	+	+	+	-	+
ODC ^d	-	-	-	+	-	-	-	-
VP ^e	+	-	+	+	+	-	-	-
Hydrolyse de l'esculine	+	+	-	+	-	-	+	-
Pyrazinamidase	+	+	-	-	-	-	+	-
Hémolyse bêta	+	V ^f	+	+	+	V	V	V
Acidification								
L-arabinose	+	+	-	-	-	-	ND ^g	-
Lactose	-	V	-	-	-	-	+	-
Saccharose	+	+	+	+	-	-	-	-
m-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	-	+	+
Salicine	+	+	-	+	-	-	+	-

^a Harf-Monteil et Monteil (2007).

^b ADH: Arginine Di Hydrolase

^c LDC: Lysine DéCarboxylase

^d ODC: Ornithine DéCarboxylase

^e VP: Voges-Proskauer

^f V: Variable

^g ND: Non Déterminé

L'identification de quelques espèces est problématique car la classification en groupes phénotypiques, sur la base de tests biochimiques conventionnels, diffère de celle obtenue en groupes génétiques (Janda et al. 1996). De plus, plus le nombre de tests biochimiques est augmenté, moins l'identification phénotypique et l'identification génomique sont corrélées (Abbot et al. 2003 ; Abbott et al. 1992 ; Altwegg et al. 1990 ; Janda et al. 1996). Par exemple Abbott et al. (Abbott et al. 2003) ont montré que sur 63 tests biochimiques, les trois espèces d'*Aeromonas* d'intérêt clinique (*A. hydrophila*, *A. caviae* et *A. veronii* biogroupe Sobria) sont invariablement positives sur 5 tests et invariablement négatifs sur 6 autres (17,46% de ressemblance). A l'heure actuelle, les caractères biochimiques utilisés seuls sont insuffisants pour distinguer les espèces d'*Aeromonas* entre elles. La méthode phénotypique apparaît ainsi connue une méthode d'identification et de classification insuffisante pour les espèces d'*Aeromonas*.

I.2. Identifications génotypiques

Les identifications génotypiques reposent sur l'information génétique contenue dans les séquences nucléotidiques. Le génotype est la partie de l'information génétique qui, intervenant avec le milieu extérieur, conduit au phénotype (Renaud et Aubel 2007). Les informations génomiques peuvent provenir de l'hybridation ADN/ADN, et des séquences des gènes conservés tels que l'ADNr16S, *gyrB*, *rpoD*, *rpoB* et récemment *dnaJ*. Les méthodes de biologie moléculaire ont changé la façon de classer les bactéries, et ce en analysant le plus grand nombre possible de leurs caractères génotypiques.

I.2.1. L'hybridation ADN/ADN

L'hybridation ADN/ADN consiste à hybrider la totalité de deux génomes bactériens entre eux, permettant ainsi de mesurer une certaine similarité entre deux molécules d'ADN (Renaud et Aubel 2007). Le degré de relation entre deux souches est basé en premier sur le pourcentage d'hybridation et aussi sur la différence des températures de semi-dénaturation " T_m ". Une hybridation à 70% et un T_m de 4 - 5°C correspond à une identité de séquence de 96%. Actuellement, 17 espèces du genre *Aeromonas* sont classées en 20 groupes d'hybridation bien définis (Tableau2). Une autre espèce : *Aeromonas bivalvium* isolée des mollusques dans une étude de Minana-Galbis et *al.* (Minana-Galbis et *al.* 2007) n'est toujours pas classée dans ce tableau en raison des recherches non terminées sur cette espèce pour pouvoir la classer soit indépendamment ou appartenant à une classe d'espèces déjà prédéfinie et classée. Cependant, l'hybridation ADN/ADN est une méthode longue, fastidieuse, onéreuse et ne permettant de comparer que deux ADN entre eux à la fois.

Tableau 2. Classification des *Aeromonas* en fonction de leurs groupes d'hybridation ^a.

Groupes d'<i>Aeromonas</i>	Groupes d'hybridation (GH)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	GH 1
<i>A. bestiarum</i>	GH 2
<i>A. salmonicida</i>	GH 3
<i>A. caviae</i>	GH 4
<i>A. media</i>	GH 5
<i>A. eucrenophila</i>	GH 6
<i>A. sobria</i>	GH 7
<i>A. veronii</i> bv Sobria	GH 8/10
<i>A. jandaei</i>	GH 9
<i>A. veronii</i> bv Veronii	GH 10/8
<i>Aeromonas</i> sp.	GH 11
<i>A. schubertii</i>	GH 12
<i>Aeromonas</i> sp. group 501	GH 13
<i>A. trota</i>	GH 14
<i>A. allosaccharophila</i>	GH 15
<i>A. encheleia</i>	GH 16
<i>A. popoffii</i>	GH 17
<i>A. culicicola</i>	GH 18
<i>A. simiae</i>	GH 19
<i>A. molluscorum</i>	GH 20

Minana-Galbis *et al.* (2007), Harf-Monteil *et al* (2007 + 2004), Casco *et al* (2000).

1.2.2. Les gènes: 16S, *gyrB*, *rpoD*, *rpoB*, *dnaJ*

Les gènes de ménage constituent de bons marqueurs moléculaires dans l'étude des relations phylogénétiques et taxonomiques des espèces d'*Aeromonas* (Nováková *et al.* 2009, Küpfer *et al.* 2006).

Le gène de l'ADNr16S (1650 pb) est le plus souvent utilisé en taxonomie moléculaire. Ce gène est présent chez toutes les bactéries (universel). Toutes les molécules de ce gène ont la même structure secondaire ce qui fait que si des modifications de structure primaire se reproduisent, elles doivent toujours respecter les positions permettant les repliements (Renaud et Aubeil, 2007). De plus, le nombre et la diversité considérables de séquences disponibles de ce gène dans les bases de données permettent des comparaisons rapides et efficaces. L'analyse du gène de l'ADNr16S a indiqué que le genre *Aeromonas* est composé d'un groupe d'espèces très proches génétiquement (98.7%) (Soler et al. 2004), les séquences déterminant certaines espèces ne différant que par quelques nucléotides (Küpfer et al. 2006). Les espèces les plus proches par taxonomie du gène de l'ADNr16S sont notamment *A. schubertii* et *Aeromonas encheleia* (Saavedra et al. 2006), ceci se confond avec les études réalisées par Martinez-Murcica et al. (Martinez-Murcica et al. 1999) ainsi que Küpfer et al. (Küpfer et al. 2006) (Figure 1).

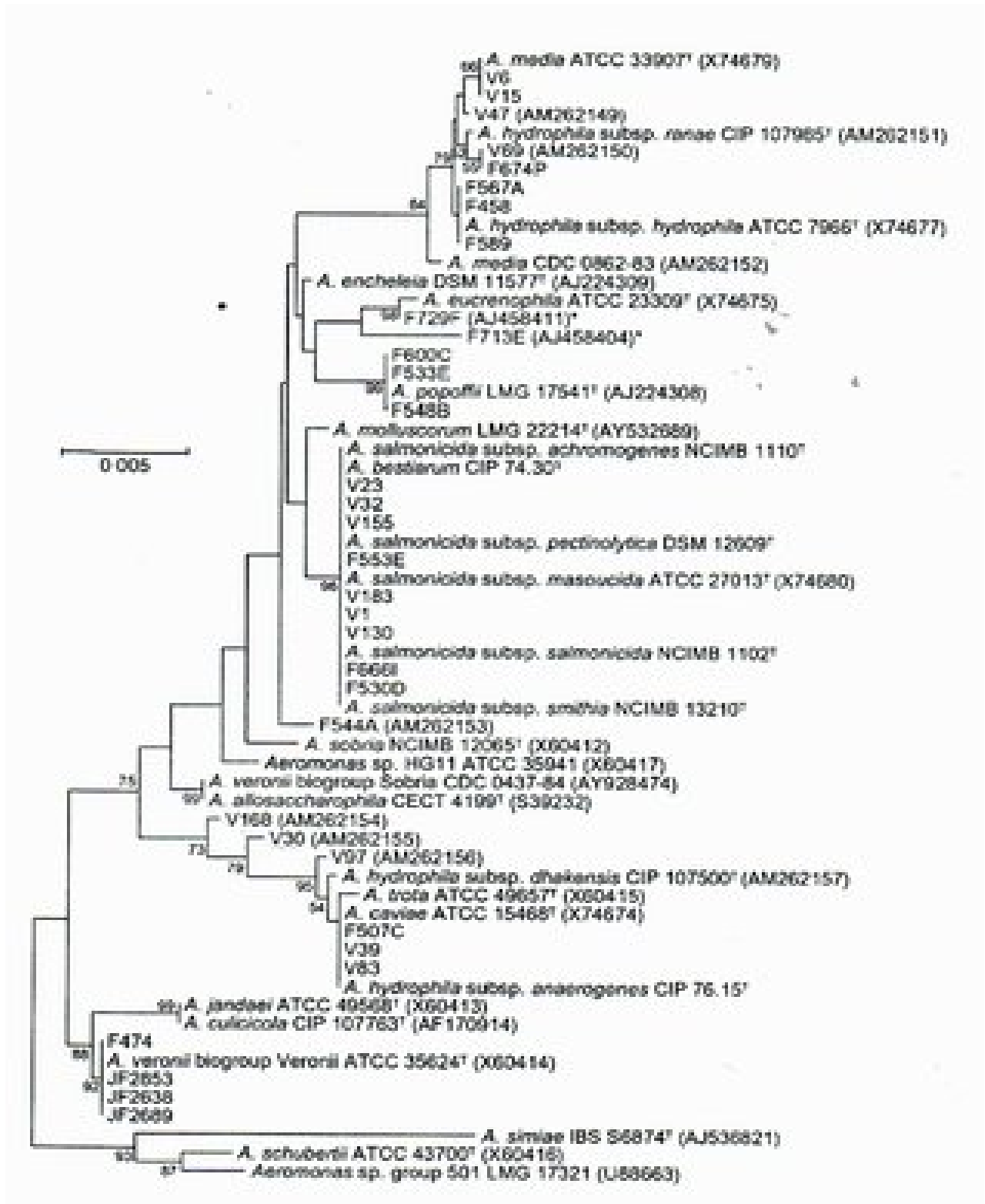


Figure 1. Arbre phylogénétique neighbour-joining non enraciné des espèces *Aeromonas* basé sur la séquence du gène de l'ADNr16S (Küpfer et al. 2006).

Cependant, la phylogénie des *Aeromonas* ne repose pas uniquement sur l'utilisation du marqueur 16S. Les marqueurs *gyrB* (sous unité de l'ADN gyrase, type II d'ADN topoisomérase), *rpoD* (sous unité de facteur σ^{70} , un des facteurs sigma qui confère un promoteur de transcription spécifique à l'initiation sur l'ARN polymérase), *rpoB* (sous unité de l'ARN polymérase) et récemment *dnaJ* (gène codant la protéine HSP 40) sont également utilisés.

L'analyse des séquences des gènes *gyrB* et *rpoD* a permis de mieux clarifier les relations phylogénétiques interspécifiques au sein des *Aeromonas* (Küpfer et al. 2006 ; Soler et al. 2004). Le taux des substitutions des gènes *gyrB* et *rpoD* est similaire (<2%) ainsi que le nombre des positions variables (32% et 34% respectivement) (Soler et al. 2004). L'utilisation du marqueur *gyrB* est plus résolutive pour différencier le groupe *Aeromonas* sp. GH11 et les espèces *A. encheleia*, *A. veronii*, *A. culicicola* et *A. allosaccarophila* entre eux, alors que l'utilisation du marqueur *rpoD* permet de différencier les espèces *Aeromonas salmonicida* et *Aeromonas bestiarum* (Soler et al. 2004).

D'après Saavedra et al. (Saavedra et al. 2006), la comparaison des séquences des gènes ménagers est une approche inestimable non seulement pour la classification des espèces mais aussi pour l'identification d'isolats étroitement liés. Les séquences des gènes *gyrB* et *rpoD* seraient plus variables que les séquences du gène de l'ADNr16S qui seraient plus conservées, permettant ainsi une meilleure distinction des espèces proches. De même, Küpfer et al. (Küpfer et al. 2006) ont trouvé que l'analyse comparative des gènes *gyrB* et *rpoB* permet de clarifier les relations de la taxonomie et la phylogénie des souches d'*Aeromonas* isolées de l'homme, des animaux et de l'environnement, tandis que l'ADNr16S définit les isolats seulement au niveau du genre.

Les études de Nhung et al. (Nhung et al. 2007) ont montré que la similarité de séquence moyenne du gène *dnaJ* entre les espèces d'*Aeromonas* était de 89.2% en regroupant les espèces d'*A. allosaccarophila* et le groupe d'*Aeromonas* sp. GH11, qui étaient différenciés en utilisant le gène *gyrB* dans l'étude de Soler et al. (Soler et al. 2004). La combinaison des arbres phylogénétiques basés sur les séquences des gènes *gyrB* avec *rpoD* ou celles des gènes *gyrB* avec *rpoB* confirme souvent la

position et la distance des espèces dans les embranchements des arbres individuels (Küpfer et al. 2006 ; Saavedra et al. 2006). La similarité de séquence moyenne du gène *gyrB* obtenue entre les espèces d'*Aeromonas* (92.2%) est comparable à celle du gène *rpoD* (89.3%) (Soler et al. 2004) et du gène *dnaJ* (89.2%) (Nhung et al. 2007) et moins élevée que celle obtenue en comparant les séquences du gène de l'ADNr16S (98.7%).

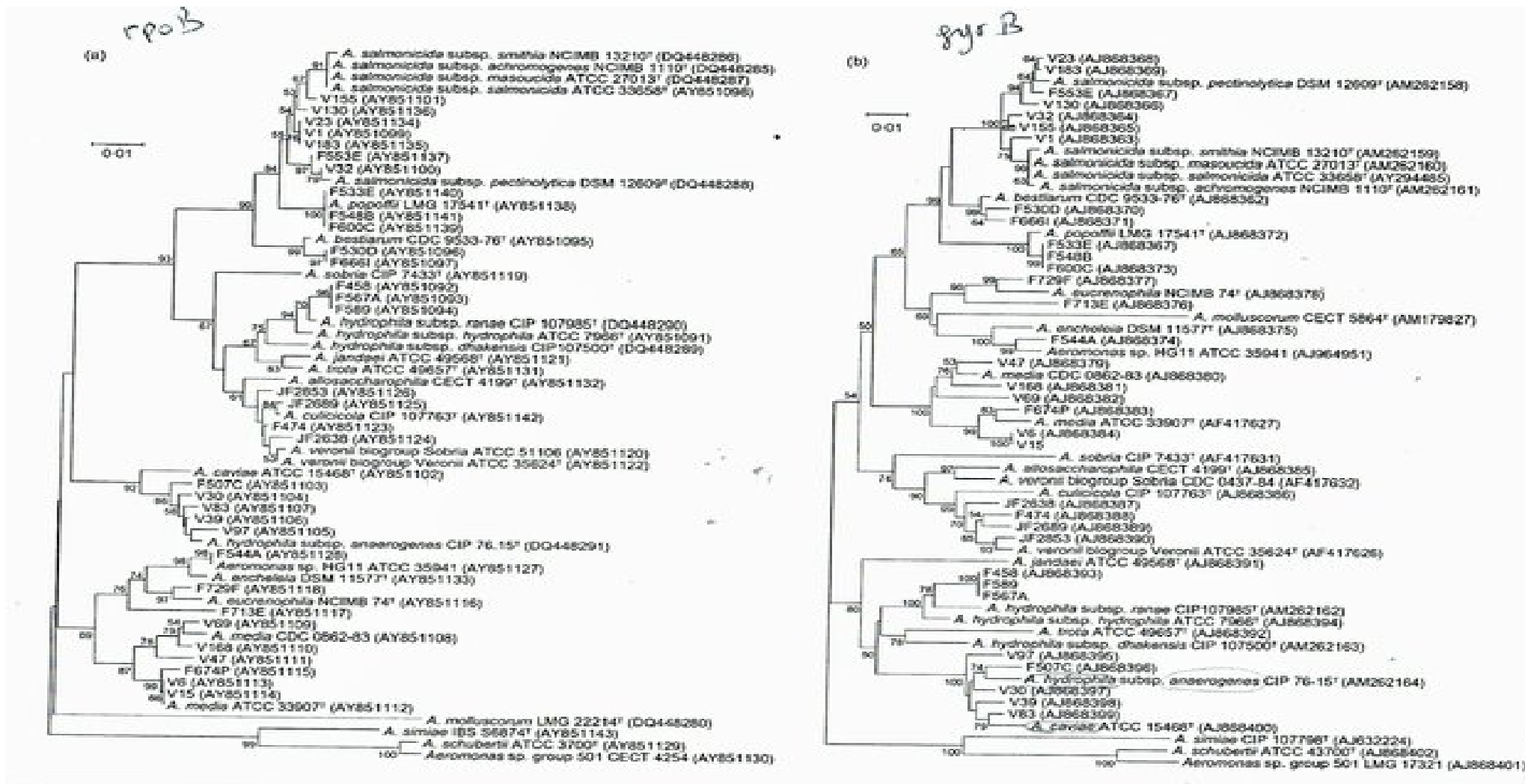


Figure 2. Arbres phylogénétiques neighbour-joining non enracinés des espèces *Aeromonas* basés sur les séquences des gènes *rpoB* (a) et *gyrB* (b) (Küpfer et al. 2006).

Toutes ces différences compliquent la taxonomie des espèces d'*Aeromonas* ainsi que leur classification. En raison du rôle pathogène important de certaines espèces dans les infections cliniques, il est nécessaire d'étudier leurs facteurs de virulence.

II. Facteurs de virulence

La virulence de la bactérie peut être évaluée en confrontant seulement la bactérie avec un hôte (Froquet et al. 2007). La plupart des facteurs de virulence produits par les espèces d'*Aeromonas*, notamment les trois espèces d'intérêt clinique (*A. hydrophila*, *A. caviae* et *A. veronii* biogroupe Sobria) sont liés à la pathogénicité chez l'homme, à l'exception d'un seul facteur, la couche S d'*A. salmonicida* qui est essentiellement lié à la pathogénicité de cette espèce chez les poissons (Janda, 1991).

II.1. Facteurs d'adhérence

Les *Aeromonas* ont la capacité d'adhérer aux érythrocytes (Janda, 1991). Cette capacité d'adhésion est liée à la présence et au type de *pili* (Kirov et al. 2000), au flagelle polaire (37kDa), à la formation de flagelles latéraux et les OMP (*outer membrane proteins*) (Harf-Monteil et Monteil, 2007). Les isolats cliniques des *Aeromonas* ont une faible adhésion aux cellules intestinales 407 humaines (moins de 5 bactéries intestinales liées par cellule) par rapport aux isolats environnementaux des *Aeromonas* (plus de 20 bactéries par cellule) (Krovacek et al. 1994) (Figure 3).

Ceci suggère que l'environnement peut être source d'*Aeromonas* capables de causer les infections chez l'homme. Les études effectuées par Sechi et al. (Sechi et al. 2002) ont montré que 50% des souches d'*A. hydrophila* sont capables d'adhérer aux cellules épithéliales, parmi lesquelles 40% sont d'origine clinique et 33% d'origine environnementale. De plus, 66% des souches cliniques et 17% des souches environnementales d'*A. hydrophila* seraient cytopathogènes. Chez l'espèce d'*A. sobria*, seulement 12.5% des souches d'origine clinique sont capables d'adhérer aux cellules épithéliales contre 67% des souches d'origine environnementale.

Toutefois, la proportion de souches cliniques d'*A. sobria* cytopathogènes demeure plus importante (87.5%) comparée aux souches d'origine environnementale

(67%) (Sechi et al. 2002). Ceci explique le rôle des *Aeromonas* dans le développement des furoncles et dans les infections des plaies.

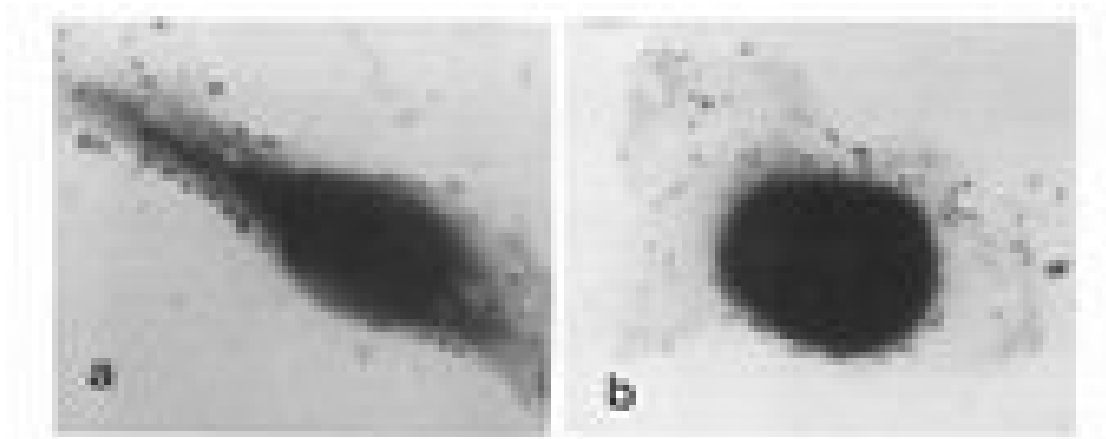


Figure 3. Adhésion d'*A. hydrophila* aux cellules intestinales 407 humaines (Krovacek et al., 1994).

(a) adhésion localisée de *A. hydrophila* 2H, isolée d'un patient avec la diarrhée. Bactérie adhérente au long des cellules. (b) adhésion diffusée de *A. hydrophila* 6SS, isolée de sédiment de mer. Bactérie adhérente au tour des cellules et sur la matrice cellulaire.

II.2. Pili

Les *pili* sont des *adhésines* avec deux formes structurales, soit des *pili* "droits" ou bien d'autres *pili* qui sont plus courbés qualifiés de "souples" (Janda, 1991). Les *pili* de type IV existent en deux familles; *Bfp* et *Tap*. Ils ont été purifiés des espèces *Aeromonas* associées aux diarrhées et ils sont considérés comme facteurs de colonisation intestinale (Kirov et al. 2000), du fait qu'ils permettent aux bactéries *Aeromonas* d'adhérer à différents types de cellules (cellules intestinales humaines 407, cellules de lignée hépatique), et aux tissus intestinaux humains. Ce pouvoir d'adhésion rend les *pili* importants pour la virulence des bactéries *Aeromonas*.

Le *pili* droit est exprimé dans toutes les conditions, au contraire du *pili* flexible qui est régulé en fonction de l'environnement et exprimé au maximum à 22°C dans un milieu liquide et sous conditions de réduction de fer, ce qui suggère que la synthèse du *pili* flexible peut être déclenchée par les conditions environnementales (Janda, 1991). En 2002, Sechi et al. (Sechi et al. 2002) ont montré par PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que le gène *BfpG* était présent dans 4 souches

environnementales sur un ensemble de 46 souches étudiées (18 cliniques et 28 environnementales), tandis que le gène *BfpA* n'était observé dans aucune des souches étudiées.

II.3. OMP et flagelles

Les OMP sont des protéines de la membrane externe et les flagelles, des prolongements cytoplasmiques assurant la mobilité des cellules. Tous deux sont composés de protéines complexes. Cité par Janda (Janda, 1991), Aoki et Holland ont analysé la composition des OMP des souches *A. hydrophila* et *A. salmonicida*. Pour *A. hydrophila*, les OMP se sont avérées hétérogènes d'une souche à l'autre, quoique la plupart des souches contenait une même OMP de 36 kDa. Au contraire, les OMP des souches *A. salmonicida* se sont avérées similaires et la molécule la plus abondante était une OMP de 32 kDa. Kuijper *et al.* (Kuijper *et al.* 1989) ont étudié les profils des OMP de 46 souches d'*Aeromonas* d'origine fécale. La majorité des OMP comportaient un poids moléculaire compris entre 25 et 45 kDa, les souches d'*A. caviae* révélant des profils OMP assez similaires, au contraire des souches d'*A. hydrophila* et d'*A. veronii* biotype Sobria révélant des profils OMP très hétérogènes.

Il existe des flagelles latéraux et des flagelles polaires. Les premiers permettent principalement le déplacement des bactéries vers les cellules cibles et les deuxièmes permettent l'adhérence des bactéries à ces cellules cibles. Ces flagelles sont importants pour les *Aeromonas* en raison de leur capacité de former des biofilms sur les surfaces inertes, ce qui explique leur association aux gastroentérites (Kirov *et al.* 2002). Harf-Monteil *et al.* (Harf-Monteil *et al.* 2003) ont observé une adhérence des bactéries *Aeromonas* aux cellules de lignée hépatique et la présence de flagelles latéraux pour des souches d'*A. caviae* isolées de diarrhées. Au contraire, Aguilera-Arreola *et al.* (Aguilera-Arreola *et al.* 2007) ont trouvé que le gène de la flagelline *lafA* du flagelle latéral montrait une faible fréquence chez *A. caviae* et *A. veronii* en comparaison avec *A. hydrophila*. Les flagelles latéraux codés par le gène *laf* sont essentiels pour la mobilité et pour la formation de biofilms (Kirov *et al.* 2002) et constituent un facteur de colonisation important (Aguilera-Arreola *et al.* 2007). Au moins 49% des isolats des espèces *Aeromonas* associés aux diarrhées humaines produisent le flagelle latéral (Kirov *et al.* 2002). Les gènes des flagelles latéraux

présentent une distribution spécifique d'espèces et spécifique géographiquement (Aguilera-Arreola *al.* 2007).

II. 4. Système de sécrétion de type III (TTSS)

Les TTSS sont des systèmes de sécrétion permettant de libérer les toxines bactériennes directement dans la cellule hôte. Ils sont communs dans les souches pathogènes des bactéries à coloration de Gram négative (*E.coli* entéropathogène, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Yersinia* spp., et *Pseudomonas aeruginosa*) (Chacon *et al.* 2004 ; Vilches *et al.* 2004). Plusieurs études ont tenté d'élucider l'existence du TTSS dans les espèces *Aeromonas* (Burr *et al.* 2002 ; Burr *et al.* 2003 ; Burr *et al.* 2005 ; Chacon *et al.* 2004 ; Yu *et al.* 2004). Un TTSS fonctionnel situé sur un grand plasmide thermolabile de virulence chez *A. salmonicida* et situé dans le chromosome chez *A. hydrophila* AH-1, a été reporté (Burr *et al.* 2002 ; Burr *et al.* 2003 ; Chacon *et al.* 2004 ; Yu *et al.* 2004). Ce TTSS secrète une toxine ADP-ribosylante codé par le gène *aexT* qui *in vitro* donne un effet cytotoxique (Vilches *et al.* 2004 ; Yu *et al.* 2004).

En outre, d'autres études ont prouvé l'existence d'autres gènes de TTSS (*ascF-ascG*) dans les espèces cliniques mésophiles (Chacon *et al.* 2003) principalement dans *A. hydrophila* (Yu *et al.* 2004) et *ascV* était trouvé le plus souvent dans *A. veronii* biogroupe Sobria (Yu *et al.* 2004). Burr *et al.* (Burr *et al.* 2002 ; Burr *et al.* 2003 ; Chacon *et al.* 2004) ont démontré que les TTSS jouent un rôle important dans la cytotoxicité des espèces du genre *Aeromonas* dans les études *in vitro*, ou dans les modèles de poissons. La prévalence des TTSS est significativement plus faible chez *A. caviae* (0-14%) que chez *A. hydrophila* (78%) (Vilches *et al.* 2004). Toutefois, le rôle des TTSS dans le développement des maladies invasives humaines est resté indéterminé (Yu *et al.* 2004).

II.5. Les hémolysines

Les hémolysines (*hly*) sont des substances capables de former des pores dans la membrane de la cellule cible. Chez les *Aeromonas*, les hémolysines apparaissent pour être non seulement des substances hémolytiques mais aussi des toxines cytotoxiques et cytotoniques (Yogananth *et al.* 2009 ; Janda, 1991), cette multifonction rend l'interprétation des données difficiles. D'après Sechi *et al.* (Sechi *et*

al. 2002), ces molécules sont présentes dans 20% des souches cliniques d'*A. hydrophila* et 16.6% dans celles environnementales, un pourcentage qui est assez important, en outre 60% des souches cliniques *A. sobria* produisent l'hémolysine (Sechi et *al.* 2002). Dans cette étude, l'effet cytopathogène était induit dans le cas des cellules de lignée hépatique infectées par les souches d'*Aeromonas* produisant l'hémolysine.

L'aérolysine (*aer*) ou encore appelée -hémolysine a été trouvé chez une souche d'*A. caviae* isolée d'une bactériémie (Harf-Monteil et *al.* 2003). *In vitro*, cette toxine nécessitait une activation par la furine pour produire un effet hémolytique (Gurcel et *al.* 2006 ; Harf-Monteil et *al.* 2003). Dans plusieurs souches d'*Aeromonas*, notamment *A. hydrophila* et *A. sobria*, les hémolysines ont la capacité de lyser les érythrocytes quand el les sont cultivées sur gélose au sang de mouton (Janda, 1991). Certaines études ont démontré que les gènes Aérolysine-hémolysine sont principalement présents dans *A. hydrophila* (Wu et *al.* 2007), alors que d'autres études ont trouvé que ces gènes sont plus fréquents chez *A. caviae* et *A. veronii* que chez *A. hydrophila* (Aguilera-Arreola et *al.* 2007) suggérant que ces toxines suffisent à provoquer la diarrhée chez les patients colonisés avec *A. caviae* et *A. hydrophila*. En outre, les études de Bin Kingombe *et al.* (Bin Kingombe et *al.* 1999), ont montré l'absence de ces gènes dans les souches d'*A. caviae*, *A. jandaei* et *A. trota*. Ces différents résultats ne permettent pas clairement d'établir le rôle pathogène des souches d'*Aeromonas*.

II.6. Les entérotoxines

Trois entérotoxines ont contribué variablement à l'entéro-pathogénicité dans un modèle murin: les entérotoxines cytotoxiques (*AHCYTOEN*), les entérotoxines thermolabiles (*alt*) et les entérotoxines thermostables (*ast*), (Saavedra et *al.* 2006). Après l'adhérence aux cellules intestinales, les bactéries secrètent les entérotoxines, ce qui provoque la diarrhée. L'entérotoxine cytotoxique (*AHCYTOEN*) est plus souvent rencontrée chez *A. veronii* biogroupe *Sobria* (Vilches et *al.* 2004). Les *AHCYTOEN* sont présentes dans les souches environnementales d'*A. hydrophila* mais dans aucune des souches cliniques (Sechi et *al.* 2002). Ce qui suppose que l'environnement peut être un réservoir des espèces d'*Aeromonas* potentiellement virulentes. De plus, Aguilera-Arreola *et al.* (Aguilera-Arreola et *al.* 2007) ont trouvé

que les gènes des toxines *ast* et *alt* étaient notoirement absents des groupes *A. caviae* et *A. veronii* mais étaient présents chez la majorité des isolats de *A. hydrophila*, confirmant les résultats de Wu *et al.* (Wu *et al.* 2007) (Tableau 3).

Les études de Wu *et al.* (Wu *et al.* 2007) qu'il n'y a de relations entre la présence des gènes d'*AHCYTOEN*, *ast*, *alt* et même les autres gènes précédemment décrits tels qu'*aerA*, *hlyA*, *aexT* ou *ascF-ascG* dans les isolats d'*Aeromonas* et le développement des infections extra-intestinales ou la bactériémie.

Tableau3. Distribution des gènes putatifs de virulence dans des isolats cliniques d'*Aeromonas*^a.

Gènes de virulence	Nombre (%) des isolats avec des gènes de virulence		
	<i>A. hydrophila</i> Complexe, n = 60	<i>A. caviae</i> Complexe, n = 27	<i>A. veronii</i> bigroupe Sobria Complexe, n = 28
<i>AHCYTOEN</i>^b	40 (67)	5 (19)	27 (96)
<i>aerA</i>^c	27 (45)	2 (7)	6 (21)
<i>hlyA</i>^d	47 (77)	0 (0)	0 (0)
<i>ast</i>^e	15 (25)	0 (0)	0 (0)
<i>alt</i>^f	43 (72)	6 (22)	2 (7)
<i>ascV</i>^g	13 (22)	3 (11)	15 (54)
<i>aexT</i>^h	16 (27)	8 (30)	8 (29)
<i>ascF-ascG</i>ⁱ	16 (27)	3 (11)	2 (7)

^a Wu *et al.* (2007).

^b ***AHCYTOEN***: Entérotoxine cytotoxique

^c ***aerA***: Aérolysine A

^d ***hlyA***: Hémolysine A

^e ***ast***: entérotoxine thermostable

^f ***alt***: entérotoxine thermolabile

^g ***ascV***: Composant du système de sécrétion de type III

^h ***aexT***: Composant du système de sécrétion de type III

ⁱ ***ascF-ascG***: Composant du système de sécrétion de type III

II.7. Les enzymes extracellulaires

Certaines souches d'*Aeromonas* produisent des protéases et des lipases. La fréquence de production de ces enzymes n'est pas associée à la source de l'isolat (Abbey et Etang, 1991). Dans les souches d'*Aeromonas*, la fréquence de production de ces enzymes est semblable à la production des hémolysines et des entérotoxines.

II.7.1. Les protéases

Les protéases sont des enzymes dont certaines sont capables d'endommager les tissus et favorisant ainsi l'établissement et l'invasion de l'infection. La plupart des souches d'*Aeromonas* secrètent deux protéases majeures, une appartenant à la famille des protéases sérine thermolabiles et l'autre à la classe générale des métalloprotéases thermostables (Janda, 1991). La virulence due à la protéase *ahyA* chez *A. hydrophila* était prouvée par l'augmentation de la DL50 du mutant *ahyA*. Tandis que, chez *A. salmonicida* la virulence due à la sérine protéase *aspA* est restée indéterminée en raison de la diminution de virulence du mutant *aspA* (Casco et al. 2000). Ce qui suggère que ces différences existent chez les protéases de la même classe, et qui sont produites par différentes espèces d' *Aeromonas*.

II.7.2. Les lipases

Les lipases sont des enzymes capables d'effectuer l'hydrolyse d'un triglycéride en glycérol et en acides gras, donc important pour la nutrition des bactéries. Chez de nombreuses bactéries à coloration de Gram négative, elles sont souvent associées à des dommages intestinaux. Les gènes de lipase ont été communément présents dans la plupart des souches *Aeromonas* (Chacon et al. 2003). La virulence des lipases chez *A. hydrophila* a été démontrée selon Merino et al. (Merino et al. 1999) par leur activité cytotoxique sur les lignées cellulaires et l'augmentation de la DL50 à la mutation des gènes *plc* chez les poissons.

I. Matériel et méthodes

I.1. Collection de souches, culture et conservation

* **Lieu de travail** : Laboratoire de microbiologie-infectiologie

Equipe 6 : Bactéries pathogènes opportunistes et environnement
UMR 5557 CNRS . UCBL . ENVL

En collaboration avec le CBVH : Collège de Bactériologie, Virologie et d'Hygiène Hospitalière.

Dans notre étude, au total 159 souches bactériennes d'origines clinique et environnementale. Suite à une étude préalablement réalisée au laboratoire (2006), ces souches ont été collectées et cultivées sur des géloses au sang de mouton (BioMérieux, Marcy l'étoile, France) pendant 24h à 37°C. Leur appartenance à la famille des *Aeromonadaceae* et au genre *Aeromonas* a été vérifiée par différents tests biochimiques: coloration de Gram, test oxydase, type respiratoire et résistance au composé vibriostatique O/129. Les souches ont ensuite été conservées à -80°C dans un bouillon cœur-cerveille comportant 25% de glycérol.

Pour confirmer l'appartenance de ces souches à leurs famille et genre précédemment cités, nous avons repiqué et cultivé toutes les souches conservées sur gélose au sang de mouton (BioMérieux, Marcy l'étoile, France) pendant 24h à 37°C, refais les tests de coloration de Gram, et le test d'oxydase ainsi que l'examen microscopique (Microscope optique objectif x400). Nous avons enfin conservé toutes les souches à -80°C dans un bouillon cœur-cerveille comportant 25% de glycérol.

I.1.1. Souches d'origine clinique

Grâce à la collaboration du Collège de Bactériologie de Virologie et d'Hygiène Hospitalière (CBVH) qui regroupe de nombreux centres hospitaliers en France, 108 souches d'origine clinique ont été collectées, et ont été une bonne partie de la plateforme de notre étude. Les données cliniques associées à ces souches et fournies par le CBVH sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4: Contexte clinique des 108 souches d'*Aeromonas* d'origine clinique

Contact hydrique		Pathogène et forme clinique	
Oui	N= 19 cas	16	cutané
		1	gastroentérites
		2	autres
Non	N= 50 cas	16	bactériémie
		14	gastroentérites
		14	cutané
		6	autres
Non déterminé	N= 39 cas	29	pathogène mais forme clinique non déterminée
		10	non pathogène

I.1.2. Souches d'origine environnementale

Nous avons voulu travaillé sur de différentes origines environnementales. Pour cela, 51 souches d'origine environnementale ont été collectées et étudiées: 17 souches provenant d'escargots d'élevage (Maine et Loire, 1995 . France .) qui est une origine à la fois animalière et alimentaire, 17 souches provenant du lac d'Annecy (Haute Savoie . France .) qui est une eau douce et 17 souches provenant de la lagune d'épuration de Montracol (Ain . France .), classée dans les eaux usées.

I.2. Identification des souches

I.2.1. Identification des souches par la galerie API20E

En première approche et afin d'identifier les souches de cette étude, la galerie API20E (BioMérieux, Marcy l'étoile, France), qui permet une identification bactérienne sur la base de 21 tests biochimiques, a été utilisée.

I.2.2. Identification des souches par Omnilog ID

Le système BIOLOG (BIOLOG, Hayward CA, U.S.A) représenté par son programme et nouveau matériel connu sous le nom Omnilog ID ; pour l'identification biochimique des microorganismes a été utilisé sur l'ensemble des souches étudiées.

Le système BIOLOG repose sur la capacité d'une souche à métaboliser chacun des 95 substrats qu'il contient. Cette capacité est mesurée par la présence ou l'absence d'une coloration violette au cours du temps. Cette coloration est due à l'oxydation du tétrazolium violet par la respiration cellulaire des bactéries. Le protocole a été réalisé conformément aux indications du fournisseur "BIOLOG" par le laboratoire AES Chemunex (Bruz, France) qui nous a invité à des jours de formations qui nous ont permis de mieux comprendre le fonctionnement de ce matériel (Annexe 2).

Deux repiquages successifs des souches ont été réalisés sur gélose au sang de mouton (BioMérieux, Marcy l'étoile, France). Une suspension bactérienne a été réalisée dans 12 mL de bouillon d'inoculation (GN2/GP2, BIOLOG, Hayward CA, U.S.A) afin d'obtenir un inoculum de turbidité équivalente à 52% (50-55) de transmission mesurée au turbidimètre. Des microplaques de 96 puits prêtes à l'emploi et composées de 95 substrats carbonés ont étéensemencées avec 150 µL d'inoculum par puit. L'incubation a été faite à 30°C pendant 22 h. Les plaques ont été lues à partir de la quatrième heure d'incubation et de façon régulière pendant les 22 h. Le résultat de l'identification a été obtenu par comparaison du profil de chaque souche avec le profil des souches de chaque espèce d'*Aeromonas* présente dans la base de données. Les résultats ont été enregistrés sur le logiciel ID de l'ordinateur BIOLOG et imprimés à la fin de la confirmation de l'espèce. Un exemple de fiche d'identification éditée est présenté dans l'annexe 2.

I.2.3. Identification des souches par le séquençage du gène *rpoB*

Comme le gène 16S ADNr, le gène *rpoB* (sous-unité ARN polymérase) est également un gène de ménage couramment utilisé pour l'identification moléculaire des espèces du genre *Aeromonas*. Ce gène a tout d'abord été amplifié par PCR (Polymerase chain reaction) selon le protocole de Küpfer et *al.* (Küpfer, Kuhnert et *al.* 2006). Les séquences du couple d'amorce utilisé sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5: Gènes de virulence étudiés, amorces et taille des fragments

Gènes amplifiés	Séquences des amorces	Souche type: Témoin positif	Taille du fragment (en pb)	Références bibliographiques
<i>rpoB</i>	rpoB-f: 5'-GCAGTGAAAGARTTCTTTGGTTC-3' rpoB-r: 5'-GTTGCATGTTTGTACCCAT-3'	<i>A. hydrophila</i>	560	Küpfer et al (17)
<i>ast</i>	Ast-f: 5'-TCTCCATGCTTCCCTTCCA CT-3' Ast-r: 5'-GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG-3'	<i>A. hydrophila</i>	328	Sen et al (22)
<i>alt</i>	Alt-f: 5'-TGACCCAGTCCTGGCACGGC-3' Alt-r: 5'-GGTGATCGATCACCACCAGC-3'	<i>A. hydrophila</i>	443	Sen et al (22)
<i>AHCYTOEN</i>	AHCYTOEN-f: 5'-GAGAAGGTGACCACCAAGAACA-3' AHCYTOEN-r: 5'-AACTGACATCGCCCTTGA ACTC-3'	<i>A. hydrophila</i>	232	Wu et al (27)
<i>aerA</i>	aerA-f: 5'-GCWGARCCCR TCTATCCW-3' aerA-r: 5'-TTTCTCCGGT AACAGGATTG-3'	<i>A. hydrophila</i>	252	Wu et al (27)
<i>hlyA</i>	hlyA-f: 5'-GGCCGGTGGCCCGAA GATACGGG-3' hlyA-r: 5'-GGCGGCGCCGGA GGAGACGGG-3'	<i>A. hydrophila</i>	597	Wu et al (27)

R: A/G W: A/T

Les PCR ont été effectuées dans un volume réactionnel de 50 µL, contenant 25 µL de mix PCR (Promega, Charbonnières les Bains . France . Annexe 3), 2,5 µL de chaque amorce à une concentration de 10 µM chacune, 5 µL de suspension bactérienne et 15 µL d'eau distillée stérile. Le programme d'amplification d'ADN a été le suivant: une dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min, 25 cycles comprenant chacun 25 sec de dénaturation à 95°C, 30 sec d'hybridation à 55°C et une minute d'élongation à 72°C. L'amplification PCR a été terminée par une élongation à 72°C pendant 10 min.

Après amplification, 8 µL de chaque produit de amplification ont été mélangés avec 2 µL d'une solution de dépôt colorée (Annexe 4), et ont été déposés dans un gel à 0.8% d'agarose dans du tampon TAE 1X (Annexe 4). La migration des amplifiats par électrophorèse a été effectuée pendant 1h30 à 120V en parallèle à un marqueur de poids moléculaire, de "100 pb" (Fischer scientific/Invitrogen, Illkirch, France). Les fragments amplifiés ont été visualisés sous UV et photographiés.

Les amplifiats obtenus ont été séquencés (sur les deux brins) chez Biofidal Inc. (Vaulx-en-Velin, France). Les séquences obtenues ont été assemblées et comparées en ligne aux bases de données par utilisation des programmes du site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> ou BIBI.

I.3. Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique des 159 souches d'*Aeromonas* a été extrait d'après une méthode appliquée au laboratoire (Kodjo et al. 1997). Celle-ci repose sur une lyse douce des cellules suivie d'une purification au phénol-chloroforme, une précipitation à l'éthanol absolu et un lavage à l'éthanol 70%. Le protocole est détaillé dans l'Annexe 1. La concentration des ADNs a été dosée par spectrophotométrie à longueur d'onde 260 nm dans le laboratoire d'Hygiène et Industrie Des Aliments d'Origine Animale (HIDAOA) situé lui aussi à l'École Nationale Vétérinaire de Lyon.

I.4. Détection des gènes de virulence par PCR

I.4.1. Sélection des amorces

Les gènes de 5 facteurs de virulence décrits chez différentes espèces du genre *Aeromonas* ont été recherchés par PCR: les gènes d'hémolysines (*aerA* codant l'aérolysine et le gène *hlyA* codant l'hémolysine), les gènes d'entérotoxines cytotoxiques (le gène *ast* codant l'entérotoxine thermostable et le gène *alt* codant l'entérotoxine thermolabile) et les gènes d'entérotoxines cytotoxiques *AHCYTOEN*.

Les 5 couples d'amorces utilisés ont été définis par Sen et *al.* (Sen et Rodgers, 2004) et Wu et *al.* (Wu et *al.* 2007) et sont présentés dans le tableau 5 ultérieurement.

I.4.2. Conditions de PCR

Pour chaque couple d'amorce, des mises au point ont été faites sur la souche type *A.hydrophila subsp hydrophila* CECT 839, souche connue pour la présence des différents gènes étudiés et dont la séquence était disponible dans la base de données GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Cette souche a été utilisée comme témoin positif dans chacune des expériences PCR réalisées. Un témoin négatif réalisé avec tous les réactifs sans ADN a été inclus. Le volume total de PCR a été de 25 µL, contenant 12,5 µL de mix PCR (Promega, Charbonnières les Bains . France . Annexe 3), 2,5 µL de chaque amorce à une concentration de 10 µM chacune, 2 µL d'ADN (environ 100 ng) et 5,5 µL d'eau distillée stérile.

Deux programmes d'amplification d'ADN ont été utilisés:

- Pour les gènes *ast* et *alt*, le programme PCR utilisé comprend:

Une dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min, 25 cycles comprenant chacun 25 sec de dénaturation à 95°C, 30 sec d'hybridation à 55°C et une minute d'élongation à 72°C. L'amplification PCR a été terminée par une élongation à 70°C pendant 5 min.

- Pour les gènes *AHCYTOEN*, *aerA* et *hlyA*, le programme utilisé comprend:

Une dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min, 30 cycles comprenant chacun une minute de dénaturation à 95°C, une minute d'hybridation à 55°C et une minute d'élongation à 72°C. L'amplification PCR a été terminée par une élongation à 72°C pendant 10 min.

Après amplification, 8 μ L de chaque produit de l'amplification ont été mélangés avec 2 μ L d'une solution de dépôt colorée (Annexe 4), et ont été déposés dans un gel à 0.8% d'agarose dans du tampon TAE 1X (Annexe 4). La migration des amplifiats par électrophorèse a été effectuée pendant 1h30 à 120V en parallèle à un marqueur de poids moléculaire de "100 pb" (Fischer scientific/Invitrogen, Illkirch, France). Les fragments amplifiés ont été visualisés sous UV et photographiés.

Un résultat a été considéré comme positif si la taille du fragment obtenu correspondait à la taille de celui obtenu avec le témoin positif, et si le témoin négatif (sans ADN), ne présentait aucune bande.

I.3.4. Confirmation par le séquençage

Afin de valider les différentes PCR réalisées, deux amplifiats obtenus avec les différents couples d'amorces et présentant la taille attendue par comparaison au témoin positif, ont été séquencés (sur les deux brins) chez Biofidal Inc. (Vaulx-en-Velin, France).

II. Conclusion

Dans la dernière décennie et jusqu'à présent, les scientifiques donnent et partagent un intérêt accru à la taxonomie des *Aeromonas*, quelle soit phénotypique ou génotypique, mais malgré cela, elle manque à l'heure actuelle, de vigueur et de robustesse afin de définir et classer convenablement et parfaitement les espèces d'*Aeromonas*, surtout celles qui présentent une importance en santé publique telles que *A. hydrophila*, *A. caviae* et *A. veronii* biogroupe Sobria. Pour ces espèces, la définition et l'étude de nouveaux marqueurs permettrait d'améliorer le classement et la distribution des sous espèces d'*Aeromonas*. L'identification biochimique par la galerie API20E ne permettait pas dans notre étude l'identification de l'ensemble des souches au rang de l'espèce. Tandis que, le système Omnilog ID nous a permis une meilleure identification mais il reste un investissement considérablement coûteux en laboratoire de routine. En outre, il n'a pas permis l'identification précise et lumineuse d'un certain nombre de souches d'importance clinique.

Aucun des facteurs de virulence étudiés (similaires ou non), ne permet d'associer l'une des trois espèces d'intérêt clinique à une maladie, infection ou un indice de dangerosité et de pathogénicité. D'après notre étude, il n'existe pas de différence significative du profil de virulence entre les différentes souches d'origine clinique (pathogènes ou non) et environnementale de la même espèce, à l'exception de *A. caviae*. Ce qui permettrait de supposer que les souches de l'environnement peuvent être la cause de la contamination de l'homme. Ces résultats nécessiteraient d'être confirmés par une étude similaire portant sur un nombre plus important de souches. Cependant, la présence des 5 facteurs de virulence étudiés n'était pas associée au développement des infections cliniques, d'autres études supplémentaires de recherche ciblés sur de nouveaux gènes seraient donc nécessaires pour clarifier le rôle pathogène des facteurs de virulence spécifiques à chacune des espèces *Aeromonas*. Il existe environ une centaine de facteurs de virulence peu ou non décrits et les recherches se poursuivent toujours pour en découvrir d'autres. Pour cela, des études plus approfondies et le séquençage des génomes représentent une perspective intéressante pour progresser en ce sens.

V. Références bibliographiques

1. **Abbey S.D et Etang B.B.** (1988). Incidence and biotyping of *Aeromonas* species from the environment. *Microbios*; 56:149-155.
2. **Abbey S.D et Etang B.B.** (1991). Virulence factors from *Aeromonas* species. *Microbios*; 56:71-77.
3. **Abbott S.L, Cheung W.K.W et Janda J.M.** (2003). The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol*; 41:2348-2357.
4. **Abbott S.L, Cheung W.K.W, Kroske-Bystrom S, Malekzadeh T et Janda J.M.** (1992). Identification of *Aeromonas* strains to the genospecies level in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*; 30:1262-1266.
5. **Aguilera-Arreola Ma.G, Hernandez-Rodriguez C et Zuniga G.** (2007). Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii*, and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: a comparative study. *Can J Microbiol*; 53:877-887.
6. **Altwegg M, Steigerwalt A.G, Altwegg-Bissig R, Luthy-Hotteinstein J et Brenner D.J.** (1990). Biochemical identification of *Aeromonas* genospecies isolated from humans. *J Clin Microbiol* ; 28:258-264.
7. **Bin Kingombe C.I, Hyus G, Howald D, Luthi E, Swings J et Jemmi T.** (2004). The usefulness of molecular techniques to assess the presence of aeromonas spp. harboring virulence markers in foods. *Int J Food Microbiol*; 94:113-121.
8. **Bin Kingombe C.I, Hyus G et Tonella M.** (1999). PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. *Appl Environ Microbiol*; 65:5293-5302.
9. **Burr S.E, Pugovkin D, Wahli T, Segner H et Frey J.** (2002). Evidence for a type III secretion system in *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*. *J Bacteriol*; 184:5966-5970.
10. **Burr S.E, Stuber K et Frey J.** (2003). The ADP-Ribosylating toxin, aexT, from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is translocated via a type III secretion pathway. *J bacteriol*; 185:6583. 6591.

11. **Burr S.E, Pugovkin D, Wahli T, Segner H et Frey J.** (2005). Attenuated virulence of an *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* type III secretion mutant in a rainbow trout model. *Microbiol*; 151:2111-2118.
12. **Casco'n A, Yugueros J et Temprano A.** (2000). A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun*; 68:3233-3241.
13. **Chacon M.R, Figueras M.J, Gatro-Escarpulli, Soler L et Guarro J.** (2003). Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antoine van Leeuwenhoek*; 84:269-278.
14. **Chacon M.R, Soler L, Groisman A, Guarro J et Figueras M.J.** (2004). Type III secretion system genes in clinical *Aeromonas* isolates. *J Clin Microbiol*; 42:1285-1287.
15. **Clity E, Couppie P, Saint-Marie D et Pradinaud R.** (2003). Post traumatic ulcerations. *Ann Dermatol Venerol*; 130:791-792.
16. **De Paolis M.R et Lippi D.** (2008). Use of molecular methods for the identification of a bacillus strain isolated from paper affected by foxing. *Microbiol research*; 163:121-131.
17. **Esteve C et Birkbeck T.H.** (2004). Secretion of haemolysins and proteases by *Aeromonas hydrophila* EO63: separation and characterization of the serine protease (caseinase) and the metalloprotease (elastase). *J Appl Microbiol*; 96:994. 1001.
18. **Froquet R, Cherix N et Burr S.E.** (2007). Alternative host model to evaluate *Aeromonas* virulence. *Appl Environ Microbiol*; 73:5657-7659.
19. **Gurcel L, Lacovache L, Van Der Goot F.G, Alouf J.E et Popoff M.R.** (2006). Aerolysin and related *Aeromonas* toxins. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*; 3:608-622.
20. **Harf-Monteil C et Monteil H.** (2007). *Aeromonas*. Précis de la bactériologie clinique; 2:1167-1175.
21. **Harf-Monteil C, Prévost G et Monteil H.** (2003). Facteurs de virulence d'*Aeromonas caviae* isolés de cas cliniques. Virulence factors of clinical *Aeromonas caviae* isolates. *Doi:10.1016/j.patbio.2003.09.011*
22. **Hochedez P, Hope-Rapp E, Olive C, Nicolas M, Beaucaire G et Cabié A.** (2009). Caractéristiques des bactériémies à *Aeromonas hydrophila* aux Antilles. *Médecine et maladies infectieuses*; 39 :S25.

23. **Janda J.M.** (1991). Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin Microbiol Rev*; 4:397-410.
24. **Janda J.M, Abbott S.L.** (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect Dis*; 27:332-344.
25. **Janda J.M, Abbott S.L, Khashe S, Kellogg G.H et Shimada T.** (1996). Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. *J Clin Microbiol*; 34:1930-1933.
26. **John Albert M, Strom M.S et Ansaruzzaman M.** (2000). Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *J Clin Microbiol*; 38:3785-3790.
27. **Kirov S.M, Barnett T.C, Pepe C.M, Strom M.S et Albert M.J.** (2000). All rights reserved investigation of the role of type IV *Aeromonas* pilus (Tap) in the pathogenesis of *Aeromonas* gastrointestinal infection. *Infect Immun*; 68:4040. 4048.
28. **Kirov S.M, Tassel B.C, Semmler A.B.T, O'Donovan L.A, Rabaan A.A et Shaw J.G.** (2002). Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *J Bacteriol*; 184:547-555.
29. **Kodjo A, Richard Y et Tonjum T.** (1997). *Moraxella boevrei* sp nov, a new *Moraxella* species found in goats. *Int J Syst Bact*; 47:115-121.
30. **Krause K.H, Fivaz M, Monod A et van der Goot F.G.** (1998). Aerolysin induces G-protein activation and Ca²⁺ release from intracellular stores in human granulocytes. *J Biological Chemistry*; 273:18122-18129.
31. **Krovacek K, Pasquale V, Baloda S.B, Soprano V, Conte M et Dumontet S.** (1994). Comparison of putative virulence factors in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from the marine environmental and human diarrhea cases in Southern Italy. *Appl Environ Microbiol*; 60:1379-1382.
32. **Küpfer M, Kuhnert P, Korczak B.M, Peduzzi R et Demarta A.** (2006). Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, gyrB and rpoB sequences. *Inter J Syst Evol Microbiol*; 56:2743-2751.

33. **Kuijper ED.J, Bol P, Peeters M.F, Steigerwalt A.G, Zanen H.C et Brenner D.J.** (1989). Clinical and epidemiologic aspects of members of *Aeromonas* DNA hybridization Groups isolated from human feces. *J Clin Microbiol*; 27:1531-1537.
34. **Laganowska M.L et Kaznowski A.** (2004). Restriction Fragment Length Polymorphism of 16S. 23S rDNA Intergenic Spacer of *Aeromonas* spp. *Syst Appl Microbiol*; 27:549. 557.
35. **Merino S, Aguilar A, Nogueras M.M, Regue M, Swift S et Toma'S J.M.** (1999). Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. *Infect Immun*; 67:4008-4013.
36. **Minana-Galbis D, Farfan M, Fusté M.C et Loren J.G.** (2007). *Aeromonas bivalvium* sp. Nov., isolated from bivalve mollusks. *Int J Syst Evol Microbiol*; 57:582-587.
37. **Nam I.Y et Joh K.** (2007). Rapid detection of virulence factors of *Aeromonas* isolated from a trout farm by Hexaplex-PCR. *J Microbiol*; 45:297-304.
38. **Nhung P.H, Hata H, Ohkusu K, Noda M, Shah M.N, Goto K et Ezaki T.** (2007). Use of the novel marker *dnaJ* and DNA-DNA hybridization to clarify interrelationships within the genus *Aeromonas*. *Int J Syst Evol Microbiol*; 57:1232-1237.
39. **Nováková D, ůvec P et Sedlá ek I.** (2009). Characterization of *Aeromonas encheleia* strains isolated from aquatic environments in the Czech Republic. *Environ. In the Czech Republic*; 48:289-294.
40. **Recule C, Hirtz P, Cohard M, Le Noc P et Croize J.** (1994). Septicémie et infection du liquide d'ascite à *Aeromonas sobria*. *Méd Mal Infect*; 24:285-286.
41. **Renaud F et Aubel D.** (2007). Taxonomie bactérienne. Précis de la bactériologie clinique; 2:13-24.
42. **Saavedra M.J, Figueras M.J et Martinez-Murcia A.J.** (2006). Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. *Int J Syst Evolutionary Microbiol*; 56:2481-2487.
43. **Sechi L.A, Deriu A, Falchi M.P, Fadda G et Zanetti S.** (2002). Distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. isolated from Sardinian waters and from patients with diarrhoea. *J Appl Microbiol*; 92:221-227.

44. **Sen K et Rodgers M. (2004)**. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *J App Microbiol*; 97:1077-1086.
45. **Sha J, Kozlova E.V et Chopra A.K. (2002)**. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila* induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. *Infect Immun*; 70:1924-1935.
46. **Shannon K.E, Lee D.Y, Trevors J.T et Beaudette L.A. (2007)**. Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *Science of the Total Environ*; 382:121. 129.
47. **Sinha S, Shimada T, Ramamurthy T, Bhattacharya S, Yamasaki S, Takeda Y et Balakrish Nair G. (2004)**. Prevalence, serotype distribution antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India. *J Med Microbiol*; 53:527-534.
48. **Soler L, Yanez M.A et Chacon M.R. (2004)**. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int J Syst Evol Microbiol*; 54:1511-1519.
49. **Tena D, Aspiroz C, Figueras M.J, González-Praetorius A, Aldea M.J, Alperi A et Bisquert J. (2009)**. Surgical site infection due to *Aeromonas* species : Report of nine cases and literature review. *Scandinavian j.infect.Diseases*; 41:164-170.
50. **Vilches S, Urgell C et Merino S. (2004)**. Complete type III secretion system of a mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain. *Appl Environ Microbiol*; 70:6914-6919.
51. **Watts J.L, Lowery D.E, Teel J.F et Rossbach S. (2000)**. Identification of *Corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. *J Dairy Sci*; 83:2373-2379.
52. **Wu C.J, Wu J.J, Yan J.J et Lee H.C. (2007)**. Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan. *J Infect*; 54:151-158.

53. **Yogananth N, Bhagyaraj R, Chanthuru A, Anbalagan T et Mullai Nila K.** (2009). Detection of virulence gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish samples using PCR technique. *Global J. Biotech et Biochem*; 4:51-53.
54. **Yu H.B, Srinivasa Rao P.S et Lee H.C.** (2004). A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. *Infect Immun*; 72:1248. 1256.

Annexe 1: Extraction de l'ADN total d'*Aeromonas* d'après Kodjo et al. (1997)

- Sortir les souches congelées sur une boîte de gélose au sang (laboratoire BioMérieux, Marcy l'étoile) 24h à 37°C
- Repiquer la souche sur deux boîtes de gélose au sang (laboratoire BioMérieux, Marcy l'étoile)
- Suspendre la totalité des colonies dans 1 ml de tampon TES pH=8 (annexe 4.A)

Ajouter 2 mg de lysozyme (100000 U/ml)

Incuber une heure à 37°C sous agitation

- Ajouter 50µl de protéinase K à 1%, ensuite 50µl de SDS à 25%

Agiter par détournement (la solution devient visqueuse et s'éclaircit)

Incuber 30 minutes à 37°C sous agitation puis 30 minutes à 65°C sous agitation

- Effectuer un phénol-chloroforme:

Ajouter un volume équivalent de mélange phénol-chloroforme-alcool iso-amylé (1ml) sous hotte aspirante (Annexe 4.C)

Agiter vigoureusement jusqu'à l'obtention d'une suspension laiteuse stable et homogène

Centrifuger 15 minutes à 4000 tours/minute

Récupérer le surnageant à l'aide d'une pipette recourbée dans un tube propre

- Traiter le surnageant avec 5µl de RNase à 1%

Incuber une heure à 60°C sous agitation vigoureuse

- Effectuer autant de phénol-chloroforme que nécessaire pour obtenir un surnageant limpide

Centrifuger 10 minutes à 4000 tours/minute

- Précipiter avec 2ml d'alcool absolu froid (stocker à -20°C)

Retourner doucement

Placer 30 minutes à -20°C

- Récupérer la méduse à l'aide d'une pipette pasteur

Essorer au bord du tube

Placer la méduse dans de l'eau distillée stérile (le volume dépend de la quantité d'ADN obtenue)

Placer une nuit à 37°C pour faciliter la dissolution.

Annexe 2: Protocole Omnilog ID pour l'identification biochimique



- Préparation de culture pure:

Cultiver la souche sur une gélose au sang (BioMérieux, Marcy l'étoile, France) pendant 24h à 37°C.

Repiquer une colonie sur une gélose au sang (BioMérieux, Marcy l'étoile, France) pendant 24h à 37°C afin d'obtenir une culture pure.

Conserver les boîtes à +4°C jusqu'à utilisation.

- Sortir les microplaques (GN-NENT: Biolog/AES Chemunex, Bruz, France) de la chambre froide à +4°C et les mettre à température ambiante. Ces microplaques contiennent 96 substrats biochimiques.
- Sortir les boîtes de gélose contenant les cultures pures des souches, et les mettre sous le PSM avec les écouvillons (Biolog/AES Chemunex, Bruz, France), les tubes de suspension pour culture bactérienne (GN/GP-IF: Biolog/AES Chemunex, Bruz, France) et l'appareil de mesure de sensité (Biolog/AES Chemunex, Bruz, France).
- Placer un tube de fluide d'inoculation témoin (12ml) (GN2/GP2, BIOLOG, Hayward CA, U.S.A) ne contenant pas de culture bactérienne dans turbidimètre le régler à 100.
- A l'aide d'un écouvillon stérile, suspendre une partie de la culture bactérienne (quelques colonies) dans le tube de fluide de 12ml. Bien essorer l'écouvillon sur la surface intérieure du tube.
- Agiter doucement le tube par détournement pour obtenir un milieu homogène et éviter la formation de bulles d'air.

- Mesurer la turbidité de transmission sur le turbidimètre pour qu'elle soit à 52% (50-55).
- Après avoir passer tous les tubes, les vider un par un dans des puits de 25ml (Biolog/AES Chemunex, Bruz, France).
- A l'aide d'une micropipette électronique multicanaux (Biolog/AES Chemunex, Bruz, France), remplir les 96 puits de la microplaque.
- Placer les microplaques dans l'incubateur Omnilog (Biolog/AES Chemunex, Bruz, France).
- Lancer la lecture à partir du logiciel d'identification installé sur l'ordinateur Biolog.
- La première lecture est entre 4-6h d'incubation à un intervalle de 15 minutes entre 2 lectures et la deuxième est entre 16-22h d'incubation avec le même intervalle.
- Les résultats sont au fur et à mesure enregistrés dans la base de données du logiciel et imprimés automatiquement en fin de lecture de confirmation.

Annexe 3: Mix PCR (Promega, Charbonnières les bains)

ADN Taq Polymérase	50 unités/ml
dATP, dGTP, dCTP, dTTP	400 µM
MgCl ₂	3 mM

- Le Mix PCR est vendu prêt à utiliser

Annexe 4: préparations réalisées au laboratoire

A. Tampon TES pH=8

NaCl	150 mM
EDTA	10 mM
Tris HCl	10 mM
Eau distillée	1000 ml

- Dissoudre dans 800 ml d'eau distillée, régler le pH à 8, compléter le volume à 1000 ml avec de l'eau distillée, stériliser en autoclave à 110°C pendant 20 minutes et conserver à +4°C.

B. Solution de dépôt des amplifiants sur le gel d'agarose

25% de bleu de bromothymol

25% de xylène cyanol

50% de glycérine

- Mélanger les trois produits dans un flacon, stériliser en autoclave à 110°C pendant 20 minutes et conserver à +4°C.

C. Mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique

Phénol 25 ml

Chloroforme 24 ml

Alcool isoamylique 1 ml

- Ajouter un volume équivalent de tampon tes pH=8
- Agiter vigoureusement. Utiliser la phase inférieure. Stocker à +4°C.

D. Préparation TAE 50X, pH=8

Tris base 2M

EDTA 0.05M

- Ajuster le pH avec 57ml d'acide acétique glacial

Eau distillée qsp 1000 ml

- Stériliser en autoclave à 110°C pendant 20 minutes
- Conserver à +4°C et diluer au 1/50 au moment de l'emploi.