
Risques liés aux bactéries viables mais non cultivables : niveau de la connaissance et limites

Sam DUKAN

Laboratoire de Chimie Bactérienne
Equipe : viabilité et stress oxydant
UMR 7283 – Institut de Microbiologie de la Méditerranée
Email : sdukan@imm.cnrs.fr

Vivant \approx **Viable**

=

Capacité à former une colonie



→ **3** Notions **Fondamentales** associées à la **Cultivabilité** :

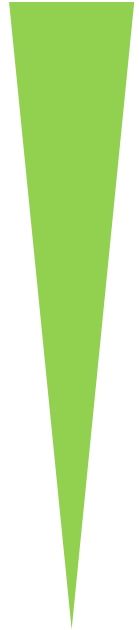
Métaboliser

Grandir

Se diviser

Viabilité

Sensibilité
Pertinence



Capacité à Infecter un Hôte

Capacité à former une colonie

Se diviser + G + M

Capacité à s'allonger

Grandir (G) + M

Activité Métabolique

Métaboliser (M)

Respiration Cellulaire

Intégrité membranaire

Intégrité Physique

M.I.



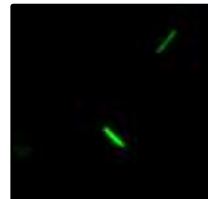
UFC



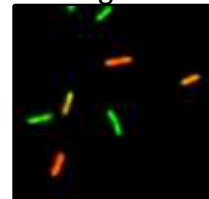
DVC



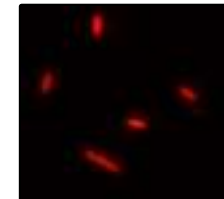
CV6®



BacLight®



Total



L'état **Viable Mais Non Cultivable (VBNC)**

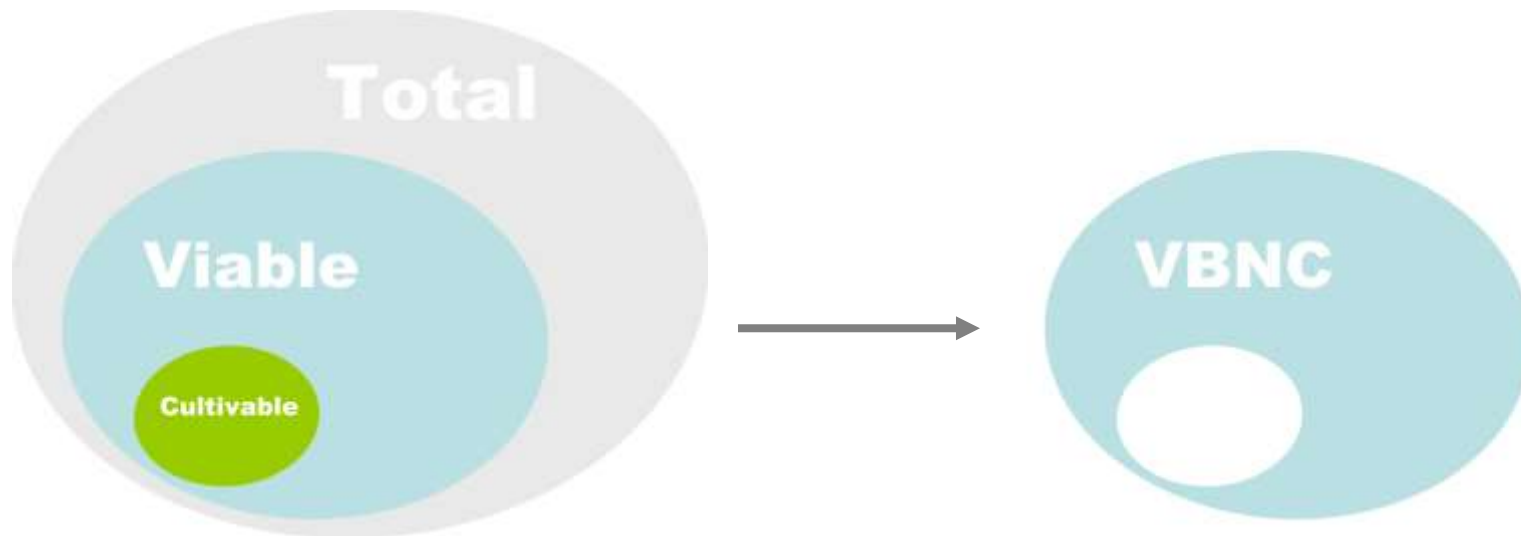


Table 1. Bacteria Described to Enter the VBNC State

<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>S. flexneri</i>
<i>Aquaspirillum</i> sp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S. sonnei</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>B. pseudomallei</i>	<i>M. luteus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>M. varians</i>	<i>Tenacibaculum</i> sp.
<i>C. jejuni</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
	<i>M. smegmatis</i>	
<i>C. lari</i>	<i>Pasteurella piscida</i>	<i>V. campbellii</i>
<i>Cytophaga allerginae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>V. cholerae</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>V. fischeri</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>P. putida</i>	<i>V. harveyi</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>P. syringae</i>	<i>V. mimicus</i>
<i>E. hirae</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>V. natriegens</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>Escherichia coli</i> (including EHEC)	<i>R. meliloti</i>	<i>V. proteolytica</i>
<i>Francisella tularensis</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>V. shiloi</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>V. vulnificus</i> (types 1&2)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>S. typhi</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhimurium</i>	
<i>K. planticola</i>		

Viable mais Non Cultivable

Cas **1**

Marqueurs de viabilité

Surestiment le nombre de Bactéries « Vivantes »

Cas **3**

Marqueur de Cultivabilité

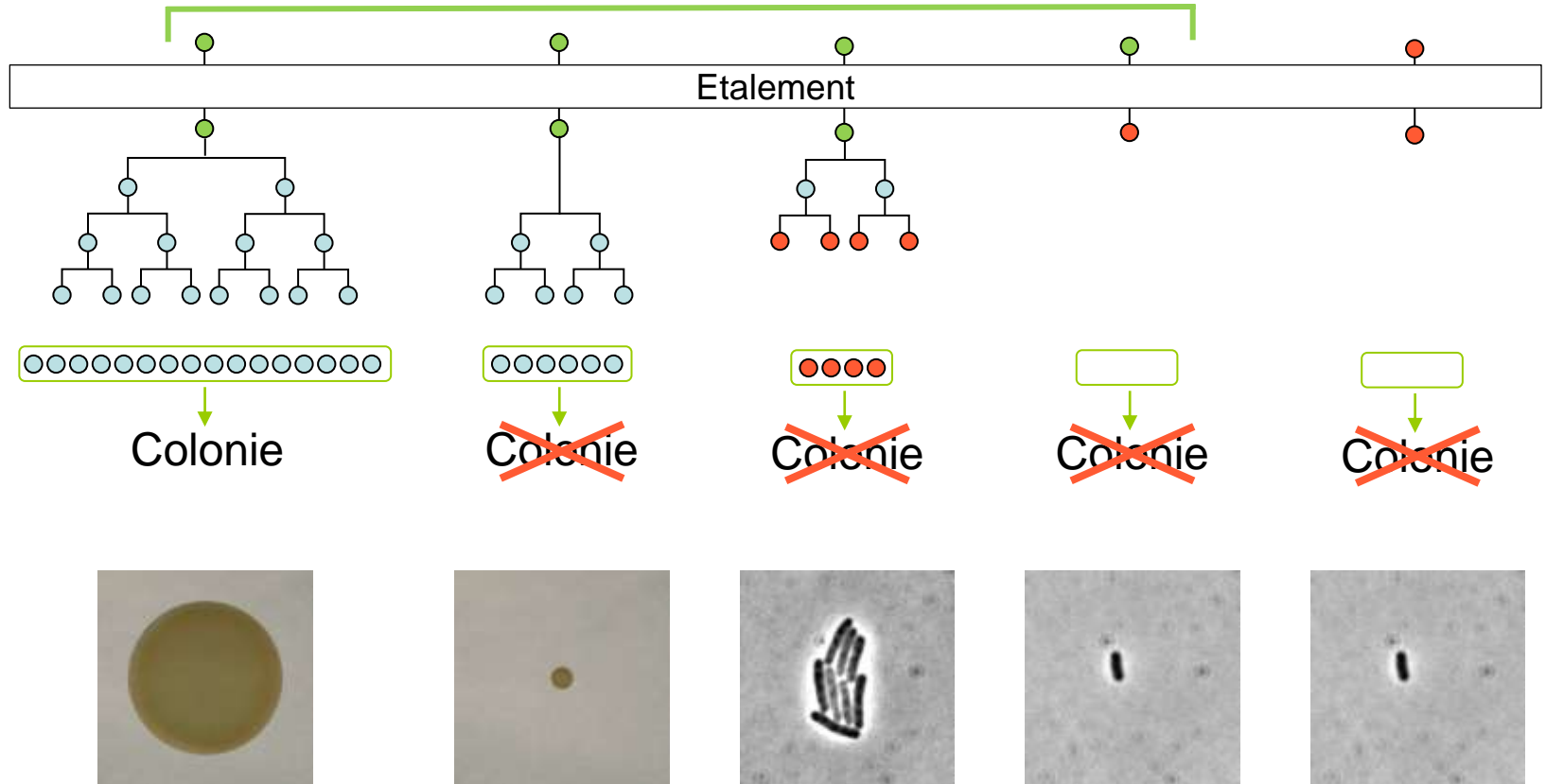
Sous-estime le nombre de Bactéries « Vivantes »

Cas **2**

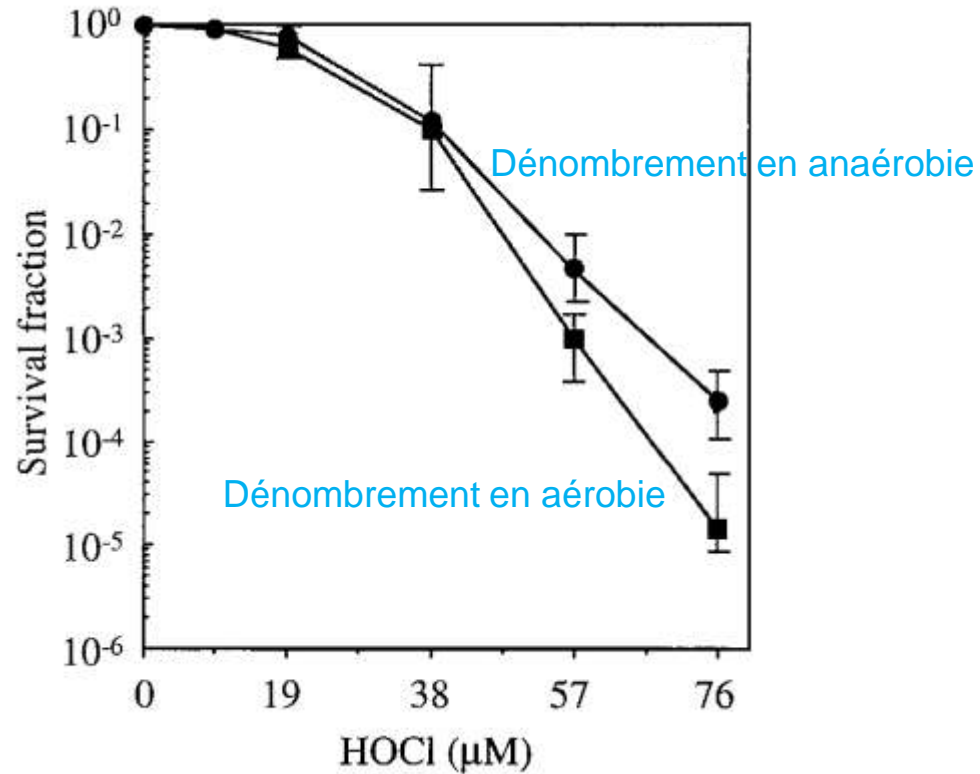
Etat Physiologique Contrôlé

Viable mais **Non Cultivable**

Cellules Initialement Vivantes

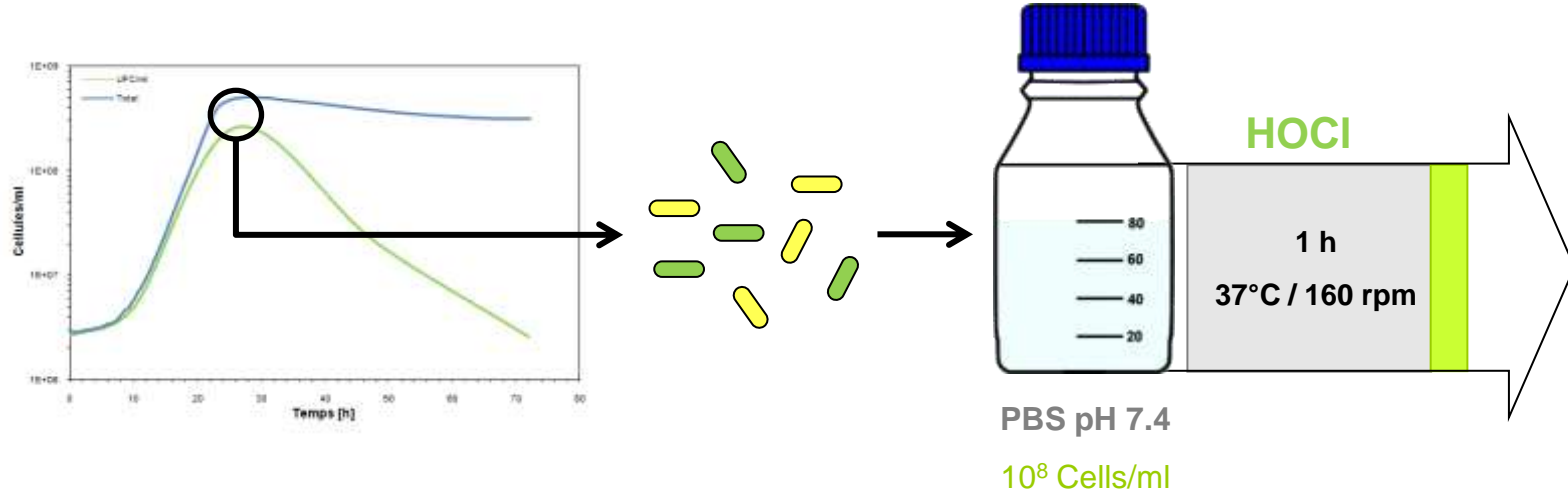


1 --- *Escherichia coli* – Létalité sur la boîte de Pétri après désinfection à HOCl

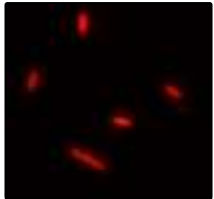


→ Après désinfection, des bactéries perdent leur capacité à former des colonies visibles par l'observateur. Existence d'une létalité conditionnée sur boîte de Pétri

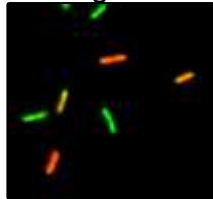
2--- *Legionella pneumophila* – Etat VBNC ?



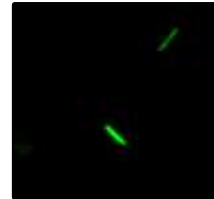
Total



BacLight®



CV6®



DVC



BCYE



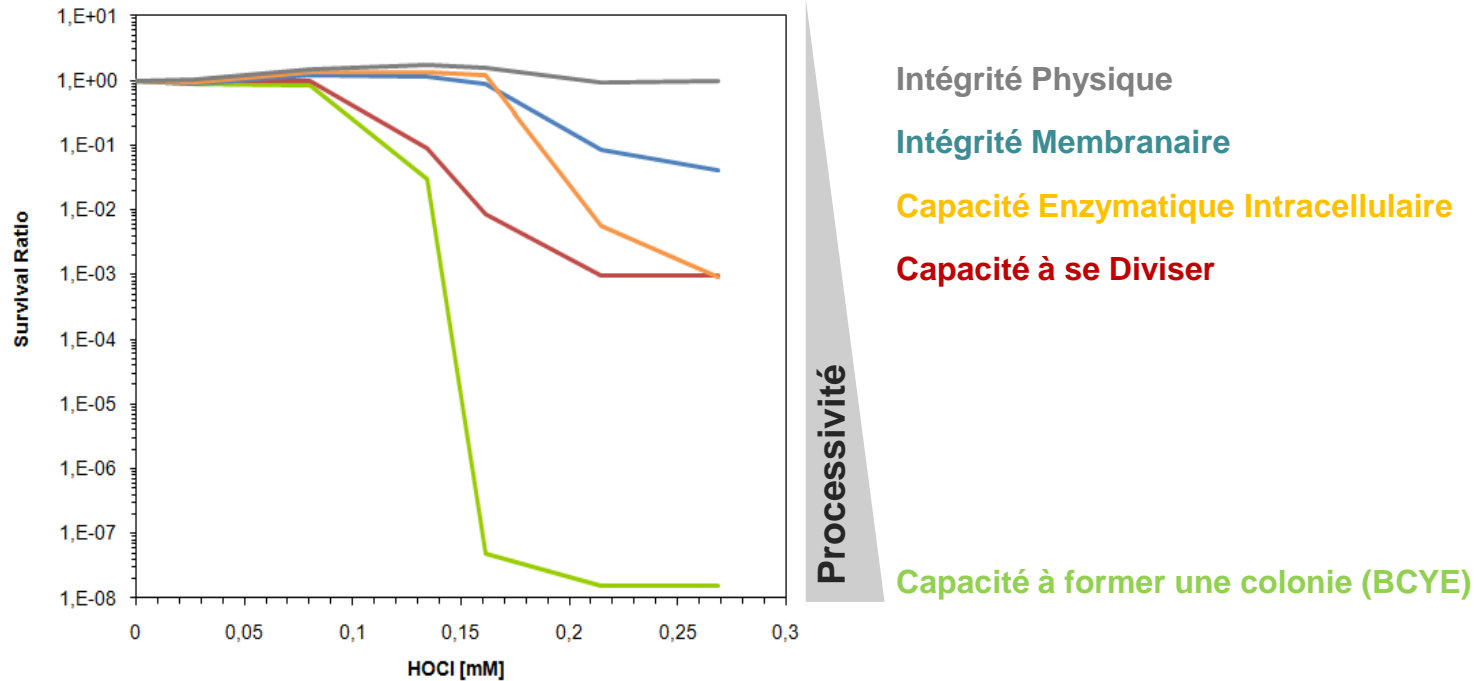
BCYES



M.I.

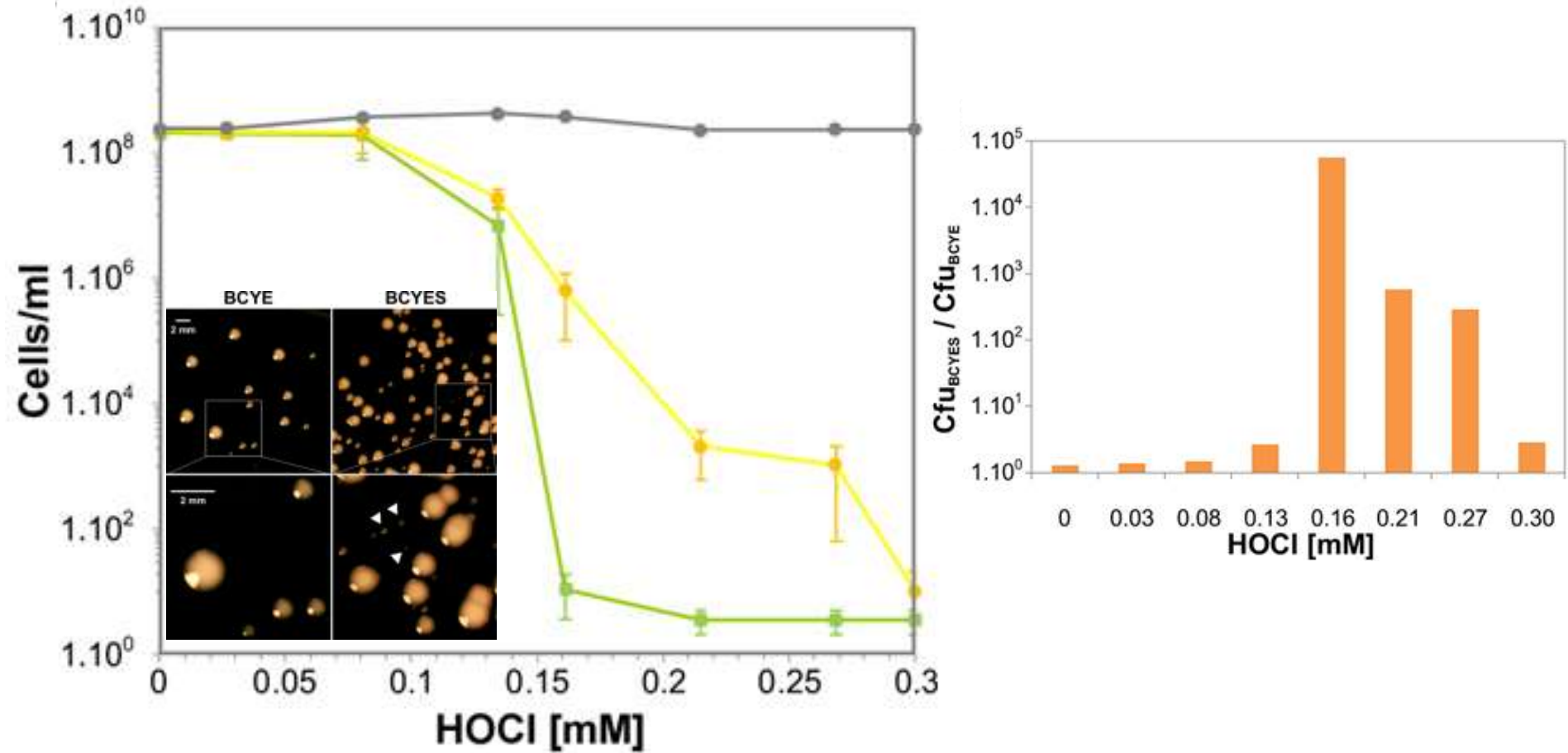


2--- *Legionella pneumophila* : Etat VBNC ?



→ L'analyse au niveau de la population confirme la processivité dans l'altération des différents marqueurs de viabilité

2--- *Legionella pneumophila* : Etat VBNC ?

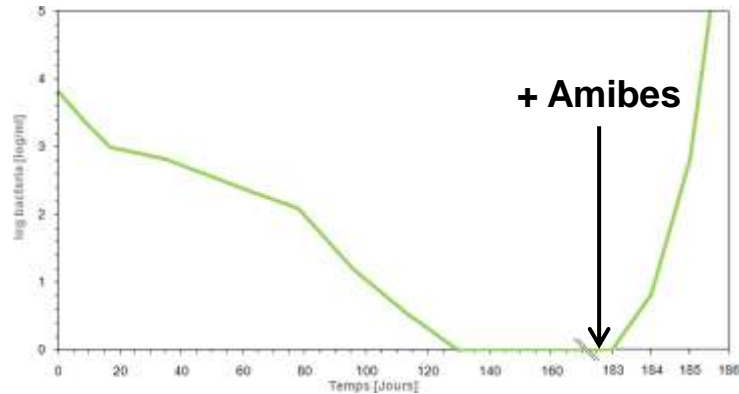


→ Après désinfection, des bactéries perdent leur capacité à former des colonies visibles par l'observateur sur le milieu BCYE. Existence d'une létalité conditionnée sur boîte de Pétri

2--- *Legionella pneumophila* : Etat VBNC ?

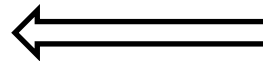
→ **Carence Nutritive** = Perte progressive de la **cultivabilité**

- ↳ Mise en contact avec les amibes :
- ↳ **Ré-augmentation** du nombre de bactéries cultivables

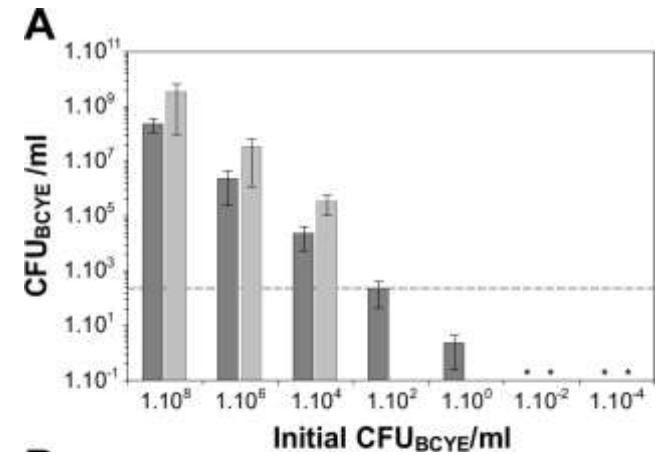
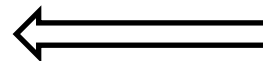


(Steinert et al., 1997, AEM)

→ **Résurrection des bactéries VBNC**



→ **Aucune résurrection observée en utilisant le milieu BCYES**

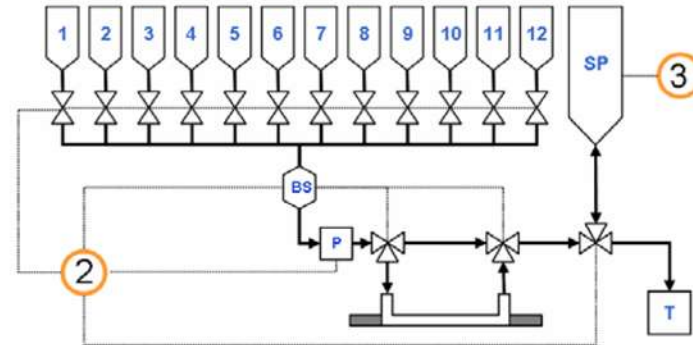


Apport de la microfluidique et du time lapse dans l'étude de l'état VBNC

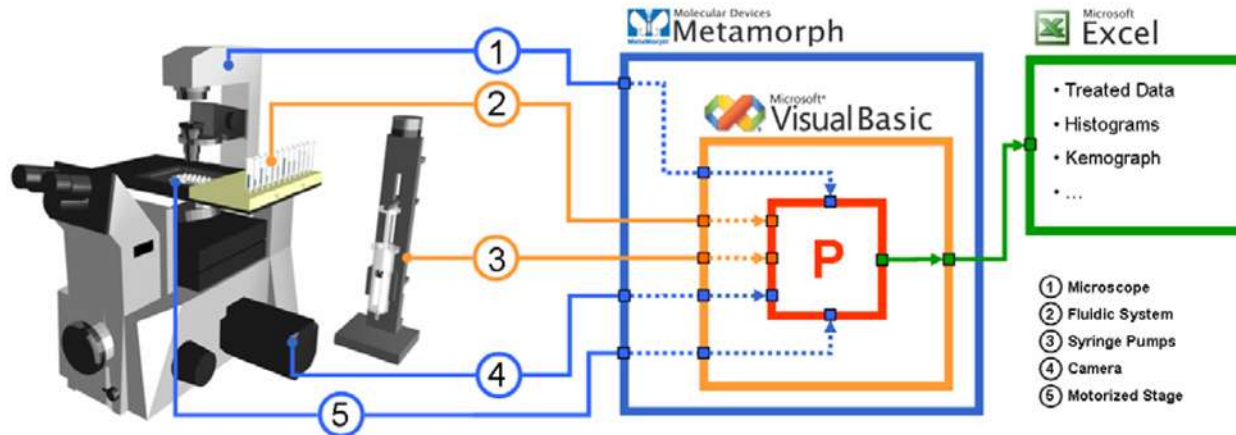
A



B



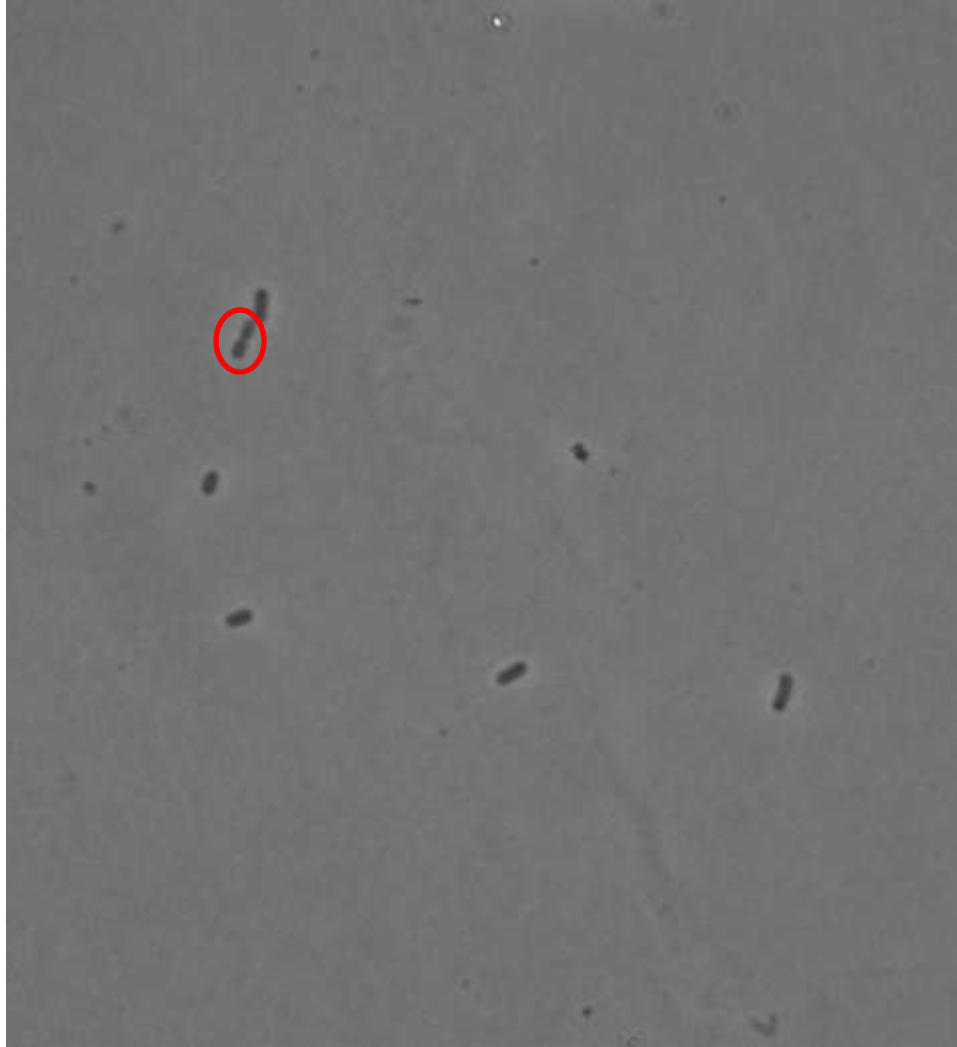
C



→ Suivi au cours du temps de cellules individuelles = Devenir de l'individu

3--- Suivi de la multiplication des bactéries sur milieu gélosé

E. coli
37°C, 200 rpm
24h de culture (phase stationnaire)



3--- *Legionella pneumophila* – suivi de la multiplication des bactéries sur milieu gélosé

L. pneumophila souche Paris 24h
(phase stationnaire)

Ajout 0 ou 0,5 1 et 5 mM HOCl 1h
à 37°C

2,6 10⁹ CFU/ml (0 mM)
1,2 10⁸ CFU/ml (0,5 mM)
0 CFU/ml (1 mM)
0 CFU/ml (5mM)

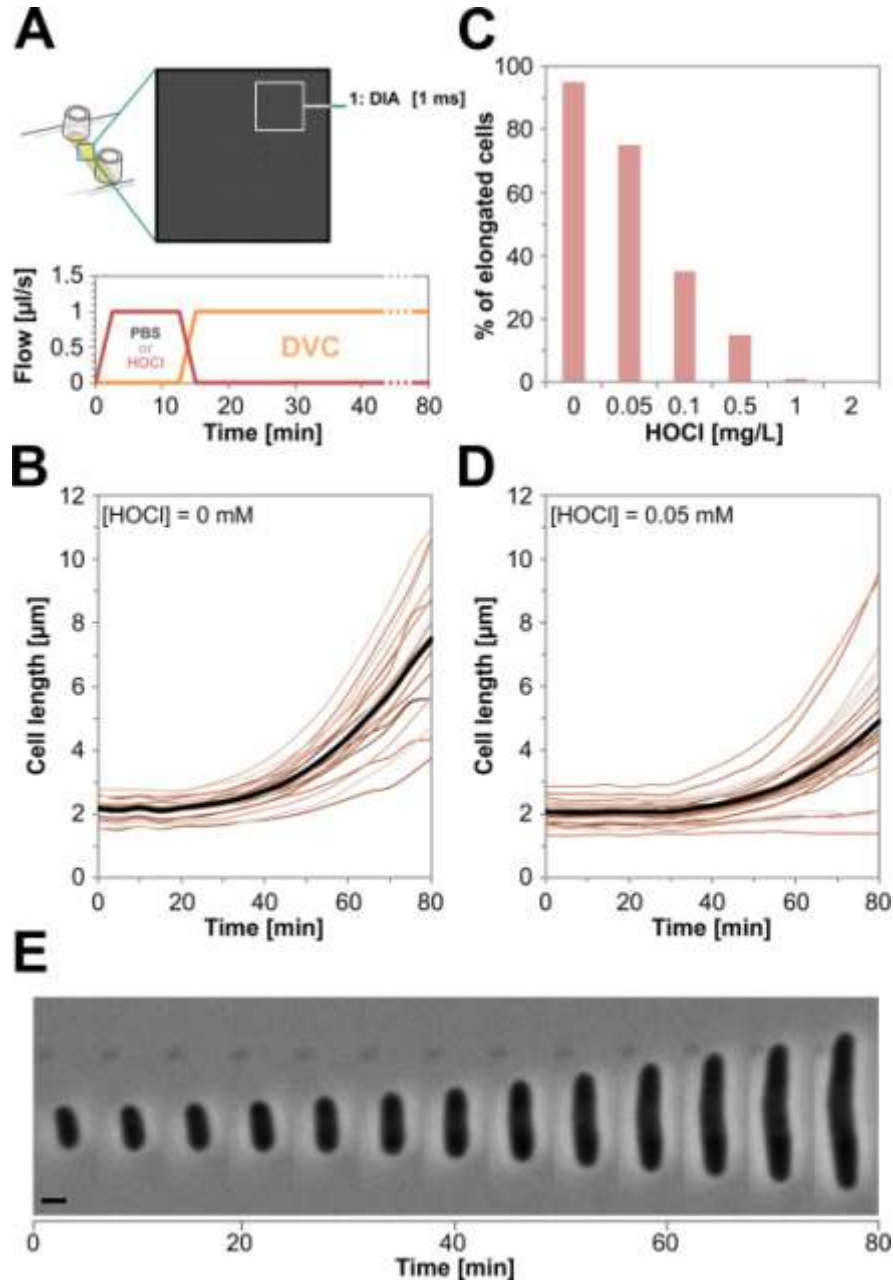


Nbre totale de cellules 8 10 ⁹ bactéries/ml	0	0,5 mM	1 mM	5 mM
CFU/ml (%)	32%	1,5%	0%	0%
Multiplication (%)	81%	21%	0%	0%

→ **Après stress, des bactéries perdent leur capacité à former des colonies visibles par l'observateur MAIS forment des micro-colonies.**
Existence d'une létalité conditionnée sur boîte de Pétri

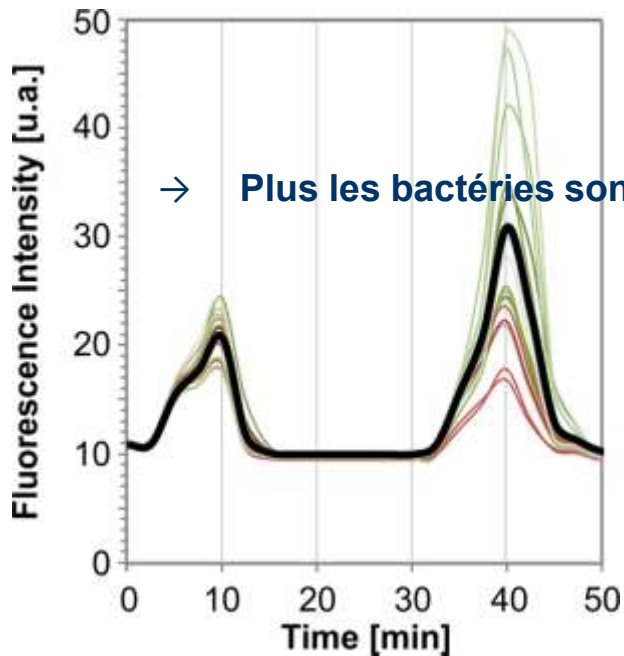
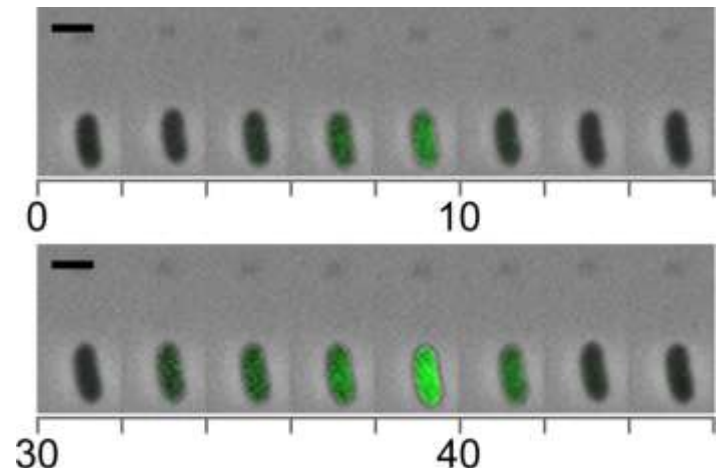
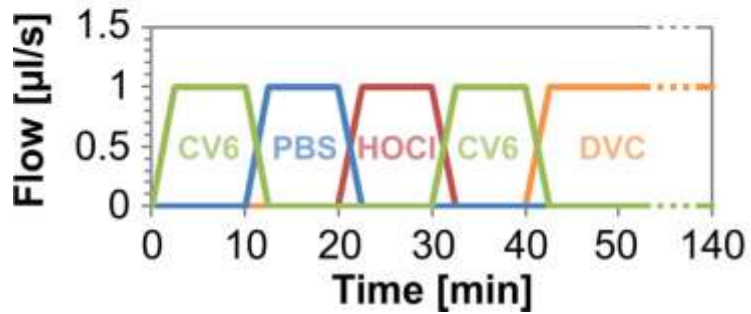
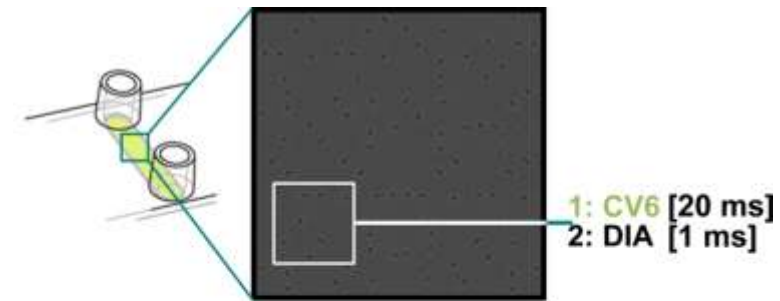
- **La présence de bactéries dites « VBNC » pourrait s'expliquer au moins en partie par l'existence d'une létalité conditionnée sur la boîte de Pétri !**
- **L'utilisation d'un milieu de culture mieux adapté révèle l'existence de ces bactéries**
- ***A priori*, toutes les expériences publiées dans la littérature de type résurrection sont critiquables**

4--- Les marqueurs de viabilité sont-ils fiables ?

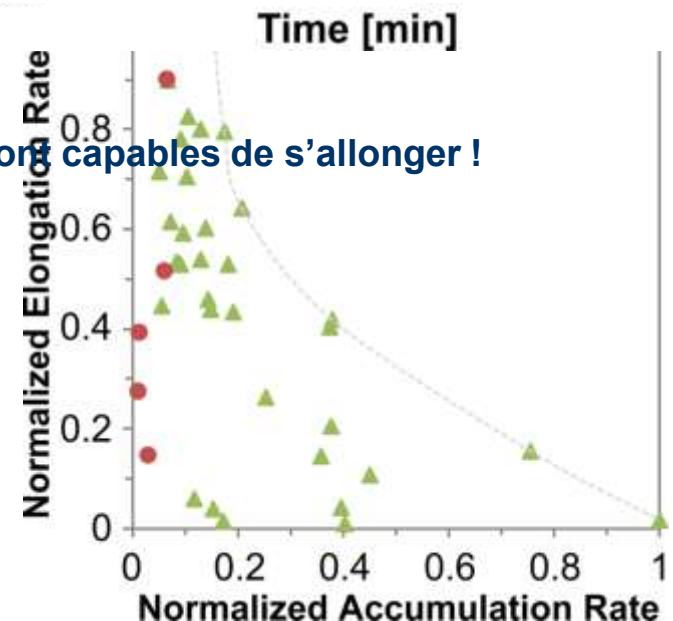


→ Possibilité de suivre le devenir de chaque individu

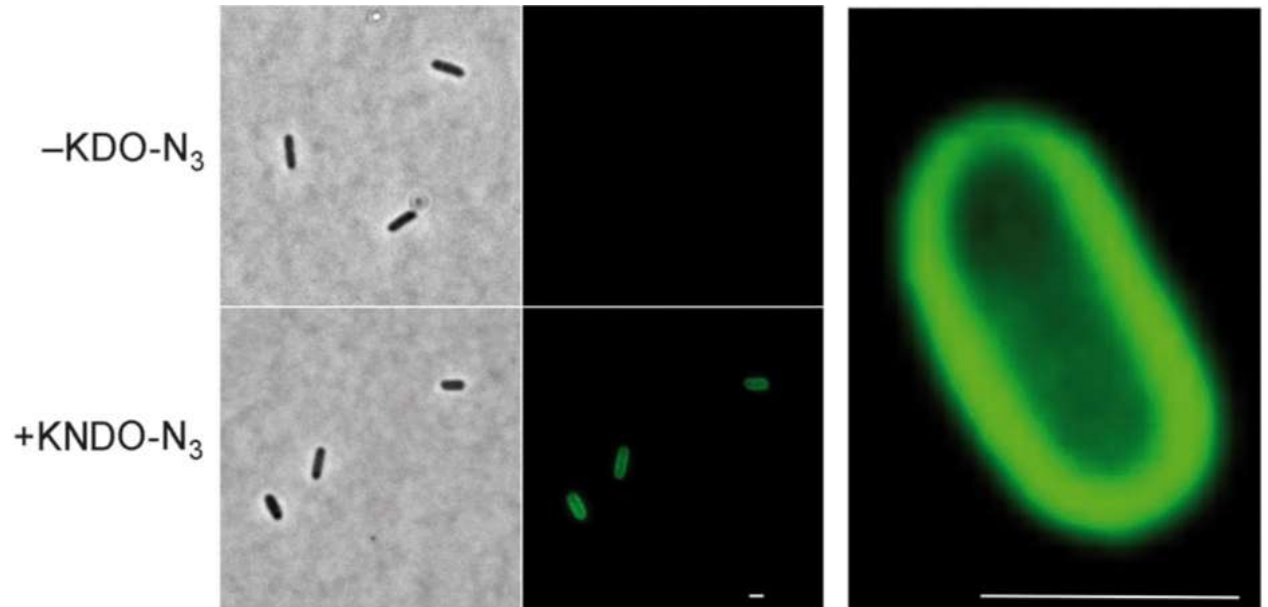
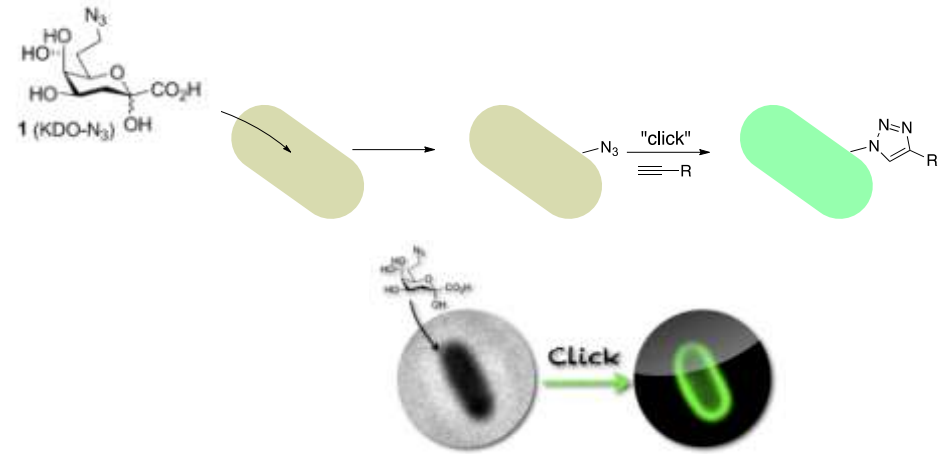
4--- Les marqueurs de viabilité sont-ils fiables ?



→ Plus les bactéries sont CV6+ moins elles sont capables de s'allonger !



5--- Nouveau marqueur de viabilité



→ **Spécificité des bactéries Gram – VIVANTES**

- **L'analyse au niveau de chaque individu des marqueurs de viabilité révèle des incohérences après désinfection à HOCl**
- **Mise au point d'un nouveau marqueur de viabilité permettant simultanément d'identifier les bactéries vivantes et le type de bactéries**

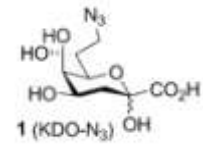


Equipe Dukan



Maïalenne Chabalièr
Benjamin Ezraty
Maisonneuve Etienne
Adrien Ducret
Audrey Dumont

ICMMO



Boris Vauzeilles
Monzer Awwad
Annie Malleron

CNRL



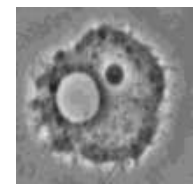
Jérôme Etienne
Sophie Jarraud

Equipe Technique



Philippe Notareschi
Alain Grossi
Michel Genevois

Unité des Rickettsies



Bernard Lascola
Isabelle Pagnier



Merci de votre Attention