

J. Cozien¹, L. Leroi², J. Jacquin¹, L. Quintric², F. Marquer², C. Dussart², M.A. Travers³ and D. Hervio-Heath¹
 1 Ifremer, RBE-SG2M-LSEM, Centre de Brest, Pointe du Diable, F-29280 Plouzané, France
 2 Ifremer, IMN-IDM-RIC, Centre de Brest, Pointe du Diable, F-29280 Plouzané, France
 3 Ifremer, RBE-SG2M-LGPM, Station de La Tremblade, Avenue de Mus de Loup, F-17390 La Tremblade, France

Joelle.Cozien@ifremer.fr // Dominique.Hervio.Heath@ifremer.fr

Introduction - Objectifs

Les vibriens sont présents dans les eaux marines et estuariennes du monde entier. Le genre *Vibrio* comprend 116 espèces dont des pathogènes de l'Homme et d'organismes marins. Si la dynamique des agents pathogènes dans l'environnement ou chez leurs hôtes est bien étudiée, on connaît très peu l'implication et la dynamique d'autres communautés de microorganismes dans l'émergence de ces pathogènes ou dans le processus pathogène. Afin d'aider à y répondre, nous avons choisi une approche Metabarcoding et proposons d'utiliser simultanément un marqueur conventionnel, l'ARNr 16S, et de nouvelles amorces ciblant les principaux groupes de *Vibrio* spp et les espèces de *Vibrio* d'intérêt. Une première application des ces systèmes a été réalisée dans le cadre du projet Envicopas (ENVironmental changes on COastal PATHogen Systems).

Méthodes

Sélection d'un marqueur *Vibrio* spp. pour le séquençage haut débit (HTS)

Couverture et résolution taxinomique réalisée sur 6 marqueurs potentiels

Gene	nombreSeq	nombreEspèce
1 ARNr16S	3026	106
2 recA	2471	99
3 gyrB	2902	99
4 pspH	2811	94
5 gapA	407	92
6 rpoB	562	91
7 tsaA	531	88
8 mreB	584	84
9 ftsZ	569	83
10 atpA	673	69
11 rpoD	672	43
12 toxR	588	28
13 hsp60	349	18
14 rctB	167	17
15 luxA	65	10

- Vibrio potentiellement pathogènes de l'Homme :**
 - V.parahaemolyticus*, *V.vulnificus*, *V.cholerae*
 - V.alginolyticus* (pathogène émergent)
- Vibrio pathogènes pour les organismes marins :**
 - V.aestuarius*, *V.anguillarum*, *V.harveyi*, *V.mytili*, *V.rotiferianus*, *V.haliotocoli*, *V.tapetis*, *V.splendidus*, *V.tubiasihii*, *V.crassostreae*...

Dessin de nouvelles amorces (gène *ftsZ*) spécifiques de *Vibrio* spp. via KASpoD [Parisot et al., 2012] et alignement des séquences (83 espèces).

Analyse phylogénétique
 La plupart des espèces de *Vibrio* peuvent, théoriquement, être discriminées par le gène *ftsZ*

Validation du marqueur *ftsZ*

Sur des mélanges d'ADN (20ng/espèce)
 ADN extraits de 60 espèces Type/Réf. ou environnementales (14 clades)

Application à l'analyse d'échantillons environnementaux

Prélèvement eau de mer (Envicopas, 06/09/2016)

- Détection et diversité des vibriens cultivables à 37°C**
 - * Filtration eau de mer : 1L, 100ml, 10ml (triplicat) / enrichissement EPAS 37°C, extraction ADN par lyse thermique, PCR et Séquençage HTS
 - * Filtration eau de mer : 1ml (triplicat), milieux sélectifs 37°C, Maldi-ToF
- Séquençage HTS (ARNr 16S - *ftsZ*) ADN extraits d'eau de mer filtrée**

Filtration 4L (triplicat), extraction MOBIO Power Water

Analyse des données de séquençage HTS (ARNr 16S - *ftsZ*)

- ➔ Amplification ADN Régions V3-V4 de l'ARNr 16S (460pb) et régions du gène *ftsZ* (59F: 393pb /61F: 434pb)
- ➔ Préparation des librairies Séquençage paired-end MiSeq Illumina (plateforme GeT-PlaGe-NG6, Genotoul)
- ➔ Traitement des données Plateforme Galaxy Outil FROGS (Find Rapidly Otu with Galaxy Solution) [G.Pascal et al., 2015]

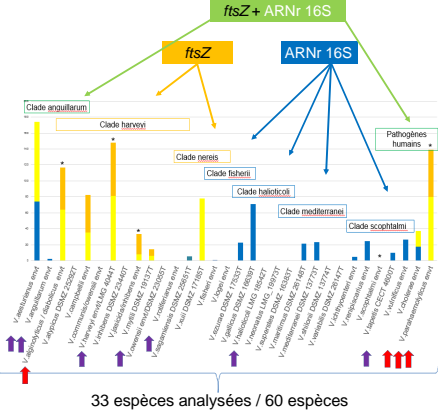
Utilisation de l'algorithme de classification Swarm [Mahé et al., 2014]
 Assignment taxonomique : bases de données d'ARNr 16S Silva128-16S et du gène *ftsZ* téléchargée en avril 2017

Résultats

Validation du marqueur *ftsZ* sur les mélanges d'ADN

Analyse des données de séquençage

Analyse de la présence/absence des *Vibrio*
 * ARNr 16S multi-affiliation
 ARNr 16S : 13 espèces identifiées
ftsZ-61F : 9 espèces identifiées
ftsZ-59F : 6 espèces identifiées



Les *Vibrio* potentiellement pathogènes de l'Homme (↑) sont identifiés conjointement avec l'ARNr 16S et le gène *ftsZ*.
 Les *Vibrio* potentiellement pathogènes pour les organismes marins sont peu représentés (↓). Les analyses sur les clades *splendidus* (18 espèces), *corallilyticus* (1 espèce) et *orientalis* (6 espèces) sont en cours - optimisation de la PCR.

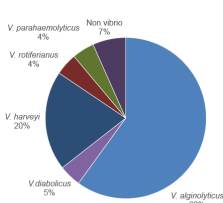
Analyse d'échantillons environnementaux

Détection et diversité des vibriens cultivables à 37°C

Détection des *Vibrio* pathogènes de l'Homme par PCR

	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.vulnificus</i>	<i>V.cholerae</i>
1L	3/3	3/3	0/3
100ml	2/3	3/3	1/3 (faible)
10ml	0/3	1/3	1/3

Souches identifiées par Maldi-ToF



- Détection *Vibrio* pathogènes**
V.parahaemolyticus (4%)
- Autres *Vibrio* majoritaires**
V.alginolyticus (60%)
V.harveyi (20%)

Diversité similaire à celle évaluée par l'analyse des données de séquençage du gène *ftsZ*.

Analyse des données de séquençage (enrichissement)

ARNr 16S	<i>ftsZ-61F</i>	<i>ftsZ-59F</i>
Détection <i>Vibrio</i> pathogènes		
<i>V.cholerae</i> (2,4%) : 10ml 1/3	<i>V.parahaemolyticus</i> (0,3-6%) : 1L 3/3 et 100ml 1/3 <i>V.cholerae</i> (3,3%) : 10ml 1/3	<i>V.parahaemolyticus</i> (0,1-4,5%) : 1L 3/3 et 100ml 1/3
Autres <i>Vibrio</i>		
Multi-affiliation (26-55%) : 16 espèces	<i>V.alginolyticus</i> (>79%) <i>V.harveyi</i> (5-12%)	<i>V.alginolyticus</i> (>86%) <i>V.harveyi</i> (1-10%)
<i>V.corallilyticus</i> , <i>V.xuii</i> , <i>V.diaboli</i> , <i>V.neptunius</i> , <i>V.panuliri</i> , <i>V.variabilis</i>	<i>V.natriegens</i> , <i>V.xuii</i> , <i>V.nereis</i>	<i>V.natriegens</i> , <i>V.xuii</i> , <i>V.nereis</i>

Le gène *ftsZ* cible à 100% le genre *Vibrio*
 Il identifie les espèces pathogènes de l'Homme (sauf *V. vulnificus*) et d'organismes marins (*V. harveyi*).

Le gène ARNr 16S cible 31 à 62% du genre *Vibrio*.
V.cholerae : seul pathogène humain identifié.
 L'analyse de ce gène présente de nombreuses espèces assignées à une multi-affiliation ne permettant pas de distinguer les espèces entre elles.

ADN extraits d'eau de mer filtrée (sans enrichissement)

Amplification ARNr 16S Amplification *ftsZ-59F*

Amplification des ADN et séquençage MiSeq Illumina en cours

Conclusions et perspectives

Cette étude préliminaire pour étudier la diversité des *Vibrio* dans l'environnement avec un autre marqueur que l'ARNr16S se révèle prometteuse. Le gène étudié *ftsZ* (division cellulaire) permet de cibler à 100% le genre *Vibrio* dans les conditions testées et identifie certains pathogènes humains et d'organismes marins. L'analyse des données issues des filtres environnementaux (sans enrichissement) se révélera primordiale pour conclure sur l'efficacité de ce marqueur.