

## DYSENTERIE A SHIGELLA ET ESCHERICHIA COLI ENTEROINVASIFS. DIAGNOSTIC PAR HYBRIDATION ADN/ADN.

par

H. D'HAUTEVILLE<sup>1</sup>, R. VICENS<sup>2</sup>, P. COULANGES<sup>2</sup> et P.J. SANSONETTI<sup>1</sup>

### INTRODUCTION

La dysenterie bacillaire ou shigellose est une maladie endémique dans le monde entier, mais pose un problème tout particulier dans les régions intertropicales et les pays en voie de développement où *Shigella flexneri* est l'espèce prévalente et *S. dysenteriae* est responsable d'épidémies meurtrières. D'autres espèces peuvent être isolées telles *S. sonnei* et *S. boydii* ainsi que certaines souches d'*E. coli* très proches des *Shigella* appelées *E. coli* entéroinvasifs ou ECEI.

La principale étape dans la physiopathologie de la shigellose est la capacité qu'ont ces bactéries de pénétrer dans les cellules de l'épithélium colique, de s'y multiplier et de finalement les tuer. Ce phénotype invasif donne lieu à des lésions intestinales faites d'abcès et d'ulcérations qui sont responsables des symptômes observés au cours de la dysenterie.

Cette étape critique du pouvoir pathogène des *Shigella* et des ECEI est sous le contrôle d'un plasmide de 220 kbases (kb). Tous ces plasmides partagent un très haut niveau d'homologie et les séquences plus particulièrement impliquées dans l'invasivité apparaissent hautement conservées [4, 7, 8, 9, 10, 11, 13].

Il devient donc possible d'exploiter l'homologie de ces séquences conservées pour détecter des Shigelles et des ECEI par hybridation ADN/ADN à l'aide d'une sonde nucléotidique spécifique. Ce travail a reposé sur l'utilisation d'une sonde ADN de 17 kb. L'hybridation a été effectuée sur des colonies bactériennes isolées et des selles dysentériques.

La sonde a été choisie sur la base d'études des séquences plasmidiques impliquées dans l'invasivité d'une souche de *S. flexneri* du sérotype 5 appelée M90T. Des études préalables utilisant la mutagenèse à l'aide du transposon Tn5 avaient montré que les insertions de ce transposon inactivant la pénétration pouvaient être cartographiées au sein de trois fragments *EcoRI* quasi contigus d'un poids moléculaire respectif de 7,5, 11,5 et 17, kb [4]. Le fragment de 17 kb avait été reconnu comme le plus sensible dans la détection des quatre espèces de *Shigella* et les souches d'ECEI par hybridation sur des colonies isolées [8]. Le travail a donc consisté à l'évaluation de l'efficacité de cette sonde ADN de 17 kbases en région d'endémie à Madagascar.

(1) Service des Entérobactéries, U. 199 INSERM, Institut Pasteur, Paris.

(2) Laboratoire de Bactériologie, Institut Pasteur, Tananarive.

La détection des *Shigella* et des ECEI sur colonies isolées, directement dans des selles ou dans des produits contaminés (eau, nourriture) est un problème majeur dans les pays en voie de développement où ces espèces constituent un pourcentage parfois important des agents responsables de diarrhées et surtout de diarrhées graves avec syndrome dysentérique. Une telle situation exige un diagnostic rapide de façon à mettre en œuvre un traitement immédiat ainsi qu'un outil épidémiologique fiable permettant l'étude simple de nombreux isolats.

Les techniques classiques de détection ne sont souvent pas suffisamment rapides et sensibles. Il n'existe pas de milieu d'enrichissement spécifique et l'identification doit faire appel à des techniques bactériologiques, immunologiques et finalement à différents tests de virulence : test de Sereny [12], invasion de cultures cellulaires [3].

Une technique d'hybridation ADN/ADN permettant l'expertise d'un nombre important de souches (plusieurs centaines en une expérience) dans des conditions de sensibilité et de spécificité satisfaisantes, utilisable à la fois sur des colonies isolées et des produits pathologiques, répondrait aux critères exigés.

La situation à Madagascar est marquée depuis plusieurs décades par la survenue d'épidémies de shigellose d'importance et de durée variable selon les régions. Le germe prévalent a été longtemps *S. dysenteriae* 1 mais *S. flexneri* est isolée de plus en plus fréquemment.

En 1979 par exemple, les *Shigella* représentaient environ 5 p. 100 des isolats au cours des diarrhées. Parmi celles-ci, 70 p. 100 appartenaient à l'espèce *S. flexneri* et seulement 5,7 p. 100 à l'espèce *S. dysenteriae* [5]. A l'heure actuelle, par rapport à ce bruit de fond, il existe chaque année, au premier et dernier trimestre, une épidémie de dysenterie sur la Côte Est du pays. Cette épidémie n'a pu être expertisée jusqu'à présent sur le plan bactériologique compte tenu des conditions locales et de la distance séparant cette région de Tananarive.

Il est donc apparu intéressant de tester l'efficacité de la sonde ADN «*Shigella*» de 17 kb dans une telle situation à deux niveaux :

— au laboratoire lui-même afin de confirmer la fiabilité de cette sonde par une étude comparative de l'identification par les méthodes bactériologiques classiques et par l'hybridation moléculaire des isolats appartenant aux espèces *Shigella* et ECEI.

— sur le terrain afin d'évaluer la possibilité d'utiliser la sonde directement sur du matériel pathologique, c'est-à-dire, d'effectuer l'hybridation, donc la recherche des gènes spécifiques, sur un aliquot de selles dysentériques.

## MATERIEL ET METHODES

### Souches bactériennes

Un total de 45 souches ont été étudiées : douze souches d'entérobactéries isolées, conservées et identifiées à l'Institut Pasteur de Tananarive ; trente-trois souches de collection obtenues du laboratoire de bactériologie médicale de l'Hôpital Militaire de Tananarive. Ces souches ont été réidentifiées par les méthodes bactériologiques habituelles. Les colonies isolées ont été lysées, leur ADN dénaturé et transféré sur nitrocellulose et papier Whatman 541 pour hybridation.

## **Selles pathologiques**

Cent vingt sept malades présentant un syndrome diarrhéique et/ou dysentérique ont été étudiés. Dans 109 cas, les selles ont pu être analysées par les méthodes bactériologiques classiques. 109 selles ont eu un aliquot immobilisé sur nitrocellulose pour hybridation. Dans 41 cas, une colonie représentative de la population bactérienne majoritaire et/ou d'apparence pathologique a aussi été déposée sur nitrocellulose pour hybridation sur colonies.

### **Préparation de la sonde ADN, marquage et hybridation**

Le fragment de 17 kbases issu du plasmide pWR100 impliqué dans la virulence de *S. flexneri* sérotype 5 (M90T) a été cloné dans le site EcoR1 du vecteur de clonage pBR325, fournissant une molécule recombinante, pHS4033 qui, en une étape de coupure par EcoR1, permet d'obtenir la sonde [1].

La préparation de la sonde a été régulièrement effectuée par coupure de pHS4033, à l'aide d'EcoR1, séparation des deux fragments d'ADN sur gel d'agarose à bas point de fusion, extraction du fragment de 17 kbases et marquage au P<sup>32</sup> par déplacement de coupure [6]. Après dénaturation, la sonde marquée a été hybridée en conditions stringentes avec les ADN immobilisés sur matrice de nitrocellulose.

L'hybridation a été effectuée pendant la nuit, de même que l'autoradiographie qui a suivi. La durée totale de l'expérience, tous ADN immobilisés sur les filtres est de 48 h. Plusieurs centaines d'échantillons peuvent être testés en une seule expérience.

### **Préparation, séparation et hybridation des plasmides**

Les plasmides ont été préparés à partir des souches étudiées par la méthode de lyse alcaline, séparés en électrophorèse en gel d'agarose puis transférés par buvardage sur nitrocellulose [2].

## **RESULTATS**

### **Etude portant sur les douze souches d'entérobactéries isolées, identifiées et conservées à l'Institut Pasteur de Madagascar.**

Les résultats sont reportés sur le tableau 1 et illustrés par la figure 1. La numérotation de 1 à 14 est commune à ce tableau et à cette figure. Le tableau 1 sert donc de légende.

Cette étude préliminaire a permis de démontrer, sur un effectif limité de souches, la sensibilité et la spécificité de la méthode. Parmi les douze isolats initialement identifiés comme *Shigella*, les trois qui n'ont pas été reconnus par la sonde de 17 kb se sont avérés, lors de la réidentification, ne pas appartenir à cette espèce. Il s'agissait probablement d'une contamination du milieu de conservation plutôt que d'une erreur initiale d'identification.

Par contre, l'étude des plasmides de virulence contenus dans les souches définitivement identifiées comme *Shigella*, a montré dans 3 cas, la présence d'un plasmide de 220 kb hybridant avec la sonde et dans 6 cas, un plasmide délété donnant néanmoins une réponse en hybridation avec la sonde. Il est connu que les plasmides de virulence de 220 kb chez les *Shigella* sont très instables,

particulièrement après conservation prolongée en gélose. Ceci pourrait rendre compte des résultats tout en notant que des séquences hybridant avec la sonde continuent à être reconnues dans le plasmide délété, ce qui n'en diminue donc pas la sensibilité.

#### **Etude portant sur 33 souches de collection obtenues du laboratoire de bactériologie médicale de l'Hôpital Militaire de Tananarive.**

Les isolats ont été réidentifiés, les colonies hybridées avec la sonde de 17 kb, les plasmides étudiés en électrophorèse en gel d'agarose puis identifiés par hybridation à l'aide de la même sonde. Comme montré dans le tableau 2, 24 isolats sur les 25 appartenant à l'une des 4 espèces de *Shigella* ont été identifiés par la sonde (sensibilité = 96 p. 100). Inversement, 1 isolat sur les 8 non identifiés bactériologiquement comme *Shigella* a donné un signal positif (spécificité = 87,5 p. 100). L'étude des plasmides hébergés par les souches a montré que 13 des souches de *Shigella* ayant hybridé avec la sonde sur colonies isolées hébergeaient effectivement un grand plasmide de 220 kb donnant une réponse positive après hybridation avec la même sonde. Même la souche de *Shigella* qui n'avait pas hybridé sur colonie isolée possédait ce même grand plasmide indiquant qu'il avait dû être perdu dans la colonie précédemment testée. Ceci permet donc de considérer la sensibilité de cette technique comme étant de 100 p. 100. Les onze autres souches de *Shigella* hébergeaient un plasmide de plus petit poids moléculaire qui hybridait cependant avec la sonde. Ces résultats sont illustrés sur la figure 2.

Il faut aussi noter que le seul faux positif observé concerne une souche de *Proteus morgani* dont on sait que certains isolats sont considérés comme invasifs pour les cellules eucaryotes.

#### **Résultats de l'étude réalisée au cours d'une épidémie de syndromes dysentériques sur la côte est de Madagascar.**

Les résultats de cette étude sont présentés sur le tableau 3. Seuls y sont reportés les résultats des hybridations sur échantillons de selles pathologiques lorsqu'ils étaient confrontables avec une étude bactériologique, soit 93 échantillons.

Sur les 109 selles diarrhéiques et/ou dysentériques analysées bactériologiquement, une souche de *Shigella* a pu être isolée dans 13,7 p. 100 des cas. Si l'on considère les *E. coli* LDC- comme de possibles ECEI, cela amène à 33 p. 100 le nombre de souches entéroinvasives potentielles. Cependant, aucune tendance épidémique n'a pu être observée car les souches de *Shigella* isolées étaient d'espèces différentes. Dans ce contexte, la sonde de 17 kb s'est avérée plutôt décevante avec une sensibilité de 22 p. 100 très faible par rapport aux 100 p. 100 sur colonies isolées. La spécificité pourrait par contre, être sous-estimée en cas de *Shigella* présentes dans les selles mais non détectées par les techniques bactériologiques classiques. Ceci est cependant improbable compte tenu de la médiocre sensibilité ci-dessus mentionnée.

Il ne semble donc pas, selon les techniques utilisées dans cette étude, que cette méthode puisse être, dans l'immédiat, utilisée sur le terrain pour le traitement direct d'échantillons pathologiques.

## CONCLUSION

La sonde ADN de 17 kb qui a été clonée à partir du plasmide pWR100 codant pour l'invasivité de *S. flexneri* reconnaît l'ensemble des espèces appartenant au genre *Shigella* avec une excellente sensibilité (- 100 p. 100 sous réserve de la persistance du plasmide) et une spécificité raisonnable (87,5 p. 100) sous réserve qu'il s'agisse d'hybridation réalisée sur colonies isolées. Ce problème des faux positifs observés n'est pas totalement résolu. Deux hypothèses principales peuvent être avancées: l'existence de séquences invasives cryptiques au sein de plasmides appartenant à d'autres espèces ou l'existence, au sein de la séquence de 17 kb, de séquences type IS largement représentées au sein des bactéries entériques.

Plutôt que de caractériser plus précisément cette sonde afin de tenter de répondre directement à ces deux questions, il nous paraît raisonnable d'exploiter des données plus récentes obtenues dans notre laboratoire afin de définir une sonde plus petite et de préférence intra-génique. Certains peptides codés par le plasmide de virulence pWR100 sont très proches et présentent une antigénicité croisée qui rend certainement compte d'un haut degré de conservation dû à leur fonction dans l'invasion des cellules. Leurs séquences génétiques devraient être aussi hautement conservées. Les gènes de certains d'entre-eux ont été clonés, permettant d'envisager l'évaluation de sondes d'environ 1 kb.

La mise au point de techniques de marquage non radioactif des sondes devrait faciliter le développement de telles techniques.

Bien que nous ayons dès le début anticipé des problèmes, nous avons été très déçus par l'absence de sensibilité de la méthode d'hybridation employée directement sur des échantillons de selles pathologiques (22 p. 100) ainsi que par sa médiocre spécificité. Les essais ultérieurs devront prendre en compte ces résultats :

- croissance préalable de l'échantillon de selles en milieu sélectif pour les bactéries entériques;
- traitement plus drastique des échantillons afin d'augmenter la lyse bactérienne et la dispersion de l'ADN ainsi que pour éliminer le mucus et les protéines qui peuvent induire une fixation non spécifique de la sonde. (Mucolytiques, protéinase K...).

Les « faux positifs » observés dans cette étude pourraient correspondre à une plus grande sensibilité de la sonde par rapport à la méthode bactériologique d'autant que toutes les colonies présentes sur le milieu d'isolement de la coproculture ne sont pas systématiquement identifiées. Cependant, la faible sensibilité observée va contre cette hypothèse. De plus, l'absence de situation épidémique dans l'étude réalisée (nombre limité de cas de dysenterie et isolats de *Shigella* appartenant à des espèces différentes) rendent encore plus difficile une telle hypothèse.

L'hybridation ADN/ADN est un remarquable outil diagnostique permettant de larges études d'épidémiologie moléculaire. De telles techniques doivent maintenant être mises à l'épreuve d'une utilisation sur le terrain en particulier dans les pays en voie de développement. Ce travail dégage, sur un exemple pratique, les inconvénients et les limites d'une telle approche.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par la Commission des Communautés Européennes, Programme « Science et Technique au service du Développement ». Contrat n° TSD-M-013.

## Fig. 1

Figure 1 : Autoradiographie effectuée après hybridation sur colonie à l'aide de la sonde ADN de 17 kb marquée au  $P^{32}$ . La numérotation correspond à celle présentée sur le tableau 1.

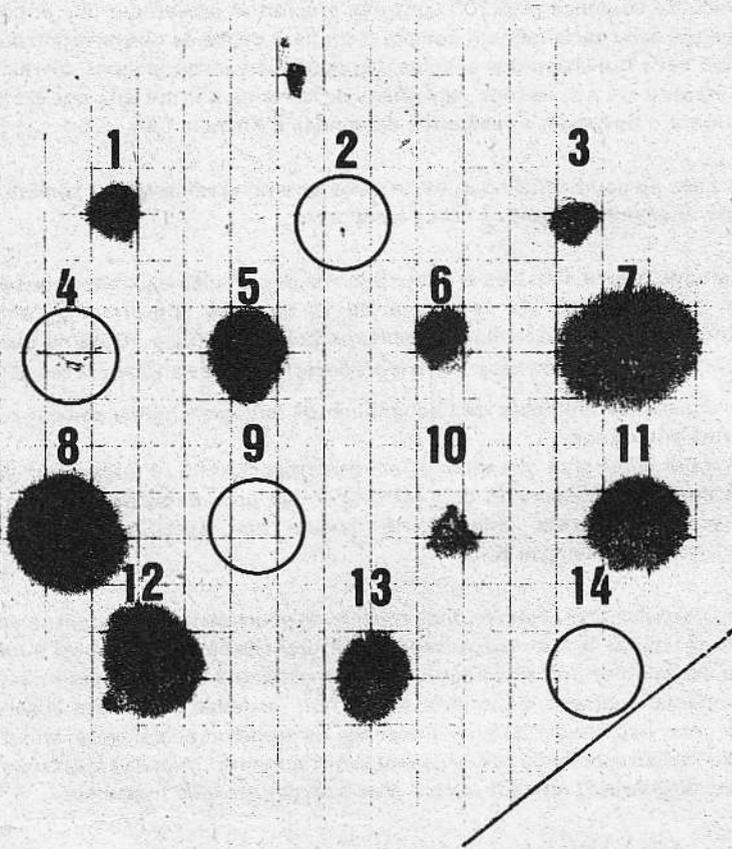


TABLEAU 1

N°	Identification bactérie initiale	Résultat hybridation sur colonie avec la sonde 17 kb	Réidentification bactériologique
1	<i>S. flexneri</i>	+	<i>S. flexneri</i>
2	<i>S. boydii</i>	-	<i>K. ozenae</i>
3	<i>S. dysenteriae</i>	+	<i>S. dysenteriae</i>
4	<i>S. sonnei</i>	-	<i>E. coli</i>
5	<i>S. sonnei</i>	+	<i>S. sonnei</i>
6	<i>S. flexneri</i>	+	<i>S. flexneri</i> 1
7	<i>S. sonnei</i>	+	<i>S. sonnei</i>
8	<i>S. sonnei</i>	+	<i>S. sonnei</i>
9	<i>S. dysenteriae</i>	-	<i>E. coli</i>
10	<i>S. dysenteriae</i>	+	<i>S. dysenteriae</i> 1
11	<i>S. boydii</i>	+	<i>S. boydii</i> 5
12	<i>S. sonnei</i>	+	<i>S. sonnei</i>
13	<i>S. flexneri</i>	+	Contrôle positif
14	<i>E. coli</i>	-	Contrôle négatif

TABLEAU 2

Sensibilité et spécificité de la sonde de 17 kb pour le diagnostic des *Shigella* sur 33 souches de collection de l'Hôpital Militaire de Tananarive

Identification bactériologique	Hybridation avec la sonde de 17 kb	
	+	-
<i>Shigella</i> spp	24	1
Non <i>Shigella</i>	1	7

TABLEAU 3

Utilisation de la sonde de 17 kb pour le diagnostic au sein de 93 échantillons de selles dysentériques

Identification bactériologique	Hybridation positive avec la sonde de 17 kb sur échantillons de selles pathologiques	
<i>Shigella</i> = 15	3	Sensibilité
<i>E. coli</i> LDC <sup>-</sup> = 21	5	=
<i>E. coli</i> LDC <sup>+</sup> = 40	7	22 %
Autres = 17	2	
Total = 93		

## REFERENCES

1. BOILEAU, C.R., d'HAUTEVILLE, H. & SANSONETTI, P., — DNA hybridization technique to detect *Shigella* species and enteroinvasive *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., 1984, **20**, 959-961.
2. KADO, C.I., LIU, S.T. — Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol., 1981, **145**, 1365-1373.
3. LA BREC, E.H., SCHNEIDER, H., MAGNANI, T.T. & FORMAL, S.B., — Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery. J. Bacteriol., 1964, **38**, 1503-1518.
4. MAURELLI, A.T., BAUDRY, B., d'HAUTEVILLE, H., HALE, T.L. & SANSONETTI, P.J. — Cloning of plasmid DNA sequences involved in invasion of HeLa cells by *Shigella flexneri*. Infect. Immun., 1985, **49**, 164-171.
5. PECARRERE, J.L., BOUDON, A., COLLET, M., & coll., — Apropos de l'isolement de 367 souches de *Shigella* à Madagascar. Arch. Inst. Pasteur, Madagascar, 1979, **48**, 45-54.
6. RIGBY, P.W.J., DIECKMAN, M., RHODES, C. & BERG, P., — Labelling DNA to high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol., 1977, **113**, 237-251.
7. SANSONETTI, P., DAVID, M., & TOUCAS, M., — Corrélation entre la perte d'ADN plasmidique et le passage de la phase I virulente à la phase II avirulente chez *Shigella sonnei*. C.R. Acad. Sc. Paris, 1980, **290(D)**, 879-882.
8. SANSONETTI, P.J., KOPECKO, D.J., & FORMAL, S.B., — *Shigella sonnei* plasmids: evidence that a large plasmid is necessary for virulence. Infect. Immun., 1981, **34**, 75-83.
9. SANSONETTI, P.J., d'HAUTEVILLE, H., FORMAL, S.B., & TOUCAS, M., — Plasmid mediated invasiveness in «*Shigella*-like» *Escherichia coli*. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1982, **132 A**, 351-355.
10. SANSONETTI, P.J., KOPECKO, D.J. & FORMAL, S.B., — Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. Infect. Immun., 1982, **35**, 852-860.
11. SANSONETTI, P.J., d'HAUTEVILLE, H., ECOBICHON, C. & POURCEL, C., — Molecular comparison of virulence plasmids in *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1983, **134 A**, 295-318.
12. SERENY, B. — Experimental keratoconjunctivitis shigellosa. Acta Microbiol. Hung., 1957, **4**, 367-376.
13. WATANABE, H. & NAKUMURA, A. — Identification of *Shigella sonnei* form I plasmid genes necessary for cell invasion and their conservation among *Shigella* species and *Escherichia coli*. Infect. Immun., 1986, **53**, 352-358.