



Development of impedancemetric and biochemical methods for detecting low bacterial contaminations in complex liquid media

Sylvain Rouillard

► To cite this version:

Sylvain Rouillard. Development of impedancemetric and biochemical methods for detecting low bacterial contaminations in complex liquid media. Life Sciences [q-bio]. INAPG (AgroParisTech), 2004. English. NNT : 2004INAP0030 . pastel-00002276

HAL Id: pastel-00002276

<https://pastel.hal.science/pastel-00002276>

Submitted on 22 Mar 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON



Ecole Doctorale ABIES

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Discipline : Microbiologie Appliquée

présentée et soutenue publiquement par

Sylvain ROUILLARD

le 17 décembre 2004

Développement de méthodes impédancemétriques et
biochimiques pour la détection rapide d'une faible
contamination bactérienne en milieu liquide complexe

Development of impedancemetric and biochemical methods
for detecting low bacterial contaminations in complex liquid
media

Directeur de thèse
Francis DUCHIRON

Codirecteur de thèse
Christine MIELCAREK

Jury

M. Jean-Claude Meunier
Mme Marie-Bénédicte Romond
Mme Nelly Cochet

Président M. Francis Duchiron
Rapporteur Mme Christine Mielcarek
Rapporteur

Directeur de thèse
Examineur

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier chacun des membres du Jury qui ont accepté de juger les travaux effectués au cours de ma thèse.

Je remercie plus particulièrement Christine Mielcarek, pour son aide et son soutien tout au long de ces quatre années, ainsi que M. Jean-Claude Meunier, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible.

J'ai également une pensée pour toutes les personnes qui ont guidé mes pas jusqu'à cet aboutissement, par leurs conseils ou leurs encouragements, dans un passé récent comme lointain. Je remercie toutes ces personnes, et en particulier M. Eric Pinelli.

Je remercie les partenaires du projet Microqual, pour leur coopération, et les échanges fructueux, aussi bien sur le plan scientifique qu'humain, que nous avons pu avoir au cours de ces travaux.

Je remercie enfin tout le personnel de l'EBI, dont chacun des membres a participé, d'une manière ou d'une autre, aux travaux réalisés au cours de cette thèse. Je remercie tout spécialement les courageux qui ont assisté à mes présentations, et encore plus les aventureux qui s'y sont intéressés.

Résumé

Dans un contexte général où les consommateurs se sentent toujours plus concernés par les risques que font peser sur leur santé les biens de consommations, les industriels se doivent d'assurer l'innocuité de leurs produits. Le risque microbiologique en particulier, affecte de nombreux secteurs, dont l'agro-industrie, et il devient donc stratégique de disposer de techniques permettant de l'évaluer de façon sensible et rapide. Le développement de telles techniques est l'objectif du projet européen Microqual, dans lequel s'inscrivent les travaux présentés au cours de cette thèse. Ceux-ci ont concerné la détection proprement dite, par le biais du développement d'un nouveau prototype de suivi impédancemétrique de la croissance bactérienne. Ils ont également porté sur une méthode originale de concentration, basée sur l'utilisation de lectines immobilisées sur des micro-billes paramagnétiques, et ont permis de mettre au point les outils nécessaires au futur développement de cette méthode.

Mots-clé : bactérie, détection, lectine, billes paramagnétiques, impédancemétrie

Abstract

Consumers are more and more concerned by the risk put on their health by consumer goods. In this context, industries have to certify the harmlessness of their product. Especially, the microbiological risk is a particular threat in many sectors, including the food industries. It is therefore strategic to master techniques that can assess this risk in an accurate and fast manner. Developing such techniques was the aim of the Microqual European project, which the researches presented here contributed to. They more specifically addressed the detection issue, through the development of a new prototype device for the impedancemetric measurement of the bacterial growth. They also dealt with an original concentration method, based on the use of immobilized lectins on the surface of paramagnetic microbeads, and lead to the setup of the necessary technical toolkit for the future development of this method.

Keywords : bacteria, detection, lectin, paramagnetic beads, impedancemetry

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	3
Abstract	4
Table des matières	5
Liste des tableaux	8
Liste des figures	9
Liste des annexes	11
Liste des communications	12
Liste des abréviations	13
<i>Introduction</i>	
Partie I. Microbiologie et sécurité sanitaire des produits de consommation	18
I. LES CRAINTES DU GRAND PUBLIC, LA SITUATION REELLE	18
A. La situation en France	18
B. L'opinion publique	21
C. La France dans l'Europe	22
II. LE CADRE LEGISLATIF	23
A. La réglementation en agroalimentaire	23
B. La réglementation pharmaceutique	24
C. Les instances de veille et de contrôle sanitaire	25
III. LES ENJEUX ECONOMIQUES	31
A. Le coût social des infections bactériennes	31
B. Le coût industriel des contrôles	33
C. Exemple du lait UHT	35
Partie II. Les techniques de détection microbienne	36
I. METHODES CLASSIQUES	36
A. Principe	36
B. Amélioration des méthodes de référence	39
C. Avantages et limites	41
II. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	43

A.	Principe.....	43
B.	Avantage et limites.....	46
III.	TECHNIQUES DE DETECTION IMPEDANCEMETRIQUE	48
A.	Principe et applications	48
B.	Les solutions du marché.....	51
C.	Avantage et limites.....	51
IV.	AUTRES TECHNIQUES.....	53
A.	Approches sérologiques	53
B.	Méthodes colorimétriques	56
C.	Bio-capteurs	59
V.	LA TECHNIQUE DE SEPARATION MAGNETIQUE MEDIEE PAR DES LECTINES	61
A.	Présentation des lectines.....	62
B.	Les lectines en tant qu'outil en microbiologie	63
C.	Lectines, billes magnétiques et microbiologie	64
	Partie III. Objectifs et moyens du projet Microqual	69
I.	OBJECTIFS ET APPROCHES	69
A.	Les objectifs du projet.....	69
B.	L'approche globale de la problématique.....	70
C.	La méthodologie.....	71
II.	LES RESULTATS DES PARTENAIRES EUROPEENS	72
A.	Concentration physico-chimique.....	72
B.	Impédancemétrie classique	73
C.	Bio-capteur, ELISA et PCR	73
III.	LES TRAVAUX DE L'EBI	73
A.	Développement de l'outil lectine	73
B.	Développement d'un impédancemètre alternatif	74
	<i>Présentation des travaux personnels</i>	
	Justification de la démarche.....	76
I.	CHOIX DES SOUCHES BACTERIENNES.....	77
A.	Une étude théorique... ..	77
B.	... et un choix pragmatique	77
II.	CHOIX DES LECTINES.....	78
A.	Sélection théorique.....	78
B.	Confirmation pratique	79

C. Choix final.....	80
III. UN PROTOTYPE DE DETECTION ELECTROMAGNETIQUE.....	81
A. Choix d'un modèle d'étude préliminaire	81
B. Choix d'un modèle d'étude de croissance bactérienne	82
Chronologie.....	83
I. REPRODUCTION DES RESULTATS PUBLIES	83
A. Matériels et méthodes.....	83
B. Résultats	85
C. Discussion	88
II. APPROCHE CHROMATOGRAPHIQUE	90
A. Matériels et méthodes.....	90
B. Résultats	92
C. Discussion	93
D. Conclusion.....	95
III. ÉTUDES EN MICROPLAQUE	97
A. Etudes préliminaires et mises au point.....	97
B. Mesure quantitative rapide de l'affinité de lectines pour des cellules bactériennes entières	101
C. Évaluation de l'activité biochimique des lectines immobilisées sur billes magnétiques.....	106
D. Conclusion.....	110
IV. APPLICATION A UNE MATRICE COMPLEXE	111
A. Matériels et méthodes.....	111
B. Résultats	112
C. Discussion	113
V. DETECTION ELECTROMAGNETIQUE.....	114
A. Matériels et méthodes.....	114
B. Résultats et discussion.....	115
C. Conclusion.....	119
Conclusion	
L'affinité lectine/bactérie.....	121
L'efficacité de la LMS.....	122
Application au lait UHT	123
Bibliographie.....	125

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Liste des 26 maladies à déclaration obligatoire, du pathogène mis en cause, et du nombre de déclarations annuelles (d'après les BEH).....	19
Tableau II. Instances nationales et internationales de veille et de contrôle sanitaire.....	27
Tableau III. Coût estimé par habitant et par an des maladies infectieuses bactériennes d'origine alimentaire.	32
Tableau IV. Liste des méthodes validées AFNOR par type de méthode (d'après [32]).....	41
Tableau V. Principaux essais basés sur des lectines mettant en jeu des bactéries pathogènes	63
Tableau VI. Principales méthodes d'analyse rapide (adapté de [32]).....	68
Tableau VII. Prix indicatif des lectines et anticorps utilisées au cours de ces travaux.....	73
Tableau VIII. Liste des souches bactériennes utilisées et de leur abréviation	77
Tableau IX. Inhibition des lectines de légumineuses par les constituants de la structure pariétale bactérienne (d'après [193]).....	78
Tableau X. Parallèle entre les résultats d'agglutination et d'affinité biochimiques des lectines.	79
Tableau XI. Facteurs et niveaux du plan expérimental (étude de la fixation lectins-billes)	84
Tableau XII. Composition finale de la solution réactionnelle pour la capture bactérienne par les complexes billes-lectines (protocole Kroll [199])	89
Tableau XIII. Estimation de l'efficacité de fixation de chacune des souches bactériennes	99
Tableau XIV. Seuils de détection statistique pour chacune des souches bactériennes	100
Tableau XV. Effet du lait sur la détection des bactéries immobilisées grâce à la ConA.....	101
Tableau XVI. Estimation de l'efficacité de fixation et mesure du pourcentage d'hydrophobicité obtenu par la méthode MATH.....	103
Tableau XVII. Affinité de 3 lectines pour chacune des souches testées.....	104
Tableau XVIII. Influence du lait sur l'affinité apparente de la ConA pour les bactéries	112
Tableau XIX. Valeurs des K_D , B_{max} et B_{max}/K_D pour chacune des souches testées en Dulbecco.	113
Tableau XX. Valeurs des K_D , B_{max} et B_{max}/K_D pour chacune des souches testées en Dulbecco complémenté par 10% (v/v) de lait UHT demi-écrémé.	113
Tableau XXI. Comparaison des TTD obtenus par le Zenix, le Rabbit et le Malthus	117

Liste des figures

Figure 1. Evolution du nombre de TIAC, toute étiologies confondues, déclarées en France de 1987 à 2001 (d'après [2])	18
Figure 2. Classement de la mauvaise qualité sanitaire des aliments parmi les risques pour la santé (sondage français [12]).....	21
Figure 3. Les critères de qualité des aliments pour les Français (d'après [15]).....	22
Figure 4. Schéma de principe du fonctionnement du Stomacher.....	40
Figure 5. Système Petrifilm.....	40
Figure 6. Schéma de principe de la PCR.....	43
Figure 7. Schéma de principe de la RT-PCR	44
Figure 8. Schéma de principe de la PCR en temps réel	45
Figure 9. Schéma de principe de la capture immuno-magnétique (IMS)	55
Figure 10. Schéma de principe du BIAcore	60
Figure 11. Le dispositif Zenix	74
Figure 12. Méthodologie prévue pour la mise au point d'un piège bactérien basé sur les lectines.....	76
Figure 13. Structure 3D de la ConA, complexée avec du α Man(1-6) α Man-Ome (PDB : 1QDC), et ses caractéristiques moléculaires principales	80
Figure 14. Protocole d'étude de la fixation bille-lectine.....	81
Figure 15. Protocole d'étude du piègeage bactérien par les billes-lectines	85
Figure 16. Cinétique de fixation des lectines aux billes paramagnétiques.....	86
Figure 17. Effet de différents paramètres sur le taux de fixation des lectines sur les billes magnétiques.....	86
Figure 18. Evolution de l'orientation du projet (chromatographie).....	90
Figure 19. Chromatogrammes superposés de la fixation de thyroglobuline sur gel d'agarose-ConA en fonction du tampon utilisé	91
Figure 20. Pic d'élution induit par l'acide chlorhydrique 25mM.....	92
Figure 21. Chromatogramme type de Sm sur gel d'agarose-ConA.....	93
Figure 22. Effet de l'incubation de bactéries sur leur viabilité dans divers conditions.....	94
Figure 23. Evolution de l'orientation du projet (microplaque).....	97

Figure 24. Comparaison des différents protocoles d'immobilisation de bactéries sur microplaque.....	98
Figure 25. Optimisation du protocole Graham.....	99
Figure 26. Analyse statistique des résultats de révélation des bactéries immobilisées sur microplaque.....	100
Figure 27. Représentation schématique des principales étapes du protocole ELLA	102
Figure 28. Régression linéaire de la quantité de lectine ConA retenues par quantité de <i>S. epidermidis</i> immobilisées.....	103
Figure 29. Quantité de lectines non fixées en fonction des lectines initialement incubées ...	106
Figure 30. Activité peroxydase exprimée par quantité de billes magnétiques saturées en ConA déposées par puits.....	106
Figure 31. Activité biochimique des complexes bille-lectine en fonction du temps d'incubation des billes magnétiques avec la ConA.....	107
Figure 32. Activité biochimique des complexes bille-lectine en fonction de la concentration en ConA lors de l'incubation des billes magnétiques.....	107
Figure 33. Courbe de croissance des bactéries (Se) immobilisées sur des billes magnétiques saturées en ConA.....	108
Figure 34. Relation entre la quantité de bactéries retenues (représentée par la DO_{630} après 6h de croissance) et le nombre de complexes bille-lectine déposés par puits.....	108
Figure 35. Bactéries retenues par LMS en fonction des bactéries incubées	112
Figure 36. Evolution du projet (bilan).....	114
Figure 37. Effet de la concentration en sel sur le signal du Zenix	116
Figure 38. Evolution du signal Zenix en fonction de la conductivité. Le paramètre mesuré est le module des deux composantes du signal renvoyé par l'appareil (voir III.A p.81). ...	116
Figure 39. Profil type de l'enregistrement d'une croissance bactérienne par le Zenix. Le paramètre mesuré est le module des deux composantes du signal renvoyé par l'appareil (voir III.A p.81).....	117
Figure 40. Relation entre le TTD et la charge bactérienne initiale	117
Figure 41. Evolution de X et Y au cours d'une croissance bactérienne. Les paramètres X et Y mesurés sont les deux composantes du signal renvoyé par l'appareil (voir III.A p.81).	118

Liste des annexes

Annexe 1. Rapport technique Microqual – Description of the ZENIX board	144
Annexe 2. Rapport technique Microqual – L'influence des cations métalliques divalents sur l'activité de la lectines ConA étudiée par le BIAcore	156
Annexe 3. Article en préparation : lectin-magnetic separation on the tracks again.....	164

Liste des communications

Publications

- Lectin-Magnetic Separation on the tracks again – Article en préparation
- The lectin tool in microbiology – Revue en préparation

Colloques

- Réunion microqual, Cergy-Pontoise, France. 05/12/2000-06/12/2000
- Réunion microqual, Aberdeen, Royaume-Uni. 29/05/2001
- Réunion microqual, Athènes, Grèce. 30/11/2001-01/12/2001
- Réunion microqual, Cergy-Pontoise, France. 27/06/2002-28/06/2002
- Réunion microqual, Wageningen, Pays-Bas. 18/12/2003-19/12/2003

Liste des abréviations

ADN :	Acide D ésoxyribo N ucléique
ADNc :	Acide D ésoxyribo N ucléique complémentaire
AFSSA :	Agence Française de Sécurité Sanitaire des A liments
AFSSAPS :	Agence Française de Sécurité S Anitaire des P roduits de Santé
AFNOR :	Association Française de N ORmalisation
AMM :	Autorisation de M ise sur le M arché
ARN :	Acide R ibo N ucléique
ARNm :	Acide R ibo N ucléique m essenger
ATP :	A dénosine T ri P hosphate
AUA :	A gricultural U niversity of A thens
BEH :	B ulletin E pidémiologique H ebdomadaire
CA :	C hiffre d’ A ffaire
CB :	C arbonate B uffer (tampon carbonate)
CCA :	C ommission du C odex A limentarius
UFC :	U nité F ormant C olonie
CIP :	C ollection de l’ I nstitut P asteur
CIPV :	C onvention I nternationale pour la P rotection des V égétaux
ConA :	C oncanavaline A
CSR :	C ommunicable disease S urveillance & R esponse
DEFT :	D irect E pi f luorescent F ilter T echnique
DG SANCO :	D irection G énérale " S ANté et protection des C ONSommateurs"
DO :	D ensité O ptique
DSA :	<i>Datura Stramonium Agglutinin</i>
EBI :	E cole de B iologie I ndustrielle
EDTA :	E thylene D iamine T etra A cetic

EFSA :	E uropean F ood S afety A uthority
ELISA :	E nzyme L inked I mmuno S orbent A ssay
ELLA :	E nzyme L inked L ectin A ssay
EMA :	E uropean M edicines A gency
ERS :	E conomic R esearch S ervice
FAO :	F ood and A griculture O rganization
HACCP :	H azard A nalysis and C ritical C ontrol P oint
ICH :	I nternational C onference on H armonisation
IMS :	I mmuno- M agnetic S eparation
INSERM :	I nstitut N ational de la S anté E t de la R echerche M édicale
InVS :	I nstitut de V eille S anitaire
ISO :	I nternational O rganization for S tandardization
JECFA :	J oint F AO/ W HO E xpert C ommittee on F ood A dditives and C ontaminants
LMS :	L ectin M ediated S eparation
LcA :	<i>Lens culinaris</i> A gglutinin
LEA :	<i>Lycopersicum Esculentum</i> A gglutinin
LoL :	<i>Lathyrus odoratus</i> L ectin
MATH :	M icrobial A dhesion T o H ydrocarbons
MKTTn :	M uller- K auffman au T étra T hionate/ n ovobiocine
NF :	N orme F rançaise
NPP :	N ombre le P lus P robable
N/D :	N on/ D éterminé
OMS :	O rganisation M ondiale de la S anté
OIE :	O ffice I nternational des E pizooties
OMC :	O rganisation M ondial du C ommerce
OPD :	O - P henylène- D iamine
p/v :	p oids/ v olume

PBS :	Phosphate Buffer Saline
PCA :	Plating Count Agar
PALCAM :	Polymixin Acriflavine Lithium chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PT :	<i>Psophocarpus Tetragonolobus</i>
RVS :	Rappaport-Vassiliadis au Soja
RT-PCR :	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RGU :	Robert Gordon University
RU :	Resonance Gnit
SPS :	Sanitaire et PhytoSanitaire
STA :	<i>Solanum Tuberosum Agglutinin</i>
SAB :	Serum Albumine Bovine
SIDA :	Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise
TIAC :	Toxy-Infection Alimentaire Collective
TBT :	Technical Barriers to Trade
TSC :	Tryptone Sulfite Cyclosérine
Taq :	Thermus aquaticus
TTD :	Time To Detection
TS :	Trypcase Soja
UE :	Union Européenne
UHT :	Ultra Haute Température
UV :	Ultra Violet
v/v	volume/volume
VIH :	Virus de l'Immunodeficiency Humaine
VHB :	Virus de l'Hépatite B
WGA :	Wheat Germ Agglutinin
WIB :	Whitley Impedance Broth

Introduction

Ces dernières décennies, les industries alimentaire et pharmaceutique ont accompli des efforts considérables afin de garantir au mieux la sécurité de leur produits. En particulier, les techniques de production ont été adaptées aux exigences sévères en matière d'hygiène, et la traçabilité a été améliorée.

Le contrôle traditionnel de la qualité se concentrait souvent sur le produit fini. Ce contrôle final permettait de déceler les produits non-conformes. Au fil du temps, ces systèmes traditionnels se sont révélés insuffisants car ils n'apportaient pas toutes les garanties nécessaires au consommateur.

Afin de remédier à cette situation, la solution était de mettre en place une gestion préventive du procédé de production. Dans la gestion préventive, on contrôle toutes les étapes du processus de production (de la réception des ingrédients à l'emballage et l'étiquetage du produit fini) et on minimise les risques de contamination en prenant des précautions et des mesures adéquates. Lorsque les différentes étapes sont sous contrôle, le produit fini répondra aux normes de qualité.

Du fait de la multiplication de ces points de contrôle, notamment biologiques et microbiologiques, l'amélioration des techniques d'analyse est devenue un enjeu capital pour les industriels. Qu'elle porte sur la fiabilité, la sensibilité et/ou la rapidité, cette amélioration se traduira *in fine* par un gain financier.

En ce domaine, la marge de progression des contrôles microbiologiques est importante. Les méthodes traditionnelles de détection et/ou d'identification d'éventuels contaminants reposent généralement sur la croissance du micro-organisme, qui nécessite typiquement 48h ou plus. C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet européen Microqual, dont ont fait partie les travaux exposés dans cette thèse.

Partie I. Microbiologie et sécurité sanitaire des produits de consommation

La problématique de la sécurité que présentent (ou ne présentent pas) les produits de consommation pour la santé – et en particulier pour la santé du consommateur – fut un sujet très médiatisé durant la dernière décennie. Le cas de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine en particulier, a stigmatisé à lui seul une succession de problèmes de santé publique survenus antérieurement, tels que l'utilisation d'hormones de croissance, les traces de dioxine retrouvées dans certains produits, etc...

I. Les craintes du grand public, la situation réelle

A. La situation en France

1. Les toxi-infections alimentaires

Un foyer de Toxi-Infection Alimentaire Collective (TIAC) est officiellement défini par la survenue d'au moins deux cas groupés d'une symptomatologie similaire, en générale digestive, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire. Même si l'importance de certains virus ne doit pas être négligée[1], il n'en demeure pas moins que les causes les mieux connues de TIAC sont d'origine bactérienne.

L'institut de veille sanitaire produit chaque année un bilan sur les TIAC en France. Les dernières données disponibles concernent l'année 2001[2]. Cette année là, 559 foyers de TIAC avaient été déclarés, touchant 6 742 personnes. Pour environ 10% des individus déclarés, le cas était jugé suffisamment grave pour entraîner une hospitalisation, et 3 personnes âgées sont décédées.

Une étude statistique portant sur les seules TIAC à salmonelles (64% des déclarations) a par ailleurs démontré la relativement faible représentativité de ces données[3]. En effet, seules environ 25% des cas de TIAC font l'objet d'une déclaration auprès des instances de surveillance, la majeure partie d'entre elles échappe donc à la comptabilisation officielle. Une estimation statistique plus juste porterait donc à environ 1 400 le nombre de foyers réels de TIAC en France en 2001, soit environ 2,5 fois le chiffre officiel.

L'historique du nombre de foyers de TIAC déclarés depuis 1987 (figure 1) montre une augmentation pratiquement constante jusqu'en 1998, puis une stabilisation, voire une légère baisse entre 1998 et 2001. Il n'existe cependant pas de données sur la représentativité et l'exhaustivité des données avant 1995. Il paraît raisonnable de penser que celle-ci est d'autant plus mauvaise que l'on se situe plus près de la date de mise en place du réseau de surveillance. Il est donc très aventureux d'interpréter les données antérieures à 1995. En revanche, l'augmentation de l'exhaustivité de la déclaration obligatoire entre 1995 et 2000 peut expliquer en partie l'augmentation du nombre de déclarations.

En résumé, les chiffres officiels fournissent une moyenne d'environ 8 000 personnes affectées par une toxi-infection d'origine alimentaire, entraînant une moyenne de 770 hospitalisations, et de 5 décès par an, entre 1995 et 2001.

2. Autres infections bactériennes d'origine alimentaire

De même que pour les TIAC, le système de déclaration obligatoire (Tableau I) permet d'avoir un ordre de grandeur de la prévalence et de la mortalité engendrée par certains agents infectieux. La différence importante avec les TIAC est qu'un cas isolé doit également être déclaré auprès des autorités.

Le botulisme, par exemple, est une intoxication due à une neurotoxine bactérienne produite par différentes espèces de *Clostridium*, les plus connues appartenant au groupe des *Clostridium botulinum*. Trois formes distinctes sur le plan épidémiologique ont été décrites. La plus fréquente est le botulisme d'origine alimentaire qui résulte de l'ingestion d'un aliment contenant la toxine botulique préformée. Entre 1991 et 2002, tous les cas de botulisme étaient d'origine alimentaire. Le botulisme représente, sur cette même période, un total cumulé de 340 malades, et a entraîné la mort de 5 personnes[4, 5].

La listériose est due à la bactérie *Listeria monocytogenes* et l'ingestion d'aliments contaminés par *L. monocytogenes* est le mode de contamination le plus fréquent chez l'homme. En France, en 2001, près de 187 cas de listériose ont été identifiés[6], et ce nombre est relativement stable depuis 1996[7]. Elle touche préférentiellement des personnes immuno-déprimées naturellement (femmes enceintes, nouveaux-nés, personnes âgées) ou à l'occasion d'une maladie (cancer, cirrhose, traitement immunosuppresseur...). La maladie est caractérisée par une mortalité élevée : 20 à 30% des cas. On compte ainsi 64 décès en 1999.

Au-delà des déclarations obligatoires, les cas d'infections alimentaires sont également signalés par un réseau de surveillance mettant en jeu, entre autres, les hôpitaux et laboratoires d'analyse. Pour l'année 2000, et en incluant les déclarations obligatoires, on totalise ainsi environ 14 000 personnes affectées par une infection alimentaire[8].

De façon générale, il est très délicat de déterminer le nombre exact d'infections alimentaires en France chaque année. Les données disponibles sont souvent extrêmement parcellaires, jamais exhaustives, et le taux de recouvrement des différents réseaux d'observation difficilement estimable. De plus, il n'existe aucune information précise disponible sur la gravité de chacun des cas, et la plupart d'entre eux se limitent bien souvent à une gêne de quelques heures si le sujet est bien portant par ailleurs.

Parallèlement à ces chiffres, nous disposons également des données de mortalité en France, plus systématiquement relevés par l'INSERM[9]. Chaque année, 150 à 160 décès ont pour cause principale une infection alimentaire. A titre d'exemple, et à des fins de comparaison, en 1998 les chutes et accidents divers ont causé 19 426 décès, les suicides 10 534, la cirrhose 8 863, les accidents de la route 8 253 et les accidents d'origine médicale ou chirurgicale 2 657.

3. Infections bactériennes d'origine pharmaceutique

Deux problèmes d'infection bactérienne liée à un produit pharmaceutique ont été relevés par l'AFSSAPS en 2002[10] :

- Quelques cas de septicémie dus à *Pseudomonas cepacia*, liés à une contamination de l'humidité résiduelle dans le bouchon de la spécialité pharmaceutique IVELIP 20% ;
- Un cas grave d'appendicite mycosique compliquée d'un abcès sous-hépatique suite à la contamination d'un enfant par un complément alimentaire dénommé COLOTIUM.

B. L'opinion publique

Malgré les travers des enquêtes d'opinion¹, elles restent néanmoins le seul moyen d'avoir une idée de la confiance des Français envers leurs produits de consommation. La couverture médiatique des problèmes sanitaires liés aux produits de consommation est également un indice, qu'elle soit la cause ou le résultat des préoccupations des Français.

Or, l'une et l'autre se sont grandement amenuisées ces dernières années. Ainsi, les deux plus grands instituts de sondage en France ont réalisé leur dernière enquête entièrement consacrée à ce sujet il y a plus de quatre années (10/1999 pour Ifop, 10/2000 pour Ipsos). Une étude intéressante publiée en 2000 synthétise les données permettant de juger de l'importance de ces problèmes dans l'opinion publique en France à cette époque[11].

Fin octobre 1999, 2,4% des Français plaçaient la qualité des produits alimentaires comme problème actuel le plus préoccupant, et 6,4% d'entre eux le plaçaient au second rang. En cumul, cette préoccupation occupait le 7^{ème} rang, très loin derrière le chômage, ou même le SIDA. En revanche, 71% des personnes interrogées pensaient qu'il n'y a pas suffisamment de règles pour encadrer ce que font les entreprises en matière de sécurité alimentaire, contre 51% pour le commerce international par exemple. Pour ce qui concerne plus spécifiquement les risques pour la santé et la sécurité des personnes, la mauvaise qualité sanitaire de l'alimentation vient en 8^{ème} position (figure 2), loin derrière le SIDA et la drogue[12].

Pour un sondage Ipsos[13], 49% des Français ont répondu que les produits alimentaires ne présentent en général ni plus ni moins de risques depuis 10 ans, contre 30% qui pensent que les risques sont aujourd'hui plus grands. Parmi quatre réponses

¹ « Ces limites sont en particulier le risque d'artefact quand l'enquête doit choisir, en un temps très court et hors contexte, une réponse parmi une série d'items proposés sur un sujet complexe ; l'influence de la thématique générale et de l'enchaînement des questions sur les réponses obtenues à chacune, et, enfin, le risque de superficialité de l'approche par comparaison à des entretiens approfondis. En revanche, par rapport à ces derniers, les sondages ont l'intérêt de fournir des indications sur de vastes échantillons représentatifs de la population étudiée. Par ailleurs il ne faut pas oublier qu'une opinion déclarée peut différer de l'opinion effective (*a fortiori* si l'interviewé escompte des retombées aux résultats de l'enquête et biaise ses réponses pour cela), et peut différer surtout du comportement en situation réelle . »

11. BONNY, S. Les consommateurs, l'agriculture, la qualité et la sécurité des aliments: une analyse du questionnement des consommateurs et des réponses apportées. *INRA Prod. Anim.*, 2000, **13**(5), 287-301.

possibles, la préoccupation la plus importante était « les risques relatifs à la sécurité des aliments tels que la listéria ou la vache folle » (45%). D'autres sondages sur le même thème et réalisés à la même époque dépeignent un avis encore plus alarmiste[11].

Des études plus récentes ont montré une augmentation de l'importance d'absence de risques sanitaires en tant que critère de qualité des aliments. En 2001, ce critère était cité par 15% des Français en premier choix (contre 40% pour le goût)[14]. Il est passé en 2004 à 27% (contre 23% pour le goût)[15]. En cumul des premier, deuxième et troisième choix, le goût reste néanmoins en tête, avec 23% de réponses, contre 22% pour le risque sanitaire (figure 3).

En conclusion, la qualité des produits alimentaires est loin d'être un enjeu sociétal central. Néanmoins, cette qualité est synonyme d'absence de risque sanitaire pour une majorité des Français, et beaucoup d'entre eux estiment que cette sécurité est en baisse.

C. La France dans l'Europe

D'après les chiffres officiels de cas déclarés d'infections alimentaires, fournis par 44 pays européens à l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2003[8], la France se situe en 5^{ème} position en terme d'incidence, avec 23 cas par an pour 100 000 habitants, derrière la Roumanie (5), la Russie (7), la Croatie (21) et la Grèce (22), et loin devant la plupart des pays, tels que l'Allemagne (243) ou le Royaume-Uni (199). La situation de la France est donc excellente, si tant est que les chiffres officiels soient exactement comparables.

Quant à l'opinion des Européens concernant la sécurité sanitaire des produits, une enquête menée en 2001 en Allemagne et aux Pays-bas montre que le consommateur choisit un produit alimentaire surtout en fonction de la saveur, du prix et de la fraîcheur[16]. Des enquêtes plus globales, réalisées dans le cadre de l'Eurobaromètre, permettent d'avoir une vue d'ensemble sur tous les pays de l'Union Européenne. Le dernier Eurobaromètre standard en date (automne 2003) montre une nouvelle fois que les Français accordent beaucoup d'importance à la qualité des produits alimentaires. 87% d'entre eux pensent que ce sujet devrait figurer parmi les actions prioritaires de l'UE, ce qui les place au 5^{ème} rang européen derrière le Portugal, le Luxembourg, la Grèce, et la Suède[17]. Une étude de 1998 indiquait déjà un degré de paranoïa relativement élevé en France comparativement à nos voisins européens[18]. Sur 12 produits alimentaires proposés, une moyenne de seulement 63% des sondés français les considéreraient sûrs, ce qui plaçait la France au 10^{ème} rang européen (sur 15).

La France est donc dans une situation paradoxale, puisque les questions de sécurité sanitaire préoccupent plus les Français que leurs voisins, alors même que la situation y est plus favorable. Cet état de fait est d'autant plus étonnant que l'impact de ce problème, aussi bien en terme de morbidité que de mortalité, est relativement faible.

II. Le cadre législatif

La maîtrise du problème de sécurité sanitaire, en France et en Europe, passe par une intensification des contrôles, en particulier microbiologiques, en tous points de la chaîne de production et de distribution. Sous la responsabilité de l'industriel, ou mené par un organisme public, chacun de ces contrôles s'inscrit dans un cadre législatif de plus en plus strict.

A. La réglementation en agroalimentaire

Le contrôle sanitaire des produits alimentaires intervient à deux niveaux.

1. Les autocontrôles : une obligation pour les entreprises agroalimentaires

La responsabilité des professionnels quant à leurs pratiques et à leurs conséquences est un des éléments fondamentaux de la sécurité alimentaire, qui se traduit par l'obligation de mise en place d'autocontrôles fondée sur les principes de la méthode d'analyse des risques et maîtrise des points critiques (HACCP), introduite par la loi du 19 mai 1998.

L'absence ou l'inefficacité des autocontrôles peuvent entraîner des sanctions administratives importantes allant de la saisie des denrées produites jusqu'à la fermeture de l'établissement (correspondant à des mesures de type préventif).

Par ailleurs, le distributeur d'un produit agroalimentaire ou le consommateur peuvent introduire des actions civiles lorsque le produit ne présente pas les caractéristiques attendues, notamment en terme de sécurité alimentaire. Le producteur sera considéré comme responsable si les autocontrôles prévus n'ont pas été mis en place.

Cette responsabilité du professionnel a été introduite positivement par le législateur dans le droit français, par la loi du 19 mai 1998, sur la responsabilité du fait des produits défectueux. Ce texte, qui transpose une directive communautaire, met en place un système de responsabilité sans faute. Les objectifs de la directive étaient d'harmoniser le régime de responsabilité dans l'Union Européenne, et de promouvoir un régime simple de responsabilité favorable aux victimes.

Cependant, ce texte prévoit que le producteur peut être exonéré de sa responsabilité, notamment lorsque l'état des connaissances scientifiques et techniques au moment de la mise en circulation du produit ne permettait pas à celui-ci de déceler l'existence du défaut.

2. Les contrôles officiels

Les agents de l'Etat sont chargés du contrôle de l'application par les professionnels des réglementations en matière de sécurité sanitaire des aliments. Ce contrôle se situe à trois niveaux différents :

- Le premier consiste en la vérification du respect des prescriptions classiques conformément à la conception, l'aménagement, l'équipement et l'entretien des locaux, le comportement du personnel et sa propreté.
- Le second niveau découle des principes des autocontrôles que doit mettre en place tout professionnel de l'agroalimentaire et des moyens spécifiques qu'il aura choisi de mettre en œuvre pour répondre à l'obligation de sécurité des aliments.
- Le troisième niveau consiste en la mise en œuvre de plans de surveillance dont l'objectif est d'estimer la contamination de produits destinés à la consommation humaine par les substances susceptibles de constituer un risque pour la santé du consommateur. Les agents de contrôle réalisent des prélèvements dans les industries agroalimentaires et dans les élevages en vue de rechercher des contaminants dans les denrées alimentaires, et en particulier des contaminants microbiologiques.

B. La réglementation pharmaceutique

L'activité de l'industrie pharmaceutique en France s'exerce dans un cadre très strict fixé par les Codes de la Santé Publique et de la Sécurité Sociale.

La fabrication, l'importation, l'exportation, la distribution en gros de médicaments ainsi que l'exploitation des spécialités pharmaceutiques ne peuvent être effectuées que dans des établissements pharmaceutiques dont l'ouverture est subordonnée à une autorisation délivrée par les autorités nationales.

Par ailleurs, un médicament ne peut être commercialisé que s'il a reçu une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), ce qui signifie qu'ont été réalisées les études qui ont permis de s'assurer de sa qualité, de sa sécurité et de son efficacité. L'AMM peut être refusée, suspendue

ou retirée à tout moment si l'évaluation du rapport entre le bénéfice et le risque n'est pas satisfaisante. Par ailleurs des contrôles en laboratoire sont effectués, ainsi que des inspections sur les lieux de fabrication. Au minimum ces inspections ont lieu tous les deux ans. Ces inspections concernent les différentes étapes de la production d'un médicament, ainsi que les sites de production des matières premières utilisées dans la fabrication du produit fini.

Postérieurement à la délivrance de l'AMM, la pharmacovigilance a pour objet la surveillance du risque d'effet indésirable résultant de l'utilisation des médicaments mis sur le marché. La prévention d'un risque d'effet indésirable peut conduire dans de rares cas à un retrait du marché de la spécialité concernée.

C. Les instances de veille et de contrôle sanitaire

1. Au niveau national

a) La veille sanitaire

L'Institut national de Veille Sanitaire (InVS) succède au réseau national de santé publique. Il est placé sous la tutelle du ministre chargé de la santé. La mission générale de l'InVS est de suivre, en permanence, l'état de santé de la population et son évolution, de surveiller l'épidémiologie et l'évaluation des risques. L'InVS fait appel aux différents systèmes de surveillance ou réseaux de services de soins, et s'appuie sur des réseaux nationaux participant à la surveillance de l'état de santé de la population, dont il anime la fonction de veille sanitaire.

C'est cet organisme qui centralise, par exemple, les notifications pour les maladies à déclaration obligatoire. Nombre de ces maladies sont liées à des produits de consommation, notamment alimentaires (TIAC, botulisme, listériose, etc...). Il a également la charge de la publication du Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire.

b) Le contrôle sanitaire dans l'agroalimentaire

Placée sous la triple tutelle des ministres chargés de la santé, de l'agriculture et de la consommation, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) a été créée le 1^{er} avril 1999.

Ses missions sont au nombre de trois :

- Evaluer les risques nutritionnels et sanitaires des aliments depuis la production des matières premières jusqu'à la distribution au consommateur. Ceci couvre, en particulier, les risques microbiologiques ;
- Mener des activités de recherche et d'appui technique en matière de santé animale, hygiène des aliments et nutrition ;
- Assurer des missions spécifiques en matière de médicament vétérinaire (évaluation des dossiers d'autorisation de mise sur le marché, de limites maximales de résidus, contrôle de qualité, contrôle de la publicité et pharmacovigilance vétérinaire).

L'agence a un rôle de veille et d'alerte sans pouvoirs de contrôle direct ni de police sanitaire qui relèvent des ministères concernés sauf pour ce qui est du médicament vétérinaire. L'agence émet des avis, formule des recommandations, accomplit des recherches, fournit l'expertise dans le cadre de l'appui scientifique et technique, mène des actions d'information ou de formation. Pour tout ce qui relève de la sécurité sanitaire des aliments, elle est consultée systématiquement sur tous les projets réglementaires et législatifs de son champ de compétence. Elle a la faculté de s'auto-saisir ou de l'être par les ministères et par les associations agréées de consommateurs.

c) Le contrôle sanitaire en pharmaceutique

L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) a été créée par la loi du 1er juillet 1998 relative au renforcement de la veille sanitaire et du contrôle de la sécurité sanitaire des produits destinés à l'homme. Elle est placée sous la tutelle du ministre chargé de la santé.

L'AFSSAPS a hérité des compétences de l'Agence du médicament élargies à tous les produits de santé. Elle garantit, au travers de ses missions de sécurité sanitaire, l'efficacité, la qualité et le bon usage de tous les produits de santé destinés à l'homme, ainsi que des produits cosmétiques.

Elle prend des décisions au nom de l'Etat, notamment en ce qui concerne les AMM. Les décisions concernant les AMM (octroi, refus, modification, renouvellement, retrait) sont prises par le directeur général de l'AFSSAPS après avis de la commission d'AMM. Ces avis résultent d'un processus d'évaluation technique et scientifique des données du dossier

présenté le plus souvent par un laboratoire pharmaceutique. Ce dossier comporte les résultats des études pharmaceutiques et biologiques, pharmacologiques et toxicologiques ainsi que des études chimiques. L'AMM peut être suspendue ou retirée à tout moment si :

- il apparaît que la spécialité pharmaceutique est nocive dans les conditions normales d'emploi ;
- l'effet thérapeutique fait défaut ;
- la spécialité n'a pas la composition qualitative et quantitative déclarée ;
- il apparaît que les renseignements fournis sont erronés ;
- les conditions prévues lors de la demande de mise sur le marché ne sont pas ou plus remplies, comme par exemple la qualité microbiologique du produit ;
- l'étiquetage ou la notice du médicament ne sont pas conformes aux prescriptions générales ou spécifiques prévues.

Pour motiver son avis, l'AFSSAPS peut évaluer un produit sur le plan scientifique et médico-économique, réaliser des contrôles ou avoir recours à des inspections sur sites.

2. Au niveau européen

Les organismes européens n'ont en général qu'un rôle consultatif, essentiellement à la demande de la Commission Européenne. Ils représentent néanmoins le premier pas vers une centralisation des réseaux de veille et de contrôle sanitaire à un niveau européen, au travers notamment de leur mission de coordination et de gestion des dossiers communs à toutes les instances nationales (Tableau II).

a) L'agroalimentaire

La politique de sécurité alimentaire de l'Union Européenne englobe les chaînes alimentaires humaines et animales. Elle fournit une vaste législation et décrit la responsabilité des producteurs et des fournisseurs dans le maintien de la qualité de l'alimentation. Les règlements de l'UE comptent parmi les plus sévères dans le monde.

La législation européenne a été complètement révisée, vers la fin des années 90, pour la rendre plus scientifique et transparente. En 1997, un nouveau conseil scientifique européen a été établi. L'Agence Européenne pour la Sécurité de la chaîne Alimentaire (EFSA) a vu

quant à elle le jour en 2002. L'EFSA est un organisme indépendant qui travaille en étroite collaboration avec de nombreuses agences scientifiques et institutions des états membres de l'UE. Elle fournit, en toute indépendance, des conseils scientifiques sur toutes les matières ayant un rapport direct ou indirect avec la sécurité alimentaire. Elle couvre tous les niveaux de la production alimentaire, de la production primaire à la livraison au consommateur. L'EFSA prend également en charge l'évaluation des risques au sein de la chaîne alimentaire et l'évaluation scientifique de toutes les matières en rapport avec l'alimentation, que ce soit aussi bien la santé et le bien-être animal que la santé végétale.

b) La santé

L'Agence européenne pour l'évaluation des médicaments (EMA) a été créée le 22 juillet 1993 et est opérationnelle depuis 1995.

Sa mission principale est la protection de la santé humaine et animale. L'EMA fonctionne en réseau et coordonne les ressources scientifiques mises à disposition par les autorités nationales des états membres de l'Union Européenne, afin d'assurer une évaluation et supervision des médicaments. L'Agence travaille en étroite collaboration avec des partenaires internationaux, renforçant la contribution de l'UE aux efforts d'harmonisation mondiale.

Les avis scientifiques de l'Agence sont élaborés par trois comités responsables des médicaments à usage humain (le Comité des spécialités pharmaceutiques), des médicaments à usage vétérinaire (le Comité des médicaments vétérinaires) et des médicaments dits "orphelins" pour les maladies rares (le Comité des médicaments orphelins).

L'EMA est habilitée à délivrer des AMM européennes, par le biais de la procédure dite centralisée, valables pour tous les pays membres de l'UE.

c) La veille

Le réseau européen de surveillance, d'alerte et de contrôle des maladies infectieuses financé par la Direction Générale SANTé et CONSommation (DG SANCO) de la Commission Européenne met en relation les ministères chargés de la Santé et les instituts de surveillance des états membres. Le système d'alerte, basé sur un réseau de télétransmission sécurisé entre les états membres, permet l'échange rapide d'informations épidémiologiques sur les risques infectieux pouvant toucher plusieurs états membres. Il doit permettre d'identifier précocement les menaces infectieuses émergentes en Europe et de coordonner la réponse.

3. Au niveau international

L'OMS, agence spécialisée des Nations Unies pour la santé, a été fondée le 7 avril 1948. Comme il est précisé dans sa Constitution, l'OMS a pour but d'amener tous les peuples au niveau de santé le plus élevé possible. Parmi ses six fonctions de bases, on trouve « Gérer l'information, évaluer les tendances et comparer les performances des systèmes de santé » et « Fixer, valider, contrôler et faire respecter des normes et des critères ».

a) Veille sanitaire mondiale

Pour la première, qui correspond à une mission de veille sanitaire, cela se concrétise par un rapport annuel sur la santé dans le monde. Ce rapport fait un bilan des principales données sanitaires globales, et soumet également des suggestions visant à permettre une amélioration de la situation sanitaire mondiale. Une banque de données regroupant les statistiques disponibles pour chaque pays est également mise à disposition du public et mise à jour régulièrement. Enfin, d'un point de vue plus opérationnel, l'OMS émet également des bulletins d'alerte et des recommandations concernant les épidémies en cours, par le biais du département de surveillance et de réponses face aux maladies contagieuses.

b) Le Codex Alimentarius

Pour ce qui concerne la normalisation internationale en matière agricole et alimentaire, elle est assurée par différents organes tels que la Convention Internationale de Protection de Végétaux (CIPV) en matière de santé des végétaux, l'Office International des Epizooties (OIE) en ce qui concerne la santé animale et les zoonoses et la Commission du Codex Alimentarius (CCA) pour l'innocuité et la loyauté des transactions des denrées alimentaires. Le Codex Alimentarius est un programme mixte de la FAO et de l'OMS créé en 1962 et chargé d'élaborer des normes internationales relatives aux denrées alimentaires dans le double objectif de protéger la santé des consommateurs et d'assurer la loyauté des pratiques suivies dans le commerce. La CCA est une instance intergouvernementale regroupant 161 membres qui disposent chacun, comme à la FAO, d'une voix lors des votes pour l'adoption des normes. Le recours au vote est toutefois très rare, les normes étant le plus souvent adoptées par consensus.

Le Codex Alimentarius *sensu stricto* est l'ensemble des normes, directives, codes d'usage et recommandations élaborés par l'organe exécutif du programme FAO/OMS : la Commission du Codex.

Dans le cadre de la création de l'Organisation Mondiale du Commerce (OMC) qui s'est substituée au GATT en avril 1994, deux accords spécifiques ont été conclus à Marrakech afin de limiter le recours à des entraves injustifiées aux échanges à l'aide de règles techniques à visée protectionniste :

- l'accord sur l'application des mesures sanitaires et phytosanitaires (accord SPS) et
- l'accord sur les obstacles techniques au commerce (accord TBT)

Avec la signature de ces accords et la mise en place d'un Organe de Règlement des Différends (ORD), les normes édictées par les organisations internationales de référence ont été reconnues officiellement pour les échanges commerciaux. Le Codex Alimentarius est visé explicitement par l'accord SPS et implicitement par l'accord TBT (pour ce qui concerne les procédés de production, la composition, les dénominations, l'étiquetage, le marquage, le conditionnement, l'emballage des denrées alimentaires).

L'adoption en juillet 1995 par le Codex Alimentarius de limites maximales de résidus (LMR) pour cinq hormones, sur la base des travaux du JECFA (Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires) a été à l'origine d'un panel à l'OMC, à la demande des Etats-Unis et du Canada contre l'Union Européenne (dont la réglementation prohibe l'usage à des fins anabolisantes d'hormones en élevage). Il s'agit du premier exemple d'utilisation d'une norme Codex dans le cadre d'un litige porté devant l'OMC. Les enjeux des discussions internationales visant à l'élaboration des normes codex ont pris une importance capitale depuis les accords de Marrakech.

c) La Conférence Internationale d'Harmonisation

Il n'existe pour l'instant aucune instance de contrôle mondial en matière de produits de santé humaine. Les trois grandes instances restent donc l'EMEA en Europe, la Food and Drug Administration aux USA, et le Kosheisho au Japon. Toutes trois délivrent les AMM dans leur zone d'influence. Néanmoins, depuis les années 1990, un effort d'harmonisation a été entrepris dans le cadre de l'OMS, auquel participent ces trois organisations et les industries pharmaceutiques. Le projet de Conférences Internationales sur l'Harmonisation des prérequis techniques à l'enregistrement de produits pharmaceutiques à usage humain (ICH) permet une avancée significative dans ce sens. On est cependant encore très loin de l'établissement d'un organisme réglementaire.

III. Les enjeux économiques

Si l'incidence et l'importance des infections d'origine bactérienne causées par des produits de consommation (essentiellement alimentaires) semblent relativement faibles en France, c'est une évidence de dire qu'elles seront toujours trop fortes tant qu'elles ne seront pas nulles. La réalité actuelle impose néanmoins que cette évidence sur le plan humain soit relayée par des évidences économiques, qui tendent à avoir un poids important à certains niveaux décisionnels.

A. Le coût social des infections bactériennes

1. Une estimation improbable

Il est bien sûr extrêmement difficile – pour ne pas dire impossible – de chiffrer ce coût avec précision. La première raison a déjà été évoquée, et il s'agit de la faible fiabilité des statistiques épidémiologiques. S'il est certain que les données officielles sont inexactes quel que soit le pays, aucune estimation ou facteur correctif ne semble en revanche faire consensus.

Ensuite, et d'un point de vue strictement économique, les infections bactériennes entraînent une variété de conséquences dont le coût est parfois difficilement chiffrable. Il est facile par exemple, d'estimer le coût des soins médicaux, ou des journées de travail perdues. En revanche, la baisse de fréquentation des restaurants étant à l'origine d'une TIAC est par exemple peu quantifiable, de même que le décès d'un nourrisson.

Enfin, ce coût dépend de toute évidence de la gravité de chaque cas d'infection. Une infection ayant pour conséquence une gêne passagère n'aura bien sûr pas le même impact qu'une infection entraînant une hospitalisation. Or, il n'existe là encore aucune information précise, du moins en France, sur l'importance et la gravité des TIAC ou autres infections déclarées.

Un certain nombre de chiffres ont cependant été publiés depuis une dizaine d'années, notamment par les instituts américains, qui ont une approche très économiste des problèmes de santé publique notamment. Pour toutes les raisons évoquées plus haut, qui s'appliquent pour la plupart à tous les pays, il convient donc de ne pas considérer ces chiffres pour autre chose que ce qu'ils sont : de très vagues et improbables estimations.

2. Les chiffres des économistes

L'une des premières études d'envergure a été publiée en 1996 par l'Economic Research Service (ERS) des Etats-Unis[19]. Elle attribuait aux infections bactériennes d'origine alimentaire un coût de 2,7 à 6,7 milliards de dollars par an aux USA. Les postulats et approximations ont depuis été affinés, et cette même estimation publiée par l'ERS pour l'année 2000 était de 6,9 milliards de dollars, soit environ 25\$/an et par habitant. Plusieurs pays ont depuis lors commandé des études similaires (Tableau III).

Il est bien évident que ces chiffres ne peuvent en aucun cas être strictement comparés les uns aux autres. Chacune des études repose sur des postulats et sur des statistiques bien différentes. En revanche, il apparaît clairement dans chacun de ces cas, que l'ordre de grandeur de ces coûts est loin d'être nul ou négligeable.

3. Un cas réel

Toutes ces extrapolations sont probablement raisonnables, mais considérer des chiffres exacts reposant sur des faits réels permet de souligner d'autant mieux le poids économique de ces infections bactériennes. Une étude portant sur un cas concret de salmonellose a été ainsi réalisée au Royaume-Uni en 1989[25].

Cette épidémie de salmonellose a été détectée par le système de surveillance après 245 contaminations et 51 hospitalisations. Une alerte publique a alors été lancée, et 80% des produits incriminés rappelés. Le coût total de cette épidémie, réparti entre le public, l'Etat, le système de santé et les laboratoires de contrôles, était d'environ 400 000£ (~ 610 000€). Cette étude a également permis de déterminer le gain financier réalisé grâce à la détection précoce du problème. Sans le rappel, l'épidémie aurait en effet coûté environ 1,8 millions de livres (~ 2,7 millions d'Euros). En l'occurrence, les auteurs concluent que le retour sur investissement concernant la mise en place du réseau de surveillance est d'un facteur de 3,5 pour le secteur public, et 23,3 pour la société en général. Sur un plan humain, les auteurs de cette étude estiment que 29 000 cas d'intoxication, 185 hospitalisations et 5 décès ont pu être évités grâce au système de surveillance épidémiologique.

Enfin, cette étude révèle, en creux, ce qu'un contrôle sans faille au niveau industriel aurait permis d'économiser dans ce cas précis : 600 000 Euros, 245 contaminations et 51 hospitalisations, sans compter le gain de productivité pour l'industriel, qui n'aurait pas rappelé et détruit ses produits.

B. Le coût industriel des contrôles

1. Une tendance à l'évitement...

Si pour l'industrie pharmaceutique, il paraît évident qu'aucun défaut de fabrication du produit ne doit porter atteinte à la santé de son consommateur, les choses ne sont pas aussi simples pour l'industrie agroalimentaire. Plusieurs considérations pourraient en effet pousser l'industriel à ne pas réaliser les contrôles nécessaires sur ses produits, et en particulier les contrôles bactériens.

Tout d'abord, il n'est pas possible pour le futur consommateur d'évaluer la qualité sanitaire lors de l'achat. La plupart des toxi-infections alimentaires sont causées par des concentrations faibles de contaminants incolores et sans odeur. La qualité sanitaire d'un produit ne fera donc pas, *a priori*, baisser le volume de vente.

Ensuite, l'immense majorité des toxi-infections alimentaires n'engendrent, chez les personnes par ailleurs en bonne santé, que des troubles diarrhéiques passagers et d'intensité variable. Ces troubles sont bien souvent considérés comme bénins par le consommateur, qui ne juge même pas utile d'aller consulter un médecin ou même de se médicurer (d'où la grande difficulté d'avoir des statistiques fiables quant à l'importance du phénomène).

Enfin, en cas d'infection, le lien entre le trouble et la qualité sanitaire de l'alimentation n'est pas toujours clairement formulé. Même s'il l'était, il serait de toute façon difficile au consommateur d'imputer la responsabilité de son trouble à un aliment en particulier, ce qui met le producteur dans une situation relativement confortable. De plus, lorsque le consommateur parvient à identifier le ou les responsables de son intoxication, sa réaction sera généralement d'éviter la consommation de ce ou ces produits en général, sans discrimination de producteur et/ou de fournisseur.

2. ... encadrée par la législation

Il n'y a donc pas d'incitation « naturelle » forte, pour un producteur ou un fournisseur de l'industrie agroalimentaire, à contrôler de façon stricte la qualité sanitaire de ses produits. La question est alors de savoir si la société dans son ensemble accepte de prendre en charge les coûts, aussi bien humains que financiers, que peuvent entraîner les contaminations des produits de consommation, ou si elle préfère obliger les industriels à prendre ces coûts en charge, par le biais d'une contrainte législative imposant une norme stricte en matière de qualité sanitaire des produits, et se donnant les moyens de contrôler le respect de cette norme.

La tendance internationale actuelle s'oriente très nettement vers la seconde option. Quelques études (Partie I.III.A.3) ont en effet montré que la mise en place d'un système de contrôle qualité était financièrement rentable pour la société en termes financiers, et bien sûr en termes de vies humaines sauvées et plus généralement de confort de vie.

A cela s'ajoute une dimension plus globale. La réglementation sanitaire dont se dote un pays est accessoirement un moyen pratique de réguler et orienter ses échanges commerciaux. Elle devient alors un levier puissant jouant parfois le rôle de protectionnisme (à peine) déguisé, ce qui souligne d'autant plus l'importance de la mise en place du Codex.

3. Les coûts effectifs

Du fait de la très grande variété des cas, tant au niveau des produits que des procédés, il est difficile d'avoir un aperçu global du poids de la démarche qualité sur les industriels dans son ensemble. Cependant, on peut avoir un ordre de grandeur au travers de quelques études précises, portant sur des secteurs d'activité particuliers.

Ainsi, le secteur de la viande et de la volaille a été particulièrement étudié aux Etats-Unis, suite à l'instauration d'une nouvelle réglementation concernant la démarche qualité en 1996. En 1997, une première étude[26] estimait que le coût de la mise en place de cette nouvelle réglementation s'élèverait à 1,1-1,3 milliards de dollars sur 20 ans. Cette même étude estimait l'économie engendrée grâce à la réduction des décès et dépenses de santé entre 1,9 et 171,8 milliards de dollars, la large fourchette s'expliquant par l'influence importante de quelques postulats. Une nouvelle étude[27] publiée en 2003 permet de tirer un premier bilan. Le coût estimé est finalement de 850 millions de dollars, ce qui représente une augmentation du coût de production de 1% dans ce secteur. Ce surcoût s'est bien sûr reporté sur les prix finaux, mais de manière imperceptible pour le consommateur. En revanche, cette augmentation de 1% n'est bien évidemment pas négligeable pour le producteur.

Cependant, les auteurs de cette étude notent un taux significativement plus élevé de faillites ou cessations d'activité des sites de production ayant retardé ou ralenti la mise en place des nouvelles normes de qualité, en comparaison de ceux qui ont immédiatement réalisé les investissements nécessaires. Ce retard, même s'il ne représente qu'un facteur aggravant, et non la cause primaire de la cessation d'activité, est donc extrêmement pénalisant pour l'industriel. La mise en place de cette réglementation est sanitairesment et économiquement intéressante pour la société, et est également rendue indispensable pour les industriels.

En moyenne, il est généralement admis que les coûts d'investissement liés à une démarche d'assurance qualité représentent de 1 à 2% du chiffre d'affaire (CA) d'une PME de 100 salariés. Par ailleurs, le coût de la non-qualité (perte financière due au manque de qualité) se chiffre généralement entre 25 et 40% du CA avant la mise en place d'une démarche qualité, et entre 2 et 4% après. De façon générale, le retour sur investissement est positif pour l'industriel.

C. Exemple du lait UHT

Le lait UHT a la particularité de devoir être parfaitement stérile afin de garantir sa durée de conservation. La méthode de référence standardisée officielle consiste en une incubation du produit pendant 15 jours à 30°C (Directive Européenne 92/46/EEC). Une méthode plus rapide repose sur les conséquences de la croissance de micro-organismes dans le lait : le lait est acidifié. Cette acidification peut être mise en évidence grâce à l'emploi d'un réactif coloré, la resazurine. La réaction colorimétrique prend entre 10 minutes et quelques heures, mais ce test nécessite une pré-incubation de 5 jours des échantillons testés. Cette pré-incubation est nécessaire afin de laisser les éventuels contaminants se développer et atteindre ainsi la concentration minimale pouvant être détectée par la méthode colorimétrique (10^4 UFC/mL).

Durant cette période, et dans l'attente des résultats du test, le ou les lots concernés doivent être stockés. En effet, seuls les lots ayant un résultat négatif peuvent être commercialisés. Pour un site de production de taille moyenne, cette contrainte se matérialise par un stock journalier de 3 millions de litres. D'un point de vue économique, ceci représente un risque évalué à 1 500 Keuros, auquel viennent s'ajouter les coûts annuels de stockage (300 Keuros).

Il apparaît donc bien, sur cet exemple précis, que la démarche qualité a un impact économique non négligeable. De façon corollaire, il est clair que le développement et la mise en place d'une technique fiable, plus sensible et donc plus rapide, permettrait de réduire considérablement cet impact.

Partie II. Les techniques de détection microbienne

En fonction du produit auquel on s'intéresse, l'importance des contrôles microbiologiques peut être énorme. Que l'on recherche les bactéries saprophytes, les bactéries utiles, les bactéries putréfiantes ou encore les bactéries pathogènes, toute démarche qualité concernant les produits de consommation agroalimentaires ou pharmaceutiques fait appel à de nombreux tests bactériologiques.

Comme évoqué dans la première partie, des analyses doivent être menées tout au long des procédés de fabrication et sur le produit final afin de s'assurer que le produit est sain avant sa libération. Les échantillons analysés doivent être de volume suffisant et représentatif. Le prélèvement doit naturellement se faire de façon aseptique.

I. Méthodes classiques

A. Principe

Dans certains cas particuliers, la stérilité ou la qualité microbiologique d'un produit peuvent être estimés par l'effet sur celui-ci de la croissance du ou des micro-organismes (acidification, dégagement de gaz, etc...). Cependant, la plupart des analyses officielles ([28]) se font sur des milieux nutritifs gélosés coulés dans des boîtes de Pétri. Des échantillons liquides de produit (broyé et remis en solution si nécessaire) sont déposés dans les boîtes sur des milieux sélectifs. Il n'existe pas de milieu pour cultiver simultanément toutes les bactéries, qu'elles soient aérobies, anaérobies, thermophiles, mésophiles, exigeantes ou non, fermentant les sucres... Plusieurs milieux différents sont donc utilisés, afin de rechercher des populations bactériennes d'intérêt particulier.

Il peut être nécessaire de pratiquer également des contrôles microbiologiques de l'environnement. Ils sont utiles pour détecter les sources de contamination, ou vérifier l'efficacité d'un traitement décontaminant par exemple.

Une liste non exhaustive des dénombrements les plus classiquement réalisés est donnée ici, dans le but de montrer les principales variations lors de la mise en jeu des techniques normées (normes ISO, [29]).

1. Flore aérobie mésophile 30°C

La définition de la flore totale a fait l'objet d'un arrêté (21/12/1979). Elle correspond aux micro-organismes aptes à donner des colonies visibles après trois jours d'incubation à 30°C sur gélose à dénombrement. En d'autres termes, il s'agit de la flore mésophile aéro-anaérobie facultative. La quantité de bactéries ainsi dénombrées donne une idée de la charge bactérienne globale. Dans des conditions d'hygiène normale, celle-ci avoisine $2,5 \times 10^5$ UFC/g. Au-delà de 5×10^5 UFC/g, le produit est considéré comme impropre à la consommation humaine. Chaque produit a néanmoins une norme spécifique. Il est bien évident qu'un yaourt, par essence très riche en bactéries, n'aura pas la même norme que du lait UHT, théoriquement parfaitement stérile.

Pour les dénombrer, il faut mélanger l'échantillon à la gélose encore liquide et laisser solidifier. Le dénombrement se fait après 72 ± 3 h de croissance à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ (ISO 4833 :1991, [29]). Des techniques spécifiques pour chaque produit viennent compléter cette méthode générale, notamment pour ce qui concerne la préparation de l'échantillon.

2. Les coliformes fécaux

Les coliformes sont les témoins de la qualité hygiénique des aliments. Un nombre élevé de coliformes est généralement synonyme de conditions d'hygiène insuffisante, d'une contamination récente (ils sont facilement détruits par traitement thermique), et entraîne une légitime suspicion de la présence de bactéries pathogènes. En particulier, une indication de contamination fécale va conduire à rechercher plus spécifiquement les salmonelles par exemple.

Les coliformes ne persistent pas longtemps dans les aliments mais leur disparition ou absence ne signifie pas que le risque de trouver un pathogène soit nul. Ils regroupent des entérobactéries ayant des caractères communs, et en particulier celui de pouvoir fermenter le lactose aux températures élevées avec production d'acide et de gaz. Il existe deux méthodes classiques de détection (ISO 4831 :1991, [29]).

a) En milieu solide

Le dénombrement en milieu solide s'effectue en mélangeant le produit à de la gélose désoxycholate lactose. Après solidification, les boîtes de Pétri sont placées à $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durant 24 ± 2 h. Les colonies caractéristiques rouge foncé, d'un diamètre supérieur à 0,5 mm sont dénombrées.

b) En milieu liquide - technique du nombre le plus probable

Le produit est mélangé à du bouillon lactosé bilié au vert brillant dans 3 tubes différents contenant une cloche de Durham, puis le tout est porté à $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 à 48h. Les tubes positifs sont ensuite repiqués dans le même milieu et portés à $44\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pendant 24 à 48h. Les tubes positifs (dégagement gazeux dans les cloches de Durham) sont finalement comptés, et on en déduit le nombre le plus probable de bactéries présentes dans l'échantillon initial, grâce aux tables de référence.

3. Les bactéries pathogènes

a) Les salmonelles

Salmonella est un bacille aéro-anaérobie, responsable de près des deux tiers des toxi-infections alimentaires déclarées en France. Elle doit être absente dans des quantités importantes d'aliment (0/25g). Les salmonelles sont transmises des animaux aux hommes et inversement. Elles sont présentes dans l'intestin d'individus appelés porteurs sains, c'est à dire ne présentant pas les symptômes de la maladie. Le respect des règles d'hygiène (température de stockage des aliments $< 3^{\circ}\text{C}$ ou $> 65^{\circ}\text{C}$, plan de désinfection, hygiène des mains, dépistage des porteurs sains, lutte contre les insectes et rongeurs...) permet de diminuer les risques de contamination par ce pathogène.

La technique de détection se décompose en trois phases, avec une durée totale de 3 à 7 jours. La première consiste en un pré-enrichissement en eau peptonée tamponnée à $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 4 à 24h en fonction du produit et de sa charge microbienne initiale présumée. Ce pré-enrichissement est ensuite inoculé dans du bouillon Muller-Kauffmann au tétrathionate/novobiocine (MKTn), et du bouillon Rappaport-Vassiliadis modifié (RVS). RVS est incubé à $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$, et MKTn à $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, pendant 24 à 48h. Enfin, l'enrichissement est étalé sur gélose sélective à $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant $24\pm 3\text{h}$ au minimum. Si des colonies se développent, il faut alors réaliser d'autres essais biochimiques pour les caractériser (ISO/FDIS 6579 :2001, [29]).

b) Les staphylocoques dorés

Staphylococcus aureus est responsable d'environ 20% des TIAC, appelées également les « Maladies du Banquet ». Lorsque la concentration en staphylocoques devient supérieure à $5\times 10^4/\text{g}$, les bactéries sécrètent une entérotoxine. L'entérotoxine staphylococcique est thermostable et résiste aux températures de cuisson habituelles, alors que les staphylocoques

sont thermosensibles. La norme est généralement de moins de 10^2 bactéries par gramme de produit.

La détection se fait par étalement du produit sur une gélose de Baird Parker (ISO 6888-1 :1999, [29]). Les boîtes sont incubées à 35 ou 37°C pendant 24 à 48h, les colonies caractéristiques sont dénombrées, et des tests biochimiques sont réalisés sur ces colonies (coagulase, thermonucléase).

c) Les anaérobies sulfito-réducteur 46°C

Cette catégorie regroupe plusieurs bactéries, dont en particulier *Clostridium perfringens* ou *Clostridium botulinum*, qui sporulent et forme des spores thermorésistantes. Le nom de ce groupe provient de la méthode utilisée pour les détecter : ils transforment les sulfites du milieu en sulfures noirs. Le dénombrement se fait en milieu solide TSC (tryptone sulfite cyclosérine), après 20h d'incubation à 35 ou 37°C en anaérobiose (NF V 08-019, [29]).

d) Listeria monocytogenes

Le dénombrement se déroule en trois phases. Un premier enrichissement en milieu de Fraser-demi, à 30°C pendant 24h permet d'inoculer un milieu d'enrichissement secondaire liquide complet (bouillon de Fraser). Après une incubation de 48h à 35 ou 37°C, les premier et deuxième enrichissements sont isolés sur des milieux sélectifs solides (Oxford, PALCAM). Après 24 à 48h à 30, 35 ou 37°C, un examen doit permettre de détecter des *Listeria* présumées, qui doivent alors être confirmées par des examens biochimiques (ISO 11290-1 :1996, [29]).

B. Amélioration des méthodes de référence

De nombreux systèmes visent à améliorer une ou plusieurs étapes de ces méthodes, en terme de rapidité, de précision et/ou d'automatisation essentiellement. Les trois étapes critiques sont notamment la préparation, l'ensemencement et la lecture, qui sont celles nécessitant une intervention humaine, souvent longue et fastidieuse.

1. Amélioration de la préparation de l'échantillon

La préparation de l'échantillon est une étape critique. Elle englobe toutes les phases comprises entre le prélèvement et l'ensemencement, en passant par le transport entre le lieu de prélèvement et le laboratoire d'analyse, ou encore la dilution.

Ces étapes sont tout particulièrement problématiques pour les échantillons solides. Il existe aujourd'hui des appareils permettant d'automatiser la dilution, et d'autres réalisant également l'homogénéisation, tels que le désormais classique Stomacher[30] ou le plus récent Pulsifier[31], développés par Anthony Sharpe (figure 4).

2. Amélioration de l'ensemencement

Les techniques de lame immergée, ou de boîtes de contact, rendent cette phase pratiquement instantanée, mais se limitent à des applications pratiques très particulières (contrôle d'un milieu liquide ou de surface respectivement).

Le système Pétrifilm (figure 5) s'est largement popularisé, et permet de substituer aux boîtes de Pétri (longues à préparer) des membranes prêtes à l'emploi permettant la croissance des micro-organismes dans les mêmes conditions. Cette alternative a été validée par l'AFNOR pour de nombreuses applications (Tableau IV). Lorsque cela est possible, l'utilisation de membranes filtrantes autorise également un gain de temps substantiel[33]. Enfin, des appareils permettent également d'automatiser l'ensemencement puis la lecture sur boîte de Pétri classique. Cette automatisation s'accompagne néanmoins parfois d'une perte de précision et de sensibilité[34].

Toutes ces méthodes présentent par ailleurs l'intérêt d'être plus économiques que la méthode traditionnelle[35].

3. Amélioration de la lecture

Les analyseurs d'images, souvent employés en combinaison avec des ensemenceurs automatiques, permettent de s'affranchir d'une étape laborieuse de lecture et de dénombrement des colonies.

On peut également faciliter cette étape en utilisant des milieux contenant des substrats chromogènes, qui apportent éventuellement une coloration souche-spécifique. Le marquage des souches peut également être réalisé par des méthodes immuno-enzymatiques ou par utilisation de sondes nucléiques (Partie II.IV.A.1 et Partie II.II.A respectivement).

C. Avantages et limites

1. Des méthodes lentes et des résultats peu reproductibles

Cette liste des principales familles de micro-organismes habituellement recherchés montre que, pour chacun d'entre eux, la ou les méthodes classiquement employées présentent deux inconvénients majeurs, tous deux liés à la méthode de détection.

Le premier est la faible précision du mode de détection. Malgré l'apparition d'appareils automatiques qui permettent d'étaler puis de dénombrer les colonies à la surface d'une boîte de Pétri, le meilleur dispositif reste encore le bras et l'œil humains. Aux erreurs inhérentes à ce mode de dénombrement s'ajoute la variabilité du phénomène de croissance microbienne. L'expression du résultat en UFC (Unité Formant Colonie) et non en nombre de bactéries en est par exemple une conséquence. Suite à la combinaison de ces multiples facteurs d'incertitude, il est communément admis que la précision du dénombrement n'excède pas $\pm 0,5$ log en concentration. Et encore cette précision n'est-elle valable que pour des concentrations suffisamment élevées pour que le nombre de colonies se développant à la surface d'une boîte de Pétri soit statistiquement significatif. De plus, il est généralement reconnu que ce type de méthode sous-estime le nombre réel de bactéries présentes dans l'échantillon, comme cela a été montré par exemple pour les *Salmonellae*[36, 37, 38].

Le second inconvénient est que la phase de détection ne passe qu'après une nécessaire phase de croissance du micro-organisme. Dans le meilleur des cas, elle est unique, directement sur la boîte de Pétri. Bien souvent, un étalement et une croissance directement sur la gélose ne permettent pas de détecter un nombre suffisant de bactéries, et l'échantillon doit être préalablement enrichi, ce qui implique une ou plusieurs phases de croissance supplémentaires. Les vitesses de croissance des micro-organismes sont extrêmement variables, mais on peut considérer que pour les plus rapides, une phase de croissance nécessitera 24h à 48h. On voit également ici que cette méthode est par ailleurs limitée aux organismes à croissance raisonnablement rapide, qui constituent fort heureusement la majorité des micro-organismes d'intérêt, mais pas la totalité.

2. Des techniques souche-spécifiques

La description des techniques employées a montré que pour chaque souche ou famille d'intérêt est utilisé un milieu et des conditions de croissance spécifiques. Le but de cette démarche est de sélectionner avec autant de précision que possible le ou les micro-organismes

désirés, à l'exclusion des éventuels autres contaminants présents dans l'échantillon. Cette façon de faire présente deux intérêts.

Le premier, c'est de faciliter et accélérer l'interprétation finale du dénombrement. Les conditions de croissance sont en effet choisies de telle sorte qu'une forte présomption existe quant au genre de la bactérie dénombrée. En combinant cette présomption à une confirmation visuelle, on peut bien souvent se passer d'une caractérisation bio-chimique supplémentaire, qui allongerait encore le temps d'obtention du résultat.

Le deuxième, c'est de raccourcir le nécessaire temps de croissance de la bactérie. En fournissant des conditions optimales pour la bactérie recherchée, on accélère bien sûr son taux de croissance pour s'approcher autant que possible de sa vitesse maximale, et réduire d'autant la ou les phases d'attente.

Cependant, le fait que la technique employée accélère la détection et le dénombrement d'une souche en particulier présente l'inconvénient majeur de devoir connaître, *a priori*, quel micro-organisme doit être recherché. Les bases de ces techniques ne permettent en effet pas de quantifier et/ou de qualifier dans un délai raisonnable la population bactérienne d'un échantillon sans avoir une idée assez précise de la nature de celle-ci avant l'analyse. La principale cause à cela est qu'il n'existe pas de milieu de croissance général, permettant le développement rapide de tout micro-organisme, en raison de la grande diversité des besoins de chaque bactérie.

3. L'avantage du classicisme

Ces techniques présentent malgré tout un certain nombre d'avantages de poids.

Le principal est sans aucun doute le prix. Le matériel utilisé est peu onéreux, et la plus grande part du temps utilisé pour ces techniques est dédiée à attendre que les micro-organismes se développent, ce qui ne nécessite aucune intervention humaine. Par ailleurs, les compétences techniques nécessaires à la réalisation de ces techniques sont assez largement répandues. Enfin, et en conséquence des deux points précédents, ces techniques représentent toujours aujourd'hui une référence établie en microbiologie.

II. Techniques de biologie moléculaire

A. Principe

L'idée de détecter les micro-organismes non pas grâce à leur capacité de multiplication, mais grâce à la présence de leur matériel génétique, n'est pas neuve. Les balbutiements de cette approche ont débuté dans les années 1980[39, 40]. La méthode la plus commune alors était d'hybrider l'ADN bactérien par des sondes marquées (radioactives généralement)[41, 42]. Le potentiel de cette approche a cependant été totalement supplanté par la révolution PCR (amplification en chaîne par polymérisation), et tout autre système est tombé, probablement à juste titre, en désuétude.

La PCR est une technique d'amplification enzymatique du nombre de copies d'une séquence nucléotidique ciblée. L'amplification est exponentielle, et peut théoriquement démarrer avec une seule copie originale dans l'échantillon analysé. La première utilisation de cette technique pour la détection de bactéries en milieu complexe a été publiée en 1988[43]. Elle permettait alors la détection d'une bactérie dans un gramme de sol, une sensibilité 1 000 fois supérieure aux techniques moléculaires employées jusqu'alors. Plusieurs techniques s'appuyant sur la PCR se sont depuis développées. Plus récemment encore, des techniques de biologie moléculaire particulières reposant sur l'utilisation de « puces » à ADN ont été développées, et feront l'objet d'un paragraphe indépendant (IV.C.2).

1. La PCR classique

Cette technique décrite pour la première fois en 1985[44] permet d'amplifier des séquences d'ADN et d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement. Elle permet d'obtenir un résultat semi-quantitatif concernant la présence ou l'absence de la séquence recherchée. Elle nécessite de connaître la séquence nucléotidique des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences serviront à synthétiser des oligonucléotides complémentaires (de longueur de 20 à 30 nucléotides en général) que l'ADN polymérase utilisera comme amorces. La technique comporte des cycles successifs. Chaque cycle comprend une succession de trois phases (figure 6):

- Une phase de dénaturation par la chaleur pour séparer les deux brins d'ADN (92-95°C, 30 secondes-1 minute).
- Une phase d'hybridation de l'ADN avec les deux amorces spécifiques à une température d'environ 45-60°C. Chaque amorce se fixe à son brin d'ADN complémentaire (30

secondes-1 minute), et les paramètres de temps et températures choisis doivent dépendre des séquences choisies pour les amorces.

- Une phase d'extension par l'ADN polymérase à partir des amorces à environ 70-72°C (1-2 minutes).

Cette technique a pris un essor considérable avec l'introduction d'une ADN polymérase résistante à la chaleur. Cette ADN polymérase, ou Taq polymérase, est extraite d'une bactérie thermophile (*Thermus aquaticus*) et ne fonctionne qu'aux environs de 72°C. Elle permet une automatisation des différents cycles, le nombre de cycles étant généralement compris entre 30 et 40. Cette méthode permet d'amplifier l'ADN compris entre les deux amorces d'un facteur de 10^5 à 10^6 . Les résultats doivent être optimisés en fonction d'un certain nombre de paramètres: quantité d'ADN de départ, concentration en $MgCl_2$, concentration en amorces, spécificité des amorces, température d'hybridation, etc... Le choix des amorces est particulièrement crucial pour obtenir des résultats satisfaisants (spécificité, taille, paramètres physico-chimiques.....). L'introduction de logiciels spécialisés et des bases de données nucléotidiques a permis de réaliser des choix basés sur des outils statistiques.

Finalement, le produit d'amplification est déposé sur un gel de migration puis révélé. La présence ou l'absence de celui-ci est alors mis en évidence (résultat semi-quantitatif). La technique la plus en pointe à l'heure actuelle est sans doute l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant[45]. Cette technique n'a été que très récemment appliquée à la détection de bactéries dans le cadre d'un contrôle qualité des produits industriels, mais elle paraît assez prometteuse[46]. De nombreux développements sont toutefois encore nécessaires avant de rendre cette approche techniquement attractive.

2. La RT-PCR

La RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR), consiste en une PCR classique après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc). La synthèse d'ADNc est catalysée par des transcriptases inverses (figure 7). Ces enzymes sont des ADN polymérases ARN dépendantes, capables d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADN complémentaire. Cela correspond effectivement à l'«inverse» d'une réaction de transcription de l'ADN en ARN cellulaire classique. Comme toutes les ADN polymérases, les transcriptases inverses ne peuvent pas initier seules la synthèse d'un brin d'ADN. Elles ont besoin d'une amorce possédant une extrémité 3'-OH libre.

Selon les protocoles, il est ensuite recommandé d'inhiber la réaction de transcription inverse et de détruire ou dénaturer l'hybride ARN/ADNc. Ensuite, la Taq polymérase catalyse la synthèse du second brin d'ADNc en utilisant le premier brin comme matrice et la PCR permet d'amplifier le fragment d'ADNc. Le produit final est un ADN dont l'un des brins est complémentaire de l'ARN d'intérêt et l'autre brin a une séquence correspondant à celle de l'ARN d'intérêt.

L'intérêt majeur de la RT-PCR par rapport à la PCR classique est de permettre de détecter spécifiquement des micro-organismes vivants. L'ARN est très rapidement dégradé, aussi bien lorsqu'il est libéré dans le milieu extra-cellulaire (après une lyse par exemple) que lorsqu'il reste confiné dans la cellule. La détection d'ARN messenger signifie donc qu'une cellule capable de transcription est présente dans l'échantillon, ce qui signifie que cette cellule est vivante ou viable. Un petit nombre de succès d'utilisation de cette technique en milieu complexe a été publié ([47]).

3. La PCR quantitative

Dans ce type de PCR, on cherche à estimer le nombre de copies présentes dans la séquence cible d'ADN ou d'ARN. La PCR en temps réel[48] est, dans ce but, particulièrement intéressante, car elle permet une quantification fiable.

Au début de la réaction de PCR, les réactifs sont en excès mais en concentration assez faible afin d'éviter que la renaturation des amplicons n'entre en compétition avec l'hybridation des amorces. L'amplification est alors réalisée à un taux exponentiel. Après la phase exponentielle, la réaction d'amplification entre dans une phase linéaire où le taux d'amplification devient extrêmement variable, même au niveau de replica d'un même échantillon, à cause d'une compétition entre la renaturation des amplicons et l'hybridation des amorces. Suit une phase plateau où le taux d'amplification décroît à près de zéro, générant très peu d'amplicons.

Afin de recueillir des données quantitatives avec précision, chacun des échantillons doit être analysé dans sa phase exponentielle qui est la phase la plus reproductible de la réaction de PCR. La technologie de la PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un composé fluorescent (ou fluorochrome), indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle (figure 8). L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En

observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible.

Cette technique a d'ores et déjà été appliquée à la détection de bactéries (*Salmonella*[49], *E. coli*[50] par exemple) avec succès. En particulier, la méthode LightCycler, bien qu'encore coûteuse, paraît prometteuse et a été utilisée récemment pour la détection de contaminants en agroalimentaire[51, 52].

B. Avantage et limites

1. Une sensibilité et une rapidité élevées...

La sensibilité et la rapidité sont en effet les deux atouts principaux de cette technique. Dans un cas idéal, l'échantillon à analyser nécessite très peu, voire aucune préparation. La PCR en elle-même, si la mise au point a été faite au préalable, se déroule en deux heures environ. Si l'on inclut l'étape de révélation, le tout ne nécessite que quelques heures tout au plus. Et encore ce délai est-il considérablement raccourci avec la PCR en temps réel. Ces délais sont également valables si une unique bactérie est présente dans l'échantillon.

La PCR est extrêmement sensible. De plus, un choix judicieux des amorces permet de rendre la technique spécifique, et de ne sélectionner qu'une population très précise, qu'elle soit pure ou en communauté avec d'autres contaminants.

Cette technique a non seulement l'avantage d'être rapide, sélective et reproductible, mais elle est aussi, dans une certaine mesure, automatisable, spécialement pour ce qui concerne la PCR en temps réel.

2. ... à un coût élevé

Même si les coûts de ces techniques se démocratisent à mesure qu'elles se popularisent, ils demeurent néanmoins élevés en comparaison des techniques classiques. L'équipement (thermocycleur), les réactifs (amorces, et surtout enzymes), le consommable (de qualité biologie moléculaire) sont autant de freins au large développement industriel de ces méthodes. Les formes les plus classiques de PCR ne peuvent de plus pas être totalement

automatisables. Par ailleurs, la mise au point du procédé peut s'avérer très technique et fastidieuse.

Enfin, lorsque l'échantillon contient des concentrations élevées d'inhibiteur pour la PCR, une étape supplémentaire de purification de l'ADN devient nécessaire pour éviter les faux négatifs.

3. Limites de mise en œuvre

a) Quelle bactérie recherche-t-on ?

Pour la PCR comme pour toute méthode, la spécificité est à double tranchant. Elle est particulièrement intéressante lorsque l'on sait quel contaminant est recherché. Les amorces utilisées seront alors développées de sorte que seule cette cible soit amplifiée. Mais le jeu de la mise au point des amorces a ses limites, et elles peuvent rapidement être atteintes. En particulier, il n'est pas possible d'amplifier de longs gènes, ce qui restreint le choix des amorces à une région limitée du gène cible. Lorsque la population ciblée est hétérogène, il faut alors mettre au point et utiliser plusieurs amorces, ce qui multiplie d'autant le coût total de l'opération (multiplex PCR)[53]. Cette approche n'est pas toujours possible en raison des éventuels risques d'inhibition croisée.

b) Dans quel état de viabilité ?

La PCR, dans sa forme la plus classique, ne fait aucune espèce de distinction entre les bactéries mortes, les débris bactériens et les bactéries vivantes, cultivables ou non. Ainsi, la détection du matériel génétique libéré dans le milieu lors de la mort d'une cellule bactérienne va se faire aussi bien sinon mieux que celle d'ADN encore enfermé dans une bactérie vivante. Or, dans de nombreuses applications, la contamination « mémoire », ou les restes d'une contamination passée, n'ont que peu d'importance. Le lait UHT par exemple, contient une quantité importante de débris bactériens provenant de la destruction de la population bactérienne naturellement nombreuse dans le lait lors du traitement UHT, de sorte qu'il devient théoriquement impossible d'y détecter une bactérie vivante par PCR.

Pour s'affranchir de ce problème, lorsqu'il se pose, on peut avoir recours à une phase d'enrichissement du milieu, ce qui retire une bonne part de l'avantage de la technique PCR, ou utiliser une RT-PCR, beaucoup plus délicate à mettre en œuvre d'un point de vue technique. En effet, l'ARN messenger est très facilement dégradable. Cela fait de lui un

marqueur fiable de présence de bactéries vivantes, mais en rend également difficile la manipulation. La contamination des échantillons par de l'ADN génomique est également une des principales difficultés de cette technique. En effet, l'ADN génomique peut entrer en compétition avec l'ADNc lors de l'étape d'hybridation des amorces. Il est donc nécessaire d'avoir recours à une étape supplémentaire de purification de l'ARN.

c) Dans quel milieu ?

Les techniques de PCR ont été utilisées avec succès pour la détection bactérienne en milieu défini simple ([54]). Malheureusement, de nombreux composés, chimiques ou bio-chimiques, peuvent ralentir, voire inhiber, la réaction de PCR. Comme évoqué plus haut, une étape de purification du matériel génétique devient alors nécessaire. Cette étape peut viser à concentrer directement le matériel génétique par des méthodes bio-chimiques, ou à le concentrer par le simple biais de la multiplication des micro-organismes, ce qui, comme nous l'avons déjà vu, est lent.

III. Techniques de détection impédancemétrique

A. Principe et applications

La mesure de l'impédance électrique a été utilisée en tant que moyen de détection dans de nombreux domaines tels que la biologie, la physiologie ou la médecine[55]. L'une de ces applications est la mesure automatique d'impédance en microbiologie. Elle permet de mesurer, détecter, quantifier, identifier les micro-organismes d'un échantillon. La technique consiste en la mesure d'impédance (ou de composantes de l'impédance : conductance, capacitance, résistance...) pendant la croissance d'un micro-organisme, grâce à des électrodes immergées dans un milieu inoculé et maintenu à température constante. Le milieu est alors assimilé à un circuit électrique composé de résistances et de capacités. Le courant qui le parcourt sous l'effet d'une tension alternative est alors fonction de la fréquence de ce courant, et de l'impédance du « circuit », calculée à partir des deux composantes capacitives et conductives suivant l'équation de Eden et Eden[56].

1. Historique

Les concepts de conductance et de conductivité sont connus depuis plus de 100 ans en physique et en chimie. A partir de 1890, un scientifique américain, G.N. Stewart, a mené une série d'expériences qui ont introduit ces concepts en physiologie[57, 58]. Dans sa lancée,

Stewart fut le premier à appliquer l'impédancemétrie à la microbiologie, en mesurant le développement de bactéries putréfiantes dans le sang sur une période de plusieurs semaines[59]. Stewart a ensuite délaissé la microbiologie pour se recentrer sur des études plus physiologiques qui l'ont rendu célèbre.

Entre 1899 et 1970, de très rares publications font état de travaux portant sur la mesure d'impédance en microbiologie : Oker-Blom[60], Parsons et Sturges[61, 62], Parsons *et al.*[63], Allison *et al.*[64] et McPhillips & Snow[65].

Cette technique a alors pris son essor sous l'impulsion des travaux d'Amiram Ur[66, 67, 68]. Pour la première fois, le mot conductance était remplacé par le terme plus général d'impédance, et l'une de ses publications[67] précise : « *En introduisant un inoculum dans un réacteur contenant du milieu de culture, il est possible de suivre les changements d'impédance causés par le développement d'un micro-organisme. De la même manière, il est possible de quantifier de façon précise l'effet d'antibiotiques sur ces cultures* ».

Depuis 1975, les travaux ayant contribué à mieux comprendre l'aspect fondamental du sujet ont été très rares. Cependant, de l'apparition de systèmes spécialement conçus pour la mesure d'impédance microbiologique a résulté une explosion de publications portant sur des applications pratiques de ces techniques.

2. Principe théorique

Les protéines et les sucres du milieu de culture sont électriquement neutres et faiblement ionisés. Les micro-organismes transforment ces molécules et libèrent des molécules plus petites, tels que des acides aminés ou du lactate par exemple, qui possèdent une charge et une mobilité électrique (résultant de la charge et de la taille) nettement supérieures aux molécules d'origine.

Ces modifications peuvent être mesurées grâce à un couple d'électrodes immergées dans le milieu de croissance. La sensibilité des appareils permet de mesurer des variations très faibles d'impédance, et donc de détecter des quantités très faibles de bactéries longtemps avant que des colonies ne soit visibles sur boîtes de Pétri.

La cinétique classique d'impédance d'une culture microbienne est de forme sigmoïde. La première phase correspond au temps nécessaire à la culture pour produire un signal significatif et détectable par l'appareil. Elle est donc pour partie indépendante de la phase de

latence de la culture proprement dite. Les deuxième et troisième phases en revanche, peuvent être assimilées à la phase exponentielle puis à la phase stationnaire observées classiquement lors d'une croissance bactérienne.

Le paramètre fondamental de cette cinétique est le temps de détection (Time To Detection, TTD), qui est le temps nécessaire à la détection d'une modification significative du signal électrique. Deux paramètres vont influencer fondamentalement ce TTD :

- La charge initiale : le TTD est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de micro-organismes présents initialement dans le milieu[69]. Il est donc d'autant plus court que ce nombre est élevé.
- La composition du milieu : pour optimiser le signal obtenu, il convient d'utiliser des milieux de cultures particulièrement adaptés pour induire une variation forte d'impédance. En fonction de la physiologie de la souche considérée, on fournira donc des composés qu'elle aura spontanément tendance à dégrader en petites molécules chargées. Un milieu impédancemétrique idéal permettra donc une croissance rapide du micro-organisme (nutriments adaptés, milieu tamponné), aura une impédance initiale faible (longues molécules faiblement chargées), et fournira au micro-organisme des molécules métabolisées et dégradées en petites molécules chargées. Il sera également faiblement tamponné, afin de ne pas neutraliser les éventuels protons formés par la métabolisation, et qui sont d'excellents conducteurs électriques.

Cet exercice de gymnastique nécessitant parfois une souplesse que la microbiologie et la physico-chimie ne permettent pas, on peut avoir recours à l'impédancemétrie indirecte[70, 71]. Lorsque le micro-organisme étudié s'obstine à ne produire que des déchets métaboliques non ou faiblement chargés (cas des levures notamment), on peut mesurer le changement d'impédance induit par le dégagement de dioxyde de carbone métabolique et son piégeage dans une solution alcaline. On peut alors utiliser un milieu de culture classique. La mesure plus spécifique de la capacitance[72] peut également se montrer adaptée aux croissances microbiennes pour lesquelles les mesures de conductance sont inefficaces. Les levures, moisissures et certaines bactéries non fermentaires peuvent avantageusement être mesurées par ces techniques.

3. Applications

Les principales applications ont lieu dans le domaine de l'industrie agroalimentaire ou pharma-cosmétique, et visent à détecter et quantifier les bactéries d'un produit, dans le cadre par exemple d'un test de stérilité. L'un des premiers secteurs visé par cette méthode a été l'industrie laitière, où de nombreuses publications ont suivi celle de Gnan et Luedecke[73], sur la contamination initiale du lait. Les travaux publiés ont également porté sur les analyses du lait pasteurisé[74], avec des résultats parfois meilleurs que la technique du NPP classiquement employée (détection en 20h de coliformes à 1UFC/mL[75]). Mais la technique a également trouvé des applications dans des domaines aussi variés que la brasserie[76], la viticulture[77], la production de viande[69] ou de poisson[78], ou encore les produits des industries pharmaceutiques ou cosmétiques[79].

Les applications pour l'environnement[80] ou la santé[81, 82, 83] n'ont en revanche pas débouché sur des utilisations standardisées, pas plus que les techniques d'identification[84, 85]. On peut enfin citer les antibiogrammes[56, 86, 87], ou encore l'étude des caractéristiques de croissance des micro-organismes.

B. Les solutions du marché

Essentiellement quatre appareils commerciaux sont disponibles pour les mesures impédancémétriques. Le MALTHUS (développé par Malthus Instruments Ltd) et le RABIT (Rapid Automated Bacterial Impedance Technique, développé par Don Withley Sc. Ltd) mesurent exclusivement les variations de conductance en fonction du temps. Ces deux systèmes permettent également des mesures de conductance indirecte. Le BACTOMETER (développé par bioMérieux-Vitek) et le BACTRAC (développé par SyLab) permettent de mesurer les variations d'impédance, de conductance et de capacitance.

C. Avantage et limites

1. Des systèmes à haut rendement

Les mesures d'impédance peuvent être utilisées pour estimer la qualité microbiologique de matières premières, pour réaliser des tests de stérilité en cours ou en fin de process, ou encore pour évaluer la durée de vie du produit fini. Le principal intérêt de ces techniques est de produire des résultats significativement plus rapidement (habituellement en 2 à 24h, en fonction de la charge initiale) que les méthodes classiques de croissance et comptage de colonies.

En plus de fournir des résultats rapides, ces appareils permettent d'analyser facilement de nombreux échantillons simultanément, et, pour certains d'entre eux, de façon totalement indépendante.

2. Des systèmes robustes, des résultats informatifs

Une conséquence pratique de la simultanéité et la multiplicité des mesures possibles est qu'il est envisageable de réaliser de multiples répétitions pour chaque échantillon, et, si nécessaire, de réaliser également des témoins positifs et/ou négatifs. La multiplication des analyses n'est en effet plus un problème aussi important que pour l'utilisation de méthodes classiques.

Par ailleurs, et comme pour toutes les techniques reposant sur des mesures du métabolisme, on peut considérer que les mesures d'impédance sont de bien meilleurs prédicteurs de la durée de vie du produit testé, que les dénombrements sur boîtes de Pétri. En effet, le nombre de bactéries présentes d'une part, et leur activité, ou capacité à se multiplier d'autre part, peuvent être mesurés simultanément avec ces appareils.

3. Une gamme d'utilisation limitée

La plupart des contaminations microbiennes ont été décrites dans la littérature comme pouvant être mesurées par l'une ou l'autre des techniques d'impédancemétrie. Cependant, à l'heure actuelle, il faut reconnaître que si les contaminations globales peuvent être quantifiées correctement et exactement, les contaminations par des organismes isolés et spécifiquement par les pathogènes s'avèrent plus délicates à évaluer avec précision.

Qui plus est, le milieu de croissance influence fortement la sensibilité et la sélectivité des ces techniques. De ce point de vue, l'inconvénient rencontré est comparable à celui des méthodes classiques, pour lesquelles le développement d'un milieu optimisé s'accompagne d'une spécificité à une souche donnée. La connaissance *a priori* de la souche recherchée devient alors un pré-requis à l'optimisation poussée du procédé.

Pour conclure, le prix reste un inconvénient notable à la technique. Il faut en effet investir dans un appareillage relativement coûteux. La plus grande partie de ce coût s'explique par l'extrême sensibilité de ces mesures aux variations de températures, ce qui oblige au développement d'un matériel de régulation de température particulièrement précis. De plus, le consommable tel que les électrodes et/ou tubes de croissance sont également

onéreux. L'usage de ces appareils est donc réservé à des industries pour lesquelles la multiplicité des échantillons et la vitesse à laquelle ils sont traités compensent l'investissement matériel.

IV. Autres techniques

Le but de cette présentation des techniques de détection bactérienne n'est pas l'exhaustivité. Le nombre et la variété des techniques disponibles est en effet bien trop élevé. Néanmoins, un certain nombre de ces techniques, ou familles de techniques, ont une importance particulière dans le contexte des travaux réalisés au cours de cette thèse, soit parce que les techniques développées au cours de ces travaux s'en inspirent, soit pour permettre des comparaisons d'efficacité. Celles-ci font donc ici l'objet d'un rapide descriptif.

A. Approches sérologiques

La réaction antigène-anticorps est utilisée depuis longtemps dans le domaine du diagnostic médical. Les anticorps sont produits dans un système animal lorsqu'une particule ou molécule étrangère est injectée dans le système. Par exemple, lorsque *Salmonella* est introduite dans un lapin, celui-ci va produire des anticorps dirigés contre la bactérie ou ses composants. Ces anticorps peuvent alors être isolés et purifiés puis utilisés afin de capturer la ou les protéines contre lesquelles ils sont dirigés.

1. Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA)

Il existe de nombreux protocoles ELISA. Le plus couramment utilisé dans le contexte microbiologique est cependant l'ELISA sandwich.

Cette méthode consiste à immobiliser un anticorps dirigé contre la bactérie d'intérêt à la surface d'une plaque de plastique. L'échantillon contenant la bactérie est alors déposé et la bactérie immobilisée sur l'anticorps. Après un lavage, un second anticorps, lui aussi dirigé contre la bactérie, est déposé sur cette même surface. Cet anticorps secondaire est couplé à une enzyme, généralement la peroxydase. Il va s'immobiliser sur les bactéries piégées, et on pourra alors ajouter le substrat de l'enzyme couplée pour révéler la présence de bactéries. La peroxydase catalyse en effet la dégradation de son substrat en un produit coloré. L'intensité de la coloration sera donc proportionnelle à la quantité de peroxydase immobilisée, elle-même proportionnelle à la quantité d'anticorps secondaire immobilisé, elle-même à nouveau proportionnelle à la quantité de bactéries immobilisées.

Toutes ces opérations se déroulent dans des plaques, de 96 puits ou plus, qui permettent d'analyser en parallèle de nombreux échantillons. Le résultat d'analyse peut être qualitatif et interprété à l'œil nu (présence ou absence de coloration), ou même quantitatif si un calibrage préalable a été réalisé.

Une adaptation de ce protocole permet d'obtenir un résultat rapide sans aucune manipulation et met en jeu l'immunoprécipitation visuelle. Ce système se décompose en trois puits. Le premier, dans lequel est déposé l'échantillon, contient l'anticorps couplé à un composé coloré. Le complexe bactérie-anticorps va se former et va alors migrer par capillarité vers le second puits, qui renferme un anticorps secondaire également dirigé vers la bactérie. Le complexe tri-partite va alors précipiter et former une ligne colorée. Les anticorps en excès vont continuer de migrer vers le troisième puits et y seront précipités par un anticorps dirigé contre eux. Une seconde ligne colorée garantira alors que le test a bien fonctionné (témoin positif). Le test en lui-même ne prend qu'une dizaine de minutes, mais ne présente toutefois pour l'instant qu'une sensibilité et une reproductibilité assez limitées[88].

2. La Séparation ImmunoMagnétique (IMS)

Comme nous l'avons vu jusqu'à présent, le principal inconvénient des techniques classiques est de reposer sur une nécessaire phase de croissance du ou des micro-organismes. Le but de toutes les techniques dites rapides est de réduire, voire de s'affranchir de cette phase, qui vise à concentrer, sélectivement ou non, le contaminant recherché, afin de le détecter aisément et sans ambiguïté.

L'intérêt des techniques présentées brièvement dans cette section est de permettre une concentration du micro-organisme par un mécanisme très rapide ne reposant pas sur la multiplication et la croissance bactérienne.

On a recours pour cela à des billes paramagnétiques, c'est-à-dire qu'elles n'expriment leurs propriétés magnétiques que lorsqu'elles sont placées dans un champ magnétique. On peut ainsi obtenir une suspension homogène de ces billes en solution, puis les concentrer au moyen d'un simple aimant[89]. Il existe plusieurs producteurs de billes paramagnétiques, mais le plus réputé est sans doute Dynal, qui fournit une grande variété de produits (Dynabeads), dont certains sont homologués (Tableau IV, p.41). L'essentiel de cette variété repose sur la préparation de la surface des billes, qui peut être déjà recouverte d'anticorps

spécifiques de la souche recherchée ou bien de radicaux chimiques réactifs ayant la capacité de fixer les anticorps requis pour une application particulière.

Après éventuelle immobilisation de l'anticorps désiré à la surface de la bille, le complexe bille-anticorps est mis en solution dans la suspension bactérienne (figure 9). Les bactéries cibles sont alors immobilisées à la surface des billes, puis attirées près d'un aimant placé à l'extérieur du tube. Le diluant de départ peut alors être évacué, et les billes portant les bactéries resuspendues dans un volume plus petit. Les conséquences de cette opération sont donc doubles : d'une part la bactérie cible est concentrée (même quantité, mais dans un volume plus faible), et cela sans croissance bactérienne, et d'autre part la suspension de départ est débarrassée de ses impuretés, qu'elles soient biologiques, particulières ou chimiques.

Cette phase d'isolement/concentration peut alors être suivie d'une phase de détection. Toutes les méthodes de détections sont plus efficaces lorsque la bactérie est plus concentrée et en suspension dans un tampon défini. Chacune d'elle peut donc être utilisée[90] après une IMS, en fonction des besoins.

3. Immuno-immobilisation

Plusieurs systèmes originaux reposent sur l'immobilisation de bactéries en mouvement ou en croissance.

Le test BioControl 1-2 par exemple, permet de détecter *Salmonella* après une nuit d'incubation (et 24h de pré-enrichissement). L'échantillon à analyser est déposé dans un puits communicant avec une chambre contenant de l'agar, à la surface de laquelle l'opérateur va déposer une solution contenant des anticorps dirigés contre le flagelle de *Salmonella*. La bactérie va donc migrer dans l'agar puis se trouver immobilisée lors de sa rencontre avec le front d'anticorps qui diffusent en sens inverse. La réaction va provoquer l'apparition d'un « immuno-bande » en forme de V, visible à l'œil nu, là où les bactéries se concentrent, ce qui rend l'interprétation du test aisée.

Un autre test de détection[91] de *Salmonella* repose également sur l'immuno-immobilisation (Tableau IV, p.41). Il s'agit ici d'introduire un bâtonnet recouvert d'anticorps anti-*Salmonella* dans une préculture. Le bâtonnet et les *Salmonella* capturées sont alors placés dans un second tube contenant un milieu de croissance. Les bactéries se développent alors mais restent piégées sur le bâtonnet. Après 4h, il est transféré vers une troisième tube

contenant un anticorps secondaire, puis lavé et mis en présence d'un réactif coloré dans les tubes suivants. Le principe général est exactement similaire à l'ELISA classique, mais le dispositif est plus facilement maniable, et la phase de croissance bactérienne immobilisée par les anticorps augmente beaucoup la sensibilité du système, et donc diminue la durée du test (environ 22h en tout).

4. Limites de ces méthodes

Les techniques reposant sur une reconnaissance antigène-anticorps nécessitent un nombre important de bactéries (de l'ordre de 10^6 UFC), et par conséquent une phase d'enrichissement préalable est indispensable.

De plus, le milieu de culture et/ou la matrice à analyser (aliment par exemple) sont susceptibles d'interférer sur la réaction. Ainsi, des débris, bactériens ou autres, peuvent générer de faux positifs, et ces techniques nécessitent donc souvent une étape de confirmation supplémentaire, faisant appel à d'autres protocoles. Des protéases, présentes dans le milieu, peuvent dégrader le réactif. Des produits chimiques peuvent également inhiber la réaction.

Enfin, ces méthodes mettent en jeu des protocoles rigoureux, longs et fastidieux, en particulier pour ce qui concerne l'ELISA dans sa forme la plus classique. Mais depuis quelques années sont apparus des kits de diagnostic automatiques reposant sur la technique ELISA : VIDAS (bioMérieux), Assurance EIA (BioControl), Detex (Molecular Circuitry Inc.), pour n'en citer que quelques-uns (Tableau IV, p.41). Les dispositifs de migration latérale ou d'immuno-immobilisation ont également pour objectif principal de répondre à ce problème.

B. Méthodes colorimétriques

La mise en jeu d'une ou plusieurs réactions colorées permet souvent d'accélérer la phase de détection des micro-organismes par rapport à l'observation à l'œil nu de la formation de colonies. Les méthodes sérologiques, déjà évoquées, reposent généralement sur ce principe, mais elles ne sont pas les seules.

1. Direct Epifluorescent Filter Technique (DEFT)

Cette méthode simple en théorie consiste à filtrer l'échantillon à analyser, ou un enrichissement de cet échantillon. Les bactéries, retenues par le filtre, sont alors colorées à l'acridine orange (colorant de l'ADN et de l'ARN), puis le filtre est observé en microscopie UV[92, 93]. Les bactéries vivantes émettront une fluorescence orangée, tandis que les bactéries mortes seront vertes[94]. La lecture se fait généralement manuellement, mais il existe également des appareils semi-automatiques.

Cette technique donne néanmoins des faux positifs fréquents. La coloration est en effet influencée par de nombreux paramètres, tels que la concentration en ARN de la bactérie (i.e. son état physiologique) ou la perméabilité de sa membrane à l'acridine (caractère souche spécifique). Les performances de cette technique restent cependant acceptables dans certains cas et sur certains produits[95], et elle a même été adoptée comme technique de routine dans l'industrie laitière au Royaume-Uni.

L'investissement matériel reste élevé – mais le coût de l'analyse est ensuite très faible – et la sensibilité n'est pas inférieure à 10^3 - 10^4 bactéries par millilitre. Par ailleurs, cette technique ne s'applique que lorsque le produit est filtrable, soit naturellement, soit après un traitement qui n'altère pas la flore bactérienne.

La cytométrie de flux peut être considérée comme une amélioration de cette technique. Elle consiste en effet à marquer les bactéries et à les injecter dans le canal d'un appareil de détection de fluorescence[96, 97, 98]. L'avantage de cette technique, outre l'automatisation de la partie la plus laborieuse du procédé, est que chaque bactérie passe dans le canal, et l'analyse permet en théorie d'obtenir des informations sur chaque cellule, et donc sur l'ensemble de la population, telles que la taille et la forme des bactéries. Malheureusement, il reste difficile d'adapter la cytométrie en flux à la bactériologie[99], même si les applications pour les cellules eucaryotes sont légion. Les bactéries sont en effet plus petites, contiennent moins de copies d'ADN (typiquement 3 log de moins qu'une cellule eucaryote), et ont des caractéristiques physiques (taille, forme) extrêmement dépendantes de leur milieu de croissance, ce qui rend la détection et le typage difficiles[100].

2. ATPmétrie

Tous les organismes vivants utilisent de l'Adénosine TriPhosphate (ATP). En présence du couple luciférine/luciférase, d'oxygène et d'ions magnésium, l'ATP va faciliter la réaction conduisant à la génération de lumière. La lumière émise peut alors être reliée à la biomasse[101]. La méthode peut-être rendue spécifique de l'ATP microbien par une lyse sélective préalable des cellules somatiques[102].

Les appareils de détection disponibles rendent la technique très sensible, et sont en théorie capables de détecter jusqu'à 100 bactéries (plutôt 10^3 - 10^4 en pratique). Malheureusement, il n'est pas possible d'estimer le nombre de bactéries viables dans le produit par cette méthode, car la conversion entre ce résultat et la mesure d'intensité de lumière émise est trop fluctuante. La quantité d'ATP par unité de biomasse est en effet influencée par la souche, par son état physiologique, ainsi que par le produit lui-même. Le résultat est donc exprimé en unité de lumière relative.

Bien que cette contrainte limite fortement l'exploitation de cette méthode, elle a fait l'objet de développement sur des produits aussi variés que la viande, le lait, l'eau, les jus de fruit, le vin[103] ou encore la bière[104]. L'application pour laquelle cette technique a rencontré un vif succès reste cependant le contrôle de surface, dans le but de vérifier l'efficacité d'une désinfection par exemple. Dans ce contexte en effet, l'origine de l'ATP (cellulaire, bactérien, etc...) importe peu, de même que sa quantité, si l'on ne s'intéresse qu'à un résultat de présence ou absence de contaminant. On obtient ainsi un rapide indicateur global d'hygiène.

3. Bactériophages bioluminescents

Cette technique repose sur le même principe que l'ATPmétrie, et fait intervenir la luciférase. Des phages modifiés pour transférer le gène de la luciférase sont incubés dans la suspension contenant les bactéries. Lorsque le virus infecte la cellule, la bactérie intègre ce gène et devient luminescente[105]. Différents bactériophages peuvent ainsi être utilisés afin de cibler une ou plusieurs souches bactériennes, et de nombreuses applications ont été publiées[106, 107]. De même que pour l'ATPmétrie, et pour les mêmes raisons, cette approche présente l'avantage de ne détecter que les cellules viables, mais elle peut être relativement longue (le temps de l'infection des bactéries par le virus), et reste assez peu sensible.

C. Bio-capteurs

Un bio-capteur peut se définir comme une molécule biologique attachée à un détecteur. Il existe donc une très grande variété de bio-capteurs. La partie biologique peut être constituée d'un anticorps, d'un récepteur, d'une enzyme, d'acides nucléiques... Le détecteur quant à lui peut mesurer des signaux aussi variés que des signaux optiques, électrochimiques, thermiques ou massiques. Enfin, l'analyte détecté peut être la bactérie (détection directe) ou un composé caractéristique de sa présence (détection indirecte).

La combinaison de chacune de ces possibilités rend très importante la variété des applications. La revue d'Ivnitski *et al.*[106] reste la plus complète sur le sujet de l'utilisation des bio-capteurs pour la détection bactérienne. A l'heure actuelle, l'utilisation de nez électroniques ou de bio-puces semblent les plus prometteuses.

1. Les nez électroniques

Les nez électroniques sont des groupes de détecteurs de produits chimiques destinés à analyser les métabolites volatiles présents dans l'air. Chacun des capteurs est destiné à la détection d'un composé particulier. Les signaux sont ensuite analysés par un logiciel permettant d'associer un micro-organisme particulier au profil chimique de l'air situé au-dessus de la culture bactérienne après comparaison à des profils de référence[108]. Dans certains cas précis, il est également possible de quantifier la contamination, ou de préciser dans quelle phase de croissance elle se situe. Ce type de dispositif a été appliqué à de nombreux produits, notamment agroalimentaires[109, 110, 111, 112]. Les progrès récents ont permis de miniaturiser ces dispositifs, et de les rendre plus robustes, pour des coûts relativement modestes. Ils présentent alors l'avantage de fournir des résultats rapides *in situ*. Ils sont de plus non-invasifs, et ne nécessitent aucune formation technique pour l'opérateur. En revanche, ils ne sont adaptés qu'à une tâche particulière, le développement d'une application nouvelle restant relativement complexe. L'utilisation de nez électroniques n'est pas non plus possible lorsque l'air à analyser est trop humide, car cela interfère avec les capteurs et fournit des résultats non reproductibles.

2. Les biopuces

Une biopuce est un petit outil d'analyse et de diagnostic d'environ 1cm^2 . Elle se présente sous la forme d'un support en verre ou en silicium sur lequel sont fixés des protéines ou des milliers de fragments d'ADN ou d'ARN.

Lors d'une analyse, on cherche à détecter des fragments de matériel, génétique (ADN ou ARN cibles) ou protéique, contenus dans un échantillon biologique. Le matériel à analyser peut être celui d'un micro-organisme infectieux par exemple. La présence de la molécule cible dans l'échantillon est révélée par son attachement à la sonde qui lui est complémentaire sur la puce. Il s'agit ensuite, en mesurant la fluorescence, de repérer les sondes qui ont effectivement réagi avec le matériel marqué contenu dans l'échantillon testé. La lecture de la puce nécessite des méthodes optiques sophistiquées (balayage laser, caméra, etc.), couplées à un traitement informatique de l'image. Une biopuce permet d'identifier en un temps très court un grand nombre de gènes (puces à ADN ou à ARN) ou de protéines (puces à protéines)[113].

La rapidité d'obtention d'une masse d'informations fait tout l'intérêt de cette technique, car elle permet de combiner de très nombreuses analyses biochimiques en une seule analyse. Quelques développements fructueux ont été réalisés dans le domaine de l'analyse de l'eau[114]. Cette méthodologie n'est cependant pas encore applicable telle quel à des échantillons comprenant une matrice complexe (alimentaire par exemple). Le potentiel de cette technologie naissante est cependant énorme.

3. Le BIAcore

Un autre type très utilisé de bio-capteur est le BIAcore, dont il sera à nouveau question dans le chapitre suivant. Le principe de détection de ce biocapteur repose sur la résonance plasmonique de surface[115] (figure 10a). Le BIAcore a pour fonction de visualiser en temps réel des interactions entre biomolécules non marquées dans un débit continu de tampon.

Un des réactifs, le ligand, est retenu de manière spécifique à la surface du biocapteur. Les biocapteurs les plus fréquemment utilisés sont constitués d'un support de verre recouvert d'une fine couche d'or et d'un hydrogel réticulé de dextran carboxyméthylé. Sur ces surfaces seront immobilisés de façon covalente des ligands hydrosolubles dans un milieu hydrophile (protéines, acides nucléiques, glycoprotéines...). Il existe différentes surfaces selon le type de ligand à immobiliser (carboxyméthyle CM5, nickel NTA, streptavidine SA). Dans un autre type de surfaces (HPA), le dextran est remplacé par une matrice plane recouverte de chaînes

aliphatiques en C18 ; cette interface hydrophobe peut être facilement recouverte d'une couche lipidique par fusion spontanée de liposomes injectés à son contact. Les autres partenaires, les analytes, sont injectés à débit constant par un circuit microfluidique au contact de cette interface. Les changements de masse induits par l'association ou la dissociation des complexes modifient la réfringence du milieu et décalent la position de l'angle de résonance. L'enregistrement de la variation de l'angle de résonance, ou sensorgramme, permet de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées sur le biocapteur (figure 10b). Le signal de résonance est exprimé en unités de résonance (RU). Une variation de 1 000 RU correspond à une déviation de l'angle de 0,1 degrés.

Plusieurs applications ont été réalisées avec succès dans le domaine de la détection de micro-organismes. L'approche peut être directe, avec injection des bactéries directement dans le flux analysé et immobilisation de celles-ci à la surface du capteur par des anticorps spécifiques[116]. L'approche indirecte quant à elle consiste à incuber une quantité connue d'anticorps avec les bactéries en suspension dans l'échantillon. Les anticorps libres non fixés par les bactéries sont ensuite récupérés et dosés dans le BIAcore[117]. L'intensité du signal sera alors inversement proportionnelle à la quantité de bactéries dans l'échantillon initial.

Cependant, les bactéries ont une taille relativement importante en comparaison du canal transportant le fluide à analyser, ce qui pose de nombreux problèmes et limite les développements de cette technique. Ces quelques succès obtenus jusqu'à présent passent par un traitement thermique des échantillons bactériens, ce qui entraîne un fractionnement et une dénaturation de la cellule bactérienne. Dans l'état actuel des développements, cette technique ne permet donc pas de discriminer les bactéries vivantes, viables ou même intactes, des débris bactériens.

V. La technique de séparation magnétique médiée par des lectines

Cette technique, mise au point dans les années 1990-2000, fait plus spécifiquement l'objet des travaux présentés dans cette thèse. Elle repose sur une combinaison de la technique d'IMS décrite plus haut d'une part, et de l'utilisation de molécules encore largement méconnues : les lectines.

A. Présentation des lectines

La définition de cette famille de molécule n'a toujours pas trouvé de consensus, et chaque auteur a coutume de placer dans ses communications sa définition personnelle des lectines, la règle sera ici respectée.

Les lectines sont un groupe hétérogène de protéines et glycoprotéines non-enzymatiques ayant pour caractéristique commune d'avoir la propriété de se lier de façon spécifique et non-covalente à une ou plusieurs séquences de résidus sucrés.

A cette définition générale peuvent s'ajouter des critères plus polémiques. Parmi les plus classiques, on peut citer « les lectines sont d'origine non-immunitaire », « les lectines ont la propriété d'agglutiner des érythrocytes » ou encore « les lectines ont une propriété d'agglutination de cellules et/ou de précipitation des glyco-conjugués ». L'origine non-immunitaire est certainement vraie dans la plupart des cas, encore que cela dépend bien évidemment de l'endroit où l'on situe la frontière du système immunitaire. Les découvertes de ces dix dernières années tendent à rendre cette frontière de plus en plus poreuse aux lectines, et à rendre obsolète cette partie de la définition ([118]). Le critère d'agglutination des érythrocytes a fait recette à l'aube de la lectinologie, mais elle est généralement admise comme dépassée. Enfin, le critère plus général d'agglutination de cellules, qui entend tout aussi bien cellules eucaryotes que procaryotes, implique que la molécule possède au moins deux sites de fixation, ce qui me semble inutilement restrictif.

Une définition plus simpliste, mais suffisante pour la compréhension de cette thèse, revient à dire que les lectines sont aux oligosaccharides ce que sont les anticorps aux peptides, à la différence près qu'il n'existe aucune unité de structure, de fonction ou d'origine des lectines.

La rencontre des lectines avec le petit monde de la science remonte à 1888, quand un certain Stillmark observe l'agglutination des érythrocytes par des extraits de ricin[119]. Le nom de lectine apparaît beaucoup plus tard, en 1954[120], et regroupe ainsi les diverses appellations qui coexistaient jusqu'alors (hemagglutinines, phytoagglutinines, phytohemagglutinines...). Des lectines sont découvertes chez toutes les formes de vie (bactéries, champignons, végétaux, animaux) et même chez les virus. L'intérêt pour les lectines en tant qu'outil biochimique ne s'est vraiment manifesté qu'à partir des années 1970.

Les applications développées à partir de lectines ont alors été nombreuses et variées : le typage d'érythrocytes[121], l'étude des résidus glycosylés de la surface des cellules[122], leur utilisation comme agent mitogène[123], la purification de glycoprotéines[124], la cartographie des transports neuronaux[125], ou encore la séparation de sous-populations cellulaires[126], pour n'en citer que quelques-unes. Simplement dans le domaine de la médecine moléculaire, l'ouvrage de Rhodes et Milton[127] recense une cinquantaine de techniques et applications différentes utilisant les lectines.

B. Les lectines en tant qu'outil en microbiologie

Pratiquement tous les micro-organismes présentent des résidus sucrés à leur surface. Ces sucres peuvent être liés de façon covalente, comme les acides téichoïques glycosylés du peptidoglycane, ou de façon non-covalente, comme dans la capsule polysaccharidique. Dans tous les cas, chaque sucre exposé à la surface bactérienne est un site potentiel de fixation pour une lectine. La capacité des lectines à s'attacher aux bactéries a donc permis de les utiliser comme marqueur, ou comme adsorbeur de cellules entières, de composants cellulaires, ou encore de métabolites.

Le premier usage historique des lectines en microbiologie[128], et par la suite sans doute le plus développé, est l'agrégation directe des micro-organismes en suspension. Typiquement, une solution de lectine est mélangée à une suspension bactérienne. Si la lectine possède plusieurs sites de fixation (protéine multimérique), et que la bactérie en suspension présente un site de fixation pour cette lectine, les lectines peuvent alors agréger plusieurs cellules entre elle, et entraîner ainsi la sédimentation des micro-organismes. Une observation à l'œil nu, au microscope, voire une mesure de densité optique, permettent de conclure quant au résultat qualitatif du test. En choisissant la lectine de telle sorte que sa spécificité vis-à-vis d'une séquence oligo-saccharidique la rende également spécifique pour une souche donnée, on obtient ainsi un test rapide et visuel de présence et/ou d'identification d'un contaminant, si toutefois celui-ci ne montre pas de propriétés d'auto-agglutination. De nombreuses publications font état de tests reposant sur ce principe, et s'appliquant à des souches très disparates.

Un outil aussi intéressant que les lectines a par la suite trouvé d'autres applications en microbiologie. On peut ainsi recenser de nombreuses publications dont le sujet était l'étude de bactéries pathogènes et mettant en jeu des lectines (Tableau V). Les lectines ont aussi été

utilisées comme outil pour l'étude de composants bactériens externes, ou pour détecter des récepteurs à bactériophage[189, 190, 191, 192, 193]. Il a également été proposé d'utiliser une technique reposant sur les lectines pour le typage Gram des bactéries[194, 195] ou l'étude de biofilms[196, 197].

En résumé, les lectines ont été utilisées avec succès au cours de nombreuses études « fondamentales », en particulier structurales. En revanche, ces études n'ont débouché sur aucune application microbiologique transposable du laboratoire de recherche à celui d'analyse ou de contrôle industriel, avec une exception notable : la technique de séparation magnétique (Lectin Magnetic Separation, LMS).

C. Lectines, billes magnétiques et microbiologie

Toutes les applications citées plus haut s'appliquent généralement à des sujets d'études fondamentales, structurales ou fonctionnelles. La technique d'agglutination peut, en principe, être utilisée comme méthode de détection, voire de typage de bactéries, mais elle requiert un échantillon très chargé en bactéries pour pouvoir être interprétée correctement. De plus, la technique repose pour une grande part sur le manipulateur, qui va décréter si un test est positif ou non (le plus souvent à l'œil nu), ce qui rend ce test faiblement reproductible. L'utilisation pratique de cette méthode ne peut donc se concevoir que pour des cas très particuliers.

En revanche, la combinaison des propriétés des lectines avec la technique de billes magnétiques, déjà employée en IMS (Partie II.IV.A.2), paraissent beaucoup plus prometteuse. C'est l'équipe du docteur Kroll, au Royaume-Uni, qui a ouvert la voie au début des années 1990. Une première étude publiée en 1991[198] avait pour but de comparer l'efficacité d'adsorption de *Listeria monocytogenes* par plusieurs dispositifs de lectine immobilisée (lectine d'*Helix pomatia*) :

- sur billes d'agarose en suspension
- sur billes d'agarose en colonne d'affinité
- sur billes magnétiques

A l'issue de ces expériences, les chercheurs ne semblent pas enthousiasmés par les billes magnétiques, la colonne d'affinité ayant donné de meilleurs résultats. Parmi les problèmes rencontrés avec les billes magnétiques, ils mentionnent une « disparition » des

bactéries, qui ne se retrouvent ni parmi les bactéries non-immobilisées, ni parmi les bactéries libérées des billes magnétiques par compétition avec du *N*-acetyl glucosamine (l'oligosaccharide spécifique de cette lectine). Étonnamment, les bactéries non libérées par le compétiteur ne sont jamais dénombrées, ce qui ouvre bien sûr le champ à de nombreuses spéculations quant au devenir effectif des bactéries « manquantes ». Par ailleurs, les billes magnétiques, préparées par leur soin, ne sont contrôlées ni en terme d'activité biochimique finale des lectines, ni même en terme de quantité de lectine immobilisée.

Ces premiers résultats mitigés sont suivis d'une seconde publication l'année suivante[199], portant essentiellement sur le même sujet mais avec différentes lectines et souches bactériennes. L'interrogation quant à cette perte de bactéries en cours de manipulation a disparu, et toute bactérie non dénombrée est considérée comme étant immobilisée sur les billes avec succès, sans toutefois la moindre forme de justification raisonnée ou expérimentale. De même que pour la publication précédente, l'efficacité de la préparation du complexe bille-lectine n'est pas mesurée ni estimée, ni en terme quantitatif (nombre de lectines par bille), ni en terme qualitatif (mesure d'activité biochimique des lectines immobilisées à la surface des billes). Dans ces conditions, et sans réserve, les auteurs présentent des résultats très satisfaisants en terme de capture bactérienne, et qualifient cette technique d'« efficace », « pratique » et « reproductible » lorsqu'elle est appliquée à des bactéries en suspension dans un tampon. Des expériences sur des aliments artificiellement contaminés sont également décrites, et donnent des taux de capture inférieurs aux suspensions pures, mais néanmoins non négligeables. La spécificité du phénomène de capture est estimée de façon très discutable. De plus, les auteurs soulignent furtivement un paradoxe : moins de billes en suspension conduisent à une capture plus importante des bactéries. Ce problème est cependant évacué en une phrase sans aucune hypothèse explicative.

Une troisième publication, plus orientée sur l'étude de l'isolement de lectines de l'hémolymph et du liquide coelomique d'invertébrés, présente à nouveau de bons résultats de capture[200], en suspension pure ou issue d'aliments. Sans toutefois s'en formaliser ou chercher à y apporter des réponses, les auteurs y soulignent plus que dans les précédentes publications le manque de cohérence des résultats de libération des bactéries « capturées » par le sucre compétiteur, ou, en l'occurrence, par le cocktail de sucres compétiteurs employés. Notamment, il n'existe aucune relation fiable entre l'effet de ces compétiteurs dans les tests d'agglutination et dans les tests avec billes magnétiques. Dans le même temps[201], le groupe

collabore dans le cadre de l'utilisation de leur technique pour améliorer une technique de détection moléculaire (PCR). Une nouvelle fois, les résultats de séparation annoncés sont satisfaisants, mais l'intérêt dans le cadre de la détection PCR est présenté comme toujours théorique à l'issue de ces travaux.

Enfin, le groupe franchit le pas de l'application, et propose l'utilisation de lectines immobilisées sur billes magnétiques (LMS) pour la détection de pathogènes[202]. Les problèmes évoqués plus haut se retrouvent à nouveau. Malgré des résultats encourageants (mais toujours aussi peu cohérents), la discussion s'ouvre sur un sec « The application of LMS to microbiology assays is not a panacea » (L'application de la LMS aux tests microbiologiques n'est pas une panacée), qui semble conclure deux années de travaux de ce groupe. L'ensemble de ces travaux fait l'objet du chapitre d'ouverture d'un ouvrage général intitulé « New techniques in food and beverage microbiology », et édité par Kroll lui-même [203].

Cinq années après le groupe de Kroll, un autre groupe anglais s'intéresse à nouveau à la LMS appliquée à la microbiologie. Une première tentative, au cours d'une étude d'extraction de bactéries du sol, initie l'intérêt de ce groupe pour la technique[204]. En utilisant le protocole du groupe Kroll, cette équipe obtient des résultats intéressants en terme d'efficacité de capture, mais difficilement interprétables du fait, selon eux, de l'interférence des billes magnétiques avec les particules du sol.

Leur étude de la LMS se poursuit alors sur des contaminants bactériens de l'eau. Cette étude importante réalise un grand pas vers la compréhension plus fine de l'ensemble du processus, depuis la préparation des billes magnétiques jusqu'à la capture bactérienne finale[205], notamment en raison des contrôles plus nombreux réalisés aux différentes étapes. Tout d'abord, le phénomène d'immobilisation des lectines à la surface des billes est suivi par mesure des lectines du surnageant. Ce suivi montre une très forte variabilité de résultats à chaque expérience. Ensuite, les bactéries non libérées par le sucre compétiteur sont ici dénombrées, ce qui permet de faire la part des choses entre bactéries non-fixées, bactéries fixées, et bactéries libérées. Les résultats montrent que la capture bactérienne est elle aussi peu reproductible, et qu'une grande partie des bactéries ne sont pas libérées par la présence du sucre compétiteur. Enfin, les auteurs soulignent l'importance de la méthode de lavage des billes dans le taux de capture : un lavage doux permet une meilleure récupération des bactéries. Ces résultats suggèrent que la fixation des bactéries aux billes magnétiques

recouvertes de lectines est faiblement voire non spécifique. Au total, les taux de récupération obtenus sont très inférieurs à ceux affichés par le groupe Kroll.

Afin de limiter les sources de variations, aussi bien au niveau de la préparation des complexes bille-lectine, que de la fixation de ces complexes aux bactéries, ce groupe propose une méthode alternative indirecte[206]. Elle consiste à incuber des lectines biotinylées avec les bactéries, puis à ajouter à la suspension des billes magnétiques recouvertes de streptavidine. Cette approche a en effet pour résultat de diminuer la variabilité, et d'augmenter légèrement du même coup le taux de capture, probablement par optimisation de l'orientation des lectines. Cependant, l'efficacité du dispositif reste faible, et le taux de libération des bactéries par les sucres compétiteurs, assimilé par ce groupe à la spécificité de la capture, est quant à lui très bas.

La technique est par la suite brièvement citée dans quelques revues[90, 207], ou est parfois simplement évoquée.

En conclusion, il existe une très grande variété de techniques pour détecter, dénombrer, identifier des contaminants (Tableau VI). Seule une petite partie de ces techniques, voulue la plus représentative de l'ensemble, a été présentée ici. Cette diversité montre deux choses. Tout d'abord, il existe pour pratiquement chaque analyse, chaque cas particulier, chaque combinaison contaminant/produit contaminé, une méthode rapide et efficace d'analyse. Cette diversité montre également, en creux, qu'il n'existe pas de technique universelle, que l'on rêverait ubiquiste, immédiate, et sensible. Tant qu'une telle méthode n'existera pas, le classique étalement sur milieu gélosé restera la méthode de référence, malgré tous ses inconvénients.

Par ailleurs, les techniques permettant une détection, sans connaître *a priori* la nature de la contamination, sont très rares, et généralement peu sensibles, surtout dans une matrice complexe. C'est plus spécifiquement sur ce point que portait le projet Microqual.

Partie III. Objectifs et moyens du projet Microqual

I. Objectifs et approches

A. Les objectifs du projet

Le projet européen Microqual dans son ensemble, et les travaux de chacun des partenaires, s'inscrivent dans un but unique. Il s'agit de mettre au point une méthode permettant une détection rapide d'une contamination faible et de nature inconnue d'une matrice liquide complexe. La base de ce projet a été resserrée dès son démarrage, en fixant un cadre précis aux diverses investigations, par le biais, entre autres, d'objectifs qualitatifs et/ou chiffrés caractérisant cette future méthode.

La matrice liquide complexe plus particulièrement étudiée est le lait UHT. Après une étude de marché réalisée en début de projet, il s'est avéré que chaque pays européen a des habitudes de consommation particulière en matière de lait. Dans certains pays comme le Royaume-Uni par exemple, le lait stérilisé UHT se vend relativement peu en comparaison du lait pasteurisé. Cependant, parmi les pays consommant du lait UHT, le lait UHT demi-écrémé est le plus représentatif de la consommation européenne[208], et a donc été retenu comme modèle commun d'étude à toutes les équipes.

Compte tenu du caractère déjà très ambitieux du projet, il a été convenu de limiter l'étude à la détection de formes végétatives bactériennes, ce qui exclut en particulier les spores de toute nature, ou les levures et champignons.

Les formes végétatives bactériennes sont en effet le souci principal des producteurs de lait UHT. L'origine de contamination la plus fréquente n'est semble-t-il pas une stérilisation incomplète, mais plutôt une recontamination du produit au cours du conditionnement. Ceci confirme qu'on ne peut pas présager de la nature exacte de la contamination. La méthode finale devra donc avoir un spectre de reconnaissance suffisamment large pour détecter n'importe quel contaminant.

La méthode UHT a théoriquement une efficacité de 100% de stérilisation des formes bactériennes végétatives. La présence d'une seule bactérie dans un échantillon est donc inacceptable. Par ailleurs, le conditionnement le plus usuel pour la vente de lait UHT, dans les

pays européens continentaux, est la brique d'un litre. Sans préjuger du résultat final, il paraissait assez probable que la méthode mise au point serait invasive, et donc destructrice. L'échantillon disponible pour l'analyse est donc d'un volume de 1L. Par conséquent, le seuil de sensibilité de la méthode a été fixé à 1 bactérie par litre de lait.

Quant au critère de rapidité, un objectif de durée d'analyse de 8h maximum a été fixé, avec une limite optimiste de 4h.

Enfin, l'objectif principal est bien de détecter une bactérie, sans nécessité d'en identifier l'espèce, ni de réellement quantifier la contamination. Obtenir très rapidement une information de stérilité ou de contamination permet soit de libérer le lot sain sans délai, soit de mener des analyses plus poussées sur un lot suspect.

B. L'approche globale de la problématique

Afin de maximiser les chances d'aboutir à une méthode apportant une réponse satisfaisant ou s'approchant des critères fixés, il a été décidé de multiplier les techniques mises en œuvre. Chaque partenaire a donc été amené à étudier plus particulièrement une ou plusieurs approches s'inscrivant dans l'une de ces deux catégories :

- Les approches permettant une concentration de la charge bactérienne du produit à analyser. Compte tenu des critères requis, ceci peut être reformulé de la façon suivante : il s'agit d'isoler la (ou les) bactérie(s), et de se débarrasser de la plus grande partie possible du litre de lait. En effet, quelle que soit la méthode de détection utilisée au final, une plus grande concentration permettra un temps de détection d'autant plus court. De plus, une matrice aussi complexe que le lait ne peut qu'interférer avec le dispositif de détection. Eliminer autant de ses composés que possible ne pourra qu'être bénéfique.
- Les approches permettant de détecter une très faible contamination. Ces techniques peuvent éventuellement s'affranchir de la contrainte liée à la matrice complexe, mais devront alors être associées à une technique de concentration bactérienne très performante.

Le but de multiplier les voies explorées est de n'exclure aucune combinaison concentration/détection, et de ne retenir finalement que celle qui montrera la meilleure efficacité dans notre contexte.

C. La méthodologie

Le projet européen Microqual regroupait plusieurs partenaires, qui ont travaillé chacun sur une ou plusieurs techniques. L'objectif de chacune de ces études était préalablement défini et s'inscrivait pleinement dans la logique décrite précédemment. Un compte-rendu de ces études ainsi qu'un bilan de faisabilité étaient présentés tous les 6 mois, afin d'orienter ou réorienter les recherches de chacun des groupes en fonction des résultats et avancées.

Le docteur David Gray et son équipe font partie de la Robert Gordon University (RGU), à Aberdeen, Royaume-Uni. Ils sont spécialisés dans le traitement physico-chimique des échantillons, ainsi que dans l'utilisation de méthodes impédancemétriques. Ce groupe travaillait essentiellement sur la mise au point de moyens de traitement et de concentration de l'échantillon en bactéries. Les techniques mises en jeu reposaient sur des procédés physiques (Stomacher, filtres, centrifugation). Parallèlement, cette équipe menait également des travaux visant à optimiser la détection des contaminants par impédancemétrie classique (système Malthus), notamment par le biais d'une optimisation de la composition bio-chimique du milieu de croissance.

Le laboratoire du Pr. Georges Nichas fait partie de l'Agricultural University of Athens (AUA). Ce partenaire ayant une grande expérience dans le domaine de l'impédancemétrie, son objectif principal était tout naturellement de définir des conditions optimales d'utilisation de cette méthode dans notre contexte particulier, afin notamment de fournir une référence pour le développement parallèle d'un impédancemètre alternatif.

IXTREM est une société ayant développé un appareil de grande sensibilité, adapté à la détection de défauts matériels par le biais de moyens électromagnétiques. Des études préliminaires ont montré qu'il était possible d'adapter ce dispositif pour détecter une croissance bactérienne en milieu liquide, sur le modèle des impédancemètres du marché. L'électronique, à la pointe de la technologie actuelle, ouvrait cependant de nouvelles voies d'optimisation, particulièrement en terme de sensibilité, et donc de rapidité de détection.

AGROTEC est un pôle multidisciplinaire d'appuis et de services technologiques pour les industries agroalimentaires basé à Agen. Le rôle principal de cette équipe était de jouer le rôle d'intermédiaire entre le projet Microqual et l'industrie, à un double niveau. Le premier consistait en l'établissement d'un cahier des charges répondant aux attentes concrètes des industriels. La mise au point de tests à l'échelle pilote constituait le second niveau. Enfin,

AGROTEC a également participé aux tests applicatifs de l'impédancemètre alternatif développé par IXTREM.

L'équipe du Dr. Haasnoot fait partie de l'institut pour la sécurité alimentaire RIKILT, basé à Wageningen, Pays-Bas. Leur laboratoire étant équipé d'un appareil BIAcore, leur tâche était d'étudier l'utilisabilité de ce dispositif dans notre contexte. Parallèlement, ils ont travaillé sur le développement de méthodes immunologiques (ELISA) ou moléculaires (PCR) de détection des bactéries.

Enfin, l'Ecole de Biologie Industrielle (EBI), sous la responsabilité du Dr. Mielcarek, était coordinateur du projet, et a également accueilli les travaux de recherche faisant l'objet de cette thèse.

II. Les résultats des partenaires européens

A. Concentration physico-chimique

Deux approches différentes ont été conduites, par RGU d'une part, et AGROTEC d'autre part. Le but de ces traitements était de séparer les bactéries présentes dans un échantillon de lait, afin de les concentrer dans une liqueur claire et débarrassée d'une grande partie des composants du lait. La contrainte majeure pour ces dispositifs était qu'aucune perte bactérienne ne pouvait être tolérée. L'objectif étant de détecter *in fine* une bactérie présente dans l'échantillon, un taux de perte au cours de ce traitement aurait rendu cet objectif inaccessible.

RGU a développé et étudié différentes alternatives basées sur l'utilisation du Stomacher ou du Pulsifier (voir Partie II.I.B.1). Aucune de ces études n'a donné de résultat satisfaisant, puisque des taux de récupération de l'ordre de 1% ont été obtenus. Des traitements physico-chimiques, par acidification puis centrifugation, ont permis d'obtenir des taux de récupération allant de 2 à 40%, ce qui reste largement insuffisant. L'utilisation d'hexane n'a pas donné de meilleurs résultats. Des tests de filtration, menés par RGU, mais aussi par AGROTEC n'ont pas non plus été concluants.

B. Impédancemétrie classique

RGU et AUA ont développé en parallèle des milieux de croissance optimaux pour des souches potentiellement contaminantes du lait, aussi bien avec le système Malthus qu'avec le système Rabbit. Les TTD de souches tests ont été déterminés, et ces résultats ont permis d'avoir un point de repère au cours du développement d'un nouveau prototype.

C. Bio-capteur, ELISA et PCR

Le groupe RIKILT a tenté plusieurs approches, mettant en jeu plusieurs méthodes de détection, dans le but de déterminer celle(s) ayant des limites de détections compatibles avec les besoins du projet Microqual.

L'utilisation du BIAcore (Partie II.IV.C.3) a montré ses limites. Notamment, le capteur est peu sensible à la fixation de bactéries, probablement en raison de la taille relative des bactéries par rapport au capteur. Une méthode indirecte ne s'est pas révélée concluante.

La technique ELISA, utilisée avec des anticorps à spectre relativement large pour les bactéries Gram positives d'une part, et Gram négatives d'autre part, a donné des résultats insuffisants en terme de limite de détection ($>10^4$ UFC/mL dans le meilleur des cas).

Enfin, les techniques moléculaires testées ne donnaient des résultats satisfaisants qu'après une période de 18h de pré-enrichissement, période trop longue pour satisfaire aux critères du projet.

III. Les travaux de l'EBI

Les travaux présentés dans cette thèse constituent la partie scientifique des réalisations de l'Ecole de Biologie Industrielle (EBI) dans le cadre du projet Microqual. Ils s'articulent suivant deux axes. Le premier vise à mettre au point un moyen original de concentration de l'échantillon à analyser basé sur la LMS, et le second à apporter une expertise microbiologique dans le cadre du développement d'un impédancemètre alternatif.

A. Développement de l'outil lectine

Les résultats très optimistes du groupe Kroll (Partie II.V.C) peuvent sembler contestables, tant à la lecture de leurs publications[199, 200, 202], qu'à la lumière des publications plus récentes[205, 206]. Il n'en demeure pas moins que le potentiel théorique de la LMS est resté largement sous-exploité. Ce potentiel est pourtant énorme. D'une part, il est

clairement établi que des lectines peuvent se lier à des bactéries, notamment par les résultats de tests d'agglutination. D'autre part, l'IMS est désormais une technique qui a fait ses preuves. Les lectines, qui présentent l'intérêt d'être moins chères (Tableau VII), plus disponibles, plus facilement maniables que les anticorps, peuvent donc en théorie constituer un apport intéressant en microbiologie par le biais de la LMS. Et si des échecs ont été décrits, avec plus ou moins d'honnêteté et/ou de rigueur scientifique, aucune explication satisfaisante n'a à ce jour été apportée qui justifierait d'abandonner une voie aussi prometteuse. Les travaux présentés dans cette thèse ont eut pour but d'apporter une contribution au développement de cette méthode.

B. Développement d'un impédancemètre alternatif

Le deuxième axe des recherches menées à l'EBI consiste en un partenariat avec l'entreprise IXTREM, dans le but de développer un impédancemètre alternatif à ceux existant sur le marché (Partie II.III.B). Ce partenariat a permis la mise en commun des compétences dans le domaine de l'électronique de pointe d'IXTREM, et des compétences en microbiologies de l'EBI, dans le but de mettre au point puis d'améliorer l'appareil Zenix (figure 11) sur des critères de performance directement liés à l'utilisation finale.

Le rôle de l'EBI était donc double. D'une part, il s'agissait d'orienter le développement de l'appareil vers un dispositif conforme à ce que peut attendre un microbiologiste, par exemple concernant le dimensionnement, la stérilisation, la maniabilité, etc... D'autre part, l'EBI fournissait un retour d'informations concernant les performances du système et ses défauts, et leur traduction en terme de sensibilité et de rapidité de détection, ainsi que d'éventuelles pistes permettant à IXTREM de reprendre et améliorer le système au niveau matériel (Annexe 1).

Présentation des travaux personnels

Justification de la démarche

Les travaux présentés dans cette thèse s'articulaient autour de deux axes nettement distincts mais s'inscrivant dans le même objectif général, celui du projet européen Microqual (voir Partie III.I.A). Le premier axe consistait à développer un piège bactérien rapide et sensible (moins de 8h, permettant la capture d'une bactérie dans un litre) mettant en jeu les lectines. Le second axe visait à développer un nouveau dispositif de détection impédancemétrique de bactéries en croissance, basé sur l'appareil Zenix, développé par le partenaire IXTREM.

Le point de départ de la première voie d'étude était la reproduction des résultats de LMS obtenus par l'équipe Kroll (Partie III.V.C), et, partant de là, la validation, l'optimisation et l'industrialisation du dispositif (figure 12). Quant au second volet, il consistait en un aller et retour entre le laboratoire et la société IXTREM. Chaque étape comprenait une évaluation critique du dispositif électronique en condition d'utilisation bactériologique, suivie d'une amélioration de ce dispositif sur le plan de sa conception (matérielle et/ou logicielle) et de son électronique. Des points de repère pour la performance relative du système par rapport aux matériels commerciaux étaient par ailleurs fournis par les autres partenaires européens disposant de ces matériels.

Ces fondations méthodologiques étant fixées, un certain nombre de choix restaient à réaliser. En effet, le champ d'étude imposé par le projet Microqual était extrêmement large, puisque tout contaminant végétatif bactérien devait pouvoir être détecté, sans préjuger notamment de l'espèce ou du genre. Pour ces études, aussi bien des lectines que du Zenix, il fallait néanmoins restreindre le champ des investigations préliminaires, et donc s'arrêter sur un choix de souches test. De même, de nombreuses lectines différentes sont désormais disponibles sur le marché, et un choix restrictif était là encore nécessaire. Enfin, plusieurs contraintes techniques ont également dû être données *a priori* pour le développement du Zenix.

I. Choix des souches bactériennes

Le projet Microqual ne restreignant le champ d'investigation qu'aux formes bactériennes végétatives, il fallait choisir judicieusement un nombre nécessairement restreint de souches test pour toutes les études du projet.

A. Une étude théorique...

La plus évidente des restrictions aurait été de se limiter aux souches posant de réels problèmes aux industriels. Malheureusement, ces données sont considérées comme très sensibles par les producteurs, qui ne souhaitent par conséquent pas communiquer sur le sujet. Par ailleurs, il est généralement admis que la source principale de contamination du lait UHT est en fait la recontamination du produit au moment de l'emballage. Dans ces conditions, n'importe quel type de contaminant, environnemental ou manu-porté, est une source potentielle de contamination. Cette approche ne permet donc pas de restreindre le champ d'étude.

B. ... et un choix pragmatique

Il a donc été décidé de se limiter dans un premier temps à une série de micro-organismes classiquement utilisés et disponibles au laboratoire, et issus de la souchothèque de l'Institut Pasteur (CIP) afin de garantir une disponibilité continue des souches. La liste des micro-organismes employés et de leurs abréviations est donnée dans le Tableau VIII. *Sm* et *Es* ont plus spécifiquement été retenues en raison de leur origine affichée à la CIP (isolement d'une contamination de produits laitiers). L'ensemble a été choisi pour présenter une variété, au niveau du typage Gram par exemple. La présence de certaines souches relativement proches les unes des autres devra permettre de dégager plus facilement des pistes générales concernant ces groupes.

II. Choix des lectines

Pour les mêmes raisons qu'évoquées dans le paragraphe précédent, le critère principal de sélection des lectines d'étude était leur spécificité. En effet, la spécificité des lectines pour les résidus sucrés entraîne naturellement une certaine spécificité vis-à-vis des souches bactériennes. Cette spécificité est fonction de la richesse de la surface de ces souches en ces sucres, ainsi que de leur accessibilité stérique.

A. Sélection théorique

Le premier filtre de sélection a reposé sur les résultats des travaux de thèse d'Ahidjo Ayouba[193]. Ses recherches l'ont amené à quantifier l'affinité d'un nombre important de lectines pour une douzaine de constituants de la structure pariétale bactérienne (Tableau IX). Parmi ces lectines, nous avons retenu de prime abord celles disponibles dans le commerce. Dans ce groupe, quatre lectines se distinguent par leur affinité élevée pour certains composés du peptidoglycane, mais aussi pour leur spectre large d'affinité. Celles-ci apparaissent surlignées dans le Tableau IX, et sont extraites des espèces *Lathyrus ochrus* (LoLI et LoLII), *Lens culinaris* (lentille, LcA) et *Concanavalia ensiformis* (ConA).

La combinaison de ces deux critères d'affinité élevée d'une part, et de spectre large d'autre part, faisait de ces lectines de bonnes candidates pour notre application. Nous recherchions ces deux critères pour maximiser les chances de capture sans présumer du type bactérien *a priori*.

Le recours à ce premier filtre de sélection se justifie à plusieurs niveaux. Tout d'abord, l'affinité d'une lectine pour les composés du peptidoglycane, une structure externe et donc relativement accessible de la cellule bactérienne, permet de préjuger d'une possibilité de fixation efficace des lectines aux bactéries. Ensuite, ces travaux présentent un double avantage :

- D'une part, les résultats couvrent un spectre large de combinaisons lectines-composés glucidiques, étudiées suivant les mêmes techniques et par le même auteur, ce qui garantit autant que faire se peut la comparabilité des résultats.
- D'autre part, ces résultats sont quantitatifs. Cette remarque peut paraître surprenante. La disponibilité de résultats quantitatifs fait cependant cruellement défaut lorsque l'on s'intéresse à l'affinité de lectines pour des bactéries entières. Le test de référence, dans ce

domaine, est le test d'agglutination (Partie III.V.A), qui ne fournit que des résultats qualitatifs, parfois présentés au mieux comme semi-quantitatifs. L'étude d'Ayouba, à la frontière entre microbiologie et biochimie, présente donc de ce point de vue un intérêt majeur.

Malgré tous ces avantages, notre pré-sélection reste entachée de doutes, notamment au sujet de la transposabilité des résultats d'Ayouba à une situation « réelle » mettant en jeu des lectines et des bactéries entières.

B. Confirmation pratique

L'examen des résultats d'agglutination bactérienne permet de lever certains de ces doutes. En la matière, les résultats récents de Porter *et al.* [205] comptent parmi les plus larges en terme de nombre de combinaisons lectines-bactéries testées, ainsi que pour la variété de bactéries utilisées. Par chance, cinq des lectines testées au cours de cette étude recoupent celles testées par Ayouba, ce qui permet de vérifier le parallèle entre les mesures biochimiques d'Ayouba et leurs conséquences au niveau de cellules entières (Tableau X).

La comparaison de ces résultats n'est *a priori* pas évidente, puisqu'il s'agit de comparer des données quantitatives à des données semi-quantitatives, dont il faut rappeler qu'elles sont obtenues de façon très subjective. Le résultat d'agglutination se présente en effet en trois classes (agglutination, agglutination faible ou agglutination forte), le classement de chaque expérience étant à la charge de l'expérimentateur, sans aucun autre point de repère que son expérience personnelle.

Le parallèle entre ces deux résultats est pourtant flagrant. LEA et STA ne présentent aucune affinité détectable pour les composés de la paroi bactérienne, et présentent également les résultats d'agglutination les plus faibles du panel analysé par Porter *et al.*, avec une majorité de résultats négatifs. A l'extrême opposé, LcA et ConA présentent une affinité pour de nombreux composés de la paroi bactérienne, ce qui se traduit par une prépondérance de résultats positifs d'agglutination, certaines d'entre elles étant des agglutinations fortes. DSA enfin, ne présente qu'une faible affinité pour un faible nombre de composés, ce qui se traduit effectivement par une place intermédiaire dans les résultats d'agglutination, avec un large spectre de reconnaissance, mais aucune agglutination forte.

Bien que ce parallèle reste très parcellaire, il semble accréditer l'hypothèse d'une relation positive entre les résultats biochimiques d'Ayoub et l'affinité générale des lectines pour diverses souches bactériennes. Ceci valide le choix des lectines test réalisé au vu de ces résultats.

C. Choix final

Les trois lectines LoL, LcA et ConA ont donc été retenues comme étant d'un intérêt particulier dans le cadre de notre étude, et du projet Microqual en général. Parmi ces trois molécules, ConA est de loin la plus connue, tant au niveau structural (par exemple [209], figure 13) que fonctionnel[205]. Elle est également la plus facilement disponible sur le marché, et la moins onéreuse (Tableau VII, p.73). Pour l'ensemble de ces raisons, ConA a été retenue comme la lectine préférentielle d'étude.

Quant au choix des billes, il s'est orienté vers les billes Dynal Tosyl-activées de 280µm de diamètre. Les billes Dynal sont probablement les plus utilisées et les plus fiables. Elles ont par ailleurs été homologuées pour intervenir dans des méthodes officielles de détection bactérienne (Tableau IV, p.41). L'activation Tosyl, qui permet de fixer à leur surface tout type de protéine (figure 14), est très simple à mettre en œuvre, et est recommandée par le fournisseur dans des contextes similaires. C'est par ailleurs vers cette alternative que se sont tournés les auteurs des précédentes publications sur la LMS, ce qui facilitera donc la comparaison des résultats. Enfin, la taille de ces billes consiste en un compromis entre deux impératifs majeurs :

- Les billes doivent rester en suspension aussi longtemps que possible, et doivent pour cela être aussi petites que possible ;
- Les billes doivent avoir une taille relative minimale par rapport aux bactéries, afin que l'aimantation de l'échantillon permette la formation effective d'un culot.

III. Un prototype de détection électromagnétique

Le prototype utilisé repose sur l'appareil Zenix, développé par la société IXTREM, et dont la fonction est la détection de défauts dans les matériaux. D'après IXTREM, cet appareil serait également capable de mesurer, avec une sensibilité potentiellement supérieure aux appareils du commerce, les variations d'impédance d'un milieu liquide. Sur cette base théorique, il fallait donc appuyer IXTREM dans son effort de développement, tant au niveau des capteurs (sondes), que du traitement du signal. Dans ce contexte, il était difficile de s'appuyer sur des connaissances quelconques pour restreindre le champ d'étude et accélérer la mise au point. Des choix, plus ou moins arbitraires, ont donc été faits afin d'aboutir rapidement à des solutions définitives concernant l'appareil puis de tester ces solutions en conditions d'utilisation impédancemétriques.

A. Choix d'un modèle d'étude préliminaire

Compte tenu des contraintes qu'impose le travail sur du matériel bactérien (cinétiques lentes, préparations longues, contaminations), il aurait été difficile de progresser dans les travaux préliminaires en s'attachant dès le début à réaliser les études dans les conditions finales d'utilisation du dispositif.

Le principe général de la détection impédancemétrique étant de mesurer des variations de compositions ioniques d'un milieu (Partie II.III.A.2), il a été décidé de réaliser les premières analyses sur des solutions d'eau à concentration saline (NaCl) variable. La variation de la concentration en NaCl, qui apporte de petits ions très mobiles, induit en effet une importante variation de conductance, et donc d'impédance dans le milieu. De plus, l'intérêt de ces solutions est qu'elles se préparent extrêmement aisément, très rapidement, et que le lavage du matériel entrant en contact avec elles peut se faire par simple rinçage à l'eau distillée. Il est certain que les variations d'impédance étudiées ainsi sont très importantes en comparaison des faibles sensibilités nécessaires à la détection précoce de l'effet sur un milieu d'une croissance bactérienne. Cependant, ces conditions expérimentales permettent de réaliser un premier filtre sélectif et facile à mettre en œuvre.

Par ailleurs, un choix a été réalisé quant au signal étudié. En effet, le signal renvoyé par le Zenix se décompose suivant deux paramètres X et Y. Ces deux paramètres résultent de la démodulation du signal par le Zenix lui-même en deux composantes sinusoïdale et cosinoïdale respectivement (voir Annexe 1). X et Y sont *a priori* supposés correspondre

aux composantes capacitives et résistives du milieu. Il convient cependant de rappeler ici que le Zenix n'est originellement pas développé ni utilisé en tant qu'impédancemètre. La signification exacte des mesures réalisées ne peut donc pas être donnée avec précision dans ce contexte, faute de recul suffisant. Sur les conseils d'IXTREM, et pour réduire les critères de sélection, il a été décidé de borner les études préliminaires à une analyse du module du signal, $(X^2+Y^2)^{1/2}$.

B. Choix d'un modèle d'étude de croissance bactérienne

Une fois ces études préliminaires réalisées, et le premier dispositif retenu (logiciel + sondes), une confirmation en conditions bactériologiques de l'efficacité du système était nécessaire. Le principal critère pour mesurer l'efficacité de ce type d'appareil est la comparaison des temps de détection (Time To Detection, TTD) avec les matériels disponibles sur le marché. Il était donc nécessaire de définir des conditions opératoires pouvant être utilisées dans plusieurs laboratoires et permettant de déterminer les TTD des différents appareils dans des conditions similaires. En particulier, la souche étudiée, sa température de croissance et le milieu de culture utilisé sont des points sensibles.

La souche d'étude retenue était *S. marsescens* (Tableau VIII, p.77). La raison principale est que cette souche avait été retenue comme souche d'étude pour l'ensemble du projet Microqual (I), et qu'à ce titre, chacune des équipes partenaires en disposait. Par ailleurs, cette souche a une croissance relativement rapide à 37°C, ce qui permet de diminuer d'autant la durée des expériences.

En ce qui concerne le milieu, il a été décidé de retenir un milieu générique, utilisé classiquement en mesure impédancémétrique, et par conséquent disponible sur le marché : le Whitley Impedance Broth (WIB).

Chronologie

I. Reproduction des résultats publiés

Les résultats de la littérature, en particulier ceux du groupe Kroll (Partie III.V.C), semblent démontrer l'efficacité et la viabilité du concept de LMS. La première étape de ces travaux consistait donc logiquement à reproduire ces résultats, sur la base des publications, avant de penser à optimiser et adapter la technique aux besoins spécifiques du projet Microqual. Par delà un simple objectif de reproduction, il s'agissait également de générer des données sur l'efficacité du protocole de préparation des billes-lectines, notamment en terme de perte de lectines. En effet, aucune publication utilisant la LMS ne fait mention de tels résultats, pourtant d'une importance capitale pour l'interprétation des taux de capture bactérienne par ces billes-lectines. De ces résultats dépendent également la viabilité économique du système, qui sera d'autant plus intéressant que peu de lectines seront nécessaires pour préparer le piège bactérien. Dans ce contexte, un objectif de moins de 5% de perte de lectines (95% des lectines incubées doivent être immobilisées sur les billes) a été fixé par le projet Microqual.

A. Matériels et méthodes

1. Préparation des billes-lectines

Le schéma général du protocole a été décidé après analyse des protocoles du groupe Kroll[202] et du fournisseur de billes magnétiques. Leur comparaison avait déjà été effectuée par Porter *et al.*, qui avaient obtenu de meilleurs résultats avec le protocole Kroll[205]. C'est donc sur cette base générale qu'ont été réalisées ces expériences. Étant donné que certains paramètres constituaient des variables d'un plan expérimental, seules les caractéristiques fixes seront décrites ici.

Tous les produits sont manipulés dans des conditions stériles. Les incubations se déroulent dans des microtubes de 1,5mL. Une quantité prédéterminée de billes paramagnétiques est lavée deux fois dans le tampon d'incubation, puis resuspendue dans 125µL d'une solution de lectine. Celle-ci est obtenue par dilution de la quantité de lectine lyophilisée requise dans le tampon d'incubation.

Les tubes sont alors placés dans un dispositif d'agitation lente et inclinée. Lorsque l'incubation est terminée, les billes sont magnétisées, et le surnageant est retiré. Les billes sont lavées dans 1mL de tampon d'incubation, et resuspendues dans 125µL de tampon d'incubation complémenté à 0,1% de Sérum Albumine Bovine (SAB). Le SAB est destiné à bloquer les sites actifs restant libres sur les billes, et d'éviter ainsi des réactions parasites lors de l'utilisation de ces billes-lectines.

Les deux surnageants obtenus (S1, 125µL ; S2, 1mL, figure 14) contiennent donc les lectines non immobilisées sur les billes. La concentration protéique de ces surnageants est déterminée par la méthode Bio-Rad, en suivant le protocole du fournisseur. Un taux de non fixation est finalement déterminé comme étant le rapport entre la quantité de lectines trouvées dans les surnageants et la quantité initiale de lectines incubées, déterminée dans les mêmes conditions (méthode Bio-Rad, même gamme étalon). Le taux de fixation est aisément déduit de ce résultat.

Les échantillons sont finalement lavés deux fois dans du tampon, suspendus dans 800µL de ce tampon et conservés à 4°C pendant moins de deux semaines.

Certaines de ces expériences faisaient partie d'un plan d'expériences, dont les facteurs, ainsi que leurs niveaux respectifs, sont donnés dans le Tableau XI. Les tampons d'incubation testés étaient du tampon phosphate 0,1M (pH=8,2) et borate HCl 12,5mM (pH=6,9) ou NaOH (pH=9,5). Les résultats de ce plan ont été interprétés grâce au logiciel Design Expert (Stat-Ease).

Une étude de cinétique de fixation a également été menée. Pour ces expériences, plusieurs tubes identiques sont mis en incubation au même moment, et la première incubation est arrêtée au temps souhaitée, différent pour chaque tube. Les paramètres utilisés pour cette étude étaient :

- Tampon d'incubation : tampon phosphate 0,1M pH=7,4 ;
- Concentration en billes : $2 \cdot 10^9$ /mL ;
- Rapport Lectine/Billes : $14 \pm 1 \mu\text{g}/10^7$;
- Température : 26 ± 1 °C.

2. Piégeage bactérien

Les tubes et système d'agitation sont identiques à ceux décrits plus haut. L'échantillon contient 900µL d'une suspension bactérienne, auxquels sont ajoutés 95µL de lectines-billes (figure 15). Certains échantillons ne reçoivent pas de billes mais un volume équivalent de PBS (témoins négatifs). La suspension bactérienne est obtenue par dilution séquentielle en tampon « Ringer au quart » ($\frac{1}{4}$ R, [199]) complémenté par 7mM MnSO_4 ($\frac{1}{4}$ R modifié [199], $\frac{1}{4}$ Rm) d'une culture d'une nuit dans 9mL de Trypcase Soja (Biomérieux) de la souche testée. Les suspensions testées ont une concentration finale comprise entre 10^3 et 10^4 UFC/mL, des souches Es ou Sm.

Après quatre heures d'incubation à 4°C, l'échantillon est magnétisé. Les billes sont lavées dans 1mL de $\frac{1}{4}$ R, puis resuspendues dans 1mL de $\frac{1}{4}$ Rm ou de $\frac{1}{4}$ R complémenté par 19mM d'EDTA disodique. Les deux surnageants sont étalés sur PCA (Biomérieux, ref 51072) et dénombrés après 24h à 37°C ou 48h à 30°C. L'addition de ces deux surnageants représente les bactéries non retenues par les billes-lectines.

L'EDTA doit agir comme un compétiteur, en complexant les cations métalliques présents dans la solution. Il diminue ainsi l'activité biochimique des lectines, ce qui conduit à la désorption des bactéries liées spécifiquement aux billes[205]. Après 30min d'incubation, le culot magnétisé est resuspendu dans 1mL de $\frac{1}{4}$ R. Le surnageant ainsi obtenu, ainsi que la suspension finale, sont également étalés sur PCA. La différence de dénombrement entre le surnageant obtenu après incubation dans l'EDTA et celui obtenu dans le $\frac{1}{4}$ R permet d'évaluer la spécificité de la fixation bactérienne.

Les différences observées entre les groupes expérimentaux sont analysées grâce au test paramétrique t par le logiciel Sigmatat.

B. Résultats

1. Conjugaison billes-lectines

a) Cinétique de fixation

Les résultats expérimentaux sont présentés figure 16. La courbe obtenue pour ConA regroupe les résultats de trois expériences indépendantes. Les expériences pour les deux autres lectines n'ont en revanche été réalisées qu'une seule fois en simple.

Compte tenu de l'évolution très rapide de la réaction dès les premières minutes d'incubation, les valeurs aux temps proches de zéro sont très incertaines, ce qui explique l'importante variabilité observée. Le temps zéro, à la différence du témoin négatif, est en effet obtenu après une incubation des billes dans la solution de lectine aussi courte que l'autorise le dispositif expérimental. Pour chacune des trois lectines testées, une heure d'incubation est suffisante pour obtenir le maximum de fixation.

b) Paramètres influents

L'influence des principaux facteurs sur le résultat de la conjugaison lectine-bille a été étudiée par la technique de la planification factorielle d'expériences. Il en ressort que le rapport de la quantité de lectines par bille magnétique lors de l'incubation a une influence prépondérante sur le système (figure 17). Ce facteur a un effet (pente de la courbe associée sur la figure) nettement plus important que la température, le pH ou la quantité de billes mises en jeu. Plus le rapport lectines/billes est faible, et plus la proportion finale de lectines effectivement conjuguées sera importante.

c) Taux de fixation

Peu d'expériences ont été réalisées sur les lectines LoL et LcA. Il apparaît néanmoins que le taux de fixation obtenu pour ces deux lectines est inférieur à celui obtenu pour la ConA (figure 16). Aucune tentative d'optimisation n'a été réalisée. En revanche, des essais hors de l'intervalle d'étude du plan factoriel précédent ont été réalisés pour ConA, notamment en utilisant des ratios lectines/billes plus faibles (jusqu'à $0,5\mu\text{g}/10^7$ billes). Dans ces conditions, des taux de fixation de 80% des lectines initialement incubées ont pu être obtenus, l'ensemble des conditions expérimentales donnant des taux compris entre 10% et 80%.

Afin de parvenir à utiliser plus de 95% des lectines incubées (objectif initial), il a suffi de récupérer le surnageant S1 (figure 14) contenant les lectines non fixées d'une première préparation, et de l'utiliser comme solution de lectines sur un nouveau lot de billes. Cette technique de recyclage a permis d'obtenir des taux globaux de plus de 95% des lectines initiales immobilisées à la surface de billes, et donc une perte minimale de lectines.

2. Capture bactérienne

a) Reproduction du protocole du groupe Kroll

Une première série de résultats a été obtenue en suivant le protocole Kroll. En particulier, les billes-lectines obtenues sont en suspension dans du PBS lorsqu'elles sont mises en incubation avec la suspension bactérienne. Différents types de complexes billes-lectines, obtenus à l'issue des expériences de l'étude cinétique ou du plan factoriel décrits plus haut, ont été testés.

Une étude statistique, portant sur 96 expériences réalisées dans les mêmes conditions a montré que :

- Le compétiteur n'a pas d'effet significatif ($p=37\%$) ;
- La proportion de bactéries retenues sur les billes est indépendante du type de complexe billes-lectines utilisé, de la souche utilisée (Es ou Sm) ou de sa concentration. Cette proportion est de $52\% \pm 12\%$ (moyenne $\pm$ déviation standard) de la quantité de bactéries initiales ;
- La proportion de bactéries retenues dans le témoin négatif sans billes n'est pas significativement différente de celles retenues avec billes ($p=80\%$).

Par ailleurs, la formation d'un précipité floconneux a été observée dans tous les échantillons. Ce même précipité est obtenu dans un témoin sans billes ni bactéries (900 μ L de $\frac{1}{4}$ Rm auxquels sont ajoutés 95 μ L de PBS).

b) Mise en évidence de l'influence du tampon

Les mêmes expériences ont été menées en lavant les complexes billes-lectines dans du $\frac{1}{4}$ R avant leur incubation avec la suspension bactérienne. Le but de ces expériences complémentaires est de démontrer l'influence des tampons respectifs utilisés pour les échantillons bactériens et de billes-lectines dans le protocole précédent.

Dans ces conditions, une extrême variabilité des résultats est observée, qui n'est corrélée avec aucun des facteurs expérimentaux (complexe bille-lectine utilisé, souche, concentration bactérienne). Typiquement, entre 0% et 30% des bactéries sont dénombrées comme étant capturées par les billes. Les mêmes dénombrements, sur des témoins négatifs sans billes, donnent des résultats très reproductibles compris entre 0% et 3%. Lorsque le taux de bactéries capturées par les billes est supérieur à 3%, le compétiteur semble avoir un effet

sur la dissociation des bactéries, mais la grande variabilité des résultats ne permet pas d'analyse statistique suffisamment puissante pour conclure sans ambiguïté sur ce point.

C. Discussion

1. Optimisation de la préparation des complexes billes-lectines

Le critère unique d'optimisation pour cette étude était le taux de fixation des lectines aux billes. Un taux élevé devait être obtenu, avec un objectif de 95% minimum.

Dans ce contexte, les expériences réalisées ont montré que le paramètre le plus influent permettant de maximiser le taux de fixation est la quantité de lectines rapportée à la quantité de billes en début d'incubation. Plus ce rapport est faible, et moins le taux de perte sera important. Cette corrélation est logique, et correspond à l'effet de la loi d'action des masses entre les groupements réactifs tosyl présents à la surface des billes magnétiques, et les lectines libres en solution. En revanche, les autres facteurs testés (pH, température, concentration en billes magnétiques) ne sont que peu influents dans le domaine d'étude exploré, ce qui rend le système relativement robuste. Néanmoins, l'objectif de 95%+ de fixation ne peut être atteint, même avec un rapport lectine/billes très bas. Pour détourner ce problème, et limiter au maximum les pertes de lectines, une solution alternative est suggérée, qui consiste à récupérer les lectines non fixées pour les réutiliser sur un nouveau lot de billes. Il a été démontré que cette approche de recyclage permet d'obtenir des pertes inférieures à 5% lorsqu'elle est appliquée à ConA.

Par ailleurs, l'étude de la cinétique de cette réaction a montré que quelques minutes suffisent pour parvenir à l'équilibre thermodynamique. Ceci est à opposer aux 16 heures préconisées par le fournisseur et que l'on retrouve dans la plupart des publications.

Cette étude a donc permis de mieux connaître la réaction chimique de fixation des lectines aux billes magnétiques, et donc de mieux contrôler cette étape cruciale du protocole. Il faut néanmoins garder à l'esprit que la quantité de lectines immobilisées à la surface des billes n'est peut-être pas proportionnelle l'activité biochimique des lectines immobilisées.

2. Analyse rétrospective des données bibliographiques

Sur les cinq articles du groupe Kroll sur la LMS, les quatre présentant des résultats d'efficacité jugés satisfaisants par les auteurs utilisent les mêmes tampons pour la préparation

de billes-lectines d'une part (PBS 0,1M pH=7,4), et pour la suspension bactérienne d'autre part ($\frac{1}{4}$ Rm)[199, 200, 201, 202]. Dans ces articles, le protocole de capture bactérienne commence donc invariablement par le mélange de 95 μ L de PBS à 900 μ L de $\frac{1}{4}$ Rm. Les concentrations molaires finales de chacun des ions constituant ce mélange sont fournies dans le Tableau XII, sur la base des concentrations décrites dans [199].

Les ions Ca^{2+} , Mn^{2+} et Mg^{2+} ont une solubilité très faible en présence de phosphates. Les produits de solubilité (Kps) des espèces $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2$ et $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ sont en effet très bas et valent respectivement $1,3 \cdot 10^{-32}$, 10^{-22} et 10^{-25} à 25°C. Ces propriétés physico-chimiques permettent d'expliquer la formation d'un précipité floconneux très important dans les tubes réactionnels lors de l'addition de billes magnétiques à la suspension bactérienne.

Compte tenu des résultats élevés de « capture » bactérienne obtenus sur les témoins négatifs sans billes, il est démontré que la formation de ce précipité artefact suffit à piéger les bactéries. Dès lors, il apparaît que cette « capture » est d'une part très peu spécifique des lectines, ce qui explique le manque d'effet du compétiteur, et d'autre part assez peu reproductible, ce qui explique la forte variabilité observée. Ces observations, ainsi que l'ordre de grandeur de la quantité de bactéries piégées, sont cohérents avec celles du groupe Kroll, même si leur interprétation est radicalement différente. Cette nouvelle interprétation du phénomène permet par ailleurs d'expliquer un paradoxe relevé à plusieurs reprises par le groupe Kroll : en diminuant la concentration en complexes billes-lectines utilisés, ils obtenaient une augmentation du nombre de bactéries capturées. Étant donnée la faible intervention de ces complexes dans le phénomène de piégeage physique, cette observation apparaît beaucoup moins paradoxale. Enfin, ce groupe a également obtenu des taux de piégeage significatifs sur les échantillons alimentaires. Néanmoins, ils soulignent que les résultats obtenus l'ont été après une dilution 1:4 de leurs échantillons dans du $\frac{1}{4}$ R, dans le but de diminuer la force ionique de la solution, ce qui était supposé entraîner une plus grande activité biochimique des lectines[203].

Les mêmes essais menés avec des tampons compatibles ont fourni des taux de capture bactérienne beaucoup plus faibles, cohérents avec les résultats obtenus lors de la première publication du groupe Kroll sur la LMS[198], ainsi qu'avec ceux de Porter *et al.*[205, 206]. Les résultats obtenus sont également très variables d'une expérience à l'autre, comme le soulignaient Porter *et al.*

3. Conséquences sur le déroulement du projet

Cette première série d'expériences a en définitive apporté plus de questions que de réponses. Il s'avère que les bons résultats de LMS publiés reposaient plus sur un artefact lié à un piégeage physique non spécifique des bactéries que sur une capture par les billes magnétiques. Conformément à ce que laissent entendre les publications plus récentes, l'efficacité effective du dispositif est plus faible, et surtout est très peu reproductible. L'objectif du projet Microqual étant la détection d'une seule bactérie dans un litre de liquide, une efficacité proche de 100% est l'objectif à atteindre.

Dans ce contexte, l'ensemble des travaux a dû être réorienté, d'une mise au point et d'une optimisation vers une étude plus fondamentale visant à comprendre pourquoi les taux de capture obtenus sont si faibles, et quelle est la source de cette variabilité.

II. Approche chromatographique

L'une des premières préoccupations était de savoir quelles conditions expérimentales seraient optimales pour la capture de bactéries par des complexes « billes magnétiques – lectines ». Porter *et al.* ont en effet réalisé une étude assez précise des conditions optimales d'utilisation de la ConA en solution, mais il restait à vérifier que ces résultats étaient extrapolables aux lectines immobilisées à la surface de billes. Pour répondre à cette question, il a été décidé de recourir à du matériel certifié et disponible dans le commerce, se rapprochant autant que possible du dispositif « billes magnétiques – lectines » : des billes d'agarose, recouvertes de ConA (figure 18). Cette approche a notamment permis de s'affranchir des multiples incertitudes concernant l'étape de préparation des billes magnétiques au laboratoire.

A. Matériels et méthodes

1. Préparation de la colonne

Toutes les manipulations sont réalisées en conditions stériles. Les colonnes (Pharmacia, C10/10) sont séchées à l'éthanol 70° puis rincées avec du tampon avant leur utilisation. La pompe (Waters 600 Controller) est nettoyée par des débits successifs d'acide chlorhydrique 25mM et de soude 0,2M. Trois millilitres d'agarose-ConA (Sigma) ou agarose-LcA (Sigma) sont coulés puis équilibrés avec un débit de tampon à 0,6mL/min.

2. Capture de thyroglobuline sur gel d'agarose

Les injections d'échantillon sont réalisées grâce à un échantillonneur automatique (Waters 717plus), à un débit de 0,15mL/min. La thyroglobuline est dissoute dans du tampon à 20mg/mL, et 300µL de cette solution sont injectés à chaque expérience. La détection en sortie de colonne est enregistrée par une barrette de diodes (Waters 996), réglée à 280nm. Après le passage du premier pic, le débit est graduellement augmenté jusqu'à 0,6mL/min.

- Étape de fixation

Deux tampons ont été testés : du tampon acétate 5mM (pH=5,6, 0,5M NaCl) complémenté par 1mM de MnCl₂, MgSO₄ et CaCl₂, et du tampon Dulbecco.

- Étape d'élution

Des concentrations ioniques élevées (jusqu'à 5M NaCl), des tampons basiques (jusqu'à pH=11), un tampon d'acide borique, des concentrations élevées en compétiteur (jusqu'à 1M de mannoside), et des tampons acides (jusqu'à pH=1,5) ont été testés, soit par gradient, soit par changement brutal.

3. Capture de bactéries sur gel d'agarose

- méthode en colonne

Un volume de 0,3mL de suspension bactérienne, contenant environ 10⁴ bactéries (*S. marcescens*), est injecté au moyen d'une seringue. Les débits utilisés sont les mêmes que pour la thyroglobuline. L'élution est induite par un débit de mannoside dilué à 0,5M dans du Dulbecco. Des échantillons de 1mL sont collectés de façon continue en sortie de colonne, et étalés immédiatement sur PCA. Les boîtes sont dénombrées après une incubation de 16 heures à 37°C, ou de 48h à 30°C.

- méthode en lot

Trois millilitres d'agarose-ConA ou d'agarose-LcA sont rincés deux fois en tampon Dulbecco : le surnageant est jeté après la décantation des billes, et le culot est resuspendu dans un large volume de Dulbecco. Les billes sont finalement diluées dans 3mL de Dulbecco. Un volume de 0,3mL de la suspension bactérienne est alors ajouté, et est incubé pendant une heure en rotation lente inclinée à température ambiante. Le tout est ensuite coulé dans la colonne de la même façon que décrit ci-dessus. Des prélèvements sont réalisés tout au long du protocole afin de suivre l'évolution de la viabilité des bactéries à chaque étape.

Par ailleurs, et afin d'étudier plus précisément l'impact de l'étape d'incubation sur la viabilité bactérienne, une expérience complémentaire a été menée. Elle consiste en une incubation d'une heure de bactéries en Dulbecco seul, en présence de ConA libre, en présence d'agarose-ConA ou en présence d'agarose-SAB, dans les mêmes conditions que l'incubation précédant la chromatographie.

B. Résultats

1. Choix du tampon

Après trois répétitions à vide (sans colonne), l'aire totale correspondant à la totalité de la thyroglobuline injectée a été mesurée à $8,7.10^8$ uV*sec à 0,15mL/min. Une injection sur la colonne de la thyroglobuline en tampon acétate donne un pic débutant à 8 minutes après injection (thyroglobuline non fixée par le gel) de $4,2.10^8$ uV*sec à 0,15mL/min, soit une efficacité de fixation de 52%. Dans les mêmes conditions, mais en tampon Dulbecco, on retrouve ce même pic, mais avec une aire de $1,2.10^8$ uV*sec à 0,15mL/min, soit 86% de fixation dans la colonne (figure 19).

2. Méthode d'élution

De tous les tampons testés, aucun n'a permis l'élution de la thyroglobuline. Seul un tampon permettait d'induire un pic d'élution significatif : l'HCl 25mM. Mais l'aire de ce pic est nettement supérieure à ce qui serait obtenu par élution de 100% de la thyroglobuline initialement injectée. Par ailleurs, l'injection de ce tampon sur un gel neuf (n'ayant jamais reçu de thyroglobuline) produit également un pic, probablement dû au décrochage de lectines de leurs billes d'agarose sous l'effet de ce tampon acide (figure 20).

3. Capture bactérienne sur gel d'agarose

a) Méthode en colonne

Avec le gel d'agarose-ConA, environ 15% des bactéries injectées sont retenues par la colonne (16%, erreur standard $\pm 3\%$, 8 répétitions), puis éluées par le mannoside 0,5M. Les 85% restant ne sont pas retenus par la colonne. Peu, voire pas de bactéries ne restent dans la colonne après élution au mannoside 0,5M (figure 21a).

Le gel d'agarose-LcA n'a permis la rétention que d'une faible quantité de bactéries (<10%), non éluées spécifiquement par le mannoside.

b) Méthode en lot

Cette technique, aussi bien avec le gel d'agarose-ConA que celui d'agarose-LcA, n'a permis la rétention d'aucune bactérie. Entre 20% et 25% ($Q_{25}=18\%$, Médiane= 23% , $Q_{75}=24\%$, 5 répétitions) des bactéries sont libérées de la colonne dès la mise en route du débit de Dulbecco (figure 21b). Un étalement du gel, une fois la chromatographie terminée, permet de dénombrer 4% des bactéries initiales. Les bactéries manquantes sont donc mortes, ou ont perdu leur viabilité. Pour comprendre la cause de cette perte de viabilité (environ 70% de perte), une expérience complémentaire a été menée concernant l'étape d'incubation (voir matériels et méthodes). Les résultats présentés figure 22 montrent que l'incubation de bactéries en présence de billes d'agarose induit une perte de viabilité. Cette perte peut aller jusqu'aux deux tiers des bactéries incubées avec de l'agarose-ConA.

C. Discussion

1. Conditions d'utilisation de la ConA

a) Tampon de fixation

Les préconisations des fournisseurs de ConA quant au tampon à utiliser précisent généralement un pH voisin de la neutralité, et la présence de cations métalliques divalents (Calcium, Magnésium, Manganèse). Une étude sur le BIAcore réalisée par l'équipe de RIKILT a effectivement démontré l'importance de la présence de ces ions pour la fixation de thyroglobuline (Annexe 2). Pour la fixation bactérienne, l'étude de Porter *et al.*[205] a confirmé ces résultats. Nos expériences ont permis de déterminer un tampon commercial standardisé permettant une bonne activité biochimique de la ConA. Cette activité a de plus été confirmée dans un contexte assez proche de la LMS, puisqu'ici aussi, les lectines sont également immobilisées à la surface de supports solides sphériques.

b) Tampon d'élution

Le choix d'un compétiteur pour la ConA est assez large. On peut en effet employer une compétition stricte, et utiliser l'un des sucres spécifiques de la ConA (mannoside par exemple). On peut également opter pour une méthode chimique non dénaturante, en particulier la précipitation des ions métalliques divalents (Calcium, Manganèse, Magnésium) nécessaires à la bonne activité biochimique de la lectine. On peut enfin jouer sur la force ionique du tampon, voire tester des conditions d'acidité ou de basicité plus ou moins drastiques.

Aucune de ces possibilités n'a pu être favorisée à l'issue des expériences de mise au point sur la thyroglobuline. En effet, l'affinité de la ConA pour cette glycoprotéine est tellement forte qu'il s'est avéré impossible de dissocier les complexes « ConA – thyroglobuline » formés. Ces résultats sont confirmés par d'autres études similaires[210].

Lorsque des bactéries étaient mises en jeu, le mannoside s'est avéré être un compétiteur efficace à une concentration de 0,5mol/L. Dans notre contexte, son efficacité avoisine les 100%, puisqu'il permet la libération de toutes les bactéries emprisonnées dans le gel.

2. Capture bactérienne

a) Méthode en colonne

La méthode de chromatographie en colonne a donné des résultats reproductibles, conduisant à la rétention de 20 à 25% des bactéries injectées. Ces bactéries sont ensuite libérées du gel par addition de mannoside. Bien que ce résultat reste très en dessous de l'objectif du projet Microqual, cette approche a permis de conclure positivement sur plusieurs points.

Tout d'abord, il est possible de retenir spécifiquement des bactéries grâce à des lectines ConA immobilisées à la surface de sphères solides. Des conditions opératoires permettant cette rétention ont été déterminées (tampon, température). Il est par ailleurs probable qu'une solution de mannoside soit un compétiteur efficace de la liaison lectine-bactérie.

Ensuite, dans ce dispositif expérimental, les résultats obtenus sont reproductibles, contrairement à ce qui avait été obtenu par LMS (voir chapitre précédent). Les deux différences majeures avec les expériences de LMS, et qui pourraient expliquer ce gain de reproductibilité sont :

- L'utilisation de matériel certifié (gel d'agarose-ConA) et *a priori* fiable
- Une méthode différente d'incubation des billes-lectines avec les bactéries

b) Méthode en lot

Le but de cette approche était d'étudier ce type d'incubation, proche de celui de la LMS. Il en ressort qu'un grand nombre de bactéries perdent leur viabilité en cours d'incubation. En effet, le total des bactéries récupérées, en sortie de colonne et dans le gel, ne dépassent pas 30% des bactéries injectées. Il apparaît que les billes d'agarose jouent probablement un rôle de broyeur et endommagent notablement les bactéries. Il est alors raisonnable de penser que le même problème peut intervenir lors de l'utilisation de billes magnétiques, dans des proportions qui restent à déterminer. Néanmoins, cette possibilité, qui n'a pas été envisagée dans les études du groupe Kroll, implique que les chiffres présentés dans ces publications sont potentiellement sur-estimés, puisque toute bactérie non dénombrée y est considérée comme fixée. Par ailleurs, ce phénomène peut éventuellement expliquer pour partie la variabilité observée lors des essais précédents de LMS.

D. Conclusion

A l'issue des expériences précédentes, il apparaît que la LMS donne des résultats de capture bactérienne très variables. Il est peu probable que la liaison des lectines aux bactéries soit l'élément responsable de cette variabilité. En effet, elle est confirmée, dans des conditions proches de la LMS, par nos résultats de chromatographie. Ainsi, ce manque de reproductibilité a deux causes possibles :

- La perte de viabilité bactérienne induite par l'incubation des bactéries avec des billes
- La variabilité des complexes obtenus après incubation des billes magnétiques et des lectines

La première cause évoquée peut sans doute être minimisée par une réduction de la durée d'incubation des bactéries aux billes-lectines. Une heure d'incubation est probablement plus long que nécessaire, à en juger d'après les temps d'incubation classiquement utilisés pour l'IMS, ou pour les tests d'agglutination. Cette hypothèse ne pourra toutefois être confirmée qu'une fois le problème de la variabilité des complexes billes-lectines résolu.

En ce qui concerne cette deuxième cause, l'étude présentée dans le premier chapitre sur l'optimisation de la fixation des lectines aux billes magnétiques n'avait pas révélé de défaut majeur de reproductibilité. Cette étude présentait cependant le biais de ne s'intéresser qu'à l'aspect quantitatif de la fixation. L'aspect qualitatif consisterait à étudier la quantité d'activité biochimique des lectines immobilisées, et non la quantité de protéine lectine. Cette

approche permettrait de préciser l'impact du mode de préparation sur l'aspect fonctionnel des complexes billes-lectines ainsi obtenus. A plus long terme, des données sur cet aspect fonctionnel pourraient par ailleurs permettre d'optimiser le dispositif, en orientant par exemple le choix de la ou des lectines utilisées vers celles ayant l'activité la plus élevée.

Malheureusement, comme cela a été évoqué plus haut, il n'existait pas de protocole permettant de quantifier l'affinité de lectines pour des cellules bactériennes entières. Le test le plus approchant est le test d'agglutination, qui ne fournit au mieux que des résultats semi-quantitatifs et peu reproductibles (extrêmement dépendants de l'expérimentateur), qui ne s'applique pas aux souches ayant une tendance spontanée à l'auto-agglutination, et qui ne s'applique pas non plus aux lectines n'ayant qu'un unique site de fixation. Par ailleurs, utiliser un test reposant sur un protocole de LMS s'avérerait également plus que hasardeux, compte tenu des nombreuses incertitudes pesant encore sur ce protocole. L'utilisation du BIAcore aurait été très intéressante dans ce contexte, mais des études précédentes ont montré les limites de cet appareil en bactériologie.

III. Études en microplaque

La mise au point d'un protocole nouveau, permettant de mesurer et de quantifier l'affinité d'une lectine donnée pour une souche bactérienne donnée, paraissait être l'étape obligée pour la bonne continuation du projet. Idéalement, ce protocole devait s'adapter à toute souche bactérienne et à toute lectine, et donner des résultats interprétables aussi bien à partir de lectines en solution (pour permettre un criblage fonctionnel des lectines) que de lectines immobilisées sur un support tel que les billes magnétiques (figure 23).

A. Etudes préliminaires et mises au point

L'idée d'utiliser une approche par microplaque pour développer un tel protocole a été inspirée par les travaux de Graham *et al.* [131]. Ces techniques permettent d'immobiliser des bacilles (*Bacillus anthracis*) entiers au fond de puits, pour ensuite les détecter par addition et révélation de lectines marquées. Ce protocole n'a été développé que pour *Bacillus anthracis*, et ne donne qu'un résultat qualitatif (présence ou absence). Il représente néanmoins une bonne base de départ. En effet, les facultés d'auto-agglutination des souches n'interfèrent pas avec cette méthode, et elle est applicable aux lectines ne possédant qu'un unique site de fixation. Ces deux caractéristiques à elles seules représentent une nette amélioration par rapport au test d'agglutination. L'objectif des travaux préliminaires était donc double :

- optimiser la méthode d'immobilisation des bactéries entières sur les micro-plaques ;
- rendre la technique quantitative.

1. Immobilisation des bactéries

Une étude bibliographique a permis de déterminer quatre protocoles distincts (Graham *et al.*[131], Borowski *et al.*[211], Peters *et al.*[212] et Singh et Doyle[213]), ayant pour but d'immobiliser des bactéries entières sur micro-plaque. Brièvement, la méthode de Borowski *et al.* repose sur l'immobilisation par centrifugation de bactéries préalablement fixées au formaldéhyde, et celle de Peters *et al.* sur l'immobilisation chimique par de la poly-D-lysine, suivie d'une fixation au formaldéhyde. Les méthodes de Graham *et al.* et Singh et Doyle (même groupe de chercheurs) reposent sur l'immobilisation par le jeu de l'hydrophobicité des souches.

a) Matériels et méthodes

- Protocole Borowski

Un millilitre d'une culture bactérienne d'une nuit est dilué dans 9mL de Dulbecco et centrifugé (3 000x g, 15 min, 4°C). Le culot est re-suspendu dans 10mL de Dulbecco complété par 100µL de formaldéhyde. Cette suspension est conservée une nuit à 4°C, puis centrifugée à nouveau (mêmes conditions). Le culot est re-suspendu en tampon carbonate (pH=9,6, 50mM), dilué en série, puis déposé sur microplaque. Celle-ci est placée en incubation à 4°C une nuit. La plaque est ensuite vidée, puis saturée avec une solution de Dulbecco complété en SAB (1%) 1h à 37°C.

- Protocoles Graham et Singh

Un millilitre d'une culture bactérienne d'une nuit est dilué dans 9mL de tampon carbonate (pH=9,6, 50mM, protocole Graham) ou d'ammonium sulfate (130g/L en Dulbecco, protocole Singh) et centrifugé (3 000x g, 15 min, 4°C). Le culot est suspendu à nouveau dans le même tampon, puis re-centrifugé (mêmes conditions). Après re-suspension, 100µL sont déposés en microplaque. La plaque est centrifugée (130x g, 15 min, 4°C, protocole Graham), ou incubée 30min à 37°C (protocole Singh). Chaque puits est ensuite vidé à la pipette, et les plaques sont mises à sécher à l'étuve (55°C, 15min). 200µL de SAB (1%) sont ensuite ajoutés (1h, 37°C).

- Protocole Peters

Un millilitre d'une culture bactérienne d'une nuit est dilué dans 9mL de Dulbecco, puis lavé par deux centrifugations successives (3 000x g, 15 min, 4°C), suivies par une redilution du culot en Dulbecco. 100µL de cette suspension sont déposés sur une plaque préalablement traitée par 1h d'incubation à 37°C avec une solution de poly-D-lysine (20µg/mL en Dulbecco) et deux lavages au Dulbecco. Après une heure d'incubation à 37°C, 100µL de glutaraldéhyde (0,01% v/v en Dulbecco) sont ajoutés, et l'incubation se poursuit encore 10min à 37°C. La plaque est alors vidée et saturée par du SAB (1% en Dulbecco, 1h, 37°C).

Pour tous ces protocoles, la plaque est finalement vidée, lavée trois fois en tampon SAB et incubée avec 100µL d'une solution de ConA conjuguée à la peroxydase (2,5µg/mL) en tampon SAB. Après deux heures à température ambiante, les plaques sont vidées, et

incubées pendant 15 min avec 100µL d'une solution à 3,7mM de o-phenylène-diamine (OPD) et 0,4mM de peroxyde d'hydrogène en tampon citrate (pH=5,0). La réaction est bloquée par 50µL d'acide sulfurique (2,5M), et l'absorbance est mesurée à 490nm.

Une méthode directe d'estimation l'efficacité des protocoles d'immobilisation a été mise au point. Elle consistait à ajouter 200µL de Trypcase Soja (TS) dans chacun des puits contenant des bactéries immobilisées, puis de suivre la courbe de croissance à la température optimale et sous agitation. Ce suivi de croissance se faisait par mesure d'absorbance à 630nm grâce à un lecteur automatique de plaque (BIO-TEK). De la même façon, des courbes étalon ont été réalisées en utilisant des suspensions bactériennes de concentration connue en TS, et incubées dans les mêmes conditions. En fin de croissance, la quantité initiale de bactéries fixées dans un puits est estimée par rapprochement avec la courbe étalon la plus proche.

b) Résultats

Les résultats comparatifs de ces 4 méthodes sont présentés figure 24. Si le protocole Borowski est celui qui permet d'obtenir les absorbances les plus élevées, c'est la méthode Graham qui donne les résultats les plus cohérents et les plus répétables. De plus, une optimisation de la méthode Graham, qui consistait à remplacer l'utilisation du tampon carbonate par du Dulbecco, a permis d'obtenir des signaux plus nets (figure 25).

La méthode directe pour évaluer l'efficacité du protocole d'immobilisation des bactéries à la surface des puits consistait à suivre leur courbe de croissance, et à la comparer à des courbes étalons pour en déduire le nombre de bactéries fixées. Le rapport entre ce nombre et les bactéries initialement déposées dans le puits peut ensuite être estimé (Tableau XIII).

Chacune des souches a montré une capacité différente à être immobilisée sur le plastique. Sur la base de cet échantillon de sept souches, il semble que la structure pariétale est un facteur déterminant, les souches Gram positives étant plus facilement fixées que les Gram négatives.

c) Discussion

Des trois méthodes, celle de Graham *et al.* est la plus directe et la plus simple, a permis d'obtenir les résultats les plus reproductibles, et, après adaptation et optimisation, la quantité de bactéries immobilisées la plus grande. Il a donc été décidé de retenir cette méthode pour la suite des investigations.

2. Analyse statistique des données

Une première idée permettant de donner une dimension quantitative à cette méthodologie était de déterminer un seuil de détection, exprimé en nombre de bactéries immobilisées. Il est en effet possible de déterminer, pour chacune des souches testées, le nombre minimum de bactéries nécessaires afin d'obtenir un signal significativement différent du témoin. Plus ce nombre sera faible, et plus la bactérie sera facilement détectable.

Le protocole consiste donc à immobiliser sur une même plaque plusieurs souches bactériennes, à des concentrations différentes, puis de révéler leur présence par les lectines marquées (protocole Graham). Deux tests statistiques non paramétriques sont ensuite nécessaires pour la bonne interprétation des résultats : le test de Kruskal et Wallis, qui permet de valider le fait que tous les résultats obtenus ne sont pas statistiquement semblables entre eux. S'il est positif, le test de Siegel et Castellan[214] détermine quels résultats sont significativement différents du témoin négatif (sans bactérie). Un exemple des résultats obtenus grâce à un tel traitement est présenté figure 26.

3. Résultats et intérêts de cette approche statistique

La combinaison de la mesure directe du nombre de bactéries immobilisées à l'analyse statistique présentée plus haut permet, de façon synthétique, de déterminer des seuils de détection. Les résultats obtenus sont présentés Tableau XIV.

A ce stade, il était possible d'approcher la problématique de la détection de contaminants du lait, en étudiant l'impact des composants du lait sur le seuil de détection mesuré. Pour cela, une étude a été menée en faisant se dérouler l'incubation des lectines marquées et des bactéries immobilisées dans un tampon complété par du lait UHT demi-écrémé.

Les résultats sont présentés Tableau XV. Ils montrent clairement un effet négatif du lait sur la reconnaissance des bactéries par les lectines. Cet effet se fait d'autant plus ressentir que le seuil de détection en tampon PBS est élevé, c'est-à-dire qu'un nombre important de bactéries est nécessaire pour obtenir un signal significatif en absence de composés compétiteurs.

Cette méthodologie permet donc d'interpréter des résultats de fixation de lectines sur bactéries entières, et même d'approcher l'affinité mise en jeu par le biais d'un seuil de

détection déterminé de façon statistique. Elle constitue donc une avancée notoire par rapport aux méthodologies d'étude de la fixation lectine-bactérie existante.

Néanmoins, la faible puissance du test statistique utilisé, lié en grande partie au caractère non paramétré des échantillons, limite à elle seule la portée de cette avancée. A cet égard, cette méthode laissait encore une grande marge d'amélioration, en partie comblée par la poursuite de son développement.

B. Mesure quantitative rapide de l'affinité de lectines pour des cellules bactériennes entières

1. Matériels et méthodes

a) Provenance du matériel

Les milieux gélosé (Plate Count Agar, PCA) et liquide (Tryptone Soya, TS) sont obtenus chez Biomérieux (France). Le tampon Dulbecco (pH=7,1) provient de Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA). Les microplaques MaxiSorp 96 puits à fond plat proviennent de VWR (France). Le reste du matériel, y compris les lectines marquées à la peroxydase (Concanavalin A, ConA ; Wheat Germ Agglutinin, WGA ; lectine de *Psophocarpus tetragonolobus*, PT) a été acquis auprès de Sigma (France). Le choix de ces lectines particulières a été essentiellement orienté par le fait qu'elles étaient disponibles sous forme marquée à la peroxydase, sur la base des critères microbiologiques déjà évoqués (Justification de la démarche.II).

b) Préparation des bactéries

Les souches utilisées pour cette étude sont présentées dans le Tableau VIII, p.77. Elles sont maintenues sur PCA à 4°C pendant maximum 14 jours. Les conditions de croissance ont été standardisées, afin d'assurer une certaine répétabilité des résultats. En effet, l'état physiologique de la souche a un effet sur l'interaction lectine-bactérie[205]. Plusieurs colonies sont resuspendues en TS et incubées à température optimale de croissance (Tableau VIII, p.77) pendant une journée. Un millilitre de cette suspension est ensuite dilué dans un tube de TS neuf et incubé à la même température pendant une nuit.

La suspension finale est lavée par deux centrifugations successives (3 000x g, 15 min, 4°C) chacune suivies par une resuspension du culot dans du tampon Dulbecco. Des dilutions

en série dans du Dulbecco permettent d'obtenir des suspensions de concentration désirée, et de réaliser des étalements sur PCA pour dénombrement.

c) Immobilisation sur microplaque

La procédure est adaptée de Graham *et al.*[131]. Les suspensions (100µL) de la dilution appropriée sont déposées dans les puits (figure 27). Des puits contrôle reçoivent du Dulbecco stérile, ou du TS stérile préparé de la même façon que les suspensions bactériennes (y compris les lavages par centrifugation et les dilutions en Dulbecco). Les plaques sont alors scellées et centrifugées (130x g, 15 min, 20°C). Le contenu de chaque puits est prélevé à la pipette, puis remplacé par 200µL de Dulbecco complété par 0,1% (p/v) de SAB. Les plaques sont incubées pendant 1h à 37°C. Les plaques ainsi préparées sont immédiatement utilisées pour la suite de la procédure ELLA (Enzyme Linked Lectin Assay) décrite dans le paragraphe e).

d) Estimation de l'efficacité d'immobilisation

Il a été postulé que l'efficacité d'immobilisation devait être corrélée à l'hydrophobicité intrinsèque de la souche. Cette propriété a été estimée pour chaque souche par une adaptation[215] du test d'adhésion microbienne aux hydrocarbures (Microbial Adhesion To Hydrocarbons, MATH[216]). Les micro-organismes sont lavés de la même façon que précédemment, puis la densité optique à 600nm (DO₆₀₀) est ajustée à environ 0,6. Six cents microlitres de xylène sont alors ajoutés à des aliquots de 4mL de cette suspension, puis le tout est vortexé à grande vitesse pendant 60 secondes. Après que les deux couches se sont séparées (environ 15 min), la phase aqueuse inférieure est prélevée et transférée dans un tube propre afin de déterminer sa DO₆₀₀. Le pourcentage d'hydrophobicité est alors calculé de la façon suivante :

$$\% \text{ hydrophobicité} = 100 \times (DO_{\text{avant}} - DO_{\text{après}}) / DO_{\text{avant}}$$

Les corrélations entre immobilisation et hydrophobicité ont été mesurées par le test de Spearman basé sur les rangs, grâce au logiciel SigmaStat.

e) Révélation par lectine couplée à la peroxydase

Les plaques sont vidées puis incubées avec une solution de lectines (100µL/puits, 2h, température ambiante). Les solutions de lectines sont préparées par dilution dans du Dulbecco 0,1% (p/v) SAB à 2,5µg/mL pour ConA, 1,7µg/mL pour PT et 0,9µg/mL pour WGA

(exprimé en masse de protéine par mL). La moitié des puits reçoivent du Dulbecco 0,1% de SAB (p/v) comme témoin négatif. Les plaques sont ensuite lavées trois fois en Dulbecco, vidées, et incubées pendant 15 min avec 100µL d'une solution à 3,7mM de o-phenylène-diamine (OPD) et 0,4mM de peroxyde d'hydrogène en tampon citrate (pH=5,0). La réaction est bloquée par 50µL d'acide sulfurique (2,5M), et l'absorbance est mesurée à 490nm.

Les résultats présentés tiennent compte des puits témoins. De l'absorbance mesurée à une concentration bactérienne donnée est soustraite l'absorbance obtenue sans dépôt de lectine mais avec la même concentration bactérienne. A cela est à nouveau soustraite la différence obtenue de la même façon mais sans bactérie (TS stérile dilué de la même façon que la suspension bactérienne, avec et sans lectine). En effet, il a été observé que malgré les étapes de lavage, le peu de TS restant dans les puits pouvait induire un signal non négligeable.

2. Résultats

a) *Efficacité de l'immobilisation*

L'hydrophobicité de chaque souche a été estimée (Tableau XVI) comme étant le pourcentage des bactéries passant de la phase aqueuse à la phase hydrophobe au cours du protocole MATH. Plus celle-ci est importante, et plus la souche se fixe à la surface du plastique. En effet, il existe une corrélation positive entre l'hydrophobicité mesurée par la méthode MATH et les mesures « directes » (III.A.1.a) d'immobilisation obtenues par suivi de croissance des bactéries fixées ($p < 0,1\%$). De plus, cette corrélation est linéaire ($r^2 = 0,83$).

b) *Affinité lectine-bactérie*

Les dilutions des suspensions bactériennes étaient ajustées de sorte à rester sous la limite de saturation stérique de la surface des puits d'une part, et à rester dans l'intervalle de linéarité du lecteur de microplaque d'autre part. Dans ces conditions, le tracé de la DO_{490} (proportionnelle à la quantité de lectines fixées) par rapport à la quantité de bactéries immobilisées a pu être réalisé, et une régression linéaire a été établie. Lorsqu'une mauvaise régression était obtenue ($r^2 < 0,8$), la souche était considérée comme non réactive vis-à-vis de la lectine. Par ailleurs, une courbe étalon pour la solution de lectine a pu être réalisée, ce qui permet de traduire la DO_{490} obtenue en masse de lectine retenue.

Un exemple de résultat est présenté figure 28. La pente de la courbe fournit une bonne estimation de l'affinité de la lectine pour la souche bactérienne utilisée, exprimée en

picogrammes de lectine retenus par 10^6 CFU. Ce même traitement des données a été fait sur les sept souches étudiées, et les résultats sont résumés dans le Tableau XVII.

3. Discussion

a) *Efficacité de la fixation*

La corrélation observée entre la mesure directe d'immobilisation des bactéries au plastique et la mesure d'hydrophobicité par la méthode MATH confirme une hypothèse théorique formulée *a priori*. Il est donc légitime d'utiliser cette dernière méthode, simple et rapide, comme prédicteur de l'efficacité de fixation, ce qui permet d'éviter la longue et fastidieuse mesure directe.

La pertinence de la méthode MATH comme mesure absolue de l'hydrophobicité a été très discutée[217]. Certains auteurs ont suggéré que les résultats obtenus ne correspondent pas à l'hydrophobicité réelle de la souche dans son environnement initial, en raison de l'influence du protocole sur les cellules bactériennes (mise en présence d'hydrocarbures, changement de tampon, centrifugation, etc...).

Cependant, cela ne remet pas en question la corrélation observée entre les résultats de la méthode MATH et le taux d'immobilisation des bactéries au plastique. C'est bien cette corrélation qui importe ici, puisque c'est elle qui permet de substituer le protocole MATH au protocole de mesure directe du taux de fixation.

b) *Affinité lectine-bactérie*

Les résultats présentés dans le Tableau XVII confirment plusieurs propriétés déjà connues des interactions lectines-bactéries.

La première est la grande variabilité de l'affinité d'une lectine pour des souches proches, voire appartenant à la même espèce[142]. Ceci est à mettre en relation avec la diversité inter-souches des résidus sucrés exposés en surface. Ainsi, les deux *Pseudomonas* étudiées n'ont jamais la même affinité pour une même lectine.

La deuxième est que la ConA est une lectine ayant un grand spectre de reconnaissance, avec des affinités variables et pouvant aller jusqu'à $2\,200\text{ pg}/10^6\text{ UFC}$, en fonction de la souche. Ceci confirme et valide le choix d'étudier cette lectine plus

particulièrement, réalisé en début de projet. WGA et PT montrent un spectre de reconnaissance plus étroit dans ce panel de souches.

Bien que les valeurs absolues obtenues avec ces deux lectines sont généralement inférieures à celles de ConA, il serait inapproprié de les comparer entre elles directement, compte tenu de la différence de masse molaire de chacune des protéines, ainsi que de la différence de marquage à la peroxydase de ces trois lectines. Une comparaison inter-lectine correcte de ces résultats ne devrait pas aller plus loin que l'étude des différences de ratios d'affinité d'une bactérie à l'autre. Par exemple, ConA est 150 fois plus affine pour Se que pour Sa, alors que ce ratio n'est que de 1,7 pour WGA, et que PT ne se lie à aucune des deux souches.

Il est également difficile de comparer ces données avec les résultats de la littérature, obtenus pour la plupart par la méthode d'agglutination. Comme évoqué plus haut, il peut exister une grande différence d'affinité d'une lectine pour deux souches de la même espèce. Ainsi, une comparaison n'est possible que si le même couple lectine-bactérie a été étudié, et si la souche a été maintenue et préparée dans les mêmes conditions. A cette difficulté s'ajoute bien évidemment celle de comparer ces données quantitatives à des résultats semi-quantitatifs et extrêmement variables d'un expérimentateur à un autre.

Une comparaison peut toutefois être faite avec les résultats de Holm and Jespersen[195]. Ces auteurs utilisent la WGA en cytométrie de flux pour réaliser un marquage Gram, avec un bon pourcentage de souches correctement interprétées (jusqu'à 99% sur leur échantillon de 12 souches et dans des conditions particulières). Toutefois, leur critère de typage ne repose pas exclusivement sur un marquage à la WGA. Par exemple, ils interprètent correctement les *Pseudomonas sp.* comme des souches Gram négatives, bien que celles-ci soient marquées par la WGA. Sizemore *et al.*[194] avaient déjà noté ce cas particulier des *Pseudomonas sp.*, et par ailleurs, certains tests d'agglutination ont donné des résultats positifs pour des souches Gram négatives avec la WGA[199]. Les résultats présentés ici sont donc en accord avec ces connaissances sur WGA, et confirment que cette lectine ne peut être employée seule pour remplacer le typage Gram classique.

Enfin, s'il s'avère que le choix de la ConA comme lectine principale d'intérêt est probablement judicieux, il apparaît ici clairement que le couple ConA-Sm n'était pas le plus favorable pour réaliser les premières expériences.

C. Évaluation de l'activité biochimique des lectines immobilisées sur billes magnétiques

1. Matériels et méthodes

a) Préparation des complexes billes-lectines

Les grandes lignes du protocole sont les mêmes que pour celui présenté précédemment (I.A.1, figure 14). Toutes les étapes sont réalisées en conditions stériles. L'incubation se déroule en microtube de 2mL. Les billes magnétiques sont lavées deux fois en Dulbecco, puis resuspendues dans des solutions de lectine (ConA) de concentrations variables. La dilution finale des billes est la même que dans la suspension mère fournie par le producteur. Les tubes sont placés en rotation inclinée lente à température ambiante. Lorsque l'incubation est terminée, le surnageant est prélevé, les billes sont lavées, puis à nouveau resuspendues en Dulbecco. Les deux surnageants ainsi obtenus contiennent les lectines non fixées sur les billes, et leur quantité est déterminée par la méthode Bio-Rad en suivant le protocole du fournisseur.

b) Mesure d'activité biochimique

Les microplaques sont incubées une heure à 37°C avec une solution de thyroglobuline diluée dans du Dulbecco à 5mg/mL. La concanavaline A a une très grande affinité pour cette molécule (II.C.1.b). Des dilutions en série d'une suspension de billes magnétiques saturées en lectine sont alors incubées (100µL/puits) pendant deux heures à température ambiante. La dernière étape consiste alors à ajouter 100µL d'une solution de peroxydase diluée en Dulbecco dans chaque puits (60ng/mL de peroxydase, deux heures, à température ambiante). Chacune de ces étapes est suivie de trois lavages par 200µL de tampon Dulbecco.

La quantité de peroxydase retenue dans chacun des puits est alors estimée par la mesure de la DO₄₉₀ de 100µL de surnageant après incubation avec 100µL d'une solution d'OPD pendant 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité puis blocage par 50µL d'acide sulfurique 2M. Les témoins négatifs consistaient en puits incubés sans billes, incubés avec des billes saturées de SAB (sans lectine), ou encore de puits saturés au SAB au lieu de thyroglobuline.

c) Mesure d'activité bactériologique

Le même protocole que pour le test biochimique est suivi. Au lieu d'ajouter la peroxydase, 100µL d'une suspension bactérienne concentrée (*S. epidermidis*, ~10⁷UFC/puits)

sont incubés pendant deux heures à température ambiante. Les puits sont alors lavés, puis réincubés avec 200µL de Trypcase Soya (TS) à 37°C sous agitation. La croissance bactérienne est alors suivie par mesure de la DO₆₃₀, et comparée à des courbes étalon obtenues à partir de puits vides ayant reçu une concentration connue de bactéries en TS sur la même plaque.

2. Résultats

a) Préparation des billes magnétiques

L'estimation de l'efficacité de fixation de lectine à la surface des billes magnétiques par mesure protéique (figure 29) montre que la quantité de lectines fixées est constante, et n'est pas influencée par la quantité de lectines incubées dans la gamme de concentration étudiée. Ceci indique que les billes ainsi obtenues sont en fait saturées en lectine. D'autres résultats ont confirmé que le niveau de saturation n'est pas affecté par la durée d'incubation, ni par le volume total réactionnel.

b) Mesure d'activité biochimique

La figure 30 montre que l'activité biochimique détectée est corrélée de façon positive à la quantité de billes déposées dans le puits. Les témoins négatifs (Billes-SAB) avaient une activité très faible (entre 0 et 1%), et n'étaient pas influencés par la quantité de billes déposées. Le bruit de fond n'atteignait pas un niveau détectable (0%), et les lectines libres, susceptibles d'accompagner les complexes billes-lectines malgré les lavages, n'influençaient pas le résultat de ces tests (signal négligeable).

De la même façon, et en utilisant le même protocole, l'influence de la concentration initiale en lectines du tampon de préparation des billes magnétiques, ainsi que celle de la durée d'incubation sur l'activité biochimique des lectines immobilisées sur les complexes billes-lectines ont été étudiées. Les résultats sont présentés figure 31 et figure 32. Il est démontré que l'incubation de plus de 2mg/mL de lectines avec les billes magnétiques ne donne pas d'augmentation substantielle de l'activité biochimique finale du complexe (figure 32). Pour ce qui concerne le temps d'incubation, ce test a révélé que non seulement une durée de plus d'une heure ne permet pas de fixer plus de lectine, mais aussi qu'elle entraîne une diminution de l'activité biochimique finale exprimée à la surface des billes (figure 31).

c) Mesure d'activité bactériologique

Les résultats (figure 33) montrent que les complexes billes-lectines permettent la capture d'environ 10% des bactéries déposées. Aucun des témoins négatifs n'a donné de tels résultats, la plupart d'entre eux restant en dessous de 2% (limite de détection de la méthode, correspondant à 30 UFC dénombrées par boîte de Petri).

Le nombre de bactéries retenues est corrélé positivement au nombre de billes-lectines déposées (figure 34), jusqu'à un pic à environ 10^7 billes/puits, au-delà de quoi le ratio bactéries immobilisées/bille diminue pour finalement atteindre un plateau.

3. Discussion

a) Validation des résultats antécédents

L'étude complémentaire menée ici, dans des conditions plus standardisées qu'en début de projet, a montré que les billes magnétiques obtenues sont saturées en lectines, et a également confirmé les résultats antécédents concernant la durée de l'incubation des billes avec les lectines, ou encore le volume réactionnel employé. Néanmoins, cette approche initiale basée sur des mesures protéiques a prouvé ses limites (I.C.1). En particulier, il n'existait aucune garantie que ces mesures strictement quantitatives reflétaient l'activité réelle observée *in fine* sur les billes obtenues. Les mesures d'activité réalisées ici, aussi bien biochimiques que bactériologiques, fournissent des résultats beaucoup plus informatifs sur l'efficacité réelle des complexes obtenus.

b) Mesures d'activité biochimique

Dans les conditions du protocole mis en place, une activité est détectée lorsque :

- Les billes magnétiques sont retenues à la surface des puits via l'ancrage des lectines immobilisées sur la thyroglobuline.
- La peroxydase se lie aux billes magnétiques retenues

La mesure d'une activité est donc le double témoin de la présence de lectines actives à la surface des billes magnétiques. Les résultats obtenus prouvent ainsi que

1/ les billes magnétiques portent des lectines à leur surface - ceci avait déjà été démontré par les mesures protéiques ;

2/ ces lectines conservent leur activité biochimique une fois immobilisées sur les billes.

En plus de mettre en évidence cette activité (ce qui n'avait été vérifié par aucun auteur dans le passé), cette méthode permet également de quantifier cette activité de façon précise et reproductible. Ceci a ouvert la voie vers une optimisation de la préparation des complexes billes-lectines sur des critères fonctionnels.

Ainsi, la quantité de lectine à incuber avec les billes a été fixée à 2mg/mL. Quant à l'aspect cinétique, la durée d'incubation optimale est de 1h. Les raisons de l'influence négative des longues incubations (>1h) sont inconnues. On peut émettre l'hypothèse que des chocs répétés entre billes lors de l'incubation conduisent à endommager les lectines, et/ou qu'une incubation trop longue des lectines à température ambiante a pour effet de dénaturer la protéine de façon notable.

L'un des apports de cette série d'expériences a également été de montrer l'inutilité de la longue étape (16-24h) de saturation des complexes bille-lectine en SAB, recommandée par le fournisseur de billes. En dépit du fait que cette étape de saturation n'a jamais été réalisée, les témoins négatifs testés n'ont jamais donné de signaux significatifs. Cela est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle les billes sont déjà saturées en lectine. La suppression de cette étape de saturation au SAB a ainsi permis de réduire considérablement la durée du protocole de préparation des complexes billes-lectines, et d'obtenir des résultats généralement plus reproductibles.

c) Mesures d'activité bactériologique

Dans ces conditions opératoires, environ 10% des bactéries déposées dans un puits pouvaient être spécifiquement retenues par des complexes billes-lectines. Ce pourcentage peut paraître faible, mais il ne reflète pas l'efficacité des complexes billes-lectines en tant que tel. En effet, il est probable que ce taux corresponde à un maximum stérique induit par la géométrie même du dispositif. Les puits, dans lesquels se déroule la réaction, ont une surface, et donc une capacité de rétention de bactéries limitée, d'autant plus si l'on suppose qu'une seule couche de bactéries peut être retenue de façon spécifique. La capacité limite d'un puits n'est pas connue avec précision. Néanmoins, les données dégagées d'expériences précédentes (notamment III) laissent à penser que ces 10% (soit environ 10^6 bactéries) peuvent correspondre à cette limite stérique. En d'autres termes, il est probable que le facteur limitant la quantité de bactéries retenues ne soit la géométrie du puits plutôt que l'activité des billes-lectines.

Cette géométrie peut également expliquer la relation entre la quantité de billes déposées et la quantité de bactéries retenues (figure 34). En effet, la figure 30 suggère que les puits sont saturés en billes à environ 7.10^7 billes déposées, ce qui correspond au début du plateau observé dans la figure 34. La diminution observée en début de plateau correspond vraisemblablement à des concentrations sub-optimales en billes. Une addition supplémentaire de billes conduit, du fait de la densité de celles-ci sur le fond du puits, à une diminution de la surface totale de lectines accessibles aux bactéries, et par là même une rétention plus faible.

D. Conclusion

A la suite de ces expériences, certains points importants concernant la LMS ont donc pu être mis en évidence :

① Le protocole ELLA mis au point permet de rationaliser l'étude des affinités relatives de lectines pour diverses souches bactériennes. Ce protocole permet de quantifier cette affinité de façon reproductible, et est applicable à toutes sortes de lectines (y compris celles n'ayant qu'un unique site de fixation) et toutes sortes de souches bactériennes (y compris celles ayant une tendance à l'auto-agglutination), autant de critères qu'aucun protocole ne pouvait remplir jusqu'alors.

② Un test de mesure d'activité biochimique des lectines a été mis au point, qui permet notamment d'évaluer l'efficacité de complexes billes magnétiques-lectines préparés en laboratoire. A ce jour, aucune publication n'avait fait état d'un tel protocole ou d'une telle étude. Ce test a permis d'optimiser la préparation des billes-lectines en terme d'activité biochimique immobilisée. Cette optimisation induit un gain de temps substantiel pour la préparation (une heure au lieu de deux jours), s'accompagnant d'une augmentation notable de l'activité biochimique des complexes.

③ Une adaptation de ce dernier test a permis d'obtenir la première preuve indiscutable de l'intérêt que peut représenter la LMS, en permettant, dans des conditions particulières, la capture d'un nombre important de bactéries à la surface des billes-lectines.

L'ensemble de ces outils techniques mis au point permet de s'engager de façon plus rationnelle dans la voie de l'étude et du développement de la LMS, les travaux réalisés dans ce domaine jusqu'à aujourd'hui ne s'appuyant que sur des résultats qualitatifs et/ou sur des études parcellaires de l'ensemble du processus de la LMS.

IV. Application à une matrice complexe

Les études fondamentales présentées dans les parties précédentes, permettent une compréhension plus fine et une approche plus rationnelle du mécanisme de liaison des lectines aux bactéries. Il a également été possible d'appliquer les protocoles mis au point pour étudier et prévoir l'impact que pourrait avoir le lait UHT sur ce phénomène.

A. Matériels et méthodes

1. Mesure de l'affinité de lectines pour les cellules bactériennes entières

Le même protocole que décrit en III.B est suivi, à la différence près que la lectine ConA est diluée dans du Dulbecco complémenté à 1% ou 10% (v/v) de lait UHT demi-écrémé, ou dans du lait UHT demi-écrémé pur (100%).

2. Séparation magnétique médiée par des lectines

Les grandes lignes du protocole utilisé sont les mêmes que celui présenté en I.A.2 (figure 15, p.85). Cent microlitres de billes magnétiques saturées en ConA sont incubés pendant deux heures sous agitation douce et à température ambiante avec 5mL d'une suspension bactérienne. Après un lavage dans 5mL de Dulbecco, les billes sont resuspendues dans 1mL de ce même tampon. La suspension finale est diluée en série et étalée sur PCA. Un dénombrement est réalisé après incubation à 37°C pendant 24h, et comparé avec les résultats obtenus avec des témoins négatifs. Ces témoins sont réalisés sans billes ou avec la même quantité de billes saturées au SAB. Pour certaines expériences, les bactéries ont été incubées avec une faible quantité de lectines en solution, en quantité comparable aux lectines libres pouvant accompagner les complexes billes-lectines malgré leur lavage.

Les suspensions bactériennes sont préparées à partir d'une culture d'une nuit en Trypcase Soya (TS). Cette culture subit deux centrifugations successives, suivies par une resuspension dans un tampon (Dulbecco ou Dulbecco complémenté par 10% v/v de lait demi-écrémé UHT). La suspension est finalement diluée en série dans ce même tampon. Chacune des dilutions est utilisée dans l'expérience, afin d'obtenir la courbe des bactéries retenues en fonction de la quantité de bactéries incubées initiale. Le traitement mathématique des résultats obtenus est présenté dans la partie résultats, et a été réalisés grâce au logiciel SigmaStat.

B. Résultats

1. Mesure de l'affinité de lectines pour les cellules bactériennes entières

Les résultats sont présentés dans le Tableau XVIII, et montrent une diminution du nombre de lectines fixées par UFC à mesure que la concentration en lait augmente dans le tampon d'incubation.

2. Séparation magnétique médiée par les lectines

Typiquement, les résultats montrés dans la figure 35 sont représentatifs de l'ensemble des résultats obtenus. Les bactéries retenues de façon spécifique sont déterminées par la différence entre les bactéries retenues par les billes-lectines et celles présentes dans un même échantillon ayant subi le même protocole mais sans bille (témoin négatif, correspondant en fait à la contamination du tube). La quantité de bactéries retenues spécifiquement peut être correctement prédite par l'équation 1. $B_{\max}$ et K_D sont caractéristiques d'une souche donnée. $B_{\max}/K_D$ correspond à l'efficacité du piège bactérien pour de faibles concentrations en bactéries, ou, présenté d'une autre façon, à la probabilité statistique de capturer une bactérie unique dans 5mL de tampon et dans ces conditions expérimentales. Le Tableau XIX donne les K_D , $B_{\max}$ et $B_{\max}/K_D$ obtenues pour chaque souche en tampon Dulbecco.

Équation 1. Régression du nombre de bactéries retenues (Br) par rapport au nombre de bactéries initialement incubées (Bi) en présence de billes-lectines. $B_{\max}$ est la quantité asymptotique de bactéries nécessaires pour saturer le piège. $B_{\max}/K_D$ reflète l'efficacité du piège aux faibles concentrations bactériennes.

$$Br = \frac{B_{\max} \times Bi}{K_D + Bi}$$

De façon logique, le $B_{\max}$ pour chaque souche est corrélé négativement avec le volume d'une cellule bactérienne ($p=1,5\%$, $\rho=-0,809$ test de Spearman sur les rangs, logiciel Sigmastat). Par ailleurs, l'efficacité du piège aux faibles concentrations varie entre 16 et 70%, en fonction de la souche.

Plusieurs expériences contrôle ont été réalisées avec *S. epidermidis* :

- Lorsque les bactéries sont incubées avec une quantité de lectines libres en solution reflétant la quantité de lectines libres pouvant accompagner les billes-lectines malgré leurs lavages, les bactéries retenues n'étaient pas plus nombreuses que dans le témoin négatif sans billes.
- Lorsque des billes-SAB étaient utilisées, environ 10 fois moins de bactéries étaient retenues qu'avec les billes-ConA. Des billes non traitées (ayant toujours leurs résidus Tosyl en surface) ont approximativement la même efficacité que des billes-ConA en tampon Dulbecco.
- Cependant, lorsque le Dulbecco est complété avec du SAB (1mg/mL), les billes non traitées ne retiennent pas plus de bactéries que le témoin négatif, alors que les billes-ConA conservent la plus grande part de leur activité biochimique.

Finalement, les mêmes expériences ont été réalisées pour 4 des souches bactériennes dans du Dulbecco complété par 10% (v/v) de lait UHT demi-écrémé. Pour ces quatre souches, une diminution importante du K_D , et donc une perte de l'efficacité du piège ont été observées (Tableau XX).

C. Discussion

Les essais en microplaques, tout comme les essais en réelles conditions de LMS, montrent l'influence néfaste des composants du lait sur l'association ConA-bactérie. Pour la plupart des souches, du lait dilué à 10% suffit à rendre le piège totalement inopérant, du moins aux faibles concentrations bactériennes qui intéressent le projet Microqual. Ceci avait été pressenti lors des études de la lectine à l'aide du BIAcore (Annexe 2), et est confirmé ici en conditions réelles d'utilisation (figure 36).

Ces observations prouvent la nécessité de traiter le lait avant analyse, afin d'en retirer par exemple les substances compétitrices s'y trouvant, telles que les glycoprotéines ou les sucres. Si toutefois le piège bactérien à base de lectine devait être utilisé sur du lait pur ou peu dilué, il apparaît ici que la lectine ConA ne serait de toute évidence pas un choix judicieux, malgré son large spectre de reconnaissance bactérien. L'utilisation des outils mis au point au cours de ce travail permettrait néanmoins de cribler rapidement un grand nombre de lectines afin de déterminer laquelle ou lesquelles seraient les plus aptes à se lier aux bactéries, compte tenu de ces conditions particulières de milieu.

V. Détection électromagnétique

L'objectif principal de ces expérimentations était de développer, à partir d'un matériel existant mais adapté à des applications très différentes, un dispositif capable de détecter une croissance bactérienne. Pour cela, un premier travail visant à réaliser des sondes adaptées aux besoins, en termes de performance de détection, mais aussi de facilité de manipulation, a été réalisé sur un modèle chimique. La confirmation de ces choix dans un contexte bactériologique a ensuite pu être obtenue.

A. Matériels et méthodes

1. Calibration chimique

Plusieurs solutions salines de concentration en NaCl allant de 0 à 58,44g/L (1M) ont été préparées à partir d'eau désionisée. La conductivité de la solution est alors déduite de l'Équation 2.

Équation 2. Expressions dérivées de la conductivité des solutions de chlorure de sodium (d'après [218])

$$\sigma(T, N) = \sigma(25, N) \left\{ \frac{1.000 - 1.962 \times 10^{-2} \Delta + 8.08 \times 10^{-5} \Delta^2}{-N \Delta [3.020 \times 10^{-5} + 3.922 \times 10^5 \Delta + N(1.721 \times 10^{-5} \Delta - 6.584 \times 10^{-6} \Delta)]} \right\}$$

ou T est la température en °C, N la normalité de la solution de, $\Delta = 25 - T$ et

$$\sigma(25, N) = N [10.394 - 2.3776N + 0.68258N^2 - 9.13538N^3 + 1.0086 \times 10^{-2} N^4]$$

Les mesures sont effectuées dans des tubes à essai classiques (16x160mm) dans des volumes constants d'environ 5 à 10mL. Dans un premier temps, un balayage des signaux obtenus avec les solutions à 0M puis 1M suivant la fréquence d'étude est réalisé grâce à la fonction adaptée du Zenix (voir Annexe 1 pour plus de détails). Une fréquence est alors retenue pour l'étude de l'effet de la concentration saline de la solution sur le module du signal. Pour cela, la sonde est plongée dans des tubes de concentration croissante et le signal est enregistré lorsqu'il est stabilisé.

Ce même protocole est reproduit pour différents types de sondes, jusqu'à la sélection finale du type qui servira aux études bactériologiques.

2. Calibration bactériologique

Les réglages optimaux de l'appareil sont déterminés en suivant la croissance de *S. marcescens* dans du milieu WIB (10mL) à plusieurs voltages et fréquences simultanément. Le tube de croissance est immergé dans un bain-marie, et la température est contrôlée à $37\pm 1^\circ\text{C}$. Les réglages optimaux sont ceux pour lesquels le signal obtenu en fin de culture est le plus élevé.

Une fois ces réglages déterminés, plusieurs croissances bactériennes sont suivies, chacune ayant une charge bactérienne initiale (inoculum) différent. Le TTD est estimé de la même façon que pour le système commercial Rabbit. Le module du signal, enregistré par le Zenix à 1s^{-1} , est ré-échantillonné de façon à obtenir un point toutes les 6 minutes, par moyennage des valeurs obtenues pendant ces intervalles. Le TTD est le temps du premier point pour lequel la différence entre trois points consécutifs est supérieure à un minimum fixé préalablement. Dans notre cas, ce minimum a été choisi de façon empirique suffisamment élevé de sorte à ce qu'aucun de nos enregistrements précédant ne donnent de faux positifs.

Des prélèvements occasionnels en cours de culture, et systématiques en fin de cultures, permettent de confirmer la croissance effective des micro-organismes, de même que l'absence de contaminations dans le milieu réactionnel. Seules les cultures non contaminées sont ensuite prise en compte.

B. Résultats et discussion

1. Sélection des sondes

L'appareil Zenix n'est pas, à l'origine, développé pour détecter des variations impédancémétriques à l'intérieur d'un milieu liquide. Sur la base de l'expérience du développeur du dispositif, il est postulé que la conception même de l'appareil, au niveau électronique, doit permettre une adaptation vers ce nouvel usage. Il restait cependant à mettre au point la partie capteur de l'appareil. C'est au court de cette étape préalable de conception des sondes qu'une calibration chimique a été utilisée, afin de s'affranchir des contraintes liées à l'expérimentation sur du matériel biologique (évolution « lente » du signal, contamination).

a) Sonde interne ou externe

L'idée de développer un dispositif de capteurs externes était séduisante. Des sondes non-intrusives, et n'entrant donc pas en contact direct avec le produit, auraient en effet permis

de réaliser les mesures sans avoir recours à une phase de décontamination entre deux échantillons. Sans présager de l'utilisation finale du dispositif, cela aurait également autorisé une utilisation non destructrice de l'échantillon.

Malheureusement, il est apparu que les sondes externes testées étaient plus influencées par le contenant que par l'échantillon lui-même, ce qui rendait toute mesure de l'impédance impossible. Il a donc été convenu d'orienter le développement vers la mise au point de sondes immergées dans l'échantillon.

b) Bobinage des sondes

Les sondes utilisées consistent essentiellement en un ensemble de bobines émettrices (création d'un champ électrique) et réceptrices (détection de ce champ et de l'influence du milieu sur celui-ci). Différentes options concernant l'arrangement spatial relatif des bobines émettrices et réceptrices ont été testées (voir Annexe 1), de même que différents types de bobines (nombre de spires). En particulier, la distance entre les dispositifs émetteur et récepteur a dû être réduite, afin de miniaturiser les sondes et adapter leur taille au volume attendu pour les échantillons à analyser.

Des tests en aveugle ont permis de déterminer quel arrangement conduisait à la meilleure sensibilité vis-à-vis des variations de composition saline du milieu. Cet arrangement particulier a par la suite été retenu par la société IXTREM pour la production des sondes impédancemétriques.

c) Matériau utilisé

Plusieurs modèles de sondes ont dû être écartés, non pas sur la base de leurs performances mais en raison du matériau utilisé pour protéger les bobinages. Celui-ci doit en effet résister aux procédures de décontamination bactérienne les plus élémentaires. Un traitement à la chaleur n'étant pas envisageable à ce stade du développement, nos choix se sont orientés vers une décontamination chimique (alcool, eau de javel). Le polymère utilisé ne devait donc pas être soluble dans ces produits, faute de quoi une dérive du signal était observée au fil des expérimentations. Le façonnage des sondes devait également limiter au mieux les aspérités présentes à la surface des sondes.

d) Choix final

Sur la base de ces différents critères, plusieurs modèles de sondes ont été écartés. Les enregistrements obtenus avec la sonde finalement retenue sont présentés figure 37. Par ailleurs, ces expériences ont permis de confirmer que le signal du Zenix est directement et linéairement influencé par la conductivité de la solution, telle que déduite de l'équation 2 (figure 38).

2. Performances de détection

Un exemple typique de suivi de croissance est présenté figure 39, et correspond à l'allure attendue.

a) Traitement du signal

Le Zenix permet un échantillonnage très fin du signal, de l'ordre d'une mesure par milliseconde. Néanmoins, dans le but de faciliter une comparaison des performances de cet appareil avec ses concurrents du marché, il a été décidé de ré-échantillonner ces mesures à un niveau comparable à celui du Rabbit (Introduction.Partie II.III.B). Pour cela, un point a été enregistré toutes les secondes, et les valeurs obtenues ont été moyennées par groupe de 6 minutes.

b) Détermination du temps de détection

Le temps de détection (TTD) est déterminé par le Rabbit lorsque trois différences calculées entre des mesures consécutives sont supérieures à une valeur seuil fixée de façon empirique par l'expérimentateur. Toujours dans un souci de comparaison, un calcul similaire a été mis au point afin de déterminer de façon mathématique le TTD du Zenix. Une valeur seuil a ainsi été déterminée pour le Zenix. Cette valeur correspondait à la valeur minimale pour laquelle aucun des enregistrements réalisés au laboratoire ne donnait de faux positifs, c'est-à-dire de TTD correspondant manifestement à la phase de latence.

c) Performance du système

Sur ces bases de calcul, le TTD aux faibles concentrations initiales est obtenu par régression et extrapolation (figure 40). A titre de comparaison, les TTD obtenus par les partenaires européens sur la même souche, avec les appareils commerciaux, et dans les conditions opératoires décrites, sont présentés dans le Tableau XXI.

3. Pertinence des mesures effectuées

a) *Echantillonnage des mesures*

Les modes d'échantillonnage et de calcul du TTD ont été choisis en prenant modèle sur les appareils commerciaux du marché. L'intérêt de tels choix est de faciliter la comparaison des performances respectives. Néanmoins, la définition du TTD pour le Rabbit repose sur la comparaison de quatre mesures consécutives, soit une période probatoire de 24 minutes pour un échantillonnage de 1 point par 6 minutes. Il conviendrait de vérifier si ce choix des concepteurs du Rabbit est délibéré, ou repose sur des contraintes techniques liées à leur appareil. En effet, le Zenix autorise un échantillonnage beaucoup plus fin que celui du Rabbit, et pourrait donc permettre de réduire d'autant la période probatoire de détermination du TTD. Il existe donc ici une marge d'optimisation du Zenix.

b) *Calcul du temps de détection*

La valeur seuil utilisée pour la détermination du TTD a une influence capitale. Plus celle-ci est élevée, et plus la variation du signal enregistrée devra être brutale avant que le TTD ne soit atteint. A l'opposé, un seuil trop bas entraînera une détermination erronée du TTD, correspondant aux faibles fluctuations induites par le bruit du signal.

L'impédance d'une solution est influencée de façon importante par la température de celle-ci. Au laboratoire, le dispositif de mesure n'était associé qu'à un dispositif rudimentaire de contrôle de la température. Il est donc probable qu'un meilleur contrôle de ce paramètre crucial permettrait de diminuer le bruit de mesure. Une mesure plus stable permettrait alors de diminuer d'autant le seuil de sensibilité pour le TTD, ce qui représente une autre voie d'amélioration possible pour l'appareil.

c) *Paramètre mesuré*

L'ensemble de ces mesures de TTD repose sur l'enregistrement du module des paramètres X et Y du Zenix (Justification de la démarche.III.A). Une étude plus approfondie sur ce choix montre que ces deux paramètres n'évoluent pas dans le même sens au cours de la croissance bactérienne (figure 41). Une sensibilité plus élevée pourrait donc être obtenue par mesure du paramètre X seul. De plus, un calcul de la dérivée de ce paramètre devrait permettre un accroissement de la sensibilité. Une fonction additive des dérivées respectives des paramètres X et Y devrait encore amplifier cette sensibilité, car elle permettrait de considérer la somme des variations de ces deux paramètres en valeur absolue.

C. Conclusion

Une première phase d'étude a permis de déterminer un dispositif, basé sur le Zenix, et capable de mesurer et détecter la croissance d'une souche particulière. En ce qui concerne sa sensibilité, les premières estimations placent cet appareil largement au niveau de ceux existants actuellement sur le marché. Ces résultats très encourageants laissent à penser qu'une exploration plus large des possibilités de l'appareil doit être envisagée, afin de confirmer les résultats obtenus sur cette souche.

En effet, si ces résultats sont généralisés, la marge d'optimisation du dispositif est suffisamment grande pour espérer obtenir un appareil plus performant que les solutions actuelles. Parmi les pistes possibles, on peut citer :

- La mise au point d'un matériel expérimental adapté au travail des micro-organismes. Les conditions opératoires pour ces expériences ne permettaient en effet que des conditions de stérilité incertaines. De ce fait, l'étude de micro-organismes à croissance plus lente a été impossible (contamination systématique avant la fin de l'expérience).
- La mise au point d'un matériel expérimental adapté à la mesure d'impédance. Il est en effet reconnu que la température a un impact majeur sur les mesures d'impédance. L'utilisation d'un moyen précis de régulation thermique tout au long de la croissance permettrait donc l'obtention d'un signal plus stable, ce qui influencerait positivement sur la sensibilité du système.
- La mise au point d'un traitement du signal performant. Le traitement du signal utilisé pour obtenir les TTD était destiné à obtenir une information similaire à ce que permettent d'obtenir les matériels commerciaux. A l'évidence, un échantillonnage d'un point toutes les six minutes retarde naturellement le TTD. Un échantillonnage plus fin accompagné d'un traitement intrinsèquement plus sensible du signal (basé sur les fonctions dérivées), permettrait sans aucun doute d'augmenter la sensibilité du Zenix.

Conclusion

L'affinité lectine/bactérie

Le piège bactérien qui devait être étudié dans le cadre du projet européen Microqual reposait essentiellement sur l'interaction entre les lectines et les bactéries. Cette interaction existe, comme en atteste la littérature[205]. En revanche, le seul protocole permettant d'étudier cette interaction était jusqu'à présent le test d'agglutination, qui présente comme défauts de n'être que qualitatif, d'être subjectif et donc peu reproductible, de n'être applicable qu'aux souches bactériennes n'ayant pas de propriété d'auto-agglutination, et aux lectines ayant au moins deux sites de fixation. Les aspects qualitatifs et subjectifs en particulier, sont un frein à une approche raisonnée et fiable de l'étude de cette interaction, et par conséquent de son utilisation en biotechnologie.

Les travaux réalisés au cours de ces recherches ont permis de passer outre cet obstacle, en développant un protocole d'étude permettant de quantifier de façon objective et reproductible l'affinité d'une lectine donnée pour diverses souches bactériennes. Le protocole mis au point est simple, ne requiert aucun matériel de pointe, et s'affranchit de tous les pré-requis du test d'agglutination. Dans un contexte général, ce protocole permettrait de caractériser chacune des lectines disponibles en termes d'affinité pour des cellules bactériennes entières. Un criblage systématique pourrait donc conduire à la mise en évidence concrète et fiable de lectines d'intérêt particulier en bactériologie, en fonction de la spécificité d'interaction désirée.

Dans le cadre du projet Microqual, cette nouvelle technique a permis de valider des choix théoriques, et de sélectionner une lectine ayant un intérêt particulier dans notre contexte applicatif, en raison de sa faible sélectivité vis-à-vis des souches bactériennes. La concanavaline A a ainsi été retenue en raison de son affinité pour six des sept souches bactériennes de notre panel.

L'efficacité de la LMS

L'intérêt de la technique est difficile à estimer sur la base des publications disponibles. Certaines, sans suite, annoncent d'excellents résultats, avec des taux de capture bactérienne à deux chiffres, le plus souvent supérieurs à 50%, avoisinant parfois les 100%. D'autres sont plus réservées. Des observateurs ont porté un vif intérêt à cette technique prometteuse, mais force est de constater qu'aucun développement récent n'est venu confirmer ces espoirs.

Les travaux présentés dans cette thèse montrent que, dans les conditions opératoires décrites, les publications les plus pessimistes étaient malheureusement les plus crédibles. Sans toutefois remettre en cause l'intérêt potentiel de la méthode, la démonstration théorique restait à accomplir. Dans ce but, les bases opératoires faisaient défaut. En particulier, aucune étude n'avait à ce jour porté sur la préparation des billes magnétiques recouvertes de lectines. Cette étape est pourtant bien évidemment cruciale pour la maîtrise du protocole de LMS dans son ensemble, ainsi que pour l'interprétation des résultats de capture.

Les travaux réalisés ont permis d'étudier cette étape, en couvrant aussi bien les aspects quantitatifs (quantité de lectines immobilisées à la surface des billes) que qualitatifs (activité fixatrice de sucre développée par les billes magnétiques), dans des contextes biochimiques ou bactériologiques. Les protocoles mis au point permettent, d'une manière simple, sensible, rapide et reproductible, de mesurer l'efficacité d'un complexe bille-lectine, sur une molécule soluble, puis sur une cellule bactérienne entière. Ceci a permis de rationaliser l'étape d'optimisation de la préparation de ces complexes, en mesurant l'effet des principaux paramètres de préparation sur leur efficacité finale, démarche jamais réalisée auparavant.

Utiliser l'approche développée au cours de ces travaux permettrait de tirer des conclusions sur l'utilisation, à terme, de la LMS en biotechnologie. Ainsi, une capture spécifique a été observée et mesurée. Néanmoins, ces études n'ont porté que sur une unique lectine. Des travaux généralisant cette approche à d'autres lectines, et impliquant éventuellement plus de souches bactériennes, seraient donc justifiés.

Application au lait UHT

L'objectif du contrat européen Microqual était de détecter, en moins de 8h, une bactérie contaminant un litre de lait UHT. Ces objectifs, de sensibilité et de rapidité, étaient très ambitieux en comparaison des solutions actuellement disponibles sur le marché. Pour être aussi rapide, la méthode mise au point se doit de comporter deux étapes : de concentration d'abord, puis de détection. Les travaux présentés dans cette thèse portaient sur chacune de ces étapes.

Pour ce qui concerne l'étape de détection, la démarche de développement d'un impédancemètre performant à partir d'un appareil déjà existant mais initialement destiné à un usage tout autre, a porté ses fruits. Ainsi, il a été démontré que le Zenix est capable de détecter une croissance bactérienne de façon aussi performante que ces concurrents du marché, mais avec une marge d'optimisation encore très grande (notamment par le biais d'un meilleur contrôle de la température). Les résultats obtenus doivent donc être généralisés, et les voies d'améliorations explorées. Si ces performances sont confirmées, le Zenix serait le meilleur moyen de détection parmi ceux étudiés dans le cadre du projet Microqual.

Pour ce qui concerne l'étape de concentration, aucun des partenaires européens n'est parvenu à mettre au point une solution performante et suffisamment rapide. La matrice complexe que constitue le lait demeure un problème majeur. En ce qui concerne la LMS, qui reste prometteuse en elle-même, les glucides libres, ou les glycoprotéines libres, peuvent interférer de façon négative. Les débris cellulaires nécessairement présents à l'issue du traitement UHT ne peuvent également qu'avoir un impact négatif sur la technique.

Pour résoudre cet ensemble de problèmes liés à la matrice, plusieurs approches sont envisageables. L'une d'elles consisterait à traiter le lait, d'une manière physico-chimique par exemple (filtration, précipitation, dénaturation sélective des interférants), mais sans léser par ce traitement les éventuelles bactéries présentes. En se focalisant sur la LMS, une autre solution serait de jouer sur les différentes spécificités des lectines, et d'utiliser plusieurs d'entre elles, afin de maximiser les chances d'avoir un spectre d'affinité suffisamment large pour accrocher plus spécifiquement les bactéries entières. Pour cette dernière solution, tous les outils nécessaires ont été développés aux cours des travaux présentés ici, et les résultats obtenus sur une population réduite de lectines et de souches bactériennes permettent d'être

raisonnablement optimiste quant à l'utilisation de cette technique particulière dans le domaine particulier du contrôle qualité en microbiologie.

Enfin, de nombreuses difficultés techniques prévisibles n'ont pas été étudiées au cours de ces travaux. Par exemple, il est vraisemblable que les contaminants bactériens du lait, quelle qu'en soit l'origine, se trouvent dans un état stressé. Cet état de stress n'est pas reproduit lors d'expérience sur du produit artificiellement contaminé par des organismes pré-cultivés en fin de phase exponentielle. Encore une fois, les techniques mises au point au cours de ces travaux peuvent permettre d'étudier ce paramètre, et son influence éventuelle sur la technique de séparation magnétique médiée par des lectines.

Bibliographie

1. KOOPMANS, M. et DUIZER, E. *Foodborne viruses: an emerging problem*. [en ligne], Washington DC: 2002, [référence du September 2002].
<http://europe.ilsa.org/publications/publist.cfm?publicationid=426>
2. HAEGHEBAERT, S., LE QUERREC, F., BOUVET, P., *et al.* Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. *BEH*, 2002, **50**(2002), 249-254.
3. HAEGHEBAERT, S., LE QUERREC, F., GALLAY, A., *et al.* Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000. *BEH*, 2002, **23**(2002), 105-110.
4. HAEGHEBAERT, S., CARLIER, J.-P. et POPOFF, M. Caractéristiques épidémiologiques du botulisme humain en France, 2001 et 2002. *BEH*, 2003, **29**(2003), 129-130.
5. HAEGHEBAERT, S., POPOFF, M., CARLIER, J.-P., *et al.* Caractéristiques épidémiologiques du botulisme humain en France, 1991-2000. *BEH*, 2002, **14**(2002), 57-59.
6. GOULET, V., JACQUET, C., MARTIN, P., *et al.* Surveillance de la listériose humaine en France, 2001. *BEH*, 2004, **9**(2004), 33-34.
7. JACQUET, C., BROUILLE, F., SAINT CLOMENT, C., *et al.* La listériose humaine en France en 1998. *BEH*, 1999, **37**(1999), 153-154.
8. WHO. *8th Report 1999-2000*. [en ligne], K. Schmidt and A. Gervelmeyer Eds, 2003, [référence du 26 Février 2004].
http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threp_fr.htm
9. SC8 - Service d'information sur les causes médicales de décès. [référence du 26 Février 2004], <http://sc8.vesinet.inserm.fr:1080/>
10. AFSSAPS. *Bilan 2002: Principaux faits marquants*. [en ligne], 2003, [référence du 26 Février 2004]. <http://afssaps.sante.fr/pdf/5/bilan03.pdf>
11. BONNY, S. Les consommateurs, l'agriculture, la qualité et la sécurité des aliments: une analyse du questionnement des consommateurs et des réponses apportées. *INRA Prod. Anim.*, 2000, **13**(5), 287-301.
12. GRÉMONT, H., LOYAU, C. et CHALIKA, A. *Perception des consommateurs de la sécurité alimentaire*. [en ligne], 2002, [référence du 26 Février 2004].
http://www.ania.net/espace/dossiers/dossiers_pdf/021021_Enquête%20Finale%20allégée-SIAL%202002.pdf
13. IPSOS. *Les Français, la qualité et la sécurité des aliments*. [en ligne], 2000, [référence du 18/10/2000]. <http://www.ipsos.fr/Canalipsos/poll/441.asp>

14. LOISEL, J.-P. et COUVREUR, A. *Les Français, la qualité de l'alimentation et l'information*. [en ligne], INC Eds, 2001, [référence du 26 Février 2004].
<http://www.credoc.fr/pdf/alimentation.pdf>
15. LOUIS-HARRIS. Les agriculteurs jugés par les consommateurs. *60 millions de consommateurs*, 2004 **381**.
16. FRANSSEN, W., SLEURINK, D., TIJL, F., *et al.* *Sécurité de l'alimentation*. [en ligne], 2001, [référence du 26 Février 2004]. <http://www.future-of-food.org/resultats/resultats.html>
17. EEIG. *Public opinion in the European Union*. [en ligne], 2004, [référence du 27/02/2004]. http://europa.eu.int/comm/public_opinion/archives/eb/eb60/eb60_en.htm
18. EEIG. *Public opinion in the European Union*. [en ligne], 1998, [référence du 27/02/2004].
http://europa.eu.int/comm/public_opinion/archives/eb/eb49/eb49_report_en.pdf
19. BUZBY, J. C., ROBERTS, T., LIN, C. T. J., *et al.* *Bacterial Foodborne Disease: Medical Costs and Productivity Losses*. Washington D.C.: Agricultural Economic Report, 1996, 100 p.
20. Anonyme. *Food Safety Management Systems, Costs, Benefits and Alternatives*. [en ligne], 2002, [référence du 10 mars 2004].
<http://www.health.gov.au/pubhlth/strateg/foodpolicy/pdf/alternatives.htm>
21. TODD, E. C. Costs of acute bacterial foodborne disease in Canada and the United States. *Int J Food Microbiol*, 1989, **9**(4), 313-326.
22. SCOTT, W. G., SCOTT, H. M., LAKE, R. J., *et al.* Economic cost to New Zealand of foodborne infectious disease. *N Z Med J*, 2000, **113**(1113), 281-284.
23. ROBERTS, J. A. et SOCKETT, P. N. The socio-economic impact of human *Salmonella enteritidis* infection. *Int J Food Microbiol*, 1994, **21**(1-2), 117-129.
24. LINDQVIST, R., ANDERSSON, Y., LINDBACK, J., *et al.* A one-year study of foodborne illnesses in the municipality of Uppsala, Sweden. *Emerg Infect Dis*, 2001, **7**(3 Suppl), 588-592.
25. ROBERTS, J. A., SOCKETT, P. N. et GILL, O. N. Economic impact of a nationwide outbreak of salmonellosis: cost-benefit of early intervention. *Bmj*, 1989, **298**(6682), 1227-1230.
26. CRUTCHFIELD, S. R., BUZBY, J. C., ROBERTS, T., *et al.* *An economic Assessment of Food Safety Regulations: The New Approach to Meat and Poultry Inspection*. Washington D.C.: Agricultural Economic Report, 1997, 21 p.

27. OLLINGER, M. et MUELLER, V. *The Economics of Sanitation and Process Controls in Meat and Poultry Plants*. Washington D.C.: Agricultural Economic Report, 2003, 65 p.
28. Anonyme. Arrêté du 21 décembre 1979 modifié, relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées animales ou d'origines animale. *Journal officiel*, 1980.
29. AFNOR. *Microbiologie alimentaire*. Saint-Denis: 2002, 676 p.
30. SHARPE, A. N. et JACKSON, A. K. Stomaching: a new concept in bacteriological sample preparation. *Appl. Microbiol.*, 1972, **24**175-178.
31. FUNG, D. Y. C., SHARPE, A. N., HART, B. C., *et al.* The Pulsifier: a new instrument for preparing food suspensions for microbiological analysis. *J. Rapid Meth. Autom. Microbiol.*, 1998, **6**43-49.
32. LECLERCQ, A. et CATTEAU, M., 2002, Chapitre 11. Base de la microbiologie alimentaire pratique, *in* J. Freney, F. Renaud, C. Bollet and R. Leclercq, eds., *Actualité permanentes en bactériologie clinique*, Paris, p. 24.
33. RODRIGUES, U. M. et KROLL, R. G. Microcolony epifluorescence microscopy for selective enumeration of injured bacteria in frozen and heat-treated foods. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**(4), 778-787.
34. GARCIA-ARMESTO, M. R., OTERO, A., RUA, J., *et al.* Evaluation of the spiral plating system for the routine assessment of indicator microorganisms in raw ewe's milk. *J Food Prot*, 2002, **65**(8), 1281-1286.
35. CHAIN, V. S. et FUNG, D. Y. C. Comparison of Redigel, Petrifilm, Spiral Plate System, Isogrid, and aerobic plate count for determining the numbers of aerobic bacteria in selected food. *J. Food Protect.*, 1991, **54**208-211.
36. EDEL, W. et KAMPELMACHER, E. H. Comparative studies on the isolation of "sublethally injured" salmonellae in nine European laboratories. *Bull World Health Organ*, 1973, **48**(2), 167-174.
37. MORINIGO, M. A., MARTINEZ-MANZANARES, E., MUNOZ, A., *et al.* Evaluation of different plating media used in the isolation of salmonellas from environmental samples. *J Appl Bacteriol*, 1989, **66**(4), 353-360.
38. THOMASON, B. M., DODD, D. J. et CHERRY, W. B. Increased recovery of salmonellae from environmental samples enriched with buffered peptone water. *Appl Environ Microbiol*, 1977, **34**(3), 270-273.

39. MOSELEY, S. L., HUQ, I., ALIM, A. R., *et al.* Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by DNA colony hybridization. *J Infect Dis*, 1980, **142**(6), 892-898.
40. WIRTH, D. F. et PRATT, D. M. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982, **79**(22), 6999-7003.
41. FITTS, R., DIAMOND, M., HAMILTON, C., *et al.* DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp. in foods. *Appl Environ Microbiol*, 1983, **46**(5), 1146-1151.
42. KING, W., RAPOSA, S., WARSHAW, J., *et al.* A new colorimetric nucleic acid hybridization assay for *Listeria* in foods. *Int J Food Microbiol*, 1989, **8**(3), 225-232.
43. STEFFAN, R. J. et ATLAS, R. M. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**(9), 2185-2191.
44. SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, **230**(4732), 1350-1354.
45. ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Methods*, 2004, **56**(3), 297-314.
46. JI, N., PENG, B., WANG, G., *et al.* Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. *J Microbiol Methods*, 2004, **57**(3), 409-413.
47. MAROIS, C., SAVOYE, C., KOBISCH, M., *et al.* A reverse transcription-PCR assay to detect viable *Mycoplasma synoviae* in poultry environmental samples. *Vet Microbiol*, 2002, **89**(1), 17-28.
48. HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P. S., *et al.* Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, 1992, **10**(4), 413-417.
49. CHEN, W., MARTINEZ, G. et MULCHANDANI, A. Molecular beacons: a real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. *Anal Biochem*, 2000, **280**(1), 166-172.
50. FORTIN, N. Y., MULCHANDANI, A. et CHEN, W. Use of real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Anal Biochem*, 2001, **289**(2), 281-288.
51. WANG, X., JOTHIKUMAR, N. et GRIFFITHS, M. W. Enrichment and DNA extraction protocols for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria*

- monocytogenes in raw sausage meat with multiplex real-time PCR. *J Food Prot*, 2004, **67**(1), 189-192.
52. CHEUNG, P. Y., CHAN, C. W., WONG, W., *et al.* Evaluation of two real-time polymerase chain reaction pathogen detection kits for *Salmonella* spp. in food. *Lett Appl Microbiol*, 2004, **39**(6), 509-515.
 53. PAN, T. M. et LIU, Y. J. Identification of *Salmonella enteritidis* isolates by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction. *J Microbiol Immunol Infect*, 2002, **35**(3), 147-151.
 54. DEWETTINCK, T., HULSBOSCH, W., VAN HEGE, K., *et al.* Molecular fingerprinting of bacterial populations in groundwater and bottled mineral water. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**(3), 412-418.
 55. GEDDES, L. A. et BAKER, L. E., 1989, Chapitres 1 et 11, Principles of applied biomedical instrumentation, New York, John Wiley & Sons, p. 961.
 56. FIRSTENBERG-EDEN, R. et EDEN, G. *Impedance Microbiology*. New York: John Wiley, 1984, 170 p.
 57. STEWART, G. N. Researches on the circulation time in organs and on the influences which affect it. *J Physiol*, 1894, **XV**1-89.
 58. STEWART, G. N. Researches on circulation time and on the influences which affect it. IV. The output of the heart. *J Physiol*, 1897, **XXII**159-183.
 59. STEWART, G. N. The changes produced by the growth of bacteria in the molecular concentration and electrical conductivity of culture media. *J Experimental Medic*, 1898, **42**35-243.
 60. OKER-BLOM, M. Die elektrische Leitfähigkeit im dienste der Bakteriologie. *Zentralbl Bakteriol*, 1912, **65**382-389.
 61. PARSONS, L. B. et STURGES, W. S. The possibility of the conductivity method as applied to studies of bacterial metabolism. *J Bacteriol*, 1926, **11**177-188.
 62. PARSONS, L. B. et STURGES, W. S. Conductivity as applied to studies of bacterial metabolism. *J Bacteriol*, 1926, **11**267-272.
 63. PARSONS, L. B., DRAKE, E. T. et STURGES, W. S. A bacteriological conductivity culture cell and some of its applications. *J Am Chem Soc*, 1929, **51**166-171.
 64. ALLISON, J. B., ANDERSON, J. A. et COLE, W. H. The method of electrical conductivity in studies of bacterial metabolism. *J Bacteriol*, 1938, **36**571-586.
 65. MCPHILLIPS, J. et SNOW, N. Studies on milk with a new method of conductivity cell. *Australian J Dairy Technol*, 1958, **3**192-196.

66. UR, A. Determination of blood coagulation using impedance measurements. *Biomed Eng*, 1970, 5(7), 342-345.
67. UR, A. Changes in the electrical impedance of blood during coagulation. *Nature*, 1970, **226**(242), 269-270.
68. UR, A. Detection of clot retraction through changes of the electrical impedance of blood during coagulation. *Am J Clin Pathol*, 1971, **56**(6), 713-718.
69. FIRSTENBERG-EDEN, R. Rapid estimation of the number of microorganisms in raw meat by impedance measurement. *Food Technol*, 1983, 3764-70.
70. OWENS, J. D., THOMASON, D. S., THOMPSON, P. S., *et al.* Indirect conductimetry: a novel approach to the conductimetric enumeration of microbial populations. *Letters in Applied Microbiology*, 1989, 9245-249.
71. DÉZENCLOS, T., ASCON-CABRERA, M., ASCON, D., *et al.* Optimisation of the indirect impedancemetry technique; a handy technique for microbial growth measurement. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, **42**(2-3), 232-238.
72. NOBLE, P. A., DZIUBA, M. et ALBRITTON, W. L., 1992, Formulation of culture media for measuring capacitance changes during bacterial growth, American Society of Microbiology General Meeting, New Orleans, LA.
73. GNAN, S. et LUEDECKE, L. O. Impedance measurements in raw milk as an alternative to the standard plate count. *J Food Protection*, 1982, **45**(1), 4-7.
74. BOSSUYT, R. G. et WAES, G. M. Impedance measurements to detect post-pasteurization contamination of pasteurized milk. *J. Food Protect.*, 1983, **46**622-624.
75. MADDEN, R. H. et GILMOUR, A. Impedance as an alternative to MPN enumeration of coliforms in pasteurized milks. *Lett Appl Microbiol*, 1995, **21**(6), 387-388.
76. EVANS, H. A. V. A note on two uses for impedimetry in brewing microbiology. *J Applied Bacteriology*, 1982, 53423-426.
77. HENSCHKE, P. A. et THOMAS, D. S. Detection of wine yeast by electronic methods. *J Applied Bacteriology*, 1988, **64**123-133.
78. VAN SPREEKENS, K. J. A. et STEKELENBURG, F. K. Rapid estimation of the bacteriological quality of fresh fish by impedance measurements. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1986, **24**95-96.
79. CONNOLLY, P., BLOOMFIELD, S. F. et DENYER, S. P. The use of impedance for preservative efficacy testing of pharmaceuticals and cosmetic products. *J Appl Bacteriol*, 1994, **76**(1), 68-74.

80. SILVERMAN, M. P. et MUNOZ, E. F. Automated electrical impedance technique for rapid enumeration of fecal coliforms in effluents from sewage treatment plants. *Appl Environ Microbiol*, 1979, **37**(3), 521-526.
81. CADY, P., DUFOUR, S. W., LAWLESS, P., *et al.* Impedimetric screening for bacteriuria. *J Clin Microbiol*, 1978, **7**(3), 273-278.
82. BROWN, D. F., WARNER, M., TAYLOR, C. E., *et al.* Automated detection of micro-organisms in blood cultures by means of the Malthus Microbiological Growth Analyser. *J Clin Pathol*, 1984, **37**(1), 65-69.
83. BUCKLAND, A., KESSOCK-PHILIP, S. et BASCOMB, S. Early detection of bacterial growth in blood culture by impedance monitoring with a Bactometer model 32. *J Clin Pathol*, 1983, **36**(7), 823-828.
84. LAWLESS, P., DUFOUR, S. et CADY, P., 1973, Impedance changes in media as a method of identifying microorganisms, International Congress in Bacteriology, Tel Aviv, Israel.
85. SZIGETI, E. et FARKAS, J. Use of conductimetric technique for data capture in predictive microbiology. *Acta Alimentaria*, 2000, **29**307-314.
86. UR, A. et BROWN, D. F. Impedance monitoring of bacterial activity. *J Med Microbiol*, 1975, **8**(1), 19-28.
87. CADY, P., 1975, Rapid automated bacterial identification by impedance measurement, in C.-G. Heden and T. Illeni, eds., new approaches to the identification of microorganisms, New York, John Wiley, p. 73-99.
88. POWER, C. A., JOHNSON, R. P., MCEWEN, S. A., *et al.* Evaluation of the Reveal and SafePath rapid *Escherichia coli* O157 detection tests for use on bovine feces and carcasses. *J Food Prot*, 2000, **63**(7), 860-866.
89. LEA, T., VARTDAL, F., DAVIES, C., *et al.* Magnetic monosized polymer particles for fast and specific fractionation of human mononuclear cells. *Scand J Immunol*, 1985, **22**(2), 207-216.
90. SAFARIK, I., SAFARIKOVA, M. et FORSYTHE, S. J. The application of magnetic separations in applied microbiology. *J Appl Bacteriol*, 1995, **78**(6), 575-585.
91. RAMALHO, D., GELLI, D. S., LANDGRAF, M., *et al.* Detection of *Salmonella* in foods using Tecra *Salmonella* VIA and Tecra *Salmonella* UNIQUE rapid immunoassays and a cultural procedure. *J Food Prot*, 2002, **65**(3), 552-555.
92. COUSINS, C. M., PETTIPHER, G. L., MCKINNON, C. H., *et al.* A rapid method for counting bacteria in raw milk. *Dairy Ind. Int.*, 1979, **44**27-39.

93. PETTIPHER, G. L., MANSELL, R., MCKINNON, C. H., *et al.* Rapid membrane filtration epifluorescent microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk. *Appl Environ Microbiol*, 1980, **39**423-429.
94. HOBBIE, J. E., DALEY, R. J. et JASPER, S. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol*, 1977, **33**(5), 1225-1228.
95. PETTIPHER, G. L. et RODRIGUES, U. M. Rapid enumeration of microorganisms in foods by the direct epifluorescent filter technique. *Appl Environ Microbiol*, 1982, **44**(4), 809-813.
96. DING, T., BILITEWSKI, U., SCHMID, R. D., *et al.* Control of microbial activity by flow injection analysis during high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 1993, **27**(2), 143-157.
97. PINDER, A. C., PURDY, P. W., POULTER, S. A., *et al.* Validation of flow cytometry for rapid enumeration of bacterial concentrations in pure cultures. *J Appl Bacteriol*, 1990, **69**(1), 92-100.
98. DONNELLY, C. W. et BAIGENT, G. J. Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *Appl Environ Microbiol*, 1986, **52**(4), 689-695.
99. SHAPIRO, H. M. et NEBE-VON-CARON, G. Multiparameter flow cytometry of bacteria. *Methods Mol Biol*, 2004, **263**33-44.
100. ALLMAN, R., MANCHEE, R. et LLOYD, D., 1993, Flow cytometric analysis of heterogeneous bacterial populations, *in* D. Lloyd, ed., *Flow Cytometry in Microbiology*, Germany, Springer-Verlag London Limited, p. 27-47.
101. LEVIN, G. V., CHEN, C. S. et DAVIS, G. Development of the firefly bioluminescent assay for the rapid, quantitative detection of microbial contamination of water. AMRL-TR-67-71. *Amrl Tr*, 19671-73.
102. THORE, A., ANSEHN, S., LUNDIN, A., *et al.* Detection of bacteriuria by luciferase assay of adenosine triphosphate. *J Clin Microbiol*, 1975, **1**(1), 1-8.
103. FUNG, D. Y. C., 1997, Overview of rapid methods of microbiological analysis, *in* M. L. Tortorello and S. M. Gendel, eds., *Food microbiological analysis*, New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker, Inc., p. 1-25.
104. TAKAHASHI, T., NAKAKITA, Y., WATARI, J., *et al.* Application of a bioluminescence method for the beer industry: sensitivity of MicroStar-RMDS for detecting beer-spoilage bacteria. Rapid Microbe Detection System. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, **64**(5), 1032-1037.

105. ULITZUR, S. et KUHN, J., 1987, Introduction of lux genes into bacteria: a new approach for specific determination of bacteria and their antibiotic susceptibility, *Bioluminescence and Chemiluminescence: New Perspectives*, Bristol, Wiley, p. 463-472.
106. IVNITSKI, D., ABDEL-HAMID, I., ATANASOV, P., *et al.* Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosensors & Bioelectronics*, 1999, **14**, 599-624.
107. STEWART, G. S., JASSIM, S. A., DENYER, S. P., *et al.* The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within 4 h using bacteriophage amplification. *J Appl Microbiol*, 1998, **84**(5), 777-783.
108. BARTLETT, P. N., ELLIOTT, J. M. et GARDNER, J. W. Electronic noses and their application in the food industry. *Food Technol*, 1997, **51**(12), 44-48.
109. KESHRI, G., VOYSEY, P. et MAGAN, N. Early detection of spoilage moulds in bread using volatile production patterns and quantitative enzyme assays. *J Appl Microbiol*, 2002, **92**(1), 165-172.
110. DU, W. X., KIM, J., CORNELL, J. A., *et al.* Microbiological, sensory, and electronic nose evaluation of yellowfin tuna under various storage conditions. *J Food Prot*, 2001, **64**(12), 2027-2036.
111. BLIXT, Y. et BORCH, E. Using an electronic nose for determining the spoilage of vacuum-packaged beef. *Int J Food Microbiol*, 1999, **46**(2), 123-134.
112. JONSSON, A., WINQUIST, F., SCHNURER, J., *et al.* Electronic nose for microbial quality classification of grains. *Int J Food Microbiol*, 1997, **35**(2), 187-193.
113. GROW, A. E., WOOD, L. L., CLAYCOMB, J. L., *et al.* New biochip technology for label-free detection of pathogens and their toxins. *J Microbiol Methods*, 2003, **53**(2), 221-233.
114. VORA, G. J., MEADOR, C. E., STENGER, D. A., *et al.* Nucleic Acid amplification strategies for DNA microarray-based pathogen detection. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(5), 3047-3054.
115. FAGERSTAM, L. G., FROSTELL, A., KARLSSON, R., *et al.* Detection of antigen-antibody interactions by surface plasmon resonance. Application to epitope mapping. *J Mol Recognit*, 1990, **3**(5-6), 208-214.
116. BOKKEN, G. C., CORBEE, R. J., VAN KNAPEN, F., *et al.* Immunochemical detection of Salmonella group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **222**(1), 75-82.

117. LEONARD, P., HEARTY, S., QUINN, J., *et al.* A generic approach for the detection of whole *Listeria monocytogenes* cells in contaminated samples using surface plasmon resonance. *Biosens Bioelectron*, 2004, **19**(10), 1331-1335.
118. TURNER, M. W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol*, 2003, **40**(7), 423-429.
119. KENNEDY, J. F., PALVA, P. M. G., CORELLA, M. T. S., *et al.* Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, 1995, **26**219-230.
120. BOYD, W. C. et SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 1954, **119**419.
121. MURPHY, L. A. et GOLDSTEIN, I. J. Five alpha-D-galactopyranosyl-binding isoelectins from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. *J Biol Chem*, 1977, **252**(13), 4739-4742.
122. CUATRECASAS, P. et TELL, G. P. Insulin-like activity of concanavalin A and wheat germ agglutinin--direct interactions with insulin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1973, **70**(2), 485-489.
123. NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res*, 1960, **20**462-466.
124. BLAKE, D. A. et GOLDSTEIN, I. J. Resolution of carbohydrates by lectin affinity chromatography. *Methods Enzymol*, 1982, **83**127-132.
125. GERFEN, C. R. et SAWCHENKO, P. E. An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L). *Brain Res*, 1984, **290**(2), 219-238.
126. REISNER, Y. et SHARON, N. Fractionation of subpopulations of mouse and human lymphocytes by peanut agglutinin or soybean agglutinin. *Methods Enzymol*, 1984, **108**168-179.
127. RHODES, J. M. et MILTON, J. D. *Lectin Methods and Protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1998, 616 p.
128. SUMNER, J. B. et HOWELL, S. F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. *Journal of Bacteriology*, 1936, **32**227-237.
129. DOYLE, R. J. et BIRDSELL, D. C. Interaction of concanavalin A with the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1972, **109**(2), 652-658.
130. COLE, H. B., EZZELL, J. W., JR., KELLER, K. F., *et al.* Differentiation of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species by lectins. *J Clin Microbiol*, 1984, **19**(1), 48-53.

131. GRAHAM, K., KELLER, K., EZZELL, J., *et al.* Enzyme-linked lectinosorbent assay (ELLA) for detecting *Bacillus anthracis*. *Eur J Clin Microbiol*, 1984, **3**(3), 210-212.
132. DELUCCA, A. J., 2ND. Lectin grouping of *Bacillus thuringiensis* serovars. *Can J Microbiol*, 1984, **30**(9), 1100-1104.
133. REEDER, W. J. et EKSTEDT, R. D. Study of the interaction of concanavalin A with staphylococcal teichoic acids. *J Immunol*, 1971, **106**(2), 334-340.
134. JARLOV, J. O., HANSEN, J. E., ROSDAHL, V. T., *et al.* The typing of *Staphylococcus epidermidis* by a lectin-binding assay. *J Med Microbiol*, 1992, **37**(3), 195-200.
135. GILBRIDE, K. J. et PISTOLE, T. G. Isolation and characterization of a bacterial agglutinin in the serum of *Limulus polyphemus*. *Prog Clin Biol Res*, 1979, **29**525-535.
136. KOHLER, W. et PROKOP, O. [Agglutination of streptococci of the group C by an agglutinin from *Helix pomatia*]. *Z Immunitätsforsch Allerg Klin Immunol*, 1967, **133**(1), 50-53.
137. KOHLER, W. et NAGAI, T. Reactions of the lectin anti-AHP from the edible snail *Helix pomatia* with N-acetyl-D-galactosamine of streptococci. *Kitasato Arch Exp Med*, 1989, **62**(2-3), 107-113.
138. JARLOV, J. O., ROSDAHL, V. T., YEO, M., *et al.* Lectin typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Singapore, England and Wales, and Denmark. *J Med Microbiol*, 1993, **39**(4), 305-309.
139. DAVIDSON, S. K., KELLER, K. F. et DOYLE, R. J. Differentiation of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci by lectins and plant agglutinins. *J Clin Microbiol*, 1982, **15**(4), 547-553.
140. JONES, J. W. Interaction of coagulase negative staphylococci with lectins. *J Clin Pathol*, 1993, **46**(8), 761-763.
141. STAAT, R. H., DOYLE, R. J., LANGLEY, S. D., *et al.* Modification of in vitro adherence of *Streptococcus mutans* by plant lectins. *Adv Exp Med Biol*, 1978, **107**639-647.
142. LEE, W., DE LA BARCA, A. M., DRAKE, D., *et al.* Lectin-oral streptococci interactions. *J Med Microbiol*, 1998, **47**(1), 29-37.
143. WAGNER, M. Interaction of wheat-germ agglutinin with streptococci and streptococcal cell wall polymers. *Immunobiology*, 1979, **156**(1-2), 57-64.
144. KELLENS, J. T., JACOBS, J. A., PEUMANS, W. J., *et al.* The agglutination of beta-haemolytic streptococci by lectins. *J Med Microbiol*, 1993, **39**(6), 440-445.

145. HOLM, S. E., BERGHOLM, A. M., WAGNER, B., *et al.* A sialic-acid-specific lectin from *Cepaea hortensis* that promotes phagocytosis of a group-B, type-Ia, streptococcal strain. *J Med Microbiol*, 1985, **19**(3), 317-323.
146. SLIFKIN, M. et CUMBIE, R. Identification of group B streptococcal antigen with lectin-bound polystyrene particles. *J Clin Microbiol*, 1987, **25**(7), 1172-1175.
147. KOHLER, W. et PROKOP, O. [Agglutination experiments with streptococci with the phytagglutinin of *Dolichos biflorus*]. *Z Immunitatsforsch Allerg Klin Immunol*, 1967, **133**(2), 171-175.
148. PROKOP, O. et KOHLER, W. [Agglutination reactions of micro-organisms with *Helix pomatia* protein gland extract. (Anti-Ahel-agglutination)]. *Z Immunitatsforsch Allerg Klin Immunol*, 1967, **133**(2), 176-179.
149. OTTENSOOSER, F., NAKAMIZO, Y., SATO, M., *et al.* Lectins detecting group C streptococci. *Infect Immun*, 1974, **9**(5), 971-973.
150. WAGNER, M. Agglutination of bacteria by a sialic acid-specific lectin of the snail *Cepaea hortensis*. *Acta Histochem*, 1982, **71**(1), 35-39.
151. SLIFKIN, M. et GIL, G. M. Identification of group C streptococcal antigen extracts with lectin-bound polystyrene particles. *J Clin Microbiol*, 1984, **19**(1), 83-84.
152. SLIFKIN, M. et GIL, G. M. Rapid biochemical tests for the identification of groups A, B, C, F, and G streptococci from throat cultures. *J Clin Microbiol*, 1983, **18**(1), 29-32.
153. KELLENS, J. T., JACOBS, J. A., PEUMANS, W. J., *et al.* Agglutination of "Streptococcus milleri" by lectins. *J Med Microbiol*, 1994, **41**(1), 14-19.
154. SLIFKIN, M. et DOYLE, R. J. Lectins and their application to clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 1990, **3**(3), 197-218.
155. FACINELLI, B., GIOVANETTI, E., CASOLARI, C., *et al.* Interactions with lectins and agglutination profiles of clinical, food, and environmental isolates of *Listeria*. *J Clin Microbiol*, 1994, **32**(12), 2929-2935.
156. GOLDSTEIN, I. J. et STAUB, A. M. Interaction of concanavalin A with polysaccharides of *Salmonellae*. *Immunochemistry*, 1970, **7**(3), 315-319.
157. ALLEN, P. Z. Interaction of *Salmonella telaviv* with *Maclura pomifera* lectin. *Infect Immun*, 1985, **47**(1), 90-93.
158. DOYLE, R. J., WOODSIDE, E. E. et FISHEL, C. W. Protein-polyelectrolyte interactions. The concanavalin A precipitin reaction with polyelectrolytes and polysaccharide derivatives. *Biochem J*, 1968, **106**(1), 35-40.

159. MITRA, A., GUHA, A. K. et CHATTERJEE, B. P. Typing of *Shigella dysenteriae* strains of different serogroups by lectins. *Zentralbl Bakteriol*, 1994, **281**(1), 55-60.
160. LE MINOR, L., TOURNIER, P. et CHALON, A. M. [The agglutination by concanavalin A of certain gram negative bacilli. A study into the relationship with the somatic antigens of *Salmonella* serotypes (author's transl)]. *Ann Microbiol (Paris)*, 1973, **124A**(4), 467-476.
161. MCSWEEGAN, E. F. et PISTOLE, T. G. Interaction of the lectin limulin with capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* and *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982, **106**(4), 1390-1397.
162. UPPAL, T. B. Use of Litchi chinensis lectins (agglutinins) in diagnostic microbiology. *J Pak Med Assoc*, 1985, **35**(4), 110-111.
163. PISTOLE, T. G. Bacterial agglutinins from *Limulus polyphemus*--an overview. *Prog Clin Biol Res*, 1979, **29**547-553.
164. MANGIA, A. H., BERGTER, E. B., TEIXEIRA, L. M., *et al.* A preliminary investigation on the chemical composition of the cell surface of five enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1999, **94**(4), 513-518.
165. RODRIGUEZ-SANCHEZ, L., SALAZAR-GOMEZ, G., MESTA-HOWARD, A. M., *et al.* [Classification of *Klebsiella* strains with lectins]. *Rev Latinoam Microbiol*, 1995, **37**(1), 11-17.
166. CHATTERJEE, B. P., GUHA, A. K., PAL, R., *et al.* Lectin typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains of different serogroups, Habs and Fisher types. *Zentralbl Bakteriol*, 1989, **271**(3), 364-371.
167. CONNELLY, M. C., STEIN, D. C., YOUNG, F. E., *et al.* Interaction with lectins and differential wheat germ agglutinin binding of pyocin 103-sensitive and -resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol*, 1981, **148**(3), 796-803.
168. ALLEN, P. Z., CONNELLY, M. C. et APICELLA, M. A. Interaction of lectins with *Neisseria gonorrhoeae*. *Can J Microbiol*, 1980, **26**(4), 468-474.
169. CURTIS, G. D. et SLACK, M. P. Wheat-germ agglutination of *Neisseria gonorrhoeae*. A laboratory investigation. *Br J Vener Dis*, 1981, **57**(4), 253-255.
170. DOYLE, R. J., NEDJAT-HAIEM, F., KELLER, K. F., *et al.* Diagnostic value of interactions between members of the family *Neisseriaceae* and lectins. *J Clin Microbiol*, 1984, **19**(3), 383-387.

171. SCHAEFER, R. L., KELLER, K. F. et DOYLE, R. J. Lectins in diagnostic microbiology: use of wheat germ agglutinin for laboratory identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol*, 1979, **10**(5), 669-672.
172. SCHALLA, W. O., RICE, R. J., BIDDLE, J. W., *et al.* Lectin characterization of gonococci from an outbreak caused by penicillin-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol*, 1985, **22**(4), 481-483.
173. SCHALLA, W. O., WHITTINGTON, W. L., RICE, R. J., *et al.* Epidemiological characterization of *Neisseria gonorrhoeae* by lectins. *J Clin Microbiol*, 1985, **22**(3), 379-382.
174. VAZQUEZ, J. A. et BERRON, S. Lectins agglutination test as an epidemiological marker for *Neisseria gonorrhoeae*. *Genitourin Med*, 1990, **66**(4), 302.
175. MOYES, A. et YOUNG, H. An analysis of lectin agglutination as a means of subdividing gonococcal serovars. *J Med Microbiol*, 1992, **37**(1), 51-55.
176. MOYES, A. et YOUNG, H. Typing of *Neisseria gonorrhoeae* by auxotype, serovar and lectin agglutination. *Br J Biomed Sci*, 1993, **50**(4), 295-300.
177. FRASCH, C. E. Role of lipopolysaccharide in wheat germ agglutinin-mediated agglutination of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol*, 1980, **12**(4), 498-501.
178. CORBEL, M. J., COCKREM, D. S. et BREWER, R. A. Differentiation of smooth and rough *Brucella* strains by lectins. *Vet Rec*, 1983, **113**(12), 261-262.
179. WONG, K. H., SKELTON, S. K. et FEELEY, J. C. Interaction of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* with lectins and blood group antibodies. *J Clin Microbiol*, 1985, **22**(1), 134-135.
180. O'SULLIVAN, N., BENJAMIN, J. et SKIRROW, M. B. Lectin typing of *Campylobacter* isolates. *J Clin Pathol*, 1990, **43**(11), 957-960.
181. KUROKI, S., SAIDA, T., NUKINA, M., *et al.* *Campylobacter jejuni* strains from patients with Guillain-Barre syndrome belong mostly to Penner serogroup 19 and contain beta-N-acetylglucosamine residues. *Ann Neurol*, 1993, **33**(3), 243-247.
182. KORTING, H. C., ABECK, D., JOHNSON, A. P., *et al.* Lectin typing of *Haemophilus ducreyi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1988, **7**(5), 678-680.
183. CORBEL, M. J. et BREWER, R. A. Interaction of *Haemophilus equigenitalis* (contagious equine metritis organism) with lectins. *Vet Rec*, 1983, **112**(9), 202.
184. CRAFT, D. L., CHENGAPPA, M. M. et CARTER, G. R. Differentiation of *Pasteurella haemolytic* biotypes A and T with lectins. *Vet Rec*, 1987, **120**(16), 393.

185. DOYLE, R. J., NEDJAT-HAIEM, F., MILLER, R. D., *et al.* Interaction between plant agglutinins and *Legionella* species. *J Clin Microbiol*, 1982, **15**(5), 973-975.
186. SIRIDEWA, K., FROMAN, G., HAMMAR, L., *et al.* Characterization of glycoproteins from *Chlamydia trachomatis* using lectins. *Apmis*, 1993, **101**(11), 851-857.
187. GOLDSTEIN, I. J. et MISAKI, A. Interaction of concanavalin A with an arabinogalactan from the cell wall of *Mycobacterium bovis*. *J Bacteriol*, 1970, **103**(2), 422-425.
188. JACKSON, M., CHAN, R., MATOBA, A. Y., *et al.* The use of fluorescein-conjugated lectins for visualizing atypical mycobacteria. *Arch Ophthalmol*, 1989, **107**(8), 1206-1209.
189. ETZLER, M. E., 1986, Distribution and function of plant lectins, *in* I. E. Liener, N. Sharon and I. J. Goldstein, eds., *The lectins, properties, functions, and applications in biology and medicine*, Orlando, Fla, Academic Press, Inc., p. 371-435.
190. LIS, H. et SHARON, N., 1986, Application of lectins, *in* I. E. Liener, N. Sharon and I. J. Goldstein, eds., *The lectins, properties, functions, and applications in biology and medicine*, Orlando, Fla, Academic Press, Inc., p. 293-370.
191. LIS, H. et SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. *Annu Rev Biochem*, 1986, **55**35-67.
192. NICOLSON, G. L. The interactions of lectins with animal cell surfaces. *Int Rev Cytol*, 1974, **39**89-190.
193. AYOUBA, A., 1992, Interaction des lectines végétales avec les constituants du peptidoglycane bactérien, Département de Biologie Structurale et Ingénierie des Protéines, Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Fondamentales du CNRS, Toulouse, Université Paul Sabatier de Toulouse - Faculté des Sciences Pharmaceutiques, p. 111.
194. SIZEMORE, R. K., CALDWELL, J. J. et KENDRICK, A. S. Alternate gram staining technique using a fluorescent lectin. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**(7), 2245-2247.
195. HOLM, C. et JESPERSEN, L. A flow-cytometric gram-staining technique for milk-associated bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(5), 2857-2863.
196. THOMAS, V. L., SANFORD, B. A., MORENO, R., *et al.* Enzyme-linked lectinsorbent assay measures N-acetyl-D-glucosamine in matrix of biofilm produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Curr Microbiol*, 1997, **35**(4), 249-254.

197. STRATHMANN, M., WINGENDER, J. et FLEMMING, H. C. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods*, 2002, **50**(3), 237-248.
198. PATCHETT, R. A., KELLY, A. F. et KROLL, R. G. The adsorption of bacteria to immobilized lectins. *J Appl Bacteriol*, 1991, **71**(3), 277-284.
199. PAYNE, M. J., CAMPBELL, S., PATCHETT, R. A., *et al.* The use of immobilized lectins in the separation of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria* and *Salmonella* spp. from pure cultures and foods. *J Appl Bacteriol*, 1992, **73**(1), 41-52.
200. PAYNE, M. J., CAMPBELL, S. et KROLL, R. G. Separation of bacteria using agglutinins isolated from invertebrates. *J Appl Bacteriol*, 1993, **74**(3), 276-283.
201. GRANT, K. A., DICKINSON, J. H., PAYNE, M. J., *et al.* Use of the polymerase chain reaction and 16S rRNA sequences for the rapid detection of *Brochothrix* spp. in foods. *J Appl Bacteriol*, 1993, **74**(3), 260-267.
202. PAYNE, M. J., CAMPBELL, S. et KROLL, R. G. Lectin-magnetic separation can enhance methods for the detection of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteridis* and *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 1993, **10**75-83.
203. KROLL, R. G., GILMOUR, A. et SUSSMAN, M. *New techniques in food and beverage microbiology*. Oxford: Blackwell Scientific publications, 1993, 300 p.
204. PORTER, J., PICKUP, R. et EDWARDS, C. Evaluation of flow cytometric methods for the detection and viability assessment of bacteria from soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1997, **29**(1), 91-100.
205. PORTER, J., ROBINSON, J., PICKUP, R., *et al.* An evaluation of lectin-mediated magnetic bead cell sorting for the targeted separation of enteric bacteria. *J Appl Microbiol*, 1998, **84**(5), 722-732.
206. PORTER, J. et PICKUP, R. Separation of natural populations of coliform bacteria from freshwater and sewage by magnetic-bead cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*, 1998, **33**221-226.
207. SAFARIK, I. et SAFARIKOVA, M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999, **722**(1-2), 33-53.
208. C.N.I.E.L. *L'économie laitière en chiffres*. Paris: C.N.I.E.L., 2000, 197 p.
209. BOUCKAERT, J., HAMELRYCK, T. W., WYNS, L., *et al.* The crystal structures of Man(α 1-3)Man(α 1-O)Me and Man(α 1-6)Man(α 1-O)Me in complex with concanavalin A. *J Biol Chem*, 1999, **274**(41), 29188-29195.

210. FRANCO-FRAGUAS, L., CARLSSON, J. et BATISTA-VIERA, F. The adsorption/desorption behaviour of horseradish peroxidase and porcine thyroglobulin on concavalin 1-sepharose with different ligand densities. *IJBC*, 2000, **5**(4), 255-265.
211. BOROWSKI, R. S., STOCK, L. M. et SCHILLER, N. L. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for studying *Pseudomonas aeruginosa* cell surface antigens. *J Clin Microbiol*, 1984, **19**(6), 736-741.
212. PETERS, H., JURIS, M., JANN, B., *et al.* Monoclonal antibodies to enterobacterial common antigen and to *Escherichia coli* lipopolysaccharide outer core: demonstration of an antigenic determinant shared by enterobacterial common antigen and *E. coli* K5 capsular polysaccharide. *Infect Immun*, 1985, **50**(2), 459-466.
213. SINGH, J. S. et DOYLE, R. J. Salt-enhanced enzyme-linked lectinosorbent assay. *Journal of Microbiological Methods*, 1993, **17**61-65.
214. SIEGEL, S. et CASTELLAN, N. J. *Nonparametric statistics for behavioural science*. 1988, 330 p.
215. SWEET, S., WALLACE, T. et SAMARANAYAKE, L. Determination of the cell surface hydrophobicity of oral bacteria using a modified hydrocarbon adherence method. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1987, **48**159-163.
216. ROSENBERG, M., GUTNIK, D. et ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1980, **9**29-33.
217. PEMBREY, R. S., MARSHALL, K. C. et SCHNEIDER, R. P. Cell surface analysis techniques: What do cell preparation protocols do to cell surface properties? *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(7), 2877-2894.
218. STROGYN, A. Equations for calculating the dielectric content of saline water. *IEEE Trans. Microwave Theory and Tech*, 1971, **19**733-736.

Annexes

Annexe 1. Rapport technique Microqual – Description of the ZENIX board

I- Brief operating instructions

The ZENIX board generates sinus output signals in the frequency range from 2 kHz to 2 MHz. The input signal coming from the eddy current coils is demodulated digitally using sinus and cosinus signals inside the system.

The following functions (Fig. 74) as a result of the synchronous demodulation of the ZENIX board are available:

- X=F(t)** sinus component as function of time
- Y=F(t)** cosinus component as function of time
- Mod = F(t)** modulation of X and Y as function of time
- Arg=F(t)** argument of X and Y as function of time
- Y=f(X)** Y as function of X

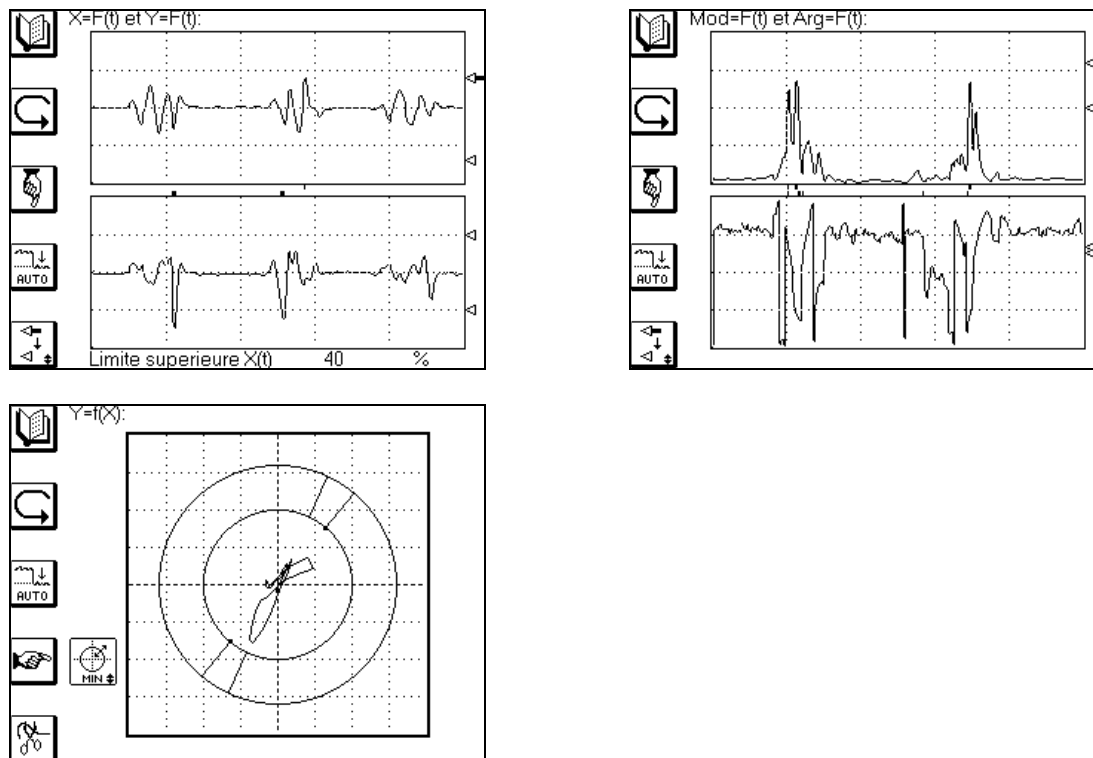


Figure 74. Scheme of the functions of the ZENIX board.

The measurement values, which can be adjusted, are as follows (see Figs. 75-83):

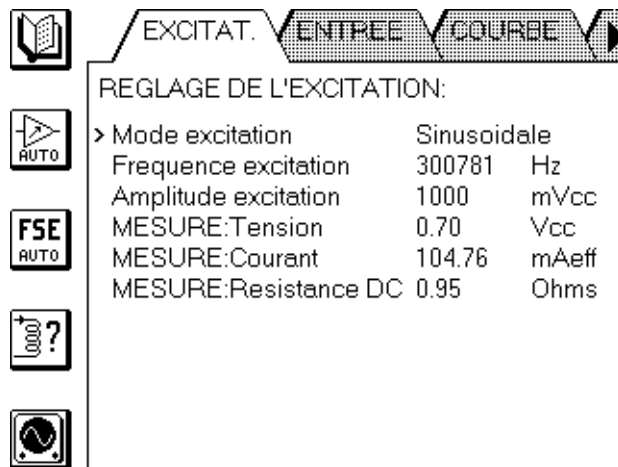


Figure 75. Parameter of the excitation signal: mode, frequency, and amplitude. The real output signal (voltage, current, and resistor) can be measured.

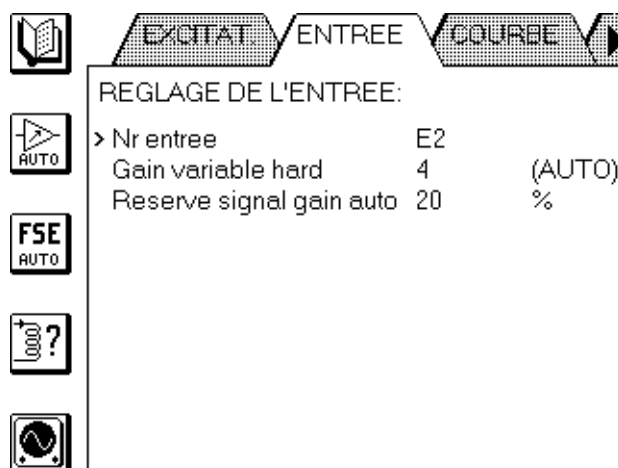


Figure 76. Parameter of the input signal: input (E1, E2, or E2-E1), hard gain, and signal reserve.

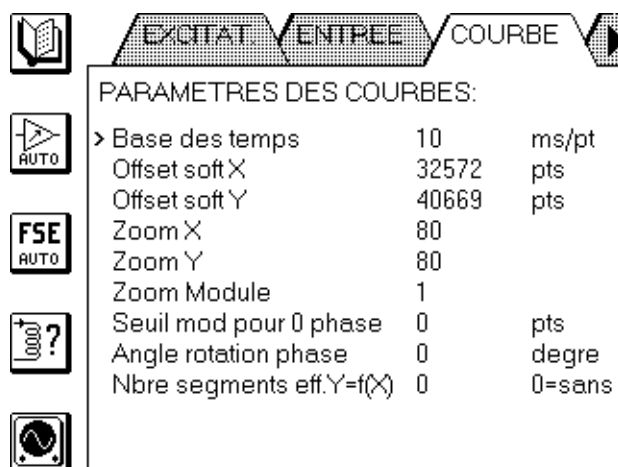


Figure 77. Representation of the signals: time base, offsets, zooms, threshold value of zero phase, phase degree, and automatic deletion of curve $Y=f(X)$.

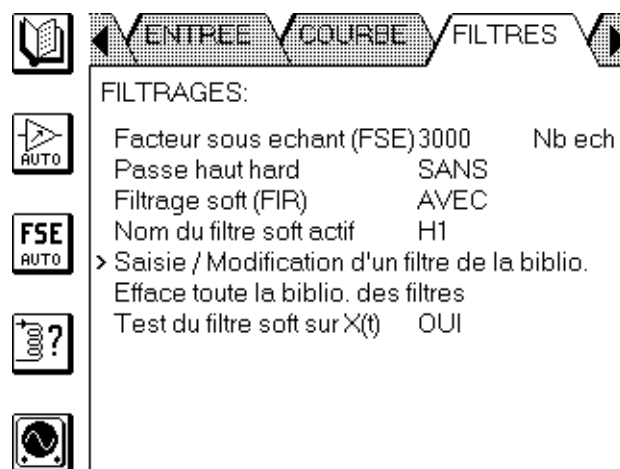


Figure 78. Parameters of filter: FSE (presentation parameter $FSE = \text{frequency [Hz]} * \text{time base [ms]} / 1000$), high-pass filter, and software filter library.

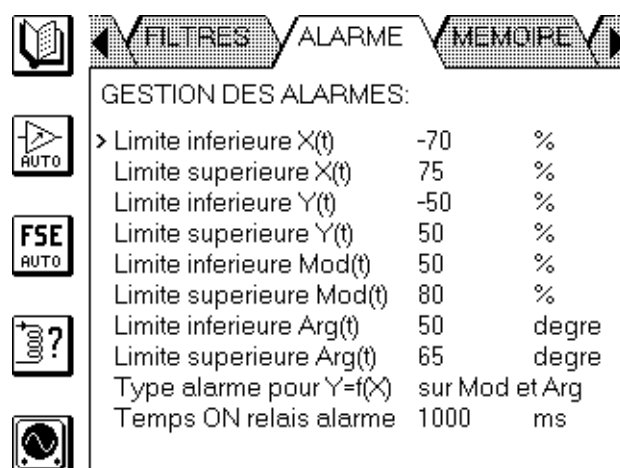


Figure 79. Parameter of alarms: upper and lower limits, type of alarm, and ON-time of alarm relays.

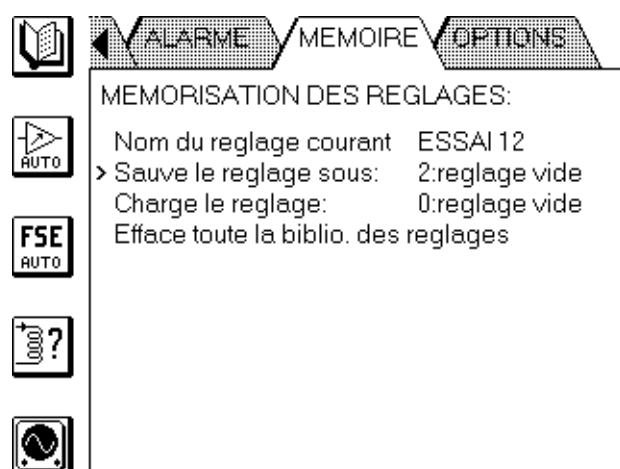


Figure 80. Save and load of the adjustments.

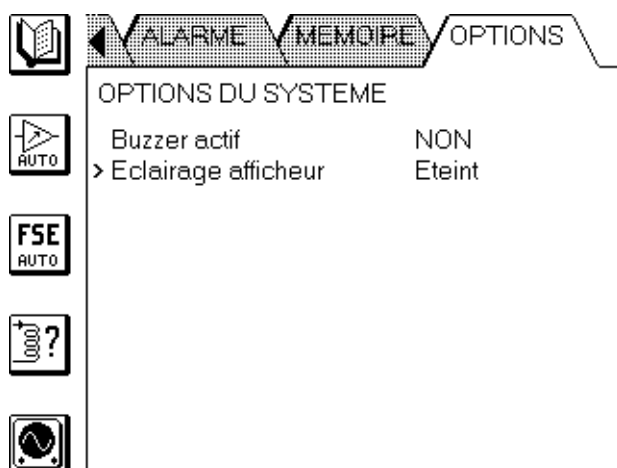


Figure 81. Additional options: buzzer and display light (on/off).

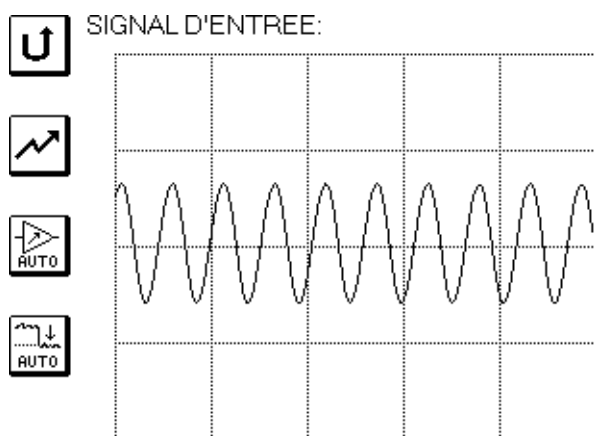


Figure 82. Operating mode: Oscilloscope.

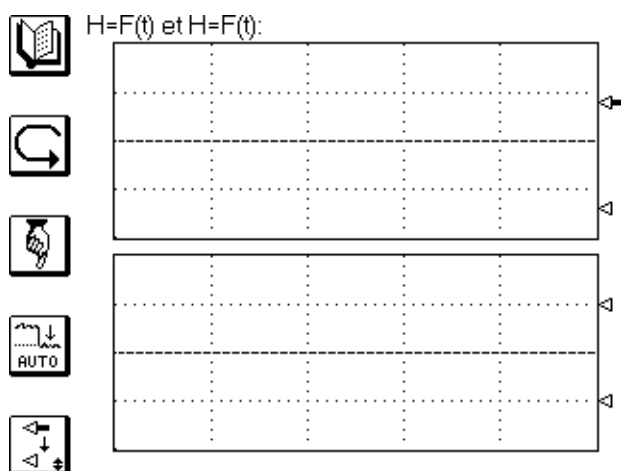


Figure 83. Operating mode: direct voltage.

II- Brief summary of the software PCDEMOD

The software PCDEMOD, written by SECAD, allows the adjustments of the parameter of the ZENIX board and the data acquisition on a computer via the serial interface.

The following adjustments can be made (see Figs. 84-89):

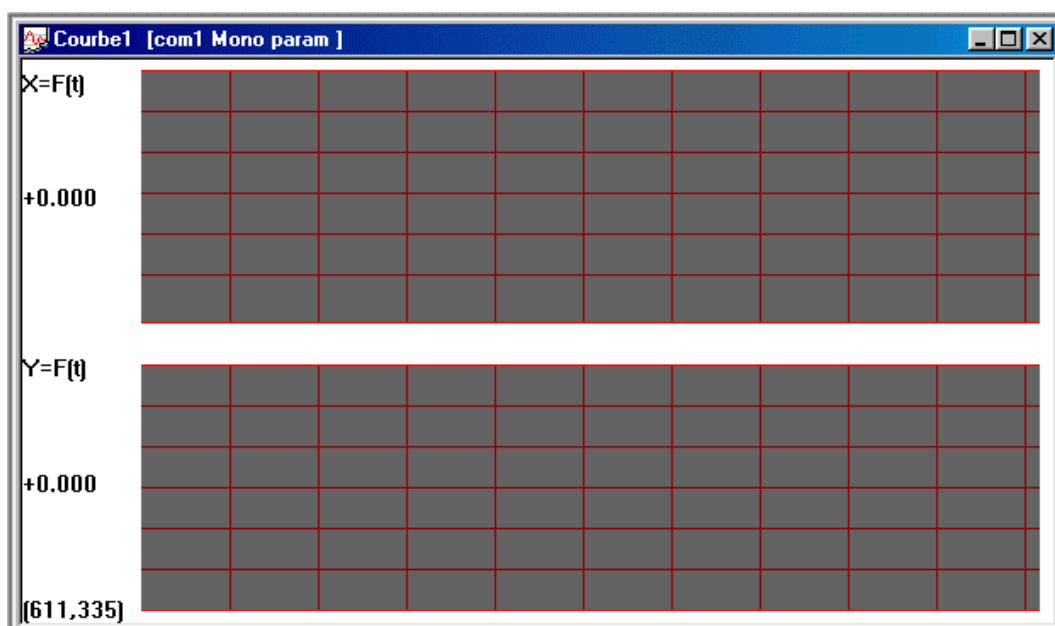


Figure 84. Selection of the curve to be displayed: $X=F(t)$ and $Y=F(t)$, $MOD=F(t)$ and $ARG=F(t)$, and $Y=f(X)$.

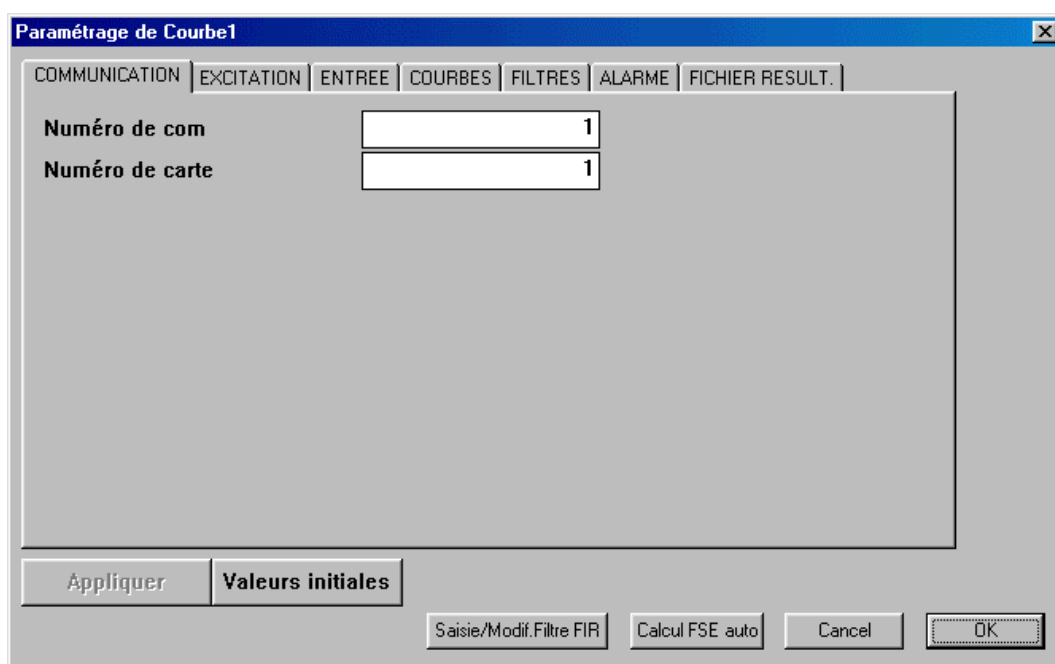


Figure 85. Adjustments of the parameter of the ZENIX board as described in the section “Brief operating instructions”.

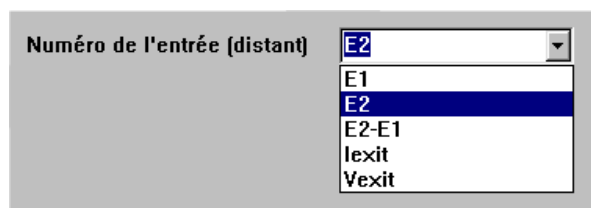


Figure 86. Adjustment of the input signal: E1, E2, E2-E1, and voltage and current of the excitation signal.

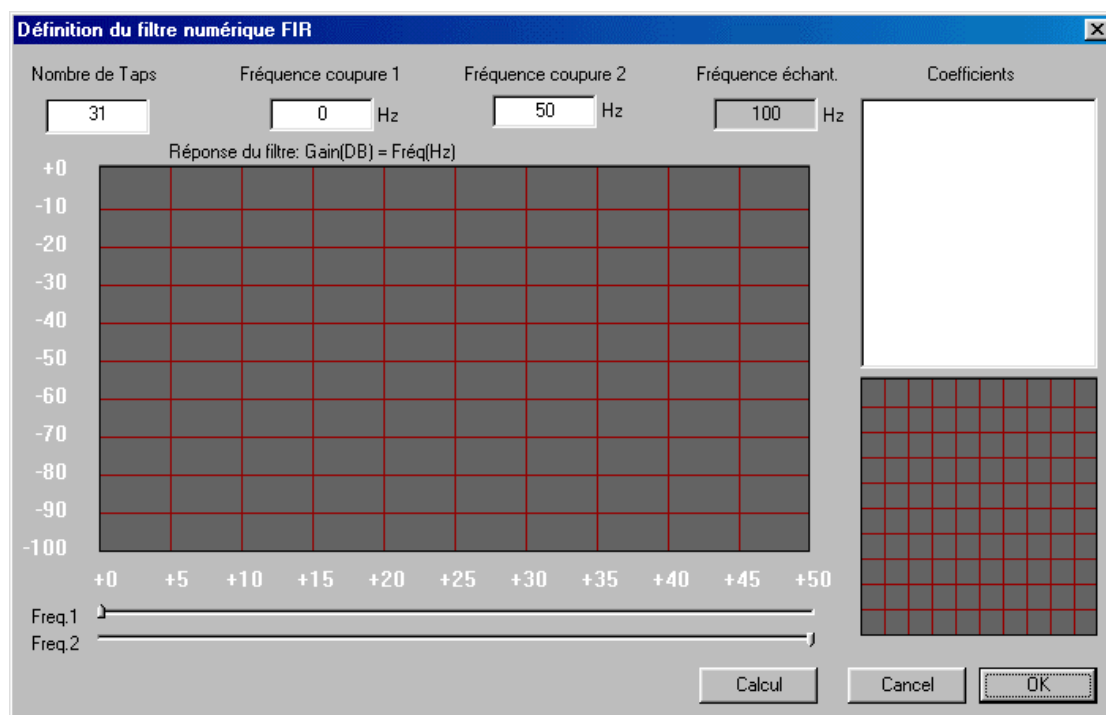


Figure 87. Adjustment of the numerical filters.

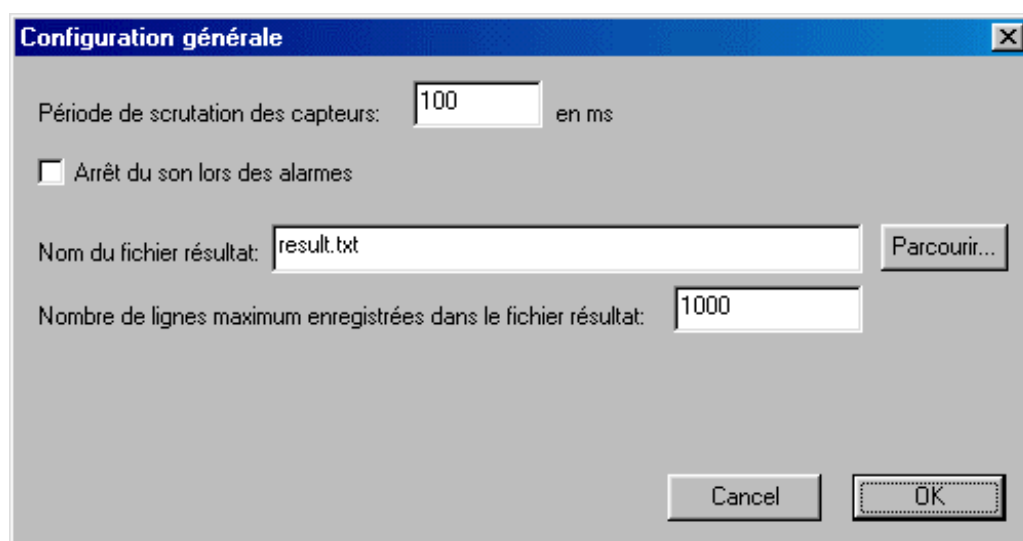


Figure 88. General adjustments: Interval of saving the measurement values, name of the file, number of values to be saved.

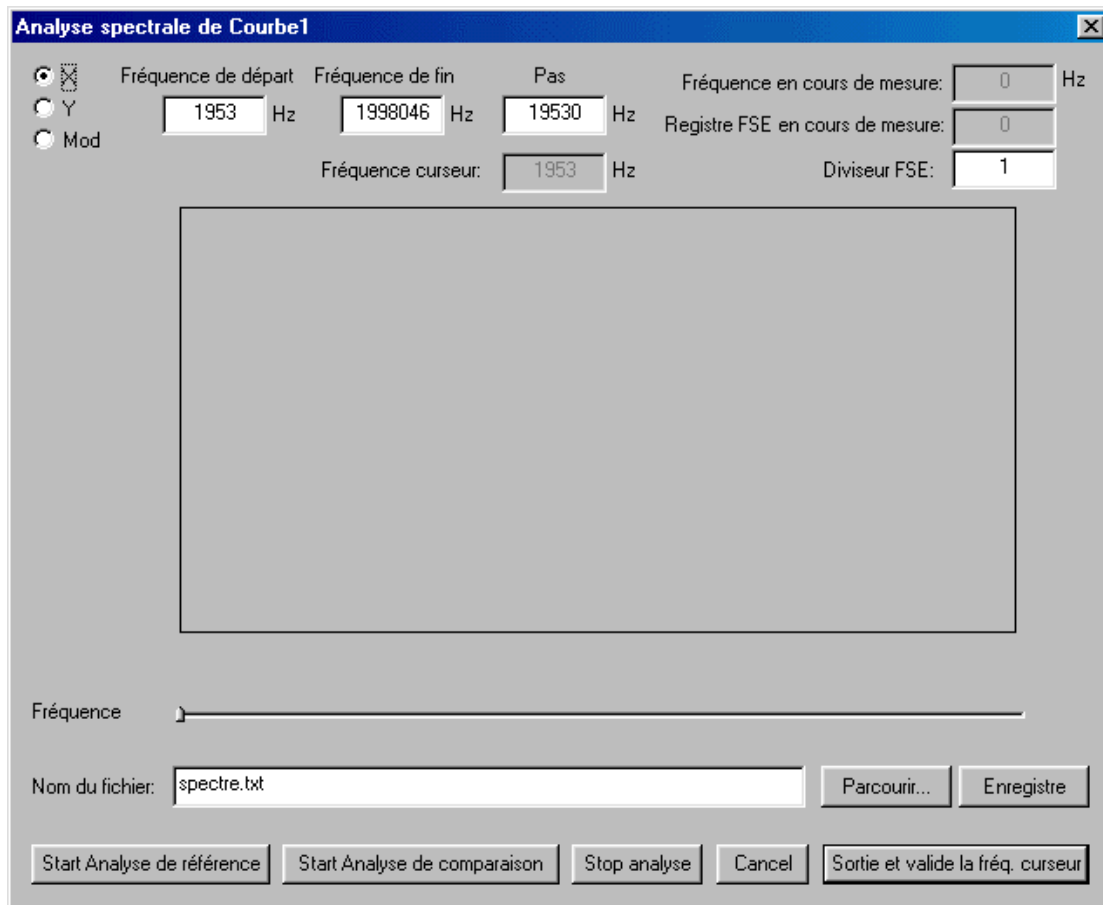


Figure 89. Spectrum analysis: The excitation frequency sweeps from the lower to the upper limit, and the measurement values will be displayed and saved. The spectra can be evaluated regarding maxima and minima as well as overdriving.

III- Technical characteristics of the ZENIX board

Central unit:

- 32 bits microprocessor « COLDFIRE », clocked at 32MHz
- 512Ko FLASH EPROM with possibility to program through the COM
- 512Ko SRAM without backup
- 512Ko SRAM with battery backup
- Background mode connector for debugging

Peripherals

- Graphic LCD display interface 320x240 pixels enlightened
- Keyboard interface 24 Keys + 1 « ON » key for powering the board

- Serial communication interface (COM) configurable per module in RS232, RS422, RS485 or passive loops of current. Programmable baudrate : maximum 115200 baud.
- output relays : normally-open contacts 50V 500mA
- Timekeeper
- Buzzer
- Display back light control
- Dynamic power supply control, for reduce the losses of the excitation amplifier

Sensor excitation signal :

- Sinusoidal signal (12 bits digital reconstitution with 8MHz sampling frequency)
- Programmable frequency from 1953Hz to 2MHz (1023 steps)
- Programmable amplitude peak-peak from 0V to 16V (256 steps)
- Output current max: 0,5A RMS

Sensor conditioning signal:

- identical inputs E1 or E2, with possibility of carrying out E1-E2
- Differential pre amplifier on each input with fixed gain of 11
- Input impedance : 11K Ω
- Variable gains (after preamplifier) adjustable by software from 1 to 1936, by steps distributed in a non-linear way (limitation of the gain in high frequencies)
- Automatic hardware offset compensation
- Hardware high pass filter, 2Hz cut-off, enable by software
- 12bits analogic/numeric conversion at 8Mhz sampling frequency. (the full scale amplitude on the input converter is 2V peak-peak)
- Output voltage for sensor supply adjustable by an on board potentiometer from 5 to 9V at 100mA DC max

FPGA, loading by software, fulfilling the following functions:

- Generator of numerical sine and cosine on 12 bits at programmable frequencies
- Entirely numerical synchronous demodulation: sine and cosine multipliers on 12bits and integral filters with 16 bits output. Results of x(t) and y(t) signals located in two 16 bits registers.
- A FIFO of 256x12 bits samples allow direct acquisitions of the signal
- Logic management of the board

Power Supply (separated board FUSIXAL):

- Input swing 10 to 15VDC, 2A max

Functions Added by DEMOD software:

- Software calculation of module and argument on X and Y: $MOD=f(t)$ et $ARG=f(t)$
- Displaying the graphic curves $X=f(t)$, $Y=f(t)$, $MOD=f(t)$, $ARG=f(t)$, et $Y=f(X)$ with adjustable time base, zoom and offset. Maximum time base = 1KHz.

- Programmable phase rotations from 0 to 360°
- Programmable universal numerical filter (FIR type) on X and Y, up to 128 taps, entirely configurable
- Programmable alarms with triggering output relay
- Automatic adjustments of the hardware gain and offset according to the input signal
- Oscilloscope mode with manual trigger and fixed time base

IV- Measurement set-up used

The measurement set-up used is schematically shown in Fig. 90. The ZENIX board is connected with a PC via an RS 232 cable. The software PCDEMOD is running on the PC for the parameter adjustment and data acquisition. The measurement chamber is located in a water bath. Temperature is kept constant and recorded with a thermometer.

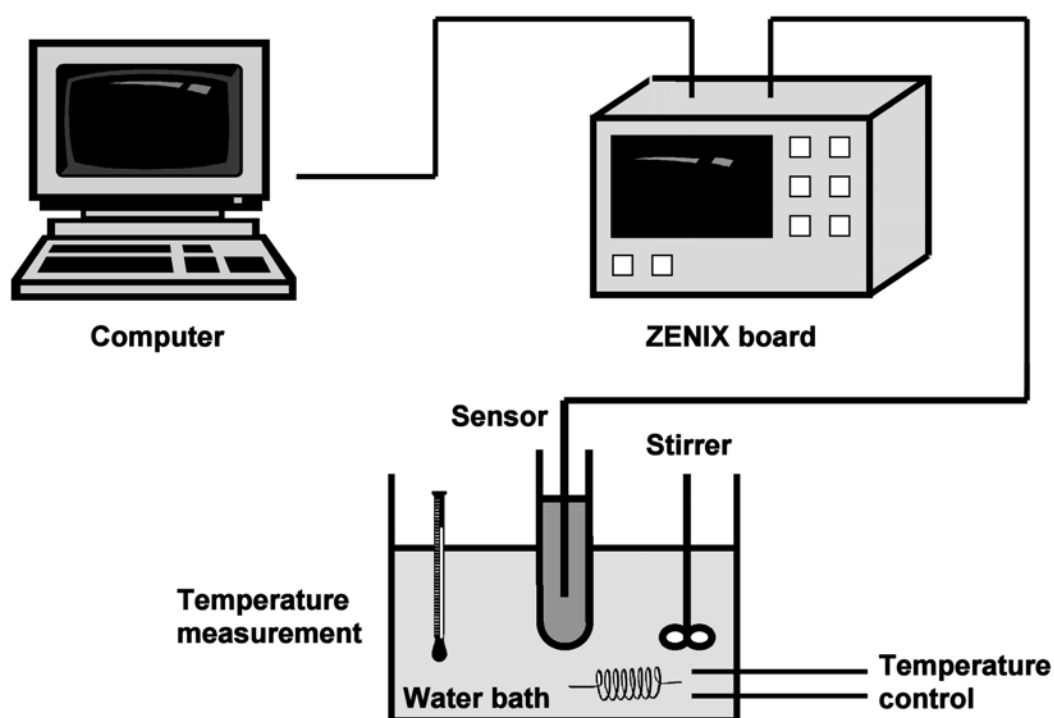


Figure 90. Scheme of the measurement equipment.

V- Development of adapted eddy current sensors

In order to obtain sensors, which are sensitive enough to detect the small differences in the electromagnetic properties of milk (different fat contents and dilution with water), various coil arrangements were developed and tested.

Figure 15. Driver pickup sensor

Pickup sensors were developed having one emitter coil and two receiver coils. By using coils as receiver, which are connected in differential way (winded in clockwise and counter-clockwise around a core), disturbances resulting from the electrical fields of other equipment are minimised. External sensors, which allow non-invasive measurements, and intrusive sensors, which are more sensitive, are developed.



Figure 91. Scheme of the emitter coil E (left) and the receiver coils R1 and R2 connected in differential way.

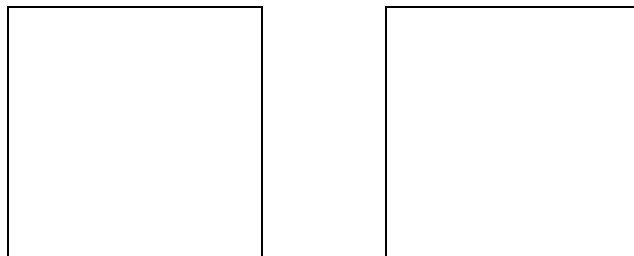


Figure 92. Scheme of the external and intrusive sensor.

2- Differential sensors

Differential sensors were developed having two separate arrangements of coils. Each of them consists of an emitter and a receiver. The emitter coils are winded around a core and connected in the same direction. The receiver coils are winded around a core and connected in opposite direction. Figs. 93-94 show this principle.

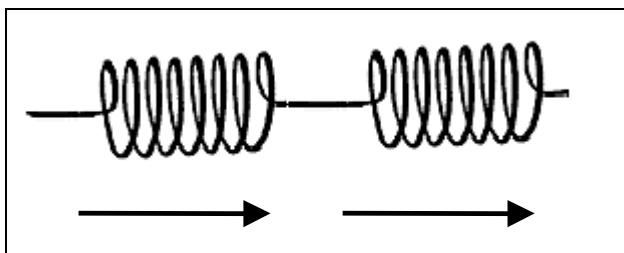


Figure 93. Scheme of the emitter coils E1 and E2.

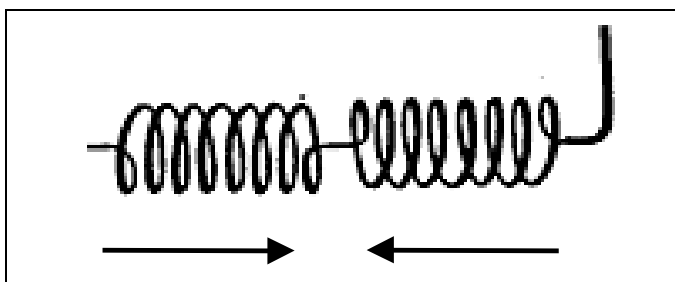


Figure 94. Scheme of the receiver coils R1 and R2.

By isolating the arrangements from each other two independent systems arise (see Figs. 95-96 for a presentation of this principle). The first one is in contact with the sample to be analysed. The second one is in contact with a standard. This makes the differential coils more sensitive against smallest changes in the electromagnetic properties of the sample.

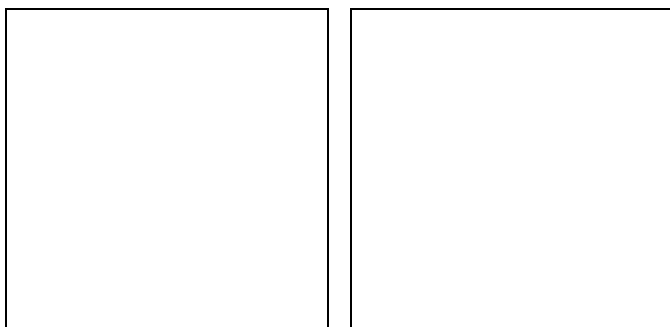


Figure 95. Emitters and Receivers in direct coupling.

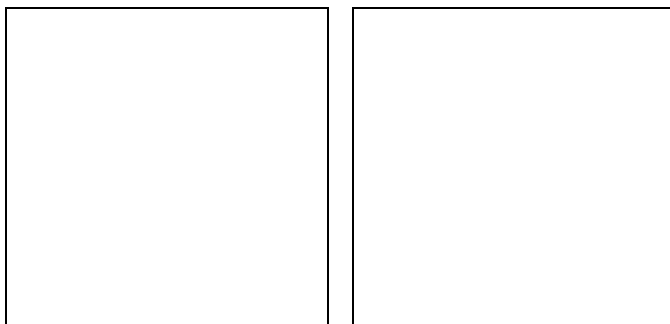


Figure 96. Emitters and Receivers in indirect coupling.

Annexe 2. Rapport technique Microqual – L'influence des cations métalliques divalents sur l'activité de la lectines ConA étudiée par le BIAcore

EXECUTIVE SUMMARY

This progress report describes the results obtained within work package 6 (Optical biosensor) of the MICROQUAL project during the first year.

The application of lectins plays an essential role in the project with regard to the isolation and detection of bacteria in sterilized milk. The lectins used in this study (*Canavalia ensiformis* (ConA), *Lens culinaris* (LCA) and *Lathyrus odoratus* (LOA)) were selected by EBI and they were immobilised on three different biosensor chips (CM5, F1 and C1) by a standard coupling procedure (amine coupling).

The activity of the immobilised lectins and the possibility to re-use them were tested during binding experiments with thyroglobulin (a glycoprotein of 669 kDa). During these experiments, it was proven that the lectins required metal ions (Ca^{2+} , Mg^{2+} or Mn^{2+}) for their activity. All three immobilised lectins could bind this glycoprotein and these bindings were strong. The immobilised lectins could be re-used after regeneration with hydrochloric acid.

Binding experiments of the immobilised lectins with two bacterial strains (*Enterobacter skazakii* and *Serratia marcescens*) showed rather disappointing results. Only very weak responses were obtained with high concentrations of the bacteria (1×10^8 - 5×10^9 cfu/ml) obtained from purified culture media. The application of an indirect assay, in which lectins were added to the bacteria and the free lectins were determined due to their binding to immobilised thyroglobulin, did not result in a suitable assay for the quantification of bacteria also.

It was proven that milk contained components that interact with the immobilised lectins. Different standard solutions of several milk proteins were injected over the immobilised lectins and the binding with the three lectins was measured. Especially with ConA, a high binding was observed with the glycoproteins kappa-casein and beta-lactoglobulin. These bindings were less with immobilised LOA and LCA.

Future experiments will be focussed on:

- Improvements of the direct and indirect assays for bacteria.
- Further investigations on the binding of milk components.
- The possible use of antibodies against the peptido glycan structure of bacterial cells.

1. INTRODUCTION

The main objective of the MICROQUAL project is the development of more effective physical methods, based on innovative electrical, electromagnetic and optical biosensor techniques, to determine the microbiological quality of sterilised milk.

The optical biosensor applied in this project (BIACORE 3000 of the company Biacore AB, Uppsala in Sweden) uses the optical phenomenon surface plasmon resonance (SPR), to monitor biomolecular interactions. The detection depends on changes in the mass concentration of macromolecules at the biospecific interface, and does not require any labelling of interactants. One interactant is immobilised on the sensor surface, which forms one wall of a micro-flow channel. A solution containing the other interactant(s) flows continuously over the sensor surface. As molecules from the solution bind to the immobilised interactant, the resonance angle changes and a response is registered. The unit for the SPR signal is the resonance unit (RU).

The research to be performed with the optical biosensor is described in work package number 6 of the project. The objectives of this work package are:

- To quantify the binding between lectins and bacteria.
- To identify the best lectins for the detection of different bacteria.
- To apply this new detection system in combination with bacterial concentration techniques.
- To develop a fast detection system for concentrated bacteria.
- To compare the results obtained with other techniques involved in the project.

The work within this work package is divided into three sub tasks:

Sub task 6.1: Different lectins will be selected and optimum conditions for the immobilisation of these lectins to different chemically modified biosensor chips will be investigated. The lectins of interest have to be covalently bound to the sensor surfaces and the stability of these re-usable sensor chips is evaluated.

Sub task 6.2: Different biosensor chips with different immobilised lectins will be used to study the interaction with different bacteria in solution. Data of association and dissociation, which are quantitative parameters for the binding efficiency of the bacteria to the lectins, will be obtained and used for the selection of the lectin or a combination of lectins to be applied in the final sensor chip. Optimum conditions for sample introduction into the biosensor and conditions for the regeneration of the re-usable sensor chips will be investigated.

Sub task 6.3: With the final sensor chip, the evaluation is focused on finding the detection limits for the different bacteria of interest in culture media and in concentrated milk samples. Using contaminated milk samples (with different relevant bacteria), the results obtained with the validated biosensor application will be compared with those obtained with the other techniques involved in the project.

This progress report summarises the results obtained with the optical biosensor during the first twelve months of the MICROQUAL-project in which sub task 6.1 (preparation of biosensor chips) was fulfilled and in which we started with sub task 6.2 involving experiments to investigate the binding between immobilised lectins and bacteria. Additional experiments were performed in which we investigated the binding of milk proteins to the lectins.

2. EXPERIMENTS

2.1. Immobilisation of lectins to the biosensor chips.

The procedures used during the immobilisation of lectins to three different biosensor chips are described completely in deliverable no. 11 (11-05-2001).

2.2. Binding experiments of thyroglobulin to the immobilised lectins.

Thyroglobulin was selected as model glycoprotein to study the activity of the immobilised lectins, the influence of metal ions during the binding and the possibility to re-use these biosensor chips with immobilised lectins. The procedures used during these experiments are described completely in deliverable no. 11 (11-05-2001).

2.3. Binding experiments of bacteria to the immobilised lectins.

The bacteria *Serratia marcescens* and *Enterobacter sakazakii* were grown in two media; BHI (Brain heart broth) and PFZ (peptone physiologic salt) for 18 or 72 hours and reached a stationary phase.

2.3.1. Direct binding of bacteria

Bacteria grown in BHI were centrifuged at 2000 g during 10 minutes and washed twice with HBS-P buffer (enriched with 60 mM CaCl_2).

Bacteria grown in PFZ could be used directly after the addition of 60 mM CaCl_2 . To concentrate the bacteria grown in PFZ, they were centrifuged at 2000 g during 10 minutes and the cells were re-suspended in a smaller volume of HBS-P buffer (enriched with 60 mM CaCl_2). The final concentrations of bacteria ranged from 1×10^8 - 1×10^9 cfu/ml and these solutions were injected over the lectin-bound sensor surfaces during 15 min at a flow rate of 1 $\mu\text{l/min}$. The interactions were monitored at 25°C. In the case of LOA and LCA coated sensor chips, the bound bacteria were removed by a 3 min during injection of 10 mM HCl at a flow rate of 2 $\mu\text{l/min}$. The ConA coated sensor chip was regenerated with 25 mM HCl (4 min injections at a flow rate of 2 $\mu\text{l/min}$).

2.3.2. Indirect biosensor assay with bacteria

In the indirect biosensor assay, a sample of bacteria strain solutions (*Serratia marcescens*, strain 240 or *Enterobacter Sakazaki*, strain 239) in PFZ (1×10^9 CFU/ml) was incubated with 0.08 μg of one of the lectins. During the incubation of 1 hour these lectins will bind to the bacteria. This solution was centrifuged and the concentration of non-bound lectins in solution was measured with the BIACORE using a sensor chip coated with thyroglobulin.

2.4. Binding experiments of milk proteins to the immobilised lectins.

The 3 lectins (ConA, LCA and LOA) were immobilised in 3 different channels of a CM5-chip and solutions with different concentrations of 6 different milk proteins (beta-lactoglobulin, kappa-casein, gamma-casein, alpha-casein, beta-casein and gamma-globulin) in biacore buffer were injected. Calibration curves of the milk proteins were prepared. The responses obtained after injection with the milk proteins were compared with thyroglobulin injections.

2.5. Influence of lactose on the binding of proteins to lectins.

Different concentration of lactose (0 to 5 g per 100 ml) were mixed with a fixed concentration of kappa-casein (0.5 mg/ml) and the binding of kappa-casein to the three immobilised lectins was measured.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Immobilisation of lectins to the biosensor chips (sub task 6.1).

In sub task 6.1, different lectins had to be selected and optimum conditions for the immobilisation of these lectins to different chemically modified biosensor chips had to be investigated.

The three lectins (LOA, LCA and ConA) selected by EBI could be immobilised onto the three different biosensor chips (CM5, F1 and C1) by means of a standard coupling procedure (amine coupling). The CM5 biosensor chip has a carboxymethylated dextran layer (of approx. 100 nm thickness), the F1 has a shortened carboxymethylated dextran layer and the C1 chip contains no dextran but only some carboxyl groups. The amounts of lectin that could be immobilised into the flow channels of the CM5, F1 and C1 chips were 10, 3 and 1 ng, respectively.

A more extended description of these results was reported in deliverable no. 11 (11-05-2001).

3.2 Binding experiments of thyroglobulin to the immobilised lectins.

All three immobilised lectins could bind thyroglobulin and these bindings were strong as shown by the low dissociation. The immobilised lectins could be re-used after regeneration with hydrochloric acid (10 or 25 mM). The lectins required metal ions (Ca^{2+} , Mg^{2+} , or Mn^{2+}) for their activity. In literature and in our experiments, Mn^{2+} was the metal ion that resulted in the most effective binding of thyroglobulin to the lectins. However, in the BIACORE, MnCl_2 caused problems due to precipitated particles on the biosensor chips. A good alternative was the use of Ca^{2+} ions (60 mM) in the running buffer and in the sample solution. Without CaCl_2 , there was no binding between the lectins and thyroglobulin observed.

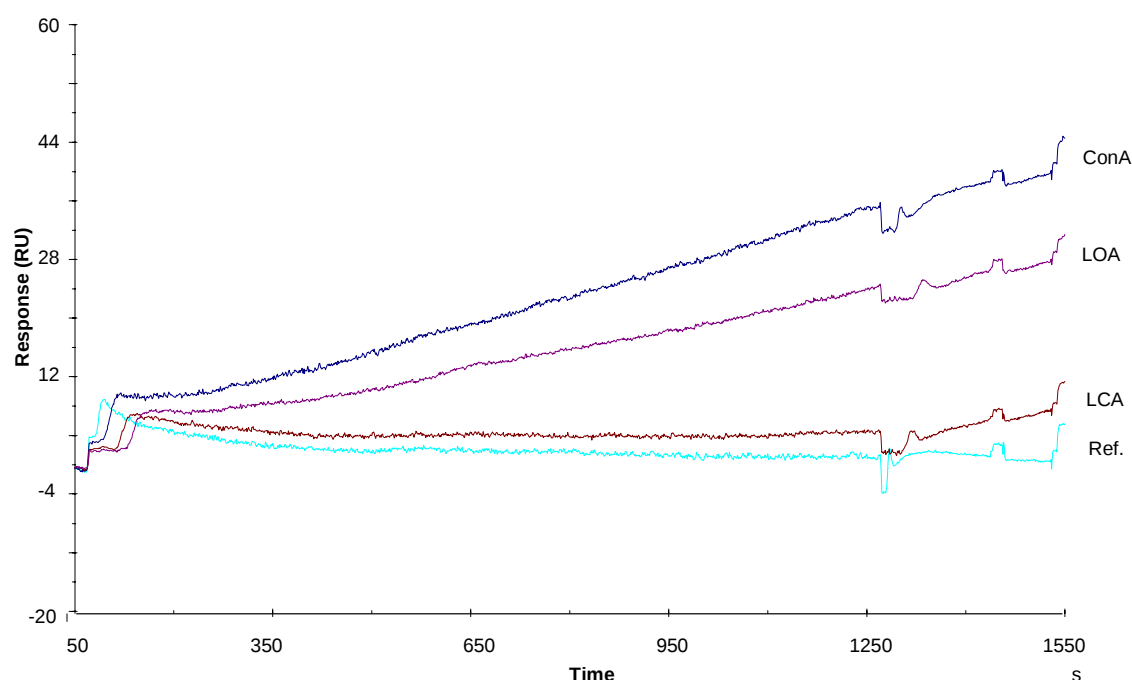
A more extended description of these results was reported in deliverable no. 11 (11-05-2001).

3.3. Binding experiments with bacteria.

3.3.1. Direct binding of bacteria

Direct binding experiments with 2 bacterial strains (*Serratia marcescens* and *Enterobacter Sakazaki*) were performed. In these experiments, lectins were immobilised on the chip and bacteria containing solutions (in the concentration range of 1×10^8 - 1×10^{10} cfu/ml) were injected (15 - 20 μl) over the immobilised lectins at a low flow rate (1 $\mu\text{l}/\text{min}$). Even at high bacterial concentrations of 1×10^9 CFU/ml very low responses (see Figure 1) were obtained. An explanation for these low responses obtained from the binding of bacteria was that bacterial cells are too big to penetrate into the SPR active region.

Figure 1. The binding of *Enterobacter Sakazaki* (a 24-hours old culture containing 1×10^{10} cfu/ml) to ConA, LCA and LOA immobilised on a F1-chip.



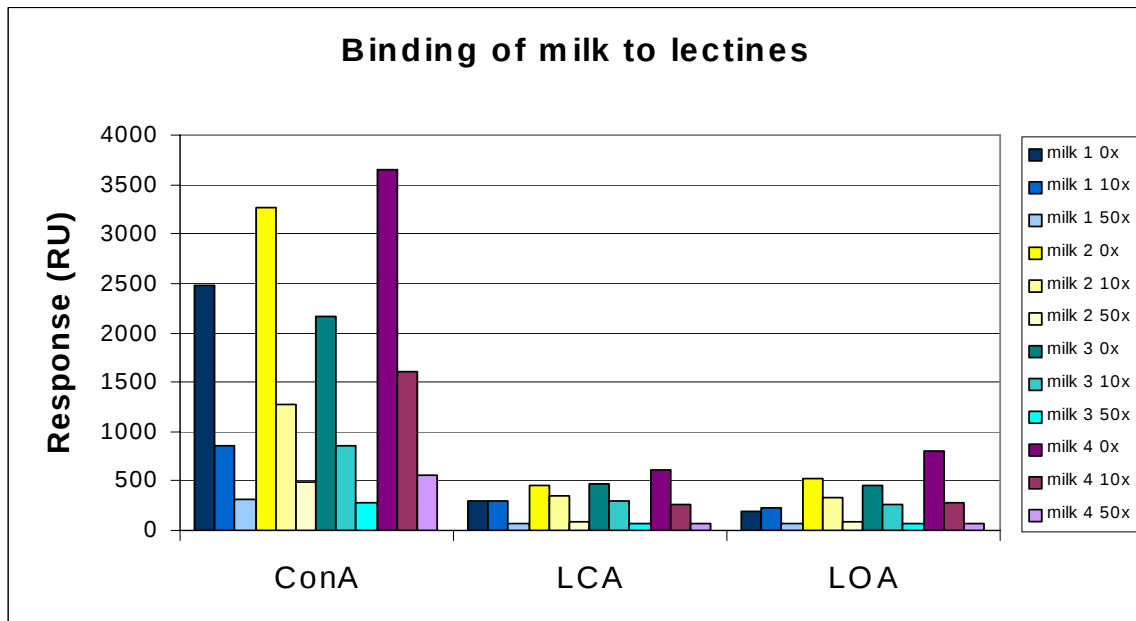
3.3.2. Indirect biosensor assay with bacteria

In initial experiments with the indirect biosensor assay, a sample of the bacteria strains (*Serratia marcescens*, strain 240 or *Enterobacter Sakazaki*, strain 239) in PFZ (1×10^9 cfu/ml) was incubated with the lectins. During the incubation of 1 hour these lectins should bind to the bacteria. This solution was centrifuged. If the lectins have bound to the bacteria, the concentrations of lectins in the supernatant will be lower. The supernatants were measured with the BIACORE using a sensor chip coated with thyroglobulin. The lowest concentration of lectins that could be detected with this sensor chip was $0.8 \mu\text{g/ml}$ of ConA, LCA and LOA. Using different concentrations of lectins added to the same concentration of bacteria (1×10^9 cfu/ml) did not result in a reduction of the concentration of lectins in the supernatant. The amount of lectins that have to bind to the bacteria, to cause a lectin measurable reduction in the supernatant, was calculated. Theoretically, 300 lectin molecules have to bind to 1 bacterial cell to cause a measurable response in the BIACORE, which is quite high. This indicates that the indirect assay will not result in a better assay to determine the binding between lectins and bacterial cells.

3.4 Binding experiments with milk proteins.

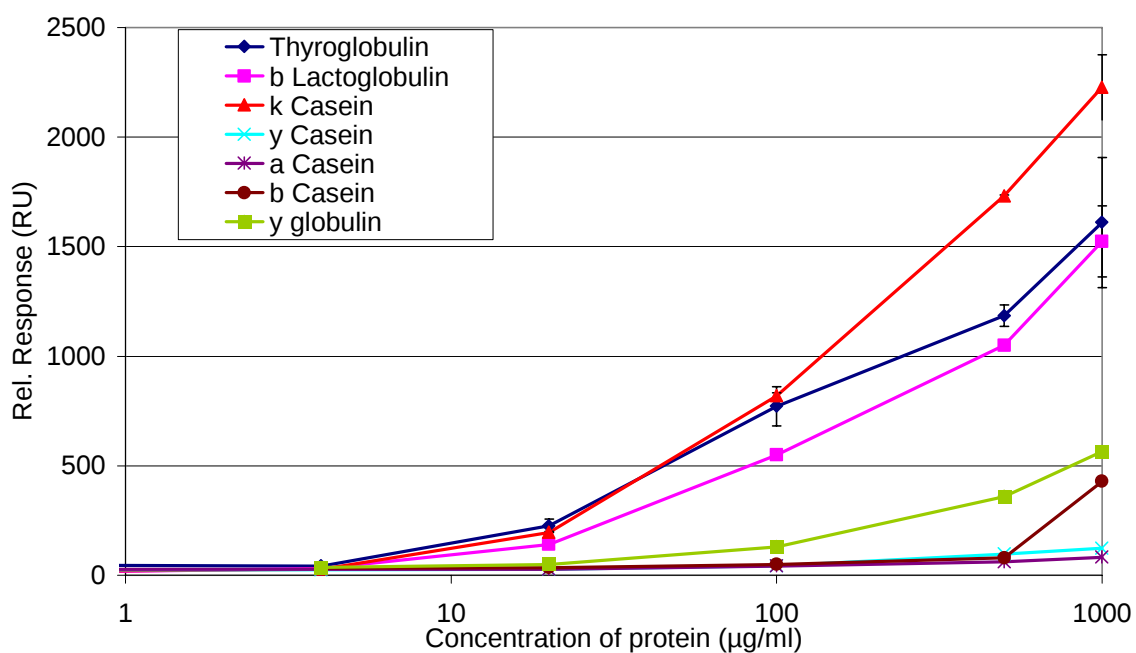
The report also described the problems that could be expected when using lectins to isolate bacterial cells from milk. From literature, it is known that milk contains glycoproteins which could bind to the lectins. There are 6 known glycoproteins in milk: β -lactoglobuline, α -casein, β -casein, γ -casein, κ -casein and γ -globulin. As shown in Figure 2, high responses were obtained due to the binding of components from milk using ConA immobilised on the sensor chip. These responses were lower with LCA and LOA immobilised on the biosensor chip.

Figure 2. Binding of milk components to immobilized lectins



To investigate the binding of different milk proteins to the lectins, different standard solutions of these proteins were injected over the immobilised lectins. The 3 lectins (ConA, LCA and LOA) were immobilised in 3 different flow-channels of a CM5-chip and the 6 different milk proteins, diluted in buffer, were injected. In Figure 3, 4 and 5, the calibration curves of the different milk proteins binding to the three lectins are shown. The responses obtained after injection of the milk proteins were compared with thyroglobulin injections.

Figure 3. Calibration curves obtained with different milk proteins binding to ConA immobilised on a CM5 chip



These figures showed that there were differences observed between the binding of milk proteins to the three immobilised lectins. ConA showed high binding with kappa-casein and beta-lactoglobulin. These bindings were much less with the other lectins.

Figure 4. Calibration curves obtained with different milk proteins binding to LOA immobilised on a CM5 chip

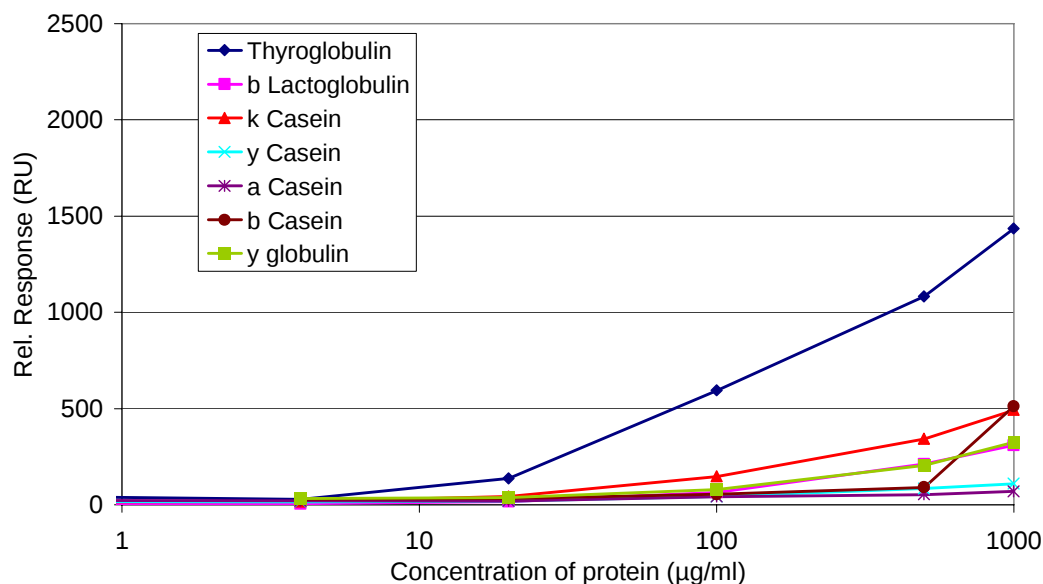
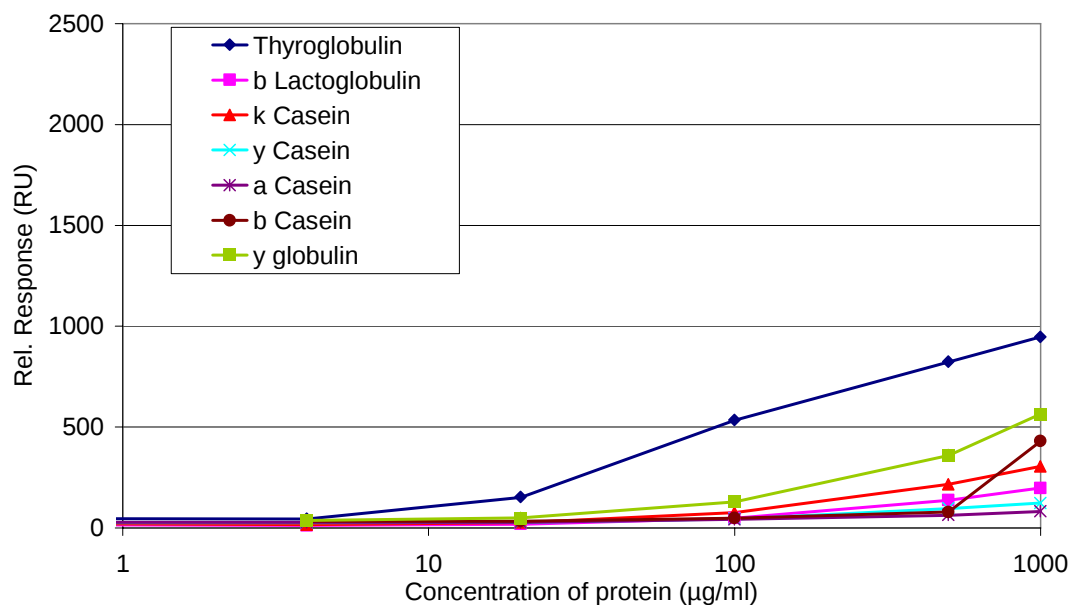


Figure 5. Calibration curves obtained with different milk proteins binding to LCA immobilised on a CM5 chip

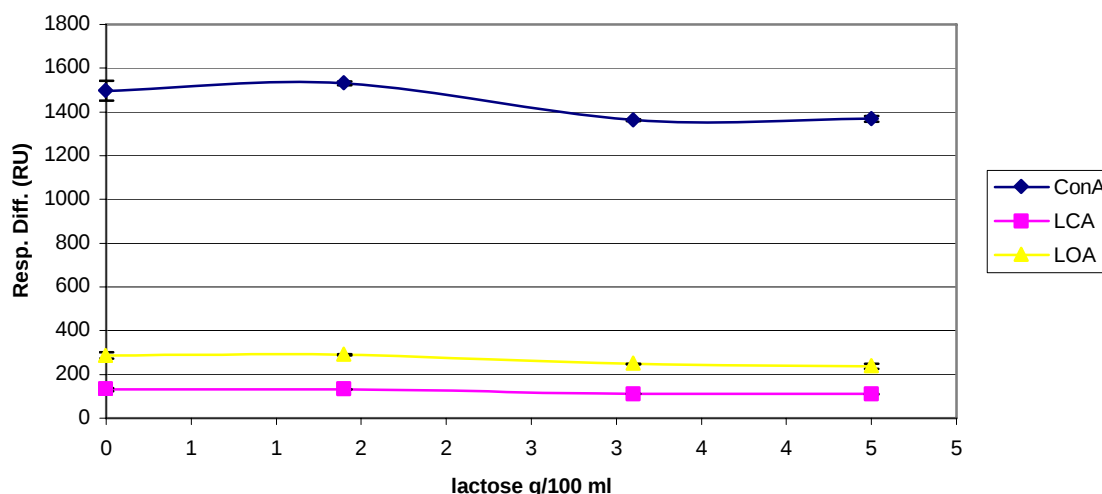


3.5 Influence of lactose on the binding of proteins to immobilised lectins.

Lactose is a sugar which is present in milk in a high concentration (approx. 4.5 g/100ml). It was not known if this sugar could influence the binding of lectins to sugar containing compounds as proteins or bacteria. With the BIACORE it was not possible to measure the binding of lactose directly. Lactose

is too small to cause an increase in the SPR response. Therefore an indirect method was used in which different concentrations of lactose were added to κ -casein in a fixed concentration (0.5 mg/ml). The binding of κ -casein was measured and as shown in Figure 6, there was no influence of the concentration of lactose observed.

Figure 6. Influence of lactose on κ -casein (0.5 mg/ml) binding to the lectins on a CM5-chip



4. FUTURE EXPERIMENTS

- Completion of the research with indirect assays.
- Completion of the work with milk proteins binding to lectins.
- One explanation of the low responses obtained during the binding experiments with bacteria to immobilised lectins was due to the large size of the bacteria and the relative small size of the SPR active region. Future experiments will be focussed on the possibility to measure bacterial fragments.

The possibility to use antibodies (if available) against the peptido glycan structure of bacteria.

Annexe 3. Article en préparation : lectin-magnetic separation on the tracks again

Introduction

A lot of progress has been made over the last decades in the frame of detecting bacterial contaminants. However, the cheap and highly sensitive method that makes it possible to rapidly and easily detect any kind of bacteria is still a dream that every microbiologist would love to make true. Especially for low contamination levels, the existing methods still lack of rapidity to meet the industrial expectations, and also the emerging anti-bioterrorism needs. In this context, the scientific community cannot afford to ignore a path that potentially leads to a significant improvement. This explains why so many different techniques and technique combinations are explored nowadays.

The Lectin Magnetic Separation (LMS) is one of those techniques. Lectins are an heterogeneous group of non-enzymatic (glyco)proteins that share the property of specifically and not covalently bind sugar residues. Because of this property, they can be used as biochemical tools for a wide variety of applications, and, in that respect, can be compared to antibodies. For instance, the LMS has a lot in common with the more familiar Immuno-Magnetic Separation (IMS). Lectins are immobilized on the surface of paramagnetic beads just like antibodies are, and play the same role as antibodies, ie bacteria binding molecules. Once the bacteria are trapped, the beads can be peletted by means of a simple magnet, the supernatant discarded, and the bacteria resuspended in a smaller volume to facilitate and fasten the subsequent detection. However, what makes the LMS different of the IMS is also what makes it more seducing: lectins bind to glycoresidues, which are usually more accessible than peptides on the surface of the bacterial cell, and lectins are naturally present in a vaste variety of organisms, and do not require an expensive, time consuming production process like antibodies do.

The LMS as such, has been presented in 8 articles (Patchett *et al.*, 1991; Payne *et al.*, 1992; Payne *et al.*, 1993; Grant *et al.*, 1993; Payne *et al.*, 1993; Porter *et al.*, 1997; Porter *et al.*, 1998; Porter *et al.*, 1998), by two different groups, during the 90's. Even though this litterature is generally enthusiastic, it seems that the limitations encountered by those two teams discouraged them and others from exploiting this method any further. Among those limitations, the main one was the lack of repeatability in the results, which remained largely unexplained, mostly because those teams did not have the sound technical tools readily available to monitor the LMS process, from the bead preparation, to the bacteria concentration. They were also lacking an appropriate technique for quantitatively assess the lectin-bacteria interaction, and therefore to make a rational choice of lectins to use for instance. The purpose of this article is to propose new standardized methods for the development of LMS.

I. Materials and methods

A. Materials sources

Plate Count Agar (PCA) and Tryptone Soya (TS) were obtained from Biomérieux (France). Dulbecco's buffer (pH=7,1) was obtained from Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA). MaxiSorp flat-bottom polystyrene 96 well microtiter plates were obtained from VWR (France). Other material was purchased at Sigma (France), including the peroxidase-labelled Concanavalin A (ConA), Wheat Germ Agglutinin (WGA) and *Psophocarpus tetragonolobus* (PT) lectins.

B. Bacterial growth and preparation

Bacteria used for this study are listed in Table I. They were maintained on PCA at 4°C for not more than 2 weeks. The growth procedure was standardized, to ensure the repeatability of the results, as the physiological state of the strain is known to have an effect on the lectin-bacteria interaction (Porter *et al.*, 1998). Several colonies were resuspended in TS and grown at optimal temperature (see Table I) during the day. One millilitre of this suspension was then diluted in a fresh tube of TS and grown at the same temperature overnight.

The suspension was washed by two consecutive centrifugations (3,000×g, 15min, 4°C) followed by a resuspension of the pellet in Dulbecco's buffer. Serial dilutions in Dulbecco's were then made and colony forming counts were determined using PCA. One millilitre of sterile TS received the same treatment (centrifugations and dilutions) as a negative control.

Table I. CIP (Collection of bacterial strains of Institut Pasteur) reference of the strains used in this study. The lyophilised strains were obtained from CIP (Institut Pasteur, Paris).

	<i>Serratia</i> <i>marcescens</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i>
CIP	53.90	53.156	A22	54.8	53.124	69.13	76.117
Growth temperature	30°C	37°C	30°C	37°C	37°C	30°C	37°C

C. Quantitative ELLA

1/ Microplate coating

The procedure used is derived, adapted and optimized from Graham *et al.*, 1984. Cell suspensions (100µL) at the appropriate dilution in Dulbecco's were deposited in microplate wells. Control wells contained either sterile Dulbecco's, or sterile TS prepared the exact same way as the bacterial suspensions (including the washing centrifugations and subsequent dilutions). Plates were sealed and centrifuged (130×g, 15min, 20°C). The content of the plate was then pipetted out, and each well was incubated for 1h at 37°C with 200µL of Dulbecco's containing 0.1% (w/v) of BSA. The coated and saturated plates were immediately used for the Enzyme Linked Lectin Assay (ELLA) procedure described in paragraph 3 below.

2/ Coating efficiency assessment

It was assumed that the immobilization efficiency is correlated with the intrinsic hydrophobicity of the strain. This property was estimated for each strain by an adaptation (Sweet *et al.*, 1987) of the microbial adhesion to hydrocarbons (MATH) method (Rosenberg *et al.*, 1980). Microorganisms are washed the same way as described above, and the subsequent absorbance at 600nm (OD₆₀₀) is adjusted to 0.6. Six hundred microliters of xylene are then added to 4mL aliquots of this suspension. The mixture is vortexed at high speed for 60 seconds. After the two layers had clearly separated (about 15min), the lower aqueous phase was carefully removed and transferred to clean tubes for OD₆₀₀ determination. The percentage of hydrophobicity was then calculated as:

$$\% \text{ hydrophobicity} = 100 \times (\text{OD}_{\text{before}} - \text{OD}_{\text{after}}) / \text{OD}_{\text{before}}$$

Correlations between immobilization and hydrophobicity were assessed using a Spearman test based on ranks by the SigmaStat software.

3/ Peroxydase linked lectin revelation

The plates were flick dried, and incubated with 100µL/well of lectin for 2h at room temperature. Peroxidase labelled lectins were diluted in 0.1% (w/v) BSA to the concentration of 2.5µg/mL for ConA, 1.7µg/mL for PT and 0.9µg/mL for WGA (expressed in weight of protein/mL). Half of the wells received 0.1% (w/v) BSA as negative control. After that, the plates were washed three times with Dulbecco's, flick dried, and incubated for 15min with 100µL of 3.7mM o-phenylene-diamine (OPD) and 0.4mM hydrogen peroxide in citrate buffer (pH 5.0). The reaction was blocked by 50µL of 2.5M sulphuric acid, and OD was measured at 490nm.

The results presented take into account all the control wells. From the OD measured at a given bacterial concentration deposit, is subtracted the value of the OD with the same bacterial deposit but no lectin. From this difference is subtracted the similarly obtained difference with no bacteria (sterile TS diluted the same way as were the bacteria, with and without lectin). It has been observed that despite the washing steps, the little quantity of TS that remained could be enough to induce a non-negligible signal.

D. Lectin-Bead optimization

1/ Bead preparation

All the material is handled aseptically at all times. The incubation takes place in 2mL sterile microtubes. The beads are washed twice in Dulbecco's, and then resuspended in a lectin solution (ConA) at various concentrations. The final dilution of the beads is the same as the initial dilution in the mother suspension.

Tubes are placed on a slow tilt rotative agitation device. When incubation is over, the beads form a pellet by the use of a magnet, and the supernatant is pipetted out. The beads are then washed in incubation buffer, and resuspended in the same buffer.

The two obtained supernatants are expected to contain the not-fixed lectins. Their protein content is measured with the Bio-Rad method, following the supplier's protocols.

2/ Biochemical activity test

The plate wells were incubated for 1h at 37°C with a solution of thyroglobulin in Dulbecco's (5mg/mL). ConA is known to have a very high affinity for this protein. Serial dilutions of a suspension of ConA saturated magnetic beads were then incubated (100µL/well) for 2h at room temperature. The last step consisted in adding 100µL/well of a peroxidase solution in Dulbecco's (60ng/mL, 2h at room temperature). Three washing steps of the wells with 200µL of Dulbecco's followed each step.

The quantity of retained peroxidase was then assessed by an OD₄₉₀ measurement of 100µL of supernatant from each well after incubation with 100µL of OPD solution for 15min at room temperature in the dark, finally blocked by 50µL of 2M sulfuric acid. Negative controls

included wells incubated with either no beads, or BSA saturated beads, and also wells saturated with BSA instead of thyroglobulin.

3/ Bacteriologic alactivity test

The same protocol as for the above test was followed. Instead of adding the peroxidase enzyme, 100µL of a concentrated bacterial suspension (*S. epidermidis*, $\sim 10^7$ CFU/well) was added. After the 2h incubation step at room temperature, the wells were washed, and incubated again with 200µL of Trypcase Soya (TS) at 37°C and under agitation. The subsequent bacterial growth was monitored by measuring the OD630, and compared to standard curves obtained on empty wells that received known quantities of bacteria in TS.

E. Lectin Magnetic Separation

Hundred microliters of ConA-saturated beads are gently mixed with 5mL of bacterial suspension for 2h at room temperature. After a washing in 5mL of Dulbecco's, the beads are finally resuspended in 1mL of Dulbecco's. This final suspension is serially diluted and plated on PCA. The count is made after an incubation of 24h at 37°C, and compared with the results obtained with negative controls. Negative controls are carried out in the same conditions but with either no beads, or the same quantity of BSA saturated beads. In some experiments, bacteria were incubated with a quantity of free lectins, which reflected the few free lectins that possibly come along with the beads despite the washings. The bacterial strains tested are listed in table I.

II. Results and discussions

A. Quantitative ELLA

1/ Coating efficiency

Each strain hydrophobicity was estimated (Table II) as the percentage of bacteria retained by the hydrophobic phase during the MATH protocol. The higher it is, the more the strain will stick to the plastic surface as shows the correlation ($p < 0.1\%$) between this result and the other direct method (see materials and methods). Moreover, this correlation is linear ($r^2 = 0.83$).

Table II. Estimation of the fixation efficiency of the coating protocol and measure of the percentage of hydrophobicity as obtained by the MATH method. The two lines are well linearly correlated ($r^2 = 0.83$).

	<i>S. marcescens</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>E. faecalis</i>
Fixation efficiency	50%	100%	20%	40%	100%	55%	60%
Hydrophobicity	47%	93%	22%	59%	97%	81%	70%

This correlation confirms the initial postulate. The MATH method can therefore be used as a simple and fast assessment of the coating efficiency, to avoid the time consuming direct method.

The relevance of the MATH results has been extensively discussed elsewhere (see for instance Pembrey *et al.*, 1999). It has been suggested that the results obtained by that method do not perfectly reflect the actual hydrophobicity of the strain in its natural environment, because of the influence of the protocol itself on the bacterial cells (by the hydrocarbon phase, the buffer or the centrifugations...).

However, these issues are not relevant in this context, since they do not affect the observed correlation between the MATH result and the bacterial coating efficiency. This correlation is what really matters, since that is what allows us to conveniently replace the direct measurement method by the rapid MATH measure.

2/ Lectin-bacteria affinity

The bacterial suspension dilutions were adjusted to remain under the limit of saturation of the well surface by the immobilized bacteria on one hand, and to remain in the range of linearity of the microplate reader on the other. In these conditions, plot could be made of the OD₄₉₀ (proportional with the amount of immobilized lectins) versus quantity of coated bacteria, and a linear regression could be established. When a poor regression coefficient was observed ($r^2 < 0.8$), the strain was considered as non-reactive for the lectin. Furthermore, a standard curve was established for the lectin in solution, which could allow us to translate the OD₄₉₀ obtained into a mass of fixed lectin.

An example of what was obtained is presented figure 1. The slope of such a line gives an estimation of the affinity of a lectin for a given bacterial strain, expressed in ng of lectin fixed per immobilized bacterium. This protocol was carried out with a panel of 7 bacterial strains, and all the results are summed up in table III.

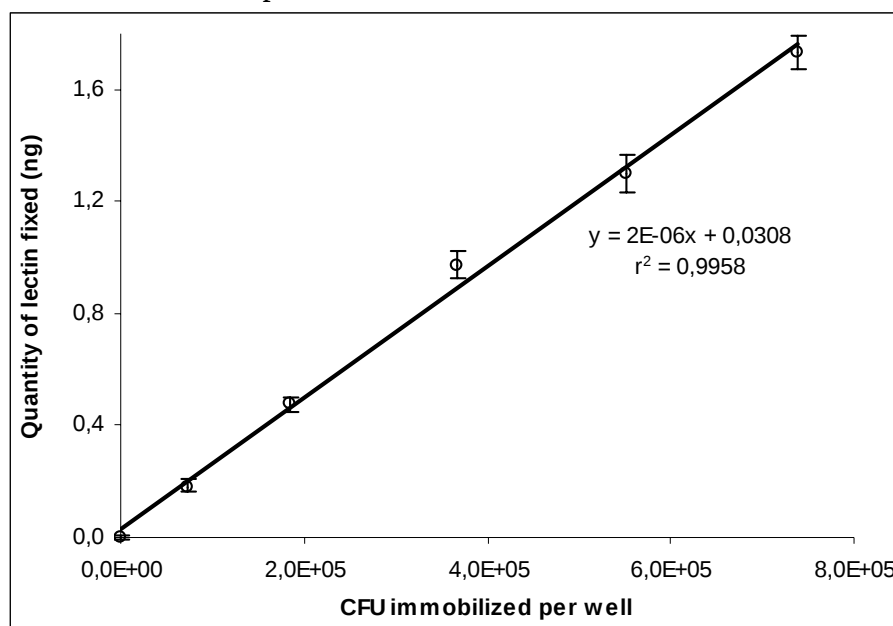


Fig 1. Linear regression of the quantity of ConA fixed on various quantities of immobilized *S. epidermidis*. The plot is based on the median of a set of four repetitions, the first and third quartiles being the values for the error bars. The slope of the line is the affinity of the lectin for this bacterial strain, expressed in ng of fixed lectin per CFU.

The results presented in Table III confirm many known properties of the lectin-bacteria interactions.

First, it has been pointed out how variable the fixation is from one strain to another, even inside a single species (Lee *et al.*, 1998). This must be correlated with the surface sugar residues variations. Examining the over-lapping genus shows that the two *Pseudomonas*, for instance, never have the same affinity for a given lectin.

Second, ConA is the lectin with the wider pattern of recognition, with affinities as high as 2,232ng/10⁹CFU depending on the strain. WGA and PT exhibit a narrower range of recognition in this panel of strains.

Even though the absolute values obtained with these two lectins are generally lower, it would be inappropriate to directly compare those to the ones of ConA, considering the difference of molecular weight, as well as the difference of peroxidase labelling of the three lectins. A correct comparison of these results should not go further than differences between affinity ratios when it comes to compare a lectin to another. For example, ConA is 150 times more affine for *S. epidermidis* than for *S. aureus*, whereas WGA has a ratio of only 1.7, and PT binds to none of the two strains.

Table III. Affinity of the three lectins for the panel of bacterial strains. Results are the median of 3 independent repetitions.

Lectin affinity (ng fixed / 10 ⁹ immobilized CFU)	S. <i>marcescens</i>	S. <i>aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>E. faecalis</i>
ConA	78	15	383	0	2,232	402	74
WGA	0	221	35	0	367	1,058	0
PT	0	0	0	0	0	1,148	67

It is also difficult to compare the data with the results already published elsewhere using the agglutination methods. As stated above, there can be a variability of the affinity of two strains of the same species for a given lectin. So, comparisons could only apply if experiments were carried out on an exactly matching couple strain/lectin, and also if the bacteria was maintained in similar conditions. This difficulty is even greater than the one of comparing our quantitative results with qualitative ones, which can furthermore vary from one laboratory to another.

However, the results we obtained can be compared to those of Holm *et al.*, 2003. They used the WGA lectin for Gram typing with a good percentage of correctly interpreted strains (up to 99% in particular conditions with their panel of 12 strains) by using a flow cytometric technique. However, their discrimination parameter does not only rely on the WGA staining. For instance, they correctly interpret *Pseudomonas sp.* as Gram negative strains although the binding of WGA to their surface. Sizemore *et al.*, 1990 already pointed out this *Pseudomonas sp.* special case and furthermore, agglutination studies gave positive results for Gram negative strains with WGA (Payne *et al.*, 1992). Therefore, these results are in agreement with what was reported elsewhere, and confirm the non suitability of a single WGA staining test for Gram typing.

This method is rapid (4h), cheap and easy to realize, gives objective quantitative results and is suitable to any lectin and bacteria, regardless of the number of sugar fixation sites on the lectin as well as of the possible auto-agglutination property of the strain. For all these reasons, this method is superior and gives more valuable data than the only method used so far, namely the agglutination method.

B. Lectin-Bead optimization

1/ Magnetic beads preparation

The estimation of the lectin coating efficacy by protein assay shows that the quantity of lectins actually immobilized on the beads is constant and not influenced by the quantity of incubated lectins (fig 2). This proves that the beads are saturated by the lectin. The saturation level is also not dependant on the incubation time (result not shown). Several incubation volumes were also used and did not give any noticeable difference.

However, the main issue is to know, rather than the lectin quantity, the lectin biochemical activity carried by the beads, which is a crucial parameter for the rest of the study. Studying it was done via the biochemical assays.

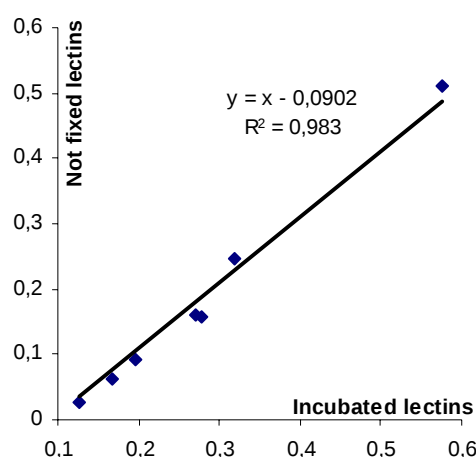


Fig 2. Quantity of not fixed lectins vs initially incubated lectins. The quantity of lectin on both axis is expressed by the OD₅₉₅ result of the protein assay (see materials and methods). The quantity of actually fixed lectins is estimated by the difference between the incubated lectins and the not fixed lectins (ie x-y on the graph). As shown by the regression, this quantity is a constant.

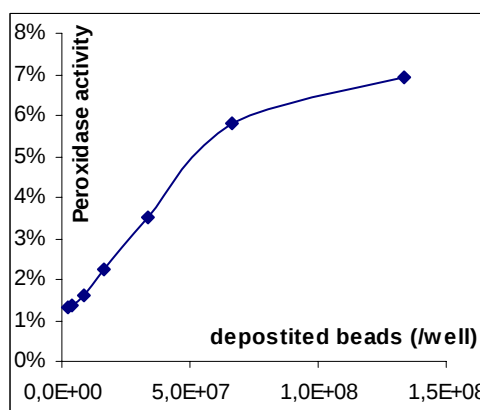


fig 3. Relation of the quantity of lectin saturated beads deposited in a well vs. peroxidase activity. 100% of peroxidase activity is determined as the maximum OD possibly obtained if 100% of the incubated enzyme were retained.

2/ Biochemical activity test

Figure 3 shows that the detected biochemical activity is positively correlated with the quantity of deposited beads. Negative controls (BSA saturated beads) had a low activity (under 1%) and were not dependant on the initial quantity of deposited beads. Moreover, it was determined that the background noise was undetectable (0%), and that the free lectins, which could remain despite the bead washings, did not influence the assay result (negligible signal, results not shown).

In this protocol, an activity is detected when:

1/ magnetic beads are retained in the well, through the specific interaction of the lectin with the thyroglobulin.

2/ the lectin coated magnetic beads bind and retain the peroxidase enzyme.

From these results, we concluded that not only the beads carry lectins on their surface, but also that these lectins preserve their biochemical activity once attached to the bead. This is mandatory to observe a bead-bacterium specific interaction. This is actually the first evidence of this preserved activity, which allows us to move on and check if this retained activity is strong enough to attach bacteria.

On the same basis, and using the same protocol, we also estimated the influence of the concentration of lectins in the initial coating buffer of the beads on one hand, and of the duration of this incubation on the other hand. Results are presented in figure 4.

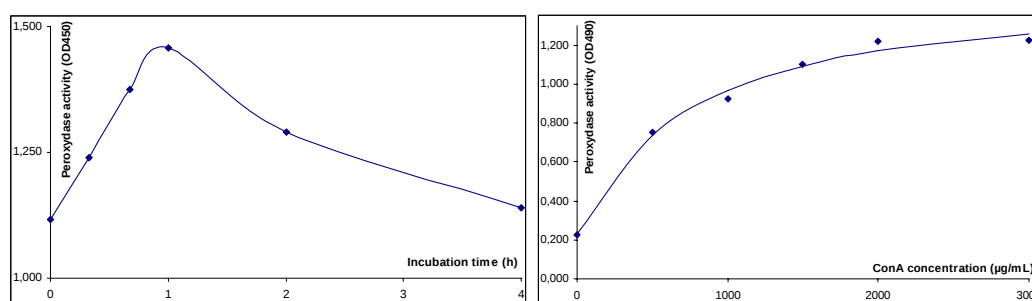


Figure 4. On the left, influence of the incubation *duration* of the beads with the lectins on the measure of the lectin activity of the coated beads. A control with beads incubated with a buffer free of lectin gave an OD of 0.330. On the right, influence of the *concentration* of lectin incubated with the beads on the activity. In the two experiments, $5 \cdot 10^7$ beads were deposited per well.

It appears that incubating more than 2mg/mL of lectin with the beads does not give a substantial increase in the retained biochemical activity on the beads surface. Regarding the incubation duration, not only an incubation longer than 1h does not result in the fixation of more lectins, but also it decreases the expressed lectin activity of the beads. The reasons of that are unknown, and it can only be hypothesized that repeated shocks among the beads during the incubation may damage the lectins, and/or that a too long storage at room temperature leads to a degradation of the protein to a certain degree.

Finally, the BSA saturation recommended by the beads manufacturer was proved to be useless for our application. Despite the fact that this saturation was never realized in none of the above mentioned experiments, the negative controls tested never gave any significant signal. This is consistent with our conclusion that the beads are actually already saturated with lectins. Avoiding this saturation step shortened the preparation time of the coated beads dramatically, and also improved the repeatability of all our tests.

3/ Bacterial activity test

The bacteriological test results indicate that the lectin-magnetic beads allow the specific immobilization of around 10% of the deposited bacteria (fig. 5). None of the controls gave such a result, most of them remaining under 2% (which is the detection threshold for this method).

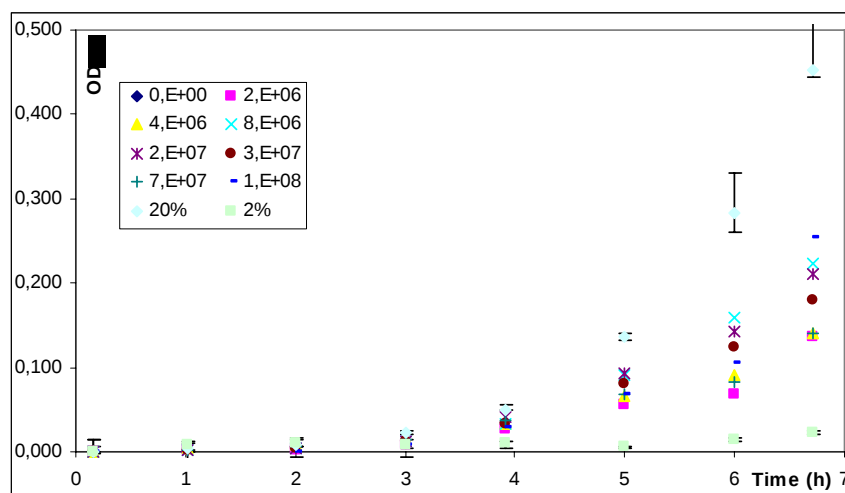


fig 5. Growth curve of the bacteria retained by the immobilized lectin saturated beads. Each curve is for a different deposited bead quantity per well (see caption), except the 20% and 2% curves, which are the curves that would have been obtained if 20% or 2% respectively of the deposited bacteria were retained (controls).

Although this percentage might seem low, it does not reflect the actual efficiency of the lectin-beads as such. In particular, each well has a limited bacterial capacity, granted that only a single layer of bacteria can be specifically retained. The maximum capacity of the well is not known with accuracy, but from our experience, this steric saturation is obtained with as few as 10% of the deposited quantity. In other words, the limiting factor can well be the well geometry rather than the lectin-bead activity.

This particular geometry might as well explain the relation between the quantity of deposited beads and the quantity of retained bacteria (fig 6).

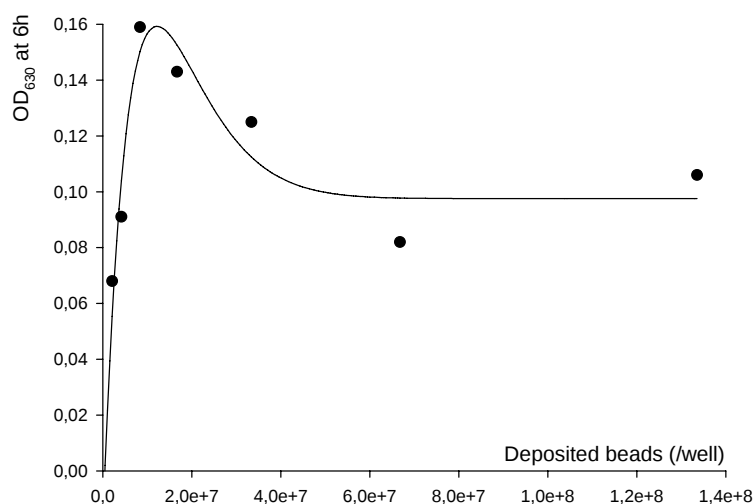


Fig 6. Relation of the quantity of bacteria retained (expressed by the OD_{630} after 6h of growth) vs. the number of beads deposited per well.

Figure 3 strongly suggests that the wells are saturated by the beads for more than approximately $7 \cdot 10^7$ deposited beads, which corresponds to the beginning of the plateau in figure 6. The subsequent decrease is certainly due to a sub-optimal beads density. Due to the beads density in the well, a bead addition leads to a broader total lectin surface accessible to the bacteria, and therefore a lower retention.

Keeping these considerations in mind, we concluded that:

First, the lectin-saturated beads do present a lectin biochemical activity. This activity is showed by the peroxidase activity test, and, more importantly, by the ability of the beads to retain a valuable quantity of bacteria, considering the well geometry;

Second, apart of the well geometry influence, the peroxidase test allows us to assess the lectin biochemical activity more rapidly and more accurately than tests involving bacterial assays;

Finally, the optimal conditions for the preparation of coated beads were determined, not only considering the quantity of immobilized lectins, but also the quantity of biochemical activity retained and expressed at the surface of the beads.

These results are the first firm evidence that magnetic beads can effectively bind and retain a consistent number of bacteria.

C. Lectin Magnetic Separation

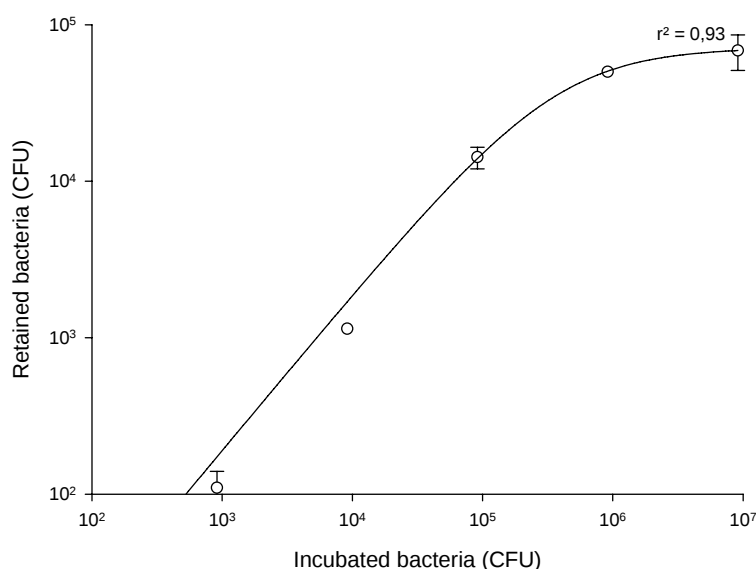


Figure 7. Plot of the retained bacteria vs. the number of bacteria in the initial 5mL of buffer for *Bacillus cereus*.

$$Br = \frac{B_{\max} \times Bi}{K_D + Bi}$$

Eq. 1 Regression of the number of retained bacteria (Br) vs. number of initial bacteria (Bi). $B_{\max}$ is the asymptotic quantity of bacteria needed to saturate the trap. $B_{\max}/K_D$ reflects the efficiency of the trap at low initial concentrations.

A typical result is presented in figure 7. Specifically retained bacteria are determined as the bacteria retained by the lectin-beads minus the bacteria that receive the same treatment but without beads (negative control, actually corresponding to the contamination of the tube). The quantity of specifically retained bacteria can be correctly predicted from the initial bacterial concentration by the equation 1. $B_{\max}$ and K_D are different for each strain tested. $B_{\max}/K_D$ is the efficiency of the trap at low initial concentrations, or put differently, the statistical chance of capturing a single bacterium in 5mL of buffer with these experimental conditions. Table IV gives the K_D , $B_{\max}$ and $B_{\max}/K_D$ values obtained for each strain in Dulbecco's buffer.

Table IV. Values of the K_D , B_{max} and B_{max}/K_D obtained for each strain in Dulbecco's. The regression coefficient (R^2) was greater than 0.99 for each regression.

	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
K_D (CFU)	3.10^{14}	3.10^8	5.10^7	5.10^5	6.10^8	2.10^8	2.10^9
B_{max} (CFU)	8.10^{13}	2.10^8	1.10^7	7.10^4	2.10^8	1.10^8	1.10^9
B_{max}/K_D	25%	60%	19%	16%	28%	51%	69%

Logically, it was found that B_{max} is statistically negatively correlated with the volume of the bacterial cell ($p=1.5\%$, $\rho=-0.809$ with a Spearman rank order test). On the other hand, the efficiency of the trap range from 15% up to 70% of retained bacteria at low concentrations, depending on the strain.

Several control experiments were carried out using *S. epidermidis*:

- When bacteria were incubated with a quantity of free lectins, which reflected the few free lectins that possibly come along with the beads despite the washings, not more bacteria were retained than in the negative control.
- When beads saturated with BSA were used, 10 times less bacteria were retained than when ConA beads were used. Untreated beads (i.e. beads that still had their reactive residues on their surface) had approximately the same efficiency as the ConA beads in Dulbecco's.
- However, when used in Dulbecco's complemented with 1mg/mL of BSA, untreated beads would not retain more bacteria than the negative control, whereas the ConA beads would still keep most of their activity.

Finally, the same experiments were carried out for 4 strains in Dulbecco's complemented with 10% v/v of semi-skimmed UHT milk. The aim for these experiments was to assess the influence of the buffer composition on the trap efficiency. For those 4 strains, we observed a dramatic increase of the K_D , which denotes a loss of retention efficiency (Table V). This trend was already predictable after an quantitative ELLA experiment using semi-skimmed milk as an incubation buffer (results not shown).

Table V. Values of the K_D , B_{max} and B_{max}/K_D obtained for each strain in Dulbecco's complemented with 10% v/v of semi-skimmed UHT milk. The regression coefficient (R^2) was greater than 0.99 for each regression.

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
K_D (CFU)	7.10^{10}	2.10^{11}	1.10^9	3.10^{10}
B_{max} (CFU)	2.10^8	2.10^8	1.10^8	1.10^9
B_{max}/K_D	0.3%	0.1%	10%	3%

All these experiments tend to prove the specificity of the trap, which actually rely on the interaction between the lectin and the bacterial cells. Purely physical entrapment is excluded since BSA saturated beads are ten times less efficient than ConA beads. Chemical binding through the active residues on the beads is impossible since the beads are saturated with ConA, and since untreated beads completely lose their bacterial retention capabilities in a BSA complemented medium whereas ConA beads do not.

With the experimental conditions tested in this study, we obtained a reproducible probability of catching a single bacterium in 5 mL of phosphate buffer of 15 to 70% depending on the strain.

III. Conclusion

This paper presents a set of protocols that can greatly help a research team who would like to work on the lectin-bacteria interaction, and more specifically on the LMS method. From the rational choice of the lectin(s) to use, to the bead preparation optimization in term of lectin biochemical activity and/or in term of bacterial retention, every step of the protocol setup is addressed here. Furthermore, microtube scale experiments confirm the efficiency of these methods, and a way to quantize the LMS efficiency is proposed. All of this consists in the toolkit that the LMS pioneers were lacking to produce reproducible and quantitative results.

References

- Graham, K., Keller, K., Ezzell, J. et Doyle, R., 1984. Enzyme-linked lectinosorbent assay (ELLA) for detecting *Bacillus anthracis*. *Eur J Clin Microbiol* 3(3), 210-212.
- Grant, K. A., Dickinson, J. H., Payne, M. J., Campbell, S., Collins, M. D. et Kroll, R. G., 1993. Use of the polymerase chain reaction and 16S rRNA sequences for the rapid detection of *Brochothrix* spp. in foods. *J Appl Bacteriol* 74(3), 260-267.
- Holm, C. et Jespersen, L., 2003. A flow-cytometric gram-staining technique for milk-associated bacteria. *Appl Environ Microbiol* 69(5), 2857-2863.
- Lee, W., De La Barca, A. M., Drake, D. et Doyle, R. J., 1998. Lectin-oral streptococci interactions. *J Med Microbiol* 47(1), 29-37.
- Patchett, R. A., Kelly, A. F. et Kroll, R. G., 1991. The adsorption of bacteria to immobilized lectins. *J Appl Bacteriol* 71(3), 277-284.
- Payne, M. J., Campbell, S. et Kroll, R. G., 1993. Lectin-magnetic separation can enhance methods for the detection of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteridis* and *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* 1075-83.
- Payne, M. J., Campbell, S. et Kroll, R. G., 1993. Separation of bacteria using agglutinins isolated from invertebrates. *J Appl Bacteriol* 74(3), 276-283.
- Payne, M. J., Campbell, S., Patchett, R. A. et Kroll, R. G., 1992. The use of immobilized lectins in the separation of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria* and *Salmonella* spp. from pure cultures and foods. *J Appl Bacteriol* 73(1), 41-52.
- Pembrey, R. S., Marshall, K. C. et Schneider, R. P., 1999. Cell surface analysis techniques: What do cell preparation protocols do to cell surface properties? *Appl Environ Microbiol* 65(7), 2877-2894.
- Porter, J. et Pickup, R., 1998. Separation of natural populations of coliform bacteria from freshwater and sewage by magnetic-bead cell sorting. *Journal of Microbiological Methods* 33221-226.
- Porter, J., Pickup, R. et Edwards, C., 1997. Evaluation of flow cytometric methods for the detection and viability assessment of bacteria from soil. *Soil Biol. Biochem.* 29(1), 91-100.
- Porter, J., Robinson, J., Pickup, R. et Edwards, C., 1998. An evaluation of lectin-mediated magnetic bead cell sorting for the targeted separation of enteric bacteria. *J Appl Microbiol* 84(5), 722-732.
- Rosenberg, M., Gutnik, D. et Rosenberg, E., 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 929-33.

- Sizemore, R. K., Caldwell, J. J. et Kendrick, A. S., 1990. Alternate gram staining technique using a fluorescent lectin. *Appl Environ Microbiol* 56(7), 2245-2247.
- Sweet, S., Wallace, T. et Samaranayake, L., 1987. Determination of the cell surface hydrophobicity of oral bacteria using a modified hydrocarbon adherence method. *FEMS Microbiol. Lett.* 48159-163.

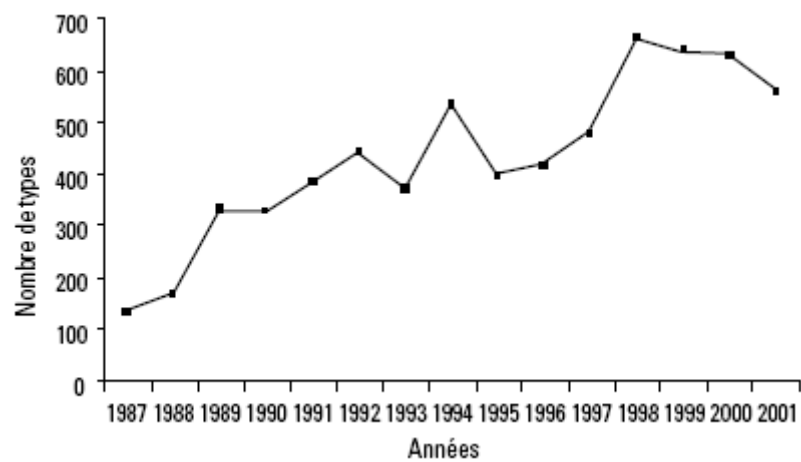


Figure 1. Evolution du nombre de TIAC, toute étiologies confondues, déclarées en France de 1987 à 2001 (d'après [2])

Tableau I. Liste des 26 maladies à déclaration obligatoire, du pathogène mis en cause, et du nombre de déclarations annuelles (d'après les BEH)

Maladie	Type de pathogène	Pathogène	Déclarations
Botulisme	Bactérien	<i>Clostridium</i>	33 (2002)
Brucellose	Bactérien	<i>Brucella</i>	~40
Charbon	Bactérien	<i>Bacillus anthracis</i>	-
Choléra	Bactérien	<i>Vibrio cholerae</i>	8 (2000)
Diphtérie	Bactérien	<i>Corynebacterium</i>	1 (2002)
Fièvres hémorragiques africaines	Viral	Ebola	-
Fièvre jaune	Viral	Arbovirus	0 (2000)
Fièvre typhoïde et paratyphoïdes	Bactérien	<i>Salmonella enterica</i>	92 (2001)
Infection aiguë par le virus de l'hépatite B	Viral		-
Infection par le VIH quel qu'en soit le stade	Viral	VIH	1515 (2002)
Infection invasive à méningocoque	Bactérien	<i>Neisseria meningitidis</i>	678 (2002)
Légionellose	Bactérien	<i>Legionella</i>	1021 (2002)
Listériose	Bactérien	<i>Listeria</i>	187 (2001)
Orthopoxviroses dont la variole	Viral	-	-
Paludisme autochtone	Parasitaire	<i>Plasmodium</i>	3630 (2000)
Paludisme d'importation dans les DOM	Parasitaire	<i>Plasmodium</i>	4489 (2000)
Peste	Bactérien	<i>Yersinia pestis</i>	0 (2000)
Poliomyélite	Viral	Poliovirus	0 (2000)
Rage	Viral	<i>Rhabdoviridae</i>	0 (2000)
Saturnisme de l'enfant mineur	Chimique	Plomb	~2500
Suspicion de maladie de Creutzfeldt-Jakob et autres Encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles humaines	Bio-chimique	Protéine PrPsc	1103 (2001)
Tétanos	Bactérien	<i>Clostridium tetani</i>	26 (2001)
Toxi-infection alimentaire collective	Variable	-	559 (2001)
Tuberculose	Bactérien	<i>Mycobacterium</i>	6322 (2002)
Tularémie	Bactérien	<i>Francisella tularensis</i>	-
Typhus exanthématique	Bactérien	<i>Rickettsia prowazekii</i>	-

K 1 "Je vais vous citer différents risques pour la santé ou la sécurité des personnes. Pour chacun d'eux vous me donnerez une note de 1 à 10. 1 si vous estimez que ce risque n'est pas du tout important et 10 s'il est très important, les notes intermédiaires vous permettant de nuancer votre jugement".

Notes moyennes sur 10		TOTAL ECHANTILLON		
		2000	2001	2002
Bases		1007	1002	1005
Le sida	8,6	8,5	8,8	
La drogue	8,8	8,5	8,7	
L'abus d'alcool.....	7,9	7,9	8,3	
Le tabac	8,1	7,9	8,2	
La violence urbaine.....	7,8	7,8	7,9	
La circulation routière	7,4	7,5	7,9	
La pollution de l'environnement.....	7,6	7,6	7,7	
La mauvaise qualité sanitaire de l'alimentation	7,1	7,1	7,2	
Une alimentation déséquilibrée : excès de graisse, sucre, sel.....	6,7	6,8	6,8	
Le stress de la vie moderne	6,7	6,8	6,7	
Les accidents du travail	6,1	6,1	6,6	
MOYENNE DES RISQUES		7,5	7,5	7,7

(x) = Écarts significatifs par rapport à l'année précédente

Figure 2. Classement de la mauvaise qualité sanitaire des aliments parmi les risques pour la santé (sondage français [12])

Q : Voici les critères de qualité des aliments. Pouvez-vous me dire quel est pour vous le plus important, puis quel est celui que vous classez en deuxième position et en troisième position ?

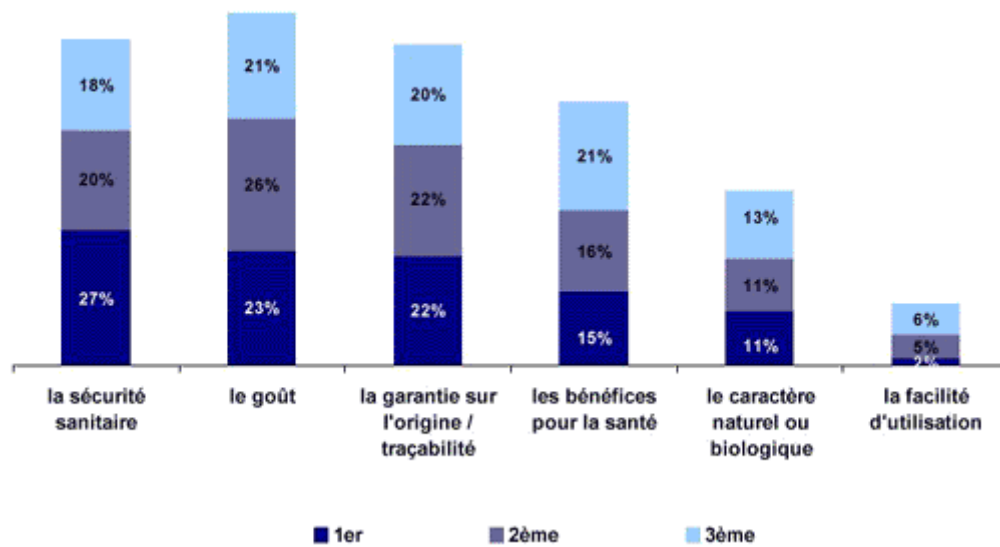


Figure 3. Les critères de qualité des aliments pour les Français (d'après [15])

Tableau II. Instances nationales et internationales de veille et de contrôle sanitaire

Echelle	Veille sanitaire	Contrôle Sanitaire	
		Agro-alimentaire	Pharmaceutique
Française	 INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE	 afssa Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments	 AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES PRODUITS DE SANTÉ
Européenne	 Direction Générale Santé et Protection des Consommateurs Réseau financé par la DG SANCO	 EFSA Agence européenne pour la sécurité de la chaîne alimentaire	 ema Agence européenne pour l'évaluation des médicaments
Mondiale	 WORLD HEALTH ORGANIZATION ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ	 WORLD HEALTH ORGANIZATION ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ FIAT PANIS Etablissement de normes (Codex Alimentarius)	 WORLD HEALTH ORGANIZATION ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ Etablissement de normes (ICH)

Tableau III. Coût estimé par habitant et par an des maladies infectieuses bactériennes d'origine alimentaire.

	Coût par habitant et par an en US\$
Australie[20]	80
Canada[21]	32
N.-Zélande[22]	68
Royaume-Uni[23]	11*
Suède[24]	14
USA[19]	25

* Ne porte que sur les salmonelloses

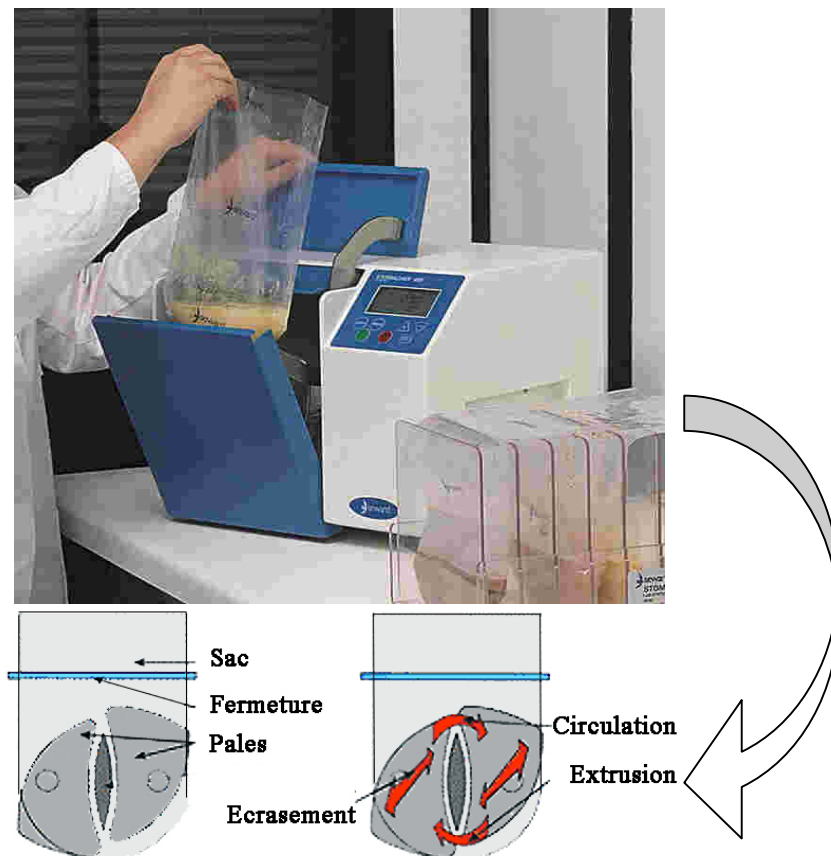


Figure 4. Schéma de principe du fonctionnement du Stomacher

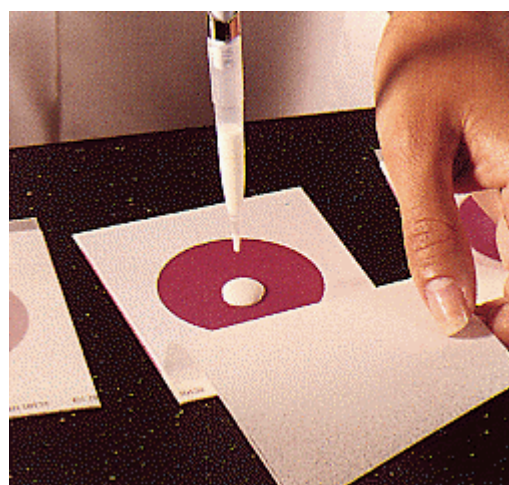


Figure 5. Système Petrifilm

Tableau IV. Liste des méthodes validées AFNOR par type de méthode (d'après [32])

Recherche ou dénombrement de	Salmonella	Listeria (genre)	Listeria monocytogenes	Entérobactéries	Coliformes	E. coli	E. coli O157	Flore totale	Antibiotiques
Méthode prise en référence Type de méthode	ISO 6579 NF EN 12824 (V 08-013)	V 08-055	V 08-055 NF EN ISO 11290-1 (V 08-028-1)	NF ISO 7402 (V 08-021)	NF ISO 4831 (V 08-016) NF ISO 4832 (V 08-015) NF V08-017	NF ISO 4832 (V 08-016) NF V 08-017	Méthode BAM 1992	ISO 4833 FIL 100A	Méthode officielle JO 6.10.83
Milieux de culture	Sprint Salmonella *		Rapid'L Mono (recherche) Rapid'L Mono (dénombrement) ALOA/L Mono disk Chromagar™ Listeria	Petrifilm Enterobacteriaceae	Petrifilm Coliformes Petrifilm P2000 Petrifilm haute sensibilité coliformes à 30°C	Petrifilm E. coli Rapid'E. coli Gélose Coli-ID		Petrifilm flore totale	
Test immunologique	Salmonella Rapid Test Dynabeads Salmonella	Listeria rapid test					Dynabeads E. coli O157		
Réaction enzymatique									Penzym *
Réaction bactérienne									T 101 *
Bio-récepteurs									Béta Star *
Test immuno-enzymatique	Vidas Salmonella Transia Plate Salmonella Gold Transia Plate Salmonella SEP Kit TECRA Kit Locate Maxaryme Salmonella Vidas ICS-SLM Vidas ICS boîte EiaFoss	Vidas Listeria Transia Plate Listeria	Vidas Listeria monocytogenes				Vidas ECO ICE		
Test d'hybridation moléculaire	Lumiprobe 24 Salmonella *		Genetrak Listeria monocytogenes Accuprobe Listeria monocytogenes Probelia Listeria monocytogenes						
PCR	Probelia Salmonella Système BAX Salmonella								

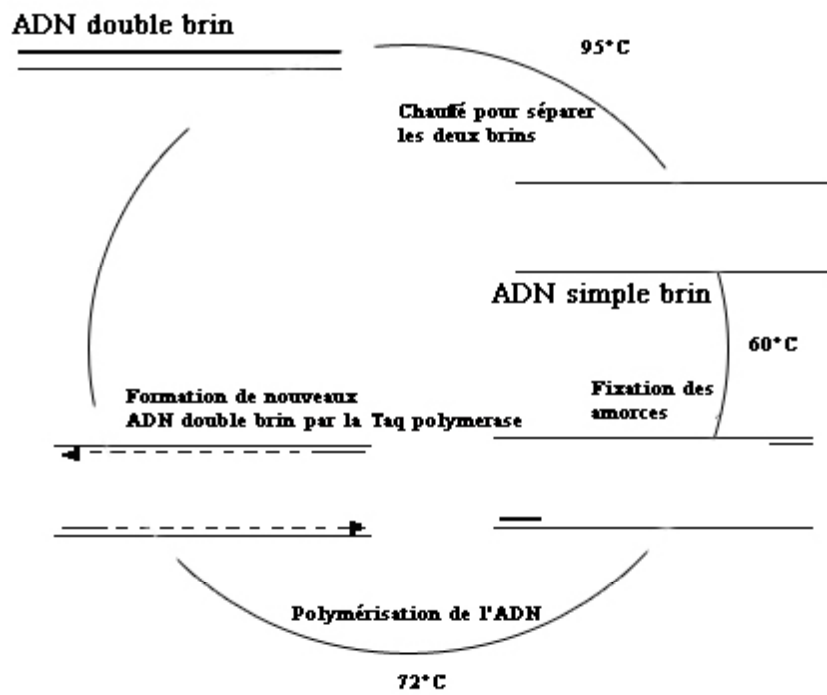


Figure 6. Schéma de principe de la PCR

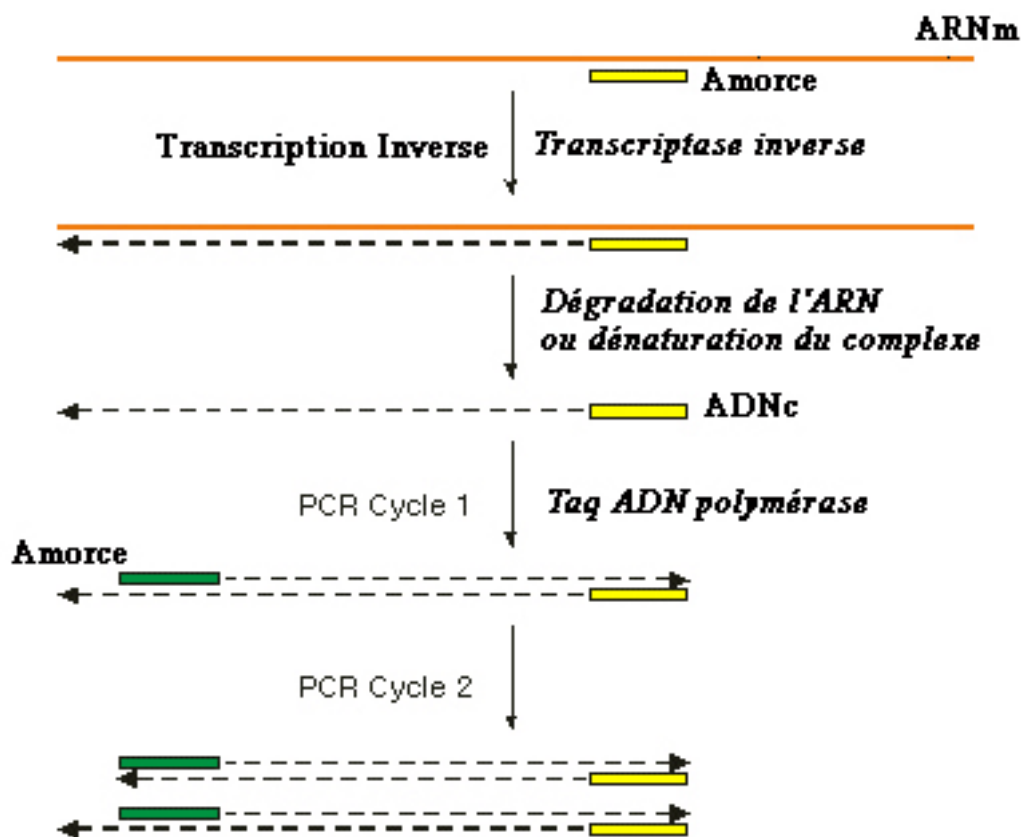


Figure 7. Schéma de principe de la RT-PCR

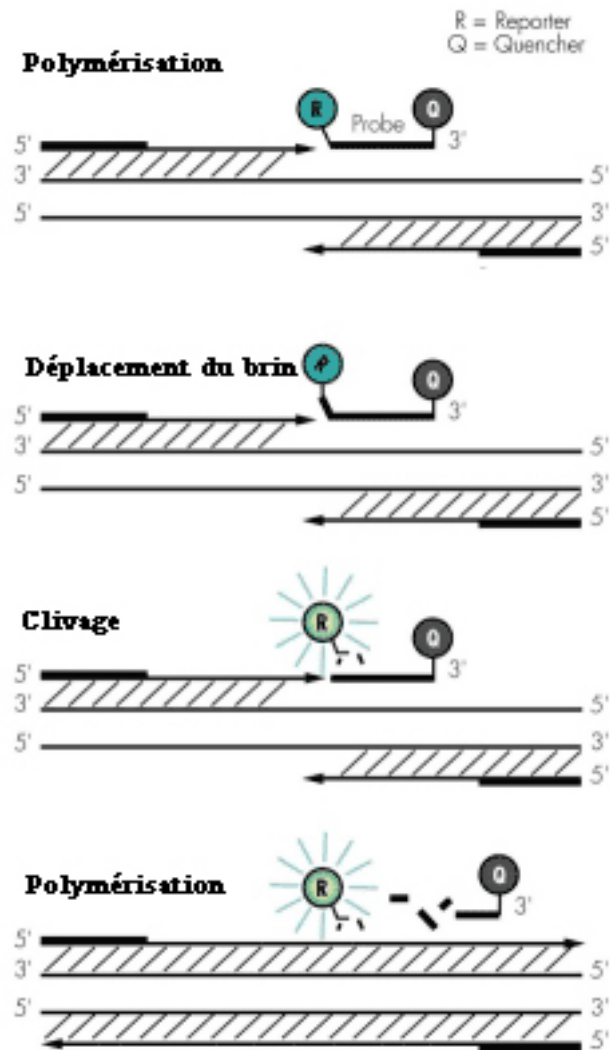


Figure 8. Schéma de principe de la PCR en temps réel

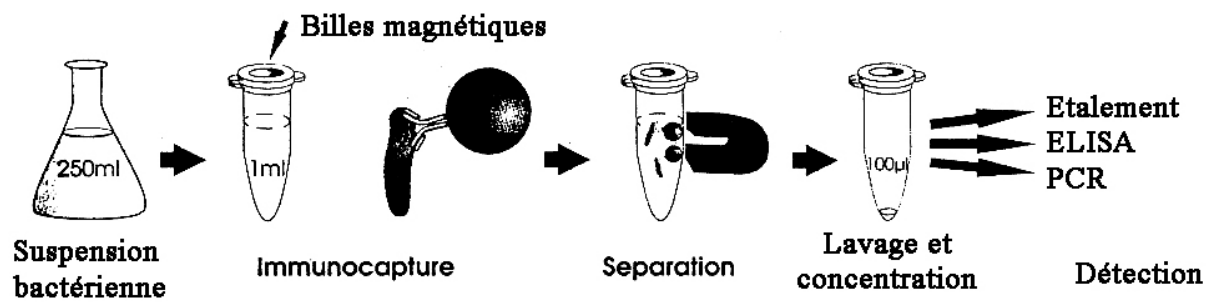


Figure 9. Schéma de principe de la capture immuno-magnétique (IMS)

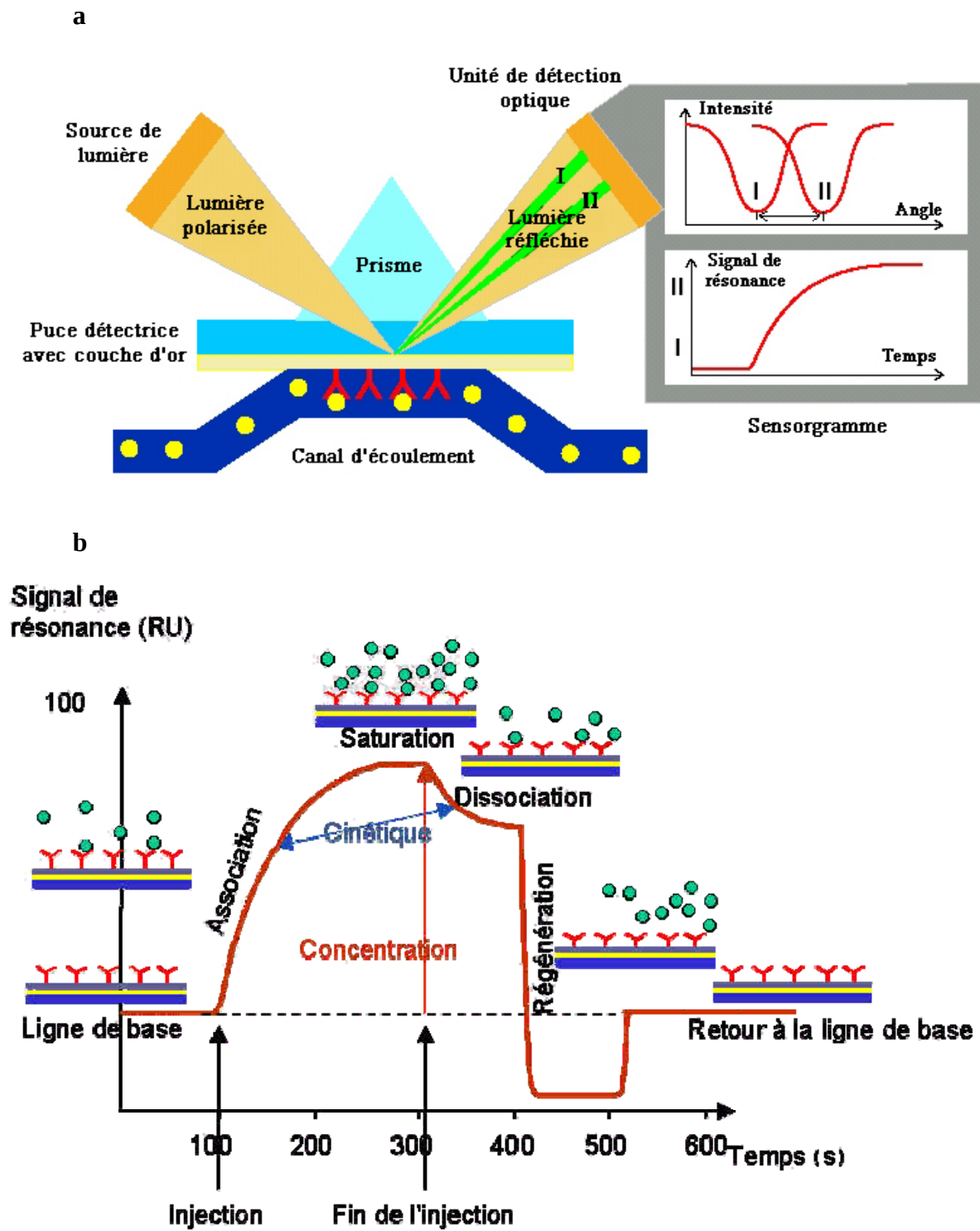


Figure 10. Schéma de principe du BIAcore

a : Schéma explicatif du principe de détection par résonance plasmonique de surface

b : Schéma d'un sensorgramme, associant le phénomène biochimique à la surface du capteur

Tableau V. Principaux essais basés sur des lectines mettant en jeu des bactéries pathogènes

Bactérie	Références
<i>Bacillus spp.</i>	[129, 130, 131, 132]
<i>Staphylococcus spp.</i>	[133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140]
<i>Streptococcus sp.</i>	[141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153]
<i>Corynebacterium diphteriae</i>	[137, 148]
<i>Listeria monocytogenes</i>	[154, 155]
<i>Salmonella spp.</i>	[156, 157]
<i>Shigella sp.</i>	[158, 159]
<i>Yersinia sp.</i>	[160]
<i>Erwinia amilovora</i>	[160]
<i>Proteus spp.</i>	[162]
<i>Escherichia coli</i>	[161, 162, 163, 164]
<i>Klebsiella spp.</i>	[165]
<i>Pseudomonas spp.</i>	[166]
<i>Neisseria spp.</i>	[161, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177]
<i>Brucella spp.</i>	[178]
<i>Campylobacter spp.</i>	[179, 180, 181]
<i>Haemophilus spp.</i>	[182, 183]
<i>Pasteurella haemolytica</i>	[184]
<i>Legionella spp.</i>	[185]
<i>Chlamydia spp.</i>	[186]
<i>Mycobacterium spp.</i>	[187, 188]
<i>Neisseria meningitidis</i>	[161]

Tableau VI. Principales méthodes d'analyse rapide (adapté de [32])

Méthode	Principe	Sensibilité	Temps d'analyse sans l'enrichissement	Avantages	Inconvénients
Impédancemétrie	Détection du changement des caractéristiques électriques du milieu lié à une croissance microbienne	Théoriquement un micro-organisme par prise d'échantillon	24 à 48 heures	Automatisable, peut traiter simultanément beaucoup d'échantillons ; quantitative	Investissement important, peu spécifique (dépend du milieu utilisé)
ATPmétrie	Détection par bioluminescence de l'ATP microbien	10^{-15} mole d'ATP, soit quelques dizaines de levures ou quelques centaines de bactéries	15 minutes	Très rapide, peu coûteuse, quantitative, très utile pour le contrôle d'hygiène	Non spécifique, très sensible aux effets de matrice (présence d'ATP non microbien)
Épifluorescence (DEFT)	Filtration de l'échantillon, coloration des micro-organismes par un colorant fluorescent, observation en épifluorescence réfléchie	Dépend de la filtration du produit, peut descendre à une cellule/ml	1 heure	Très sensible, peu coûteuse, quantitative	Ne concerne que les produits filtrables ou liquéfiables ; investissement important pour une installation automatisée, sinon fastidieux
Cytométrie en flux	Coloration des échantillons par un colorant fluorescent, alignement dans un flux laminaire et détection par un photomultiplicateur	10^2 à 10^3 cellules/ml après optimisation de la préparation de l'échantillon	2 heures	Automatisable, sensible, quantitative	Préparation d'échantillon assez lourde, investissement important
Sondes nucléiques	Hybridation d'un segment d'ADN ou d'ARN spécifique par une sonde marquée	10^5 à 10^6 cellules/ml	6 heures	Très spécifique, Peu d'investissement Qualitative	Peu sensible, coûteuse
Sondes nucléiques plus amplification	Amplification <i>in vitro</i> de fragments spécifiques d'ADN par PCR, LCR, RT-PCR,...	Théoriquement une copie d'ADN par prise d'échantillon	4 heures	Très sensible, très spécifique, rapide Quantitative	Très sensible à la contamination croisée, coûteuse, d'emploi très délicat, très sensible aux effets de matrice.
Méthodes immunologiques	Exploitent la spécificité antigène-anticorps, avec révélation par marquage de l'anticorps (RIA, FIA, Elisa) ou non : détection par effet piézo-électrique, résonance plasmonique de surface, microscopie de force atomique,...	Dépend essentiellement de la méthode de révélation : 10^4 à 10^6 cellules/ml en Elisa	7 minutes à 4 heures	Spécifique, rapide, peu d'investissement, facile d'emploi, qualitative	Spécificité parfois insuffisante ; malgré de gros progrès, il reste un taux de faux positifs et faux négatifs non nul.

Tableau VII. Prix indicatif des lectines et anticorps utilisées au cours de ces travaux.

Lectine (nom ou organisme d'origine)	Prix (/5mg)
Concanavalin A	2,5 €
<i>Lathyrus odoratus</i>	246 €
<i>Lens culinaris</i>	116 €
WGA	49 €
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	111 €
Anticorps anti Lipide A (Gram négatifs)	2140 €
Anticorps anti Gram positifs	1860 €

Les prix indiqués sont ceux pratiqués par les fournisseurs (sigma et interchim respectivement pour les lectines et les anticorps) au moment de la réalisation des travaux. Ils sont calculés sur la base d'une quantité de 5mg ou, à défaut, au prix pour 5 mg extrapolé à partir de la quantité la plus proche disponible.

Ces prix ne sont donnés qu'à titre indicatif, puisque le degré de pureté ainsi que l'activité de chacun de ces produits sont difficilement comparables.

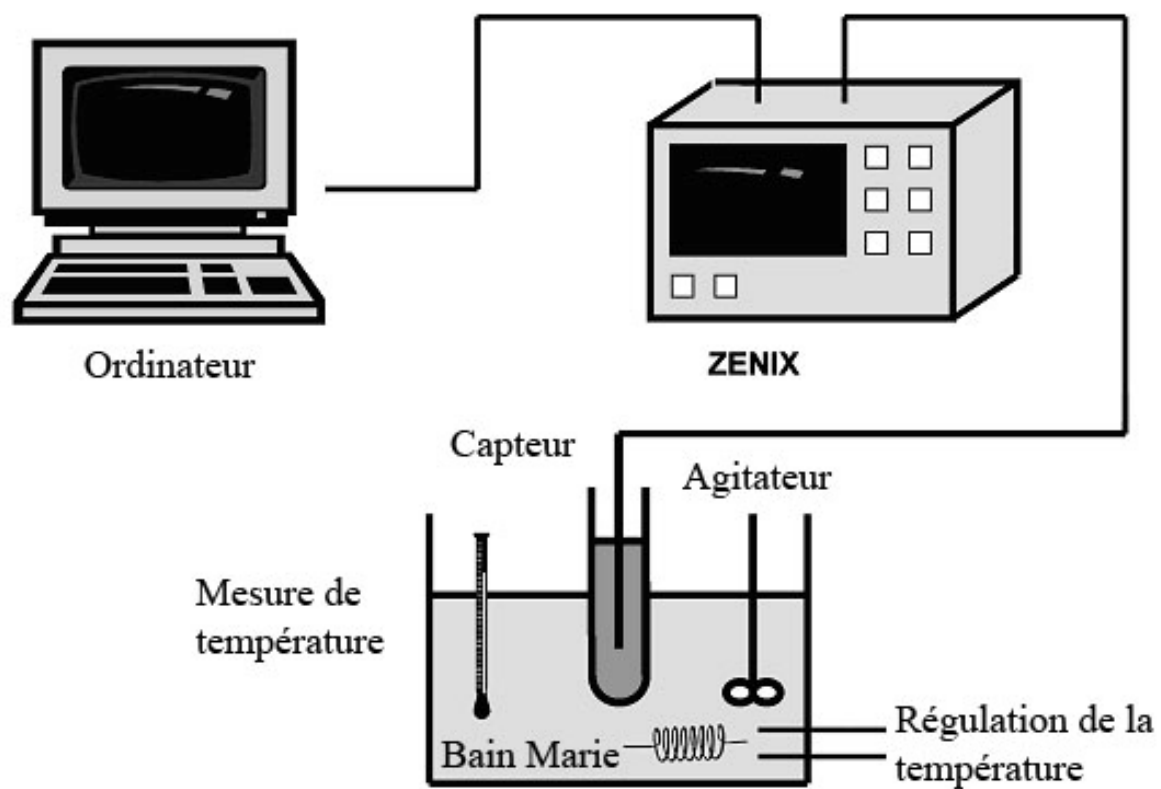


Figure 11. Le dispositif Zenix

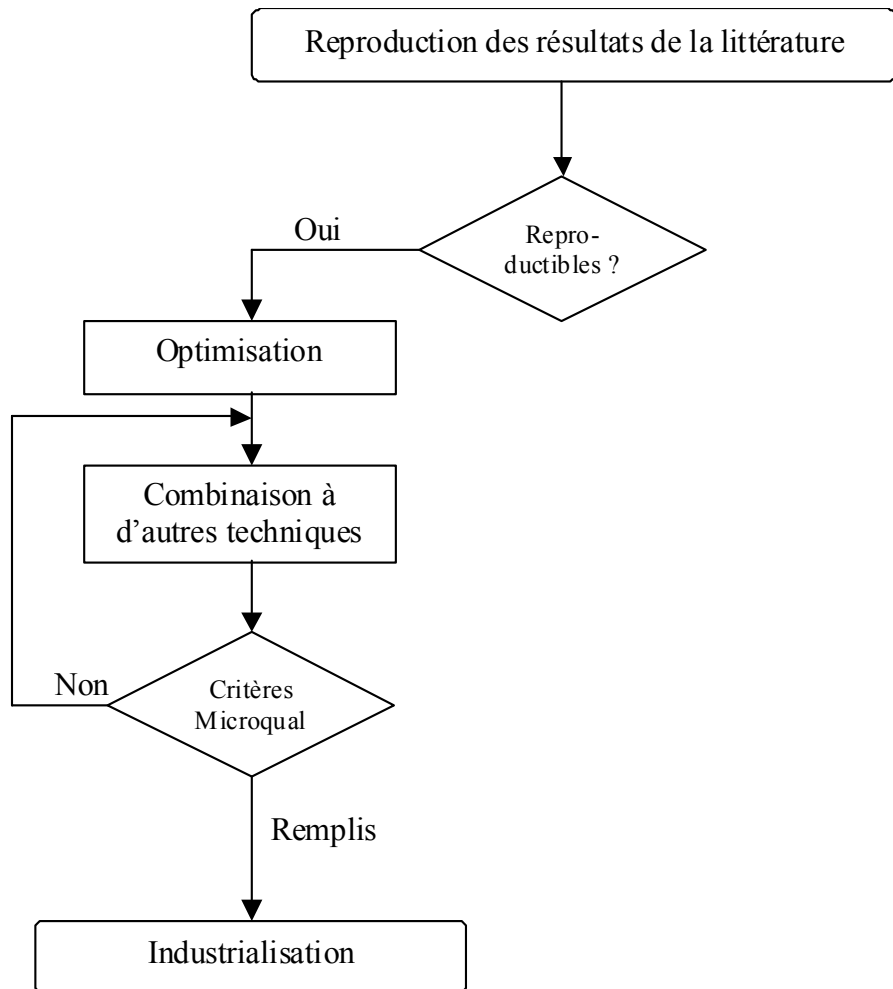


Figure 12. Méthodologie prévue pour la mise au point d'un piège bactérien basé sur les lectines

Ce diagramme schématise le déroulement du projet tel que planifié avant l'obtention des premiers résultats expérimentaux.

Tableau VIII. Liste des souches bactériennes utilisées et de leur abréviation

	Référence CIP (Collection de l'Institut Pasteur)	Abréviations	Température optimale de croissance
<i>Serratia marcescens</i>	53.90	Sm ou S	30°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	53.156	Sa	37°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A22	Pyo	30°C
<i>Bacillus cereus</i>		Bc	30°C
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	53.124	Se	37°C
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	69.13	Pf	30°C
<i>Enterococcus faecalis</i>	76.117	Ef	37°C
<i>Enterobacter sakazakii</i>	57.33	Es	37°C

Tableau IX. Inhibition des lectines de légumineuses par les constituants de la structure pariétale bactérienne (d'après [193])

Lectine		Spécificité Concentration inhibitrice (mM)											
		MeMan	Man	Glc	GlcNH ₂	GlcNAc	MurAC	MurNAc	NeuAc	Gal	GalNH ₂	GalNAc	Fuc
LaphL	Glc/Man	0,62	0,62	5,0	2,5	0,62	0,41	1,65	3,3	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
LartL	-	0,62	1,87	10,0	5,0	2,5	0,82	3,3	3,3	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
LcicL	-	0,62	1,25	5,0	2,5	2,5	0,82	3,3	3,3	3,3	3,3	>10,0	>10,0
LoLI	-	0,21	1,65	3,3	10,0	10,0	0,41	3,3	3,3	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
LoLI	-	0,21	1,65	1,65	10,0	10,0	1,65	3,3	3,3	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
LniLI	-	1,25	2,5	10,0	5,0	5,0	1,65	3,3	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
LniLI	-	2,5	5,0	10,0	10,0	5,0	1,65	3,3	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
LtinL	-	0,41	1,65	5,0	10,0	5,0	0,21	1,65	1,65	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
PsA	-	0,21	1,65	5,0	10,0	5,0	0,41	0,82	0,82	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
LcA	-	0,82	3,3	10,0	>10,0	10,0	3,3	3,3	0,82	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
Con A	-	0,078	0,31	10,0	5,0	0,31	>10,0	3,3	3,3	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
Con B	-	0,31	2,5	10,0	>10,0	>10,0	>10,0	10,0	3,3	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
CrIL	-	1,25	2,5	5,0	5,0	5,0	>10,0	5,0	5,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
DgrL	-	0,62	1,25	10,0	10,0	10,0	>10,0	5,0	1,65	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
DbL	Gal/GalNAc	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	1,65	1,65	0,21	0,41	1,65	0,21	>10,0
PhluL	-	10,0	10,0	10,0	1,25	10,0	5,0	5,0	2,5	5,0	2,5	2,5	10,0
EcoL	-	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	3,3	1,65	3,3	0,41	10,0
BfL	-	>10,0	>10,0	10,0	>10,0	10,0	1,65	0,82	1,65	1,65	1,65	0,21	>10,0
SBA	-	>10,0	>10,0	10,0	>10,0	>10,0	1,65	1,65	3,3	0,82	0,82	0,05	>10,0
SjA	-	>10,0	>10,0	>10,0	10,0	>10,0	>10,0	5,0	1,25	10,0	10,0	0,31	>10,0
WfIL	-	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	10,0	>10,0	3,3	>10,0	>10,0	0,16	>10,0
UEAII	GlcNAc	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	10	2,5	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
UEAI	Fuc	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	3,3	10,0	>10,0	10,0	>10,0	0,62
LtetL	-	10,0	>10,0	>10,0	>10,0	10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	0,16

L'activité inhibitrice correspond à la concentration la plus faible (en mM) de l'ose ou du dérivé qui inhibe 4 unités d'hémagglutination, telles que définies dans [193]. En d'autres termes, les chiffres indiqués dans ce tableau sont inversement proportionnels à l'affinité des lectines pour les composés sucrés.

Légendes

MeMan :	α -D-mannopyranoside
Man :	Mannose
Glc :	Glucose
GlcNH ₂ :	Glucosamine
GlcNAc :	N-acétyl-glucosamine
MurAC :	Acide Muramique
MurNAc :	Acide N-acétylmuramique
NeuAc :	Acide sialique
Gal :	Galactose
GalNH ₂ :	Galactosamine
GalNAc :	N-acétylgalactosamine
Fuc :	L-Fucose

Espèces

Lathyrus aphaca
L. articulatus
L. cicera
L. ochrus

L. nissolia

L. tingitanus
Pisum sativum (Pois)
Lens culinaris (Lentille)
Canavalia ensiformis
Canavalia brasiliensis
Cratylia floribunda
Dioclea grandiflora
Dolichos biflorus (Dolique)
Phaseolus lunatus
Erythrina corallodendron
Butea frondosa
Glycine max (Soja)
Sophora japonica
Ulex europaeus (Ajonc)

Lotus tetragonolobus

Lectines/ isolectines

LaphL
LartL
LcicL
LoLI
LoLI
LniLI
LniLI
LtinL
PsA
LcA
Con A
Con B
CrIL
DgrL
DbL
PhluL
EcoL
BfL
SBA
SiA
UEA I
UEA II
LtetL

Tableau X. Parallèle entre les résultats d'agglutination et d'affinité biochimiques des lectines.

a. Inhibition de lectines par les constituants de la paroi bactérienne (d'après [193], voir Tableau IX).

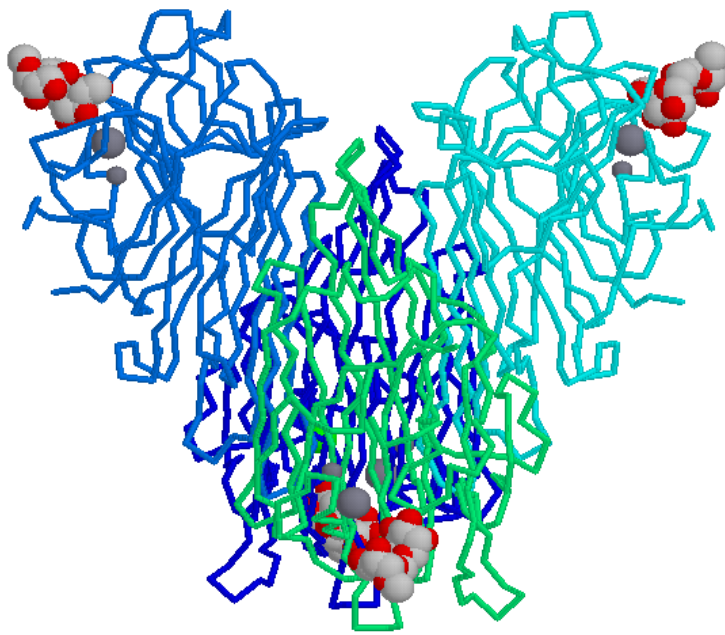
Lectine	Spécificité	Concentration inhibitrice (mM)											
		MeMan	Man	Glc	GlcNH ₂	GlcNAc	MurAC	MurNAc	NeuAc	Gal	GalNH ₂	GalNAc	Fuc
LcA	Glc/Man	0,82	3,3	10,0	>10,0	10,0	3,3	3,3	0,82	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
Con A	-	0,078	0,31	10,0	5,0	0,31	>10,0	3,3	3,3	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
DSA	GlcNAc	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	2,5	2,5	>10,0	>10,0	>10,0	-
LEA	-	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>5,0	>5,0	>10,0	>10,0	>10,0	-
STA	-	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>5,0	>5,0	>10,0	>10,0	>10,0	-

b. Résultats semi-quantitatifs d'agglutination bactérienne (d'après [205])

	LEA	STA	DSA	ConA	LcA
<i>Escherichia coli</i>					
ED8654	+	0	++	++	+++
AB1157	0	0	++	++	++
220	0	0	++	+	++
D53	0	+	++	+	++
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	ND	ND	ND	++	+++
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	0	+	++	++
<i>salmonicida</i>	ND	+	++	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	+	+	+++	++
<i>cloacae</i>	+	++	+	+++	0
<i>Salmonella pullorum</i>	+	0	+	+	0
<i>Erwinia herbicola</i>	0	++	++	0	++
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	+	+	+	++
<i>putida</i>	0	0	0	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	+	+	+++
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	+
30-0-1	0	ND	ND	ND	+++
30-0-46	+	++	++	++	++
<i>Arthrobacter globiformis</i>	+	0	+	++	++

Légende : 0, pas d'agglutination ; +, agglutination faible ; ++, agglutination ; +++, forte agglutination ; ND, non déterminé.

Source des lectines : LEA, *Lycopersicum esculentum* ; STA, *Solanum tuberosum* ; DSA, *Datura stramonium* ; ConA, *Canavalia ensiformis* ; LcA, *Lens culinaris*.



- Poids moléculaire : 104kDa
- Chaînes : 4
- Sous-unités : 4
- Spécificité :
Résidus α -D-mannosyl
et α -D-glucosyl

Figure 13. Structure 3D de la ConA, complexée avec du α Man(1-6) α Man-Ome (PDB : 1QDC), et ses caractéristiques moléculaires principales

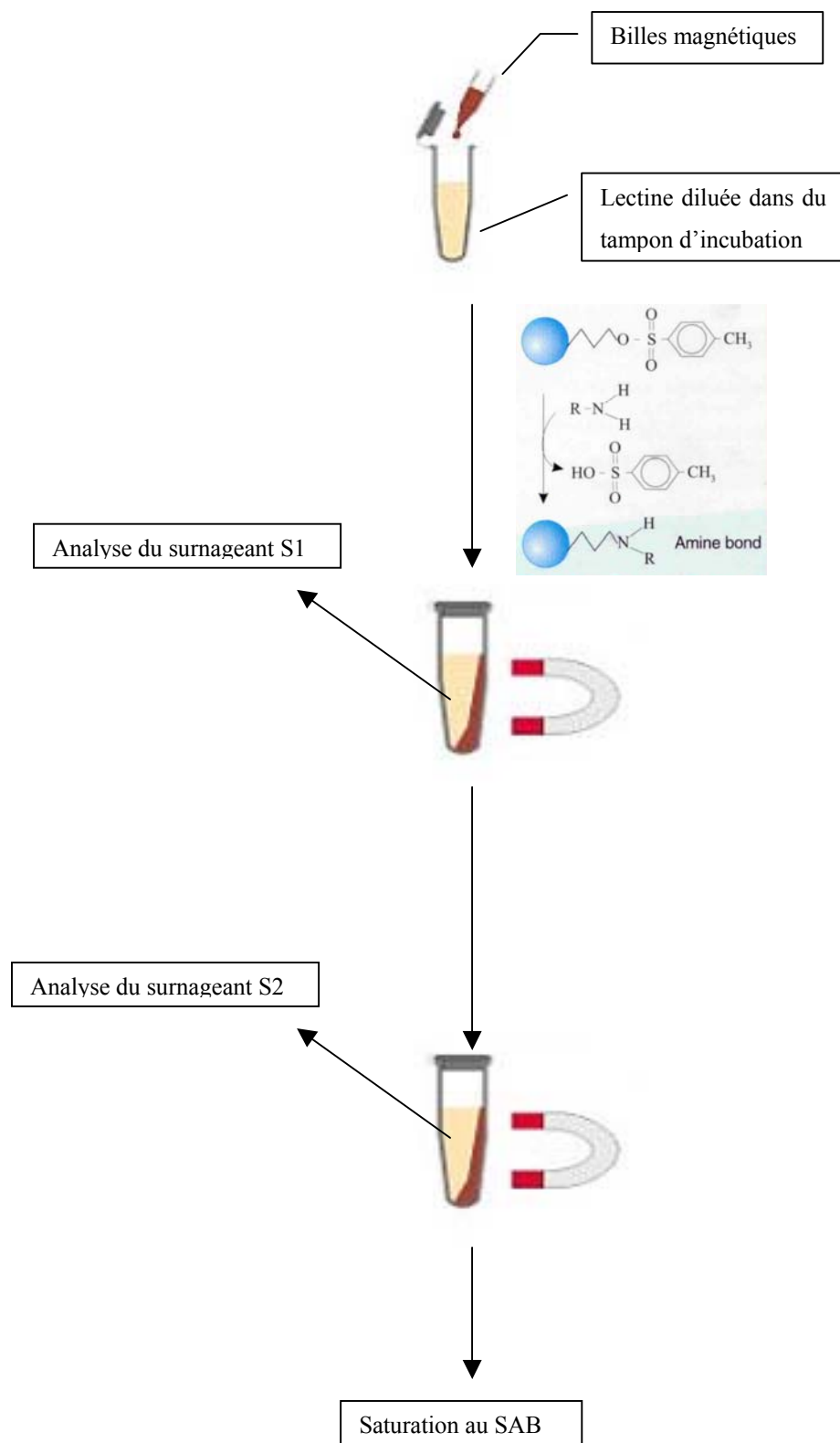


Figure 14. Protocole d'étude de la fixation bille-lectine

Tableau XI. Facteurs et niveaux du plan expérimental (étude de la fixation lectines-billes)

	Nombre d'expériences	6	18	6
	Niveaux	-	0	+
pH		6,9	8,2	9,5
Température (°C)		25	31	37
Quantité de lectines incubées rapportée au nombre de billes ($\mu\text{g}/10^7$ billes)		3	9	15
Concentration initiale en billes ($10^9/\text{mL}$)		1	1,5	2

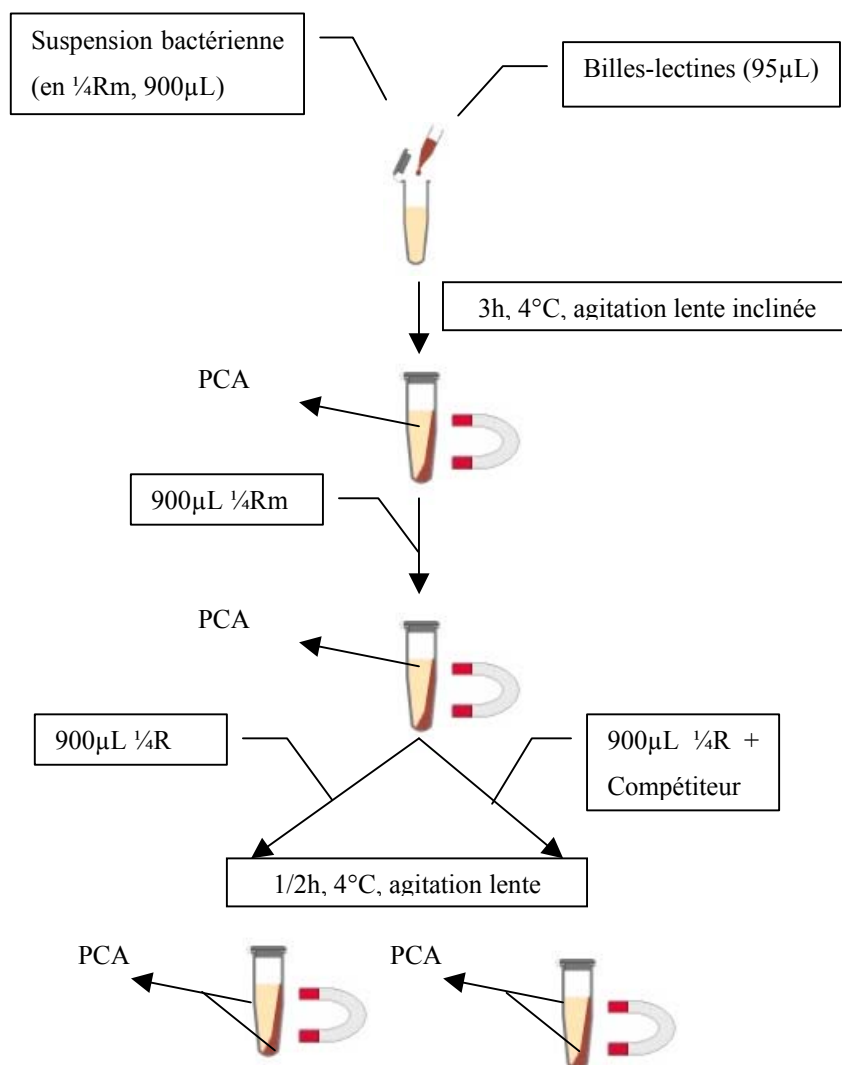


Figure 15. Protocole d'étude du piègeage bactérien par les billes-lectines

¼R : Ringer au quart ([199], voir matériels et méthodes)

¼Rm : ¼R modifié ([199], voir matériels et méthodes)

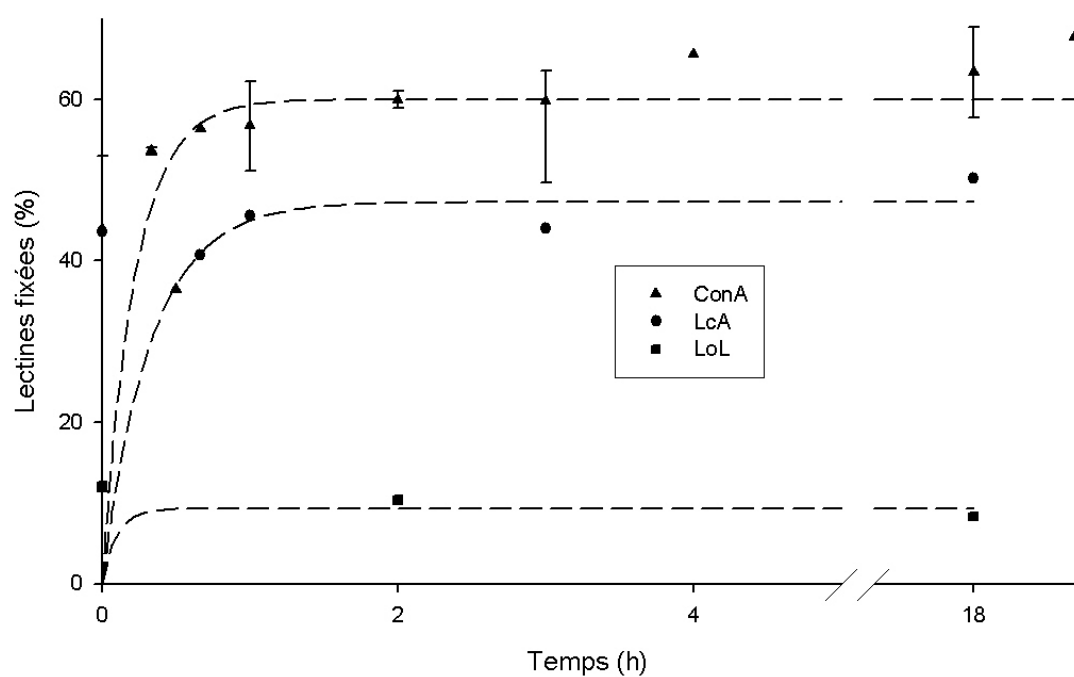


Figure 16. Cinétique de fixation des lectines aux billes paramagnétiques.

Les barres d'erreur représentent les maximum et minimum obtenus.

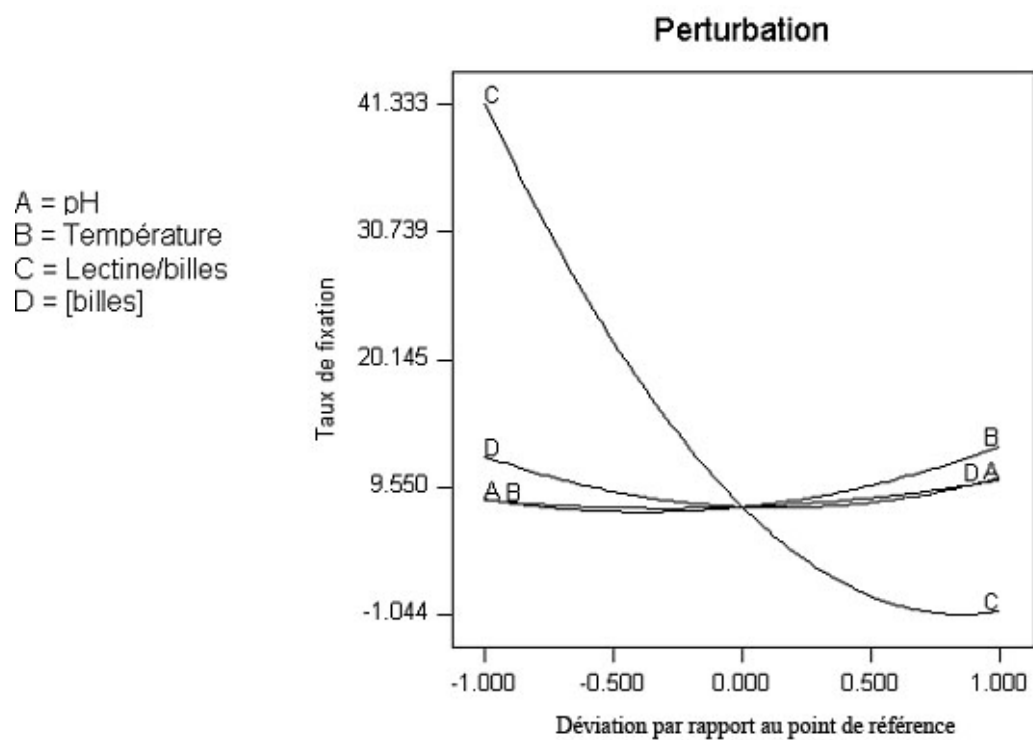


Figure 17. Effet de différents paramètres sur le taux de fixation des lectines sur les billes magnétiques

Tableau XII. Composition finale de la solution réactionnelle pour la capture bactérienne par les complexes billes-lectines (protocole Kroll [199])

Composé ionique	Concentration finale (mmol/L)
Na_2HPO_4	7,3
NaH_2PO_4	2,9
NaCl	48
KCl	1
CaCl	0,59
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	1,8
MgCl_2	0,09
MnSO_4	0,09

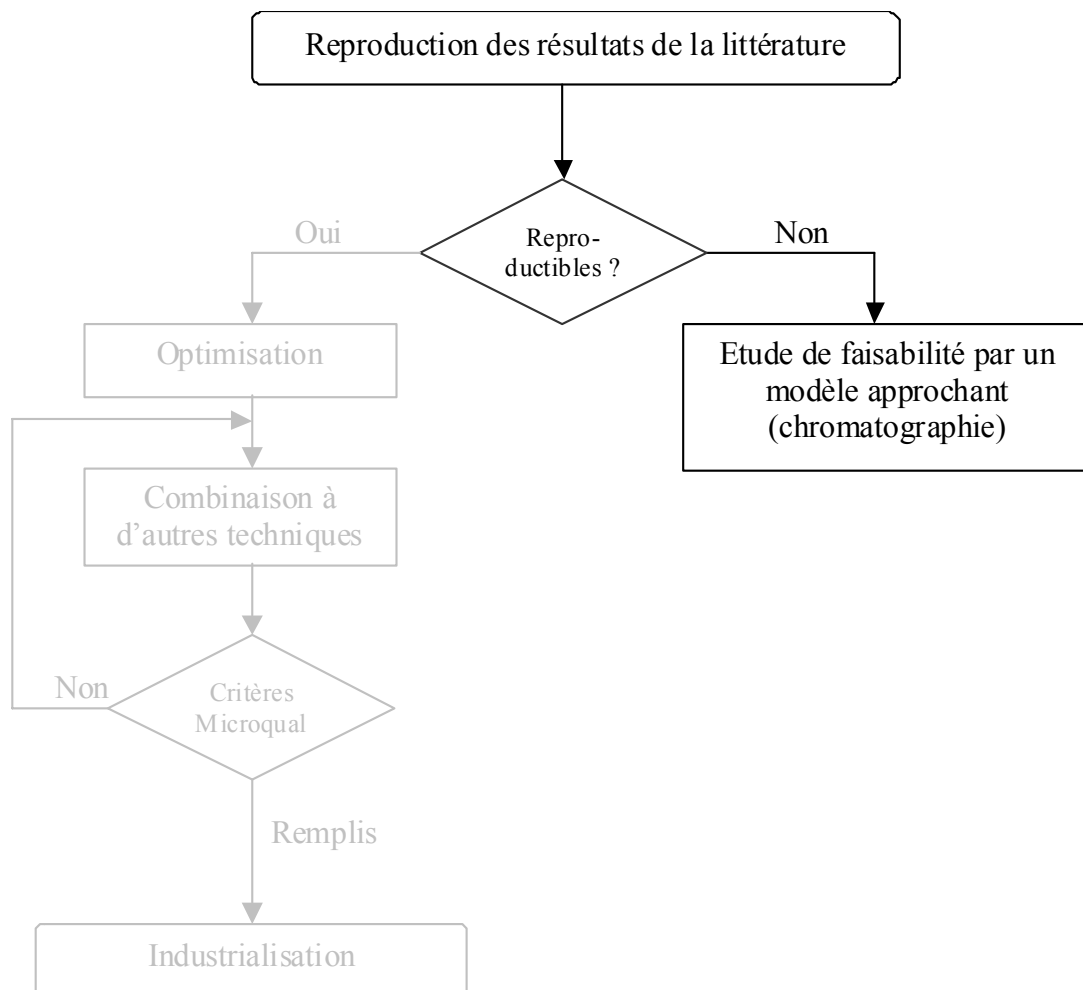


Figure 18. Evolution de l'orientation du projet (chromatographie)

La non reproductibilité des résultats de la bibliographie a entraîné une réorientation complète du projet vers une étude plus fondamentale de faisabilité. Celle-ci s'est faite dans un premier temps par l'utilisation d'un modèle d'étude de l'interaction « support solide – lectine – bactérie » reposant sur une approche chromatographique.

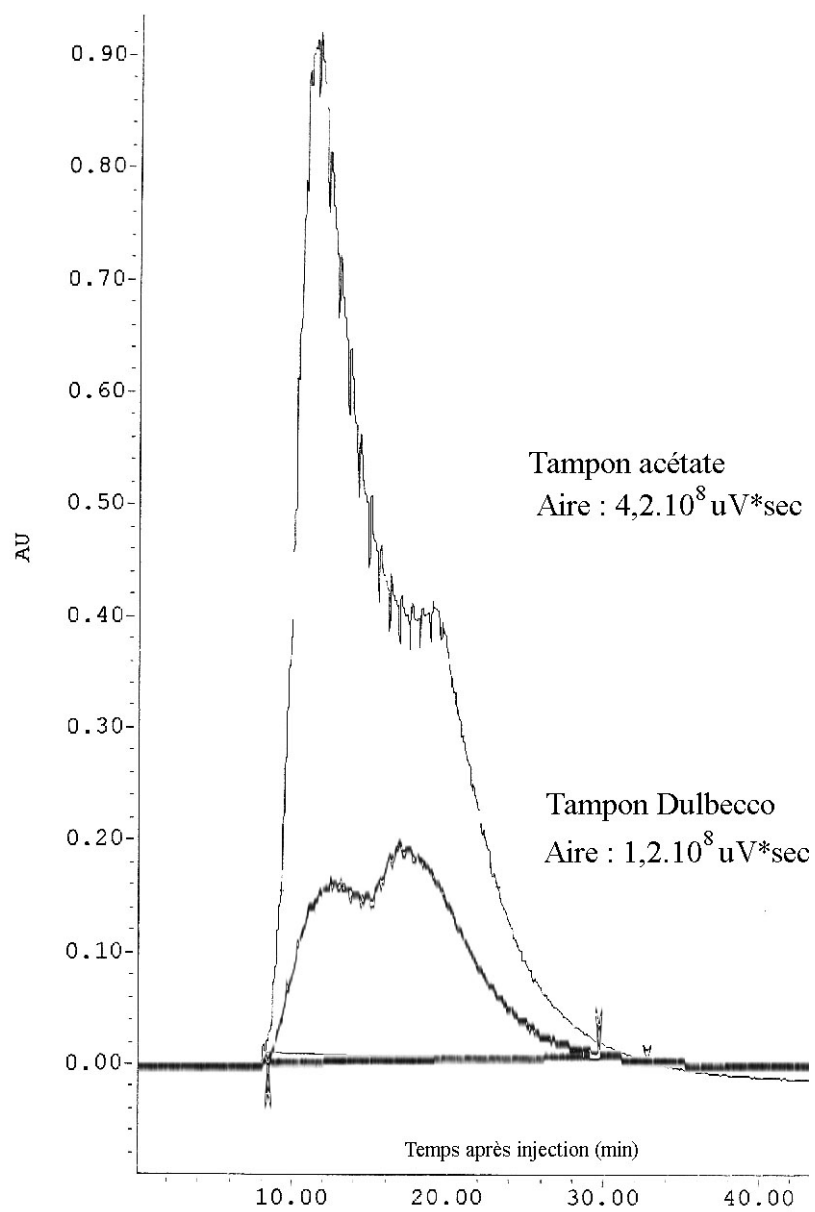


Figure 19. Chromatogrammes superposés de la fixation de thyroglobuline sur gel d'agarose-ConA en fonction du tampon utilisé

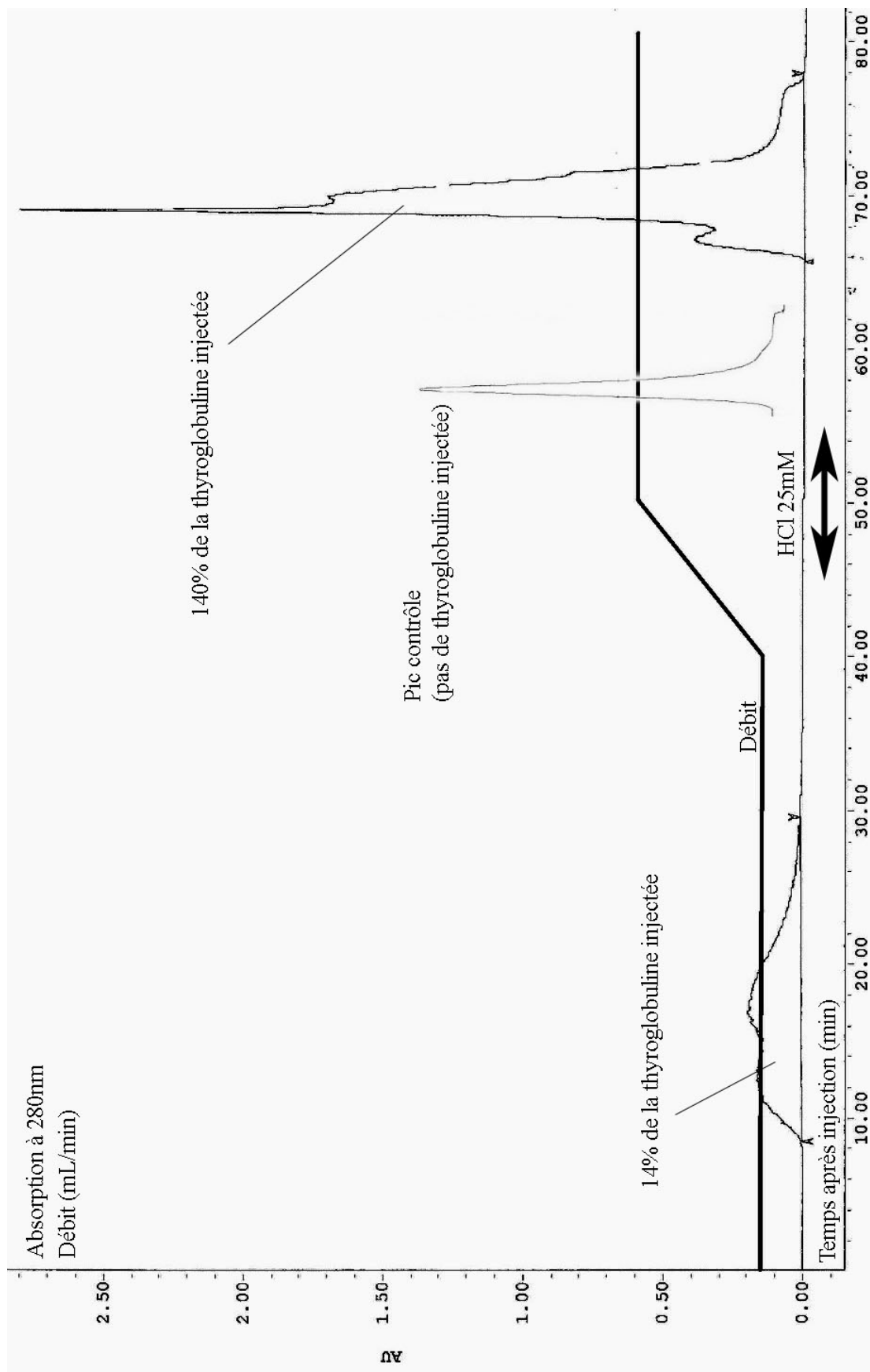


Figure 20. Pic d'élution induit par l'acide chlorhydrique 25mM

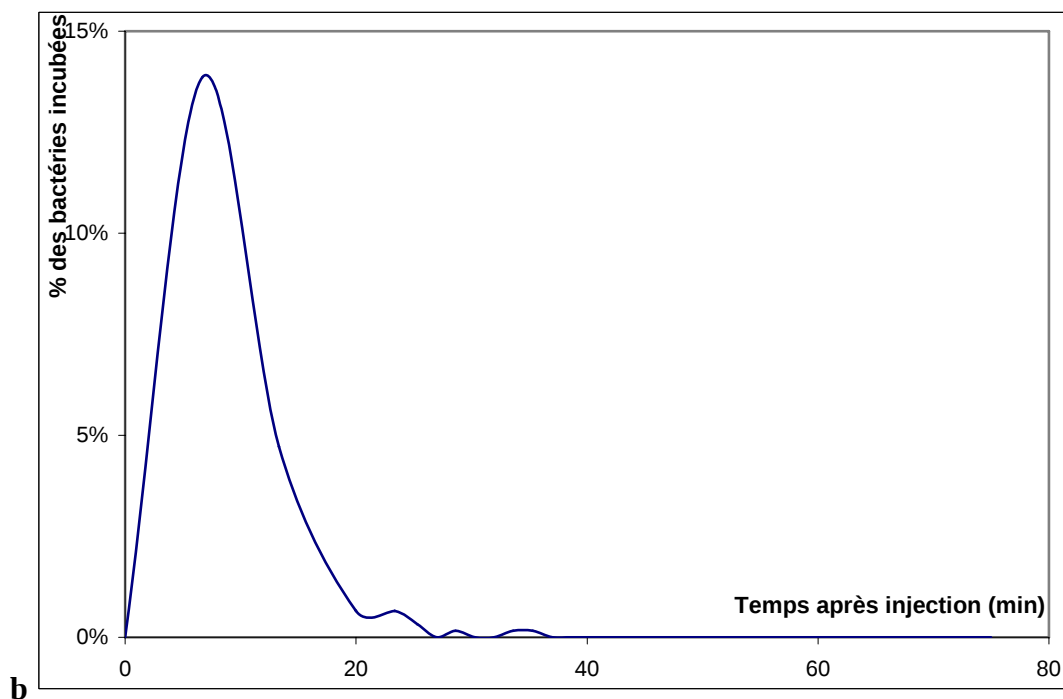
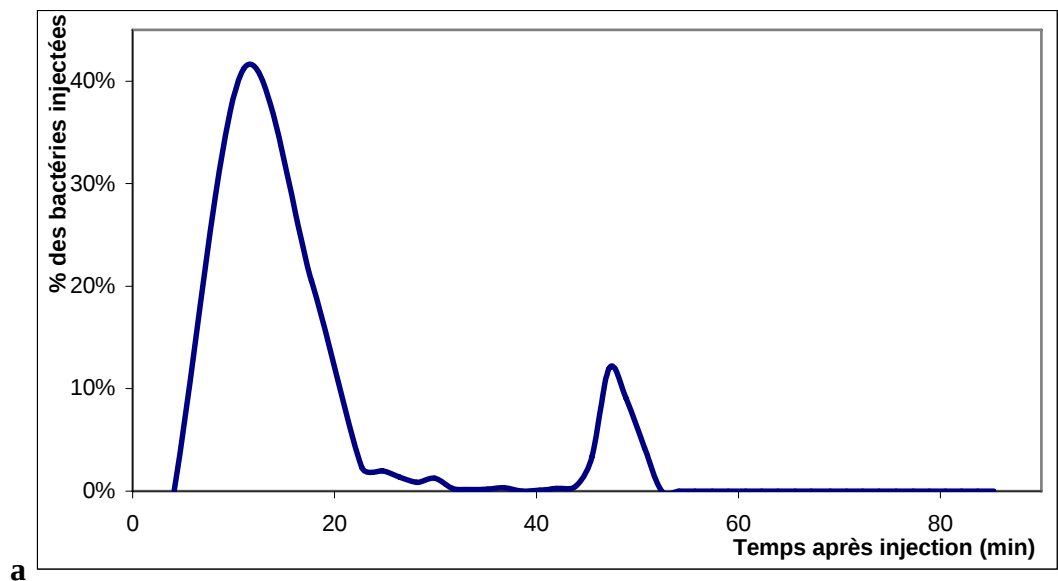


Figure 21. Chromatogramme type de Sm sur gel d'agarose-ConA

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la population bactérienne injectée (environ 10^4 bactéries) afin de standardiser les résultats obtenus pour chaque expérience. Le débit est fixé à 0,15mL/min jusqu'à t+20min, puis évolue linéairement vers 0,6mL/min à partir de t+25min. L'élution se fait par une solution de mannoside à 0,5M (augmentation linéaire de la concentration entre t+30 et t+45min, puis arrêt à t+55min).

a : méthode en colonne. L'aire du premier pic représente 85% des bactéries injectées, celle du second 15%.

b : méthode en lot. Le même profil est obtenu avec un gel d'agarose-LcA.

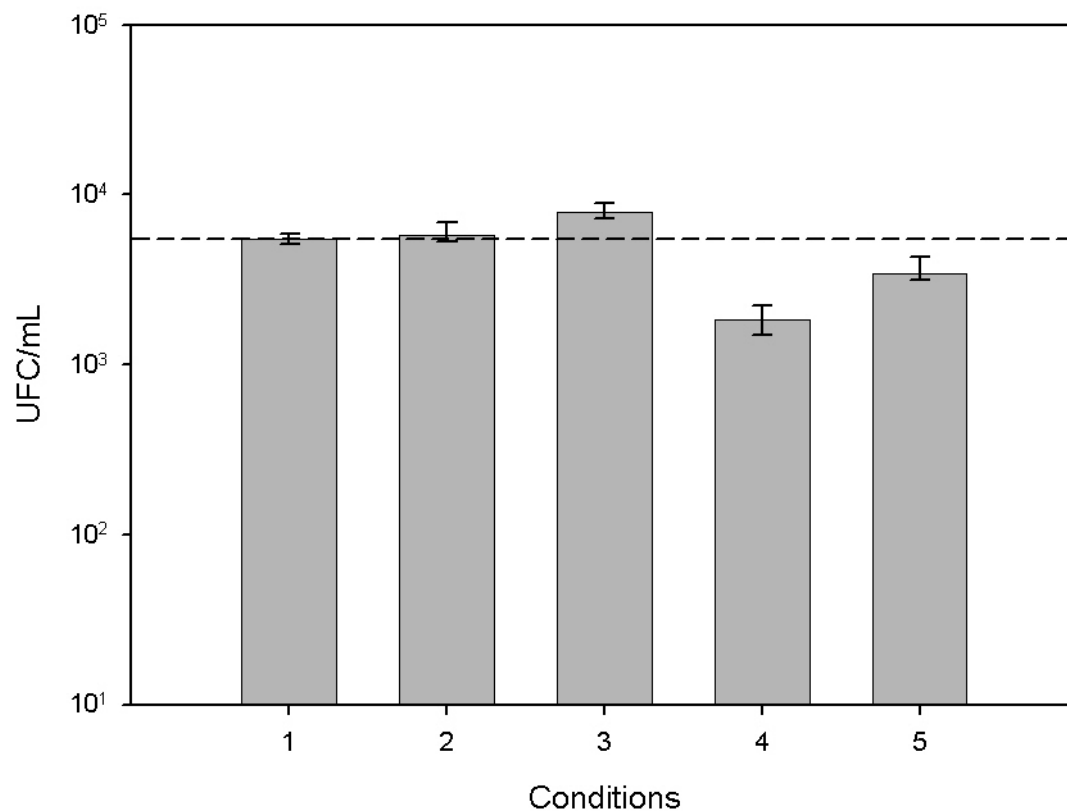


Figure 22. Effet de l'incubation de bactéries sur leur viabilité dans divers conditions

1 : charge bactérienne initiale

2 : charge bactérienne après 1h d'incubation en Dulbecco

3 : charge bactérienne après 1h d'incubation en Dulbecco + ConA

4 : charge bactérienne après 1h d'incubation en Dulbecco + Agarose-ConA

5 : charge bactérienne après 1h d'incubation en Dulbecco + Agarose-SAB

Les barres d'erreur représentent les maximas et minimas obtenus (2 à 4 répétitions).

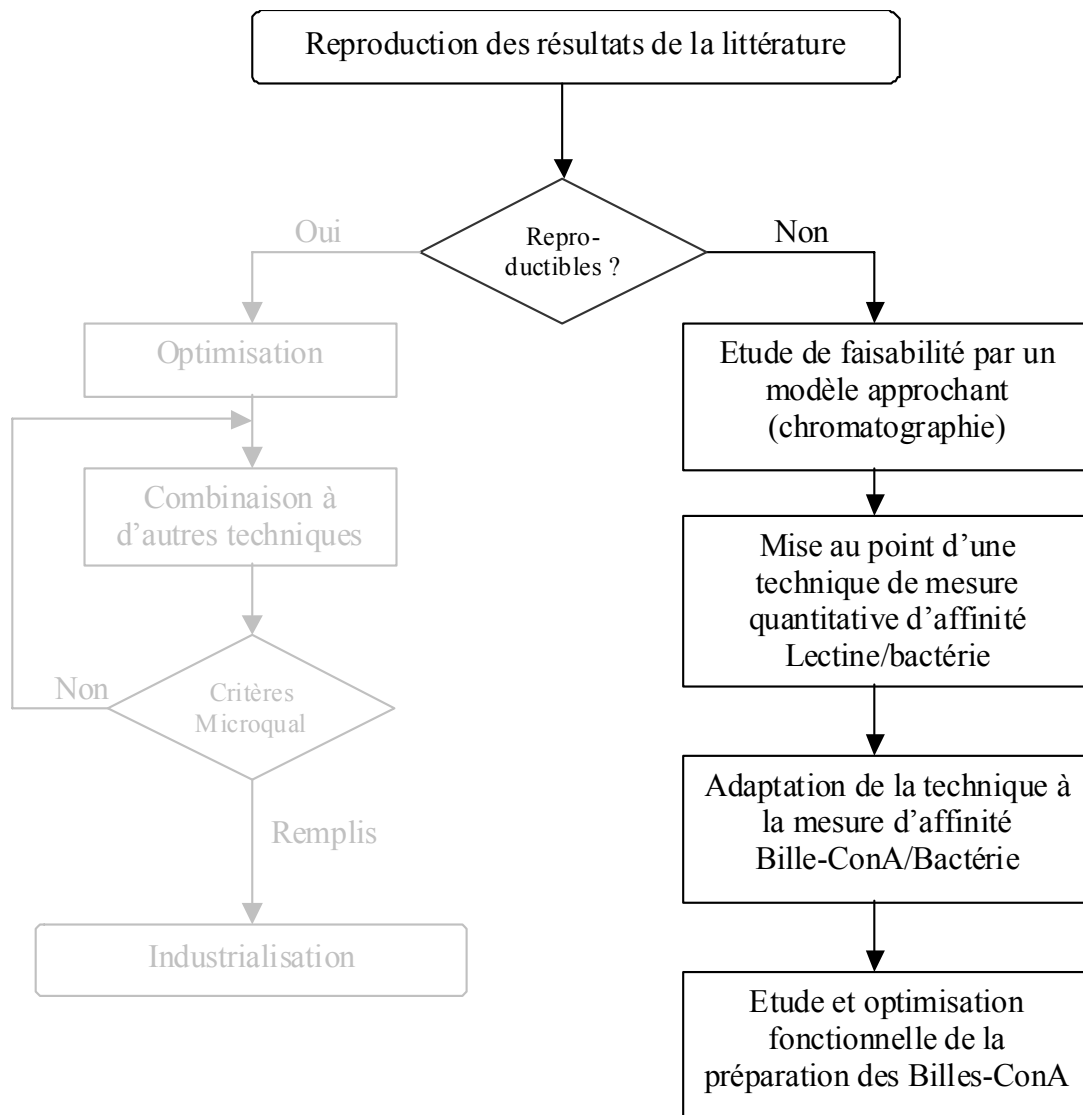


Figure 23. Evolution de l'orientation du projet (microplaque)

L'étude de faisabilité a débouché sur la mise au point, en microplaques, de méthodes d'étude quantitative de l'interaction « lectine – bactérie » puis « billes – lectine – bactérie ». Ces méthodes ont permis une optimisation de l'étape de préparation des billes magnétiques.

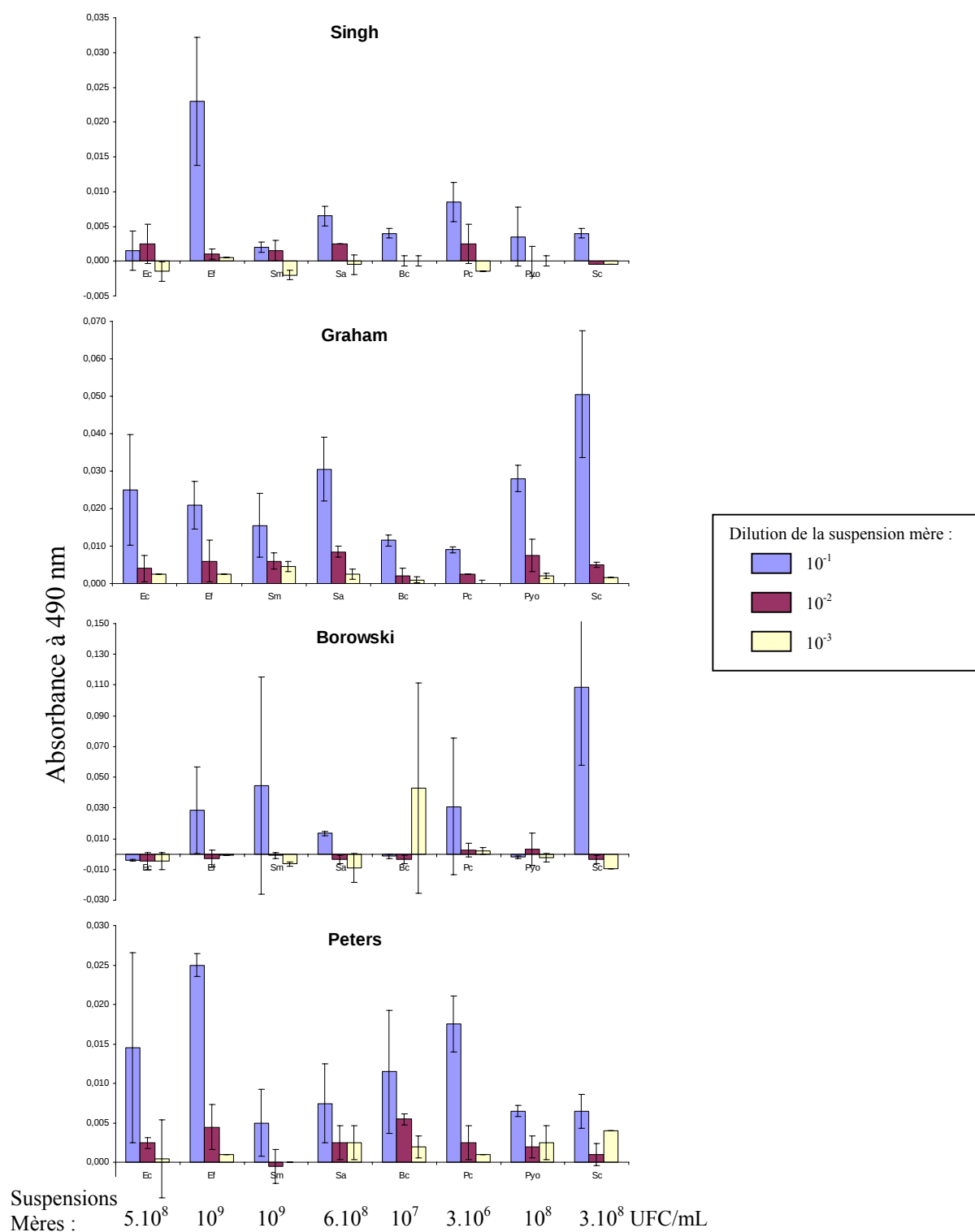


Figure 24. Comparaison des différents protocoles d'immobilisation de bactéries sur microplaque.

Les barres d'erreur représentent l'écart-type obtenu sur deux répétitions. Les abréviations des souches bactériennes sont données dans le Tableau VIII (p.77). Les concentrations des suspensions mères respectives sont indiquées sous les graphes.

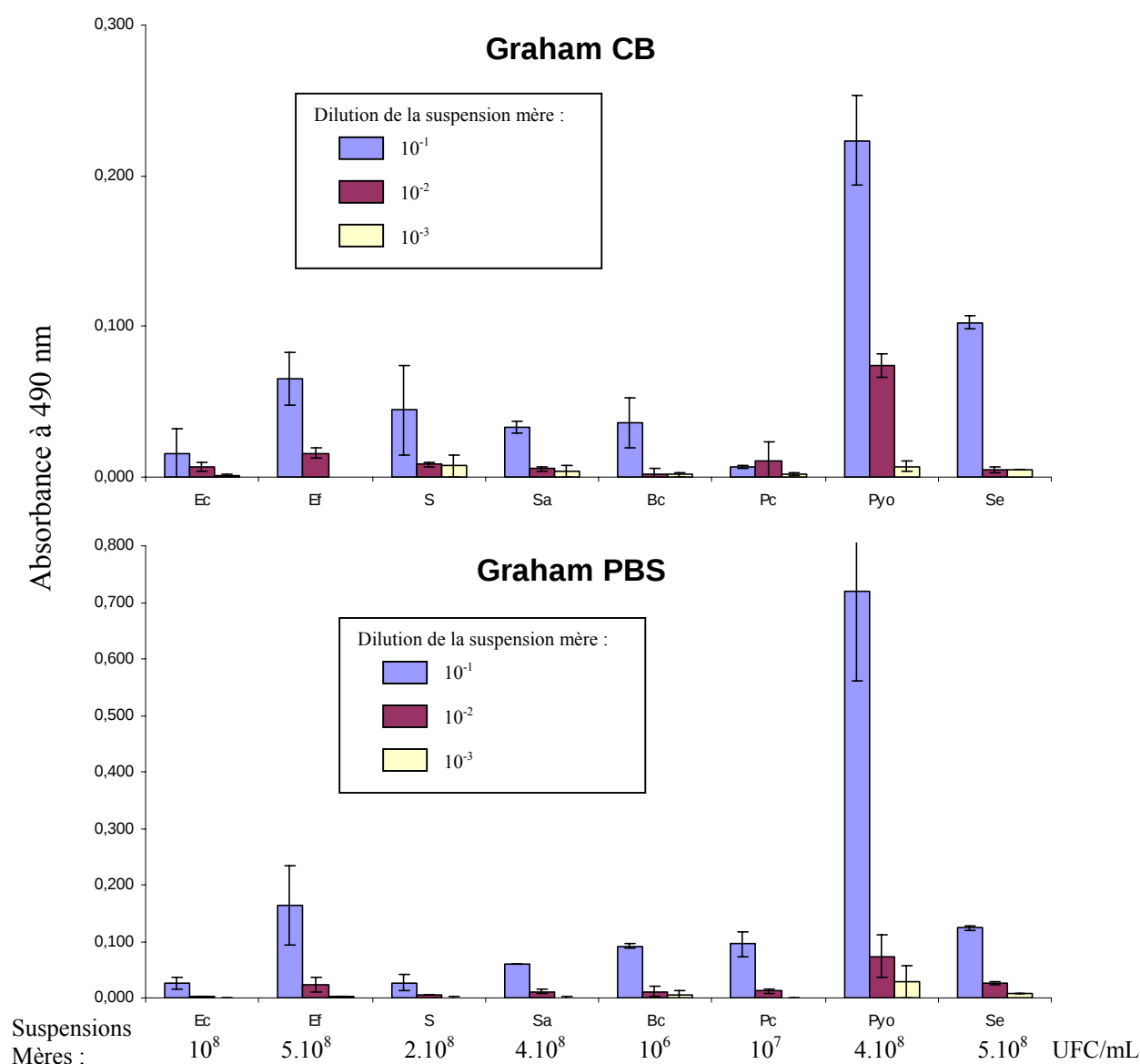


Figure 25. Optimisation du protocole Graham

Le graphe intitulé « Graham PBS » représente les résultats obtenus en remplaçant le tampon carbonate (Graham CB) par du tampon Dulbecco (voir matériels et méthodes), toute chose étant identique par ailleurs. Les barres d'erreur représentent l'écart-type obtenu sur deux répétitions. Les abréviations des souches bactériennes sont données dans le Tableau VIII (p.77). Les concentrations des suspensions mères respectives sont indiquées sous les graphes.

Tableau XIII. Estimation de l'efficacité de fixation de chacune des souches bactériennes

	<i>S. marcescens</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>E. faecalis</i>
Efficacité de fixation	50%	100%	20%	40%	100%	55%	60%
Concentration approximative déposée (UFC/mL)	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7	10^6	10^7

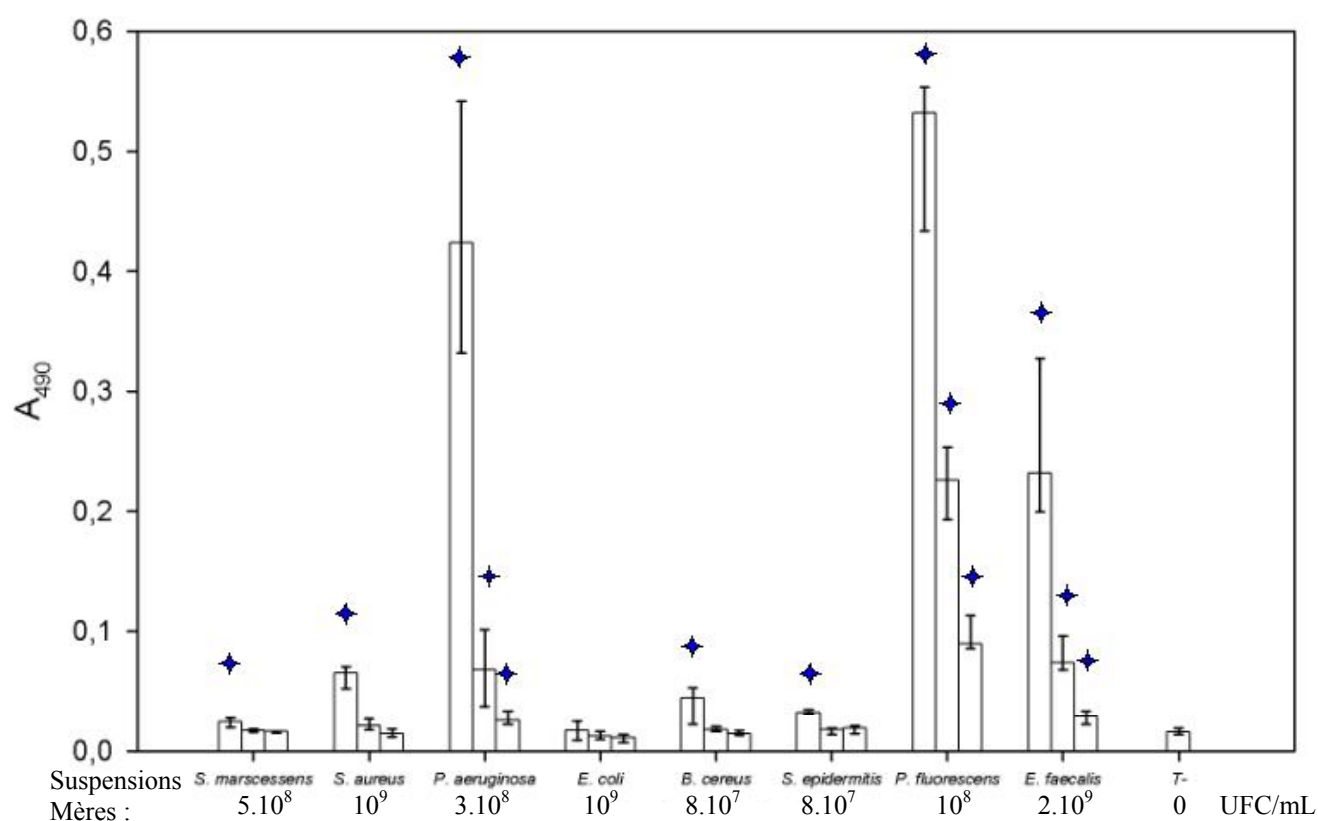


Figure 26. Analyse statistique des résultats de révélation des bactéries immobilisées sur microplaque

Les barres d'erreur représentent les premier et troisième quartiles obtenus sur trois répétitions. Pour chaque souche, trois dilutions (10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} de la suspension mère) ont été testées et les résultats sont représentés par les trois barres de chaque groupe (respectivement de gauche à droite). Les concentrations des suspensions mères respectives sont indiquées sous les graphes. La barre intitulée T- représente le contrôle négatif (sans bactérie). Les étoiles signalent les valeurs significativement différentes du témoin d'après le test de Siegel et Castellan.

Tableau XIV. Seuils de détection statistique pour chacune des souches bactériennes

	<i>S. marcescens</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>
Bactéries par puits	7.10^5	10^6	4.10^4	6.10^4	4.10^5	8.10^5	4.10^4	10^3

Tableau XV. Effet du lait sur la détection des bactéries immobilisées grâce à la ConA
 Le seuil de détection en Dulbecco est indiqué (cf. tableau précédent). Les lignes suivantes indiquent l'effet de la présence de lait demi-écrémé UHT dans le tampon d'incubation (respectivement à 1%, 10% et 100%, ce dernier correspondant à du lait pur).

+ : le signal est statistiquement significatif

- : le signal n'est pas statistiquement différent du contrôle négatif

N/D : expérience non réalisée.

	<i>S. marcescens</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>
Bactéries par puits	7.10^5	10^6	4.10^4	6.10^4	4.10^5	8.10^5	4.10^4	10^3
	Lait 1%							
	-	N/D	+	+	+	+	+	N/D
	Lait 10%							
	-	N/D	+	+	-	-	+	N/D
	Lait 100%							
	-	N/D	+	-	-	-	-	N/D

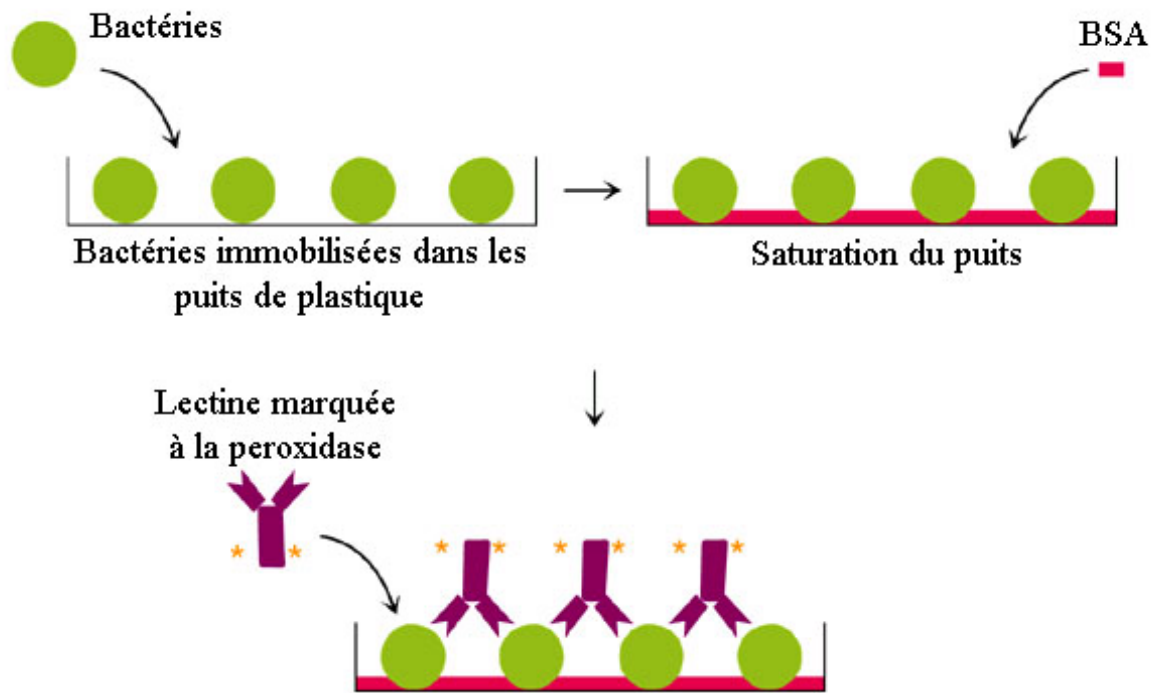


Figure 27. Représentation schématique des principales étapes du protocole ELLA

Tableau XVI. Estimation de l'efficacité de fixation et mesure du pourcentage d'hydrophobicité obtenu par la méthode MATH

	<i>S. marcescens</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>E. faecalis</i>
Efficacité de fixation	50%	100%	20%	40%	100%	55%	60%
Hydrophobicité	47%	93%	22%	59%	97%	81%	70%

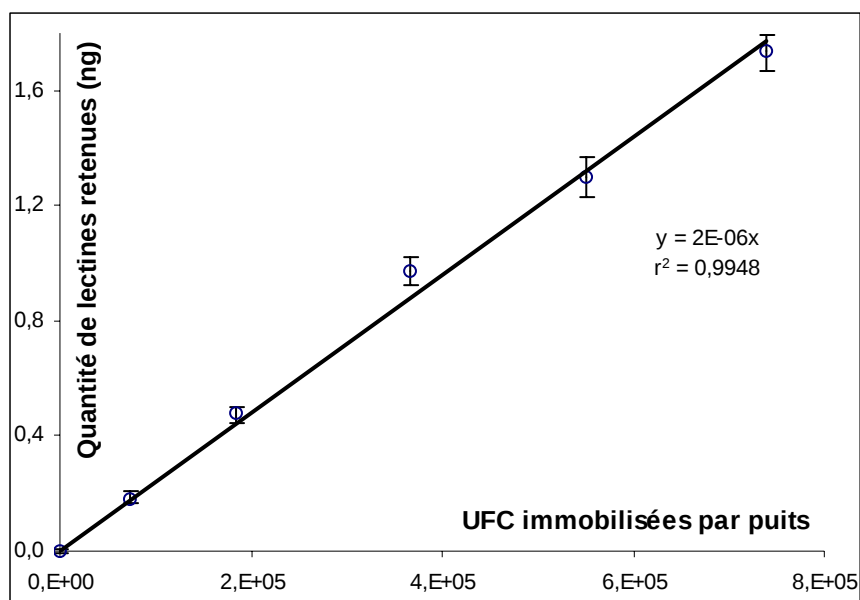


Figure 28. Régression linéaire de la quantité de lectine ConA retenue par quantité de *S. epidermidis* immobilisée

Le tracé est basé sur la médiane de 4 répétitions, les barres d'erreur étant les premier et troisième quartiles.

Tableau XVII. Affinité de 3 lectines pour chacune des souches testées.

Les résultats présentés sont la médiane de 3 répétitions indépendantes.

Affinité de la lectine (pg fixés / 10 ⁶ UFC immobilisées)	<i>S. marcescens</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>E. faecalis</i>
ConA	78	15	383	0	2 232	402	74
WGA	0	221	35	0	367	1 058	0
PT	0	0	0	0	0	1 148	67

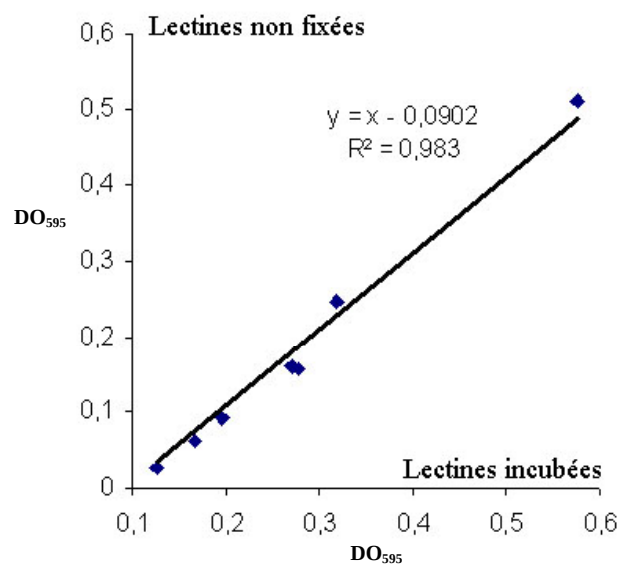


Figure 29. Quantité de lectines non fixées en fonction des lectines initialement incubées

Les quantités sont exprimées en DO_{595} déterminées par le test Bio-Rad (voir matériels et méthodes). La quantité de lectine fixée est déduite par la différence entre les lectines incubées et les lectines non fixées, soit $(x-y)$. Cette quantité est donc constante.

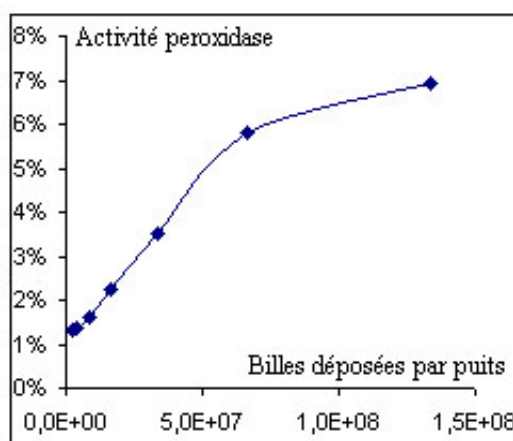


Figure 30. Activité peroxydase exprimée par quantité de billes magnétiques saturées en ConA déposées par puits.

100% d'activité peroxydase correspondrait à la rétention de toute la peroxydase incubée par les complexes bille-lectine.

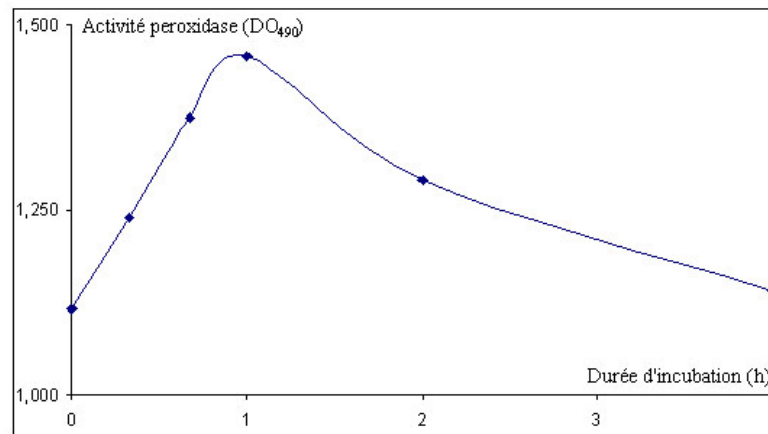


Figure 31. Activité biochimique des complexes bille-lectine en fonction du temps d'incubation des billes magnétiques avec la ConA

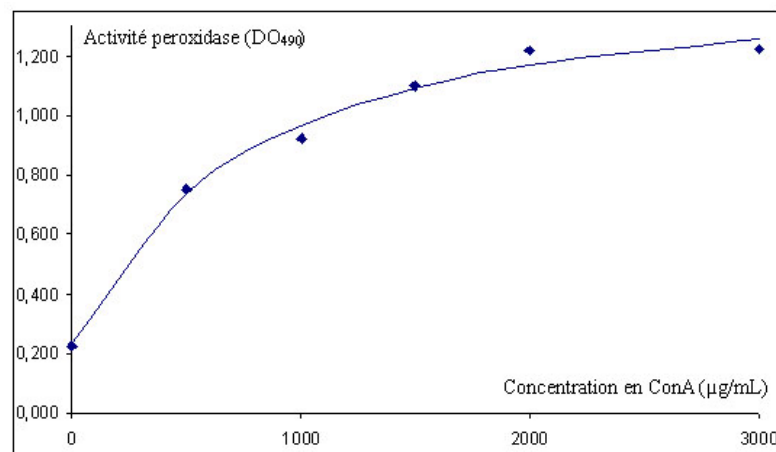


Figure 32. Activité biochimique des complexes bille-lectine en fonction de la concentration en ConA lors de l'incubation des billes magnétiques

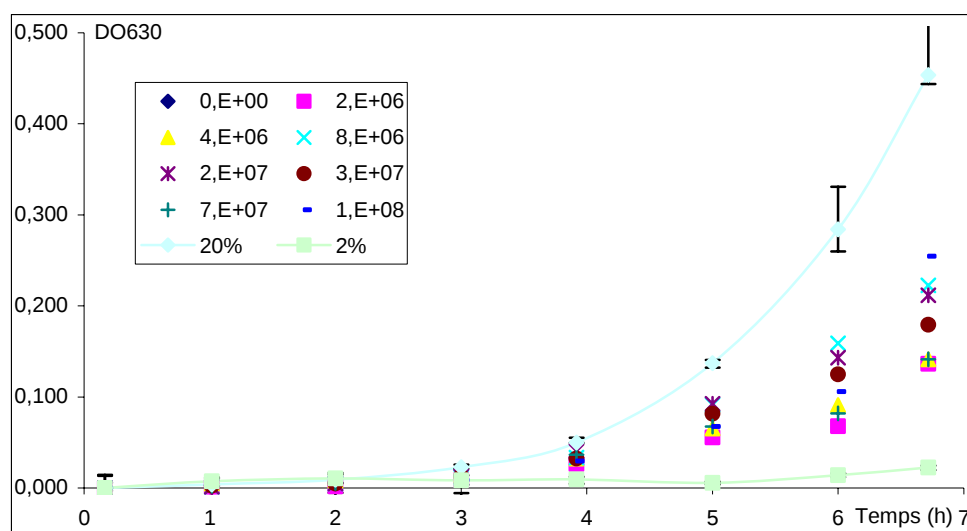


Figure 33. Courbe de croissance des bactéries (Se) immobilisées sur des billes magnétiques saturées en ConA.

Chaque courbe correspond à une quantité différente de billes déposées par puits (voir encart), à l'exception des courbes intitulées 20% et 2%, qui sont les courbes qui auraient été obtenues si respectivement 20% et 2% des bactéries déposées avaient été retenues (témoins positifs)

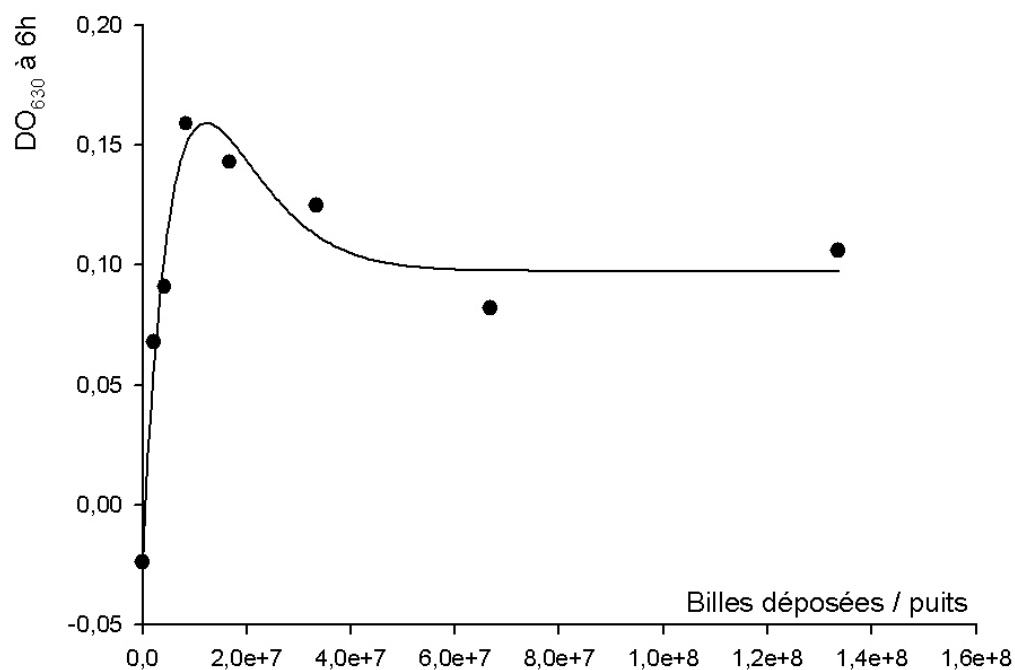


Figure 34. Relation entre la quantité de bactéries retenues (représentée par la DO_{630} après 6h de croissance) et le nombre de complexes bille-lectine déposés par puits

Tableau XVIII. Influence du lait sur l'affinité apparente de la ConA pour les bactéries

Affinité de la lectine ConA (ng fixés / 10 ⁹ UFC immobilisées)	<i>S. marcescens</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>E. faecalis</i>
Dulbecco	78	15	383	0	2 232	402	74
Dulbecco + lait 1%	16	6	314	0	158	417	27
Dulbecco + lait 10%	0	3	254	0	19	338	25
lait	0	0	198	0	3	130	18

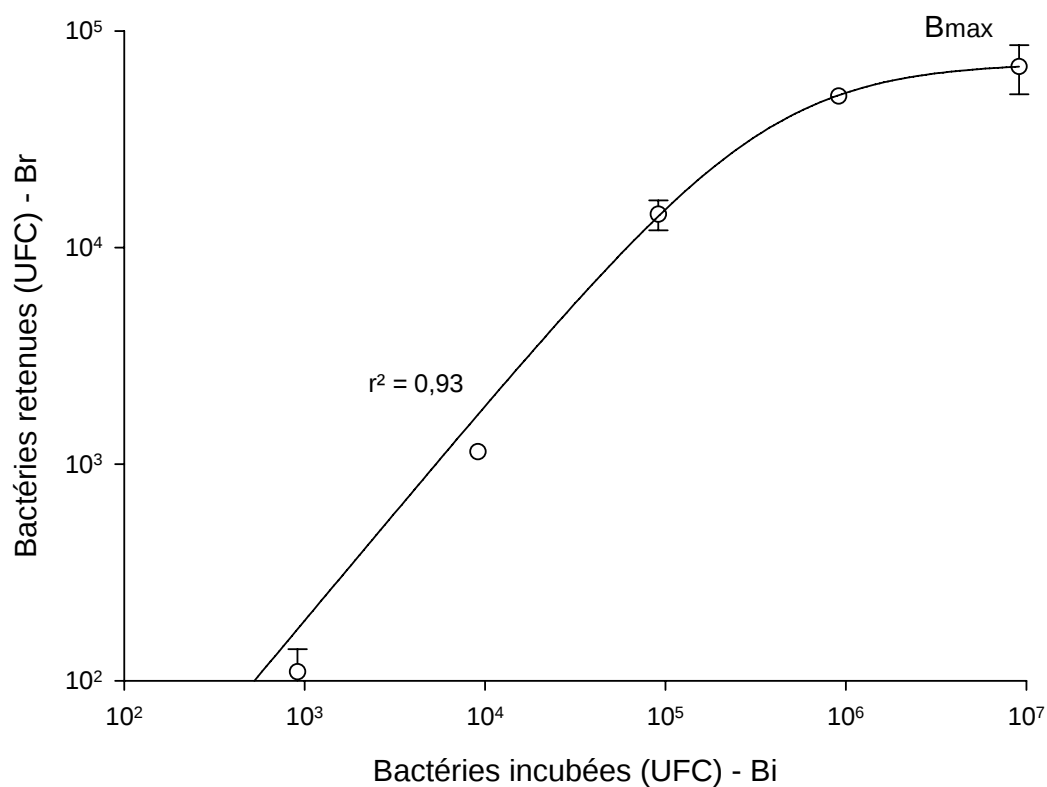


Figure 35. Bactéries retenues par LMS en fonction des bactéries incubées

La souche utilisée est Bc. Les barres d'erreur représentent les valeurs maximum et minimum obtenues. Dans le texte, les notations utilisées sont les suivantes :

- B_r : Bactéries retenues
- B_i : Bactéries incubées
- B_{max} : Quantité asymptotique de bactéries nécessaires pour saturer le piège

Tableau XIX. Valeurs des K_D , B_{max} et B_{max}/K_D pour chacune des souches testées en Dulbecco.

Le coefficient de régression des données expérimentales par le modèle décrit dans l'Équation 1 est chaque fois supérieur à 0,99.

	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
K_D (UFC)	3.10^{14}	3.10^8	5.10^7	5.10^5	6.10^8	2.10^8	2.10^9
B_{max} (UFC)	8.10^{13}	2.10^8	1.10^7	7.10^4	2.10^8	1.10^8	1.10^9
B_{max}/K_D	25%	60%	19%	16%	28%	51%	69%

Tableau XX. Valeurs des K_D , B_{max} et B_{max}/K_D pour chacune des souches testées en Dulbecco complémenté par 10% (v/v) de lait UHT demi-écrémé.

Le coefficient de régression des données expérimentales par le modèle décrit dans l'Équation 1 est chaque fois supérieur à 0,99.

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
K_D (UFC)	7.10^{10}	2.10^{11}	1.10^9	3.10^{10}
B_{max} (UFC)	2.10^8	2.10^8	1.10^8	1.10^9
B_{max}/K_D	0.3%	0.1%	10%	3%

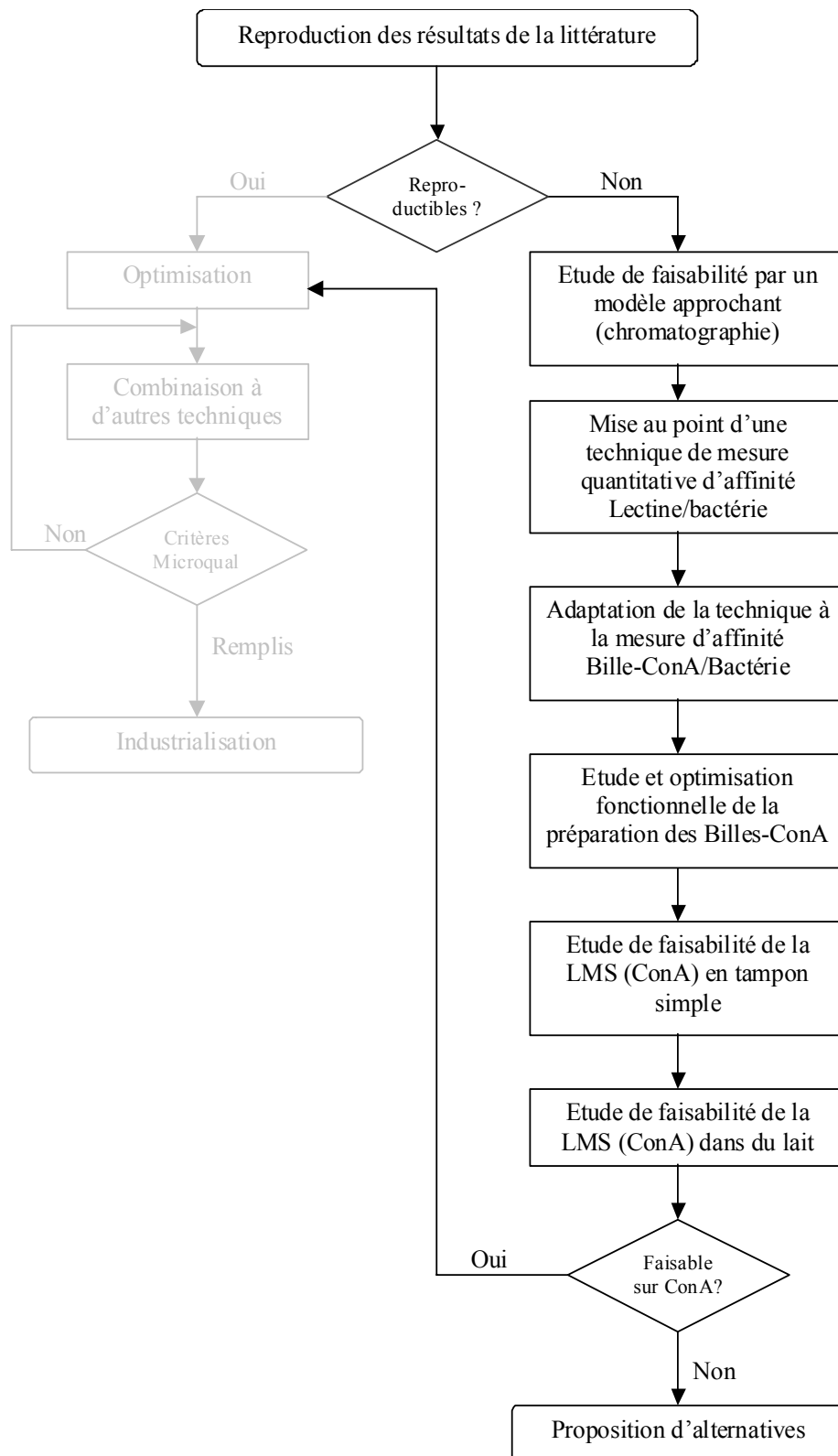


Figure 36. Evolution du projet (bilan)

La mise au point de techniques d'étude de l'interaction « lectine – bactérie » puis « bille – lectine – bactérie » a permis de conclure quant à l'efficacité de la séparation magnétique (LMS) médiée par la concanavaline A (Con A).

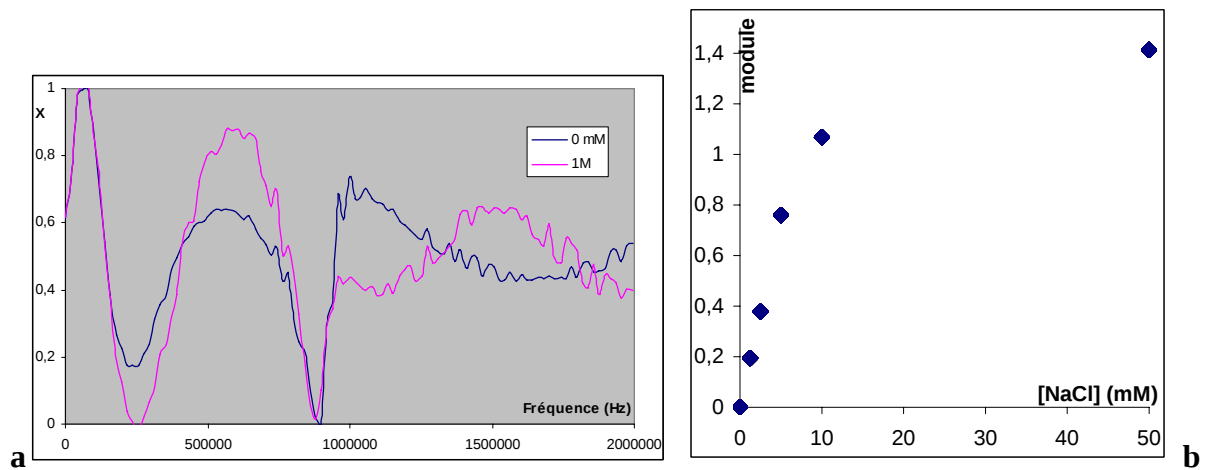


Figure 37. Effet de la concentration en sel sur le signal du Zenix

a : Balayage de fréquences. Le paramètre mesuré est la composante X du signal renvoyé par l'appareil (voir III.A p.81).

b : Evolution du signal en fonction de la concentration en sel. Le paramètre mesuré est le module des deux composantes du signal renvoyé par l'appareil (voir III.A p.81).

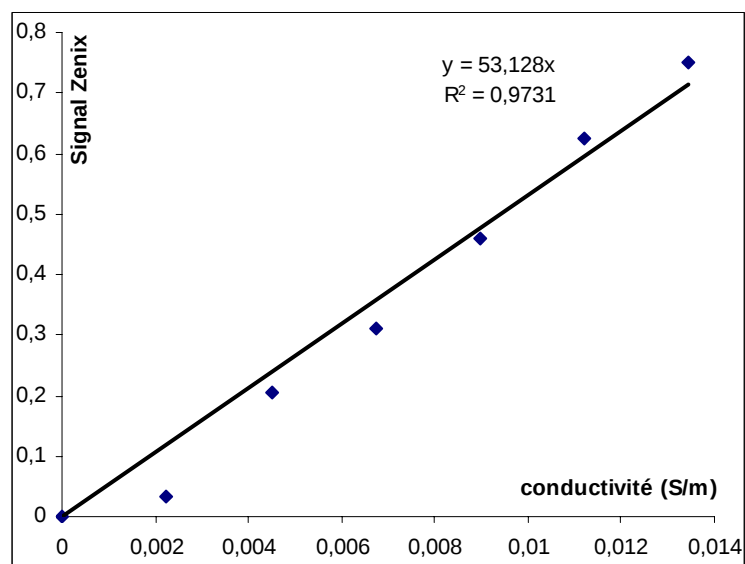


Figure 38. Evolution du signal Zenix en fonction de la conductivité. Le paramètre mesuré est le module des deux composantes du signal renvoyé par l'appareil (voir III.A p.81).

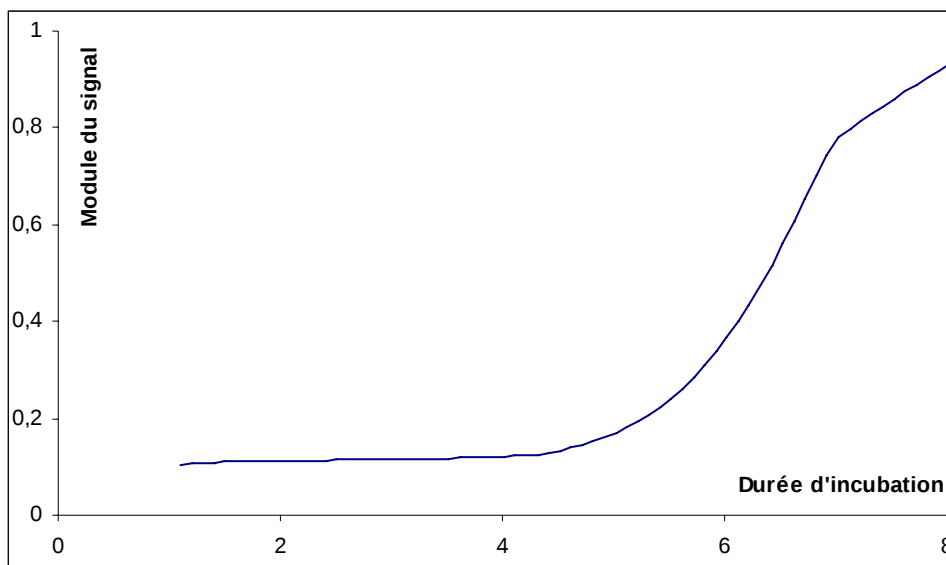


Figure 39. Profil type de l'enregistrement d'une croissance bactérienne par le Zenix. Le paramètre mesuré est le module des deux composantes du signal renvoyé par l'appareil (voir III.A p.81).

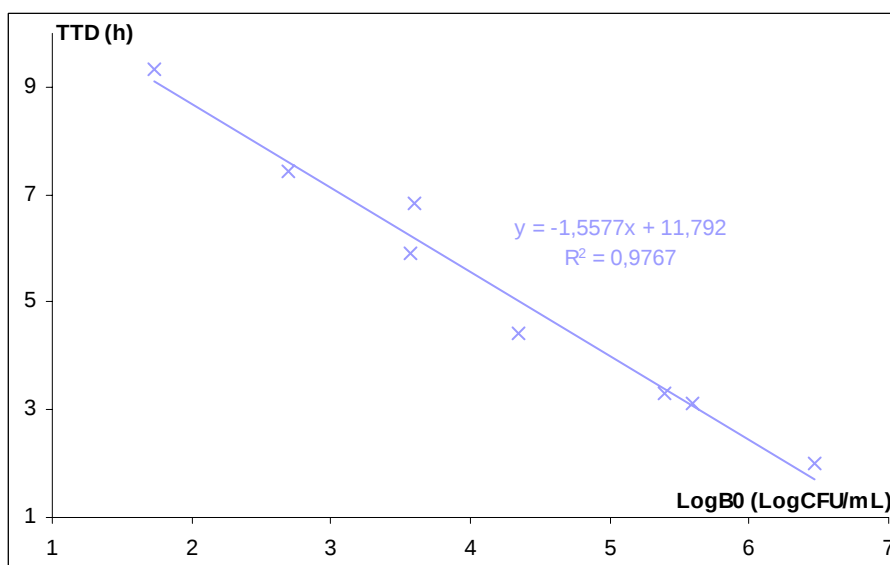


Figure 40. Relation entre le TTD et la charge bactérienne initiale

Tableau XXI. Comparaison des TTD obtenus par le Zenix, le Rabbit et le Malthus

	Zenix	Rabbit	Malthus
TTD aux faibles charges initiales (1UFC/mL)	11,8h (estimé)	12,9h	10h

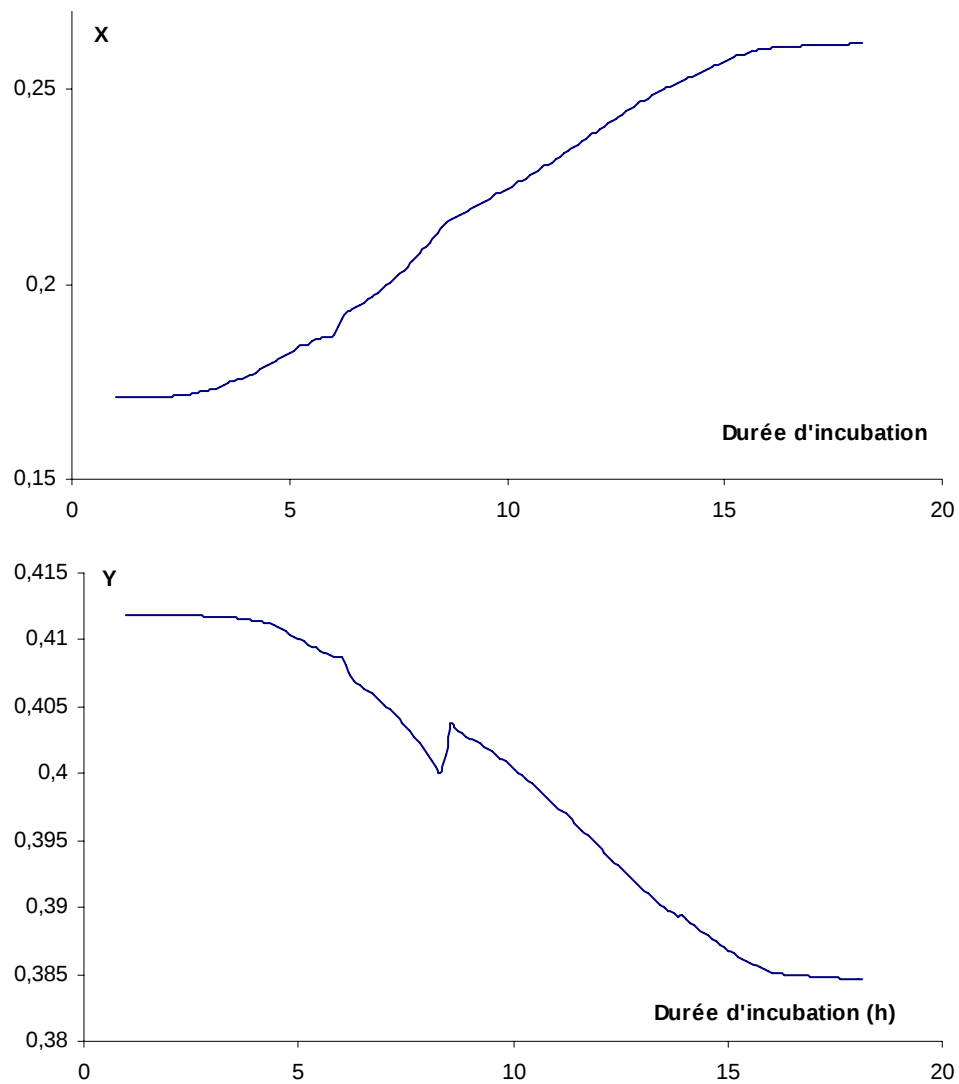


Figure 41. Evolution de X et Y au cours d'une croissance bactérienne. Les paramètres X et Y mesurés sont les deux composantes du signal renvoyé par l'appareil (voir III.A p.81).