

Méthodes de détection rapide en microbiologie alimentaire

par **Christine VERNOZY-ROZAND**

Thèse de doctorat de 3^e cycle (Ph. D), Habilitation à diriger des recherches (HDR)
Maître de conférences à l'École nationale vétérinaire de Lyon

1. Méthodes traditionnelles	F 1 130 - 2
2. Méthodes rapides	— 2
2.1 Tests biochimiques miniaturisés.....	— 2
2.2 Tests physico-chimiques.....	— 2
2.2.1 Impédance.....	— 2
2.2.2 Bioluminescence et fluorescence.....	— 3
2.3 Méthodes immunologiques.....	— 3
2.4 Méthodes génétiques.....	— 4
2.4.1 Sondes spécifiques.....	— 5
2.4.2 Application de la PCR.....	— 5
3. Limites des méthodes rapides de microbiologie alimentaire	— 5
4. Conclusion	— 6
Références bibliographiques	— 6

Les **toxi-infections alimentaires** affectent plus de dix mille personnes en France chaque année sur lesquelles nous n'enregistrons heureusement que quelques décès à l'opposé des États-Unis où les décès annuels dus aux intoxications alimentaires se comptent par centaines. Les bactéries pathogènes le plus souvent citées sont les salmonelles (plus de 50 % des cas), **Staphylococcus aureus** et **Clostridium perfringens**. Il faut également noter l'émergence de nouveaux pathogènes comme **Yersinia enterocolitica**, **Listeria monocytogenes**, **E. coli O157 : H7**, **Aeromonas spp**, **Plesiomonas spp**. Les changements de mode de vie (prise de nombreux repas à l'extérieur du domicile familial) expliquent la recrudescence des accidents alimentaires collectifs. Les industriels agroalimentaires ont besoin de méthodes rapides pour apprécier la qualité hygiénique des denrées produites et pouvoir maîtriser efficacement leurs procédés de fabrication. Ils veulent disposer de méthodes d'analyse leur permettant de commercialiser leurs produits sans attendre 4 à 5 jours comme c'est le cas actuellement avec les méthodes microbiologiques traditionnelles d'isolement et d'identification. Les méthodes de détection rapide sont également importantes pour vérifier la qualité microbiologique des matières premières entrant dans la composition d'un produit.

1. Méthodes traditionnelles

Depuis presque un siècle, les méthodes bactériologiques traditionnelles sont fondées presque exclusivement sur l'utilisation de milieux spécifiques pour isoler et dénombrer les cellules bactériennes dans l'aliment. Cependant, certains micro-organismes pathogènes exigent des protocoles complexes longs et fastidieux.

Les aliments contiennent un très grand nombre d'ingrédients dont des protéines, des glucides, des lipides et sels minéraux. La plupart de ces composants peut affecter la viabilité des bactéries et ainsi interférer avec la détection de bactéries pathogènes spécifiques. La composition physico-chimique des aliments est également très variable : liquide, solide, semi-solide et d'autres formes mixtes. Ces différences de viscosité peuvent également gêner la réalisation de prises d'essai homogènes assurant une analyse alimentaire reproductible.

Outre l'extrême variété des matrices alimentaires, la microflore naturelle présente, parfois abondante peut également gêner l'isolement et l'identification de bactéries pathogènes spécifiques [3]. Cette interférence est d'autant plus préjudiciable que les bactéries pathogènes à détecter sont présentes en faible nombre dans l'aliment. D'autre part, de nombreux traitements sont utilisés pour favoriser la conservation des aliments : la chaleur, le froid (réfrigération ou congélation), l'addition de conservateurs, etc. [4].

Les cellules bactériennes stressées sont extrêmement sensibles aux différents ingrédients utilisés dans les milieux sélectifs. Elles peuvent ainsi être facilement non détectées par les méthodes microbiologiques traditionnelles. Pour résoudre ces différents problèmes, les microbiologistes ont dû modifier les protocoles et les milieux utilisés en les adaptant spécifiquement aux bactéries pathogènes. Le procédé le plus efficace est sans doute l'étape d'enrichissement des échantillons alimentaires qui facilite la détection de ces pathogènes spécifiques [17], [18].

Généralement, le procédé commence par une phase de préenrichissement pendant laquelle les échantillons alimentaires sont incubés dans un milieu nutritif non sélectif permettant la revivification des bactéries stressées [12]. Ensuite, les échantillons préenrichis sont transférés dans un milieu d'enrichissement sélectif qui permet la croissance de la bactérie cible tout en diminuant celle de la microflore saprophyte. La dernière étape consiste en un isolement à partir du bouillon d'enrichissement sur des milieux sélectifs et ou chromogènes permettant une reconnaissance facile des colonies suspectes. Ces dernières sont ensuite l'objet d'identification avec réalisation d'une série de tests biochimiques et, éventuellement, caractérisation sérologique [9], [10].

Bien que ces méthodes de détection bactériologique traditionnelle aient prouvé leur efficacité, elles nécessitent pour leur réalisation beaucoup de temps (4 à 5 jours) et parfois une grande technicité. Elles ne répondent donc pas aux exigences des industriels de l'agroalimentaire qui veulent des méthodes rapides de détection [11].

2. Méthodes rapides

Ces méthodes regroupent un ensemble très large de systèmes incluant des tests biochimiques miniaturisés d'identification, des tests physico-chimiques qui mesurent les métabolites bactériens, des tests immunologiques ou génétiques parfois complètement automatisés [5].

2.1 Tests biochimiques miniaturisés

Les bactéries isolées de l'aliment sont généralement identifiées grâce à leurs caractères biochimiques. Le remplacement des boîtes de Pétri par de petites cupules a permis d'économiser du milieu et de simplifier l'ensemble des tests. L'utilisation d'inoculum concentrés a permis aussi de réduire les temps d'incubation.

Il existe actuellement des **kits d'identification rapide** permettant d'effectuer l'étude simultanée de nombreux caractères et, ceci, de façon très rapide.

Les systèmes API (appareils et procédés d'identification) présentés sous forme de galeries de 10, 20 et 50 caractères sont proposées pour différents micro-organismes (entérobactéries, staphylocoques, streptocoques, lactobacille, levure...) ainsi que les « tubes Roche » (*enterotube*, *oxyfermtube*...). Ces systèmes de tests combinés permettent un gain de temps considérable pour les phases de préparation et d'ensemencement. Par contre, les temps d'incubation restent de l'ordre de 24 heures.

Il existe également des galeries API pour la recherche d'activité enzymatique. La lecture est alors effectuée après 4 heures d'incubation. Il s'agit des systèmes *rapid 20 E* pour les entérobactéries, *staph ident* pour les staphylocoques.

La plupart des tests biochimiques miniaturisés utilisés en analyse alimentaire identifient les entérobactéries. Tous les kits commercialisés exigent une culture bactérienne pure. Comparés aux méthodes traditionnelles d'identification, les kits biochimiques d'identification sont fiables de 80 à 99 % [19]. La plupart des kits décrits par Hartman et al. (1992) [11] sont produits par de nombreux industriels. Néanmoins, seules quelques systèmes ont fait l'objet d'études collaboratives entre différents laboratoires et ont obtenu la validation AOAC (Association of Official Analytical Chemists) pour l'identification des bactéries à l'origine d'accidents alimentaires.

Exemple : le système *API 20 E* de bioMérieux Vitek (Hazelwood, MO) ou le système *enterotube II* de Becton Dickinson (Cockeysville, MD) ont obtenu la validation AOAC pour l'identification des différents sérotypes de salmonelles [6], [14].

Il existe désormais sur le marché des instruments utilisés essentiellement en clinique qui permettent d'identifier automatiquement les bactéries à partir de leurs caractères biochimiques et de déterminer leur antibiorésistance.

Exemple : le système *autoMicrobic* de bioMérieux Vitek permet l'identification automatique de bactéries pathogènes dans l'aliment.

2.2 Tests physico-chimiques

Plusieurs systèmes peuvent détecter la présence de bactéries dans l'aliment en mesurant les changements générés par la croissance ou le métabolisme bactérien. La plupart de ces tests sont entièrement automatisés mais ils nécessitent une culture bactérienne pure. Jay (1985) [13] a recensé et détaillé l'ensemble des tests physico-chimiques ainsi que leurs applications en analyse agroalimentaire, seules l'impédance et la bioluminescence seront détaillées ci-après.

2.2.1 Impédance

Au cours des réactions métaboliques qui permettent la croissance du micro-organisme, certaines molécules électriquement inertes, les sucres par exemple, sont transformées en molécules ionisées telles que des acides ; ce fait se traduit par un accroissement de la conductance, c'est-à-dire une baisse de la résistance (impédance en courant alternatif) du milieu.

Ce phénomène peut être exploité dans les conditions suivantes : l'échantillon à analyser est introduit dans une cellule contenant un milieu de culture approprié dans lequel plongent deux électrodes ; le passage périodique d'un courant alternatif permet de mesurer l'impédance et d'enregistrer ses variations, par rapport à une cellule témoin remplie de milieu stérile ; la diminution d'impédance dans la cellule de mesure y révèle la présence et la croissance des micro-organismes et le temps nécessaire pour obtenir un signal perceptible est en relation avec le nombre de micro-organismes présents.

Les appareils disponibles actuellement semblent allier de bonnes performances (détection instantanée de 10^7 cellules/mL) à une bonne adaptation aux besoins du contrôle des produits alimentaires :

- possibilité d'utiliser des échantillons de taille variable ;
- possibilité de traiter de nombreux échantillons simultanément ;
- large gamme de température ;
- facilité d'utilisation ;
- possibilité de travail en milieu trouble.

Le **Bactometer** de bioMérieux Vitek consiste en une série de puits contenant des milieux spécifiques pour la détection de certains groupes bactériens. L'instrument est entièrement automatisé et l'ordinateur jumelé permet une surveillance continue et simultanée des variations de l'impédance dans chacun des échantillons analysés. Le **Malthus series** de Malthus instruments (Crawley, England) mesure, également de manière automatique, les changements de conductance liés à la croissance bactérienne dans les milieux de culture.

Mais à la différence de l'appareil précédent, ce dernier ne détecte spécifiquement que les différents sérotypes de salmonelles dans l'aliment [6], [8].

2.2.2 Bioluminescence et fluorescence

Le dosage de l'ATP (adénosine triphosphate) par la réaction bioluminescente du système ATP-luciférase-luciférase est très employé. L'ATP est un composé présent dans toutes les cellules vivantes, et en particulier dans toutes les cellules bactériennes ; c'est la forme universelle sous laquelle l'énergie est transférée des systèmes producteurs d'énergie, le système respiratoire par exemple, aux systèmes consommateurs responsables des biosynthèses, de la contraction musculaire, de la bioluminescence. L'ATP est donc un indicateur de la présence d'organismes vivants. Or la réaction bioluminescente du ver luisant qui met en œuvre un pigment, la luciférase, et une enzyme, la luciférase, permet de le doser avec une haute sensibilité. Les luminomètres sont capables de doser 10^{-13} g d'ATP, ce qui correspond théoriquement à environ 200 bactéries, mais si l'on tient compte de la dilution au cours de la préparation de l'échantillon et du volume dans lequel se fait la mesure, le seuil est en fait de l'ordre de 10^5 cellules/g, ce qui n'est pas pleinement satisfaisant (Lacheretz et al, 1979 [15]) ; c'est pourquoi beaucoup d'efforts sont déployés pour parvenir à un seuil idéal de l'ordre de 10^3 cellules par gramme.

Pour l'analyse des produits alimentaires, la préparation de l'échantillon pose certains problèmes. Lorsque les micro-organismes recherchés sont le seul matériel vivant du produit analysé, ils en contiennent tout l'ATP et la préparation est simple ; elle consiste à recueillir les cellules sur un filtre et à en extraire l'ATP par un agent approprié. Le procédé est donc utilisable pour évaluer la contamination globale de l'eau, la richesse d'un levain ou l'efficacité d'un antibiotique. En revanche, quand il s'agit de détecter des micro-organismes dans un produit contenant du matériel cellulaire (liquide biologique, aliment), le produit contient alors l'ATP « somatique » et l'ATP microbien qu'il faut distinguer (Bourgeois et Lereau 1991 [2]). C'est une source de difficultés, auxquelles un procédé d'extraction approprié permet théoriquement de remédier, mais la bibliographie se fait largement l'écho des difficultés rencontrées avec des produits tels que le lait ou la viande.

Un grand nombre de luminomètres automatiques permettant une mesure de l'ATP sont actuellement disponibles. Leur niveau de sensibilité est compris entre 10^3 à 10^4 cellules par millilitre. Le **Enliten test** de Promega (Madison, WI) concentre les bactéries dans 1 mL de lait par centrifugation, lie les cellules chimiquement et détecte l'ATP relargué avec le réactif luciférase/luciférase. La lumière émise est quantifiée grâce au luminomètre qui la convertit en unité formant colonie (UFC) par millilitre, le test est réalisé en 10 min avec une sensibilité de 10 000 cellules par millilitre [9].

2.3 Méthodes immunologiques

La spécificité de la réaction antigène-anticorps est mise à profit pour compléter et affiner l'étude d'un micro-organisme.

En effet, généralement, les études morphologiques, physiologiques et biochimiques permettent d'identifier l'espèce d'un micro-organisme. Mais, au sein d'une espèce, des différences très fines apparaissent et la sérologie va permettre de différencier ces individus d'une même espèce.

Un micro-organisme peut être considéré comme une « mosaïque » d'antigènes, certains lui étant spécifiques.

La spécificité de la réaction antigène-anticorps est mise à profit pour la détection spécifique d'un micro-organisme dans un produit alimentaire. On utilise alors des sérums spécifiques de ces micro-organismes. Les techniques employées sont :

- l'agglutination sur lame ;
- l'immunofluorescence ;
- ou la technique immuno-enzymatique, ELISA.

Plus récemment, des techniques de cytométrie en flux permettent de coupler des études morphologiques et immunochimiques. Il existe aussi des systèmes de culture couplés avec une réaction immunochimique [16].

Dans certains cas, on peut aussi extraire les antigènes des cellules microbiennes et procéder ensuite à la réaction immunochimique avec les antigènes purifiés : la réaction se traduit alors par une précipitation à l'interface antigène-anticorps.

Enfin, dans le cas de micro-organismes toxigènes, la recherche de toxine peut s'effectuer par des méthodes sérologiques, essentiellement par des méthodes d'immunodiffusion.

Toutes les techniques immunologiques décrites sont basées sur la même réaction spécifique antigène-anticorps. Mais selon la nature de l'antigène d'une part, la technique de marquage de l'antigène ou de l'anticorps d'autre part, on distingue les méthodes suivantes.

n La précipitation

Elle est utilisée lorsque l'antigène est soluble, c'est-à-dire totalement dissous dans le milieu utilisé. Ce milieu peut être liquide ou solide ; on parle alors de « précipitation en milieu liquide » ou de « précipitation en milieu solide ».

n L'agglutination

Elle est utilisée lorsque l'antigène est particulaire ou figuré (taille généralement supérieure à $1 \mu\text{m}$). Cependant, des antigènes plus petits peuvent être fixés par des techniques appropriées sur des hématies, des particules de latex ou de charbon, etc. On parle alors d'agglutination indirecte, conditionnée ou passive et d'hémagglutination dans le cas particulier où l'on utilise des hématies.

n L'immunofluorescence

Elle consiste à coupler quelquefois l'antigène, mais plus souvent l'anticorps, à une substance fluorescente [l'isothiocyanate de fluorescéine (verte) ou de rhodamine (rouge)], afin de déceler la présence de l'anticorps ou de l'antigène correspondant dans le prélèvement.

Plus précisément, les anticorps sont couplés par des techniques appropriées à des composés fluorescents ; lorsque ces anticorps réagissent avec les antigènes qui leur sont spécifiques, le complexe antigène-anticorps fluorescent est visualisé à l'aide d'un microscope à fluorescence. La technique peut être directe ou indirecte [20].

● Immunofluorescence directe

Dans cette technique, c'est l'anticorps spécifique de l'antigène recherché qui est marqué, puis déposé sur la préparation de l'échantillon à examiner. Une émission de fluorescence après lavage signe la présence de l'antigène.

● Immunofluorescence indirecte

Cette technique comprend deux temps successifs où l'anticorps spécifique de l'antigène recherché joue le rôle d'anticorps dans le premier temps, et le rôle d'antigène dans le deuxième temps. Ce n'est pas cet anticorps qui porte le fluorochrome mais l'anti-anticorps que l'on dépose dans le second temps.

Les anticorps fluorescents peuvent être utilisés pour identifier directement les bactéries dans les échantillons cliniques mais aussi pour permettre une détection rapide des bactéries pathogènes, en particulier les bactéries pathogènes, dans les aliments.

n L'ELISA ou Enzyme Linked Immuno Sorbent-Assay

Elle permet de visualiser une réaction immunologique grâce à une enzyme. Le substrat spécifique de cette enzyme libère, en sa présence, un composé coloré. L'apparition d'une couleur signe donc une réaction positive, et l'intensité de la coloration obtenue est fonction de la quantité d'antigène ou d'anticorps ayant réagi.

Sous cette dénomination sont regroupées un grand nombre de techniques, mais seules les réactions dites en phase hétérogène (où l'on fixe l'antigène ou l'anticorps sur une phase solide : plastique, cupules, billes de métal, tubes, etc.) ont des applications en hygiène alimentaire.

Parmi ce type de réactions, la technique « sandwich » (parce que l'antigène se trouve pris en sandwich entre deux anticorps) est la plus utilisée.

Les tests ELISA sont largement employés en diagnostic agro-alimentaire. Mais à l'instar de la technique par immunofluorescence, le problème majeur est le manque de spécificité lié à l'utilisation des anticorps polyclonaux. Le développement récent de la technologie des hybridomes et la possibilité de préparer des anticorps monoclonaux de très grande spécificité a permis des améliorations spectaculaires de la méthode ELISA.

Exemple : deux tests ELISA actuellement disponibles pour la détection de salmonelles : *Salmonella-Tek* (Organon Technica Durham, NC) a une sensibilité et une spécificité respectivement de 96,5 % et 89,3 %. Le *MICROELISA Dynatech Lab.* (Chantilly, VA) montre une sensibilité et une spécificité respectivement de 99,2 % et 99 %.

Ces deux méthodes ainsi que les autres tests immunologiques permettant la détection rapide de salmonelles exigent 48 heures parce qu'ils nécessitent au moins 10^9 cellules/mL. Ce seuil est atteint après une phase d'enrichissement sélectif.

Plusieurs stratégies sont utilisées pour augmenter la sensibilité des tests ELISA. La production de composés fluorescents ou chimioluminescents au lieu de produits colorés a augmenté de 10 fois la sensibilité des tests.

n L'agglutination latex, l'immunodiffusion et les tests *dipstick*

D'autres méthodes immunologiques utilisent ces différents tests qui ne nécessitent pas de matériel particulier comme des lecteurs de plaques ELISA. Par conséquent, ils peuvent être réalisés dans des laboratoires moyennement équipés. Les kits d'agglutination latex utilisent des particules en latex dont la face externe est recouverte avec des anticorps dirigés contre un composant spécifique de la bactérie. Peter Feng (1996) [9] a listé l'ensemble des tests actuellement commercialisés spécifiques des salmonelles. Les tests de type

dipstick sont également sur le marché, ils permettent par exemple la capture spécifique des bactéries cibles présentes dans un bouillon sélectif d'enrichissement, ce qui réduit considérablement le temps de l'analyse alimentaire, on parle d'immunoconcentration.

n L'immunoconcentration

Il s'agit d'un procédé nouveau qui permet de détecter des micro-organismes spécifiques, présents en faible nombre dans l'aliment ou associé à une microflore abondante et variée. Cette technique utilise des supports solides d'une grande variété (polystyrène, Nylon, hydroxyde de titane, agarose, nitrocellulose, polyvinyle) recouverts d'anticorps mono ou polyclonaux dirigés contre des antigènes de surface de la bactérie cible. La capture spécifique de la bactérie cible est suivie d'une phase de lavage qui réduit considérablement les éléments indésirables. Cette capture immunologique n'affecte pas la vitalité des bactéries. Ces dernières peuvent donc se multiplier lorsqu'elles sont placées dans un milieu de culture adéquat, en présence de leurs supports (billes magnétiques, *dipstick*), ou après relargage sous l'action d'une enzyme spécifique.

La bactérie cible est ainsi séparée de la matrice alimentaire et se retrouve concentrée dans un volume très inférieur à celui d'origine. La réussite de l'immunoconcentration n'est possible que si l'organisme cible est présent en nombre suffisant.

Le seuil est déterminé par la sensibilité de la méthode qui peut varier en fonction de l'affinité et de l'avidité particulière de l'anticorps pour l'antigène de surface choisi.

2.4 Méthodes génétiques

Le principe de la méthode repose sur la propriété qu'ont les chaînes d'acides nucléiques simple brin de ne s'hybrider qu'avec des fragments de séquence complémentaires ; c'est là que réside la spécificité de cette technique. Elle utilise, d'autre part, la capacité de l'ADN (acide désoxyribonucléique) à se fixer sur des supports membranaires de nitrocellulose ou Nylon.

Pour réaliser l'identification, il faut disposer de l'ADN de la souche inconnue et de l'ADN d'une souche de référence. Ce dernier constitue la sonde, il est marqué pour permettre la détection de l'hybride formé avec l'ADN cible à identifier. Divers types de marquage sont possibles, radioactifs ou non. La révélation est réalisée par autoradiographie ou, dans le cas des sondes « froides », par une réaction enzymatique colorée [2].

Les différentes étapes de la manipulation sont les suivantes :

- préparation de la sonde : extraction de l'ADN de la souche connue et marquage ;
- préparation de l'ADN cible, extraction et dépôt sur une membrane ;
- hybridation : mise en contact de la sonde avec la membrane dans les conditions de formation de l'hybride stable ;
- révélation de la membrane : lavages pour l'élimination de la sonde en excès, d'hybrides non spécifiques, et mise en évidence de l'hybride ADN sonde-ADN inconnu.

Basées sur ce principe, plusieurs stratégies sont envisageables :

- parmi plusieurs micro-organismes, on cherche à identifier une espèce bien précise. Dans ce cas, la sonde appartient à cette espèce et l'on dépose sur la membrane les ADN des différents micro-organismes ;
- le micro-organisme isolé d'un milieu doit être identifié parmi plusieurs espèces les plus probables, rencontrées dans le même environnement. La membrane reçoit les ADN de ces différentes espèces connues. La sonde est préparée avec l'ADN du micro-organisme à identifier ;
- enfin dans le cas le plus général, les ADN des souches inconnues sont déposés sur la membrane. Elle est successivement soumise à l'hybridation par des sondes différentes après des cycles hybridation-déshybridation.

L'identification par utilisation de sondes nucléiques est un procédé encore nouveau ; de nombreuses mises au point font toujours l'objet de recherches intenses. Elles ont toutes pour but d'augmenter la spécificité et la sensibilité du système, tout en simplifiant les manipulations.

2.4.1 Sondes spécifiques

La plupart du temps, les sondes sont préparées avec l'ADN « total », chromosomique et plasmidique sans distinction. Mais il est possible de mettre en évidence l'existence de séquences plus spécifiques codant pour des propriétés particulières, par exemple de pathogénicité.

Les sondes sont préparées alors à partir de tout ou partie de plasmides clonés ou bien même de séquences oligonucléotidiques de synthèse. La séquence de ces oligonucléotides peut être déduite de celle d'une protéine ou d'un peptide particulier grâce au code génétique. Comme plusieurs séquences nucléotidiques peuvent correspondre à un même polypeptide, les sondes sont utilisées en mélange ; les conditions de stringence lors de la manipulation assurent la spécificité de l'hybridation.

Ces conditions démontrent également l'avenir industriel des sondes dans les kits de diagnostic. Les sondes caractéristiques de micro-organismes pathogènes contaminant les denrées alimentaires, peuvent théoriquement être produites facilement. D'une part, la synthèse des oligonucléotides devient courante dans les laboratoires, grâce à des équipements de plus en plus fiables et performants. D'autre part, on maîtrise de mieux en mieux la production des ADN par les bactéries recombinantes et l'on parvient à des rendements de l'ordre de 5 mg d'ADN par litre de culture.

L'utilisation de sondes à ARN (acide ribonucléique) est plus intéressante que l'utilisation de sondes à ADN. En effet, la plupart des cibles d'ADN sont présentes en une copie unique dans les chromosomes bactériens. Quelques rares séquences d'ADN sont au nombre de 2 à 10 copies dans les plasmides des cellules bactériennes. Par contre, une cellule d'*Escherichia coli*, par exemple, contient approximativement 10^4 copies d'ARNr (acide ribosomal) par cellule. Ainsi, les sondes d'ARNr peuvent augmenter la sensibilité des tests de 1 000 à 5 000 fois. D'autre part, l'ARNr est sous forme de chaîne monocaténaire ; la dénaturation avant l'hybridation n'est pas nécessaire. En conséquence, les sondes d'ARNr 16S sont de plus en plus utilisées dans les tests génétiques et rapides de détection des bactéries pathogènes dans l'aliment [7].

2.4.2 Application de la PCR

Des progrès importants sont aussi obtenus grâce à l'amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction). Elle consiste en la synthèse répétée d'une portion d'ADN que l'on veut détecter. Schématiquement, le principe est le suivant : l'ADN double brin est dénaturé par chauffage. Deux oligonucléotides utilisés par la polymérase comme amorces sont hybridés sur chacune des chaînes. Ils délimitent la portion d'ADN à amplifier. La polymérase synthétise l'ADN complémentaire depuis l'extrémité 3'OH des amorces. À partir d'une séquence d'ADN, on en obtient donc deux strictement identiques. Cet ADN double brin à son tour dénaturé sera à nouveau repris dans un cycle identique.

Ce processus est répété plusieurs dizaines de fois (jusqu'à 40). À chaque cycle de synthèse, la quantité d'ADN située entre les deux amorces est doublée, augmentant théoriquement de façon exponentielle ; n cycles multiplient par 2^n la séquence d'ADN. En réalité, on doit tenir compte du rendement de la synthèse qui diminue ce facteur ; il est de $1,85^{20}$ au lieu de 2^{20} après 20 cycles d'amplification.

L'amplification en chaîne est possible grâce à l'utilisation d'une polymérase particulière, la *Taq* polymérase, isolée d'une archaebactérie (*Thermus aquaticus*) capable de résister à des températures élevées et dont la température optimale d'activité est de l'ordre

de 70 à 80 °C. Cette propriété est indispensable pour que toutes les étapes, dénaturation par le chauffage, hybridation des amorces et synthèse puissent être réalisées dans une succession de cycles. L'automatisation de l'amplification est maintenant possible grâce à des appareils spécialement conçus assurant les cycles de chauffage.

Le marquage des sondes pendant l'amplification se fait par incorporation des nucléotides marqués comme dans le procédé par amorçage au hasard. Le grand progrès réside en un marquage plus efficace qui rend possible la détection fiable de sondes courtes [2].

À partir de quantités extrêmement faibles d'ADN, jusqu'à une seule molécule, l'amplification des sondes spécifiques est suffisante pour permettre une détection sensible même par marquage froid. Cette technique se met en place dans les laboratoires au moment même où beaucoup d'efforts ont déjà été consacrés à l'augmentation de la sensibilité du signal de détection des sondes froides. Il ne fait pas de doute que, grâce à elle, la détection des micro-organismes par hybridation d'ADN va se simplifier, s'automatiser et s'adresser ainsi au diagnostic de routine.

La plupart des techniques d'amplification génique exigent un enrichissement sélectif de l'aliment avant l'état d'amplification pour concentrer la bactérie et diluer les composants alimentaires. En effet, de nombreux composants alimentaires inhibent la *Taq* polymérase. Les étapes de préparation de l'échantillon, l'amplification génique elle-même, la détection des amplicons par électrophorèse en gel d'agarose prennent au moins un jour. Ainsi, la méthode nécessite en moyenne deux, trois jours pour sa réalisation, ce qui limite considérablement l'avantage lié à la très haute sensibilité de la PCR. D'autre part, la détection des amplicons, qui nécessitent un transilluminateur, n'est pas compatible avec l'analyse d'un très grand nombre d'échantillons dans les laboratoires de contrôle alimentaire. Enfin, les tests de PCR utilisant des amorces d'ARNr 16S souffrent souvent d'un manque de spécificité. Les systèmes actuellement sur le marché permettent de concentrer l'organisme cible et de le séparer des composants alimentaires. Ces différents systèmes utilisent la technique d'immunoconcentration évoquée préalablement. En effet, l'immunoconcentration constitue une étape préliminaire intéressante à la PCR. Elle permet une concentration de la bactérie cible dans un volume variant de 10 à 100 µL compatible avec les volumes testés en PCR. Les inhibiteurs (sang) de la *Taq* polymérase sont éliminés lors de la phase de lavage. Trois systèmes d'immunoconcentration sont utilisés actuellement dans les laboratoires d'analyses agroalimentaires :

- les billes magnétiques avec une séparation immunomagnétique (DYNAL) ;
- le système « Dipstik » (TECRA) ;
- l'immunoconcentration entièrement automatisée permise par le VIDAS (bioMérieux).

Ce sont des méthodes immunologiques qui peuvent être appliquées sur un bouillon d'enrichissement et elles sont bien adaptées à la biologie moléculaire mais une seule permet la réalisation automatique des étapes : VIDAS.

Tous présentent des avantages de gain de temps, de sensibilité, de spécificité, de facilité d'emploi par rapport aux méthodes conventionnelles, ce qui leur ouvre un avenir prometteur en microbiologie alimentaire.

3. Limites des méthodes rapides de microbiologie alimentaire

Malgré l'introduction récente des méthodes rapides en microbiologie alimentaire, nous avons pu assister à une véritable explosion de ces tests dans les dix dernières années. Par exemple, pour les salmonelles, il existe plus de 20 kits de détection rapide. Tout le

monde s'accorde à dire que ces méthodes rapides sont souvent plus sensibles et spécifiques que les méthodes dites traditionnelles. Moins de 4 heures sont souvent nécessaires pour la réalisation de ces tests. Mais il convient de préciser que l'adjectif « rapide » est parfois utilisé de manière abusive. En effet, ces méthodes ne peuvent pas être utilisées directement à partir de l'aliment. Il est presque toujours nécessaire de réaliser une phase d'enrichissement traditionnelle pour augmenter de manière sélective la bactérie pathogène cible et cette étape prend du temps. Les méthodes rapides suivent toujours cette phase. Ainsi, le temps réel de l'analyse alimentaire est souvent de 1 à 2 jours ; certes plus court que lors de l'utilisation de la méthode traditionnelle. Ces nouvelles méthodes rapides doivent faire l'objet d'une validation nationale ou internationale avant d'être utilisées en routine dans les laboratoires d'analyses alimentaires. Ces validations nécessitent des études collaboratives entre différents laboratoires. Cette validation est longue et coûteuse. Ainsi de nombreuses méthodes rapides actuellement commercialisées ne sont toujours pas validées (validation AFNOR, validation AOAC) et on peut légitimement se demander quelles sont leurs performances en terme de sensibilité et de spécificité. En outre, la plupart des méthodes rapides utilisées sur le mar-

ché ne peuvent être utilisées qu'en dépistage [1]. Un résultat négatif donné par la méthode est considéré comme définitif mais un résultat positif ne doit être considéré que présumptif. Il faudra toujours procéder à une confirmation de ce résultat en utilisant des méthodes traditionnelles de type isolement sur milieu sélectif.

4. Conclusion

Les méthodes d'analyses rapides en microbiologie alimentaire sont de plus en plus fréquemment utilisées, mais les scientifiques doivent être conscients de leurs avantages mais aussi de leurs limites. Malgré la nécessaire phase d'enrichissement, la durée totale de l'analyse alimentaire est souvent réduite de 1 à 2 jours par rapport aux méthodes traditionnelles. L'avantage évident de ces tests est donc la rapidité. Cependant, l'extrême variété des technologies utilisées dans ces méthodes rapides nécessitent une réelle formation des personnels et une réelle adéquation avec les besoins du laboratoire d'analyses.

Références bibliographiques

- [1] ANDREWS (W.H.), 1991. – *General referee reports : food microbiology*. (non dairy). J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74 : 158-62.
- [2] BOURGEOIS (C.M.) et LEVEAU (J.-Y.), 1991. – *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires*. Volume 3. *Le contrôle microbiologique*. Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires. Éd. Lavoisier-Tec. § doc., Paris.
- [3] CLARK (J.A.), 1980. – The influence of increasing numbers of non-indicator organisms upon the detection of indicator organisms by the membrane filter and presence-absence tests. *Can. J. Microbiol.* 26 : 827-32.
- [4] DUPONT (H.L.), LEVINE (M.M.), HORNICK (R.B.) et FORMAL (S.B.), 1989. – *Inoculum size in shigellosis and implication for expected mode of transmission*. *J. Infect. Dis.* 159 : 1126-28.
- [5] DZIEZAK (J.D.), 1987. – *Rapid methods for microbiological analysis of foods*. *Food Technol.* 41 : 56-73.
- [6] FENG (P.), 1992. – *Commercial assay systems for detecting foodborne Salmonella : a review*. *J. Food Prot.* 55 : 927-34.
- [7] FENG (P.), 1992. – *Rapid methods for detecting foodborne pathogens*. In *Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual*, p. 427-37. Arlington, VA : Assoc. Off. Anal. Chem. Int. 7th ed.
- [8] FENG (P.), 1994. – *Rapid detection of foodborne pathogenic bacteria*. *Annu. Rev. Microbiol.* 48 : 401-26.
- [9] FENG (P.), 1996. – *Emergence of rapid methods for identifying microbial pathogens in food*. *J. AOAC Int.* 79 : 3, 809-12.
- [10] FUNG (D.Y.C.) et COX (N.A.), 1981. – *Rapid microbial identification systems in the food industry : present and future*. *J. Food Prot.* 44 : 877-80.
- [11] HARTMAN (P.A.), SWAMINATHAN (B.), CURIALE (M.S.), FIRSTENBERG-EDEN (R.), SHARPE (A.N.) et al., 1992. – *Rapid methods and automation*. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, ed. C. VANDERZANT, D.F. SPLITTSTOSSER, p. 665-746. Washington DC : Am. Public Health Assoc.
- [12] HURST (A.), 1997. – *Bacterial injury : a review*. *Can. J. Microbiol.* 23 : 935-44.
- [13] JAY (J.M.), 1985. – *Analysis of food products for microorganisms or their products by non-culture methods*. In *Food Analysis Principles and Techniques*, ed. D.W. GRUENWEDEL, J.R. WHITAKER, p. 87-126. New York/Basel : Marcel Dekker.
- [14] KNIGHT (M.T.), WOOD (D.W.), BLACK (J.F.), GOSNEY (G.), RIGNEY (P.O.) et al., 1960. – *Gram-negative identification card for identification of Salmonella, Escherichia coli, and other Enterobacteriaceae isolated from foods : collaborative study*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73 : 729-33.
- [15] LACHERETZ (A.), JAKUBZAK (E.), LECJERC (H.) et CATSARAS (M.), 1979. – *Essais de détermination de la contamination bactérienne de la viande par mesure de l'ATP*. Communication aux journées de microbiologie alimentaire de la Société française de Microbiologie, Lille, mai.
- [16] NOTERMANS (S.) et WERNARS (K.) 1991. – *Immunological methods for detection of foodborne pathogens and their toxins*. *Int. J. Food Microbiol.* 12 : 91-102.
- [17] RAY (B.), 1979. – *Methods to detect stressed microorganisms*. *J. Food Prot.* 42 : 346-55.
- [18] SCHEUSNER (D.L.), BUSTA (F.F.) et SPECK (M.L.), 1971. – *Inhibition of injured Escherichia coli by several selective agents*. *Appl. Microbiol.* 21 : 46-9.
- [19] STAGER (C.E.) et DAVIS (J.R.) 1992. – *Automated systems for identification of microorganisms*. *Clin. Microbiol. Rev.* 5 : 302-27.
- [20] THOMASON (B.M.), 1981. – *Current status of immunofluorescent methodology for salmonellae*. *J. Food Prot.* 44 : 381-84.