

Chapitre 3 : Les méthodes de détection rapides des microorganismes en industrie agroalimentaire.

La détection de microorganismes passent par une étape de culture qui peut durer 24/48h ou plus. La maîtrise de la **qualité** microbiologique passe par un ensemble de démarche qui vont du **contrôle des matières premières** des produits en cours de transformation et de l'aliment ou du produit fini. Ces contrôles doivent être **fiables, reproductibles et rapides** afin de pouvoir agir au plus vite en cas de problème dans la chaîne de fabrication.

Toutes ces contraintes ont poussé les chercheurs et les industriels à mettre au point des méthodes de **plus en plus rapides et sensibles** permettant une bonne surveillance des produits pendant toutes les étapes de leur fabrication pour détecter les contaminants **sans alourdir les coûts financiers**.

Dans ce chapitre différentes techniques seront présentées, certaines permettant de détecter les microorganismes directement, d'autre permettant de détecter des produits de leur métabolisme. Enfin, d'autres techniques seront dédiées à la détection de toxine d'origine microbienne.

I) Analyse par bioluminescence ou détection par ATP-métrie.

a) Principe.

Toute cellule vivante produit et consomme de l'ATP, par conséquent la **détection d'ATP dans un produit est synonyme de la présence d'un organisme vivant dans ce produit.**

L'ATP n'est pas rapidement détruit, il a une **longue durée de vie** donc la détection de l'ATP peut nous indiquer qu'un microorganisme était présent dans le produit.

L'ATP-métrie est donc une technique qui permettra de **détecter** voir **dénombrer** les **microorganismes présents**.

Remarques :

→ La détection de l'ATP **ne permet pas de savoir s'il s'agit d'ATP bactérien ou d'ATP non bactérien.**

→ Les quantités d'ATP présentes dans certains produits peuvent être **1000 fois à 10 000 fois supérieures** que celle contenue dans les cellules bactériennes car elles sont plus petites.

Si le produit à analyser contient de grande quantité d'ATP intrinsèque (non bactérien) il est possible de **l'éliminer**. Il est possible de procéder par une **étape d'extraction sélective** qui fait appelle à des **tampons** qui vont **augmenter la perméabilité des cellules eucaryotes** mais qui ne vont pas toucher les parois des cellules bactériennes.

Cette extraction dure **10 à 15 secondes**, elle est suivie par une étape de **destruction de l'ATP résultant**, suivra après une étape **d'extraction de l'ATP bactérien**, suivie elle même par une étape de quantification de ce dernier.

b) Echantillonnage/extraction :

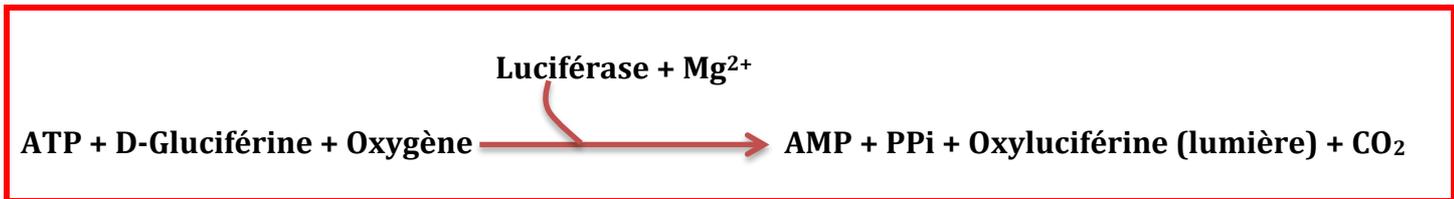
- **Echantillonnage** : échantillons représentatifs.
- **Broyage** : échantillons broyés dans de l'eau physiologique stérile pour mettre en suspension l'échantillon.
- **Filtration** : permet d'éliminer les grosses bactéries.
- **Extraction de l'ATP intrinsèque par tampon** du filtrat obtenu : permet de perméabiliser les cellules eucaryotes et de libérer leur contenu en ATP.

- **Ajout d'une ATPase** : détruit tout l'ATP des cellules animales et végétales qui a été libéré.
- **Inhibition de l'ATPase** : pour ne pas détruire l'ATP bactérien.
- **Extraction de l'ATP bactérien.**
- **Dosage de l'ATP bactérien.**

Cette manipulation est réalisée sur plusieurs lots, on obtient donc plusieurs résultats et c'est la moyenne de ces résultats qui donnera une idée de la quantité d'ATP bactérien.

c) Analyse.

Pour quantifier l'ATP, on utilise la réaction suivante :



Plus il y a d'ATP plus il y a de lumière. C'est donc une analyse **qualitative**.

On ne peut pas faire de coloration entre la quantité d'ATP et le nombre de bactérie. La quantité d'ATP dépend de **l'état physiologique de la bactérie** et **peut différer d'une espèce de bactérie à une autre**. Cette technique peut être quantitative seulement si on est sûr qu'un produit n'est contaminé que par **une seule bactérie**.

Des études ont donc été faites :

Microorganismes	Teneur en ATP 10 ¹⁶ g/C
Enterobacter aerogenes	0,3
Bacillus coagulans	1,7
Staphylococcus aerens	0,6
E. coli	1
Klebsiella pneumoniae	5

d) Avantages de la technique :

Le seuil de détection est compris entre **10³ et 10⁵ bactérie par mL ou par gramme** d'aliment analysé. Le temps entre le début de l'analyse, le broyage, et le résultat est de **1h**. Les autres techniques de culture varient entre 24h et 72h, c'est donc une technique **très rapide**. C'est une technique **reproductible, automatisable**.

e) Limites de la technique :

On ne peut **pas identifier les microorganismes** présents. Les **bactéries mortes peuvent être également quantifiées**, on peut donc sur estimer la quantité d'ATP donc le nombre bactéries. Il est **difficile de quantifier** cette technique quand le produit à analyser contient un mélange d'espèces bactériennes

f) Applications :

Cette technique peut permettre d'observer **l'évolution du nombre de bactérie pathogène ou non** dans un produit.

Elle est utilisée pour la numération des microorganismes dans le lait cru, dans les jus de fruits, dans l'eau potable, les desserts lactés, les produits cosmétiques et pharmaceutiques.

Cette technique est utilisée également pour vérifier l'efficacité de procédés de stérilisation des conserves.

Elle permet de détecter d'éventuelles contaminations au niveau d'une chaîne de production et permet aussi de vérifier l'efficacité des désinfectants.

II) Les méthodes par sondes nucléiques.

- 1) Hybridation moléculaire
- 2) Sondes nucléiques

La technique précédente ne permet pas d'accéder au genre voire à l'espèce des microorganismes responsables de la contamination. Des **techniques moléculaires** ont ainsi été développées. Elles ont d'abord été introduites dans l'analyse médicale et sont depuis quelques années couramment utilisées dans l'industrie agroalimentaire.

a) Principe.

Tout microorganisme vivant possède un gène ou une séquence d'ADN spécifique. **La détection de ce gène, de cette séquence indique la présence du microorganisme recherché, le nombre de gène ou de séquence détecté renseigne sur le nombre de cellules présentes.**

b) Echantillonnage/extraction.

Cette technique peut se faire sur des quantités d'extraction très faible : de **0,1 g à 1 g ou 0,1 mL à 1 mL.**

- **Homogénéisation** précédé d'un broyage pour un solide si nécessaire.
- **Extraction** : l'ADN total est **directement extrait**. Cette extraction peut faire appel à des **protocoles normés**. Ces protocoles sont mis en œuvre par des produits de laboratoire ou des kits d'extraction commercialisés.
- **Amplification** par **PCR** : peut être nécessaire ou non afin d'améliorer le seuil de détection.

L'extraction va nous donner de l'ADN total, et la détection va se faire dans cet ADN total ou non par une sonde spécifique du gène ou du fragment de gène recherché et cette sonde nucléique va être hybridé directement avec l'ADN total. Si le nombre de copie est suffisant, l'hybridation sera visible, s'il n'est pas suffisant, on fait d'abord une étape d'amplification avec des amorces du gènes recherché.

En effet, les sondes nucléiques pour le diagnostic microbiologique des aliments n'ont jamais pu être utilisé directement sur des échantillons alimentaires parce qu'elles présentent l'inconvénient d'avoir un **seuil de détection trop faible qui est de 10^5 microorganismes par gramme ou par mL par hybridation directe. Le seuil va jusqu'à 10^2 microorganismes/mL quand c'est couplé avec la PCR.**

Quand on fait une **hybridation directe**, la durée peut aller de **3 à 4h**. Si on fait l'hybridation suivie d'une **PCR** il faut rajouter le temps nécessaire pour la PCR ça va être donc de **5 à 8h**.

c) Avantages

- Sensible
- Spécifique
- Rapide

d) Inconvénients

- Nécessite une **technicité** et il faut que les personnes soient **formées** : quand on travaille avec des microorganismes il y a des **risques de contamination énormes**.

- Utilisation des sondes qui peuvent être **radioactives** (= **sondes chaudes**) même si de plus en plus on se dirige vers l'utilisation des **sondes froides** (= sonde est couplée à une enzyme. Une fois que l'hybridation se fait on dispose d'un substrat d'enzyme qui fait que quand il y a réaction enzyme/substrat il y a une **réaction colorée** quand il y a hybridation).

e) Détection

Cette technique peut être utilisée pour détecter toutes les bactéries dont on connaît une **séquence d'acides aminés spécifique**. Cependant, si on utilise une séquence qui est commune à plusieurs bactéries on ne saura pas de quelle bactérie il s'agit. Cette technique peut être utilisée pour la recherche de **microorganismes pathogènes**.

Cette technique permet de détecter :

- **Salmonella** qui est une bactérie pathogène qu'on retrouve dans **produits alimentaires**. La contamination par cette bactérie donne une salmonellose → **gastro mortelle**.
- **Listéria** qui donne comme maladie la listériose. La listéria peut envahir la **circulation sanguine** et peut se retrouver dans les **organes vitaux**. C'est une bactérie d'origine **alimentaire** et touche particulièrement les femmes enceintes.
- **Staphylococcus aureus** qui est responsable de maladies graves car elle est **multirésistante**.

Depuis un certain nombre d'années s'est développée une PCR spéciale qui est la **PCR quantitative** (= QPCR). Cette technique consiste à faire une **amplification** mais présente l'avantage de donner le **nombre de cibles** dans l'échantillon total. On peut donc quantifier le pathogène mais on peut quantifier dans un même échantillon plusieurs pathogènes.

III) Techniques sérologiques

1) Immunofluorescence

2) Immunoenzymologie

Ex : la méthode ELISA

La **pathogénicité** (dangerosité) d'un microorganisme n'est pas dû uniquement à sa présence, dans certains cas elle est liée à la **production de toxines** par ce dernier. On doit aussi vérifier qu'il n'y a pas de toxine. Dans ces conditions, la **détection** de la toxine est une **étape nécessaire** pour estimer le risque.

La méthode ELISA est l'une des technique utilisée.

a) Echantillonnage

L'aliment ou le produit à analyser est introduit dans un sac plastique stérile contenant un **diluant** (censé mettre en solution tout ce qui est soluble dans l'aliment donc la toxine car elle est soluble) qu'on place dans un appareil appelé **stomacher**. Avant de mettre l'échantillon dans ce sac une **étape de broyage** est souvent **nécessaire** (pour les produits solides en particulier pour libérer un maximum de choses au moment de la dilution). Ce sac est frappé par des palettes pour optimiser l'étape de mélange et faciliter la dissolution du produit dans le diluant. La quantité d'échantillon est standardisé selon l'aliment et la durée de cette étape est de **30-60 secondes**.

Après cette étape le mélange est filtré et la détection se fera au niveau du **filtrat**.

b) Détection

La toxine peut être considérée comme un **Ag** qui peut avoir un **AC spécifique** et chaque fois qu'on a une réaction entre Ag et AC montre que la toxine est là. Préalablement à la détection il faut disposer d'AC spécifique de la toxine. Donc on injecte à un cobaye la toxine et on récupère les AC de ce cobaye. On dispose donc d'une **source de toxine** et de son AC qui le reconnaît qui est commercialisé. Donc si on a une toxine qu'on ne connaît pas ça sera très difficile de trouver les AC. On utilise les **plaques ELISA** (8 puits sur 12 puits).

CF Schémas feuille

Les plaques sont préparées de la manière suivante :

- au niveau d'un puits on va **fixer les AC** et pour que la détection soit **vérifiée** on fait la manipulation sur plusieurs puits.
- On ajoute notre échantillon => **filtrat obtenu**
- On ajoute un **AC couplé à une enzyme** qui reconnaît l'Ag

Après chacune des étapes on fait un **lavage**.

- On ajoute le **substrat de l'enzyme**.

Quand la réaction se fait le produit est soit **coloré**, soit **fluorescent** (immunofluorescence). On fait donc une lecture dans un **lecteur microplaque** qui va donner **l'intensité** de la coloration ou de la fluorescence.

Préalablement à cette étape d'analyse des coupes d'étalonnage sont faites pour relier la **concentration** de toxine et **l'intensité** de la coloration/fluorescence → On va faire des **dilutions** et mettre dans les puits pour avoir différentes couleurs selon la concentration. On va pouvoir faire une courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en toxine. On peut donc détecter et quantifier grâce à cette méthode. Grâce à une courbe d'étalonnage on peut déterminer la **concentration** de toxines. La courbe d'étalonnage doit être faite dans les **mêmes conditions de milieu**.

c) Avantages

- **Simple**
- **Rapide**
- **Sélective**
- **Reproductive**
- Elle peut être totalement **automatisée**
- On peut effectuer jusqu'à **4 000 analyses par jour**
- La durée d'une analyse est de **1-5h**

d) Inconvénients

- Ne peut être utilisée que pour des **toxines dont on possède un AC spécifique**.
- Si on dispose d'un **seul type d'AC** et qu'on fait le test sans réaction ça ne veut pas dire qu'il y a aucun risque car certains pathogènes possèdent plusieurs toxines (ex : **staphylococcus aureus**).
- Certaines **réactions non spécifiques** peuvent être observées. On peut se protéger de ce genre d'erreurs en faisant des **témoins**.

e)

Cette technique est utilisée pour détecter les **toxines de staphylococcus aureus** mais on n'arrive pas à les différencier et on n'est pas capables de détecter toutes les toxines de clostridium botulinum. Elle est utilisée pour détecter les **mycotoxines** (toxines produites par les champignons). Cette technique est aussi utilisée pour détecter directement certaines bactéries comme **Salmonella** et certaines **entérobactéries**.

Applications

A. Indicateurs de contamination fécale et qualité d'un produit

On a un produit qu'on veut consommer et on nous demande de faire l'analyse pour savoir si on peut le consommer.

Pour analyser un produit X, on recherche :

- Les **mésophiles totaux**
- Les **coliformes totaux**
- Les **coliformes fécaux**
- Les **streptocoques**
- Le **clostridium**

On prend par exemple les mésophiles pour faire l'analyse. On prend 1g d'aliments qu'on met dans 9 mL d'eau physiologique. Vu qu'on ne sait pas combien on a de toxines dans l'aliment on est obligé de faire des dilutions. On met chaque dilution dans une boîte de pétri quand les bactéries vont se multiplier ça va donner des colonies qu'on va devoir compter.

CF feuille

	Nombre de colonies
Solution mère	10 000
Dilution 10^{-1}	1 000
Dilution 10^{-2}	100
Dilution 10^{-3}	10

Les nombres sont des exemples pris au hasard.

Quand on dénombre sur un boîte de Pétri il y a une règle : seuls sont exploitables les résultats ou les colonies dans une boîte est compris entre 25 et 250.

D'après cette règle, seul le résultat de la dilution 10^{-2} sont exploitables. Quand j'ai le chiffre 100 ça veut dire que j'ai 100 colonies et vu qu'une colonie correspond à une bactérie on a 100 bactéries qui sont dans le mL de la dilution 10^{-2} . J'ai donc 1 000 colonies par mL dans la dilution 10^{-1} . Donc j'ai 10 000 colonies par mL de la suspension mère. Maintenant si on veut trouver combien on a de colonies par gramme d'aliment : on en conclut qu'on a 100 000 colonies par 10 mL de la suspension mère. On a mis un gramme d'aliment pour 9 mL d'eau donc on peut conclure qu'on a 100 000 colonies par gramme d'aliment analysé.

/! 1 gramme correspond à 1 mL.

On a une norme notée n qui est exprimé en **nombre de colonies/g d'aliment**. La valeur doit être comparée à la norme.

Règle :

- Si ma valeur est **inférieure ou égale à la norme** : c'est un produit de **bonne qualité**.
- Si ma valeur est comprise **entre n et $10n$** : le produit a une **qualité satisfaisante**.
- Si ma valeur est comprise entre **$10n$ et $30n$** : le produit a une **qualité acceptable**.
- Si ma valeur est **supérieure à $30n$** : le produit a une **qualité corrompue**. On ne peut plus consommer l'aliment.

La norme n'est donc pas vraiment un chiffre qui représente un réel danger.

Supposons qu'on a fait l'analyse pour les coliformes totaux et fécaux et les clostridiiums : il y a une norme pour chaque aliment et pour chaque microorganisme. On a fait une analyse :

- **Mésophile** : valeur est comprise entre **n et $10n$**
- **Coliformes fécaux** : valeur est **supérieure à $30n$**
- **Coliformes totaux** : valeur comprise entre **$10n$ et $30n$**
- **Clostridiiums** : valeur **inférieure à n**

La qualité est donnée par les microorganismes qui donnent le **plus mauvais résultat** donc le produit est corrompu et ne peut pas être consommé.