



Développement d'un outil de PCR multiplex en temps réel pour la recherche de pathogènes alimentaires bactériens lors d'investigations de foyers de Toxi-Infection Alimentaire (Collective) (TIA(C))

Audrey Malet

► To cite this version:

Audrey Malet. Développement d'un outil de PCR multiplex en temps réel pour la recherche de pathogènes alimentaires bactériens lors d'investigations de foyers de Toxi-Infection Alimentaire (Collective) (TIA(C)). Biologie moléculaire. 2018. hal-01997835

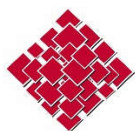
HAL Id: hal-01997835

<https://ephe.hal.science/hal-01997835>

Submitted on 29 Jan 2019

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.



École Pratique des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté

Par

Audrey MALET

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : Développement d'un outil de PCR multiplex en temps réel pour la recherche de pathogènes alimentaires bactériens lors d'investigations de foyers de Toxi-Infection Alimentaire (Collective) (TIA(C)).

Soutenu le 10 décembre 2018 devant le jury suivant :

Pr. Sylvie DEMIGNOT – **Présidente**
M. David ALBERT – **Tuteur scientifique**
Pr. EPHE Bernard MIGNOTTE – **Tuteur pédagogique**
Dr. Emmanuel BREARD – **Rapporteur**
M. Jean-Philippe ROSEC – **Examineur**

Mémoire préparé sous la direction de :

David ALBERT - **Unité SEL du Laboratoire de Sécurité des Aliments de Maisons-Alfort (ANSES)**

Agnès CHAMOIN - **Unité LCSV du Laboratoire de Sécurité des Aliments de Maisons-Alfort (ANSES)**

Directeur : Laurent LALOUX

Chef du département des contaminants microbiologiques : Michel-Yves MISTOU
et de

Pr. Bernard MIGNOTTE

Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire (EA 4589 - LGBC) de l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (UVSQ) / Université Paris-Saclay

Directeur : Pr. Bernard MIGNOTTE

EPHE (Science de la vie et de la Terre)

Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématique de l'EPHE : Les Cellules et leur Environnement : Dynamique des Interactions (CEDI)

REMERCIEMENTS

Au terme de ces cinq années de travaux, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à cette formation.

Tout d'abord les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer et de juger mon travail dans le cadre de ce diplôme de l'École Pratique des Hautes Études en Sciences de la Vie et de la Terre. Le Docteur Emmanuel BREARD en tant que rapporteur, monsieur Jean Philippe ROSEC en tant qu'examineur, le Professeur Sylvie DEMIGNOT en tant que Présidente, le Pr. Bernard MIGNOTTE en tant que tuteur pédagogique, et M. David ALBERT en tant que tuteur scientifique.

La maître de conférences Flore RENAUD-PAÏTRA pour sa disponibilité au commencement de la formation, à chaque réunion de début d'année, et pour son aide lors des unités d'enseignements.

Le Professeur Bernard MIGNOTTE pour avoir accepté d'être mon tuteur pédagogique et pour avoir toujours répondu à mes questions, surtout lors des phases de rédaction, intermédiaire pour l'obtention du CCR, puis finale pour ce mémoire de fin de diplôme.

Je remercie également l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire pour l'alimentation, l'environnement et le travail) à travers la personne de Monsieur Laurent LALOUX, directeur du laboratoire de sécurité des aliments, de m'avoir offert la possibilité de suivre cette formation et permis mon évolution.

Agnès CHAMOIN, Chef de l'unité LCSV dont je fais partie, et au sein de laquelle j'ai pu évoluer. Merci d'avoir accepté sans hésitation cette volonté de formation et de l'avoir appuyée. Merci d'avoir eu confiance en moi, cela a beaucoup compté et m'a permis lors de certaines baisses de régime de reprendre mon souffle. Ton écoute sans faille, toutes les discussions que nous pouvons avoir aussi bien sur le plan professionnel que personnel m'ont aidées, m'aident toujours, et m'aideront encore à évoluer j'en suis sûre.

Toute mon équipe, qui m'a soutenue au quotidien tout au long de ces années, tant techniquement que lors de nos différents échanges, bien que ma communication sur l'avancée du projet, ne fût pas des plus régulières.

David ALBERT, Adjoint au chef de l'unité LCSV au commencement de cette formation. Merci d'avoir également appuyé ma demande de formation à l'obtention de ce diplôme. Tu as également cru en moi en me confiant ce projet très intéressant qu'est de mettre en place cette méthode de détection rapide et simultanée de pathogènes alimentaires responsables de TIAC.

Cela m'a permis d'élargir nettement mes connaissances en biologie moléculaire, et d'évoluer professionnellement. Tu as répondu présent à chaque fois que j'en avais besoin en plus de nos points d'étapes réguliers, bien que tu ais rejoins une nouvelle équipe peu après le début de ma formation, et malgré une restructuration du laboratoire et un planning bien chargé !

Merci à Jacques-Antoine HENNEKINNE, Chef de l'unité SBCL, Sabine HERBIN, responsable de l'équipe Bacillus, Olivier FIRMESSE, responsable de l'équipe Clostridium, et Frédéric AUVRAY responsable de l'équipe Staphylocoques au démarrage de la formation, pour tous les échanges que nous avons pu avoir, aussi bien sur le plan de l'expertise qui vous est propre, et vos conseils, mais aussi au travers des autres qualités qui vous caractérisent, la bonne humeur, l'humanité, la franchise, et j'en oublie sûrement.

Merci aux membres des différentes équipes, unités et missions, à qui j'ai pu poser de nombreuses questions et qui m'ont apporté une aide technique précieuse. Noémie, Alexandra, Nicolas, Emeline, Krystel, Cédric, ainsi que tous ceux que j'oublie à ce moment précis. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir transmis votre savoir-faire et d'avoir partagé votre expérience avec moi à différentes étapes du projet.

Et je finirai par remercier chaleureusement mon entourage personnel, à commencer par mon mari, qui m'a soutenue, accompagnée, encouragée, et qui a pris le relais à la maison à de nombreuses reprises ! Sans oublier ma famille et mes amis, pour leurs soutient et leurs encouragements au quotidien.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	3
LISTE DES FIGURES.....	8
LISTE DES TABLEAUX.....	10
LISTE DES ABREVIATIONS.....	12
I. INTRODUCTION.....	13
I.1 REGLEMENTATION EN HYGIENE ALIMENTAIRE.....	13
I.1.1 <i>Paquet hygiène</i>	13
I.1.2 <i>Critères microbiologiques</i>	13
I.2 LES TIAC.....	14
I.2.1 <i>Investigations</i>	14
I.2.2 <i>Les partenaires en épidémiologie- surveillance</i>	14
I.3 CONTEXTE EPIDEMIOLOGIQUE	15
I.3.1 <i>A l'échelle Européenne</i>	15
I.3.2 <i>A l'échelle Française</i>	15
I.3.3 <i>A l'échelle de l'Ile de France</i>	16
I.3.4 <i>Principaux pathogènes alimentaires bactériens rencontrés dans le cadre des activités de l'unité LCSV</i> 17	
I.3.4.1 <i>Bacillus cereus</i> présumés.....	17
I.3.4.2 <i>Staphylocoques à coagulase positive</i>	18
I.3.4.3 <i>Clostridium perfringens</i>	18
I.4 CONTEXTE DU TRAVAIL AU SEIN DE L'UNITÉ LCSV « LABORATOIRE CENTRAL DES SERVICES VÉTÉRINAIRES »	19
I.4.1 <i>« Pack TIAC »</i>	19
I.5 TECHNIQUES ACTUELLES	20
I.5.1 <i>Bactériologie conventionnelle</i>	20
I.5.2 <i>Méthodes de PCR (Polymerisation Chain Reaction)</i>	20
I.6 OBJECTIF ET STRATÉGIE DE RECHERCHE	21
I.6.1 <i>Objectif général</i>	21
I.6.2 <i>Stratégie de travail</i>	21
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES	23
II.1 DÉTERMINATION DES CIBLES GÉNÉTIQUES.....	23
II.1.1 <i>Détection des Staphylocoques à coagulase positive (SCP)</i>	23
II.1.2 <i>Détection des espèces du groupe Bacillus cereus (BC)</i>	23
II.1.3 <i>Détection des Clostridium perfringens (CP)</i>	23
II.2 DESIGN DE SYSTÈMES DE DÉTECTION.....	24
II.3 SPÉCIFICITÉ IN SILICO	24
II.4 EXTRACTION DES ADN BACTÉRIENS.....	25

II.5	ESTIMATION DE LA QUALITE/QUANTITE D'ADN	26
II.6	DETECTION PAR PCR EN TEMPS REEL (qPCR)	26
II.6.1	<i>Contrôle interne positif (ou contrôle d'inhibition) – IPC</i>	27
II.6.2	<i>Détection en simplex</i>	28
II.6.2.1	Chimie SYBRGreen	28
II.6.2.2	Technologie Taqman	29
II.6.2.3	Choix des fluorophores	30
II.6.2.4	Efficacités de PCR	31
II.7	SELECTION DES SOUCHES	32
II.7.1	<i>Détermination de la spécificité analytique (Inclusivité/ exclusivité)</i>	32
II.7.1.1	Etude d'inclusivité	32
II.7.1.2	Etude d'exclusivité.....	35
II.7.2	<i>Détection multiplex sur souches pures</i>	36
II.8	SELECTION DES MATRICES ALIMENTAIRES.....	36
II.8.1	<i>Optimisation des mix PCR</i>	37
II.9	PREPARATION DES ECHANTILLONS ET DENOMBREMENTS BACTERIOLOGIQUES.....	38
II.9.1	<i>A partir de souches pures</i>	38
II.9.2	<i>A partir des matrices alimentaires : Echantillons naturellement contaminés</i>	38
III.	RESULTATS	39
III.1	DETECTION EN SIMPLEX SUR SOUCHES PURES	39
III.1.1	<i>Sélection du kit d'extraction</i>	39
III.1.2	<i>Vérification et sélection des systèmes de détection</i>	40
III.1.2.1	Analyse in silico.....	40
III.1.2.2	Vérification expérimentale	42
III.1.3	<i>Efficacités des systèmes de détection</i>	44
III.1.3.1	coa_3 : Staphylocoques à coagulase positive	45
III.1.3.2	rpoA_2 et rpoB_1 : Bacillus cereus présomptifs.....	47
III.1.3.3	cpa_4 : Clostridium perfringens	49
III.1.4	<i>Spécificité analytique : Inclusivité</i>	50
III.1.4.1	coa_3 et nuc : Staphylocoques à coagulase positive.....	50
III.1.4.2	rpoA_2 et rpoB_1 : Bacillus cereus présomptifs.....	51
III.1.4.3	cpa_4 : Clostridium perfringens	53
III.1.5	<i>Spécificité analytique : Exclusivité</i>	54
III.2	ESSAIS PRELIMINAIRES DE DETECTION EN SIMPLEX SUR MATRICE ALIMENTAIRE.....	55
III.2.1	<i>Contrôle d'inhibition (IPC)</i>	55
III.2.2	<i>Utilisation du kit d'extraction PrepSeq™ rapid spin sample (Applied)</i>	57
III.2.3	<i>Répétabilité sur matrice</i>	57
III.2.3.1	Détection des Bacillus cereus présomptifs	58
III.2.3.2	Détection de Staphylococcus aureus	59
III.2.3.3	Détection de Clostridium perfringens	59
III.2.3.4	Echantillons naturellement contaminés	60
III.2.4	<i>Limite de détection</i>	62

III.2.4.1	Estimation sur souche pures.....	62
III.2.4.2	Approche de la sensibilité sur matrice alimentaire	62
III.3	DETECTION EN MULTIPLEX SUR SOUCHES PURES	65
III.4	DETECTION MULTIPLEX SUR MATRICE ALIMENTAIRE	67
III.4.1	<i>Optimisation du mix réactionnel.....</i>	<i>67</i>
III.4.2	<i>Optimisation de la température d'hybridation</i>	<i>69</i>
III.4.3	<i>Echantillons naturellement contaminés</i>	<i>69</i>
IV.	DISCUSSION	71
V.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	75
	BIBLIOGRAPHIE.....	77
	ANNEXES	80
	ANNEXE 1	80
	ANNEXE 2	83
	ANNEXE 3	84
	ANNEXE 4	85

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation graphique du nombre d'échantillons dans lequel un pathogène alimentaire bactérien a été isolé, parmi les échantillons de TIAC, TIA, plaintes et alertes analysés en Ile de France	16
Figure 2. Schéma de principe de la chimie SybrGreen.....	29
Figure 3. Schéma de principe de la technologie Taqman (sondes d'hydrolyses)	30
Figure 4. Choix des fluorophores en fonction du thermocycleur LC 480 II et de la compatibilité Reporter / Quencher.....	31
Figure 5. Détection du gène <i>nuc</i> par PCR en temps réel avec le Light Cyclers 480 II (Utilisation de la chimie SybrGreen) à partir de l'extrait obtenu par la méthode semi-automatisée MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi) (Roche).....	40
Figure 6. Visualisation des amplifications obtenues avec les différents couples d'amorces vérifiés par PCR temps réel (LC 480 II - Roche) - chimie SybrGreen. Courbes d'amplifications et de fusion: A et B pour <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), C et D pour <i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579), E et F pour <i>Clostridium perfringens</i> (ATCC 13124).	44
Figure 7. Détermination de l'efficacité du couple d'amorces <i>coa_3</i> par PCR en temps réel à l'aide de la chimie SybrGreen, sur la souche <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	45
Figure 8. Vérification du couple d'amorces <i>coa_3</i> avec sonde de fluorescence (<i>coa_P3</i>) marquée en 5'-CY3 sur le graphique de gauche et 5'-HEX sur le graphique de droite. Détermination de l'efficacité de PCR de chaque couples d'amorces et sondes.	47
Figure 9. Détermination de l'efficacité de PCR des couples d'amorces <i>rpoA_2</i> et <i>rpoB_1</i> par PCR temps réel à l'aide de la chimie SybrGreen, en présence de la souche <i>B. cereus</i> ATCC 14579.....	48
Figure 10. Détermination de l'Efficacité de PCR du couple d'amorce <i>rpoA_2</i> avec sa sonde de fluorescence marquée en 5'LCRed610 – 3'BHQ2 (chimie Taqman). Analyse effectuée sur Light Cyclers 480 I (Roche) avec lecture de l'absorbance par le filtre Red610 (558-610 nm).....	49
Figure 11. Détermination de l'efficacité du couple d'amorces <i>cpa_4</i> par PCR en temps réel – chimie SybrGreen, avec la souche <i>C. perfringens</i> ATCC 13124.	49
Figure 12. Spécificité analytique. Essai d'inclusivité du couple d'amorces et sonde <i>nuc</i> en présence de vingt souches de SCP isolées d'échantillons de TIAC.....	50
Figure 13. Essais de détection des différentes espèces appartenant au groupe <i>Bacillus cereus</i> avec le couple d'amorces <i>rpoA_2</i> , par PCR temps réel – chimie SYBR Green.....	51
Figure 14. Détection de neuf souches représentant six espèces du groupe BC, par PCR temps réel sur LC 480 I (Roche) à l'aide du couple d'amorces <i>rpoA_2</i> et de la sonde de fluorescence Taqman marquée 5'LCRed610 – 3'BHQ2.	52
Figure 15. Spécificité analytique. Essai d'inclusivité du couple d'amorces et sonde <i>rpoA_2</i> sur vingt souches de <i>Bacillus cereus</i> présumptifs isolées d'échantillons de TIAC.....	53
Figure 16. Spécificité analytique. Essai d'inclusivité du couple d'amorces et sonde <i>cpa_4</i> sur 29 souches de <i>Clostridium perfringens</i> isolées d'échantillons de TIAC.	54
Figure 17. Courbes d'amplification de vingt répétitions d'une extraction d'ADN effectuée sur 1 ml d'EPT auquel ont été ajoutés 20 µl de la culture d'IPC (DiaControlDNA – Diagenode). Un témoin négatif d'extraction a été réalisé toutes les cinq répétitions. Ces derniers sont représentés par les courbes vertes ainsi que le témoin négatif de PCR.	56
Figure 18. Détection de l'IPC sur cinq extraits d'ADN de l'échantillon de salade thon/œuf n°15Q002606, analysés en duplicats.....	57

Figure 19. Courbes d'amplification de la PCR ciblant BC (A) et l'IPC (B), à partir de cinq extraits de l'échantillon de salade thon/œuf naturellement contaminé.....	58
Figure 20. Résultats des PCR ciblant <i>Staphylococcus aureus</i> (C) et l'IPC (D) à partir de cinq extraits de l'échantillon de salade thon/œuf (15Q002606) naturellement contaminé.	59
Figure 21. Courbes d'amplification obtenue pour les essais de détection en des <i>Clostridium perfringens</i> (E) et de l'IPC (F) sur cinq extraits de l'échantillon 15Q002606 naturellement contaminé.....	60
Figure 22. Détection de CP sur une gamme de dilutions décimales d'un extrait d'ADN de l'échantillon 18Q001746 naturellement contaminé.....	64
Figure 23. Détection des BC présumptifs sur gamme de dilutions décimales d'un extrait d'ADN de l'échantillon 18Q001868 naturellement contaminé.....	64
Figure 24. Détection de SA sur une gamme de dilutions décimales d'un extrait d'ADN de l'échantillon 18Q001868 naturellement contaminé.....	64
Figure 25. Détection multiplex des trois pathogènes (BC, SA et CP) à partir de l'échantillon de salade thon/œuf (15Q002606). Les concentrations en oligonucléotides utilisées sont données pour le mix 4 (Tableau 7). 67	
Figure 26. Courbes d'amplification correspondant à la détection multiplex des génomes de BC, CP et SA extraits de l'échantillon de salade thon/œuf, avec le Mix 3.....	68

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Séquences nucléotidiques et longueur des amorces spécifiques du gène <i>nuc</i> de <i>S. aureus</i> (méthode Anses LSA-INS-0139)	26
Tableau 2. Protocoles PCR utilisés dans le développement de la méthode pour la vérification des amorces (Chimie SybrGreen), la vérification des amorces et des sondes et les essais à partir d'échantillons alimentaires en simplex et multiplex (Chimie Taqman)	27
Tableau 3. Souches de référence testées pour l'étude d'inclusivité des couples d'amorces candidats.	33
Tableau 4. Souches de terrain testées pour l'étude d'inclusivité	33
Tableau 5. Souches de référence ou de terrain testées pour évaluer l'exclusivité des systèmes de détection. ..	35
Tableau 6. Essais de multiplexage des différents systèmes d'amplification selon quatre combinaisons de mix (A, B, C et D) et à partir des extraits d'ADN de souches pures des trois pathogènes, BC1 : <i>B. toyonensis</i> « <i>B. cereus var. mycoides</i> » ATCC 11778, SA1 : <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, et CP1 : <i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124), titrant à 10 ⁴ EG, seuls, ou mélangés.	36
Tableau 7. Matrices naturellement contaminées par BC et/ou CP et/ou SCP testées en PCR temps réel.....	37
Tableau 8. Concentrations des amorces et sondes testées dans le mix réactionnel (kit LightCycler® 480 Probe Master) pour la détection simultanée de BC (<i>rpoA</i> _2), CP (<i>cpa</i> _4) et SA (<i>nuc</i>). Les concentrations finales sont indiquées (nM).....	38
Tableau 9. Concentrations d'ADN obtenues lors des essais des quatre kits d'extraction pour 1 ml de culture soumis à l'extraction. Dosage fluorimétrique au Qubit 2.0 (ng/μl) et analyse PCR en temps réel avec le thermocycleur LC 480 II et son kit associé (LC@480 Probe Master) (Nb Equivalents génomes).....	39
Tableau 10. Noms et séquences des amorces et sondes candidates pour la détection des génomes de Staphylocoques à coagulase positive (<i>coa</i>) ou plus particulièrement <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>nuc</i>), les <i>Bacillus cereus</i> présomptifs (<i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> , et <i>nheB</i>), et les <i>Clostridium perfringens</i> (<i>cpa</i>)	41
Tableau 11. Noms et séquences des amorces et sondes retenus pour la détection des génomes de Staphylocoques à coagulase positive (<i>coa</i>) ou plus particulièrement <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>nuc</i>), les <i>Bacillus cereus</i> présomptifs (<i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> , et <i>nheB</i>), et les <i>Clostridium perfringens</i> (<i>cpa</i>)	43
Tableau 12. Résultats des essais d'exclusivité des quatre systèmes d'amplification (<i>rpoA</i> _2, <i>cpa</i> _4, <i>coa</i> _3, et <i>nuc</i>) sur un panel de souches non cibles.	55
Tableau 13. Ct moyen obtenus pour la détection de l'IPC, inoculé dans 1 ml de la suspension mère de l'échantillon de salade thon/œuf (15Q002606) : 5 répétitions de l'extraction d'ADN, et 1 ml d'EPT (20 répétitions de l'extraction d'ADN)	56
Tableau 14. Dénombrements bactériologiques de l'échantillon 15Q002606, initiaux, et deux ans après congélation à -20°C.	58
Tableau 15. Dénombrement bactériologiques et résultats des détections simplex des pathogènes BC, SA, et CP de 15 échantillons alimentaires naturellement contaminés provenant de TIAC.....	61
Tableau 16. Estimation de la limite de détection de chaque PCR à partir des échantillons alimentaires naturellement contaminés.....	65
Tableau 17. Résultats des essais de multiplexage selon les combinaisons de MIX réactionnels A, B, C, et D, en présence de 1, 2 ou des trois ADN extraits de souches pures de <i>Bacillus cereus</i> présomptifs (BC), <i>Clostridium perfringens</i> (CP), et <i>Staphylococcus aureus</i> (SA).	66
Tableau 18. Concentrations et volumes de chaque couple d'amorce et sonde testés dans le MIX 3 pour la PCR multiplex.....	68

Tableau 19. Détection multiplex sur 11 échantillons naturellement contaminés issus d'investigations de TIAC, déposés en duplicats, et à l'aide des concentrations en amorces et sondes de chaque système d'amplification retenues dans le Mix3.....	70
---	----

LISTE DES ABREVIATIONS

BC : *Bacillus cereus* (présomptifs)
BHI : Brain Heart Infusion
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
CE : Commission Européenne
COFRAC : Comité Français d'Accréditation
CP: *Clostridium perfringens*
Ct: Cycle Threshold
DDPP : Direction Départementale de Protection des Populations
DO : Déclaration Obligatoire
DT-ARS : Direction Territoriale de l'Agence Régionale de Santé
EFSA : European Food Safety Authority
eg : équivalent génome
ELFA : Enzyme Linked Fluorescent Assay
EN : Norme Européenne
EPT : Eau Peptonée Tamponée
InVS : Institut de Veille Sanitaire
ISO : International Standard Organisation
IPC : Internal Positive Control
LCSV : Laboratoire Central des Services Vétérinaires
MDO : Maladie à Déclaration Obligatoire
NCBI: National Center for Biotechnology Information
NF : Norme Française
NSB3 : Niveau de Sécurité Biologique 3
PCR : Polymerase Chain Reaction
RPF : Rabbit Plasma Fibrinogen
SA: *Staphylococcus aureus*
SCP: Staphylocoques à coagulase positive
SCVPH: Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health
SPF : Santé Publique France
TIA(C) : Toxi Infection Alimentaire (Collective)
Tm : Melting temperature ou, température de fusion
TSC : Tryptone Sulfite Cyclosérine
UFC : Unité Formant Colonie

I. INTRODUCTION

I.1 Règlementation en hygiène alimentaire

I.1.1 Paquet hygiène

La contamination des aliments par des agents microbiologiques constitue un problème de santé publique. En effet, chaque année il est recensé un grand nombre de Toxi-Infections Alimentaires, Collectives (TIA(C)) tant au niveau national qu'eupéen. Ces toxi-infections alimentaires résultent souvent d'une maîtrise insuffisante des conditions d'hygiène et sont liées à la contamination de matières premières, ou de denrées alimentaires au stade de leur production, transformation et, ou distribution, par des micro-organismes pathogènes.

Pour garantir au mieux la sécurité des denrées alimentaires, un grand nombre de textes, applicables dans l'union Européenne (directives, arrêtés, règlements...), définissant les règles, les principes et les procédures à suivre dans le secteur alimentaire ont été établis. En 2006, une harmonisation de cette réglementation en hygiène alimentaire au niveau européen a donné naissance au « paquet hygiène », regroupant six textes : La « Food law » (Règlement (CE) n° 178/2002), base de toute la réglementation du secteur des denrées alimentaires, qui a ensuite été complété par cinq autres règlements (Règlement (CE) n° 853/2004), (Règlement (CE) n° 882/2004), (Règlement (CE) n° 852/2004), (Règlement (CE) n° 854/2004), (Règlement (CE) n°183/2005) relatifs à l'hygiène des denrées alimentaires, des denrées alimentaires d'origine animale, aux contrôles officiels, et établissant les exigences en matière d'hygiène des aliments pour animaux. Cet ensemble de textes concerne l'ensemble de la filière agroalimentaire depuis la production primaire, animale et végétale jusqu'au consommateur en passant par l'industrie agroalimentaire, les métiers de bouche, le transport, et la distribution (« de la fourche à la fourchette »). Son objectif est d'harmoniser le niveau de sécurité sanitaire en impliquant l'ensemble des acteurs de la chaîne alimentaire et en optimisant les contrôles des autorités sanitaires.

I.1.2 Critères microbiologiques

En complément de la Food Law (Règlement (CE) n° 178/2002) imposant qu'aucune denrée alimentaire ne doit être mise sur le marché si elle est dangereuse, des critères microbiologiques (d'hygiène et de sécurité) ont été définis à partir de données scientifiques, et regroupés dans le (Règlement (CE) n°2073/2005), en fonction de catégories de produits et des micro-organismes qui peuvent y être majoritairement retrouvés. Ces critères

microbiologiques sont donc utilisés par les entreprises dans le cadre d'autocontrôles, mais aussi par les services de protection des populations dans le cadre de contrôles officiels, pour vérifier le statut microbiologique des denrées alimentaires produites.

Ainsi, lors de ces contrôles ou encore lors d'investigations de TIAC, des échantillons alimentaires sont prélevés puis acheminés vers des laboratoires où sont réalisés les analyses de première intention, pour rechercher et/ou dénombrer les micro-organismes pouvant altérer les denrées alimentaires, et/ou provoquer pour certains, des symptômes typiques des TIA pouvant donner lieu à une déclaration obligatoire.

I.2 Les TIAC

On parle de TIAC lorsqu'il y a apparition d'au moins deux cas similaires d'une symptomatologie pouvant être rapportée à une même origine alimentaire. Elles constituent des maladies à déclaration obligatoire (MDO). Elles sont généralement liées, comme toute TIA, à l'utilisation de matières premières contaminées et/ou au non-respect des mesures d'hygiène et des températures (rupture de la chaîne du froid et du chaud) lors de la préparation des aliments, et/ou, au manque de maîtrise des contaminations croisées lors de la manipulation des aliments. Ainsi, de multiples micro-organismes (bactéries, virus, parasites) sont susceptibles de contaminer les denrées alimentaires et d'engendrer diverses pathologies.

I.2.1 Investigations

Tout incident pouvant évoquer une suspicion de toxi-infection alimentaire collective, doit immédiatement être signalé à l'autorité sanitaire départementale : Délégation Territoriale de l'Agence Régionale de Santé (DT-ARS) ou à la Direction Départementale en charge de la Protection des Populations (DDPP). Leur signalement, ou la déclaration obligatoire, permet la réalisation d'une enquête épidémiologique destinée à identifier les aliments responsables, les facteurs favorisant leur contamination (Buisson & Teyssou, 2002) et de prendre des mesures correctives rapides afin d'éviter la survenue de nouveaux cas de contamination.

I.2.2 Les partenaires en épidémiologie- surveillance

Santé Publique France (SPF), est l'agence nationale de santé publique. Elle est placée sous la tutelle du ministère de la santé et a pour mission de protéger efficacement la santé des populations par la veille sanitaire et la surveillance épidémiologique. Elle assure en France, la surveillance des TIAC via notamment le système des remontées de déclarations obligatoires.

En Europe, l'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) analyse et interprète les données issues des pays de l'Union Européenne portant entre autre sur les maladies d'origine alimentaire. Cette instance Européenne travaille également en étroite collaboration avec l'EFSA (European Food Safety Authority) pour en assurer la surveillance.

I.3 Contexte épidémiologique

I.3.1 A l'échelle Européenne

En Europe, un bilan sur les tendances et les sources des zoonoses, les agents zoonotiques et les épidémies d'origine alimentaire, est réalisé chaque année par l'EFSA.

Les dernières données recueillies et publiées par cet organisme concernent les TIAC recensées en 2016 dans les Etats membres (EFSA Journal, 2017). 4 786 épidémies d'origine alimentaire, y compris dues à la consommation d'eau, ont été rapportées à l'échelle de l'Union Européenne cette année-là. 49 950 malades, 3 869 hospitalisations et 20 décès ont été signalés. Le taux de déclaration au niveau de l'UE était de 1,03 foyer d'origine alimentaire pour 100 000 habitants, en légère augmentation par rapport à 2015 mais à peu près égal ou légèrement inférieur aux taux de déclaration d'épidémie à l'échelle de l'UE au cours de la période 2010-2016.

En 2016, la plupart des épidémies d'origine alimentaire signalées pour lesquelles l'agent en cause était connu étaient associées à des agents bactériens (33,9% de toutes les épidémies). Les toxines bactériennes se classaient au deuxième rang (17,7%), suivis des virus (9,8% de tous les foyers), et des autres agents (2,6%). *Salmonella* a été identifiée comme l'agent le plus fréquemment signalé au niveau de l'UE (22,3%) et parmi les agents bactériens, représentait à elle seule les deux tiers des foyers (65,8%), et avec *Campylobacter*, la grande majorité des cas associés aux agents bactériens (94,1%).

I.3.2 A l'échelle Française

Selon les données épidémiologiques de Santé Publique France relatives aux TIAC en 2016 (SPF, données épidémiologiques, 2016), 1 455 TIAC ont été déclarées en France, affectant 13 997 personnes, dont 634 (5 %) ont été hospitalisées (hospitalisation ou passage aux urgences) et 3 sont décédées. Par rapport à 2015, le nombre de TIAC est en légère augmentation (+4,7 %) : 1 390 TIAC avaient été déclarées en 2015 impliquant 11 429 personnes. L'agent pathogène le plus fréquemment confirmé était *Salmonella* avec 35 % des TIAC pour lesquelles un agent a été confirmé (48 % en 2015). Les agents pathogènes les plus couramment suspectés étaient *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* et *Bacillus*

cereus correspondant à 66 % des TIAC pour lesquelles un agent a été suspecté (73 % en 2015). Aucun agent n'a pu être mis en évidence ni suspecté dans 13 % des TIAC déclarées (14 % en 2015). La proportion de TIAC survenues en restauration commerciale a augmenté entre 2015 et 2016, passant de 38 % à 41 %. La proportion de TIAC survenues en restauration collective et lors de repas familiaux est stable par rapport à 2015 : respectivement 27 % et 32 % des TIAC déclarées (29 % et 32 % en 2015).

I.3.3 A l'échelle de l'Ile de France

Un bilan des données acquises suite aux investigations de TIAC menées sur plusieurs départements de la région Ile de France (75, 77, 91, 92, 93, 94) a été réalisé au sein de l'unité LCSV (Laboratoire Central des Services Vétérinaires) sur la période de janvier 2012 à décembre 2016. 4 930 échantillons issus de TIAC, TIA ou plaintes ont été reçus et analysés sur la période 2012 - 2016, dont 884 pour lesquels un ou plusieurs pathogènes bactériens ont été isolés, soit 17,9% (Figure 1).

Les pathogènes majoritairement retrouvés parmi ceux recherchés dans les matrices alimentaires analysées sont les espèces du groupe *Bacillus cereus* (dit aussi *Bacillus cereus* présumptifs (BC)) avec 44,1% des échantillons pour lesquels un (ou plusieurs) pathogène a été isolé, suivis par les Staphylocoques à coagulase positive (SCP) (37,9%) et les *Clostridium perfringens* (CP) (16,3%). Les *Salmonella spp* et *Listeria monocytogenes* sont isolées dans moins de 10% des échantillons cas.

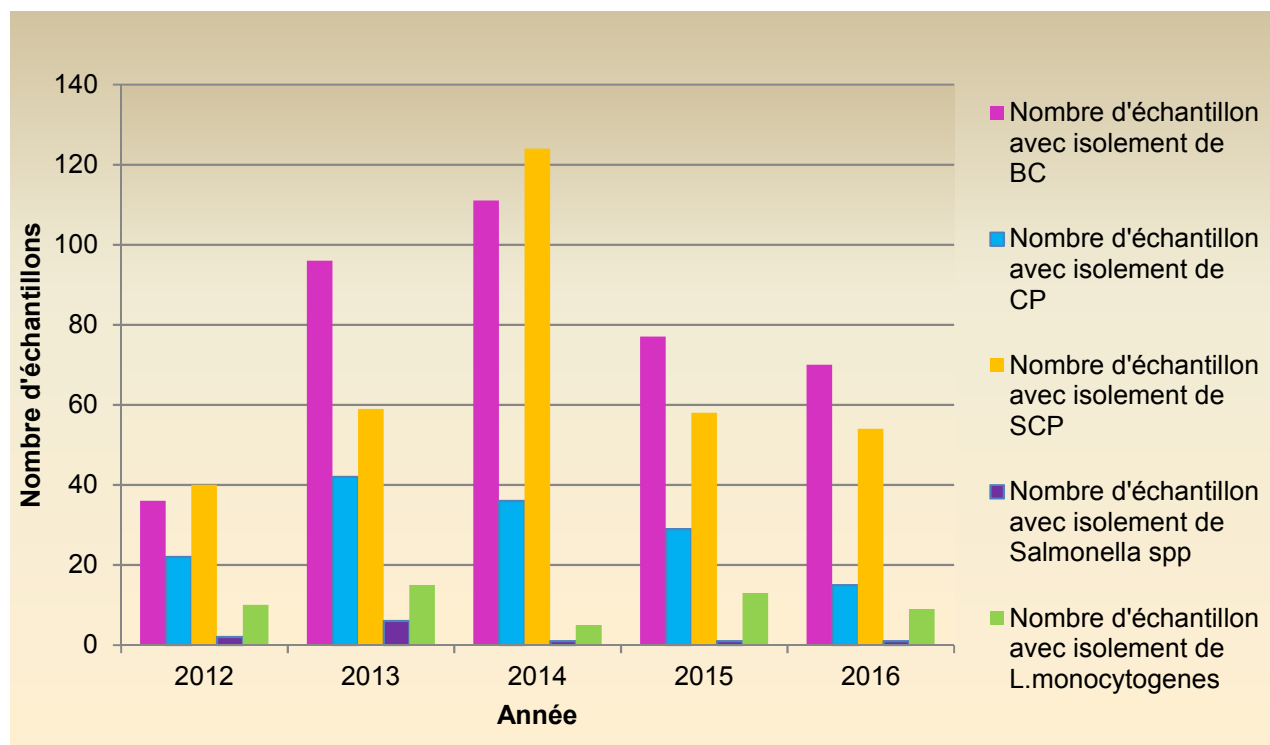


Figure 1. Représentation graphique du nombre d'échantillons dans lequel un pathogène alimentaire bactérien a été isolé, parmi les échantillons de TIAC, TIA, plaintes et alertes analysés en Ile de France

I.3.4 Principaux pathogènes alimentaires bactériens rencontrés dans le cadre des activités de l'unité LCSV

I.3.4.1 *Bacillus cereus* présumptifs

Le groupe *Bacillus cereus* sensu lato est composé de sept espèces bactériennes principales à Gram positif, aérobies ou anaérobies facultatives et sporulantes : *Bacillus cereus sensu stricto* hémolytique; *Bacillus thuringiensis* se différenciant de *Bacillus cereus sensu stricto* par la production d'un cristal parasporal toxique contre les insectes; *Bacillus anthracis*, non hémolytique, agent de la maladie du charbon, et génétiquement très proche de *Bacillus cereus sensu stricto* dont la virulence est liée à sa capsule et la production de deux toxines; *Bacillus weihenstephanensis*, correspondant à certaines souches de *Bacillus cereus* psychrotrophes (micro-organisme capables de se développer ou de survivre à basses températures); *Bacillus mycoïdes* et *Bacillus pseudomycoïdes*, caractérisés par la formation de colonies à bords filamenteux sur milieux gélosés, et enfin, *Bacillus cytotoxicus*, nouvelle espèce taxonomiquement proche des autres espèces du groupe *Bacillus cereus* (Guinebretière et al., 2013). Nous utiliserons le terme *Bacillus cereus* (BC) pour désigner l'ensemble des espèces du groupe dans la suite du texte.

Bacillus cereus est à l'origine de deux types de maladies transmises par les aliments. L'une caractérisée par des symptômes diarrhéiques, accompagnés de douleurs abdominales, de nausées, parfois de fièvre, et survenant généralement dans les 8 à 16 heures après l'ingestion de l'aliment contaminé, et l'autre caractérisée par des symptômes émétiques (ou vomissements), pouvant être suivis de diarrhées et survenant généralement dans les 1 à 5 heures après l'ingestion de l'aliment contaminé. La dose de céréulide (toxine produite par *Bacillus cereus*) suffisante pour provoquer des symptômes émétiques serait de l'ordre de 5 à 10 µg par kg de masse corporelle. Une telle quantité de céréulide peut être retrouvée dans les aliments lorsque la souche atteint une concentration supérieure ou égale à 10⁶ UFC/g (EFSA Journal, 2005).

Les toxi-infections diarrhéiques à BC sont le plus souvent associées à une population égale ou supérieure à 10⁵ ufc/g d'aliments consommés, bien que des épidémies associées à des aliments contenant 10³ ufc/g aient été décrites (ANSES, 2011). Toutes les souches de BC n'ont pas la même capacité à induire des symptômes diarrhéiques, certaines étant même utilisées comme probiotiques.

I.3.4.2 *Staphylocoques à coagulase positive*

Le genre *Staphylococcus* présente des cellules immobiles sphériques, non sporulées, aéro-anaérobies facultatives, possédant une catalase, et sont isolées par paire ou en amas. A ce jour plus d'une cinquantaine d'espèces et sous espèces ont été identifiées au sein du genre *Staphylococcus* (Stepán, et al., 2004). Les espèces sont classées en deux groupes sur la base de leur capacité à produire une coagulase libre : les staphylocoques à coagulase positive (SCP), généralement considérées comme pathogènes, et les Staphylocoques à coagulase négative (SCN), la plupart du temps non pathogènes mais qui peuvent le devenir dans des conditions particulières (pathogènes opportunistes). L'espèce *Staphylococcus aureus* (SA) appartenant au groupe des SCP est rapportée comme étant la plus largement incriminée lorsque des SCP sont mis en évidence dans les échantillons alimentaires issu de TIAC (Normanno et al., 2005) ; elle appartient au groupe des Staphylocoques à coagulase positive.

Parmi les SCP, plusieurs espèces peuvent produire des entéro-toxines. La maladie humaine est une intoxication entraînée uniquement par l'ingestion de ces toxines préformées dans l'aliment, dans lequel *Staphylococcus aureus* ou autre staphylocoque producteur d'entéro-toxine a pu se développer et produire sa toxine. Les premiers symptômes, essentiellement des nausées suivies de vomissements, apparaissent dans les 30 minutes et jusqu'à 8 heures après l'ingestion de l'aliment contaminé.

Différentes études suggèrent qu'une densité supérieure à 10^6 cellules de *S. aureus* par gramme d'aliment est nécessaire pour atteindre une quantité d'entéro-toxines susceptible de provoquer une TIAC (SCVPH plenary meeting, 2003).

I.3.4.3 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens (CP) est un Bacille Gram positif, immobile, sporulé, anaérobie stricte mais aéro-tolérant, sécrétant de nombreuses toxines et enzymes hydrolytiques dont l'entéro-toxine CPE, synthétisée au cours de la sporulation. Seules les souches de CP entéro-toxinogènes sont responsables d'intoxications alimentaires. Les aliments ou préparations culinaires contaminées contiennent au minimum 10^5 formes végétatives vivantes de *C. perfringens* entéro-toxinogène par gramme (ANSES, 2010).

Les symptômes apparaissent entre 6 et 24 heures, majoritairement entre 10 à 12 heures, après l'ingestion du repas contaminé. Ils se traduisent surtout par de la diarrhée et de violents maux de ventre, parfois de nausées.

Les préparations et aliments les plus fréquemment à l'origine d'intoxication alimentaire sont les viandes, notamment en sauce (atmosphère anaérobie favorable au développement),

cuisinées en grand volume et à l'avance, et qui n'ont pas été refroidies suffisamment vite entre le moment de leur préparation et celui où elles atteignent la température ambiante laissant place à la germination des spores contaminantes.

I.4 Contexte du travail au sein de l'unité LCSV « Laboratoire Central des Services vétérinaires »

En pratique, l'unité LCSV est amenée à réaliser dans le cadre de ses missions, et sous accréditation COFRAC (Comité Français d'Accréditation), les analyses officielles de première intention pour les Directions Départementales de la Protection des Populations (DDPP) de la majeure partie de la région Ile de France (75, 77, 91, 92, 93 et 94). Ces analyses nécessitent l'utilisation en parallèle, de plusieurs méthodes de référence normalisées imposées par le (Règlement (CE) n°2073/2005) concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires, et/ou des méthodes dites « alternatives » (validées par des organismes de certification selon la NF EN ISO 16140-2 pour le domaine de la microbiologie de la chaîne alimentaire), lorsqu'elles existent. Ces dernières sont souvent ciblées pour des raisons de coût et de temps sur les pathogènes principaux induisant les symptômes observés chez les patients et pouvant être associés aux matrices concernées.

I.4.1 « Pack TIAC »

La grande majorité des analyses mises en œuvre au LCSV relevant de l'investigation de foyers de TIAC, il avait été mis en place depuis 2002 un « pack TIAC », pour le dénombrement d'un groupe de pathogènes alimentaires bactériens pour lesquels les symptômes peuvent être souvent confondus (*Bacillus cereus* présomptifs, *Clostridium perfringens*, et Staphylocoques à coagulase positives) et d'indicateurs d'hygiène (Entérobactéries). La recherche de *Salmonella spp.*, qui est un pathogène majoritairement retrouvé dans le cadre de TIAC en France et en Europe y était également incluse. A la suite d'une revue des résultats obtenus sur quelques années en arrière, montrant que les Salmonelles étaient très rarement retrouvées, il a été proposé de retirer la recherche systématique des *Salmonella spp* du « pack TIAC ».

La mise en œuvre de ce « pack TIAC » utilise des techniques de bactériologie classique quelle que soit la matrice alimentaire analysée.

I.5 Techniques actuelles

L'unité LCSV procède ainsi à la mise en évidence des pathogènes alimentaires bactériens par des méthodes bactériologiques, immuno-enzymatique (de type ELFA) voire de biologie moléculaire (PCR en temps réel).

Lors de ces investigations, les méthodes bactériologiques et immuno-enzymatiques sont mises en œuvre en systématique pour les dénombrements de *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, et Staphylocoques à coagulase positive, et lorsque les DDPP le précise, pour les recherches de *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp*. Une méthode de biologie moléculaire/ PCR en temps réel est mise en œuvre lorsque la recherche des *Escherichia coli* producteurs de shiga-toxines est demandée.

I.5.1 Bactériologie conventionnelle

Les méthodes de bactériologie utilisées suivent les recommandations des normes de référence nationales et internationales, et/ou de méthodes alternatives souvent plus rapides à mettre en œuvre que les méthodes normalisées, et validées par une tierce partie. Ces méthodes permettent de mettre en évidence la présence d'une seule bactérie dans un échantillon mais de ne rechercher ou dénombrer qu'un micro-organisme à la fois, et nécessitent en grande majorité, plusieurs étapes de croissance bactérienne sur des milieux spécifiques.

I.5.2 Méthodes de PCR (Polymerisation Chain Reaction)

A ce jour des méthodes normalisées mais aussi des méthodes alternatives validées existent en biologie moléculaire permettant la détection d'un voire deux pathogènes alimentaires bactériens. La littérature scientifique fournit par ailleurs des publications portant sur des méthodes PCR multiplex permettant de détecter plusieurs pathogènes alimentaires bactériens simultanément. En revanche, ces études ciblent des pathogènes différents de ceux qui sont fréquemment isolés lors de nos investigations de TIAC (Huang et al., 2011). D'autres portent sur des prélèvements de médecine humaine (Fukushima et al., 2010) ou des matrices alimentaires différentes de celles que nous recevons. Et enfin, beaucoup d'études menées sont des PCR conventionnelles et non en temps réel (Chen et al., 2012).

La mise en œuvre d'une méthode PCR est rapide, le résultat d'analyse peut être rendu en 24h à 48h voire moins s'il n'y a pas d'enrichissement effectué. Cependant, la présence en faible nombre de bactéries dans un échantillon constitue une limite à ce type de méthode. Dans ce cas, un enrichissement au préalable peut être nécessaire.

I.6 Objectif et stratégie de recherche

I.6.1 Objectif général

En lien avec les autres institutions chargées de la sécurité ou de la surveillance sanitaire dans le domaine de l'alimentation, lors d'investigations de TIAC, ou lorsque la production d'un établissement ou d'un industriel de la filière agro-alimentaire présente des signes de danger pour le consommateur (non-respect des bonnes pratiques d'hygiène ou de la réglementation en matière de sécurité alimentaire), les DDPP doivent pouvoir agir rapidement afin de limiter l'extension d'un risque sanitaire. Une détection rapide et simultanée des trois pathogènes du « pack TIAC » et de *Salmonella spp*, mais aussi de *Listeria monocytogenes*, pathogène ayant de graves conséquences pour la santé, bien que moins souvent impliqué, pourrait alors permettre un gain de temps dans le diagnostic. Dans ce souci de délai de rendu des résultats d'analyses, une réflexion est menée autour de la mise en œuvre des recherches et dénombrements du « Pack TIAC » par une méthode de détection par PCR multiplex en temps réel afin de contribuer à améliorer la mise en évidence du ou des génomes des pathogènes responsables de TIAC. Dans ce contexte, le but de notre étude est de développer cette méthode comme un outil de screening. Parmi le panel d'échantillons reçus quotidiennement au laboratoire, les échantillons dans lesquels le génome de l'un des pathogènes bactérien recherché est détecté en PCR seront ensuite mis en analyse via les méthodes bactériologiques normalisées et ou alternatives validées pour estimer les niveaux de contamination. Cela permettrait de réduire le temps et le coût de ces analyses.

Cependant, la diversité des micro-organismes à rechercher ou dénombrer du « pack TIAC » implique des conditions de croissance différentes, et plus le nombre de micro-organismes à détecter est important dans une seule réaction, plus la compétition entre les micro-organismes peut être importante. C'est pourquoi, suite à l'étude des bases de données de l'unité recensant les échantillons reçus et les résultats d'analyse obtenus, nous nous sommes intéressés dans ce projet, aux trois pathogènes alimentaires bactériens retrouvés majoritairement en Ile de France lors d'investigations de foyers de TIAC, à savoir *Bacillus cereus* présomptifs, *Clostridium perfringens*, et les Staphylocoques à coagulase positive.

I.6.2 Stratégie de travail

Dans le but de développer cet outil de screening permettant de détecter simultanément les trois principaux pathogènes retrouvés dans les matrices alimentaires reçues dans notre

laboratoire lors d'investigation de TIAC, nous avons mis en place la stratégie de travail suivante :

- Déterminer des cibles génétiques permettant la détection spécifique de chacun des trois pathogènes, au regard des exigences normatives, avec l'aide d'une autre unité de notre laboratoire travaillant spécifiquement sur ces trois pathogènes bactériens.
- Sélectionner des systèmes d'amplification (amorces et sondes) pour les cibles génétiques déterminées, déjà disponibles dans la littérature et permettant de répondre aux besoins et exigences de la méthode que nous souhaitons développer (amorces et sondes de fluorescence) et/ou procéder à leur design, afin de détecter spécifiquement chaque micro- organisme cible.
- Sélectionner un panel de souches caractérisées permettant de tester la spécificité des systèmes de détection candidats (inclusivité et exclusivité).
- Tester différents kits commerciaux pour l'extraction des ADN bactériens.
- Tester les systèmes d'amplification retenus, par PCR temps réel à l'aide d'un kit de PCR prêt à l'emploi, en simplex dans un premier temps puis en multiplex, à partir de génomes de souches pures.
- Evaluer l'ajout d'un contrôle interne positif de PCR à différentes matrices alimentaires afin de vérifier les potentielles présences d'inhibiteurs de PCR non éliminés pendant les étapes d'extraction.
- Tester la méthode complète (extraction d'ADN et PCR temps réel) sur matrices alimentaires, en simplex puis en multiplex
- Déterminer les seuils de détection, et la sensibilité de la méthode complète.

II. **MATERIELS ET METHODES**

II.1 **Détermination des cibles génétiques**

Notre objectif est de développer la méthode dans le contexte normatif et d'accréditation de l'unité. Nous nous sommes donc en premier lieu appuyés sur les textes de référence utilisés en bactériologie conventionnelle pour orienter le choix des cibles génétiques à détecter.

II.1.1 *Détection des Staphylocoques à coagulase positive (SCP)*

Au regard des normes NF EN ISO 6888-1 et 2 du 1^{er} octobre 1999, visant à couvrir l'ensemble des staphylocoques à coagulase positive, nous avons orienté notre choix sur le gène de la staphylocoagulase (*coa*), ou coagulase libre. L'unité SBCL ayant également validé un système de détection basé sur le gène de la thermonucléase (*nuc*) spécifique des *staphylococcus aureus*, la détection de cette cible peut être intéressante pour la détection spécifique des *Staphylococcus aureus*, espèce majoritairement retrouvée en cas de TIAC : 100 % des souches caractérisées issues des échantillons reçues dans l'unité.

II.1.2 *Détection des espèces du groupe Bacillus cereus (BC)*

A l'issue d'une étude bibliographique et de discussions avec « l'équipe *Bacillus* » de l'unité SBCL, et en accord avec la norme NF EN ISO 7932 du 1^{er} juillet 2005 qui dénombre l'ensemble des espèces du groupe *Bacillus cereus*, sans distinguer, plusieurs cibles génétiques possibles ont été sélectionnées, ciblant un gène commun à toutes les espèces du groupe. Nos choix se sont alors portés sur des gènes de ménage, *rpoA* et *rpoB* codants pour des RNA polymérases chez *Bacillus cereus* (Cadot et al., 2010). Nous avons également sélectionné le gène *nheB*, codant pour le complexe protéique NHE (Non Hemolytic Enterotoxin) responsable de symptômes diarrhéiques lors de TIAC à *Bacillus cereus* présumés (Lee et al., 2012).

II.1.3 *Détection des Clostridium perfringens (CP)*

La norme NF EN ISO 7937 du 1^{er} février 2005 décrit les recommandations et la marche à suivre pour le dénombrement des *Clostridium perfringens*. Comme pour les deux autres pathogènes à détecter, nous avons effectué une recherche bibliographique et eu des échanges avec l'équipe « Clostridies » de l'unité SBCL, qui ont permis de nous orienter sur le gène de l'alpha toxine (*cpa*), présent chez tous les *Clostridium perfringens* (Gurjar et al., 2008 ; Albini et al., 2008).

II.2 Design de systèmes de détection

Lorsque les systèmes de détection décrits dans la littérature ne correspondaient pas aux besoins (longueur des amorces et des sondes, ou taille des amplicons) pour une PCR en temps réel, une recherche internet sur NCBI (National Center for Biotechnology Information), des cibles génétiques retenues pour chacun des pathogènes, a été réalisée. Plusieurs couples d'amorces et de sondes ont été dessinés à l'aide du logiciel Beacon designer™ (version 7) en appliquant les critères suivants :

- Amorces :
 - 20 à 25 paires de bases
 - T_m (melting Temperature (°C)) : 60°C ± 5°C
 - Taille de l'amplicon : 70 à 150 paires de bases
 - % GC entre 30 et 80%, idéalement 50%
- Sondes Taqman (ou sondes d'hydrolyse) :
 - Doivent être proche de l'une des amorces
 - 20 à 27 paires de bases
 - T_m : 10°C supérieure au T_m des amorces ± 5°C

Dans le cas particulier du gène de la staphylocoagulase (*coa*), utilisé habituellement pour le sous-typage de *SA*, ce dernier étant très variable génétiquement (Goh et al., 1992), et très peu de données étant disponibles pour l'ensemble des staphylocoques à coagulase positive, un alignement multiple sur ce gène a été réalisé grâce au logiciel CLC workbench version 7.0.4 « limited mode » à partir de séquences du gène sélectionné de dix-neuf souches de *SA* décrites sur NCBI, afin de trouver des amorces adaptées à la détection de l'ensemble des variants du gène *coa* recensés.

II.3 Spécificité in silico

La spécificité des séquences d'amorces sélectionnées dans la littérature, ou dont le design a été effectué en interne, a été analysée par le module de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la base de données NCBI, pour vérifier que les séquences correspondaient aux espèces ciblées, et l'absence de séquences homologues chez des micro-organismes non cible.

II.4 Extraction des ADN bactériens

Cinq méthodes d'extraction ont été testées dans le but d'obtenir des extraits d'ADN de qualité et quantité suffisantes pour permettre une amplification des gènes cibles et d'un contrôle interne positif par PCR en temps réel.

Disponible au laboratoire, la technique d'extraction semi-automatisée, utilisant le robot extracteur MagNa Pure (Roche) et son kit associé (Magna Pure LC DNA Isolation kit III Bacteria - Roche : réf 03 264 785 001), propose un principe de purification de l'ADN intéressant et adapté pour l'extraction d'ADN sur des matrices alimentaires complexes de type plats cuisinés. Cette technique repose sur l'utilisation de billes magnétiques, à la surface desquelles, l'ADN des bactéries préalablement lysées par réaction enzymatique puis choc thermique à 95°C va se fixer. L'élution de l'ADN purifié est ensuite réalisée après une série de lavages éliminant les substances non fixées telles que les nucléases, les membranes, ou autres inhibiteurs de PCR. Le protocole LSA-INS-366 ([Annexe 1](#)) du laboratoire décrivant l'extraction d'ADN génomique de bactéries à Gram positif, et ajoutant notamment une lyse mécanique, à l'aide de microbilles, pour fragiliser d'avantage la paroi bactérienne, nous a permis d'utiliser cette technique pour la vérification des systèmes de d'amplification de chaque pathogène incluant la détermination des efficacités de PCR.

Quatre autres kits commerciaux basés sur des principes de purification différents ont également été testés: Le DNeasy Blood and Tissue Kit - QIAGEN (réf 69504), souvent décrit dans la littérature pour des études sur matrices alimentaires impliquant de la PCR. L'ADN est purifié sur une membrane de silice après lyse thermique des bactéries. Le kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit - Promega (réf A1120), basé sur le principe de la précipitation de l'ADN à l'isopropanol. Une fois les bactéries préalablement lysées par réaction enzymatique et choc thermique les protéines sont éliminées et l'ADN peut être précipité. Le kit Instagene Matrix - Biorad (réf : 732 6030), utilisant une résine de Chelex captant les impuretés présentes dans la suspension obtenue après lyse thermique des bactéries, ne laissant que l'ADN purifié en suspension dans le surnageant. Enfin le kit PrepSeq™ Rapid spin sample preparation - Applied (réf 4407760). Il présente le même principe de purification de l'ADN sur membrane de silice que le kit DNeasy Blood and Tissue de QIAGEN, additionné de la présence matières particulaires qui vont capter les substances inhibitrices, débris cellulaires et autres particules alimentaires, et permettre de ne récupérer que l'ADN dans le surnageant. ([Annexe 2](#)).

La bonne mise en œuvre des protocoles d'extraction a tout d'abord été vérifiée en utilisant comme matrice la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 détectée par PCR en temps réel

sur un thermocycleur Light Cycler 480 (Roche) et son kit associé LC 480® SybrGreen I master, Les amorces données dans le (Tableau 1) ciblant le gène *nuc* ont été utilisées.

Tableau 1. Séquences nucléotidiques et longueur des amorces spécifiques du gène *nuc* de *S. aureus* (méthode Anses LSA-INS-0139)

Nom amorce	Séquence	Taille (pb)
Fnuc	CATCCTAAAAAAGGTGTAGAGA	22
Rnuc	TTCAATTTTMTTTCATTTTCTACCA	26

II.5 Estimation de la qualité/quantité d'ADN

Afin de juger de la qualité des extractions des cinq kits évalués et doser la quantité d'ADN extrait à partir de souches pures, l'absorbance des solutions d'acides nucléiques a été mesurée par spectrophotométrie (Nanodrop 2000 – Fisher scientifique) et les ratios $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ (indice d'une bonne purification ou de la présence de résidus protéiques indésirables pour la PCR) et $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ (témoignant de la présence résiduelle également indésirable de contaminants organiques dans la solution d'ADN) ont été calculés. La fluorimétrie a également été utilisée pour doser plus spécifiquement et précisément la concentration d'ADN de nos solutions (Qubit 2.0 – High sensitivity Assay kit).

Ces mesures ont été réalisées en duplicat sur l'extrait pur obtenu nous permettant d'avoir une bonne robustesse sur la quantification. Un nombre d'équivalent génome a été calculé considérant 1 génome par bactérie dans le cas des bactéries d'intérêts dans cette étude. Ce nombre d'équivalent génome correspond alors au nombre d'UFC présentes dans le volume de prise d'essai utilisé pour l'extraction d'ADN (1 ml).

II.6 Détection par PCR en temps réel (qPCR)

La PCR en temps réel, permettant de visualiser l'augmentation de la fluorescence en fonction de la quantité d'amplicons générés au cours de la réaction, nous offre un résultat d'analyse dans un laps de temps réduit par rapport à la PCR conventionnelle dite en « point final ». Pour ce projet, nous avons utilisé le Light cycler 480 II (Roche). Disponible au laboratoire, ce thermocycleur permet d'observer simultanément l'amplification en temps réel de cinq cibles, grâce à plusieurs filtres couvrant une large gamme de longueurs d'ondes d'excitation et d'émission. Les protocoles d'amplification décrits dans le Tableau 2 ont été établis en fonction des recommandations des kits de PCR utilisés, du type de détection (simplex ou multiplex), et des éléments recueillis au travers de publications en lien avec la PCR multiplex en temps réel (Elizaquível & Aznar, 2008; Chon et al., 2012; Morandi et al, 2015).

Tableau 2. Protocoles PCR utilisés dans le développement de la méthode pour la vérification des amorces (Chimie SybrGreen), la vérification des amorces et des sondes, et les essais à partir d'échantillons alimentaires en simplex et multiplex (Chimie Taqman)

	Chimie PCR utilisée	
	SybrGreen	Taqman
Dénaturation (1 cycle)	95°C, 10 min	
Amplification (40 cycles)	95°C, 10s 60°C, 30s 72°C, 1s	95°C, 10s 60°C, 2s 60°C, 1min
Fusion (1 cycle)	95°C, 5s 70°C, 1min 95°C, continu	/

II.6.1 Contrôle interne positif (ou contrôle d'inhibition) – IPC

Dans le contexte de développement de la méthode, la détection des pathogènes bactériens se fait à partir de matrices alimentaires dont certains composants peuvent être sources d'inhibition pour la PCR. Afin de s'assurer que les différents inhibiteurs possibles sont bien éliminés lors du processus d'extraction, où s'ils sont présents, qu'ils n'ont pas d'impact sur l'amplification des cibles d'intérêt, nous avons ajouté à nos matrices un contrôle positif exogène en volume constant, qui suit toutes les étapes de l'analyse, de l'extraction à la PCR. L'utilisation d'un IPC (Internal positive Control) endogène n'est pas adaptée dans la mesure où les matrices analysées sont très diversifiées. Ce contrôle positif permet de valider un échantillon négatif.

Le kit développé par la société Diagénodé basé sur la détection d'un virus à ADN (Phocid Herpesvirus) ne présentant aucune similarité de séquence avec le génome humain, les virus et autres pathogènes affectant l'humain a été utilisé. Les amorces et la sonde ont été conçues de façon à s'hybrider spécifiquement à une séquence spécifique du pathogène cible, la glycoprotéine B. (Diagénodé - DiaControl DNA™- Instruction d'utilisation - Version 2).

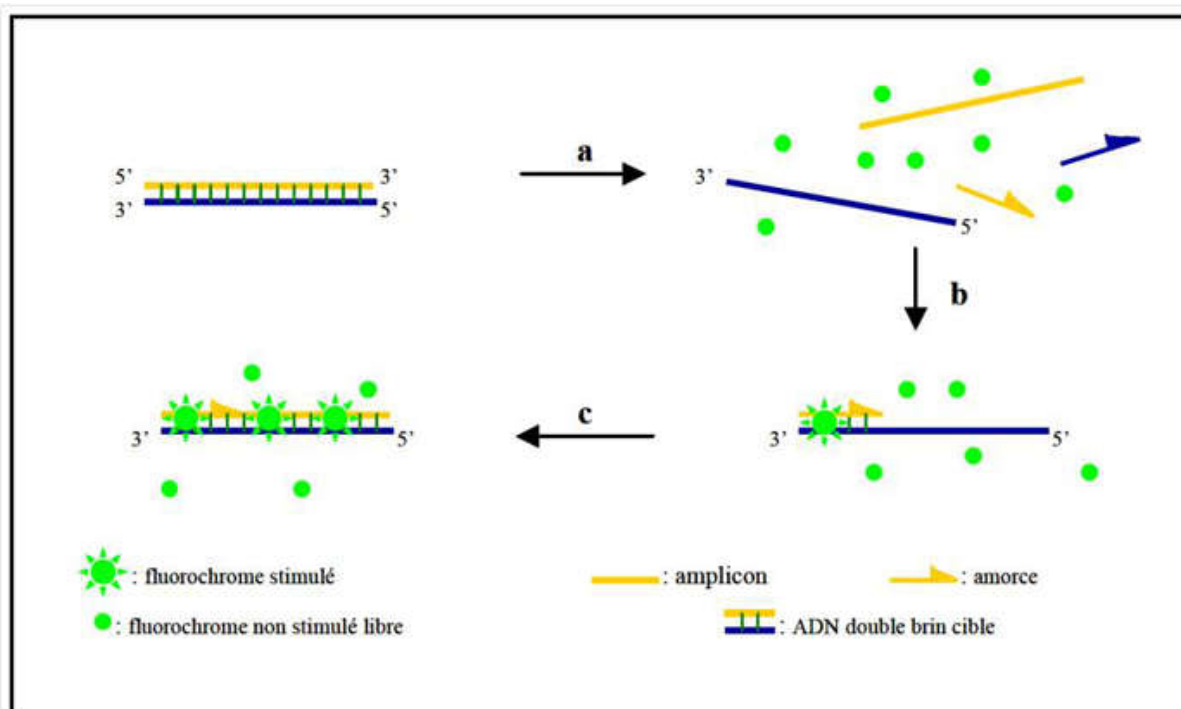
II.6.2 *Détection en simplex*

II.6.2.1 *Chimie SYBRGreen*

La technique PCR en temps réel en présence de SybrGreen ([Figure 2](#)) associée au kit PCR LC 480 SYBR Green I Master - réf 04 707 516 001 (Roche) a été utilisée afin de vérifier la spécificité et l'efficacité des couples d'amorces candidats pour chaque pathogène (synthèse Eurofins Genomics). La détection étant réalisée grâce aux longueurs d'ondes (nm) des filtres d'excitation et d'émission 465-510.

En effet, pour des raisons de coût, la synthèse des sondes de fluorescence a été effectuée ultérieurement pour les systèmes de détection retenus.

Les molécules de SYBR Green I libres dans la solution viennent se lier au niveau du petit sillon de l'ADN double brin reformé suite à l'hybridation des amorces. A ce moment-là, on observe une émission de fluorescence qui augmente proportionnellement à la quantité d'amplicons synthétisés au cours des cycles. La spécificité de cette chimie dépend complètement de la spécificité des amorces utilisées. La vérification de cette spécificité est réalisée à la fin de l'étape d'amplification grâce à la courbe de fusion : on observe la diminution de la fluorescence en fonction de l'augmentation de la température. Un pic de fusion d'un produit PCR va se distinguer facilement des pics de fusion de produits non spécifiques qui vont se dénaturer à des températures plus faibles en présentant des pics généralement plus larges.



SYBR® Green I :

- (a) Durant la dénaturation, le SYBR® Green I libre exhibe peu de fluorescence.
- (b) À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation.
- (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivie en temps réel.

Schéma extrait de l'article de Elyse Poitras et Alain Houde dans Reviews In Biology and Biotechnology Vol. 2, No 2, December 2002. pp.2-11

Figure 2. Schéma de principe de la chimie SybrGreen.

II.6.2.2 Technologie Taqman

Une fois les couples d'amorce les plus spécifiques et les plus efficaces déterminés, nous avons fait procéder à la synthèse des sondes de fluorescence correspondantes (Eurofins Genomics). Le kit Light Cycler®480 Probe Master a été utilisé pour ces PCR en temps réel, associé au programme PCR décrit dans la notice technique correspondante, puis dans un second temps, la température d'élongation de 72°C a été baissée à 60°C, au regard des différentes publications étudiées, de manière à favoriser l'hybridation des amorces et limiter les variations de températures qui diminuent l'efficacité de la Taq polymérase.

Très utilisée dans ce type de méthode pour la détection de génomes de pathogènes bactériens dans les aliments (Poitras, 2012), la technologie Taqman repose sur l'utilisation d'une séquence, dite « sonde », marquée par un premier fluorophore (Reporter) à son extrémité 5', couplé à un fluorophore suppresseur (Quencher) à l'extrémité 3', inhibant l'émission de fluorescence du Reporter. La sonde se fixe spécifiquement à sa séquence cible lors de l'étape d'hybridation. La Taq polymérase vient ensuite cliver les liaisons

phosphodiester pendant l'élongation, de par son activité 5'exo-nucléasique, libérant ainsi le Quencher et permettant l'émission de fluorescence au Reporter. (Figure 3)

La spécificité d'hybridation entre la sonde fluorescente et sa séquence d'ADN cible réduit significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mauvais appariements ou à la formation de dimères d'amorces (primer-dimers).

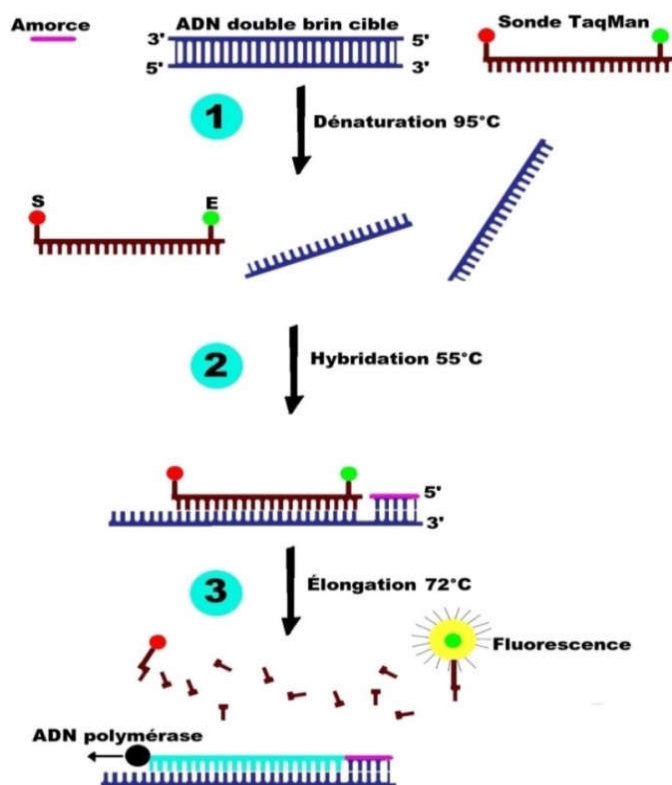


Figure 3. Schéma de principe de la technologie Taqman (sondes d'hydrolyses)

II.6.2.3 *Choix des fluorophores*

Les sondes de fluorescence ont été marquées par différents fluorophores dont les spectres d'absorption se chevauchaient le moins possible. Leur compatibilité d'utilisation avec le thermocycleur LC 480 II (Roche) a également été prise en compte (Figure 4).

L'utilisation d'un IPC a nécessité le choix d'un quatrième fluorophore pour marquer la sonde fournie dans le kit Diagénodé.

Fluorophore			Excitation Filter	Emission Filter	Detection Format
LightCycler® Cyan 500			440	488	Hydrolysis Probes (Reporter)
SYBR Green I			465	510	SYBR Green I
Fluorescein (Fluos / FAM)			465	510	Hydrolysis Probes (Reporter) HybProbe Probes (Donor) SimpleProbe Probes
			498	580	Hydrolysis Probes (Reporter, only in combination with Cyan 500)
VIC / HEX / Yellow555 / Joe			533	580	Hydrolysis Probes (Reporter)
LightCycler® Red 610			533	610	Hydrolysis Probes (Reporter)
			498	610	HybProbe Probes (Acceptor)
LightCycler® Red 640			498	640	HybProbe Probes (Acceptor)
Cy5 / Cy 5.5 / LightCycler® Red 705			618	660	Hydrolysis Probes (Reporter)
			498	660	HybProbe Probes (Acceptor)

Formats de détection possible sur le LC 480 II

5'-reporter, excitation max, emission max			3'-quencher, quenching range (quenching max)					
			BHQ-1®	BHQ-2®	BHQ-3®	ECLIPSE	DABCYL	TAMRA
			480-580 nm (535 nm)	550-650 nm (579 nm)	620-730 nm (672 nm)	390-625 nm (522 nm)	380-550 nm (453 nm)	470-560 nm (544 nm)
LC®Cyan500	450 nm	500 nm	+	-	-	+	+	+
FAM	495 nm	520 nm	+	-	-	+	+	+
TET	521 nm	536 nm	+	-	-	+	+	+
JOE	522 nm	548 nm	+	-	-	+	+	+
Yakima Yellow	530 nm	549 nm	+	-	-	+	+	+
HEX	535 nm	556 nm	+	+	-	+	+	+
Cy3	546 nm	563 nm	-	+	-	-	-	-
TAMRA	564 nm	579 nm	-	+	-	+	-	-
ROX	576 nm	601 nm	-	+	-	+	-	-
Texas Red	586 nm	610 nm	-	+	-	+	-	-
LC®Red610	590 nm	610 nm	-	+	-	+	-	-
LC®Red640	625 nm	640 nm	-	+	+	-	-	-
Cy5	646 nm	662 nm	-	+	+	-	-	-
Cy5.5	683 nm	705 nm	-	+	+	-	-	-
IRD700	685 nm	705 nm	-	+	+	-	-	-

→ Reporters sélectionnés pour cette étude.

Figure 4. Choix des fluorophores en fonction du thermocycleur LC 480 II et de la compatibilité Reporter / Quencher

II.6.2.4 Efficacités de PCR

L'efficacité de la PCR dépend des conditions de la PCR. Dans des conditions "standardisées" (même polymérase et même tampon de réaction), l'efficacité dépend principalement du couple d'amorces utilisé et de la température à laquelle l'hybridation des amorces avec la matrice est réalisée. Des efficacités de duplication les plus proches de 100% garantissent une amplification de l'ADN dans des conditions optimales.

Nous l'avons déterminé, en simplex dans un premier temps, pour chaque PCR. Elle a été estimée à partir de la pente d'une droite standard, établie à l'aide d'une gamme de dilutions décimales d'un ADN génomique extrait de souche pure, représentant le nombre de copie d'ADN en fonction du CT (Cycle Threshold). Elle est calculée avec la formule : $E\% = (10^{-1/\text{pente}} - 1) \times 100$.

II.7 Sélection des souches

Plusieurs génomes de souches de référence et de terrain ont été utilisées pour différentes étapes de la caractérisation de la méthode PCR, en fonction des paramètres d'efficacité, de spécificité, et sensibilité à étudier, et des informations disponibles dans les bases de données d'échantillons pour lesquels un pathogène a été isolé.

Les différentes souches de terrain sélectionnées, ont été isolées d'échantillons alimentaires reçus lors d'investigation de TIAC. Leurs caractéristiques bactériologiques sur milieux spécifiques avaient permis de confirmer les genres et/ou espèces recherchés (BC, SCP, CP). Ces souches, ainsi que des souches de référence, proviennent des collections des unités LCSV et SBCL du département des contaminants microbiologiques de l'ANSES et sont conservées en cryobilles à -20°C ou à -80°C.

II.7.1 Détermination de la spécificité analytique (*Inclusivité/ exclusivité*)

Un large choix de souches de terrain a été analysé pour vérifier que les couples d'amorce et sondes détectaient spécifiquement l'ensemble des analytes cibles (PR NF EN ISO 16140-4).

II.7.1.1 Etude d'inclusivité

La détection spécifique des micro-organismes cibles a été réalisée en deux parties. Les PCRs sélectionnées ont été testées sur un premier panel de souches, composé de six des sept espèces du groupe *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* n'étant pas inclus dans le développement de la méthode bien que faisant parti du groupe *Bacillus cereus* cité dans la norme NF EN ISO 7932, du fait notamment de sa pathogénicité de classe 3, et très rarement mis en évidence lors d'épisodes de TIAC ; de quatre des sept espèces de SCP positives disponibles dans l'unité SBCL et d'une souche de référence de *Clostridium perfringens*. (Tableau 3).

Tableau 3. Souches de référence testées pour l'étude d'inclusivité des couples d'amorces candidats.

Micro-organisme	Référence	N° interne	Origine
<i>B.toyonensis</i> " <i>B.cereus</i> var. <i>mycoides</i> "	ATCC 11778	BC1	LCSV
<i>B.cereus</i>	ATCC 14579		SBCL
<i>B.cereus</i>	ATCC 10987		SBCL
<i>B.cytotoxicus</i>	NVH 391-98		SBCL
<i>B.mycoides</i>	CIP 103472 (ATCC 6462)		SBCL
<i>B.pseudomycoïdes</i>	CIP 105702		SBCL
<i>B.pseudomycoïdes</i>	DSM 12442		SBCL
<i>B.weinstephanensis</i>	WSBC 10204		SBCL
<i>B.thuringiensis</i>	CIP 53137		SBCL
<i>S.aureus</i>	ATCC 25923	SA1	LCSV
<i>S. Intermedius</i>	Inconnue		SBCL
<i>S.Hyicus</i>	Inconnue		SBCL
<i>S.Delphini</i>	Inconnue		SBCL
<i>C.perfringens</i>	ATCC 13124	CP1	LCSV

Dans un deuxième temps, 69 souches (20 souches de *Bacillus cereus* présomptifs, 20 souches de Staphylocoques à coagulase positive et 29 souches de *Clostridium perfringens*) isolées d'échantillons alimentaires préalablement analysés dans l'unité LCSV, ont été utilisées sur les couples d'amorces et sondes retenus, pour vérifier plus largement leur inclusivité, c'est-à-dire l'amplification spécifique de leurs cibles respectives (Tableau 4).

Tableau 4. Souches de terrain testées pour l'étude d'inclusivité.

Souche	Référence interne de l'échantillon	Nature initiale de l'Echantillon
<i>Bacillus cereus</i> présomptifs	14Q001455	sauté de porc
<i>Bacillus cereus</i> présomptifs	14Q001601	Saumon béchamel
<i>Bacillus cereus</i> présomptifs	14Q001842	salade thaï cuit
<i>Bacillus cereus</i> présomptifs	14Q002109	pastilla aux fruits de mer
<i>Bacillus cereus</i> présomptifs	14Q002562	vols au vent dinde champignons
<i>Bacillus cereus</i> présomptifs	15Q002063B	Rosette
<i>Bacillus cereus</i> présomptifs	15Q002063A	Rosette
<i>Bacillus cereus</i> présomptifs	15Q002606	Salade œuf/thon
<i>Bacillus cereus</i> présomptifs	15Q002798	chiffonnette
<i>Bacillus cereus</i> présomptifs	15Q003126	chiffonnette
<i>Bacillus cereus</i> présomptifs	15Q003960A	Crêpe sauce tomate
<i>Bacillus cereus</i> présomptifs	16Q000148	chiffonnette
<i>Bacillus cereus</i> présomptifs	16Q000281	sauté de mines sarcives
<i>Bacillus cereus</i> présomptifs	16Q000455	mix de betterave
<i>Bacillus cereus</i> présomptifs	16Q000675	curcuma
<i>Bacillus cereus</i> présomptifs	16Q000775	pâtes chinoises
<i>Bacillus cereus</i> présomptifs	16Q000787	Emincé de porc mixé/ sauce crème et carottes
<i>Bacillus cereus</i> présomptifs	16Q000912	semoule de blé dur

Souche	Référence interne de l'échantillon	Nature initiale de l'Echantillon
<i>Bacillus cereus</i> présumptifs	16Q000913	viande/légumes et sauce du couscous
<i>Bacillus cereus</i> présumptifs	16Q001784	purée
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	14Q001040	poisson
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	14Q001042	Potage enrichi
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	14Q001054	escalope de dinde hachée
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	14Q001070	haricot vert/pomme de terre
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	14Q001324	salade de pâtes
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	14Q001325	salade de riz
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	14Q001327	salade composée
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	14Q002386	chiffonnette -trancheur
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	14Q002450	lingette matériel cuisine
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	15Q000462	Saumon mariné
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	15Q002529	Plan de travail plonge
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	15Q002606	salade œuf/thon
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	15Q002621	plan de local préparation
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	15Q002842	Semoule
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	15Q003174	surface robot hachoir fallafels
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	15Q003520	chicken Wings épicés
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	16Q000281	Saute mines sarcives
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	16Q000912	semoule de blé dur
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	16Q001782	saute de dinde à la coriandre hachée
<i>Staphylocoque</i> à coagulase positive	16Q001784	purée
<i>Clostridium perfringens</i>	14Q000084	émincé de bœuf nature
<i>Clostridium perfringens</i>	14Q001622	sauté d'agneau mixe
<i>Clostridium perfringens</i>	14Q002056	colombo de porc
<i>Clostridium perfringens</i>	15Q002291	Sauté de porc façon colombo
<i>Clostridium perfringens</i>	15Q002606	salade œuf/thon
<i>Clostridium perfringens</i>	15Q002773	tandoori de dinde/midi
<i>Clostridium perfringens</i>	15Q002987	filet de poulet 23/08 midi
<i>Clostridium perfringens</i>	15Q003181	fallafels
<i>Clostridium perfringens</i>	15Q003803	tartiflette (reste)
<i>Clostridium perfringens</i>	15Q003863	Haricots blancs
<i>Clostridium perfringens</i>	15Q004068	soupe de poisson
<i>Clostridium perfringens</i>	15Q004115	hanout épice
<i>Clostridium perfringens</i>	15Q004127	porc lait coco/gingembre
<i>Clostridium perfringens</i>	16Q000490	Poulet curcuma
<i>Clostridium perfringens</i>	16Q000553	chiffonnette planche à découper viande
<i>Clostridium perfringens</i>	16Q000810	plan de travail
<i>Clostridium perfringens</i>	16Q001781	Sauté de dinde à la coriandre
<i>Clostridium perfringens</i>	16Q003199	Brochettes de dinde crues
<i>Clostridium perfringens</i>	16Q003566	Fricassée de volaille aux champignons
<i>Clostridium perfringens</i>	17Q000759	Blanquette de veau
<i>Clostridium perfringens</i>	17Q001270	Steak haché

Souche	Référence interne de l'échantillon	Nature initiale de l'Echantillon
<i>Clostridium perfringens</i>	17Q001758	Emincé de bœuf - Mixé
<i>Clostridium perfringens</i>	17Q001823	Galette Bressane (dessert)
<i>Clostridium perfringens</i>	17Q001874	Sauce bolognaise
<i>Clostridium perfringens</i>	17Q002516	paleron de bœuf braisé
<i>Clostridium perfringens</i>	17Q002563	Emincé de bœuf au paprika
<i>Clostridium perfringens</i>	17Q003025	menthe déshydratée
<i>Clostridium perfringens</i>	17Q003104	Bœuf bourguignon
<i>Clostridium perfringens</i>	17Q003245	Pâtes au saumon + sauce

II.7.1.2 Etude d'exclusivité

Un panel de 18 souches de référence et 2 souches de terrain, composé de différents genres ou espèces de bactéries génétiquement proches des genres ou espèces de *Bacillus*, *Clostridium* et *Staphylococcus*, ou pouvant être présents dans les aliments, a été testé avec ces mêmes couples d'amorces et sondes candidats. Ceci afin de vérifier l'absence d'amplification non spécifique de micro-organismes non-cibles. (Tableau 5)

Tableau 5. Souches de référence ou de terrain testées pour évaluer l'exclusivité des systèmes de détection.

Souches	Référence	Identification LCSV
<i>Bacillus subtilis</i> susp. <i>Spizizenii</i>	ATCC 6633 - WDCM3	BS1
<i>Clostridium bifermentans</i>	ATCC 638	-
<i>Clostridium butyricum</i>	ATCC 19398	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228 - WDCM36	SE1
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	121CEB/09HMPA13	-
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	IPP68 / CH199	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	CIP76125T - WDCM159	SS1
<i>Staphylococcus hominis</i>	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	43864 - WDCM6	CF1
<i>Enterococcus faecalis</i>	19433 - WDCM9	EF1
<i>Listeria innocua</i> (serotype 6a)	33090 - WDCM17	LIn1
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i>	13076 - WDCM30	SAL-E
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	14028 - WDCM31	SAL-T
<i>Rhodococcus equi</i>	-	RE1
<i>Escherichia coli</i>	25922 - WDCM13	EC4
<i>Proteus mirabilis</i>	WDCM23	PM1

II.7.2 Détection multiplex sur souches pures

Des premiers essais de multiplexage ont été réalisés à partir de souches pures avec le même programme PCR que lors de la détermination des efficacités des systèmes d'amorces additionnés des sondes correspondantes, et dans les conditions de mix réactionnel identiques à celles utilisées en simplex (concentrations des amorces à 200 nM final, sondes à 100 nM final. 5 µl d'ADN sont analysés à la place des 10µL initialement utilisés en simplex pour conserver le volume réactionnel de 25 µL pour la PCR. Les différentes combinaisons possibles de multiplexage des trois systèmes de détection ont été testées selon les indications du Tableau 6.

Tableau 6. Essais de multiplexage des différents systèmes d'amplification selon quatre combinaisons de mix (A, B, C et D) et à partir des extraits d'ADN de souches pures des trois pathogènes, BC1 : *B. toyonensis* « *B. cereus var. mycoides* » ATCC 11778, SA1 : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, et CP1 : *Clostridium perfringens* ATCC 13124), titrant à 10⁴ EG, seuls, ou mélangés.

	Mix A : rpoA_2 + nuc	Mix B : rpoA_2 + cpa_4	Mix C : cpa_4 + nuc	Mix D : cpa_4 + nuc + rpoA_2
BC1	X	X	X	X
SA1	X	X	X	X
CP1	X	X	X	X
BC1 + CP1	X	X	X	X
BC1 + SA1	X	X	X	X
SA1 + CP1	X	X	X	X
BC1 + CP1 + SA1	X	X	X	X

X : Combinaison testée

II.8 Sélection des matrices alimentaires

Des essais de la méthode complète (Extraction et amplification par PCR temps réel) sur matrices alimentaires ont été réalisés à partir de 29 échantillons naturellement contaminés, conservés à -24°C dans l'unité, et enregistrés dans les bases de données du LCSV des années 2015 à 2018.

Des plats cuisinés de compositions diverses ont été sélectionnés, en fonction de la nature de la contamination par un, deux ou trois des pathogènes d'intérêt, et à différents niveaux de contamination de manière à pouvoir mimer les conditions réelles d'analyse. (Tableau 7)

Tableau 7. Matrices naturellement contaminées par BC et/ou CP et/ou SCP testées en PCR temps réel.

Dénomination produit	N° Echantillon	Dénombrement des BC (ufc/g)	Dénombrement des CP (ufc/g)	Dénombrement des SCP (ufc/g)
Salade de blé	15Q002315	1 800		
Salade tomate/feta	16Q000570	Présence <400	<10	<10
Ananas	16Q000637	Présence <400	<10	<10
Fallafels	15Q003181		Présence <40	
Saute de dinde à la coriandre	16Q001781	400	110 000	1 600
Fricassé de volaille aux champignons	16Q003566	<100	2 400 000	<10
Salade œuf/thon	15Q002606	10 000< N <100 000	370	73 000
Semoule de blé dur	16Q000912	340 000 000	RI*	Au moins 700
Viande, légumes et sauce couscous	16Q000913	370 000	<10	<100
Tiramisu	16Q002922	Au moins 300	<10	510 000 000
Duo haricots verts	16Q003079	<100	<10	Présence <40
Saumon mariné	17Q000500	<100	<10	Présence <40
Blé	15Q002843	5 600		10<N<100
Filet de Poulet mixé	15Q002988	140 000	140	
Emincé de dinde mixé	16Q001923	Au moins 100	8 400	
Sauté de dinde à la coriandre haché	16Q001782	1 800	<40	1 200
Cœur de colin	16Q004127			<40
Thon	17Q000910			7 100
Bœuf mixé	17Q001622			<40
Galette Bressane	17Q001823	5 500	150	
Purée	17Q001630	400		
Riz pilaf	17Q003988	1 400		
Sauce Roquefort	17Q001686	6 400 000		
Paleron de bœuf	17Q004069	17 000	7 800	
Crevettes	17Q003912		360	
Bœuf bourguignon	17Q003104		5 200	
Lentilles	17Q004052		620 000	
Morceau de paleron	18Q001746		74 000 000	
Pâtes	18Q001868	960 000		60 000 000

II.8.1 Optimisation des mix PCR

A la suite des premiers résultats obtenus sur matrice alimentaire, une optimisation des concentrations de chaque séquence d'amorce et de sondes dans le mix réactionnel a été effectuée pour limiter la compétition entre elles et permettre de caractériser la détection des différentes cibles. Le [Tableau 8](#) présente les concentrations en amorces et sondes dans les différents Mix réactionnels testés.

Tableau 8. Concentrations des amorces et sondes testées dans le mix réactionnel (kit LightCycler® 480 Probe Master) pour la détection simultanée de BC (rpoA_2), CP (cpa_4) et SA (nuc). Les concentrations finales sont indiquées (nM).

	Mix 1			Mix 2			Mix 3			Mix 4		
	rpoA_2	cpa_4	nuc	rpoA_2	cpa_4	nuc	rpoA_2	cpa_4	nuc	rpoA_2	cpa_4	Nuc
[Amorce Sens] nM	100	200	200	200	400	400	100	400	400	200	200	200
[Amorce Anti-sens] nM	100	200	200	200	400	400	100	400	400	200	200	200
[Sonde] nM	50	100	100	100	200	200	50	200	200	100	100	100

II.9 Préparation des échantillons et dénombrements bactériologiques

II.9.1 A partir de souches pures

Les souches de référence, ou de terrain, conservées en cryobilles à -20°C ou -80°C, ont été remises en culture séparément, dans du bouillon BHI pour les SCP et les BC, et bouillon Thioglycolate + rézazurine pour les CP. Elles ont ensuite été incubées 18h à 24h à 37°C pour les SCP et les CP, et 18h à 24h à 30°C pour les BC. Les CP ont été incubés en anaérobiose tandis que les SCP et BC ont été incubés en aérobie.

A l'issue des incubations de cultures de souches pures, la densité optique (DO) a été mesurée à l'aide du densitomètre WPA CO 8000 Cell density meter, pour estimer la croissance bactérienne et permettre la préparation d'une gamme de dilution et un dénombrement bactérien. Pour cela, une série de dilutions décimales en bouillon tryptone sel a été réalisée de manière à obtenir trois dilutions successives donnant théoriquement 100, 10 et 1 ufc/ml, qui ont été ensemencées sur gélose TSA-YE pour vérifier les niveaux de contamination initiaux.

II.9.2 A partir des matrices alimentaires : Echantillons naturellement contaminés

Les suspensions mères ont été préparées selon la norme NF EN ISO 6887-1, à partir de 10g d'échantillon auxquels ont été ajoutés 90ml d'eau peptonée tamponnée (EPT) (dilution au 1/10^{ème}). Les résultats de dénombrements obtenus au moment de la réception de ces échantillons dans le cadre des investigations de TIAC ont été utilisés pour l'analyse des résultats de PCR. A l'aide du kit PrepSeq™ rapid spin sample (Applied), une extraction a été réalisée à partir d'1 ml de la suspension mère pour obtenir l'ADN génomique dans un volume final de 250µL. 5 µL ont ensuite été utilisés pour l'analyse par PCR temps réel avec le programme PCR suivant :

- Dénaturation : 1 cycle; 95°C 10 min;
- Amplification : 40 cycles [95°C 10 s, 60°C ± 1°C 2 s, 60°C 1 min] ;

III. **RESULTATS**

III.1 **Détection en simplex sur souches pures**

III.1.1 *Sélection du kit d'extraction*

La souche de référence *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a été utilisée pour les essais des kits d'extraction, *Staphylococcus aureus* étant connu pour sa difficulté à en extraire l'ADN, et différentes concentrations d'ADN ont été obtenues suite aux essais réalisés avec les différents kits testés. Un dosage des extraits d'ADN a été réalisé avec le Qubit 2.0 pour estimer le taux de récupération d'ADN. Après analyse en duplicat par PCR temps réel, sur des gammes de dilutions décimales réalisées à partir des extraits, nous avons obtenu, pour les ADN extraits par les méthodes DNeasy® Blood and Tissue kit (Qiagen) et Magna Pure DNA Isolation III bacteria (Roche), des valeurs de Ct plus précoces, au premier point de la gamme, (22,88/23,46 et 20,69/21,03 respectivement) que pour les ADN extraits par les kits Instagene matrix (Biorad) et Wizard® Genomic DNA Purification Kit (.

Tableau 9). Tous les points de gammes ayant été détectés seulement pour la technique utilisant le Robot MagNA pure et son kit Magna Pure LC DNA Isolation III bacteria-fungi (Roche) (Figure 5), cette méthode nous a semblé la plus pertinente au regard du temps de manipulation et de sa facilité de mise en œuvre par rapport aux autres techniques d'extraction testées sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, même si elle ne donne pas nécessairement le meilleur rendement d'extraction.

Nous en avons alors conclu à son utilisation pour la suite des essais sur les autres pathogènes.

Tableau 9. Concentrations d'ADN obtenues lors des essais des quatre kits d'extraction pour 1 ml de culture soumis à l'extraction. Dosage fluorimétrique au Qubit 2.0 (ng/μl) et analyse PCR en temps réel avec le thermocycleur LC 480 II et son kit associé (LC®480 Probe Master) (Nb Equivalents génomes).

	Extraction <i>S.aureus</i> (1ml de culture)			qPCR	
	Dénombrement (ufc/ml)	Concentration d'adn (ng/μl)	Concentration (Equivalent génome)	Ct (duplicats)	Concentration (Equivalent génome)
Instagene matrix (Biorad)	6,1 x 10 ⁷	2,00	6,47 x 10 ⁵	25,55/ 25,69	1,04 x 10 ⁶
Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)		0,27	8,73 x 10 ⁴	24,71/ 25,00	1,60 x 10 ⁶
DNeasy® Blood and Tissue kit (Qiagen)		0,90	2,91 x 10 ⁵	22,88/ 23,46	2,8 x 10 ⁶
Magna Pure DNA Isolation III		0,53	1,71 x 10 ⁵	20,69/ 21,03	1,05 x 10 ⁷

bacteria,fungi (Roche)					
---------------------------	--	--	--	--	--

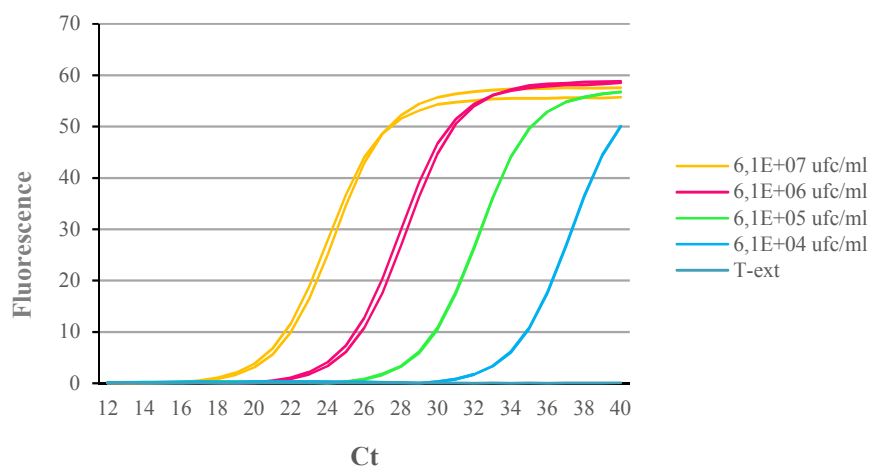


Figure 5. Détection du gène *nuc* par PCR en temps réel avec le Light Cycler 480 II (Utilisation de la chimie SybrGreen) à partir de l'extrait obtenu par la méthode semi-automatisée MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi) (Roche).

A partir de ces différents essais d'extraction, nous avons choisi d'utiliser 10 μ L d'ADN dans le mix PCR pour être le plus représentatif possible des échantillons à analyser lors des tests sur matrice alimentaire, et pour augmenter la sensibilité de la méthode à développer.

III.1.2 Vérification et sélection des systèmes de détection

III.1.2.1 *Analyse in silico*

Les séquences d'amorces et de sondes proposées par le logiciel Beacon designer™ s'accompagnaient des différents paramètres correspondants aux critères définis pour le design. Des indications supplémentaires, données par le logiciel également, nous ont permis d'identifier de potentielles formations de dimères d'amorces et/ou de structures en épingle à cheveux (repliement transitoire du brin d'ADN sur lui-même) pouvant entraîner des amplifications aspécifiques.

Les séquences d'amorces et de sondes sélectionnés à partir de données de la littérature ou dont le design a été effectué en interne, sont présentés dans le Tableau 10.

Cible	Nom	Sondes	Amorces sens	Amorces anti-sens	Taille de l'amplicon (pb)	Tm (°C)	Source
<i>SCP</i>	coa_1	CTCGTCCGACATACAAGAAGCCAAGCG	GACAAATCAAGATGGCACAGTAAC	CCGTATGATACTTGACCGTTTGC	111	71,6	Interne
	coa_2	ACTCTTTTCGCGTGCTCCCATTAATCCT	GCAGAAGAAGATAAAGCAACTAAGG	CCAAGGATTAAGTCCAGTTTGC	137	70,5	Interne
	coa_3	ACTCAACCGACGACACCGAACCTT	GGAACAAAACAGACCATTCTTAAGC	ACGTTGATTAGTACCTTGTGG	125	69,9	Interne
	coa_6	CGCCCGACACAAAACAAGCCAAGT	CAAATGGTCAAGTGCATACGG	CATGTGTTGTTACGTTATATGCG	81	69,8	Interne
	coa_5	CGCCCGCCGACATACAACAAGCC	ACAACACATGCAAACGGTCAAG	GCGAGCGCCATATGATACTTG	120	73,8	Interne
<i>S. aureus</i>	Nuc_1	AAACCTCTTTGCGTATTGCCCTTTCG	TATTAAGTGTGGCATATGTATGG	GTTAACACTAAACAAGTAGTAGCG	127	69,1	Interne
	Nuc_2	ACCTCTTTGCGTATTGCCCTTTCG	TTAAGTGTGGCATATGTATGG	GTTAACACTAAACAAGTAGTAGCG	125	69,3	Interne
	Nuc_3	AAACCTCTTTGCGTATTGCCCTTTCGA	GCAATCGTTTCAATATTACTTATAGGG	AACTAAAGTTAACTAAACAAGTAGTAG	111	67,9	Interne
<i>B. cereus</i>	rpoB_1	CGTTCGCCTTCCGACTCAGGAGCA	ATGGGTGGAGTGGTAGAAGG	ATGTTTGCATTACCAATTACATTAATTAC	104	70,8	Interne
	rpoB_2	CGCTGCCGACACTACTTGTTTTGG	AGATATCGTAGCTCGTTTCCG	GTTTTCTAAGAACGGAATACAAGC	124	72,0	Interne
	rpoB_3	ACGTCCGGCCATCTGTACCTTC	AATCAACTTGTACGTGCATATATCG	AAATACGAGAAATAACACCTTGTTC	100	68,7	Interne
	rpoB_4	ACGTCACATCAGCTCTTTGCATT (design interne)	TCAGTGGTTTCTTGATGAGG	CTTTTACACGAAGTGGTGCT	176	73,3	Cadot et al., 2010
	rpoA_1	ACTCCCTGGTGCCGCTGTACTGC	AACCTCTTACGTCGTATTCTTTATCC	GTCTTCTACTACGCCCTCAACTG	111	71,9	Interne
	rpoA_2	TGGCCCGATGCTTCCATCCGTCCA	GTCGGACAAGTGGCTAATTATGATAAG	TTAAGATTTTGGCACCTAAAGAGATAGC	100	70,8	Interne
	rpoA_3	ACCCACGGCCACGCTTTCAGTT	CGATAGTGATGTAGAAATCTTAAATCCAG	TTGATCTTCGCTTTTATTTGCATCAG	136	72,7	Interne
	rpoA_4	ACTCCCTGGTGCCGCTGT (design interne)	TAACTCCTTACGTCGTATTC	ATTTCCAACGCTTCTCTTC	186	72,6	Cadot et al., 2010
	nheB_1	CGCAGGAACACCGCTAGGAGTCGC	TGGTGGTGCAGTAGTTATTGCTAC	TGTCAGTTCTTTCTTCGCTAATACG	125	75,8	Interne
	nheB_2	CGCAGGAACACCGCTAGGAGTCGC	TGGTGCAGTAGTTATTGCTACGG	TGTCAGTTCTTTCTTCGCTAATACG	122	75,5	Interne
	nheB_3	CGCAGGAACACCGCTAGGAGTCGC	ATTATTGGTGGTGCAGTAGTTATTGC	TGTCAGTTCTTTCTTCGCTAATACG	130	75,2	Interne
<i>C. perfringens</i>	cpa_4	TTGGAATCAAAACAAAGGATGAAAACTCAAG	AAGAACTAGTAGCTTACATATCAACTAGTGGTG	TTTCCTGGGTTGTCCATTTC	124	69,9	Albini et al., 2008
	cpa_5	AGTTGATGCCCCAGCCCATAGGC	GTAAGGCGCTTATTGTGCTG	TTTTCATCCCAAGCGTAGAC	80	72,0	Interne
	cpa_6	AGTTGATGCCCCAGCCCATAGGC	ATTGTAAAGGCGCTTATTGTGC	TTTTCATCCCAAGCGTAGAC	84	71,4	Interne

Tableau 10. Noms et séquences des amorces et sondes candidates pour la détection des génomes de Staphylocoques à coagulase positive (*coa*) ou plus particulièrement *Staphylococcus aureus* (*nuc*), les *Bacillus cereus* présumptifs (*rpoA*, *rpoB*, et *nheB*), et les *Clostridium perfringens* (*cpa*)

A partir de données de séquences de gènes issus de NCBI et alignées sur le module de BLAST ; de la bibliographie ou des designs réalisés ([Tableau 10](#)), les séquences d'amorces et de sondes sélectionnées, ont toutes présenté une bonne homologie (100%) de séquence avec leurs cibles génétiques respectives sur les cents premiers résultats d'alignement. Les trois couples d'amorces ciblant le gène de l'alpha-toxine (*cpa*) pour la détection des *Clostridium perfringens* sont retenus.

Concernant les SCP pour lesquels plusieurs espèces doivent être détectées, seul le couple d'amorces proposé dans l'article de Graber et al., 2007 a présenté un alignement avec une autre espèce de SCP que *S. aureus* : *Staphylococcus Hyicus*. Aucun des autres couples d'amorces testés n'a permis d'obtenir un alignement avec l'ensemble des sept espèces de Staphylocoques à coagulase positive. Les systèmes issus de la bibliographie, ayant été développés pour de la PCR conventionnelle, et présentant des tailles d'amplicon trop long (>150 pb) n'ont pas été retenus.

Les alignements des séquences d'amorces et de sondes ciblant les gènes de RNA polymérases A et B (*rpoA* et *rpoB*), et le gène de la toxine diarrhéique (*nheB*) des *Bacillus cereus* présumptifs, ont montré une homologie de séquence de 100% avec les six espèces du groupe *Bacillus cereus*.

Cette analyse *in silico* nous a donné une première idée sur la spécificité des couples d'amorces issus de la littérature et des designs internes pour leurs cibles génétiques respectives. Elle n'était pas entièrement satisfaisante au regard des résultats obtenus pour les SCP, cependant, peu de données étant disponibles sur les différentes espèces de SCP sur NCBI, des essais expérimentaux ont été menés pour tenter de détecter d'autres espèces de SCP que *Staphylococcus aureus* avec les couples d'amorces ciblant le gène de la coagulase.

III.1.2.2 *Vérification expérimentale*

Une PCR en temps réel a été réalisée pour vérifier le bon fonctionnement de chaque couples d'amorce à partir de génome de souches pures. La PCR réalisée avec le couple d'amorces *coa_2* n'a montré aucune amplification et a été éliminé. Les autres couples d'amorces testés ont permis, par l'observation de courbes d'amplification, la détection d'une cible génétique présente dans le mix réactionnel. Cependant la réalisation de la courbe de fusion à l'issue des 40 cycles d'amplification, permettant de vérifier la température de fusion (*T_m*) des amplicons obtenus, et la spécificité des couples d'amorce, a montré pour les systèmes *coa_1*, *coa_5*, *nuc_1*, et *nuc_2* ([Figure 6 A et B](#)), et *rpoA_4*, et *nheB_3* ([Figure 6 C et D](#)), des amplifications non spécifiques telles que la formation de dimères d'amorces (observation d'un « pic » plus petit en amont de celui attendu, ou de plusieurs pics qui ne correspondaient pas aux *T_m* attendus), ou plusieurs produits amplifiés ([Figure 6 B, D et F](#)). Ils n'ont donc pas été sélectionnés pour la suite de l'étude.

Au final trois couples d'amorces ont été retenus pour la détection des SCP, neuf pour le groupe BC et trois pour CP ([Tableau 11](#)).

Cible	Nom	Sondes	Amorces sens	Amorces anti-sens	Taille de l'amplicon (pb)	Tm (°C)	Source
SCP	coa_3	ACTCAACCGACGACACCGAACCT	GGAACAAAACAGACCATCTTTAAGC	ACGTTGATTAGTACCTTGTGG	125	69,9	Interne
	coa_6	CGCCCGACACAAAACAAGCCAAGT	CAAATGGTCAAGTGCATACGG	CATGTGTGTTACGTTATATGCG	81	69,8	Interne
S.aureus							
	Nuc_3	AAACCTCTTTGCGTATTGCCCTTTCTGA	GCAATCGTTTCAATATTACTTATAGGG	AACTAAAGTTAACTAAACAAGTAGTAG	111	67,9	Interne
B. cereus	rpoB_1	CGTTGCGCTTCCGACTCAGGAGCA	ATGGGTGGAGTGGTAGAAGG	ATGTTTGCATTACCAATTACATTAATTAC	104	70,8	Interne
	rpoB_2	CGCTGCCGACACTACTTGTTTTGG	AGATATCGTAGCTCGTTTCCG	GTTTTCTAAGAACGGAATACAAGC	124	72,0	Interne
	rpoB_3	ACGTCCGGCCATCTTGTACCTTC	AATCAACTTGTACGTGCATATATCG	AAATACGAGAAATAACACCTTTGTTAC	100	68,7	Interne
	rpoB_4	ACGTCACATCAGCTCTTTGCATT (design interne)	TCAGTGGTTTCTTGATGAGG	CTTTTACACGAAGTGGTGCT	176	73,3	Cadot et al., 2010
	rpoA_1	ACTCCCTGGTGCCGCTGTTACTGC	AACTCCTTACGTCGTATTCTTTTATCC	GTCTTCTACTACGCCCTCAACTG	111	71,9	Interne
	rpoA_2	TGGCCCGATGCTTCCATCCGTCCA	GTCGGACAAGTGGCTAATTATGATAAG	TTAAGATTTGGCACCTAAAGAGATAGC	100	70,8	Interne
	rpoA_3	ACCCACGGCCACGCTTTGCAGTT	CGATAGTGATGTAGAAATCTTAAATCCAG	TTGATCTTCGCTTTTATTTGCATCAG	136	72,7	Interne
	nheB_1	CGCAGGAACACCGCTAGGAGTCGC	TGGTGGTGCAGTAGTTATTGCTAC	TGTCAAGTTCTTCTTCGCTAATACG	125	75,8	Interne
	nheB_2	CGCAGGAACACCGCTAGGAGTCGC	TGGTGCAGTAGTTATTGCTACGG	TGTCAAGTTCTTCTTCGCTAATACG	122	75,5	Interne
C. perfringens	cpa_4	TTGGAATCAAAACAAAGGATGGAAAACTCAAG	AAGAACTAGTAGCTTACATATCAACTAGTGGTG	TTTCCTGGGTTGTCCATTTCC	124	69,9	Albini et al., 2008
	cpa_5	AGTTGATGCCCCAGCCCATAGGC	GTAAGGCGCTTATTTGTGCTG	TTTTCATCCCAAGCGTAGAC	80	72,0	Interne
	cpa_6	AGTTGATGCCCCAGCCCATAGGC	ATTGTAAAGGCGCTTATTTGTGC	TTTTCATCCCAAGCGTAGAC	84	71,4	Interne

Tableau 11. Noms et séquences des amorces et sondes retenus pour la détection des génomes de Staphylocoques à coagulase positive (*coa*) ou plus particulièrement *Staphylococcus aureus* (*nuc*), les *Bacillus cereus* présumptifs (*rpoA*, *rpoB*, et *nheB*), et les *Clostridium perfringens* (*cpa*)

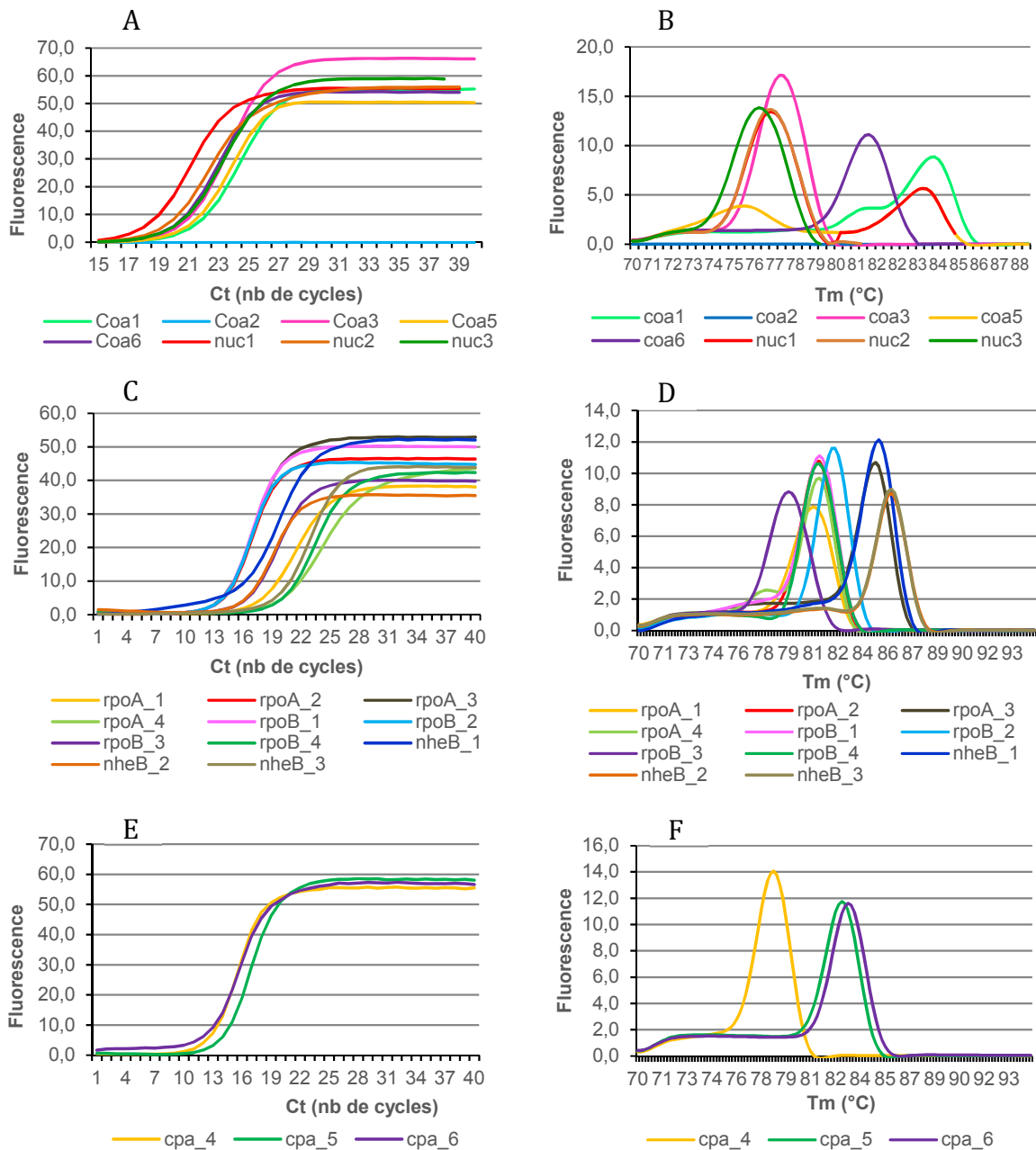


Figure 6. Visualisation des amplifications obtenues avec les différents couples d'amorces vérifiés par PCR temps réel (LC 480 II - Roche) - chimie SybrGreen. Courbes d'amplifications et de fusion: A et B pour *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), C et D pour *Bacillus cereus* (ATCC 14579), E et F pour *Clostridium perfringens* (ATCC 13124).

III.1.3 Efficacités des systèmes de détection

Une gamme de dilutions décimale de 10^6 à 1 équivalent génome (eg) a été effectuée sur les extraits d'ADN des souches de référence de *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus cereus* ATCC 14579. La visualisation des courbes d'amplification et de fusion de chaque couple d'amorce pour sa cible respective a montré une détection spécifique aux Tm attendues, pour chaque dilution. Cela nous a permis de calculer l'efficacité des différents couples d'amorces candidats.

III.1.3.1 *coa_3* : *Staphylocoques* à *coagulase* positive

La détection de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 par le système d'amorces *coa_3* a donné une efficacité à 91 %, contre *coa_1* et *coa_6*, dont les efficacités calculées étaient inférieures au critère que nous nous étions fixés de 90% (Figure 7). Concernant le système d'amorces *nuc_3* l'efficacité calculée était également inférieure à 90%. Il a donc été choisi de poursuivre avec le couple d'amorces *coa_3* pour la détection des *Staphylocoques* à *coagulase* positive.

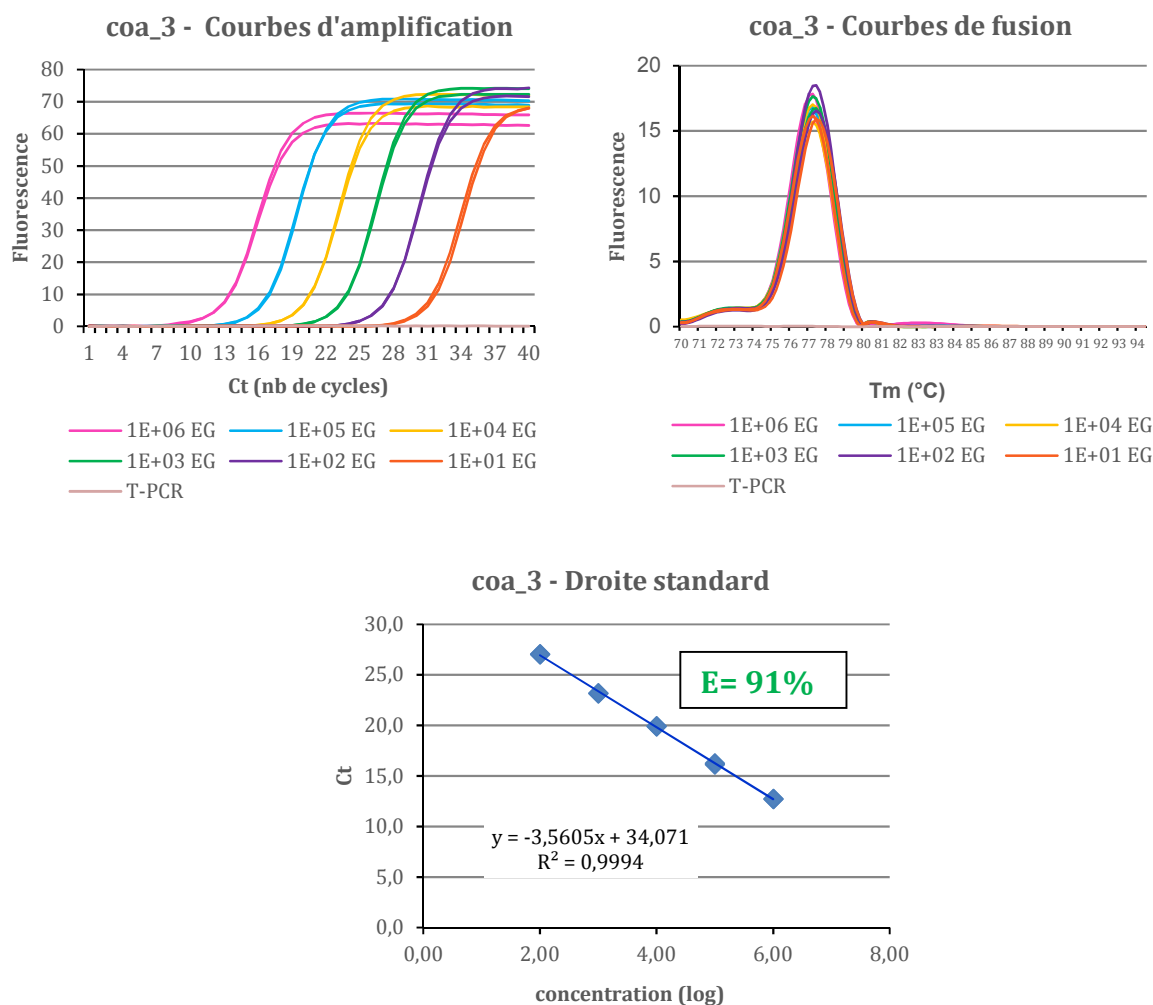


Figure 7. Détermination de l'efficacité du couple d'amorces *coa_3* par PCR en temps réel à l'aide de la chimie SybrGreen, sur la souche *S. aureus* ATCC 25923.

Une fois le couple d'amorces *coa_3* sélectionné, la sonde Taqman correspondante marquée en 5'CY3 – 3'BHQ2, a été testée sur la souche *S. aureus* ATCC 25923. La gamme de dilution précédemment utilisée a de nouveau été analysée pour calculer l'efficacité de la PCR. Les résultats présentés dans la Figure 8 montrent une amplification pour chaque point de gamme mais les courbes n'ont pas un aspect habituel et le niveau de fluorescence est faible (<2). En effet le fluorophore utilisé, CY3, dont la compatibilité avec le filtre « VIC,

HEX, Yellow » du Light Cycler 480 II nous avait été confirmée par le fournisseur, ne semble pas convenir du fait de l'aspect des courbes d'amplification obtenues. Un programme de PCR différent, avec une température d'hybridation augmentée à 60°C, et l'étape d'élongation programmée à la même température pendant un temps allongé d'une minute a été testé, pour vérifier si la réaction pouvait être améliorée en ce sens. Mais l'aspect et le niveau de fluorescence des courbes sont restés inchangés. Nous avons alors modifié le marquage de la sonde et remplacé le fluorophore « CY3 » par du « HEX ».

Les résultats de l'analyse PCR faite avec la nouvelle sonde marquée HEX sont présentés dans la Figure 8. Une courbe d'amplification est observée pour chaque point de gamme testé, de 10^7 eg (Ct = 16) à 1 eg (Ct >35). Les courbes d'amplification ont l'aspect attendu et le niveau de fluorescence est satisfaisant car nettement plus élevé que précédemment, et similaire aux niveaux de fluorescence des couples d'amorces utilisés pour la détection des génomes de BC et CP. L'efficacité de PCR calculée étant de 98%, le système coa_3 est retenu pour la détection des SCP.

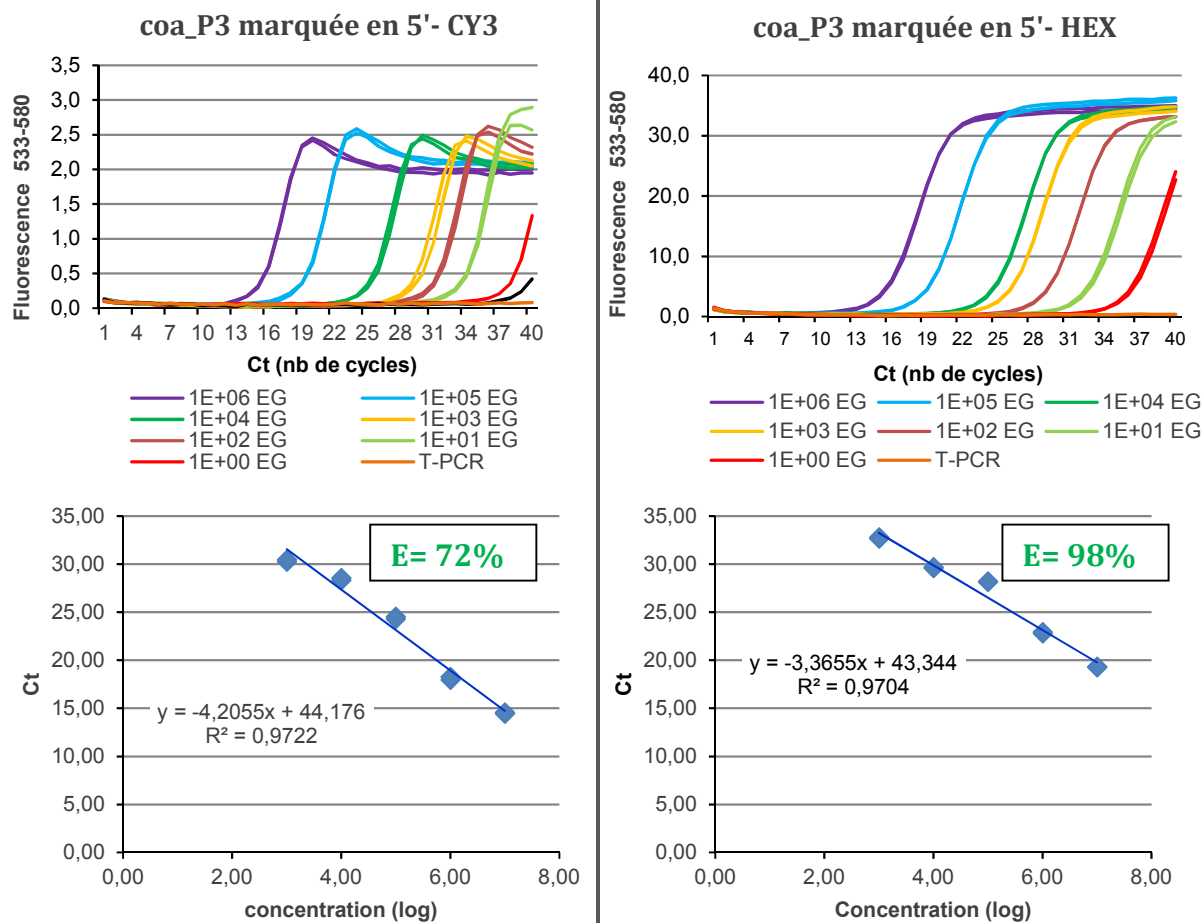


Figure 8. Vérification du couple d'amorces coa_3 avec sonde de fluorescence (coa_P3) marquée en 5'-CY3 sur le graphique de gauche et 5'-HEX sur le graphique de droite. Détermination de l'efficacité de PCR de chaque couples d'amorces et sondes.

III.1.3.2 *rpoA_2* et *rpoB_1* : *Bacillus cereus* présumptifs

Les couples d'amorces ciblant les gènes de RNA polymérase A et B, *rpoA_1*, *rpoA_3*, *rpoA_4*, *rpoB_2*, *rpoB_3* et *rpoB_4* avaient une efficacité inférieure à 90% lors des essais effectués en SybrGreen, tout comme *nheB_2*, l'un des trois couples d'amorces ciblant la toxine diarrhéique. Seuls les couples d'amorces *rpoA_2* et *rpoB_1* dont les résultats sont présentés [Figure 9](#), étaient efficaces à 90% et 92%, respectivement. Concernant les systèmes *nheB_1* et *nheB_3* l'efficacité n'a pu être calculée du fait de la fluorescence de base en augmentation constante tout au long de la réaction de PCR. La formation de dimères d'amorces ou une interaction avec les réactifs du kit PCR (nature, concentrations) utilisé pourraient expliquer ces résultats.

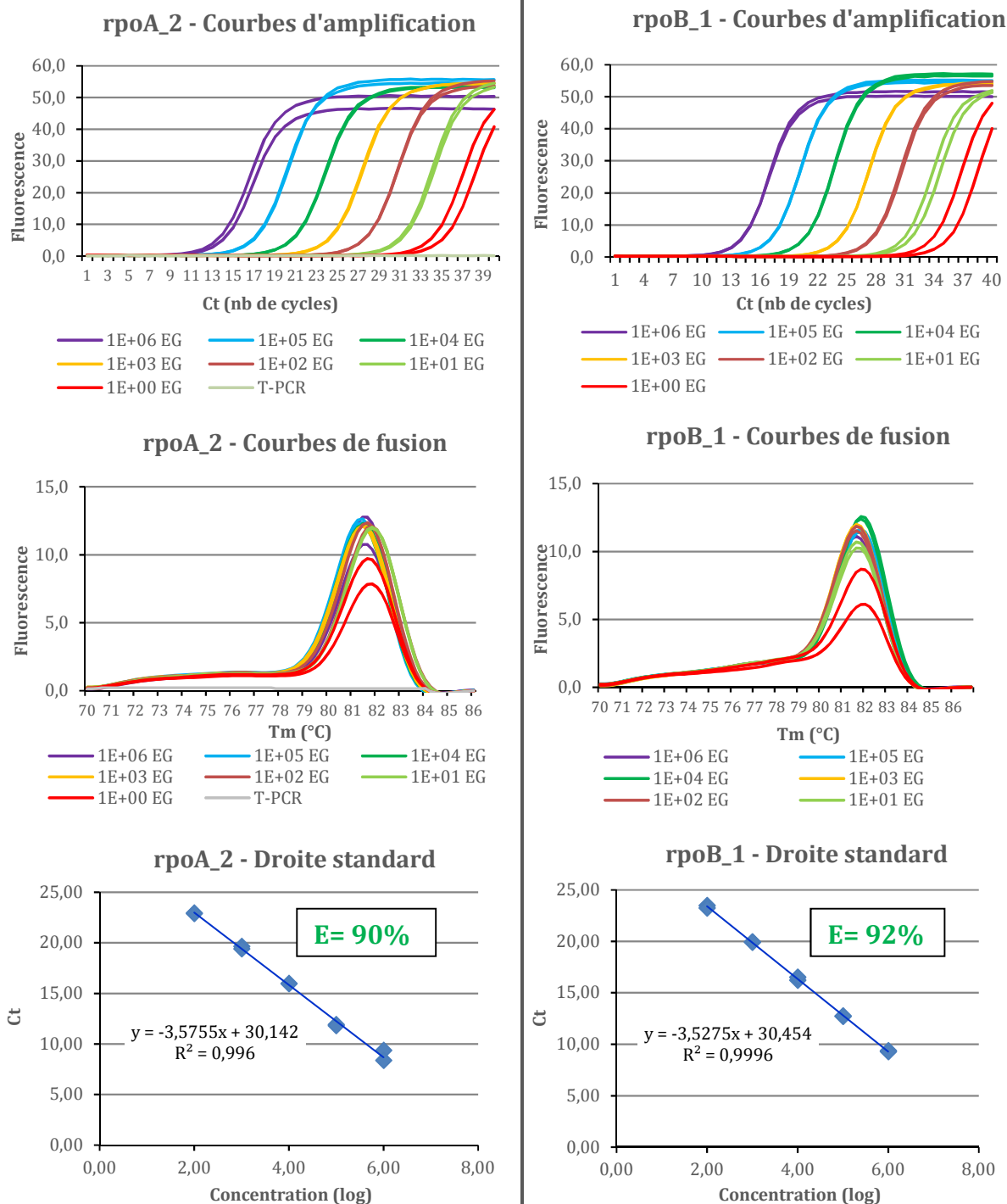


Figure 9. Détermination de l'efficacité de PCR des couples d'amorces *rpoA_2* et *rpoB_1* par PCR temps réel à l'aide de la chimie SybrGreen, en présence de la souche *B. cereus* ATCC 14579

Ces deux systèmes ont été testés pour la détection des différentes espèces de *Bacillus cereus* présumptifs mais seul *rpoA_2* a permis de toutes les détecter (cf. § III.1.4.2). C'est pourquoi le système *rpoA_2* a été sélectionné et testé avec la sonde d'hydrolyse associée, marquée en 5'-LCRed610 (Light Cycler Red610) et 3'-BHQ2 (Black Hole Quencher 2).

L'efficacité du couple d'amorce et de la sonde associée a été testée à partir de l'ADN de la souche *Bacillus cereus* ATCC 14579, et calculée à 97%, ce qui était tout à fait satisfaisant (Figure 10).

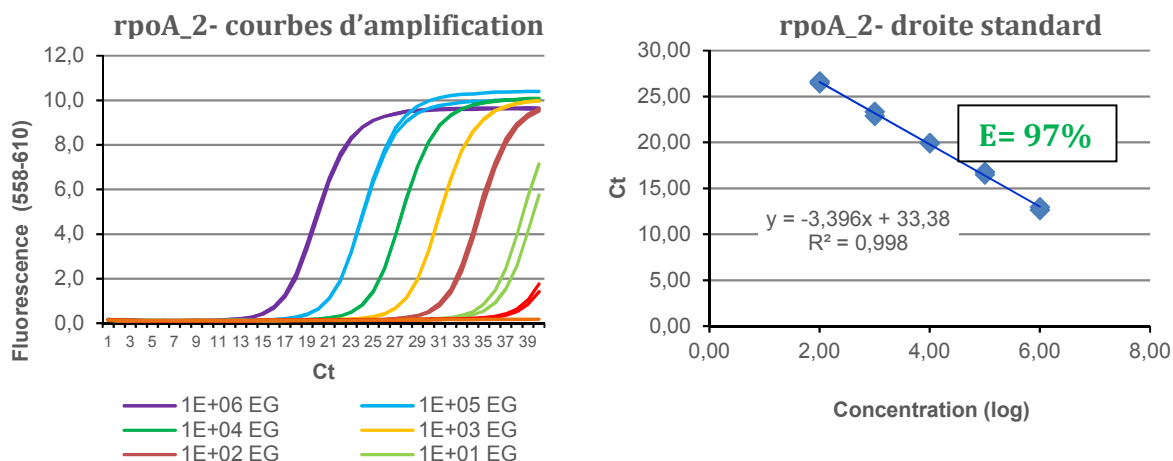


Figure 10. Détermination de l'Efficacité de PCR du couple d'amorce rpoA_2 avec sa sonde de fluorescence marquée en 5'LCRed610 – 3'BHQ2 (chimie Taqman). Analyse effectuée sur Light Cycler 480 I (Roche) avec lecture de l'absorbance par le filtre Red610 (558-610 nm).

III.1.3.3 cpa_4 : *Clostridium perfringens*

L'efficacité de PCR calculée pour les trois couples d'amorces testés pour la détection des *Clostridium perfringens* était supérieure à 90%. Le système cpa_4 développé par Albini et al., 2008, a néanmoins été sélectionné, ayant donné une meilleure efficacité (97,3%) que les systèmes cpa_5 (92,2%) et cpa_6 (90,8%) (Figure 11).

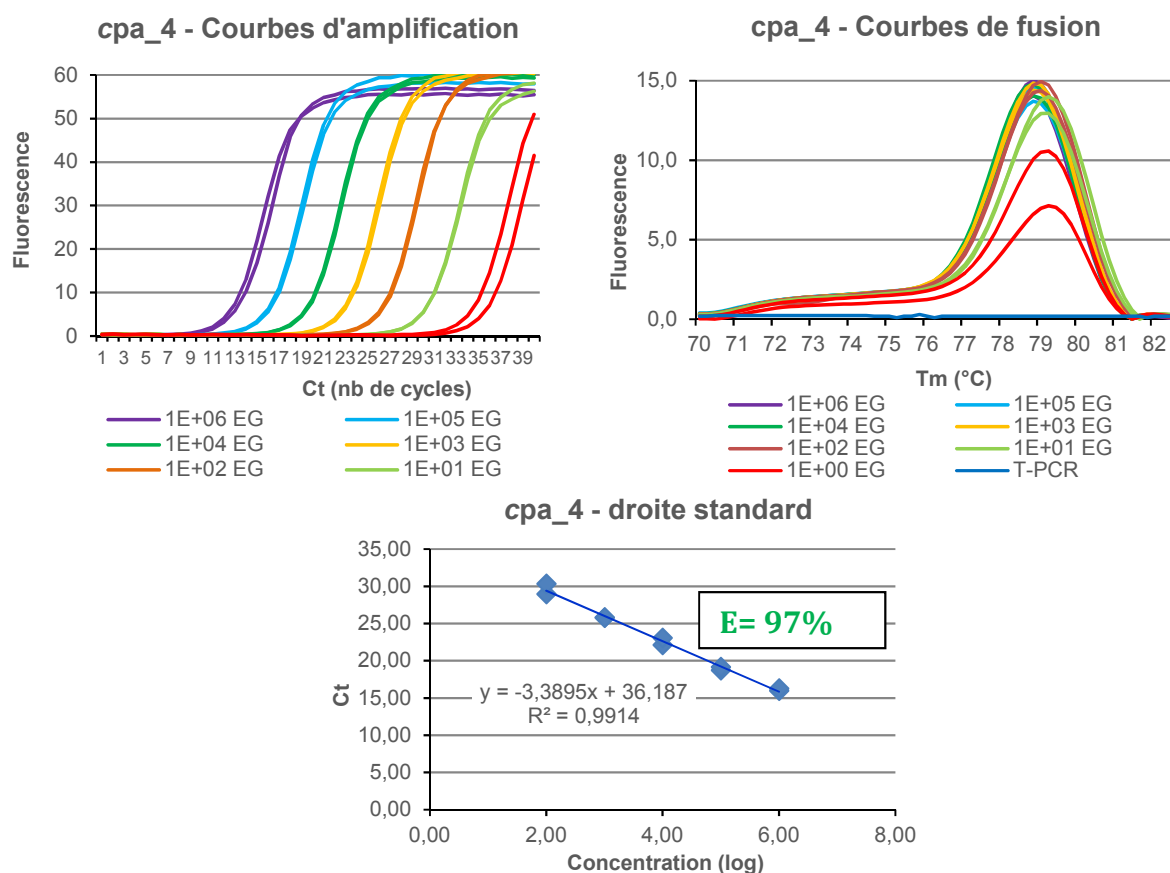


Figure 11. Détermination de l'efficacité du couple d'amorces cpa_4 par PCR en temps réel – chimie SybrGreen, avec la souche *C. perfringens* ATCC 13124.

III.1.4 Spécificité analytique : Inclusivité

III.1.4.1 *coa_3* et *nuc* : *Staphylocoques* à coagulase positive

Le couple d'amorces *coa_3* sélectionné a été testé sur les trois souches de *Staphylocoques* à coagulase positive disponibles au laboratoire, *S. delphini*, *S. hyicus* et *S. intermedius*. Pour les deux répliquats d'ADN de la souche *S. intermedius* titrant à 10^6 eg, des *Ct* tardifs (32), et identiques ont été obtenus. De même, pour la souche *S. hyicus*, les deux répliquats titrant à 10^6 eg ont donné des *Ct* tardif et identique (>35). En revanche, un seul des deux répliquats a été amplifié pour la souche *S. delphini* dont le *Ct* est supérieur à 35. Le couple d'amorces et sonde *coa_3* ne permet donc pas la détection de tous les SCP.

Testé cependant sur le panel de souches de terrain, ce couple d'amorce et sonde n'a permis d'en détecter que 7 sur 20 testées (35%). Toutes les suspensions de culture obtenues présentaient un trouble à l'issue de l'incubation donc toutes les souches étaient bien présentes et cultivables. L'alignement des 19 séquences de gène de coagulase de souches de *Staphylococcus aureus* référencées dans NCBI n'ayant pas permis de trouver une région conservée du gène de la coagulase pour le design des séquences nucléotidiques, cela explique très probablement que l'on n'ait pas détecté les 13 autres souches.

Suite à ces résultats, le couple d'amorces et sonde *coa_3* a été éliminé, et les 20 souches de SCP ont été testées avec le couple d'amorces et sonde *nuc* validé par l'unité SBCL. Tous les génomes bactériens ont bien été détectés (100%) Figure 12.

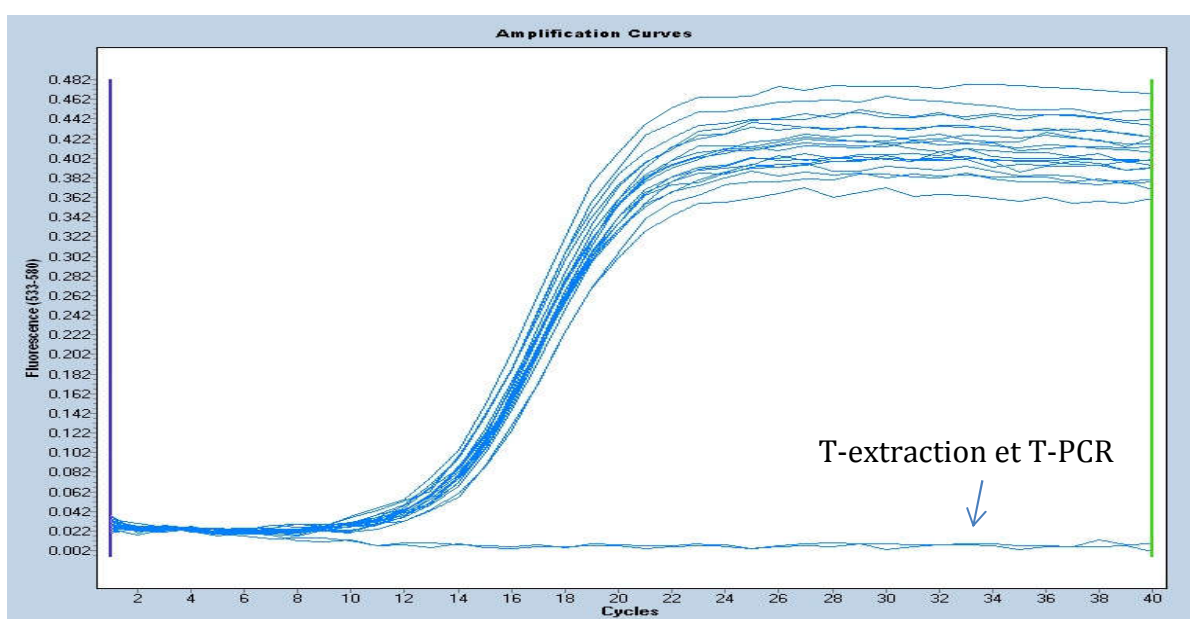


Figure 12. Spécificité analytique. Essai d'inclusivité du couple d'amorces et sonde *nuc* en présence de vingt souches de SCP isolées d'échantillons de TIAC.

III.1.4.2 *rpoA_2* et *rpoB_1* : *Bacillus cereus* présomptifs

Les résultats d'efficacité obtenus sur les couples d'amorces sélectionnés pour la détection des BC, ont permis de poursuivre les essais avec les couples d'amorces *rpoA_2* et *rpoB_1*, vérifiant si ces deux couples d'amorces étaient capables de détecter les génomes des autres espèces du groupe BC. Une suspension d'ADN de chacune des espèces du groupe BC titrant à 10^4 EG a été extraite puis analysée par PCR temps réel à l'aide de la chimie SYBR Green et il a été mis en évidence que le couple d'amorces *rpoB_1* ne permettait pas de détecter les génomes de toutes les souches contrairement au couple d'amorces *rpoA_2* avec lequel une amplification a été observée pour chaque souche (Figure 13).

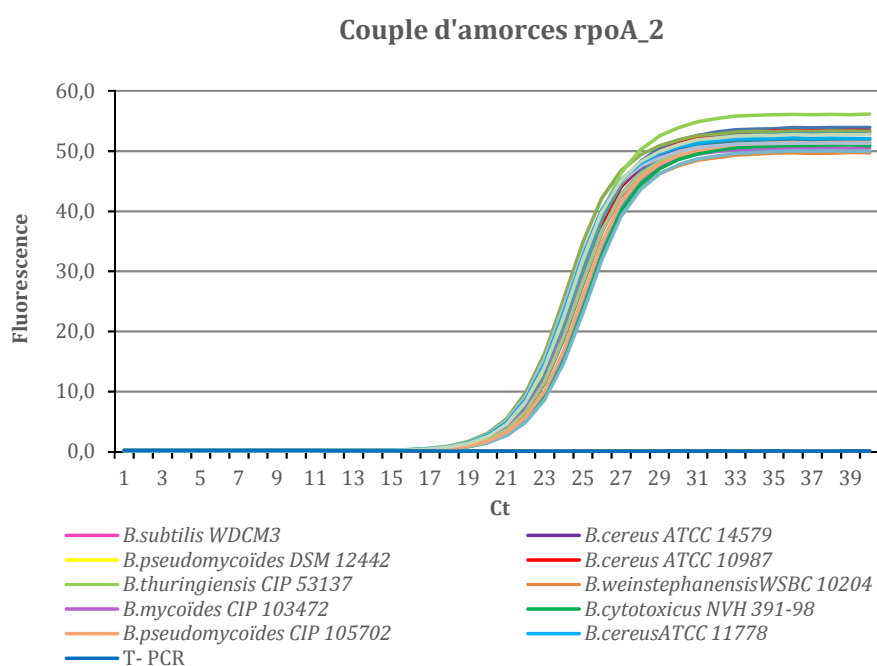


Figure 13. Essais de détection des différentes espèces appartenant au groupe *Bacillus cereus* avec le couple d'amorces *rpoA_2*, par PCR temps réel – chimie SYBR Green.

L'inclusivité du couple d'amorces *rpoA_2* a alors été testée avec sa sonde de fluorescence sur chacune des espèces du groupe BC et nous avons pu observer que tous les génomes des souches testées étaient bien détectés, bien que l'amplification du génome de la souche de *B. weinstephanensis* apparaisse plus tardivement que les autres (Figure 14). Cela nous a permis d'approuver ce système de détection et de tester le panel de souches de terrain.

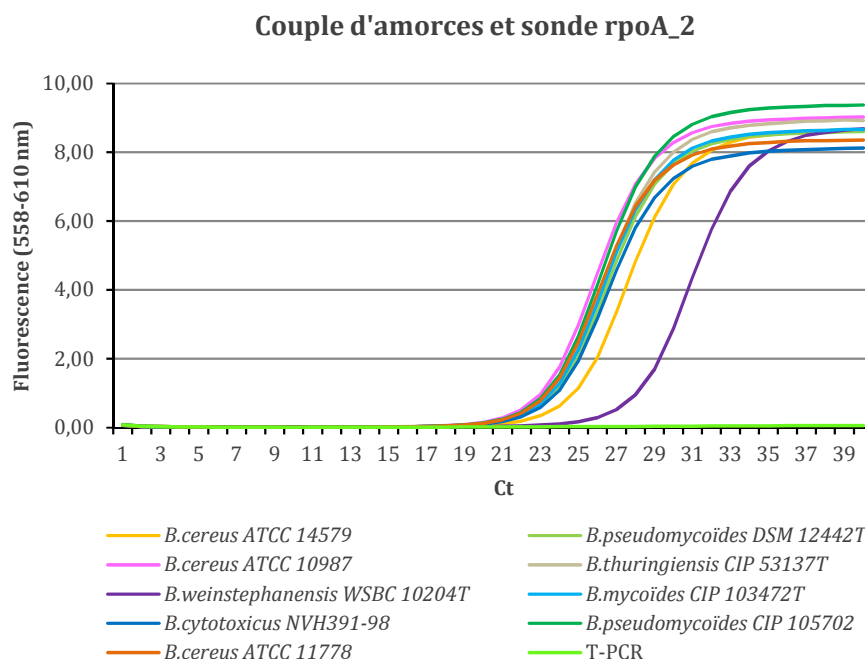


Figure 14. Détection de neuf souches représentant six espèces du groupe BC, par PCR temps réel sur LC 480 I (Roche) à l'aide du couple d'amorces rpoA_2 et de la sonde de fluorescence Taqman marquée 5'LCRed610 - 3'BHQ2.

Les génomes des vingt souches de *Bacillus cereus* présomptifs testées ont bien été détectées (100%) (Figure 15). Lors de la culture de la souche n°16Q002606, la suspension de culture obtenue après 18-24h d'incubation ne présentait pas de trouble, indiquant une croissance faible voire inexistante de la souche, donc une concentration plus faible d'ADN extrait. Cela peut expliquer l'apparition d'une courbe de fluorescence plus tardive que pour les autres souches testées, cependant le témoin négatif d'extraction mettant en évidence une contamination et étant détecté dans la même zone de Ct, elle ne peut être considérée positive. Une extraction d'ADN de cette souche a été refaite ultérieurement, le témoin négatif d'extraction était bien négatif ce qui a validé le résultat de détection.

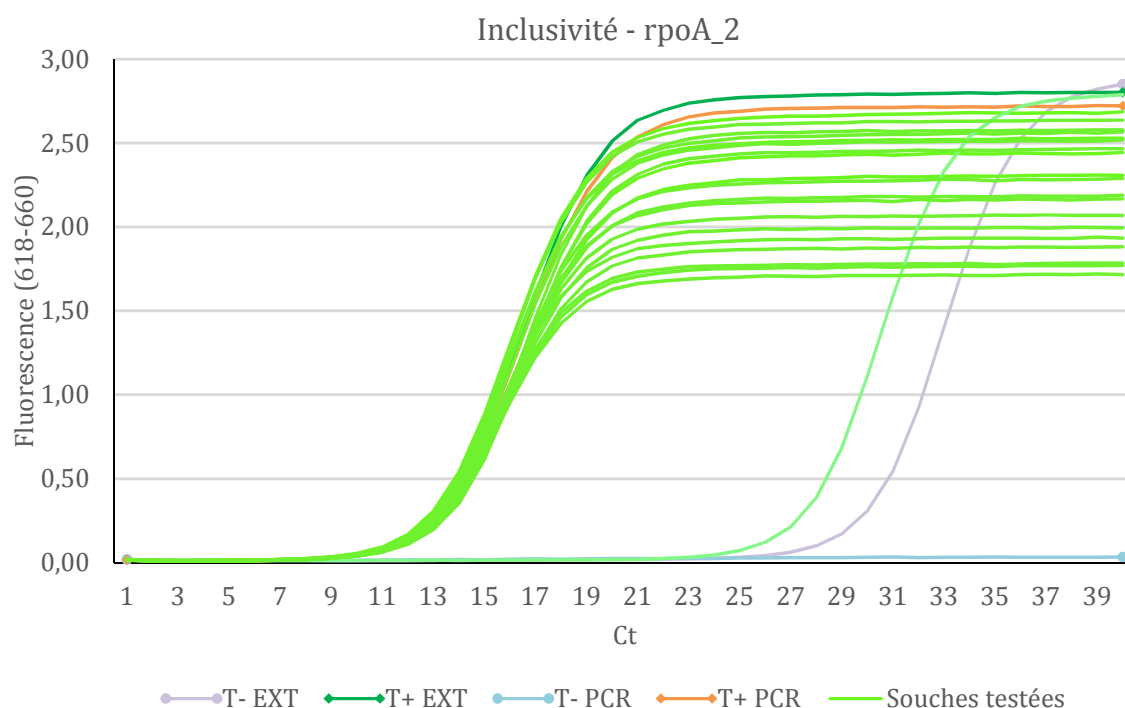


Figure 15. Spécificité analytique. Essai d'inclusivité du couple d'amorces et sonde *rpoA_2* sur vingt souches de *Bacillus cereus* présumptifs isolées d'échantillons de TIAC.

III.1.4.3 *cpa_4* : *Clostridium perfringens*

Le couple d'amorces et sonde *cpa_4* a permis de détecter 24 souches sur les 29 testées (80%) (Figure 16). Deux des souches sélectionnées initialement étaient non cultivables et ont été remplacées par deux autres souches. Comme pour les *Bacillus cereus* présumptifs, deux cultures ne présentaient pas ou peu de trouble à l'issue de l'incubation (14Q000084 et 16Q000553) entraînant une quantité d'ADN extrait plus faible et des courbes d'amplification apparaissant à un Ct plus tardif que pour la majorité des autres souches. Deux autres souches ont également été détectées tardivement (16Q000810; 14Q002056) bien que les caractéristiques bactériologiques aient été confirmées (colonies noires sur milieu TSC et précipité de sulfure de fer avec production de gaz en milieu lactose sulfite). Ces quatre souches n'ont cependant pas été considérées positives. Aussi, aucune courbe de fluorescence n'a été observée pour la souche 15Q003181, très probablement dû au fait que les colonies observées sur gélose Columbia n'étaient pas caractéristiques de *Clostridium perfringens* (rondes, petites, bombées et blanches).

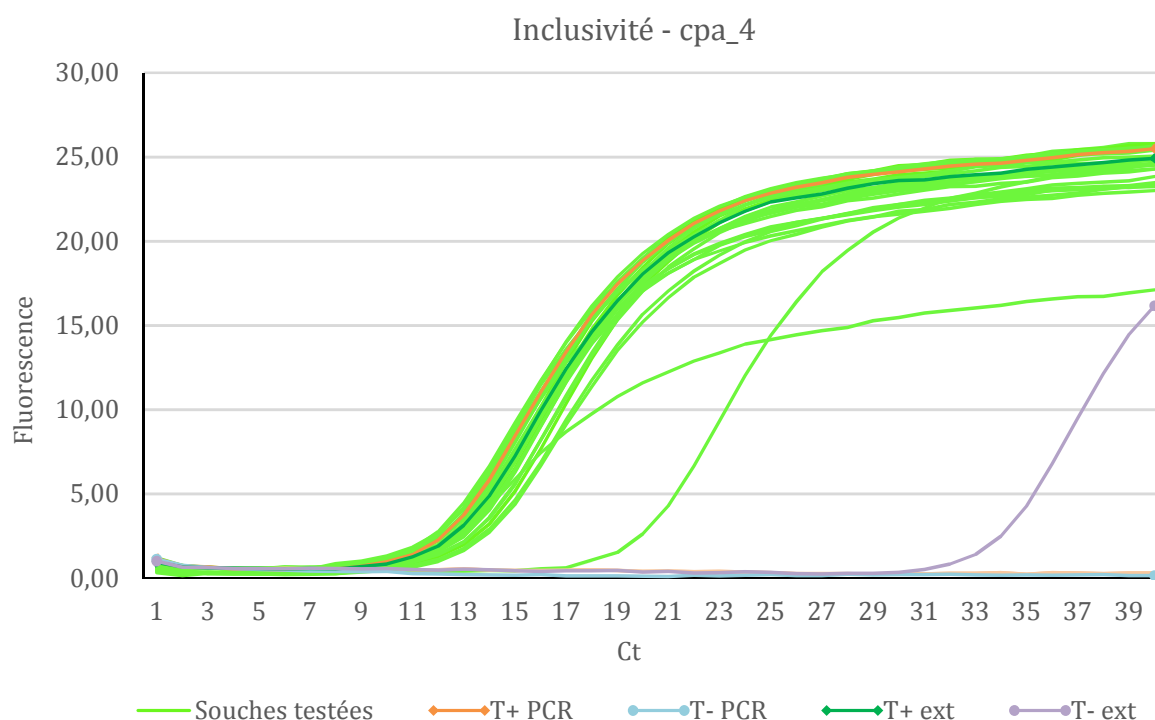


Figure 16. Spécificité analytique. Essai d'inclusivité du couple d'amorces et sonde cpa_4 sur 29 souches de *Clostridium perfringens* isolées d'échantillons de TIAC.

III.1.5 Spécificité analytique : Exclusivité

Dans un premier temps, chaque PCR a été vérifiée en présence de son ADN cible et nous avons en parallèle vérifié que chacune d'elle ne permettait pas l'amplification du génome de l'un des deux autres pathogènes d'intérêt dans cette étude. Les génomes de BC et CP n'ont pas été amplifiés par les couples d'amorces et sonde coa_3 et nuc, les génomes de SA et BC n'ont pas été amplifiés par le couple d'amorce et sonde cpa_4, et les génomes de SA et CP n'ont pas été amplifiés par le couple d'amorce et sonde rpoA_2.

Dans un deuxième temps, sur les 17 souches testées ([Tableau 5](#)), aucune n'a été détectée par le système cpa_4. Un début d'amplification tardive (>35 Ct) a été observé pour certaines souches avec les systèmes rpoA_2, nuc et coa_3 mais ont été considérées comme étant dus à des appariements non spécifiques, et donc négatives. Le gène nuc, avait également été testé sur 33 souches différentes de l'espèce SA lors de la validation de la méthode interne de l'unité SBCL pour lesquelles aucune amplification n'avait été observée.

Ces essais d'exclusivité sont présentés dans le [Tableau 12](#) ci-dessous.

Tableau 12. Résultats des essais d'exclusivité des quatre systèmes d'amplification (rpoA_2, cpa_4, coa_3, et nuc) sur un panel de souches non cibles.

IDENTIFICATION SOUCHE (espèces etc)	REFERENCE Souche	Détection rpoA_2	Détection cpa_4	Détection coa_3	Détection nuc
		BC	CP	SCP	SA
<i>Bacillus subtilis</i> susp. spizizenii	ATCC 6633 - WDCM3	-	-	-	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	ATCC 638	-	-	-	-
<i>Clostridium butyricum</i>	ATCC 19398	-	-	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228 - WDCM36	-	-	-	-
<i>S. chromogenes</i>	121CEB/09HMPA13	-	-	-	-
<i>S. pasteurii</i>	IPP68 / CH199	-	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	CIP76125T - WDCM159	-	-	-	-
<i>S. hominis</i>	Non disponible	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	43864 - WDCM6	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	19433 - WDCM9	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> (serotype 6a)	33090 - WDCM17	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Enteritidis	13076 - WDCM30	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Typhimurium	14028 - WDCM31	-	-	-	-
<i>Rhodococcus equi</i>	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	25922 - WDCM13	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	WDCM23	-	-	-	-

III.2 Essais préliminaires de détection en simplex sur matrice alimentaire

III.2.1 Contrôle d'inhibition (IPC)

Différents volumes (5, 10, 15, et 20 µl) d'un contrôle positif exogène commercial (Dia Control DNA™ – Diagenode) ont été extraits puis analysés en pour vérifier que le volume recommandé par le fournisseur convenait pour notre utilisation (= détecter convenablement une inhibition, être ni trop sensible ni trop robuste). A l'issue de notre essai, les 10µL, inoculés dans 1 ml de la suspension mère de l'échantillon à analyser, préconisés par le fournisseur, ont permis d'obtenir un Ct moyen à environ 32, cohérent avec les données fournies.

Cependant, 20 répétitions d'une extraction d'ADN de 20µl d'IPC ajoutés à 1 ml d'EPT ont été effectuées par la méthode PrepSeq™ rapid spin sample (Applied). Les résultats

observés sur la [Figure 17](#) montrent un Ct à 32, ce qui rejoint les résultats précédents et les données fournisseur. Ce volume a donc été utilisé pour la suite des essais sur les matrices alimentaires.

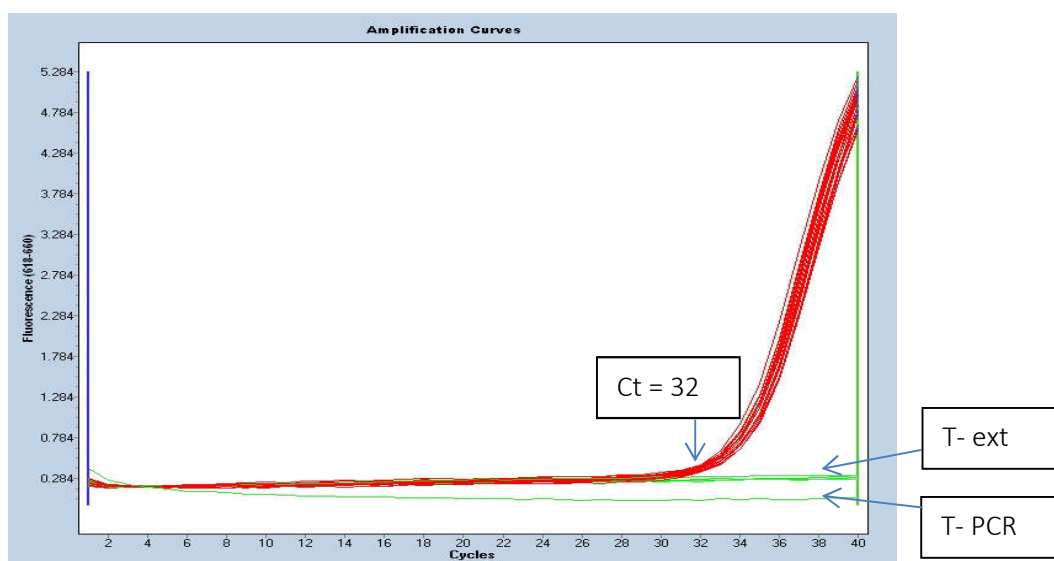


Figure 17. Courbes d'amplification de vingt répétitions d'une extraction d'ADN effectuée sur 1 ml d'EPT auquel ont été ajouté 20 µl de la culture d'IPC (DiaControlDNA – Diagénode). Un témoin négatif d'extraction a été réalisé toutes les cinq répétitions. Ces derniers sont représentés par les courbes vertes ainsi que le témoin négatif de PCR.

Une PCR, réalisée ensuite sur une série de cinq extraits d'ADN d'un échantillon alimentaire, type plat cuisiné, naturellement contaminé par BC, SCP, et CP (salade de thon/œuf – 15Q002606), et avec le système d'amplification de l'IPC seul dans le mix réactionnel, a permis de constater que le Ct moyen ne différait que de 0,7 Ct ([Tableau 13](#)), correspondant à un facteur 2 de différence entre la quantité d'ADN détectée à partir de l'extraction en EPT et la quantité d'ADN détectée à partir de l'extraction d'ADN sur la matrice alimentaire . ([Figure 18](#))

La présence de la matrice alimentaire analysée ici n'a donc eu que très peu d'impact sur la détection de l'IPC.

Tableau 13. Ct moyen obtenus pour la détection de l'IPC, inoculé dans 1 ml de la suspension mère de l'échantillon de salade thon/œuf (15Q002606) : 5 répétitions de l'extraction d'ADN, et 1 ml d'EPT (20 répétitions de l'extraction d'ADN)

Echantillons	Ct moyen de la détection IPC
salade thon/œuf	31,58
EPT	30,88

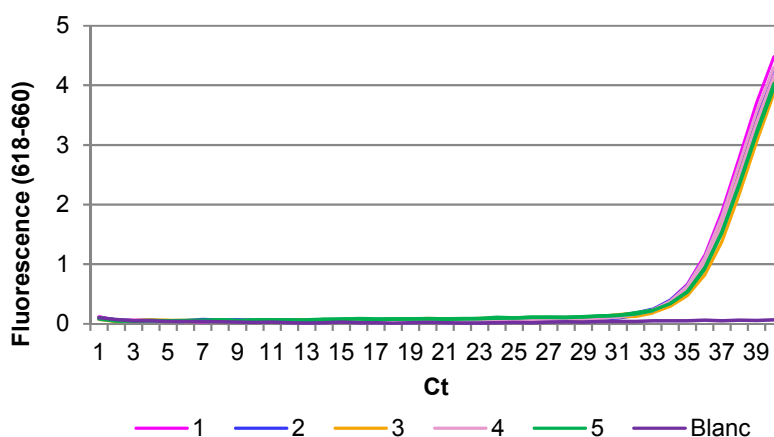


Figure 18. Détection de l'IPC sur cinq extraits d'ADN de l'échantillon de salade thon/œuf n°15Q002606, analysés en duplicats.

III.2.2 Utilisation du kit d'extraction PrepSeq™ rapid spin sample (Applied)

La méthode semi- automatisée de Roche (Magna Pure LC DNA isolation kit III bacteria fungi) sélectionnée à l'issue des essais sur souche pure de *S. aureus* n'a pu être évaluée sur matrice alimentaire suite à un dysfonctionnement de l'appareil MagnA Pure. Nous avons alors testé en parallèle les méthodes DNeasy® Blood and tissue kit (QIAGEN) et PrepSeq™ rapid spin sample (Applied) sur deux échantillons de plats cuisinés naturellement contaminés, une salade œuf/thon contaminée par les trois pathogènes à des niveaux de concentration différents (15Q002606), et une fricassée de volaille aux champignons fortement contaminé en *C. perfringens* (16Q003566). Le kit PrepSeq™ rapid spin sample (Applied) a permis la détection de tous les pathogènes présents dans les échantillons, contrairement au kit DNeasy® Blood and tissue kit (QIAGEN) qui n'a pas permis la détection de toutes les cibles en PCR.

Le Kit PrepSeq™ rapid spin sample ayant également l'avantage d'être plus rapide à mettre en œuvre a donc été retenu pour la suite des essais sur matrices alimentaires.

III.2.3 Répétabilité sur matrice

La répétabilité de la méthode a ensuite été estimée à partir de 5 extractions de l'échantillon de salade thon/œuf (15Q002606) testées en duplicats par PCR en temps réel avec le LC 480 II (Roche) et en présence de l'IPC ([Figure 19](#), [Figure 20](#), et [Figure 21](#)). Les dénombrements bactériologiques réalisés initialement et après conservation pendant deux ans à -20°C sont présentés dans le [Tableau 14](#).

Tableau 14. Dénombrements bactériologiques de l'échantillon 15Q002606, initiaux, et deux ans après congélation à -20°C.

N°échantillon	Pathogène dénombré	Dénombrement initial (ufc/g)	Dénombrement refait après conservation à -20°C (ufc/g)
15Q002606	BC	plus de 10 000 et moins de 100 000	9500
	SCP	73 000	380 000
	CP	370	<10

III.2.3.1 *Détection des Bacillus cereus présumptifs*

Les cinq extraits d'ADN issus de l'échantillon de salade thon/œuf contaminé à plus de 10^4 ufc/g mais moins de 10^5 ufc/g de BC (le dénombrement ne pouvait être plus précis du fait de la présence d'une flore annexe importante), ont présenté une courbe d'amplification avec un niveau de fluorescence satisfaisant pour la détection des BC et toutes ont un Ct équivalent à 24. (Figure 19-A). La détection est cohérente avec les essais de détection PCR sur souche pure dont les ADN testés titraient à 10^4 eg (ou équivalent ufc).

L'IPC a été détecté dans les cinq échantillons extraits. Néanmoins, l'aspect des courbes observé montre un chevauchement des signaux de fluorescence, superposant la détection des BC et celle de l'IPC. La courbe du témoin négatif d'extraction (Blanc), dans lequel seul le contrôle positif était présent, a présenté un aspect caractéristique avec un Ct de 33 et un signal de fluorescence cohérent avec celui obtenu pour les essais de détection sur IPC seul. (Figure 19-B)

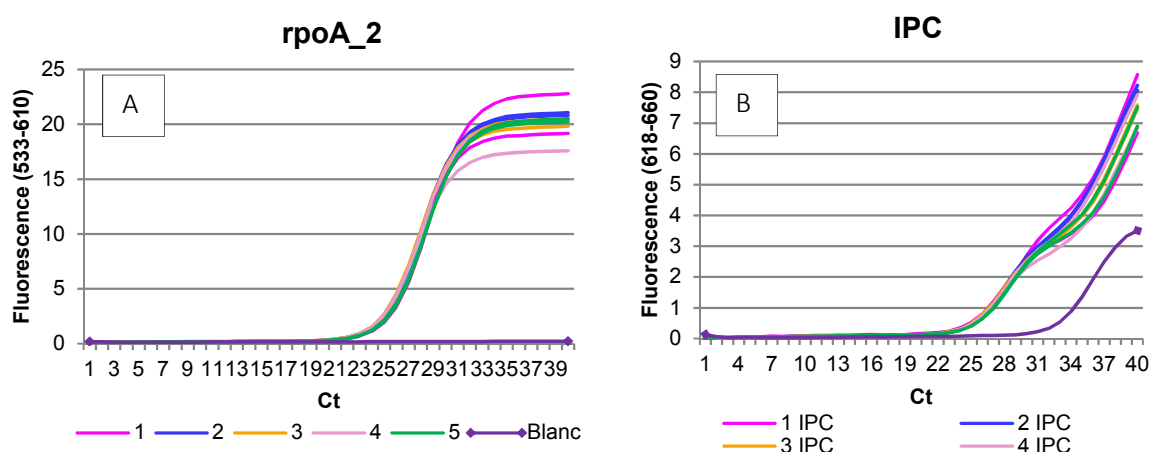


Figure 19. Courbes d'amplification de la PCR ciblant BC (A) et l'IPC (B), à partir de cinq extraits de l'échantillon de salade thon/œuf naturellement contaminé.

III.2.3.2 Détection de *Staphylococcus aureus*

De la même façon que pour BC, une détection a été obtenue pour chaque échantillon (Figure 20). A la suite des PCR (utilisant les amorces et sondes nuc) sur extrait d'ADN de souche pure de *S. aureus*, un Ct de 21 est attendu pour une solution d'ADN titrant 10^4 eg (ou équivalent ufc). Ici nous obtenons un Ct de 29 pour un dénombrement bactérien de l'ordre de 10^4 - 10^5 ufc/g.

La méthode d'extraction utilisée pour l'échantillon alimentaire étant différente de celle qui a été utilisée pour l'extraction d'ADN de la souche pure de *S. aureus*, une différence de rendement d'extraction peut expliquer un décalage de Ct.

Aussi, excepté pour l'un des deux réplicats de l'échantillon n°3, l'IPC est détecté avec un léger décalage de Ct à 34 indiquant une possible inhibition de PCR pouvant également expliquer ces résultats.

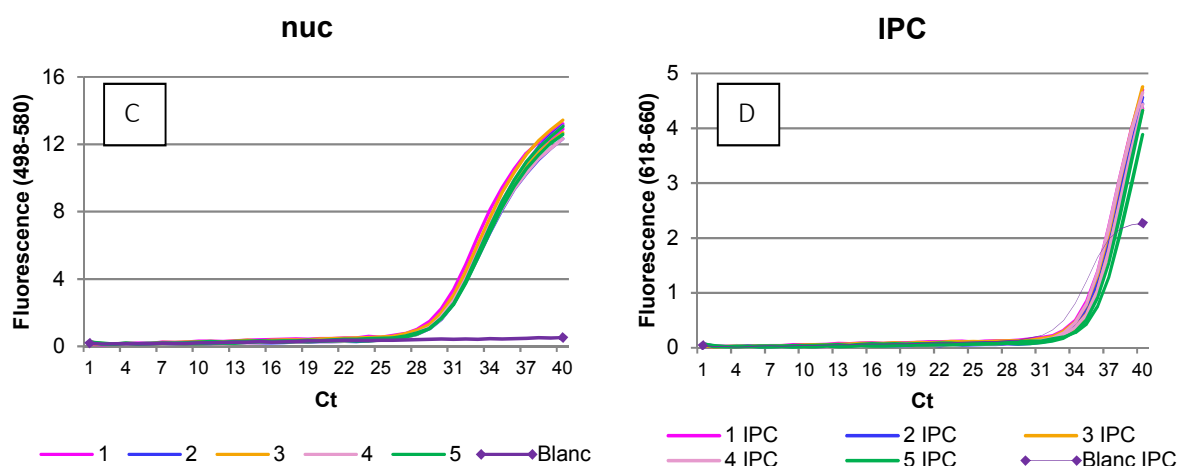


Figure 20. Résultats des PCR ciblant *Staphylococcus aureus* (C) et l'IPC (D) à partir de cinq extraits de l'échantillon de salade thon/œuf (15Q002606) naturellement contaminé.

III.2.3.3 Détection de *Clostridium perfringens*

La Figure 21 montre une détection des *Clostridium perfringens* très tardive avec un Ct de 35, pouvant être expliquée par le niveau de contamination de départ dénombré à 370 ufc/g. On s'approche ici de la limite de détection.

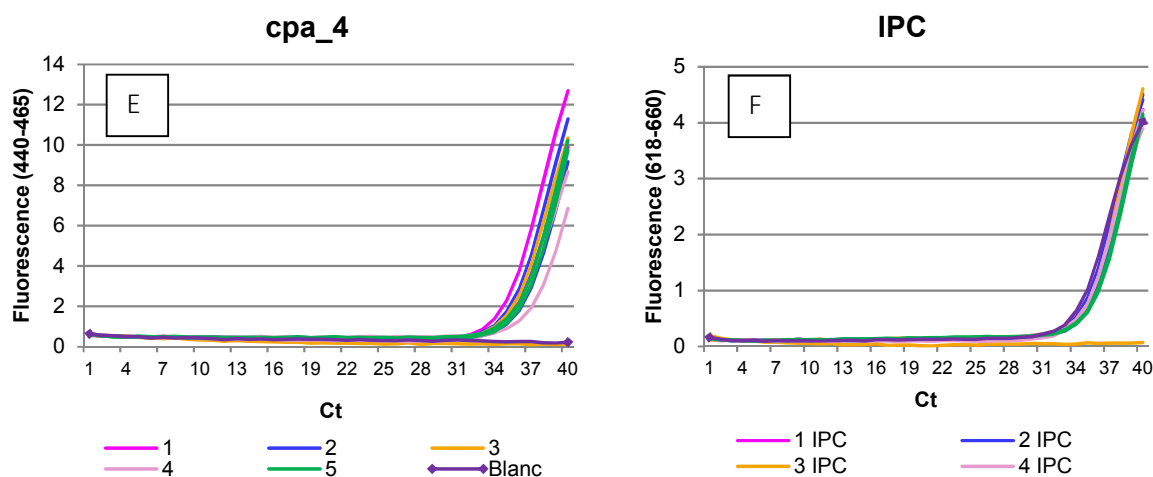


Figure 21. Courbes d'amplification obtenue pour les essais de détection en des *Clostridium perfringens* (E) et de l'IPC (F) sur cinq extraits de l'échantillon 15Q002606 naturellement contaminé.

III.2.3.4 *Echantillons naturellement contaminés*

Une série de 15 échantillons naturellement contaminés par un, deux ou trois des pathogènes, à différents niveaux de concentration, a été analysée pour compléter les essais précédents (Tableau 15). Comme pour l'échantillon 15Q002606, suite à la conservation à -20°C, nous ne sommes pas en mesure de vérifier la contamination réelle de l'échantillon au moment de l'analyse : la détection du génome ne différencie pas les cellules viables des cellules non viables. Les niveaux de contamination (initiaux et après décongélation) sont donc donnés à titre informatif bien que nous ayons pu dégager une certaine cohérence avec les résultats de PCR obtenus. Soixante-dix-huit % des échantillons contaminés en BC présumptifs sont détectés, et quatre-vingt-sept et demi % des échantillons contaminés en CP sont détectés également. En revanche la détection des *Staphylococcus aureus* n'a pas fonctionné sur les cinq échantillons contaminés avec ce pathogène (0%).

Tableau 15. Dénombrement bactériologiques et résultats des détections simplex des pathogènes BC, SA, et CP de 15 échantillons alimentaires naturellement contaminés provenant de TIAC.

Dénomination produit	N° Echantillon	Dénombrement des BC (initiaux) (ufc/g)	Détection BC (+ (Ct)/ -)	IPC (BC)	Dénombrement des CP (initiaux) (ufc/g)	Détection CP (+ (Ct)/ -)	IPC (CP)	Dénombrement des SCP (initiaux) (ufc/g)	Détection SA (+ (Ct)/ -)	IPC (SA)
Blé	15Q002843	5 600	+ (17,72)	-	<LD*	-	-	10<N<100	-	35
Filet de Poulet mixé	15Q002988	140 000	+ (23,85)	35	140	+ (30,96)	35	<LD	-	35
Emincé de dinde mixé	16Q001923	Au moins 100	-	36	8 400	+ (27,49)	36	<LD	-	36
Sauté de dinde à la coriandre haché	16Q001782	1 800	+ (18,06)	38	<40	+ (32,40)	38	1 200	-	38
Cœur de colin	16Q004127	<LD	-	35	<LD	-	35	<40	-	36
Thon	17Q000910	<LD	-	36	<LD	-	36	7 100	-	36
Bœuf mixé	17Q001622	<LD	-	-	<LD	-	-	<40	-	-
Galette Bressane	17Q001823	5 500	-	34	150	-	34	<LD	-	34
Purée	17Q001630	400	+ (23,67)	36	<LD	-	36	<LD	-	37
Riz pilaf	17Q003988	1 400	+ (18,59)	37	<LD	-	37	<LD	-	37
Sauce Roquefort	17Q001686	6 400 000	+ (19,90)	34	<LD	-	34	<LD	-	34
Paleron de bœuf	17Q004069	17 000	+ (16,99)	36	7 800	+ (26,94)	36	<LD	-	36
Crevettes	17Q003912	<LD	-	34	360	+ (23,57)	34	<LD	-	34
Bœuf bourguignon	17Q003104	<LD	-	-	5 200	+ (20,37)	-	<LD	-	-
Lentilles	17Q004052	<LD	-	39	620 000	+ (23,53)	39	<LD	-	-

*LD : Limite de détection

Résultat douteux : Inhibition de la PCR ou faible nombre d'ufc/g d'échantillon entraînant une non- détection de la cible.

Résultat non satisfaisant

Inhibition de la PCR

III.2.4 Limite de détection

III.2.4.1 *Estimation sur souche pures*

Au regard des essais réalisés lors de la détermination des efficacités de PCR à partir des souches pures de chacun des trois pathogènes BC, CP et SA, nous avons pu observer que tous les points de gammes d'ADN génomique testés, (10^6 eg à 1 eg) étaient détectés pour les souches de SCP et CP, permettant ainsi d'estimer une limite de détection de ces deux cibles génétiques à 1 eg. En revanche, concernant la détection de la cible *rpoA_2* pour les BC, la limite de détection est estimée à 10 eg.

III.2.4.2 *Approche de la sensibilité sur matrice alimentaire*

Deux échantillons de TIAC (18Q001746 – Morceau de paleron, et 18Q001868 - Pâtes) reçus et analysés en bactériologie ont été conservés une semaine au réfrigérateur puis utilisés pour estimer la sensibilité de la méthode simplex. A l'issue de l'extraction de ces deux échantillons, une gamme de 5 dilutions décimales successives a été effectuée puis analysée en PCR en temps réel.

L'extrait pur de l'échantillon 18Q001746 contaminé en *C. perfringens* à $1,3 \cdot 10^6$ ufc/g a été détecté avec un Ct de 20-21 et les points de gammes ont été détectés jusqu'à $1,3 \cdot 10^2$ ufc/g (Ct de 33-34). La détection de l'IPC donne un signal de fluorescence très faible par rapport à celui des CP, ce qui peut être dû à une forte concentration des amorces et sondes ciblant CP dans le mix. Le Ct relativement tardif indique probablement une inhibition de la PCR (Figure 22).

Concernant l'échantillon 18Q001868 contaminé en BC à $2,2 \cdot 10^5$ ufc/g, l'extrait pur est détecté (Ct de 20-21) et jusqu'à $2,2 \cdot 10^2$ ufc/g, avec un Ct de 31-32. Le niveau de fluorescence est moins fort que celui observé pour la PCR CP ce qui permet d'observer la détection de l'IPC sur le même graphique. On constate cependant que BC est détecté avec le filtre Cy5 et le signal de fluorescence interagit avec le signal de l'IPC. En effet, dans la Figure 23, on voit dans l'extrait pur, une amplification, à un niveau de fluorescence entre 1 et 2, qui s'atténue rapidement, correspondant à la présence des *B. cereus* dans l'échantillon, puis la fluorescence augmente de nouveau, à un Ct de 33, correspondant à la détection de l'IPC. Ce léger décalage de Ct peut laisser penser qu'une faible inhibition de PCR a pu avoir lieu.

Sur ce même échantillon les SCP dénombrés à $1,8.10^8$ ufc/g n'ont pas été détectés à hauteur de la quantification bactériologique. En effet, on peut voir sur la Figure 24 que l'extrait pur a été détecté à un Ct de 26 et que les points de gammes ne sont détectés que jusqu'à $1,8.10^6$ ufc/g. Le niveau de fluorescence est fort par rapport à celui de la détection de l'IPC. On peut dire, de la même façon que pour *C. perfringens*, que la concentration élevée des séquences d'amorces et de sonde dans le mix PCR en est probablement la cause. Le Ct est également décalé par rapport au résultat attendu ce qui laisse aussi penser qu'une inhibition de PCR a eu lieu ou que l'extraction n'a pas été efficace pour *S. aureus*.

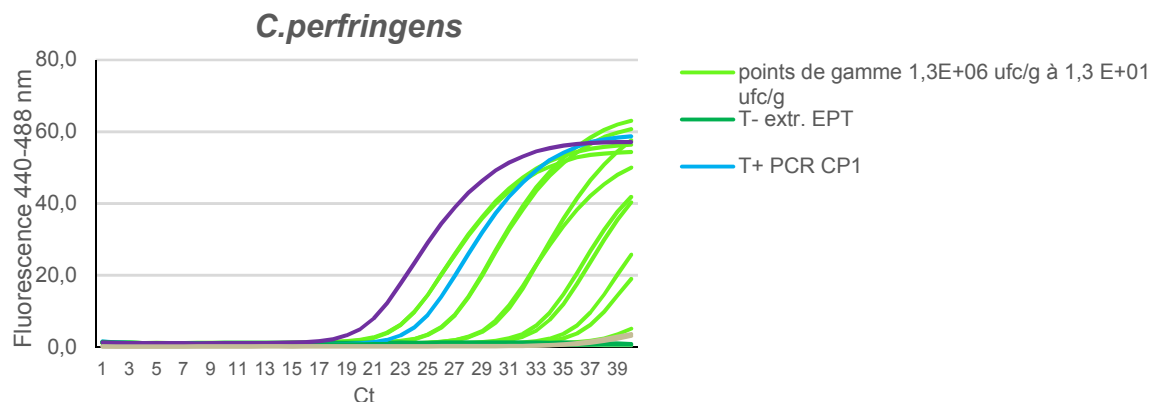


Figure 22. Détection de CP sur une gamme de dilutions décimales d'un extrait d'ADN de l'échantillon 18Q001746 naturellement contaminé.

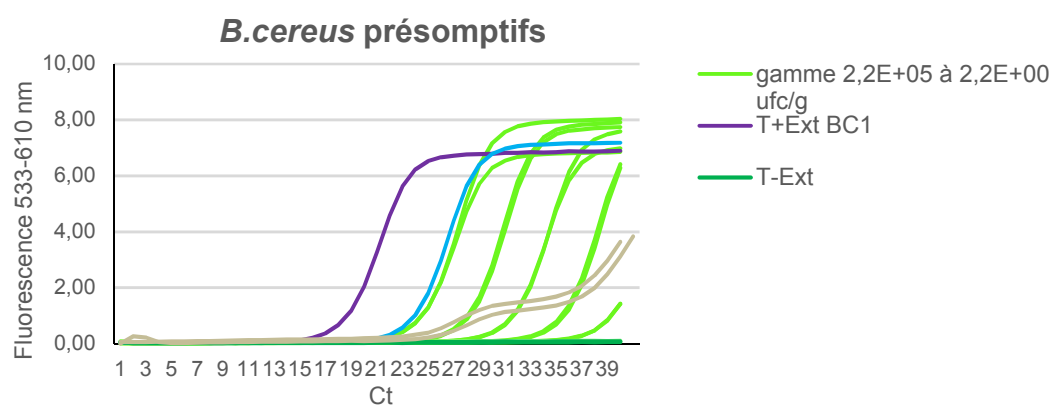


Figure 23. Détection des BC présumptifs sur gamme de dilutions décimales d'un extrait d'ADN de l'échantillon 18Q001868 naturellement contaminé.

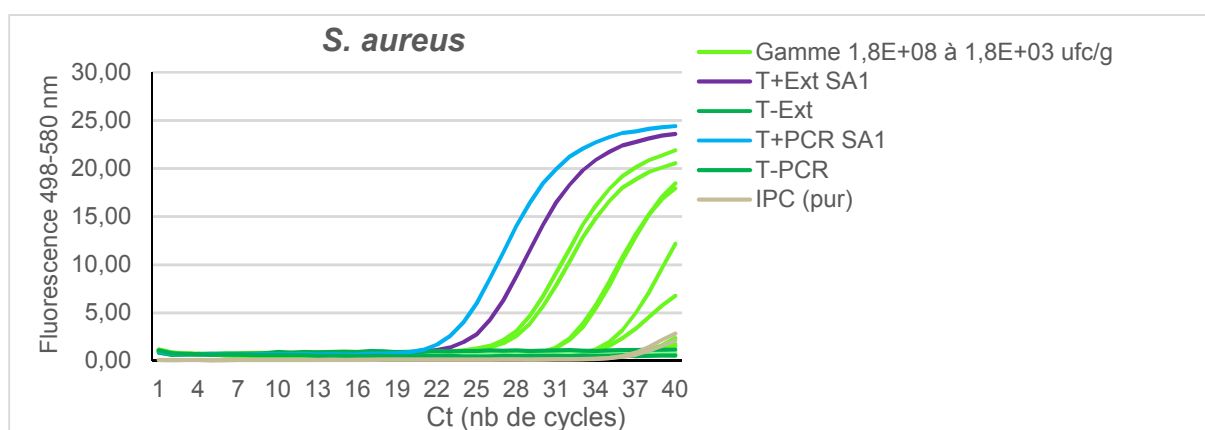


Figure 24. Détection de SA sur une gamme de dilutions décimales d'un extrait d'ADN de l'échantillon 18Q001868 naturellement contaminé.

Tableau 16. Estimation de la limite de détection de chaque PCR à partir des échantillons alimentaires naturellement contaminés.

Echantillon	Cible	[ADN] extrait pur (ufc/g)	Ct	Limite de détection (LD) estimée (ufc/g)	Ct
18Q001746	CP	1,30E+06	21	1,30E+02	35
18Q001868	BC	2,20E+05	21	2,20E+02	33
	SCP	1,80E+08	27	1,80E+06	35
18Q001869	aucune	< LD	Absence	<LD	Absence

Une estimation préliminaire (non statistiquement évaluée) de la limite de détection d'environ $2,2 \cdot 10^2$ ufc/g pour les BC présumptifs et $1,3 \cdot 10^2$ ufc/g pour les *C. perfringens* pourrait être retenue à ce stade. Concernant les SCP, il n'est pas possible de se prononcer sur une limite de détection en l'état. Nous pensons que l'extraction n'a pas été optimale. Des ajustements sont à prévoir pour l'améliorer.

III.3 Détection en multiplex sur souches pures

Les premiers résultats obtenus nous ont permis d'identifier une erreur dans le marquage des sondes pour les systèmes nuc et cpa_4. Les deux sondes avaient le même fluorophore. Nous avons alors modifié celui de la sonde du système cpa_4.

Les essais ont été effectués à l'identique avec les nouveaux réactifs et les résultats présentés dans le [Tableau 17](#) ont montré une bonne détection des cibles en présence de leurs systèmes d'amplification. Les autres pathogènes présents le cas échéant, n'ont pas été détectés. Pour chaque Mix réactionnel testé, les résultats obtenus concordent avec les résultats attendus et les courbes d'amplification ont présenté des niveaux de fluorescence cohérents avec les essais précédents.

Nous avons néanmoins observé pour la détection de *S. aureus*, une diminution de la fluorescence lorsqu'il est en multiplex, et lorsqu'au moins une deuxième cible est présente, notamment *Bacillus cereus*. La concentration en réactifs dans le mix réactionnel, ou le niveau de concentration de chacune des cibles présentes peut en être la cause et indiquer un phénomène de compétition entre les cibles. Les niveaux de fluorescence des autres cibles n'ont quant à eux, pas, ou très peu, été impactés.

Un chevauchement des absorbances des spectres d'excitation et d'émission, des fluorophores utilisés, a été observé pour la détection des génomes BC et SA. Le niveau de fluorescence est cependant très faible (0.2 à 1,8) et pourrait être corrigé par la mise en œuvre d'une compensation de couleur au niveau de l'appareil pour bien situer les signaux en rapport avec les sondes utilisées.

Tableau 17. Résultats des essais de multiplexage selon les combinaisons de MIX réactionnels A, B, C, et D, en présence de 1, 2 ou des trois ADN extraits de souches pures de *Bacillus cereus* présumptifs (BC), *Clostridium perfringens* (CP), et *Staphylococcus aureus* (SA).

ADN inoculé	MIX A (rpoA_2 + nuc)		MIX B (rpoA_2 + cpa_4)		MIX C (cpa_4 + nuc)		MIX D (rpoA_2 + cpa_4 + nuc)	
	Résultat attendu	Résultat obtenu	Résultat attendu	Résultat obtenu	Résultat attendu	Résultat obtenu	Résultat attendu	Résultat obtenu
BC	+	+(16,04)*	+	+(17,845)	-	-	+	+(17,371)
CP	-	-	+	+(23,823)	+	+(21,421)	+	+(19,47)
SA	+	+(15,426)	-	-	+	+(13,666)	+	+(12,771)
BC + CP	+ -	+ - (16,125)	+ +	+ + (17,341) (21,863)	- +	- + (22,388)	+ +	+ + (16,521) (19,114)
BC + SA	+ +	+ + (17,002) (11,622)	+ -	+ - (17,908)	- +	- + (14,167)	+ +	+ + (17,048) (6,671)
SA + CP	+ -	+ - (15,295)	- +	- + (23,648)	+ +	+ + (12,276) (23,355)	+ +	+ + (10,365) (20,348)
BC + CP + SA	+ - +	+ - + (16,288) (12,057)	+ + -	+ + - (17,192) (22,306)	- + +	- + + (23,556) (13,740)	+ + +	+ + + (16,541) (19,316) (5,768)
T- PCR	-	-	-	-	-	-	-	-

*Niveau de fluorescence

III.4 Détection multiplex sur matrice alimentaire

III.4.1 Optimisation du mix réactionnel

Un essai de multiplexage, en conservant les concentrations en oligonucléotides utilisées précédemment en simplex (MIX 4 du [Tableau 4](#)), sur cinq extraits d'ADN de l'échantillon de salade thon/œuf (15Q002606), déposés en duplicats, et dont les résultats sont présentés sur la [Figure 25](#), nous montre que la détection des CP, et des SA, donne un signal de fluorescence bien plus faible que pour les BC. Dans l'ensemble, le niveau de fluorescence est diminué par rapport aux essais en simplex et sur souche pure. Comme pour la détection en simplex, le niveau de contamination en CP dans l'échantillon alimentaire étant faible (370 ufc/g), cela explique la détection très faible et tardive que l'on a considérée négative.

A l'issue de ces résultats, nous avons testé plusieurs niveaux de concentrations des séquences d'amorces et de sondes dans le mix réactionnel pour tenter d'optimiser la réaction. ([Tableau 4](#))

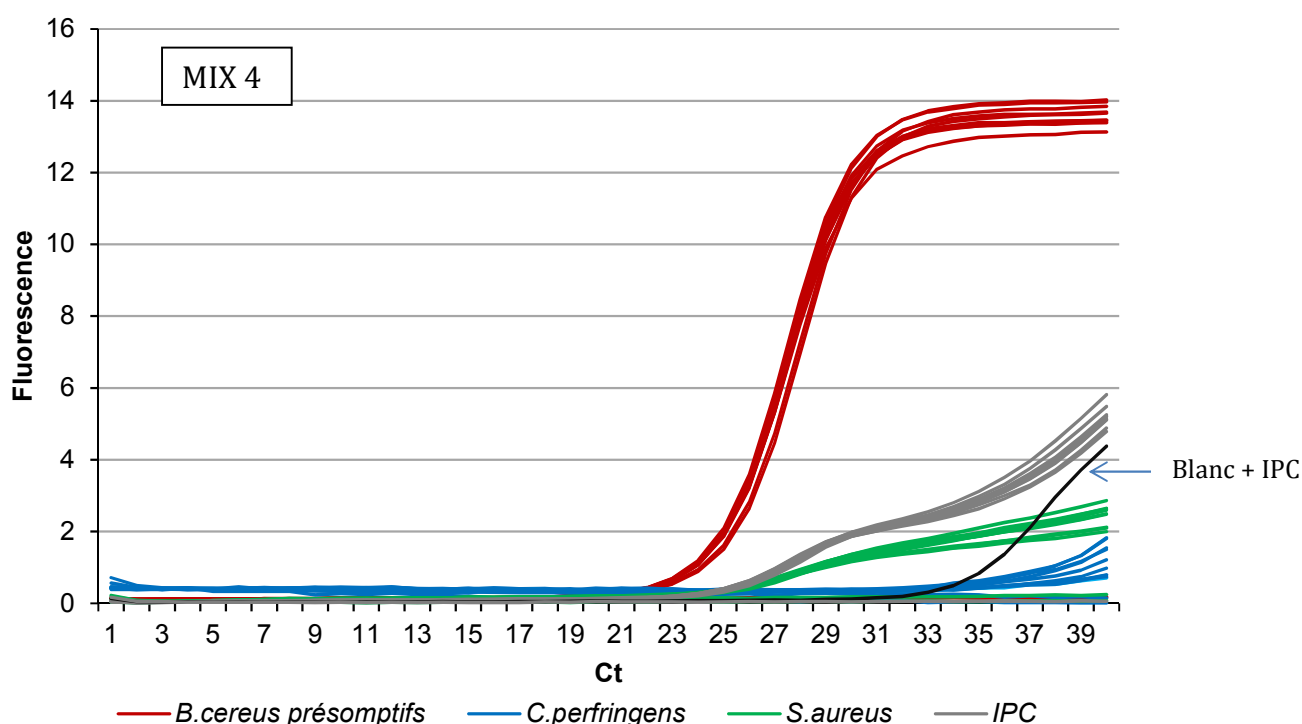


Figure 25. Détection multiplex des trois pathogènes (BC, SA et CP) à partir de l'échantillon de salade thon/œuf (15Q002606). Les concentrations en oligonucléotides utilisées sont données pour le mix 4 ([Tableau 8](#)).

Le Mix 3 (Tableau 18), que nous avons retenu, permet la détection des CP, BC et SA ainsi que l'IPC. Le niveau de fluorescence correspondant à la détection des génomes de BC a fortement baissé mais reste suffisant (6 au lieu de 14), et les Ct obtenus sont cohérents avec les niveaux de concentration bactérienne dans l'échantillon alimentaire. Cependant on observe toujours une faible détection de la fluorescence correspondant probablement à la détection des BC sur les courbes de détection de l'IPC (Figure 26).

mix PCR/syst	Concentration		Nombre de PCR	
	initiale	finale	1	12
Tampon PCR (μL)	2 X	1 X	12,5	150
H2O PCR (μL)			1,875	22,5
total (μL)			14,375	172,5
nucF (μL)	20 μM	400 nM	0,5	6
nucR (μL)	20 μM	400 nM	0,5	6
TQnuc (μL)	20 μM	200 nM	0,25	3
cpa_F4 (μL)	20 μM	400 nM	0,5	6
cpa_R4 (μL)	20 μM	400 nM	0,5	6
cpa_P4atto (μL)	10 μM	200 nM	0,5	6
rpoA_F2 (μL)	20 μM	100 nM	0,125	1,5
rpoA_R2 (μL)	20 μM	100 nM	0,125	1,5
rpoA_P2 (μL)	10 μM	50 nm	0,125	1,5
IPC			2,5	30
total (μL)			20	240

Tableau 18. Concentrations et volumes de chaque couple d'amorce et sonde testés dans le MIX 3 pour la PCR multiplex.

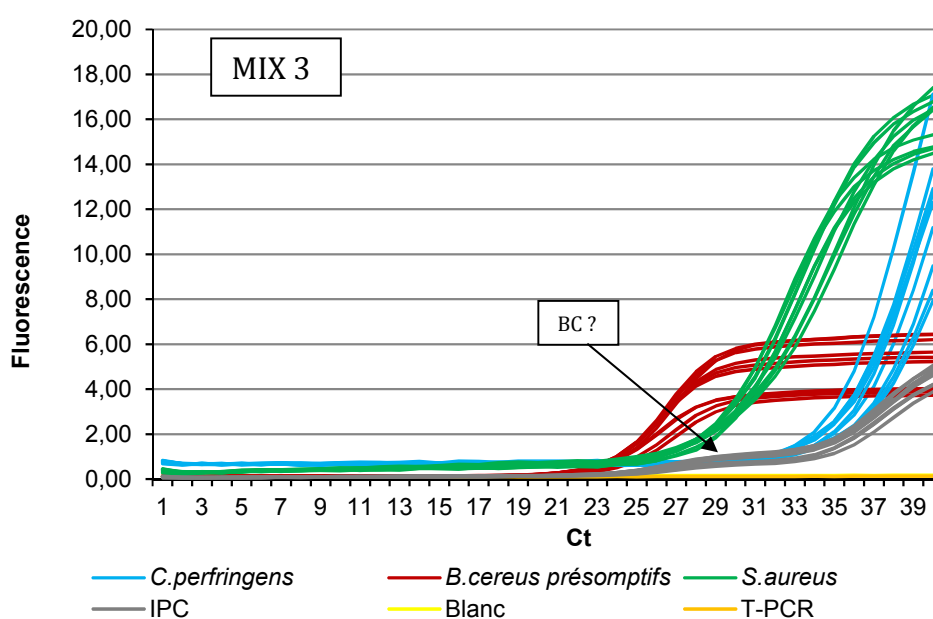


Figure 26. Courbes d'amplification correspondant à la détection multiplex des génomes de BC, CP et SA extraits de l'échantillon de salade thon/œuf, avec le Mix 3.

III.4.2 Optimisation de la température d'hybridation

Pour tenter de détecter les trois pathogènes de façon homogène, nous avons testé, sur un extrait d'ADN obtenu à partir d'une suspension artificiellement contaminée, les températures d'hybridation, 55°C et 57°C, en plus de 60°C précédemment utilisé ; 55°C étant la température d'hybridation optimale préconisée pour le couple d'amorce et sonde *nuc* (*Méthode interne LSA-INS-0139, ANSES*). La détection optimale a été observée à 55°C mais il n'y a que peu de différence constatée entre les trois températures testées. Aussi, des amplifications non spécifiques ayant été observées à 55°C et 57°C, nous avons donc conservé l'hybridation à 60°C pour nos essais.

III.4.3 Echantillons naturellement contaminés

Le Tableau 19 récapitule les résultats de multiplexage sur une série d'échantillons reçus les années passées et analysés dans le cadre d'investigations de TIAC. A l'issue de la congélation un dénombrement a été effectué pour comparer les résultats obtenus initialement et après congélation. Un nombre plus important des pathogènes est observé après congélation dans certains échantillons, s'agissant aussi bien de BC, de SCP, que de CP. La décongélation s'est effectuée à $1^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 1 nuit, avant la mise en analyse. Bien qu'étant réfrigérées, les bactéries remises dans des condition plus favorable à leur développement, ont pu se multiplier pendant cette étape de décongélation et lors de la mise en analyse, pouvant ainsi expliquer, en partie ces résultats. La prise d'essai n'étant pas identique à la première un effet d'hétérogénéité des bactéries dans les aliments est également à prendre en compte dans l'explication de ces résultats. Le mix 3 retenu précédemment a été utilisé. A l'exception de l'échantillon 16Q001781 (Sauté de dinde à la coriandre), l'IPC a été détecté dans chaque échantillon extrait. Une légère inhibition de PCR a tout de même été identifiée pour une majorité d'entre eux du fait de l'observation d'un décalage de 3 Ct. Lorsque la contamination est inférieure à 1 000 ufc/g, les signaux de fluorescence observés ne permettent pas de garantir la détection du ou des génomes bactériens recherché(s). Dans le cas d'un échantillon inconnu, la mise en œuvre de l'analyse bactériologique serait nécessaire pour vérifier la présence ou non du pathogène en faible nombre. Pour des concentrations bactériennes supérieures à 1 000 ufc/g les courbes d'amplification sont bien caractéristiques et les Ct obtenus sont cohérents avec les niveaux de contamination et/ou l'éventuelle inhibition observée par le résultat de l'IPC.

Tableau 19. Détection multiplex sur 11 échantillons naturellement contaminés issus d’investigations de TIAC, déposés en duplicats, et à l’aide des concentrations en amorces et sondes de chaque système d’amplification retenues dans le Mix3.

N° Echantillon	Nature de l'échantillon	Bacillus cereus présomptifs			Staphylococcus aureus			Clostridium perfringens			IPC	
		Dénombre- -ment initial	Dénombre- ment après décongélati on	Détection multiplex - MIX 3	Dénombre- -ment initial	Dénombre- ment après décongélati on	Détection multiplex - MIX 3	Dénombre- -ment initial	Dénombre- ment après décongélati on	Détection multiplex - MIX 3	IPC	
				+/- Ct moye n			+/- Ct moye n			+/- Ct moye n	+/- Ct moye n	
15Q002315	Salade de blé	1 800	3 700	++ 32,4	<LQ*	<LQ	--	<LQ	<LQ	--	+	34
15Q002606	salade œuf/thon	10 000<N<100 000	9 500	++ 22,8	73 000	380 000	++ 28,3	370	<LQ	++ 35,2	+	32
15Q003181	fallafels	<LQ	650	--	<LQ	<LQ	--	<40	340	--	+	32,9
16Q000570	Salade tomate/Feta	Présence, mais <400	P < 400	+- 36,8	<LQ	<LQ	--	<LQ	<LQ	--	+	35
16Q000637	Ananas	Présence, mais <400	P < 400	+- 37,5	<LQ	<LQ	--	<LQ	<LQ	--	+	35,3
16Q000912	Semoule de blé dur	340 000 000	> 1 500 000	++ 20,9	Au moins 700	Au moins 10 000	--	<LQ	<LQ	--	+	25,7
16Q001781	Sauté de dinde à la coriandre	NE=400	<LQ	--	1 600	1 100	--	110 000	<LQ	++ 32,7	-	
16Q002922	Tiramisu	Au moins 300	<LQ	--	510 000 000	1 700 000	++ 22,4	<LQ	<LQ	--	+	36,6
16Q003079	Duo de haricots verts	<LQ	<LQ	--	Présence, mais <40	<LQ	--	<LQ	<LQ	--	+	34,4
17Q000500	Saumon mariné tranché	<LQ	P < 400	--	Présence, mais <40	<LQ	--	<LQ	<LQ	--	+	36,6
16Q000913	Viande + légume+ sauce couscous	370 000	5 500	++ 31,6	<LQ	<LQ	--	<LQ	<LQ	+- 37	+	35,6

*LQ : Limite de Quantification

■ Résultat douteux : Inhibition de la PCR ou faible nombre de micro-organismes entraînant une non- détection de la cible.

IV. **DISCUSSION**

Le contrôle microbiologique des aliments est un prérequis pour garantir la sécurité sanitaire. Développer une méthode rapide et spécifique pour la détection des pathogènes alimentaires responsables de Toxi-Infections Alimentaire (Collective) est un défi, et la PCR multiplex en temps réel est un outil potentiellement adapté à cette exigence. Depuis quelques années, de nombreuses études ont été menées ciblant plusieurs pathogènes alimentaires bactériens dans diverses matrices alimentaires (Elizaquível & Aznar, 2008; Garrido et al., 2013; J.-H. Kim et al., 2014; H.-J. Kim et al., 2012; Ma et al., 2014; Wolffs et al., 2007). Cependant, aucune ne proposait la détection des trois pathogènes auxquels nous nous sommes intéressés dans ce projet, majoritairement trouvés dans les échantillons alimentaires responsables de TIAC en Ile de France, et dernièrement, à l'échelle nationale (SPF, données épidémiologiques, 2016). Nous avons alors tenté de développer une PCR multiplex en temps réel utilisant la technologie des sondes d'hydrolyse (Taqman assay) pour la détection des *Bacillus cereus*, Staphylocoques à coagulase positive et *Clostridium perfringens* utilisant respectivement *rpoA*, *coa* et *cpa* comme cibles génétiques. Selon la littérature, cette technique est la plus fréquemment utilisée jusqu'à maintenant. L'utilisation de sonde marquée avec des fluorochromes s'est avérée plus efficace que celle utilisant des agents intercalant (SybrGreen), au niveau de la spécificité et du multiplexage. Aussi, pour qu'une PCR multiplex soit efficace, les couples d'amorces et sondes utilisés, les concentrations des réactifs dans le mix réactionnel et les températures des cycles durant l'amplification sont importantes.

1. ***Bacillus cereus* présomptifs**

Les gènes de virulence identifiés jusqu'à présents chez les *Bacillus cereus* présomptifs, (ou *Bacillus cereus sensu lato*), sont spécifiques à certaines espèces de *Bacillus cereus* pathogènes. Aucune étude ne proposait la détection des sept espèces classées dans le groupe *Bacillus cereus* en une seule réaction, et en PCR temps réel, comme nous souhaitons le faire dans ce projet, à l'exception de *Bacillus anthracis* qui n'est pas une espèce impliquée dans les TIAC, et qui doit être manipulée en laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 (NSB3), étant un germe de classe 3. Cependant, une étude sur l'expression de ces gènes de virulence (Cadot et al., 2010) a rapporté l'utilisation de deux gènes de ménage, *rpoA* et *rpoB*, comme références endogènes, et codants pour des RNA polymérases. Par ailleurs, des publications (Guinebretière et al., 2002; Lindbäck et al., 2004; Lee et al., 2012) ont mis en évidence la présence systématique d'un complexe protéique, NHE (non hemolytic enterotoxin), codé par trois gènes : *nheA*, *nheB*, et *nheC*. Ce complexe est en partie responsable des symptômes

diarrhéiques lors de TIAC et d'après l'étude de Lindbäck *et al* en 2004, ces trois gènes sont indispensables pour que la bactérie puisse assurer son activité toxique, la protéine *nheB* étant le composant de liaison du complexe aux cellules intestinales.

Les couples d'amorces décrits dans la littérature, ciblant ces trois gènes, potentiellement présent dans le génome des six espèces du groupe *Bacillus cereus* à détecter étaient destinés à de la PCR en point final, et ne comprenaient donc pas de sonde de fluorescence. De plus, la taille des produits d'amplification était trop importante pour une utilisation en PCR temps réel, d'où le design de trois couples d'amorces et sonde pour la détection du gène *nheB*, trois couples d'amorces et sondes pour la détection des gènes *rpoA* et *rpoB*, et 2 sondes, l'une associée au couple d'amorces utilisé pour la détection du gène *rpoA*, et la deuxième au couple d'amorce utilisé pour la détection du gène *rpoB*, tous deux décrits dans l'étude de Cadot et al., 2010. L'analyse *in silico* de chacune des séquences d'amorces et de sondes créées a révélé une bonne spécificité pour la détection des espèces du groupe *Bacillus cereus* mais la détermination des efficacités de PCR n'a pas donné de résultats satisfaisants (<90 %) pour les séquences d'amorces et sonde développées pour le gène *nheB*, du fait d'une augmentation constante de la ligne de base de fluorescence qui peut être due à une interaction avec les réactifs du kit de PCR utilisé (natures, et concentrations) ou une détection aspécifique. En revanche, parmi les différents couples d'amorces et sondes ciblant les gènes de RNA polymérase nous avons sélectionné le système *rpoA_2* qui présentait une efficacité de PCR de 97%, tout à fait satisfaisante, et qui a permis par la suite, expérimentalement, de détecter spécifiquement les différentes espèces du groupe *Bacillus cereus*. Il a d'abord été testé en simplex, puis en multiplex sur des suspensions mères préparées à partir d'échantillons de TIAC naturellement contaminés à différents niveaux de concentration en *Bacillus cereus* présumptifs, et s'est révélé fonctionnel pour une détection estimée à environ 2×10^2 ufc/g (ces résultats n'ont pas été évalués statistiquement à ce stade). En dessous de ce niveau de contamination dans l'échantillon, la détection est tardive, voire inexistante dans certains cas. Si l'on observe à ce moment-là une inhibition du contrôle interne, une dilution de l'échantillon peut être envisagée pour tenter de lever l'inhibition et laisser apparaître la détection du pathogène. Si les courbes de fluorescence obtenues ne permettent pas de garantir le résultat de détection bien que le contrôle interne ne soit pas totalement inhibé, une vérification de la présence du ou des pathogènes bactériens par la mise en œuvre de la méthode bactériologique serait nécessaire.

2. Staphylocoques à coagulase positive

Le gène codant pour la staphylocoagulase (*coa* : Accession number : AJ306908) semblait être une cible génétique idéale pour nos besoins au regard des exigences de la norme de référence de bactériologie conventionnelle NF EN ISO 6888-2. L'analyse *in silico* nous a donné une première évaluation de la spécificité des séquences d'amorces et de sondes issues de la littérature et des designs internes mais n'était pas entièrement satisfaisante puisqu'elle ne présentait pas de résultats montrant une homologie de séquence avec d'autres espèces de Staphylocoques à coagulase positive que *Staphylococcus aureus*. Cela peut provenir du fait que peu de données sont disponibles sur les différentes espèces de Staphylocoques à coagulase positive, et que ce gène présente une forte variabilité inter et intra espèce (Kaida et al., 1987, Goh et al., 1992 ; Watanabe et al., 2005). Les résultats d'alignements réalisés via le logiciel CLC genomics WORKBENCH 7.0, sur les dix-neuf souches de *S. aureus*, ainsi que l'analyse expérimentale avec le *coa_3* qui n'a pas permis de détecter les souches *S. hyicus*, *S. intermedius* et *S. delphini*, confirment que le gène de la coagulase est variable selon les espèces de SCP, mais aussi selon les souches de SA. Aussi, bien qu'ayant obtenu une efficacité de PCR à 98% pour ce système de détection, lors de l'étude d'inclusivité, seul 35% des souches de Staphylocoques à coagulase positive de terrain testées ont été détectées. La question de l'utilité de détecter tous les staphylocoques à coagulase positive s'est alors posée, et d'après un sondage mené par le Laboratoire européen de référence pour les Staphylocoques à l'ensemble des laboratoires du réseau européen, la quasi-totalité des souches de staphylocoques à coagulase positive caractérisées suite à un isolement de souche sur un échantillon de TIAC, révèle l'identification d'un *Staphylococcus aureus*. Il a donc été décidé d'utiliser le couple d'amorce et sonde validé par l'unité SBCL, basé sur le gène *nuc*, codant pour la thermonucléase, et spécifique de *Staphylococcus aureus*. Néanmoins, l'extraction et la détection de l'ADN cible de ce pathogène ont été plus difficiles par rapport aux deux autres pathogènes. Les essais de multiplexage sur souches pure ont montré une forte diminution du signal fluorescent à partir du moment où les séquences d'amorces et sonde étaient en compétition avec d'autres éléments, notamment en présence des amorces et sonde *rpoA_2*, ciblant les *Bacillus cereus* présumptifs. Afin de trouver une solution pour pallier ce problème, nous avons tenté d'ajuster les concentrations de chaque système d'amplification PCR (amorces et sondes), et la composition d'un des mix réactionnels a permis d'équilibrer les signaux de fluorescence au profit des *Staphylococcus aureus*, avec une détection des *Bacillus cereus* nettement diminuée mais suffisante. Cependant, les échantillons analysés en simplex n'ont pas permis leur détection, de par leur faible niveau de contamination et les échantillons testés en multiplexage ont montré, comme pour les *Bacillus cereus* présumptifs, des résultats positifs seulement sur les échantillons dont la contamination était supérieure à 10⁴ ufc/g.

3. *Clostridium perfringens*

La détection des *Clostridium perfringens* dans son ensemble, et pas seulement de ceux pouvant être responsable des symptômes de toxi-infection alimentaire, est d'intérêt dans ce projet pour répondre à la norme NF EN ISO 7937 actuellement utilisée en bactériologie conventionnelle pour le dénombrement des *Clostridium perfringens* dans les aliments. C'est pourquoi le gène *cpa* codant pour l'alpha-toxine a été choisi. En effet, Chon et al., 2012 rapportent qu'il est présent dans les cinq toxinotypes de *Clostridium perfringens* (A, B, C, D et E). Il a été ciblé par plusieurs PCR en temps réel développées pour la détection des *Clostridium perfringens* dans diverses matrices (Végétaux, viandes, fèces ; Chon et al., 2012 ; Gurjar et al., 2008) et plus particulièrement comme contrôle interne positif par Albin et al., 2008. Les séquences utilisées dans cette étude ont été retenues ici, au regard des résultats satisfaisants de l'analyse *in silico* (100% d'identité) et de l'efficacité de PCR à 97%, même si la spécificité analytique (80%) doit encore être améliorée. Les essais réalisés en multiplex sur souches pures et en simplex sur matrices alimentaires naturellement contaminées démontrent une bonne détection de la cible avec 100% de détection. En multiplexage sur matrice alimentaire, peu d'échantillons (4) étaient contaminés en *Clostridium perfringens* et seulement l'un d'entre eux l'était fortement et a bien été détecté. Concernant les trois autres échantillons, nous étions confrontés à la limite de détection avec des courbes d'amplification tardives, ne permettant pas de conclure avec certitude à la détection de la cible génétique. L'ensemble de ces résultats font que, en cas d'échantillon inconnu, une confirmation par la méthode bactériologique resterait systématiquement nécessaire.

Dans l'ensemble des cas de détections tardives ou inexistantes, effectuées en PCR simplex ou en multiplex, à partir de matrices alimentaires pourtant naturellement contaminées, les dénombrements bactériologiques indiquaient une contamination inférieure à 10^3 ufc/g. La composition de la paroi des bactéries Gram positif peut présenter des difficultés pour la lyse lors de l'extraction, entraînant une perte d'efficacité de l'étape d'extraction de l'ADN. En effet, il a été mis en évidence via les essais de sensibilité de la méthode complète en simplex, d'une perte d'environ 2 log de concentration d'ADN par la méthode d'extraction PrepSeq™ rapid spin sample (Applied). Des substances inhibitrices présentes dans les aliments, incluant les matières grasses, le glycogène, les composés organiques et phénoliques, peuvent également affecter la PCR et donner des résultats faussement négatifs (O'Regan et al., 2008). Cependant, à ce stade du développement de la méthode, peu d'échantillons présentent une inhibition avec absence de détection complète de l'IPC, ce qui est encourageant pour la continuité des essais.

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Agir rapidement à la suite d'une déclaration de TIAC pour éviter l'apparition d'autres contaminations est un enjeu de taille pour les autorités sanitaires. Jusqu'à maintenant, les méthodes bactériologiques utilisées au LCSV nous permettent d'obtenir un résultat en 24h pour les plus rapides, mais pouvant aller jusqu'à 5 jours ou plus pour d'autres si des analyses de confirmations sont à mettre en œuvre. Dans le contexte d'évolution des exigences en termes de délai de rendu des résultats d'analyses, l'objectif du projet était alors de développer une méthode de screening rapide et spécifique des pathogènes alimentaires bactériens responsables de TIAC, par PCR en temps réel en multiplex. Sans enrichissement préalable, cette méthode permettrait d'obtenir une idée qualitative de la contamination bactérienne à J0, confirmée ensuite par la mise en œuvre des méthodes bactériologiques si un signal est positif ou douteux.

A l'heure actuelle, nous avons pu déterminer une cible génétique spécifique pour chaque pathogène d'intérêt dans le développement de notre méthode : le gène de RNA polymérase (*rpoA*) pour la détection des *Bacillus cereus* présumptifs (à l'exception de *Bacillus anthracis*), le gène de l'alpha-toxine (*cpa*) pour la détection des *Clostridium perfringens*, et le gène de la thermonucléase (*nuc*) pour la détection des *Staphylococcus aureus*. En effet, notre souhait de suivre les exigences des normes de bactériologie conventionnelle, n'a pas pu aboutir quant à la détection du gène de la coagulase ciblant l'ensemble des Staphylocoques à coagulase positive, celui-ci n'ayant pas permis d'obtenir de bons résultats de spécificité du fait de sa variabilité génétique importante. Il serait néanmoins intéressant de poursuivre l'étude de ce gène au sein des espèces de Staphylocoques isolées lors de TIAC pour comprendre son rôle ou son implication dans la pathogénicité de ces souches. Concernant la détection des *Clostridium perfringens*, la présence du gène *cpe* codant pour l'entéro-toxine CPE est retrouvée dans 5% des souches de *Clostridium perfringens* de type A, majoritairement isolées lors de TIAC (Petit et al., 1999). Une détection de ce gène en plus du gène de l'alpha-toxine (*cpa*) pourrait permettre d'orienter davantage l'agent responsable de la TIAC en cas de présence de pathogènes multiples dans un échantillon et à des niveaux de concentrations différents.

Lors de la synthèse et de la vérification des systèmes de détection retenus au regard de l'analyse *in silico*, les essais d'efficacité et de spécificité mis en œuvre étaient satisfaisants pour les systèmes *rpoA*_2 (BC), et *cpa*_4 (CP). L'efficacité du système de détection *nuc* (SA) n'a pas été vérifié, ayant été précédemment estimé par l'unité SBCL.

A l'heure actuelle des essais préliminaires ont été entrepris sur matrices alimentaires naturellement contaminées, en simplex et en multiplex. Les séquences d'amorces et de sondes

utilisées sont bien fonctionnels, cependant, des ajustements sont encore à effectuer pour optimiser les résultats, comme tester d'autres combinaisons de concentration des réactifs dans le mix réactionnel par exemple, pour homogénéiser les niveaux de fluorescence. Concernant la superposition des courbes de fluorescence observée lors de la détection simultanée de l'IPC en présence d'une souche de *Bacillus cereus* nous pourrions envisager de faire une compensation de couleur qui permettrait de limiter voire d'éliminer la détection sur la plage de chevauchement des absorbances.

Une limite de détection a pu être estimée dans un premier temps lors des essais d'efficacité sur souches pures, qui était de l'ordre de 10 équivalents génomes. Dans un second temps sur matrice alimentaire, par la détection en simplex, celle-ci était approximativement de 100 ufc/g. Dans l'état actuel de développement de la méthode, ces deux paramètres sont donnés sans signification statistique. Un nombre plus important d'échantillons, naturellement et artificiellement contaminés, sera analysé. Le paramètre important de l'homogénéité de la prise d'essai et des conditions d'homogénéisation lors de l'analyse sera plus finement prise en compte et les essais seront répétés afin de pouvoir mieux évaluer la sensibilité de la méthode. La méthode d'extraction sera également optimisée pour tenter d'obtenir de meilleurs rendements permettant ainsi d'augmenter la sensibilité de la méthode complète.

Pour le développement de cette méthode, le LCSV mettant en œuvre les analyses demandées par les DDPP d'Ile de France, un focus a été fait dans cette étude, sur les trois pathogènes majoritairement isolés, depuis 2012, dans les échantillons alimentaires analysés lors d'investigations de TIAC (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, et *Bacillus cereus* présumés). Cependant d'autres pathogènes bactériens (*Salmonella*, *Listeria*, et *Campylobacter*) peuvent également être à l'origine de ces TIA(C), bien que plus rarement retrouvés dans les échantillons que nous analysons. Il sera donc intéressant, une fois cette méthode mise en place et validée, d'étendre la détection à ces autres pathogènes bactériens et, pourquoi pas, à d'autres micro-organismes pouvant être responsables de TIA(C) comme les norovirus, ou les parasites.

BIBLIOGRAPHIE

- Albini, S., Brodard, I., Jaussi, A., Wollschlaeger, N., Frey, J., Miserez, R., & Abril, C. (2008). Real-time multiplex PCR assays for reliable detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in animal isolates. *Veterinary Microbiology*, 127(1-2), 179-185.
- ANSES. (2010). Fiche de description de danger microbien transmissible par les aliments, *Clostridium perfringens*.
- ANSES. (2011). Fiche de description de danger microbien transmissible par les aliments, *Bacillus cereus*. Buisson, Y., & Teyssou, R. (2002). Les toxi-infections alimentaires collectives. *Revue Française des Laboratoires*, 2002(348), 61-66.
- Cadot, C., Tran, S.-L., Vignaud, M.-L., De Buyser, M.-L., Kolstø, A.-B., Brisabois, A., ... Ramarao, N. (2010). InhA1, NprA, and HlyII as candidates for markers to differentiate pathogenic from nonpathogenic *Bacillus cereus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1358-1365.
- Chen, J., Tang, J., Liu, J., Cai, Z., & Bai, X. (2012). Development and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of five foodborne pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 112(4), 823-830.
- Chon, J.-W., Park, J.-S., Hyeon, J.-Y., Park, C., Song, K.-Y., Hong, K.-W., ... Seo, K.-H. (2012). Development of real-time PCR for the detection of *Clostridium perfringens* in meats and vegetables. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(4), 530-534.
- EFSA Journal. (2005). Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs. *EFSA Journal*, 3(4), 175.
- EFSA Journal. (2017, décembre 12). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. Consulté 27 septembre 2018, à l'adresse
- Elizaquível, P., & Aznar, R. (2008). A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables. *Food Microbiology*, 25(5), 705-713.
- Fukushima, H., Kawase, J., Etoh, Y., Sugama, K., Yashiro, S., Iida, N., & Yamaguchi, K. (2010). Simultaneous Screening of 24 Target Genes of Foodborne Pathogens in 35 Foodborne Outbreaks Using Multiplex Real-Time SYBR Green PCR Analysis. *International Journal of Microbiology*, 2010.
- Garrido, A., Chapela, M.-J., Román, B., Fajardo, P., Lago, J., Vieites, J. M., & Cabado, A. G. (2013). A new multiplex real-time PCR developed method for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* detection in food and environmental samples. *Food Control*, 30(1), 76-85.
- Goh, S. H., Byrne, S. K., Zhang, J. L., & Chow, A. W. (1992). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(7), 1642-1645.
- Graber, H. U., Casey, M. G., Naskova, J., Steiner, A., & Schaeren, W. (2007). Development of a highly sensitive and specific assay to detect *Staphylococcus aureus* in bovine mastitic milk. *Journal of Dairy Science*, 90(10), 4661-4669.
- Guinebretière, M.-H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, M.-L., ... Sorokin, A. (2013). *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 1), 31-40.

- Guinebretière, M.-H., Broussolle, V., & Nguyen-The, C. (2002). Enterotoxigenic Profiles of Food-Poisoning and Food-Borne *Bacillus cereus* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 3053-3056.
- Gurjar, A. A., Hegde, N. V., Love, B. C., & Jayarao, B. M. (2008). Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxotyping of *Clostridium perfringens* toxin producing strains in feces of dairy cattle. *Molecular and Cellular Probes*, 22(2), 90-95.
- Huang, Q., Zheng, L., Zhu, Y., Zhang, J., Wen, H., Huang, J., ... Li, Q. (2011). Multicolor combinatorial probe coding for real-time PCR. *PloS one*, 6(1), e16033.
- Kaida, S., Miyata, T., Yoshizawa, Y., Kawabata, S., Morita, T., Igarashi, H., & Iwanaga, S. (1987). Nucleotide sequence of the staphylocoagulase gene: its unique COOH-terminal 8 tandem repeats. *Journal of Biochemistry*, 102(5), 1177-1186.
- Kim, H.-J., Lee, H.-J., Lee, K.-H., & Cho, J.-C. (2012). Simultaneous detection of Pathogenic *Vibrio* species using multiplex real-time PCR. *Food Control*, 23(2), 491-498.
- Kim, J.-H., Rhim, S.-R., Kim, K.-T., Paik, H.-D., & Lee, J.-Y. (2014). Simultaneous Detection of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* in Low-fatted Milk by Multiplex PCR. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 34(5), 717-723.
- Lee, N., Sun, J. M., Kwon, K. Y., Kim, H. J., Koo, M., & Chun, H. S. (2012). Genetic diversity, antimicrobial resistance, and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* strains isolated from Sunsik. *Journal of Food Protection*, 75(2), 225-230.
- Lindbäck, T., Fagerlund, A., Rødland, M. S., & Granum, P. E. (2004). Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 12), 3959-3967.
- Ma, K., Deng, Y., Bai, Y., Xu, D., Chen, E., Wu, H., ... Gao, L. (2014). Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in fresh pork using a multiplex real-time PCR assay based on immunomagnetic separation. *Food Control*, 42, 87-93.
- Morandi, S., Cremonesi, P., Silveti, T., Castiglioni, B., & Brasca, M. (2015). Development of a triplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium sporogenes* and *Clostridium tyrobutyricum* in milk. *Anaerobe*, 34, 44-49.
- Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggio, A., ... Celano, G. V. (2005). Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 98(1), 73-79.
- O'Regan, E., McCabe, E., Burgess, C., McGuinness, S., Barry, T., Duffy, G., ... Fanning, S. (2008). Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. *BMC Microbiology*, 8, 156.
- Petit et al. (1999). *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. - PubMed - NCBI. Consulté 26 septembre 2018, à l'adresse
- Poitras, E. (2012). PCR temps réel : principes et applications. 2012.
- Règlement (CE) n° 178/2002. Règlement (CE) n° 178/2002 du Parlement européen et du Conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires, Pub. L. No. 32002R0178, 031 OJ L (2002).

- Règlement (CE) n°183/2005. (2005). Règlement (CE) N° 183/2005 du parlement Européen et du conseil du 12 janvier 2005 établissant des exigences en matière d'hygiène des aliments pour animaux.
- Règlement (CE) n° 852/2004. Règlement (CE) n° 852/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires, Pub. L. No. 32004R0852, 139 OJ L (2004).
- Règlement (CE) n° 853/2004. Règlement (CE) n° 853/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale, Pub. L. No. 32004R0853, 139 OJ L (2004).
- Règlement (CE) n° 854/2004. Règlement (CE) n° 854/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine, Pub. L. No. 32004R0854, 139 OJ L (2004).
- Règlement (CE) n° 882/2004. Règlement (CE) n° 882/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif aux contrôles officiels effectués pour s'assurer de la conformité avec la législation sur les aliments pour animaux et les denrées alimentaires et avec les dispositions relatives à la santé animale et au bien-être des animaux, Pub. L. No. 32004R0882, 165 OJ L (2004).
- Règlement (CE) n°2073/2005. Règlement (CE) n°2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE), Pub. L. No. 32005R2073, 338 OJ L (2005).
- SCVPH plenary meeting. (2003). Former Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health - Food Safety - European Commission.
- SPF, données épidémiologiques. (2016). Données épidémiologiques / Toxi-infections alimentaires collectives / Maladies à déclaration obligatoire / Maladies infectieuses / Dossiers thématiques / Accueil.
- Stepán, J., Pantůcek, R., & Doskar, J. (2004). Molecular diagnostics of clinically important staphylococci. *Folia Microbiologica*, 49(4), 353-386.
- Watanabe, S., Ito, T., Takeuchi, F., Endo, M., Okuno, E., & Hiramatsu, K. (2005). Structural Comparison of Ten Serotypes of Staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 187(11), 3698-3707.
- Wolffs, P. F. G., Glencross, K., Norling, B., & Griffiths, M. W. (2007). Simultaneous quantification of pathogenic *Campylobacter* and *Salmonella* in chicken rinse fluid by a flotation and real-time multiplex PCR procedure. *International Journal of Food Microbiology*, 117(1), 50-54.

Annexe 1

LSA-INS- 0366



MODE OPERATOIRE

ORIGINAL S I G N E

**Extraction d'ADN de *Listeria monocytogenes* à l'aide du MagNA Pure LC DNA
Isolation Kit III (Roche réf : 03 264 785 001).**

Rédacteur(s) :

Olivier Firmesse, Françoise Dilasser, Sylviane Derzelle

Approbateur :

Olivier Firmesse

**Seule la version informatique
fait foi**

Le kit MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III est localisé pièce 119 placard P1 et P2 – idem pour les plastiques nécessaires à l'analyse.

1. Précautions :

Particules MGP : La suspension de particules magnétiques (bouchon brun) doit être vortexée. Mélanger immédiatement avant usage afin d'avoir une suspension homogène.

Protéinase K : Reconstituer chaque flacon (bouchon rose) en ajoutant 1,2 ml de tampon d'élution (bouchon jaune) – bien mélanger. 1 flacon est nécessaire pour 32 extractions. Une fois reconstitué le produit est stable pendant 1 mois de 2 à 8°C ou 1 an entre -15 et -25°C.

Ne pas utiliser un tampon qui contient un précipité. Si un précipité est visible, placer le flacon à 37°C et mélanger de temps en temps jusqu'à dissolution complète du précipité.

2. Préparation des échantillons : (pour l'extraction simultanée de 32 échantillons maximum)

- **Allumer 2 bains secs :** l'un à 65°C et l'autre à 95°C (15 à 30 min avant utilisation)
- **Allumer l'appareil MagNA Pure** (chauffage des blocs) **et le système informatique**
- Mettre 1 ml d'une culture bactérienne dans un tube eppendorf de 1,7 ml.
- Centrifuger les cultures à 15000 g pendant 3 min à température ambiante. Eliminer le surnageant et conserver le culot.
- Resuspendre le culot bactérien dans 200 µl de tampon phosphate salin (PBS).
- Ajouter dans chaque tube, 180 µl de tampon de lyse (bouteille 7 incolore) au 200 µl d'échantillon. Bien homogénéiser en vortexant 5 sec.
- Ajouter 20 µl de protéinase K (bouteille rose **reconstituée**, SRPI FC20 pièce 118 F20) au mélange et mélanger délicatement par pipetage.
- Incuber pendant 10 min à 65°C (1er bain sec). Mettre des cavaliers pour éviter que les tubes ne s'ouvrent.
- Incuber ensuite les échantillons à 95°C pendant 10 min.
- Centrifuger brièvement les tubes (centrifugeuse de paillasse) afin de collecter la totalité de l'échantillon au fond du tube.
- Pipeter la totalité des échantillons (400 µl) et les mettre dans des tubes de 2 ml contenant 250 µl de billes de verre (200 µm de diamètre, Sigma).

- Homogénéiser les échantillons à l'aide du **MagNA Lyser** (vitesse : 6000 ; temps : 30 sec).
- Prélever 200 µl de chaque échantillon et procéder au transfert dans la cartouche **MagNA Pure LC Sample cartridge** (support plastique contenant 4x8 puits).

La purification de l'ADN est réalisée par l'automate. Consulter son Mode opératoire.

☛ **Ne pas oublier que seulement la moitié de l'échantillon est purifiée.**

3. Chargement du robot extracteur :

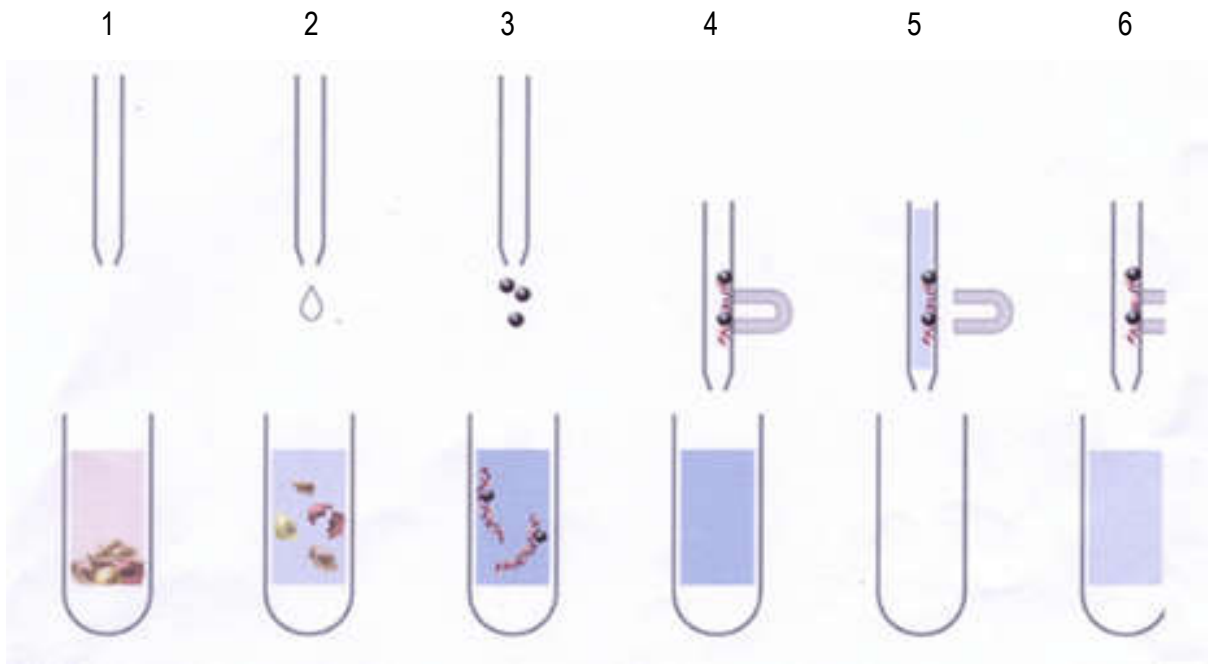
- Positionner un récupérateur de gouttes (**Tub lid seal**) sur le bras du robot. Cliquer sur **Change dropcatcher** pour déplacer le bras vers l'avant. Placer le récupérateur de gouttes avec des pinces, puis cliquer sur **Home** pour repositionner le bras de l'automate.
- Lancer le logiciel qui gère l'appareillage. Sélectionner le protocole **DNA III Bacteria**. Suivre les instructions du logiciel et renseigner le nombre d'échantillons à traiter (entrer la nature et le nom des échantillons). Préciser le volume de l'échantillon (**200 µl**) et le volume d'élution (**100 µl**). Appuyer ensuite sur **OK**. L'écran d'information « **Start information Screen** » apparaît. Le logiciel a calculé les quantités de réactifs nécessaires.
- Positionner les consommables plastiques dans l'appareil (se référer à l'écran d'information pour leur place et leur nombre).
- Sortir le rack des **bacs à réactifs** et le remplir avec 6 bacs (**Reagent tub**) (2 large et 4 moyen). Remplir tous les bacs avec la quantité de réactif demandée (le volume à pipetter dans chaque récipient est indiqué sur l'écran d'information). Un guide avec des bordures colorées est placé sur le rack pour aider au bon chargement des réactifs (correspondance de couleur), puis fermer avec le couvercle correspondant (**Tub Lid**).

☛ **Remplir le bac contenant les billes magnétiques MGPs au dernier moment : après avoir chargé les échantillons et juste avant de lancer l'extraction !!!**

- Transférer les bacs à réactifs et la cartouche contenant les échantillons dans le robot.
- Sur l'écran, confirmer le positionnement correct des consommables et réactifs en cliquant sur le schéma des récipients respectifs. Cliquer sur « **OK** » pour démarrer l'automate. Vous ne pourrez démarrer l'appareil que si la station de travail est fermée.
- En fin d'extraction, récupérer la cartouche contenant les ADN purifiés et jeter les consommables plastiques (seules les pointes excédentaires sont conservées).
- Fermer la cartouche contenant les ADN purifiés avec un adhésif (**Cartridge seal**) ou (et cela est préférable) transférer chaque échantillon d'ADN purifié dans un tube eppendorf à faible rétention identifié. Conserver l'ADN à -20°C (congélateur C24, pièce 125-3).
- Retirer le récupérateur de gouttes (**Tub lid seal**). Cliquer sur **Change dropcatcher** pour déplacer le bras vers l'avant. Faire glisser le plastique avec des pinces, puis cliquer sur **Home** pour repositionner le bras de l'automate.
- Lancer la **décontamination de l'appareil**. Cliquer sur décontamination. Edition : **Start**.

4. Principe du test :

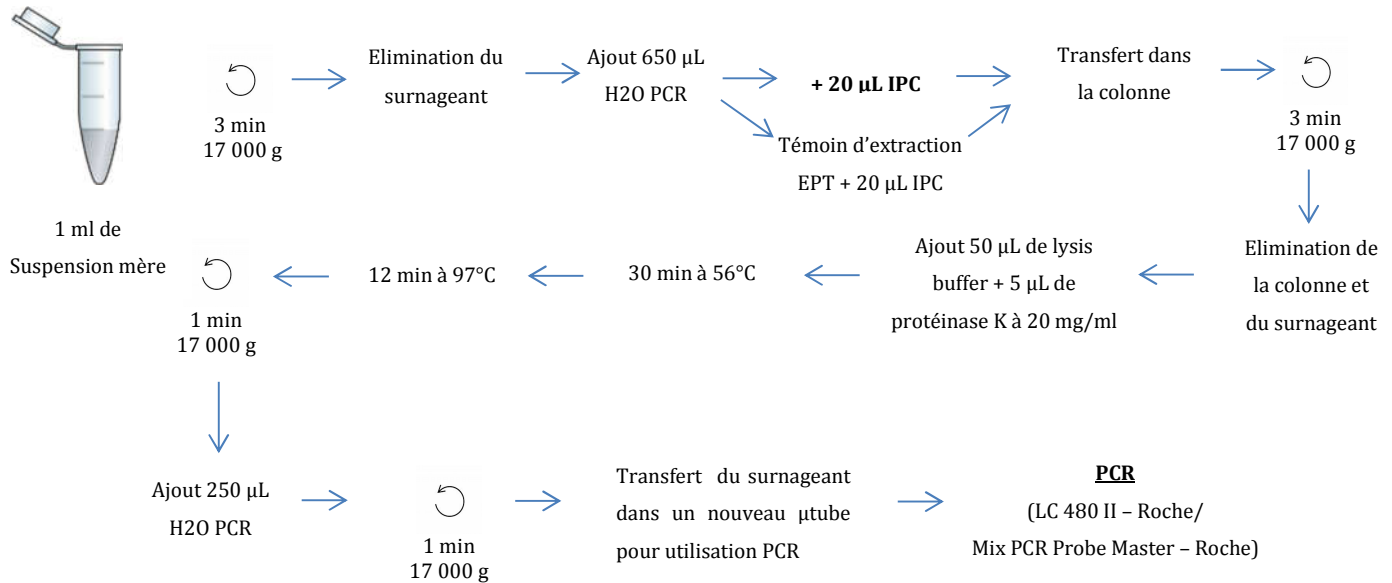
La procédure d'isolement est basée sur une technologie de billes magnétiques. Les échantillons sont lysés par incubation dans un tampon contenant des sels chaotropiques et de la protéinase K. Des particules en verre magnétisées sont ajoutées et l'ADN se fixe à leur surface. Les substances non fixées sont enlevées par l'intermédiaire de plusieurs lavages, puis l'ADN est élué. Les étapes du principe de l'isolement de l'ADN sont les suivantes.



1. L'échantillon est placé dans les puits de la cartouche (Sample Cartridge).
2. Le tampon de lyse et de fixation est ajouté à l'échantillon, favorisant la lyse cellulaire complète et le re-largage des acides nucléiques. Les nucléases sont dénaturées. La protéinase K dénature les protéines.
3. L'ADN se fixe à la surface de silice des billes grâce aux conditions chaotropiques, à l'isopropanol et à la haute stringence ionique du tampon de Tp de lyse et d'accrochage (bouteille 4, vert).
4. Les billes sur lesquelles l'ADN s'est fixé sont magnétiquement séparées du reste de l'échantillon lysé (bouteille 5 brun)
5. Les billes sont lavées plusieurs fois avec du tampon de lavage (bouteilles 1,2 et 3; noire, bleu et rouge) pour éliminer les protéines (nucléases), membranes, inhibiteurs de la PCR, et pour réduire enfin la concentration en sel.
6. Les billes sont magnétiquement séparées du tampon de lavage contenant les débris résiduels.
7. L'ADN purifié est élué (bouteille 6, jaune) des billes magnétiques à 70°C et transféré dans la cartouche d'élution tandis que les billes sont retenues dans le cône de réaction, puis jetées.

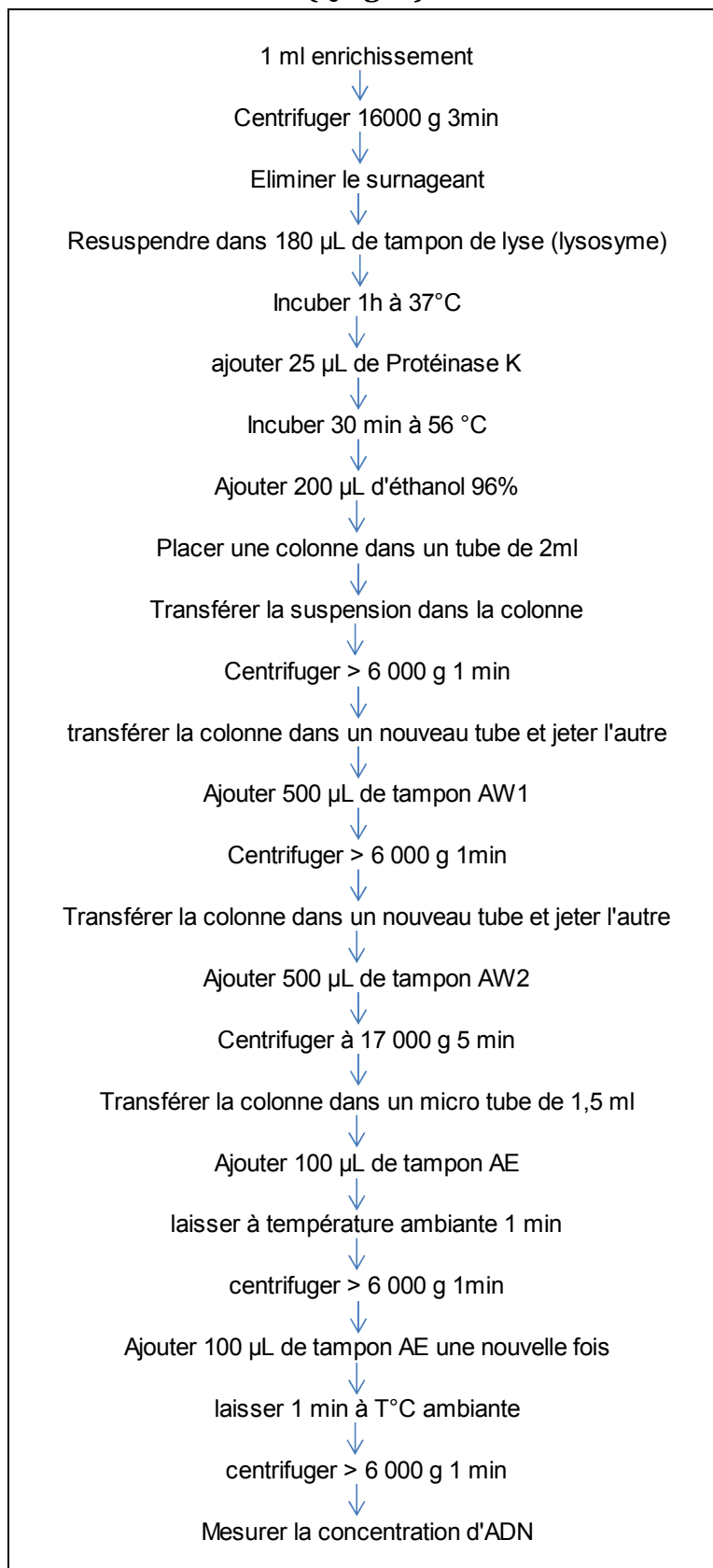
Annexe 2

Mode opératoire pour l'extraction à partir du kit PrepSeq™ rapid spin sample Applied (réf 4407760)



Annexe 3

Mode opératoire pour l'extraction à partir du kit DNeasy® Blood and Tissue kit (Qiagen)



Annexe 4

Mode opératoire modifié pour l'extraction à partir du kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (ref CAT A1120) de PROMEGA

Pellet Cells

Centrifuge **2 ml** of overnight culture for 2 minutes at **16,000 × g** and check OD at 600 nm (around 2.4+/-0.3)

Discard the supernatant.

Suspend cells in 480µl 50mM EDTA.

Add lytic enzyme(s) (120µl) [(60ul of Lysozyme at 10 mg/ml + 60ul of Lysostaphin at 10 mg/ml)]

Incubate at 37°C for **60 minutes**.

Centrifuge for 2 minutes at **16,000 × g** and remove supernatant.

Add 600µl Nuclei Lysis Solution. Pipet gently to mix.

Incubate for **10 minutes** at 80°C, then cool to room temperature.

Add 3µl of RNase Solution. Mix, incubate at 37°C for **60 minutes**, then cool to room temperature.

Add 200µl of Protein Precipitation Solution. Vortex.

Incubate on ice for **15 minutes**.

Centrifuge at **16,000 × g** for 3 minutes.

Transfer the supernatant (**around 600+/-50ul**) to a clean tube containing 600µl of room temperature isopropanol. **Gently mix**.

Centrifuge as in "Pellet Cells" above, and decant the supernatant.

Add 600µl of room temperature 70% ethanol. **Take down the pellet with the tip and gently Mix**.

Centrifuge for 2 minutes at **16,000 × g**.

Aspirate the ethanol and air-dry the pellet **overnight**.

Rehydrate the DNA pellet in 100µl of **water or Tris 10 mM** overnight at 4°C.

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Développement d'un outil de PCR multiplex en temps réel pour la recherche de pathogènes alimentaires bactériens lors d'investigations de foyers de Toxi-Infection Alimentaire (Collective) (TIA(C)).

MALET Audrey

Le 10/12/2018

RESUME

Les Toxi-infections Alimentaires (Collectives) TIA(C) sont des maladies à déclaration obligatoire. Elles surviennent essentiellement lorsque les mesures d'hygiène ou de températures ne sont pas suffisamment maîtrisées, entraînant la contamination des denrées alimentaires par de multiples micro-organismes pathogènes, et notamment les bactéries. Leur signalement déclenche la réalisation d'une enquête épidémiologique destinée à identifier les aliments responsables, les facteurs favorisant leur contamination, et de prendre des mesures rapides afin d'éviter la survenue de nouveaux cas de contamination. Au cours de cette enquête, des échantillons (plats témoins, restes...) sont acheminés vers les laboratoires d'analyse pour effectuer la recherche et/ou le dénombrement des pathogènes alimentaires, et en particulier les bactéries dans le cadre des activités du laboratoire central des services vétérinaires (LCSV). De nombreuses méthodes d'analyses normalisées, et/ou alternatives validées existent à ce jour en bactériologie conventionnelle mais aussi en biologie moléculaire, permettant de mettre en évidence la présence de pathogènes alimentaires bactériens. Les délais d'analyse en bactériologie conventionnelle peuvent être parfois longs et coûteux et ne ciblent qu'un micro-organisme à la fois. Les techniques de biologie moléculaires aboutissent à un résultat plus rapide mais ne ciblent qu'un, voire deux pathogènes également. Dans ce contexte, nous avons tenté dans cette étude, de développer un outil de PCR en temps réel, permettant de détecter simultanément les trois pathogènes principaux isolés lors d'investigation de TIAC en Ile de France. Nous avons déterminé une cible génétique spécifique pour chaque bactérie ou groupe de bactéries à détecter. Des couples d'amorces et sondes ont été dessinés ou sélectionnés à partir de la littérature puis testés sur souches pures. Ceux-ci sont satisfaisant en terme de spécificité et efficacité en simplex et les premiers essais de multiplexage sur souches pures sont encourageant, ayant mis en évidence une bonne détection de chaque cible. Sur matrice alimentaire, les essais en simplex, comme les essais en multiplex, donnent des résultats cohérents quant aux niveaux de contamination et à la limite de détection estimée. Cependant, la méthode n'est pas totalement développée à l'heure d'aujourd'hui. Des ajustements sont à réaliser pour optimiser l'étape d'extraction dans un premier temps, puis la PCR. Des essais complémentaires seront ensuite nécessaires pour la validation complète de la méthode.

Mots clés : PCR temps réel ; Multiplex ; Détection ; Pathogènes, Bactéries, TIAC, Aliments.