

576 - 01/01



0569

THESE

A L'UNIVERSITE DE CLERMONT II

(U.E.R. de Recherche Scientifique et Technique)

POUR OBTENIR

LE DOCTORAT DE 3^e CYCLE

Spécialité Sciences Alimentaires (MICROBIOLOGIE)

PAR

D 46

Khaled HARHOURA

Dr Vétérinaire

*Contribution à la mise au point d'une
technique rapide de dénombrement des
Pseudomonas des viandes*

Soutenue le 15 Février 1985 devant la Commission d'Examen :

MM. J.P. LARPENT

Président

Y. BRIAND

A. BRETON

J. LABADIE

Examineurs

~~1325~~ 1325

1325

Echange

THESE

Inscrite le	1144
Date le	2007
Cote	11

0569

A L'UNIVERSITE DE CLERMONT II

(U.E.R. de Recherche Scientifique et Technique)

POUR OBTENIR

LE DOCTORAT DE 3^e CYCLE

Spécialité Sciences Alimentaires (MICROBIOLOGIE)



PAR

Khaled HARHOURA

Dr Vétérinaire

*Contribution à la mise au point d'une
technique rapide de dénombrement des
Pseudomonas des viandes*

Viande : pseudomonas : dénombrement rapide

Soutenu le 15 Février 1985 devant la Commission d'Examen :

MM. J.P. LARPENT

Président

Y. BRIAND

A. BRETON

J. LABADIE

Examineurs

DON
MES

A LA MEMOIRE DE MA MERE

A TOUS LES MIENS

Ce travail a été réalisé à la Station de Recherche sur la viande du Centre de Recherche Zootechnique et Vétérinaire de l' I.N.R.A. de THEIX.

Je tiens à remercier :

Monsieur R. BOCCARD, Directeur de recherche, pour m'avoir accueilli dans sa station.

Monsieur J. LABADIE, chargé de recherche, qui m'a intégré dans son équipe, proposé ce sujet de recherche et m'a aidé à sa réalisation.

Monsieur J.P. LARPENT, professeur au C.U.S.T. de Clermont-Ferrand, pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury de cette thèse.

Messieurs Y. BRIAND, professeur au C.U.S.T. de Clermont-Ferrand et A. BRETON, docteur es-sciences, maître-assistant à l'Université de CLERMONT II, pour avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse.

Enfin, au personnel de la Station de Recherche sur la viande, pour leur coopération et leur sympathie, j'exprime mes sincères remerciements.

	<u>Page</u>
V. PAROI DES BACTERIES A GRAM NEGATIF	22
1 - ULTRASTRUCTURE DE LA PAROI	23
1.1 Membrane cytoplasmique	23
1.2 Espace périplasmique	25
1.3 Membrane externe	26
2 - PROTEINES DE LA MEMBRANE EXTERNE	26
2.1 Protéines majeures	26
2.1.1 Protéines matrices	27
2.1.2 Protéine TolG.	28
2.1.3 Lipoprotéine	28
2.2 Protéines mineures	29
3 - LIPOPOLYSACCHARIDE	29
VI. PAROI DES PSEUDOMONAS	31
- <u>CONCLUSION ET POSITION DU PROBLEME</u>	33
- <u>MATERIEL ET METHODES</u>	35
=====	
I. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES BACTERIENNES	35
1 - ISOLEMENT	35
2 - IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE	35
II. ETUDE SEROLOGIQUE DES SOUCHES	36
1 - OBTENTION DES SERUMS	36
2 - DETERMINATION DU TAUX D'AGGLUTININES DES SERUMS	36

3 - ESSAI DE DETERMINATION, SUR PLAQUES DE MICROTITRATION, DES TITRES CONTRE LES CELLULES ENTIERES ET CONTRE LES FRACTIONS CELLULAIRES	37
4 - AGGLUTINATION SUR LAME	38
III. MEMBRANES CELLULAIRES	38
1 - SEPARATION DES MEMBRANES	38
1.1 Méthodes physiques	39
1.1.1 Fractionnement par billes de verre	39
1.1.2 Fractionnement à la French-press	39
1.2 Méthodes chimiques	39
1.2.1 Fractionnement à l'aide du Triton X-100	39
1.2.2 Fractionnement à l'aide du Tris-E.D.T.A.-lysozyme	40
2 - PURIFICATION DES MEMBRANES	41
3 - CARACTERISATION DES MEMBRANES	42
3.1 Par électrophorèse	42
3.2 En microscopie électronique	43
IV. OBTENTION DES SERUMS ACTIFS	43
V. ESSAI DE PURIFICATION DES PROTEINES MAJEURES DE LA MEMBRANE EXTERNE	43
1 - EXTRACTION DES PROTEINES	43
1.1 Technique "rapide" d'extraction de quelques protéines membranaires selon HANCOCK et CAREY (1979)	43
1.2 Extraction de protéines majeures à partir des enveloppes cellulaires selon MIZUMO et KAGEYAMA (1979)	44
1.3 Autre méthode de purification des protéines	45

	<u>Page</u>
2 - DOSAGE DES PROTEINES	45
2.1 Méthode du BIURET	45
2.2 Méthode de LOWRY (1951)	46
2.3 Méthode de BRADFORD (1976)	46
3 - ELECTROPHORESE	46
3.1 Coloration au bleu de COOMASSIE R250	48
3.2 Coloration au nitrate d'argent	48
VI. ESSAI D'IDENTIFICATION RAPIDE DES PSEUDOMONAS	49
1 - AGGLUTINATION SUR LAME	50
2 - AGGLUTINATION EN PLAQUES DE MICROTITRATION ..	50
VII. ESSAI DE DENOMBREMENT RAPIDE DES PSEUDOMONAS .	50
1 - MISE EN EVIDENCE DU CARACTERE ANTIGENIQUE DES PROTEINES DE LA MEMBRANE EXTERNE	50
2 - DENOMBREMENT A PARTIR DES SERUMS ANTI- MEMBRANE EXTERNE	51
2.1 Bactéries en culture pure	51
2.2 Contamination naturelle	52
- RESULTATS ET DISCUSSIONS	53
=====	
I. IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE DES SOUCHES UTILISEES	53

	<u>Page</u>
II. SERO - AGGLUTINATION	53
1 - ESSAI DE DETERMINATION DE L'ANTIGENE - O	53
2 - DETERMINATION DU TAUX EN AGGLUTININES DES SERUMS	54
3 - ESSAI DE DETERMINATION DU TITRES D'AGGLU- TINATION DES DIFFERENTS SERUMS CONTRE LES SOUCHES HOMOLOGUES ET HETEROLOGUES	55
4 - RECHERCHE DE COMMUNAUTE ANTIGENIQUE PARMI LES SOUCHES DE PSEUDOMONAS UTILISEES : AGGLUTINATIONS SUR LAME	55
4.1 Cellules entières	55
4.1.1 Cellules non chauffées	55
4.1.2 Cellules entières chauffées (1h à 100°C)	56
4.2 Agglutination des cellules non chauffées et chauffées	57
4.2.1. Par des sérums actifs contre les différentes préparations de paroi et de mucopeptide	57
4.2.2 Par des sérums actifs contre les préparations de Pr-L.P.S.	57
 III. PAROIS CELLULAIRES	 58
1 - OBTENTION DES ENVELOPPES CELLULAIRES	58
1.1 Fractionnement cellulaire à la French-press	58
1.2 Fractionnement cellulaire à l'aide de billes de verre..	58
2 - SEPARATION DES MEMBRANES CELLULE	59
2.1 A l'aide du Triton X-100	59
2.2 A l'aide de tampon Tris-E.D.T.A.-lysozyme	60
3 - PURIFICATION DES MEMBRANES (par le gradient discontinu de saccharose)	60

	<u>page</u>
3.1 A partir des enveloppes cellulaires	61
3.2 A partir des membranes externes brutes et des sphéroplastes	61
4 - CARACTERISATION DES MEMBRANES CELLULAIRES .	61
4.1 Par électrophorèse	62
4.2 En microscopie électronique	62
 IV. EXTRACTION DE PROTEINES MAJEURES : (Protéine "F") ..	 62
1 - A PARTIR DES CELLULES ENTIERES	62
2 - A PARTIR DES ENVELOPPES CELLULAIRES	63
3 - A PARTIR DE GEL D'ELECTROPHORESE	63
 V. IDENTIFICATION RAPIDE DES PSEUDOMONAS PAR UN SERUM ANTI-PROTEINE "F"	 64
1 - AGGLUTINATION SUR LAME	64
2 - IDENTIFICATION EN PLAQUE DE MICROTITRATION...	66
 VI. ESSAI DE DETECTION RAPIDE DES PSEUDOMONAS	 67
1 - MISE EN EVIDENCE DU CARACTERE ANTIGENIQUE DES PROTEINES DE LA MEMBRANE EXTERNE	67
2 - DENOMBREMENT DES BACTERIES A PARTIR DU SERUM ANTI-MEMBRANE EXTERNE	67
2.1 Bactéries en culture pure	67
2.2 Bactéries de contamination naturelle	68

- CONCLUSIONS 69

- ANNEXES 73

- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 83

ABREVIATIONS

=====

A.T.P.	: Adénosine triphosphate
B.S.A.	: Sérum albumine de bovin
Bisacrylamide	: N-N' - Méthylène bis-acrylamide
D.A.P. (méso)	: Acide diaminopimélique
D.C.I.P.	: Dichlorophénol indophénol
D Nase	: Désoxyribonucléase
D.O.	: Densité optique
D.P.T.S	: Désoxycholate-Peptide-Tryptone-Safranine
D.T.T.	: Dithiothreitol
E.D.T.A.	: Acide éthylène diamine tétraacétique
HCl	: Acide chlorhydrique
HEPES	: N-2-hydroxyéthylpirazine-N'- 2'-éthane sulfonic acid
K.D.O.	: Acide 2-kéto-3-désoxyoctonique
L.D.H.	: Lactate déhydrogénase
L.P.S.	: Lipopolysaccharide
MCE	: β - Mercaptoéthanol
mM	: millimole
O.P.D.	: Orthophénylène diamine
P.B.S.	: Phosphate Buffer Saline
P.G.	: Peptidoglycane
P.M.S.	: Phénazyne méthosulfate
Pr-L.P.S.	: complexe protéine - lipopolysaccharide
S.D.H.	: Succinate déhydrogénase
S.D.S.	: Dodécyl sulfate de sodium
T.C.A.	: Acide trichloracétique
TEMED	: N,N,N',N' - Tétraméthyl éthylène diamine
Tris	: Hydroxyméthyl - amino méthane

I N T R O D U C T I O N

* * * * *

Afin d'assurer aux consommateurs des garanties de salubrité et de qualité tant organoleptiques que nutritionnelles, de profondes modifications technologiques dans la filière viande ont été réalisées.

Cependant, de l'abattage et jusqu'à leur utilisation par les consommateurs ou par l'industrie de troisième transformation, les viandes subissent de nombreux traitements. Ces traitements agissent directement sur le développement de la flore microbienne.

Les grandes quantités de matières premières, la rapidité des diverses étapes de la filière et parfois leur automatisation rendent les contrôles difficiles (ROZIER, 1982). Ces contrôles sont indispensables pour préserver la santé du consommateur. Pour cela, la viande doit être exempte de tous contaminants pathogènes pour l'homme et ne doit héberger qu'un nombre limité de germes d'altération. Ces derniers sont toujours présents et souvent en forte concentration sur les carcasses (10^3 - 10^6 germes/cm² selon ROSSET et Al. 1978). Ces germes représentent 0,3 % de la charge observée sur la peau et les poils des bovins.

Aussi, de nombreux chercheurs s'efforcent-ils de mettre au point des méthodes d'identification et de dénombrement rapides permettant de juger le niveau de contamination initiale des matières premières et de corriger les erreurs éventuelles au cours de la fabrication.

De nombreuses méthodes directes et indirectes de dénombrement rapide des microorganismes sont décrites dans la littérature. Les premières comptent les microorganismes eux-mêmes et les deuxièmes évoluent un constituant chimique (enzyme, métabolite) ou des changements produits dans le milieu. Les inconvénients majeurs de la plupart de ces techniques tiennent à leur relatif manque de sensibilité, à leur coût ou à leur difficulté de mise en oeuvre.

Les méthodes immunoenzymatiques de détection et de quantification de nombreux antigènes dans des milieux variés, tendent à se généraliser en biologie. Les succès rencontrés par ces méthodes qui mettent en jeu la réaction anticorps-antigène, nous ont conduit à envisager leur emploi pour le dénombrement des bactéries dans les produits carnés, où leur utilisation est très limitée à l'heure actuelle.

Parmi les microorganismes contaminants les viandes, nous avons choisi les Pseudomonas, en raison de l'implication fréquente de ces bactéries dans de nombreux accidents de fabrication aussi bien des produits frais que des produits transformés. La classification sérologique des Pseudomonas isolés des viandes, n'est pas connue à l'heure actuelle.

Le travail présenté dans ce mémoire est une étude sérologique et partiellement taxonomique de ces microorganismes. Notre but est d'une part de réaliser une approche taxonomique permettant la sélection de plusieurs souches représentatives des Pseudomonas des viandes et d'autre part d'essayer de mettre en évidence un ou plusieurs antigène(s) commun(s) à ces microorganismes. Cet ou ces antigène(s) pourraient servir à la mise au point d'une technique rapide de dénombrement. Comme pour les Entérobactéries (E. coli ...) et divers Pseudomonas: Ps. anguilliseptica et Ps. aeruginosa (HANCOCK et AL. 1982), il est envisageable d'utiliser, chez les Pseudomonas des viandes, des protéines accessibles de l'extérieur de la bactérie qui seraient reliées sérologiquement.

Dans un premier temps, nous essayons d'apprécier l'hétérogénéité sérologique de nos souches à partir de la paroi, du complexe Pr-L.P.S. et du mucopeptide.

Dans un deuxième temps, nous essayons d'extraire les enveloppes cellulaires, de séparer les membranes, notamment la membrane externe et, de là, nous essayons d'obtenir quelques protéines "majeures" par différentes méthodes.

Dans un troisième temps, nous axons notre travail sur une protéine ; la protéine "F" qui semble être quantitativement la plus importante et systématiquement présente chez toutes les souches de Pseudomonas. A partir de sérum anti-"F", nous essayons d'identifier et de dénombrer les Pseudomonas en culture pure et les Pseudomonas de contamination naturelle.

Enfin, notre but ultime est de contribuer à la mise au point d'une technique qui permettrait d'apprécier rapidement la qualité bactériologique des carcasses, tant au niveau des abattoirs qu'au niveau des ports ou aéroports. Il serait ainsi possible de faire un tri des viandes arrivant dans notre pays de façon à n'admettre que celles présentant le plus de garanties sur le plan de la qualité bactériologique.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I . MICROBIOLOGIE DE LA VIANDE.

1. Relations viande - microorganismes

La viande, produit de transformation du muscle, est un aliment périssable et, du fait de sa composition chimique, un bon milieu de culture pour les microorganismes.

D'après la littérature, la viande fraîche a un effet inhibiteur ou même bactéricide et un effet protecteur vis-à-vis des agressions d'agents microbiens (GILL et PENNEY, 1979).

Cette situation divise les auteurs sur la présence ou l'absence de bactéries dans la viande d'animaux sains abattus dans de bonnes conditions. Selon ROSSET et Al. (1978) et BILLOM (1981), le muscle de l'animal vivant est stérile ou très rarement contaminé. S'il est exact qu'il a été isolé des bactéries saprophytes des ganglions lymphatiques ; Salmonelles dans la viande de boeuf, de cheval et de volaille (CATSARAS, 1973 ; ROZIER et JOUVE, 1979 ; PANTALEON et Al., 1976), rien ne prouve que ces bactéries proviennent des intestins ; d'autant que ces bactéries sont incapables de se multiplier dans le milieu intestinal.

Il est donc admis, par beaucoup de chercheurs, que la viande ne renferme pas ou très peu de bactéries ; à condition que l'éviscération suive de très près l'abattage et la saignée (BILLOM, 1981) très exactement ou tant que la paroi intestinale sert de barrière. BARNES (1979) a noté que les viandes de gibier non éviscéré et conservé à +15°C restaient indemnes de bactéries pendant plusieurs jours. De leur côté, GILL et Al. (1978) n'ont pas décelé de bactéries dans la viande de mouton provenant de carcasses non éviscérées et conservées à +20°C pendant 24 heures et surtout n'ont pas constaté de différences entre animaux normaux et animaux ayant subi un stress. On peut dire finalement que la stérilité des muscles se prolonge assez longtemps : 24 heures à 20°C chez le mouton (GILL et Al., 1976-1978) ou plusieurs jours chez le gibier à plumes (BARNES, 1979).

Le muscle "dépourvu de germes" se transforme en un aliment contaminé car il est nécessairement :

- Manipulé : contamination par l'homme et par le matériel de travail.
- Conservé : le facteur "temps" nécessaire à la maturation est favorable à la multiplication bactérienne et ceci d'autant plus que la température est plus élevée (ROSSET et Al., 1978).

2. Contaminations

L'importance des contaminations des carcasses, la nature et la répartition de la flore bactérienne sont à l'origine des contraintes sanitaires qui accompagnent tout procédé de conditionnement de la viande en vue de sa commercialisation.

En effet, c'est de la charge microbienne que vont dépendre les délais de conservation et la qualité bactériologique de la viande affectée à la commercialisation. Il a été constaté, depuis longtemps, (EMPEY et SCOTT, 1939) que les premières pollutions microbiennes surviennent à l'abattoir. La lutte contre ces contaminations suppose une bonne connaissance des sources de pollutions mais également des types de microorganismes polluants et des facteurs susceptibles de favoriser ou empêcher le développement microbien.

La contamination de la viande se produit à deux niveaux :

2.1. Contaminations profondes.

D'une importance relative (10^{-2} germe/gr) (ROSSET, 1978) due essentiellement à des germes anaéro-aérobies mésophiles tel Clostridium mais leur existence est controversée. Des bactéries ont été retrouvées en profondeur dans les tissus d'animaux apparemment en bonne santé, par certains auteurs, tandis que d'autres ont obtenu de grandes quantités de tissus stériles (BILLON, 1981).

Indépendamment de ce qui a été dit précédemment, les contaminations profondes sont le plus souvent le résultat de bactériémies sanguines post prandiales ou associées à des maladies d'origines diverses qui restent inexplicables (LABADIE et GUINET, 1981).

2.2. Contaminations de surface.

Elles sont dues aux contacts répétés entre la périphérie des surfaces musculaires et un environnement contaminé. Elles sont de ce fait les plus fréquentes et les plus importantes : 10^3 à 10^6 germes/cm² (ROSSET et Al., 1978).

Les bactéries responsables de contaminations de surface sont d'origine tellurique et d'origine animale ; ce sont surtout : Pseudomonas, Acinétobacter, Entérobactéries, Staphylocoques, Microbactérium thermosphactum et Lactobacilles.

Ces bactéries sont surtout apportées par les cuirs des animaux (NEWTON et Al., 1978). Cette source de contamination des carcasses est de loin la plus importante.

En effet, ces bactéries font partie de la microflore naturelle de la peau des animaux. De plus, l'eau, le sol et la végétation apportent toute sorte de microorganismes qui pourront contaminer la viande. Ainsi la charge microbienne des carcasses représente 0,3% de la charge observée sur la peau et les poils chez les bovins. Les études entreprises par FOURNAUD et Al. (1978) sur la contamination microbienne des carcasses en fin de chaîne d'abattage, montrent que le taux de pollution de certaines populations diffère en fonction de l'abattoir et de l'endroit considéré sur la carcasse. Les variations observées proviennent des niveaux de contaminations différents de l'air et du hall d'abattage.

Les autres opérations réalisées sur les carcasses (autre que l'arrachage des peaux et cuirs) et le matériel utilisé sont aussi des sources de contaminations très importantes. Ainsi, l'éviscération, opération délicate, est une source de pollution assez fréquente (LAHELLEC et Al., 1973).

En effet, le tube digestif est un réservoir énorme de microorganismes et toute perforation, du rumen ou de l'intestin par exemple, est suivie d'une augmentation de la charge microbienne sur la carcasse. La découpe est également une source de pollution. Le matériel utilisé pour cette opération (scies, couteaux...) est souvent souillé et de ce fait peut disséminer des microbes sur la carcasse. Parallèlement à la découpe, les récipients et appareils qui sont en contact avec les surfaces musculaires sont autant de sources possibles de contaminations.

Toutes ces contaminations paraissent particulières aux conditions d'abattage, mais la viande est susceptible de subir d'autres pollutions par tout ce qui entre en contact avec elle au cours de sa préparation ultérieure (conservation...) FOURNAUD et MORAND-FEHR (1965).

La prolifération des germes est conditionnée par les caractéristiques de la viande (structure, pH, rH, Aw) et par les paramètres de son environnement (composition de l'atmosphère et la température).

- **Structure** : les opérations de découpe, de hâchage et de broyage de la viande détruisent l'activité tissulaire caractéristique et favorisent donc l'introduction des contaminants de surface dans la profondeur de la viande.

- **pH** : Après la mort de l'animal, le pH du muscle qui était de 7,0 à 7,2, descend plus ou moins rapidement en rapport avec la diminution de la quantité de l'ATP, pour atteindre lors de la rigidité cadavérique 5,5 à 5,7. Ces valeurs, bien qu'elles ne constituent pas une barrière au développement bactérien, en freinent notamment leur multiplication. En plus, l'état physiologique des animaux et les traitements qu'ils subissent, peuvent faire varier considérablement ces valeurs. D'une manière générale, un pH élevé est favorable à la multiplication microbienne.

En effet, la plupart des espèces contaminantes se multiplient à pH proche de la neutralité pH 6,5 - 7,0. Ces valeurs sont celles des viandes dites "surmenées". Dans ces conditions, la multiplication microbienne n'est plus freinée et les viandes putrifient rapidement. Parmi les espèces dominantes dans ce cas, nous rencontrons notamment les Pseudomonas et les Acinetobacter.

Au contraire, un pH abaissé est un paramètre de bonne conservation. Ainsi, l'Acinetobacter a une vitesse de croissance réduite à pH inférieur à 5,7 (GILL et NEWTON, 1977) et à pH 5,4, on note un allongement de la phase de latence de Pseudomonas et une diminution du nombre de Staphylocoques, de Microcoques et de Lactobacilles (LABADIE et Al., 1975).

- **L'activité de l'eau** : La valeur de l'Aw d'un aliment définit la flore qui pourra se développer. Elle renseigne sur l'état d'hydratation de disponibilité de l'eau dans la viande. L'Aw équivaut au rapport de la pression de vapeur de l'eau de la viande sur la pression de vapeur de l'eau pure à la même température.

Ainsi la viande fraîche a une Aw de 0,99. Cette valeur est idéale pour la croissance des microorganismes notamment les Entérobactéries et les Pseudomonas (ROSSET, 1974).

Par contre, si l'Aw est descendue sous l'action de salage, séchage... à 0,94, la multiplication des aérobies putréfiants est stoppée.

L'Aw limite pour toute croissance bactérienne se situe à 0,86 et pour des valeurs inférieures à 0,86, seules les moisissures sont capables de se multiplier.

- **Potentiel d'oxydo-réduction** : Le rH mesure la quantité d'oxygène disponible dans le milieu (ROSSET et Al., 1978). Les potentiels d'oxydo-réduction exigés par les microorganismes varient. Ainsi les bactéries aérobies strictes (Pseudomonas) exigent un rH de l'ordre de +200 mV tandis que les bactéries anaérobies strictes (Clostridium) ne se multiplient qu'à un rH voisin de -200 mV. Or, quelques heures après l'abattage, le rH devient négatif ; ce qui devrait être favorable aux anaérobies putréfiants mais le pH (5,7) normalement observé s'oppose à leur multiplication (ROSSET et Al., 1978).

- **Température** : Tout abaissement de la température freine la croissance microbienne jusqu'à la stopper complètement vers -18°C (ROSSET et Al., 1978). Néanmoins, il est vain de vouloir utiliser le froid pour abaisser la contamination microbienne (1ère règle du "Trépied frigorifique" de MONVOISIN). L'application rapide des températures basses est cependant un facteur important dans le maintien d'une bonne qualité bactériologique de la viande ; faut-il encore que cette dernière soit très peu contaminée à l'origine.

En effet, si le froid limite la multiplication de certains microorganismes mésophiles tels Clostridium et les Entérobactéries, il est beaucoup moins efficace sur certaines bactéries putréfiantes : Pseudomonas et Acinétobacter. Ces microorganismes psychrotrophes, responsables d'altération superficielle, ont une température optimale de développement vers +20°C mais se multiplient encore à 0°C. Dans cette zone, une remontée de la température de 10°C multiplie leur croissance par 4 (FROUIN, 1975 ; ROSSET, 1976). Il en résulte qu'une conservation à 0°C sera quatre fois plus longue qu'à +10°C. D'autre part et pour une même température de stockage, la durée de conservation, en jours, de la viande est d'autant plus longue que l'humidité relative (H.R.) est plus basse et pour un même taux d'humidité, elle est d'autant plus prolongée que la température est plus basse (CATSARAS, 1973).

- **Constituants de l'atmosphère** : L'oxygène (O₂) et le gaz carbonique (CO₂) influencent considérablement la multiplication microbienne.

Ainsi, une atmosphère comportant moins de 1% d'oxygène et 20% de gaz carbonique inhibe les bactéries aérobies à gram négatif tandis que les Lactobacilles et les Entérobactéries se multiplient aisément dans de telles conditions.

Selon GILL et NEWTON (1978), une atmosphère comportant 80% d'oxygène et 20% de gaz carbonique serait le mélange le plus adapté pour la conservation de la viande. Mais à cette concentration de CO₂, le stockage ne serait que de courte durée. En effet, avec le temps, le CO₂ entraîne un brunissement de la viande, ce qui est néfaste sur l'aspect de la denrée. La suppression de l'oxygène dans les emballages de la viande (le vide) favorise le développement des bactéries lactiques au détriment des bactéries putréfiantes (ROSSET et Al., 1978).

Tous les facteurs physico-chimiques existants ou créés dans et sur les viandes, peuvent activer ou inhiber la croissance des microorganismes. Le plus souvent, ils interagissent les uns avec les autres et la croissance bactérienne n'est que le résultat de ces interactions.

II. LES PSEUDOMONAS DE LA VIANDE.

=====

Les conditions d'hygiène au cours des opérations d'abattage et notamment au stade de l'éviscération montrent l'importance des Pseudomonas. En effet, la flore microbienne rencontrée sur la peau des animaux immédiatement après l'abattage est constituée de nombreuses espèces (GUNDERSON et Al., 1954 ; LAHELLEC et Al., 1973 et 1975 ; CATSARAS, 1973 ; FOURNAUD et Al., 1978 ; ROSSET, 1978).

Ultérieurement, les opérations qui suivent l'abattage, et les conditions physico-chimique de la viande et de l'environnement provoquent une sélection parmi les germes susceptibles de se développer.

Ainsi en aérobiose à pH 5,4 à pH 7, et au cours de l'entreposage sous réfrigération, les Pseudomonas ont un avantage marqué en raison de leur taux de croissance plus élevé que tous les autres germes (GILL et NEWTON, 1977).

Quand les Pseudomonas atteignent leur densité cellulaire maximum, ils réduisent la vitesse de croissance des autres espèces présentes. Aussi constituent-ils 90-95% de la flore psychrotrophe au moment de l'apparition de l'odeur caractéristique de la putréfaction ; soit à 10^7 germes/cm² (LAHELLEC et Al., 1972).

Les Pseudomonas ne sont présents que très rarement et toujours en petit nombre sur les sujets vivants. Ils ne sont pas non plus très nombreux aux premiers postes de la chaîne d'abattage (LAHELLEC et Al., 1973).

Selon CATSARAS et BUTTIAUX (1965), il n'y aurait qu'1/3 d'animaux qui seraient porteurs de Pseudomonas avant l'éviscération et que ces germes seraient apportés par les eaux superficielles et non par les matières fécales.

Chez Les sujets vivants et aux premiers stades de préparation, LAHELLEC et Al., (1972) ont montré que la flore dominante, chez les volailles, était essentiellement constituée d'Acinetobacter et de Corynébactérium, alors qu'après éviscération et trempage dans la glace se sont les Pseudomonas qui dominent.

Si nous ajoutons à ce caractère inhibiteur une atmosphère environnante favorable telles : une humidité relative élevée, une aérobiose et surtout une température de stockage comprise entre 0°C et +6°C, nous comprenons que les Pseudomonas, de par leur caractère hydrophile, seront les plus dominants à la surface des carcasses.

Les Pseudomonas, principaux germes d'altérations des denrées alimentaires conservées en aérobiose et sous réfrigération, sont des bacilles à gram négatif, non sporulés, mobiles par ciliation polaire. Les Pseudomonas ont un métabolisme strictement respiratoire ; ils sont dépourvus de métabolisme fermentatif. Ils possèdent une oxydase et une catalase. A l'inverse de Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas mallei et Pseudomonas cépacia, germes pathogènes, les Pseudomonas des denrées alimentaires ne se développent pas à +41°C.

Ils sont psychotrophes c'est-à-dire par définition même et selon la définition donnée par CATSARAS et GREBOT (1969), ces microorganismes se multiplient activement aux températures de réfrigération couramment utilisées (0°C ; +6°C). Leur température optima de croissance étant généralement plus élevée (+10°C ; +20°C ou davantage parfois).

Toute augmentation de 10°C dans les limites de ces températures, multiplie leur croissance par 4. Le Q_{10} de ces microorganismes est voisin de 4 (FROUIN, 1975 ; ROSSET, 1976). Les conséquences sont une diminution similaire des durées de conservation ; ainsi à 0°C, la conservation de la viande de boeuf est 4 fois plus longue qu'à +10°C (ROSSET, 1976).

D'autre part, ces microorganismes sont moins sensibles aux variations du pH et il faut attendre des valeurs de pH inférieures à 5,4 pour avoir un effet inhibiteur sur ces bactéries correspondant à un allongement de leur phase de latence (LABADIE et Al., 1975).

Parmi les espèces de Pseudomonas qui interviennent dans les altérations des denrées alimentaires, nous trouvons principalement : Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida et Pseudomonas fragi, les caractères biochimiques de chacune de ces trois espèces sont donnés par STANIER et Al., (1966). De nombreux auteurs ont étudié les Pseudomonas isolés de viande de boeuf et de porc (STRINGER et Al., 1969), du lait (J. RICHARD, 1981), de saumure de jambon de PARIS (FOURNAUD et LAURET, 1972), mais les tentatives faites par ces auteurs pour rattacher les espèces isolées à une (des) espèce(s) pré-citées n'ont rencontré qu'un succès partiel.

FOURNAUD et LAURET (1972) ont mis en évidence le caractère fugace de la gélatinase des Pseudomonas isolés de saumure de viande. Ces auteurs n'ont pas pu distinguer les espèces Pseudomonas fluorescens et Pseudomonas putida sur ce caractère selon le modèle proposé par STANIER (1966).

Les espèces bactériennes que ces auteurs ont isolées, seraient une espèce unique à "variations phénotypiques continues" préconisées par RHODES.

J. RICHARD (1981) a isolé des Pseudomonas du lait cru conservé cinq jours à 4-5°C. Cet auteur a montré que la quasi-totalité de souches (78 sur 79) qu'il a isolées, possédaient la plupart des caractères des Pseudomonas du groupe fluorescent : la moitié de ces souches ressemblait à Pseudomonas putida mais possédait des caractères propres à Pseudomonas fluorescens. Les résultats obtenus ont conduit l'auteur à remettre en question les modèles utilisés jusqu'alors pour l'identification des souches de Pseudomonas du groupe fluorescent.

La synthèse d'un pigment fluorescent, caractère essentiel d'identification pour les Pseudomonas fait défaut chez un pourcentage parfois élevé des souches étudiées. Ainsi B.G. SHAW et LATTY (1982) en étudiant 161 souches de Pseudomonas isolés de viande de boeuf et de porc, 87%

de ces souches étaient non pigmentées et s'apparentaient, selon ces auteurs à l'espèce Pseudomonas fragi.

Le reste des souches étudiées étaient fluorescentes et ressemblaient à Pseudomonas fluorescens et Pseudomonas putida mais distinctes des espèces décrites dans la huitième édition du manuel de BERGEY. LAHEL-LEC et AL. (1972) avaient constaté que les souches de Pseudomonas isolées en fin de préparation de volailles sont plus fréquemment pigmentées que celles retrouvées après stockage au froid.

MÖLIN et TERNSTRÖM (1982) ont mené une étude taxonomique sur un grand nombre de Pseudomonas psychrotropes : 200 souches étaient isolées de diverses viandes, 18 étaient des souches de références. Ces auteurs ont procédé à 174 tests biochimiques et physiologiques.

Plusieurs espèces et biotypes ont été trouvés : 112 des souches étudiées étaient apparentées à Pseudomonas fragi ; espèce protéolytique et non pigmentée décrite dans le manuel de BERGEY et le reste des souches s'apparentaient aux biotypes I, II et III de Pseudomonas fluorescens, de Pseudomonas putida et à quelques autres espèces de Pseudomonas.

Les principaux caractères différenciant les espèces Pseudomonas fragi, Pseudomonas fluorescens et Pseudomonas putida sont rapportés dans le tableau ci-contre (tableau N° 1.).

III. INTERET DE MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE RAPIDE.

La filière viande a subi ces dernières années de profondes modifications : concentration des entreprises, industrialisation des opérations de préparation, de transformation, de transport, de stockage et de commercialisation.

L'objectif du contrôle microbiologique est principalement de garantir la sécurité du consommateur par le dénombrement des microorganismes contaminants ou la détection des toxines produites.

Par ailleurs, la fiabilité du contrôle microbiologique permet de conférer aux produits de bonnes qualités bactériologiques, une conservation de moyenne ou longue durée.

L'amélioration des techniques de détection et de dénombrements classiques a permis, sur le plan sanitaire, d'augmenter la liste des bactéries suspectes : aux Salmonelles, Eschérichia coli, Shigelles, Staphylocoques et Clostridies, sont venus s'ajouter : Bacillus céréus, certaines Streptocoques (HOBBS, 1977) et beaucoup plus récemment Yersinia et Compylobacter.

Du point de vue de la qualité microbienne, les exigences des industriels se sont accrues avec l'augmentation des distances séparant les zones de ventes et de productions et imposant, de ce fait un allongement des durées de conservation. Ainsi on se rend compte qu'il est de plus en plus difficile de séparer la qualité marchande et la salubrité dans la mesure où des nombres élevés d'organismes d'altération réputés non pathogènes (Pseudomonas, Streptocoques) peuvent être dangereux pour le consommateur et/ou de très petits nombres de bactéries pathogènes peuvent rendre un produit dangereux (Salmonelles) (BOURGEOIS, 1977).

La qualité bactériologique d'un produit dépend :

- De l'importance qualitative et quantitative des contaminations qu'il a subies au cours de son élaboration et jusqu'à sa consommation.
- Du devenir des microorganismes pendant cette même période.

Dans ces conditions, l'analyse microbiologique donne des informations sur :

- La qualité des matières premières tout au long de la chaîne.
- L'influence de la conservation, des manipulations et notamment des procédés appliqués pour freiner la multiplication microbienne.
- La qualité bactériologique du produit avant sa consommation.
- Suivant le cas, une identification des contaminants et une estimation de leur nombre par catégories. En effet, l'origine, le mode de dissémination, la thermorésistance, le taux de la croissance et sa température optimale, les facteurs d'inhibition, la production de toxines, sont autant de facteurs qui déterminent l'importance réelle de la présence et du nombre de microorganismes d'une espèce déterminée (HOBBS, 1977).

Les examens nécessaires pour certifier la qualité bactériologique d'un produit ont les inconvénients d'être d'application lente, de sécurité limitée et de coût élevé. La longueur du délai de réponse est déjà gênante dans le cas du contrôle réglementaire ; elle l'est beaucoup plus encore dans le cas de contrôle industriel. En effet, la technique classique nécessite des prélèvements, un transport et une conservation de l'échantillon, des opérations de broyage, des dilutions voir même des concentrations; toutes ces opérations ne sont pas toujours facilement réalisables et prennent un temps assez long pour leur réalisation (BOURGEOIS, 1977). De ce fait, les conséquences peuvent être graves, en particulier au niveau du produit fini ; on est souvent obligé, soit de stocker le produit en attendant la réponse des analyses, ce qui implique des parcs de stockage importants difficilement réalisables dans le cas de produits très périssables, soit de diffuser le produit sans bien connaître sa qualité bactériologique avec tous les risques que cela comporte.

Dans l'industrie alimentaire, il est et sera de plus en plus nécessaire de disposer, dans un délai très bref, d'informations relatives à l'état bactériologique du produit, particulièrement aux niveaux :

- Des matières premières de façon à assurer la distribution judicieuse entre les différentes fabrications.
- De la fabrication, de façon à prévenir un éventuel accident de fabrication.
- De la vente pour attester de la conformité du produit aux normes avant de la mettre en circulation (BOURGEOIS, 1977).

La seule appréciation de la flore totale peut fournir déjà une indication intéressante (MISKIMIN et Al., 1976). Toutefois, il est évident que cette indication reste insuffisante pour répondre aux besoins précédemment cités. Deux approches complémentaires ont été réalisées dans les laboratoires. D'une part, la mise au point des méthodes accélérées à partir des techniques classiques et d'autre part la mise au point de méthodes entièrement nouvelles visant non plus à dénombrer les microorganismes après une phase de croissance même minime mais à les détecter directement dans le produit même.

1. Accélération des techniques classiques.

Une détection rapide signifie que le délai de réponse est inférieur à celui de la technique classique. La réduction d'incubation offre le plus de possibilités puisqu'elle est à l'origine de la longueur du délai de réponse habituel (BOURGEOIS, 1977).

Dans ces techniques, la détection est effectuée au microscope, le plus souvent après une phase de multiplication brève. Dans ces conditions, la rapidité de la détection repose sur l'amélioration des milieux de culture et surtout sur la vitesse de croissance des microorganismes aux conditions choisies.

On peut améliorer la croissance des microorganismes par diminution du temps de latence ou par accélération du taux de croissance. Malheureusement, lorsque les échantillons à analyser offrent cette possibilité, aucune sélection n'est possible (BOURGEOIS, 1977).

BEDO et Al. (1970) proposent d'activer la croissance d'*Eschérichia coli* en ajoutant un "biostimulateur" extrait de thymus au milieu de culture lactosé.

La maximalisation du taux de croissance est l'autre moyen d'abrèger le temps nécessaire à la détection ; elle s'obtient par un choix judicieux de la température d'incubation et par une optimisation de la composition du milieu. Les températures élevées d'incubation raccourcissent le temps de détection, mais les résultats obtenus peuvent être différents de ceux obtenus dans les conditions naturelles (CATSARAS et DORSO, 1976).

2. Techniques rapides.

Le terme "technique rapide" s'applique aux tests donnant un résultat en un temps très court (inférieur à une heure).

Les techniques rapides se divisent en deux grands groupes : les méthodes indirectes et les méthodes directes (PITTEPHER, 1981).

Les méthodes indirectes évaluent un constituant chimique (enzyme, métabolite) ou des changements produits dans le milieu par les bactéries. C'est le cas des techniques sérologiques, des tests de réduction, de la mesure de l'impédance, du dosage de l'A.T.P., etc... les constituants chimiques ou les changements sont mesurés et convertis en nombre de bactéries par référence à une courbe étalon.

Les méthodes directes comptent les bactéries directement en se basant sur la multiplication rapide pour former des colonies visibles ; c'est le cas de l'examen microscopique et les méthodes utilisant une membrane filtrante (PITTEPHER, 1981).

2.1. Techniques sérologiques.

L'agglutination provient du fait que lorsqu'une suspension microbienne est mise en présence d'anticorps homologues, ceux-ci établissent des ponts entre les cellules pour constituer des agglomérats, en très longues chaînes, qui sont visibles à l'oeil nu.

L'immunofluorescence est un procédé plus fin qui consiste à fixer, sur les anticorps, un composé fluorescent (l'isothiocyanate de fluoresceine) et à mettre en présence ces anticorps rendus fluorescents avec un microorganisme ou un antigène qui, à l'examen microscopique, apparaît fluorescent. Ce procédé permet de localiser, dans de nombreux cas, le site d'action des anticorps.

Les procédés de mesure de variations du potentiel d'oxydo-réduction peuvent être considérés comme susceptibles de donner des indications fiables, rapides dans des conditions simples et économiques. Mais ils ne fournissent aucune indication sur la nature des microorganismes présents. Leur sensibilité bien que relativement bonne est souvent insuffisante et dépend très largement des capacités de réduction des différentes espèces de microorganismes présents.

2.3. Détection des microorganismes par la recherche de leurs enzymes et coenzymes.

- De nombreux enzymes peuvent, théoriquement, être utilisées pour détecter et dénombrer des microorganismes : la Phosphatase et l'Estérase sont certainement les plus connues en raison de leur présence systématique chez tous les microorganismes.

Bien qu'instantanée, la détection ne peut être effectuée que pour des contaminations assez lourdes, 10⁷ bactéries/gr ou ml.

. Le test à la Glutamate décarboxylase est beaucoup plus spécifique que les précédents. Il permet de quantifier une flore particulière et notamment Eschérichia coli. Sa sensibilité est bonne (5 x 10⁴ cellules/ml) et une automatisation de la technique lui garantit une excellente reproductibilité (MORAN et WITTER, 1976).

. Un autre test, celui de la DNase, est utilisé pour détecter Staphylococcus aureus dans les produits alimentaires (KAMMAN et TALINI, 1977).

- Recherche de coenzymes : la réduction bioluminescente du système ATP - luciférine - luciférase.

L'Adénosine - 5 - triphosphate (ATP) est un substrat énergétique indispensable à la vie des cellules des Eucaryotes et des Protistes.

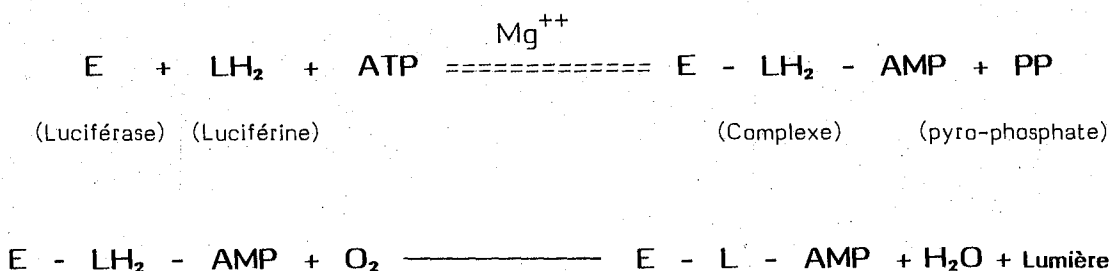


FIG. N°1 : Réaction bioluminescente du système ATP - Luciférine - Luciférase (par Mc LEROY, 1947).

Son importance dans le métabolisme a conduit de nombreux auteurs à penser qu'il est un excellent indice de la présence de cellules d'organismes vivants dans un milieu donné. L'A.T.P. est mise en évidence par une réaction bioluminescente qui utilise le système enzymatique

- Les méthodes mettant en évidence la production $^{14}\text{CO}_2$ ne sont pas sélectives. Ainsi, les réactions de dégradation de ^{14}C glucose avec production de $^{14}\text{CO}_2$ sont ubiquistes. Elles ne permettent qu'une estimation de la flore contaminante.

Pour rendre ces méthodes sélectives, il faut rendre la source elle-même sélective ; c'est le cas de la recherche des coliformes sur milieu ^{14}C lactosé (LEVIN et Al., 1956) ou bien que la sélectivité du milieu ne permette qu'aux microorganismes recherchés de métaboliser la source marquée ; c'est le cas du milieu sélectif de Clostridium de EVANCHO et Al. (1974) capable de mettre en évidence 10^4 bactéries en 4 heures.

- Les méthodes par absorption et adsorption, à l'inverse des précédentes, favorisent la concentration d'un substrat marqué sur ou dans les microorganismes.

Le phénomène de transport actif peut conduire à des concentrations intracellulaires de 1000 à 10.000 fois supérieures aux concentrations extracellulaires. Ainsi, BOURGEOIS, et Al. (1974) ont proposé l'absorption de la lysine radio-active pour le dénombrement de microorganismes hétérotrophes. Après collecte des microorganismes sur une membrane, la détection se fait au spectromètre à scintillation liquide.

Dans le cas de la flore mésophile complexe ces méthodes permettent une détection de 10^5 bactéries/gr.

Comme pour les méthodes au $^{14}\text{CO}_2$, ces méthodes ne sont pas sélectives et restent encore très limitées dans leurs applications. Par ailleurs, la manipulation de produits radioactifs restera probablement toujours délicate. Il est à prévoir que ces techniques ne sauraient être à terme que des méthodes de laboratoires hautement spécialisés.

2.6. Détections instrumentales des variations des propriétés physiques du milieu.

- La turbidimétrie

La turbidimétrie est une technique d'évaluation rapide de la concentration microbienne et non une technique de détection (BOURGEOIS, 1977). Cette technique utilise un photomètre pour mesurer la réduction de l'intensité lumineuse due à la présence des microorganismes dans ce milieu.

La concentration cellulaire est alors évaluée par comparaison à une courbe étalon. Ce procédé a permis à LEISTNER (1977) d'évaluer les flores totales de la viande mais avec une mauvaise précision.

- Comptage des particules

La technique consiste à mettre des microorganismes en suspension dans une solution électrolytique et à aspirer cette suspension à débit connu par un orifice dont le diamètre est de même ordre de grandeur que celui des microorganismes.

De part et d'autres de l'orifice sont disposées deux électrodes sous tension entre lesquelles un courant circule par l'intermédiaire de la solution conductrice.

Lorsque le courant de liquide entraîne une cellule dans l'orifice du tube, son passage se traduit par une augmentation transitoire de la résistance qui, si elle dépasse un certain seuil, engendre une impulsion électrique qui sera enregistrée (BOURGEOIS, 1977).

Il s'agit d'un procédé de dénombrement certes très rapide (quelques minutes) mais les limites de ces techniques se situent, là encore, au niveau du coût de l'appareillage et à la possibilité de ne dénombrer que les flores totales.

IV. CHOIX D'UNE TECHNIQUE.

=====

Il est souvent difficile, en bactériologie, de distinguer la détection de l'identification. En effet, dès qu'on recherche un groupe particulier de microorganismes dans un produit alimentaire, sa simple détection met en jeu une certaine dose d'identification.

La détection désigne toujours des analyses effectuées directement sur la flore complexe issue de l'échantillon à analyser alors que les tests d'identification ont pour objet la détermination précise du genre, de l'espèce, voir même du biotype des souches étudiées.

L'identification par les procédés classiques prolonge, généralement, l'analyse de plusieurs jours, bien qu'une certaine accélération soit possible. Actuellement, les recherches visent à mettre au point des techniques qui cumuleraient identification et détection.

Le choix d'une technique rapide dépend de diverses contraintes (tableau N°2). Ces contraintes diffèrent en ce qui concerne :

- Le seuil de détection et le temps minimum de détection qui varient souvent en sens inverse : ainsi pour un détecteur de sensibilité donnée, plus le seuil exigé est bas, plus le temps d'incubation est long.
- La détection des différentes espèces qui n'est pas forcément assurée même lorsqu'on prétend faire un dénombrement total. En effet, certaines espèces ont une croissance plus lente que d'autres.
- La discrimination des différentes espèces et leur identification.
- La sécurité de la détection du dénombrement et de l'identification. La sécurité offerte par une technique rapide se mesure par son coefficient de corrélation avec une technique de référence.

Le choix d'une technique rapide est fonction du type d'analyse considérée. Ainsi pour la recherche des microorganismes susceptibles d'altérer l'aliment au cours de sa fabrication et/ou nuire à sa conservation, il faut découvrir, au milieu d'une flore variée et parfois abondante, le ou les microorganisme(s) réellement responsable(s) de l'altération du produit. Dans ce cas, la recherche doit être sélective.

Parmi les techniques précédemment décrites, celles permettant de répondre à cette exigence sont peu nombreuses. Certaines ont été largement utilisées (PREVITE et Al., 1975).

Toutefois, en général leur application ne concerne qu'un domaine limité. Par ailleurs, elles sont coûteuses, chères ou dangereuses à mettre en oeuvre.

Actuellement, de nombreux laboratoires s'efforcent d'améliorer ces techniques et de mettre en oeuvre des techniques nouvelles de détection et de dénombrement. Ces techniques devraient être suffisamment rapides pour permettre d'intervenir au niveau des fabrications avant que le produit ne soit déjà commercialisé (GREBOT, 1983).

Par ailleurs, une technique rapide devrait être :

- Précise : Une technique donnant un résultat à 1% en quelques minutes est plus utile qu'une analyse qui fournit un résultat à 1%₀ en 24 heures.
- Sensible : Les techniques proposées ne sont sensibles qu'à des concentrations en microorganismes souvent supérieures à celles admises par les normes.
- Facile à mettre en oeuvre : Souvent les techniques décrites nécessitent un personnel qualifié et rodé et ne peuvent être réalisées que dans des laboratoires spécialisés.

A la lumière de ces différentes remarques, ce sont les techniques immunoenzymatiques qui nous paraissent à même de répondre à ces exigences et notamment les systèmes "ELISA" dont l'utilisation est devenue ubiquiste dans de nombreux domaines.

De nombreuses techniques utilisant les enzymes immobilisées (ELISA) sont de plus en plus utilisées. Les résultats obtenus, grâce à la grande sensibilité, fiabilité et surtout à la spécificité de ces techniques par de nombreux auteurs et dans de nombreux domaines, laissent à penser que ces techniques ont un avenir prometteur.

En effet, ces techniques permettent, non seulement de détecter mais aussi de quantifier de nombreux antigènes microbiens. Ainsi BLASER et DUNGAN (1984) ont quantifié, par cette technique, deux antigènes de poids moléculaires 30.000 et 60.000, responsables des infections dues à Campylobacter jejuni. POXTON (1979) a mis en évidence les différences sérologiques existant entre des biotypes, des espèces de Bactéroïdes sur la base des antigènes de surface. Ce même auteur en 1984 a mis en évidence l'existence d'antigène commun, de surface, à plusieurs Clostridium. Par la technique ELISA, COUSLAND et POXTON (1984) ont localisé les antigènes communs à plusieurs souches de Bactéroïdes fragilis, au niveau du lipopolysaccharide de la membrane externe de ces souches.

Dans l'industrie agro-alimentaire, ces techniques sont peu employées. GOLDSCHMIDT et FUNG (1979) ont pu quantifier par ces techniques, des toxines de Staphylococcus aureus et récemment ALEIXO et Al. (1984) ont mis au point un système E.L.I.S.A. permettant de détecter les Salmonelles dans les produits alimentaires en 27 Heures.

TECHNIQUES E.L.I.S.A.

Le principe de base fait appel à des notions d'immunologie, c'est-à-dire qu'il utilise la réaction antigène-anticorps avec le précipité que suppose cette réaction. Dans les méthodes ELISA existantes, la réalité de cette réaction est mise en évidence par le couplage à l'aide d'une enzyme (souvent la Péroxydase), de l'antigène ou de l'anticorps. La fixation de l'antigène marqué ou non ou de l'anticorps marqué ou non à un support solide permet de révéler cette réaction. En général, la fixation de l'antigène ou de l'anticorps à titrer s'effectue par interaction hydrophobe avec le support en Chlorure de polyvinyle ou polystyrène, etc...

A partir de ces données, de nombreuses méthodes ELISA ont été mises au point depuis le premier travail de ENGVALL et Al. (1971).

Quatre techniques principales sont fréquemment utilisées à l'heure actuelle (VOLLER et Al., 1979):

- Méthode compétitive pour l'antigène.
- Méthode double sandwich.
- Méthode double sandwich modifiée pour l'antigène.
- Méthode directe pour l'antigène.

Par comparaison avec les autres techniques décrites dans le chapitre précédent, les techniques ELISA ont un avantage pour leur :

- **Sensibilité :** Ces différentes techniques ELISA ont des sensibilités qui varient considérablement selon les antigènes ou les anticorps choisis. Toutefois, la majorité des auteurs s'accordent pour situer la limite de détection à 1 ng en quelques heures.
- **Fiabilité :** Compte tenu de la spécificité de la réaction antigène-anticorps, ces techniques sont très fiables.
- **Facilité d'emploi :** Les méthodes ELISA sont en général faciles à mettre en oeuvre et peu coûteuses.

Dans le travail présenté dans ce mémoire, deux méthodes ont été utilisées : une méthode compétitive pour l'antigène et une méthode directe pour l'antigène.

1. Ultrastructure de la paroi des bactéries à gram négatif.

De très nombreuses informations sur la structure et la fonction des enveloppes cellulaires et notamment sur la membrane externe sont rapportées dans les synthèses bibliographiques de COSTERTON et Al. (1974) et de DIRIENZO et Al. (1978).

L'enveloppe cellulaire de toutes les bactéries à gram négatif est constituée de deux membranes distinctes : la membrane interne ou membrane cytoplasmique et la membrane externe ; de 75 Å d'épaisseur chacune, ces deux membranes sont séparées entre elles par un espace dit "espace périplasmique" de 100 Å d'épaisseur renfermant le peptidoglycane (figures N° 2 et N°3).

1.1. Membrane cytoplasmique.

Les protoplastes des bactéries à gram négatif peuvent être obtenus par divers procédés. Ainsi, le lysozyme est capable d'hydrolyser les liaisons β (1-4) glycosidiques entre l'acide muromique et le N-Acétyle Glucosamine du peptidoglycane, en présence d'un agent complexant tel l'E.D.T.A. (COSTERTON, 1974).

Les travaux de SCHNAITMAN (1970), de MARTIN et MAC LEOD (1971) et de OSBORN et Al. (1972a et 1972b) ont montré que la membrane cytoplasmique des bactéries à gram négatif a une composition chimique similaire à celle des autres membranes biologiques.

La membrane cytoplasmique est constituée de :

- Phospholipides agencés en double couche, représentant 20-30 % du poids sec de la membrane. Selon les espèces bactériennes, ces phospholipides sont composés de phosphatidyl-éthanolamine, de phosphatidylglycérol et de cardiolipine ; avec une "tête" polaire dirigée de part et d'autre de la membrane et une "queue" non polaire dirigée vers l'intérieur de la membrane.

- Protéines insérées entre les phospholipides. Les protéines représentent 50-60 % du poids sec de la membrane (DIRIENZO et Al., 1978).

La production de protoplastes a permis à COSTERTON (1974) d'étudier des préparations pures de membranes cytoplasmiques de quelques espèces de bactéries à gram négatif. Mais la plupart des informations sur la composition chimique de la membrane cytoplasmique proviennent des travaux réalisés par SCHNAITMAN (1970) sur Eschérichia coli et ceux réalisés par OSBORN et Al. (1972a et 1972b) sur Salmonelles typhimurium.

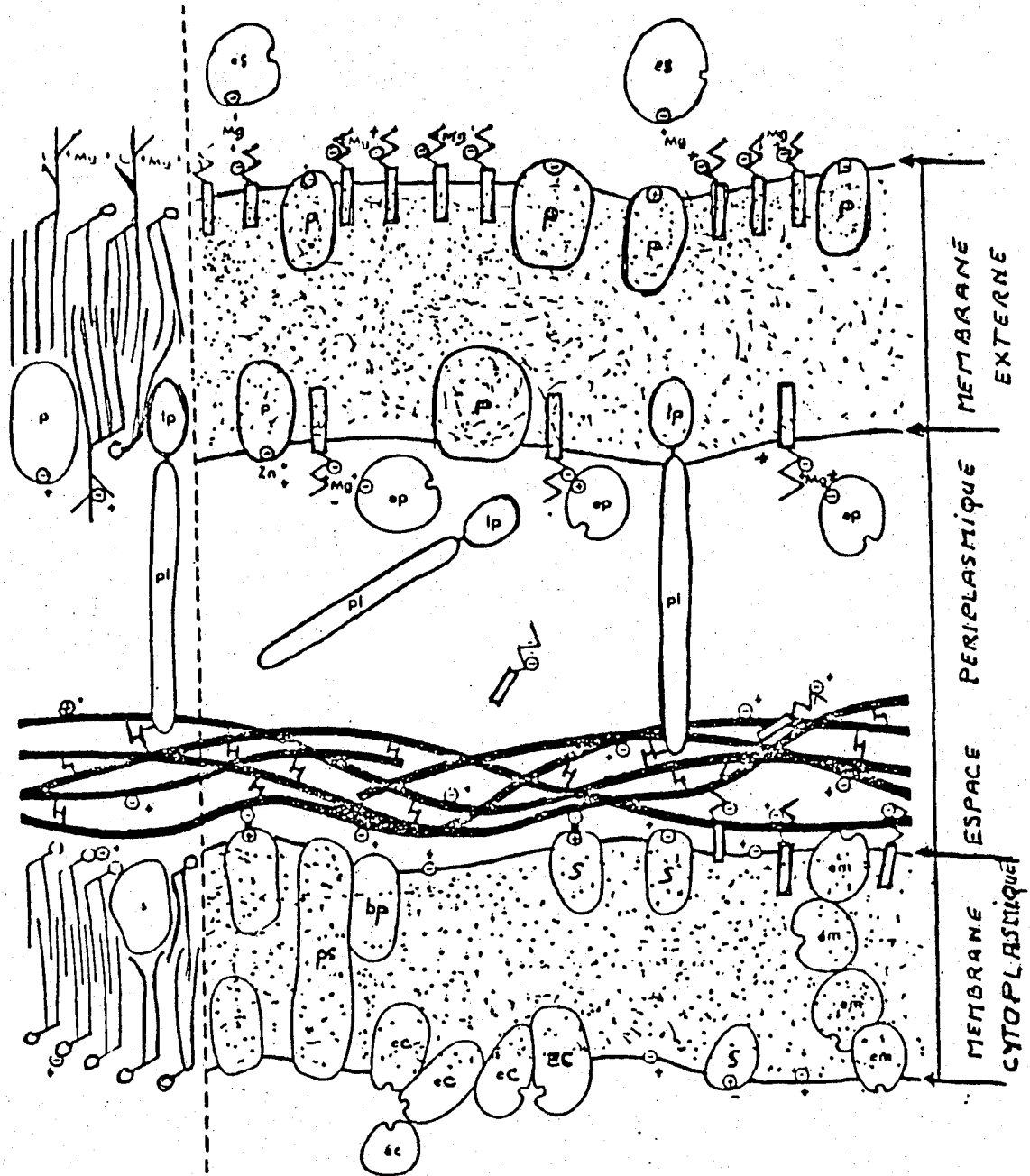


Figure N°2: Schéma des enveloppes cellulaires des bactéries Gram-négatif (par COSTERTON and al. 1974)

S : protéines structurales de la membrane cytoplasmique ;
Ps : Permeases ; Bp : protéines liées ; — : portion polysaccharidique du peptidoglycone ; H : liaisons peptidiques dans le peptidoglycone
PI : portion protéique de la lipoprotéine de Braun ; LP : portion lipidique ; P : protéines structurales et enzymatiques de la membrane externe ; ϕ : phospholipides ; ζ : lipopolysaccharides.

Enzymes (EC : fonction dirigée vers le cytoplasme ; Em : localisées dans la membrane cytoplasmique ; Ep : localisées dans l'espace périplasmique ; Es : localisées à la surface cellulaire).

1.2. Zone périplasmique

La première définition de la zone périplasmique a été donnée par MITCHELL (1961) : c'est un compartiment enzymatique limité à l'extérieur par la membrane externe. Ce qui signifie que l'espace périplasmique et le complexe peptidoglycane - lipoprotéine occupent la même zone de 100 Å d'épaisseur.

Peptidoglycane : le peptidoglycane est présent dans toutes les bactéries ; mais en quantité variable : 2,4 % du poids de la cellule de Spirillum serpens. (KOLENBRANDER et ENSIGN, 1968) et 1,2 % du poids de Pseudomonas BI6 (FORSBERG et Al., 1972).

Le peptidoglycane est obtenu par hydrolyse des liaisons covalentes entre le peptidoglycane et les lipoprotéines par la Trypsine, après chauffage de l'enveloppe cellulaire en présence du S.D.S. à 4 % (BRAUN, 1975).

Les études chimiques montrent que le peptidoglycane est composé de Glycane, constitué d'une succession de N-Acétyl-Glucoaminé et de N-Acétyl-Muramique liés entre eux par une liaison β (1-4) (SHARON et Al., 1966) et de peptide, généralement un tétrapeptide constitué de L-Alanyl-8-D-Glutamyl-L-R3-D-Alanine. Le R3 est variable selon les espèces bactériennes ; ainsi chez la majorité des Entérobactéries et particulièrement Escherichia coli, R3 est représenté par l'acide L-E-Méso-Diaminopimélique.

L'extrémité aminée (N-terminal) du tétrapeptide est toujours celui de la L-Alanine et c'est avec ce groupe aminé que le tétrapeptide se lie à l'acide N-Acétyl-Muramique. L'extrémité carboxylique (C-terminal) du tétrapeptide est celui de la D-Alanine est toujours impliqué dans la liaison interpeptidique.

Le peptidoglycane est synthétisé et assemblé à partir de composés produits dans la membrane cytoplasmique. Selon ROGERS (1970), le peptidoglycane exerce un contrôle morphologique sur les éléments cytoplasmiques de la cellule, mais ne constitue pas de barrière efficace aux petites molécules.

1.3. Membrane externe

Pour obtenir des préparations pures de membrane externe des bactéries à gram négatif, la plupart des auteurs utilisent soit la méthode de MIURA et MIZUSHINA (1968), soit la méthode de SCHNAITMAN (1970).

La première méthode est basée sur une ultracentrifugation du gradient de saccharose. Dans ce cas, la membrane externe est séparée de la membrane cytoplasmique grâce à sa haute densité due au lipopolysaccharide.

La deuxième méthode est basée sur l'action spécifique d'un détergent non ionique, le Triton X-100, qui en présence d'ions magnésium (Mg^{2+}) solubilise la membrane cytoplasmique, sans toucher à la membrane externe. Les raisons de ce phénomène ne sont pas encore connues.

Les études biochimiques montrent que la membrane externe est composée de protéines, de phospholipides et de lipopolysaccharides. Par comparaison avec la membrane cytoplasmique, la membrane externe renferme peu de variétés de protéines mais ces dernières sont plus largement représentées. La quantité de phospholipides est moins importante que celle de la membrane cytoplasmique, cependant le phosphatidyléthanolamine semble dominé dans la membrane externe. Enfin, la membrane externe renferme un composé spécifique : le lipopolysaccharide dont la quantité par bactérie serait approximativement de $2,5 \times 10^6$ molécules (SMIT et Al., 1975). Le lipopolysaccharide est exclusivement localisé dans le feuillet externe et occupe 45 % de la surface de la membrane externe (INOUYE, 1979).

Quelques protéines de cette membrane ont des interactions spécifiques avec le peptidoglycane, comme par exemple la lipoprotéine qui lui est liée par liaison covalente.

2. Protéines de la membrane externe

2.1. Protéines majeures

En étudiant la membrane externe d'*Escherichia coli* K12, SCHNAITMAN (1970) a noté qu'une bande d'une "protéine majeure" de poids moléculaire de 44 000 daltons représentait 70 % des protéines totales observées dans la membrane externe. Depuis de nombreux auteurs (INOUYE et LEE, 1973 ; HENNING et Al., 1973 ; SCHNAITMAN, 1974 ; et LUTGENBERG et Al., 1975) ont démontré que la "bande de SCHNAITMAN (1970)"

n'est qu'un artéfact de préparation et que cette bande est en fait constituée de quatre protéines distinctes de poids moléculaires voisins. Les appellations données à ces protéines diffèrent d'un groupe de chercheurs à un autre. DIRIENZO et Al., (1978) ont montré qu'il y avait une corrélation entre les bandes protéiques de ces différents auteurs.

La corrélation est basée sur la migration de chacune de ces protéines et sur les caractéristiques de chacune d'elles. Ils en ont conclu qu'il s'agit de mêmes protéines et que la résolution et la migration des protéines de la membrane externe sont dépendantes de certains détails importants tels que :

- le système de gel utilisé
- le pH des tampons
- la concentration d'acrylamide, etc.

Tous les auteurs s'accordent à regrouper les protéines de la membrane externe en deux groupes : les protéines "majeures" et les protéines "mineures".

Toutefois, cette définition est arbitraire. En effet, une protéine "mineure" peut être considérée comme "majeure" si sa production est accentuée (INOUYE, 1979).

2.1.1. Protéines Matrices ou Porines (fig. n° 4)

Les protéines matrices sont relarguées à partir du peptidoglycane avec lequel elles sont liées, soit par chauffage du complexe : Peptidoglycane - Porine - Lipoprotéine à 100°C en présence de SDS à 4% (ROSENBUSCH, 1974), soit par addition de NaCl 0,05 M au SDS à 37°C (HASEGAWA et Al., 1976).

Les porines Ia et Ib ont des poids moléculaires très voisins. C'est ROSENBUSCH (1974) qui fut le premier à purifier la protéine porine Ia de Eschérichia Coli, cette protéine de poids moléculaire 36 500 est composée de 336 acides aminés. Ces porines peuvent être séparées sur gel de polyacrylamide contenant de l'UREE 8 M (UEMURA et MIZUSHINA, 1975) et par la méthode de LAEMMLI (1970).

Le trait caractéristique des porines Ia et Ib est leur structure qui peut, sous l'action de la chaleur, prendre une forme β ; alors que les autres protéines membranaires restent toujours sous forme α quelque soit le traitement qu'elles subissent (ROSENBUSCH, 1974). Le changement en structure β , expliquerait, selon NAKAMURA et MIZUSHINA (1976) la thermomodifiabilité de ces protéines et donc les différents points de migrations qu'elles présentent sur gel de polyacrylamide.

La micrographie électronique montre que les porines sont constituées de trois monomères liés chacun à une lipoprotéine et au peptidoglycane par liaison ionique (NAKAMURA et MIZUSHINA, 1976). Les trois monomères sont liés entre eux pour former un "pore" (d'où le nom de Porine). Ces "pores" traversent la membrane externe avec laquelle ils ont des interactions hydrophobes. Ces porines seraient responsables de la diffusion passive de petites molécules ne dépassant pas 900 daltons (NAKAE et NIKAIDO, 1975).

2.1.2. Protéine Tol.G ou Omp.A

Cette protéine est souvent appelée "protéine II*" de HENNING". La Tol.G se distingue des autres protéines majeures de la membrane externe par le fait qu'elle ne soit que partiellement dégradée par les enzymes protéolytiques (INOUYE et YEE, 1972). En effet, SCHWEIZER et Al., (1978) ont montré que des fragments polypeptidiques restent liés au lipopolysaccharide après action de la Trypsine ou de la Pronase sur la protéine II*. Cette protéine est exclusivement présente dans le feuillet externe de la membrane externe et elle est maintenue stable à ce niveau par interactions spécifiques avec le lipopolysaccharide. La Tol.G aurait un rôle de récepteur de phages (DIRIENZO et Al., 1978). Le poids moléculaire de cette protéine n'est pas bien connu ; selon les auteurs, il varie de 27 000 pour GARTEN et HENNING, (1973) à 48 000 pour INOUYE et YEE, (1973). Cette variation du poids moléculaire s'expliquerait, peut-être, par la quantité de polypeptide restant collé au lipopolysaccharide.

Cette protéine présente, aussi, des migrations anormales sur différents gels de migration.

2.1.3. Lipoprotéine

BRAUN et REHN (1969) sont les premiers à rapporter l'existence d'une lipoprotéine liée au peptidoglycane d'Eschérichia coli et ayant un poids moléculaire de 7 000 daltons. la structure chimique complète de cette protéine a été déterminé par BRAUN et ses collaborateurs (BRAUN et BOSCH, 1972 et HANTKE et BRAUN, 1973). Cette protéine, souvent appelée protéine de BRAUN, est constituée de 58 acides aminés. Elle est dépourvue d'Histidine, de Tryptophane, de Glycine de Proline et de Phénylalanine. Par son groupe α -aminé de la L-lysine (C - terminal), la lipoprotéine se lie au groupe carboxyl du 10ème au 12ème acide méso-diamino-pimélique du peptidoglycane. La portion N-terminal de cette protéine est insérée dans le feuillet interne de la membrane externe. A cette portion (glycérylcystine) sont fixés deux acides gras similaires à ceux des phospholipides membranaires. Un de ces deux acides gras est souvent l'acide palmitique (65 % des cas).

D'autres travaux ont montré que cette lipoprotéine existe chez toutes les bactéries à gram négatif et elle peut-être sous deux formes : forme liée par covalence au peptidoglycane (33 %) et/ou forme libre dans la membrane externe (66 %) (INOUYE et Al., 1972).

La lipoprotéine purifiée a un aspect tridimensionnel en α hélice (INOUYE et Al., 1976) formant ainsi des "tubules". Ces "tubules" sont liés par interactions hydrophobes aux monomères des porines (figure n°5).

Les liaisons de la lipoprotéine avec d'une part, la peptidoglycane et d'autre part, avec la membrane externe expliqueraient, selon KOLENBRANDER et ENSIGN (1968), l'inélasticité de l'enveloppe cellulaire des bactéries à gram négatif.

2.2. Protéines mineures

Le nombre des protéines mineures est très varié. Dans certaines conditions de culture, la concentration de certaines protéines mineures peut être voisine de celle des protéines, dites majeures, de la membrane externe. Ces protéines joueraient un rôle important dans le transport de certains substrats tels le Maltose et la Vitamine B12 (DIRIENZO et Al. 1978). Certaines molécules protéiques ont un rôle enzymatique.

3. Lipopolysaccharide

Les études biophysiques réalisées sur la membrane externe des bactéries à gram négatif, indiquent que la couche externe de ces bactéries renferme, outre les phospholipides et les protéines, un composé spécifique : le lipopolysaccharide (SCHNAITMAN, 1971 ; COSTERTON et Al., 1974). Un chapitre complet sur la biosynthèse et l'assemblage du lipopolysaccharide a été fait par OSBORN (1979). Le lipopolysaccharide est une molécule complexe de poids moléculaire d'environ 10.000 daltons. Il est constitué de trois parties liées entre elles : lipide A, un oligosaccharide appelé aussi "core" et une chaîne polysaccharide dite chaîne "O".

- Lipide A : est l'unité de base du L.P.S.. C'est un dissaccharide phosphorylé et estérifié par des acides gras saturés (C12 - C16). Le lipide A est responsable de l'activité endotoxique des bactéries à gram négatif.
- Le "Core" oligosaccharide est un polysaccharide complexe constitué de N-Acétyleglucosamine, de quelques sucres et surtout de l'acide 2-céto-3 désoxyoctonique (K.D.O.). Le dosage de cet acide permet de quantifier le L.P.S. d'une cellule bactérienne. Le K.D.O. du core oligosaccharide est en position terminale et est lié sur l'hydroxyl en C3 libre du lipide A formant ainsi le "Core R" (lipide A + core oligosaccharide).
- La chaîne polysaccharide "O". Tous les polysaccharides "O" ont une structure de base simple constituée d'une séquence répétitive de 2 à 4 oses. La variabilité de la structure de la chaîne "O" est la base du typage sérologique "O" des bactéries à gram négatif.

Le "core R" est localisé dans le feuillet externe de la membrane externe (ROTHFIELS, 1973). Cette partie du L.P.S. a des interactions avec les protéines adjacentes (Tol. G.) (SCHWEIZER et Al., 1978). Le "core R" occupe 45 % de la surface externe de la bactéries.

A la suite des travaux de CHESTER et Al., (1973) sur quelques souches, on pensait que tous les L.P.S. de Pseudomonas pouvaient avoir le même noyau oligosaccharide. Mais DIMITRIEV et Al., (1982) ont démontré le contraire. Pour ces auteurs, il y aurait autant de noyaux oligosaccharide différents que d'espèces différentes.

Les chaînes polysaccharides "O" du L.P.S. forment des brins plus ou moins long dirigés vers l'extérieur de la bactérie.

Pour de nombreux auteurs (SUNDERSON et Al., 1973; COSTERTON et Al., 1974) la fonction barrière de la membrane externe est associée au L.P.S.. Ce dernier protégerait les cellules contre les agents extérieurs tels les antibiotiques. Ainsi les cellules lisses, dépourvues de L.P.S., ou ayant subi un traitement à l'E.D.T.A. sont sensibles aux immuns-sérums.

Comme le peptidoglycane, les lipoprotéines et les protéines de la membrane externe, le L.P.S. est synthétisé et transporté à partir de la membrane cytoplasmique. D'autre part la quasi-totalité des enzymes membranaires sont localisées dans la membrane cytoplasmique, notamment la succinate déhydrogénase et la lactate déhydrogénase. Toutefois, la membrane externe renferme une phosphorylase qui assure le transport de quelques substrats importants tel le glucose à travers la membrane externe.

VI. PAROI DE PSEUDOMONAS

=====

Comme toutes les bactéries à gram négatif, les cellules de Pseudomonas sont limitées par deux membranes : la membrane externe et la membrane interne ou membrane cytoplasmique.

Pour l'étude de la paroi, les schémas de fractionnement de ce genre bactérien ont toujours été copiés sur ceux appliqués aux cellules d'Eschérichia coli et à celles de Salmonella typhimurium en espérant trouver la même chose. Ainsi de nombreux auteurs ont pu extraire les enveloppes de Pseudomonas par actions de l'EDTA et le lysozyme et ont séparé les membranes par ultracentrifugation de gradient discontinu de saccharose comme l'ont fait MIURA et MIZUSHIMA (1968) sur Eschérichia coli. Les résultats obtenus par les différents auteurs n'ont été que partiels et souvent peu comparables à ceux obtenus sur Eschérichia coli, bactérie de référence.

GILLELAND et EAGON (1975) ont montré que Pseudomonas aëruginosa est beaucoup plus sensible à l'action de l'EDTA que les Entérobactéries ; ce qui explique en grande partie la différence entre les résultats obtenus sur Pseudomonas et ceux obtenus sur Eschérichia coli.

En modifiant sensiblement la concentration de l'E.D.T.A. et la molarité du tampon d'extraction (Tris-HCl), BOOTH et CURTIS (1977) ont pu extraire et séparer les membranes de Pseudomonas aëruginosa PAO1. Le degré de pureté des préparations a été apprécié par le dosage de la S.D.H. et de la L.D.H. dans la fraction riche en membrane cytoplasmique et par le dosage du K.D.O., composant essentiel du L.P.S. dans la fraction riche en membrane externe. L'étude de protéines membranaires, sur gel de polyacrylamide a permis à ces auteurs de définir 5 protéines majeures dans la membrane externe : I (56 000) ; II (53 000) III (38 000) ; IV (21 000) et V (16 000).

Avec la même méthode d'extraction et de séparation MIZUMO et KAGEYAMA (1978) ont quant à eux défini 6 protéines majeures dans la membrane externe avec des poids moléculaires voisins de : 60 000 (prot. D) ; 48 000 (protéine E) ; 33 000 (F) ; 21 000 (G et H) et 8 000 (I). La correspondance avec les protéines définies par BOOTH et CURTIS (1977) n'a pas été rapportée.

Les améliorations de la technique d'extractibilité ont permis à MIZUMO et KAGEYAMA (1979) d'obtenir des préparations pures de membranes et surtout de faire des corrélations entre les protéines majeures de Pseudomonas et celles d'E. coli. Ainsi la protéine I (8 000) serait similaire à la lipoprotéine d'Eschérichia coli (lipoprotéine de BRAUN). Cette protéine peut se trouver sous deux formes : forme libre dans la membrane externe et forme liée par covalence au peptidoglycane. De son côté MIZUMO (1979) a observé que deux protéines E. et H étaient retenues par le peptidoglycane quand la température d'extraction est de + 35°C. Par contre cet auteur et d'autres (HANCOCK et CAREY, 1979) ont montré qu'à + 55°C aucune protéine n'est retenue

par le peptidoglycane. D'autre part la protéine F (33 000) est souvent définie comme protéine thermomodifiable. En effet, cette protéine présente des anomalies de migrations sur gel de polyacrylamide. Selon HANCOCK et Al. (1982) cette protéine change de configuration sous l'action de la chaleur, ce qui explique peut-être les différents niveaux de migrations.

La répartition des protéines majeures dans la membrane externe n'est pas bien établie. STINNETT et EAGON (1973) ont montré qu'au moins deux protéines majeures de la membrane externe seraient fortement liées au L.P.S. formant avec ce dernier un complexe : le Pr-L.P.S. extrait relativement facilement par exposition de la cellule à l'E.D.T.A.. Les protéines ainsi liées seraient de poids moléculaires voisins de 43 000 et 16 000 (STINNETT et EAGON 1975) et accessibles de l'extérieur de la cellule.

Comme pour les Entérobactéries, tous les L.P.S. de Pseudomonas aeruginosa ont un noyau commun de polysaccharide constitué de : Glucose, Heptose, Alamine et Galactosamine permettant ainsi le sérotypage du genre Pseudomonas aeruginosa.

CONCLUSION ET POSITION DU PROBLEME

* * * * *

La contamination superficielle des carcasses est inévitable. En effet, si selon de nombreux auteurs, le muscle est quasiment stérile au moment de l'abattage des animaux, il est manipulé et stocké un certain temps indispensable pour sa transformation en viande (maturation) avant d'être proposé à la vente.

La première partie de l'étude bibliographique fait apparaître l'importance des Pseudomonas sur les viandes conservées à l'air et au froid. En effet, si ces microorganismes ne sont que très peu représentés chez les animaux vivants et aux premiers stades de la filière : 1/3 des animaux seraient porteurs de Pseudomonas avant l'éviscération (CATSARAS et BUTTIAUX, 1965) ; par leur taux de croissance plus élevé que tous les autres microorganismes, leur nombre s'accroît au cours des opérations qui suivent cette dernière (éviscération) et notamment au froid. Ainsi ces bactéries représentent 90-95 % de la flore psychrotrophe au moment de l'apparition de l'odeur caractéristique de la putréfaction, soit 10^7 germes/cm² (LAHELLEC, 1972).

Les Pseudomonas posent un problème important aux technologues qui souhaitent disposer de techniques rapides pour le dénombrement des flores qui déterminent la conservabilité des matières premières, afin de pouvoir les contrôler pour corriger d'éventuelles fautes de fabrication. L'identification des Pseudomonas, par ailleurs, n'est possible, à l'heure actuelle, qu'en 24 à 48 h. Dans ces conditions, l'émergence de techniques pouvant donner une réponse en quelques heures pourraient rendre de nombreux services aux laboratoires.

La deuxième partie de notre étude bibliographique montre l'intérêt des techniques rapides de dénombrement qui sont utilisées dans les laboratoires d'analyses médicales et dans certains domaines de l'industrie agro-alimentaire tels que les brasseries ou les laiteries. Malheureusement l'application de ces techniques à la filière viande est impossible en raison de leur caractère trop pointu et donc de leur difficulté d'extrapolation à la viande. Par ailleurs, leur manque de sensibilité, de spécificité et leur coût les rendent souvent inutilisables.

La technique sérologique mettant en jeu la réaction spécifique : antigène-anticorps semble prometteuse pour l'identification et le dénombrement des microorganismes de la viande. Sa mise au point nécessite un choix judicieux du à des antigènes qui doivent être utilisés.

Par leur accessibilité facile, les protéines de la membrane externe des bactéries à gram négatif et donc des Pseudomonas présentent un intérêt considérable.

Les nombreux travaux concernant les bactéries à gram négatif (Eschérichia coli, Salmonelles, Yersinia) et notamment ceux de HANCOCK et Al, (1983) sur diverses espèces de Pseudomonas, montrent que certaines protéines de membrane externe sont sérologiquement reliées. De plus, ces communautés sérologiques apparaissent de plus en plus comme des outils taxonomiques permettant de rapprocher ou de différencier de nombreuses espèces de bactéries à gram négatif.

Compte tenu de ce double intérêt, les protéines de membrane externe nous paraissent extrêmement intéressantes pour l'identification et le dénombrement des bactéries à gram négatif.

MATERIEL ET METHODES

I. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES BACTERIENNES

1. Isolement

Nous avons réalisé une collection de plus de cent souches de Pseudomonas isolés de différentes viandes fraîches : boeuf, veau, porc et mouton. Nous avons retenu parmi celles-ci, les 19 souches qui nous ont parues les plus représentatives de la collection. Toutefois, la souche n° 27 qui est un Pseudomonas fluorescens d'origine laitière a été également utilisée.

Toutes nos souches ont été isolées sur milieu D.P.T.S. (composition donnée en annexe), milieu permettant le dénombrement spécifique des Entérobactéries et des Pseudomonas.

Les souches ainsi isolées sont régulièrement repiquées sur gélose nutritive Difco (composition donnée en annexe) et identifiées après purification.

2. Identification Biochimique

L'identification a été réalisée à l'aide de galeries API 20E (tableaux n° 3 et n° 4). Ces galeries permettent d'identifier les microorganismes par un code chiffré. Pour cela, les 21 tests biochimiques sont regroupés en 7 groupes de 3 caractères et à l'intérieur de chaque groupe, la pondération est la suivante : 1 point pour le 1er caractère, 2 points pour le 2ème caractère et 4 points pour le 3ème caractère. Ainsi pour un groupe positif, le total des points serait égal à sept.

Compte tenu des incertitudes déjà notées par de nombreux auteurs ayant travaillé sur les denrées alimentaires, notamment le lait (Y. RICHARD, 1981) et la viande (FOURNAUD et LAURET, 1972), nous avons, dans ce présent travail, poussé l'identification biochimique de toutes nos souches par l'utilisation du système API 150. Ce système permet en effet, de définir les différents biotypes pouvant exister parmi nos souches sur la base de 50 sucres, 50 acides aminés et 50 acides organiques.

Toutefois, nous n'avons pas effectué d'étude taxonomique approfondie ; seuls les critères d'identification pour les Pseudomonas psychrotrophes décrits par MOLIN et TERNSTROM (1982) ont été retenus.

	ONPG	ADH	LDC	ODC	Cit	H ₂ S	Urée	TDA	Ind	V.P.	Gel
Ps. fluorescens	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Ps. Putida	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	Glu	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mel	Amy	Ara	Ox	Nit
Ps. fluorescens	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Ps. Putida	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Tableau n° 3 : Caractères biochimiques de *Ps. fluorescens* et *Ps. putida* par le système API 20E.

Souches	Origines	Profils	Noms d'espèce
N° 1	BOEUF	2214006	<i>Ps. fluorescens</i> / <i>Ps. putida</i>
N° 2	"	2004006	<i>Ps. putida</i>
N° 3	"	2004006	"
N° 4	"	2206004	"
N° 5	"	2204006	"
N° 6	PORC	2256044	<i>Ps. fluorescens</i>
N° 7	"	2256044	"
N° 8	BOEUF	2216006	"
N° 9	"	2206006	"
N° 10	"	2206006	"
N° 11	"	2206006	"
N° 12	"	2206006	"
N° 13	"	2206006	"
N° 14	PORC	2204046	<i>Ps. putida</i>
N° 16	"	2204046	"
N° 19	BOEUF	2204046	"
N° 20	MOUTON	2204046	"
N° 38	PORC	2214046	<i>Ps. fluorescens</i>

Tableau n° 4 : Profils biochimiques de nos souches donnés par le système API 20E.

II. ETUDE SEROLOGIQUE DE NOS SOUCHES

1. Obtention des sérums

0,5 ml de préparation vaccinale (bactéries entières, membranes externes, parois, mucopeptides, Pr - L.P.S., protéines membranaires) est mis en suspension dans 0,5 ml d'adjuvant incomplet de FREUND (DIFCO). Nous obtenons ainsi une émulsion épaisse et huileuse.

Le produit vaccinal est injecté par voie intradermique en plusieurs points au niveau du dos de lapin "tout venant". Pour chaque constituant bactérien et pour chaque lapin, cette opération est répétée deux fois à trois semaines d'intervalle.

Quatre semaines après la deuxième injection, les animaux sont tués et saignés complètement. Le sang est aussitôt récupéré. Après coagulation, le sérum récupéré par centrifugation à 3000 g pendant 15 minutes puis reparti en plusieurs fractions de 5 ml chacune. Pour éviter toute contamination microbienne, nous les avons diluées au 1/2 dans du glycérol pur et conservées à - 30°C.

2. Détermination du taux d'agglutinines des sérums

(Tableau n° 5)

Cette méthode utilise la réaction d'agglutination qui a lieu entre l'antigène et l'anticorps spécifique.

Les cellules bactériennes entières sont chauffées une heure à 100°C pour éliminer les antigènes thermolabiles (flagelles). Après centrifugation douce (5000 g pendant 10 minutes), le culot est mis en suspension dans de l'eau physiologique stérile.

Avec de l'eau physiologique stérile, nous préparons des solutions antigéniques mères de façon à obtenir une densité optique de 0,4 à 540 nm.

Des dilutions successives du sérum contenant des anticorps (réalisées au 1/2) et la suspension de particules antigéniques à concentration fixe (D.O. = 0,4 à 540 nm) sont réparties dans une série de tubes à hémolyse.

Après une nuit d'incubation à + 37° C, nous observons le fond de chaque tube. Quand le fond du tube est clair, il n'y a pas agglutination. S'il y a de fins grumeaux ou un voile, il y a agglutination. Le dernier tube de la série présentant une agglutination contient une unité agglutinante pour l'antigène considéré.

3. Essai de détermination, sur plaques de microtitration, des titres d'anticorps contre les cellules entières et contre les fractions cellulaires.

Pour cette manipulation, nous avons utilisé 17 sérums anti-cellules entières, 4 sérums anti-parois, 3 sérums anti-mucopeptide et 4 sérums anti Pr - L.P.S..

- Les parois bactériennes sont extraites par broyage des bactéries par des billes de verre de 1/8 inch selon la méthode de SALTON et HORNE (1951).
- Le mucopeptide : la préparation du mucopeptide bactérien est réalisée selon TUNSTALL et GOWLAND (1975). La méthode est basée sur l'action de la Trypsine en présence de tampon Tris-HCL 0,05M, pH 8,6.
- Le Pr - L.P.S. : la préparation du complexe Pr - L.P.S. est basée sur la méthode de HEDSTROM et Al. (1981) ; après une préculture des bactéries dans un milieu minimum liquide pour Pseudomonas décrit par EAGON et PHIBBS (1971). (La composition de ce milieu est donnée en annexe). La méthode de préparation du Pr - L.P.S. est basée sur l'action spécifique du Tris-EDTA.

Les cellules entières et les fractions cellulaires (parois, mucopeptide, Pr-L.P.S.) nous ont servis à vacciner plusieurs lapins. Des cas de mortalité ayant été observés. Le nombre de sérums obtenus est incomplet.

Nous avons aussi utilisé 17 sérums anti-cellules entières, 4 sérums anti-parois, 3 sérums anti-mucopeptides et 4 sérums anti-Pr - L.P.S.. Ces sérums sont testés contre 17 souches de Pseudomonas non chauffés et contre les mêmes 17 souches mais chauffées.

Les cellules chauffées sont celles qui ont servies à la préparation vaccinale : les cultures de ces souches de 24 heures de croissance sont mises en suspension dans de l'eau distillée et chauffées une heure à 100°C. Après centrifugation douce (5 000 g pendant 15 minutes) le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans de l'eau physiologique.

Les cellules entières chauffées et non chauffées sont testées contre les anti-sérums pré-cités. Le test d'agglutination est réalisé dans des plaques de microtitration. Les quantités de substance antigénique et de l'anti-sérum dans tous les puits des plaques sont les mêmes soit 100 µl de substance antigénique et 100 µl d'anti-sérum par puit.

4. Agglutination sur lame

Cette méthode utilise la réaction d'agglutination entre la suspension bactérienne ou substance antigénique et le sérum contenant des anticorps. L'agglutination a lieu sur une lame de verre propre (lame de COOKE).

Les suspensions bactériennes utilisées sont : 17 souches de *Pseudomonas* chauffées une heure à 100°C et les mêmes 17 souches non chauffées.

Les anti-sérums utilisés ont été préparés contre : 17 cellules entières, 4 parois, 3 mucopeptides et 4 Pr - L.P.S..

Une goutte de suspension bactérienne (chauffée / non chauffée) est mise en contact avec une goutte de chaque anti-sérums pré-cités. Le mélange est homogénéisé avec une öse stérile. L'agglutination est traduite par l'apparition de fins grumeaux dans le mélange. La lecture de l'agglutination se fait à l'oeil nu et à l'aide d'une loupe.

Cette opération d'agglutination est réalisée pour toutes les suspensions bactériennes avec tous les anti-sérums.

Par ailleurs, nous avons testé toutes nos souches chauffées contre les sérums anti-o de l'Institut PASTEUR. Il s'agit de 4 sérums-mélanges et de 16 sérums spécifiques agglutinants pour groupage de *Pseudomonas aeruginosa*.

De plus, pour tester l'auto-agglutinabilité de nos souches, nous mettons une goutte de suspension bactérienne non chauffée dans de l'eau physiologique stérile et nous observons l'apparition éventuelle de petits agglutinats.

III. MEMBRANES CELLULAIRES

=====

1. Séparation de membranes

Pour extraire les enveloppes cellulaires et séparer les membranes : membrane externe et membrane interne, nous avons testé des méthodes mécaniques : billes de verre et French-press., et des méthodes cliniques : Tris-EDTA-lysozyme et Triton X-100.

Toutes ces méthodes ont été appliquées sur nos souches, sur *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 et *Eschérichia coli* O14. Ces deux derniers ont servi de témoins.

1.1. Méthodes physiques

1.1.1. Fractionnement cellulaire par billes de verre

Nous avons appliqué la méthode de MIZUMO et KAGEYAMA (1979). C'est une méthode simple qui permet, à priori, d'obtenir de bonnes préparations d'enveloppes cellulaires.

Les bactéries sont cultivées en gélose nutritive dans 6 à 8 flacons de ROUX afin d'obtenir une grande quantité de culture. Après 24 heures de croissance à + 30°C pour nos souches et à + 37°C pour Pseudomonas aeruginosa PAO1 et Eschérichia coli O14 ; les cellules (150 g en poids humide) sont récupérées avec de l'eau distillée stérile et centrifugées à 5000 Mom pendant 10 minutes. Le culot de centrifugation est remis en suspension dans un tampon phosphate de Potassium (K_2HPO_4 - KH_2PO_4) 10 mM pH 7,2 (composition donnée en annexe). Cette suspension est broyée au WARRING-BLENDOR à + 4°C pendant une minute en présence de 50 g de petites billes de verre (1/8 Inch). Les billes de verre sont récupérées par filtration du broyat sur de la gaze. La suspension débarrassée des billes de verre est centrifugée à 100.000 g pendant 60 minutes. Le culot riche en enveloppes cellulaires est lavé deux fois avec le même tampon.

L'éclatement des cellules est vérifié au microscope optique à fort grossissement (X400).

1.1.2. Fractionnement cellulaire à la FRENCH-PRESS

Les mêmes souches cultivées dans les mêmes conditions que précédemment sont utilisées dans ce matériel. 10 ml d'une suspension épaisse des bactéries (10g bactéries / ml d'eau distillée stérile) sont versés au fond du puits de l'appareil FRENCH-PRESS, (L.K.B.) stockée une nuit à - 20°C), nous replaçons l'appareil avec son contenu, 20 minutes à - 20°C et les bactéries sont soumises à une pression de 5 tonnes qui a pour effet de détruire les cellules bactériennes. Les débris cellulaires congelés sont récupérés (aspect de pâtes) dans un flacon propre. Après décongélation totale à température ambiante, la suspension est centrifugée à 5000 rpm pendant 10 minutes. Cette centrifugation permet d'éliminer, dans le culot, les cellules intactes. Le surnageant de centrifugation est recentrifugé à 200.000 g pendant 60 minutes. Le culot ainsi obtenu est riche en enveloppes cellulaires et remis en suspension dans un tampon HEPES 0,01 M pH 7,4.

1.2. Méthodes chimiques

1.2.1. Fractionnement cellulaire à l'aide du Triton X - 100

Le Triton solubilise spécifiquement la membrane cytoplasmique.

A partir d'un aliquote de culture bactérienne broyée par la French-press., nous avons testé une méthode utilisant le Triton X -100. Le

schéma de fractionnement cellulaire ainsi utilisé est donné dans la figure n° 5.

La culture broyée à l French-Press est remise en suspension dans le tampon HEPES 0,01 M pH 7,4 et centrifugée 10 minutes à 10 000 pour éliminer les cellules restées intactes. Le surnageant (S1) est centrifugé à 200 000 g pendant une heure donnant ainsi un surnageant (S2) et un culot (C2). Le surnageant (S2) est incubé 30 minutes à 21°C et centrifugé à 200 000 g pendant 60 minutes donnant les culot et surnageant n° 3. Le surnageant (S3) riche en éléments périsplasmiques et cytoplasmiques est éliminé. Les culots (C2 et C3) sont remis ensemble, en suspension dans le tampon HEPES 0,01 pH 7,4. A ce mélange, nous additionnons du Triton X - 100 jusqu'à obtention d'une concentration finale de 20 mg/ml. Le mélange est ensuite centrifugé à 30.000 g pendant 60 minutes donnant un surnageant (S4) riche en membranes cytoplasmiques et un culot (C4) riche en membranes externes.

1.2.2. Fractionnement cellulaire à l'aide d'une méthode utilisant un tampon Tris - E.D.T.A. - lysozyme

Pour cette méthode, nous avons utilisé la technique décrite par MIZUMO et KAGEYAMA (1978). La technique est basée sur l'action simultanée du Tris, du lysozyme et de l'E.D.T.A..

Une grande quantité de cellules bactériennes (150 grs en poids humide) sont récupérées en fin de phase exponentielle (culture de 24 heures à 22°C) de croissance par centrifugation à 8000 Mpm pendant une dizaine de minutes ; puis lavées avec 20 % (poids/volume) de saccharose à 0°C. Les cellules (N x 1,5 g de poids humide) sont remises en suspension dans N x 18 ml de saccharose à 20 % (p/v). La suspension est placée dans de la glace. Des solutions maintenues elles aussi à 0°C sont ajoutées dans l'ordre suivant : N x 9 ml de saccharose 2M, N x 10 ml de Tris-HCL 0,1 M (pH 7,8 à +25°C), N x 0,8 ml de 1% EDTA-Na (pH 7,0) et N x 1,8 ml de Lysozyme. Le mélange final est réchauffé rapidement à + 30°C, et maintenu à cette température pendant 60 minutes. Pendant l'incubation du mélange, soit à 30 minutes, nous ajoutons la désoxyribonucléase (SIGMA) à raison de 3 g/ml de mélange. En fin d'incubation, le mélange devient visqueux. Nous centrifugeons ce mélange à 13 000 Mpm pendant 15 minutes à + 30°C. Nous obtenons des sphéroplastes dans le culot de centrifugation. Les membranes externes sont, quant à elles récupérées à partir du surnageant par une centrifugation de ce dernier à 30 000 Mpm pendant 60 minutes.

Les sphéroplastes sont repris dans N x 40 ml de 5 mM de chlorure de Magnésium (Mg Cl₂) et laissés en incubation pendant une heure à température ambiante. Les membranes cytoplasmiques sont alors récupérées par centrifugation à 15 000 Mpm pendant 20 minutes et lavées deux fois avec la même solution de MgCl₂ 5 mM.

Les membranes externes brutes (crudes outer-membranes) et les membranes cytoplasmiques sont mises en suspension dans de l'eau distillée stérile et dialysées 18 heures à + 4°C contre respectivement 1 mM EDTA-Na (pH 7,0) et 27 mM EDTA-Na (pH 7,0).

Les membranes ainsi obtenues sont conservées à - 30°C, après dilution au 1/2 dans du glycérol bidistillée.

2. Purification des membranes

Les enveloppes cellulaires obtenues par différentes méthodes sont séparées par centrifugation dans un gradient discontinu de saccharose.

- Principe :

La centrifugation en gradient de saccharose, des enveloppes cellulaires, permet de séparer les membranes selon leur densité respective. En effet, par sa richesse en lipopolysaccharide, la membrane externe est plus dense que la membrane cytoplasmique. Aussi la membrane externe d' Eschérichia coli se situe, après centrifugation en gradient discontinu de saccharose, dans une zone à concentration de saccharose égale à 36 % et la membrane cytoplasmique dans une zone à 52 %.

- Technique :

+ Matériel utilisé (schéma n° 1)

- Ultracentrifugeuse BECKMAN L-8 M55
- Rotor SW25 muni de 3 pots de 30 ml
- Pompe GIBSON
- Appareil de fabrication "locale" permettant le remplissage et la récupération des gradients de saccharose.

+ Mode opératoire

Dans une série de flacons propres, nous préparons des solutions de saccharose à différentes concentrations : pour les enveloppes cellulaires extraites par la French-Press, les concentrations de saccharose sont : 55 % ; 50 % ; 45 % ; 40 % et 35 %. Pour les membranes extraites par le tampon Tris-E.D.T.A.-lysozyme (selon MIZUMO et KAGEYAMA, 1978), les concentrations de saccharose sont : 60 % ; 55 % ; 50 % ; 45 % ; 40 % et 37 %.

Pour chaque concentration de saccharose, nous préparons 3 tubes à hémolyse. A l'aide d'une pipette automatique nous prélevons : soit 6 ml pour la méthode à la French-Press, soit 5 ml pour la deuxième méthode que nous déposons au fond de chacun de ces trois tubes. Ainsi nous avons des séries de trois tubes de 5 ou 6 ml correspondant à chaque concentration, sauf pour la solution la plus concentrée. En effet, cette dernière est déposée (5 ou 6 ml) directement au fond des pots de centrifugation. Ces pots sont placés droit sous les aiguilles incurvées de l'appareil de remplissage.

A l'aide d'une pompe GIBSON, nous prélevons et nous déposons, lentement contre la paroi et à la surface de la première couche de saccharose, le contenu des trois tubes suivants. Nous répétons cette opération pour toutes les solutions de saccharose de la plus concentrée vers la moins concentrée. Au-dessus de cette dernière, nous déposons 2 ml de nos échantillons.

Nous obtenons, ainsi, un gradient de saccharose constitué de 5 couches plus l'échantillon pour la méthode de French-Press, et 6 couches de saccharose plus l'échantillon pour la méthode au tampon Tris-E.D.T.A.-lysozyme.

Les pots de centrifugation ainsi remplis sont équilibrés au milligramme et placés dans le ROTOR SW25.

La centrifugation est réalisée à 25 000 Rpm (100.000 g) pendant 48 heures à + 4°C.

En fin de centrifugation, deux bandes, plus ou moins denses apparaissent à deux niveaux dans le gradient de saccharose.

Le gradient de saccharose est réparti dans une série de tubes à hémolyse à raison de 1 ml par tube, soit 32 tubes par gradient.

Une mesure de l'absorption des différentes fractions est réalisée au spectrophotomètre à 280 nm. La cinétique de la densité optique du gradient est ainsi enregistrée.

Les fractions membranes externes ou membranes cytoplasmiques sont ensuite réunies et conservées à + 4°C.

3. Caractérisation des membranes

3.1. Electrophorèse

Les profils électrophorétiques des membranes externes et cytoplasmiques sont très différents, ce qui permet de les différencier partiellement. En effet, pour la membrane externe, les protéines sont beaucoup moins nombreuses mais bien plus marquées. Par contre, le profil de la membrane cytoplasmique est plus dense avec de très nombreuses bandes fines sans dominance particulière d'une ou plusieurs bandes.

La technique d'électrophorèse utilisée et la composition des différents gels sont données dans le chapitre VI (Essai de purification des protéines de membranes).

3.2. Microscopie électronique

Toutes nos préparations de membranes externes et cytoplasmiques obtenues par les différentes techniques ont été examinées au microscope électronique à transmission à différents grossissements après coloration négative à l'acide phosphotungstique (APT) à 2 % à pH 6.

IV. OBTENTION DES SERUMS ACTIFS

=====

1 ml de chaque préparation de membrane externe est mélangé avec 1 ml d'adjuvant incomplet de FREUND ; donnant ainsi une émulsion épaisse. La moitié de cette émulsion, soit 1 ml est injectée à un lapin, par voie intradermique en plusieurs points du dos rasé et désinfecté. La deuxième moitié est injectée trois semaines après la première injection. Quatre semaines après la deuxième injection, l'animal est sacrifié et saigné complètement, le sérum est récupéré après coagulation du sang à température ambiante. Le sérum ainsi obtenu est dilué au 1/2 avec du glycérol bidistillé et conservé à - 20°C.

V. ESSAI DE PURIFICATION DES PROTEINES MAJEURES DE LA

=====

MEMBRANE EXTERNE

=====

1. Extraction des protéines

Plusieurs techniques d'extraction et de purification de protéines majeures de la membrane externe sont décrites pour les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. Nous avons essayé quelques unes de ces techniques sur un certain nombre de nos souches, sur *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 et sur *Escherichia coli* O14.

Ces techniques sont :

1.1. Technique "rapide" d'extraction de quelques protéines membranaires, selon HANCOCK et CAREY (1979).

Une culture fraîche de bactérie (1 gramme en poids humide) est

mise en suspension dans 5 ml de tampon : 2 % SDS + 25 mM Tris-HCL pH 8,0 + 10 mM E.D.T.A. Na. Cette suspension est chauffée 20 minutes à 88°C et remise dans un bain de glace. Nous ajoutons successivement du n-Butanol à 13 % de la solution finale et du sodium acétate 4N pH 5,5. Après 30 minutes d'incubation dans le bain de glace, nous centrifugeons le mélange 10 minutes à 27 000 g. Au surnageant de centrifugation, nous ajoutons 5 % d'acétone et nous laissons incuber le mélange une heure à + 30°C. Par centrifugation de dix minutes à 27 000 g, nous obtenons théoriquement un culot enrichi en protéines I et un surnageant auquel nous ajoutons 20 mM de chlorure de Magnésium (Mg Cl₂). Après une nuit d'incubation à + 4°C, nous centrifugeons ce mélange, dix minutes à 27 000 g et nous obtenons un surnageant riche en protéines F.

1.2. Extraction des protéines majeures à partir des enveloppes cellulaires, selon MIZUMO et KAGEYAMA (1979) : (figure n° 6)

Les enveloppes cellulaires sont obtenues par fractionnement des bactéries par des billes de verre dans un tampon phosphate 10 mM pH 7,4.

Les enveloppes cellulaires ainsi obtenues sont pesées et mises en suspension dans un tampon : 2 % SDS ; 10 % glycérol ; 10 mM Tris-HCP pH 7,8, à raison de 2,66 ml de tampon par gramme (en poids humide) d'enveloppes cellulaires. Le mélange est incubé à + 30°C pendant 60 minutes et centrifugé ensuite à 100 000 g pendant 60 minutes. Nous obtenons ainsi une fraction insoluble (culot) et une fraction soluble (S1) appelée fraction A.

A la fraction insoluble (culot), nous ajoutons le tampon d'extraction contenant le S.D.S., à raison de 1,33 ml de tampon par gramme de ce culot. Après une incubation de 60 minutes à + 30°C, nous centrifugeons le mélange à 100 000 g pendant 60 minutes. Nous obtenons ainsi une fraction insoluble appelée fraction B et une fraction soluble (S2) ou fraction A.

A la fraction insoluble (fraction B), nous ajoutons le même tampon SDS, mais contenant du NaCl 0,1 M. La quantité du tampon ainsi ajouté est égale au 3/4 de la quantité de ce même tampon qui a été ajouté pour obtenir le surnageant S1. Après une incubation de 60 minutes à + 30°C, nous centrifugeons à 100 000 g, pendant 60 minutes à +25°C. Nous obtenons ainsi une fraction soluble appelée fraction C et une fraction insoluble ou fraction D.

La fraction D est lavée deux fois avec de l'eau distillée stérile.

La fraction A est riche en protéine I.

La fraction B est riche en protéines D, E, F et H.

La fraction C est riche en protéines D et E.

La fraction D est riche en protéines F et H et en peptidoglycane.

1.3. Autre méthode de purification des protéines

Nous avons essayé de purifier quelques protéines majeures de la membrane externe et notamment la protéine "F", directement à partir de gel d'électrophorèse.

La technique utilisée est la suivante :

Sur un gel de polyacrylamide de 12 cm de longueur, nous avons fait migrer 0,5 mg (en protéines) de la fraction D riche en protéines "F". Cette fraction est extraite de 1 membrane externe de la souche n° 1, selon la méthode de MIZUMO et KAGEYAMA (1979).

Après électrophorèse, le gel est découpé verticalement en deux parties :

- La grande partie, non colorée, est découpée horizontalement en 24 fractions de 0,5 cm chacune. Ces fractions sont ensuite broyées mécaniquement, à l'aide de bâton en verre propre, dans des tubes à essai contenant 1 ml de tampon P.B.S.

Les broyats sont conservés 18 heures à + 4°C et centrifugés à 3000g pendant 10 minutes. Le culot contenant le S.D.S. est éliminé. Les protéines contenues dans le surnageant sont dosées par la méthode de BRADFORD (1976).

- La petite partie du gel (1 cm de large) est fixée et colorée. Cette partie, nous sert de référence pour contrôler la qualité de la migration électrophorétique.

2. Dosage des protéines

Après chaque extraction de membranes et extraction de protéines, nous avons dosé les protéines par trois méthodes.

2.1. Méthode de BIURET

La composition chimique des réactifs est donnée en annexe. Le sérum albumine bovine (B.S.A.) à 10 mg/ml est pris comme témoin. Le tampon d'extraction de protéines, nous permet de faire le "blanc" (ajustage de la densité optique à zéro).

L'absorbance est lue à 540 nm. La quantité de protéines dans la solution à doser est donnée par l'opération suivante :

$$Q = \frac{A \times B}{C}$$

avec :

Q = quantité de protéines dans la solution à doser.

A = densité optique de la solution à doser.

B = concentration de la B.S.A. / ml d'eau, soit 10 mg.

C = densité optique de la solution contenant la B.S.A.

2.2. Méthode de LOWRY (1951)

Mode opératoire :

la composition chimique des réactifs est donnée en annexe.

5 ml de réactif D sont ajoutés à 0,2 ml de solution à doser. Après dix minutes, on ajoute 0,5 ml de réactif de FOLIN - CIOCALTEU (MERCK) en agitant rapidement. On laisse la réaction se dérouler pendant 30 minutes à température ambiante.

Résultat :

La lecture des tubes se fait au spectrophotomètre par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 750 nm.

La concentration des protéines des échantillons est déterminée par référence à une gamme étalon réalisée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine à 1 mg par ml (figure n° 7a).

2.3. Méthode de BRADFORD (1976)

A 0,1 ml de solution à doser, on ajoute 5 ml de réactif au bleu de COOMASSIE G250 dont la composition est donnée en annexe.

Après 5 minutes d'incubation, l'absorbance est mesurée à 590 nm. La sérum albumine bovine est utilisée comme protéine étalon (figure n° 7b).

3. Electrophorèse

Nous avons utilisé la technique d'électrophorèse en milieu dissociant en présence de S.D.S. selon LAEMMLI (1971). Dans ces conditions l'électrophorèse, la migration des protéines ne s'effectue qu'en fonction de leur poids moléculaire. La détermination du poids moléculaire de chaque protéine est donc possible par comparaison de son r_f à celui des protéines connues. Comme protéines de référence, nous avons

utilisé des "KITS" L.M.W. de protéines prêtes à l'emploi de chez PHARMACIA. La composition des "KITS" L.M.W. est donnée en annexe. Ces "KITS" sont soumis à la même électrophorèse que nos échantillons.

A partir des stocks de solution mères d'Acrylamide, de tampon pour gel de séparation pH 8,8 et de tampon pour gel de concentration pH 6,8, nous constituons les gels suivants :

	Gel de Séparation (en ml)	Gel de Concentration (en ml)
Solution mère d'Acryl- bisacrylamide	25	4
Tampon	7,5	5
Eau distillée	27,1	10,8
T.E.M.E.D.	0,030	0,015
Persulfate d'Ammonium à 15 %	0,34	0,150

Le TEMED et le Persulfate d'Ammonium, catalyseur de polymérisation, ne sont ajoutés que juste avant de couler les gels.

Le gel de séparé est coulé, en premier, entre des plaques de verre (4 plaques au total) de 11 cm de hauteur et 8 cm de largeur, permettant ainsi d'avoir un gel de 1 mm environ d'épaisseur et de 8 cm de hauteur.

Une fois le gel polymérisé (20 minutes environ), les plaques contenant le gel de séparation sont placées dans la cuve d'électrophorèse (PHARMACIA) pleine d'eau. Au dessus de ce gel de séparation, on coule le gel de séparation et on place, tout de suite, les peignes qui permettront d'obtenir des "puits" dans lesquels les échantillons à analyser ainsi les "KITS" L.M.W. seront déposés.

Avant l'électrophorèse, nous dosons les protéines de nos échantillons par l'une des 3 méthodes précitées, nous concentrons nos échantillons par centrifugation et nous les mettons à solubiliser dans un tampon de solubilisation à pH 8,8 (la composition de ce tampon est donnée en annexe). La solubilisation des protéines de nos échantillons est réalisée par chauffage à 100°C pendant cinq minutes. La même opération de solubilisation est réalisée pour les protéines standard L.M.W.. Une fois solubilisées et refroidies à température ambiante, nous ajoutons une goutte de Bleu de Bromophénol à tous les échantillons à analyser. Ce colorant permet de visualiser le front de migration.

Une fois la polymérisation du gel de concentration réalisée, nous retirons avec précaution les peignes sans casser les puits. Nous vidons l'eau de la cave et nous remplissons cette dernière avec un tampon d'électrophorèse pH 8,3 jusqu'au haut des plaques, soit environ 3,5 litres de ce tampon.

- Electrophorèse proprement dite.

Dans le premier puit de chaque plaque, nous déposons le "KIT" contenant les protéines standard et dans chaque autre puit, nous déposons les échantillons à analyser, soit 10 g de protéines par échantillon.

L'électrophorèse est réalisée sous une tension de 100 Volts jusqu'à ce que le Bleu de Bromophénol atteigne le gel de séparation ; puis nous augmentons la tension à 200 Volts.

L'électrophorèse est arrêtée lorsque le marqueur atteint le bas du gel de séparation.

Nous démoulons les plaques. La fixation des protéines sur le gel de séparation se fait dans une solution contenant : 30 % Ethanol + 5 % d'Acide Acétique + 75 % d'eau distillée.

Après une heure, environ, de fixation, nous colorons les gels soit au Bleu de COOMASSIE R250, soit au Nitrate d'Argent.

3.1. Coloration au Bleu brillant de COOMASSIE R250

La solution de coloration, dans ce cas, est composée de : solution de fixation précédemment décrite plus 0,15 % de Bleu brillant de COOMASSIE R250. Cette solution est bien mélangée, voire même filtrée, pour éviter les dépôts de grumeaux pouvant former des artéfacts sur les gels.

Les gels d'électrophorèse sont plongés dans cette solution de coloration pendant quelques heures, voire même une nuit pour bien colorer les protéines.

La décoloration est réalisée dans une solution de même composition que celle qui nous a servi à fixer les protéines sur les gels. Cette décoloration se poursuit jusqu'à ce que le fond des gels, soit entièrement décolorée. Pour cela, nous changeons cette solution une ou deux fois.

3.2. Coloration au Nitrate d'Argent

La méthode utilisée dans ce cas est celle de MORISSEY (1981). Par comparaison à celle du Bleu brillant de COOMASSIE, la coloration au Nitrate d'Argent est beaucoup plus sensible et nécessite le port de gants pour éviter d'avoir des traces de doigts sur les gels.

Mode opératoire :

- **Préfixation** : Après avoir démoulé les gels d'électrophorèse, nous les fixons trente minutes dans une solution contenant : 50 % de Méthanol + 10 % d'Acide Acétique, puis 30 minutes dans une solution contenant : 5 % Méthanol + 7 % Acide Acétique.
- **Fixation** : Après une heure de préfixation, nous plongeons les gels dans une solution à 10 % de Glutaraldéhyde pendant trente minutes.
- **Rinçage** : Le rinçage des gels est réalisé dans de l'eau distillée pendant une nuit.
Après rinçage, nous plongeons les gels dans une solution contenant 5 µg/ml de Dithiothreitol soit 5 mg/l, pendant trente minutes. Nous plongeons les gels dans une solution contenant 0,1 % de Nitrate d'Argent pendant trente minutes ; soit 0,5 ml de Nitrate d'Argent à 20 % dans 100 ml d'eau distillée.
- **Rinçage** : On rince rapidement une fois avec de l'eau distillée et trois fois avec le liquide de développement.
- **Développement** : Le développement est réalisé avec 50 l de formaldéhyde à 37 % dans 100 ml de Carbonate de Sodium à 3 % ; soit 515 l de formaldéhyde à 30 % et 30 grs de Carbonate de Sodium dans un litre d'eau distillée. Une fois la coloration de gels désirée atteinte, nous stoppons le développement en ajoutant 5 ml de 2,3 M d'Acide Citrique (24,16 g/50 ml) directement dans le liquide de développement en agitant rapidement pendant dix minutes.
- **Lavage** : Nous lavons les gels avec de l'eau distillée pendant trente minutes.
- **Avant stockage** : Nous mettons les gels dans une solution à 0,03 % de Carbonate de Sodium pendant dix minutes.
- **Décoloration** : Elle est réalisée avec du HNO₃ à 0,6 M.

VI. ESSAI D'IDENTIFICATION RAPIDE DES PSEUDOMONAS

=====

Nous avons essayé d'identifier nos souches et de nombreuses bactéries gram - témoins, à partir d'un sérum actif contre une protéine ou complexe protéique de la membrane externe de la souche n° 1.

Notre choix a été porté sur la protéine "F" liée au peptidoglycane et extraite par un tampon Tris - E.D.T.A. - Lysozyme, selon la méthode décrite par MIZUMO et KAGEYAMA (1979). En effet, par cette méthode la protéine "F" semble, d'une part, être présente dans les membranes de toutes les souches testées et d'autre part, semble être dominante sur les gels d'électrophorèse observés.

A partir de la solution D, enrichie en protéine "F", nous avons préparé un sérum. Après deux injections intradermiques dans le dos d'un lapin, à trois semaines d'intervalle et quatre semaines après la seconde injection, nous avons obtenu un sérum actif contre cette protéine.

Sur lame et en plaques de microtitration, nous avons testé l'anti-sérum "F" contre toutes nos souches et contre quelques Entérobactéries.

1. Agglutination sur lame

Une goutte de l'anti-sérum "F" est mise en contact avec une goutte de suspension bactérienne prélevée avec une ôse stérile.

L'agglutination est lue à l'oeil nu.

2. Agglutination en plaques de microtitration

Une série de dilutions au 1/2 est réalisée à partir de l'anti-sérum "F". 100 µl de chaque dilution sont déposés au fond de chaque puit d'une plaque de microtitration.

Les suspensions bactériennes sont diluées dans de l'eau physiologique stérile de façon à obtenir une D.O. de 0,8 à 540 nm.

De la solution antigénique mère (D.O. 0,8 à 540 nm), nous prélevons 100 µl que nous déposons dans chaque puit de plaque de microtitration contenant déjà l'anti-sérum.

VII. ESSAI DE DENOMBREMENT RAPIDE DES PSEUDOMONAS

=====

1. Mise en évidence du caractère antigénique des protéines de la membrane externe

La méthode de séparation et de purification des protéines de membrane est identique à celle décrite pour la purification de la protéine "F" par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

A partir de chacune des 24 fractions de gels broyés, conservées dix huit heures à + 4°C, nous prélevons 100 µl que nous déposons au fond des puits des plaques de microtitration. Ces plaques sont mises en agitation pendant deux heures à + 20°C. Après ce délai, les plaques sont lavées quatre fois avec un tampon P.B.S. Tween 0,05 % et chaque puit reçoit 100 µl de sérum anti-bactéries totales ou du sérum témoin ou du sérum anti-protéine "F". Les plaques sont mises à incuber en agitation à 37°C pendant trois heures, puis lavées quatre fois à l'aide de tampon P.B.S. Tween.

Le sérum couplé à la Péroxydase chèvre anti-lapin (NORDIC - SERVA) dilué au millième (1 ml du sérum dans 1 000 ml de tampon P.B.S.) est alors ajouté dans chaque puit à raison de 100 µl par puit.

Les plaques sont mises à incuber en agitation à 37°C pendant trois heures. Après ce délai, les plaques sont lavées quatre fois avec le tampon P.B.S. Tween et la Péroxydase est dosée par la méthode décrite dans le chapitre suivant (Bactéries en culture pure).

2. Dénombrement à partir des sérums anti-membrane externe

Nous avons testé le système ELISA pour dénombrier les bactéries en culture pure et les bactéries de contamination naturelle (directement à partir de la viande).

2.1. Bactéries en culture pure

Les membranes externes obtenues à partir de la souche n° 13 (5 grs en poids humide) selon la méthode de MIZUMO et KAGEYAMA (1978), sont centrifugées à 100 000 g pendant soixante minutes. Le culot obtenu est repris par 2 ml de tampon Tris-HCL 33 mM pH 8,0 ; 1 mM E.D.T.A. et maintenu pendant soixante minutes à 37°C. Cette suspension est diluée en 1/100ème dans le tampon carbonate-bicarbonate pH 9,6, VOLLER et al. (1979) et répartie à raison de 200 µl par puit dans des plaques de microtitration. Après dix huit heures à 37°C, les plaques sont soumises à quatre lavages par un tampon P.B.S. Tween et utilisées immédiatement ou conservées à -20°C.

Après trente six heures de culture à 22°C en gélose inclinée sur le milieu de EAGON et PHIBBS (1971) solidifié par addition de gélose à 1 %, les souches sont reprises dans un tampon Tris-HCL 33 mM pH 8,0 ;

1 mM EDTA de manière à obtenir une concentration de 10^7 bactéries/ml. Du lysozyme est ajouté à une concentration finale de 0,5 %. Après trente minutes à 37°C, des dilutions décimales sont réalisées dans le tampon carbonate-bicarbonate pH 9,6. Ces dilutions sont ajoutées à raison de 100 µl par puit dans les plaques de microtitration sensibilisées par les extraits de membranes externes. Immédiatement après l'addition des dilutions, 100 µl de sérum actif contre les membranes externes sont ajoutés dans chaque puit à la dilution de 1/200 en tampon carbonate-bicarbonate pH 9,6. Cette dilution de sérum (1/200^{ème}) a été choisie parce qu'elle est juste suffisante pour saturer la totalité des antigènes protéiques (membranes diluées au 1/100) fixés sur le fond de la plaque, ce qui permet de réaliser la compétition. Les plaques sont ensuite incubées une heure trente à 37°C et lavées quatre fois avec le tampon P.B.S. Tween. Des anticorps Anti-IgG de lapin (NORDIC - SERVA) couplés à la peroxydase sont ajoutés à raison de 200 µl par puit (dilution 0,5%) et mis à incuber une heure trente à 37°C. Après ce délai, les plaques sont lavées quatre fois avec le tampon P.B.S. Tween ; 200 µl du mélange réactionnel (100 ml du tampon phosphate - citrate pH 5,0, 40 mg d'orthophénylène diamine, 40 µl de H₂O₂ à 30 %) sont ensuite ajoutés dans chaque puit. Après quinze minutes à l'obscurité, 50 µl de soude 0,5N sont introduits de manière à stabiliser la coloration. Les résultats sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Multiskan (Flow laboratories) à 405 nm.

2.2. Contamination naturelle

31 échantillons de viandes hachées provenant d'un super-marché des environs de CLERMONT-FERRAND ont été utilisés.

Chaque échantillon (3 grammes) est dilué au 1/10^{ème} en tube à essai stérile de 20 x 20 mm dans le tampon Tris-HCl 33 mM pH 8,0; 1 ml est prélevé dans chaque échantillon pour effectuer les dénombrements en boîtes de Pétri. Du lysozyme est ajouté (concentration finale 0,5 %) et après trente minutes à 37°C, des dilutions au 1/10^{ème} sont réalisées en tampon carbonate-bicarbonate pH 9,6. Le reste du test est réalisé de manière identique à ce qui est décrit pour les bactéries en souches pures.

Les dénombrements sont réalisés selon les procédés classiques en boîtes de Pétri, après dilutions en eau physiologique immédiatement après broyage des échantillons dans le tampon Tris-HCl 33 mM pH 8,0 et avant addition du lysozyme.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE DES SOUCHES UTILISEES

=====

Les résultats des tests biochimiques réalisés sur galeries API 20E conduisent à des profils, tous identiques ou presque. Aussi, ces bactéries correspondent à Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida.

Lorsque nous analysons les tests effectués grâce aux galeries API 50 AO, AA et CH, soit 150 caractères, nous pouvons différencier différents biotypes parmi nos souches de Pseudomonas isolés de viande.

La majorité des souches (n° 1, 4, 6, 7, 8, 13, 16, 19, 20 et n° 38) appartient au biotype I de MOLIN et TERNSTROM (1982). Les souches n° 2, 3, 10, 11 et 14 correspondent à Pseudomonas fragi alors que la souche n° 5 appartient à Pseudomonas fluorescens (biotype II) de ces mêmes auteurs. La souche n° 27 est un Pseudomonas fluorescens d'origine laitière issue de la collection de l'Institut PASTEUR de PARIS. Les souches n° 9 et n° 12 n'ont pas pu être identifiées.

II. SERO-AGGLUTINATIONS

=====

1. Essai de détermination de l'antigène "O"

La séro-agglutination est effectuée sur lame, entre nos 19 souches (n°1 à 14, 16, 19, 20, 27 et n° 38) chauffées 1 heure 30 à 100 °c et les 4 sérums mélangés de l'Institut PASTEUR. Seule la souche n° 3 présente une agglutination. Cette souche (n°3) agglutine avec 2 sérums mélangés (P.M.C. et P.M.F.).

Mise en suspension avec les sérums entrant dans la composition de ces deux sérums-mélanges la souche n° 3 a donné 4 réactions positives suivantes :

	P.M.C.				P.M.F.			
	P9	P10	P13	P14	P7	P8	P11	P12
Souche n° 3	+	-	-	+	-	-	+	+

La lecture de l'agglutination est faite à l'oeil nu. Nous ne pouvons, de ce fait, écarter les erreurs possibles. En plus, il n'est pas exclu que les souches utilisées échappent à la classification du comité international sur les Pseudomonas. D'autre part, nos souches, d'origine carnée, peuvent faire partie des 1 % des Pseudomonas qui n'appartiennent pas aux 16 séro-groupes connus.

2. Détermination du taux en agglutinines des sérums

Sur l'ensemble des animaux vaccinés, nous avons noté des cas de mortalité, ce qui a réduit le nombre de sérums obtenus à :

17 sérums anti-cellules entières

4 sérums anti-parois

4 sérums anti-Pr-L.P.S.

3 sérums anti-Mucopeptide.

Les sérums obtenus sont dilués jusqu'au 10ème tube, soit jusqu'au 1/5120.

Ces différentes dilutions de sérums sont testées contre des solutions mères (D.O. = 0,4 à 540 nm) de 17 souches bactériennes chauffées, 17 non chauffées et contre les différents constituants bactériens soit : 4 préparations de parois, 4 préparations de Pr-L.P.S. et 3 préparations de mucopeptides.

Les résultats sont rapportés dans les tableaux n° 6, n° 7, n° 8, n° 9 et n° 10.

- Cellules entières : nous observons que dans l'ensemble, le taux d'agglutinines dans les sérums contre les cellules chauffées est inférieur à celui contre les cellules non chauffées.
- Constituants bactériens : Paroi, Pr-L.P.S. et Mucopeptide. En général, le taux en agglutines pour les différents constituants est le même. Toutefois, ce taux est nettement inférieur à celui des sérums anti-cellules entières ; excepté le taux du sérum anti-paroi de la souche n° 20 qui lui est égal à celui du sérum anti-cellules non chauffées.

SOUCHES		Nº TUBE	Nº TUBE
	1	9	10
	2	8	6
	3	5	10
	4	10	10
	5	8	10
	6	5	8
	7	7	5
	8	6	10
	9	10	10
	10	9	5
	11	4	5
12	10	10	
13	6	9	
14	10	6	
16	5	6	
19	8	6	
20	10	7	

nº 6 nº 7

SOUCHES	Nº TUBE			
	12	7	5	—
	20	7	5	6
	27	5	4	10
	38	7	7	7

nº 8 nº 9 nº 10

- Taux en agglutinines des sérums obtenus à partir de diverses préparations

- Tableau nº 6 : Cellules entières chauffées
- " nº 7 : Cellules entières non chauffées
- " nº 8 : Parois
- " nº 9 : Pr-L.P.S.
- " nº 10 : Mucopeptides

3. Essai de détermination du titre d'agglutination des différents sérums contre les souches homologues et hétérologues

Les expériences ont été réalisées en plaques de microtitration (96 cupules par plaque). Les résultats obtenus montrent des titres importants pour les souches homologues. Toutefois, pour des raisons non comprises, probablement liées à la nature du matériau constituant les plaques, la lecture était difficile et les titres n'ont pas pu être obtenus.

4. Recherche de communauté antigénique parmi les souches de Pseudomonas utilisées : Agglutination sur lame

4.1. Cellules entières

4.1.1. Cellules non chauffées (Tableau n° 11)

Toutes les souches utilisées sont très rapidement agglutinées par les sérums homologues. La souche n° 14 est auto-agglutinable.

On constate que le sérum préparé à partir d'une souche donnée est capable d'agglutiner plusieurs souches pratiquement au même niveau que la souche homologue, alors que la souche ayant servi à l'obtention de cet anti-sérum ne croise qu'avec un nombre plus réduit de sérums. Les seules exceptions sont, la souche n° 6 qui montre une agglutination avec tous les sérums et les souches n° 5 et n° 11, qui croisent avec plus de sérums que leurs correspondants avec les autres souches.

La souche n° 6, bien que non auto-agglutinable présente une agglutination non spécifique au moins avec le sérum de lapin.

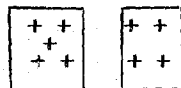
Les souches n° 7 et n° 13 ne sont agglutinées que par les sérums homologues.

Certaines souches telles la n° 2 et la n° 3 montrent certaines agglutinations avec d'autres sérums que leurs sérums homologues mais d'intensité très faible.

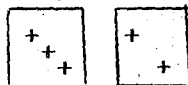
Les autres souches utilisées montrent des croisements notables avec des sérums d'autres souches : c'est le cas des souches n° 1, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 16 et n° 19. La souche n° 20 ne croise qu'avec le sérum homologue et le sérum de la souche n° 6.

		SERUMS																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	16	19	20	
SOUCHES	1	++ ++	+	-	++ ++	++ ++	-	-	++	++ +	-	-	-	-	-	-	++	-	
	2	-	++ ++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	3	-	-	++ ++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
	4	++	+	-	++ ++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	++ ++	++	-	++ ++	++ ++	-	-	++	++	++	++	-	-	-	-	+	+	-
	6	++ ++	++ ++	+	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++
	7	-	-	-	-	-	-	++ ++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	++ ++	+	-	++ ++	++ ++	-	-	++ ++	++ ++	++	-	-	-	-	-	+	+	-
	9	++ ++	+	++	++	++ ++	-	-	++ ++	++ ++	++ ++	-	-	-	-	+	-	-	-
	10	+	++ ++	++	-	-	-	+	-	-	++ ++	++	-	-	-	+	-	-	+
	11	++	+	+	++	-	++ ++	++ ++	-	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	+	-	+	-	++ ++	++
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++ ++	-	++ ++	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++ ++	-	-	-	-
	14	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG
	16	-	++ ++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	++ ++	-	-	++ ++	++ ++	-	+
19	+	-	++	-	-	++ ++	++	-	+	++ ++	++ ++	-	-	-	-	-	++ ++	++ ++	
20	-	-	-	-	-	++ ++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++ ++	

Tableau n° 11 : Agglutinations des bactéries non chauffées.



Agglutinations fortes



Agglutinations moyennes



Agglutinations faibles



Auto-agglutination

Le tableau n° 11 montre que certaines souches sont agglutinées de façon similaire par différents sérums. C'est le cas d'une part des souches n° 11 et n° 19 et d'autre part des souches n° 1, n° 8 et n° 9. Les souches semblent être, à priori, agglutinées par les mêmes sérums et leurs sérums agglutinent les mêmes souches.

4.1.2. Celules entières chauffées : (1h à 100 °c)

L'agglutination des souches par les sérums homologues est nette et rapide.

Le tableau n° 12 montre que les agglutinations des cellules chauffées sont moins importantes que celles des cellules non chauffées.

Le chauffage des cellules entraîne plusieurs conséquences.:

- Une disparition des agglutinations de faible intensité.
- Moins d'agglutination croisées qu'entre les cellules non chauffées et les sérums. Toutefois certaines souches montrent plus croisements. C'est le cas des souches n° 7 et n° 20.
- Une disparition de certaines agglutinations croisées de forte intensité. C'est le cas de la souche n° 6.
- Apparition d'agglutinations nouvelles mais relativement peu importantes.

Bien que la nature des antigènes impliqués dans nos observations soit hypothétique, il est probable que les agglutinations observées correspondent à des antigènes protéiques pour ceux qui ont disparu totalement ou partiellement pendant le chauffage, alors que ceux qui ont résisté sont certainement de nature polysaccharide ; ce qui confirme les travaux de TUNSTALL et GOWLAND (1975) qui suggèrent l'existence de plusieurs (3) antigènes de natures différentes chez les Pseudomonas.

L'hétérogénéité sérologique de nos souches paraît, à priori, très grande et nos résultats ne nous permettent pas un groupage sérologique. Toutefois, nous pouvons rapprocher quelques souches entre elles. Ainsi les souches n° 1, n° 4 et n° 5 voire la souche n° 6 ont probablement un ou plusieurs antigènes thermostables (Antigène "O") en commun ainsi que les souches n° 19 et n° 20 entre elles. La majorité des souches utilisées dans cette étude ne peut donc être groupées sur la base des antigènes O. Il est donc impossible d'utiliser ces structures pour détecter ou dénombrer les Pseudomonas isolés de viandes.

4.2. Agglutination des cellules non chauffées et chauffées

4.2.1. Par des sérums actifs contre les différentes préparations de paroi et de mucopeptide

- avec les bactéries non chauffées (Tableau n° 13), nous observons que des agglutinations ou presque.

Les souches n° 11 et n° 20 sont assez bien agglutinées par les anti-sérums de Mucopeptide de souches n° 20 et n° 38 et faiblement par les antisérums de Parois n° 12 et n° 20. Les souches n° 19 et n° 20 sont nettement agglutinées par les antisérums des différentes préparations, excepté les antisérums des parois n° 12 et n° 27 qui n'agglutinent pas la souche n° 20.

- Les mêmes expériences réalisées avec les cellules chauffées 1h à 100 °c (Tableau n° 14) montrent que les résultats sont très peu modifiés.

Les souches n° 19 et n° 20 sont les plus agglutinées. Le chauffage fait apparaître de nouvelles agglutinations : c'est ce que nous observons avec l'antisérum du Mucopeptide de la souche n° 38, qui agglutine les souches n° 7, 8, 9, 10, 11, 16, 19 et n° 20.

4.2.2. Par des sérums actifs contre les préparations de Pr-L.P.S. (Tableau n°15 et n° 16)

Des résultats voisins de ceux du paragraphe précédent sont observés avec les anti-sérums de souches n° 12 et n° 20 sur les cellules non chauffées.

Le chauffage des cellules augmente considérablement les possibilités de croisements. Ainsi l'antisérum de la souche n° 27 qui n'agglutinait pratiquement aucune souche réagit avec 7 des 16 souches chauffées. Il en est de même avec les antisérums de Pr-L.P.S. de souches n° 12 et n° 20 qui agglutinent 11 et 9 souches sur 16. (Tableau n° 16).

Les sérums obtenus avec le complexe Pr-L.P.S. donnent de meilleurs résultats avec les cellules entières chauffées 1 h à 100 °c (Tableau n° 16) qu'avec les cellules entières non chauffées (Tableau n° 15).

		SÉRUMS						
		PAROIS				MUCOPEPTIDES		
		12	20	27	38	20	27	38
SOUCHES	1	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—	—
	6	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG
	7	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG
	8	—	—	—	—	—	—	—
	9	—	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	—
	11	+	+	—	—	+++	—	++
	12	++	AG	AG	AG	AG	AG	AG
	13	—	—	—	—	—	—	—
	16	—	—	—	—	—	—	—
19	++	+++	+++	+	+++	++	++	
20	—	++	—	++	+++	+++	+++	

Tableau n° 13 : Agglutinations des cellules bactériennes non chauffées par des sérums actifs contre diverses préparations de parois et de mucopeptides

		SERUMS				SERUMS			
		Pr-LPS 12	Pr-LPS 20	Pr-LPS 27	Pr-LPS 38	Pr-LPS 12	Pr-LPS 20	Pr-LPS 27	Pr-LPS 38
SOUCHES	1	-	-	-	-	-	+	-	-
	2	-	-	-	-	+	-	+	-
	3	-	-	-	-	+	+	-	-
	4	-	-	-	-	+	+	-	+
	5	-	-	-	-	-	+	-	-
	6	AG	AG	AG	AG	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	+	+	+	+
	8	-	-	-	-	+	+	+	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	+
	11	++	-	-	+	+	-	-	+
	12	+++ ++	-	-	-	+++	AG	AG	AG
	13	-	-	-	-	+	-	+	-
	16	-	-	-	-	+	+	+	+
19	-	+++	-	+	+	+	+	++++	
20	-	+++	-	-	+	+	+	++++	

N° 15

N° 16

Agglutinations des bactéries par diverses préparations de Pr-L.P.S.

Tableau n° 15 : Bactéries non chauffées

Tableau n° 16 : Bactéries chauffées

III. PAROIS CELLULAIRES

1. Obtention des enveloppes cellulaires

1.1 Fractionnement cellulaire, à la French-press

Cette méthode décrite pour Eschérichia coli, par SCHNAITMAN (1970), ne semble pas être extrapolable aux Pseudomonas de la viande ; du moins dans les mêmes conditions décrites par l'auteur. En effet, le premier passage de toutes nos suspensions bactériennes (10 ml par souche) sous une pression de deux tonnes, n'était pas concluant. Aussi nous avons augmenté la pression jusqu'à cinq tonnes.

Le broyat (de la souche n° 13) ainsi obtenu est récupéré dans un tampon HEPES 0,01 M pH 7,4. Après décongélation complète, la suspension est centrifugée à 5000 rpm pendant dix minutes. Le culot contenant les cellules intactes est éliminé et le surnageant est observé au microscope optique à fort grossissement (X400) : les cellules semblent immobiles et "éclatées".

D'autre part, une goutte de ce surnageant est colorée à l'acide phosphotungstique à 2% pH 6,0. Observée au microscope électronique à transmission, cette préparation confirme l'éclatement cellulaire observé au microscope optique.

Les modifications apportées (5 tonnes au lieu de 2), nous ont permis d'obtenir une préparation d'enveloppes cellulaires (photo n° 1) proche de ce qui a été observé par SCHNAITMAN (1970).

1.2 Fractionnement cellulaire par les billes de verre

Cette méthode est d'application simple, mais elle est peu précise. En effet, la quantité de billes de verre et la durée de broyage dans le Warring-Blendor ne sont pas bien définies dans les publications qui font référence à cette technique. D'autre part, celle-ci n'a jamais été décrite pour les Pseudomonas des produits carnés.

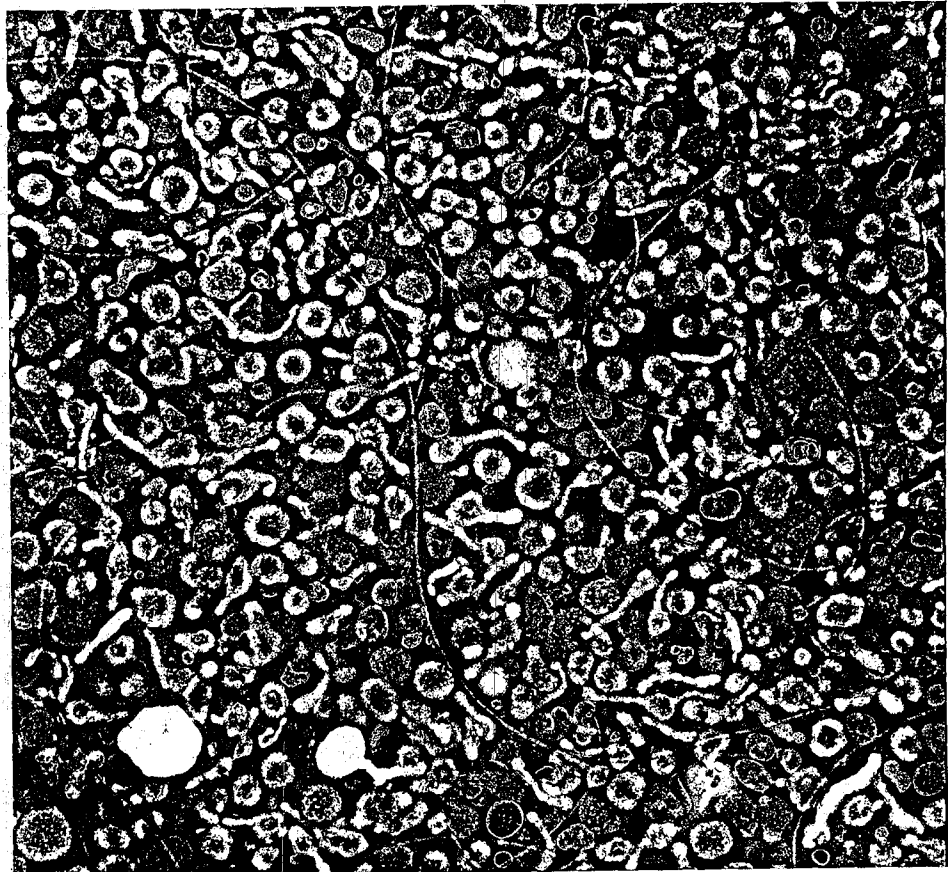


Photo n° 1 : Examen en microscopie électronique des enveloppes cellulaires, obtenues par fractionnement à la French-press, de Pseudomonas biotype I, souche n° 13, (G x 37500).

Pour l'adapter à nos souches, nous avons apporté quelques modifications. Ces modifications sont les suivantes : à 150 grs (en poids humide) de culture bactérienne, on ajoute 50 grs de billes de verre de 2 mm de diamètre. Un broyage d'une minute à + 4° C, nous permet d'obtenir une assez bonne préparation d'enveloppes cellulaires de quelques unes de nos souches.

Une centrifugation douce (5000 rpm pendant 10 minutes) permet d'éliminer les cellules non éclatées dans le culot.

L'examen en microscopie électronique du surnageant riche en enveloppes cellulaires de la souche n° 13, confirme l'éclatement cellulaire par cette méthode (photo n° 2). Cet examen ne permet cependant pas de différencier le résultat ainsi obtenu de celui de la méthode précédente.

Après solubilisation et électrophorèse sur gel de polyacrylamide des enveloppes cellulaires (5 mg de protéines par ml de tampon d'extraction, dosées au BIURET) de la souche n° 13 et d'autres souches ainsi traitées, nous avons obtenu des profils électrophorétiques très similaires (figure n° 8). Ce résultat semble confirmer la proximité taxonomique de nos souches . Par ailleurs, ces profils montrent que le traitement des bactéries par des billes de verre, a les mêmes effets quelles que soient les souches.

2. Séparation des membranes cellulaires

2.1 A l'aide de Triton X-100

L'addition du Triton X-100 à une suspension d'enveloppes cellulaires doit, théoriquement, permettre d'obtenir, après centrifugation, une fraction soluble de membranes cytoplasmiques et une fraction insoluble riche en membranes externes.

Cette méthode est très souvent employée par de nombreux auteurs. Nous l'avons testée et répétée plusieurs fois sur quelques unes de nos souches, notamment sur la souche n° 13. Malheureusement, nous n'avons obtenu aucun enseignement valable. En effet, l'examen en microscopie électronique rapporté sur les photos n° 3 et n° 4 ne permet pas d'apprécier la qualité de nos préparations. Le même constat d'échec a été observé sur gel de polyacrylamide.

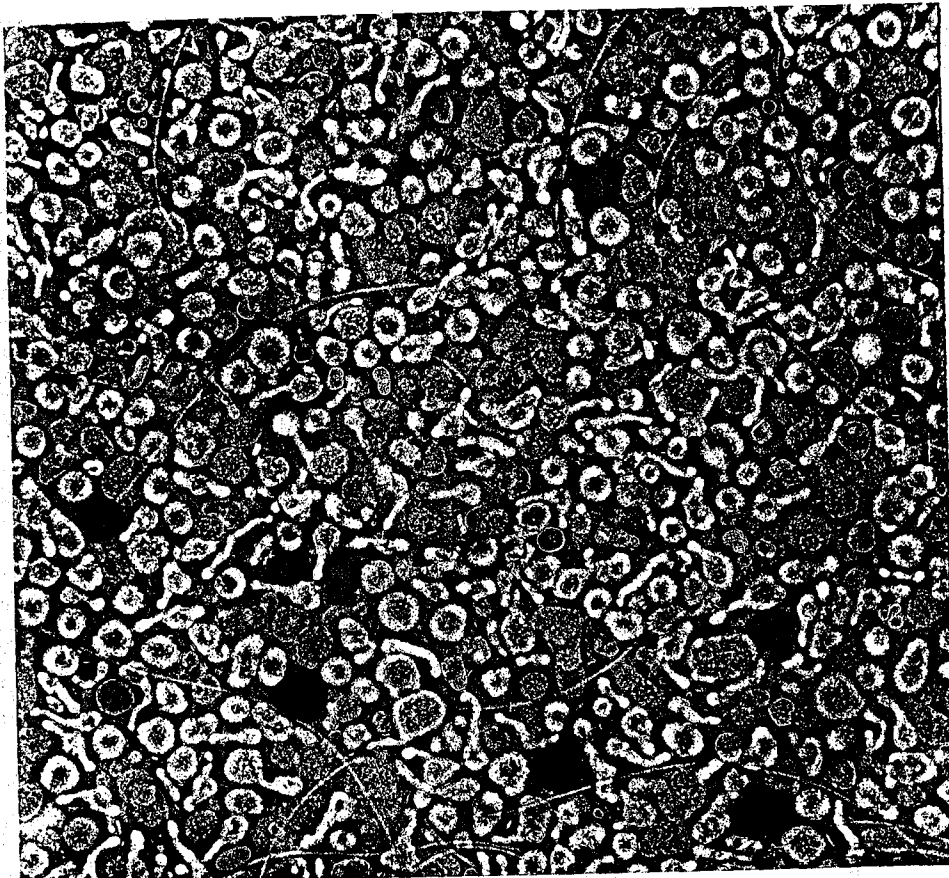


Photo n° 2 : Examen en microscopie électronique des enveloppes cellulaires, obtenues par fractionnement aux billes de verre, de Pseudomonas biotype I, souche n° 13, (G x 37500).

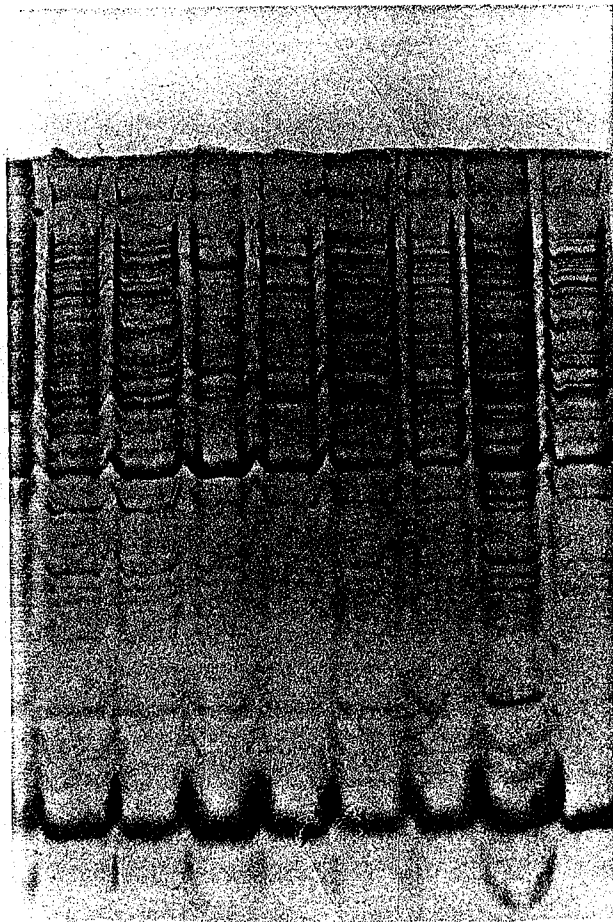


Figure n° 8 :

Analyse électrophorétique sur gel de polyarylamide S.D.S. des enveloppes cellulaires, de quelques souches de Pseudomonas de viandes, obtenues par traitement aux billes de verre.

Quantité de protéines déposées = 40 µg/puit.

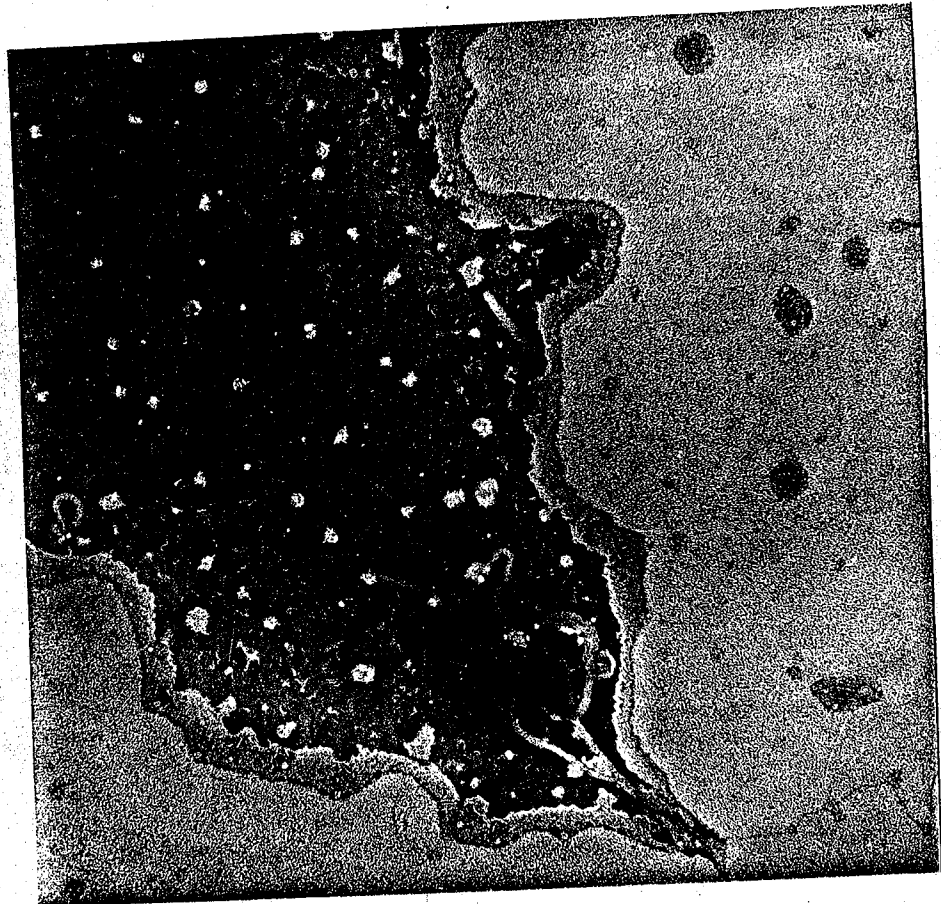


Photo n° 3 : Examen en microscopie électronique, membranes cytoplasmiques (fraction soluble au Triton X-100) de Pseudomonas biotype I, souche n° 13, (G x 49500).

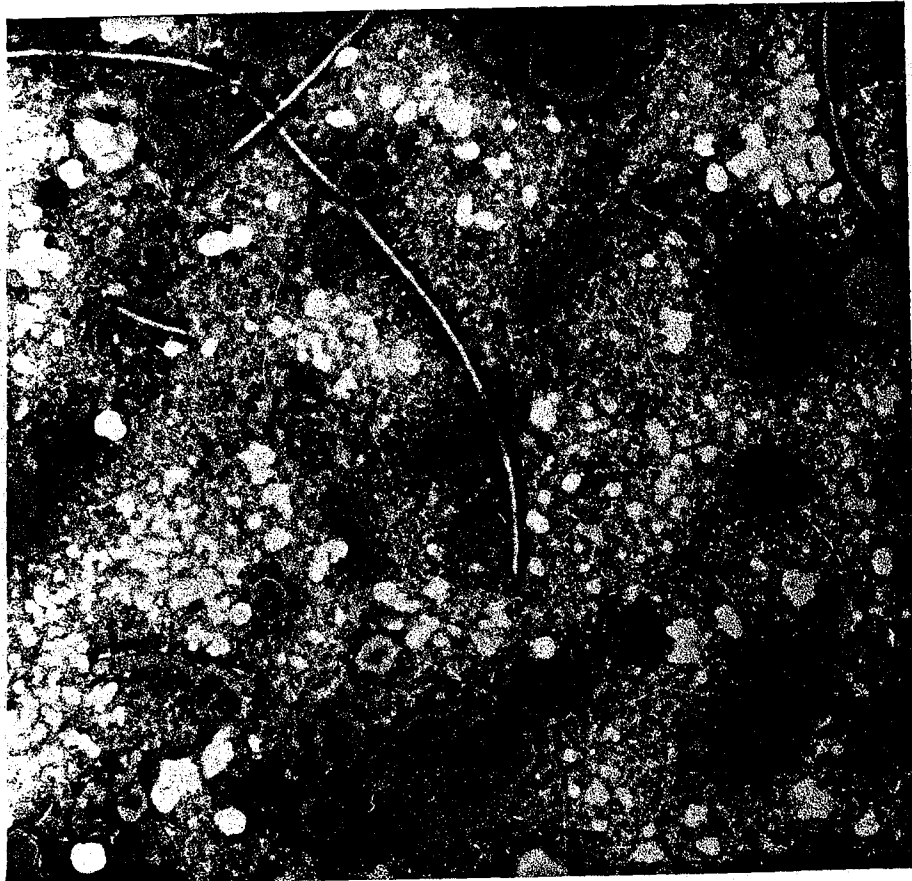


Photo n° 4 :

Examen en microscopie électronique des membranes
externes (fraction insoluble au Triton X-100)
de Pseudomonas biotype I, souche n° 13,
(G x 64500).

2.2 A l'aide de tampon Tris-E.D.T.A.-lysozyme

Le tampon Tris-E.D.T.A. - lysozyme permet, théoriquement, de libérer les membranes externes et les sphéroplastes. Nous l'avions testé sur la souche n° 13.

La qualité des préparations de ces membranes est appréciée par l'observation en microscopie électronique à transmission et par les profils obtenus sur gel de polyacrylamide en présence de S.D.S..

- Au microscope électronique, les sphéroplastes apparaissent sous forme de vésicules éclatées (photo n° 5). Le même phénomène est observé sur la préparation de membranes externes ; mais dans ce cas, les vésicules sont nettement plus petites (photo n° 6). Cependant, nous constatons quelques contaminations de la préparation des membranes externes par des fragments de flagelles. De ce fait, nous avons reproduit cette méthode d'extraction sur la même culture bactérienne (souche n° 13) en la faisant suivre d'un chauffage d'une heure à 100° C. Le résultat obtenu nous semble de meilleure qualité (photo n° 7).

- Profil électrophorétique (figure n° 9).
Dans les mêmes conditions d'extraction et d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de S.D.S., les résultats obtenus pour la souche n° 13 sont proches de ceux obtenus pour Pseudomonas aeruginosa PAO₁ et pour Escherichia coli.

La colonne C₁, montre que la membrane externe de la souche n° 13 (Pseudomonas isolé de viande) est constituée de 3 protéines majeures de poids moléculaire : 46.000, 37.000 et 28.000 daltons.

3. Purification des membranes

La purification des membranes cellulaires est souvent réalisée par centrifugation en gradient discontinu de saccharose. Aussi, nous avons essayé de purifier ces membranes à partir des enveloppes obtenues par fractionnement cellulaire à la French-press et à partir des membranes externes brutes et des sphéroplastes obtenus à l'aide de la méthode au Tris-E.D.T.A.- lysozyme.

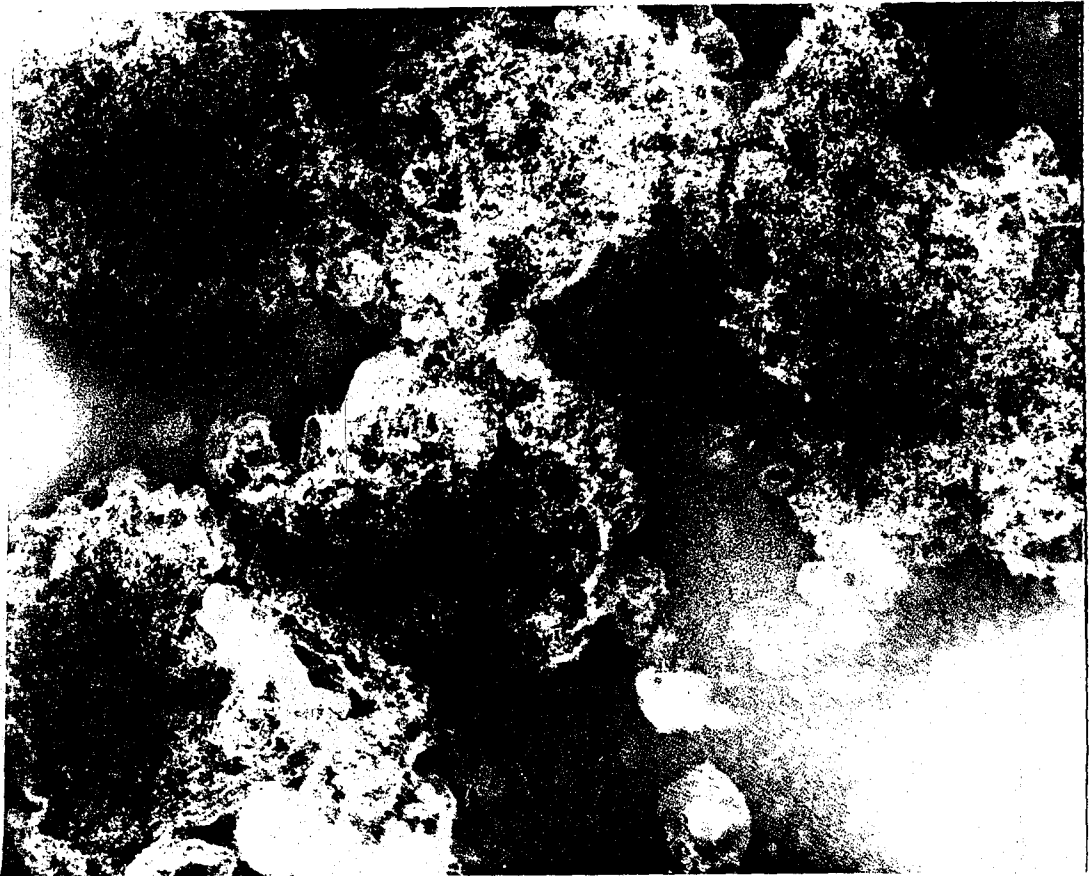


Photo n° 5 : Examen en microscopie électronique des sphéroplastes de pseudomonas biotype I, (souche n° 13), obtenus par fractionnement à l'aide de tampon Tris-E.D.T.A.-lysozyme (G x 75000).

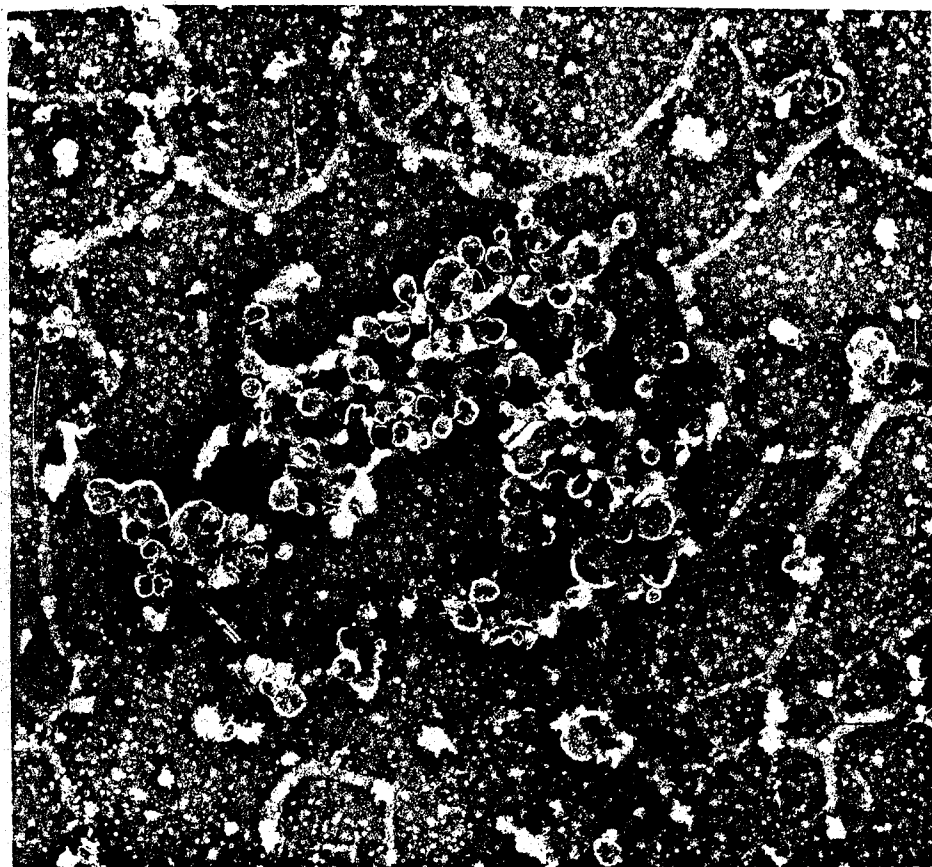


Photo n° 6 : Examen en microscopie électronique des membranes externes brutes, de pseudomonas biotype I, (souche n° 13, non chauffée), obtenues à l'aide de la méthode au Tris-E.D.T.A.-lysozyne, (G x 49500).

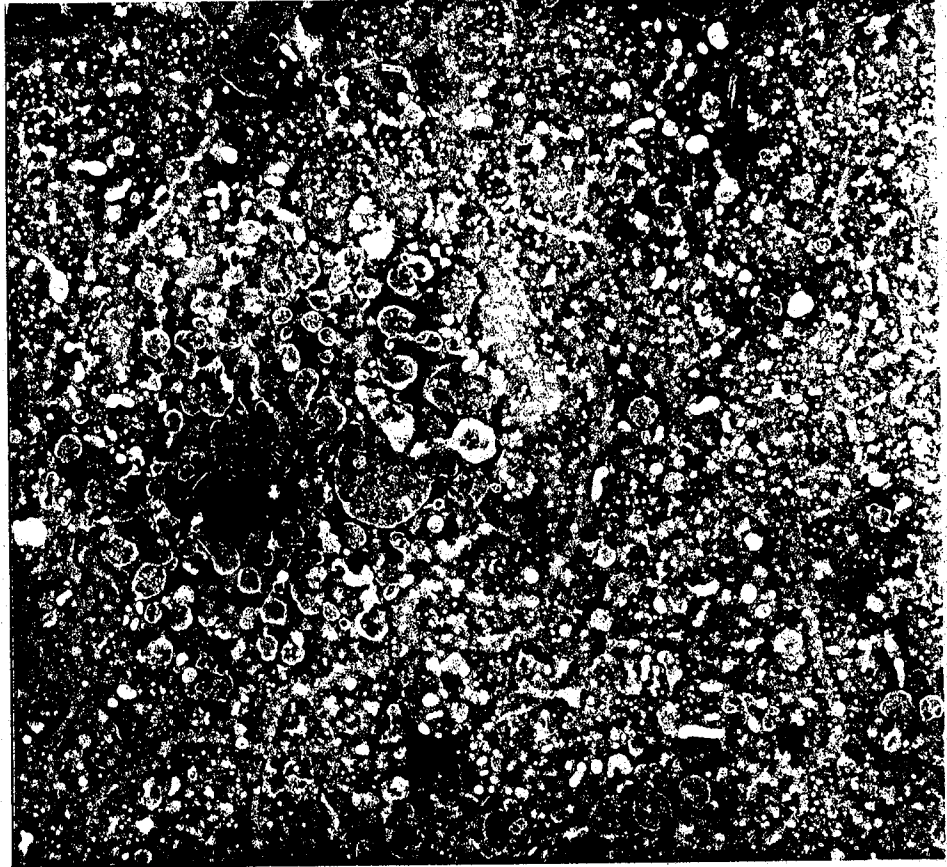


Photo n° 7 : Examen en microscopie électronique des membranes externes brutes, de Pseudomonas biotype I, (souche n° 13, chauffée 1 heure à 100° C), obtenues à l'aide de la méthode au Tris-E.D.T.A.-lysozyne, (G x 49500).

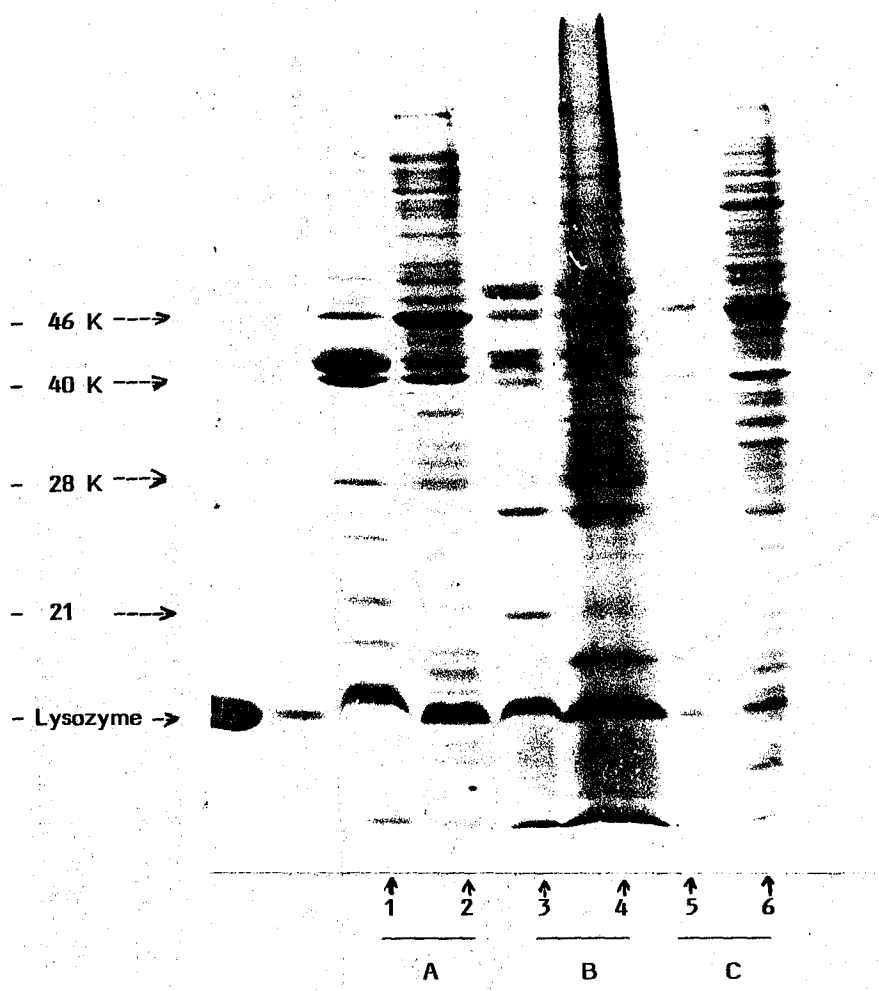


Figure n° 9 :

Analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide-S.D.S. des membranes externes obtenues à l'aide du Tris-E.D.T.A.-lysozyme.

A = <u>Ps aëruqinosa</u>	1 = Membranes externes 20 µg
	2 = Enveloppes cellulaires 30 µg
B = <u>E. coli</u>	1 = Membranes externes 20 µg
	2 = Enveloppes cellulaires 35 µg
C = <u>Ps. souche n° 13</u>	1 = Membranes externes 10 µg
	2 = Enveloppes cellulaires 20 µg

3.1 A partir des enveloppes cellulaires

Cette méthode mise au point par SCHNAITMAN (1970) pour Escherichia coli n'est peut-être pas facilement extrapolable à d'autres bactéries tels les Pseudomonas de la viande. En effet, selon cet auteur, la membrane cytoplasmique se retrouve dans la zone correspondant à 36 % de saccharose et la membrane externe dans celle à 52 % de saccharose.

Pour des raisons matérielles, nous n'avons réalisé de centrifugation qu'à environ 90.000 g au lieu de 131.000 g, mais nous avons augmenté le temps de centrifugation de 24 h à 36 h voire 48 h. Malgré ces modifications, nous n'avons pas pu séparer les membranes par cette méthode. En effet, tous nos échantillons à analyser étaient retrouvés au fond des tubes de centrifugation.

3.2 A partir des membranes externes brutes et des sphéroplastes

Ce travail est un peu plus facile à mettre en oeuvre. En effet, les membranes obtenues à l'aide de tampon Tris-E.D.T.A.-lysozyme sont bien séparées (voir paragraphe sur la séparation des membranes).

Le gradient discontinu de saccharose doit permettre de les purifier.

Là aussi, nous avons apporté quelques modifications sur la vitesse et la durée de centrifugation. Ainsi, avec une centrifugation de 90.000 g pendant 48 h à + 4° C. nous avons obtenu un résultat apparemment convenable. En effet, le densitogramme d'éluion obtenu (figure n° 10) est proche de ce qui est décrit pour Pseudomonas aëruiginosa, malgré un fractionnement manuel du gradient.

Ce densitogramme nous permet de caractériser les membranes.

4 - Caractérisation des membranes

Dans ce travail, nous nous sommes occupés de la membrane externe qui présente un intérêt pour la suite de notre travail. Pour celà, nous avons réuni les fractions 5 à 13 (figure n° 10) correspondant au pic de densité optique de la préparation de "membranes externes". A partir de ces fractions, nous voulions réaliser les dosages enzymatiques (S.D.H. et K.D.O.) qui seuls permettraient d'apprécier, à coup sûr, la qualité de notre préparation. Malheureusement, nous n'avons pas pu réaliser ce travail. Nous nous sommes limités à l'image électrophorétique et à l'observation au microscope électronique.

4.1 Electrophorèse

Après centrifugation des fractions "riches en membranes externes", un culot est obtenu. Ce dernier est solubilisé dans un tampon de solubilisation pH 8,3.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a permis d'obtenir le profil électrophorétique de ces fractions (figure n° 11).

Nous remarquons la présence de quatre protéines (20.000 ; 28.000 ; 37 000 et 46 000 daltons) avec une nette dominance de la protéine de 37 000 (même poids moléculaire que la tropomyosine prise comme référence). Cette protéine pourrait correspondre à la protéine F de Pseudomonas aeruginosa dont le poids moléculaire peut varier selon de nombreux auteurs entre 35 et 42 000 selon le traitement subi aux cellules.

4.2 Microscopie électronique

L'examen en microscopie électronique montre bien qu'il s'agit de vésicules très fines. Quelques unes apparaissent sous forme d'un C ouvert (photo n° 8).

De plus, cette préparation est peu contaminée par des fragments de flagelles, ce qui montre l'intérêt du chauffage (1 h à 100° C) sur de telles structures.

D'autre part, si nous n'avons aucune preuve qu'il s'agit de membranes externes, ces caractéristiques sont très proches de celles décrites par MIZUMO et KAGEYAMA (1978).

IV - EXTRACTION DE PROTEINES MAJEURES

=====

1. A partir des cellules entières

Nous avons essayé d'extraire la protéine I et notamment la protéine F par la méthode décrite pour Pseudomonas aeruginosa, par HANCOCK et CAREY (1979).

Nous n'avons pas pu avoir de résultats convaincants.

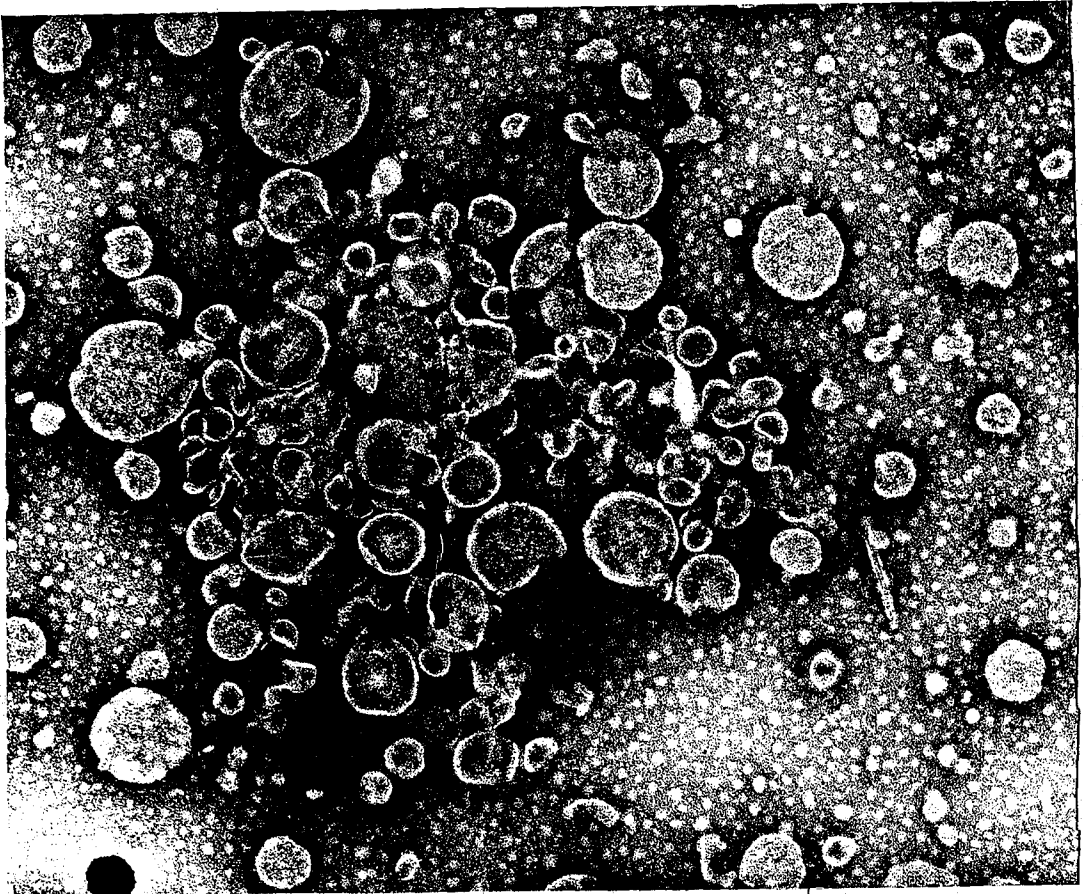


Photo n° 8 :

Examen en microscopie électronique des membranes externes purifiées par gradient discontinu de saccharose, de Pseudomonas biotype I, (souche n° 13), (G x 864 00).

2. A partir des enveloppes cellulaires

A partir des enveloppes cellulaires extraites à l'aide de billes de verre suivi d'un traitement par un tampon dissociant (2 % SDS - 10 % glycérol - 10 mM Tris-HCl pH 7,8) à 30° C, nous avons obtenu différentes fractions (A et C) et notamment une fraction D, très enrichie en protéine "F" associée au peptidoglycane (figure n° 12, colonne 2).

Notre résultat montre qu'il est parfaitement possible de séparer cette protéine par ce procédé. Un poids moléculaire de 40.000 daltons environ semble confirmer son identité avec la protéine F décrite chez Pseudomonas aeruginosa. De ce fait, nous avons adopté cette terminologie pour notre protéine, même si nous demeurons convaincus qu'il ne s'agit peut-être pas de la même.

L'addition d'un tampon (2 % Triton X-100, Urée 6 M, 10 mM Tris-HCl pH 7,4) à la fraction D, suivi d'une incubation de 60 minutes à + 40° C, ensuite d'une centrifugation à 100.000 g pendant 60 minutes à + 25° C, nous ont permis d'obtenir un surnageant enrichi en protéine "F". Après précipitation à l'acétone et solubilisation par un tampon de solubilisation pH 8,3, la protéine "F" (1 mg/ml) apparaît très purifiée sur gel de polyacrylamide coloré au bleu brillant de COOMASSIE R250 (figure n° 12, colonne 3).

3. A partir de gel de polyacrylamide

Nous avons fait migrer la fraction D traitée comme précédemment, sur un gel de polyacrylamide de 12 cm de hauteur, nous avons découpé ce gel en 24 fractions de 0,5 cm chacune. Ces fractions sont reprises dans le tampon P.B.S.. Le dosage des protéines par la méthode de BRADFORD (1976) montre qu'il n'y a qu'une fraction qui contient des protéines (0,47 mg/ml de P.B.S.).

Par comparaison à la partie colorée du gel, cette fraction correspond bien à la bande protéique "F" (40.000 daltons environ).

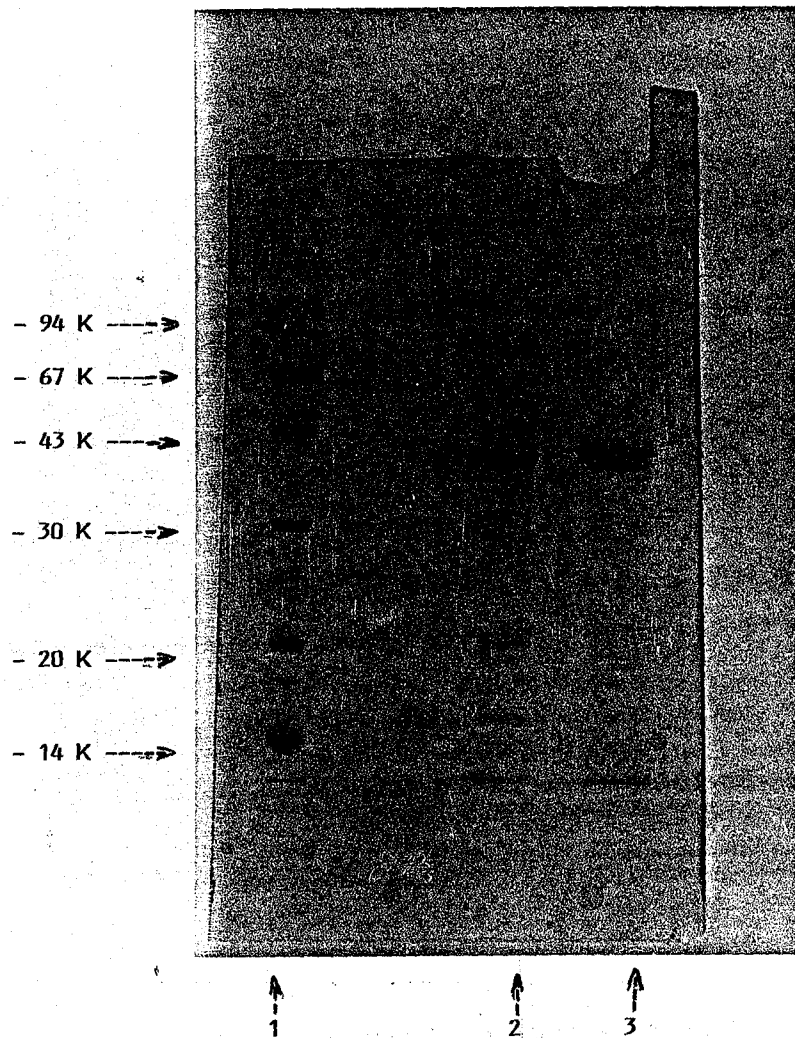


Figure n° 12 :

Analyse électrophorétique gel de polyacrylamide S.D.S.

1 - Kit "LMW" standard

2 - Fraction D, riche en protéine "F" (15 µg)

3 - Protéine "F" de Pseudomonas biotype I, (souche n°13) (10 µg).

V - ESSAI D'IDENTIFICATION DES PSEUDOMONAS

=====

(par le sérum anti-protéine "F").

De part sont accessibilité de l'extérieur de la bactérie, par sa présence systématique dans tous les profils des membranes externes et surtout par la facilité de son extraction, la protéine "F" apparaît comme un constituant bactérien de choix pouvant éventuellement permettre l'identification des cellules entières.

L'anti-sérum préparé contre cette protéine est obtenu par vaccination, intradermique, d'un lapin avec la fraction D traitée par le tampon dissociant.

Cet anti-sérum reconnaît bien la fraction n° 12 décrite précédemment (figure n° 13) correspondant à la protéine "F" mais n'interfère pas avec les autres fractions. Ce résultat indique bien que la fraction D utilisée contient un antigène dominant.

1. Agglutination, sur lame, des cellules entières

Le tableau suivant (tableau n° 17) montre que le sérum anti-protéine "F" de la souche n° 13 reconnaît bien Ps. fluorescens, Ps. fragi, Ps. putida et pas les autres bactéries à gram négatif testées ; à l'exception toutefois de Serratia liquefaciens.

SOUCHES TESTEES	AGGLUTINATION
Ps. fluorescens	+
Ps. putida	+
Ps. aeruginosa	-
Ps. fragi	+
S. typhimurium	-
S. dublin	-
S. panama	-
S. seftenberg	-
E. coli (014)	-
E. coli (K12)	-
E. coli (K99)	-
C. freundii	-
E. aerogenes	-
P. mirabilis	-
P. vulgaris	-
E. hafniae	-
S. liquefaciens	+
Y. enterocolitica	-
Flavobacterium sp.	-

Tableau n° 17 : Agglutinations de divers gram (-) par un sérum anti "F".

Le croisement avec Serratia liquefaciens peut correspondre soit à des contaminations par des Pseudomonas soit à une copurification avec la protéine "F" d'un autre antigène présent chez les deux bactéries.

2. Agglutination en plaques de microtitration

Les résultats obtenus en plaques de microtitration confirment ceux obtenus sur lame de verre.

En plus, le sérum anti-protéine "F" même dilué au 1/512^{ème} (10^{ème} dilution au 1/2) dans un tampon PBS, agglutine les Pseudomonas de la viande et Serratia liquefaciens mais n'agglutine pas les autres bactéries à gram négatif.

Nos résultats montrent que les Pseudomonas de la viande et peut-être Serratia liquefaciens, sont reliées sérologiquement par au moins une protéine et que si biochimiquement le profil électrophorétique, des membranes externes des Pseudomonas isolés de viande, est proche de celui de Ps. aeruginosa, il ne semble pas exister de communauté antigénique, du moins à ce niveau, entre cette bactérie et les Pseudomonas de la viande.

VI. ESSAI DE DETECTION RAPIDE DES PSEUDOMONAS

=====

1. Mise en évidence du caractère antigénique des protéines de la membrane externe

Nous constatons (figure n° 14) que les 24 fractions du gel d'électrophorèse de la membrane externe de la souche n° 13 montrent des réponses variables au test ELISA proposé.

Toutefois, il apparaît clairement que les pics d'activité correspondent exactement aux protéines "majeures" déjà caractérisées par ailleurs.

De plus, nous observons que la protéine "F" semble donner une réponse plus importante que les autres ; ce qui constitue un argument supplémentaire permettant de la choisir parmi les autres.

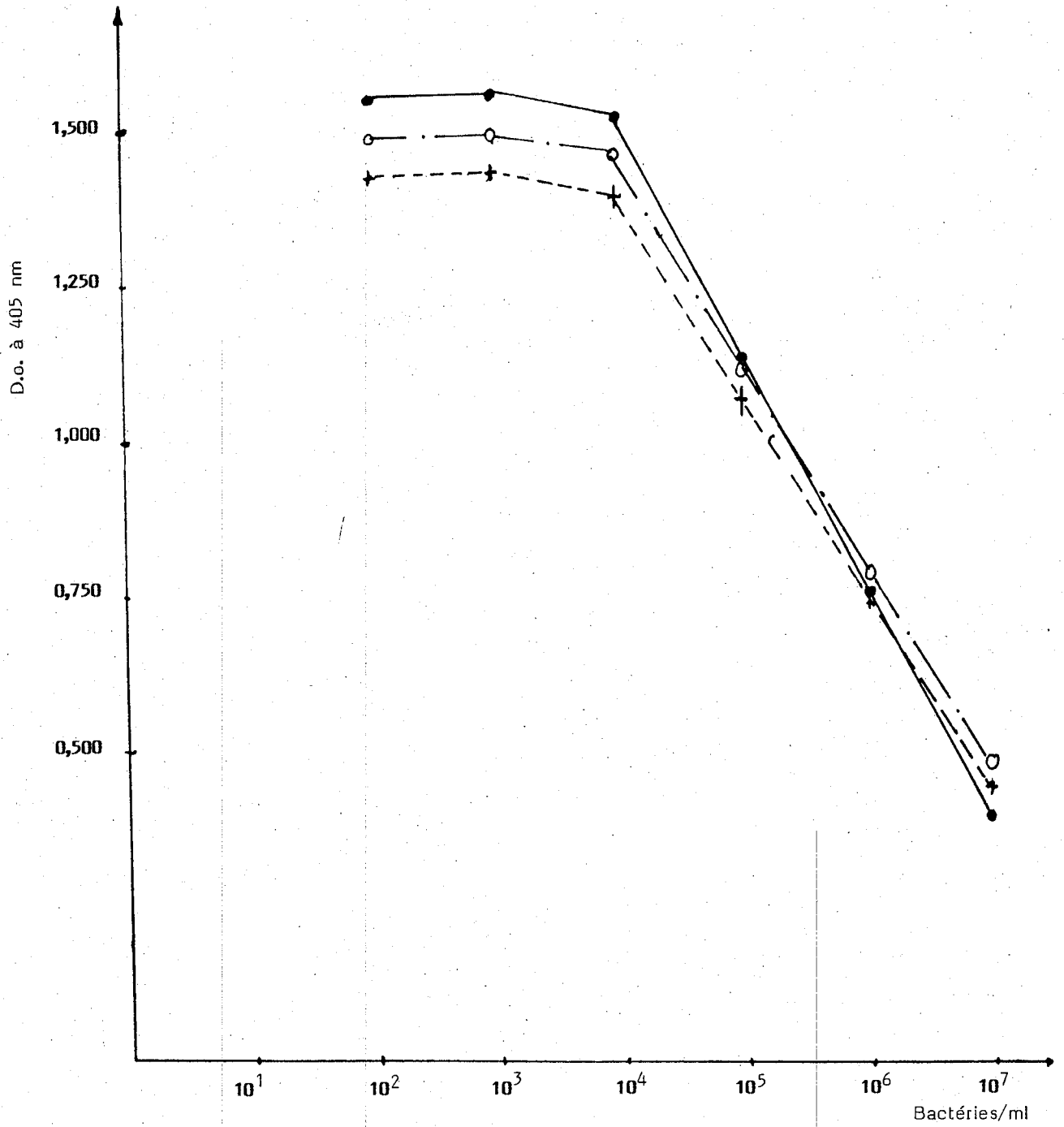
D'autre part, si nous avons choisi la membrane externe de la souche n° 13, c'est parce que cette bactérie ne semblait être agglutinée, ni par les sérums actifs contre les cellules entières chauffées (tableau n° 12) ou non chauffées (tableau n° 11), ni par les sérums actifs contre les préparations de parois et de mucopeptides (tableaux n° 13 et n° 14).

2. Dénombrement des bactéries à partir du sérum anti-membrane externe

2.1 Bactéries en culture pure

La figure n° 15 montre les communautés antigéniques existant entre les Pseudomonas utilisés dans ce travail. En effet, les courbes de compétition pour les anticorps produits contre la préparation de membranes externes de la souche n° 13 (préparation obtenue à l'aide de Tris-E.D.T.A.-lysozyme), sont extrêmement proches les unes des autres, quelles que soient les bactéries utilisées.

Dans ces conditions, il est probable que la majorité des protéines mises en évidence par électrophorèse en gel d polyacrylamide constituent des antigènes communs aux Pseudomonas fragi, Ps. fluorescens et Ps. putida.



- ⋈ - - - - ⋈ : Souches n° 1, 2, 3, 4, 10
- — . — ○ : Souches n° 8, 9, 10, 11, 27, 14
- — — — ● : Souches n° 6, 7, 12, 16, 19, 20

Figure n° 15 : Courbes de compétition pour les anticorps actifs contre la membrane externe de Ps. fragi. (souche n° 13).

On note par ailleurs, que les quelques différences observées dans la composition des protéines des membranes externes (figure n° 8) ne semblent pas influencer notablement la réponse des souches présentant ces différences.

La sensibilité du test mis au point dans ce travail est relativement faible dans la mesure où nous ne sommes capables que de détecter 10^4 bactéries/ml. Cette valeur constitue ainsi une limite qui ne peut en aucun cas être considérée comme suffisante.

2.2 Bactéries de contamination naturelle

Les résultats des analyses faites sur 31 échantillons de viandes de commerce, confirment tout à fait les observations effectuées sur les souches de collection de notre laboratoire.

Les résultats obtenus dans cette partie de travail (figure n° 16) sont très proches de ceux obtenus avec les cultures pures. En particulier, la limite de sensibilité établie dans ces conditions est pratiquement identique.

Toutefois, ces tests sont très peu nombreux pour étendre nos résultats à toutes les viandes et produits carnés.

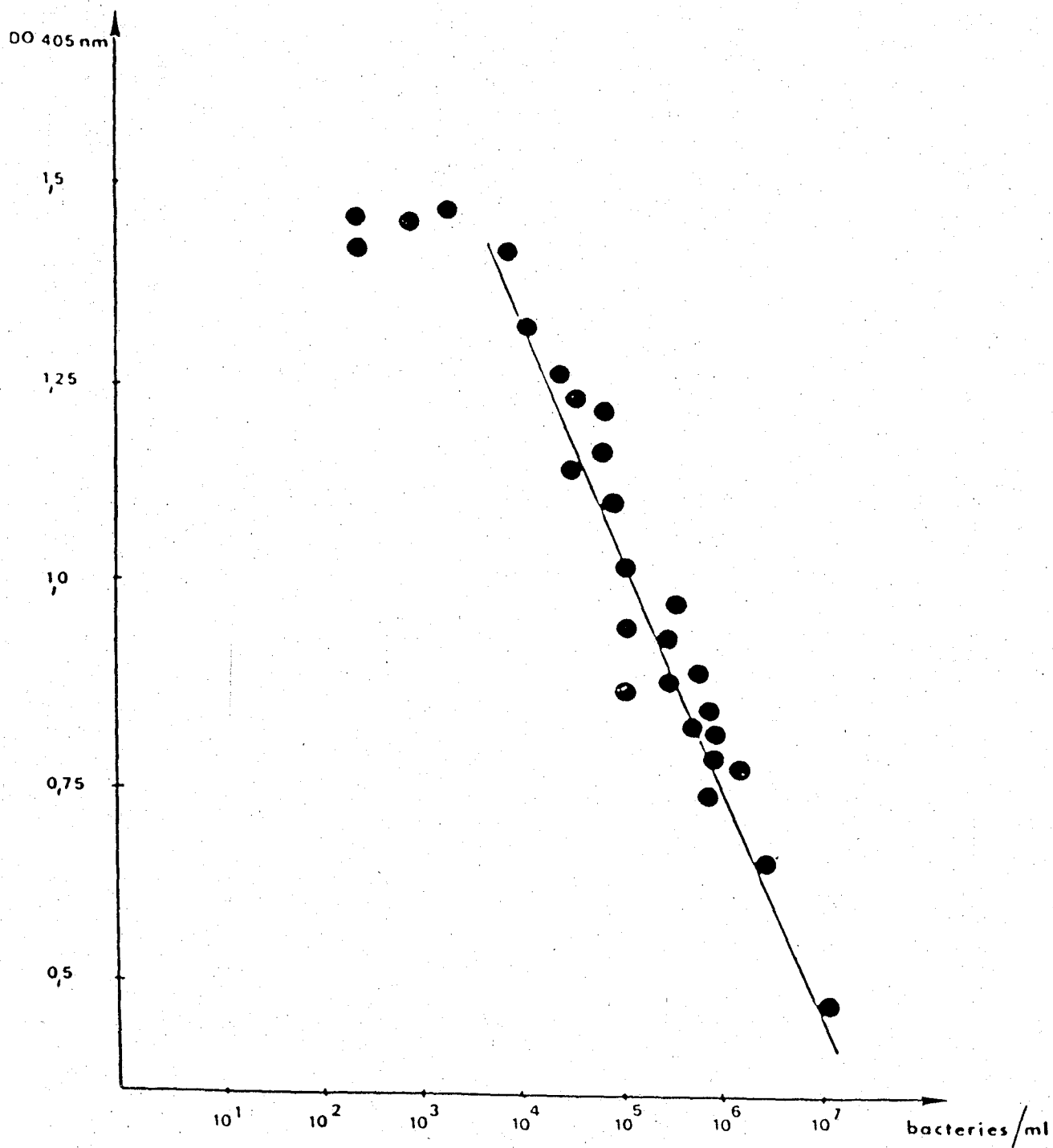


Figure n° 16 : Dénombrements des Pseudomonas par une méthode ELISA dans des échantillons de viande du commerce.

CONCLUSIONS

Les muscles d'animaux sains et abattus dans de bonnes conditions ne sont que rarement contaminés en profondeur. Mais, par les différents traitements et les différentes manipulations qu'elle subit avant sa commercialisation, la viande est inévitablement contaminée en surface. C'est donc de la charge microbienne initiale et des conditions de stockage que vont dépendre les délais de conservation et la qualité bactériologique.

Un des moyens de conservation des viandes, le plus utilisé est le froid. Ce dernier exerce, en effet, une action bactériostatique sur la quasi-totalité des microorganismes, à l'exception toutefois des psychrotrophes tels que les Pseudomonas non pathogènes. Ces bactéries malgré une phase de latence allongée, continuent à se multiplier activement aux températures généralement utilisées pour conserver la viande à l'état réfrigéré (0°C - 6°C) et en aérobiose. Il est donc évident que moins les Pseudomonas sont nombreux en début de conservation, plus le temps de stockage peut être long.

Un certain nombre d'études taxonomiques ont été réalisées sur les Pseudomonas d'origine alimentaire. Mais toutes les tentatives faites pour les rattacher à une (des) espèce(s) donnée(s), n'ont rencontré qu'un succès partiel. En effet, en dehors de Pseudomonas fragi (non pigmenté), les autres Pseudomonas isolés des viandes semblent distincts des espèces décrites dans le manuel de BERGEY (8ème édition).

Aussi, les Pseudomonas, non pathogènes, posent un problème important aux technologues qui souhaitent disposer de techniques rapides pour les dénombrements des flores qui déterminent la conservabilité des matières premières.

Les inconvénients majeurs de la plupart des techniques nouvelles décrites, tiennent à leur coût et surtout à la difficulté de leur mise en oeuvre.

Les méthodes sérologiques mettant en jeu la réaction spécifique : anticorps-antigène, tendent à se généraliser en biologie. Ces méthodes, d'emploi facile, nécessitent tout de même un choix judicieux du ou des antigène(s).

L'étude des antigènes thermostables, au niveau de la paroi, du mucopeptide et du complexe Pr-L.P.S., des Pseudomonas isolés de viandes, à montrer l'hétérogénéité sérologique des micro-organismes isolés et caractérisés dans le cadre de ce travail. Le nombre limité de souches employées est certainement l'une des raisons majeures qui explique cette hétérogénéité. Toutefois, il paraît illusoire de vouloir réaliser un groupage sur la base des antigènes O. Les bactéries de ce genre sont biochimiquement extrêmement diversifiées et potentiellement très nombreuses à pouvoir contaminer et se multiplier dans les produits carnés. En effet, l'étude taxonomique, non approfondie, réalisée dans ce travail montre l'existence de plusieurs biotypes (fragi, biotype I, biotype II, fluorescens, putida).

D'autre part et à, l'exception d'une seule souche (N° 3) tous les tests d'agglutination de nos souches par des anti-sérums O (de l'Institut PASTEUR), se sont avérés négatifs. Seule une étude à partir de très nombreuses souches pourrait permettre de préciser l'étendue de l'hétérogénéité sérologique des Ps. fragi, Ps. fluorescens et Ps. putida isolés de viandes.

A l'heure actuelle, la classification sérologique de ces bactéries est inconnue.

Parmi les constituants bactériens renfermant le ou les antigènes pouvant servir au sérogroupage ou à l'identification de l'espèce, les protéines de la membrane externe sont des éléments de choix :

- Elles jouent un rôle important dans les interactions entre la bactérie et son hôte.
- Leur électrophorèse en gel de polyacrylamide-S.D.S., indique des similitudes quelles que soient les souches de la même espèce.

Des taxonomistes tels que NAKAJIMA et al., (1983) n'hésitent pas à utiliser ces similitudes pour différencier les espèces d'un même genre.

Plusieurs techniques d'obtention des enveloppes cellulaires, de séparation de membranes et d'extraction de protéines majeures sont décrites pour Eschérichia coli et Pseudomonas aeruginosa. Mais aucune d'elles n'a été réalisée, à l'heure actuelle, sur les Pseudomonas des viandes.

Au cours de ce travail, nous avons testé quelques unes des méthodes décrites. Nous n'avons pas toujours obtenu de résultats convaincants ; à l'exception de deux techniques :

- La première, décrite par MIZUMO et KAGEYAMA (1978), nous a permis d'obtenir de bonnes préparations de membranes externes, à l'aide de tampon Tris-E.D.T.A.-lysozyme.
- La deuxième, décrite par MIZUMO et KAGEYAMA (1979), nous a permis d'obtenir différentes fractions membranaires A, C et notamment la fraction D, enrichie en protéine "F", à l'aide de tampon : 2 % S.D.S. - 10 % glycérol - 10 mM Tris-HCl (pH 7,8).

L'analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide S.D.S., des membranes externes, montre :

- d'une part des similitudes quelles que soient les souches de Pseudomonas de viandes et d'autre part, la présence systématique d'une protéine de poids moléculaire voisin de 37 - 40000 daltons.

Cette protéine semble migrer au même point que la protéine "F" de Pseudomonas aëruçinosa.

Dans le cadre de notre travail, l'intérêt des membranes externes, ne réside pas tant dans les similitudes des profils électrophorétiques mais dans les communautés antigéniques qui existent entre les protéines structurales de ces membranes. Ces communautés antigéniques apparaissent clairement lorsque nous examinons les résultats du test ELISA sur les cultures pures.

Les résultats obtenus sur des Pseudomonas de contamination naturelle et de collection sont très proches. De ce fait, il est probable que les protéines majeures de la membrane externe sont antigéniquement très proches et qu'elles sont très répandues chez les Pseudomonas des viandes en général.

Les principales limites à l'utilisation du test ELISA que nous avons employé sont de deux ordres :

- Un manque relatif de sensibilité (10^4 bactéries/ml)
- L'existence éventuelle de viandes hachées dont la flore dominante n'est pas constituée de Pseudomonas.

Par ailleurs, la mise au point d'un test ELISA, à partir d'un ensemble protéique comme la membrane externe augmente le risque de croisements avec les protéines de membrane externe d'autres bactéries à gram négatif. Aussi, il serait préférable d'utiliser un nombre très limité de ces protéines (une ou deux), ce qui tendrait à diminuer, théoriquement, les risques de croisements.

Le choix de la protéine "F" paraît intéressant, notamment par sa spécificité d'agglutination et ce malgré le problème posé par Serratia liquefaciens.

Indépendamment de ces restrictions, les résultats acquis dans le cadre de ce travail sont prometteurs. De nombreux essais de détection, de dénombrement mériteraient d'être réalisés à partir de différents produits carnés.

Par ailleurs, l'identification rapide des Pseudomonas, par agglutination mériterait d'être largement développée afin de juger convenablement de la spécificité des réactions observées.

Enfin, une étude précise de la nature du ou des antigène(s) responsable(s) des agglutinations devra être menée.

Les progrès récents de la filière viande entraînent et entraîneront de plus en plus des concentrations d'entreprises avec automatisation des chaînes d'abattage voire de découpe et d'emballage. Dans ce contexte, la mise au point d'une technique rapide telle que le test ELISA proposé dans ce travail peut contribuer efficacement au contrôle continu des matières premières avant leur commercialisation.

Compte tenu de ses avantages (facilité d'emploi, fiabilité et coût peu élevé), cette technique pourrait rendre de grands services dans le contrôle des viandes dans mon pays et ce pour deux raisons.

- Les installations frigorifiques sont insuffisamment développées dans nos abattoirs, ce qui est lourd de conséquences bactériologiques sur les carcasses destinées à la consommation.
- Une grande part de viandes est actuellement importée. Le contrôle bactériologique est lent et souvent réalisé après dédouanement de la denrée.

A partir de ces deux constatations, un résultat donné en quelques heures permet de faire le tri de carcasses à la sortie des abattoirs, et au niveau des ports et aéroports ; pour n'admettre que les viandes présentant un maximum de garanties sur la plan bactériologique.

ANNEXES

A - MILIEUX DE CULTURE

GELOSE NUTRITIVE

Agar - Agar	12 grs
Tryptone Bacto (Difco)	10 grs
Protéose peptone	5 grs
Extrait de levure	5 grs
Glucose	5 grs
Eau distillée	1 litre

Ajuster à pH 7,4 - Autoclaver 20 minutes à 120 °C.

MILIEU D.P.T.S.

Désoxycholate de Sodium	1 gr
Peptone universelle T.P. (Peptone de caseine)	10 grs
Safranine	0,02 grs
Gélose	10 grs
Eau distillée	1 litre

Ajuster à pH 7,4 - Autoclaver 20 minutes à 120 °C.

MILIEU MINIMUM pour PSEUDOMONAS de EAGON ET PHIBBS (1971)

K_2HPO_4	7 grs
KH_2PO_4	3 grs
$(NH_4)_2SO_4$	1 gr
$Mg SO_4 \cdot 7H_2O$	0,11 gr
Glucose	5 grs
Agar *	10 grs
Eau distillée	1 litre

Ajuster à PH 7,0 - Autoclaver 20 minutes à 120 °C.

* L'agar est ajouté si on veut obtenir le même milieu mais solide.

B - TAMPONS

- PHOSPHATE DE SODIUM 0,1 M :

Solution A = $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,2 M Soit 27,6 grs/litre d'eau distillée

Solution B = $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 M Soit 53,65 grs/l

ou
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,2 M Soit 71,64 grs/l

Pour pH 7,3, prendre 115 ml de solution A et 385 ml de solution B et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

- PHOSPHATE DE POTASSIUM :

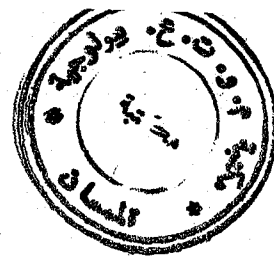
KH_2PO_4 - K_2HPO_4 ; 0,1 M et 0,01 M ; pH 5,8 - 7,7

Solution A : KH_2PO_4 ; 0,5 M (68,04 grs/l)

Solution B : K_2HPO_4 ; 0,5 M (87,09 grs/l)

0,01 M		
pH	Solution A (ml/litre)	Solution B (ml/litre)
5,8	-	-
5,9	17,9	2,1
6,0	17,3	2,6
6,1	16,8	3,2
6,2	16,1	3,84
6,3	15,3	4,6
6,4	14,4	5,5
6,5	13,4	6,56
6,6	12,4	7,6
6,7	11,2	8,8
6,8	10,0	10,0
6,9	8,86	11,1
7,0	7,7	12,3
7,1	6,64	13,3
7,2	5,66	14,34
7,3	4,76	15,24
7,4	3,36	16,0
7,5	3,26	16,7
7,6	2,7	17,3
7,7	2,2	17,8

Pour pH 7,2, prendre 5,66 ml de solution A et 14,34 ml de solution B ; compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.



- Tampon : 2 % SDS - 10 % Glycérol - 10 mM Tris-HCl pH 7,8

Pour extraction des enveloppes cellulaires selon MIZUMO et KAGEYAMA (1979) :

- A 500 ml d'eau distillée, ajouter 10 mM de Tris (P.M. = 121,14) soit 1,21 grs ; ajuster à pH 7,8 avec HCl 6 N.

Ajouter 20 grs de S.D.S. et 100 ml de Glycérol.

- Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

- P.B.S. Tween pH 7,4

	Pour 5 litres
NaCl	40 grs
KH_2PO_4	1 gr
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 12\text{H}_2\text{O}$	14,5 grs
KCl	1 gr
Tween	2,5 ml
H_2O	5 litres

C - ELECTROPHORESE

- Solution mère d'Acrylamide - Bisacrylamide

Acrylamide	30 %
Bisacrylamide	0,8 %
H_2O distillée	100 ml

- Solution tampon pour gel de séparation à pH 8,8

Tris - HCl	3 M
S.D.S.	0,8 %
B - Mercaptoéthanol	0,4 %

. Peser 36,9 grs de Tris 3M dans de l'eau distillée, ajuster à pH 8,8 avec HCl 3M (soit 24 ml d'HCl dans 100 ml) ; compléter à 100 ml avec de l'eau distillée. C'est à ce mélange que l'on ajoute le SDS et le B - Mercaptoéthanol.

- Solution tampon pour gel de concentration à pH 6,8

Tris - HCl	0,5 M
S.D.S.	0,4 %
B - Mercaptoéthanol	0,2 %

Prendre du HCl 0,5 M (soit 4 ml dans 100 ml d'eau distillée). Peser 6 grs de Tris 0,5 M dans 100 ml d'eau. Ajuster le pH à 6,8 en versant la solution Tris 0,5 M dans celle contenant du HCl 0,5 M et c'est à cette dernière solution que l'on ajoute le S.D.S. et le B - Mercaptoéthanol.

- Tampon d'électrophorèse à pH 8,3

		Pour 3,5 litres
Tris (P.M. = 121,14)	0,02 M	10,6 grs
Glycine (P.M. = 75,07)	0,192 M	49,9 grs
S.D.S.	0,1 %	3,5 grs
B - Mercaptoéthanol	0,05 %	1,75 ml

- Tampon de solubilisation des protéines, pH 8,8

Tris - HCl	0,05 M
Glycérol	7,5 %
S.D.S.	3,0 %
B - Mercaptoéthanol	1,0 %

- "KITS" de calibration "LMW" (poids moléculaire faible) de PHARMACIA.

Phosphorylase b.	94 000
Albumine	67 000
Ovalbumine	43 000
Anhydrase carbonique	30 000
Inhibiteur de la Trypsine	20 000
α - Lactalbumine	14 000

D - DOSAGE DES PROTEINES

- Méthode du BIURET

Prise d'essai	0,2 ml
Cholate de Sodium à 4 %	0,2 ml
NaOH à 10 %	2,3 ml
Sulfate de Cuivre à 1 %	0,3 ml

Bien mélanger la solution - laisser agir la réaction pendant 15 minutes.
Lire l'absorbance à 540 nm.

- Méthode de LOWRY et Al. (1951)

Réactif A = solution à 2 % de Na_2CO_3 dans NaOH 1N

Réactif B = solution à 1 % de Cu SO_4 dans l'eau distillée

Réactif C = solution à 2 % de Tartatre de Sodium et de Potassium dans l'eau distillée.

Réactif D = 1 ml de Réactif B + 1 ml de Réactif C, compléter à 100 ml avec le Réactif A. Ce Réactif D doit être préparé extemporanément.

Réactif E = Réactif de FOLIN-CIOCALTEU (MERCK).

La densité optique est lue à 750 nm.

- Méthode de BRADFORD (1976)

Réactif au bleu de Coomassie G 250 =

0,01 % (poids/volume) de bleu de Coomassie G 250

4,7 % (P/V) Ethanol

8,5 % Acide phosphorique

La densité optique est lue à 590 nm.

E - DOSAGE ENZYMATIQUE

* Dosage de la succinate déhydrogénase (S.D.H.)

Le dosage de la S.D.H. est réalisé dans la préparation membranaire supposée riche en membranes cytoplasmiques.

Technique

- Tampon phosphate 50 mM pH 7,6 contenant :

Ca Cl ₂	0,75 mM	soit	11 mg/100 ml
Cyanure de potassium	1,5 mM	soit	10 mg/100 ml
Sérume albumine	0,1 %	soit	100 mg/100 ml
Cysteine sulfate	3,0 mM	soit	46 mg/100 ml

- Préparer une solution de Phénazyne Méthosulfate (P.M.S.) = 55 mg/2 ml d'eau distillée.
- Préparer une solution de Dichlorophénolindophénol (D.C.I.P.) = 1 mg/2 ml d'eau distillée.
- Peser ces deux produits dans des tubes enveloppés de feuilles d'aluminium et n'ajouter l'eau qu'à la dernière minute.
- Peser 0,648 gramme d'Acide succinique dans 2 ml de tampon.

Mesure

- Elle se fait à 30 °c au spectrophotomètre réglé à 600 nm.
- Ajouter, successivement, dans une cuve :

Tampon	3 ml
Aliquote extrait à doser	0,05 ml
P.M.S.	0,1 ml
D.C.I.P.	0,1 ml
- Laisser agir en suivant l'évolution au spectrophotomètre pendant 10 minutes ; quand la cinétique du blanc est stabilisée, ajouter 0,1 ml d'Acide succinique.
- Enregistrer la variation de Densité optique pendant 10 minutes.

Calcul de l'activité enzymatique (A_e)

$$A_e = \frac{\Delta D.O. \times \text{Volume total} \times \text{dilution}}{E_o \times \text{Vol. aliquote} \times \text{temps en minutes}}$$

$$A_e = \mu \text{ mole transformé/mn}^{-1} / \text{ml}^{-1} / 30^\circ\text{c}$$

avec E_o = Coefficient d'extinction micromolaire de D.C.I.P. = 21,6

$$A_e = \frac{\Delta D.O. \times 3,25 \times 1}{21,6 \times 0,05 \times 10} = 0,31 \times D.O.$$

- A cette activité, il convient de retrancher l'activité équivalente à celle qui serait due à la variation de $\Delta D.O.$ due au blanc (sans substrat).
- Les résultats sont exprimés en final, en micromole de substrat transformé par minute, par gramme de protéine (déterminé par BIURET) à + 30°C.

* Dosage du 2-Kéto-3-Désoxyoctonate (K.D.O.)

Le dosage du K.D.O. est réalisé selon la technique décrite par OSBORN et AL. (1973). Comme témoin, nous utilisons le K.D.O. standard commercialisé par SIGMA.

Echantillon contenant 0,01 - 0,05 μ mole de K.D.O. standard.

Chauffer 8 minutes à 100 °c.

Ajouter 100 μ l de H₂SO₄ 0,25 N.

Laisser un certain temps à température ambiante.

Ajouter 50 μ l de HIO₄ 0,1 N.

Incuber 10 minutes à 55 °c.

Ajouter 200 μ l d'Arsenite de Sodium 4 % dans HCL 0,5 N.

Développer en ajoutant 800 μ l d'Acide Thiobarbiturique à 0,6 %.

Chauffer 10 minutes à 100 °c.

Secouer la solution finale en ajoutant 1 ml de Butanol contenant 5 % de HCL.

Centrifuger.

Mesurer l'absorbance à 552 nm et à 508 nm.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

ABSHIRE, R. and R. GUTHRIE (1973). - Fluorescent antibody as a method for the detection of fecal pollution *Escherichia coli* as indicator organisms. *Canadian Journal of Microbiology*, 19, 201-206.

ALLEN, P. - Development of the luminescence biometer for microbial detection. *Development in Industrial Microbiology*, 14, 1, 67-63.

ALEXIO, J.A.G., B. SWAMINATHAN and S.A. MINNICH (1984). - *Salmonella* detection in foods and feeds in 27 hours by an Enzyme Immunoassay. *Journal of Microbiological Methods* 2, 135-145.

BAILLIE, A. ; J. CROWTHER and A. BAIRD-PARKER, (1973). - The use of antibodies and other techniques for the detection of *Clostridium Botulinum*. London, Academic Press, 317-325.

BARNES, E.M., (1979). - The intestinal microflora of poultry and game birds during life and after storage. *Journal of applied Bacteriology* 46, 407-419.

BARTHOLIN, G. et B. BOUDET, (1973). - Recherche d'une méthode rapide de contrôle de la qualité Bactériologique en usine de conserves de légumes. *Bulletin d'informations techniques de la Station Expérimentale de DURY* n° 8, 57 p.

BAYER, M.E. and C.C. REMSEN (1970). - Structure of *Escherichia coli* after Freeze-Etching. *Journal of Bacteriology*, 101, 304-313.

BEDOLOSONCZI, C. ; I. VIORICA et A. SZOLBOSI, (1970). - Utilisation d'un biostimulateur extrait du thymus pour la détection rapide d'*Escherichia coli* dans les aliments. *Annales d'hygiène de langue Française, Médecine et Nutrition*, 6, n° 1, 55-58.

BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology (8th ed.). Williams and Wilkins co., BALTIMORE, 1975.

BILLOM, J. (1981). - Examen Microbiologique des viandes fraîches. R.T.V.A. n° 170, Juillet-Août, 1981.

BLASER, M.J. and D.J. DUNCAN (1984). - Human serum antibody Response to compylobacter jejuni infection as measured in an Enzyme-Linked-Immunsorbent Assay. Infection and Immunity, May 84, 292-298.

BOTH, B.R. and N.A.C. CURTIS, (1977). - Separation of the cytoplasmic and outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Bioch. and Bioph. Research Comm. Vol. 74, n° 3, 1168-1176.

BOURGEOIS, C.M., (1977). - Méthodes rapides en microbiologie alimentaire. Série APRIA n° 13.

BOURGEOIS, C.M. ; P. MAFART et D. THOUVENOT, (1974). - Méthode rapide de détection des contaminants dans la bière par marquage radioactif. Proceeding of the European Brewery Convention, Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing company, 219-230.

BRADFORD, M.M., (1976). - A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein Dye binding Analytical Biochemistry, 72, 248-254.

BRAUN, V. and K. REHN, (1969). - Chemical characterization spatial distribution and function of a lipoprotein (Murcin-lipoprotein) of the *E. coli* Cell-Wall : The specific effect of Trypsin on the membrane structure. European Journal Biochemistry, 10, 426-438.

BRAUN, V. and U. SIEGLIN, (1970). - The covalent murcin-lipoprotein structure of the *E. coli* Cell-Wall : The attachment site of the lipoprotein on the murcin. European J. Biochemistry, 13, 336-346.

BRAUN, V. and H. Wolff, (1970). - The murcin-lipoprotein linkage in the cell-wall of *Escherichia coli*. European J. Biochemistry, 14, 387-391.

CATOIR, M. ; R. GERBER et A. GOY, (1974). - Essais du "Coulter-counter" pour le dénombrement de la flore totale du lait cru. Revue générale des Questions Laitières, 54, n° 531-532 pp 22-30.

CATSARAS, M. (1973). - Les "intoxications" alimentaires par la viande et les produits carnés. Industries Alimentaires et Agricoles 90, 11, 1467-1473.

CATSARAS, M. et R. BUTTIAUX, (1965). - Les Acromonas dans les matières fécales humaines. Institut PASTEUR, LILLE, 16, 85-88.

CATSARAS, M. et Y. DORSO, (1976). - Méthode d'analyse microbiologique, en 24 heures, des denrées alimentaires. 1 - Principe et application aux plats cuisinés. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de FRANCE, 49, n° 2, 237-241.

CATSARAS, M. et D. GREBOT, (1969). - Etude complémentaire sur les bactéries psychrotrophes des viandes. Annales de l'Institut Pasteur, LILLE, 20, 231-238.

CHESTER, I.R. ; P.M. MEADOW and T.L. PITT, (1973). - The relationships between the O-antigenic lipopolysaccharides and serological specificity in strains of Pseudomonas aeruginosa of different O-serotypes. Journal of General Microbiology, 78, 305-318.

COSTERTON, J.W., (1970). - The structure and function of the cell envelope of gram negative bacteria. Revue Canadienne de Biologie, 29, 299-316.

COSTERTON, J.W. ; J.M. INGRAM and K.I. CHENG, (1974). - Structure and function of the cell-envelope of Gram negative bacteria. Bacteriological review, 38, n° 1, 87-110.

COUSLON, G. and I.R. POXTON, (1984). - Crossed immunoelectrophoresis and Enzyme-Linked-ImmunoSorbent Assay of the cell surface antigens of Bacteroides fragilis. Journal of General Microbiology, 130, 645-655.

CRANSTON, P. ; MATTHEWS, D. (1973). - Evaluation of an enrichment serology technique for *E. coli* in Frozen foods.
The Australian J. of Dairy Technology, 28, n°4, 172-175.

CRONAN, J.E. Jr (1979). - Bacterial outer-membranes : biogenesis and Functions.
Edited by M. INOUE.

DANIELSON, D. and G. LAURELL, (1964). - Detection of enteropathogenic *Escherichia coli* in a Swedish watercourse by means of fluorescent antibodies and conventional methods.
Acta Paediatrica, 53, 49-54.

DAVIS, J. (1969). - Microbiological standards for foods.
Laboratory Practice 18, n° 7, 749-764.

De VOES, I.W. ; J.W. COSTERTON and R.A. Mac-LEOD, (1971). - Demonstration by freeze-etching of a single cleavage plane in the cell-wall of a gram-negative bacteria.
Journal of Bacteriology, 106, 659-671.

DIRIENZO, J.M. ; K. NAKAMURA and M. INOUE, (1978). - The outer membrane proteins of Gram-negative bacteria.
- Biosynthesis, assembly and functions.
Ann. Rev. Biochem. 47, 481-532.

DMITRIEV, B.A. and al. (1982). - Somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa* : - The structure of the lipopolysaccharides chain of *Ps. aeruginosa* 0 : 6 (Lanyi) lipopolysaccharide.
European J. Biochemistry 125, 229-237.

DUBRAY, G. (1981). - Etude ultrastructurale et biochimique des enveloppes des bactéries du genre *Brucella*.
Thèse de Doctorat es-sciences naturelles. Université de PARIS-SUD Centre d'ORSAY.

EAGON, R.G. and P.V. PHIBBS, (1971). - Kinetics for transport of glucose, fructose and Mannitol by *Pseudomonas aeruginosa*.
Canadian Journal Biochemistry, 49, 1031-1041.

EMPEY, W.A. (1982) and W.J. SCOTT, (1939) : - Cités par J. FOURNAUD.

ENGVALL, E. and P. PERLMANN, (1972) : - Enzyme - Linked - Immuno-sorbent Assay : III - Quantitation of specific antibodies by enzyme labelled anti-immunoglobulin in antigen - coated tubes.
The Journal of Immunology, 109, n° 1, 129-135.

EVANCHO, G. ; D. ASHTON and A. ZWARUN, (1974). - Use of radio-metric technique for the rapid detection of growth of clostridial species.
Journal of Food Science, 39, n° 1, 77-79.

FAGERBERG, D. and J. AVENS, (1976). - Enrichment and plating methodology for Salmonella detection in food.
J. of Milk and Food technology 39, n° 9, 628-646.

FOLSBERG and al. (1972) : - Isolation, characterization and ultrastructure of the peptidoglycan layer of a marine Pseudomonas.
J. of Bacteriology, 109, 895-905.

FOURNAUD, J. (1982). - Types de germes rencontrés aux différents stades de la filière.
Hygiène et technologie de la viande fraîche. Edition C.N.R.S.

FOURNAUD, J. ; G. GRAFFINO ; R. ROSSET et R. JACQUE, (1978). - Contamination microbienne des carcasses à l'abattoir.
Industries Alimentaires et Agricoles, 4, 273-282.

FOURNAUD, J. et R. LAURET, (1972). - Position taxonomique des bactéries mobiles, à gram négatif, aérobies strictes, isolées de saumures de viande.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A222, 70-89.

FOURNAUD, J. et C. MORAND-FEHR, (1965). - Contribution à l'étude microbiologique de la viande bovine désossée et congelée d'origine française. Comparaison avec quelques viandes d'autres origines.
Annexe Bull. Inst. Inter. du froid, 1, 63-74.

FOURNAUD, J. ; P. SALE et C. VALIN, (1973). - Conservation de la viande bovine sous emballage plastique, sous vide ou en atmosphère contrôlée. Aspects biochimiques et microbiologique.
XIX ème Réunion Eur. chercheurs en viande. PARIS.

FOX, C.F. (1972). - The structure of cell membranes.
Scientific American, 226 (2), 30-38.

FUNG, D. and P. HARTMAN, (1972). Rapid characterization of bacteria, with emphasis on staphylococcus aureus.
Canadian J. of microbiology, 18, 1623-1627.

GARTEN, W. and U. HENNING (1973). - Cell envelope and shape of E. coli K12 : Isolation and preliminary characterization of the major Ghost-membrane proteine.
European J. Biochemistry, 47, 343-352.

GILL, C.O. and K.G. NEWTON, (1977). - The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperature.
Journal of Appl. Bacteriology, 43, 189-195.

GILL, C.O. and K.G. NEWTON, (1978). - The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperature.
Meat Science, 2, 207-217.

GILL, C.O. and N. PENNEY, (1979). - Survival of bacteria in carcasses.
Applied Envir. Microbiology, 37, 667-669.

GILL, C.O., N. PENNEY and P.M. NOTTINGHAM, (1976); - Effect of delayed evisceration on the microbial quality of meat.
Apply Envir. Microbiology, 31, 465-468.

GILL, C.O. ; N. PENNEY and P.M. NOTTINGHAM, (1978). - Tissue sterility in uneviscerated carcasses.
Applied Environmental Microbiology, 36, 356-359.

GILLELAND, H.E. ; J.D. STINNETT ; L.L. ROTH and R.G. EAGON, (1973). - Freeze-etching study of Pseudomonas aeruginosa : Localisation within the cell-wall of an ethylene-diamine têtetraacetate - Extrable component.
J. of Bacteriology, 113, n° 1, 417-432.

GOLDSHMIT, M.C. and D.Y.C. FUNG, (1979). - Automated instrumentation for microbiological analysis.
Food Technology, 3, 63-70.

GUNDERSON, M.F. ; Mc FADEN, H.W. and KYLE, T.S. (1954). - Cités par LAHELLEC, C. (1972).

HANCOCK, R.E.W. and al. (1982). - Monoclonal antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* outer-membrane antigens : Isolation and characterization.
Infection and Immunity, 37, 166-171.

HANCOCK, R.E.W. and H. NIKAIKO, (1978). - Outer-membranes of Gram-negative bacteria : XX - Isolation from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and use in reconstitution and definition of the permeability.
J. of Bacteriology, 136, n° 1, 381-390.

HANTKE, K. and V. BRAUN, (1973). - Covalent binding of lipid to protein : Diglyceride and Amide-linked Fatty acid at the N-terminal End of the Murcin-lipoprotein of the *E. coli* Outer-membrane.
European J. Biochemistry, 34, 284-296.

HASEGAWA, Y. ; H. YAMADA and S. MIZUSHIMA, (1976). - Interactions of Outer-membrane proteins 0-8 and 0-9 with peptidoglycan sacculus of *Escherichia coli* K12.
Journal biochemistry, 80, 1401-1409.

HECKELS, J.E., (1977). - The surface properties of *Nesseria gonorrhoeae* : Isolation of the major components of the Outer-membrane.
J. of General Microbiology, 99, 333-341.

HEDSTROM, R.C. ; R.K. SHOCKELEY and R.G. EAGON, (1981). - Ethylene diamine tetraacetate - Extrable protein - lipopolysaccharide complex of *pseudomonas aeruginosa* : - characterization of protein components.
Journal of Bacteriology, 148, 995-997.

HENNING, U. ; B. HOHN and I. SONNTAG, (1973). - Cell envelope and shape of *Escherichia coli* K12, the ghost membrane.
European J. Biochemistry, 39, 27-36.

HINCKLEY, A. ; E. MÜLLER and I. ROTHFIELD, (1972). - Reassembly of a membrane bound multienzyme system formation of a particle containing phosphatidylethanolamine lipopolysaccharide and two glycosyltransferase enzymes.
Journal Biol. Chem., 247, 2623-2638.

HOBBS, B. (1977). - Problems and solutions in Food microbiology.
Food Technology, 31, n° 1, 90-96.

HOBBS, G. ; D.C. CANN ; G. GOWLAND and H.D. BYERS, (1964).
- A serological approach to the Genus Pseudomonas.
J. applied bacteriology, 27 (1), 83-92.

HOBEN, D. ; D. ASHTON and A. PETERSON, (1973). A rapid presumptive procedure for the detection of Salmonella in foods and food ingredients.
Applied Microbiology, 25, n° 1, 123-129.

HOFSTRA, H. and J. DANKERT, (1979). - Antigenic cross-reactivity of Major Outer-membrane proteins in enterobacteriaceae species.
Journal of General Microbiology, III, 293-302.

INOUYE, M., (1979). - Bacterial Outer-membranes :
Biogenesis and functions, Edited by Masayori INOUYE.

INOUYE, M. and al., (1976). - Lipoprotein form the outer-membrane of Escherichia coli : Purification, Paracrystallisation and some properties of its free-form.
Journal of Bacteriology, 127, 555-563.

INOUYE, M. ; J. SHAW and C. SHEN, (1972). - The assembly of a structural lipoprotein in the envelope of Escherichia coli.
Journal Biol. Chem., 247, 8154-8159.

INOUYE, M. and M.L. YEE, (1973). - Homogeneity of envelope proteins of E. Coli separated by gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate.
Journal of Bacteriology, 113, 304-312.

INSALATA, N. ; C. MAHNKE and W. DUNLAP, (1972). - Rapid direct fluorescent antibody method for the detection of Salmonella in food and feeds.

Applied Microbiology, 24, n° 4, 645-649.

JUFFS, B. (1970). - A four day count for Psychrotrophs.

Australian Journal of Technology, 25, n° 1, 30-32.

KAMMAN, J. and S. TALINI, (1977). Optimal conditions for assay of staphylococcal nuclease.

Journal of Food Science, 42, n° 2, 421-424.

KOLENBRANDER, P.E. and J.C. ENSIGN, (1968). - Isolation and chemical structure of the peptidoglycan of spirillum serpens cell walls.

Journal of Bacteriology, 95, 201-210.

LABADIE, J. et M. DOUMBIA, (1984). - Dénombrement rapide des bactéries isolées des carcasses de boeuf, de porc et de mouton par une méthode de la Rasazunine.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B 179, 217-224.

LABADIE, J. ; J. FOURNAUD et B.L. DUMONT, (1975). - Relations entre le pH et la microflore des viandes hachées de bovins.

Annales de Technologie Agricole, 24, 193-203.

LABADIE, J. et M. GUINET, (1981). - Etude de la multiplication microbienne dans le muscle juste après l'abattage.

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. B 147, 355-363.

LAEMMLI, U.K. (1970). - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature, 227, 680-689.

LAHELLEC, C. (1982). - Cours de microbiologie des denrées alimentaires : Pseudomonas-Aeromonas, 11ème leçon, Institut PASTEUR, LILLE.

LAHELLEC, C. et al., (1975). - La flore psychrotrophe des carcasses d volailles : III - Etude de 5920 souches isolées à partir de carcasses de poulet.

Journal Applied Bacteriology, 38, 89-97.

LAHELLEC, C. ; C. MEURIER et M. CATSARAS. - La flore psychrotrophe des carcasses de volailles.

1972 - I - Evolution aux différents postes d'une chaîne d'abattage. Annales de recherches vétérinaires, 3(3), 421-434.

1973 - II - Evolution au cours de l'éviscération. Annales de recherches vétérinaires, 4(4), 499-512.

LANE, B.C. and R.E. HURLBERT, (1980). - Characterization of the cell wall and cell wall proteins of *chromatium vinosum*.

Journal of Bacteriology, 141, n° 3, 1386-1398.

LEE, J. and G. WOLFE, (1967). - Rapid identification of bacteria in foods ; replica plating and computer method.

Food Technologia, 21, n° 6, 35-39.

LEROY (Mc), (1947). - Cité par C.M. BOURGEOIS, (1977).

LEVIN G. and al., (1956). - Cités par C.M. BOURGEOIS, (1977).

LEVIN G. and al. (1967). - Cités par SHARPE, A. and al. (1970).

MARTIN, E.L. and R.A. Mac LEOD, (1971). Isolation and chemical composition of the cytoplasmic membrane of a Gram-negative bacteria. Journal of Bacteriology, 105, 1160-1167.

MARTINI (de), M. and M. INOUE, (1978). - Interaction between two Major Outer-membrane proteins of *E. coli* : The matrix protein and the lipoprotein.

Journal of bacteriology, 133, n° 1, 329-335.

MISKIMIN, D. and al., (1976). - Relationships between indicator organisms and specific pathogens in potentially hazardous foods.

Journal of Food Science, 41, n° 5, 1001-1005.

MITCHELL, P. (1961). - Cité par COSTERTON, J.W. and al. (1974).

MIURA, T. and S. MIZUSHIMA, (1968). - Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from spheroplast membrane of *Escherichia coli*.

Biochimica, Biophysica Acta, 150, 156-161.

MIURA, T. and S. MIZUSHIMA, (1969). - Separation and properties of Outer and cytoplasmic membranes in *Escherichia coli*. *Biochimica Biophysica Acta*, 193, 268-276.

MIZUMO, T. and M. KAGEYAMA, (1978). - Separation and characterization of Outer-membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biochemistry*, 84, 179-191.

MIZUMO, T. and M. KAGEYAMA, (1979). - Isolation and characterization of major Outer-membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO with special reference to peptidoglycan associated protein. *Journal of Biochemistry*, 86, 979-989.

MIZUSHINA, S. and H. YAMADA, (1975). - Isolation and characterization of two outer-membrane preparations from *Escherichia coli*. *Biochimica, Biophysica Acta*, 375, 44-53.

MOLIN, G. and A. TERNSTROM, (1982). - Numerical taxonomy of Psychrotrophic *Pseudomonas*. *J. of General Microbiology*, 128, 1249-1264.

MORAN, J. and L. WITTER, (1976). - An automated rapid test for *Escherichia coli* in milk. *J. of Food Science*, 41, n° 1, 165-167.

MÜLLER, E. ; A. HINCKLEY and I. ROTHFIELD, (1972). Studies of phospholipid requiring bacterial enzymes : III - Purification and properties of Uridine diphosphate glucose ; lipopolysaccharide glucosyltransferase. *Journal Biol. Chemistry*, 9, 381-392.

NAKAE, T. (1976). - Identification of the Outer-membrane of *E. coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 71, 877-884.

NAKAE, T. and H. NIKAIDO, (1975). - Outer-membrane as a diffusion barrier in *Salmonella typhimurium* : Penetration of oligo and polysaccharides into isolated outer-membrane vesicles and cells with degraded peptidoglycan layer. *Journal Biol. Chem.*, 250, 7359-7365.

NAKAJIMA, K. MUROGA and R.E.W. HANCOCK, (1983). - Comparison of fatty acid, protein, and serological properties distinguishing outer-membranes of *Pseudomonas anguilliseptica* strains from those of fish pathogens and other *Pseudomonas*.
International J. of Systematic Bacteriology, 33(1), 1-8.

NAKAMURA, K. and S. MIZUSHIMA, (1976). - Effects of heating in dodecyl sulfate solution on the conformation and electrophoretic mobility of isolated major outer-membrane proteins from *Escherichia Coli* K12.
Journal of Biochemistry, 80, 1411-1422.

NANNINGA, N., (1970). - Ultrastructure of this cell envelope of *Escherichia coli* B after Freeze-etching.
Journal of Bacteriology, 101, 297-303.

NEWTON, K.G. ; J.C.L. HARRISON and A.M. WAUTERS, (1978). - Sources of psychrotrophile bacteria on meat at the abattoir.
J. of Applied bacteriology, 47, 367-378.

OSBORN, M. J. (1979). - Biosynthesis and assembly of the lipopolysaccharide of the membrane.
Bacterial outer-membranes : Biogenesis and Functions, Edited by M. INOUE.

OSBORN, M.J. and al. (1972). - Mechanism of assembly of the outer-membrane of *Salmonella typhimurium* : Isolation and characterization of cytoplasmic and outer-membrane.
Journal of Biol. Chemistry, 247, 3962-3972.

OSBORN, M.J. ; J.E. GANDER and E. PARISI, (1972). - Mechanism of assembly of the outer-membrane of *salmonella typhimurium* : - Site of synthesis of lipopolysaccharide.
Journal Biol. Chemistry, 247, 3973-3986.

OSBORN, M.J. and R. MUNSON, (1974). - Separation of the inner (cytoplasmic) and outer-membrane of Gram-negative bacteria.
Methods Enzymology, 31A, 642-653.

OVERBEEKE, N. and Ben LUGTENBERG, (1980). - Major outer-membrane proteins of *Escherichia coli* strains of human origin.
J. of General Microbiology, 121, 373-380.

PANTALEON, J. ; J. GLEDEL et B. CORBION, (1976). - Salmonelles provenant d'animaux et de denrées d'origine animale : Données épidémiologiques.

Médecine et Nutrition, 12(1), 45-47.

PETERKIN, P.I. and A.N. SHARPE, (1984). - Rapid enumeration of staphylococcus aureus in foods by direct demonstration of Enterotoxigenic colonies on membrane filters by Enzyme Immunoassay.

Appl. and Envir. Microbiol. 47(5), 1047-1053.

PITTEPHER, G.L., (1981). - Rapid methods for assessing bacterial number in milk.

J. of Dairy Industries International, 19, 15-21.

POXTON, Ian, R., (1979). - Serological identification of bacteroides species by an ELISA.

J. of clinical pathology, 32, 294-298.

POXTON, Ian, R., (1984). - Demonstration of the common antigens of clostridium botulinum, Cl. sporogenes and Cl. novoyi by ELISA and electroblot transfer.

J. of General Microbiology, 130(4), 975-981

PUGSLEY, A. and L. EVISON, (1975). - A fluorescent antibody technique for the enumeration of faecal streptococci in water.

J. of Applied Bacteriology, 38, 63-65.

RAMALEY, R.F. (1979). - Molecular biology of extracellular enzymes. Advances in Applied Microbiology, 25, 37-55.

RHODES, M.E. (1959). - Cité par J. FOURNAUD et R. LAURET, (1972).

RICHARD, J. (1981). - Classification adansonienne et identification de Pseudomonas psychrotrophes isolés du lait cru conservé à basse température.

Annales de Microbiologie (Institut PASTEUR, PARIS), 132A, 171-182.

ROGERS, H.I. (1970). - Bacterial growth and this cell envelope.

Bacteriological Review, 34, 194-204.

ROSENBUSCH, J.P. (1974). - Characterization of the major envelope proteins from Escherichia coli regular arrangement on the peptidoglycan and unusual Dodecyl sulfate binding.

J. Biological chemistry, 249, 8019-8029.

ROSSET, R. (1974). - Problèmes microbiologiques concernant le traitement des viandes par réfrigération et par congélation.

Revue générale du froid, 65,(10), 1075-1082.

ROSSET, R. (1976). - Le froid : Agent de préservation des qualités de la viande et des produits carnés.

C.R. Sciences Acad. Agricole Française, 62,(9), 1-31.

ROSSET, R. ; F. LEBERT et P. LIGER, (1978). - De quelques problèmes d'hygiène dans la filière viande.

Industries Alimentaires et Agricoles, 4, 335-341.

ROTHFIELD, L.I. (1973). - Reassembly of bacterial membrane components. Proc. Amer. Society Exp. Biol., 25, 1495-1502.

R.T.V.A. (Revue Technique Vétérinaire de l'Alimentation).

- 1979 - Faut-il revoir nos conceptions des Salmonelles dans l'industrie alimentaire ? Par J. ROZIER et J. JOUVE. n° 151, 15-24.

- 1981 - Les contrôles microbiologiques des denrées alimentaires d'origine animale. Par J. ADROIT. n° 166, 22-27.

- 1981 - Détermination rapide de la contamination microbienne superficielle des viandes par bioluminescence. Par J. JOUVE, V. CARLIER et J. ROZIER. n° 172, 14-17.

- 1982 - Dégradation de la qualité des aliments par les microorganismes. Par J. ROZIER ; V. CARLIER et F. BOLNOT. n° 180, 3-13.

- 1982 - Utilisation des rayons ultra-violet dans la conservation des viandes. Par R. DUBUIS et N. KOLHER. n° 181, 21-33.

- 1982 - Etude de l'application de la bioluminescence au dénombrement de la flore bactérienne superficielle des carcasses à l'aide du Biocounter M2010. Par V. CARLIER et al. n° 184, 13-21.

- 1983 - Appréciation rapide de la qualité de la viande et des produits carnés. Par J. ROZIER. n° 185, 18-21.

SALTON, M.R.J. and R.W. HORNE, (1951). - Studies of the bacterial cell-wall.

II. Methods of preparation and some properties of cell-walls.
Biochimica et biophysica Acta, 7, 177-197.

SANDERSON, K.E. and al., (1973). - Permeability of lipopolysaccharide - deficient (Rough) mutants of Salmonella typhimurium to antibodies lysozyme and other agents.

Bacterial Review, 101, 111-118.

SCHNAITMAN, C.A. (1970). - Examination of the protein composition of the cell envelope of Escherichia coli by Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

Journal of Bacteriology, 104, 882-889.

SCHNAITMAN, C.A. (1970). - Protein composition of the cell-wall and cytoplasmic membrane of Escherichia coli.

Journal of bacteriology, 104, 890-901.

SCHNAITMAN, C.A. (1974). - Outer-membrane proteins of E. coli. III. Evidence that the major protein of Escherichia coli 0111 Outer-membrane consists of four distinct polypeptids species.

Journal of Bacteriology, 118, 442-453.

SHWEIZER, M; and al. (1978). - Major proteins of the Escherichia coli outer cell envelope membrane : Interaction of Protein II* with lipopolysaccharide.

European Journal Biochemistry, 82, 211-21 .

SHARON, N. ; T. OSAWA ; H.M. FLOWERS and R.W. JEANLOZ, (1966). - Isolation and study of the chemical structure of a disaccharide from Micrococcus lysodrikticus cell-walls.

J. of biological chemistry, 241, 223-230.

SHARPE, A. ; C. PETTIPHER and G. LLOYD, (1976). - A miniaturized coating technique for anaerobic bacteria.

Canadian J. of Microbiology, 22, 1728-1733.

SHAW, B.G. and J.B. LATTY, (1976). - A numerical taxonomic study of Pseudomonas strains spoiled meat.

Journal of Applied Bacteriology, 52, 219-228.

SHELEF, L. and J. JAY, (1970). - Use of titrimetric method to assess the bacterial spoilage of fresh beef.

Applied Microbiology, 19, n° 6, 902-905.

SMIT, J. ; Y. KAMIO and H. NIKAIDO, (1975). - Outer-membrane of *Salmonella typhimurium* : chemical analysis and freeze-fracture studies with lipopolysaccharide mutants.

Journal of Bacteriology, 124, 942-958.

STANIER, R.Y. ; N.J. PALLERONI and M. DOUDOROFF, (1966). - The aerobic *Pseudomonas* : a taxonomic study.

Journal General Microbiology, 43, 159-271.

STANNARD, C.J. and J.M. WOOD, (1983). - The rapid estimation of Microbial contamination of Raw Meat by mesurement of Adenosine Triphosphate (A.T.P.).

Journal of Applied Bacteriology, 55, 429-438.

STEVEN, A.C. and al., (1977). - Cités par INOUE, M. (1979) : *Bacterial outer-membranis : Biogenesis and Functions*.

Edited by M. INOUE.

STINETT, J.D. ; H.E. GILLERAND and R.G. EAGON, (1973). - Proteins released from cell Envelopes of *Pseudomonas aeruginosa* on exposure to Ethylene diamine tetraacetate - Extractable proteins.

Journal of Bacteriology, 114, n° 1, 399-407.

STRINGER and al., (1969). - Cités par LAHELLEC, C., (1982). - Cours de microbiologie des denrées alimentaires : *Pseudomonas Aeromonas* (11ème leçon, Inst. PASTEUR, LILLE).

TOURTELOTTE, M.E. and J.S. ZUPNIK, . - Cités par COSTERTON and al., (1974). - Structure and Function of the cell Envelope of Gram negative bacteria.

Bacteriological Review, 38, n° 1, 87-110.

TUNSTALL, A.M. ; G. GOWLAND and G. HOBBS, (1975). - The Antigens Associated with the cell walls of members of the Genus *Pseudomonas*. *J. Applied Bacteriology*, 38, 158-168.

UEMURA, J. and S. MIZUSHIMA, (1975). - Isolation of Outer-Membrane Proteins of *Escherichia coli* and their characterization on polyacrylamide gel.

Biochimica and Biophysica Acta, 413, 163-176.

VOLLER, A. ; D.E. BIDEWELL and A. BARTLETT, (1979). - The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) : A guide with abstracts of microplate applications.

Dynatech-Europe, Borough House. Rue du Pré, GUERNSEY, G.B..

WELHOENER, H.O. and al., (1971). - Schnelles Erkennen von Infektionen durch chemische Analyse.

In congress of the European Brewery Convention, 13.

WHITE, D.A. ; F.R. ALBRIGHT ; W.J. LENNARZ and C.A. SCHNAITMAN, (1971). - Distribution of phospholipid-synthesizing enzymes in the wall and membrane subfractions of the envelope of *Escherichia coli*.

Biochimica and Biophysica Acta, 249, 636-642.

WHITE, D.A. ; W.J. LENNARZ and C.A. SCHNAITMAN, (1972). - Distribution of lipids in the wall and cytoplasmic membrane subfractions of the cell envelope of *Escherichia coli*.

Journal of Bacteriology, 109, 686-690.

L'étude des protéines de la membrane externe des bactéries à gram négatif, tend à se généraliser. En effet, elle permet, semble-t'il, de résoudre certains problèmes de taxonomie jusqu'à présent non résolus.

Notre travail, s'inscrit dans le cadre d'une étude de la membrane externe des Pseudomonas isolés des viandes et de quelques protéines majeures. Notre but est la mise en évidence d'une ou de plusieurs protéines structurales nous permettant de détecter spécifiquement les Pseudomonas des produits carnés.

Pour cette étude, nous avons utilisé plusieurs techniques de séparation des membranes externes des bactéries à gram négatif.

Une technique basée sur l'action d'un tampon Tris contenant de l'E.D.T.A. et du lysozyme, semble applicable aux Pseudomonas des viandes.

Les membranes externes isolées selon cette technique semblent identiques, quelles que soient les souches de Pseudomonas employées dans notre travail.

En ce qui concerne la sensibilité du test E.L.I.S.A. employé, nous arrivons à détecter, en 4 heures, 10^4 bactéries/ml ; aussi bien pour les bactéries en culture pure que les bactéries isolées directement de viandes.

Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps actifs contre une protéine dominante (protéine "F") de la membrane externe permet une identification rapide des Pseudomonas des viandes (Ps. fragi, Ps. fluorescens et Ps. putida). Des croisements avec Serratia liquefaciens, autre bactérie psychrotrophe fréquemment rencontrée sur les viandes, ont été observés. La cause de ces croisements est encore mal connue.

Mots clefs : Pseudomonas fragi, Ps. fluorescens, Ps. putida, membrane externe, protéine "F", identification, détection, E.L.I.S.A..