



HAL
open science

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA DIVERSITE
GENETIQUE BACTERIENNE ET A LA
CARACTERISATION DE BACTERIES PRESENTES
DANS DES PRELEVEMENTS ATMOSPHERIQUES**

Agnès Prieur

► **To cite this version:**

Agnès Prieur. CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA DIVERSITE GENETIQUE BACTERIENNE ET A LA CARACTERISATION DE BACTERIES PRESENTES DANS DES PRELEVEMENTS ATMOSPHERIQUES. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris XI, 2001. Français. NNT: . tel-00333218

HAL Id: tel-00333218

<https://theses.hal.science/tel-00333218>

Submitted on 22 Oct 2008

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

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

GPMS
Génomes, Polymorphisme et Minisatellites
Université Paris Sud – Bât. 400
91405 Orsay Cedex
Tél. : 01.69.15.46.45

Département de Biologie
Centre d'Etudes du Bouchet
3 rue Lavoisier, BP 3
91710 Vert Le Petit
Tél. : 01.69.90.82.00

**UNIVERSITE DE PARIS-SUD
U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY**

T H E S E

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS XI, ORSAY

Spécialité : Biologie cellulaire, biologie moléculaire et génétique cellulaire

par

Agnès PRIEUR

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA DIVERSITE GENETIQUE
BACTERIENNE ET A LA CARACTERISATION DE BACTERIES
PRESENTES DANS DES PRELEVEMENTS ATMOSPHERIQUES**

Devant le jury composé de :

M. Gérard LEBLON	président
Mme Christine POURCEL	rapporteur
M. Philippe GLASER	rapporteur
M. Patrick FORTERRE	examinateur
M. Fabien SQUINAZI	examinateur
M. Gilles VERGNAUD	directeur de thèse

RESUME

La détection, voire l'identification, de bactéries dans l'air trouve une large application dans le domaine civil (diagnostic médical, surveillance de la qualité des aliments, de l'eau, de l'air ou du sol,...) et militaire (défense biologique).

L'objectif principal de cette thèse a été, d'une part, d'étudier la diversité génétique de *Bacillus anthracis* et, d'autre part, d'analyser la composition bactérienne de prélèvements atmosphériques.

L'identification précise de souches de *B. anthracis* (étude de la diversité de cette espèce bactérienne) repose, d'une part, sur une approche par typage de répétitions en tandem et, d'autre part, sur une approche par typage de mutations ponctuelles. Les résultats obtenus par ces deux méthodes indépendantes sont en accord. Cependant, les répétitions en tandem apportent une bien meilleure résolution.

L'étude de la composition bactérienne de l'air participe à la validation d'un système de détection. Celui-ci doit être capable de caractériser en moins d'une heure, la présence de quelques bactéries par litre d'air de l'environnement. Le protocole développé ici permet de détecter 1 pg d'ADN pur en moins de deux heures, sans faire appel à une étape d'amplification génique.

L'analyse du bruit de fond atmosphérique tire parti de ce protocole, à l'exception de quelques modifications qui permettent d'analyser un plus grand nombre d'échantillons. Les résultats de quatre collectes soulignent que le bruit de fond atmosphérique peut varier de demi-heure en demi-heure. Le seuil de sensibilité de la méthode est d'environ 100 bactéries par litre d'air.

ABSTRACT

The detection, and even the identification, of airborne bacteria is required by a large variety of civilian (medical diagnosis, quality control of food, air, water or soil,...) and military sectors (biological defence).

This report deals with the genetic diversity of *Bacillus anthracis* and the analysis of the bacterial composition of atmospheric samples.

The precise identification of *B. anthracis* strains (study of the genetic diversity of bacteria) is based on typing tandem repeats and punctual mutations. The results of these two methods are in agreement although tandem repeats typing is more resolute.

The study of the bacterial composition of air participate in the validation of a detection system which has to be able to characterise, in less than one hour, airborne pathogens at a concentration of a few bacteria per liter of air. The protocol developed here permits the detection of 1 pg of pure DNA in less than two hours.

The study of the bacterial composition of air uses this same protocol slightly modified in order to analyse more samples. The analysis of four days of collection emphasizes that the atmospheric background can vary from 30 minutes to 30 minutes. The sensibility of the method used is about 100 bacteria per liter of air. Interestingly, peaks of individual species have been observed.

Qu'il me soit permis, avant d'entrer dans le vif du sujet, d'exprimer ma reconnaissance à l'égard de tous ceux qui ont apporté une contribution assurément précieuse dans la concrétisation de mon projet, sans laquelle je n'aurais pu aboutir.

Je tiens tout d'abord à remercier Gilles VERGNAUD d'avoir consenti à m'accueillir dans son équipe et su m'accompagner tout au long des trois années qui viennent de s'écouler.

Mes vifs remerciements s'adressent également à :

- Monsieur LEBLON de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse,
- Madame POURCEL et Monsieur GLASER d'avoir accepté d'être rapporteurs,
- Messieurs FORTERRE et SQUINAZI d'avoir bien voulu examiner mon travail.

Je leurs suis reconnaissante du temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce travail.

Je tiens particulièrement à souligner que cette thèse n'aurait pu voir le jour sans la contribution financière de la DGA. Je remercie, en particulier Messieurs ORLIANGES, MERICAM-BOURDET et LHOTE (DSA/SPNuc) d'avoir suivi les évolutions des différents projets présentés dans ce rapport de thèse.

Je souhaite, par ailleurs, témoigner de ma gratitude à l'égard des membres du comité de parrainage de ma thèse qui ont également participé au suivi de son élaboration. Mes sincères remerciements s'adressent à Madame MEYNADIER et Messieurs MERICAM-BOURDET, LION, GLASER et PANNETIER pour leur soutien, leur écoute et leurs précieux conseils.

Je ne saurais, au demeurant, oublier l'accueil toujours très chaleureux qui me fut réservé, pour la réalisation de mes travaux, par différents laboratoires ainsi que par leurs directeurs :

- Monsieur DUGUET de l'Institut de Génétique et de Microbiologie (IGM, Université Paris 11),
- Messieurs EON et FERNANDEZ du Centre d'Etudes du Bouchet (CEB, Vert Le Petit),
- Monsieur HEMERY du Laboratoire de Chimie Macromoléculaire (LCM, Université Paris 6),
- Monsieur KEDDAM du Laboratoire de Physique des Liquides et d'Electrochimie (LPLE, Université Paris 6).

Pour m'avoir fait profiter de leurs expériences, de leurs connaissances et de leur soutien tout au long de mes recherches, je tiens à remercier en particulier :

- Monsieur Patrick HEMERY et Mesdames Michelle MASURE et Marie-Isabelle LATOUFF du Laboratoire de Chimie Macromoléculaire, qui m'ont encadrée à l'occasion des expérimentations ayant porté sur la modification de l'alcool polyvinylique,
- Messieurs Claude GABRIELLI et Hubert PERROT et Madame Karine BIZET du Laboratoire de Physique des Liquides et d'Electrochimie, pour m'avoir guidée lors de l'utilisation de la microbalance à cristal de quartz,

- Mesdames Patricia TCHEPIKOFF, Claudette SIMOES, Bernadette MONTIGNY et Messieurs Vincent RAMISSE et Joël PASTRE pour leur contribution au projet relatif au bruit de fond atmosphérique,
- Madame Patricia SYLVESTRE pour m'avoir fourni les photographies de *Bacillus anthracis*,
- Madame Valérie VAUDE-LAUTHIER et Messieurs Christophe PANNETIER et Jérôme CHATOUX pour l'aide dans le déroulement du projet sur le système de détection,
- Mesdames Françoise RAMISSE et Marie-Agnès LABARRE qui m'ont fournies les souches bactériennes,
- Monsieur Gilles VERGNAUD et Madame Patricia TCHEPIKOFF pour leur précieux apport sur le projet SNP,
- Messieurs Pierre-Yves CHANAL, Raymond PLA et Thierry MERCIER pour m'avoir procuré les prélèvements atmosphériques,
- Messieurs Serge LOMBARDI, Serge DESCROIZETTE, Roger DUJANCOURT, Thierry LOCATELLI, Bernard ALLALI et Hervé COMBEAU, pour avoir réparé ou élaboré les produits nécessaires à la conduite de mes travaux.

Ma gratitude s'exprimera aussi, pour leur disponibilité et leur gentillesse, à l'égard :

- des membres de l'équipe Génomes, Polymorphisme et Minisatellites : Gilles, Yolande, Philippe, Patricia, France, Lucie, Elisabeth, Marta, Pascale et Fabienne,
- des personnes de l'IGM, et en particulier de celles situées au deuxième étage : Denise, Françoise, Sophie, Aurora, Philippe, Chantal, Cécile, Justine, Emmanuelle, Christophe, Didier, Jean-Marc, Anne,
- du personnel du CEB, et en particulier le département DBT : Valérie, Claudette, Bernadette, Vincent, Christophe, Joël, Jérôme,...

J'adresse également des remerciements à :

- Monsieur Lucien COPPET du CEB pour avoir accepté de me rencontrer et pour m'avoir accordé sa confiance dès notre première entrevue,
- Monsieur Georges TRON et ses collaborateurs pour toute l'attention dont ils ont témoigné à mon égard,

sans qui ce travail n'aurait jamais débuté. Je leur adresse un grand merci pour tout ce qu'ils m'ont apporté.

Je ne saurais oublier, ici, ma famille pour son soutien tout au long de ce périple. Qu'au travers de ce manuscrit, elle trouve le témoignage de toute mon affection et les remerciements pour sa patience et sa mansuétude de tous les jours.

Enfin, je souhaite assurer de ma profonde reconnaissance toutes celles et tous ceux que j'ai pu rencontrer et qui, sans avoir été cités, sont intervenus dans le déroulement de ma thèse et m'ont toujours entourée de leur sympathie.

SOMMAIRE

PREAMBULE.....	11
INTRODUCTION.....	16
1. <i>BACILLUS ANTHRACIS</i>.....	16
1.1. GENERALITES SUR LES <i>BACILLUS</i>	16
1.2. POUVOIR PATHOGENE NATUREL	16
1.3. MORPHOLOGIE ET STRUCTURE.....	18
1.4. VIRULENCE ET PRODUITS DERIVES.....	19
1.5. EPIDEMIOLOGIE	19
1.6. MENACE BIOLOGIQUE.....	20
1.6.1. EXEMPLE DE GRUINARD.....	20
1.6.2. EXEMPLE DE SVERDLOVSK.....	21
2. COMPOSITION BIOLOGIQUE DU BRUIT DE FOND ATMOSPHERIQUE.....	22
2.1. INTRODUCTION	22
2.2. LE POLLEN	23
2.3. LES SPORES FONGIQUES	24
2.4. LES BACTERIES.....	25
2.4.1. DETECTION SUR BOITE DE CULTURE	25
2.4.2. IDENTIFICATION DES ADN 16S	26
2.4.3. CONCLUSIONS	28
2.5. HABITATS NATURELS DE CERTAINS GENRES BACTERIENS ETUDIES.....	30
2.5.1. <i>BACILLUS</i>	30
2.5.2. <i>BRUCELLA</i>	30
2.5.3. <i>BURKHOLDERIA</i> ET <i>PSEUDOMONAS</i>	31
2.5.4. <i>CLOSTRIDIUM</i>	31
2.5.5. <i>ESCHERICHIA</i> , <i>SHIGELLA</i> , <i>SALMONELLA</i> ET <i>YERSINIA</i>	32
2.5.6. <i>FRANCISELLA</i>	32
2.5.7. <i>MICROCOCCUS</i>	33
2.5.8. <i>VIBRIO</i>	33
3. MOYENS DISPONIBLES POUR LA CARACTERISATION DE BACTERIES.....	34

RESULTATS - DISCUSSION	36
4. DIVERSITE GENETIQUE BACTERIENNE : APPLICATION A	36
<i>BACILLUS ANTHRACIS</i>.....	36
4.1. TECHNIQUES D'IDENTIFICATION DE LA DIVERSITE GENETIQUE CHEZ	
LES BACTERIES	37
4.1.1. SEQUENÇAGE	37
4.1.2. RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)	38
4.1.3. RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHISM DNA) OU AP-PCR	
(ARBITRARILY PRIMED-PCR)	40
4.1.4. AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM).....	41
4.1.5. VNTR (VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEAT)	44
4.2. LES MINISATELLITES COMME MARQUEURS DE LA DIVERSITE GENETIQUE	45
4.3. PRESENTATION DU PROJET RELATIF A L'ETUDE DES SNP	60
4.4. PREMIERE SELECTION DE SNP	61
4.4.1. SNP NON DISCRIMINANTS	61
4.4.2. SNP RETENUS ET DETERMINATION DES TEMPERATURES D'HYBRIDATION	62
4.4.3. BILAN DES SNP RETENUS POUR L'ETUDE SUR LA COLLECTION DE SOUCHE	64
4.5. ANALYSE DES SNP SUR UNE COLLECTION DE SOUCHES	65
4.5.1. QUELQUES RESULTATS REPRESENTATIFS	65
4.5.1.1. SNP DIRECTEMENT VALIDE : SNP 10	65
4.5.1.2. SNP VALIDE PAR UNE SECONDE PCR : SNP 16.....	66
4.5.1.3. CAS DU SNP 32.....	68
4.5.2. BILAN DE L'ANALYSE DES SNP SUR UNE COLLECTION DE SOUCHES DE	
<i>BACILLUS ANTHRACIS</i>	70
4.6. DISCUSSION RELATIVE AUX SNP	71
5. ANALYSE DE LA COMPOSITION BACTERIOLOGIQUE DU BRUIT	73
DE FOND ATMOSPHERIQUE	73
5.1. METHODE DE COLLECTE	73
5.1.1. GRAVITE.....	74
5.1.2. FILTRATION.....	74
5.1.3. FORCE EXTERNE.....	75
5.1.4. BARBOTAGE	75
5.1.5. IMPACT SUR SOLIDE OU SEMI-SOLIDE	75
5.1.6. IMPACT VIRTUEL.....	76

5.2. MOYENS DISPONIBLES POUR LA CARACTERISATION DE MICRO-ORGANISMES	77
5.2.1. CULTURE	77
5.2.2. MICROSCOPIE	78
5.2.3. CYTOMETRIE	78
5.2.4. CONCLUSIONS	80
5.3. PRESENTATION DU PROJET RELATIF A L'ETUDE SYSTEMATIQUE DU BRUIT	
DE FOND ATMOSPHERIQUE	80
5.4. PRELEVEMENTS ATMOSPHERIQUES	83
5.5. CULTURE ET CYTOMETRIE	85
5.6. HYBRIDATION CROISEE	88
5.7. TEMOINS REALISES POUR L'ANALYSE GENETIQUE	91
5.8. ANALYSE GENETIQUE	94
5.8.1. COLLECTE 4 (26-27 AVRIL 2000)	94
5.8.2. COLLECTE 11 (15-16 JUIN 2000)	98
5.8.3. COLLECTES 18 ET 19 (02-03 ET 09-10 AOÛT 2000)	100
5.9. DISCUSSION	106
5.10. ENSEMBLE DES RESULTATS DE CULTURE ET DE CYTOMETRIE OBTENUS	
POUR L'ANNEE DE COLLECTE (AVRIL 2000-AVRIL 2001)	108
6. CHOIX TECHNOLOGIQUE POUR L'ETUDE DE FAISABILITE D'UN SYSTEME	
DE DETECTION	117
6.1. MOYENS D'IDENTIFICATION	117
6.1.1. IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE	117
6.1.2. IDENTIFICATION IMMUNOLOGIQUE	119
6.1.2.1. MESURE DIRECTE	119
• Agglutination	119
• Immunodiffusion	119
• Immunoprécipitation	119
6.1.2.2. MESURE INDIRECTE OU IMMUNODOSAGE	120
• Test de compétition	120
• Test « sandwich »	120
• Les marqueurs	121
6.1.2.3. CONCLUSIONS RELATIVES A L'IDENTIFICATION IMMUNOLOGIQUE	121
6.1.3. IDENTIFICATION GENETIQUE	122
6.1.3.1 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)	122
6.1.3.2. SONDES	123
• Méthode directe	123
• Méthode sandwich	123

• Les marqueurs.....	123
- Radiomarquage.....	123
- Fluorescence et chimiluminescence	123
- Sonde « Molecular beacon ».....	124
6.1.3.3. CONCLUSIONS RELATIVES A L'IDENTIFICATION GENETIQUE	124
6.1.4. SUPPORTS POUR LA MISE EN ŒUVRE DE L'IDENTIFICATION	125
6.1.4.1. BIOSENSEURS	125
6.1.4.2. BILLES	126
6.1.4.3. « MACROARRAYS » ET « MICROARRAYS »	126
6.1.4.4. PUCES A ADN.....	127
• Définition.....	127
• Procédé de Southern.....	127
• Procédé de Mirzabekov	128
• Procédé Affimétrie®	128
• Procédé Nanogen®	129
• Procédé Cis Bio International	129
6.1.4.5. CONCLUSIONS RELATIVES AUX SUPPORTS SERVANT POUR L'IDENTIFICATION	130
6.1.5. SYNTHÈSE.....	131
6.2. MATCI ET ANAA	131
6.3. PRESENTATION DU PROJET DE THESE RELATIF A L'ETUDE DE FAISABILITE	
D'UN SYSTEME DE DETECTION	133
6.3.1. CONSIDERATIONS QUALITATIVES	134
6.3.2. CONSIDERATIONS QUANTITATIVES	134
6.3.3. PROCÉDE	135
6.4. MICROBALANCE A CRISTAL DE QUARTZ (QCM)	136
6.4.1. MESURE EN TEMPS REEL DE LA MASSE D'ADN FIXE PAR CIRCULATION.....	136
6.4.2. FIXATION PAR EVAPORATION	138
6.4.3. CONCLUSIONS RELATIVES À L'UTILISATION DE LA QCM	139
6.5. ÉVALUATION DE MEMBRANES	140
6.5.1. CAPACITE DE FIXATION ET COMPORTEMENT D'HYBRIDATION	140
6.5.2. SATURATION PROGRESSIVE	142
6.5.3. EVALUATION DU BRUIT DE FOND GENERE PAR LES MEMBRANES TESTEES.....	143
6.5.4. CONCLUSIONS RELATIVES AU CHOIX DE LA MEMBRANE D'HYBRIDATION	144
6.6. TRAITEMENT DE L'ECHANTILLON	144
6.6.1. INFLUENCE DU LAVAGE DES BILLES APRES BROUAGE SUR LA MASSE	
D'ADN RECUPEREE	144
6.6.2. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SPORES SUR LA QUANTITE	
D'ADN DETECTABLE	145
6.6.3. CHOIX D'UN COMPETITEUR	148
6.7. CHOIX DU KIT DE MARQUAGE.....	151

6.7.1. EFFICACITE D'INCORPORATION	152
6.7.2. QUALITE DE LA SONDE	153
6.7.3. CONCLUSIONS RELATIVES AU CHOIX DU KIT DE MARQUAGE.....	154
6.8. TAMPON D'HYBRIDATION.....	154
6.8.1. CINETIQUE D'HYBRIDATION.....	155
6.8.2. INFLUENCE DU TAMPON D'HYBRIDATION	155
6.9. INSTRUMENT DE MESURE	158
6.9.1. CORRESPONDANCE ENTRE LE NOMBRE DE DESINTEGRATIONS PAR MINUTE	
ET LES VALEURS MESUREES PAR LES APPAREILS DE DETECTION TESTES.....	159
6.9.2. POURCENTAGE DE SONDE HYBRIDEE ET DETECTEE.....	160
6.9.3. BRUIT DE FOND LIE À L'UTILISATION DE CHAQUE APPAREIL DE DETECTION	161
6.10. DISCUSSION RELATIVE A LA FAISABILITE D'UN SYSTEME DE DETECTION	
DE TYPE « PUCE A ADN »	163

CONCLUSIONS..... 165

MATERIELS ET METHODES..... 168

MM.1. EXPERIMENTATION SUR LES SNP	168
MM.1.1. IDENTIFICATION DES SNP	168
MM.1.2. CHOIX DES AMORCES.....	168
MM.1.3. CONDITIONS DES PCR.....	169
MM.1.3.1. OBTENTION DE L'ADN	169
MM.1.3.2. CONDITIONS DE PCR POUR LA SELECTION DES SNP SUR UN GRADIENT	
DE TEMPERATURE.....	169
MM.1.3.3. CONDITIONS DE PCR POUR L'ANALYSE DES 38 SOUCHES DE <i>BACILLUS</i>	169
MM.1.3.4. PRODUITS UTILISES POUR LES PCR.....	170
MM.1.3.5. ELECTROPHORESE DES PRODUITS DE PCR.....	171
MM.1.3.6. ORGANISATION DES DEPOTS SUR LE GEL	171
MM.2. ANALYSE DU BRUIT DE FOND ATMOSPHERIQUE	173
MM.2.1. CULTURE DES PRELEVEMENTS	173
MM.2.1.1. CULTURE SUR MILIEU NON SELECTIF.....	173
MM.2.1.2. CULTURE SUR MILIEU SELECTIF	173
MM.2.2. ANALYSE PAR CYTOMETRIE	174
MM.2.2.1. ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	174
MM.2.2.2. ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN PHASE SOLIDE	174
• Détection de micro-organismes	174
- Filtration	174
- Prémarquage	174

- Marquage	175
- Analyse sur le ChemScan RDI.....	175
• Détection spécifique de levures et de moisissures	175
MM.2.3. ANALYSE GENETIQUE	175
MM.2.3.1. BACTERIES	176
MM.2.3.2. PREPARATION D'ADN GENOMIQUE A PARTIR DE CULTURES BACTERIENNES	176
MM.2.3.3. MESURE DE LA CONCENTRATION DES ADN EXTRAITS AU FLUORIMETRE	178
MM.2.3.4. SUPPORTS SOLIDES POUR L'HYBRIDATION	178
MM.2.3.5. HYBRIDATION CROISEE	179
MM.2.3.6. ANALYSE PAR LA METHODE « GENOME COMPLET » DES ECHANTILLONS DU BRUIT	
DE FOND ATMOSPHERIQUE	180
• <i>Bacillus stearothermophilus</i>	180
• Lyse des cellules	180
• Extraction, précipitation.....	181
• Marquage, hybridation, lavages, exposition.....	182
MM.3. MICROBALANCE A CRISTAL DE QUARTZ (QCM)	182
MM.3.1. CRISTAL DE QUARTZ	182
MM.3.2. MONTAGE POUR LA FIXATION D'ADN PAR CIRCULATION	183
MM.3.3. MONTAGE POUR LA FIXATION D'ADN PAR EVAPORATION	183
MM.3.4. MODIFICATION DE L'ADN À IMMOBILISER SUR LA MICROBALANCE.....	184
MM.4. DEPOT D'ADN SUR DES MEMBRANES DE NYLON CHARGEES POSITIVEMENT.....	184
MM.5. TRAITEMENT DE L'ECHANTILLON POUR L'ANALYSE DE SPORES.....	185
MM.6. MARQUAGE RADIOACTIF D'ADN	186
MM.7. HYBRIDATION	187
MM.8. INSTRUMENTS DE MESURE	188

BIBLIOGRAPHIE..... 189

ANNEXE

ANNEXE 1 : RESULTATS DE LA QUANTIFICATION DES INTENSITES DES SIGNAUX	
PRESENTS SUR LES MEMBRANES DE LA FIGURE 24 (PROFIL D'HYBRIDATION CROISEE).....	I
ANNEXE 2 : IMAGE DES BOITES DE CULTURE DU PRELEVEMENT DE 20H30 (COLLECTE 19) .	IV
ANNEXE 3 : IMAGE DES BOITES DE CULTURE DU PRELEVEMENT DE 14H30 (COLLECTE 19) ..	V
ANNEXE 4 : LISTE DES SOLUTIONS UTILISEES	VI
ANNEXE 5 : ABREVIATIONS	VII

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : <i>Bacillus anthracis</i>	
A) Bacilles observés au microscope.	17
B) Spore observée en microscopie électronique	17
Figure 2 : Schéma décrivant la position des sites de collecte par rapport au sens du vent dominant.....	27
Figure 3 : Arbre phylogénétique de bactéries basé sur les séquences..... d'ARNr 16S (d'après Nelson <i>et al.</i> , 2000)	29
Figure 4 : Arbre phylogénétique des espèces de <i>Bacillus</i> basé sur les séquences..... d'ARNr 16S (Forsyth <i>et al.</i> , 1998)	29
Figure 5 : Schéma illustrant le principe de la technique AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Mueller et Wolfenbarger, 1999, Vos <i>et al.</i> , 1995).....	42
Figure 6 : Résultats obtenus pour le SNP 4, lors du gradient de PCR.....	61
Figure 7 : Résultats obtenus pour le SNP 2, lors du gradient de PCR.....	62
Figure 8 : Résultats obtenus pour le SNP 16, lors du gradient de PCR.....	62
Figure 9 : Résultats obtenus pour le SNP 1, lors du gradient de PCR.....	63
Figure 10 : Résultats obtenus pour le SNP 10.	65
Figure 11 : Résultats obtenus pour le SNP 16 lors de la première PCR dont les conditions sont décrites dans le paragraphe MM.1.3.3.	66
Figure 12 : Résultats obtenus pour le SNP 16 lors de la seconde PCR.	67
Figure 13 : Résultats obtenus pour le SNP 32.	68
Figure 14 : Schéma illustrant les hypothèses suggérées par les résultats du SNP 32.	69
Figure 15 : Schéma illustrant le principe de la filtration sur support solide (généralement sur des membranes dont la porosité varie de 0,01 à 10 µm).....	74
Figure 16 : Schéma illustrant le principe de la force externe.	75
Figure 17 : Schéma illustrant le principe de barbotage.	75
Figure 18 : Schéma illustrant le principe de l'impact sur solide et centrifuge.	76
Figure 19 : Schéma illustrant le principe de l'impact virtuel.....	76
Figure 20 : Schéma illustrant les méthodes utilisées pour l'analyse des échantillons du bruit de fond atmosphérique.....	82
Figure 21 : Situation géographique du lieu de collecte.	83
A) Vue globale des alentours de Vert-Le-Petit.	83
B) Détail sur les alentours du Centre d'Etudes du Bouchet.	83
Figure 22 : Photographie du cyclone.....	84
A) Vue globale du cyclone.	84
B) Détail de la tête d'entrée du cyclone avec le système d'arrivée du tampon de collecte....	84

Figure 23 : Résultats obtenus pour les collectes 30, 31 et 32 (25-26 novembre, 08-09 décembre et 15-16 décembre 2000) en ce qui concerne les analyses de numération par culture et par cytométrie.....	86
Figure 24 : Profil d'hybridation croisée de chaque espèce représentée sur les membranes d'hybridation.....	89
A) Disposition des genres bactériens sur le support solide	89
B) Profil d'hybridation croisée	89
Figure 25 : Profils d'hybridation croisée de certaines espèces appartenant au genre <i>Bacillus</i>	88
Figure 26 : Profils d'hybridation croisée d' <i>Escherichia coli</i> et des espèces appartenant au genre <i>Shigella</i>	90
Figure 27 : Profils des témoins lors de l'analyse des collectes 4, 11, 18 et 19.	93
Figure 28 : Résultats obtenus pour la collecte 4 (26-27 avril 2000) à la suite des analyses de numération par culture et par cytométrie.....	96
Figure 29 : Résultats des analyses génétiques réalisées sur la collecte 4 (26-27 avril 2000)	95
Figure 30 : Résultats obtenus pour la collecte 11 (15-16 juin 2000) à la suite des analyses de numération par culture et par cytométrie.....	98
Figure 31 : Résultats des analyses génétiques réalisées sur la collecte 11 (15-16 juin 2000)	97
Figure 32 : Résultats de quantification des membranes correspondant aux deux pics de <i>Bacillus</i> (pics de 17h30 et de 19h30) lors de la collecte 11	99
Figure 33 : Résultats obtenus pour la collecte 18 (02-03 août 2000) à la suite des analyses de numération par culture et par cytométrie.....	102
Figure 34 : Résultats obtenus pour la collecte 19 (09-10 août 2000) à la suite des analyses de numération par culture et par cytométrie.....	102
Figure 35 : Résultats des analyses génétiques réalisées sur la collecte 18 (02-03 août 2000).....	101
Figure 36 : Résultats des analyses génétiques réalisées sur la collecte 19 (09-10 août 2000).....	103
Figure 37 : Profil d'hybridation des deux colonies isolées à partir de la culture de certains échantillons de la collecte 19.....	105
Figure 38 : Schéma illustrant le principe de la méthode indirecte d'immunodosage.	
A) Test de compétition.	120
B) Test sandwich.....	120
Figure 39 : Schéma d'un biocapteur.....	125
Figure 40 : Schéma de la synthèse <i>in situ</i> selon le procédé de Southern (1994) dans le cas où le masque a la forme d'un losange.	127
Figure 41 : Schéma décrivant le procédé Affimétrie® (Le Toullec, 1998).....	128
Figure 42 : Schéma de la coupe d'une électrode de puce à ADN Nanogen® (Sosnowski <i>et al.</i> , 1997).....	129

Figure 43A : Réaction de copolymérisation entre le pyrrole et le pyrrole lié de façon covalente à l'oligonucléotide (Livache <i>et al.</i> , 1998).....	130
Figure 43B : Schéma du procédé Cis Bio International (Livache <i>et al.</i> , 1998).....	130
Figure 44 : Variation de la fréquence de résonance lors du passage d'ADN portant des groupes sulfhydriles à la surface de la QCM.....	137
Figure 45 : Comparaison de l'efficacité d'hybridation sur des membranes chargées positivement.	141
Figure 46 : Saturation progressive de la membrane de nylon.....	142
Figure 47 : Rapport signal sur bruit en fonction du type de membrane utilisée.	143
Figure 48 : Influence du nombre de spores sur la masse d'ADN récupérée.....	147
Figure 49 : Influence du compétiteur sur l'étape de broyage	149
Figure 50 : Efficacité d'incorporation du [α - ³² P] dCTP lors du marquage.	152
Figure 51 Qualité de la sonde et efficacité de son hybridation.....	153
Figure 52 : Cinétique d'hybridation pour le tampon RapidHyb™ et le tampon Church modifié.	155
Figure 53 : Influence sur l'efficacité d'hybridation du tampon RapidHyb™, du tampon Church modifié et des tampons composés de sulfate de dextran (SD) et d'une quantité de SDS variant de 1 à 3%.	156
Figure 54 : Influence sur l'efficacité d'hybridation du tampon RapidHyb™ et des tampons composés de SDS et d'une quantité de sulfate de dextran (SD) variant de 0 à 20%.	156
Figure 55 : Comparaison, pour chaque tampon d'hybridation utilisé, des intensités mesurées en absence d'ADN sur la membrane (bruit de fond de la membrane) et en présence de 1 μ g d'ADN.....	157
Figure 56 : Comparaison des rapports signal sur bruit en fonction du tampon d'hybridation.....	157
Figure 57 : Relation linéaire entre le nombre de dpm et les unités par minute mesurées au Storm® 860 (Molecular Dynamics).....	159
Figure 58 : Relation linéaire entre le nombre de dpm et les unités par minute mesurées au MicroImager™ (Biospace Mesures).	159
Figure 59 : Schéma illustrant le protocole de préparation des réactions réalisées pour la sélection et l'analyse des SNP identifiés.	170
Figure 60 : Schéma d'une membrane. Organisation des dépôts des différents ADN bactériens sur la membrane.....	179
Figure 61 : Schéma d'un cristal de quartz.....	182
Figure 62 : Schéma du montage de la microbalance à cristal de quartz.	183
Figure 63 : Schéma du montage de la microbalance pour fixer l'ADN par évaporation (Bizet, 1997).	184

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Récapitulatif des différents moyens de détection et d'identification de bactéries.....	35
Tableau 2 : Bilan des résultats relatifs à la première sélection des SNP sur un gradient de température d'hybridation de l'amorce.....	64
Tableau 3 : Bilan des résultats obtenus pour les SNP validés sur les 32 souches de <i>Bacillus anthracis</i> et les 6 souches de <i>Bacillus cereus</i>	70
Tableau 4 : Description des expériences menées sur les trois microbalances, l'une d'elles servant de témoin.....	138
Tableau 5 : Présentation de la disposition de la gamme d'ADN sur la membrane.....	142
Tableau 6 : Influence du lavage des billes après broyage sur la masse d'ADN récupéré...	145
Tableau 7 : Influence de la concentration en spores sur la masse d'ADN détectable.....	146
Tableau 8 : Présentation de la disposition des broyats sur la membrane afin de choisir un compétiteur.....	149
Tableau 9 : Différence de composition entre les quatre kits de marquage testés (cf. §MM.6.).....	151
Tableau 10 : Calcul du pourcentage de sonde s'hybridant au support sur lequel l'ADN complémentaire est immobilisé. Comparaison en fonction de l'appareil de détection utilisé.....	161
Tableau 11 : Analyse du bruit de fond généré par les appareils de détection testés.....	162
Tableau 12 : Organisation du dépôt des produits d'amplification lors de la validation des SNP sur un gradient de température d'hybridation (ou annealing).....	171
Tableau 13 : Organisation du dépôt des produits d'amplification lors de l'analyse des SNP sur une collection de souches de <i>Bacillus anthracis</i> et de <i>Bacillus cereus</i>	172
Tableau 14 : Différence de composition entre les quatre kits de marquage testés.....	186

PREAMBULE

La détection et l'identification de micro-organismes sont des opérations qui ont pour objet respectif de mettre rapidement en évidence leur présence dans un environnement déterminé et de définir leurs caractéristiques. Elles comportent un enjeu économique intéressant non seulement les activités industrielles, plus précisément l'industrie agro-alimentaire et celle de la distribution de l'eau potable, mais également divers domaines d'intérêt général tels que la santé, la défense ou l'environnement. D'une manière générale, s'agissant de l'industrie, elles permettent de contrôler, à chaque étape de fabrication, la qualité du produit et de s'assurer de l'absence de micro-organismes dans celui-ci. Dans le domaine de la santé, ces analyses sont susceptibles de fournir un diagnostic et d'établir les modalités de prise en charge rapide du patient. En matière d'environnement, la détection et l'identification, pratiquées à l'occasion du contrôle de la qualité de l'air, de l'eau et du sol, sont de nature à favoriser la détermination de zones susceptibles d'être infectieuses, usuellement dénommées « points chauds ».

En effet, la vulnérabilité aux épidémies, constatée chez les hommes et les animaux, se trouve accentuée depuis l'augmentation des déplacements intercontinentaux et la concentration des unités de production alimentaire. Ce phénomène est clairement illustré par les épidémies annuelles de grippe affectant l'ensemble du globe et, au début de cette année, par l'épidémie de fièvre aphteuse qui a atteint le cheptel anglais avant de s'étendre à d'autres territoires.

Par ailleurs, on relève que certains mouvements doctrinaires se manifestent par des actions de bioterrorisme. La secte Aum a notamment répandu du gaz sarin dans le métro de Tokyo en mars 1995. Les enquêtes menées dans les usines exploitées par la secte ont permis de démanteler un programme d'armes biologiques rudimentaires utilisant *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum* et *C. burnetii*. Cette organisation est également soupçonnée d'avoir envoyé, en 1992, certains de ses membres au Zaïre afin de se procurer le virus Ebola (Christopher *et al.*, 1997).

En outre, une partie de la population, regroupée autour de syndicats et d'associations, met l'accent sur la qualité de l'alimentation et de l'environnement, comme ce fut le cas à l'occasion de la Journée mondiale du refus des OGM (Organismes Génétiquement Modifiés) organisée le 17 avril 2001. Ces revendications soulignent la nécessité de contrôler la dissémination de ces organismes modifiés, de définir et de maîtriser les avantages et les risques qu'ils sont susceptibles de comporter.

Les avancées en matière de biologie moléculaire et de génomique (mise à disposition du public des séquences d'organismes) favorisent le développement par les laboratoires de recherche publique ou privée de vaccins, de drogues,... Cependant, ces progrès peuvent également être utilisés par des personnes malveillantes pour la production d'organismes modifiés, dont le potentiel pathogène peut, par exemple, être supérieur à celui naturellement existant (Dennis, 2001).

Dans le cadre d'un programme de défense, une demande a été formulée par les Etats-Majors sur la possibilité de détecter et d'identifier en un laps de temps réduit des micro-organismes pathogènes présents dans des prélèvements atmosphériques.

La détection de microbes constitue un sujet auquel la Défense Nationale accorde toute son attention.

La guerre du Golfe, menée contre l'Irak en 1990, a souligné le problème lié au développement d'armes biologiques par des pays qui souhaitent exercer une menace internationale. En 1992, les autorités soviétiques ont, quant à elles, reconnu avoir développé un programme de guerre biologique depuis 1946, malgré leur signature, en 1973, de la Convention de Genève relative aux armes biologiques.

Les attaques biologiques sont destinées à parvenir, le plus rapidement possible, à la paralysie des administrations civiles, notamment des services médicaux, et des forces militaires. Certes, par le passé, les agents biologiques ont rarement été disséminés sous la forme d'aérosol. Ce mode de dispersion n'en reste pas moins un dispositif aisé dans son utilisation, permettant une large propagation des maladies. Il existe peu d'informations sur l'impact potentiel d'une attaque biologique et, consécutivement, sur l'efficacité des mesures destinées, comme la vaccination, l'antibiothérapie et la quarantaine, à remédier à une telle attaque.

Par ailleurs, la protection du militaire est devenue une préoccupation internationalement débattue, du fait de la place des médias dans la société et de la sensibilisation consécutive de la population. En effet, l'opinion publique n'admet plus, au souvenir des drames causés par les derniers grands conflits historiques, en particulier par la seconde Guerre Mondiale, la décolonisation et la Guerre Froide, que le personnel militaire meure au combat alors même que sa fonction l'expose, par définition, à ce risque. Elle exige, en conséquence, que les progrès destinés à protéger le militaire suivent la même évolution que ceux accomplis dans la fabrication des armes.

Le développement d'un système de détection est désormais une priorité pour les Etats-Majors puisqu'il a vocation à éviter la neutralisation du pays.

Ainsi, dans le domaine de la biologie, certaines des technologies actuellement en plein essor, telles que la PCR (Polymerase Chain Reaction), les puces à ADN ou le séquençage des génomes, ouvrent de nouvelles perspectives pour la mise en œuvre d'un dispositif de détection répondant à cette exigence de protection et de prévention.

Les Etats-Majors ont défini trois stades de détection – identification :

- la « détection d'alerte », qui doit en quelques minutes avertir de la présence anormale de particules biologiques dans l'air,
- la « détection de contrôle », qui doit en quelques heures confirmer cette présence ou, au contraire, lever l'alerte,
- « l'identification », qui a pour objectif de caractériser la souche bactérienne ou virale à l'origine de l'alerte et de permettre, le cas échéant, la vaccination des soldats.

Cependant, l'élaboration d'un système de détection militaire se heurte à des contraintes dont certaines lui sont propres :

- Le système nécessite d'être aisément mobile et de provoquer sur le terrain un encombrement minimal. Il devra démontrer sa robustesse et la simplicité de son usage ;
- Il conviendra de maîtriser les risques biologiques liés à son utilisation ;
- Le système doit être insensible aux éléments interférents du champ de bataille. Les mesures devront effectivement s'affranchir de perturbations éventuelles causées par la présence, dans l'air environnant, d'éléments chimiques interférents tels que les produits de combustion, les gaz d'échappement, etc. ;
- Le système doit répondre à la complexité et à la diversité de l'environnement biologique. Le prélèvement atmosphérique se caractérise par sa complexité biologique (biotope environnant) en raison de la présence naturelle de pollens, de spores fongiques, de bactéries, etc. ;
- La détection doit être sensible et générique. En d'autres termes, le mécanisme de détection doit non seulement réagir à un faible nombre de bactéries mais également viser un éventail d'espèces qui soit suffisamment large eu égard à l'imprécision entourant la définition de la menace biologique.

Mon travail est divisé en trois parties :

La première partie est une contribution à la connaissance de *Bacillus anthracis*, considéré comme la principale menace biologique par la Défense. Le travail vise donc à établir une phylogénie entre différentes souches de *B. anthracis* et à pouvoir déterminer l'origine géographique d'une souche de cette espèce bactérienne pouvant être utilisée lors d'agressions biologiques. Les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) de deux souches de *B. anthracis*, dites Davis et Ames, séquencées ou en cours de séquençage, sont identifiés puis validés par PCR. Chaque SNP est ensuite typé sur une collection de souches de *B. anthracis*. Une dizaine de SNP a été caractérisée et typée sur une quarantaine de souches différentes de *B. anthracis*.

La deuxième partie est consacrée à l'analyse systématique de prélèvements atmosphériques collectés au cours d'une année. Cette dernière s'avère indispensable à l'élaboration d'un système de détection. En effet, elle informera sur les éventuelles variations dans la composition bactérienne de l'air au cours de la journée. De plus, un système de détection efficace, impliquant un nombre minimal de faux-positifs, nécessite de s'assurer de l'absence de micro-organismes pouvant être confondus avec des pathogènes, dans la composition normale de l'air. L'étude du bruit de fond atmosphérique s'affranchit de toutes contraintes de temps de manipulation des échantillons. Vu le nombre d'échantillons à traiter (48 échantillons par semaine pendant un an, soit environ 2 500 échantillons), les techniques utilisées pour la mise au point du système de détection ont été adaptées (passage en plaques 96 puits, par exemple).

La dernière partie décrit les choix effectués pour valider la faisabilité de la détection « de contrôle », en une heure, de bactéries présentes dans des prélèvements atmosphériques. La méthode est basée sur l'hybridation des acides nucléiques marqués, issus de l'échantillon, sur des ADN génomiques de référence, immobilisés sur un support solide. La sensibilité visée par un tel système doit être de l'ordre de quelques centaines de bactéries par litre d'air prélevé (ce qui représente quelques picogrammes d'ADN). Ces choix ont pour but, à partir de techniques déjà existantes, d'améliorer les sensibilités de détection, de réduire au minimum les temps de réaction et de diminuer le nombre de manipulations effectuées par l'opérateur. Ils ont porté sur le support solide (membrane), sur le procédé de traitement de l'échantillon, sur le marquage (kit), sur l'hybridation (tampon) et sur la détection (différents appareils ont été évalués). Cependant, certains procédés n'ont pas été explorés même s'ils ont été envisagés (marquage froid fluorescent ou chimiluminescent, hybridation en présence d'un champ électrique (breveté par Nanogen[®], traitement de l'échantillon par sonication,...). Pour les besoins de mises au point et de manipulations courantes, *B. subtilis* remplace

B. anthracis. En effet, ses spores reproduisent de façon appropriée les difficultés qui peuvent être rencontrées pour accéder à l'ADN lors du traitement de l'échantillon, ce dernier constituant un point délicat du projet. Ce travail a révélé qu'il était possible, grâce aux technologies actuelles, de détecter en un temps limité un nombre restreint de bactéries provenant de prélèvements atmosphériques. Une entreprise industrielle poursuit actuellement le développement de ce système de détection.

INTRODUCTION

1. *BACILLUS ANTHRACIS*

La présentation des caractéristiques de *Bacillus anthracis* permet de comprendre l'intérêt que porte la Défense à cette espèce.

1.1. GENERALITES SUR LES *BACILLUS*

Les *Bacillus* sont des bactéries gram-positives en forme de bâtonnets. Elles sont souvent mobiles, peuvent sporuler et vivent en aérobie strict ou en anaérobie facultatif. Elles sont majoritairement saprophytes (Forsyth *et al.*, 1998).

Les *Bacillus* sont répartis en trois catégories selon la morphologie de leurs spores (Toma, 1992) :

- le groupe I rassemble les bacilles dont les spores d'aspect ovale ou cylindrique ne sont pas déformantes (*B. cereus*, *B. lentus*, *B. megaterium*,...),
- le groupe II comprend les bacilles dont les spores ont une silhouette ovale modifiant la forme du corps de la bactérie (*B. circulans*, ...),
- le groupe III réunit les bacilles dont les spores rondes déforment le corps bacillaire (*B. sphaericus*,...).

Les *Bacillus* sont des bactéries telluriques. On les retrouve également dans l'eau et dans l'air. Les espèces pathogènes sont détectées dans les organismes malades. Grâce à leurs spores, ces bactéries possèdent une grande résistance à des conditions environnementales hostiles.

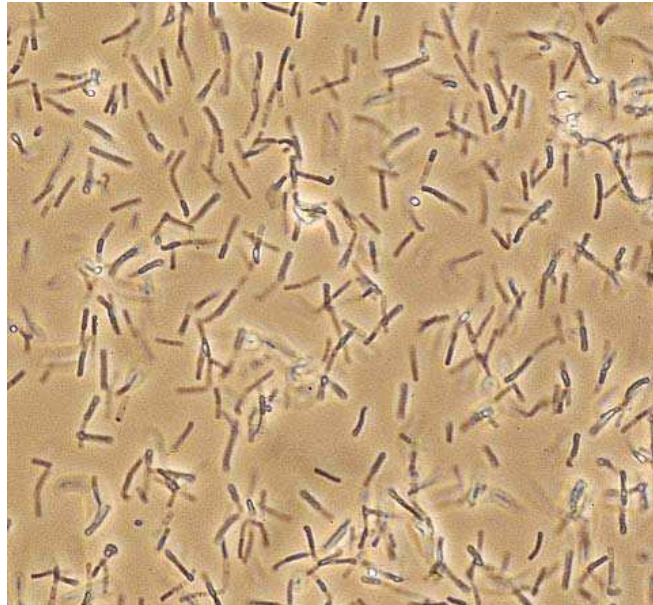
B. anthracis appartient au « groupe *B. cereus* » dans lequel se trouvent également *B. cereus*, *B. mycoïdes* et *B. thuringiensis*, ses trois plus proches voisins dans l'arbre phylogénétique (Inglesby *et al.*, 1999).

1.2. POUVOIR PATHOGENE NATUREL

B. anthracis est l'agent responsable de la maladie du charbon. Au sein des *Bacillus*, il est caractérisé par son pouvoir pathogène à l'égard des animaux et de l'homme. Il touche plus particulièrement les herbivores, mais également de nombreuses espèces de mammifères et de rares espèces d'oiseaux telles que l'autruche ou le canard.

Chez les animaux, le charbon est souvent interne et rarement externe. Les formes cliniques varient selon les espèces et les modes de contagion.

A) Bacilles de *Bacillus anthracis*



B) Spore de *Bacillus anthracis*

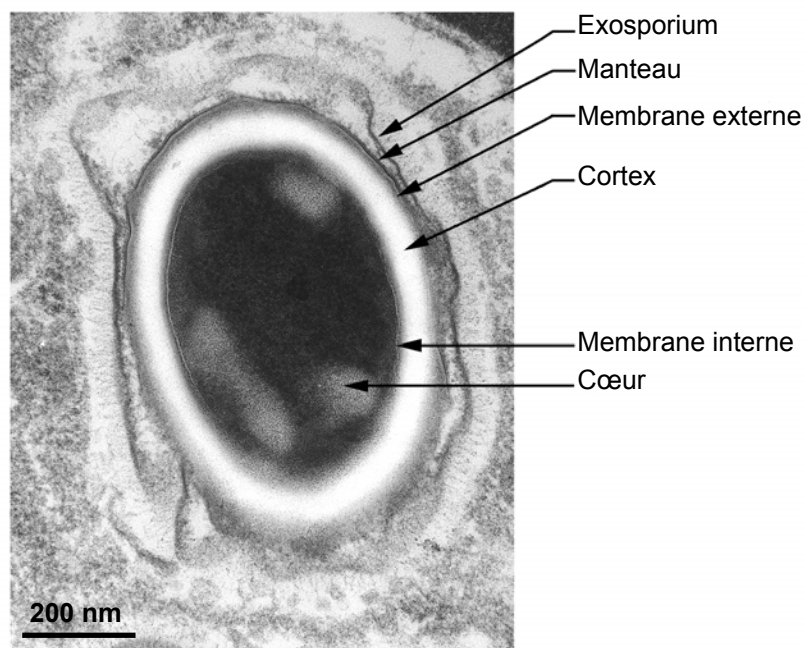


Figure 1 : *Bacillus anthracis*

A) Bacilles observés au microscope. Grossissement 40 (objectif : PLAN100/1.25 PHACO3 PHASE OBJECTIF)

B) Spore observée en microscopie électronique

Chez l'homme, cette maladie est rarement interne et souvent externe (95% des cas). Lorsqu'elle est interne, elle touche les poumons, le système gastro-intestinal ou le pharynx :

- le charbon externe chez l'homme se développe par l'intermédiaire d'une plaie que *B. anthracis* peut contaminer. La mortalité est nulle en présence d'une antibiothérapie adaptée.
- le charbon pulmonaire (ou maladie des trieurs de laine) est rare et fait suite à l'inhalation de spores de *B. anthracis*. Il est généralement fatal car le diagnostic est très difficile à établir dans les premiers stades de l'infection. Les symptômes sont un état pseudogrippal (symptômes de la méningite). En l'absence de traitement, la mort survient en 2 à 3 jours.
- les formes gastro-intestinales et pharyngées du charbon surviennent après l'ingestion de viandes contaminées et/ou peu cuites.

Quelle que soit la forme initiale de la maladie, celle-ci peut se manifester sous la forme d'une septicémie. La mort est due à l'action de la toxine charbonneuse et non à la multiplication de la bactérie. La pénicilline est le traitement de choix pour lutter contre l'infection par cette bactérie. Cependant, de rares cas de résistance à cet antibiotique ont été rapportés (Lalitha et Thomas, 1997).

1.3. MORPHOLOGIE ET STRUCTURE

B. anthracis est un gros bacille (cf. figure 1A) de 5 à 6 μm de long et de 1 μm de large en forme de bâtonnet. Ses spores ovales ne sont pas déformantes (cf. figure 1B). Il appartient donc au groupe I des *Bacillus*. Cette bactérie, aéro-anaérobie et immobile, forme des colonies dont l'aspect est blanchâtre et rugueux (Toma, 1992).

Les milieux de culture sont des milieux classiques, avec une température optimale de 30 à 35°C (températures extrêmes de 15 à 43°C) et un pH de 7,0 à 7,4 (pH extrêmes de 6,0 à 8,5). Dans les produits pathologiques, *B. anthracis* forme de courtes chaînettes, contrairement à la culture in vitro où il se caractérise par de longues chaînes.

Il possède deux aspects morphologiques intéressants : la capsule et la spore. La capsule est un des facteurs de virulence tandis que la spore permet à la bactérie de résister à des conditions hostiles. Le passage à l'état de spore exige la présence d'oxygène et d'humidité ainsi qu'une température comprise entre 18 et 42°C.

1.4. VIRULENCE ET PRODUITS DERIVES

La virulence de *B. anthracis* est due, d'une part, à la synthèse d'une capsule qui rend les bactéries résistantes à la phagocytose et, d'autre part, à la sécrétion d'une toxine puissante (Berche *et al.*, 1988).

La capsule est synthétisée dans des conditions particulières, sur des milieux contenant du sérum ou du bicarbonate et sous atmosphère enrichie en CO₂. Elle est synthétisée par trois gènes, *capA*, *capB* et *capC*, qui sont localisés sur le plasmide pXO2 (95 kb). La capsule ne peut être produite qu'*in vivo* ou en culture. Elle est présente sur les souches virulentes et, réciproquement, les souches qui ne sont pas virulentes ne sont pas entourées de cette capsule.

La toxine charbonneuse est constituée de trois polypeptides distincts, synthétisés par des gènes se trouvant sur le plasmide pXO1 (185 kb). Séparément, ces trois facteurs sont atoxiques. Les gènes *cya*, *pag* et *lef* codent respectivement pour les trois polypeptides, EF (edematogen factor) ou œdematogène, PA (protective antigen) ou immunogène et LF (lethal factor) ou cofacteur létal. Les facteurs EF et PA sont responsables de la formation d'œdèmes chez le lapin. Les facteurs PA et LF sont responsables de la mort chez la souris. Par contre, pris séparément, les facteurs EF et LF ne sont pas immunogènes et sont dépourvus de leurs propriétés biologiques spécifiques.

1.5. EPIDEMIOLOGIE

On dénombre, chaque année, entre 20 000 et 100 000 cas humains de la maladie du charbon dans le monde, plus particulièrement en Asie et en Afrique (Berche *et al.*, 1988).

Lorsque le sol est souillé par les excréments des animaux malades et par les cadavres, la contamination est favorisée car les spores de *B. anthracis* sont alors capables de survivre plusieurs dizaines d'années dans le sol (existence de « points chauds »). Cependant, en l'absence d'oxygène, notamment dans un organisme infecté et mort, les bactéries végétatives ne sporulent pas et leur virulence diminue en quelques jours. Par conséquent, il est recommandé de ne pas autopsier les cadavres contaminés par *B. anthracis* dans les jours suivant la mort.

1.6. MENACE BIOLOGIQUE

L'objectif d'une attaque biologique est de neutraliser le plus rapidement possible les forces civiles, en particulier les services médicaux, et militaires de l'adversaire. A cet égard, l'attaque demeurant invisible pendant la période d'incubation de la bactérie ainsi dispersée, elle n'entraîne aucune réaction immédiate de la part des autorités du territoire assailli (Inglesby *et al.*, 1999, Kadlec *et al.*, 1997).

La dispersion d'agents biologiques sous la forme d'aérosol a rarement été réalisée dans le passé. Cependant, ce procédé de dissémination n'en demeure pas moins envisageable pour la propagation d'une maladie. Dans le cas d'une dispersion de *Bacillus anthracis* par un aérosol, l'épidémie serait davantage de nature pulmonaire que cutanée, dans la mesure où la probabilité d'une contamination par inhalation serait supérieure à celle d'une contamination résultant d'une plaie. Sur la base des données relatives aux primates, on estime que la DL 50 pour l'homme (dose létale suffisante pour tuer 50% des personnes exposées) varie de 8 000 à 50 000 spores de *B. anthracis* inhalées. En l'absence de traitement antibiotique approprié, la mort survient en quelques jours (Franz *et al.*, 1997, Inglesby *et al.*, 1999, McGovern *et al.*, 1999).

1.6.1. EXEMPLE DE GRUINARD

Gruinard est une île anglaise. Pendant la seconde guerre mondiale, les forces alliées ont soupçonné le développement d'une arme biologique par l'Allemagne. Face à cette crainte, une collaboration scientifique américaine, canadienne et britannique a permis d'expérimenter, sur l'île de Gruinard, des bombes contenant des spores de *B. anthracis*. Malgré les conditions extrêmes dues à l'explosion de ces obus, les spores de *B. anthracis* ont résisté à cet essai. En effet, en quelques jours, certains des moutons présents sur l'île sont morts des conséquences liées à l'inhalation de la bactérie pulvérisée lors de cette expérience. Le dépôt sur le sol des particules pulvérisées a occasionné la mort d'autres animaux à la suite de l'ingestion des bactéries présentes sur l'herbe contaminée.

L'île est restée interdite jusqu'à la fin des années 80, date à laquelle elle fut décontaminée (Aldhous, 1990, Manchee *et al.*, 1981).

1.6.2. EXEMPLE DE SVERDLOVSK

Le 02 avril 1979, une épidémie de charbon s'est produite à Sverdlovsk en ex-URSS, provoquant une soixantaine de morts. En 1980, une publication a attribué l'infection cutanée et gastro-intestinale à de la consommation de viandes contaminées par *B. anthracis*. Mais les Occidentaux ont soupçonné que l'épidémie trouvait son origine dans une libération accidentelle de spores de *B. anthracis* par une usine militaire. En effet, celle-ci se situait à l'extrémité nord de la zone à haut risque dans laquelle la plupart des victimes avaient vécu ou travaillé. Les études épidémiologiques ultérieures ont suggéré que la libération de l'aérosol de *B. anthracis*, à partir de cette usine, était responsable de l'épidémie et des décès qui avaient suivi. Tous les résultats obtenus sur les victimes de cette épidémie ont confirmé l'infection par *B. anthracis*. Cet accident a provoqué une libération de spores dans l'air dont la quantité totale a été estimée entre 1 mg et 1 g (Abramova *et al.*, 1993, Inglesby *et al.*, 1999, Jackson *et al.*, 1998, Meselson *et al.*, 1994). Un défecteur soviétique a, par la suite, décrit en détail les circonstances de l'accident dans un livre.

2. COMPOSITION BIOLOGIQUE DU BRUIT DE FOND ATMOSPHERIQUE

2.1. INTRODUCTION

Le bruit de fond atmosphérique est un mélange complexe de matériels biologiques (pollens, spores fongiques, bactéries, virus,...) et chimiques (gaz d'échappements, gaz industriels,...).

Dans le but de valider les mesures enregistrées par un système de détection, notre attention a donc porté sur la possibilité pour ce dernier de répondre à la complexité de l'environnement biologique. Il convient, effectivement, de déterminer si les signaux observés sont liés à la détection de bactéries pathogènes ou si, au contraire, l'alerte se déclenche au moindre contact avec du matériel biologique générant ainsi de nombreux faux-positifs.

Les particules aériennes respirées sont classées selon leur taille :

- la fraction dite « inhalable » concerne les particules les plus larges (dont le diamètre est supérieur à 50 μm) qui se logent dans les voies respiratoires supérieures (nez et rhinopharynx),
- la fraction dite « thoracique » regroupe les particules de quelques dizaines de micromètre de diamètre qui pénètrent jusque dans le larynx,
- les particules de 1 à 10 μm de diamètre forment la fraction dite « pulmonaire ». Celles dont le diamètre est compris entre 2 et 6 μm sont transportées jusque dans les poumons. Quant à celles dont le diamètre est inférieur à 2 μm , elles sont retenues dans les alvéoles (Cherrie et Aitken, 1999, Stetzenbach, 1997).

Certains bio-aérosols peuvent soit agir comme agents sensibilisants ou infectieux, soit produire des toxines comportant, dans les trois cas, des effets sur la santé plus ou moins sévères et plus ou moins chroniques (Burge, 1990).

La plupart des travaux sur la composition biologique de l'air ont porté sur les allergènes (pollens, spores fongiques) car ils sont la cause principale des problèmes respiratoires tels que les rhinites. Les études sur la composition bactériologique de l'air ont également porté sur l'analyse d'environnements spécifiques (hôpitaux, fermes,...) susceptibles de contaminations par des agents infectieux. Parfois, elles ne se sont intéressées qu'à la bactérie responsable de l'infection.

En 1978, Bovallius *et al.* ont souligné que le comportement sur le long terme de la flore bactérienne naturelle du bruit de fond atmosphérique à l'extérieur n'avait pas été étudié depuis 1883. Malgré les nouvelles techniques, en particulier de biologie moléculaire, trois études seulement ont été menées sur ce sujet depuis cette publication (Mancinelli et Shulls, 1978, Bovallius *et al.*, 1978, Turnbull *et al.*, 1998).

Un certain nombre d'études sur le pollen, les spores fongiques et les bactéries ont été publiées. Cette section présente certaines des recherches accomplies sur des échantillons de l'air provenant de l'extérieur. Elles mettent en évidence les principales espèces biologiques retrouvées dans l'air et soulignent l'influence des facteurs environnementaux sur la présence de ces particules. Les habitats naturels de certains genres bactériens qui ont été utilisés pour le projet et diverses méthodes de collection sont ensuite exposés.

2.2. LE POLLEN

En 1994, Pehkonen et Rantio-Lehtimäki ont publié un article relatif aux effets des facteurs météorologiques sur les variations de concentrations de pollens en Finlande.

La collecte a eu lieu du 15 avril au 06 juillet 1992 et se divise en trois périodes (avant (du 15 avril au 13 mai), pendant (du 14 mai au 08 juin) et après (du 09 juin au 06 juillet) le pic annuel de pollens du bouleau). Le collecteur utilisé permet de discriminer les particules en fonction de leur taille. Ces dernières sont filtrées sur un support solide puis resuspendues dans un tampon afin d'être détectées par test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

On observe la présence de pollens de bouleau pour chacune des tailles de particules étudiées. De plus, le nombre maximal de particules est relevé pendant la période de pollinisation.

La température et l'humidité relative influent de façon déterminante dans la libération du matériel antigénique pendant la pollinisation : un temps chaud et sec favorise la libération de pollens.

Les plus grosses particules contiennent les pollens intacts et sont essentiellement détectées pendant la période de pollinisation. Les particules de taille moyenne sont, quant à elles, observées après cette période.

Les plus petites particules sont présentes avant la période de pollinisation. Leur détection, à cette époque de la pollinisation, peut correspondre à une réaction croisée de l'anticorps avec des pollens d'autres Bétulacées tels que le noisetier ou l'aulne dont les pics de pollens apparaissent un peu plus tôt dans la saison.

2.3. LES SPORES FONGIQUES

En 1982, une équipe thaïlandaise a décrit une étude concernant les spores fongiques, leur incidence saisonnière et leur concentration à l'intérieur et à l'extérieur des habitations (Bunnag *et al.*, 1982).

Une fois par semaine, pendant un an (de janvier à décembre 1977), 4 boîtes de culture ont été exposées de 5 à 15 minutes (2 à l'extérieur et 2 dans une chambre). Les champignons ont ensuite été identifiés selon la morphologie de la colonie et les caractéristiques de sporulation.

On relève que le nombre et le type de spores fongiques sont presque identiques, que celles-ci soient prélevées à l'intérieur ou à l'extérieur des habitations. Ce résultat découle d'un apport de l'air extérieur vers l'intérieur des maisons thaïlandaises, celles-ci demeurant ouvertes et ventilées favorisant ainsi la pénétration des particules. Cependant, le recours à la culture présente un certain nombre d'inconvénients : certaines spores fongiques ne se développent pas sur le milieu sélectionné, d'autres n'adhèrent pas aux lames de microscope, enfin, certaines compromettent la croissance d'autres spores. Les champignons les plus fréquemment retrouvés sont, dans l'ordre décroissant, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* et des levures. *Cladosporium* est le seul à montrer une variation saisonnière. Il est surtout présent en hiver (pic de novembre à février). Ses spores sont généralement libérées dans l'atmosphère après une précipitation (dans des conditions humides). Les variations saisonnières des trois autres genres fongiques apparaissent moins marquées.

De façon similaire, en 1992, Li et Kuo ont observé les variations de concentrations de champignons respirables (capables de passer la frontière nasale) et non respirables à l'intérieur et à l'extérieur de 6 résidences taiwanaises (à Taipei) pendant les mois de mai et de juin.

La collecte a eu lieu en mai et juin par des températures de 21 à 29°C et une humidité relative de 70 à 85 %. Les mesures de concentrations sont exprimées en cfu (colony forming unit) rapportée au volume d'air aspiré par le collecteur.

Les auteurs ont estimé que la partie respirable de champignons représentait de 70 à 85% du nombre total de champignons. Les concentrations respirables en champignons mesurées à l'intérieur et à l'extérieur des habitations sont identiques. Les spores fongiques isolées étaient, dans l'ordre de fréquence décroissant, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* et des levures. La température et l'humidité relative, élevées dans ce pays, expliquent les fortes concentrations en champignons relevées par les auteurs.

2.4. LES BACTERIES

2.4.1. DETECTION SUR BOITE DE CULTURE

Une équipe américaine (Mancinelli et Shulls, 1978) a tenté d'établir une relation entre le nombre de bactéries cultivables, les polluants présents dans l'air et les paramètres météorologiques.

Les auteurs collectent l'air avec un appareil dont le débit est fixé à 30 litres d'air par minute. La collecte dure 30 minutes. Elle se déroule à 10 mètres au-dessus du sol (sur un toit d'immeuble), dans une zone urbaine pendant la journée (entre 10h00 et 15h00), par un temps clair et nuageux (vitesse du vent de 0 à 6,4 km/h). Neuf cents litres d'air sont ainsi collectés sur des filtres maintenus verticalement. Ces filtres sont placés sur des boîtes de Petri qui sont incubées à 25°C pendant 48 heures. Les colonies formées sont ensuite comptées. Chaque micro-organisme est identifié par ses caractéristiques morphologiques et biochimiques.

Les bactéries isolées sont essentiellement d'origine tellurique, en d'autres termes on les trouve principalement dans le sol. *Micrococcus* et *Staphylococcus* sont les genres les plus fréquemment cultivés à partir des échantillons prélevés dans ce site urbain. Ils existent naturellement sur la peau de l'homme dont l'activité favorise la dispersion. Le coefficient de corrélation est négatif entre le nombre de bactéries isolées et la concentration en monoxyde d'azote (NO), alors que celui obtenu entre le nombre de bactéries cultivables et les concentrations en dioxyde d'azote (NO₂) et en particules polluantes suspendues dans l'air est positif. D'autres facteurs tels que la température, l'humidité relative et les radiations solaires influencent faiblement la capacité des bactéries à être cultivées.

En 1978, Bovallius *et al.* ont mené une étude sur la composition bactérienne de l'air prélevé en Suède en quatre sites distincts.

Ils ont utilisé un collecteur de type Andersen dont le débit a été fixé à 28,3 litres d'air par minute. Cet appareil comporte six tamis destinés à séparer les particules selon leur taille. Il dépose ces dernières, grâce à la force d'inertie, sur une surface nutritive. La culture des particules produit des colonies visibles qui sont ensuite dénombrées. Un fongicide est ajouté au milieu de culture pour inhiber la croissance des champignons.

Les collectes se déroulent sur 4 sites différents :

- à la campagne, à 40 km à l'intérieur des terres à partir de la côte, de 11h00 à 14h00, de janvier 1969 à juin 1973,
- sur la côte est de la Suède, de 11h00 à 14h00, de janvier 1969 à juin 1973,
- dans un parc urbain de Stockholm, de 09h00 à 11h00, de juillet 1972 à juin 1973,
- dans une rue urbaine du centre de Stockholm, de 09h00 à 11h00, de juillet 1972 à juin 1973.

D'après les résultats obtenus par les auteurs, les concentrations bactériennes observées dans chacun des deux sites urbains sont jusqu'à deux fois plus élevées que celles mesurées pour chacun des deux sites ruraux. Dans les sites urbains, ces concentrations sont essentiellement provoquées par l'activité humaine et deviennent faibles en hiver. La concentration moyenne en bactéries, relevées dans chaque site rural, se situe à un niveau maximal durant l'été et l'automne (juin à novembre) et trouve son niveau le plus faible en hiver (décembre à février).

Les précipitations, la neige et une forte humidité relative tendent en effet à diminuer la concentration bactérienne dans l'air. Une forte température ou des vents forts contribuent, au contraire, à augmenter cette concentration.

La moitié des particules ont une taille supérieure à 8 μm .

Selon les auteurs, on observe une quantité de bactéries cultivables inférieure dans les échantillons prélevés à 10 mètres au-dessus du sol qu'à 2 mètres. Ces résultats indiquent donc que la majorité des particules aériennes sont d'origine locale.

2.4.2. IDENTIFICATION DES ADNr 16S

En 1998, Turnbull *et al.* ont écrit un rapport portant sur la composition bactériologique de l'air ambiant en Grande-Bretagne. Leur analyse repose sur l'utilisation de technologies récentes disponibles et de techniques plus conventionnelles. Elle a pour objet de détecter, d'identifier, voire de quantifier les spores fongiques, les bactéries et les pollens présents dans l'air ambiant.

Dans cette étude, les échantillons sont collectés sur des filtres. Les pollens et les spores fongiques sont identifiés et comptés par microscopie électronique. En ce qui concerne les bactéries, les auteurs ont procédé à un examen génétique qualitatif sur certains échantillons. Cet examen génétique consiste en une PCR réalisée sur des fragments d'ADNr 16S dont les produits d'amplification sont clonés afin d'identifier le genre des bactéries présentes dans l'échantillon. Les cellules bactériennes filtrées sont, en outre, dénombrées par microscopie après hybridation avec des sondes fluorescentes spécifiques des régions variables ou conservées de l'ARNr 16S (Fluorescence Probe Microscopy).

En Grande-Bretagne, les vents dominants soufflent du sud-ouest. Les collectes sont conduites sur quatre sites différents :

- sur la côte (Lizard), dans une réserve naturelle,
- dans un parc urbain à environ 5 km du centre ville de Birmingham,
- dans deux sites ruraux (Pershore et Lichfield), sites militaires entourés de terres agricoles. A proximité du site de Pershore se trouvent une décharge et des fermes d'élevage.

Les quatre sites, Lizard, Pershore, Birmingham et Lichfield, forment une succession ordonnée sur une ligne traversant le pays du sud-ouest au nord-est (cf. figure 2). Le site de Pershore n'est pas protégé du vent par la ville de Birmingham (« upwind »), contrairement au site de Lichfield (« downwind »).

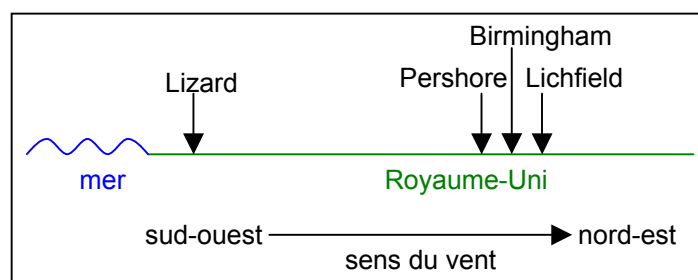


Figure 2 : Schéma décrivant la position des sites de collecte par rapport au sens du vent dominant.

Les collectes durent six heures pendant six jours sur chaque site, pour chacune des saisons. Ces campagnes se sont déroulées de l'été 1995 jusqu'à l'automne 1996 (soit six saisons). Environ 600 échantillons ont donc été prélevés.

Les auteurs ont ainsi démontré qu'il existait des profils variant selon les saisons, le cycle diurne/nocturne ou le site.

En ce qui concerne les pollens, les quantités maximales sont relevées au printemps et au début de l'été. Elles sont essentiellement observées de jour. Les plus grandes quantités de pollens ont été mesurées à Birmingham et à Pershore.

S'agissant des champignons, leur concentration est plus élevée en été et en automne. Toutefois, elle ne varie guère au cours de la journée. Les auteurs ont enregistré les plus fortes concentrations à Pershore et les plus faibles à Lizard.

Quant aux bactéries, leur concentration atteint son plus haut niveau au printemps et en été, puis décline légèrement en automne avant de diminuer de manière significative en hiver. Le profil diurne est peu soumis à des variations. En outre, les concentrations bactériennes relevées sur les sites de Pershore, Lichfield et Birmingham sont similaires. A l'inverse, elles se distinguent par leur faiblesse sur le site côtier de Lizard.

Les auteurs ont également tenté d'établir une corrélation entre, d'une part, les concentrations en pollens, en spores fongiques et en bactéries et, d'autre part, les données météorologiques et les mesures chimiques de certains polluants.

Ils ont ainsi constaté que la concentration en bactéries triplait lorsque la température relevée sur le site de Lizard augmentait de 5 à 15°C. Ils ont également mis en évidence que ce site était dominé par les genres bactériens associés aux sources marines ou aquatiques.

La concentration en bactéries tend, effectivement, à augmenter avec celle en ions chlorures et à diminuer avec la pollution de l'air, en particulier avec la présence d'ions sulfates et nitrates. Ces résultats seraient liés à la situation spécifique de ce site. En effet, les masses d'air polluées, circulant en Europe et en Grande-Bretagne, contiennent généralement moins de bactéries que les masses d'air marin provenant du sud-ouest de l'île. Les concentrations bactériennes évoluent indépendamment de la vitesse du vent soufflant sur ce lieu de collecte.

A l'inverse, les prélèvements effectués sur les sites ruraux et urbains ont permis de constater que la concentration bactérienne diminue par effet de dilution de l'air, quand la vitesse du vent augmente. Cette concentration évolue également de manière négative en présence d'air marin, notamment en raison des ions chlorures participant à la composition de ce dernier. A l'inverse, les ions nitrates et sulfates, caractérisant un air pollué, semblent contribuer sensiblement à sa croissance. On en déduit que le milieu rural et l'activité humaine sont de nature à favoriser la resuspension des bactéries dans l'air.

Sur le site côtier, la concentration en champignons dans l'air est diluée par l'effet du vent. Dans les terres, cette concentration diminue avec l'accroissement de celle en ions chlorures, avec l'apparition de précipitations, si réduites soient-elles, ou par effet de dilution avec la vitesse du vent. En revanche, elle augmente avec la température. En définitive, les fortes concentrations sont associées à une période chaude et sèche.

2.4.3. CONCLUSIONS

Seules trois études sur la composition bactériologique de l'air extérieur existent et ont été présentées ci-dessus.

Les deux premières utilisent la culture pour caractériser les bactéries présentes dans des prélèvements atmosphériques. Un biais est donc introduit dans ces travaux car ils ne considèrent que la fraction cultivable du prélèvement. Or, des études ont, ensuite, mis en évidence que la fraction cultivable ne représentait qu'environ 1% du nombre total de particules biologiques présentes dans les prélèvements (Aman *et al.*, 1995, Staley et Konopka, 1985).

L'étude anglaise a profité des avancées technologiques récentes. Elle utilise en particulier le séquençage des ADNr 16S comme méthode d'identification. Cette dernière permet de caractériser assez précisément un micro-organisme, même quand le séquençage de l'ADNr 16S n'a pas été préalablement réalisé.

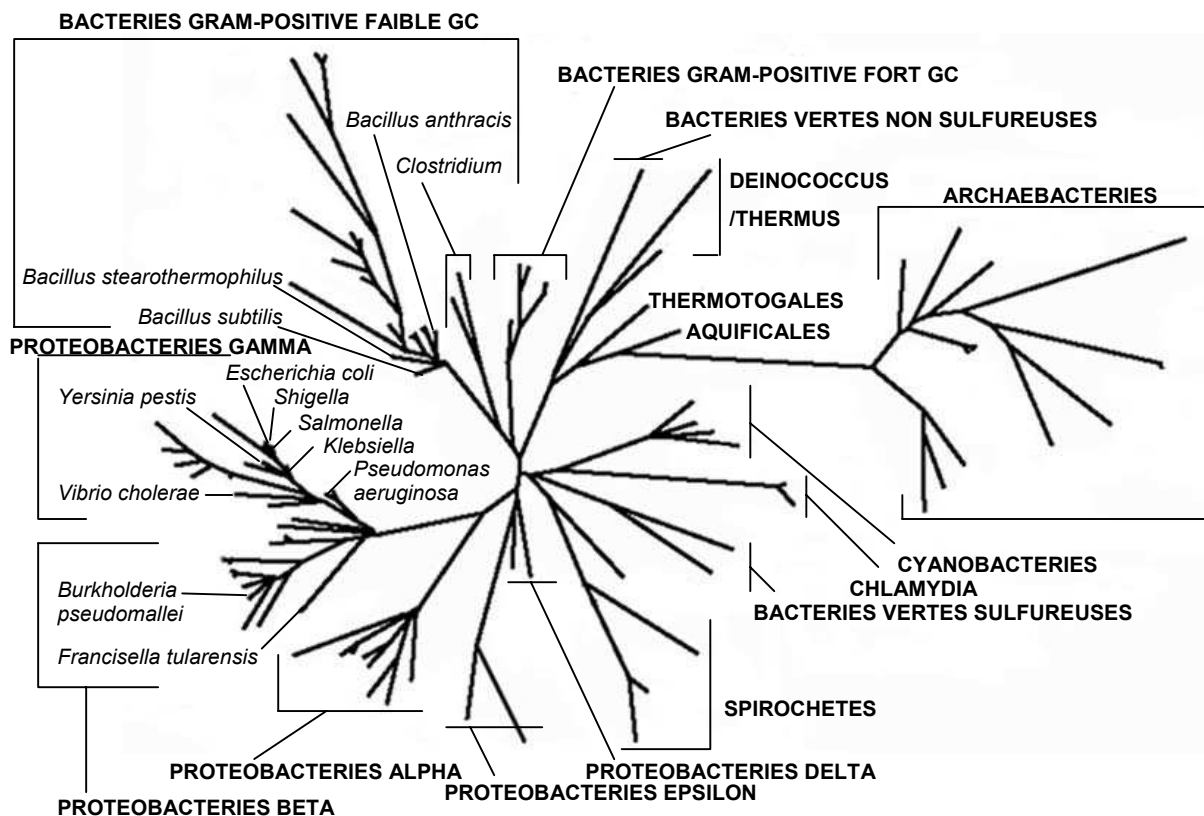


Figure 3 : Arbre phylogénétique de bactéries basé sur les séquences d'ARNr 16S (d'après Nelson et al., 2000)

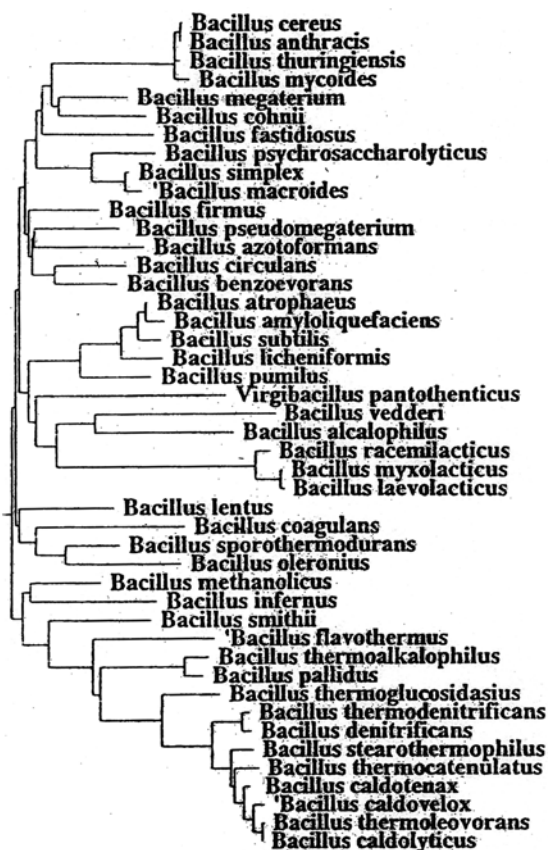


Figure 4 : Arbre phylogénétique des espèces de *Bacillus* basé sur les séquences d'ARNr 16S (Forsyth et al., 1998)

De plus, les collectes ne sont réalisées que pendant quelques jours pour chaque saison de l'année. Chaque prélèvement correspond à une durée de collecte longue (6 heures). Or, il est possible que des pics de concentration de bactéries ou d'autres micro-organismes, présents à un instant donné, soient masqués après six heures de collecte. En effet, les collectes étant réalisées sur des filtres, il est probable que la survie de certains micro-organismes soit limitée par le stress provoqué par la dessiccation.

2.5. HABITATS NATURELS DE CERTAINS GENRES BACTERIENS ETUDIES

La sélection des genres bactériens, que nous avons étudiés au cours de ce projet, est basée, d'une part, sur les résultats de l'étude anglaise concernant le bruit de fond atmosphérique (Turnbull *et al.*, 1998) et, d'autre part, sur les agents bactériens participant à la menace biologique et sur leurs proches voisins phylogénétiques.

Un arbre phylogénétique des genres bactériens présents sur les membranes que nous utilisons est représenté dans la figure 3.

2.5.1. BACILLUS

Les *Bacillus* sont largement répandus dans la nature, surtout dans le sol (Turnbull et Kramer, 1995). Ils sont rencontrés dans la poussière, dans l'eau et sur les matériels d'origines animale et végétale. Par contre, ils ne font pas partie de la flore naturelle de l'homme ou des animaux.

Les études, concernant les ADNr 16S, estiment à environ 99% l'homologie existant entre les espèces *B. anthracis*, *B. cereus* et *B. mycoïdes*. S'agissant de l'ADN génomique, cette homologie s'élève à plus de 80% entre ces trois espèces (Harrell *et al.*, 1995, Ash *et al.*, 1991). Ce pourcentage se réduit avec l'éloignement phylogénétique des espèces les unes par rapport aux autres (cf. figure 4).

2.5.2. BRUCELLA

L'animal domestique constitue le réservoir naturel de ce genre bactérien (Moyer et Holcomb, 1995). La brucellose est une zoonose dont la transmission à l'homme s'effectue par le lait, les produits laitiers, la viande et le contact direct avec les animaux infectés. Les plus fortes quantités de *Brucella* se mesurent généralement au printemps et en été. Ce genre survit le plus souvent dans les organismes infectés. En effet, il se révèle relativement fragile dans le milieu extérieur.

2.5.3. BURKHOLDERIA ET PSEUDOMONAS

Le genre *Burkholderia* (Gilligan *et al.*, 1995) regroupe 7 espèces qui appartenaient initialement au genre *Pseudomonas*. Les *Burkholderia* et *Pseudomonas* existent naturellement dans l'environnement. Ils sont présents dans l'eau, dans le sol et sur les plantes (fruits, légumes,...). Ces bactéries phytopathogènes sont capables de survivre dans des environnements aqueux.

Parmi les *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* est un pathogène nosocomial, que l'on trouve rarement dans la microflore bactérienne humaine, infectant surtout les personnes immunodéprimées, par ingestion ou inhalation (Gilligan *et al.*, 1995). Il est souvent associé à des milieux humides tels que les robinets, les éviers, les douches,....

Le genre *Burkholderia* a pour principal habitat le sol et les plantes.

Parmi les espèces appartenant à ce genre, *B. mallei* et *B. pseudomallei* sont des pathogènes d'importance considérable. *B. mallei* est un parasite strict responsable de la morve des équidés qui peut occasionnellement se transmettre à l'homme et aux carnivores. *B. pseudomallei* est présent dans le sol (boue, sédiments,...) et dans l'eau (mares, rizières,...). Cette espèce hydrotellurique peut vivre en dehors des zones tropicales et résiste au froid.

Pour leur part, *B. cepacia* et *B. multivorans* sont présents dans le sol et dans l'eau. Elles peuvent, en particulier, se développer dans l'eau du robinet, dans l'eau distillée, dans les solutions antiseptiques ou dans les solutés injectables. *B. cepacia* est une bactérie phytopathogène qui intéresse l'industrie car elle est capable de produire des substances bactéricides et fongicides, de dégrader des déchets industriels et des pesticides. Ces deux espèces pathogènes peuvent provoquer des maladies opportunistes chez des individus immunodéprimés.

2.5.4. CLOSTRIDIUM

Le genre *Clostridium* (Onderdonk et Allen, 1995) est largement répandu dans la nature, en particulier dans le sol, dans l'eau fraîche et dans les sédiments marins. C'est le seul genre anaérobie produisant des spores. Certains *Clostridium* contribuent à la composition normale de la flore microbienne des voies intestinales inférieures de l'homme et de certains autres animaux.

2.5.5. ESCHERICHIA, SHIGELLA, SALMONELLA ET YERSINIA

Ces quatre genres bactériens, dont certaines espèces sont pathogènes pour l'homme, sont en particulier responsables de gastro-entérites sévères (Gray, 1995).

Escherichia coli appartient à la flore bactérienne normale de l'intestin humain ou animal.

Les *Shigella* sont responsables de la dysenterie. La transmission de cette bactérie s'opère par le biais des individus, de l'eau ou de la nourriture.

Les *Shigella* et les *Escherichia*, du fait de la forte homologie constatée entre leurs séquences d'ADN (99% d'homologie entre les ADNr 16S), semblent *a priori* constituer un genre bactérien unique. Les tests biochimiques et sérologiques ne permettent pas de les distinguer davantage. Leur différenciation repose véritablement sur des critères cliniques.

Les salmonelles sont responsables de maladies s'étendant de la gastroentérite modérée jusqu'à la fièvre typhoïde mortelle. Elles sont largement répandues dans la nature. En effet, leur réservoir comprend tout le règne animal. Par contre, l'homme est le seul réservoir naturel connu de *Salmonella typhi* et de *S. paratyphi A, B et C*.

Parmi les 12 espèces de *Yersinia*, trois présentent un caractère pathogène pour l'homme : *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*. Les *Yersinia* provoquent des zoonoses affectant surtout les rongeurs, les petits animaux, les oiseaux et accidentellement l'homme.

Y. pseudotuberculosis est présente dans l'eau, dans le sol, dans les plantes et contribue à la composition normale de la flore intestinale des oiseaux, des rongeurs, et des carnivores (chiens, chats).

Pour sa part, *Y. pestis* est une bactérie pathogène pour les rongeurs, qui se transmet aux autres mammifères par l'intermédiaire des puces.

Y. enterocolitica se retrouve dans l'environnement (sol, eau,...) et dans la flore intestinale des animaux sauvages (rongeurs, oiseaux) et domestiques (porc, veau,...).

2.5.6. FRANCISELLA

Francisella tularensis est l'espèce pathogène la plus importante de ce genre, comprenant également *Francisella novicida* (Stewart, 1995). En effet, pour certaines souches, 50 à 100 bactéries suffisent à provoquer l'apparition de la tularémie chez l'homme, cette maladie résultant d'interactions avec des animaux sauvages ou leurs environnements.

Les rongeurs, les lagomorphes (ordre des mammifères classés autrefois parmi les rongeurs et qui comprend le lièvre et le lapin) et les tiques forment le principal réservoir de *Francisella tularensis*. Les tiques sont également vecteurs de la maladie.

Dans le milieu extérieur, la survie de *F. tularensis* dépend de la température. Lorsque celle-ci reste inférieure à 0°C, la bactérie résiste jusqu'à neuf mois dans l'eau ou le sol. Par contre, elle meurt en quelques jours lorsque la température devient supérieure à 10°C.

2.5.7. MICROCOCCUS

Le genre *Micrococcus* est répandu aussi bien dans le milieu naturel que sur la peau humaine et les animaux (Kloos et Bannerman, 1995). *M. luteus* et *M. varians* sont les espèces les plus représentatives de ce genre et se trouvent essentiellement sur les humains. *M. varians* se rencontre également sur d'autres mammifères. *M. luteus* ne survit que peu de temps dans le sol.

2.5.8. VIBRIO

Les *Vibrio* sont des habitants naturels de l'eau salée et saumâtre (McLaughlin *et al.*, 1995). Ils sont présents sur toute la surface du globe. Parmi plus de 30 espèces de *Vibrio*, 12 sont pathogènes pour l'homme ou ont été isolées à partir de prélèvements cliniques humains. La maladie humaine, caractérisée par une gastro-entérite sévère, est associée à l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés, tels que les crustacés ou les fruits de mer.

3. MOYENS DISPONIBLES POUR LA CARACTERISATION DE BACTERIES

Il existe de nombreux procédés permettant la détection de bactéries dans des échantillons.

Parmi les plus récents, les mesures physiques, effectuées notamment par spectrométrie de masse, sont aujourd'hui en plein essor pour la détection, voire l'identification, de certaines espèces bactériennes (Mandrell et Wachtel, 1999).

Certaines méthodologies, telles que l'immunologie ou la génétique, sont plus résolutive que d'autres, comme la culture ou la cytométrie. En effet, les deux premières méthodes sont très spécifiques et peuvent permettre une identification d'une particule biologique au niveau de l'espèce. Quant à la culture ou la cytométrie, leur résolution est moindre puisque ces deux techniques ne permettent que de dénombrer un nombre de particules avec une ou plusieurs caractéristiques particulières (cultivables ou non, vivant ou mort). Cependant, le couplage de ces moyens de détection (cytométrie et immunologie) peut accroître la sensibilité, la rapidité et la résolution de la méthode (Stopa, 2000).

Dans le tableau récapitulatif suivant (cf. tableau 1), nous nous sommes particulièrement intéressés à des moyens biologiques de détection et d'identification des particules biologiques. Ces différentes techniques présentent des points forts et faibles que nous avons voulu souligner dans ce tableau. Elles sont exposées dans le détail dans le paragraphe relatif aux choix technologiques de l'étude de faisabilité d'un système de détection (cf. §5.5., 5.6., 5.7. et 6.1.).

	AVANTAGES	INCONVENIENTS	REFERENCES
CULTURE (cf. §5.2.1.)	<ul style="list-style-type: none"> • Mise en œuvre simple • Automatisable • Peu coûteux 	<ul style="list-style-type: none"> • Durée d'incubation • 1% de la population bactérienne cultivable 	Amann <i>et al.</i> , 1995 Staley et Konopka, 1985 Torsvik <i>et al.</i> , 1985
MICROSCOPIE (cf. §5.2.2.)	<ul style="list-style-type: none"> • Dénombre toutes les particules • Utilisation de colorants ou fluorochromes pour distinguer les particules biologiques de celles qui ne le sont pas 	<ul style="list-style-type: none"> • Ne permet pas une identification au niveau du genre ou de l'espèce 	Buttner <i>et al.</i> , 1997
CYTOMETRIE (cf. §5.2.3.)	<ul style="list-style-type: none"> • Dénombre toutes les particules • Réponse rapide • Permet l'examen d'un grand nombre d'échantillons 	<ul style="list-style-type: none"> • Mise au point pour la détection de micro-organismes 	Stopa, 2000 Clarke et Pinder, 1998 Ferrari <i>et al.</i> , 2000
BIOCHIMIE (cf. §6.1.1.)	<ul style="list-style-type: none"> • Systèmes intégrés et disponibles dans le commerce 	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilités variables selon l'espèce bactérienne que l'on souhaite détecter • On ne détecte que les bactéries dont les profils ont déjà été réalisés • Système non multiplex 	Odumeru <i>et al.</i> , 1999 Baillie <i>et al.</i> , 1995
IMMUNOLOGIE (cf. §6.1.2.)			
MESURE DIRECTE AGGLUTINATION IMMUNODIFFUSION IMMUNOPRECIPITATION	<ul style="list-style-type: none"> • Mesure directe : pas de marquage de l'antigène 	<ul style="list-style-type: none"> • Peu sensible • Nécessité de pré-enrichir par culture l'échantillon 	
MESURE INDIRECTE TEST DE COMPETITION TEST « SANDWICH »	<ul style="list-style-type: none"> • Mesure indirecte : intervention d'un second anticorps marqué ou utilisation d'un antigène marqué • Sensible • Spécifique 	<ul style="list-style-type: none"> • Non multiplex • Synthèse d'anticorps spécifiques 	
GENETIQUE (cf. §6.1.3.)			
PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Sensible • Spécifique • Système PCR avec mesure en temps réel intégré disponible dans le commerce 	<ul style="list-style-type: none"> • Enzyme sensible aux interférents de l'environnement (Taq polymérase) 	Belgrader <i>et al.</i> , 1999 Lee <i>et al.</i> , 1999 Alvarez <i>et al.</i> , 1995 Tsai et Olson, 1992
MARQUAGE, HYBRIDATION	<ul style="list-style-type: none"> • Sensible • Spécifique 	<ul style="list-style-type: none"> • Enzyme sensible aux interférents de l'environnement (Fragment de Klenow) 	Voordouw <i>et al.</i> , 1991, 1992, 1993

Tableau 1 : Récapitulatif des différents moyens de détection et d'identification de bactéries.

RESULTATS – DISCUSSION

4. DIVERSITE GENETIQUE BACTERIENNE : APPLICATION A *BACILLUS ANTHRACIS*

Cette étude vise à ériger une phylogénie de diverses souches de *Bacillus anthracis*. Son ambition finale est d'établir, pour une souche dont la provenance est inconnue, son origine géographique par analogie avec des souches semblables préalablement analysées.

Ce projet se restreint à l'étude de *B. anthracis*, agent pathogène d'intérêt militaire. Cependant, il peut également être appliqué à d'autres pathogènes d'intérêt, aussi bien militaire que médical.

Lors d'une attaque biologique, une souche de cette espèce est susceptible d'être détectée dans l'air. Après une étude phylogénétique préalable de l'espèce, la connaissance de l'origine géographique de la souche est de nature à favoriser la localisation de l'agresseur potentiel.

De plus, ce projet permet de sélectionner un certain nombre de souches de référence qui peuvent servir à tester les anticorps contre l'espèce bactérienne étudiée.

S'agissant de cette étude de diversité, cette dernière s'inscrit dans le cadre de l'élaboration du système de « détection de contrôle ».

Ainsi, lorsque les trois hypothèses suivantes sont réunies :

- il existe un arbre phylogénétique de *B. anthracis* établi selon une méthode donnée (par exemple, plusieurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sont validés sur plusieurs souches fournissant un profil SNP pour chaque souche) (cf. §4.),
- l'analyse systématique du bruit de fond atmosphérique confirme que *B. anthracis* n'existe pas naturellement dans l'air (cf. §5.),
- une souche de cette bactérie est détectée dans l'environnement par le système de détection (cf. §6.),

on établit un profil spécifique de la souche détectée que l'on positionne ensuite dans l'arbre phylogénétique.

Dans un premier temps, différentes techniques permettant de caractériser la diversité génétique de *B. anthracis* seront exposées. Après avoir présenté l'article utilisant les minisatellites comme marqueurs de cette diversité, le projet concernant la caractérisation de SNP chez *B. anthracis* sera développé. Finalement, les résultats obtenus pour ces travaux seront discutés.

4.1. TECHNIQUES D'IDENTIFICATION DE LA DIVERSITE GENETIQUE CHEZ LES BACTERIES

Différentes techniques existent pour mettre en évidence la diversité génétique d'une bactérie. Par ailleurs, les séquences nucléotidiques, qui sont progressivement mises à la disposition du public, favorisent la mise en œuvre de ces techniques.

On examinera, dans un second temps, les divers travaux réalisés sur la variabilité génétique de cette bactérie avant d'exposer le projet relatif à l'étude des SNP chez *B. anthracis*.

Il existe différentes techniques capables d'identifier le polymorphisme du génome, en fonction de l'espèce considérée.

B. anthracis est une espèce peu polymorphe d'un point de vue génétique. Son cycle de vie peut expliquer en partie cette faible diversité. La sporulation nécessite une température comprise entre 15 et 42°C, une atmosphère humide et la présence d'oxygène. Lorsque les cadavres d'animaux morts de charbon ne subissent aucun traitement particulier, les bacilles peuvent alors sporuler et se disséminer dans l'environnement. A l'état sporulé, *B. anthracis* peut survivre plusieurs dizaines d'années dans l'environnement avant d'infecter un nouveau ruminant. Les caractères génétiques sont alors conservés tant que la bactérie n'est pas revenue à un état végétatif où elle peut se multiplier.

Plusieurs équipes ont étudié la diversité génétique chez *B. anthracis*. Leur principal objectif tendait à distinguer différents isolats de cette bactérie. Les méthodes qu'elles ont utilisées reposaient sur les technologies alors disponibles. Les résultats ont systématiquement été comparés à ceux obtenus pour *B. cereus*, *B. mycoïdes* et *B. thuringiensis*, espèces phylogénétiquement les plus proches de *B. anthracis* (Inglesby *et al.*, 1999). Ce paragraphe sera consacré à la présentation des résultats et à l'appréciation des techniques qui ont été utilisées, notamment au regard des innovations les plus récentes, au nombre desquelles figure le séquençage du génome de *B. anthracis*.

4.1.1. SEQUENÇAGE

En vue d'évaluer les relations phylogénétiques existant entre les quatre espèces citées ci-dessus (cf. §4.1.), Ash *et al.* ont, en 1991, basé leur méthode sur la comparaison des séquences des ADNr 16S.

De fortes similarités de séquence (homologie supérieure à 99%) ont été observées pour les ADNr 16S des quatre espèces. Ces résultats sont cohérents avec ceux précédemment obtenus par hybridation. En effet, les ADNr 16S de *B. anthracis* et *B. cereus* sont identiques ou ne diffèrent, tout au plus, que d'une base selon la souche utilisée. Quant à *B. mycoïdes* et *B. thuringiensis*, leurs ADNr 16S se distinguent entre eux et de *B. anthracis* ainsi que de *B. cereus* par quelques nucléotides (4 à 9 bases).

En ce qui concerne cette région du génome, *B. anthracis* est donc une espèce monomorphe. L'identification de souches par cette méthode nécessiterait le séquençage d'un ou plusieurs autres gènes. La mise en œuvre de ce procédé serait très coûteuse et ne peut donc pas s'appliquer à l'analyse d'un grand nombre d'isolats. De plus, le séquençage ne porte que sur une portion du génome, plus précisément sur un gène d'intérêt ou sur une région phylogénétiquement variable.

4.1.2. RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)

La méthode RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) révèle les variations dans la longueur des fragments d'ADN, obtenus à la suite d'une étape de digestion par des enzymes de restriction.

Leur profil électrophorétique est établi en soumettant un gel à un champ pulsé (Pulsed-Field Electrophoresis Gel, PFGE) lorsque les réarrangements concernent de grands fragments d'ADN tels que les ISR (Intergenic Spacer Region). Pour des réarrangements de séquences d'ADN plus courtes, une simple électrophorèse suffit à distinguer ces profils électrophorétiques (Kremer *et al.*, 1999).

Pour une enzyme donnée, l'absence ou la présence d'un site de restriction détermine le nombre de fragments générés. En outre, la longueur de ces derniers varie selon les insertions ou les délétions observées entre les sites de restriction (Mueller et Wolfenbarger, 1999).

En 1994, Henderson *et al.* ont tenté de différencier génétiquement des isolats de *B. anthracis* au moyen de deux procédés, l'un s'appuyant sur les RFLP et l'autre sur la PCR en présence d'amorces spécifiques ou arbitraires.

En ce qui concerne la méthode RFLP, ils ont testé 18 enzymes de restriction sur chacune des souches de *B. anthracis*. Les résultats ont révélé la similitude de tous les profils électrophorétiques. Pour cette espèce, il est donc impossible de distinguer les souches virulentes de celles qui ne le sont pas. Par contre, au sein du « groupe *B. cereus* », les profils diffèrent les uns des autres.

L’empreinte PCR, en présence d’une amorce arbitraire seule ou combinée avec une autre amorce, ne permet pas de différencier les isolats de *B. anthracis*. Cependant, les profils permettent de distinguer les espèces au sein du « groupe *B. cereus* ». Par contre, en utilisant une amorce spécifique, les auteurs ont réussi à classer les isolats de *B. anthracis* en trois groupes.

Par comparaison à la méthode RFLP, les profils obtenus par PCR sont de lecture plus simple et les résultats sont produits plus rapidement. Par contre, les empreintes PCR réalisées en présence d’amorces spécifiques soulignent que les profils sont indépendants de l’état de virulence de la bactérie.

En 1995, Harrel *et al.* ont étudié deux régions ISR (Intergenic Spacer Region) comprises entre deux gènes conservés, les ADNr 16S et 23S d’une part, et *gyrA* et *gyrB* d’autre part, afin de détecter des variations génétiques dans des isolats de *B. anthracis*, *B. cereus* et *B. mycoïdes*.

En ce qui concerne les profils RFLP, ils parviennent aux mêmes conclusions que Henderson *et al.* en 1994. Les profils RFLP sont différents au sein du « groupe *B. cereus* » mais identiques parmi les souches de *B. anthracis* utilisées.

Les empreintes PCR des deux ISR ont été réalisées avec des amorces spécifiques. Pour chaque ISR et pour chaque espèce étudiée, la bande de plus faible masse moléculaire a été séquencée. S’agissant de l’ISR des ADNr 16S-23S, il n’existe pas de différence entre les souches de *B. anthracis*. Par contre, entre les trois espèces du « groupe *B. cereus* », les divergences varient de un à treize nucléotides. En ce qui concerne l’ISR *gyrA-gyrB*, les séquences de *B. anthracis* sont identiques et les trois espèces de *Bacillus* étudiées divergent de une à deux bases.

En conclusion, ces deux études montrent que *B. anthracis* se caractérise par une grande homogénéité génétique s’agissant des séquences d’ADN étudiées.

Ces résultats sont confirmés par une étude menée en 1997 sur le gène *gyrB* (Ramisse, 1997). Celle-ci a permis d’observer une variabilité génétique au sein du « groupe *B. cereus* ». Par contre, pour six souches de *B. anthracis* d’origines différentes, les séquences centrales et C-terminales du gène codant pour la protéine GyrB sont strictement conservées.

L’ADN génomique de *B. anthracis* présente en moyenne 80% d’homologie avec les ADN de *B. cereus* et de *B. mycoïdes*. L’identité de séquence est quasiment parfaite (99%), d’une part, entre les ADNr 23S de *B. anthracis* et de *B. cereus* (Ash *et al.*, 1991, Ash et Collins, 1992) et, d’autre part, entre les ADNr 16S de *B. anthracis*, de *B. cereus*, de *B. mycoïdes* et

de *B. thuringiensis*. Par ailleurs, *B. anthracis* se distingue de *B. cereus* par l'existence de ses deux plasmides, pXO1 et pXO2.

Ces méthodes sont adaptées à la différenciation des espèces du « groupe *B. cereus* » (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoïdes* et *B. thuringiensis*). Cependant, lorsqu'on souhaite caractériser des souches de *B. anthracis*, il est nécessaire d'appliquer une méthode plus discriminante.

4.1.3. RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHISM DNA) OU AP-PCR (ARBITRARILY PRIMED-PCR)

Les marqueurs RAPD sont générés par l'amplification de séquences aléatoires d'ADN avec des petites amorces de séquences nucléotidiques également aléatoires. Une faible stringence de la PCR et la petite taille des amorces vont favoriser l'amplification de l'ADN. Les produits d'amplification sont donc soit présents si l'amorce a pu s'hybrider à l'ADN, soit absents si elle n'a pas pu s'hybrider. Si les produits d'amplification sont présents, ils peuvent également avoir des tailles différentes.

Cette méthode, facile à mettre en place, est toutefois peu reproductible. De plus, elle ne permet pas toujours de distinguer les différences génétiques (Mueller et Wolfenbarger, 1999).

En 1996, afin de distinguer trois souches de *B. anthracis* (Ames, Sterne et Vollum) dépourvues de leurs plasmides, Andersen *et al.* ont choisi de réaliser une PCR en présence d'amorces arbitraires. Les fragments produits par la PCR ont été comparés entre chacune des trois souches. Les auteurs ont ainsi identifié un fragment de 1,5 kb responsable du polymorphisme (Andersen *et al.*, 1996). Ce fragment, présent dans les souches Sterne et Ames, migre plus vite sur un gel lorsqu'il provient de la souche Vollum.

En vue de cibler à l'intérieur de ce fragment la région de divergence, les auteurs ont examiné les séquences pour les trois souches de *B. anthracis*. Ils ont identifié une zone de 150 pb pour le sérotype Vollum et de 174 pb pour les sérotypes Sterne et Ames. Le séquençage de ce fragment d'ADN a permis d'attribuer la différence de taille à une délétion de deux répétitions consécutives de 12 nucléotides :

- la souche Sterne possède quatre répétitions successives des 12 nucléotides,
- la souche Vollum ne possède que deux répétitions en tandem des 12 nucléotides,
- la région issue de la souche Ames est déléetée d'un nucléotide par rapport à celle du sérotype Sterne.

Cette séquence de divergence est nommée *vrrA* correspondant à la formule « variable region with repetitive sequence ».

D'une manière générale, les segments d'ADN répétés semblent constituer des régions d'intérêt pour les études de polymorphisme.

En 1999, Daffonchio *et al.* ont mis en évidence par RAPD une séquence nommée SG-850 présente dans toutes les souches appartenant au « groupe *B. cereus* » étudiées. Afin de pouvoir l'utiliser comme marqueur de ce groupe, deux amorces localisées à une des extrémités du fragment ont été synthétisées et testées par PCR avec les souches possédées. Les résultats ont mis en évidence une amplification uniquement pour les souches appartenant au « groupe *B. cereus* ». Cependant, les amorces n'ont pas permis de distinguer les souches virulentes de celles qui ne l'étaient pas, même lorsque les souches de *B. anthracis* ne possédaient pas les plasmides de virulence. Le fragment identifié est probablement localisé sur le chromosome bactérien. Les analyses de restriction enzymatique sur ce fragment ont ainsi fourni 11 profils différents parmi les isolats étudiés.

Cette étude souligne les limites de la technique RAPD. En effet, le fragment identifié par les auteurs ne permet pas de distinguer les espèces au sein du « groupe *B. cereus* ». De plus, la faible stringence de la PCR ainsi que la petite taille des amorces, même si elles favorisent l'amplification par PCR, augmentent la probabilité de variabilité artéfactuelle.

4.1.4. AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)

La technique AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) repose sur l'ajout d'adaptateurs aux fragments d'ADN produits par clivage en présence de deux endonucléases de restriction (cf. figure 5). Les adaptateurs correspondent à des séquences d'ADN spécialement conçues pour que leur liaison aux fragments clivés ne reconstitue pas un site de restriction. En outre, ils servent à amorcer une amplification sélective en présence d'une combinaison d'amorces marquées. Les profils sont obtenus après électrophorèse sur gel de polyacrylamide des produits amplifiés par PCR (Jackson *et al.*, 1999, Mueller et Wolfenbarger, 1999, Vos *et al.*, 1995).

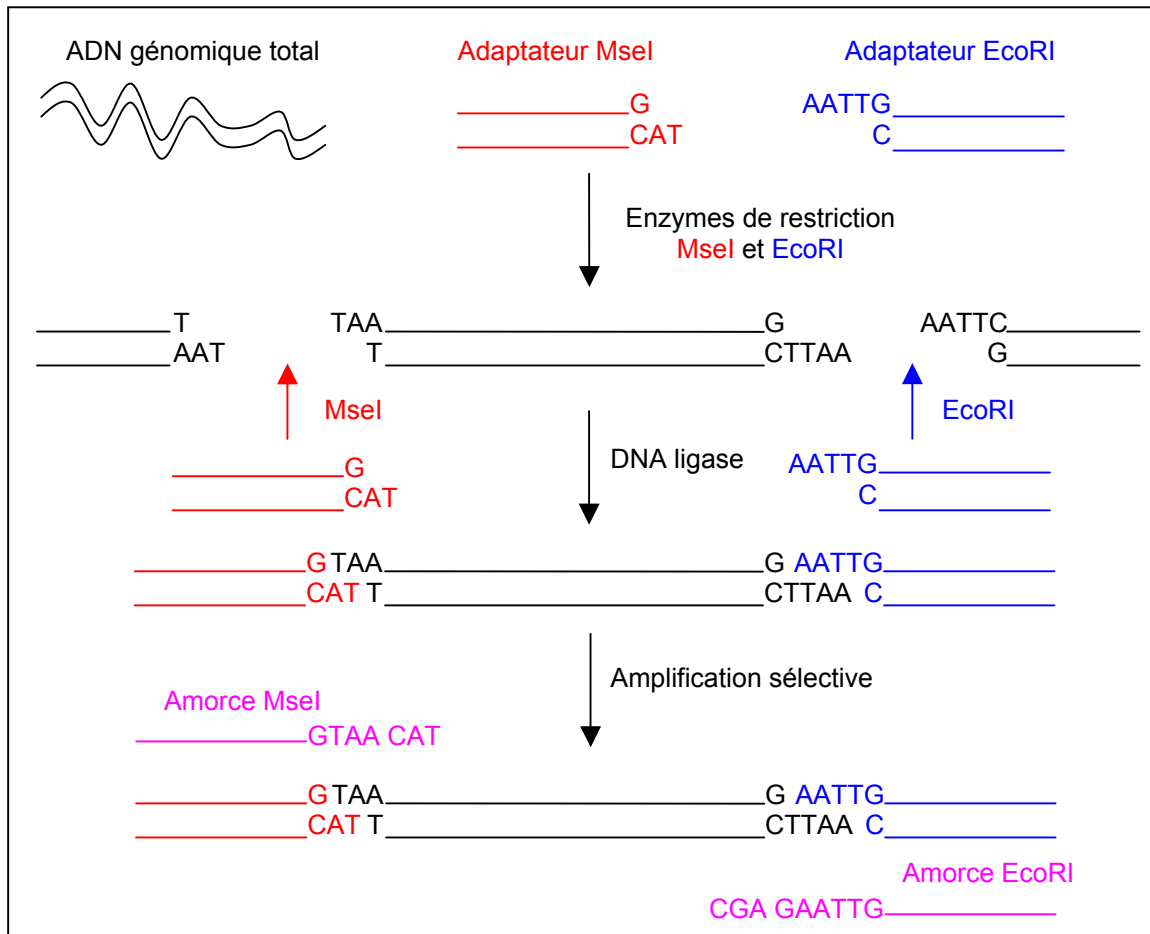


Figure 5 : Schéma illustrant le principe de la technique AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Mueller et Wolfenbarger, 1999, Vos *et al.*, 1995).

La méthode AFLP a été appliquée à l'étude de *B. anthracis* (Keim *et al.*, 1997).

La première partie du travail a porté sur cinq souches de *B. anthracis* et six espèces de *Bacillus*. Pour ces cinq souches de *B. anthracis*, la diversité ainsi observée est très faible. Si l'on ne considère pas la présence ou l'absence des plasmides pXO1 et pXO2, les fragments obtenus par AFLP apparaissent alors monomorphes. En comparaison, 42% des fragments de deux souches de *B. thuringiensis* se sont révélés polymorphes.

D'une manière générale, au sein des *Bacillus* testés, la diversité génétique par AFLP est grande et les similarités, qui demeurent, concordent avec la proximité phylogénétique existant entre les espèces :

- *B. cereus* et *B. thuringiensis* sont plus proches l'un de l'autre que de *B. anthracis* ;
- *B. mycoïdes* est plus distant de *B. anthracis* que de *B. cereus* et *B. thuringiensis* ;
- les autres *Bacillus* étudiés partagent moins de 20 % des fragments AFLP avec *B. anthracis*.

Une partie des fragments, très conservés, se retrouve chez la plupart des membres du taxon. Certains de ces fragments, qui ont une intensité de signal supérieure aux autres, sont susceptibles d'être présents en un plus grand nombre de copies. Il est possible qu'ils correspondent aux gènes des ARNr dont les séquences très conservées sont présentes dans la cellule en un grand nombre de copies.

La deuxième partie du travail a porté sur 79 souches de *B. anthracis*. L'analyse AFLP a permis d'identifier 1 221 fragments, incluant 105 fragments spécifiques des plasmides (73 de pXO1 et 32 de pXO2). 97% de ces 1221 régions étaient monomorphes et seulement 31 fragments étaient polymorphes. Au sein du « groupe *B. cereus* », l'analyse AFLP a permis de différencier environ 60% des fragments observés. Ces résultats ont permis la construction d'un arbre phylogénétique qui répartit les isolats de *B. anthracis* en deux grands groupes A et B.

Cette technique permet d'analyser rapidement et de manière aisée une large portion d'un génome microbien. Elle ne nécessite pas de connaissance particulière sur les micro-organismes et ne repose pas sur un locus génétique unique qui peut constituer une source d'erreur dans l'interprétation des résultats. Par contre, si l'on souhaite y recourir de façon systématique pour étudier la diversité génétique de plusieurs centaines de souches bactériennes, elle implique une lourde infrastructure. En outre, on constate que les profils AFLP, obtenus à partir d'un groupe d'isolats de *B. anthracis* pathogènes, comportent une grande similitude (Jackson *et al.*, 1999, Keim *et al.*, 1999).

Les profils AFLP, des bactéries ainsi étudiées, peuvent notamment être utilisés, par l'intermédiaire d'une base de données, pour :

- identifier des espèces inconnues en comparant leurs profils avec ceux de bactéries déjà étudiées,
- caractériser des régions conservées ou variables du génome parmi différentes espèces phylogénétiquement proches,
- distinguer et isoler des fragments d'ADN spécifiques de certaines espèces.

4.1.5. VNTR (VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEAT)

Un VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) est une séquence de nucléotides répétée plusieurs fois en tandem. La variation du nombre de copies de cette séquence crée un polymorphisme de taille.

On distingue :

- les minisatellites composés d'unités répétées de 6 à 100 pb,
- les microsatellites formés d'unités répétées de 1 à 5 pb.

L'utilisation des VNTR est facilitée par le séquençage de différents génomes bactériens. On exposera deux études menées sur *B. anthracis* recourant aux VNTR comme marqueurs de la diversité génétique. Cette méthode a notamment été validée pour *Yersinia pestis* (Adair *et al.*, 2000, Le Flèche *et al.*, 2001), l'objectif étant d'établir la phylogénie de n'importe quelle bactérie dont au moins une partie du génome a été séquencée.

En 2000, Keim *et al.* ont publié une nouvelle étude relative à l'utilisation de VNTR comme marqueurs génétiques afin de discriminer des souches de *B. anthracis*.

Le travail a porté sur 426 isolats de *B. anthracis* provenant de divers pays et, à titre de contrôle, sur un certain nombre de souches de *B. cereus* et de *B. thuringiensis*. Huit locus génétiques ont été utilisés : cinq minisatellites (*vrA*, *vrB₁*, *vrB₂*, *vrC₁* et *vrC₂*) et trois microsatellites (CG3, pXO1-aat et pXO2-at).

En ce qui concerne *B. cereus* et *B. thuringiensis*, les marqueurs sont très rarement amplifiés dans les conditions standards. Seul *vrA* s'amplifie dans toutes les espèces, mais les tailles d'allèles relevées divergent des cinq tailles observées pour *B. anthracis*.

Sur les 426 isolats de cette dernière bactérie, 89 génotypes ont été identifiés. L'arbre phylogénétique, construit à partir de ces résultats, est en accord avec la première version établie par cette même équipe (Keim *et al.*, 1997) (cf. §4.1.4.) : deux groupes majeurs, A et B, divisent l'espèce.

Le groupe A, subdivisé de A1 à A4, se retrouve partout dans le monde. Le sous-ensemble A1b est essentiellement présent en Afrique. Le reste de la branche A1 réunit des souches provenant de toute la surface du globe et plus particulièrement d'Amérique du Nord. Le marqueur CG3, composé de 5 nucléotides répétés 2 fois dans la majorité des souches, semble caractériser la branche A1a pour laquelle ce marqueur n'est répété qu'une fois. Les sous-groupes A2 (un seul isolat provenant du Pakistan, région sous-représentée) et A4 sont rares dans cette étude. Quant à la branche A3, elle contient 44% des génotypes et 58% des isolats.

Le groupe B, subdivisé en B1 et B2, comporte 12% des isolats. Les isolats provenant d'Afrique du Sud dominant ce groupe (93%). Dans la branche B2, on relève seulement deux génotypes provenant exclusivement d'Europe.

Une base de données de minisatellites a été mise en place afin d'identifier ces derniers dans des séquences d'ADN connues. Elle a été utilisée pour étudier la diversité génétique d'une trentaine de souches de *B. anthracis* (Le Flèche *et al.*, 2001).

Cette étude a pu être réalisée grâce au séquençage de la souche dite Ames de *B. anthracis* par le TIGR (The Institut of Genomic Research). La base de données a permis d'identifier 28 minisatellites dont le motif, répété au moins 10 fois, contient un minimum de 9 nucléotides. Parmi ces 28 minisatellites, quatre (*vrrB*₁, *vrrB*₂, *vrrC*₁ et *vrrC*₂) appartiennent à la collection caractérisée par l'équipe de Keim *et al.* en 2000. Deux autres répétitions en tandem, *vrrA* et CG3 (Keim *et al.*, 2000), ont également contribué au génotypage des 31 souches de *B. anthracis*. Les amorces ont été choisies dans les régions flanquantes des minisatellites. Les produits amplifiés par PCR sont visualisés par coloration au bromure d'éthidium après électrophorèse sur un gel d'agarose.

14 minisatellites sont polymorphes parmi ces 31 souches et 27 génotypes différents ont été identifiés. Les souches de *B. cereus* inclus dans l'étude fournissent un signal d'amplification très faible, voire inexistant.

L'arbre phylogénétique construit à partir de ces résultats est cohérent avec celui obtenu par Keim *et al.* en 2000. Aucun représentant ne définit les sous-groupes A1b et A3a. Par contre, cinq des souches testées constituent une nouvelle branche de l'arbre. Ce travail a fait l'objet d'une publication (cf. §4.2.).

4.2. LES MINISATELLITES COMME MARQUEURS DE LA DIVERSITE GENETIQUE

Research article

A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*

Philippe Le Flèche^{1,2}, Yolande Hauck², Lucie Onteniente², Agnès Prieur^{1,2}, France Denoeud², Vincent Ramiſse¹, Patricia Sylvestre¹, Gary Benson³, Françoise Ramiſse¹ and Gilles Vergnaud^{*1,2}

Address: ¹Centre d'Etudes du Bouchet, BP3, 91710 Vert le Petit, France, ²Génomes et Minisatellites, Institut de Génétique et Microbiologie, Bat 400, Université Paris XI, 91405 Orsay cedex, France and ³Department of Biomathematical Sciences, Box1023, Mount Sinai School of Medicine, One Gustave L. Levy Place, New York, USA

E-mail: Philippe Le Flèche - lefleche@igmors.u-psud.fr; Yolande Hauck - Yolande.Hauck@igmors.u-psud.fr; Lucie Onteniente - Lucie.Onteniente@igmors.u-psud.fr; Agnès Prieur - Agnes.Prieur@igmors.u-psud.fr; France Denoeud - France.Denoed@igmors.u-psud.fr; Vincent Ramiſse - Vincent.Ramiſse@ceb.etca.fr; Patricia Sylvestre - psylvest@pasteur.fr; Gary Benson - benson@ecology.biomath.mssm.edu; Françoise Ramiſse - f.ramiſse@freesurf.fr; Gilles Vergnaud* - Gilles.Vergnaud@igmors.u-psud.fr

*Corresponding author

Published: 30 March 2001

Received: 19 February 2001

BMC Microbiology 2001, 1:2

Accepted: 30 March 2001

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/1/2>

(c) 2001 Le Flèche et al, licensee BioMed Central Ltd.

Abstract

Background: Some pathogenic bacteria are genetically very homogeneous, making strain discrimination difficult. In the last few years, tandem repeats have been increasingly recognized as markers of choice for genotyping a number of pathogens. The rapid evolution of these structures appears to contribute to the phenotypic flexibility of pathogens. The availability of whole-genome sequences has opened the way to the systematic evaluation of tandem repeats diversity and application to epidemiological studies.

Results: This report presents a database ([\[http://minisatellites.u-psud.fr\]](http://minisatellites.u-psud.fr)) of tandem repeats from publicly available bacterial genomes which facilitates the identification and selection of tandem repeats. We illustrate the use of this database by the characterization of minisatellites from two important human pathogens, *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. In order to avoid simple sequence contingency loci which may be of limited value as epidemiological markers, and to provide genotyping tools amenable to ordinary agarose gel electrophoresis, only tandem repeats with repeat units at least 9 bp long were evaluated. *Yersinia pestis* contains 64 such minisatellites in which the unit is repeated at least 7 times. An additional collection of 12 loci with at least 6 units, and a high internal conservation were also evaluated. Forty-nine are polymorphic among five *Yersinia* strains (twenty-five among three *Y. pestis* strains). *Bacillus anthracis* contains 30 comparable structures in which the unit is repeated at least 10 times. Half of these tandem repeats show polymorphism among the strains tested.

Conclusions: Analysis of the currently available bacterial genome sequences classifies *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis* as having an average (approximately 30 per Mb) density of tandem repeat arrays longer than 100 bp when compared to the other bacterial genomes analysed to date. In both cases, testing a fraction of these sequences for polymorphism was sufficient to quickly develop a set of more than fifteen informative markers, some of which show a very high degree of polymorphism. In one instance, the polymorphism information content index reaches 0.82 with allele length covering a wide size range (600-1950 bp), and nine alleles resolved in the small number of independent *Bacillus anthracis* strains typed here.

Background

The polymorphism associated with tandem repeats has been instrumental in mammalian genetics for the construction of genetic maps and still is the basis of DNA fingerprinting in forensic applications. Tandem repeats are usually classified among satellites (spanning megabases of DNA, associated with heterochromatin), minisatellites (repeat units in the range 6-100 bp, spanning hundreds of base-pairs) and microsatellites (repeat units in the range 1-5 bp, spanning a few tens of nucleotides).

More recently, a number of studies have supported the notion that tandem repeats reminiscent of mini and microsatellites are likely to be a highly significant source of very informative markers for the identification of pathogenic bacteria even when these pathogens are recently emerged, highly monomorphic species [1-5]. This probably reflects the important contribution of tandem repeats to the adaptation of the pathogen to its host. Tandem repeats appear to contribute to phenotypic variation in bacteria in at least two ways. Tandem repeats located within the regulatory region of a gene can constitute an on/off switch of gene expression at the transcriptional level [6,7]. Similarly, tandem repeats within coding regions with repeat units length not a multiple of three can induce a reversible premature end of translation when a mutation changes the number of repeats (reviewed in [8-10]). In other instances, the repeated unit length is a multiple of three, and the tandem repeat contributes to a coding region. In such cases, variations in the number of copies modify the gene product itself [11].

Mutation mechanisms of micro and minisatellites have been studied in some detail in eukaryotes, essentially human and yeast (reviewed in [12]). In brief, the data obtained so far suggest that microsatellites mutate by replication slippage processes; mutation rates depend upon the efficiency of mismatch repair mechanisms and an internal heterogeneity within the array strongly stabilizes the tandem repeat. In contrast, minisatellites mutate predominantly as the result of the repair of a double strand break initiated within, or very close to, the tandem repeat. In eukaryotes at least, these events can be of replicative origin [13], or can be genetically controlled, and specifically induced, during meiosis, at double strand breaks hot-spots. Minisatellite mutation rate in eukaryotes appears to be insensitive to mismatch repair efficiency, and internal heterogeneity is compatible with a high mutation rate [12, 14].

In bacteria, loci containing a tandem repeat from the microsatellite class (repeat unit sizes of 1-8 bp) have been called simple sequence contingency loci [8]. Altered number of repeats allows for reversible on and off states

of expression for the corresponding gene. The mutation rate of a tetranucleotide (microsatellite) tract in *Haemophilus influenzae* is higher than 10^{-4} and contributes to the adaptation of the pathogen to its hosts as the infection progresses [15]. In such an extreme situation, the microsatellite is of limited value for strain identification, epidemiological and phylogenetic studies. The tandem repeat array is composed of perfect copies of the elementary unit, and different alleles are observed in a single culture. In contrast, the phylogenetic identity of minisatellite alleles of identical size can usually be further checked by DNA sequencing, since the repeated units are often not perfect [16]. The pattern of variants along the array provides an additional level of allele identification and phylogenetic information. In addition, tandem repeats with longer repeat unit length can be relatively easily typed in the size range of a few hundred base-pairs using ordinary horizontal gel electrophoresis.

In this report, we will first describe the use of a tandem repeats database for bacterial genomes ([<http://minisatellites.u-psud.fr>]) and briefly compare the general characteristics of tandem repeats in a number of bacterial genomes for which the sequence has been determined and made publicly available. We will then show how this tool can easily be applied to the rapid characterization of new highly polymorphic markers in two pathogens, *Y. pestis* and *B. anthracis*.

Both *Y. pestis* (causative agent of plague) and *B. anthracis* (causative agent of anthrax) are recently emerged clones of respectively *Y. pseudotuberculosis* [17] and *B. cereus* [18]. In the case of *Y. pestis*, a high resolution typing tool based on RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis of IS100 locations has already been developed [17]. However this technology is more demanding than PCR typing, which justifies the development of such an assay. In the case of *B. anthracis*, polymorphisms were initially identified essentially using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) typing [19]. Subsequent analyses demonstrated that the most informative fragments in AFLP patterns resulted from tandem repeat array length variations (five minisatellite loci were characterized in this way [2]).

Results and discussion

Use of the tandem repeats database

To date, 36 bacterial genome sequences from 32 species have been released in the public domain and are included in the database (Figure 1A; the nine archaeobacteria genomes sequenced to date are presented in an other page, which can be accessed from [<http://minisatellites.u-psud.fr/>]). As many other sequencing projects are under way ([<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/bact.html>] ; [<http://www.tigr.org/tdb/mdb/>]

mdbinprogress.html] ; [http://www.sanger.ac.uk/Projects/Microbes/]), the database will be regularly updated. The collection of tandem repeats present in a given genome can be queried according to a combination of criteria, total tandem repeat array length (L), repeat unit length (U), number of repeats (N), percentage of conservation of the repeats along the array (V), position on the genome (Pos), average GC percent of the repeats (%GC), strand bias in nucleotide composition (B) (these values have been precomputed using the Tandem Repeats Finder software described in [20]). The results shown on Figure 1B use the "Tandem Repeats Distribution according to repeat unit length" option (Figure 1A). Three genomes were searched for tandem repeat arrays longer than 100 base-pairs ($L \geq 100$). The genomes selected illustrate three different behaviors. On the right panel, *Pseudomonas aeruginosa* shows a very striking bias towards minisatellites with a motif length multiple of three. On the left and middle panels of Figure 1B, *Buchnera sp* and *Y. pestis*, show no such bias. The overall density of tandem repeat arrays longer than 100 base-pairs varies in the different genomes. *Buchnera sp.* contains 103 such loci, for a total genome size of 641 kb, which corresponds to a density per megabase of 161. *Pseudomonas aeruginosa*, with a total genome length of 6.3 Mb, has a density of 48. *Y. pestis* has an intermediate value of 30. Figure 2 summarizes the values observed in the 32 species. Ten non pathogenic species are presented in the upper part, 22 pathogenic species on the lower part. The species are ordered from top to bottom according to increasing genome size. The dark bars indicate for each genome the density per megabase of tandem repeat arrays longer than 100 bp. The clear bars reflect the excess of tandem repeats with unit length a multiple of three. A wide range of situations is observed, with a remarkable excess of tandem repeats multiples of three in *Mycobacterium tuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*, presumably reflecting a significant contribution of tandem repeats to coding regions in these two bacteria.

As a quick illustration of the use of this database to facilitate the development of genotyping tools for bacterial genomes, we have evaluated the polymorphism associated with tandem repeats from *Y. pestis* on one hand and *B. anthracis* on the other (in this second instance, the genome sequence has not been completed yet and does not appear on the publicly accessible Tandem Repeats Database page, Figure 1A).

Application to *Y. pestis*

Figure 3A presents the result of a query run on *Y. pestis*, to identify tandem repeats with repeat units longer than 9 base-pairs repeated at least 7 times in the strain which has been sequenced (CO-92 biovar Orientalis). Sixty-four tandem repeats fulfill these criteria (an additional group

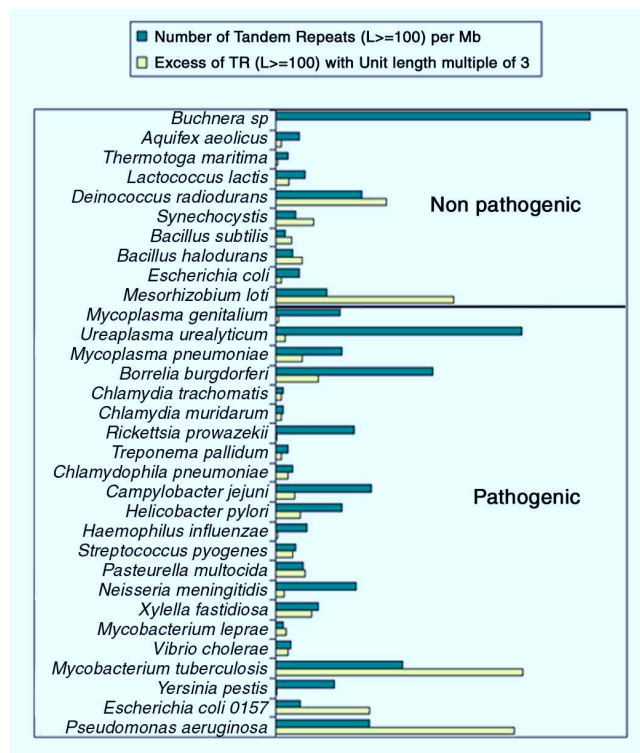


Figure 2
Relative frequency of tandem repeats within bacterial genomes The ten non-pathogen species are listed on top. Within each category, species are ordered according to genome size (smallest genome on top). The density of tandem repeat arrays longer than 100 bp is plotted for each species (dark bars). The clear bars reflect the excess (χ^2 values) of tandem repeats with a repeat unit length multiple of three.

of forty-nine have 6 copies of the motif; the twelve loci with the highest internal conservation were also included in this study). The output includes links to individual alignment files, as produced by the Tandem Repeat Finder software [20]. The alignment file also includes 200 base-pairs of flanking sequence from each side of the tandem repeat, from which primers can be selected for PCR amplification. Figure 3B shows an annotated extract of one alignment file. The positions of the primers selected for subsequent PCR amplification are underlined. Three *Y. pestis* (representing the Antiqua, Medievalis, and Orientalis biovars [17]) and two *Y. pseudotuberculosis* strains were used for the initial identification of minisatellites sufficiently polymorphic to be of interest for further studies. Table 1 summarizes the PCR conditions used for each polymorphic locus and the results obtained. A total of 76 tandem repeats were tested. PCR amplification failed in 6 cases. Twenty one loci are monomorphic in the five *Yersinia* strains typed here. Forty-nine of the loci are polymorphic (Table 1). Twenty-five of these are polymorphic among the *Y. pestis* strains.

Seven present a different allele in each of the five *Yersinia* strains, thirteen have a different allele in each of the three *Y. pestis* strains. Gel images for the 25 loci polymorphic among *Y. pestis* are shown in Figure 4. As can be seen, the repeat unit size and the overall length of the PCR products are such that tandem repeats differing by a single repeat unit can be distinguished by simple agarose gel electrophoresis.

Application to *B. anthracis*

Given the relatively low overall size of most bacterial tandem repeats, tandem repeat search can be run even on unfinished sequences. Tandem Repeats Finder was applied to *B. anthracis* sequence obtained from The Institute for Genomic Research through the website at [<http://www.tigr.org>]. The sequence was recovered as approximately 1000 contigs, for a total amount of slightly more than 5 Mb. Thirty tandem repeats have at least 10 copies of a repeat unit longer than 9 base-pairs. Fourteen of them are polymorphic among the 31 *B. anthracis* strains typed here (Table 2). Twenty-seven different genotypes are identified. Polymorphism information content (PIC) indexes based on the 27 genotypes vary from 0.07 to 0.82. Nine PIC values are above 0.5. Eight alleles are identified for CEB-Bams30, in a size range 270-900 base-pairs (Figure 5). In this case, the resolution of the largest alleles would probably be improved by using an automated DNA sequencer, and more alleles might be resolved. There are clear gaps in the size range coverage shown in Figure 5, and it is likely that the typing of additional strains would uncover new alleles. The genotyping data obtained was used to construct a phylogenetic tree based upon the Neighbor-Joining method ([<http://www.infobiogen.fr>]). In order to be able to correlate the tree obtained here with earlier studies [2], 5 minisatellites and one microsatellite reported previously were also typed. Figure 6 presents the data obtained and the resulting tree, using the nomenclature previously proposed [2]. Six *Bacillus cereus* strains have also been included and used as an outgroup in the analysis. Occasionally *B. cereus* strains will not amplify (scored as 0 in Figure 6) or will give weak amplification signals (Figure 5, last six lanes on the right). The proposed tree is in good agreement with earlier results. In particular, the A and B clusters are well defined. We have apparently no representatives for the A1b and A3a group, whereas strains 9533 and 9502 to 9505 appear to define a new branch. The correspondence between allele numbering and allele size is indicated in Table 3.

Correlations between polymorphism and structural characteristics of minisatellites

We have looked for correlations between on one hand the number of alleles and polymorphism of the minisatellites, and on the other, simple structural characteristics

of the tandem repeats in the sequenced strain : motif size, number of motifs, total length, conservation of the motifs along the array (percent identity), GC content, strand bias. In the case of *B. anthracis*, a highly significant correlation (0.01 level) is observed between polymorphism and both total length and GC content. This is not true for *Y. pestis* in which a strong correlation is seen between the number of alleles and the conservation of the motifs (Figure 7).

Conclusions

We limited here our investigation of tandem repeats to minisatellites, i.e. repeat units longer than 9 base-pairs, so as to avoid simple sequence contingency loci [8] of limited epidemiological value, and to facilitate the typing of alleles with agarose gel electrophoresis. However, simple sequence contingency loci are also represented in the database and are of great interest for molecular pathogenicity studies [6-8]. The use of the tandem repeats database was demonstrated here on two of the most genetically homogeneous human pathogens, *Y. pestis* and *B. anthracis*. There is consequently a possibility that a common database format for identification and epidemiological analyses of pathogens amenable to minisatellite typing be developed. As more data becomes available on polymorphism associated with tandem repeats, it will be added to the database presented here in order to avoid duplication of work and nomenclature.

Bacterial species differ very significantly in the density of tandem repeats within their genome, and also in their use of tandem repeats. Some species have a very strong excess of tandem repeats with repeat units length which are multiple of three, the most striking examples being *M. tuberculosis* and *P. aeruginosa*. Polymorphism in such tandem repeats is likely to modulate the protein structure rather than gene activity. In *M. tuberculosis*, all tandem repeats with total length (L) higher than 100 bp and 9 or 15 base-pairs long units are located with ORFs [21]. An important proportion of these tandem repeats correspond to the so-called PE and PPE multigene families [21].

In the two species studied here, tandem repeat polymorphism is strongly correlated with one or more of the sequenced allele characteristics, as illustrated in Figure 7. In *Yersinia pestis* a strong correlation is observed between number of alleles observed and homogeneity of the tandem array. In *Bacillus anthracis*, the strongest correlations are with total array length and GC content. It appears that the correlations are not the same in the two species, so that at present at least, the polymorphism associated with a tandem repeat cannot be inferred from its primary sequence. In particular, and in contrast to what is known for microsatellites (1-5 bp repeat units),

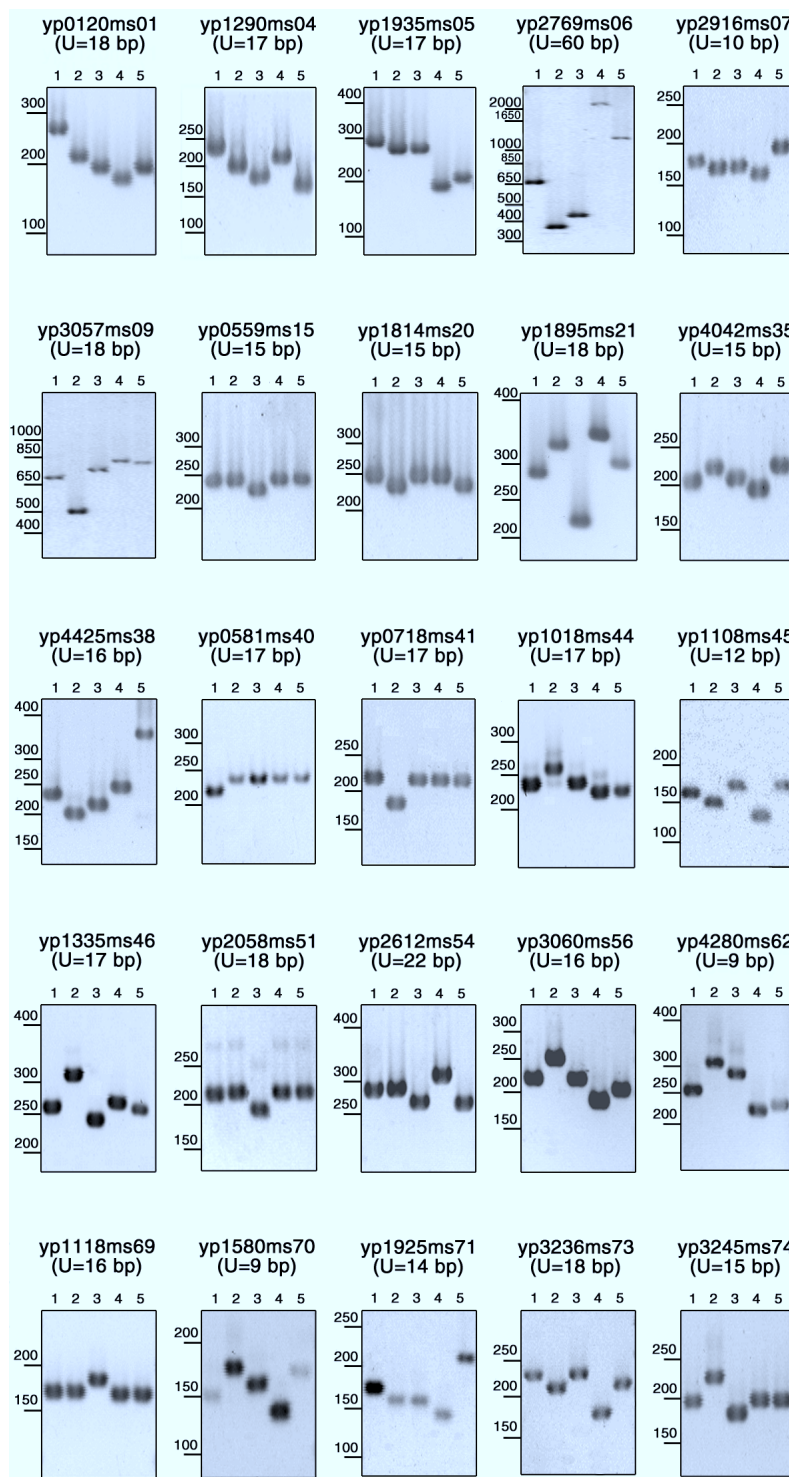


Figure 4
Images of PCR amplification of the twenty-five minisatellites polymorphic in the *Y. pestis* strains DNA from three reference *Y. pestis* strains representing each of the main biovars, *antiqua* (lane 1), *medievalis* (lane 2) and *orientalis* (lane 3) and two *Y. pseudotuberculosis* strains (lanes 4 and 5) have been PCR amplified and an aliquot of the products has been run on 2% horizontal agarose gels as described. The length of the minisatellite motifs (U) and the size range is indicated on each panel. Yp2916ms07 has one of the shortest (10 bp) unit. Four alleles are clearly distinguished between the 150 and 200 bp marker fragments.

some of the minisatellites are highly polymorphic in spite of a poor internal homogeneity of the sequenced allele, as is also the case for minisatellites in the human genome [12]. However, more systematic allele sequencing will be required to demonstrate that polymorphism is not associated with a subclass of alleles showing a higher internal homogeneity. Similarly, allele sequencing will be required to formally establish that the allele size variations observed are indeed (as is likely) the consequence of variations in the number of repeats.

Five among the *B. anthracis* markers described here (Ceb-Bams1, 3, 7, 13 and 30) are highly polymorphic with PIC values (or Nei's index) above 0.7. In this respect, it is important to observe that the length of the allele observed for Ceb-Bams1 in the Ames strain is not of the size expected from the sequence data (Table 2). This may result either from a high mutation rate at Ceb-Bams1 or from a sequencing error. The expected allele size corresponds to allele 4 (Table 3), which is unlikely for the Ames strain because Ceb-Bams1 allele 4 is observed only in cluster B strains (Figure 6) and Ames is well apart of cluster B [2]. A similar situation is observed for Ceb-Bams28, for which the expected product does not correspond to any existing allele in the collection of strains typed. In this case however, the locus is moderately polymorphic, with a PIC value of 0.26 and only three alleles observed (Table 2), so that a sequencing error is the most likely interpretation. This issue could be easily solved by typing with Ceb-Bams1 and Ceb-Bams28 the very strain which has been used for the sequencing project.

It is interesting to observe that, although the magnitude of allele size difference has not been taken into account when building the distance matrix, the resulting phylogenetic tree proposed in Figure 6 tends to group together strains with alleles of similar size at these most variable loci. This is reminiscent of observations made in *H. influenzae* [1] and suggest that mutation events are predominantly small size changes. Here again, more detailed studies involving full allele sequencing should now help understand the succession of events producing a population of alleles.

Materials and methods

Bacterial genomes DNA sequences

Finished sequences in the public domain were recovered by ftp from the NCBI or the Sanger center sites ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/bact.html] ; [http://www.sanger.ac.uk/Projects/Microbes/]). Preliminary sequence data for *B. anthracis* was obtained from The Institute for Genomic Research through the website at [http://www.tigr.org] .

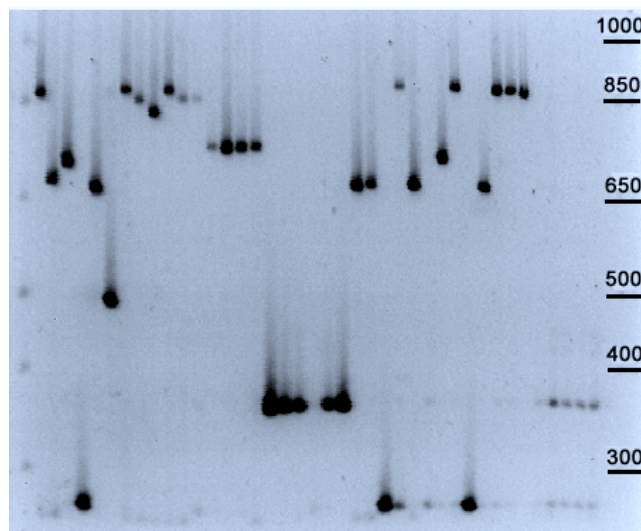


Figure 5
PCR amplification of *B. anthracis* minisatellite CEB-Bams30 DNA from *B. anthracis* and *B. cereus* (six rightmost lanes) was amplified using primers for CEB-Bams30 (Table 2). The PCR products were run on a 40 cm long 2% ordinary agarose gel.

DNA preparation

All strains used here are part of the collection maintained by the Centre d'Etudes du Bouchet (CEB). They originate either from the CIP (Collection Institut Pasteur, [http://www.pasteur.fr/]) or from AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, [http://www.afssa.fr/], Dr Josée Vaissaire). DNA from each isolate was obtained by large-batch procedures or by the simplified procedure as described in [2]. In addition, 15 µg of DNA from the *B. anthracis* Ames strain were kindly provided by Dr Mats Forsman, FOA, Sweden.

Minisatellite PCR amplification and genotyping

PCR reactions were performed in 15 µl containing 1 ng of DNA, 1x Long Range Reaction Buffer 3 (Roche-Boehringer), 1 unit of Taq DNA polymerase, 200 µM of each dNTP, 0.3 µM of each flanking primer. The Taq DNA polymerase was either prepared essentially as described in [22] or purchased from Qbiogen or Roche-Boehringer. The 1x LongRange Buffer 3 is 1.75 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl pH9.2, 16 mM (NH₄)₂SO₄.

PCR reactions were run on a Perkin-Elmer 9600 or a MJResearch PTC200 thermocycler. An initial denaturation at 96°C for five minutes was followed by 34 cycles of denaturation at 96°C for 20 seconds, annealing at 60°C for 30 seconds, elongation at 65°C for 1 minute, followed by a final extension step of 5 minutes at 65°C. In few cases, other annealing temperatures and/or elongation times were used (see tables 1 and 2). Five microliters of

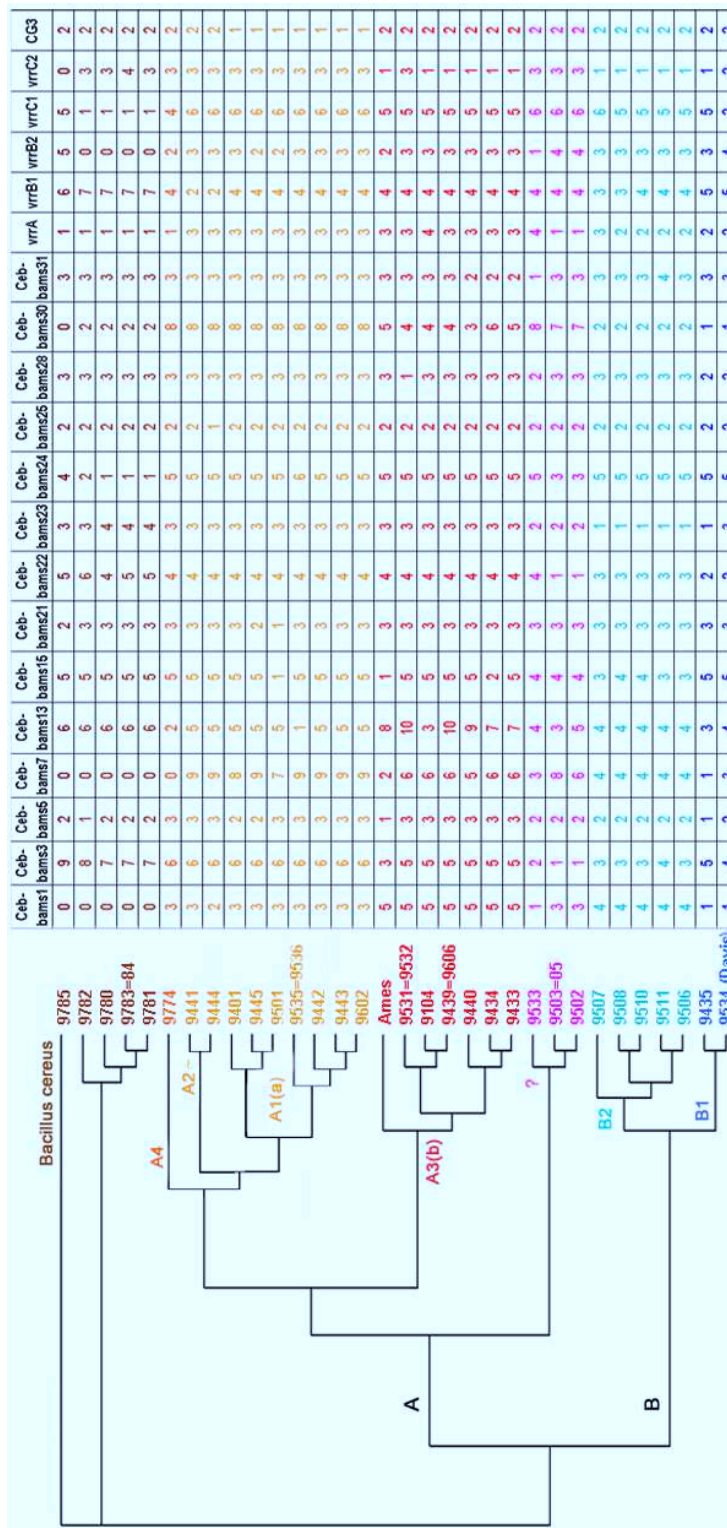


Figure 6
Bacillus anthracis phylogenetic tree The genotype of each strain for the polymorphic minisatellites is given (size estimates for each allele are given in Table 3). "0" indicates a failure of the PCR amplification. This is most often associated with *B. cereus* strains, and probably reflects in these cases sequence divergence in the flanking sequence. The phylogenetic tree was produced using the Neighbor-Joining method as available on-line at [http://www.infobiogen.fr.]

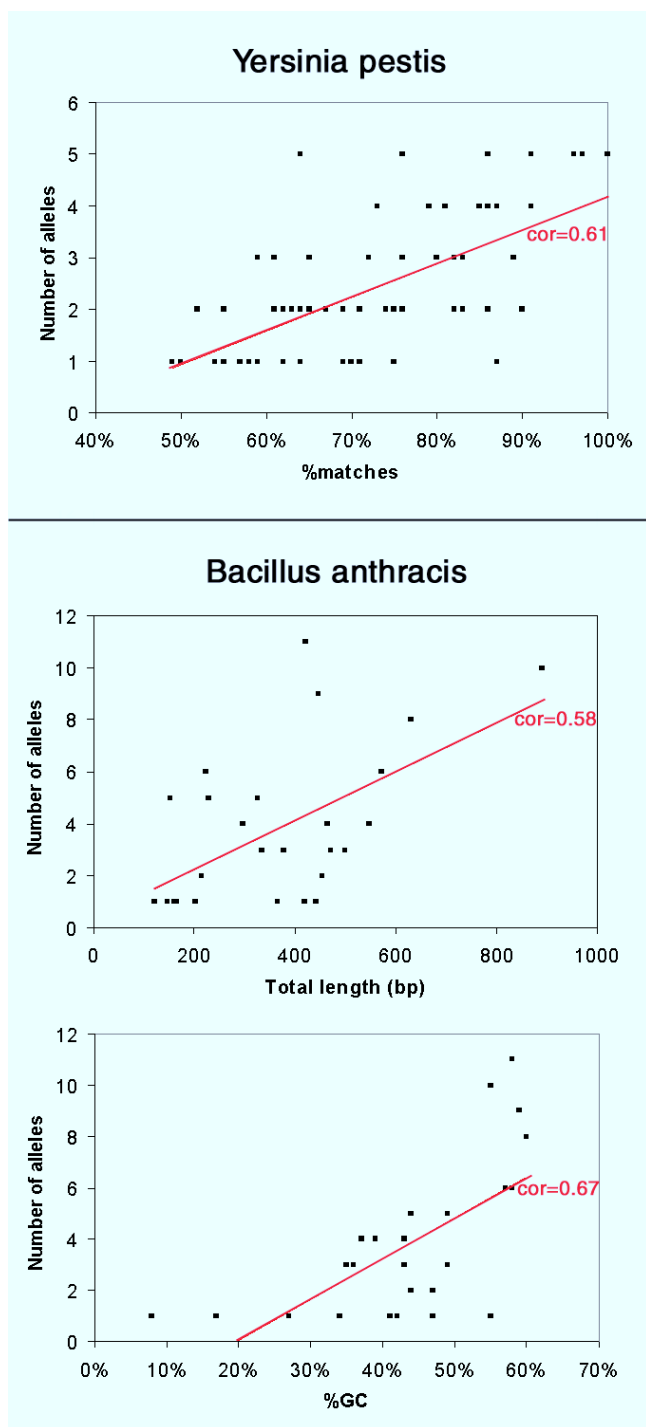


Figure 7
Significant correlation between number of alleles and minisatellites structural characteristics The number of alleles is plotted as a function of Total length and %GC for *Bacillus anthracis*, and %matches for *Yersinia pestis* (the correlations are highly significant at the 0.01 level). Number of alleles for each locus is the total number detected (i.e. *Bacillus anthracis* and *B. cereus*; *Yersinia pestis* and *Y. pseudotuberculosis*).

the PCR products were run on standard 1% or 2% agarose gel (Qbiogen) in 0.5 x TBE buffer at a voltage of 10 V/cm as indicated in Tables 1 and 2. Gel length of 10 to 40 cm were used according to PCR product size and motif length. Gels were stained with ethidium bromide and visualized under UV light. Allele sizes were estimated using as size markers the 1 kb ladder plus (Gibco-BRL which also includes a 100 bp ladder between 100 bp and 500 bp, plus 650, 850 and 1000 bp bands) or the 50 bp ladder (Euromedex) which provides a 50 bp ladder between 50 and 300 bp and a 100 bp ladder from 300 bp to 1000 bp.

Data analysis

Tandem Repeats Finder analysis:

Sequences were processed using the Tandem Repeats Finder software ([http://c3.biomath.mssm.edu/trf.html]). The output was processed to eliminate duplicates before being imported in a database (running under Access2000, Microsoft Corp.) as described previously [12]. The *B. anthracis* preliminary sequence data file uses FASTA type of headers (i.e. >sequenceId) to separate the independent contigs. The headers were replaced by runs of 10 Ns before running Tandem Repeats Finder.

Blast queries against the M. tuberculosis genome:

The identifications of the open reading frames containing a given tandem repeat from *M. tuberculosis* were done by running a BLAST search on the dedicated web page at [http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis/blast_server.shtml] .

Estimation of the excess of tandem repeats with motif length multiple of three:

A χ^2 test was calculated for the difference between the observed number of tandem repeats with motif length multiple of 3 and the expected number of tandem repeats with motif length multiple of 3 (expected value in the absence of bias being the total number of tandem repeats divided by 3). The χ^2 values vary from 0.01 to 253.5. There is a significant excess ($\chi^2 > 3.841$) for all species but 6 (*Buchnera sp*, *T. maritima*, *H. influenzae*, *M. genitalium*, *R. prowazekii*, *Y. pestis*).

Polymorphism index:

Polymorphism Information Index (PIC) or Nei's diversity index is calculated as $1 - \sum (\text{allele frequency})^2$ based upon the unique genotypes.

Phylogenetic reconstruction:

A phenetic approach, based on a distance matrix was used. Distance matrix between strains was obtained by counting the number of differences between the corresponding genotypes. Then, Neighbor Joining cluster

analysis was performed with Phylip [23] accessed at [http://www.infobiogen.fr/] . An outgroup was arbitrary chose among *Bacillus cereus* strains (9785) and input order of species was randomised.

Data (genotypes, distance matrix, phylogenetic tree) are available at [http://minisatellites.u-psud.fr/ASPSamp/

Phylogenie/data.htm]

Correlation analysis

Correlations were calculated with the statistical program SPSS: Pearson correlation, and non-parametric correlations (Kendall's tau and Spearman's rho) show similar results.

Table 1: Description of *Yersinia* polymorphic markers

Marker	U	N	% GC	V	Primer sequences	PCR	Expected product length (bp)	Estimated size range (bp)	Number of Alleles in <i>Y.pestis</i>	Total number of alleles
Markers polymorphic in <i>Yersinia pestis</i> strains										
yp0120ms01	18	8	34	86	L: CTAAGCACAAATTGTTATGCTGAACC R: TACTGAATCTGCTTCATTGTTCAAA		228	180 - 280	3	4
yp1290ms04	17	8	27	96	L: CGCTGTTGAAGTTTTAGTGAAGAA R: AAATGTAACCTGCCAAACGCTG		230	160 - 240	3	5
yp1935ms05	17	11	36	87	L: CCTCAGTTCATTGTGTAATACTCA R: GTATTAGCGAGATCACAGATGAGC		291	190 - 300	2	4
yp2769ms06	60	9	48	64	L: AATTTTGCTCCCAAAATAGCAT R: TTTTCCCATTAGCGAAATAAGTA	90 s	606	370 - 2500	3	5
yp2916ms07	10	9	44	85	L: ATACCGTACGATCAGCCTCTAT R: ATTTAATATTGATTTTGGGACTTGC		184	150 - 200	2	4
yp3057ms09	18	33	65	91	L: CGTTACCCTTGTGCCAATAGT R: ACGCAGAACATGCTTACCTTTTAT	90 s	682	500 - 820	3	5
yp0559ms15	15	10	30	62	L: TTGACCAAGTGTAAAAGGCATAAAT R: AAACATCGCCAGCCATTTTAGTA		237	225 - 250	2	2
yp1814ms20	15	9	47	74	L: ACAACCTCAGTTTGCCCTTG R: GTAAGAGCGCAATGATCGTACT		253	230 - 250	2	2
yp1895ms21	18	9	51	76	L: GCTTAAAGCAGATTGATACTACG R: CTGCATGTTACCGGTTTCAG		278	220 - 350	3	5
yp4042ms35	15	8	41	59	L: CTGTTACCGGTCAAAGTGGATATT R: AGGCTCTCCTTATCATTATTTGGTC		204	195 - 225	2	3
yp4425ms38	16	8	41	86	L: GTGAGGTATAGCTAAACGGTATGT R: CGCCGTAGATTATTTGCACTTTAT		233	200 - 380	3	5
yp0581ms40	17	7	28	76	L: GCAATCATTACCTAACCATATCTC R: GTGCAATAGGCGTTGTTGTGTA		214	220 - 240	2	2
yp0718ms41	17	7	41	75	L: GAAGAAAGCCAGCTAATCTGATG R: TAATGAATAGCAACGACAACCAATA		217	180 - 220	2	2
yp1018ms44	17	7	38	61	L: CAATCCAACAGCTATTAATGCAA R: GAATTTTCATAACACGTTCTTCCTG		233	220 - 260	2	3
yp1108ms45	12	7	65	79	L: GCATCGGAGACTGGGTAAC R: TTTCTGAGGATTTATCGGTGTGAT		161	120 - 170	3	4
yp1335ms46	17	7	33	73	L: CAGTTTTACGTTATTTTCTGAAGG R: CAGCATGAAGTATGACGGGTATATTA		252	230 - 310	3	4
yp2058ms51	18	7	37	65	L: GGTTTTACCGATATAAATCCTGAG R: GACCAAGAAGTTAAGTTGCTTATCG		207	190 - 210	2	2
yp2612ms54	22	7	28	82	L: GTCCACCATTTTCATACTGTCACTT R: GCTCTTTGTTGATTTTATTGAATG		281	250 - 300	2	3
yp3060ms56	16	7	21	81	L: AACCGACTGACTACTTATATTGG R: TTCTTTTCCATTACTCAGCCTGTT		220	180 - 250	2	4
yp4280ms62	9	7	33	60	L: TTTAGTCTTGATTAAGCTGCGTTTT R: ACGGAAGACAACCTTATTATTGATG		240	220 - 310	3	5
yp1118ms69	16	6	39	82	L: GACGTTGCAACTGCAAAAATAAG R: ACTTGTTGTGAAGACCATCACTCT		179	165 - 180	2	2
yp1580ms70	9	6	32	97	L: AAACCAACGGTTCATATTGAATAAA R: CTCTTCCGCTATTTTCTACAGA		146	140 - 170	3	5
yp1925ms71	14	6	45	91	L: GCTACTGAATATGAGTTAGCCAAA R: ATTGCCATATTGGATGCTAAAATAA		171	145 - 210	2	4
yp3236ms73	18	6	40	89	L: AATACCCTGTGGGTGATAATGAAC R: ATCGATTTAGGTACCACCAATTCA		225	175 - 230	2	3
yp3245ms74	15	6	44	83	L: CCCCGACTTATATCAAGCACTG R: AACTGACGATCTTTTCACTGAGTT		195	180 - 225	3	3

Table 1: Description of *Yersinia* polymorphic markers

Markers polymorphic in 5 <i>Yersinia</i> strains (monomorphic in <i>pestis</i>)										
yp0802ms02	18	12	49	86	L: CTGACACAAAACGAGAGCCTATTT R: AGCGTGAGTGGGCTATCAATAC	53°C 1 min	314	240 - 315	1	2
yp2925ms08	15	12	39	63	L: AGCCTTTTTGTTGATTATCAGTCAT R: CGATAAATAACTGAATTACCGGATG		270	270 - 290	1	2
yp4411ms10	14	8	32	69	L: ATCATGCTTTTGCCCTCAATATAATC R: GAAACGCAGTCCCTGTTGTAG		191	190 - 210	1	2
yp0813ms16	17	8	39	64	L: GTTGTTATCCGACAGTCTTCAATA R: GCAATTCGTTATGGCTTAGTAAAAA		235	230 - 270	1	2
yp1269ms18	27	9	54	55	L: GCAAAAGCTGAAGCAGATAAAAATAG R: AAACCAACAACAAATCATCAAC		303	220 - 250	1	2
yp2196ms22	20	8	12	55	L: AAACCAACAAGAAAAGTGAACCAC R: CATTACCATTGATGTCCTTAGAC	90 s	265	270 - 1500	1	2
yp2324ms24	19	8	34	65	L: TTCACCGGTTACCTTAATTACATA R: CTACCTTGCTGCAACACTCGAC		255	215 - 255	1	2
yp2331ms25	17	9	36	76	L: AACGCGTTAATAAAAACAATAAAGTG R: CAATATCCTTTTACTCAGCCGATG		181	190 - 230	1	3
yp2679ms27	16	8	20	76	L: ATGATTACTGGCAAGAGCACTATGT R: AACAGATCACCTGGTCGTTAAA		217	200 - 220	1	2
yp2908ms28	18	8	40	69	L: GCAGAAATAATCTTCAGGAGAAAACA R: AGATCGTCGTTAGTCCATGTCAG		242	190 - 290	1	2
yp2958ms29	16	8	23	61	L: AAAATAGTCTGTGTTTCAGCAAAGC R: CCTTAAAAACCCTAAGTGGTAAAA		215	215 - 245	1	2
yp3225ms30	54	11	51	52	L: CAATAATACCATCGTGCATGATAC R: TATTAATGGTGGTGTAGTCGCTGT		683	680 - 900	1	2
yp3532ms31	14	8	30	67	L: GTTATTTATTTTTGCCCAACTTGT R: TTAGCCTGTTGTTCTTCAATAGC		217	215 - 245	1	2
yp3787ms32	18	8	49	65	L: CGATAACGTTAATGCCATCAGTAG R: GCGCCGGTAAGTTTTGTTTATTA		218	190 - 240	1	3
yp3795ms33	15	8	43	67	L: CCCTTCTTTTATGCTTGAAGATACT R: GTTGAACACAGGCTGTTGAG		210	210 - 225	1	2
yp4371ms37	18	8	35	82	L: TACTTAGGCATTGTCTTCACTCC R: CTGAAATTATCAGTAGTGGTTCGT		235	235 - 255	1	2
yp0999ms43	17	7	38	80	L: ATTCCACCACCAACAATTATCAC R: GGTATTGATTTGAAGATGACATTG		211	220 - 300	1	3
yp1962ms50	18	7	34	71	L: TACCGAGGTATTCCTGGTCTAAT R: AGTTGACTCCCAGTCACTTTTCC		225	225 - 240	1	2
yp3734ms59	16	7	36	69	L: ATTATCATGACCCTTCCAGTGTAT R: CATCAAAATGCCAGGAGAGTAAC		218	200 - 220	1	2
yp4338ms63	17	7	38	72	L: ATTAACGATTTCTTGTGCTCAGT R: AATCAGTAACGGCATGTGTCAGTA		194	190 - 275	1	3
yp0549ms66	18	6	41	83	L: TAAAAGCGTCAACAAAGTAGGTCAT R: GTTCCTGTTGTTGAAAATGCTG		212	200 - 220	1	2
yp0782ms67	18	6	40	90	L: TTCCAGGCTAAAGATATTGACTTTG R: CTCGGCTTGTCTACGTTAATG		248	250 - 270	1	2
yp1053ms68	18	6	32	82	L: CCGTTATCTGGTAAAGTGAACAG R: GTCCGGTAGCCTGATTGTTTATT		182	175 - 205	1	3
yp3634ms75	15	6	36	80	L: ATGTGAGCTTGATTGCTGAGTAGT R: TCATATTTAGTGTGTTTGCCTTTG		210	180 - 210	1	3

Some structural characteristics of the tandem repeats are presented : U (unit length), N (number of repeats), %GC, V (% of conservation). PCR and electrophoresis conditions are as described in the material and methods section : annealing temperature is 60°C, elongation time is 60 seconds and gels are 2% agarose except when indicated otherwise. Total number of alleles means number of alleles in 3 *Y. pestis* and 2 *Y. pseudotuberculosis* strains.

Table 2: Description of *Bacillus anthracis* polymorphic markers

Marker	U	N	% GC	V	Primer sequences	PCR	Expected product length in bp (observed)	Estimated size range (bp)	Number of alleles in <i>B. anthracis</i>	Total number of alleles	PIC index
Ceb-Bams 1	21	16	44	88	L: GTTGAGCATGAGAGGTACCTGTGCCTTTTT R: AGTTCAAGCGCCAGAAGGTTATGAGTTATC		485 (520)	410-520	5	5	0.72
Ceb-Bams 3	15	25	59	73	L: GCAGCAACAGAAAACCTCTCCAATAACA R: TCCTCCCTGAGAACTGCTATCACCTTTAAC	1%	544	480-860	6	9	0.75
Ceb-Bams 5	39	10	49	92	L: GCAGGAAGAACAAAAGAACTAGAAGAGCA R: ATTATTAGCAGGGGCTCTCCTGCATTACC	53°C 60s	307	305-385	3	3	0.56
Ceb-Bams 7	18	49	55	69	L: GAATATTGTGCCACCTAACAAAACAGAAA R: TGTCAGATCTAGTTGGCCCTACTTTTCCTC	65°C 1%	1017	600-1950	9	9	0.82
Ceb-Bams 13	9	70	60	79	L: AATTGAGAAATTGCTGTACCAAAC R: CTAGTGCATTTGACCCCTAATCTTGT	120s 1%	814	330-850	8	11	0.79
Ceb-Bams 15	18	12	57	77	L: GTATTTCGCCAGATACAGTAATCC R: GTGTACATGTTGATTTCATGCTGTTT		409	410-610	5	5	0.59
Ceb-Bams 21	45	11	43	75	L: TGTAGTGCCAGATTGTCTTCTGTA R: CAAATTTTGAGATGGGAGTTTTACT		676	540-680	3	3	0.14
Ceb-Bams 22	36	15	39	81	L: ATCAAAAATCTTGCCAGACTGA R: ACCGTTAATTCACGTTTACGAGA		735	590-950	4	6	0.51
Ceb-Bams 23	42	11	37	85	L: CGGTCTGTCTCTATTATCAGTGGT R: CCTGTTGCTCCTAGTGATTTCTTAC		653	570-820	3	4	0.49
Ceb-Bams 24	42	11	44	80	L: CTTCTACTTCCGTACTTGAAATTGG R: CGTCACGTACCATTTAATGTTGTTA		630	335-670	3	6	0.2
Ceb-Bams 25	15	14	45	60	L: CCGAATACGTAAGAATAAATCCAC R: TGAAAGATCTTGAAAAACAAGCATT		391	375-390	2	2	0.07
Ceb-Bams 28	24	14	36	70	L: CTCTGTTGTAACAAAATTTCCGTCT R: TATTAACCAGGCGTTACTTACAGC		493 (400)	300-400	3	3	0.26
Ceb-Bams 30	27	16	58	78	L: AGCTAATCACCTACAACACCTGGTA R: CAGAAAATATTGGACCTACCTTCC	120s 1%		200-890	11	11	0.77
Ceb-Bams 31	9	64	58	57	L: GCTGTATTTATCGAGCTTCAAATCT R: GGAGTACTGTTTGTGAATGTTGTTT	1%	772	300-850	4	4	0.32

Some structural characteristics of the tandem repeats are presented : U (unit length), N (number of repeats), %GC, V (% of conservation). PCR and electrophoresis conditions are as described in the material and methods section : annealing temperature is 60°C, elongation time is 60 seconds and gels are 2% agarose except when indicated otherwise. The expected product length is deduced from the sequencing data corresponding to the Ames strain. When the Ames strains typing does not fit with the expected value, the observed value is indicated between (). Only one side of the Ceb-Bams30 minisatellite can be identified in the available Ames sequence. The other side was identified in the course of the independent, partial sequencing of *B. anthracis* strains (Vergnaud and col., unpublished data). Total number of alleles includes alleles observed in the *B. cereus* strains. Polymorphism Information Index (PIC) or Nei's diversity index is calculated as $1 - \sum (\text{allele frequency})^2$.

Table 3: Correspondence between *B. anthracis* allele sizes and allele numbering

allele nb marker name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ceb-Bams1	~ 410	~ 430	~ 450	~ 480	~ 520					
Ceb-Bams3	484	514	544	559	574	589	704	734	857	
Ceb-Bams5	307	346	385							
Ceb-Bams7	603	1017	1305	1503	1557	1647	1809	1899	1953	
Ceb-Bams13	328	382	454	481	490	652	742	787	814	850
Ceb-Bams15	409	535	571	589	607					
Ceb-Bams21	541	631	676							
Ceb-Bams22	591	627	699	735	~ 900	~ 950				
Ceb-Bams23	569	611	653	821						
Ceb-Bams24	336	420	462	504	630	672				
Ceb-Bams25	376	391								
Ceb-Bams28	~ 300	~ 375	~ 400							
Ceb-Bams30	266	375	500	660	695	730	760	850 to 900		

Table 3: Correspondence between *B. anthracis* allele sizes and allele numbering

Ceb-Bams31	304	700	772	853		
vrrA	289	301	313	325	337	
vrrB1	184	193	220	229	256	~ 280 ~ 290
vrrB2	~ 135	153	162	171	~ 180	
vrrC1	400	502	520	538	583	613 685
vrrC2	532	568	607	660		
CG3	153	158				

Alleles have been numbered in increasing size order. When the allele size (in base-pairs) observed in the Ames strain was in agreement with the size expected according to Ames sequence data, the values indicated in the table assume that alleles differ in size by a multiple of the motif length. These likely values will have to be confirmed by more accurate size estimation tools and allele sequencing. When the allele size in Ames is not as expected (Ceb-Bams I and Ceb-Bams28), the estimated values are preceded by a ~. The Vrr and CG3 allele sizes were described in [2]; new alleles are indicated by a ~.

Acknowledgements

Minisatellite investigations in the laboratory are supported by grants from Délégation Générale de l'Armement (DGA/DSA/STTC and DGA/DSA/SP-Nuc). Preliminary sequence data for *B. anthracis* was obtained from The Institute for Genomic Research through the website at [http://www.tigr.org]. Sequencing of *B. anthracis* was accomplished with support from Office of Naval Research, Department of Energy, and National Institute of Allergy and Infectious diseases. The *Yersinia pestis* sequence data were produced by the *Y. pestis* Sequencing Group at the Sanger Centre and can be obtained from [ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/yp/]. We wish to thank the referees for the significant improvements they have suggested.

References

- van Belkum A, Scherer S, van Leeuwen W, Willemsse D, van Alphen L, Verbrugh H: **Variable number of tandem repeats in clinical strains of Haemophilus influenzae.** *Infect Immun* 1997, **65**:5017-27
- Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, Jackson PJ, Hugh-Jones ME: **Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Reveals Genetic Relationships within Bacillus anthracis.** *J Bacteriol* 2000, **182**:2928-2936
- Frothingham R, Meeker-O'Connell WA: **Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats.** *Microbiology* 1998, **144**:1189-96
- Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C: **Variable human minisatellite-like regions in the Mycobacterium tuberculosis genome.** *Mol Microbiol* 2000, **36**:762-71
- Adair DM, Worsham PL, Hill KK, Klevytska AM, Jackson PJ, Friedlander AM, Keim P: **Diversity in a variable-number tandem repeat from Yersinia pestis.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**:1516-9
- van Ham SM, van Alphen L, Mooi FR, van Putten JP: **Phase variation of H. influenzae fimbriae: transcriptional control of two divergent genes through a variable combined promoter region.** *Cell* 1993, **73**:1187-96
- Weiser JN, Love JM, Moxon ER: **The molecular mechanism of phase variation of H. influenzae lipopolysaccharide.** *Cell* 1989, **59**:657-65
- Bayliss CD, Field D, Moxon ER: **The simple sequence contingency loci of Haemophilus influenzae and Neisseria meningitidis.** *J Clin Invest* 2001, **107**:657-66
- Henderson IR, Owen P, Nataro JP: **Molecular switches - the ON and OFF of bacterial phase variation.** *Mol Microbiol* 1999, **33**:919-32
- Wang G, Ge Z, Rasko DA, Taylor DE: **Lewis antigens in Helicobacter pylori: biosynthesis and phase variation.** *Mol Microbiol* 2000, **36**:1187-96
- Wilton JL, Scarman AL, Walker MJ, Djordjevic SP: **Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesin gene of Mycoplasma hyopneumoniae.** *Microbiology* 1998, **144**:1931-43
- Vergnaud G, Denoed F: **Minisatellites: Mutability and Genome Architecture.** *Genome Res* 2000, **10**:899-907
- Kokoska RJ, Stefanovic L, Tran HT, Resnick MA, Gordenin DA, Petes TD: **Destabilization of yeast micro- and minisatellite DNA sequences by mutations affecting a nuclease involved in Okazaki fragment processing (rad27) and DNA polymerase delta (pol3-t).** *Mol Cell Biol* 1998, **18**:2779-88
- Debrauwere H, Buard J, Tessier J, Aubert D, Vergnaud G, Nicolas A: **Meiotic instability of human minisatellite CEB1 in yeast requires DNA double-strand breaks.** *Nat Genet* 1999, **23**:367-71
- De Bolle X, Bayliss CD, Field D, van de Ven T, Saunders NJ, Hood DW, Moxon ER: **The length of a tetranucleotide repeat tract in Haemophilus influenzae determines the phase variation rate of a gene with homology to type III DNA methyltransferases.** *Mol Microbiol* 2000, **35**:211-22
- van Belkum A, Scherer S, van Alphen L, Verbrugh H: **Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1998, **62**:275-93
- Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiryole A, Carniel E: **Yersinia pestis, the cause of plague, is a recently emerged clone of Yersinia pseudotuberculosis [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 2000 Jul 5;97(14):8192].** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:14043-8
- Helgason E, Okstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M, Hegna I, Kolsto : **Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis - one species on the basis of genetic evidence.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**:2627-30
- Keim P, Kalif A, Schupp J, Hill K, Travis SE, Richmond K, Adair DM, Hugh-Jones M, Kuske CR, Jackson P: **Molecular evolution and diversity in Bacillus anthracis as detected by amplified fragment length polymorphism markers.** *J Bacteriol* 1997, **179**:818-24
- Benson G: **Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences.** *Nucleic Acids Res* 1999, **27**:573-80
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaiia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Barrell BG, et al: **Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence.** *Nature* 1998, **393**:537-44
- Engelke DR, Krikos A, Bruck ME, Ginsburg D: **Purification of Thermus aquaticus DNA polymerase expressed in Escherichia coli.** *Anal. Biochem.* 1990, **191**:396-400
- Felsenstein J: **PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2).** *Cladistics* 1989, **5**:164-166

4.3. PRESENTATION DU PROJET RELATIF A L'ETUDE DES SNP

L'identification des SNP (Single Nucleotide Polymorphism) se caractérise par :

- l'identification d'un nucléotide polymorphe à partir des données de séquence,
- l'hybridation, sur l'ADN de l'échantillon, d'une amorce adjacente au site variable mais n'incluant pas ce nucléotide polymorphe,
- l'incorporation d'un 2',3'-dideoxyribonucléotide (ddNTP) à l'extrémité 3' de l'amorce (microséquençage),
- l'identification de la base ajoutée, complémentaire à celle du locus polymorphe.

En 1994, Nikiforov *et al.* ont réalisé les réactions d'extension à partir d'amorces adjacentes au nucléotide polymorphe et en présence des quatre ddNTP. Lorsque cette réaction est réalisée en phase liquide, un seul des quatre ddNTP est marqué par la fluorescéine. Par contre, si elle est effectuée en phase solide, deux des quatre ddNTP sont marqués, l'un par la fluorescéine et l'autre par la biotine. Les nucléotides incorporés sont ensuite détectés par des tests enzymatiques standards.

En 1997, Haff et Smirnov ont utilisé la spectrométrie de masse afin de caractériser le polymorphisme au niveau de la base variable. La réaction d'extension est effectuée en présence d'une amorce adjacente à ce locus. Cette approche présente l'avantage de ne recourir qu'à une seule réaction en présence des quatre ddNTP non marqués. Cette approche peu coûteuse est très spécifique et flexible (Ross *et al.*, 2000).

La méthode que nous utiliserons, décrite en conclusion de ce paragraphe, n'implique pas l'usage de didéoxyribonucléotides. L'amorce sélectionnée inclut le nucléotide polymorphe en son extrémité 3' (amplification spécifique d'allèle ou allele-specific amplification, Beaudet *et al.*, 2001). Lorsqu'elle s'hybride à l'ADN de la souche bactérienne étudiée, l'amorce subit une extension et une amplification par PCR, le produit de cette réaction étant alors visible sur un gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium puis exposé aux ultra-violets.

Répondant à des préoccupations tant civiles que militaires, ce projet est destiné à déterminer les caractéristiques de cette souche dans le but de définir son origine géographique afin de mieux comprendre ses modes de dissémination (naturels ou artificiels).

La méthode suivie pour le projet est fondée sur les séquençages des souches Ames et Davis de *B. anthracis*. Les SNP sont identifiés en comparant les séquences Ames et Davis. Les amorces sont alors choisies en amont du site polymorphe, le dernier nucléotide, situé à l'extrémité de l'amorce, étant celui du site polymorphe. Pour chaque SNP, deux couples d'amorces sont donc utilisés, l'un dit « Ames » et l'autre dit « Davis ».

Les SNP sont au préalable sélectionnés par PCR sur une gamme de température (gradient). Chaque SNP est ensuite typé par une seconde PCR sur une collection de souches de *B. anthracis* incluant les deux souches séquencées, Ames et Davis.

Sur 167 SNP candidats identifiés, 32 ont été testés sur 32 souches de *B. anthracis* et 6 souches de *B. cereus*. Sept s'avèrent utilisables pour l'identification de souches de *B. anthracis*.

4.4. PREMIERE SELECTION DE SNP

Théoriquement, les mélanges contenant le couple d'amorce de type « Ames » (amorces 1 et 3 ou couple A) vont amplifier l'ADN de la souche Ames mais pas celui de la souche Davis. De même, les mélanges contenant le couple d'amorces de type « Davis » (amorces 2 et 3 ou couple D) amplifieront l'ADN de la souche Davis et pas celui de la souche Ames.

Les SNP les plus représentatifs des résultats obtenus sont présentés ci-dessous.

4.4.1. SNP NON DISCRIMINANTS

Le SNP 4 n'est pas discriminant (cf. figure 6).

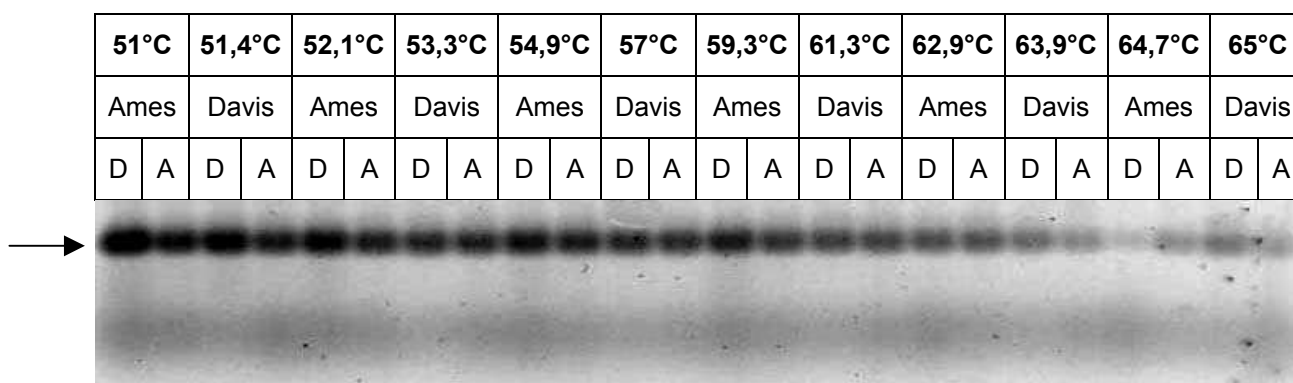


Figure 6 : Résultats obtenus pour le SNP 4, lors du gradient de PCR.

La flèche indique les bandes générées par l'amplification de l'ADN. L'ombre située sous les bandes générées par l'amplification de l'ADN correspond aux amorces qui n'ont pas été amplifiées et qui ont pu se réapparier.

En effet, les deux ADN, Ames et Davis, sont amplifiés quelle que soit la température d'hybridation, comprise entre 51 et 65°C, et quel que soit le type d'amorce. Les produits d'amplification, après coloration au bromure d'éthidium, induisent un signal d'intensité identique qui ne permet pas de déterminer si la souche est de type Ames ou de type Davis.

Les résultats obtenus pour le SNP 2 sont illustrés par l'image suivante (cf. figure 7) :

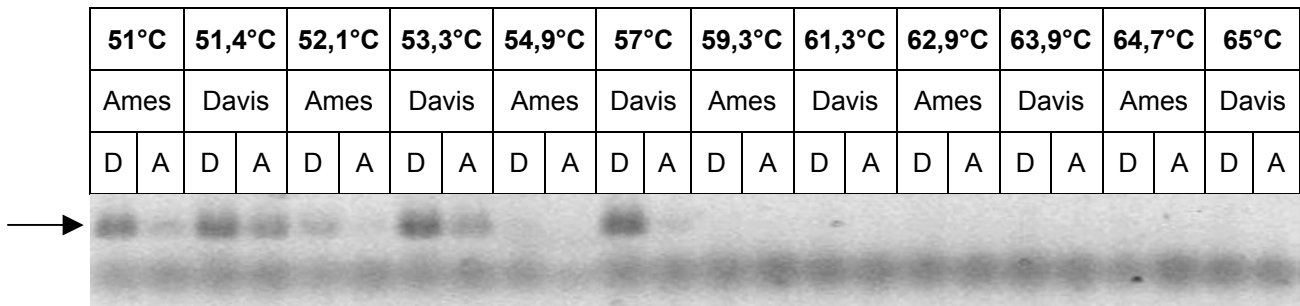


Figure 7 : Résultats obtenus pour le SNP 2, lors du gradient de PCR.

Pour des températures supérieures à 59°C, aucun signal n'apparaît. Par contre, lorsque les températures sont inférieures à 55°C, le produit d'amplification de l'ADN de la souche Ames n'est visible que dans la piste correspondant à l'amorce de type Davis. Quant à l'ADN de la souche Davis, il fournit une bande d'intensité plus forte dans la piste correspondant à l'amorce Davis que dans celle correspondant à l'amorce Ames.

Cette expérience a donc permis de montrer qu'un certain nombre de SNP identifiés par comparaison de séquences n'était pas discriminant.

4.4.2. SNP RETENUS ET DETERMINATION DES TEMPERATURES D'HYBRIDATION

Le SNP 16 fournit des résultats conformes à ceux que l'on pouvait théoriquement prévoir (cf. figure 8) :

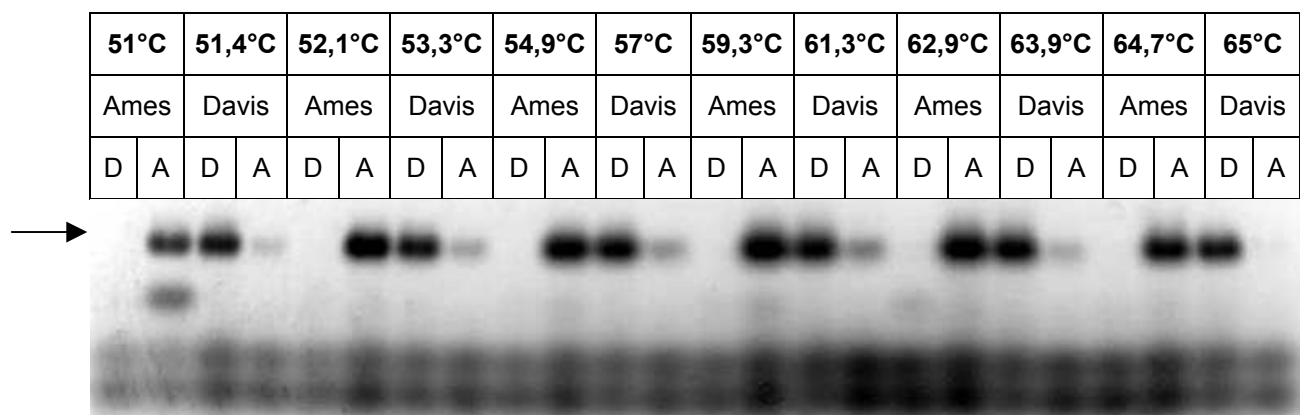


Figure 8 : Résultats obtenus pour le SNP 16, lors du gradient de PCR.

Quelle que soit la température d'hybridation de l'amorce, en présence d'ADN de la souche Ames, le produit d'amplification n'est visible que dans la piste correspondant à l'amorce A (Ames, 1 et 3). De même, en présence d'ADN Davis, ce produit n'apparaît que dans la piste correspondant à l'amorce D (Davis, 2 et 3). Dans ces conditions, la température d'hybridation de l'amorce est fixée à 65°C afin d'obtenir une stringence maximale lors de l'hybridation de l'amorce.

S'agissant du SNP 1, les produits de PCR sont visibles dans quasiment tous les puits (cf. figure 9).

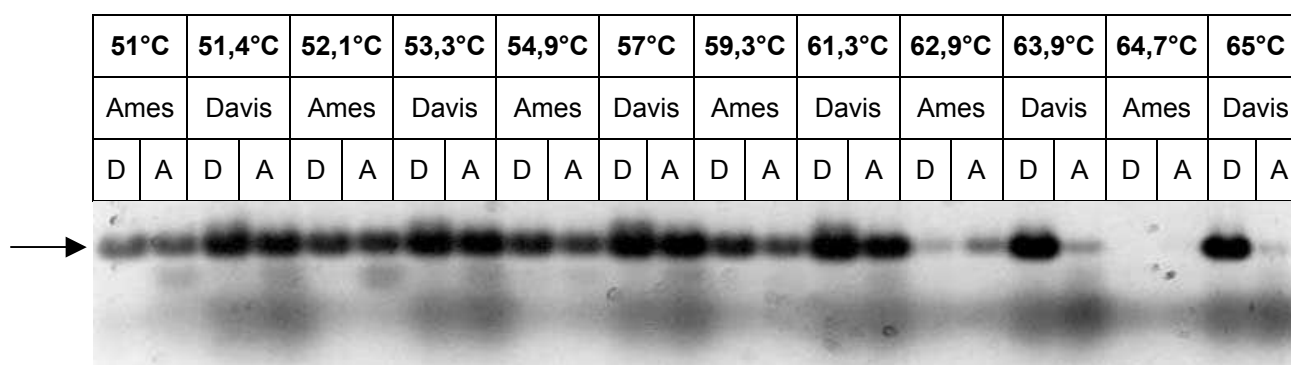


Figure 9 : Résultats obtenus pour le SNP 1, lors du gradient de PCR.

La détermination de la température est donc moins évidente pour ce SNP. Jusqu'à environ 62°C, les ADN Ames et Davis sont amplifiés quelle que soit l'amorce utilisée lors de l'amplification. A 62,9°C, l'ADN Ames présente une intensité plus forte pour la bande correspondant à l'amplification par l'amorce A (Ames, 1 et 3). Par contre, aucune bande n'est visible à 64,7°C. En ce qui concerne l'ADN de Davis, pour des températures supérieures à 62°C, le produit d'amplification n'apparaît que dans la piste correspondant à l'amorce D (Davis, 2 et 3). Il est donc possible de distinguer les souches en fonction de l'amorce utilisée pour une température d'hybridation de l'amorce supérieure à 62°C. Etant donné qu'aucune bande n'est visible à 64,7°C en présence d'ADN Ames, la température d'hybridation est fixée à une température inférieure, soit 63°C, quelle que soit l'amorce utilisée.

4.4.3. BILAN DES SNP RETENUS POUR L'ETUDE SUR LA COLLECTION DE SOUCHE

Le bilan des résultats obtenus est présenté dans le tableau 2 :

	Température d'hybridation		Température d'hybridation
SNP 1	63°C	SNP 17	non discriminant
SNP 2	non discriminant	SNP 18	65°C
SNP 3	non discriminant	SNP 19	non discriminant
SNP 4	non discriminant	SNP 20	non discriminant
SNP 5	non discriminant	SNP 21	65°C
SNP 6	non discriminant	SNP 22	non discriminant
SNP 7	non discriminant	SNP 23	non discriminant
SNP 8	57°C	SNP 24	60°C
SNP 9	non discriminant	SNP 25	58°C
SNP 10	65°C	SNP 26	53°C
SNP 11	51°C	SNP 27	64°C
SNP 12	51°C	SNP 28	57°C
SNP 13	non discriminant	SNP 29	non discriminant
SNP 14	51°C	SNP 30	65°C
SNP 15	non discriminant	SNP 31	non discriminant
SNP 16	65°C	SNP 32	51°C

Tableau 2 : Bilan des résultats relatifs à la première sélection des SNP sur un gradient de température d'hybridation de l'amorce.

Parmi les 32 SNP testés, 16 ne sont pas discriminants. Ils peuvent correspondre à des erreurs de séquence de l'une des deux souches. En effet, la résolution du séquençage de la souche Ames de *B. anthracis* s'élève à 10x tandis que celle du séquençage de la souche Davis n'atteint que 1x.

En conclusion, ces expériences ont permis de sélectionner environ 50% des SNP candidats.

4.5. ANALYSE DES SNP SUR UNE COLLECTION DE SOUCHES

Dans la deuxième phase du projet, tous les candidats sélectionnés seront typés sur une collection d'ADN de *Bacillus* : 34 souches de *B. anthracis* (32 différentes parmi lesquelles deux sont dupliquées) et 6 souches de *B. cereus*.

4.5.1. QUELQUES RESULTATS REPRESENTATIFS

4.5.1.1. SNP DIRECTEMENT VALIDE : SNP 10

Les résultats, auxquels on pourrait théoriquement s'attendre, sont représentés ci-après par l'image obtenue pour le SNP 10 (cf. figure 10) :

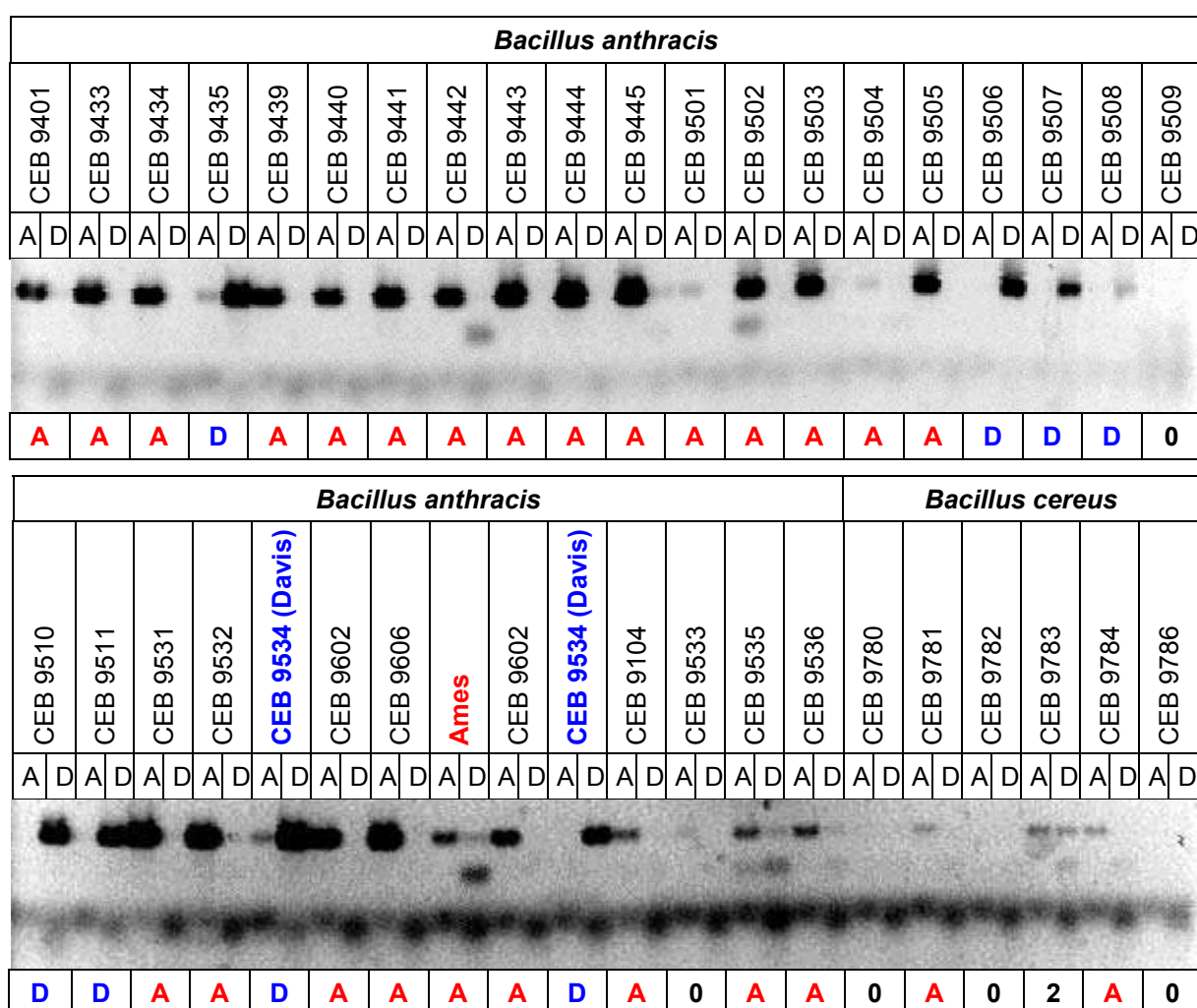


Figure 10 : Résultats obtenus pour le SNP 10.

La première ligne indique l'espèce bactérienne utilisée. La deuxième mentionne les références des souches tandis que la troisième signale les amorces employées. En dessous de l'image, le tableau résume les résultats obtenus. Pour une souche considérée,

D : le fragment d'ADN amplifié est de type Davis ;

A : le fragment d'ADN amplifié est de type Ames ;

0 : il n'y a pas eu d'amplification ;

2 : l'ADN a été amplifié pour les deux types d'amorces, A (1 et 3) et D (2 et 3).

2/A, 2/D : le produit d'amplification est visible dans chaque piste mais son intensité est plus élevée dans celle correspondant au type Ames (2/A) ou au type Davis (2/D).

S'agissant de ce SNP, on distingue aisément, pour la majorité des souches étudiées, les cas où le site polymorphe est de type Ames ou Davis.

L'absence de signal, en ce qui concerne certaines souches, peut s'expliquer soit par une qualité insuffisante de l'ADN à amplifier, soit par une affinité réduite de l'amorce pour l'ADN considéré. Certains des six *B. cereus* illustrent ce dernier cas. En effet, la séquence de l'amorce, sélectionnée à partir de la séquence de *B. anthracis*, peut s'apparier à des séquences d'ADN de *B. cereus* qui ne lui sont pas totalement homologues.

Le SNP 10 qui vient d'être validé peut donc servir de référence lors de l'analyse d'une souche inconnue de *B. anthracis* dans des études ultérieures.

4.5.1.2. SNP VALIDE PAR UNE SECONDE PCR : SNP 16

Parfois, la PCR ne permet pas d'établir clairement si le site polymorphe est de type Ames ou de type Davis. La SNP 16 illustre ce genre de situation (cf. figure 11).

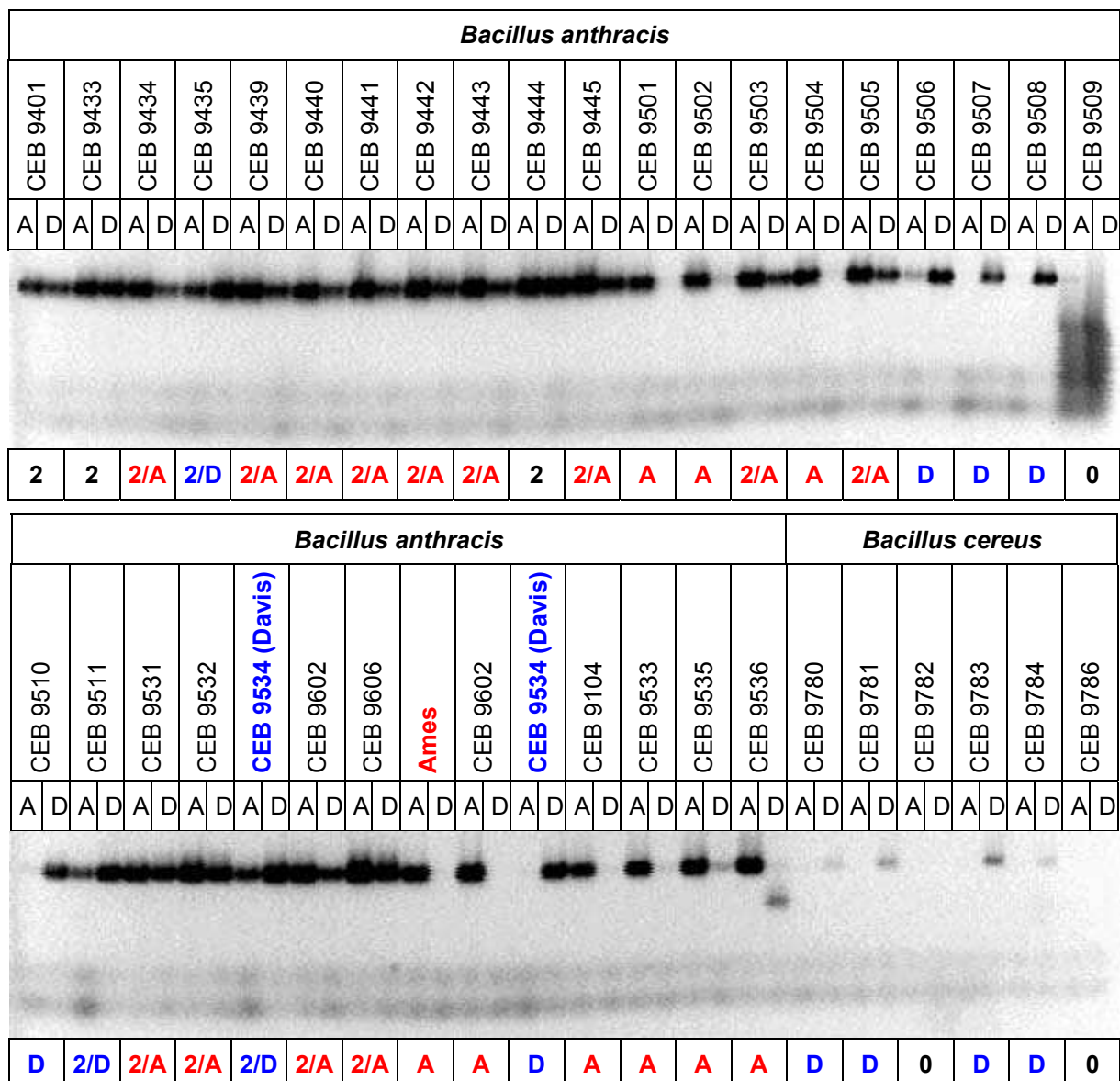


Figure 11 : Résultats obtenus pour le SNP 16 lors de la première PCR dont les conditions sont décrites dans le paragraphe MM.1.3.3.

En ce qui concerne le SNP 16, une majorité des souches présente une bande dans chacune de leurs deux pistes. Parfois, l'intensité est plus forte dans l'une des deux pistes que dans l'autre. Elle permet alors de supposer que le site polymorphe de cette souche appartient soit au type Ames, soit au type Davis.

Aussi, pour confirmer les résultats, une seconde PCR est-elle effectuée dans des conditions différentes. Pour le SNP 16, 30 cycles sont exécutés sur l'appareil GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) avec une température d'hybridation de 60°C. Les résultats obtenus sont illustrés par l'image suivante (cf. figure 12) :

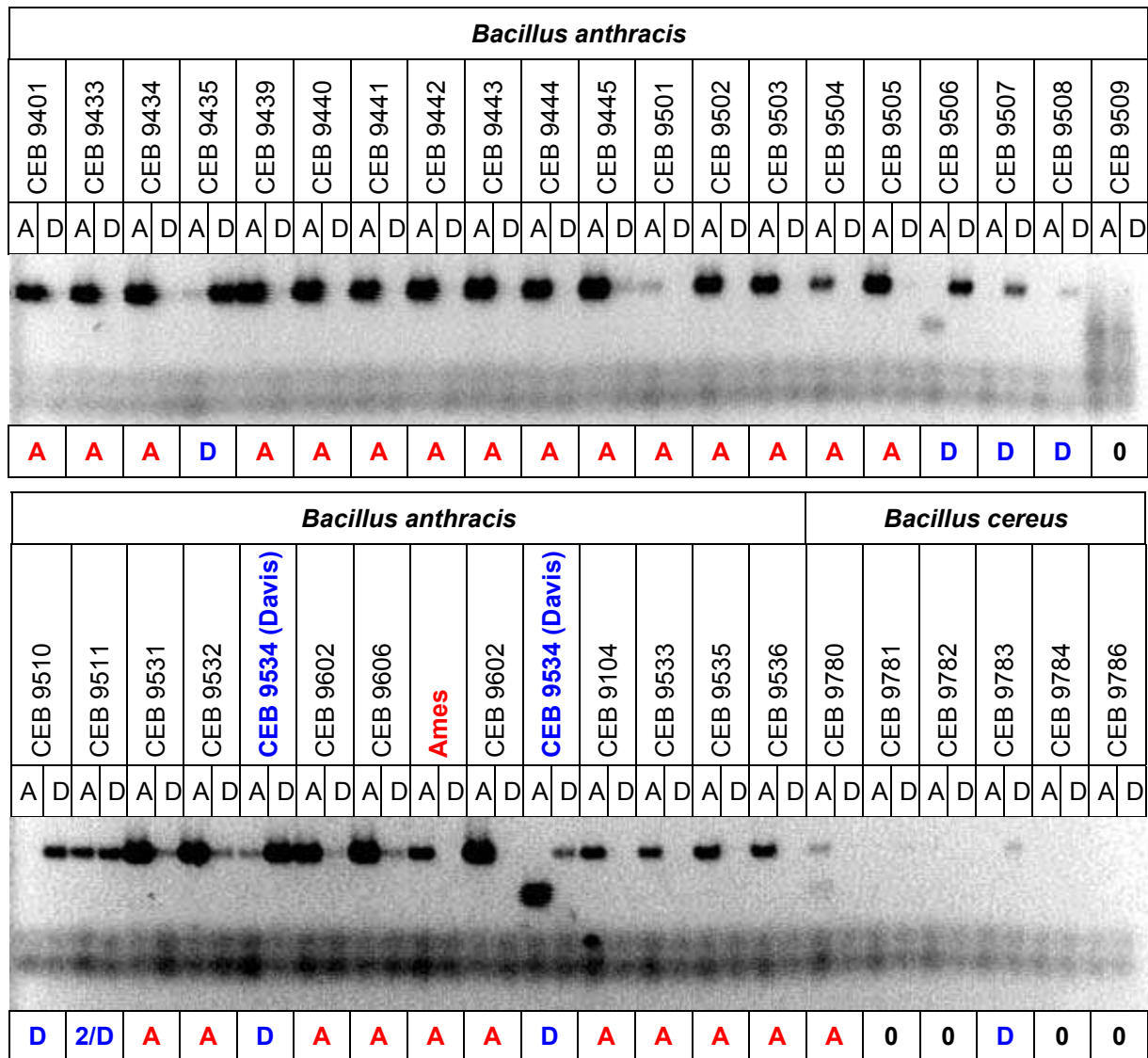


Figure 12 : Résultats obtenus pour le SNP 16 lors de la seconde PCR. 30 cycles sont réalisés sur l'appareil GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) à une température d'hybridation de 60°C.

Cette seconde PCR, en comparaison à l'expérience précédente, confirme les résultats préalablement observés.

Par conséquent, le SNP 16 entre, comme le SNP 10, dans la catégorie des SNP qui serviront par la suite de référence lors de l'analyse d'une souche inconnue de *B. anthracis*.

4.5.1.3. CAS DU SNP 32

Le SNP 32 qui a été validé montre un profil particulier exposé dans la figure 13.

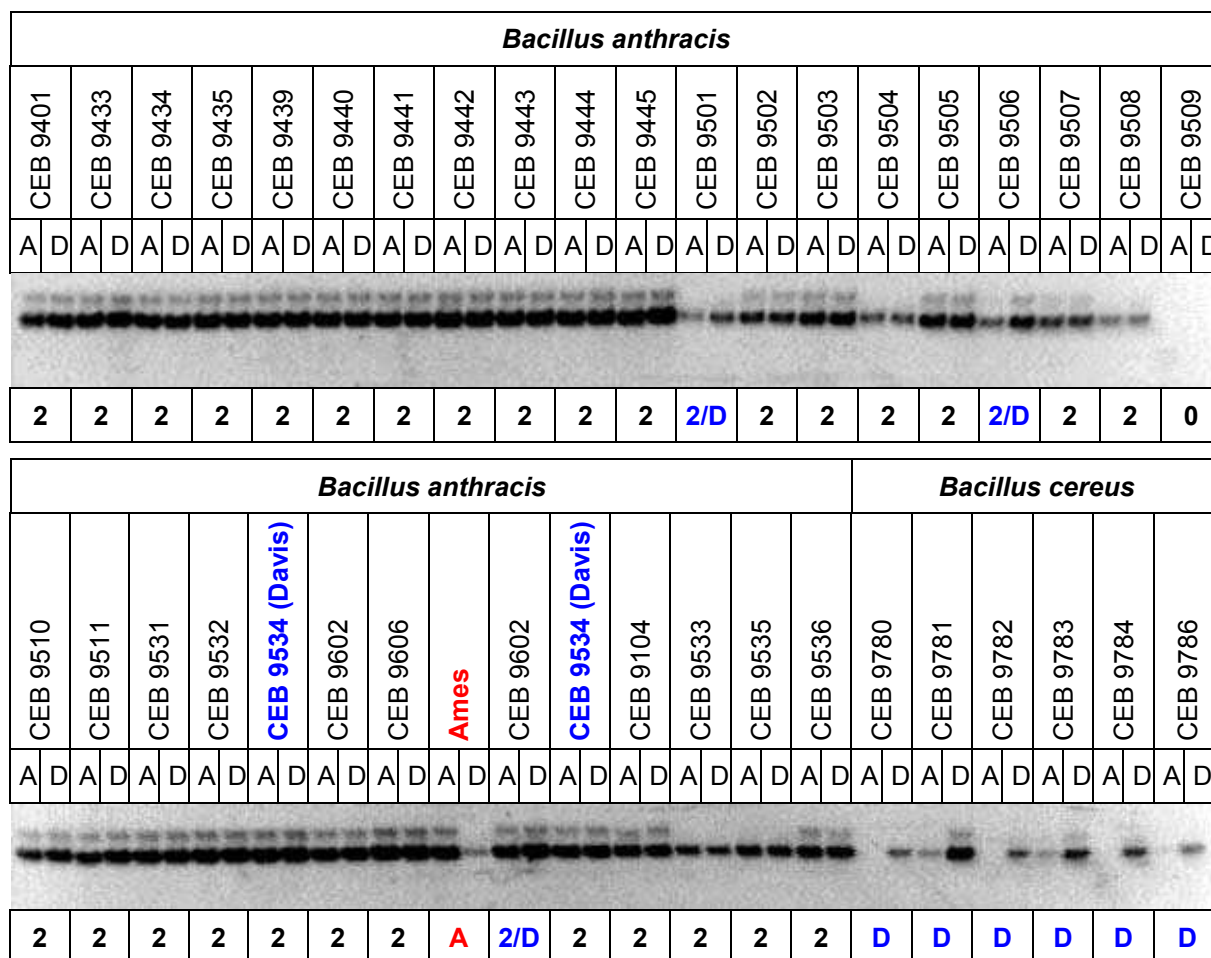


Figure 13 : Résultats obtenus pour le SNP 32.

En ce qui concerne les souches de *B. anthracis*, les résultats montrent la présence d'une bande dans chaque piste du gel, que l'amorce soit de type Ames ou Davis. Les intensités de ces bandes sont comparables. Seule la souche Ames présente un profil particulier, de type Ames : elle n'a pas de bande dans la piste « Davis ». En ce qui concerne les *B. cereus*, on n'observe l'existence d'une bande que dans les pistes « Davis ». Le même type de profil est obtenu lorsque le nombre de cycle et la quantité d'ADN par PCR sont réduits.

Par conséquent, le SNP 32 exhibent trois genres de profils :

- profil de type Ames, se caractérisant par une bande uniquement dans la piste Ames,
- profil de type Davis, se caractérisant par une bande uniquement dans la piste Davis (cas des *B. cereus*),
- profil double bande, se caractérisant par une bande d'intensité comparable dans chacune des deux pistes, Ames et Davis.

Ces résultats permettent d'établir les hypothèses suivantes (cf. figure 14) :

- le profil observé sur les souches de *B. cereus* (profil de type Davis) serait un profil « ancestral » n'ayant pas subi de modifications particulières ;
- au cours de l'évolution, le profil « double bande » découlerait de la duplication de l'allèle existant puis de l'apparition d'une mutation ponctuelle sur cet allèle dupliqué. Ce profil est observé pour la majorité des souches de *B. anthracis* ;
- pour obtenir le profil de type Ames, il faut envisager la délétion de l'allèle n'ayant pas subi la mutation.

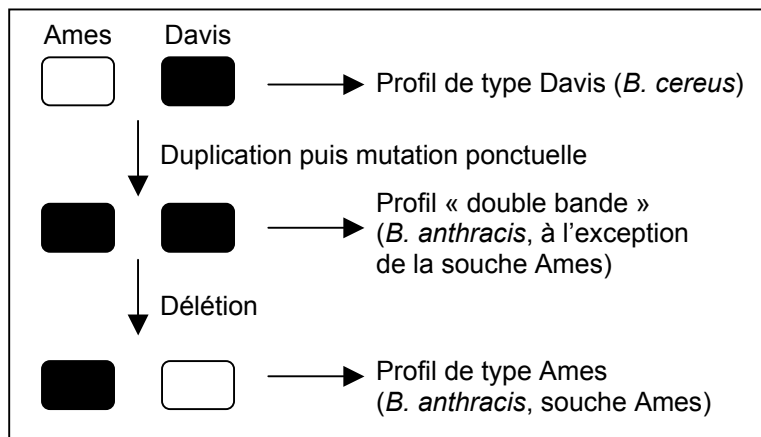


Figure 14 : Schéma illustrant les hypothèses suggérées par les résultats du SNP 32.

4.5.2. BILAN DE L'ANALYSE DES SNP SUR UNE COLLECTION DE SOUCHES DE *BACILLUS ANTHRACIS*

Les résultats des SNP sont résumés dans les tableaux suivants (cf. tableau 3) :

<i>Bacillus anthracis</i>																				
Souche	CEB 9401	CEB 9433	CEB 9434	CEB 9435	CEB 9439	CEB 9440	CEB 9441	CEB 9442	CEB 9443	CEB 9444	CEB 9445	CEB 9501	CEB 9502	CEB 9503	CEB 9504	CEB 9505	CEB 9506	CEB 9507	CEB 9508	CEB 9509
SNP 8	2	2/A	2/A	2/D	2/A	2/A	2/A	A	2/A	2/A	2/A	A	A	2/A	2	2/A	2	2/D	D	D
SNP 10	A	A	A	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	D	D	D	0
SNP 16	A	A	A	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	D	D	D	0
SNP 21	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	0	A	A	0	A	A	A	A	0
SNP 25	A	A	A	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	D	D	D	0
SNP 26	2	2/A	2/A	D	2	2/A	2	2/A	2/A	2/A	2	A	A	2	A	2/A	D	D	D	0
SNP 32	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	0

<i>Bacillus anthracis</i>														<i>Bacillus cereus</i>						
Souche	CEB 9510	CEB 9511	CEB 9531	CEB 9532	CEB 9534 (Davis)	CEB 9602	CEB 9606	Ames	CEB 9602	CEB 9534 (Davis)	CEB 9104	CEB 9533	CEB 9535	CEB 9536	CEB 9780	CEB 9781	CEB 9782	CEB 9783	CEB 9784	CEB 9786
SNP 8	2/D	2/D	2/A	2/A	2/D	2/A	2/A	A	A	2/D	A	A	A	2	D	D	2	0	A	A
SNP 10	D	D	A	A	D	A	A	A	A	D	A	0	A	A	0	A	0	2	A	0
SNP 16	D	2/D	A	A	D	A	A	A	A	D	A	A	A	A	A	0	0	D	D	0
SNP 21	A	A	A	A	D	A	A	A	A	0	0	0	A	A	0	0	0	A	A	0
SNP 25	D	D	A	A	D	A	A	A	A	D	A	A	A	A	0	0	0	0	0	0
SNP 26	D	D	2	2	D	2	2	A	A	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	0
SNP 32	D	D	D	D	D	D	D	A	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

Tableau 3 : Bilan des résultats obtenus pour les SNP validés sur les 32 souches de *Bacillus anthracis* et les 6 souches de *Bacillus cereus*.

Parmi les 16 SNP précédemment sélectionnés, 9 sont non spécifiques ou correspondent à des erreurs de séquençage aussi bien dans la souche Ames que dans la souche Davis.

Les 7 SNP restants se divisent en trois catégories :

- Les SNP 8, 10, 16, 25 et 26 permettent de déterminer si une souche de *B. anthracis* appartient au groupe A ou au groupe B. Les résultats présentés dans les tableaux confirment la phylogénie précédemment établie à partir de ces souches par Le Flèche *et al.* (2000).
- Le SNP 21 caractérise la souche Davis parmi d'autres *B. anthracis*.
- Quant au SNP 32, il isole la souche Ames des autres *B. anthracis*.

Parmi les 167 SNP identifiés, seuls 32 ont été étudiés. Par conséquent, d'autres SNP sont susceptibles d'exister et pourraient valider d'autres nœuds phylogénétiques.

4.6. DISCUSSION RELATIVE AUX SNP

L'information fournie à ce jour par l'étude des SNP demeure restreinte. En effet, on ne met en évidence que les mutations survenues entre les séquences des deux souches de *B. anthracis*. Cette restriction ne s'applique pas à l'approche reposant sur l'utilisation des minisatellites, celle-ci permettant, par ailleurs, d'établir une relation phylogénétique entre différentes souches d'une même espèce à partir de la séquence ADN d'une seule souche.

La comparaison des résultats tirés de deux PCR, dont on pourrait présumer qu'elles sont identiques, pose des problèmes d'interprétation, dans la mesure où les deux réactions se déroulent, pour des raisons expérimentales évidentes, dans des tubes distincts.

De ce point de vue, les méthodes d'analyse des SNP, utilisant le miniséquençage, pourraient être plus performantes. En effet, les expériences sont alors réalisées dans un seul et même tube pour un SNP considéré (Haff et Smirnov, 1997).

Par contre, le typage par l'intermédiaire des SNP est robuste. Il est donc susceptible de s'appliquer à de l'ADN relativement dégradé et présent en faible quantité. Les minisatellites, quant à eux, nécessitent un ADN d'assez bonne qualité afin de pouvoir amplifier et distinguer des allèles de tailles différentes selon les souches bactériennes.

Dans le cas de *B. anthracis*, espèce peu polymorphe d'un point de vue génétique, il semble que l'approche utilisant les minisatellites soit la plus adaptée. En effet, la connaissance de la séquence d'une seule souche suffit à établir une relation phylogénétique entre différentes souches de cette espèce. De plus, lorsque l'espèce est très monomorphe, les minisatellites sont susceptibles d'apparaître comme des lieux importants de variations de l'ADN.

Dans la situation inverse d'espèces génétiquement polymorphes telles que *Vibrio cholerae*, les SNP sont susceptibles de fournir des informations suffisantes sur la phylogénie bactérienne (Stine *et al.*, 2000). En outre, *Vibrio cholerae* possède environ trois fois moins de minisatellites qu'une espèce telle que *Yersinia pestis* ou *Bacillus anthracis*.

Finalement, un projet reposant sur l'utilisation des SNP peut facilement être mis en place même si la structure du laboratoire ne permet pas de posséder du matériel de pointe, en particulier pour le séquençage. En effet, l'utilisation des minisatellites requiert, pour la validation de la différence des tailles des allèles, le séquençage de certains d'entre eux.

Le projet relatif aux SNP se poursuit par une étude comparant les souches Ames et Poitiers (CEB 9602) de *B. anthracis*. Ces deux souches sont plus proches dans l'arbre phylogénétique établi par Le Flèche *et al.* (2001). En effet, elles appartiennent toutes deux au groupe A. Au vu des résultats précédemment exposés, il sera, par conséquent, nécessaire de valider un plus grand nombre de SNP s'agissant de l'étude des souches Ames et Poitiers afin de pouvoir discerner certaines branches.

Considérant qu'il a été démontré que le SNP 32 caractérise la branche contenant l'unique souche Ames (cf. §4.5.2.), sa validation demeure pour l'identification des SNP présents dans les souches Ames et Poitiers.

5. ANALYSE DE LA COMPOSITION BACTERIOLOGIQUE DU BRUIT DE FOND ATMOSPHERIQUE

L'étude relative à la composition bactériologique de l'air est un projet d'envergure qui a fait appel à un travail d'équipe. Les collectes, l'analyse des échantillons et la création d'une base de données a permis de fédérer autour de ce projet des chercheurs et des techniciens de formations différentes (physique, biologie, informatique) dont une partie des résultats est présentée ci-après.

Après avoir exposé différents moyens de collecte et diverses techniques permettant de dénombrer des particules biologiques présentes dans des échantillons, nous discuterons des conditions de collecte des échantillons et des différentes analyses réalisées sur quelques échantillons. Enfin, les résultats de culture et de cytométrie obtenus sur l'ensemble de l'année de collecte seront présentées.

5.1. METHODE DE COLLECTE

Les concentrations des particules biologiques varient de moins de 10^2 cfu/m³ dans les salles blanches et les salles opératoires des hôpitaux à 10^5 - 10^{10} cfu/m³ dans certains sites industriels et agricoles. L'augmentation du temps de collecte entraîne une réduction de la viabilité des cellules végétatives bactériennes qui ont été dispersées dans l'air.

La collecte apparaît comme une étape décisive pour l'étude de la composition bactériologique de l'air. Il existe plusieurs appareils capables de collecter des particules d'air. Leur capacité à isoler les micro-organismes de l'air dépend, d'une part, des caractéristiques physiques du collecteur et, d'autre part, des caractéristiques physiques et biologiques des particules que l'on souhaite détecter (Buttner, 1997).

Les paramètres physiques sont, notamment :

- l'efficacité d'entrée dans le collecteur, c'est-à-dire la capacité du collecteur à extraire les particules de l'air ambiant sans distinction de leur taille, de leur forme ou de leur densité,
- l'efficacité de collection ou la capacité du collecteur à transférer, dans le milieu de collection, les particules de l'air.

Quant aux paramètres biologiques, ils reposent essentiellement sur l'intégrité biologique de la particule, et en particulier sur son état cultivable ou non.

En conclusion, le choix du collecteur dépendra de sa capacité à concentrer de grands volumes d'air en préservant la viabilité des particules biologiques, dans la gamme de taille d'intérêt. Les temps de collecte, les milieux de collection et les modes de détection ou d'identification des particules biologiques sont également déterminants dans la capacité de celles-ci à surmonter ou non le stress provoqué par la méthode de collection lors du prélèvement atmosphérique.

5.1.1. GRAVITE

Une boîte de Petri, dont le couvercle reste ouvert, est exposée à un environnement afin que les organismes aériens soient collectés par simple gravité. Toutefois, cette méthode n'est ni quantitative, le volume d'air déposé n'étant pas mesurable, ni qualitative, cette méthode étant tributaire de la masse de la particule.

5.1.2. FILTRATION

La filtration permet d'isoler des particules aériennes grâce au passage de l'air sur un milieu poreux (membrane) (cf. figure 15). La porosité du filtre varie généralement de 0,01 à 10 μm . Cette méthode entraîne cependant une perte de viabilité des cellules végétatives qui semble liée au stress provoqué par la dessiccation intervenant pendant la collection. Le débit d'aspiration de l'appareil est de l'ordre de 1 à 50 litres d'air/min.

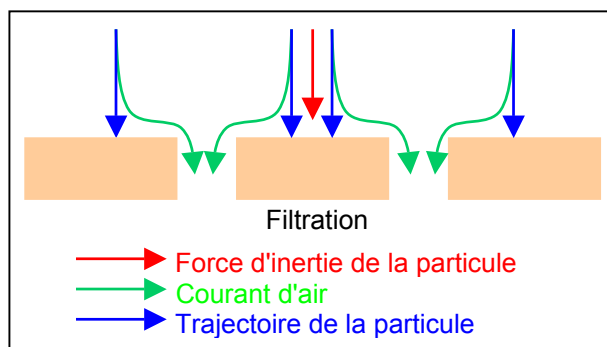


Figure 15 : Schéma illustrant le principe de la filtration sur support solide (généralement sur des membranes dont la porosité varie de 0,01 à 10 μm).

5.1.3. FORCE EXTERNE

Les particules peuvent également être isolées du flux d'air par des forces externes qui s'appliquent sur elles, telles que les forces électriques sur des particules chargées (cf. figure 16).

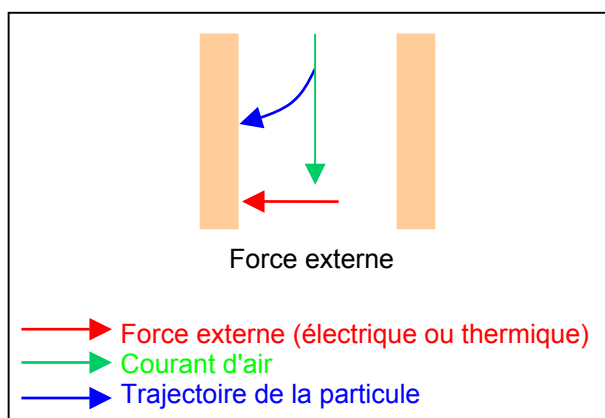


Figure 16 : Schéma illustrant le principe de la force externe.

5.1.4. BARBOTAGE

Dans ce système, la force d'inertie des particules aspirées favorise leur contact avec le milieu liquide (cf. figure 17). Les particules sont alors mises en suspension dans ce milieu. Pour un appareil tel que l'AGI-30, environ 10 litres d'air sont aspirés par minute.

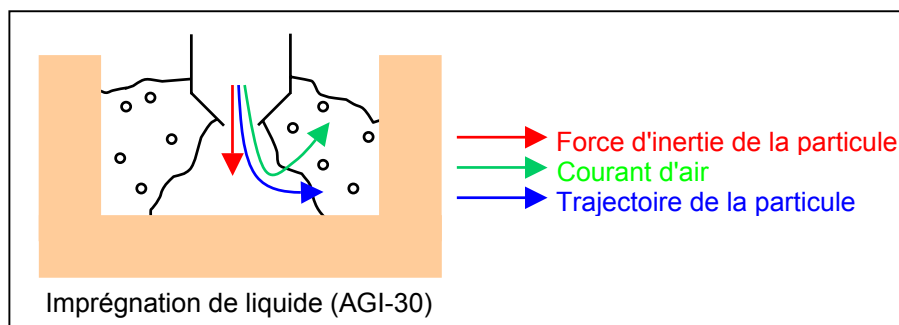


Figure 17 : Schéma illustrant le principe de barbotage.
Entre parenthèses, figure le type d'appareil correspondant à la méthode de collecte.

5.1.5. IMPACT SUR SOLIDE OU SEMI-SOLIDE

La technique dite « d'impact » consiste à séparer les particules de l'air aspiré en utilisant l'inertie de ces dernières dans le but de provoquer leur dépôt sur la surface de collection solide ou semi-solide (cf. figure 18). Cette méthode est la plus fréquemment rencontrée dans les études de composition bactériologique de l'air.

En ce qui concerne l'impact sur milieu solide, le débit d'air varie entre 10 et 100 litres d'air/min selon l'appareil utilisé. Quant au Cyclone (cf. figure 22), il aspire environ 1 000 litres d'air/min.

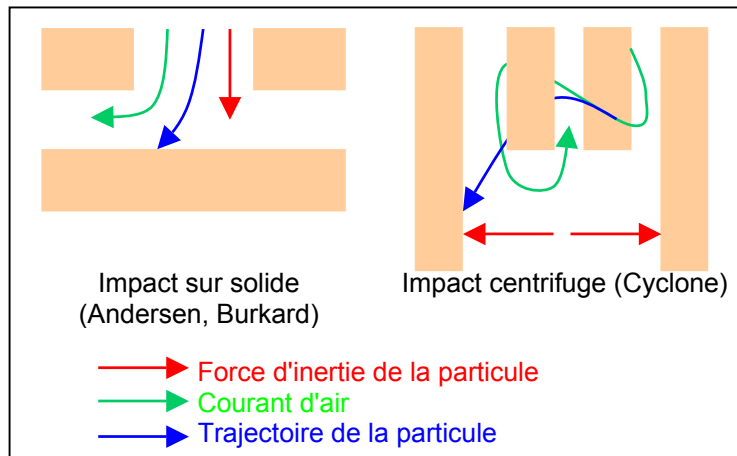


Figure 18 : Schéma illustrant le principe de l'impact sur solide et centrifuge. Entre parenthèses, figure le type d'appareil correspondant à la méthode de collecte.

5.1.6. IMPACT VIRTUEL

L'impact virtuel repose également sur la force d'inertie des particules. La séparation des particules s'opère lorsque le courant d'air contenant les particules de faible inertie et les grosses particules, dont l'inertie est élevée, traversent la surface virtuelle d'impact et sont collectées au-delà de cette interface. Ce système est dichotomique puisqu'il divise un courant d'air en deux courants dont l'un est collecté (cf. figure 19). Son débit est de l'ordre de 100 à 500 litres d'air/min.

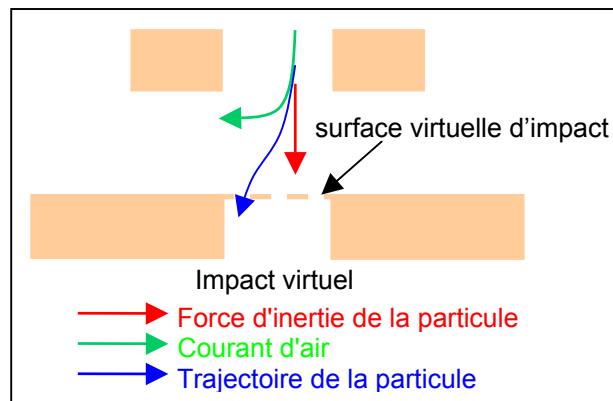


Figure 19 : Schéma illustrant le principe de l'impact virtuel.

5.2. MOYENS DISPONIBLES POUR LA CARACTERISATION DE MICRO-ORGANISMES

Les moyens de détection regroupent les méthodes qui permettent de dénombrer des micro-organismes présents dans un échantillon. Pour l'analyse de prélèvements atmosphériques, la culture reste la technique la plus utilisée. Cependant, la microscopie et la cytométrie autorisent également ce type d'examen, sans avoir recours à la mise en culture du micro-organisme.

Par ailleurs, l'identification donne une information plus précise sur le micro-organisme détecté (par exemple, son genre ou son espèce). L'immunologie et la génétique permettent ce niveau de résolution dans l'analyse d'échantillons. Les possibilités offertes par ces deux méthodes seront détaillées ultérieurement, lors de l'étude de faisabilité d'un système de détection.

5.2.1. CULTURE

La culture est utilisée pour pratiquer différentes analyses dans des domaines variés tels que le contrôle qualité dans le secteur agro-alimentaire, l'analyse sanguine pour la médecine,....

La culture présente l'avantage d'une mise en œuvre facile et rapide. Elle permet également d'enrichir un échantillon avant de détecter et/ou d'identifier des micro-organismes. Après la période d'incubation, les colonies peuvent être dénombrées par un système d'analyse d'image assisté par un ordinateur.

Les inconvénients sont cependant nombreux. La culture peut durer de quelques jours à plusieurs semaines. De plus, certaines espèces bactériennes, éventuellement pathogènes, présentes en faible nombre dans l'échantillon à analyser, sont susceptibles d'être masquées par la microflore naturelle de l'échantillon, anodine pour la santé. La collecte d'échantillons atmosphériques génère un stress qui prive temporairement ou définitivement les micro-organismes de leur capacité de culture. Les échantillons, qui n'auraient pas subi un traitement préalable, peuvent demeurer pathogènes, de sorte que leur culture nécessite des infrastructures particulières. Les micro-organismes qui requièrent un tissu hôte ou un environnement particulier ne poussent pas sur les milieux de culture classiques.

Des études publiées (Amann *et al.*, 1995, Staley et Konopka, 1985) indiquent qu'environ seulement 1% de la population bactérienne, issue du sol ou de l'eau, peut être cultivable, en comparaison au nombre total de cellules comptées par microscopie.

En particulier, Torsvik *et al.* (1990) ont montré, sur des échantillons provenant du sol, que seulement 0,3% des micro-organismes, marqués par fluorescence (acridine-orange) et énumérés par microscopie, était cultivable.

Des études similaires sur de la vase mettent en évidence que la fraction cultivable représente entre 1 et 15% du nombre total de micro-organismes énumérés par microscopie (Wagner *et al.*, 1993 et 1994).

5.2.2. MICROSCOPIE

La microscopie permet d'obtenir une estimation du nombre total de micro-organismes présents dans l'échantillon de l'environnement. A l'inverse de la culture, elle considère aussi bien les micro-organismes cultivables que ceux qui ne le sont pas (Buttner *et al.*, 1997).

L'utilisation de colorants permet de différencier, d'une part, les particules biologiques de celles qui ne le sont pas et, d'autre part, les cellules selon qu'elles sont ou non capables de respirer. Les colorants permettent également de distinguer les cellules entières des débris membranaires.

L'analyse par microscopie implique une énumération fastidieuse et consommatrice de temps. Cependant, les systèmes d'analyse d'image permettent, aujourd'hui, un comptage rapide assisté par ordinateur.

5.2.3. CYTOMETRIE

La cytométrie est réalisée soit en flux, soit en phase solide.

- En flux, l'échantillon liquide, introduit dans l'appareil de mesure, défile à une grande vitesse dans une gaine liquide, devant un faisceau laser. Les cellules, prises en charge par le liquide d'entraînement, sont analysées individuellement lors de leur passage au niveau du point d'illumination.
- La cytométrie en phase solide consiste en l'immobilisation des particules sur un filtre. Après avoir coloré les particules présentes sur ce filtre, celles-ci sont dénombrées sous un microscope relié à un ordinateur permettant une analyse d'image automatisée.

La cytométrie utilise divers colorants et fluorochromes selon l'étude que l'on doit mener (Clarke et Pinder, 1998) :

- Certains colorants tels que la rhodamine ont la capacité de traverser la paroi bactérienne. Ils s'accumulent donc dans les cellules vivantes et permettent, par conséquent, leur dénombrement.
- L'iodure de propidium est, quant à lui, un colorant d'exclusion qui s'incorpore aux cellules dont la paroi cellulaire est dégradée. Le SYTO 9, un intercalant de l'ADN, s'insère dans toutes les cellules. Par conséquent, la combinaison de ces deux derniers colorants permet d'évaluer, par simple déduction, le nombre de cellules viables dans un échantillon.
- D'autres colorants, tels que le ChemChrome, deviennent fluorescents après un clivage enzymatique (notamment un clivage estérasique). Ils permettent, par exemple, la détection de micro-organismes vivants.
- Des anticorps fluorescents peuvent également être utilisés pour détecter une espèce bactérienne particulière. L'addition d'un second paramètre de sélection améliore les temps d'analyse et facilite la confirmation de la détection de l'espèce (Ferrari *et al.*, 2000, Stopa, 2000).

La cytométrie, par rapport aux méthodes d'analyse conventionnelle (culture ou microscopie), présente l'avantage de fournir une réponse rapide (les expérimentations et la lecture des résultats ne durent au maximum qu'une heure) et de permettre l'examen d'un grand nombre d'échantillons. De plus, cette méthode tient compte des cellules non cultivables. Des études montrent qu'il est effectivement possible de détecter jusqu'à 10^3 cfu/ml en 5 minutes (Stopa, 2000), voire 10^2 cellules/ml en trente minutes (Clarke et Pinder, 1998).

Par contre, les appareils de cytométrie, normalement destinés à détecter des cellules eucaryotes, nécessitent un certain nombre de mise au point lors de la mise en évidence de micro-organismes, en particulier de bactéries dont la taille est de l'ordre du micromètre. Par conséquent, il est nécessaire d'établir au préalable des profils susceptibles d'être rencontrés au cours des expérimentations par le passage de solution pure d'une espèce de bactérie ou de pollen.

5.2.4. CONCLUSIONS

Ces trois techniques de détection se limitent bien souvent à dire si la particule est ou non biologique, à quelle grande catégorie elle appartient (micro-organisme ou cellule eucaryote) ou son état physique (vivant ou mort, cultivable ou non). Elles ne caractérisent pas suffisamment ces particules pour être utilisées seules lors de l'analyse de prélèvements atmosphériques.

Lors de l'analyse des échantillons du bruit de fond atmosphérique, la culture et la cytométrie seront utilisées pour dénombrer respectivement la fraction cultivable des micro-organismes et le nombre total de particules biologiques, de micro-organismes, de levures et moisissures.

En outre, une analyse génétique a été réalisée sur certains des échantillons collectés.

5.3. PRESENTATION DU PROJET RELATIF A L'ETUDE SYSTEMATIQUE DU BRUIT DE FOND ATMOSPHERIQUE

L'étude du bruit de fond atmosphérique précède celle portant sur la faisabilité d'un système de détection. Elle vise à fournir des connaissances sur les éventuelles variations dans la composition bactérienne de l'air au cours de la journée, et plus généralement à bien connaître la nature de l'environnement biologique.

De plus, la mise au point d'un système de détection efficace, impliquant un nombre minimal de faux-positifs, nécessite de vérifier l'absence de pathogènes d'intérêt militaire et de leurs proches voisins phylogénétiques, dans la composition normale de l'air étudié.

Les prélèvements atmosphériques ont la particularité d'avoir été effectués sur des temps courts. En effet, chaque échantillon représente 30 minutes de collecte. Les collectes ont eu lieu régulièrement pendant une année entière (une fois par semaine d'avril 2000 à avril 2001). Au cours de chacune de ces collectes, on enregistre certains paramètres météorologiques locaux (cf. §5.4.). Après avoir été conservés à 4°C, jusqu'à la fin de la collecte, les échantillons sont aliquotés afin de faciliter l'exécution des analyses suivantes (cf. figure 20) :

- la numération sur boîte de culture des colonies formées à partir de l'étalement d'échantillons non congelés,
- l'analyse cytométrique, également effectuée sur des échantillons non congelés,
- deux analyses génétiques :
 - la première, présentée dans ce rapport, est dite « génome complet » (ou « RSGP » pour Reverse Sample Genome Probing, cf. §6.3.). Tous les ADN du prélèvement atmosphérique sont extraits, marqués puis hybridés au génome complet des ADN de référence, immobilisés sur un support solide ;
 - en ce qui concerne la seconde, les ADN issus des prélèvements atmosphériques sont amplifiés en présence d'amorces spécifiques à certains gènes, pour un nombre limité d'espèces. Les résultats tirés de cette analyse ne seront pas exposés dans ce rapport.

Les données qui résultent de l'ensemble de ces analyses sont ensuite enregistrées dans la base de données « BDF » (Bruit De Fond), laquelle permet à la fois de gérer les stocks d'échantillons et d'opérer une étude comparative des résultats obtenus pour les différentes collectes effectuées.

Lors de l'analyse génétique du bruit de fond atmosphérique, l'hybridation croisée entre les ADN de référence immobilisés sur le support solide et l'ADN extrait du prélèvement peut se produire. Dans le cadre de ce travail, cette réaction ne pose pas de problème dans la mesure où de tels profils d'hybridation croisée ont été préalablement réalisés pour toutes les espèces présentes sur le support solide. La comparaison du profil d'hybridation de l'ADN extrait à ceux obtenus pour les ADN de référence permettra de détecter des pics de concentration bactérienne, voire d'identifier des espèces.

L'hybridation croisée représente même un avantage puisqu'elle permet de mettre en évidence des bactéries non représentées sur le support solide et dont l'ADN s'hybride de façon croisée avec les ADN bactériens de la membrane.

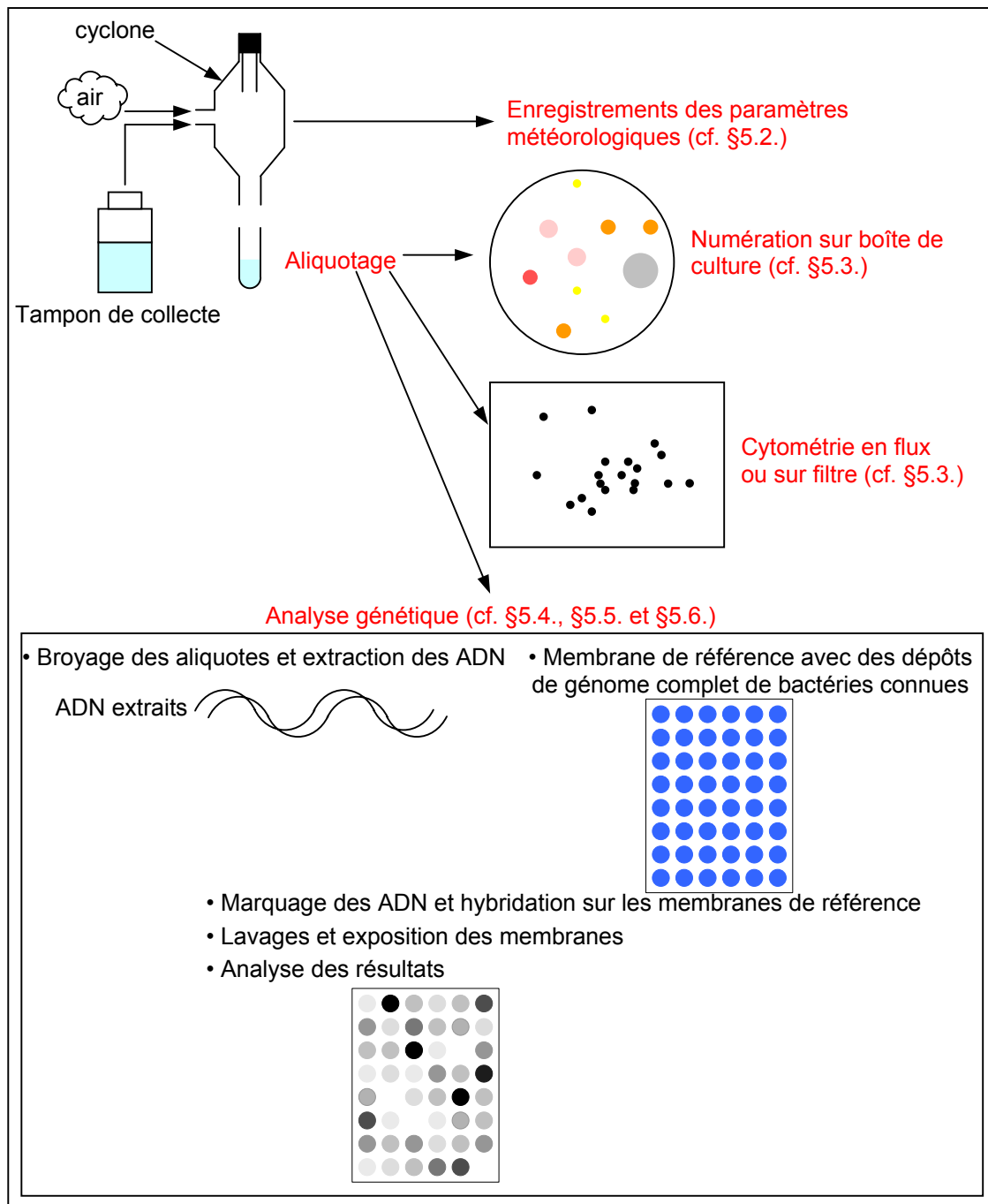


Figure 20 : Schéma illustrant les méthodes utilisées pour l'analyse des échantillons du bruit de fond atmosphérique.

S'agissant des expériences de culture, la numération a été accomplie sur la totalité des échantillons collectés. Pour leur part, les expériences de cytométrie ont été réalisées sur le quart de ces échantillons.

L'analyse génétique des échantillons du bruit de fond atmosphérique nécessite une étude préalable des profils d'hybridation croisée des bactéries présentes sur les membranes d'hybridation. Quatre collectes (4, 11, 18 et 19 ayant eu lieu, respectivement, les 26-27 avril 2000, 15-16 juin, 02-03 août et 09-10 août 2000) ont ensuite été entièrement examinées par la méthode « génome complet » ou « RSGP » (Reverse Genome Sample Probing, cf. §6.3.).

5.4. PRELEVEMENTS ATMOSPHERIQUES

Chaque échantillon de bruit de fond atmosphérique correspond à une durée de prélèvement de 30 minutes. La collecte a lieu une fois par semaine et s'étend sur 24 heures. En conséquence, chaque semaine de prélèvement donne lieu à la production de 48 échantillons. La collecte s'étale sur une année (d'avril 2000 à avril 2001), ce qui représente environ 2 500 échantillons.

Le prélèvement s'effectue à un mètre du sol, sur un site de collecte unique, situé dans l'enceinte du Centre d'Etudes du Bouchet. Le cyclone est protégé des intempéries par un petit abri. A proximité du lieu de collecte, on trouve des terres agricoles, des étangs et des bois (cf. figure 21).

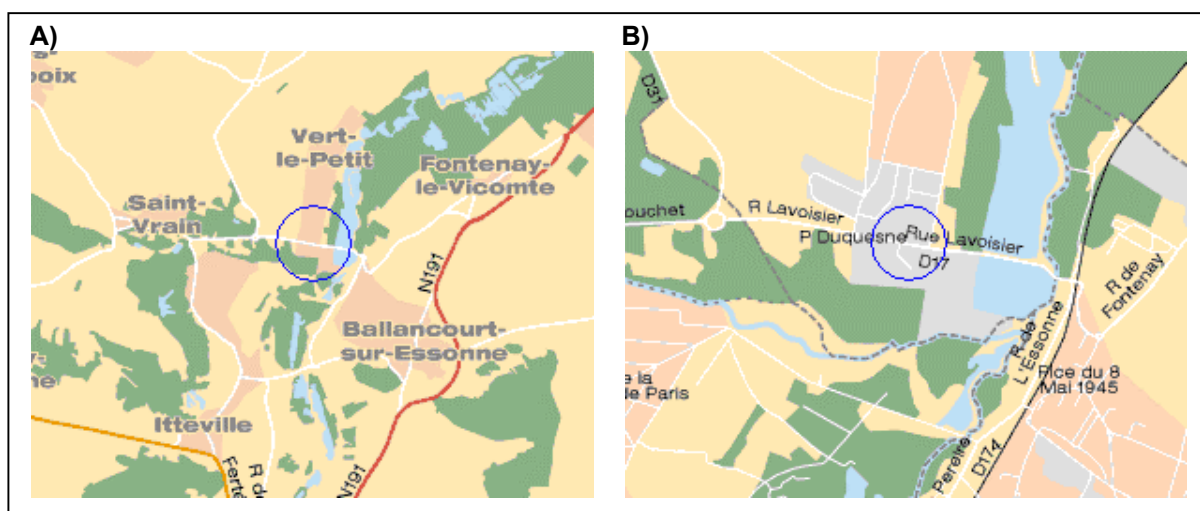


Figure 21 : Situation géographique du lieu de collecte.

A) Vue globale des alentours de Vert-Le-Petit.

B) Détail sur les alentours du Centre d'Etudes du Bouchet.

Le cercle bleu localise sur les deux photographies le Centre d'Etudes du Bouchet, représentant une portion de la partie grise sur l'image B). Les bois sont indiqués en vert, les étangs en bleu, les terres agricoles en jaune et les parties urbaines en rose-orangé.

Le prélèvement est effectué à l'aide d'un appareil de type Cyclone (cf. figure 22, cf. §5.1.5.). Son orientation est telle que sa tête d'entrée est dirigée vers le sud. Le rendement de cet appareil atteint 30 à 50%, dans la gamme de taille allant de 1 à 10 μm (fraction « pulmonaire »). Le cyclone aspire 1 000 litres d'air par minute. Le Tween 20[®] à 0,1% (ICN Biomedical, réf. : 194724) est utilisé comme tampon de collecte des échantillons.

L'air est aspiré par la tête d'entrée du cyclone et les particules aériennes sont plaquées contre la paroi en verre de l'appareil. Une pompe péristaltique emmène le tampon de collecte jusqu'à la tête d'entrée du cyclone, à un débit de 1,2 ml par minute. En d'autres termes, la solution qui est aspirée avec l'air rince la paroi en verre (cf. figure 22).

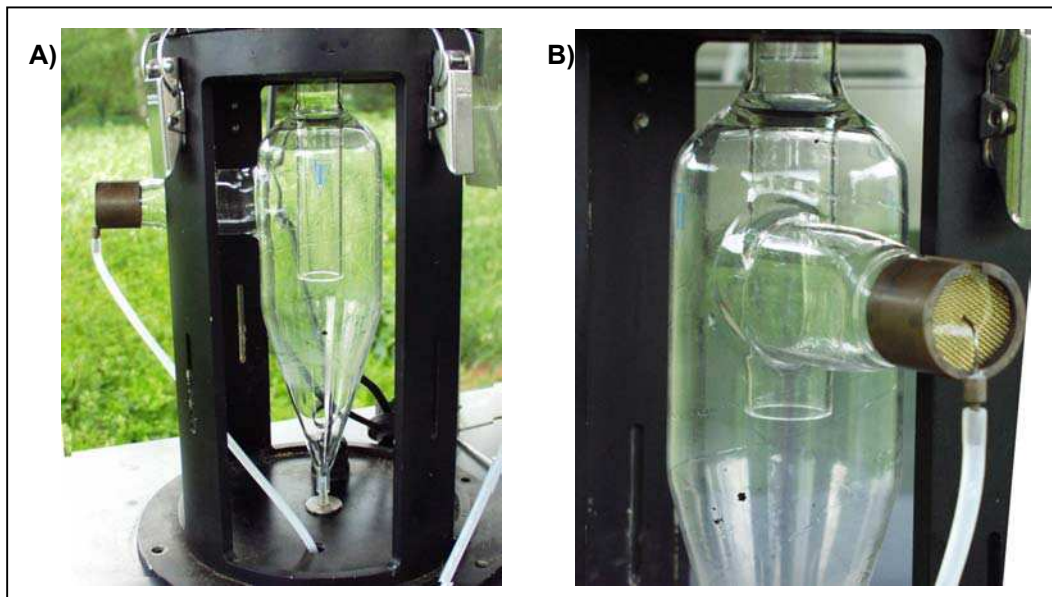


Figure 22 : Photographie du cyclone.

A) Vue globale du cyclone.

B) Détail de la tête d'entrée du cyclone avec le système d'arrivée du tampon de collecte.

Lors de la collecte, différents paramètres météorologiques sont enregistrés :

- la température de l'air,
- la vitesse du vent,
- la direction du vent,
- l'humidité relative,
- la pression atmosphérique,
- l'intensité lumineuse,
- le rayonnement UV B.

Après 24 heures de collecte, on constate une variation du volume de chacun des 48 échantillons. Après avoir pesé le prélèvement, ce volume est ajusté à 35 ml afin d'obtenir des dilutions comparables pour chaque analyse et pour chaque échantillon (Cage *et al.*, 1996).

Les prélèvements sont ensuite aliquotés. Une première fraction, nommée « GLY », est diluée dans du glycérol à une concentration finale de 30% (5 tubes de 1,5 ml). Une seconde fraction, désignée « BRUT », est aliquotée sans ajout ni modification (10 tubes de 1,5 ml). Le reste de l'échantillon est conservé dans le tube d'origine.

La conservation se déroule à -80°C ou à 4°C selon la nature des analyses à effectuer sur l'aliquote.

5.5. CULTURE ET CYTOMETRIE

Les collectes 30, 31 et 32 ont été effectuées, respectivement, les 25-26 novembre, 08-09 décembre et 15-16 décembre 2000.

Elles ont permis de réaliser la numération de tous les échantillons sur les milieux non sélectif et sélectif (cf. §MM.2.1.). Les résultats sont exprimés en cfu par ml d'échantillon.

Différentes analyses cytométriques ont également été accomplies sur un quart des échantillons issus de chaque collecte :

- en flux (EPICS® XL-MCL), la cytométrie dénombre la totalité des particules biologiques présentes dans l'échantillon, qu'elles soient mortes ou vivantes. A l'aide de profils établis au préalable, il est possible de définir une région correspondant spécifiquement aux micro-organismes lors de l'analyse des résultats (cf. §5.2.3. et §MM.2.2.1.) ;
- en phase solide (ChemScan RDI, Chemunex), la cytométrie dénombre les particules vivantes, dont l'intégrité membranaire n'est pas affectée. La détection porte soit sur les micro-organismes, soit, de façon plus spécifique, sur les levures et les moisissures (cf. §5.2.3. et §MM.2.2.2.).

Les résultats sont exprimés en nombre de particules biologiques par ml d'échantillon,

La figure suivante expose les résultats obtenus pour ces trois collectes en ce qui concerne les analyses de numération par culture et par cytométrie (cf. figure 23) :

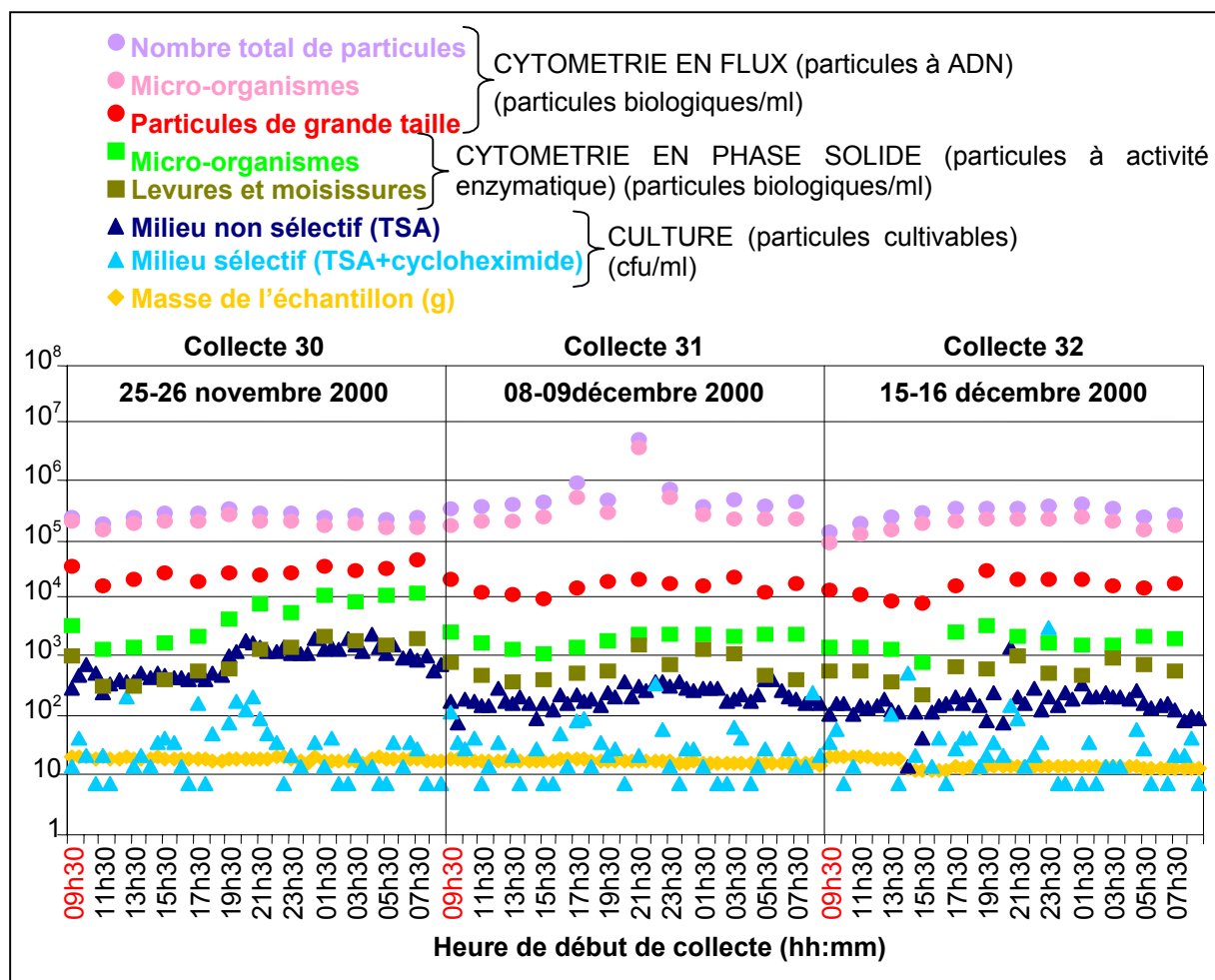


Figure 23 : Résultats obtenus pour les collectes 30, 31 et 32 (25-26 novembre, 08-09 décembre et 15-16 décembre 2000) en ce qui concerne les analyses de numération par culture et par cytométrie.

Au cours des trois collectes, la masse de l'échantillon à la sortie du cyclone ne varie pas de façon considérable. Elle s'élève en moyenne à 18 g. Or, sur le Cyclone, le débit du tampon de collecte a été fixé à 1,2 ml/min. Un prélèvement atmosphérique représentant 30 minutes de collecte devrait donc contenir environ 36 g d'échantillon. Il apparaît donc une perte d'environ 50% du tampon de collecte. L'origine de ce phénomène réside dans le système de collecte lui-même. En effet, la solution étant aspirée en même temps que l'air (cf. figure 22), elle subit une évaporation. Cependant, un temps très humide permet de limiter la perte à un niveau inférieur à 50%. Afin de remédier à ces variations, nous avons procédé à une harmonisation des masses d'échantillons avant de les aliquoter (cf. §5.4.)

Les résultats de numération par culture révèlent des différences selon que le milieu est ou non sélectif. En ce qui concerne les trois collectes étudiées, le nombre de colonies est plus faible (environ 10³ cfu/ml sur le milieu non sélectif) que celui relevé à l'issue de la cytométrie, notamment la cytométrie en flux. De plus, le nombre de colonies sur le milieu sélectif ne varie que de 0 à 500 cfu/ml.

La collecte 30 se caractérise par une grande quantité de micro-organismes cultivables sur le milieu non sélectif, entre 20h00 le 25 novembre et 08h00 le lendemain. A l'inverse, le milieu sélectif n'autorise la croissance que d'un faible nombre de micro-organismes, ces derniers étant plus probablement des bactéries dans la mesure où le milieu sélectif contient un antifongique (cf. §MM.2.1.2.).

La cytométrie en flux, capable de détecter les micro-organismes, cultivables ou non, en détermine un plus grand nombre (de 10^5 à 10^6 particules biologiques/ml). Le nombre de ces particules dans la région des micro-organismes est comparable au nombre total de particules, mesuré par l'appareil. Les particules dites de grandes tailles, pouvant correspondre aux pollens, représentent environ 10% du nombre total de particules biologiques.

La cytométrie en phase solide présente des valeurs inférieures à celles observées par la cytométrie en flux et proches de celles observées en culture. En effet, une fraction des particules biologiques peut être abîmée par la dessiccation lors de la filtration de l'échantillon (cf. §5.2.3. et §MM.2.2.2.) (Buttner *et al.*, 1997, Cage *et al.*, 1996).

Les deux analyses de cytométrie en phase solide permettent d'estimer la proportion de levures et de moisissures par rapport au nombre total de micro-organismes vivants. Les résultats montrent qu'environ 80-90% des particules dénombrées sont des levures et des moisissures.

Enfin, la comparaison de ces trois modes de numération confirme que la culture permet le dénombrement d'une fraction limitée de micro-organismes. Si l'on admet que la cytométrie en flux permet de recenser toutes les particules biologiques présentes dans l'échantillon (environ 10^5 particules biologiques/ml), alors la fraction cultivable (environ 10^3 cfu/ml) et celle dénombrée par cytométrie en phase solide (10^3 particules biologiques/ml) ne représentent que 1% de la fraction totale des micro-organismes présents dans l'air. Ces résultats confortent les études précédentes dans lesquelles la fraction cultivable représentait effectivement moins de 1% de la totalité des micro-organismes présents dans l'échantillon et dénombrés par microscopie (Amann *et al.*, 1995). Quant au résultat concernant la cytométrie en phase solide, il pourrait s'expliquer par la perte de viabilité d'un nombre important de micro-organismes lors de la filtration de l'échantillon (dessiccation des particules biologiques).

Les résultats de culture et de cytométrie obtenues pour toutes les collectes réalisées d'avril 2000 à avril 2001 sont présentés dans le paragraphe 5.10.

5.6. HYBRIDATION CROISEE

L'ADN à analyser dans les prélèvements atmosphériques est un mélange complexe d'acides nucléiques provenant de diverses particules biologiques, notamment des pollens, des spores fongiques, des bactéries et des virus.

En 1998, Turnbull *et al.* ont étudié le contenu biologique du bruit de fond atmosphérique en Grande-Bretagne et ont, en particulier, analysé certains ADNr 16S (cf. §2.4.2.). Ils ont mis en évidence qu'un tiers du bruit de fond atmosphérique était composé de *Bacillus*. Le deuxième tiers présentait des similitudes significatives avec des bactéries connues. En revanche, les séquences produites par le dernier tiers n'ont pas pu être identifiées dans la mesure où les auteurs ne disposaient pas des données nécessaires (absence d'homologie des séquences dans les banques de données).

Ce paragraphe vise à établir le profil d'hybridation croisée propre à chaque espèce bactérienne présente sur la membrane. Ce profil permet, d'une part, de valider la méthode choisie et, d'autre part, d'attribuer une signature spécifique à chaque espèce bactérienne.

La figure 24 présente les différences de profils selon la sonde d'ADN bactérien utilisée. L'annexe 1 présente un tableau récapitulant les résultats de quantification de chacune des membranes. La position occupée par une membrane correspond à celle occupée par l'ADN immobilisé sur celle-ci. De plus, cet ADN est complémentaire à la sonde, citée sous la membrane.

Aucun signal n'apparaît sur le témoin négatif (soude, en bas à droite, cf. figure 24). Les solutions utilisées lors de la préparation des membranes ne sont donc pas contaminées par de l'ADN.

Les espèces bactériennes présentes sur la membrane et appartenant au genre *Bacillus* sont notées en rouge (cf. figure 24). Elles représentent environ un tiers des espèces présentes sur la membrane. Parmi ce genre, certaines espèces présentent de fortes propriétés d'hybridation croisée (cf. figure 25).

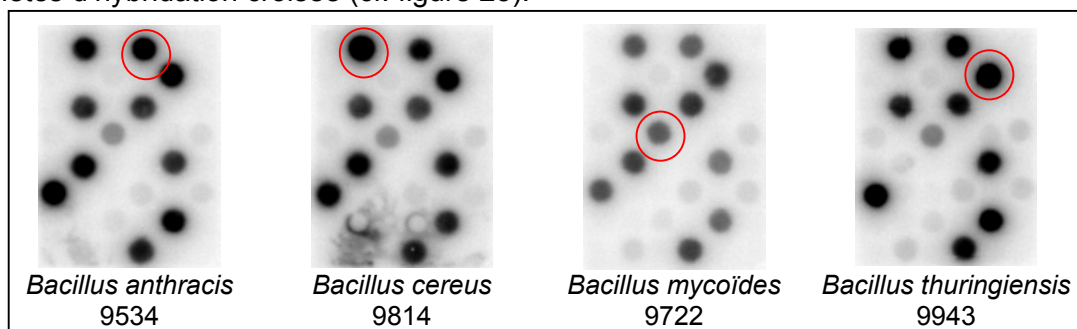


Figure 25 : Profils d'hybridation croisée de certaines espèces appartenant au genre *Bacillus*.

L'espèce citée sous la membrane correspond à la sonde employée. Les cercles rouges indiquent le dépôt sur la membrane contenant l'ADN de la même espèce.

Les résultats montrent une forte hybridation croisée, en particulier entre *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus mycoïdes*.

Ces quatre espèces sont phylogénétiquement très proches (Forsyth *et al.*, 1998). En 1991, Ash *et al.* ont publié un article portant sur la comparaison des séquences d'ADNr 16S de ces quatre espèces (cf. §4.1.1.). Cette région du génome se caractérise par une homologie supérieure à 99%. De plus, l'ADN génomique de *B. anthracis* présente environ 80% d'homologie avec les ADN de *B. cereus* et de *B. mycoïdes* (Harrell *et al.*, 1995, cf. §4.1.2.).

Quasiment toutes les expériences d'hybridation croisée utilisant la méthode d'analyse dite « génome complet » mettent en évidence que l'intensité du signal, mesuré sur le dépôt correspondant à la sonde d'ADN employée, est supérieure aux intensités de signal de tous les autres dépôts.

Par contre, chaque espèce bactérienne, en dépit de leur probable proximité phylogénétique, exhibe un profil spécifique d'hybridation croisée.

Certains genres bactériens s'hybrident à d'autres. Ce phénomène est illustré dans la figure 26 :

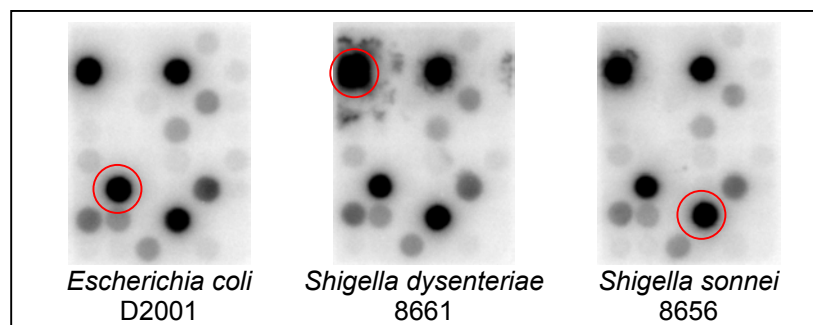


Figure 26 : Profils d'hybridation croisée d'*Escherichia coli* et des espèces appartenant au genre *Shigella*.

L'espèce citée sous la membrane correspond à la sonde employée. Les cercles rouges indiquent le dépôt sur la membrane contenant l'ADN de la même espèce.

Une partie de la sonde d'*Escherichia coli* s'hybride aux ADN de *Shigella* présents sur les membranes, et inversement. Cependant, à l'image des résultats obtenus pour les *Bacillus*, un profil spécifique se dessine pour chaque espèce bactérienne. En effet, l'intensité du signal, fourni par le dépôt d'ADN d'*Escherichia coli* s'hybridant à sa sonde complémentaire est supérieure aux intensités générées par la même sonde sur les dépôts des ADN de *Shigella*. Ce constat se vérifie également en ce qui concerne chacune des deux sondes d'ADN de *Shigella*.

Ce phénomène s'explique également par la forte proximité génétique de ces deux genres bactériens (Pupo *et al.*, 2000).

Enfin, *Bacillus stearothermophilus* a été sélectionné afin de contrôler les différentes étapes du protocole de traitement de l'échantillon issu de prélèvements atmosphériques (cf. §MM.2.3.6.). S'agissant de l'analyse génétique, une quantité déterminée de spores de cette bactérie est ajoutée, avec de l'eau et à chacun des aliquotes du prélèvement atmosphérique. Il est donc nécessaire que *B. stearothermophilus* ne s'hybride pas de façon croisée avec les autres bactéries, et en particulier avec les autres *Bacillus*, sous peine de ne pouvoir détecter ces derniers dans l'air.

Cette espèce a été choisie pour deux raisons :

- d'une part, le signal n'est présent sur son profil d'hybridation croisée que sur le dépôt correspondant à son ADN. Il n'existe pas de forte hybridation croisée avec les autres *Bacillus*, ces derniers étant suffisamment éloignés d'un point de vue phylogénétique. Cet éloignement se vérifie s'agissant, notamment, des quatre espèces d'intérêt que sont *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* et *B. mycoïdes*. Par conséquent, *B. stearothermophilus* ne compromet pas la détection de *B. anthracis* ;
- d'autre part, *B. stearothermophilus* est une bactérie capable de sporuler. En d'autres termes, utilisé comme témoin positif pour le contrôle du rendement des ADN extraits à partir des prélèvements atmosphériques, il présente l'avantage de reproduire des difficultés similaires à celles rencontrées lors de la lyse de spores, en particulier celles de *B. anthracis* et de *B. subtilis*.

5.7. TEMOINS REALISES POUR L'ANALYSE GENETIQUE

Une série de témoins est réalisée dans le but de contrôler les différentes manipulations (contrôle d'éventuelles contaminations humaines, rendement de récupération du matériel biologique après traitement de l'échantillon du bruit de fond atmosphérique).

Sur les membranes d'hybridation, un dépôt, exclusivement composé de bleu de bromophénol et de soude, sert de contrôle négatif. Il permet de vérifier qu'aucun ADN de l'échantillon du bruit de fond atmosphérique ne s'hybride de façon non spécifique à la membrane et qu'aucune solution utilisée (NaOH, TE, bleu de bromophénol) pour la fabrication des membranes ne soit contaminée par de l'ADN. Par conséquent, il fournit le bruit de fond spécifique à la membrane.

Lors du broyage des échantillons du bruit de fond atmosphérique, on procède à l'ajout des spores de *B. stearothermophilus*. Ce contrôle positif permet de vérifier que lors des différentes étapes du traitement de l'échantillon (broyage, extraction, précipitation, marquage, hybridation), le matériel génétique est effectivement récupéré. Ainsi, une membrane sans signal sur le dépôt *B. stearothermophilus* ne pourra-t-elle pas être exploitée en raison de la perte de matériel génétique causée par le traitement de l'échantillon.

Cinq membranes témoins sont également réalisées :

- la première (T1) est hybridée avec l'extrait issu du prébroyage et du broyage de 10 µg d'ARNt dilué dans de l'eau. Cette membrane permet de contrôler la contribution du signal fourni par l'ARNt ;
- la deuxième (T2) est hybridée avec de l'eau qui n'a subi que le marquage. Ce témoin contrôle l'absence de contamination par un ADN quelconque, la stérilité de l'eau utilisée lors du traitement de l'échantillon ;
- la troisième (T3) est hybridée avec des spores de *B. stearothermophilus* ayant seulement été soumises au marquage. Ce témoin permet de contrôler la présence ou non d'ADN de *B. stearothermophilus* dans la suspension commerciale. Contrairement au cinquième témoin, si de l'ADN est présent en plus des spores, il ne sera pas perdu lors du traitement de l'échantillon, en particulier lors des étapes d'extraction et de précipitation ;
- la quatrième (T4) est hybridée avec l'extrait issu d'un échantillon dont l'ARNt a été prébroyé et dont les spores de *B. stearothermophilus*, ajoutées juste après le prébroyage, n'ont pas subi l'étape de broyage. Ce témoin permet de contrôler la contribution des ADN de *B. stearothermophilus* qui seraient éventuellement présents dans la suspension commerciale ;
- la cinquième (T5) est hybridée à l'extrait issu du prébroyage de l'ARNt et du broyage de spores de *B. stearothermophilus*. Ce témoin est indispensable pour comparer les différentes membranes. Il permet de vérifier la contribution de *B. stearothermophilus* au signal des échantillons du bruit de fond atmosphérique.

Lors de l'analyse génétique des 4 collectes (4, 11, 18 et 19 ayant, respectivement, eu lieu les 26-27 avril 2000, 15-16 juin 2000, 02-03 août 2000 et 09-10 août 2000), les cinq membranes témoins, représentées dans la figure suivante (cf. figure 27), ont présenté les profils suivants.

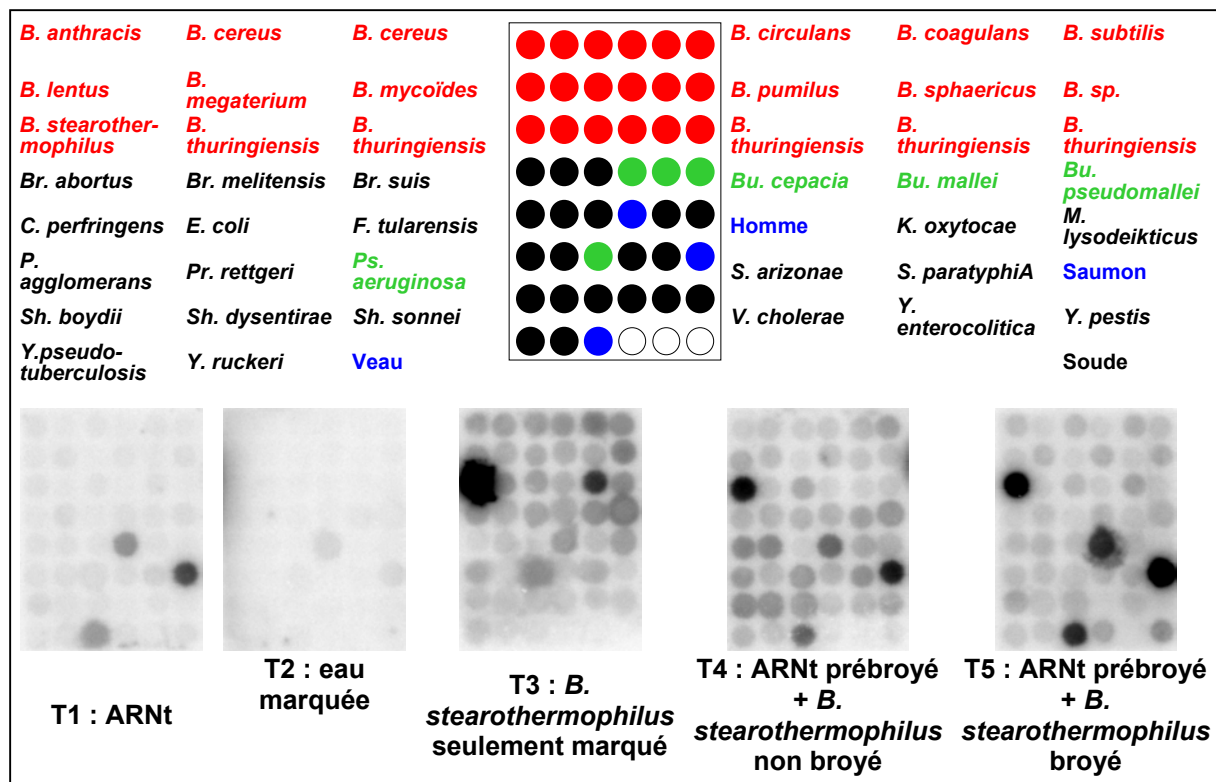


Figure 27 : Profils des témoins lors de l'analyse des collectes 4, 11, 18 et 19.

Le témoin T1 fournit le profil d'hybridation croisée de l'ARNt de levure de boulanger sur les différents ADN bactériens présents sur la membrane (cf. figure 27). Les trois principaux signaux sont observés sur les ADN d'homme, de saumon et de veau.

Le témoin T2 consiste à marquer l'eau, qui servira à la préparation de toutes les solutions lors du traitement des échantillons pour l'analyse génétique. Il permet de vérifier que celle-ci n'est contaminée par aucun ADN.

Les témoins T3, T4 et T5 permettent d'évaluer le comportement de la solution commerciale de spores de *B. stearothermophilus*.

Le témoin T3, comprenant un simple marquage de 75 000 spores de cette solution, met en évidence un fort signal correspondant à la présence d'ADN de cette bactérie en l'absence de toute lyse cellulaire.

Le témoin T4 a pour objectif de vérifier le comportement de la solution en l'absence de broyage. Les spores, incubées en présence des billes, subissent l'étape de lyse (SDS, protéinase K). L'image de la figure 27 montre que le signal correspondant à l'ADN de *Bacillus stearothermophilus* est plus faible que celui issu du témoin T3.

Cette observation peut résulter :

- soit de la perte d'ADN lors de l'étape d'extraction,
- soit de l'interaction non spécifique, pendant quelques minutes, entre les ADN libres et les billes de verre,
- soit de la combinaison de ces deux phénomènes.

Il faut également noter que la lyse, réalisée en présence de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) et de protéinase K, peut contribuer au signal, dans la mesure où elle porte sur les cellules végétatives, susceptibles d'être présentes dans la solution.

Le témoin T5 apporte deux informations utiles aux expériences :

- *B. stearothermophilus* a été ajouté lors de l'étape de broyage à tous les échantillons de l'environnement afin de pouvoir comparer les intensités observées sur les différentes membranes (cf. §MM.2.3.6.). Le témoin T5 permet donc d'évaluer, en déduisant le signal présent sur sa membrane de celui mesuré sur les membranes des prélèvements, la contribution du bruit de fond atmosphérique au signal ;
- la comparaison des membranes T4 et T5 permet d'apprécier l'effet du broyage sur la solution commerciale des spores. En effet, en ce qui concerne *B. stearothermophilus*, l'intensité du signal est légèrement supérieure sur la membrane T5. Au vu des résultats, cette solution, susceptible de renfermer des ADN libres, peut également contenir, en plus des spores, des cellules végétatives de *B. stearothermophilus* dont les ADN participent également aux différents signaux observés.

5.8. ANALYSE GENETIQUE

Les quatre collectes, 4, 11, 18 et 19 ont fait l'objet d'une étude par analyse génétique.

Les résultats de la numération par culture et par cytométrie des échantillons issus de ces collectes sont commentés ci-après avec ceux portant sur l'analyse génétique.

Pour l'analyse génétique, tous les ADN présents dans l'échantillon, dans la mesure où ils ne sont pas trop dégradés par le broyage, participent au signal final, ce dernier étant ensuite mesuré.

5.8.1. COLLECTE 4 (26-27 AVRIL 2000)

Le graphique suivant (cf. figure 28) présente les numérations par culture et par cytométrie, effectuées sur les échantillons de la collecte 4. Les résultats d'analyse génétique sont exposés dans la figure 29.

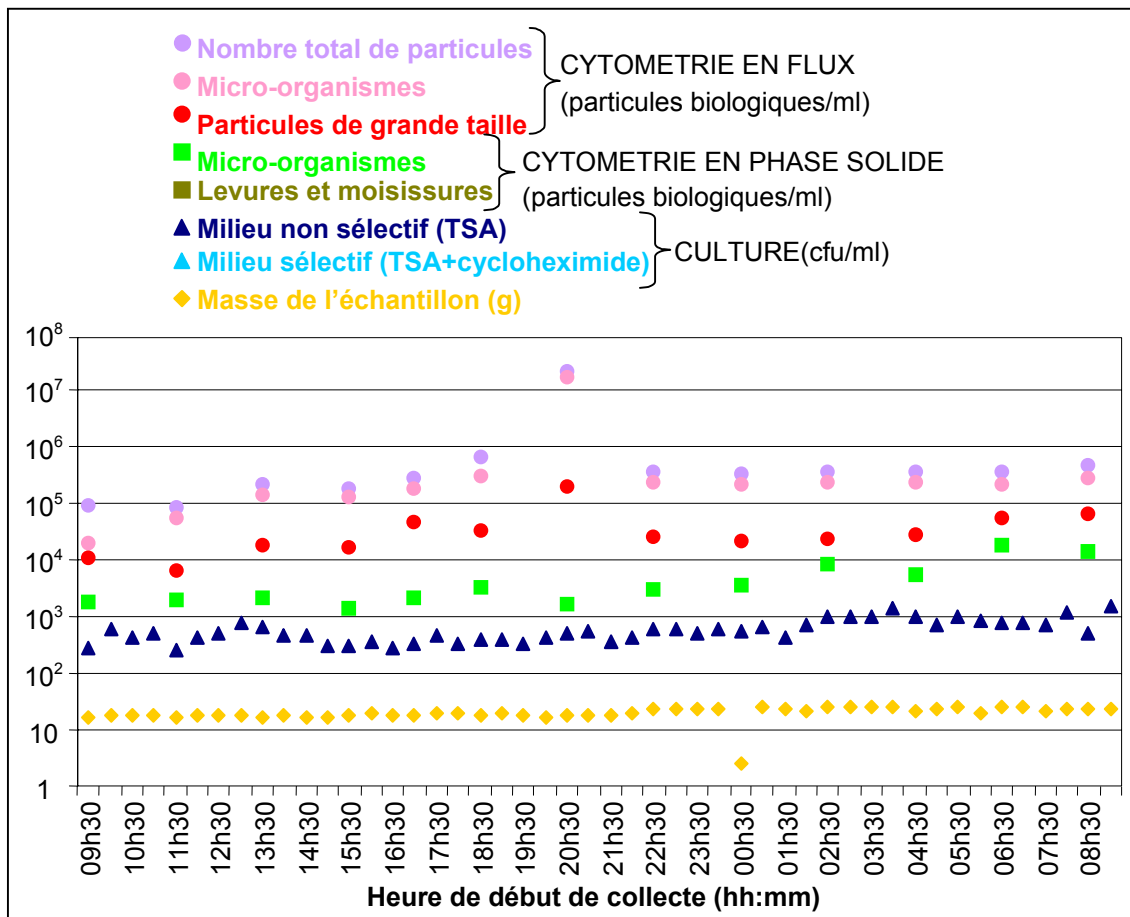


Figure 28 : Résultats obtenus pour la collecte 4 (26-27 avril 2000) à la suite des analyses de numération par culture et par cytométrie.

La collecte 4, du 26-27 avril 2000, ne présente aucun pic microbien particulier s'agissant tant de la numération par culture ou par cytométrie en phase solide (ChemScan RDI), que des analyses génétiques. Les profils génétiques observés pour cette collecte sont comparables à celui du témoin T5 dans lequel la sonde est constituée de *B. stearothermophilus* broyé en présence d'eau et d'ARNt prébroyé.

Cependant, la cytométrie en flux permet de détecter à 20h30 un pic de micro-organismes. Ces derniers ne sont pas cultivables et ne semblent pas être vivants. Les analyses génétiques (cf. figure 29), entreprises pour les seuls besoins de la détection bactérienne, ne donnent aucun signal particulier pour cette demi-heure de collecte.

On en déduit que :

- soit l'échantillon ne contient pas de bactéries,
- soit il comprend des bactéries et ces dernières sont peu nombreuses,
- soit il comporte des bactéries appartenant à des espèces ne figurant pas sur la membrane et qui échappent consécutivement à la détection.

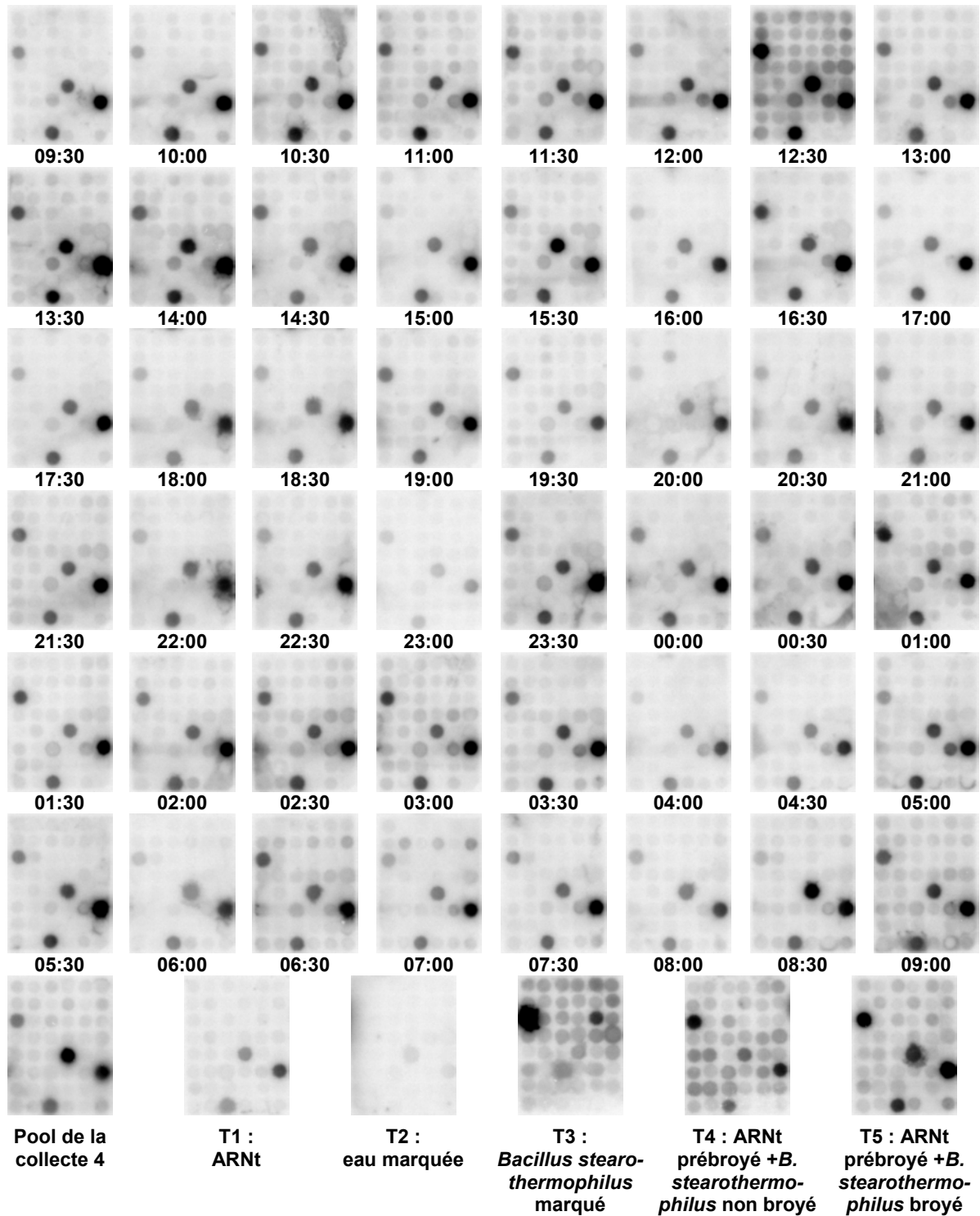
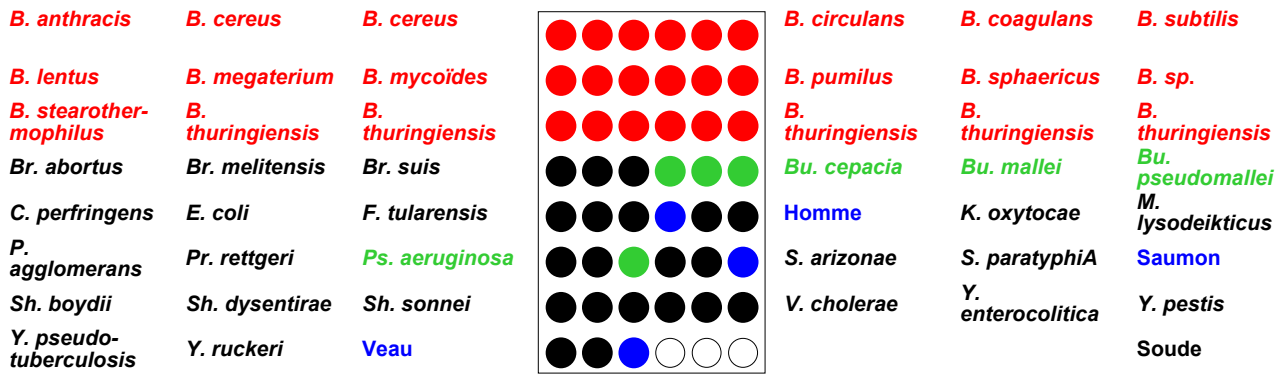


Figure 29 : Résultats des analyses génétiques réalisées sur la collecte 4 (26-27 avril 2000).
A) Disposition des genres bactériens sur le support solide.
B) L'horaire du début de collecte est indiqué sous la membrane correspondant à l'échantillon.

Pour leur part, les mesures de cytométrie en phase solide, spécifiques à la détection des levures et des moisissures (cf. §MM.2.2.2.), sont de nature à procurer une première estimation de la composition de cet échantillon, notamment leur proportion par rapport au nombre total de micro-organismes.

5.8.2. COLLECTE 11 (15-16 JUIN 2000)

Les résultats des analyses génétiques de la collecte 11 sont exposés dans la figure 31. Le graphique situé ci-dessous reproduit les mesures relatives à la numération des micro-organismes (cf. figure 30).

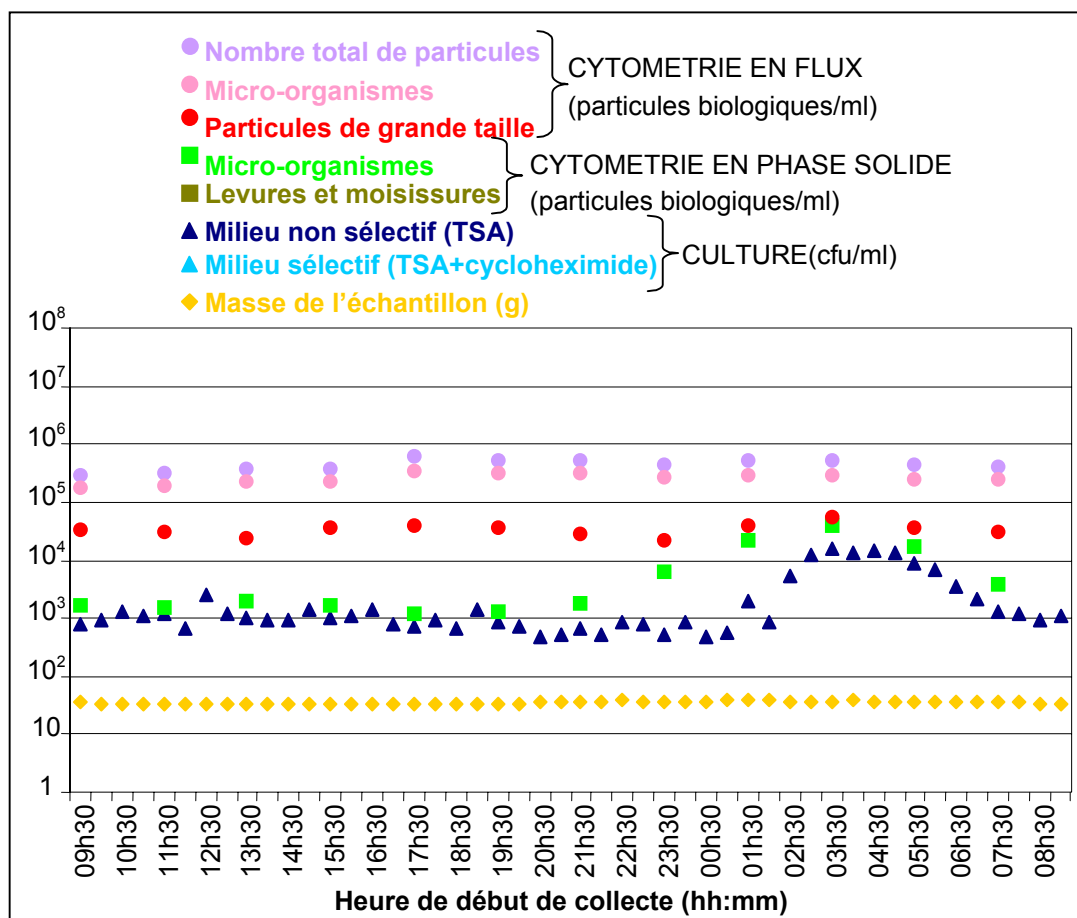


Figure 30 : Résultats obtenus pour la collecte 11 (15-16 juin 2000) à la suite des analyses de numération par culture et par cytométrie.

La numération des échantillons de cette collecte fait apparaître un niveau élevé de micro-organismes cultivables le 16 juin 2000, entre 02h30 et 06h30. Ces micro-organismes sont également détectés par cytométrie en phase solide. Les analyses génétiques ne révèlent aucune contribution particulière du bruit de fond atmosphérique pendant cette période.

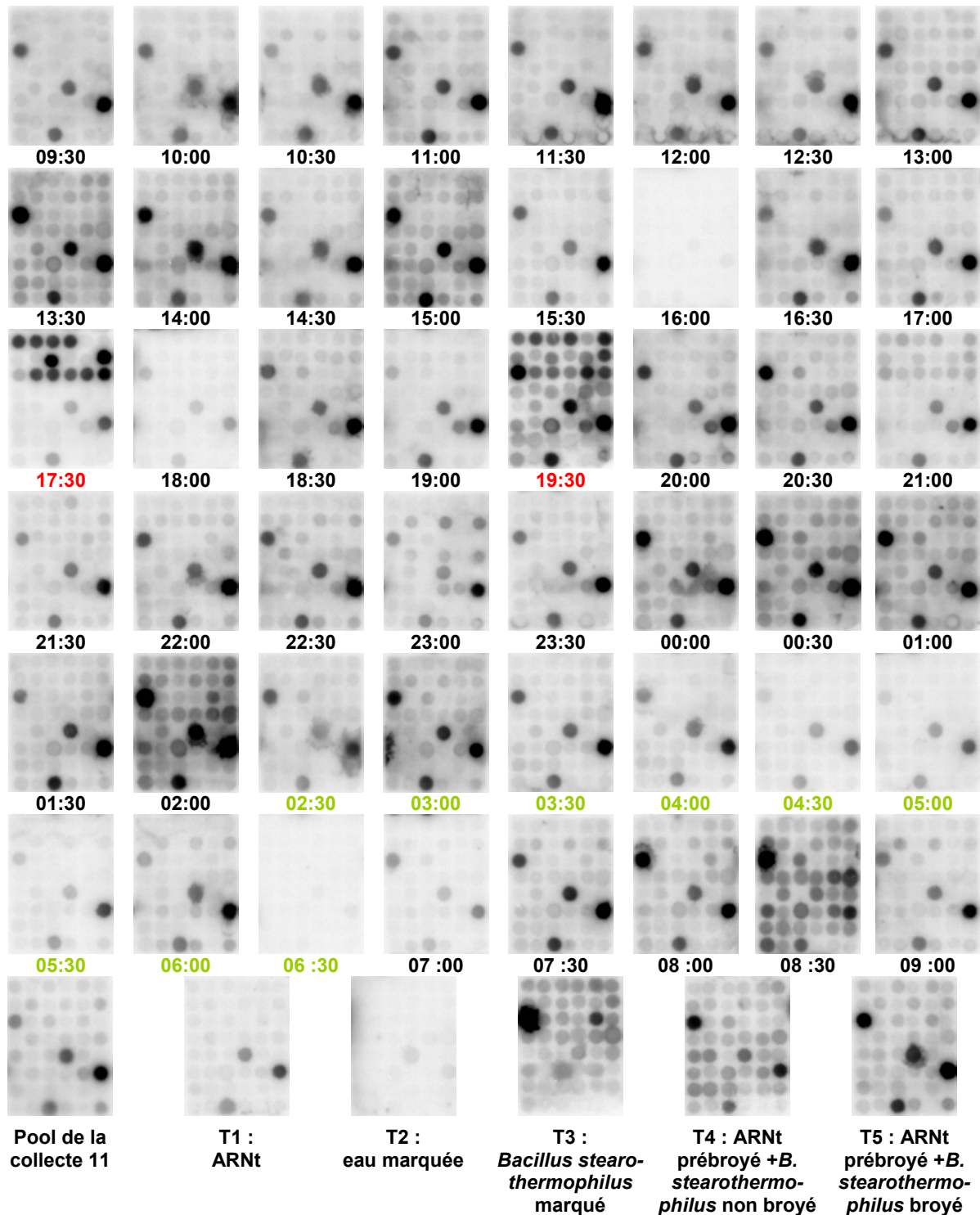
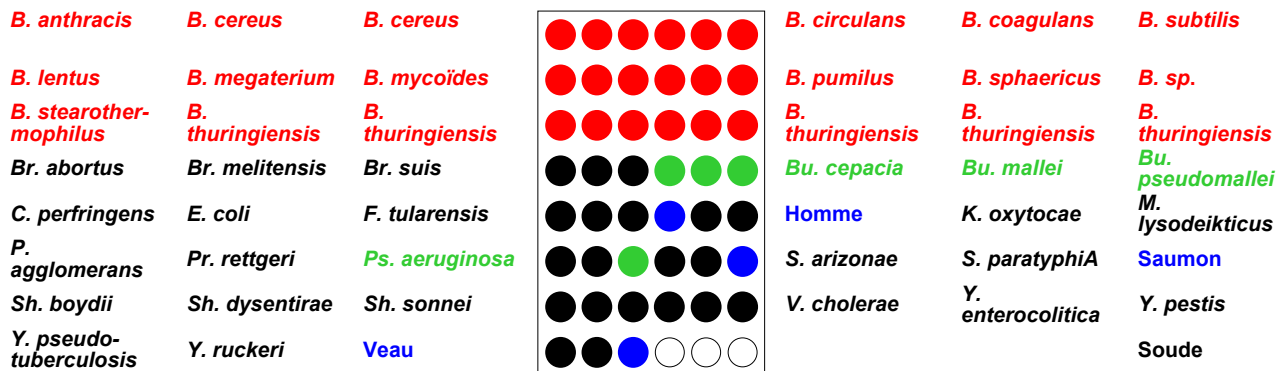


Figure 31 : Résultats des analyses génétiques réalisées sur la collecte 11 (15-16 juin 2000)

A) Disposition des genres bactériens sur le support solide.

B) L'heure du début de collecte est indiquée sous la membrane correspondant à l'échantillon.

Les horaires indiqués en vert mettent en évidence un pic de micro-organismes observé par culture et/ou cytométrie, tandis que ceux indiqués en rouge signalent un pic de bactéries vu par analyse génétique.

Ainsi qu'il fut exposé au sujet de la collecte 4 (cf. §5.8.1.), ces observations s'expliquent :

- soit par l'absence de bactéries dans ces prélèvements,
- soit par une faible quantité de bactéries,
- soit par le fait que ces espèces ne figurent pas sur la membrane.

Par contre, l'analyse génétique de la collecte 11 (cf. figure 31) met en évidence deux pics bactériens, à 17h30 et à 19h30. Pour ces horaires, les intensités des signaux, mesurés pour chaque espèce, sont représentés dans les graphiques de la figure 32.

En ce qui concerne le pic de 17h30, les dépôts d'ADN du genre *Bacillus*, et notamment des espèces *Bacillus spp* (9901) et *B. mycoïdes* (9722) montrent les intensités les plus élevées sur la membrane. Considérant le nombre important de représentants du genre *Bacillus* déposés sur la membrane (environ un tiers des dépôts), il est possible d'affirmer que la bactérie détectée appartient très probablement à ce genre. L'espèce s'hybride fortement avec *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoïdes* et les différents *B. thuringiensis* présents sur la membrane. Par conséquent, cette bactérie est susceptible de faire partie du « groupe *B. cereus* », qui regroupe ces quatre espèces.

Le pic de 19h30 met également en évidence des intensités plus fortes sur les dépôts d'ADN du genre *Bacillus*, et notamment des dépôts *B. thuringiensis* et *B. subtilis*. Or, le profil d'hybridation croisée de *B. subtilis* ne met en évidence qu'une seule tache correspondant au dépôt de son ADN. Ceci suggère la présence dans l'échantillon de 19h30 d'un minimum de deux espèces bactériennes dont l'une, au moins, appartient au genre *Bacillus*, d'après le raisonnement suivi pour l'échantillon de 17h30.

La détection de l'espèce bactérienne dans l'échantillon de 17h30, correspondant probablement à un *B. thuringiensis*, peut s'expliquer par les phénomènes météorologiques. En effet, la bactérie peut être resuspendue dans l'air par le vent et évoluer en fonction des phénomènes météorologiques. Elle pourrait alors trouver son origine soit dans son épandage en tant qu'insecticide, soit dans le sol, un de ses habitats naturels (cf. §2.5.1.).

5.8.3. COLLECTES 18 ET 19 (02-03 ET 09-10 AOUT 2000)

Les graphiques suivants (cf. figures 33 et 34) présentent les numérations par culture et par cytométrie, effectuées sur les échantillons des collectes 18 et 19. Quant aux résultats d'analyse génétique, ils sont exposés dans les figures 35 et 36.

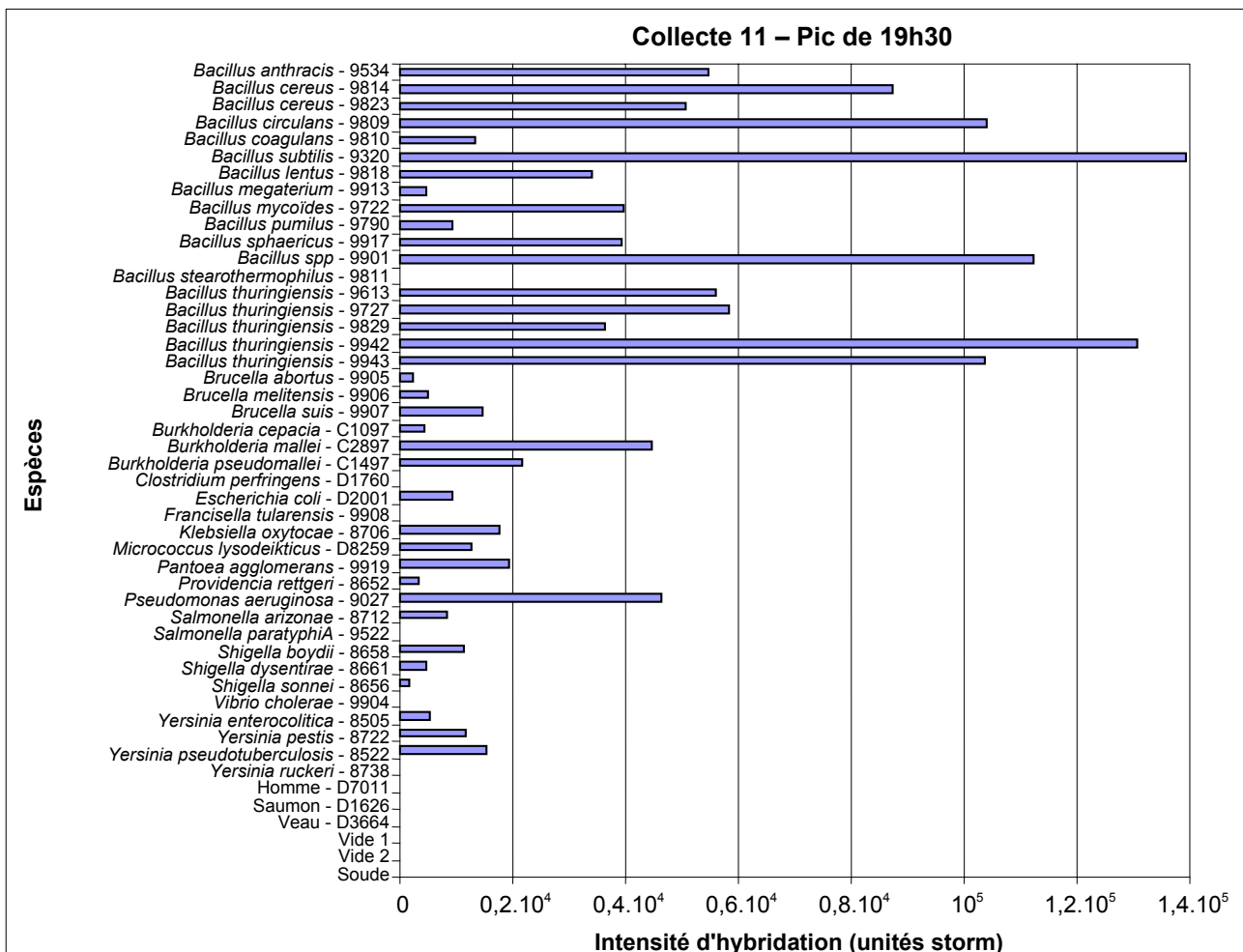
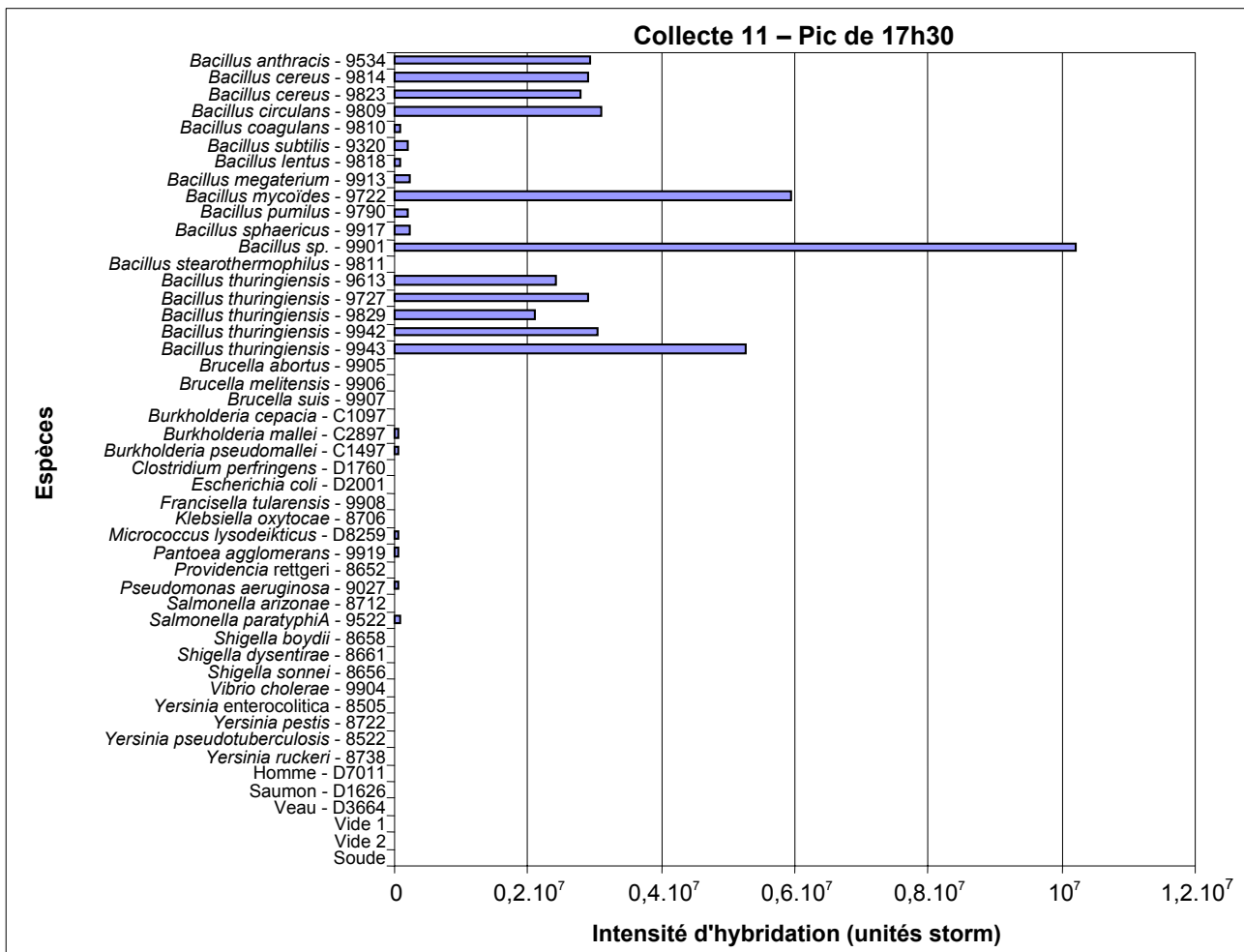


Figure 32 : Résultats de quantification des membranes correspondant aux deux pics de *Bacillus* (pics de 17h30 et de 19h30) lors de la collecte 11

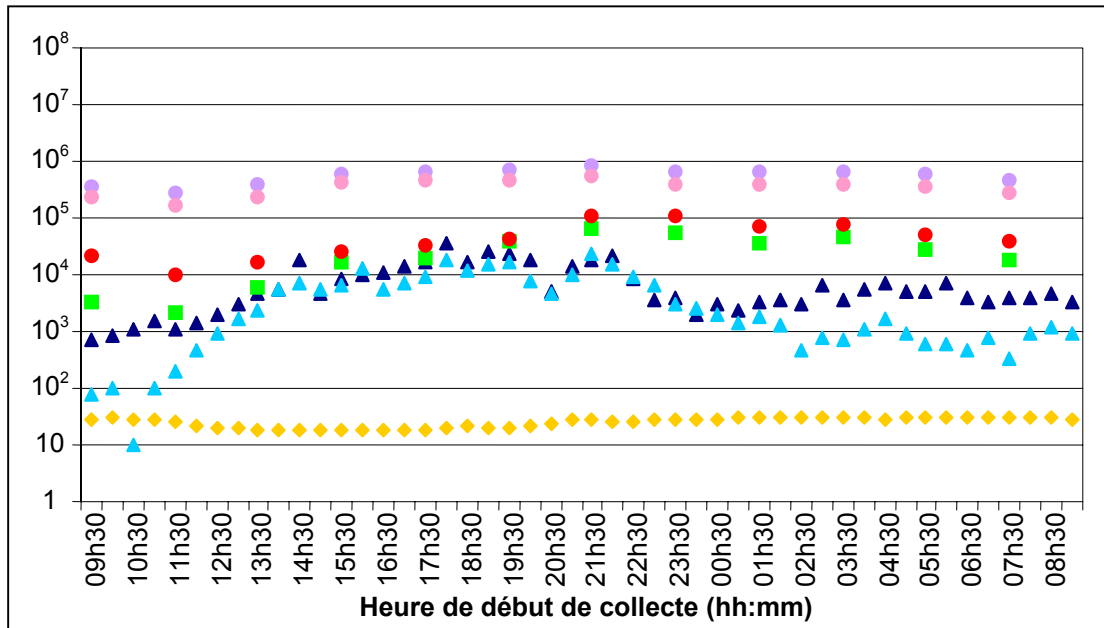
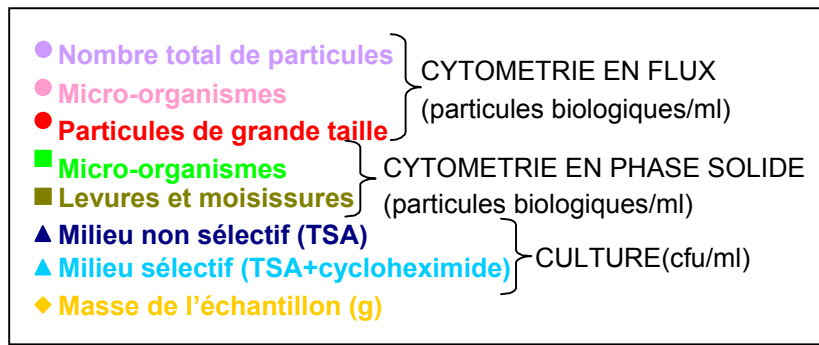


Figure 33 : Résultats obtenus pour la collecte 18 (02-03 août 2000) à la suite des analyses de numération par culture et par cytométrie.

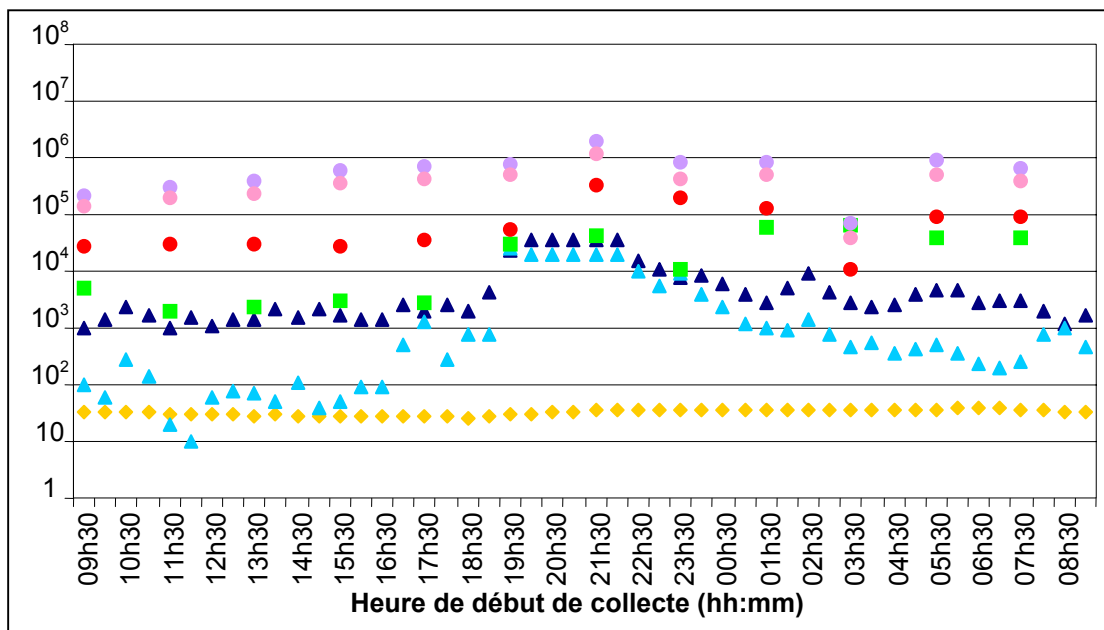


Figure 34 : Résultats obtenus pour la collecte 19 (09-10 août 2000) à la suite des analyses de numération par culture et par cytométrie.

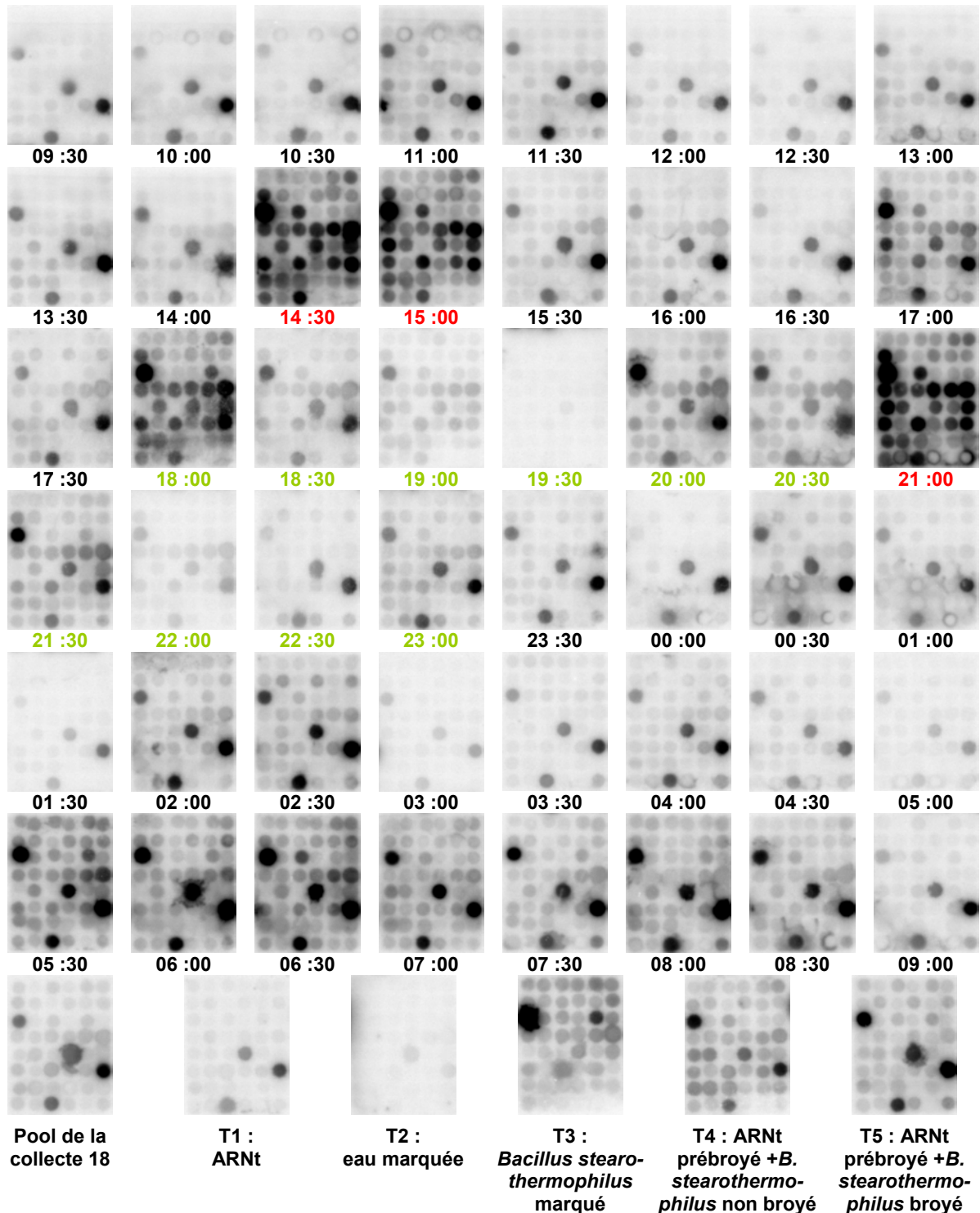
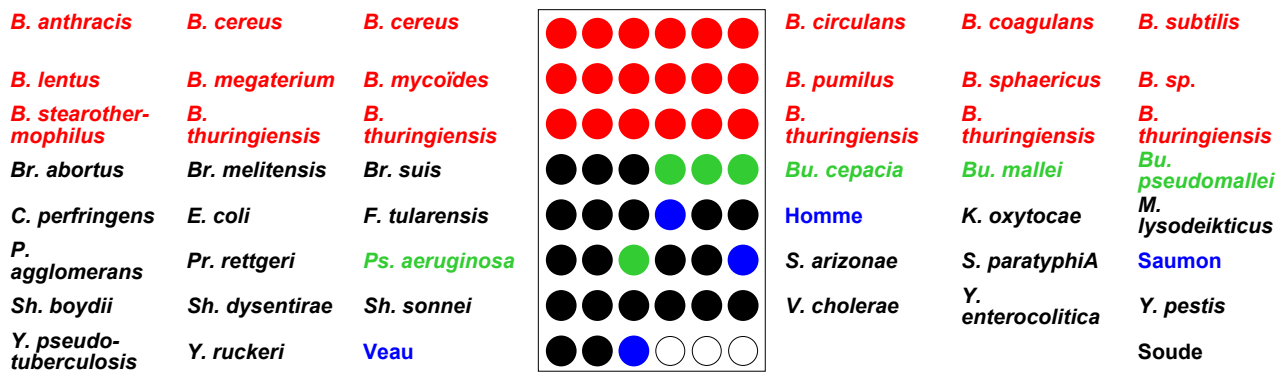


Figure 35 : Résultats des analyses génétiques réalisées sur la collecte 18 (02-03 août 2000).

A) Disposition des genres bactériens sur le support solide.

B) L'heure du début de collecte est indiquée sous la membrane correspondant à l'échantillon.

Les horaires indiqués en vert mettent en évidence un pic de micro-organismes observé par culture et/ou cytométrie, tandis que ceux indiqués en rouge signalent un pic de bactéries vu par analyse génétique.

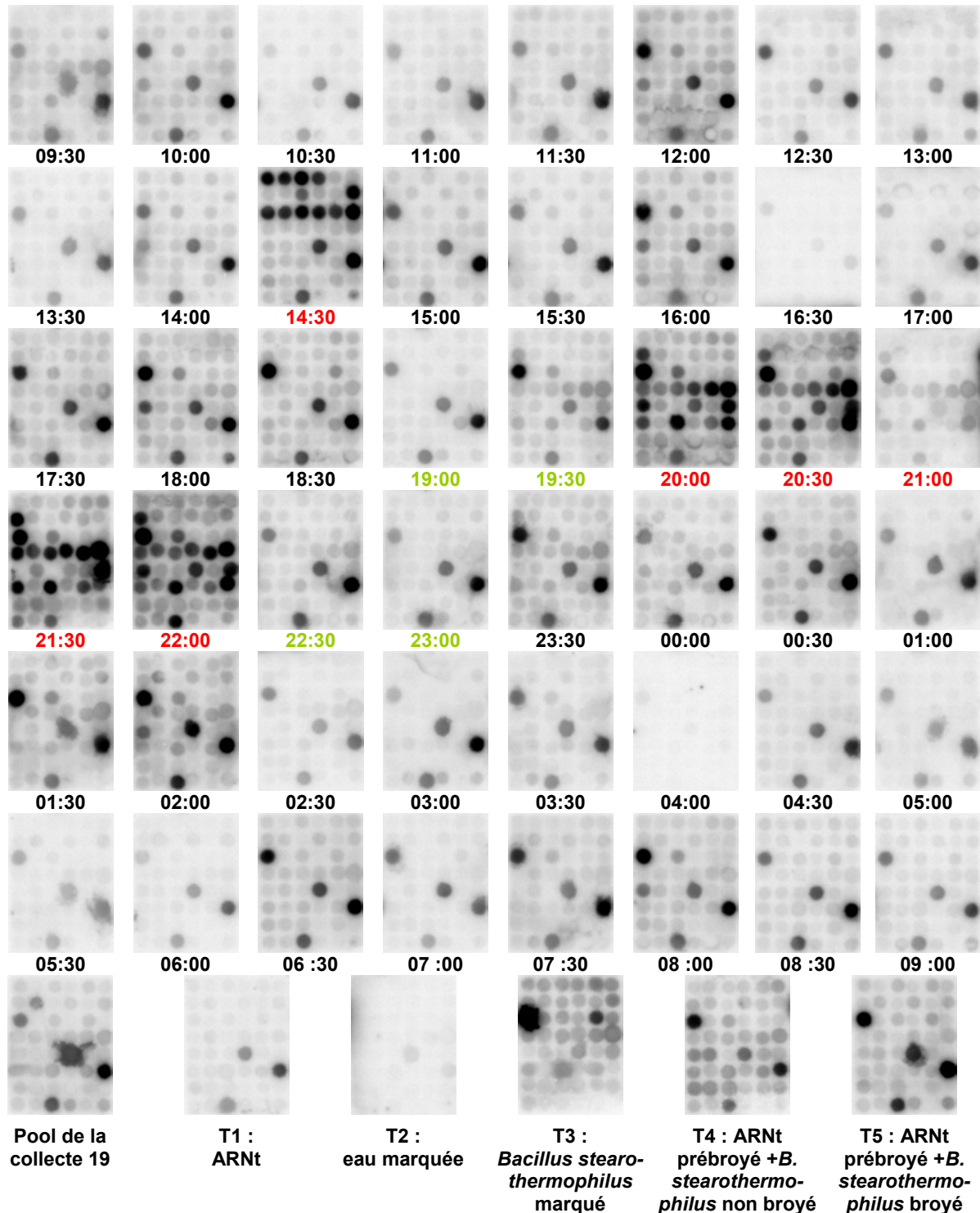
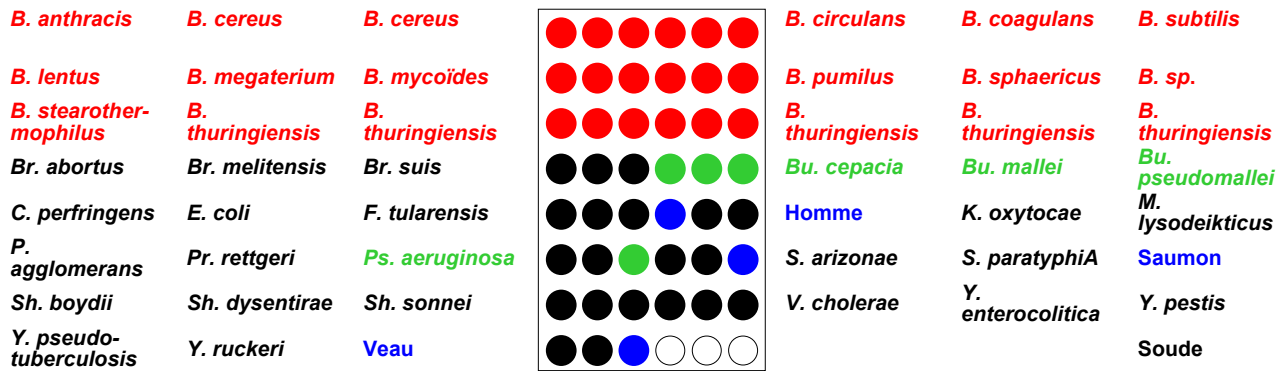


Figure 36 : Résultats des analyses génétiques réalisées sur la collecte 19 (09-10 août 2000).

A) Disposition des genres bactériens sur le support solide.

B) L'heure du début de collecte est indiquée sous la membrane correspondant à l'échantillon.

Les horaires indiqués en vert mettent en évidence un pic de micro-organismes observé par culture et/ou cytométrie, tandis que ceux indiqués en rouge signalent un pic de bactéries vu par analyse génétique.

Ces deux collectes ont donné lieu à des cultures sur le milieu sélectif, réalisées en complément de celles exécutées sur le milieu non sélectif.

Pour chacune d'elle, on observe un rapprochement des deux courbes de numération sur les milieux sélectif et non sélectif (de 14h00 à 23h00 pour la collecte 18 et de 19h00 à 22h00 pour la collecte 19). Ce résultat suggère la présence de pics bactériens (cf. §MM.2.).

D'après les résultats de culture, les collectes 18 et 19 présentent, respectivement, un pic de micro-organismes de 14h00 à 23h00 et de 19h00 à 23h00.

La cytométrie ne montre pas de pics marqués pendant ces périodes.

Quant à l'analyse génétique (cf. figures 35 et 36), elle met en évidence des pics bactériens aux alentours de 14h30, 15h00 et 21h00 pour la collecte 18 et entre 20h00 et 22h00 pour la collecte 19. Les signaux, dont l'intensité est la plus élevée, correspondent aux dépôts d'ADN de *Burkholderia*. Contrairement à l'analyse faite sur les *Bacillus* pour la collecte 11, il est impossible, ici, d'affirmer que la bactérie détectée appartient au genre *Burkholderia*, puisque celui-ci n'est pas suffisamment représenté sur la membrane.

La comparaison de ce profil génétique avec ceux obtenus pour les trois *Burkholderia*, lors de l'étude de l'hybridation croisée (cf. figure 24), suggère la présence de plusieurs genres bactériens dans l'échantillon. Par conséquent, les pics secondaires observés sur les dépôts d'ADN de *Micrococcus lysodeikticus*, et de *Pseudomonas aeruginosa* présentent autant d'importance que le signal principal.

Les images des boîtes de culture réalisées sur les milieux sélectif et non sélectif, de l'échantillon prélevé entre 20h30 et 21h00 lors de la collecte 19, figurent en annexe 2. On constate que le nombre de colonies est très élevé quel que soit le milieu utilisé. Par conséquent, les bactéries détectées, dans cet échantillon, sont susceptibles d'appartenir à la fraction cultivable et de se caractériser par une concentration élevée.

Au vu de ces résultats, les quatre échantillons de la collecte 19, prélevés de 20h00 à 22h00, qui étaient congelés en présence de glycérol, ont été réétalés sur des boîtes contenant un milieu non sélectif (cf. §MM.2.1.1.). Trois colonies, représentatives de celles vues sur les échantillons réétalés, ont été isolées et leurs ADN extraits, comme décrit précédemment (cf. §MM.2.3.2.). Ces ADN ont ensuite été marqués radioactivement et hybridés à des membranes (cf. §MM.6. et §MM.7.). Après avoir exposé ces dernières à un écran photosensible lu sur le Storm® 860 (cf. §MM.8.), deux des trois ADN extraits se sont hybridés à la membrane d'hybridation. Ils reproduisent une partie du signal précédemment visualisée par l'analyse génétique de la collecte 19, entre 20h00 et 22h00 (cf. figure 37).

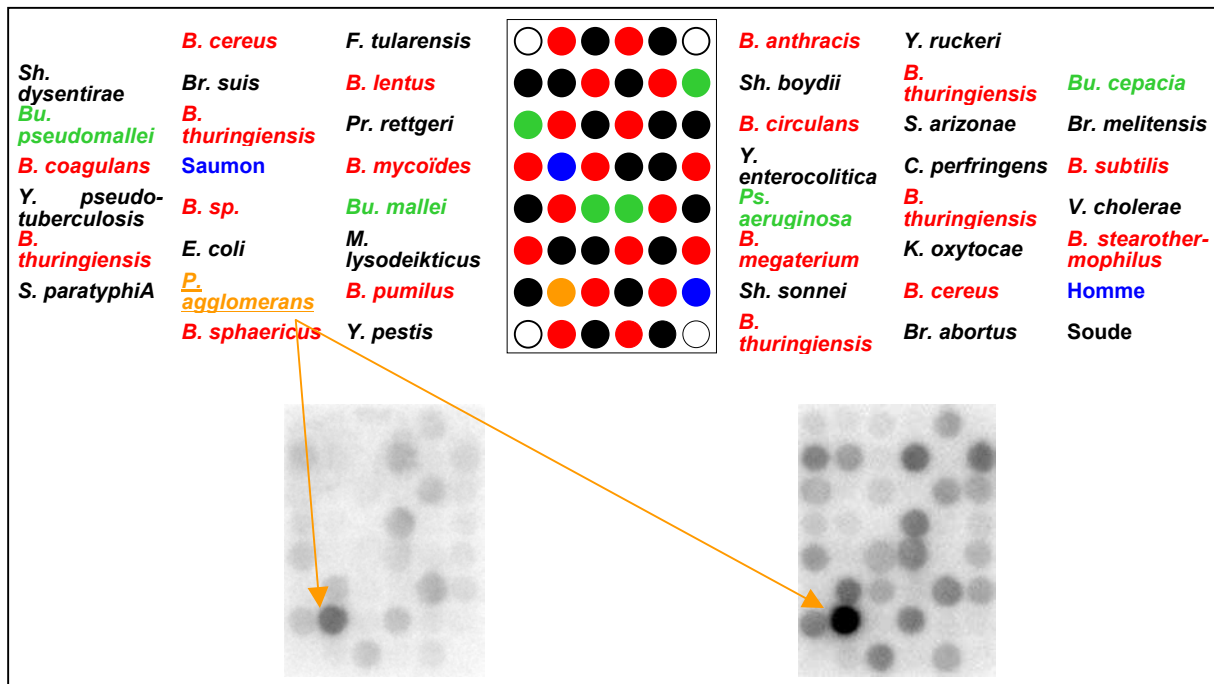


Figure 37 : Profil d'hybridation des deux colonies isolées à partir de la culture de certains échantillons de la collecte 19.

Par ailleurs, la collecte 19 met en évidence un pic bactérien de type *Bacillus* à 14h30.

Le raisonnement, suivi pour identifier ce pic, est similaire à celui employé lors de la détection du pic de *Bacillus* dans la collecte 11 (cf. §5.8.2.). Au demeurant, l'image des boîtes de culture de cet échantillon (cf. annexe 3) met en évidence, en présence de cycloheximide, un nombre très faible de colonies. Aucun pic de micro-organismes n'ayant été relevé par l'analyse cytométrique, on en déduit que la bactérie détectée n'est pas cultivable et qu'elle est présente dans le prélèvement à une concentration élevée.

La sensibilité de la méthode est estimée en comparant sur cet échantillon (échantillon 14h30 de la collecte 19) le signal le plus intense émis par un *Bacillus* (*B. thuringiensis* 9943) à celui fourni par le témoin *B. stearothermophilus* sur la membrane. Si l'on considère que ces signaux sont quasiment de même intensité, l'analyse génétique permet de détecter environ 75 000 bactéries (dans un échantillon de 500 µl, cf. §MM.2.3.6.), soit 150 000 bactéries par 1 ml en une minute de collecte.

Or, le collecteur utilisé aspire environ 1 000 litres d'air en une minute, avec un rendement de 30 à 50% dans la gamme de taille de 1 à 10 µm (cf. §5.4.). On en déduit qu'il y avait en moyenne, lors du prélèvement de cet échantillon, entre 300 et 500 bactéries par litre d'air.

La méthode « génome complet » permettant de voir aisément un pic lorsque 300 à 500 bactéries sont présentes par litre d'air, on estime que le seuil de sensibilité de cette méthode est d'environ 100 bactéries par litre d'air.

5.9. DISCUSSION

L'étude des 4 collectes présentées ci-dessus met en évidence que la composition du bruit de fond peut varier d'une demi-heure à l'autre.

Cette étude semble également démontrer que les micro-organismes sont habituellement présents à une concentration minimale que la cytométrie en flux permet d'évaluer approximativement à 10^5 particules biologiques par ml d'échantillons, soit une centaine de particules biologiques par litre d'air. Pour leur part, les expériences de culture et de cytométrie en phase solide ne permettent de dénombrer qu'une fraction des micro-organismes détectés par la cytométrie en flux (cf. §5.5.). Par contre, l'analyse génétique caractérise des pics bactériens que les méthodes de numération sont incapables de mettre en évidence (cf. §5.8.).

En outre, cette étude préliminaire souligne que l'analyse d'échantillons susceptibles de contenir des agents pathogènes nécessite, pour des raisons de fiabilité, de ne pas se contenter des méthodes reposant sur la culture et la cytométrie.

Ces deux procédés n'aboutissent, en effet, qu'à la numération des micro-organismes présents dans l'échantillon, c'est-à-dire à une information purement quantitative.

La méthode génétique, en fournissant une information qualitative sur certains genres bactériens, procure un complément indispensable à la numération.

Toutefois, le protocole utilisé pour l'analyse génétique devra subir quelques modifications afin de réduire la durée d'intervention de l'expérimentateur. A cet égard, il est envisagé de recourir au broyage et à l'extraction de l'ADN des échantillons, en plaque 96 puits. De plus, l'hybridation, également réalisée en plaque 96 puits, est actuellement en cours d'évaluation.

Les premiers résultats obtenus à partir des quatre collectes ont permis d'établir qu'aucune bactérie d'intérêt militaire n'entraîne dans la composition bactériologique de l'air en concentration suffisante pour être détectée ici. Nos résultats ont, néanmoins, mis en évidence la présence de *Bacillus* dans l'air (cf. §5.8.).

A cet égard, il convient de relever que les *Bacillus* se trouvent largement répandus dans les sols et qu'ils peuvent se diffuser dans l'atmosphère par le seul effet du vent agissant sur la poussière (cf. §2.5.1.).

L'immobilisation sur les supports solides d'hybridation, des espèces constituant les plus proches voisins phylogénétiques de *Bacillus anthracis* et d'un nombre important d'autres espèces du genre *Bacillus*, permet de vérifier que les *Bacillus* détectés diffèrent de *Bacillus anthracis*.

Cependant, des études supplémentaires seront nécessaires afin d'évaluer l'effet des concentrations de différents *Bacillus* sur les signaux d'hybridation mesurés. On s'attachera en particulier aux quatre *Bacillus* du « groupe *B. cereus* » (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoïdes* et *B. thuringiensis*).

Pour résoudre ce problème, plusieurs analyses devront donc être réalisées sur un même échantillon. La méthode « génome complet » donne un premier aperçu du profil bactérien de l'échantillon issu de l'environnement. Par exemple, lorsqu'un pic de *Bacillus* appartenant au groupe « *B. cereus* » est détecté, on peut envisager de réaliser une PCR multiplexe et quantitative, en présence de quatre amorces, chacune spécifique des quatre espèces de ce groupe. Il serait alors possible d'estimer la quantité de produit formé pour chacune des quatre espèces et d'en déduire la proportion de chacune d'elles.

Nos résultats soulignent également la nécessité pour les supports solides d'hybridation de comporter, pour chaque agent pathogène participant à la menace biologique, les représentants phylogénétiques les plus proches.

De plus, les analyses génétiques vont générer de nombreux résultats (images des membranes et quantification des intensités de signaux obtenus) dont le traitement informatique envisagé pourra poser des problèmes.

L'objectif tend, désormais, à analyser le reste des échantillons collectés au cours de la période comprise entre avril 2000 et avril 2001 et d'améliorer le protocole précédemment décrit. A cette fin, l'analyse des résultats pourra s'appuyer sur l'exploitation de la base de données du bruit de fond atmosphérique. La mise en place de cette dernière permet déjà de gérer les stocks d'échantillons. Elle doit également faciliter l'établissement de corrélations entre les différentes analyses biologiques. Les paramètres météorologiques locaux également enregistrés dans cette base de données permettront, quant à eux, de fournir d'autres informations, en particulier sur les raisons de survenue d'un pic de particules biologiques.

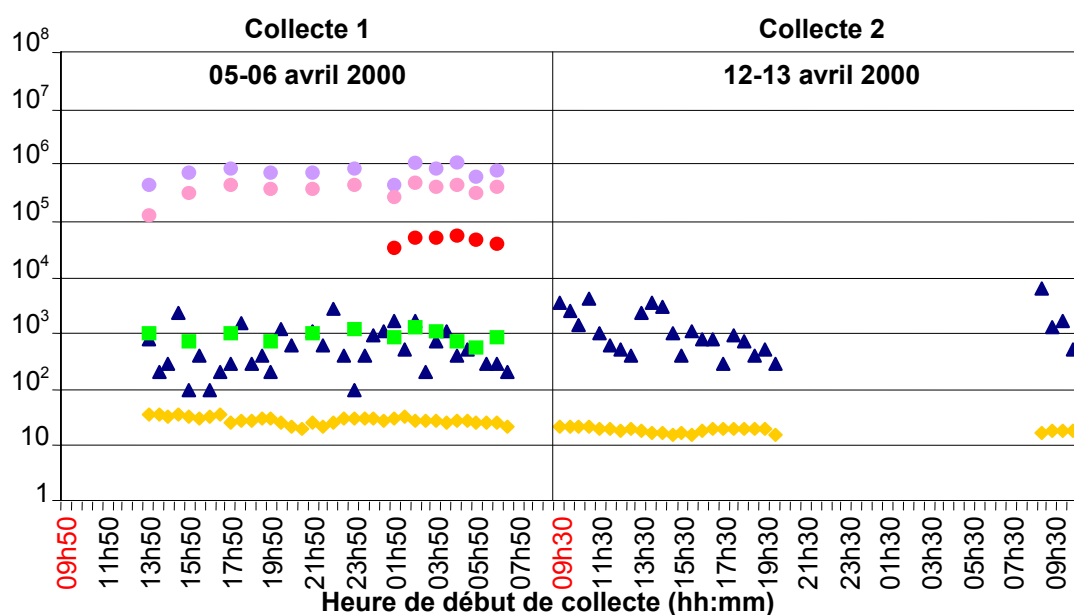
Il devient également nécessaire d'accroître le nombre de bactéries représentées sur les membranes d'hybridation. Par conséquent, il faut envisager le réexamen, à partir des échantillons conservés dans du glycérol, des prélèvements collectés afin d'isoler et d'identifier des bactéries de l'environnement. Ce travail, pouvant être réalisé par une entreprise extérieure au CEB, fournirait alors les souches nécessaires à la préparation d'ADN génomique.

Un second projet portant sur la composition bactériologique de l'air et tirant profit de ce projet pilote fait, à l'heure actuelle, l'objet d'un appel d'offres.

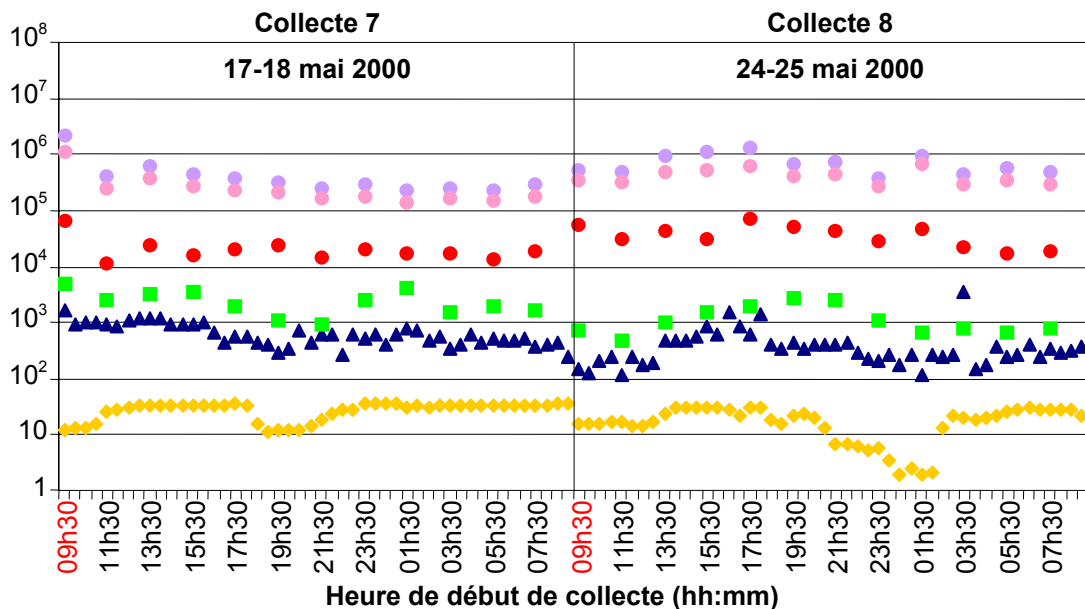
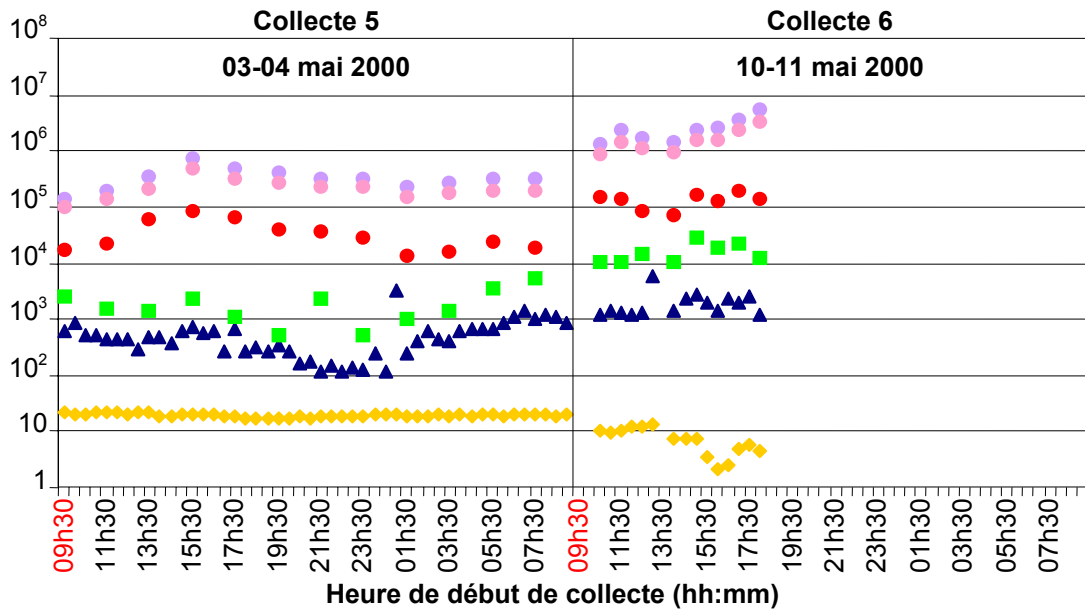
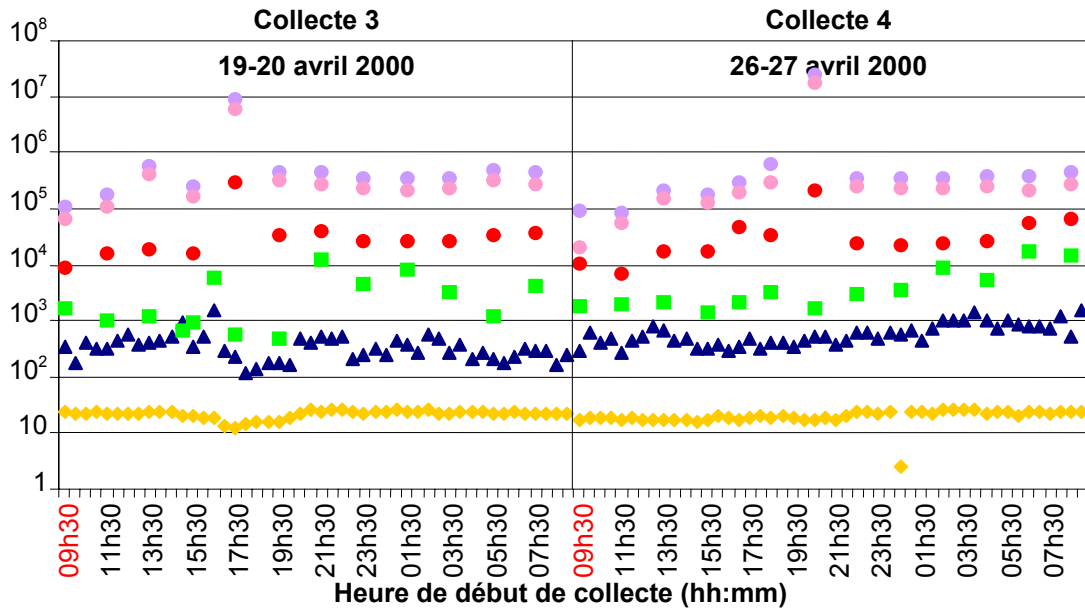
L'objectif est d'analyser l'air sur plusieurs sites caractéristiques de la diversité géographique française (site rural/site urbain, campagne/mer/montagne). Les études biologiques devront au minimum s'attacher à la numération de particules (cytométrie et/ou culture) et à l'analyse génétique. Cette dernière n'implique pas obligatoirement de recourir à la méthode « génome complet ». Une analyse des ADNr 16S contenus dans l'échantillon peut compléter les informations obtenues, en particulier au niveau du genre bactérien. Cette dernière méthode sera facilitée par le séquençage, établi et à venir, d'un nombre croissant de bactéries et d'autres organismes.

5.10. ENSEMBLE DES RESULTATS DE CULTURE ET DE CYTOMETRIE OBTENUS POUR L'ANNEE DE COLLECTE (AVRIL 2000-AVRIL 2001)

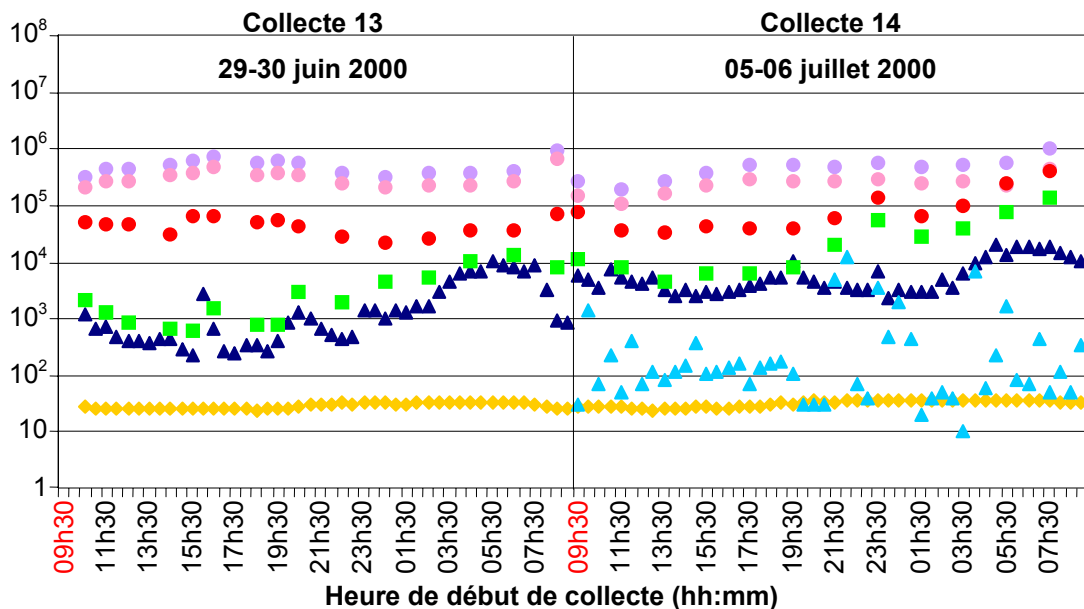
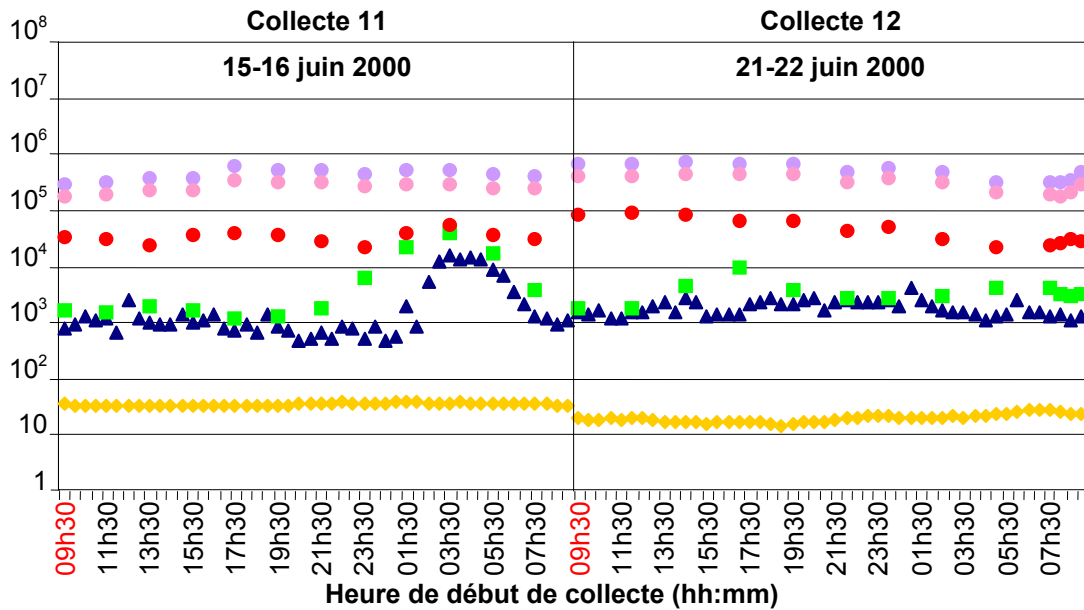
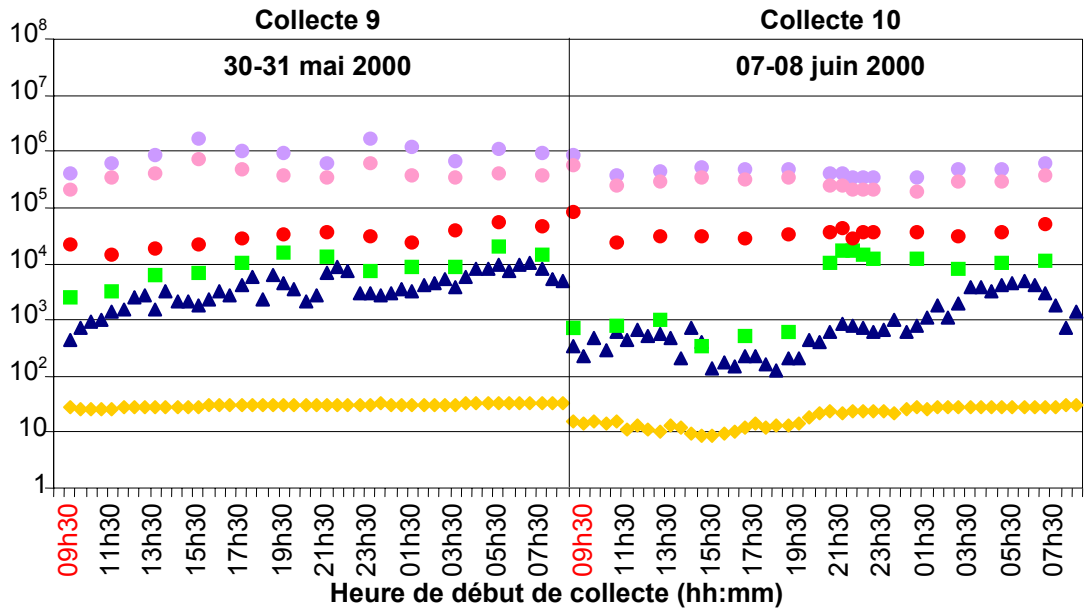
- Nombre total de particules } CYTOMETRIE EN FLUX
- Micro-organismes } (particules biologiques/ml)
- Particules de grande taille } CYTOMETRIE EN PHASE SOLIDE
- Micro-organismes } (particules biologiques/ml)
- Levures et moisissures } (particules biologiques/ml)
- ▲ Milieu non sélectif (TSA) } CULTURE (cfu/ml)
- ▲ Milieu sélectif (TSA+cycloheximide) } CULTURE (cfu/ml)
- ◆ Masse de l'échantillon (g)



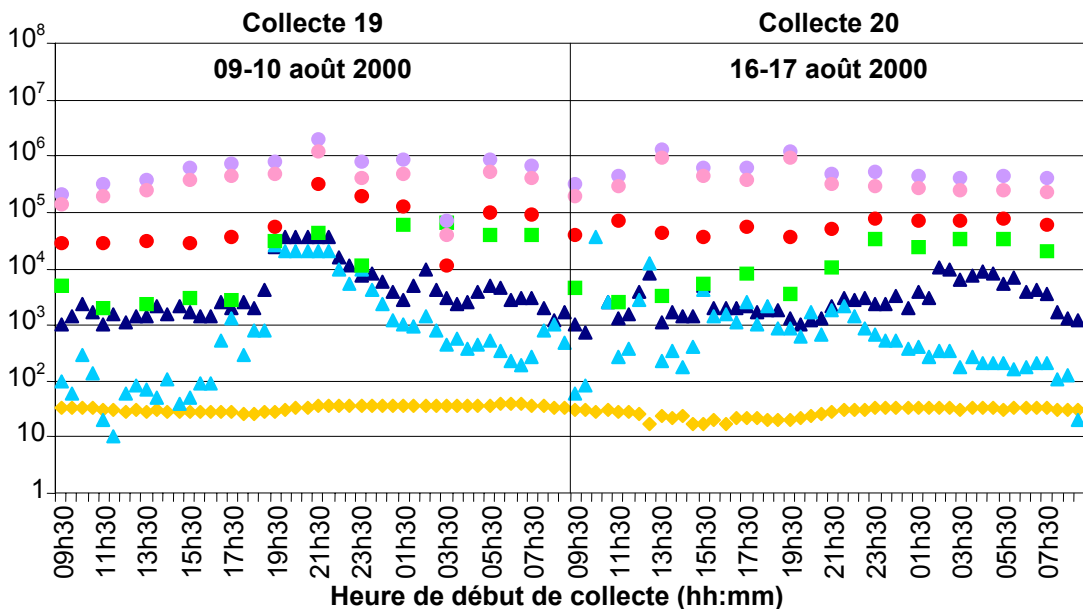
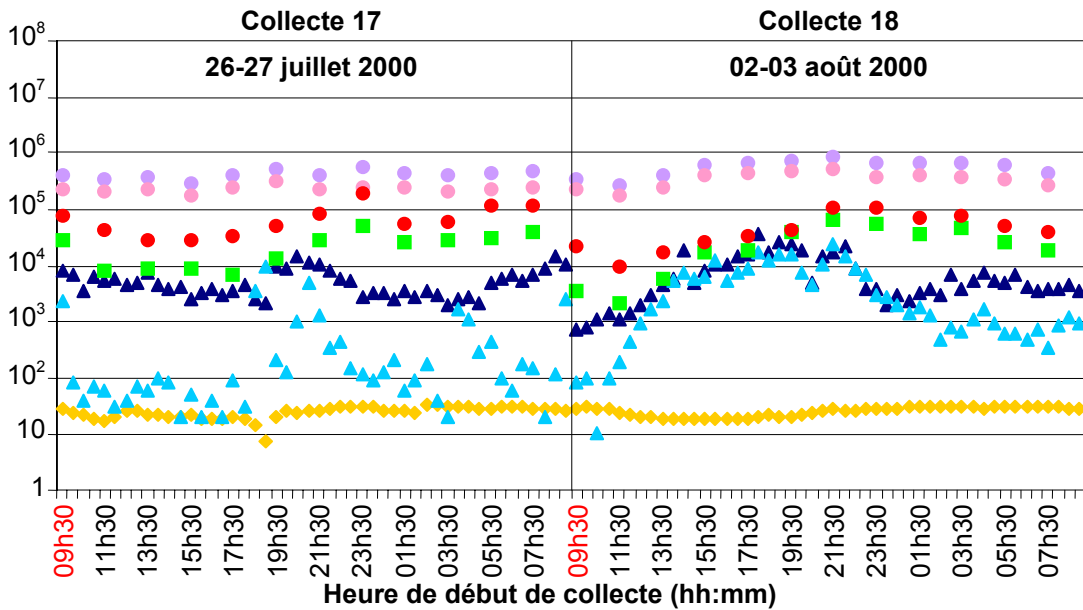
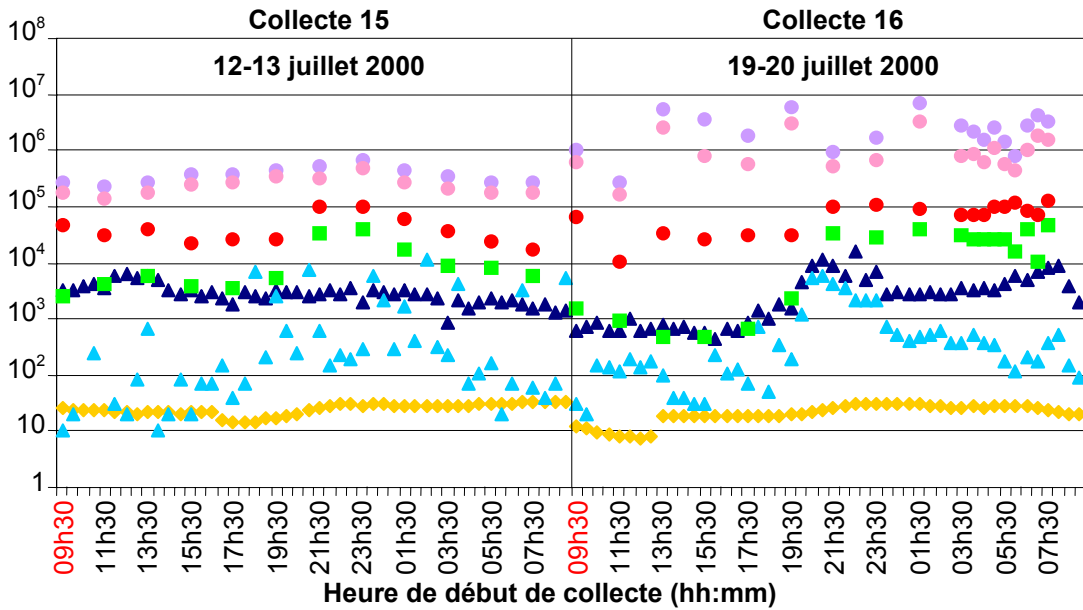
- Nombre total de particules } CYTOMETRIE EN FLUX
- Micro-organismes } (particules biologiques/ml)
- Particules de grande taille } (particules biologiques/ml)
- Micro-organismes } CYTOMETRIE EN PHASE SOLIDE
- Levures et moisissures } (particules biologiques/ml)
- ▲ Milieu non sélectif (TSA) } CULTURE (cfu/ml)
- ▲ Milieu sélectif (TSA+cycloheximide) } (particules biologiques/ml)
- ◆ Masse de l'échantillon (g)



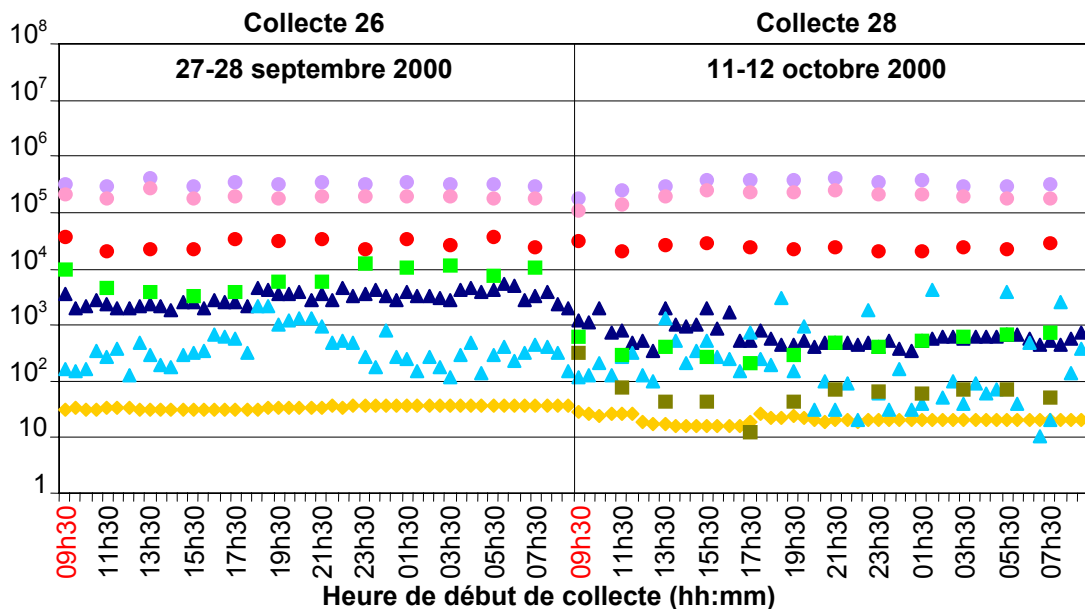
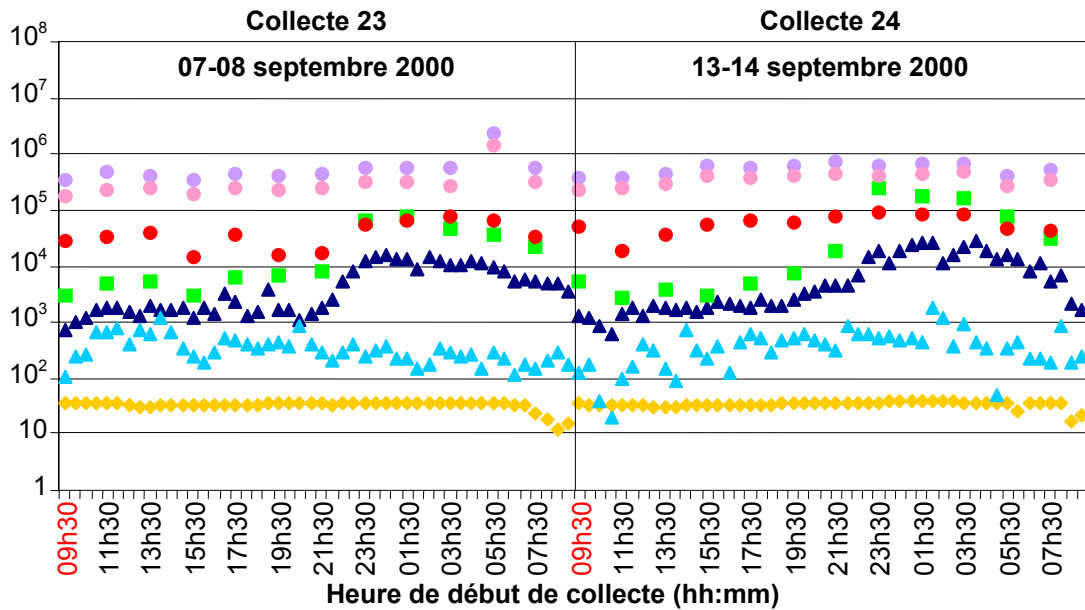
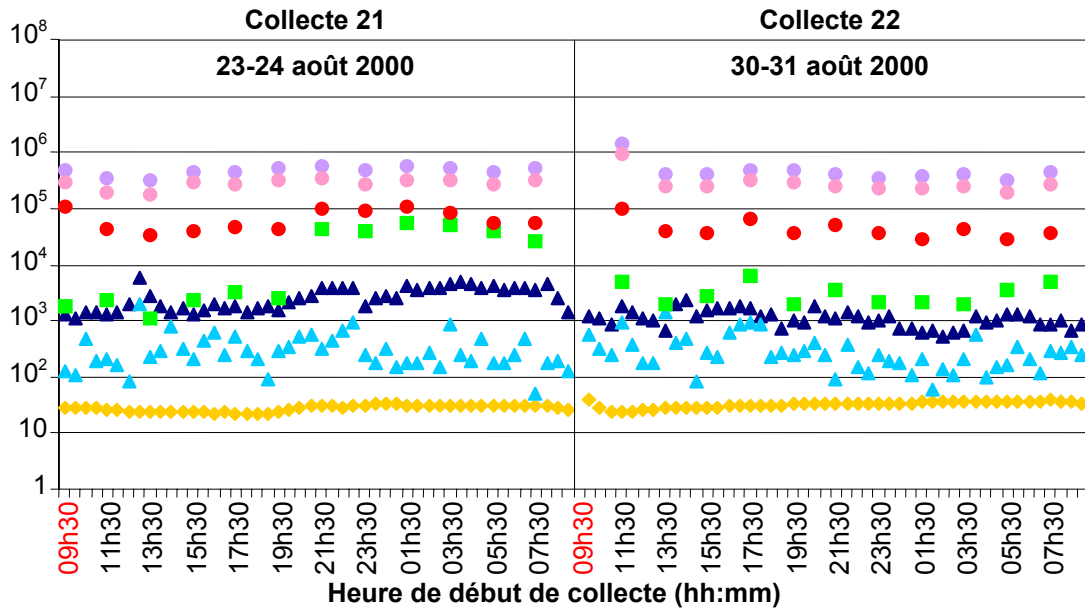
- Nombre total de particules } CYTOMETRIE EN FLUX
- Micro-organismes } (particules biologiques/ml)
- Particules de grande taille } (particules biologiques/ml)
- Micro-organismes } CYTOMETRIE EN PHASE SOLIDE
- Levures et moisissures } (particules biologiques/ml)
- ▲ Milieu non sélectif (TSA) } CULTURE (cfu/ml)
- ▲ Milieu sélectif (TSA+cycloheximide) } (particules biologiques/ml)
- ◆ Masse de l'échantillon (g)



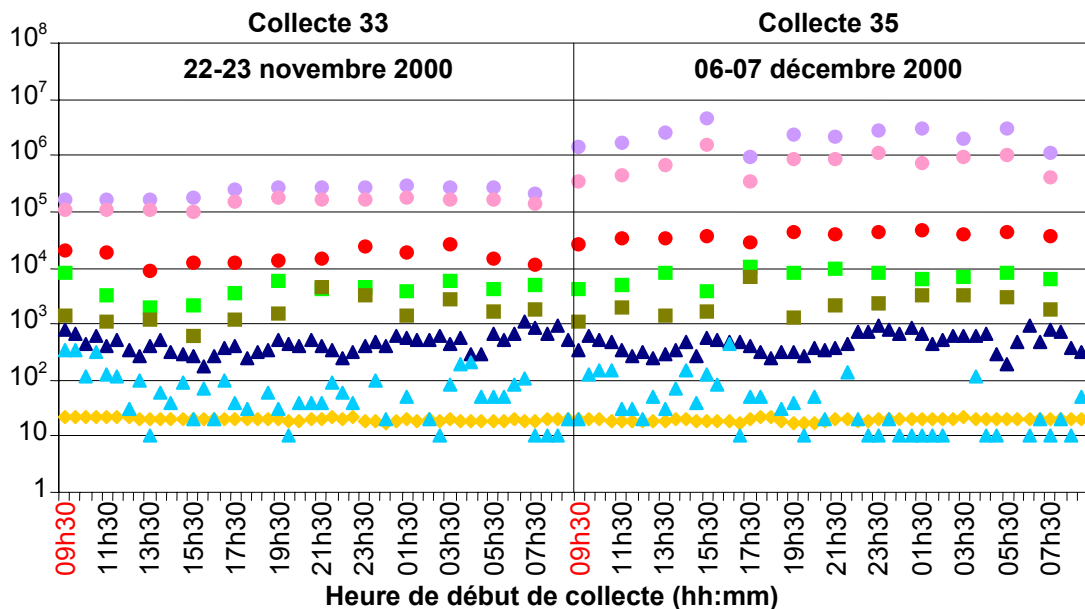
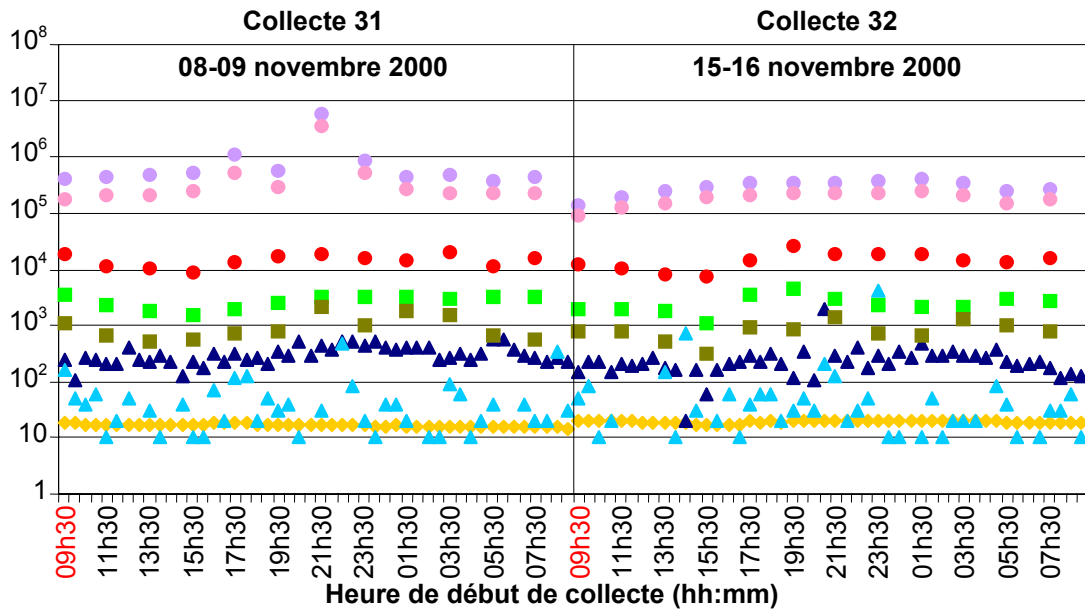
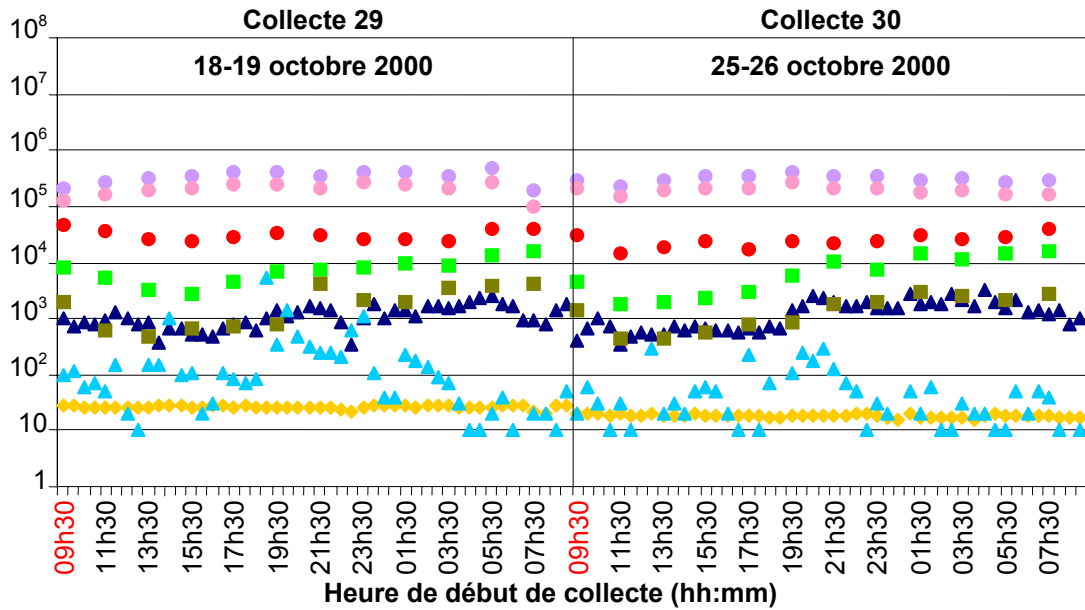
- Nombre total de particules } CYTOMETRIE EN FLUX
- Micro-organismes } CYTOMETRIE EN FLUX
- Particules de grande taille } CYTOMETRIE EN FLUX
- Micro-organismes } CYTOMETRIE EN PHASE SOLIDE
- Levures et moisissures } CYTOMETRIE EN PHASE SOLIDE (particules biologiques/ml)
- ▲ Milieu non sélectif (TSA) } CULTURE (cfu/ml)
- ▲ Milieu sélectif (TSA+cycloheximide) } CULTURE (cfu/ml)
- ◆ Masse de l'échantillon (g)



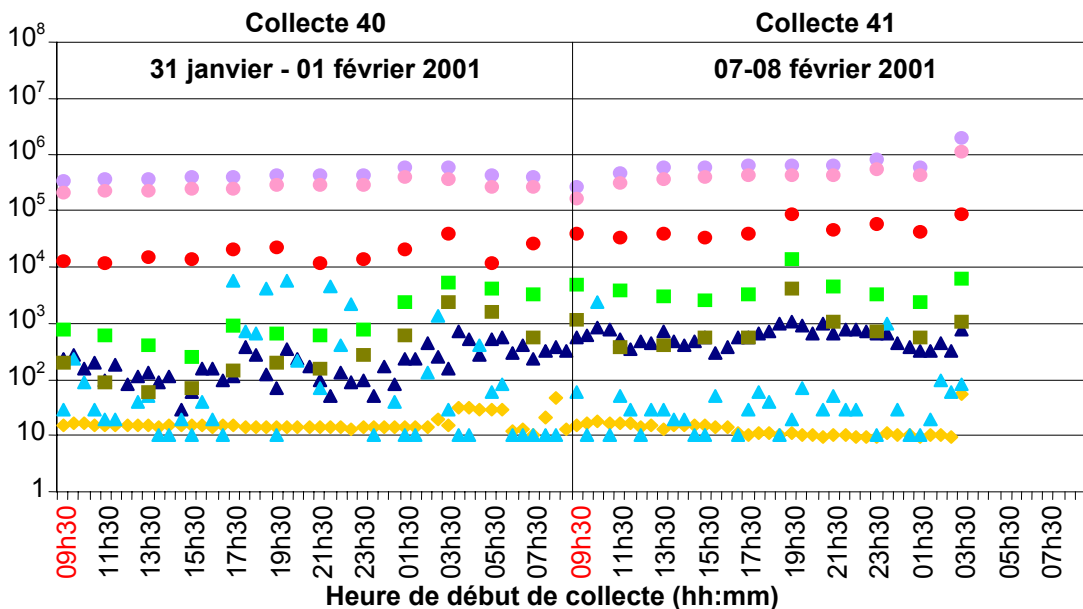
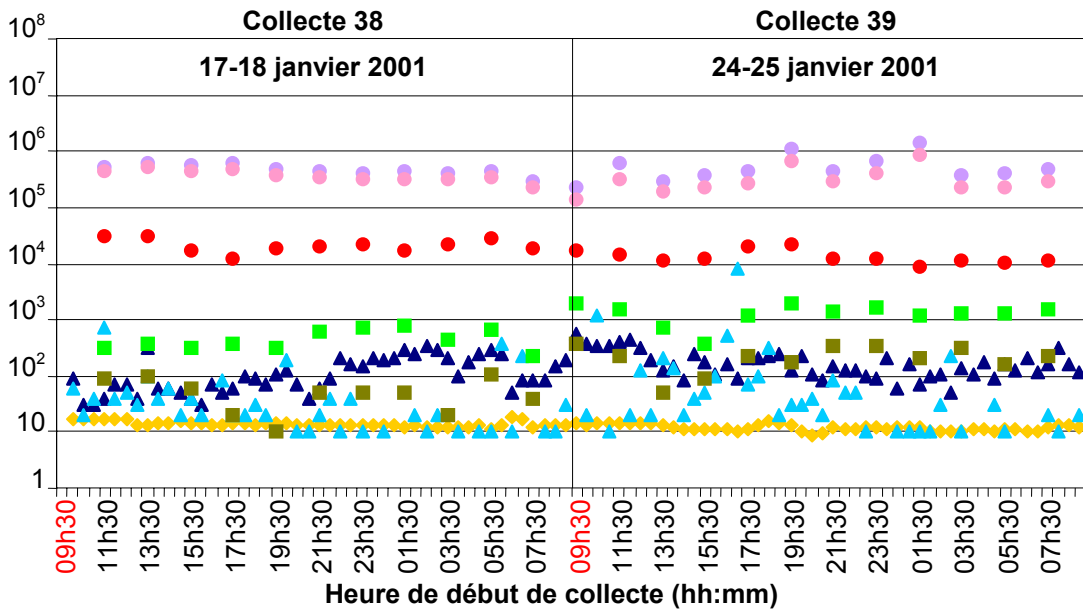
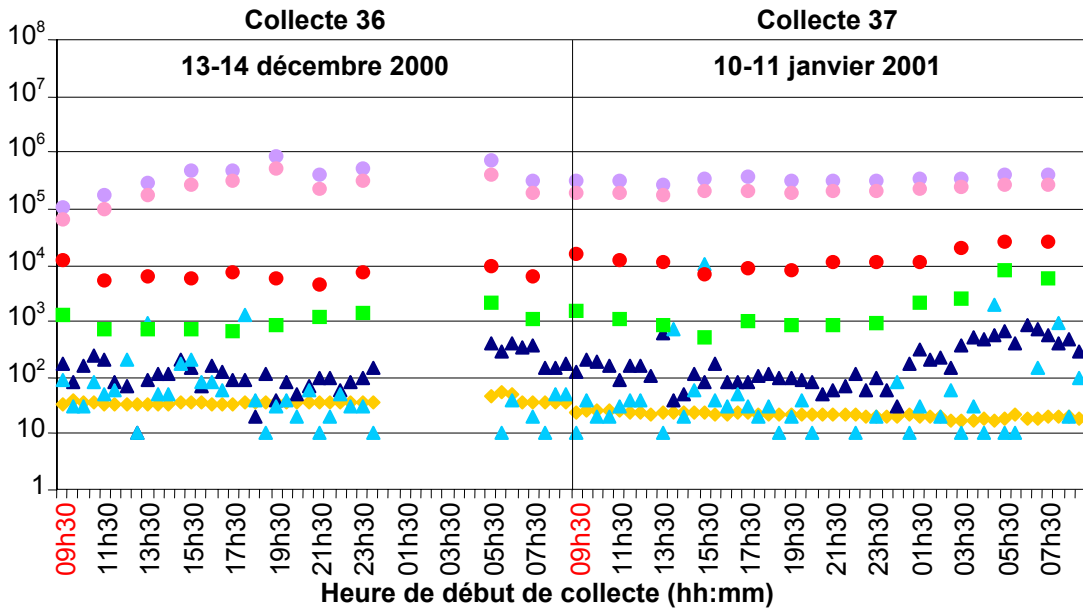
- Nombre total de particules } CYTOMETRIE EN FLUX
- Micro-organismes } (particules biologiques/ml)
- Particules de grande taille } (particules biologiques/ml)
- Micro-organismes } CYTOMETRIE EN PHASE SOLIDE
- Levures et moisissures } (particules biologiques/ml)
- ▲ Milieu non sélectif (TSA) } CULTURE (cfu/ml)
- ▲ Milieu sélectif (TSA+cycloheximide) } (particules biologiques/ml)
- ◆ Masse de l'échantillon (g)



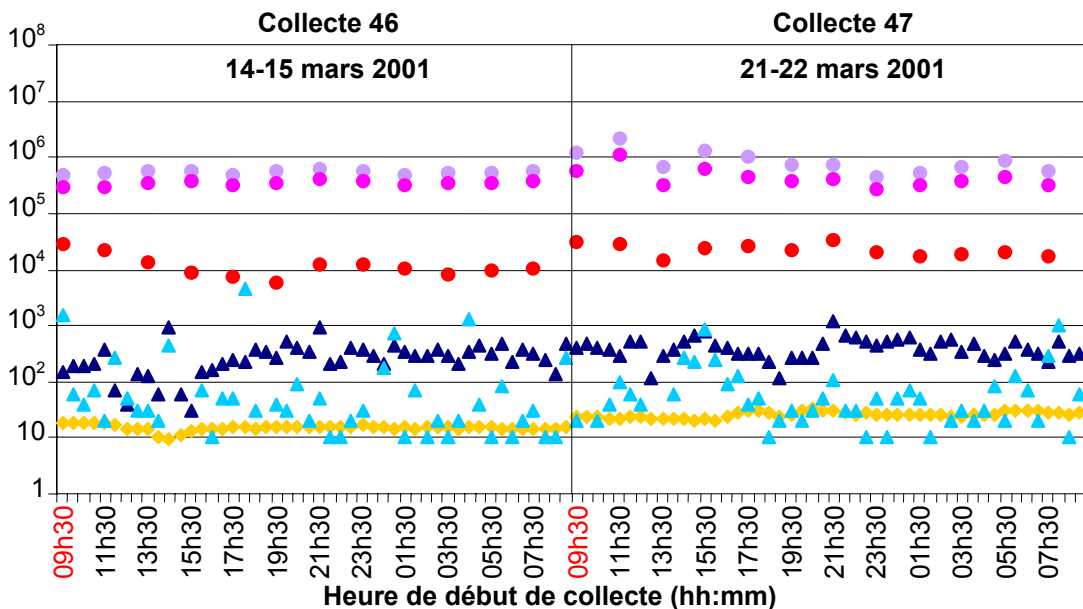
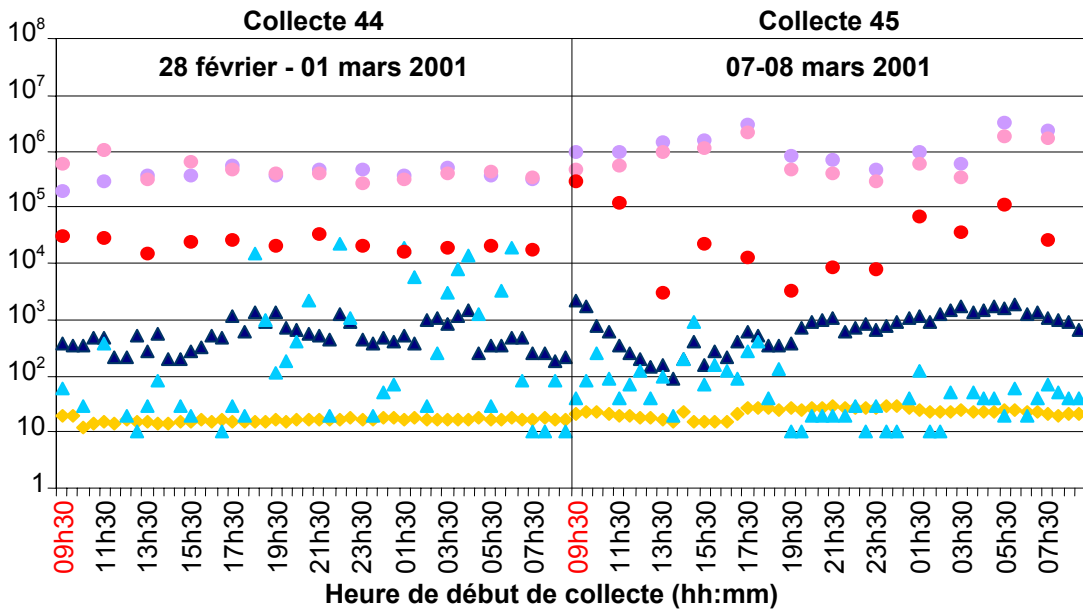
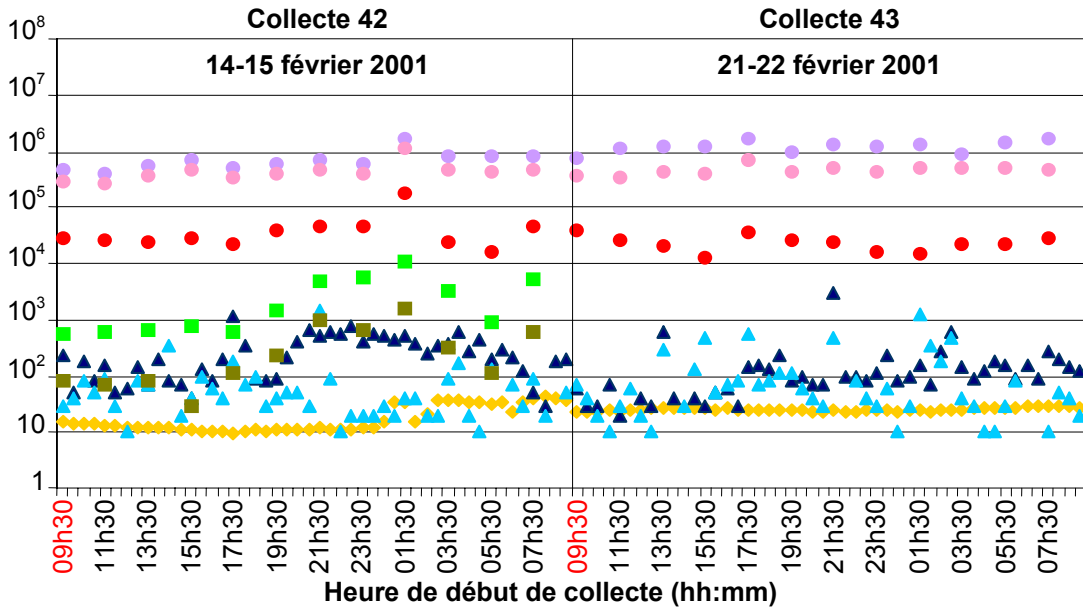
- Nombre total de particules } CYTOMETRIE EN FLUX
- Micro-organismes } (particules biologiques/ml)
- Particules de grande taille } (particules biologiques/ml)
- Micro-organismes } CYTOMETRIE EN PHASE SOLIDE
- Levures et moisissures } (particules biologiques/ml)
- ▲ Milieu non sélectif (TSA) } CULTURE (cfu/ml)
- ▲ Milieu sélectif (TSA+cycloheximide) } (particules biologiques/ml)
- ◆ Masse de l'échantillon (g)



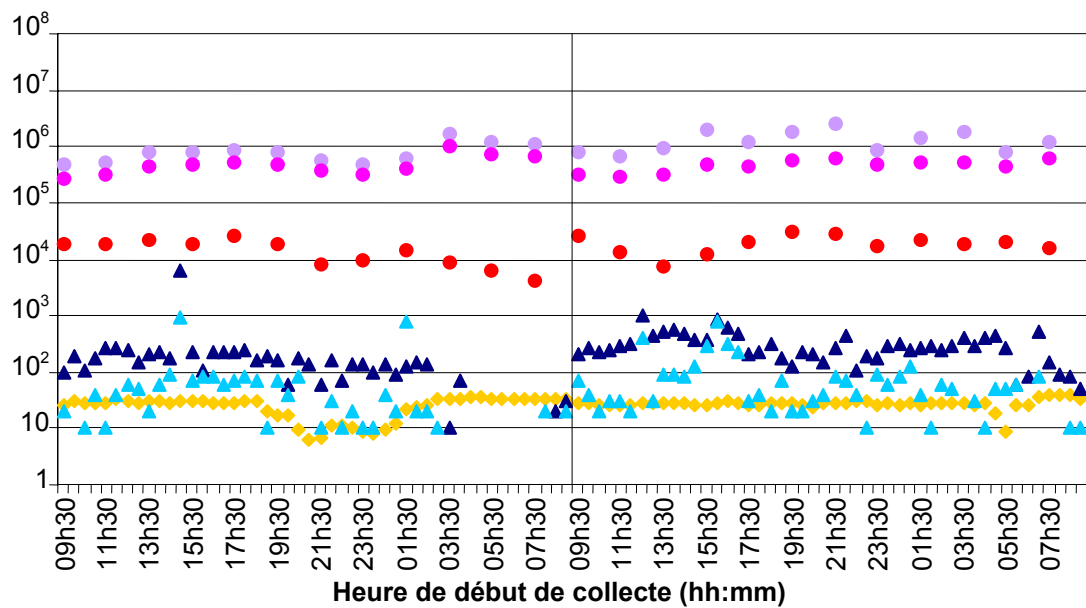
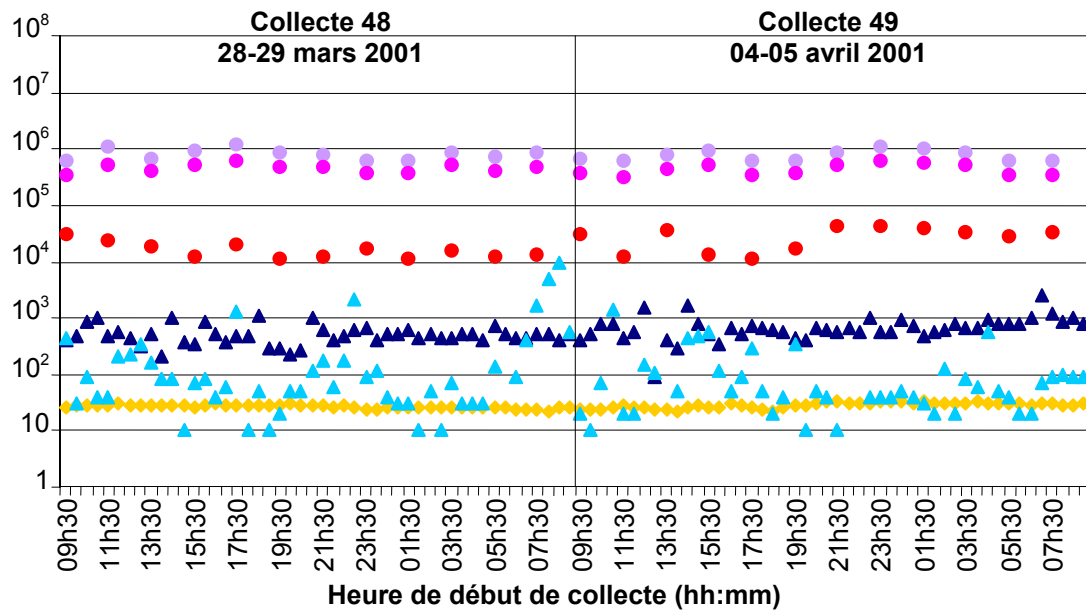
- Nombre total de particules } CYTOMETRIE EN FLUX
- Micro-organismes } (particules biologiques/ml)
- Particules de grande taille } (particules biologiques/ml)
- Micro-organismes } CYTOMETRIE EN PHASE SOLIDE
- Levures et moisissures } (particules biologiques/ml)
- ▲ Milieu non sélectif (TSA) } CULTURE (cfu/ml)
- ▲ Milieu sélectif (TSA+cycloheximide) } (particules biologiques/ml)
- ◆ Masse de l'échantillon (g)



- Nombre total de particules } CYTOMETRIE EN FLUX
- Micro-organismes } (particules biologiques/ml)
- Particules de grande taille } (particules biologiques/ml)
- Micro-organismes } CYTOMETRIE EN PHASE SOLIDE
- Levures et moisissures } (particules biologiques/ml)
- ▲ Milieu non sélectif (TSA) } CULTURE (cfu/ml)
- ▲ Milieu sélectif (TSA+cycloheximide) } (particules biologiques/ml)
- ◆ Masse de l'échantillon (g)



- Nombre total de particules } CYTOMETRIE EN FLUX
- Micro-organismes } (particules biologiques/ml)
- Particules de grande taille } CYTOMETRIE EN PHASE SOLIDE
- Micro-organismes } (particules biologiques/ml)
- Levures et moisissures } CULTURE (cfu/ml)
- ▲ Milieu non sélectif (TSA)
- ▲ Milieu sélectif (TSA+cycloheximide)
- ◆ Masse de l'échantillon (g)



6. CHOIX TECHNOLOGIQUE POUR L'ETUDE DE FAISABILITE D'UN SYSTEME DE DETECTION

Les moyens de détection, tels que la culture, la cytométrie et la microscopie, ont été présentés précédemment (cf. §5.2.).

Ce paragraphe est destiné à présenter les procédés permettant l'identification de bactéries et fixe notre choix sur la méthodologie à suivre pour le projet de « détection de contrôle ». Dans un deuxième temps, nous décrivons un système de détection utilisant la PCR et développé par une équipe américaine. Après avoir décrit le projet de la thèse relatif à ce système de détection, nous discuterons des différents résultats exposés.

6.1. MOYENS D'IDENTIFICATION

Certains procédés permettent de caractériser les particules de l'environnement, en précisant leur place dans la classification des organismes vivants. Ils utilisent les techniques de la biochimie, de l'immunologie ou de la génétique.

6.1.1. IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE

Différents systèmes de détection emploient des tests biochimiques pour identifier des bactéries.

Un des premiers systèmes intégrés décrit est le mini-API system de BioMérieux. Simple d'utilisation, il réalise un certain nombre de réactions biochimiques et permet d'établir des profils spécifiques pour un nombre limité d'espèces bactériennes. Cependant, ce système n'est pas automatisé et ne repose que sur la lecture de l'expérimentateur.

Les systèmes développés ultérieurement ont été automatisés afin de répondre à des critères de rapidité pour l'identification de bactéries. En effet, la demande s'accroît pour la détection de pathogènes mortels, mais également de germes responsables de maladies incapacitantes.

En 1999, Odumeru *et al.* ont comparé cinq de ces appareils, disponibles dans le commerce : Vitek (BioMérieux), MicroScan Walk-Away 40 (Dade Diagnostics Corp.), Replianalyzer (Oxoid Inc.), MicroLog (Biolog Inc.) et Microbial Identification System (MIDI Inc.).

En ce qui concerne le Vitek et le MicroScan Walk-Away 40, la suspension bactérienne est inoculée, respectivement, sur des cartes ou dans des plaques qui contiennent une variété de substrats biochimiques et d'antibiotiques conventionnels. La croissance bactérienne, dans les puits de ces supports, modifie le substrat biochimique. La lecture de la carte ou de la plaque permet alors d'établir un profil biochimique, qui peut être comparé à ceux d'organismes connus.

Le Replianalyzer fournit également un profil biochimique. Cependant, le système utilise des boîtes d'Agar, plutôt que des plaques composées de micropuits.

S'agissant du MicroLog, la suspension bactérienne est inoculée dans les micropuits d'une plaque qui contiennent un milieu tamponné, différentes sources de carbone et un indicateur coloré, le tétrazolium violet. Le colorant est réduit lorsque les différentes sources de carbone sont utilisées. Le profil biochimique résultant peut être comparé à ceux de micro-organismes connus.

Quant au Microbial Identification System, les profils en acide gras, générés par des micro-organismes inconnus, sont comparés à ceux obtenus pour des micro-organismes connus.

Le système BioLog (Biolog Inc.) a, en particulier, été évalué pour l'identification de *Bacillus anthracis* (Baillie *et al.*, 1995). Il s'avère que, dans la majorité des cas, ce système est capable de distinguer *Bacillus anthracis* des autres espèces du genre *Bacillus*. Toutefois, des tests complémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces résultats. En effet, il arrive que des membres du « groupe *Bacillus cereus* » donnent de faux-positifs.

Ces différents systèmes présentent des sensibilités variables selon l'espèce bactérienne que l'on doit détecter. Certains sont plus performants pour des bactéries d'intérêt médical, tandis que d'autres seront plus appropriés pour la détection de micro-organismes issus de l'environnement. En effet, ils dépendent fortement du nombre de profils existants dans la base de données.

De plus, ils ne sont pas multiplex. En d'autres termes, la suspension bactérienne doit généralement être répartie entre les différents puits des plaques ou cartes, nécessitant souvent un pré-enrichissement par culture bactérienne.

6.1.2. IDENTIFICATION IMMUNOLOGIQUE

L'analyse par la voie immunologique est :

- soit directe : aucun des réactifs n'est marqués. Le résultat de la réaction entre l'antigène et l'anticorps est directement observé,
- soit indirecte : l'un des réactifs, l'antigène ou l'anticorps, est marqué. Lorsque la réaction antigène-anticorps intervient, le signal produit par le marqueur est mesuré.

6.1.2.1. MESURE DIRECTE

• Agglutination

L'agglutination permet une mesure directe de la présence bactérienne dans un échantillon. Des billes de latex colorées et recouvertes d'anticorps agglutinent l'antigène spécifique (bactéries). On observe alors la formation d'un précipité. La méthode est peu sensible (10^7 bactéries sont nécessaires par réaction) mais est simple à mettre en œuvre.

• Immunodiffusion

L'immunodiffusion utilise un appareil en forme de « L » comportant deux chambres. La chambre verticale est dite « de mobilité ». Elle contient de l'Agar semi-solide inoculé avec un anticorps spécifique de la bactérie que l'on doit détecter. La chambre horizontale est dite « d'inoculation ». Elle contient un milieu sélectif enrichi et est inoculée avec l'échantillon préenrichi par culture. Les bactéries peuvent alors migrer vers la chambre « de mobilité » et réagir avec l'anticorps pour former une ligne de précipitation. Cette méthode est utilisée, en particulier, pour la détection des salmonelles mobiles dans l'industrie alimentaire.

• Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation consiste à saturer à l'intérieur de petits appareils en plastique un nombre important de blocs absorbants au moyen d'anticorps de détection et d'anticorps de capture. Ces deux anticorps sont spécifiques de l'antigène. L'échantillon est absorbé par les blocs. Lorsque l'antigène est présent dans l'échantillon, il réagit, dans un premier temps, avec l'anticorps marqué et, dans un second temps, avec l'anticorps de capture pour former une bande visible d'immunoprécipitation.

6.1.2.2. MESURE INDIRECTE OU IMMUNODOSAGE

• Test de compétition

Les antigènes non marqués de l'échantillon entrent en compétition avec un antigène marqué de quantité connue pour les sites de fixation de l'anticorps (cf. figure 38A). Par conséquent, l'intensité de signal diminue à mesure que l'échantillon contient une quantité croissante d'antigène.

• Test « sandwich »

Ce test consiste à recouvrir un support solide d'un anticorps, dans le but de capturer l'antigène de l'échantillon qui lui est spécifique (cf. figure 38B). Un second anticorps marqué va reconnaître l'antigène. Le signal mesuré est proportionnel à la quantité d'antigène présent dans l'échantillon.

Le test « sandwich » le plus utilisé au laboratoire est l'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) : le second anticorps est couplé à une enzyme qui catalyse la réaction de formation d'un produit coloré à partir d'un substrat spécifique.

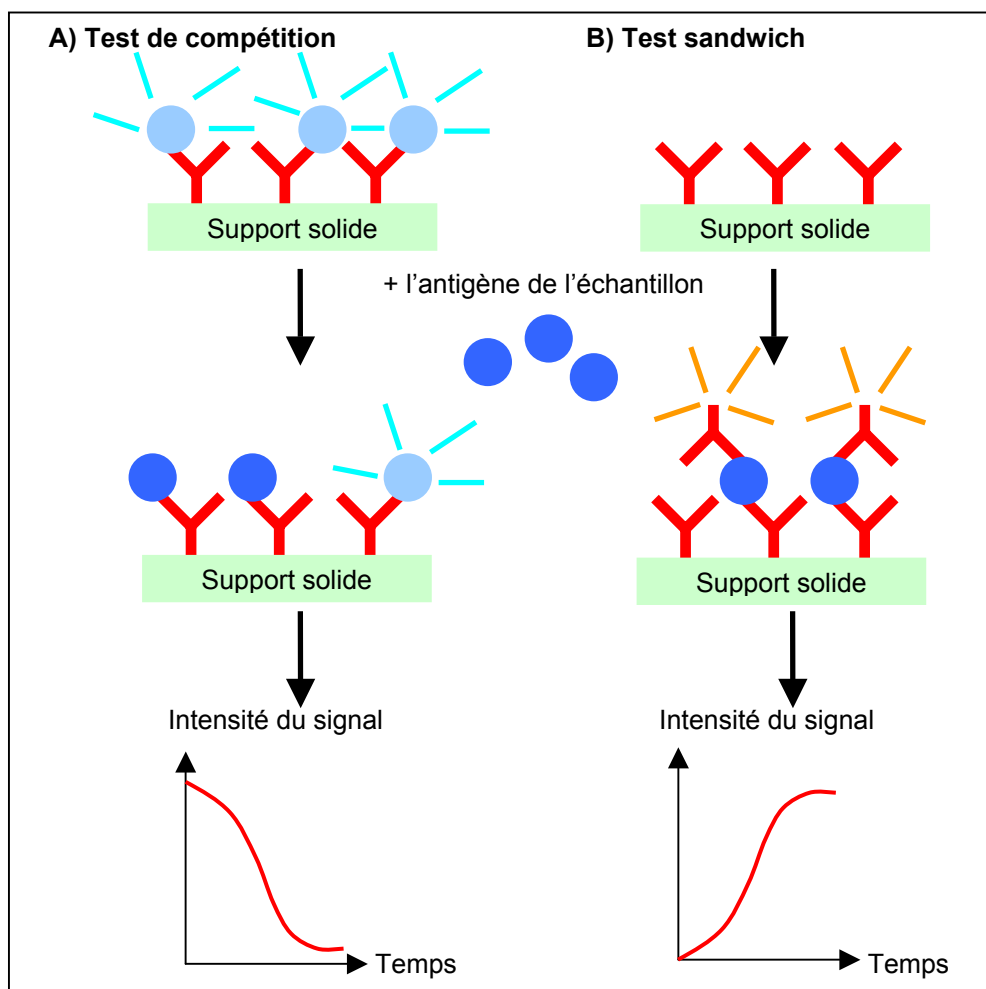


Figure 38 : Schéma illustrant le principe de la méthode indirecte d'immunodosage. **A)** Test de compétition. **B)** Test sandwich.

• **Les marqueurs**

Les deux tests décrits ci-dessus nécessitent l'usage de marqueurs qui sont :

- soit des radioéléments dans le cadre de dosages radio-immunologiques ou RIA (Radio ImmunoAssay),
- soit des enzymes s'agissant de dosages immuno-enzymatiques ou EIA (Enzyme ImmunoAssay).

6.1.2.3. CONCLUSIONS RELATIVES A L'IDENTIFICATION IMMUNOLOGIQUE

Les méthodes d'analyses reposant sur l'usage des anticorps sont généralement sensibles et spécifiques. Elles présentent l'avantage de ne pas nécessiter un traitement particulier de l'échantillon. En effet, les antigènes bactériens détectés sont majoritairement situés sur la surface de la bactérie.

Une autre possibilité réside dans la détection d'une toxine ou d'une molécule sécrétée par la bactérie.

Par contre, toutes ces méthodes immunologiques exigent la synthèse d'anticorps spécifiques aux antigènes. Les anticorps doivent être spécifiques afin de réduire les réactions croisées qui peuvent avoir lieu avec des antigènes de bactéries n'ayant aucun rapport avec celle que l'on cherche à détecter. En effet, lorsque ces tests portent sur des échantillons prélevés dans l'environnement, les anticorps sont susceptibles de présenter de l'affinité pour des antigènes compétiteurs de ceux que l'on recherche (faux-positifs).

Par ailleurs, il n'existe pas, aujourd'hui, de tests immunologiques multiplex, c'est-à-dire capables de détecter, en une seule expérience, plusieurs genres, voire espèces, de bactéries présentes dans un échantillon.

Ce type d'identification ne permet de détecter que ce que l'on cherche. En effet, la sélection des anticorps impose l'identification d'espèces bactériennes prédéterminées.

De plus, l'échantillon n'étant soumis à aucun traitement, la pathogénicité de ce dernier subsiste lors des analyses immunologiques sauf s'il est fixé sur un support solide.

En comparaison à l'immunodosage, les méthodes directes d'analyses sont moins sensibles. La majorité d'entre elles nécessite un enrichissement cellulaire par culture.

En outre, s'agissant de l'immunodosage, il n'est pas toujours possible de produire un bioréactif marqué. Les temps d'analyses durent plusieurs heures et du personnel qualifié de laboratoire d'analyse est nécessaire pour ce genre d'expérimentation.

6.1.3. IDENTIFICATION GENETIQUE

L'analyse par voie génétique utilise :

- la PCR, procédé qui amplifie les ADN de l'échantillon et qui augmente la quantité de matériel génétique, favorisant ainsi la sensibilité de la détection,
- le marquage radioactif, fluorescent ou chimiluminescent des acides nucléiques de l'échantillon.

6.1.3.1 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

La PCR est une technique qui implique l'usage d'amorces d'ADN (oligonucléotides), destinées à amplifier des régions spécifiques de génomes. Ces dernières années, la PCR a connu un essor considérable, en particulier dans le domaine du diagnostic médical.

Cette technique sensible permet d'obtenir une quantité détectable d'acides nucléiques à partir de quelques cellules bactériennes recueillies dans un échantillon. Sa spécificité varie selon le degré de sélection appliqué lors du choix des amorces.

En 1999, Belgrader *et al.* sont parvenus à détecter, par PCR, des bactéries en 7 minutes, ce temps incluant celui de traitement de l'échantillon (cf. §6.2.). Leurs résultats sont obtenus en temps réel, c'est-à-dire que le signal est mesuré et visualisé sur un écran simultanément au déroulement de la PCR.

La même année, Lee *et al.* ont utilisé le Lightcycler™ pour détecter la présence de quelques bactéries de *Bacillus anthracis*. Le Lightcycler™ appartient à une génération récente d'appareil dont la durée de PCR est réduite en raison d'une plus grande vitesse de transition des températures (jusqu'à 20°C par seconde). De plus, ce système est couplé à un fluorimètre qui permet une analyse en temps réel des produits issus de la PCR.

Néanmoins, la PCR repose sur l'utilisation d'une enzyme, la Taq polymérase, qui s'est avérée sensible à certains interférents de l'environnement (Alvarez *et al.*, 1995, Tsai et Olson, 1992). En 1992, Tsai et Olson ont testé différentes méthodes de purification d'ADN provenant de sédiments. Ils ont montré que certains composants de l'humus pouvaient inhiber la PCR. Or, ces inhibiteurs sont susceptibles d'être présents dans d'autres prélèvements de l'environnement (eau, air). Ces auteurs ont également souligné que l'inhibition de la PCR pouvait être levée en diluant l'échantillon.

A l'image de l'identification immunologique, la PCR présente également l'inconvénient de ne détecter que ce que l'on cherche, du fait de la sélection des amorces. En effet, ce sont ces dernières qui, dans un mélange complexe d'ADN, détermineront si une espèce est présente ou non. Par contre, elles ne permettent pas de révéler la présence d'une espèce inconnue.

6.1.3.2. SONDÉS

- **Méthode directe**

Après lyse cellulaire, les ADN de l'échantillon sont marqués puis hybridés à des ADN d'espèces connues (ADN de référence) qui sont préalablement immobilisés sur un support solide. Les ADN marqués qui interagissent de façon non-spécifique avec les ADN immobilisés sur le support solide sont éliminés par lavage. Le signal mesuré est proportionnel à la quantité des ADN marqués qui restent hybridés aux ADN de référence.

- **Méthode sandwich**

Une sonde « de capture » et une sonde « de lecture » ou « de détection » sont synthétisées. La sonde de capture, fixée à un support solide, immobilise les ADN de l'échantillon et facilite leur sélection dans un mélange complexe d'ADN tandis que la sonde de détection ou de lecture permet la révélation de l'hybridation ADN-sonde de capture.

- **Les marqueurs**

Il existe plusieurs catégories de marqueurs selon les techniques de détection employées.

- **Radiomarquage**

Les ADN peuvent être radiomarqués par voie enzymatique en utilisant le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I et un nucléotide marqué par un radio-élément : il s'agit de la méthode dite de « random-priming » ou amorçage aléatoire. Ce procédé consiste à incorporer le nucléotide en divers endroits d'un brin d'ADN. Le radiomarquage présente l'inconvénient d'être une méthode comportant un risque biologique lié à l'utilisation du radio-élément, mais l'avantage d'être une technique bien maîtrisée et sensible.

- **Fluorescence et chimiluminescence**

La fluorescence et la chimiluminescence (marquages dits froids) sont des substituts au marquage radioactif (marquage dit chaud). Ce procédé repose sur l'incorporation de nucléotides modifiés (par la fluorescéine ou la biotine, par exemple) par le fragment de Klenow. La gêne stérique provoquée par la molécule de fluorescéine ou de biotine entraîne l'incorporation d'un nombre de nucléotides modifiés inférieur au nombre de nucléotides incorporés pendant le radiomarquage.

La détection repose sur une réaction intermédiaire de forte spécificité. Dans le cas de la biotine, l'interaction a lieu avec une molécule de streptavidine couplée à une enzyme. De même, la fluorescéine réagit avec un anticorps anti-fluorescéine également couplé à une enzyme. Pour chaque réaction, l'enzyme catalyse la formation d'un produit coloré ou qui émet un signal fluorescent ou chimiluminescent en fonction du substrat initial.

Dans le cadre d'applications qui requièrent un minimum de manipulation, l'ADN marqué par la fluorescéine est directement détecté sans amplification enzymatique du signal.

Les sondes oligonucléotides sont généralement marquées à une extrémité à l'aide de la polynucléotide kinase T4. Ce procédé ne permet l'incorporation que d'une seule molécule de marqueur par oligonucléotide. Il est donc moins sensible qu'un marquage par « random-priming » qui permet, au contraire, l'incorporation de plusieurs marqueurs par molécule d'ADN.

- Sonde « Molecular beacon »

Ces sondes, simple brin, se caractérisent par une structure en « épingle à cheveux ». Elles sont, effectivement, composées d'une séquence cible portant sur chacune de ses extrémités des séquences terminales complémentaires. Une de ces deux séquences porte à son extrémité un groupe fluorophore tandis que l'autre séquence est liée à un groupe « quencher », responsable de l'extinction de la fluorescence. En absence de la séquence cible, elles sont hybridées l'une à l'autre et forme une structure stable en « épingle à cheveux ». Ainsi, les deux groupes se trouvent à proximité l'un de l'autre, provoquant l'extinction (ou « quenching ») de la fluorescence. Lorsque la sonde rencontre la molécule cible, elle forme un hybride plus long et plus stable que la structure en « épingle à cheveux ». Ce changement conformationnel de la sonde entraîne la séparation des deux séquences complémentaires et provoque l'éloignement du « quencher » par rapport au fluorophore. Ce dernier est alors capable d'émettre de la fluorescence quand il est illuminé à une certaine longueur d'onde (Tyagi et Kramer, 1996, Piatek *et al.*, 1998).

6.1.3.3. CONCLUSIONS RELATIVES A L'IDENTIFICATION GENETIQUE

L'analyse génétique se révèle plus sensible et spécifique que l'analyse immunologique, tout en étant plus lourde de mise en œuvre et plus lente. La lyse cellulaire permet la perte de pathogénicité de l'échantillon. L'inconvénient résulte de l'impossibilité de réutiliser l'échantillon si le procédé de traitement évolue. Il est donc nécessaire de diviser l'échantillon en un nombre suffisant d'aliquotes avant de lyser l'échantillon.

La PCR présente l'avantage d'amplifier la quantité d'ADN à détecter. Par contre, l'utilisation d'enzymes, lors de la PCR ou de l'étape de marquage, dans l'analyse de

prélèvements atmosphériques, comporte souvent des limites liées, notamment, à l'inhibition par des éléments interférents de l'environnement.

Dans le cadre de la détection de « contrôle », il apparaît donc nécessaire de réduire au minimum l'utilisation d'enzymes. La difficulté principale réside dans le traitement de l'échantillon afin de rendre l'ADN accessible aux analyses et d'éliminer, ou de diluer, les effets inhibiteurs des éléments interférents sans, toutefois, affecter la sensibilité de détection.

6.1.4. SUPPORTS POUR LA MISE EN ŒUVRE DE L'IDENTIFICATION

Ce paragraphe est consacré aux supports d'analyse disponibles pour des identifications, utilisant indifféremment des protéines, des anticorps ou de l'ADN. On distingue deux grandes catégories de « support » :

- les biosenseurs qui vont traduire leur « sensibilité » à une interaction biologique en un signal physique mesurable,
- les biocapteurs, tels que les billes, les membranes ou les puces à ADN, qui se contentent de « capter » les molécules. Il est alors nécessaire d'inclure une autre molécule marquée pour obtenir un signal mesurable.

6.1.4.1. BIOSENSEURS

Un biosenseur est un appareil constitué d'une couche bioréceptrice couplée à un transducteur physicochimique (cf. figure 39). La couche bioréceptrice se compose de l'ensemble des molécules biologiques (anticorps, acide nucléique,...) couplées au transducteur et capables d'interactions moléculaires spécifiques. Lorsque l'analyte (antigène, acide nucléique,...) de l'échantillon interagit avec la couche bioréceptrice, le transducteur convertit l'interaction moléculaire en un signal physique mesurable. Ainsi, le signal est électrochimique lorsque la mesure porte sur une variation de voltage, optique lorsqu'on examine celle d'une longueur d'onde d'une lumière spécifique, calorimétrique s'agissant de changements de température, ou encore piézo-électrique en cas de mesure relative aux variations de masses (Bizet, 1997, Burlage, 1997).

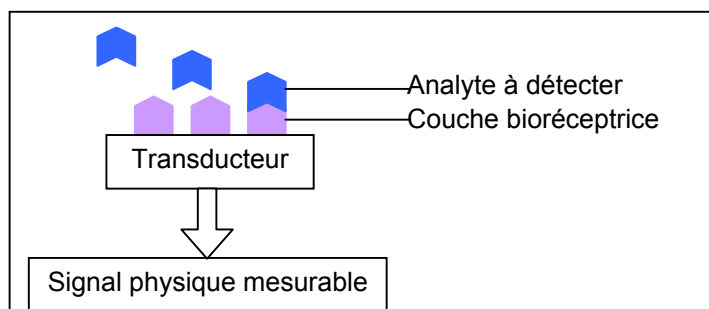


Figure 39 : Schéma d'un biocapteur.

6.1.4.2. BILLES

Ce système d'analyse se caractérise par l'immobilisation de molécules réceptrices (anticorps, acide nucléique,...) sur des billes en suspension (billes magnétiques ou en latex). L'analyte (antigène, acide nucléique,...) que l'on souhaite détecter dans l'échantillon est capturé par la molécule réceptrice (Huang *et al.*, 1994 et 1996, Rudi *et al.*, 1997).

Dans le cas de billes magnétiques, des lavages successifs permettent de purifier l'analyte qui est retenu par la molécule réceptrice. L'analyte peut ensuite être décroché des billes magnétiques afin d'être soumis à des analyses d'identification. Ce système est disponible commercialement.

En 1997, grâce à cette méthode, Rudi *et al.* ont amplifié, par PCR, l'ADN de diverses espèces retenu sur les billes magnétiques.

6.1.4.3. « MACROARRAYS » ET « MICROARRAYS »

On distingue les « macroarrays » et les « microarrays » (Jordan, 1998).

Les « macroarrays » sont des membranes de nylon sur lesquelles l'ADN cible est disposé régulièrement. L'hybridation de la sonde complémentaire permet de mesurer des signaux au moyen d'écran photosensible. Des robots existent dans le commerce pour déposer les ADN sur ces membranes. La densité des ADN sur les « macroarrays » varient de quelques dizaines à quelques centaines de dépôts par cm². La détection emploie essentiellement la radioactivité.

Les « microarrays », plus récents, comportent plusieurs milliers de dépôts sur une lame de verre traitée. Ces dépôts sont exclusivement exécutés par un robot. La densité s'élève à environ 2 000 dépôts par cm² (Schena *et al.*, 1995 et 1996, DeRisi *et al.* 1996, Jordan, 2000).

6.1.4.4. PUCES A ADN

• Définition

Une puce à ADN est constituée d'un réseau dense et régulier de microsursaces auxquelles correspond une adresse individuelle. Sur chacune de ces microsursaces, sont greffées plusieurs sondes qui sont des molécules d'ADN simple brin de même séquence, généralement des oligonucléotides. Ces sondes sont hybridées aux ADN cibles marqués, issus de l'échantillon en solution. Après avoir lavé la surface, afin d'éliminer les molécules qui n'ont pas interagi de façon spécifique, les signaux émis par les molécules marquées sont mesurés et analysés (Bellis et Casellas, 1997, Le Toullec, 1998).

Il existe différentes puces à ADN utilisant plusieurs méthodes d'immobilisation des sondes sur divers supports solides. Cinq des principaux procédés sont présentés ci-dessous :

- deux ont été décrits par Southern et Mirzabekov,
- trois ont été développés par les sociétés Affimétrie[®], Nanogen[®] et CIS bio international.

• Procédé de Southern

Ce procédé (Southern *et al.*, 1994) repose sur la synthèse *in situ* d'oligonucléotides en superposition. Une base est ajoutée dans une surface définie et délimitée par un masque. Avant chaque nouvelle synthèse, le masque est déplacé d'un pas fixé et toujours dans la même direction (cf. figure 40). Des sondes oligonucléotidiques de tailles différentes sont donc synthétisées. Le support est en verre et le système d'adressage (déplacement du masque) est mécanique.

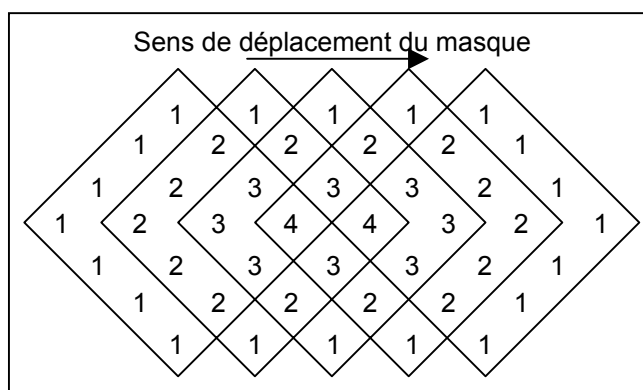


Figure 40 : Schéma de la synthèse *in situ* selon le procédé de Southern (1994) dans le cas où le masque a la forme d'un losange. Les chiffres indiquent le nombre total de bases par oligonucléotide après passage du masque aux cinq positions.

• Procédé de Mirzabekov

Dans ce procédé décrit par Yershov *et al.* en 1996, le support en verre est constitué de plusieurs petits blocs de gel de polyacrylamide. Les oligonucléotides sont greffés chimiquement sur les blocs de polyacrylamide activés. L'adressage des oligonucléotides sur la puce est mécanique et est réalisé au moyen d'une micropipette robotisée prélevant 1 nl.

• Procédé Affimétrie[®]

Affimétrie[®] a mis au point la méthode VLSIPS (Very Large Scale Immobilized Polymer Synthesis) (cf. figure 41). Cette méthode permet de synthétiser *in situ* des oligonucléotides par adressage photochimique. Le support en verre porte des groupements photolabiles qui sont recouverts d'un masque photolithographique de forme définie. Après exposition à la lumière, les sites non recouverts sont activés. Sur ces groupes activés, un nucléoside peut être couplé. L'application d'un nouveau masque et l'illumination d'autres sites permettent l'ajout d'un deuxième nucléoside. En moyenne, un quart des sites est concerné pour chaque synthèse (McGall *et al.*, 1996).

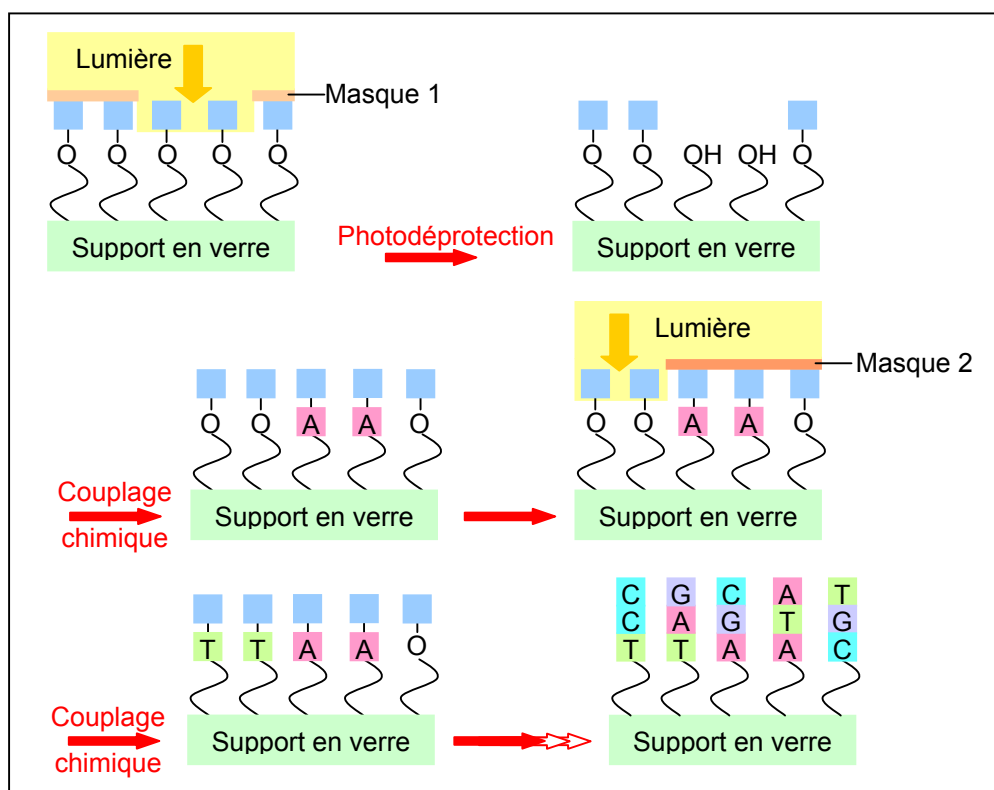


Figure 41 : Schéma décrivant le procédé Affimétrie[®] (Le Toullec, 1998).

• Procédé Nanogen®

Nanogen® a développé le système APEX (Automated Programmable Electronic matrix) (cf. figure 42). Cette puce est composée de plusieurs électrodes (25 ou 100 de platine ou d'or selon la génération de la puce) qui peuvent être contrôlées individuellement par un champ électrique et qui servent chacune de microsurface d'hybridation (Cheng *et al.*, 1998, Edman *et al.*, 1997, Heller *et al.*, 2000, Sosnowski *et al.*, 1997). Ainsi, la création d'un champ électrique, au niveau d'une micro-électrode, permet l'adressage des sondes et leur fixation séquentielle au support solide, l'accélération de l'hybridation et l'amélioration de la spécificité du signal par la « stringence électronique » (adaptation locale du champ électrique pour éliminer sélectivement les molécules cibles ayant interagi de façon non-spécifique avec les sondes immobilisées ou le support).

Le tampon d'hybridation en présence du champ électrique est peu salin et à base d'histidine.

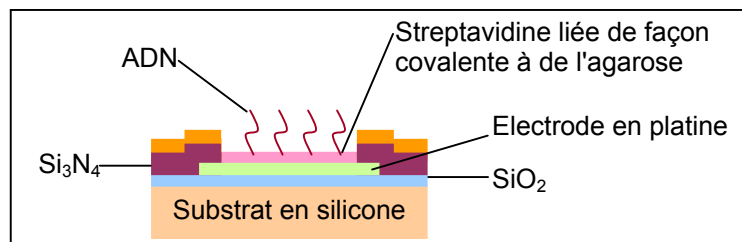


Figure 42 : Schéma de la coupe d'une électrode de puce à ADN Nanogen® (Sosnowski *et al.*, 1997).

• Procédé Cis Bio International

Le procédé Cis Bio International (Livache *et al.*, 1994, 1998) utilise un procédé d'adressage presque similaire à celui de Nanogen®. Cependant, l'adressage n'intervient que dans l'étape de fixation de l'oligonucléotide de capture, et non pour l'accélération de l'étape d'hybridation. La puce est composée de plusieurs micro-électrodes contrôlées individuellement. Les oligonucléotides destinés à être immobilisés sont liés de façon covalente à un groupement pyrrole (cf. figure 43A). Ils sont ensuite dirigés par l'intermédiaire d'un champ électrique vers une micro-électrode activée, où ils sont copolymérisés en présence de pyrrole libre (cf. figure 43B).

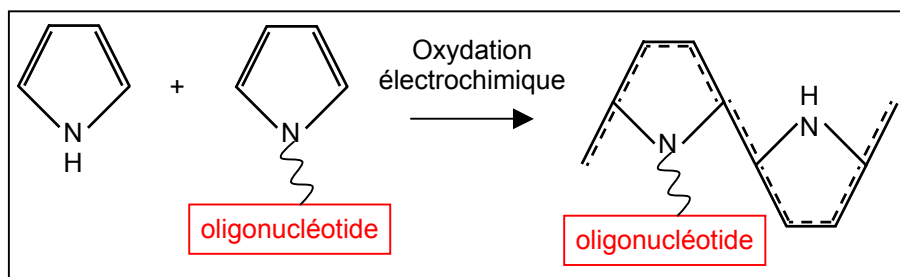


Figure 43A : Réaction de copolymérisation entre le pyrrole et le pyrrole lié de façon covalente à l'oligonucléotide (Livache *et al.*, 1998).

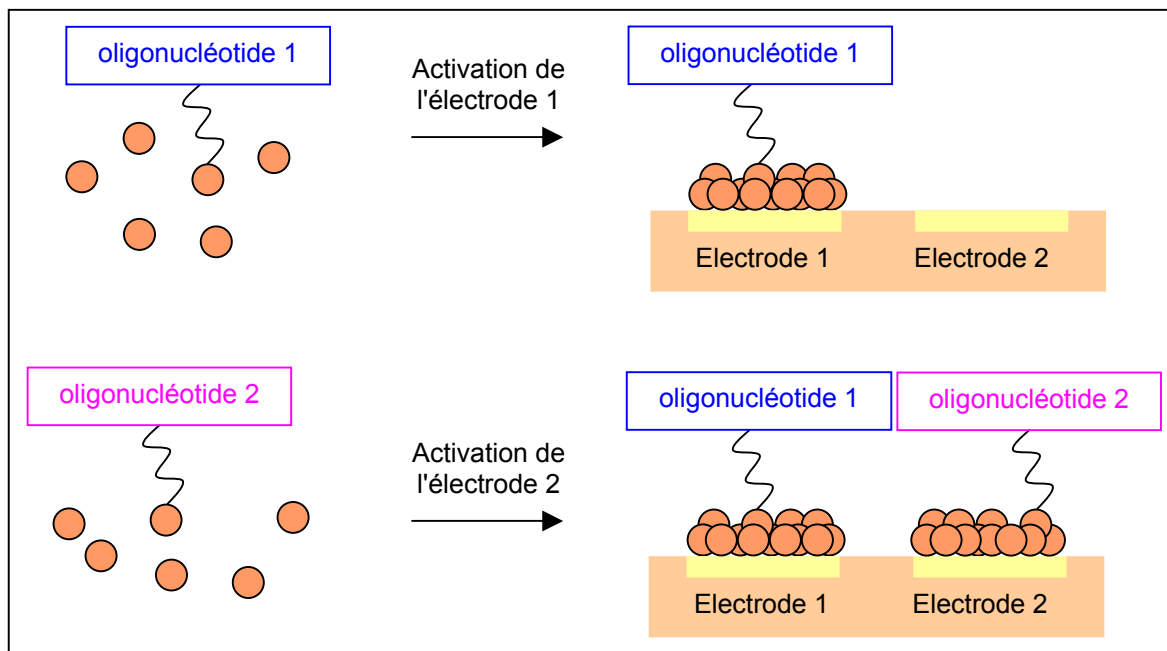


Figure 43B : Schéma du procédé Cis Bio International (Livache *et al.*, 1998).

6.1.4.5. CONCLUSIONS RELATIVES AUX SUPPORTS SERVANT POUR L'IDENTIFICATION

Aujourd'hui, lorsqu'on les compare aux méthodes de biologie moléculaire existantes, les biosenseurs disponibles ne montrent pas une sensibilité suffisante au vu des besoins exprimés. De plus, la synthèse de la couche bioréceptrice exige parfois de modifier la molécule réceptrice qui la constitue.

Les puces à ADN constituent un domaine dont les récents développements bénéficieront aux autres techniques de biologie moléculaire, et réciproquement. S'agissant des puces à ADN, les efforts ont essentiellement porté sur les supports utilisés, sur les moyens d'immobiliser les sondes sur ces surfaces et sur la miniaturisation du système. Ceci permet d'analyser pour chaque échantillon plusieurs centaines voire plusieurs milliers de sondes.

6.1.5. SYNTHÈSE

En définitive, sur les différentes méthodes proposées (cf. tableau 1), l'analyse génétique a été retenue pour la poursuite du projet. Néanmoins, les risques d'inhibition, liés à l'utilisation d'enzymes, suggèrent de limiter leur emploi. On évitera, par exemple, de coupler deux techniques, telles que la PCR et le marquage enzymatique du matériel génétique, utilisant chacune d'elles une enzyme différente. L'effort portera principalement sur les contraintes de temps imposées par les Etats-Majors.

La PCR et l'immuno-analyse, qui nécessitent de choisir respectivement des amorces et des anticorps spécifiques, ne favorisent pas l'identification d'espèces inconnues. De la même façon, les tests biochimiques ne permettent de caractériser que les espèces dont les profils sont déjà présents dans les bases de données.

La question se pose alors de savoir comment une espèce bactérienne inconnue peut être identifiée.

Afin de répondre à cette question, les OGM constituent un exemple applicable pour tous les procédés de détection. Lorsque la modification génétique affecte une protéine de surface normalement reconnue par un anticorps, l'OGM peut alors demeurer invisible au système d'identification. De même, si la modification génétique se situe au niveau du site d'amorçage de la PCR, l'amplification de la cible sera limitée, ce qui empêche la détection de l'organisme. En ce qui concerne les tests biochimiques, alors qu'il est pathogène, l'OGM pourrait reproduire le profil d'un organisme non pathogène.

Par contre, un OGM a plus de chance d'être détecté par une méthode basée sur l'hybridation de son ADN marqué à des génomes complets d'ADN de référence. En effet, une fraction de l'ADN modifié pourra s'hybrider à la fraction de génome qui lui ressemble, dans la mesure où la collection de génome de référence est suffisamment importante.

6.2. MATCI ET ANAA

Le MATCI (Miniature Analytical Thermal Cycling Instrument) et l'ANAA (Advanced Nucleic Acid Analyzer) sont deux appareils PCR récemment développés par une équipe américaine (Belgrader *et al.*, 1998a, 1998b, 1999a, Northrup *et al.*, 1998).

Leur objectif est d'élaborer un système qui soit autonome pendant au moins 24 heures et capable de détecter, d'identifier et de quantifier automatiquement les agents impliqués dans la menace biologique. Le seuil de détection imposé s'élève à 1 ACPLA (Agent-Containing Particle per Liter of Air), ce seuil étant augmenté en présence des bruits de fond naturels de l'environnement (gaz d'échappement, pollens, spores et bactéries non pathogènes,...). Le temps de manipulation doit être inférieur à 20 minutes pour la détection de 5 ACPLA ou plus et inférieur à 35 minutes pour la caractérisation de 1 ACPLA (Belgrader *et al.*, 1998b).

Afin de répondre à toutes ces contraintes, Northrup *et al.* ont développé en 1998 un appareil de première génération, le MATCI. Ce système transportable ne comprend qu'une seule chambre réactionnelle en silicone dont le système de chauffage permet une forte variation de température en un temps très court et dont l'uniformité thermique est conservée pendant la PCR. La réaction de PCR a donc lieu dans cette chambre en présence des différents réactifs nécessaires. Le système permet la détection, en temps réel et par fluorescence, de l'accumulation des produits PCR grâce à l'intégration dans la chambre réactionnelle d'un système de micro-électrophorèse. Grâce au MATCI, une PCR de 35 cycles dure environ 20 minutes. Les résultats sont visualisés en temps réel sur un ordinateur portable, alimenté par une batterie. L'instrument complet occupe le volume d'une mallette.

L'ANAA est un appareil de deuxième génération, identique au MATCI, qui comprend dix chambres réactionnelles. De plus, il possède une alerte visible et sonore qui se déclenche lorsque le signal mesuré est positif. En 1998, Belgrader *et al.* ont démontré que les dix chambres réactionnelles étaient uniformes les unes par rapport aux autres dans leurs profils de chauffage, de refroidissement et de détection. L'ANAA est capable de détecter 10^4 spores/ml en 18 minutes et 10^6 spores/ml en 26 minutes. La limite de détection est de 10^2 cellules végétatives (*Erwinia herbicola*)/ml, de 10^3 spores de *Bacillus*/ml et de 10^4 virions MS2/ml (Belgrader *et al.*, 1998a).

En 1999, après quelques améliorations sur l'ANAA, la même équipe (Belgrader *et al.*, 1999a) est parvenue à détecter, par PCR, 500 cellules bactériennes végétatives en 7 minutes. Cet appareil est donc un système de détection très rapide. Il présente les avantages d'être portable et opérationnel. Il permet une détection en temps réel de la présence de pathogènes dans un échantillon. La sensibilité de l'ANAA est aussi forte pour des virus à ADN que pour des bactéries du fait de l'approche utilisée (PCR). Elle est élevée pour chaque chambre réactionnelle.

Cependant, ce système très sensible n'est pas multiplex : l'échantillon doit être réparti dans les dix chambres réactionnelles. La sensibilité globale de l'appareil doit donc être divisée par le nombre de réactions réalisées en parallèle.

L'ANAA ne permet de retrouver que ce que l'on cherche. En effet, à une chambre réactionnelle correspond une réaction PCR et donc une amorce spécifique d'espèce. Par conséquent, les espèces pathogènes non représentées dans ce système ne seront pas identifiées.

En outre, le système n'est pas testé en présence d'interférents tels que ceux qui peuvent être rencontrés dans le sol, l'eau ou l'air et qui sont susceptibles d'inhiber la PCR. L'inhibition, si elle existe, pourrait être levée :

- soit en diluant l'ADN et donc l'inhibiteur, ce qui affecte le temps de détection,
- soit en purifiant l'ADN ce qui éliminerait l'inhibiteur mais réduirait le seuil de sensibilité de l'appareil.

6.3. PRESENTATION DU PROJET DE THESE RELATIF A L'ETUDE DE FAISABILITE D'UN SYSTEME DE DETECTION

Le projet de détection a pour but de valider la faisabilité d'un système capable de détecter, en une heure, quelques centaines de bactéries présentes dans des prélèvements atmosphériques.

Voordouw *et al.* ont mis au point, en 1991, la technique « RSGP » (Reverse Sample Genome Probing) qui permet d'identifier des bactéries présentes dans des échantillons de l'environnement par hybridation de l'ADN génomique. Le procédé consiste à marquer les ADN cibles de l'échantillon et à les hybrider sur les génomes de référence immobilisés sur un support solide.

Cette équipe a également utilisé cette méthode pour isoler et caractériser des bactéries de l'environnement. Ces dernières peuvent alors être déposées sur le support solide et servir à l'identification d'autres échantillons (Voordouw *et al.*, 1991, 1992). Lors de ces études, l'enrichissement de l'échantillon par culture s'est avéré nécessaire afin d'avoir une sensibilité suffisante. En effet, les auteurs n'avaient déposé que quelques nanogrammes d'ADN sur leurs filtres.

En 1993, Voordouw *et al.* ont fixé de plus grandes quantités de matériel génétique sur les filtres afin d'accroître la sensibilité de la technique. Ceci a permis, d'une part, de supprimer la mise en culture de l'échantillon, sans perte de sensibilité, et, d'autre part, de rendre la méthode quantitative.

Le procédé que nous utiliserons pour ce projet de détection repose sur cette méthode, élaborée et expérimentée sur des prélèvements de l'environnement.

Comme précisé dans le paragraphe 6.1.3.3., l'objectif est de réduire au minimum l'utilisation d'enzymes dans la procédure de « détection de contrôle ». Cette étude explore la possibilité de réaliser une détection de type « puce à ADN », sans préamplifier le matériel génétique.

6.3.1. CONSIDERATIONS QUALITATIVES

Comme décrit dans l'introduction, le système de détection doit répondre à plusieurs contraintes :

- Etre mobile et utilisable sur le terrain avec un encombrement minimal,
- Etre robuste, simple à utiliser et à risque biologique contrôlé,
- Etre insensible aux éléments interférents du champ de bataille tels que les produits de combustion, les gaz d'échappements, etc.,
- Répondre à la complexité et à la diversité de l'environnement biologique et ne pas déclencher de faux-positifs intempestifs,
- Etre générique et sensible car, la menace biologique étant relativement mal définie, la détection ne doit pas être trop ciblée.

6.3.2. CONSIDERATIONS QUANTITATIVES

Ce paragraphe vise à établir le seuil de sensibilité théorique du système de détection (Belgrader *et al.*, 1998b).

La quantité d'ADN dans une cellule bactérienne peut être calculée d'après la formule suivante :

$$Q = \frac{n \times m}{N_A}$$

où Q : masse d'ADN dans une cellule bactérienne (en g)

n : nombre de base pour l'espèce bactérienne considérée

m : masse moléculaire moyenne d'une paire de bases = 649 Da

N_A : nombre d'Avogadro = 6.10^{23}

Une cellule bactérienne de *Bacillus anthracis* contient donc environ 5.10^{-3} pg d'ADN, sachant que la taille du génome de *Bacillus anthracis* est de 4,5 Mb.

L'armée américaine a estimé que 8 000 à 50 000 spores de *Bacillus anthracis* (soit 40 à 250 pg d'ADN) sont mortelles pour l'homme (Franz *et al.*, 1997). Un ACPLA (Agent-Containing Particle per Liter of Air) de *Bacillus anthracis* correspond à une particule de *Bacillus anthracis* qui pourrait contenir jusqu'à 15 spores de cette espèce bactérienne (Belgrader *et al.*, 1998b).

Un homme moyen inspire environ 7 litres d'air par minute (Stetzenbach, 1997). Avec une forte efficacité de dépôt des spores sur les parois du système respiratoire et en présence de 1 ACPLA de *Bacillus anthracis* (à raison de 15 spores par particule), il reçoit la dose mortelle d'environ 8 000 spores en 80 minutes.

Un collecteur de type Cyclone dont le débit est fixé à 1 000 litres d'air par minute a un rendement de 30 à 50% dans la gamme de taille de 1 à 10 μm (fraction pulmonaire) (Stetzenbach, 1997). En présence d'un nuage bactérien à une concentration de 1 ACPLA (à raison de 15 spores par particule), ce collecteur prélève entre 4 500 et 7 500 spores en 1 minute (soit quelques dizaines de picogrammes d'ADN).

Considérant la limite de 1 ACPLA imposée par les Etats-Majors, il a été décidé de fixer le seuil de sensibilité de détection à environ 1 000 spores (soit 5 pg d'ADN) dans l'échantillon, afin que ce seuil ne soit pas mortel même s'il peut être incapacitant.

6.3.3. PROCEDE

Une microbalance à cristal de quartz (QCM) a été testée en collaboration avec le Laboratoire de Physique des Liquides et Electrochimie (Université Paris 6).

Les résultats sur la QCM étant jugés insatisfaisants au vu de ce qu'il était possible d'obtenir dans un laboratoire de biologie moléculaire, la démarche pour le projet de détection a été redéfinie.

Le nouveau support utilisé est constitué d'une membrane de nylon sur laquelle les ADN d'espèces bactériennes connues sont immobilisés. Le traitement de l'échantillon, le marquage des ADN de l'échantillon, leur hybridation au support solide et la mesure du signal émis nécessitent de tester différents produits disponibles dans le commerce.

Ces produits sont choisis pour leur capacité à fournir une sensibilité suffisante et à réduire le temps et le nombre de manipulations.

6.4. MICROBALANCE A CRISTAL DE QUARTZ (QCM)

L'ambition de ce paragraphe est d'évaluer l'adéquation de la microbalance à cristal de quartz (QCM ou Quartz Crystal Microbalance) aux objectifs du projet de détection.

Le composé biologique actif est constitué par l'ADN de référence qui doit être fixé sur un support solide, l'une des deux électrodes d'or dans le cas présent, l'autre servant au passage du courant (cf. figure 61).

Deux moyens sont donc envisagés afin d'immobiliser l'ADN :

- la première méthode consiste à mesurer en temps réel la masse d'ADN portant des groupes sulfhydriles et capable de se fixer sur la surface de l'électrode par simple passage de la solution (cf. figure 62) ;
- la deuxième repose sur l'évaporation de cette même solution d'ADN (cf. figure 63).

Après le dépôt d'ADN sur la QCM, une sonde d'ADN complémentaire est préparée en présence du kit E+. Les QCM sont ensuite hybridées dans le tampon Church en présence de cette sonde afin, d'une part, de vérifier l'efficacité de l'immobilisation et, d'autre part, d'estimer la masse d'ADN fixé sur le support et participant à la réaction d'hybridation.

6.4.1. MESURE EN TEMPS REEL DE LA MASSE D'ADN FIXE PAR CIRCULATION

La circulation d'une solution d'ADN, portant des groupes sulfhydriles capables d'interagir avec l'or de l'électrode, permet de mesurer en temps réel la masse d'ADN qui se fixe à la surface.

D'après les caractéristiques techniques du kit utilisé (FasttagTM Biotin Labeling Kit), l'ADN porte environ un groupe sulfhydryle (-SH) toutes les 10 à 20 paires de bases (Daniel *et al.*, 1998).

Le type de résultat obtenu est présenté dans la figure suivante (cf. figure 44). La fréquence de résonance enregistrée lors du passage de la solution d'ADN diminue à mesure que l'ADN s'immobilise sur la surface.

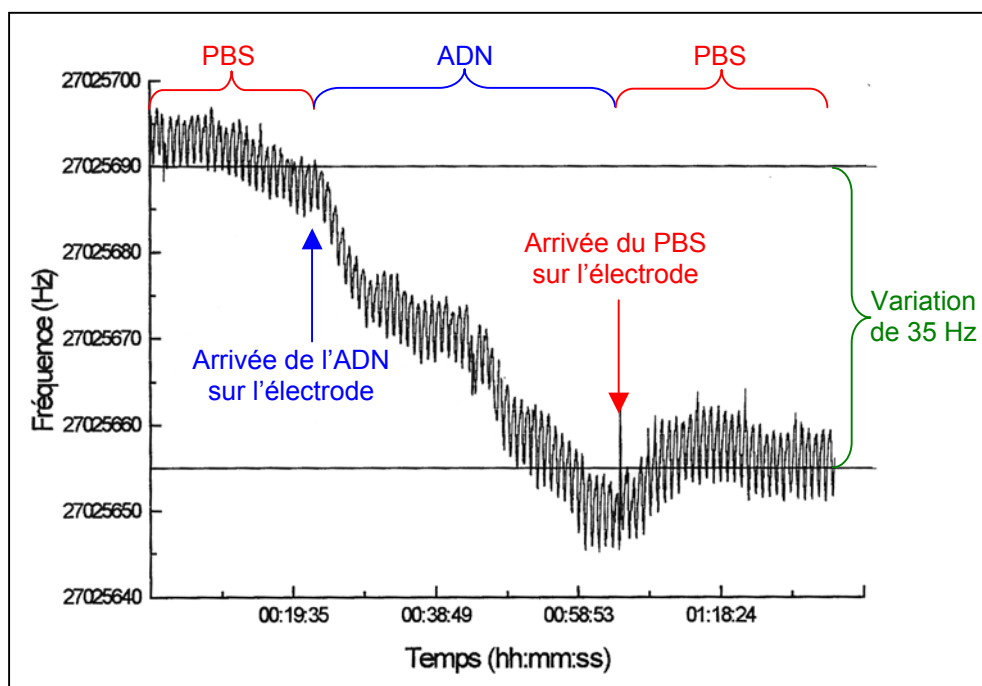


Figure 44 : Variation de la fréquence de résonance lors du passage d'ADN portant des groupes sulfhydriles à la surface de la QCM.
 PBS : Phosphate Buffered Saline.

Dans un premier temps, la circulation du tampon PBS à la surface de l'électrode d'or sert à stabiliser la fréquence de résonance du quartz. Quand celle-ci est stable, l'ADN dilué dans le tampon de circulation est déposé sur la surface d'or. On observe alors une diminution de la fréquence de résonance au fur et à mesure que la solution circule, ce qui suggère que de l'ADN s'immobilise effectivement sur l'électrode de la QCM. Enfin, une nouvelle circulation du tampon PBS permet d'éliminer l'ADN qui ne s'est pas immobilisé de façon covalente à la surface de l'électrode.

La variation de fréquence enregistrée est de 35 Hz. D'après l'équation de Sauerbrey, dont le coefficient de sensibilité théorique dépend des caractéristiques de la QCM (Bizet, 1997), cette variation correspondrait au dépôt d'environ 10 ng d'ADN sur l'électrode.

$$\Delta F = -k \cdot \Delta m$$

où ΔF : variation de fréquence (en Hz),

Δm : variation de masse (en g),

k : coefficient de sensibilité théorique (en $\text{Hz} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^2$),

avec $k = 54,95 \cdot 10^7 \text{ Hz} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ pour une microbalance à quartz oscillant à 27 MHz.

Cependant, ce coefficient n'est pas nécessairement adapté à l'évaluation de la masse d'un polymère tel qu'une molécule d'ADN. En effet, il est susceptible de surestimer la masse d'ADN fixé du fait de l'immobilisation de ce polymère en plusieurs points sur l'électrode d'or.

Afin d'estimer la quantité d'ADN disponible pour l'hybridation, parmi celle immobilisée sur le cristal de quartz, une sonde radioactive d'ADN complémentaire a été préparée. Le signal obtenu est comparé à celui produit par une gamme d'ADN, déposée sur une membrane Hybond-N+, de quantité connue et hybridée simultanément avec une même concentration de sonde en présence de tampon Church modifié.

Le signal mesuré, après l'hybridation du cristal en présence de la sonde complémentaire radiomarquée, correspond à une quantité de 1 à 2 ng d'ADN immobilisé.

La microbalance permet donc d'immobiliser facilement de 1 à 10 ng d'ADN portant des groupes sulfhydriles. La différence d'estimation de masse d'ADN fixé par les deux méthodes peut refléter :

- soit un éventuel décrochement de l'ADN lors de l'hybridation,
- soit une accessibilité réduite d'une fraction de l'ADN,
- soit un effet de masse apparente de l'ADN accru par sa structure de polymère,
- soit la combinaison de ces trois facteurs.

Les deux estimations sont donc en bon accord.

6.4.2. FIXATION PAR EVAPORATION

Trois solutions de volume identique (100 µl), contenant différentes concentrations d'ADN portant des groupes sulfhydriles, sont soumises à évaporation sur trois microbalances (cf. tableau 4).

Le signal mesuré, après l'hybridation de la QCM en présence d'une sonde complémentaire radiomarquée, permet d'estimer la masse d'ADN immobilisé sur l'électrode d'or, par comparaison avec l'intensité du signal produit par une gamme de dilution du même ADN non modifié et fixé sur une membrane de nylon chargée positivement.

Nom	Concentration en ADN (ng/µl)	Masse totale d'ADN déposée (ng)	Masse totale d'ADN estimée après hybridation (ng)
Témoin	0	0	0
QCM-ADN 1	10	1 000	6
QCM-ADN 2	40	4 000	25

Tableau 4 : Description des expériences menées sur les trois microbalances, l'une d'elles servant de témoin.

Les ADN sont dilués dans du tampon PBS. La dernière colonne présente les résultats obtenus après l'hybridation des QCM. La masse d'ADN capable de s'hybrider est estimée en comparant les signaux mesurés avec ceux obtenus lors de l'hybridation d'une membrane portant une gamme d'ADN.

En absence d'ADN sur la microbalance témoin, aucune mesure positive n'est enregistrée après l'hybridation. Les dépôts de 1 000 ng et de 4 000 ng d'ADN permettent de détecter, respectivement, l'équivalent de 6 ng et de 25 ng après l'hybridation.

Cette méthode simple permet d'immobiliser l'ADN beaucoup plus efficacement que la méthode par circulation, ou bien la durée d'application de cette dernière n'a pas été suffisamment longue. D'ailleurs, la pente de la droite (cf. figure 44) ne s'est pas infléchie, suggérant bien que l'électrode est encore loin de la saturation. En ce qui concerne l'immobilisation par évaporation, il est probable que la cristallisation du tampon PBS lors de l'évaporation ait bloqué la fixation. La dilution de l'ADN en présence d'un autre tampon est alors susceptible de favoriser l'hybridation de l'ADN immobilisé après l'évaporation de la solution.

6.4.3. CONCLUSIONS RELATIVES A L'UTILISATION DE LA QCM

Le composé biologique fixé sur la microbalance utilisée (27 MHz) doit, afin d'être détectable, induire une variation de fréquence d'au moins 10 Hz. Dans le cas de l'ADN, cette variation correspond à la fixation d'un minimum de 300 pg d'ADN.

La microbalance permet d'immobiliser, sur une électrode d'or de 5 mm de diamètre, quelques dizaines de nanogrammes d'ADN. Quant aux membranes de nylon, dont les résultats sont présentés dans le paragraphe suivant, elles sont capables de fixer environ 2 µg d'ADN sur des surfaces de 3 mm de diamètre (cf. §6.4.2. et §6.5.1.). Les densités d'ADN immobilisés s'élèvent donc à environ 5 ng/cm² sur la microbalance et à 14 µg/cm² sur une membrane de nylon chargée positivement.

Par conséquent, quelle que soit la méthode utilisée, l'immobilisation de l'ADN sur l'électrode d'or de la QCM demeure 1 000 fois moins efficace que celle opérée sur une membrane de nylon chargée positivement.

L'absence de caractère multiplex de l'approche s'ajoute à la faible capacité d'immobilisation de l'ADN et à la faible sensibilité de la QCM. En d'autres termes, les microbalances à cristal de quartz ne permettent pas de détecter en une seule expérience plusieurs ADN d'origines différentes.

Par conséquent, les données établissent que l'approche « microbalance à cristal de quartz » ne répond pas, aujourd'hui, aux exigences requises pour le système de détection, en particulier à celles tenant à la sensibilité et au caractère multiplex du système.

Ce moyen de détection est donc écarté jusqu'à de nouvelles évolutions.

6.5. EVALUATION DE MEMBRANES

Plusieurs membranes chargées positivement ont été comparées sur la base des critères suivants :

- leur capacité de fixation de l'ADN,
- leur efficacité d'hybridation,
- le bruit de fond qu'elles génèrent.

Une telle comparaison est nécessaire afin, d'une part, d'améliorer l'efficacité d'hybridation et, d'autre part, de diminuer le bruit de fond lié à la membrane. Cette optimisation a pour principale conséquence de réduire les temps d'acquisition, initialement de l'ordre de quatre heures s'agissant d'une sonde de 1 pg d'ADN ayant, elle-même, été hybridée pendant plusieurs heures.

Quatre membranes de nylon chargées positivement (cf. §MM.4.), provenant de fournisseurs distincts (ce qui n'implique pas que leurs fabricants sont différents), ont été comparées.

Chaque type de membranes comporte des dépôts d'ADN de levure. 10 ng d'ADN complémentaire sont radiomarqués pendant 15 minutes avec le kit DL, selon les instructions du fabricant (cf. §MM.6.). La sonde est ensuite répartie entre les quatre membranes (soit 2,5 ng d'ADN de levure par membrane). L'hybridation dure 1 heure à 65°C en présence du tampon d'hybridation Rapid-Hyb™.

6.5.1. CAPACITE DE FIXATION ET COMPORTEMENT D'HYBRIDATION

L'intensité du signal d'hybridation (bruit de fond déduit) de chacune des quatre membranes a été mesurée en fonction de la quantité d'ADN par dépôt (cf. figure 45).

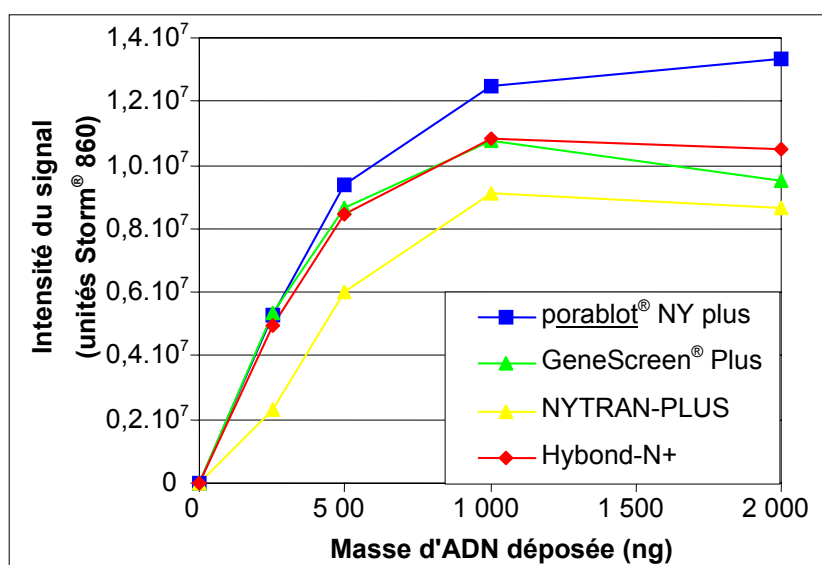


Figure 45 : Comparaison de l'efficacité d'hybridation sur des membranes chargées positivement.

Les membranes porablot[®] NY plus, GeneScreen Plus[®], NYTRAN-PLUS et Hybond-N+ sont respectivement représentées par des carrés (bleus), des triangles (verts), des ronds (jaunes) et des losanges (rouges).

D'après la figure 45, la membrane NYTRAN-PLUS (rond jaune) se caractérise par un signal d'hybridation inférieur aux autres membranes en tous points de la courbe. Les membranes GeneScreen Plus[®] (triangle vert) et Hybond-N+ (losange rouge) présentent une courbe d'hybridation similaire. La membrane porablot[®] NY plus (carré bleu) présente un signal d'hybridation légèrement supérieur aux autres membranes.

Le lot testé de membrane NYTRAN-PLUS présente donc de moins bonnes qualités d'hybridation que les trois autres membranes. De plus, une quantité de 1 µg d'ADN sature le dépôt d'ADN de 3 mm de diamètre.

Les lots de membranes GeneScreen Plus[®] et Hybond-N+ sont comparables et la saturation du dépôt est également atteinte pour 1 µg.

La membrane porablot[®] NY plus paraît la plus performante dans cet essai. En effet, sa courbe se dissocie progressivement des trois autres et la saturation ne semble pas encore atteinte quand 2 µg d'ADN sont filtrés par dépôt.

De plus, quelle que soit la membrane utilisée, il convient de noter que le signal n'est pas quatre fois plus élevé s'agissant du dépôt de 1 µg en comparaison à celui de 250 ng. Ce phénomène peut s'expliquer soit par un encombrement stérique intervenant sur la membrane, soit par sa saturation progressive.

6.5.2. SATURATION PROGRESSIVE

Au vu de ces premiers résultats, des essais complémentaires, avec deux membranes superposées, ont été réalisés.

L'organisation de la gamme d'ADN, fixée sur les deux membranes superposées, est exposée dans le tableau suivant (cf. tableau 5) :

0 ng	25 ng	50 ng	75 ng	100 ng	150 ng	200 ng	250 ng
0 ng	25 ng	50 ng	75 ng	100 ng	150 ng	200 ng	250 ng
300 ng	350 ng	400 ng	450 ng	500 ng	550 ng	600 ng	650 ng
300 ng	350 ng	400 ng	450 ng	500 ng	550 ng	600 ng	650 ng
700 ng							
700 ng							

Tableau 5 : Présentation de la disposition de la gamme d'ADN sur la membrane.

La figure 46, présentée ci-dessous, montre les résultats obtenus après l'hybridation, des membranes ainsi fabriquées, à une sonde complémentaire en présence de tampon RapidHyb™.

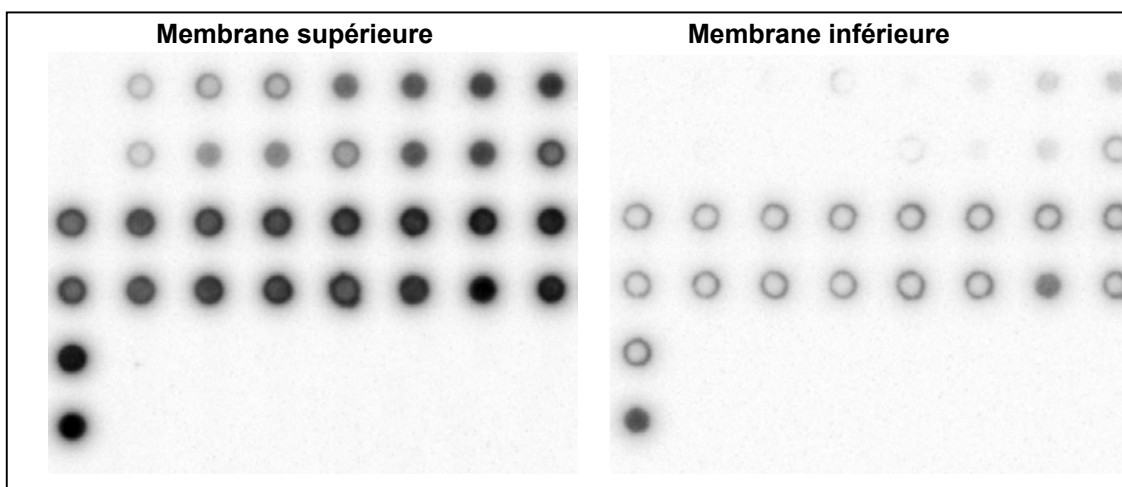


Figure 46 : Saturation progressive de la membrane de nylon.

La membrane « supérieure » est celle qui entre en premier en contact avec l'échantillon.

La membrane « inférieure » permet de visualiser la saturation.

Dans la figure 46, il apparaît clairement que la saturation de la membrane débute dès le dépôt correspondant à 300 ng d'ADN. En effet, le signal est visible sur la membrane inférieure pour cette quantité d'ADN. En outre, il s'accroît à mesure que la masse d'ADN par dépôt augmente.

Par conséquent, ces résultats confirment le phénomène de saturation progressive des membranes lors du dépôt de grandes quantités d'ADN.

6.5.3. ÉVALUATION DU BRUIT DE FOND GÉNÉRE PAR LES MEMBRANES TESTÉES

Sur la base des mesures d'intensité de signal relevées, lors de la comparaison des quatre membranes (cf. §6.5.1.), on calcule un rapport signal sur bruit pour chaque membrane. Ce dernier est établi à partir :

- des intensités relevées pour les dépôts contenant 1 µg d'ADN, qui présentent le plus fort signal,
- des intensités mesurées sur la même membrane, pour une surface équivalente, au niveau du dépôt correspondant au témoin négatif.

Ce rapport permet de mieux cerner les différences qui peuvent exister entre les membranes car il prend en considération l'intensité du signal et le bruit de fond, spécifiques à chacune d'elles (cf. figure 47).

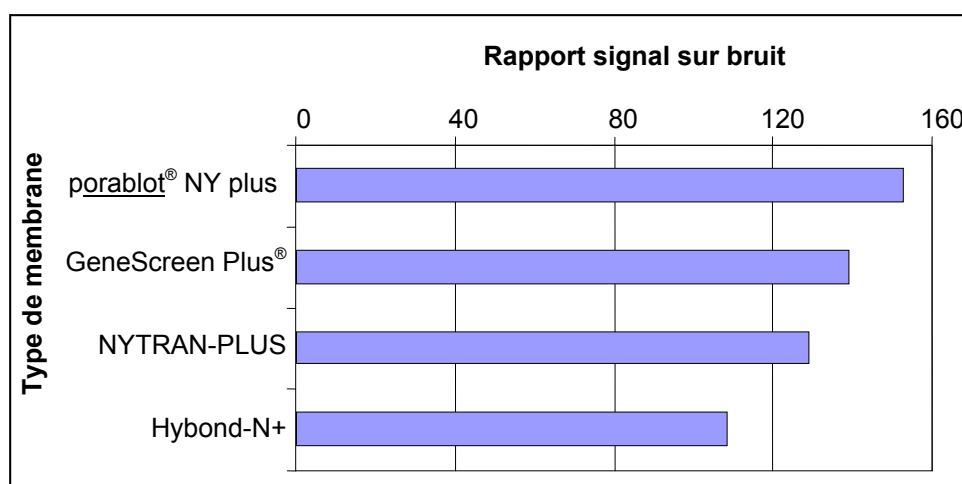


Figure 47 : Rapport signal sur bruit en fonction du type de membrane utilisée.

On constate une variation du rapport signal sur bruit de 100 à 150. Les quatre types de membrane, porablott® NY plus, GeneScreen Plus®, NYTRAN-PLUS et Hybond-N+, ont des rapports respectifs de 152, 139, 129 et 108. Les membranes porablott® NY plus et GeneScreen Plus® présentent donc l'avantage de cumuler un fort signal d'hybridation avec un faible bruit de fond. A l'inverse, la membrane Hybond-N+ a une valeur de bruit de fond élevée, de sorte que son rapport signal sur bruit apparaît inférieur à celui de la membrane NYTRAN-PLUS.

6.5.4. CONCLUSIONS RELATIVES AU CHOIX DE LA MEMBRANE D'HYBRIDATION

A l'issue de ce test, le lot de membrane chargée porablot[®] NY plus apparaît le plus performant, à la fois en capacité de fixation et en rapport signal sur bruit.

La filtration d'importantes quantités d'ADN sur une membrane porablot[®] NY plus permet de gagner environ 30% de signal, voire davantage puisque le point de saturation ne semble pas atteint dans la première expérience présentée (cf. §6.5.1.).

6.6. TRAITEMENT DE L'ÉCHANTILLON

Certaines bactéries, telles que les *Bacillus*, présentent, à l'état sporulé, une paroi cellulaire plus résistante qu'à l'état végétatif. Une simple lyse en présence de lysozyme ne suffit pas alors à détruire cette paroi. Belgrader *et al.* (1999b) ont procédé à la destruction des spores de *B. anthracis* par ultrasons en présence de billes de verre. La méthode que nous avons utilisée est simplement basée sur l'agitation de l'échantillon en présence de billes de verre.

Les conditions optimales du broyage, en particulier le type de billes, leur quantité, le temps et la vitesse de broyage, ont été définies en présence d'un grand nombre de spores. Différents types de billes (verre et zirconium), de diamètres variables (0,1 et 0,5 mm), ont également été testés.

Les premières expériences de broyage ont permis d'établir qu'il existe une perte dans la quantité d'ADN théoriquement récupérable (cf. §6.6.1.). La proportion d'ADN perdu est d'autant plus élevée que la masse d'ADN présente dans l'échantillon est faible (cf. §6.6.2.). Afin de résoudre ce problème, nous avons tenté d'identifier un compétiteur permettant de récupérer l'ADN théoriquement broyé en évitant que ce compétiteur n'interfère dans les étapes suivantes de marquage, d'hybridation et de détection (cf. §6.6.3.).

6.6.1. INFLUENCE DU LAVAGE DES BILLES APRES BROYAGE SUR LA MASSE D'ADN RECUPEREE

Cette expérience a pour but de vérifier si un (ou plusieurs) rinçage(s) des billes est (ou sont) nécessaire(s) afin de récupérer l'ADN de l'échantillon ayant subi le broyage.

Après le broyage de $2 \cdot 10^6$ cfu/ μ l (soit 10^9 cfu) de spores de *B. subtilis* (réf. : CEB 9789), on récupère le lysat. Les billes sont ensuite rincées trois fois avec 50 μ l d'eau. Chaque produit de lavage est récupéré séparément. Pour chacun de ces quatre échantillons, 15 μ l (équivalent à $3 \cdot 10^7$ cfu) sont déposés sur une membrane de nylon chargée positivement.

Une sonde complémentaire est marquée avec le kit E+, puis hybridée à la membrane dans du tampon Church.

La masse d'ADN récupérée après broyage est estimée en comparant les intensités des signaux obtenus pour ces dépôts avec celles d'une gamme d'ADN de *B. subtilis* déposée dans les mêmes conditions sur la même membrane.

Les résultats sont présentés dans le tableau 6.

	Masse d'ADN détecté (ng)	Pourcentage d'ADN récupéré sur l'ensemble du signal
Lysat	95,05	87,33%
Lavage 1	10,82	9,94%
Lavage 2	2,04	1,88%
Lavage 3	0,92	0,85%
Masse totale d'ADN détecté (ng)	108,83	100%

Tableau 6 : Influence du lavage des billes après broyage sur la masse d'ADN récupéré. Le 100% correspond à la somme des signaux obtenus pour le lysat et les trois lavages.

Le lysat permet de récupérer environ 90% du signal. La quasi-totalité du signal est retrouvée dans le lysat et le lavage 1.

Au vu du gain modeste apporté par ce rinçage, et des contraintes de manipulations qu'il impose, celui-ci sera abandonné pour la suite du projet.

Etant donné que le génome d'une spore de *B. subtilis* contient 4,21 Mb, soit approximativement 0,0045 pg d'ADN (cf. §6.3.2.), les 15 µl de spores broyées à $2 \cdot 10^6$ cfu/µl comptent environ 136 ng d'ADN. La quantité totale d'ADN détectée est d'environ 110 ng. De plus, une nouvelle titration de la solution de spores a confirmé la concentration précédemment mesurée. Cette différence, entre la masse d'ADN théorique et celle estimée après broyage, est compatible avec les incertitudes de mesure.

6.6.2. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SPORES SUR LA QUANTITE D'ADN DETECTABLE

Le lysat doit être aisément détectable quelle que soit la quantité de matériel génétique, ce dernier étant, de surcroît, susceptible d'être partiellement perdu au cours de cette étape de broyage. Notre attention a donc porté sur le broyage d'un faible nombre de spores.

Des concentrations variables de spores de *Bacillus subtilis* (10^5 à 10^6 cfu/ μ l) sont broyées. 8 μ l sont déposés dans des conditions dénaturantes sur une membrane de nylon chargée positivement. Cette dernière est alors hybridée avec une sonde radiomarquée d'ADN complémentaire. Après l'exposition de la membrane à un écran photosensible, le signal émis est mesuré sur le Storm[®] 860.

Le broyage de quantités variables de spores donne les résultats présentés dans le tableau suivant (cf. tableau 7) :

Concentration en spores (cfu/ μ l)	Nombre de cfu dans 8 μ l	Masse d'ADN théorique dans 8 μ l (ng)	Masse d'ADN mesurée dans 8 μ l (ng)	Pourcentage d'ADN récupéré
100 000	800 000	3,6	0	0
200 000	1 600 000	7,2	4,2	58
300 000	2 400 000	10,8	7,1	66
400 000	3 200 000	14,4	5,3	37
500 000	4 000 000	18	12,4	69
600 000	4 800 000	21,6	22,5	104
700 000	5 600 000	25,2	15,5	61
800 000	6 400 000	28,8	18,4	64
900 000	7 200 000	32,4	18,3	57
1 000 000	8 000 000	36	28,4	79

Tableau 7 : Influence de la concentration en spores sur la masse d'ADN détectable.

La masse d'ADN théorique est estimée en considérant qu'une cellule bactérienne de *B. subtilis* contient une séquence de 4,21 Mb. La masse d'ADN mesurée est déterminée par comparaison des intensités de signaux relevées pour les différentes quantités de spores avec celles obtenues pour une gamme d'ADN déposée sur la même membrane. Le pourcentage d'ADN récupéré est calculé à partir des quantités mesurées et théoriques (masse mesurée x 100 / masse théorique).

Le graphique suivant a été construit à partir des données provenant de ce tableau (cf. figure 48).

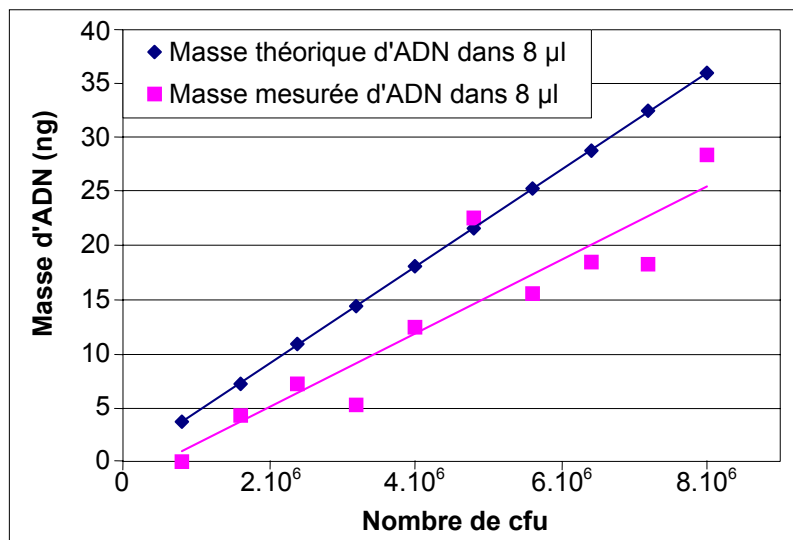


Figure 48 : Influence du nombre de spores sur la masse d'ADN récupérée.

En présence d'un nombre inférieur à 10^6 cfu, le signal d'hybridation n'est plus mesurable.

Lorsque le nombre de cfu est supérieur à 10^6 , le signal d'hybridation est détectable, mais reste légèrement inférieur, de quelques nanogrammes, au signal théorique. Ces résultats peuvent s'expliquer par divers facteurs :

- il est possible que le broyage abîme excessivement l'ADN des spores en le réduisant en petits fragments. Lors du dépôt sur la membrane, la filtration peut suffire à favoriser le passage de ces petits fragments au travers de celle-ci ;
- lors de la filtration sur les membranes de nylon, certains dépôts sont saturés par la présence de débris membranaires dans le lysat. Avant l'hybridation, la membrane est rincée dans du TE 1x afin de neutraliser l'effet dénaturant de la soude sur l'ADN. Il est donc possible que certains ADN non enchevêtrés dans celle-ci, à la suite de cette saturation, se décrochent. Toutefois, ceci devrait surtout influencer sur les quantités élevées de spores broyées et déposées sur les membranes ;
- l'ADN est susceptible d'être adsorbé de façon non-spécifique sur les billes de verre par des interactions électrostatiques entre ces dernières de charge globale nette positive et l'ADN de charge globale nette négative. Lors des lavages, ces interactions sont d'une intensité telle qu'elles compromettent l'élution de l'ADN en présence d'eau. L'utilisation d'une autre solution est susceptible de favoriser son décrochage des billes de verre. Dans ce cas, il est probable qu'une quantité constante d'ADN, de l'ordre de quelques nanogrammes, se fixe non spécifiquement aux billes de verre. Cette perte est sans conséquence sur le broyage de grandes quantités de spores mais elle nuit à la détection d'un faible nombre de micro-organismes présents dans l'échantillon ($0,8 \cdot 10^6$ spores).

Dans la mesure où une perte d'ADN est observée, quelle que soit la quantité de spores broyées, la recherche d'un compétiteur est donc nécessaire.

6.6.3. CHOIX D'UN COMPÉTITEUR

Le broyage entraîne une perte de matériel génétique, quelle que soit la masse d'ADN préalablement ajoutée (cf. §6.6.1.). La proportion d'ADN perdu est d'autant plus grande que la masse d'ADN à récupérer dans l'échantillon est faible (cf. §6.6.2.).

Quatre compétiteurs (cf. §MM.5.) ont été évalués afin de récupérer une plus grande quantité d'ADN, dans le cas où celui-ci serait adsorbé de façon non-spécifique sur la surface des billes de verre ou sur celle du tube.

Chacun des quatre compétiteurs est soumis à quatre expériences :

- chaque compétiteur est broyé seul ;
- la même expérience est réalisée en présence de chaque compétiteur et d'ADN de *B. subtilis* ;
- 300 µl de compétiteur sont prébroyés. 200 µl d'ADN sont ajoutés puis broyés ;
- dans un premier temps, 500 µl de compétiteur sont prébroyés. Puis, les billes sont rincées trois fois en présence de 500 µl d'eau afin d'éliminer l'excès de compétiteur. Dans un second temps, ces billes servent à broyer 500 µl d'ADN.

Une gamme d'ADN de *B. subtilis* et les broyats ainsi obtenus sont déposés sur une membrane de nylon chargée positivement dans des conditions dénaturantes. La gamme d'ADN permet d'estimer la masse d'ADN récupérée après le broyage. En outre, afin d'observer l'influence du compétiteur sur la fixation de l'ADN à la membrane, le compétiteur et l'ADN sont déposés soit successivement et dans cet ordre, soit de manière simultanée.

Les expériences de broyage sont contrôlées par deux témoins :

- l'ADN est incubé en présence de billes de verre sans subir l'étape de broyage et en l'absence de tout compétiteur. L'objectif est de vérifier si l'ADN peut être adsorbé de façon non-spécifique sur les billes de verre en l'absence de broyage ;
- l'ADN est broyé en l'absence de compétiteur.

De plus, en vue d'évaluer l'effet du compétiteur sur la saturation de la membrane, la filtration est exécutée sur deux membranes mises l'une sur l'autre.

Une sonde complémentaire, préparée à partir du kit E+, est ensuite hybridée sur la membrane. Puis, l'intensité des signaux est lue sur le Storm® 860.

Les broyats, obtenus à partir de ces diverses expériences, sont déposés sur une membrane selon le modèle suivant (cf. tableau 8).

0 ng	25 ng	50 ng	75 ng	100 ng	150 ng	200 ng	250 ng
0 ng	25 ng	50 ng	75 ng	100 ng	150 ng	200 ng	250 ng
300 ng	350 ng	400 ng	450 ng	500 ng	550 ng	600 ng	650 ng
300 ng	350 ng	400 ng	450 ng	500 ng	550 ng	600 ng	650 ng
700 ng							
700 ng						ADN + billes	ADN broyé
polyC	saumon	ARNt	lait	polyC	saumon	ARNt	lait
polyC	saumon	ARNt	lait	polyC	saumon	ARNt	lait
polyC	polyC	saumon	saumon	ARNt	ARNt	lait	lait

Tableau 8 : Présentation de la disposition des broyats sur la membrane afin de choisir un compétiteur.

La gamme d'ADN est inscrite en orange. L'ADN incubé quelques minutes en présence des billes de verre est noté en marron. Celui qui est broyé est indiqué en violet. Chaque compétiteur broyé seul est représenté en bleu. Lorsqu'il est broyé en présence d'ADN, il apparaît en rose. Le compétiteur prébroyé seul avant d'être broyé en présence d'ADN est inscrit en gris. Dans le cas où une étape de lavage des billes est réalisée entre le prébroyage et le broyage, il est indiqué en vert. Enfin, sur la dernière ligne, le compétiteur et l'ADN sont déposés soit successivement et dans cet ordre (noté en noir), soit de façon simultanée (noté en rouge).

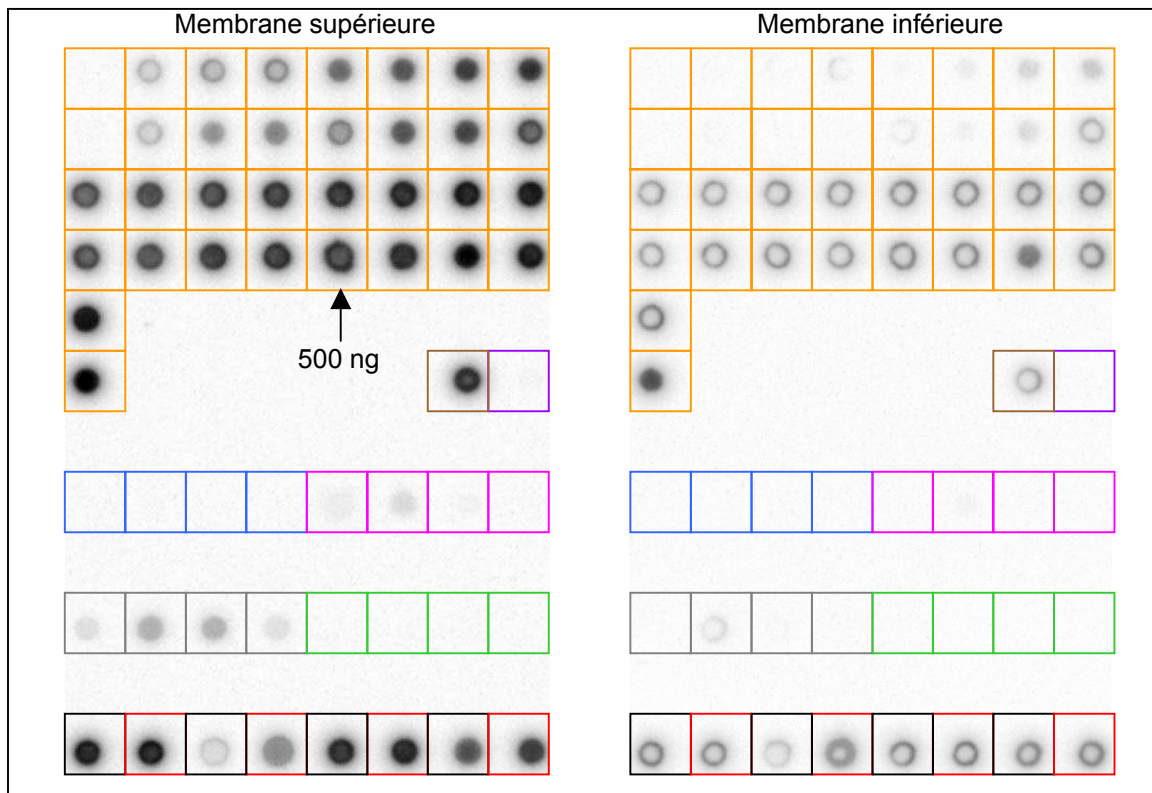


Figure 49 : Influence du compétiteur sur l'étape de broyage.

La membrane « supérieure » est celle qui entre en premier en contact avec l'échantillon. La membrane « inférieure » permet de vérifier si de l'ADN est perdu lorsqu'il traverse la première.

En l'absence de broyage (marron), l'intensité de signal, sur le dépôt contenant les 500 ng d'ADN incubés en présence des billes, est inférieure à celle du dépôt de 500 ng d'ADN dans la gamme (orange). Cette intensité correspond approximativement à une masse de 400 à 450 ng. Cette perte d'ADN peut donc correspondre à l'adsorption non-spécifique de celui-ci sur les billes de verre et/ou aux 10% de perte provoqués par l'absence de rinçage des billes (cf. §6.6.1.).

Le broyage des compétiteurs sans ADN (bleu) permet d'observer leur comportement d'hybridation. L'absence de signal souligne que ceux qui ont été sélectionnés ne s'hybrident pas avec cet ADN. Cependant, le profil d'hybridation du compétiteur retenu devra être vérifié ultérieurement avec tous les ADN de référence du système de détection.

Le broyage d'ADN seul (violet) génère un signal très faible qui est en partie restauré si cette étape est réalisée en présence du compétiteur (rose).

Si l'étape de prébroyage en présence de compétiteur est ajoutée (gris), alors elle favorise davantage la restauration du signal. Par contre, si elle est suivie de trois lavages destinés à éliminer une partie du compétiteur (vert), le signal disparaît.

De plus, c'est en présence de l'ADN de saumon et de l'ARNt de levure de boulanger que les signaux les plus forts sont observés.

La présence de compétiteur est donc nécessaire afin de restaurer une partie du signal d'hybridation. Son prébroyage accroît un peu plus l'intensité du signal. En revanche, l'élimination d'une partie du compétiteur par lavages successifs opérés après le prébroyage doit être proscrite si l'on souhaite conserver le peu de signal récupéré.

La membrane inférieure présente des signaux qui n'étaient pas prévus. Lors du simple dépôt des compétiteurs et de l'ADN (inscrit en rouge ou en noir selon qu'ils sont déposés de manière simultanée ou consécutive), elle présente 15 à 35% de signal encore visible pour le polyC, l'ARNt et le lait. Ce signal atteint 70 à 75% pour l'ADN de saumon. Les trois premiers compétiteurs n'interfèrent donc pas de façon significative sur la fixation de l'ADN de *B. subtilis* (CEB 9318) sur la membrane, contrairement à ce que l'on observe s'agissant de l'ADN de saumon.

Malgré la quantité importante d'ADN présent (500 ng, soit 10^8 bactéries), ce dernier n'est quasiment plus visible après quatre minutes de broyage à 4200 vpm. Trois hypothèses peuvent expliquer cette perte de signal :

- le broyage, trop intense, réduit l'ADN en petits fragments capables de passer au travers des deux membranes ;
- l'ADN nu est plus fragile que la spore complète. Lors du broyage, il est donc également réduit en petits fragments ;
- l'absence des parois membranaires et des fragments de spores augmente l'adsorption non-spécifique de l'ADN sur les billes.

Dans ces conditions, l'ARNt de levure de boulanger apparaît comme un bon candidat pour jouer le rôle de compétiteur lors du broyage car il présente une des intensités de signal les plus fortes dans le cas du prébroyage. De plus, contrairement à l'ADN de saumon, il offre les avantages de ne pas interférer avec un marquage par « random-priming » ou de pouvoir, en principe, être éliminé de façon sélective grâce à la RNaseA.

6.7. CHOIX DU KIT DE MARQUAGE

S'agissant du marquage, notre attention a essentiellement porté sur sa durée, qui s'élevant actuellement à une heure, doit à terme être réduit à une dizaine de minutes.

Les tests ont porté sur quatre kits, dont les principales différences de composition sont exposées ci-après (cf. tableau 9).

	Kit E+	Kit E-	Kit HL	Kit DL
ADN	0,2 ng/μl	0,2 ng/μl	0,5 ng/μl	0,5 ng/μl
Fragment de Klenow	Exonucléase +	Exonucléase -	Exonucléase -	Exonucléase -
Amorce	Hexanucléotide	Hexanucléotide	Hexanucléotide	Décanucléotide
Tampon de marquage	X	X	Y	Y
dATP, dTTP, dGTP	0,25 mM	0,25 mM	0,2 mM	0,2 mM
[α-³²P] dCTP	0,5 μCi/μl	0,5 μCi/μl	1 μCi/μl	1 μCi/μl
Volume réactionnel final	20 μl	20 μl	50 μl	50 μl

Tableau 9 : Différence de composition entre les quatre kits de marquage testés (cf. §MM.6.).

L'efficacité d'incorporation du [α - 32 P] dCTP et la qualité de la sonde sont évaluées en fonction du kit utilisé et du temps de marquage.

6.7.1. EFFICACITE D'INCORPORATION

Le signal total mesuré sur chacun des filtres, préparés comme décrit dans le paragraphe MM.6., permet de déterminer le pourcentage de [α - 32 P] dCTP incorporé lors de la réaction de marquage.

L'efficacité des kits de marquage testés est déterminée en calculant, de la façon suivante, le pourcentage de [α - 32 P] dCTP incorporé lors de la réaction de marquage :

$$\text{pourcentage de } [\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{ dCTP incorporé} = \frac{\text{dpm incorporé (filtre lavé)}}{\text{dpm total (filtre non lavé)}} \times 100$$

La figure ci-contre (cf. figure 50) représente le pourcentage de [α - 32 P] dCTP incorporé en fonction du temps de marquage.

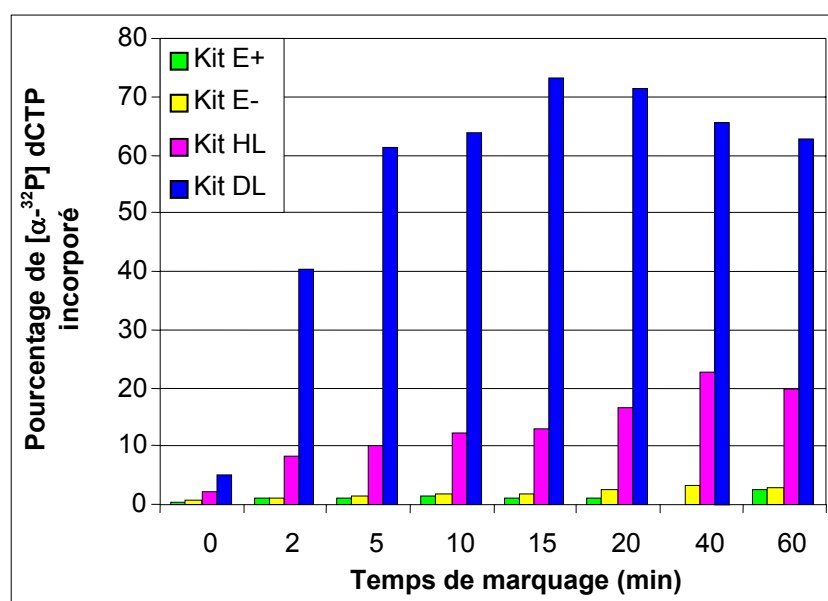


Figure 50 : Efficacité d'incorporation du [α - 32 P] dCTP lors du marquage.

Le pourcentage de [α - 32 P] dCTP incorporé atteint une valeur optimale supérieure à 70% après 15 à 20 minutes de marquage avec le kit DecaLabelTM. Par contre, il n'est que de 20% après 40 minutes avec le kit HexaLabelTM et ne dépasse pas 10% avec les deux autres kits après une heure de marquage.

On retient donc que 15 minutes suffisent, avec le kit DecaLabelTM, à marquer efficacement de l'ADN.

Il apparaît, enfin, que l'amorce, le tampon de marquage et dans une moindre mesure l'enzyme jouent un rôle considérable dans l'efficacité du marquage.

6.7.2. QUALITE DE LA SONDE

La qualité des sondes produites est estimée en hybridant celles-ci sur une membrane que l'on expose ensuite à un écran photosensible, lu sur le Storm[®] 860.

La figure 51 indique l'intensité d'hybridation mesurée par le Storm[®] 860 en fonction du temps de marquage de chaque sonde.

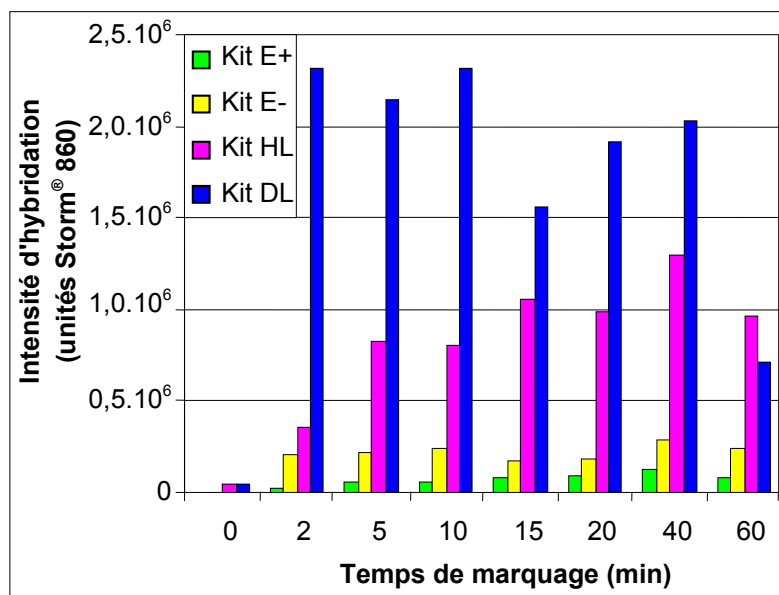


Figure 51 Qualité de la sonde et efficacité de son hybridation.

Les résultats d'hybridation concordent avec les premières conclusions apportées par les expériences de marquage (cf. §6.7.1.) :

- **Importance de l'enzyme de Klenow** : Les fragments synthétisés par le kit E- s'hybrident plus efficacement à la membrane que ceux synthétisés par le kit E+ du laboratoire.
- **Importance du tampon** : La comparaison entre les résultats obtenus avec le kit HL (en rose) et ceux obtenus avec le kit E- (en jaune) souligne que la différence de composition entre les deux tampons est un facteur agissant de façon significative sur l'efficacité d'incorporation lors du marquage et sur la qualité d'hybridation de la sonde.
- **Importance de l'amorce** : Le remplacement de l'amorce hexanucléotide par une amorce décanucléotide influe favorablement sur le pourcentage d'incorporation et sur la qualité de la sonde.
- **Importance du temps** : Un marquage trop long a un effet négatif très marqué pour le kit DL (en bleu).

6.7.3. CONCLUSIONS RELATIVES AU CHOIX DU KIT DE MARQUAGE

Le kit DL paraît être le plus performant. En combinant les trois facteurs, enzyme de Klenow, tampon de marquage et amorce, le temps de marquage est réduit d'une heure à une dizaine de minutes. L'efficacité d'incorporation et la qualité de la sonde demeurent meilleures que celles obtenues initialement avec le kit E+. Les temps de dénaturation de la sonde, avant marquage et avant hybridation, de 5 minutes dans les expériences actuellement réalisées, peuvent probablement être réduits à une minute. En effet, dans une PCR, 15 secondes de dénaturation à 92°C suffisent généralement à dénaturer l'ADN.

Il convient de souligner que la radioactivité utilisée pour le système de détection peut présenter des risques pour la santé de l'utilisateur. L'emploi de substances non radioactives pour marquer l'ADN est susceptible de supprimer ces risques, à condition toutefois, que la sensibilité du système soit préservée.

6.8. TAMPON D'HYBRIDATION

L'amélioration des conditions d'hybridation constitue l'une des priorités du projet. En effet, les temps consacrés à cette étape, généralement réalisée en laboratoire, atteignent environ une nuit. Notre ambition est de réduire ce délai à environ 15 minutes. De plus, les tampons employés doivent fournir un faible bruit de fond mais un fort pourcentage d'hybridation. En d'autres termes, ils doivent concentrer la sonde, à proximité des dépôts d'ADN qui sont situés sur la membrane.

Ce paragraphe décrit les tests d'hybridation réalisés en présence de différents tampons :

- le tampon RapidHyb™,
- le tampon Church modifié,
- un tampon d'hybridation à base de SDS et de sulfate de dextran.

Quarante nanogrammes d'ADN de levure sont marqués pendant 15 minutes avec le kit DL. Puis, les 300 µl de produit du marquage sont répartis à raison de 30 µl pour chacune des 10 membranes (soit 4 ng d'ADN par membrane).

Dans un premier temps, la cinétique d'hybridation est observée lors de l'utilisation des tampons RapidHyb™ et Church modifié. Dans un second temps, ces tampons sont comparés à d'autres au vu de leur capacité d'hybridation et de la faiblesse du bruit de fond qu'ils peuvent générer.

6.8.1. CINÉTIQUE D'HYBRIDATION

La préhybridation et l'hybridation s'effectuent dans les tampons Church ou RapidHyb™. La réaction d'hybridation est arrêtée à différents temps (15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 1 heure ou 4 heures).

En ce qui concerne la cinétique d'hybridation, les résultats suivants sont obtenus (cf. figure 52) :

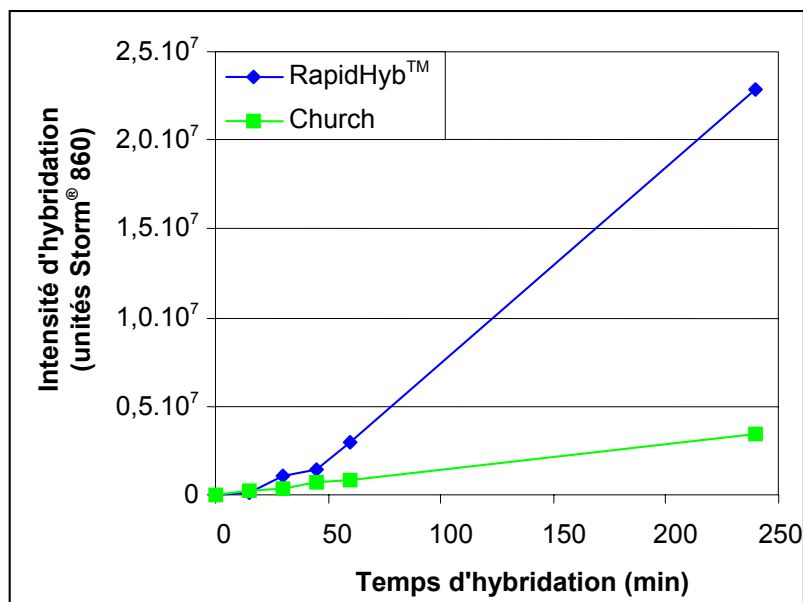


Figure 52 : Cinétique d'hybridation pour le tampon RapidHyb™ et le tampon Church modifié.

Dès trente minutes d'hybridation, l'intensité du signal en présence du tampon RapidHyb™ est supérieure d'un facteur 3 à 4 en comparaison à celle mesurée en présence du tampon Church modifié. Cet écart s'accroît quand la durée de cette étape est prolongée. Le point 0 est une extrapolation théorique de l'expérience.

Cette expérience confirme que, selon le tampon choisi, 15 minutes d'hybridation suffisent à générer un signal lorsque la sonde radiomarquée complémentaire est présente en excès.

Au vu de ces résultats, il semble donc intéressant d'évaluer d'autres catégories de tampons.

6.8.2. INFLUENCE DU TAMPON D'HYBRIDATION

Afin de déterminer le tampon d'hybridation le plus efficace, une série d'expériences a été réalisée en présence des trois tampons précédemment cités.

S'agissant de cette expérience, dix membranes identiques sont hybridées pendant une heure à 65°C.

La mesure du signal d'hybridation fournit, pour chacun des tampons utilisés et en fonction de la quantité d'ADN par dépôt, les données consignées dans les figures 53 et 54 :

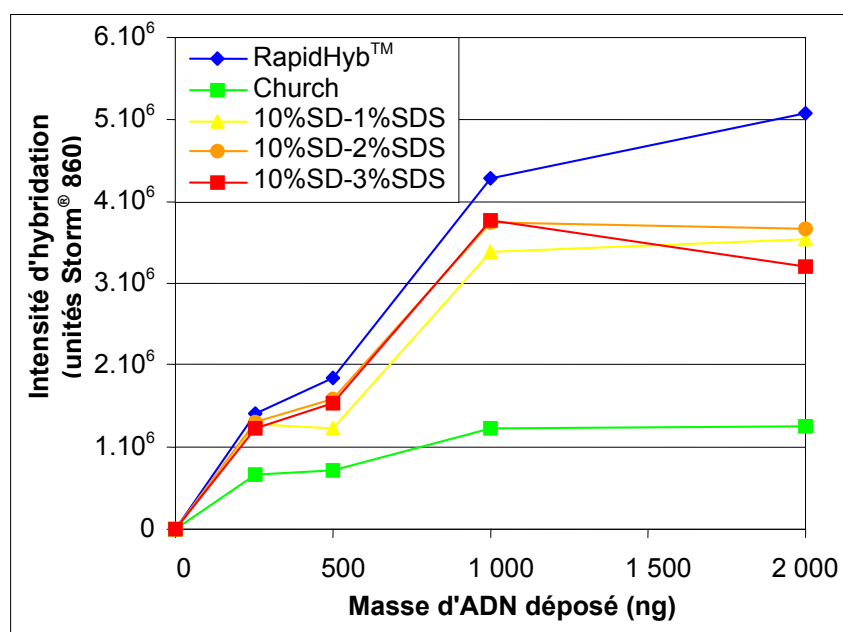


Figure 53 : Influence sur l'efficacité d'hybridation du tampon RapidHyb™, du tampon Church modifié et des tampons composés de sulfate de dextran (SD) et d'une quantité de SDS variant de 1 à 3%.

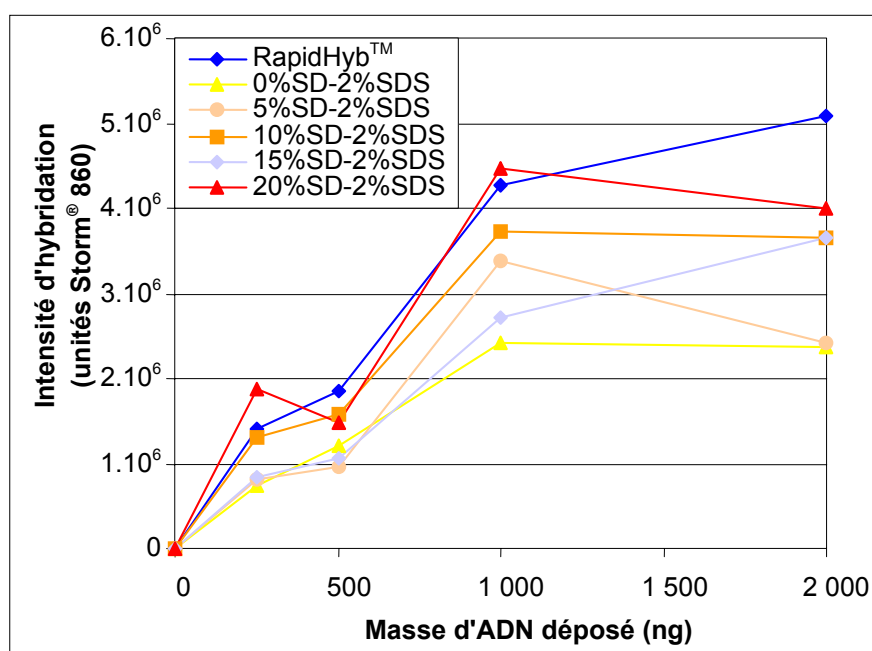


Figure 54 : Influence sur l'efficacité d'hybridation du tampon RapidHyb™ et des tampons composés de SDS et d'une quantité de sulfate de dextran (SD) variant de 0 à 20%.

Les deux figures, 53 et 54, confirment les résultats précédemment obtenus (cf. §6.5.1.), en ce qui concerne la quantité nécessaire et suffisante d'ADN à déposer pour acquérir un signal d'hybridation optimal. En effet, le signal atteint un plateau lorsqu'un microgramme d'ADN est immobilisé (effet de saturation). Par conséquent, cette masse d'ADN suffit, à elle

seule, à fournir une intensité maximale du signal sur ce type de membrane (NYTRAN-PLUS).

De plus, pour chaque hybridation, le tampon RapidHyb™ (cf. figures 53 et 54, losange bleu) présente une intensité de signal supérieure à celle découlant de l'utilisation des autres tampons. Seul celui contenant 20% de sulfate de dextran et 2% de SDS (cf. figure 54, triangle rouge) procure une efficacité d'hybridation comparable.

L'analyse des mesures de bruit de fond et du rapport signal sur bruit en fonction du tampon d'hybridation utilisé donnent les figures suivantes (cf. figures 55 et 56) :

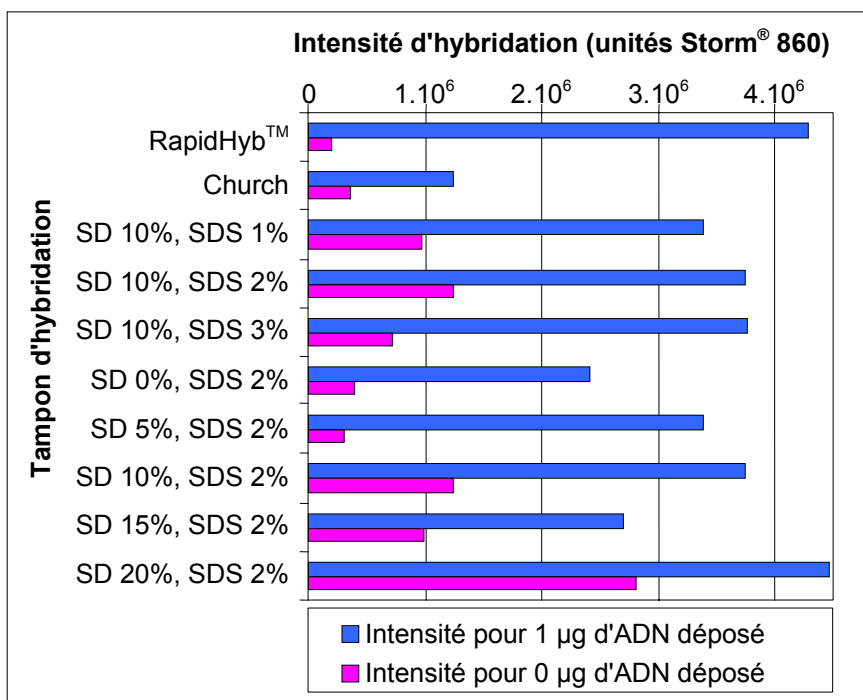


Figure 55 : Comparaison, pour chaque tampon d'hybridation utilisé, des intensités mesurées en absence d'ADN sur la membrane (bruit de fond de la membrane) et en présence de 1 µg d'ADN.

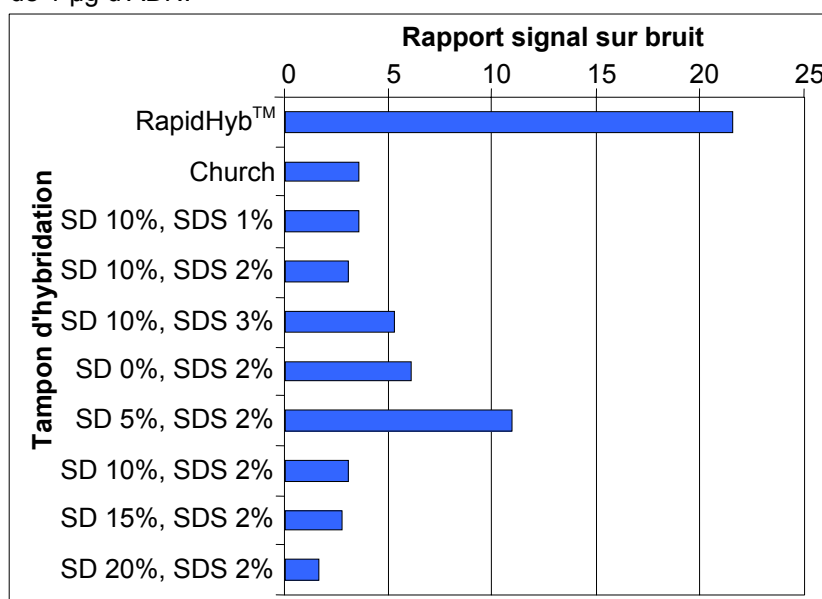


Figure 56 : Comparaison des rapports signal sur bruit en fonction du tampon d'hybridation.

Les tampons à base de sulfate de dextran et de SDS, s'ils sont capables de faire s'hybrider l'ADN aussi efficacement que le tampon RapidHyb™, présentent l'inconvénient d'amplifier le bruit de fond au niveau de la membrane.

Quant au tampon Church modifié, qui contient 2% de SDS, il présente une efficacité d'hybridation réduite correspondant à une faible intensité du signal. De plus, à l'instar des tampons à base de sulfate de dextran et de SDS, son rapport signal sur bruit est relativement faible.

Le tampon RapidHyb™ fournit les plus fortes intensités mesurées sur les dépôts d'ADN et le plus faible bruit de fond sur la membrane. Cette solution est donc la plus appropriée pour obtenir une hybridation efficace et spécifique.

Le tampon RapidHyb™ reste donc la référence pour l'hybridation.

6.9. INSTRUMENT DE MESURE

L'objectif de ce paragraphe est d'établir une correspondance entre les unités de mesure du Storm® 860 (Molecular Dynamics) ou du Microlmager™ (Biospace Mesures) et le nombre de désintégrations par minute.

Le Storm® 860 est un appareil de détection semblable à un scanner. Il est constitué d'un laser, protégé par une vitre, destiné à lire un écran photosensible préalablement exposé à des membranes radioactives, pendant un temps déterminé. Les bruits de fond générés par ce type d'appareil proviennent donc de l'écran photosensible et de la vitre.

Quant au Microlmager™, il comprend une caméra CCD (Charge Coupled Device) et un tube intensificateur. Lorsqu'une molécule radioactive se désintègre, elle émet un électron qui transfère une partie de son énergie à un film scintillant recouvrant la membrane à analyser. Le signal lumineux ainsi fourni est amplifié par le tube intensificateur et analysé par la caméra CCD. Il est visualisé en temps réel sur un écran d'ordinateur. Par conséquent, le bruit de fond généré par cet appareil ne provient que du film scintillant.

6.9.1. CORRESPONDANCE ENTRE LE NOMBRE DE DESINTEGRATIONS PAR MINUTE ET LES VALEURS MESUREES PAR LES APPAREILS DE DETECTION TESTES

Le nombre de désintégration par minute (ou dpm) de chaque dépôt est estimé sur un compteur étalonné (cf. §MM.8.) :

$$\text{Nombre de dpm} = \text{Valeur mesurée au compteur} \times 150$$

Les intensités des signaux de chaque Benchkote sont ensuite mesurées soit sur le Storm® 860, soit sur le Microlmager™. La relation qui existe entre les désintégrations par minute et les valeurs mesurées par les deux appareils est alors établie.

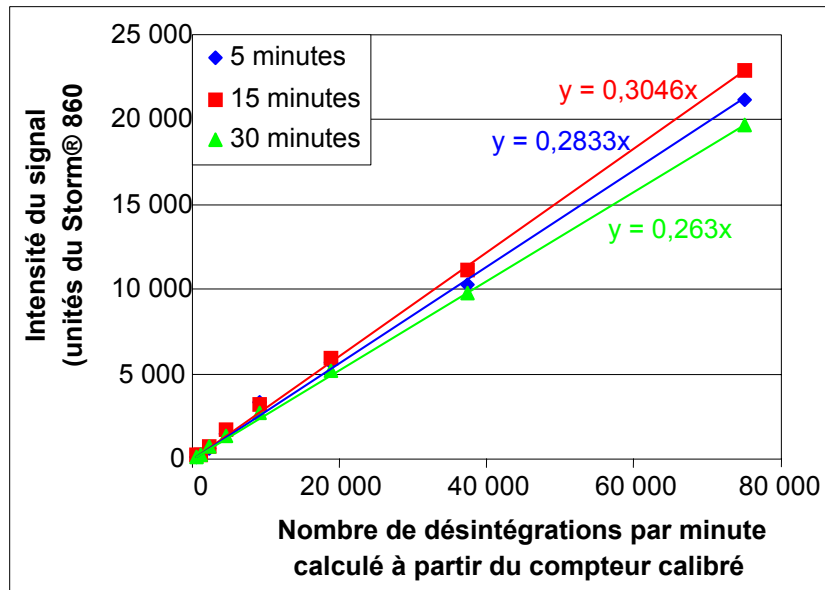


Figure 57 : Relation linéaire entre le nombre de dpm et les unités par minute mesurées au Storm® 860 (Molecular Dynamics).

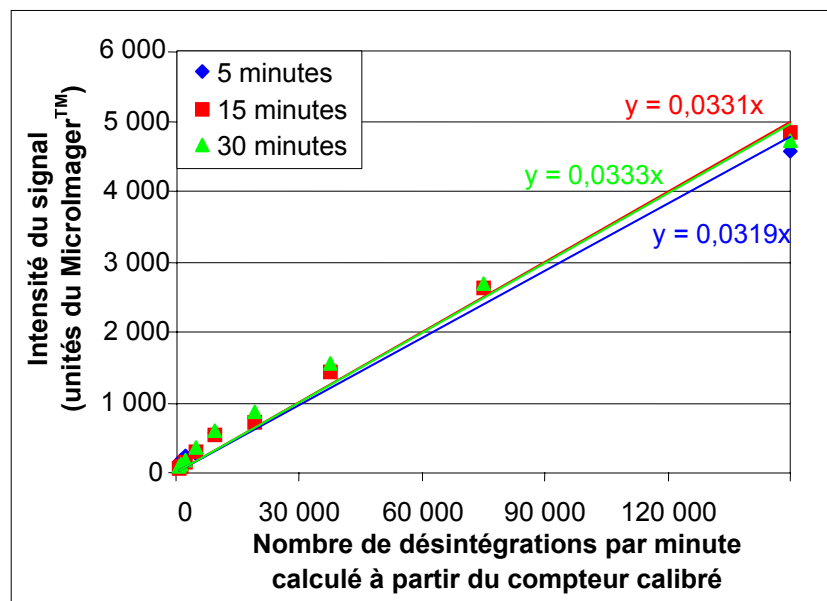


Figure 58: Relation linéaire entre le nombre de dpm et les unités par minute mesurées au Microlmager™ (Biospace Mesures).

Les figures 57 et 58 établissent une relation linéaire entre le nombre de désintégrations par minute mesuré à l'aide d'un compteur étalonné et les unités mesurées soit par le Storm® 860, soit par le MicroImager™.

La relation n'est linéaire que sur une gamme de désintégrations qui varient selon l'appareil de détection : de 0 à environ 80 000 dpm pour le Storm® 860 et de 0 à 150 000 dpm pour le MicroImager™. Pour chacun de ces deux appareils, un nombre supérieur de désintégrations par minute tend apparemment à saturer le système, ce qui se traduit par la perte de linéarité dans leur relation avec le nombre de désintégration.

Pour remédier à ces problèmes de saturation des mesures, la solution réside dans des temps de réaction plus courts en ce qui concerne le marquage, l'hybridation et/ou l'exposition.

Dans de telles conditions expérimentales (cf. §MM.8.), 3 à 5 désintégrations par minute se traduisent en une unité par minute mesurée par le Storm® 860 lorsque le temps d'exposition varie de 5 à 30 minutes. Quant au MicroImager™, 30 désintégrations par minute se traduisent en une unité par minute par cet appareil quand l'acquisition du signal dure entre 5 et 30 minutes.

Pour un temps d'exposition donné, il est donc possible de déterminer la quantité de radioactivité présente sur un support, et par conséquent le pourcentage de sonde hybridée sur celui-ci.

6.9.2. POURCENTAGE DE SONDE HYBRIDEE ET DETECTEE

Ce paragraphe est consacré à l'évaluation de la quantité de sonde qui s'hybride de façon spécifique sur l'ADN de référence, ce dernier étant lui-même fixé sur un support solide.

Deux sondes d'ADN complémentaire, de 100, 10 et 1 pg, sont marquées pendant une heure à 37°C, avec le kit E+. Elles ne sont pas éluées et sont directement mises à hybrider, pendant une heure à 65°C dans un tube contenant 400 µl de tampon RapidHyb™ et une membrane sur laquelle de l'ADN a été immobilisé. L'intensité des signaux que ces membranes génèrent est mesurée sur le Storm® 860 ou sur le MicroImager™ pour des temps d'exposition de 5, 15 ou 30 minutes.

On détermine alors le pourcentage de sonde immobilisée sur la membrane de nylon.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 10 :

Quantité initiale de sonde (pg)	Nombre de dpm correspondant à la masse initiale de sonde	Nombre moyen d'unités par minute et par dépôt mesuré par l'appareil de détection			Nombre moyen de dpm calculé par dépôt (cf. §6.9.1.)			Pourcentage de sonde hybridée et détectée par dépôt		
		5 min	15 min	30 min	5 min	15 min	30 min	5 min	15 min	30 min
		Storm® 860								
100	150 000	10 031	14 263	13 342	35 406	46 827	50 730	24	31	34
10	15 000	528	706	656	1 863	2 317	2 496	12	15	17
1	1 500	201	248	242	710	814	919	47	54	61
Microlmager™										
100	150 000	1 641	1 530	1 439	51 429	45 942	43 475	34	31	29
10	15 000	305	251	226	9 568	7 535	6 831	64	50	46
1	1 500	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Tableau 10 : Calcul du pourcentage de sonde s'hybridant au support sur lequel l'ADN complémentaire est immobilisé. Comparaison en fonction de l'appareil de détection utilisé.

Le nombre moyen d'unités par minute et par dépôt correspond à la moyenne des valeurs brutes, mesurées pour chaque dépôt par l'appareil de détection, rapportée à une minute d'acquisition.

Quels que soient les temps d'acquisition réalisés, le nombre moyen de dpm calculé par dépôt pour le Storm® 860 et le Microlmager™ présente des résultats comparables s'agissant d'une sonde composée de 100 pg d'ADN.

Lorsque cette dernière est réduite à 10 pg, le Microlmager™ montre de meilleurs résultats : il distingue entre 3 et 5 fois plus de désintégrations par minute que le Storm® 860. Par conséquent, il détecte un pourcentage de sonde hybridée 3 à 5 fois plus élevé que celui obtenu au moyen du Storm® 860.

En revanche et contrairement au Storm® 860, le Microlmager™ ne repère aucun signal lorsque la sonde ne contient que 1 pg d'ADN. Ce constat résulte vraisemblablement d'un manque de sensibilité du Microlmager™ dont les performances ont été modifiées afin qu'il puisse être utilisé pour détecter des sondes marquées par chimiluminescence.

6.9.3. BRUIT DE FOND LIÉ À L'UTILISATION DE CHAQUE APPAREIL DE DÉTECTION

Il est également possible de déterminer le bruit de fond des différents éléments intervenant dans la mesure des signaux pour chaque appareil de détection.

Pour toutes les analyses, la membrane génère un bruit de fond qui lui est spécifique et qui a déjà fait l'objet d'un paragraphe dans cette étude (cf. §6.5.).

De plus, à partir de l'expérience précédente (cf. §6.9.2.), lors de l'analyse des images, des mesures de bruit de fond sont effectuées en dehors des zones où les signaux sont aperçus afin d'évaluer le bruit de fond :

- de la vitre du Storm® 860,
- de l'écran photosensible,
- du film scintillant,
- de la membrane hybridée en présence de 1 pg de sonde et exposée sur le Storm® 860 ou sur le Microlmager™,
- de la membrane hybridée en présence de 10 pg de sonde et exposée sur le Storm® 860 ou sur le Microlmager™,
- de la membrane hybridée en présence de 100 pg de sonde et exposée sur le Storm® 860 ou sur le Microlmager™.

Les mesures de bruit de fond réalisées sont reproduites dans le tableau 11 :

Quantité initiale de sonde (pg)	SIGNAL Nombre moyen de dpm calculé par dépôt (cf. §6.9.1.)			BRUIT DE FOND Nombre moyen de dpm calculé (cf. §6.9.1.)			Rapport signal sur bruit		
	5 min	15 min	30 min	5 min	15 min	30 min	5 min	15 min	30 min
	Storm® 860								
100	35 406	46 827	50 730	474	446	417	74,64	105,03	121,62
10	1 863	2 317	2 496	121	49	55	15,46	47,73	45,36
1	710	814	919	178	86	136	3,98	9,51	6,74
Microlmager™									
100	51 429	45 942	43 475	8 744	8 005	4 595	5,88	5,74	9,46
10	9 568	7 535	6 831	7 895	5 249	4 960	1,21	1,44	1,38
1	/	/	/	9 849	7 347	7 056	0	0	0
Bruit de fond spécifique aux appareils de détection (cf. §6.9.)									
Ecran (Storm® 860)				105	18	20			
Vitre (Storm® 860)				56	14	7			
Scintillant (Microlmager™)				1 506	965	1 593			

Tableau 11 : Analyse du bruit de fond généré par les appareils de détection testés. Le nombre moyen d'unités par minute et par dépôt correspond à la moyenne des valeurs brutes, mesurées pour chaque dépôt par l'appareil de détection, rapportée à une minute d'acquisition.

La colonne nommée « SIGNAL » du tableau fait référence aux valeurs précédemment calculées sur le nombre moyen de dpm détecté par l'appareil de mesure (cf. tableau 10). La colonne centrale « BRUIT DE FOND » concerne les mesures du bruit de fond. Toutes ces valeurs font référence à une même surface spécifique à chaque appareil.

On constate que le film scintillant utilisé par le MicroImager™ produit un bruit de fond supérieur à ceux mesurés et cumulés sur l'écran et sur la vitre du Storm® 860. Ce phénomène peut être réduit en remplaçant le film scintillant après chaque mesure et en le protégeant au maximum des rayons lumineux.

Les rapports « signal sur bruit » observés sur le Storm® 860 sont donc plus élevés que ceux obtenus sur le MicroImager™.

De plus, quel que soit l'instrument de mesure utilisé, lorsque la quantité de sonde diminue, le bruit de fond tend à se confondre avec l'intensité du signal mesuré. Par conséquent, le rapport signal sur bruit diminue.

En conclusion, le Storm® 860 semble plus sensible que le MicroImager™. En effet, son rapport signal sur bruit demeure plus élevé que celui du MicroImager™, quelle que soit la quantité de sonde à détecter. Le bruit de fond qu'il génère reste plus faible que celui du MicroImager™.

Cependant, pour l'étude de faisabilité d'un système de détection, le MicroImager™ présente l'avantage de mesurer des intensités de signaux qu'il visualise en temps réel sur un écran d'ordinateur. Un nouveau réglage de l'appareil permettrait probablement de restituer les performances dont le constructeur s'est initialement prévalu.

6.10. DISCUSSION RELATIVE A LA FAISABILITE D'UN SYSTEME DE DETECTION DE TYPE « PUCE A ADN »

Afin de valider un tel système de détection, la méthode que nous avons utilisée, dite de « génome complet », repose sur l'hybridation des acides nucléiques marqués de l'échantillon sur le génome complet des ADN de référence immobilisés sur un support solide.

En moins de deux heures, elle a permis de détecter une sonde de 1 pg sur des membranes de nylon comportant de l'ADN complémentaire (marquage de 15 minutes avec le kit DL, hybridation d'une heure en présence du tampon RapidHyb™ et exposition d'environ 15 minutes au Storm® 860).

Dans cette étude, un certain nombre de procédés envisagés n'ont pas pu être expérimentés. Il s'agit du marquage froid, fluorescent ou chimiluminescent, de l'hybridation en présence d'un champ électrique (breveté par Nanogen®), du traitement de l'échantillon

par sonication (Belgrader *et al.*, 1999b, Taylor *et al.*, 2001). Ils font aujourd'hui l'objet d'études plus approfondies et conduites au Centre d'Etudes du Bouchet (Vert-Le-Petit).

Par ailleurs, une entreprise industrielle poursuit actuellement le développement de ce système de détection pour l'obtention d'un produit à usage militaire, voire civil. L'utilisation de puces à ADN, comme support solide d'hybridation à la place des membranes de nylon, présentent l'avantage d'accroître de façon considérable la collection de génomes bactériens immobilisés et, par conséquent, de modifier le niveau d'identification du système. En effet, en ce qui concerne les membranes de nylon, l'identification se situe au niveau du genre. Du fait de la multiplication du nombre de bactéries présentes sur les puces à ADN, elle pourra évoluer vers l'espèce en immobilisant des fragments d'ADN spécifiques. Cependant, la quantité d'ADN déposé sur ces puces est généralement inférieure à celle fixée sur les membranes de nylon. L'immobilisation de gènes spécifiques et la diminution de la quantité d'ADN déposé se traduira probablement par une diminution du signal, et donc du seuil de sensibilité. Par conséquent, il faudra peut être envisager d'avoir recours à la PCR afin de récupérer la perte de sensibilité.

Trois points importants restent à souligner :

- les expériences réalisées ont mis en évidence une perte importante d'ADN lors du broyage de faibles quantités de spores. En effet, en l'absence de compétiteur, on estime que des quantités inférieures à 800 000 cfu ne sont pas détectables ;
- la fiabilité du système de détection, qui fait l'objet de cette étude, demeurera subordonnée à la connaissance qualitative et quantitative de la population bactérienne existant naturellement dans l'air et qui constitue le bruit de fond atmosphérique ;
- cette étude ne considère pas les interférents biologiques et chimiques. En effet, toutes les expérimentations sont réalisées sur des solutions pures. En particulier, les contributions du bruit de fond atmosphérique et du compétiteur, sur le signal mesuré, ne sont pas considérées.

CONCLUSION

Cette étude se divise en trois grands projets : la validation de SNP spécifiques à *Bacillus anthracis*, le système de détection et la composition bactériologique de l'air.

La validation de quelques SNP spécifiques à *Bacillus anthracis* a montré ses limites par rapport à l'approche minisatellites, précédemment décrite par Le Flèche *et al.* (2000), dans le cas d'espèces peu polymorphes. Par contre, les SNP sont susceptibles de fournir des informations suffisantes sur la phylogénie bactérienne en ce qui concerne des espèces génétiquement très polymorphes, telles que *Vibrio cholerae* (Stine *et al.*, 2000).

D'une manière plus générale, les SNP peuvent être utilisés pour l'analyse phylogénétique de tout autre agent pathogène que *B. anthracis*, dans la mesure où les données de séquences d'au moins deux souches divergentes ou de plusieurs souches, s'agissant d'une région très polymorphe, sont disponibles (Stine *et al.*, 2000).

Le second projet a permis de montrer la faisabilité d'un système capable de détecter quelques picogrammes d'ADN en moins de deux heures (marquage de 15 minutes avec le kit DL, hybridation d'une heure en présence du tampon RapidHyb™ et exposition d'environ 15 minutes au Storm® 860).

Par contre, certains procédés n'ont pas pu être explorés mais n'en demeurent pas moins envisagés : marquage froid fluorescent ou chimiluminescent, hybridation en présence d'un champ électrique (breveté par Nanogen®), traitement de l'échantillon par sonication (Belgrader *et al.*, 1999b, Taylor *et al.*, 2001). Ils font aujourd'hui l'objet d'études plus approfondies et conduites au Centre d'Etudes du Bouchet (Vert-Le-Petit, Essonne).

Le protocole, établi au cours de ce projet de détection, a été appliqué à l'étude systématique du bruit de fond atmosphérique. Cette étude de grande envergure a fait appel à des compétences diverses, tant dans le domaine de la biologie, que dans celui de la physique ou de l'informatique

L'analyse des 4 collectes présentées dans ce rapport de thèse met en évidence que la composition biologique du bruit de fond atmosphérique peut varier d'une demi-heure à l'autre. Il faut également noter la présence d'un « bruit de fond » constant, d'une concentration minimale, de micro-organismes détectés dans l'air. Par ailleurs, cette étude souligne la nécessité d'examiner les échantillons par différentes méthodes, telles que la culture, la cytométrie ou l'analyse génétique.

Le projet concernant l'étude de faisabilité d'un système de détection a fait l'objet d'un appel d'offres. Une entreprise industrielle poursuit actuellement le développement de ce système pour l'obtention d'un produit à usage militaire, voire civil.

L'utilisation de puces à ADN, comme support solide d'hybridation à la place des membranes de nylon, présente l'avantage d'accroître de façon considérable la collection de bactéries immobilisées et, par conséquent, de modifier le niveau d'identification du système. En effet, en ce qui concerne les membranes de nylon, l'identification se situe au niveau du genre. Du fait de la multiplication du nombre de bactéries sur le support, elle pourra évoluer vers l'espèce.

Quant à l'étude portant sur la composition bactériologique du bruit de fond atmosphérique, elle nécessite encore l'analyse des échantillons collectés au cours de la période comprise entre avril 2000 et avril 2001 et l'amélioration du protocole précédemment décrit. Les résultats obtenus pourront alors être exploités par l'intermédiaire de la base de données du bruit de fond atmosphérique. Des corrélations pourront également être établies avec les paramètres météorologiques locaux, préalablement enregistrés.

Il devient également nécessaire d'accroître le nombre de bactéries représentées sur les supports d'hybridation. Par conséquent, il faut envisager le réexamen, à partir des échantillons conservés dans du glycérol, de tous les prélèvements collectés afin d'isoler et d'identifier des bactéries spécifiques à l'environnement. Ce travail, pouvant être réalisé par une entreprise extérieure au CEB, fournirait alors les souches nécessaires à la préparation d'ADN génomique.

Par ailleurs, un second appel d'offres a été engagé pour un projet portant sur la composition bactériologique de l'air.

L'objectif est d'analyser l'air sur plusieurs sites caractéristiques de la diversité géographique française (site rural/site urbain, campagne/mer/montagne). Les études biologiques devront au minimum se concentrer sur la numération de particules (cytométrie et/ou culture) et sur l'analyse génétique. Cette dernière n'implique pas obligatoirement de recourir à la méthode « génome complet », celle-ci se distinguant effectivement par sa complexité expérimentale. Une analyse limitée aux ADNr 16S de l'échantillon peut ainsi suffire à déterminer les genres bactériens présents. Cette méthode, expérimentalement plus simple, sera facilitée par le séquençage, établi et à venir, d'un nombre croissant de bactéries et d'autres organismes.

Finalement, le projet reposant sur l'utilisation des SNP se poursuit actuellement par une étude comparant les souches Ames et Poitiers (CEB 9206) de *Bacillus anthracis*. Ces deux souches apparaissent plus proches dans l'arbre phylogénétique établi par Le Flèche *et al.* (2000). En effet, elles appartiennent toutes deux au groupe A. Au vu des résultats précédemment exposés, il sera, par conséquent, nécessaire de sélectionner un plus grand nombre de SNP s'agissant de l'étude sur les souches Ames et Poitiers afin de pouvoir discerner certaines branches.

Ce type de projet présente l'avantage de pouvoir être mis rapidement en place même si la structure du laboratoire ne permet pas de posséder du matériel de pointe, en particulier pour le séquençage. En effet, l'utilisation des minisatellites exige, pour la validation de la différence des tailles des allèles, de séquencer certains d'entre eux.

Ce travail met en évidence :

- d'une part, la difficulté liée au traitement de l'échantillon. Cette étape s'affirme comme la plus critique de tout le projet. En effet, elle nécessite de récupérer une quantité maximale de tous les ADN présents dans l'échantillon et de lui conserver une qualité minimale pour que la spécificité de la méthode demeure optimale.

- d'autre part, la sous représentation bactérienne sur les supports d'hybridation. A l'heure actuelle, les puces à ADN sont susceptibles de répondre à cette difficulté. Cependant, elles ne permettent pas d'utiliser l'approche « génome complet », dans la mesure où elles ne peuvent pas comporter, à une adresse précise, la totalité du génome d'une espèce bactérienne. Ce problème peut, toutefois, être résolu en couplant l'approche « génome complet », qui aurait pour objet de fournir une première information sur le genre bactérien, à une approche « puce à ADN », qui consisterait à immobiliser des gènes spécifiques du genre, de l'espèce, voire de la souche et qui apporterait donc une information plus précise. Ainsi, l'échantillon serait traité une seule fois et utilisé successivement pour l'approche « génome complet » puis pour l'approche « puce à ADN ». En outre, il serait alors possible, sous réserve de prévoir tous les contrôles adéquats, de fabriquer des puces à ADN spécifiques de genre, voire d'espèces bactériennes particulières (« puces à ADN » spécifiques à la détection du genre *Bacillus*, par exemple).

MATERIELS ET METHODES

MM.1. EXPERIMENTATION SUR LES SNP

L'analyse des SNP de *Bacillus anthracis* est réalisée en quatre étapes :

- identification des SNP,
- choix des amorces,
- première sélection des SNP sur une gamme de température d'hybridation de l'amorce,
- analyse des SNP sélectionnés sur 34 souches de *B. anthracis* (dont deux sont dupliquées) et sur 6 souches de *B. cereus*.

MM.1.1. IDENTIFICATION DES SNP

Le séquençage de la souche Ames de *Bacillus anthracis*, fourni par le TIGR (The Institute for Genomic Research, <http://www.tigr.org>) est en cours de réalisation. Le séquençage partiel de la souche dite Davis a été réalisé par le CNS (Centre National de Séquençage, Génoscope, Evry).

Les séquences des souches Ames et Davis de *B. anthracis* sont comparées afin d'identifier les SNP à valider. Seules les substitutions répondant aux critères suivants sont retenues :

- nombre maximum de substitutions par lecture : 1,
- indice de qualité minimum du chromatogramme : 20.

A l'issue de cette analyse, 167 SNP ont été identifiés.

MM.1.2. CHOIX DES AMORCES

Pour la validation de chaque SNP et leur analyse sur les 40 souches, trois amorces sont sélectionnées :

- la première, amorce 1, est spécifique à la souche Ames. Elle comporte les 24 nucléotides en amont du SNP et le nucléotide polymorphe de la souche Ames ;
- la deuxième, amorce 2, est spécifique à la souche Davis. Elle inclut les 24 bases en amont du SNP ainsi que celle polymorphe de la souche Davis ;
- la troisième, amorce 3, est commune à tous les *B. anthracis*. Elle se situe à 100 pb en aval du site polymorphe. Elle est constituée de 25 bases.

MM.1.3. CONDITIONS DES PCR

Les SNP sont systématiquement testés par PCR sur une gamme de température d'hybridation de l'amorce. Seuls 32 SNP, choisis aléatoirement parmi les 167, sont testés sur les souches Davis et Ames de *B. anthracis*. Puis, ils sont analysés sur la collection de *Bacillus*.

MM.1.3.1. OBTENTION DE L'ADN

Les ADN de *B. anthracis* et de *B. cereus* sont récupérés selon le protocole rapide établi par Keim *et al.* (2000) ou selon celui décrit précédemment (cf. §MM.2.3.2.).

En ce qui concerne le protocole décrit par Keim *et al.* (2000), *B. anthracis* est étalé sur un milieu gélosé à base de sang puis incubé à 37°C pendant une nuit. Une colonie de chaque isolat est séparément resuspendue dans 200 µl de TE 1x. La suspension est ensuite portée à ébullition pendant 20 minutes et refroidie à température ambiante. Les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation d'une minute à 15 000 g. Le surnageant contenant l'ADN est alors récupéré. Sa stérilité est vérifiée sur 10% du surnageant.

Après titration par dilution, l'ADN ainsi obtenu est de qualité suffisante pour une amplification par PCR.

MM.1.3.2. CONDITIONS DE PCR POUR LA SELECTION DES SNP SUR UN GRADIENT DE TEMPERATURE

La PCR est réalisée sur l'appareil PTC-200 (MJ Research) dans les conditions suivantes :

- l'ADN est dénaturé 5 minutes à 94°C ;
- puis, s'agissant du gradient, 31 cycles sont effectués dans les conditions suivantes :
 - dénaturation à 94°C pendant 20 secondes,
 - hybridation pendant 20 secondes à une des températures du gradient qui varient de 51 à 65°C (12 températures sont testées),
 - puis élongation à 65°C pendant 20 secondes ;
- l'extension est ensuite achevée à 65°C pendant 5 minutes.

MM.1.3.3. CONDITIONS DE PCR POUR L'ANALYSE DES 38 SOUCHES DE *BACILLUS*

La PCR est réalisée sur le même appareil. Seule la température d'hybridation varie en fonction du SNP en cours d'analyse :

- l'ADN est dénaturé 5 minutes à 94°C ;
- puis pour un SNP déterminé, 34 cycles sont effectués dans les conditions suivantes :

- dénaturation à 94°C pendant 20 secondes,
- hybridation pendant 20 secondes à la température déterminée par le gradient pour ce SNP,
- puis élongation à 65°C pendant 20 secondes ;
- l'extension est ensuite achevée à 65°C pendant 5 minutes.

Dans certains cas, une seconde PCR a été réalisée car les produits d'amplification présentaient un signal trop fort nuisant à une lecture correcte des images. Les conditions de PCR sont alors exposées avec les résultats (cf. §4.5.1.2.).

MM.1.3.4. PRODUITS UTILISES POUR LES PCR

Le volume réactionnel est de 20 µl par tube. Il comprend :

- 2 µl de tampon d'incubation 10x (tampon d'incubation 1x : Tris-HCl 10 mM pH 9,0, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Triton X-100 0,1%, BSA 0,2 mg/ml) (Q-BIOgene, réf. : EPMWG),
- 3 µl de chaque dNTP à 2 mM (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, MBI Fermentas, réf. : #R0181),
- 0,4 µl de Taq DNA polymérase à 5 UI/µl (Q-BIOgene, réf. : EPTQA100),
- 10 µl d'ADN à 0,1 ng/µl,
- 1 µl d'un mélange d'amorces 1+3 (A, Ames) ou 2+3 (D, Davis) à 10 µM,
- 3,6 µl d'eau.

Les solutions sont préparées selon le modèle suivant (cf. figure 59) :

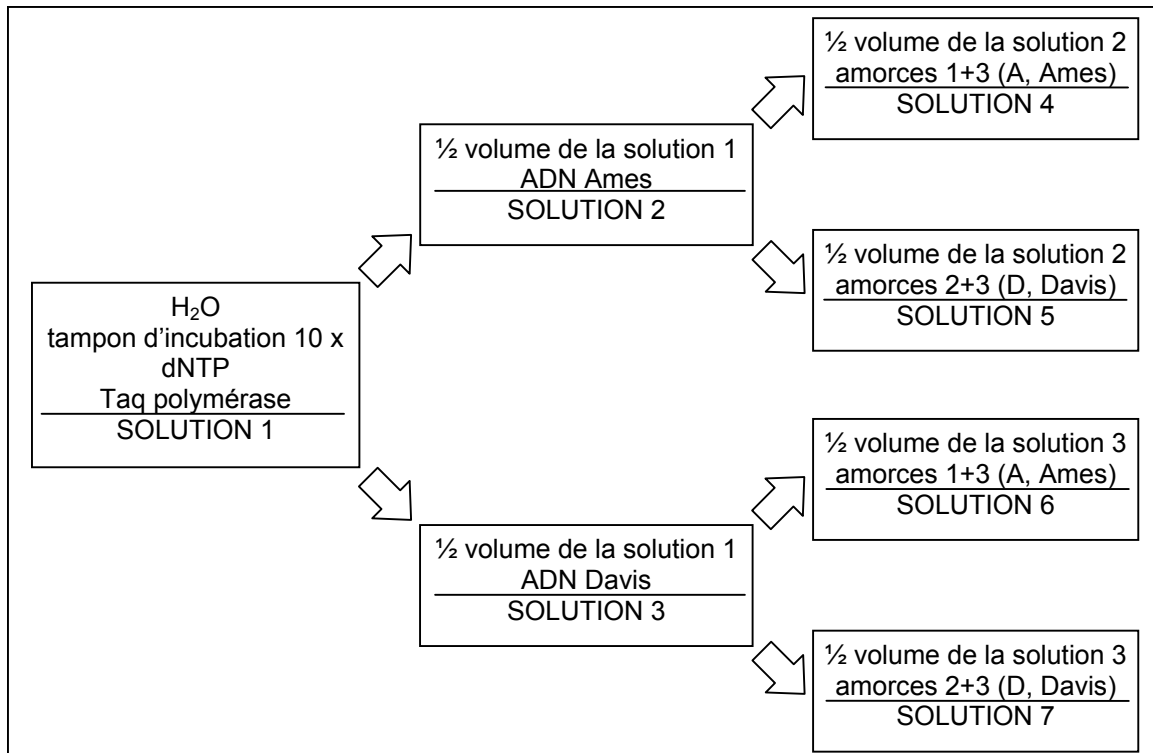


Figure 59 : Schéma illustrant le protocole de préparation des réactions réalisées pour la sélection et l'analyse des SNP identifiés.

Pour chaque SNP à sélectionner, une gamme de température d'hybridation (12 températures) est testée sur chaque couple d'amorces (1+3 et 2+3), en utilisant alternativement l'un des deux ADN, Ames ou Davis. Par conséquent, 24 réactions différentes sont réalisées.

S'agissant de l'analyse des 40 souches de *Bacillus* (38 souches différentes dont deux sont dupliquées), 40 réactions sont effectuées sur chacun des deux couples d'amorces (1+3 et 2+3).

Chaque réaction PCR contient l'amorce 3 et l'une des deux autres amorces, 1 ou 2, ainsi que l'ADN de l'une des deux souches de *B. anthracis*, Ames ou Davis.

Théoriquement, les mélanges contenant les amorces 1 et 3 vont amplifier l'ADN de la souche Ames et pas celui de la souche Davis. De même, les mélanges contenant les amorces 2 et 3 amplifieront l'ADN de la souche Davis et pas celui de la souche Ames.

MM.1.3.5. ELECTROPHORESE DES PRODUITS DE PCR

2,5 µl d'une solution à base de bleu de xylène cyanol (cf. annexe 4, SIGMA, réf. : X-4126) sont ajoutés dans chaque tube réactionnel. Puis 8 µl de chaque produit d'amplification sont déposés sur un gel d'agarose standard à 2% (Q-BIOgene, réf. : AGAH0500) dissous dans du TBE 0,5x. L'électrophorèse dure environ 45 minutes à 400 volts. L'électrophorèse est arrêtée lorsque le bleu de dépôt, migrant trois fois moins vite que les SNP, se situe à environ 3 cm des loges.

Le gel est ensuite coloré pendant 30 minutes dans une solution à 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium (BET, Q-BIOgene, réf. : ETBC01) dissous dans du TBE 0,5x. Il est visualisé sous une lampe à ultra-violets.

MM.1.3.6. ORGANISATION DES DEPOTS SUR LE GEL

En ce qui concerne la validation des SNP, le dépôt est organisé de la manière suivante (cf. tableau 12) :

Température	51°C	51,4°C	52,1°C	53,3°C	54,9°C	57°C	59,3°C	61,3°C	62,9°C	63,9°C	64,7°C	65°C
Souche	Ames	Davis	Ames	Davis	Ames	Davis	Ames	Davis	Ames	Davis	Ames	Davis
Amorce	D A	D A	D A	D A	D A	D A	D A	D A	D A	D A	D A	D A

Tableau 12 : Organisation du dépôt des produits d'amplification lors de la validation des SNP sur un gradient de température d'hybridation (ou annealing).
D : Davis, A : Ames.

Lors de l'établissement du gradient, les températures d'hybridation sont imposées par l'appareil PCR. Sur le gel, elles augmentent, toutes les deux loges, de la gauche vers la droite, sur une gamme variant de 51°C à 65°C.

A chacun de ces changements correspond de l'ADN dont la souche est soit de type Ames soit de type Davis, comme indiqué dans le tableau 12.

Quant aux amorces A et D, elles sont réparties alternativement dans chacune des loges comprises dans le gel.

S'agissant de l'analyse des SNP sur les 40 souches de *Bacillus*, les dépôts sont organisés de la façon suivante (cf. tableau 13) :

		<i>Bacillus anthracis</i>																																								
Référence de la souche		CEB 9401		CEB 9433		CEB 9434		CEB 9435		CEB 9439		CEB 9440		CEB 9441		CEB 9442		CEB 9443		CEB 9444		CEB 9445		CEB 9501		CEB 9502		CEB 9503		CEB 9504		CEB 9505		CEB 9506		CEB 9507		CEB 9508		CEB 9509		
	Amorces	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	
			<i>Bacillus anthracis</i>															<i>Bacillus cereus</i>																								
	Référence de la souche		CEB 9510		CEB 9511		CEB 9531		CEB 9532		CEB 9534 (Davis)		CEB 9602		CEB 9606		Ames		CEB 9602		CEB 9534 (Davis)		CEB 9104		CEB 9533		CEB 9535		CEB 9536		CEB 9780		CEB 9781		CEB 9782		CEB 9783		CEB 9784		CEB 9786	
		Amorces	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D

Tableau 13 : Organisation du dépôt des produits d'amplification lors de l'analyse des SNP sur une collection de souches de *Bacillus anthracis* et de *Bacillus cereus*.
D : Davis, A : Ames.

Pour chaque SNP, on détermine le profil de chaque souche qui est théoriquement soit de type Ames soit de type Davis.

MM.2. ANALYSE DU BRUIT DE FOND ATMOSPHERIQUE

Différentes analyses sont réalisées sur les échantillons atmosphériques prélevés :

- numération par culture,
- analyse cytométrique,
- analyse génétique par la méthode « génome complet ».

MM.2.1. CULTURE DES PRELEVEMENTS

La culture est réalisée sur deux boîtes de milieu gélosé TSA (Tryptic Soy Agar, DIFCO, réf. : 236950) dont l'une contient également du cycloheximide qui sert d'antifongique.

Chaque boîte de culture est photographiée après le comptage des colonies afin d'alimenter la base de données.

MM.2.1.1. CULTURE SUR MILIEU NON SELECTIF

100 µl de chaque échantillon collecté sont mis en culture sur une boîte de gélose TSA. Ce milieu non sélectif permet, après une incubation des boîtes pendant 6 jours à 20°C, de dénombrer la flore microbienne totale. Le résultat est exprimé en cfu (colony forming unit).

Cependant, ce résultat reflète seulement une partie de la flore microbienne cultivable présente dans l'échantillon. En effet, certains micro-organismes cultivables ne croissent pas de façon optimale à 20°C. De plus, certains microbes se développent dans des proportions compromettant la croissance de certains autres.

MM.2.1.2. CULTURE SUR MILIEU SELECTIF

Ce protocole n'a été utilisé que depuis le mois de juillet 2000. Pour chaque échantillon, 100 µl de collecte sont mis en culture sur une boîte de gélose TSA contenant un antifongique, le cycloheximide (Calbiochem®, réf. : 239764) à une concentration finale de 200 µg/ml. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 5 jours.

Ce type de milieu permet d'éliminer l'envahissement de la boîte par certains champignons. Ces conditions de culture favorisent largement la croissance des colonies bactériennes (Bovallius *et al.*, 1978, Buttner et Stetzenbach, 1993).

MM.2.2. ANALYSE PAR CYTOMETRIE

MM.2.2.1. ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX

Un mélange réactionnel contenant 1 volume de SYTO 9 dye à 3,34 mM est ajouté à 1 volume d'iodure de propidium à 20 mM (LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit, Molecular Probes, réf. : L-7012). 1,5 µl de ce mélange sont additionnés à 500 µl d'échantillon du bruit de fond atmosphérique. Après 15 minutes d'incubation dans l'obscurité, la suspension bactérienne colorée est analysée au cytomètre en flux EPICS® XL-MCL (Coulter).

MM.2.2.2. ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN PHASE SOLIDE

• Détection de micro-organismes

- Filtration

Après avoir nettoyé le support de filtration avec de l'éthanol à 70% puis de l'eau milli-Q, une membrane ChemFilter CB04 (diamètre : 25 mm, porosité : 0,4 µm, Chemunex, réf. : 200-C2010-01) est déposée sur celui-ci.

Puis, successivement 100 µl de l'échantillon de bruit de fond à analyser et 1 ml du contre-colorant CSE/2 (Chemunex, réf. : 200-R4091-01) sont déposés et filtrés sur la membrane.

Le CSE/2 est utilisé pour réduire le bruit de fond fluorescent relevé sur la membrane. Il doit être conservé à température ambiante.

- Prémarquage

Les échantillons sont ensuite prémarqués sous une hotte à flux laminaire. Pour chaque échantillon, un Labelling Pad (diamètre : 25 mm, Chemunex, réf. : 200-C2012-03) est déposé sur un Support Pad (diamètre : 25 mm, Chemunex, réf. : 200-C2008-01) et imbibé de 600 µl de solution ChemSol A4 (Chemunex, réf. : 200-R2050-01).

Ce dernier réactif est utilisé comme tampon de prémarquage afin d'optimiser le marquage des micro-organismes. Il doit être conservé à température ambiante.

Le ChemFilter CB04 sur lequel se trouve l'échantillon est alors transféré sur le Labelling Pad. L'ensemble est enfin incubé pendant une heure à 37°C.

- Marquage

La solution de marquage est préparée en ajoutant 150 µl de ChemChrome V6 (Chemunex, réf. :200-R1007-01) à 15 ml de ChemSol B16 (Chemunex, réf. : 200-R2023-01). Cette solution photosensible doit être conservée dans l'obscurité entre 4 et 8°C et être utilisée dans les quatre heures qui suivent sa préparation.

La solution ChemSol B16 est utilisée comme tampon de marquage tandis que le réactif ChemChrome V6 constitue le marqueur, de couleur jaune, et se conserve entre 4 et 8°C.

Pour chaque échantillon, un nouveau Labelling Pad est déposé sur un Support Pad et imbibé avec 600 µl de la solution de marquage. Les membranes ChemFilter CB04 sont alors transférées sur ces Labelling Pad, ces derniers étant saturés par la solution de marquage. L'ensemble est ensuite incubé pendant 30 minutes à 30°C.

- Analyse sur le ChemScan RDI

Les membranes sont lues par le ChemScan RDI (Chemunex).

• Détection spécifique de levures et de moisissures

Les étapes sont identiques à celles décrites dans le paragraphe précédent (cf. §MM.2.2.2., Détection de micro-organismes).

Seuls les réactifs sont différents :

- le contre-colorant utilisé pour la filtration est le CSE/5 (Chemunex, réf. : 200-R4069-02),
- le tampon de prémarquage correspond au ChemSol A6 (Chemunex, réf. : 200-R2053-01),
- la solution de marquage est constituée de ChemSol B2 (Chemunex, réf. : 200-R2022-02) et de ChemChrome V6 (Chemunex, réf. : 200-R1007-03).

MM.2.3. ANALYSE GENETIQUE

Cette section est exclusivement consacrée à la présentation des expériences génétiques réalisées pour l'analyse des échantillons du bruit de fond atmosphérique, basée sur le « génome complet » des bactéries.

MM.2.3.1. BACTERIES

Les espèces bactériennes dont la référence est un nombre à quatre chiffres proviennent du CEB (Centre d'Etudes du Bouchet, Vert-Le-Petit). Elles représentent la majorité des souches présentes sur la membrane. Certaines espèces, dont la référence est précédée par un C, proviennent du CRSSA (Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, La Tronche). S'agissant des espèces dont la référence débute par un D, les ADN sont achetés chez Sigma Aldrich sous la référence citée.

Les bactéries sont conservées à -80°C dans du glycérol dont la concentration finale est de 30% (cf. annexe 4).

Les ADN extraits de ces bactéries sont ensuite fixés sur des membranes qui servent de support solide à l'hybridation.

MM.2.3.2. PREPARATION D'ADN GENOMIQUE A PARTIR DE CULTURES BACTERIENNES

Plusieurs extractions d'ADN sur des espèces bactériennes différentes sont effectuées en série. Une attention particulière est portée sur la nécessité de ne pas mélanger les souches (Wilson, 1995).

Avant toute extraction, chaque espèce bactérienne est réensemencée sur un milieu solide gélosé LB (Lucia Broth, cf. annexe 4) à 37°C pendant 24 heures, afin de vérifier l'absence de contamination de la bactérie par d'autres micro-organismes. Les bactéries sont ensuite repiquées tous les 10 à 15 jours.

Lorsque les colonies bactériennes apparaissent après 24 heures d'incubation à 37°C, l'espèce est mise en culture dans 200 ml de milieu liquide 2YT (cf. annexe 4), sous agitation vigoureuse, pendant une nuit à 37°C.

Les 200 ml de culture sont ensuite centrifugés pendant 20 minutes à 4 000 g. Le surnageant est éliminé. Puis le culot est resuspendu doucement dans 750 µl de TE 1x.

L'extraction des ADN de *Bacillus* requiert une étape supplémentaire par rapport aux ADN des autres bactéries, en raison de leur capacité à sporuler lorsque les temps de culture sont longs. 750 µl du culot resuspendu de *Bacillus* sont broyés pendant 4 minutes à 4 200 vpm (broyeur Mini-Beadbeater™ de Biospec Products) en présence de 1 g de billes de verre de 0,1 mm de diamètre. Le broyat est récupéré et conservé dans la glace. Puis 750 µl du culot bactérien sont ajoutés aux billes et soumis à un broyage. Cette étape est répétée jusqu'à ce qu'il ne subsiste plus de culot à broyer. Les billes sont alors rincées avec du TE 1x et le produit de rinçage est regroupé avec l'ensemble du broyat dans un seul tube de 50 ml (pour 200 ml de culture initiale).

Le broyat, en ce qui concerne les *Bacillus*, ou le culot bactérien, s'agissant des autres genres, est alors complété à hauteur de 20 ml avec du TE 1x. Puis, du SDS est ajouté à une concentration finale de 0,5%. Les protéines sont détruites par incubation en présence de protéinase K à une concentration finale de 0,1 mg/ml. La solution est homogénéisée et incubée à 37°C sous agitation douce pendant une nuit.

Après l'ajout de 3,6 ml de NaCl 5 M (concentration finale en NaCl = 0,9 M) et de 3 ml de CTAB 10 % - NaCl 0,7 M (préchauffé à 65°C, cf. annexe 4), le tube est incubé à 65°C pendant 20 minutes. L'extraction d'ADN est réalisée en présence d'un volume de chloroforme/alcool isoamylique (cf. annexe 4). Après une centrifugation à 4 000 g pendant 20 minutes, l'étape d'extraction est répétée une fois sur le surnageant (ajout d'un volume de chloroforme/alcool isoamylique et centrifugation à 4 000 g pendant 20 minutes). La phase aqueuse est alors récupérée tandis que la phase organique est éliminée.

La précipitation de l'ADN a lieu en ajoutant, progressivement le long de la paroi du tube, 0,6 volume d'isopropanol ou propanol-2 (la précipitation à l'isopropanol répond à des contraintes de volume). L'ADN qui précipite sous la forme de filaments est récupéré à l'aide d'une pipette Pasteur. Il est rincé dans de l'éthanol à 70 % avant d'être mis à sécher.

La solution restante est, quant à elle, centrifugée à 4 000 g pendant 20 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est mis à sécher. Puis ce dernier est resuspendu dans 1 ml de TE 1x et 20 µl de NaCl 5 M. L'ajout progressif de 3 ml d'éthanol absolu, le long de la paroi du tube, provoque la précipitation d'un autre filament d'ADN qui est récupéré à l'aide d'une pipette Pasteur, rincé dans de l'éthanol à 70 % et mis à sécher.

Dans l'hypothèse où aucun filament ne se formerait au cours de ces deux précipitations (s'agissant des *Bacillus*, si les ADN sont trop broyés, la solution devient floconneuse, de sorte qu'aucun filament d'ADN ne se forme), il est nécessaire de centrifuger, à nouveau, le tube pendant 20 minutes à 4 000 g. Le surnageant sera éliminé et le culot mis à sécher.

Les ADN secs sont ensuite resuspendus dans un volume minimal de 1 ml de TE 1x. Leur concentration est mesurée au fluorimètre avant de les stocker à -20°C ou à -80°C selon la fréquence d'utilisation.

MM.2.3.3. MESURE DE LA CONCENTRATION DES ADN EXTRAITS AU FLUORIMETRE

La mesure de concentration des ADN est réalisée grâce au fluorimètre DyNA Quant™ 200 (Hœfer). La fluorimétrie permet de doser la concentration en ADN d'une solution contenant également des ARN ou des nucléotides libres. Cette méthode repose sur la fluorescence émise par le réactif Hoescht 33258 (ou bisbenzimidazole H 33258, Calbiochem® Corporation, réf. : 382061) lorsqu'il se fixe spécifiquement à l'ADN double brin. Ce réactif étant potentiellement mutagène, sa manipulation nécessite le port de gants.

Les mesures sont réalisées dans 2 ml de tampon contenant 200 µl de TNE 10x auxquels sont ajoutés 2 µl de Hoescht 33258 à 1 mg/ml. Dans un premier temps, l'appareil est étalonné en l'absence de tout ADN puis en présence de 2 µl d'un ADN de concentration connue. Ensuite, 2 µl des solutions à doser sont ajoutés séquentiellement. La mesure de la concentration correspond à la différence entre la valeur lue sur l'appareil et celle précédemment mesurée.

MM.2.3.4. SUPPORTS SOLIDES POUR L'HYBRIDATION

Les supports solides qui sont utilisés pour l'hybridation sont des membranes de nylon chargées positivement porablot NY plus (Macherey-Nagel, réf. : 741242), d'une surface de 27x36 mm². Elles comportent 48 ADN d'espèces bactériennes différentes (cf. figure 60).

<i>Bacillus anthracis</i> 9534	<i>Bacillus cereus</i> 9814	<i>Bacillus cereus</i> 9823	<i>Bacillus circulans</i> 9809	<i>Bacillus coagulans</i> 9810	<i>Bacillus subtilis</i> 9320
<i>Bacillus lentus</i> 9818	<i>Bacillus megaterium</i> 9913	<i>Bacillus mycoïdes</i> 9722	<i>Bacillus pumilus</i> 9790	<i>Bacillus sphaericus</i> 9917	<i>Bacillus sp.</i> 9901
<i>Bacillus stearothermophilus</i> 9811	<i>Bacillus thuringiensis</i> 9613	<i>Bacillus thuringiensis</i> 9727	<i>Bacillus thuringiensis</i> 9829	<i>Bacillus thuringiensis</i> 9942	<i>Bacillus thuringiensis</i> 9943
<i>Brucella abortus</i> 9905	<i>Brucella melitensis</i> 9906	<i>Brucella suis</i> 9907	<i>Burkholderia cepacia</i> C1097	<i>Burkholderia mallei</i> C2897	<i>Burkholderia pseudomallei</i> C1497
<i>Clostridium perfringens</i> D1760	<i>Escherichia coli</i> D2001	<i>Francisella tularensis</i> 9908	Homme D7011	<i>Klebsiella oxytoca</i> 8706	<i>Micrococcus lysodeikticus</i> D8259
<i>Pantoea agglomerans</i> 9919	<i>Providencia rettgeri</i> 8652	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	<i>Salmonella arizonae</i> 8712	<i>Salmonella paratyphiA</i> 9522	Saumon D1626
<i>Shigella boydii</i> 8658	<i>Shigella dysentirae</i> 8661	<i>Shigella sonnei</i> 8656	<i>Vibrio cholerae</i> 9904	<i>Yersinia enterocolitica</i> 8505	<i>Yersinia pestis</i> 8722
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> 8522	<i>Yersinia ruckeri</i> 8738	Veau D3664			Soude + Bleu

Figure 60 : Schéma d'une membrane. Organisation des dépôts des différents ADN bactériens sur la membrane.

Les membranes sont découpées au format d'une plaque 96 puits, puis équilibrées dans un bain de TE 1x. Chacune d'elle permet la fabrication de huit petites membranes au format 27x36 mm².

Chaque dépôt de 50 µl contient 20 ng/µl d'ADN et 0,002 % de bleu de bromophénol qui sert à visualiser les dépôts. La dilution est réalisée dans une solution de soude à 0,4 N afin de dénaturer l'ADN.

Après chaque dépôt, tous les puits sont rincés par 500 µl de soude 0,4 N. Puis la membrane est équilibrée pendant quelques secondes dans un bain de NaOH 0,4 N. La soude est alors éliminée par rinçage de la membrane dans deux bains de TE 1x.

Les membranes sont ensuite mises à sécher dans l'obscurité. Puis, elles sont découpées et placées dans les tubes d'hybridation. Elles sont conservées ainsi à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

MM.2.3.5. HYBRIDATION CROISEE

Pour chaque espèce bactérienne, la réaction de marquage est réalisée dans un volume final de 20 µl. 1 ng d'ADN est marqué avec le kit E+ pendant une heure à 37°C (cf. §MM.6.).

La sonde est éluée sur une colonne de Séphadex® G75 afin d'éliminer les nucléotides libres non incorporés.

Après dénaturation de la sonde, celle-ci est mise à hybrider en présence des membranes à 65°C pendant une heure dans 750 µl de tampon Rapid-Hyb™ (cf. §MM.7.).

Les membranes sont lavées puis exposées à un écran photosensible. Un temps d'exposition de 15 minutes suffit à révéler les signaux d'hybridation croisée, visualisés sur le Storm® 860 (cf. §MM.8.).

MM.2.3.6. ANALYSE PAR LA METHODE « GENOME COMPLET » DES ECHANTILLONS DU BRUIT DE FOND ATMOSPHERIQUE

Les manipulations s'opèrent avec des gants afin d'éviter une contamination des échantillons par des DNAses et de l'ADN humain.

Quatre collectes ont été entièrement analysées : il s'agit des collectes 4 (26 et 27 avril 2000), 11 (15 et 16 juin 2000), 18 (02 et 03 août 2000) et 19 (09 et 10 août 2000). Tous les échantillons sont traités le même jour.

• Bacillus stearothermophilus

Des spores de *Bacillus stearothermophilus* (Raven Biological Laboratories, réf. : ATCC 7953) sont utilisées afin de contrôler les différentes étapes du protocole de traitement de l'échantillon issu de prélèvements atmosphériques. Le fabricant a mesuré la concentration de spores en cfu. Cette mesure a été confirmée par la mise en culture d'une quantité déterminée de ces spores. Cependant, les analyses cytométriques en phase solide et en phase liquide montrent la présence d'une concentration 1 000 fois plus élevée de particules dont le comportement (taille et réfringence) est identique à celui de spores. Ce résultat suggère que la plupart des spores de l'échantillon sont tuées.

La quantité de spores ajoutées servira donc à l'évaluation ultérieure de la sensibilité du système génétique, dans la mesure où tous les ADN présents dans l'échantillon, s'ils ne sont pas trop dégradés par le broyage, participent au signal mesuré en final, que la spore soit viable ou non.

• Lyse des cellules

Des tubes à vis de 2 ml, stérilisés par autoclavage et contenant 1 g de billes de verre de 0,1 mm de diamètre, sont utilisés pour le broyage. Une étape de prébroyage est réalisée afin de saturer des sites potentiellement libres, localisés au niveau des billes de verre ou des parois du tube, sur lesquels les ADN sont susceptibles de se fixer de façon non-spécifique (cf. §MM.5. et §6.6.3.). 10 µg d'ARNt de levure de boulanger (Sigma, réf. : R9001) sont employés, dans un volume final de 200 µl, pour le prébroyage de 20 secondes à 6,5 vpm

(FastPrep™ FP120, Bio 101 Savant). Les ARNt sont donc captés sur les sites de fixation potentiels de l'ADN se substituant ainsi aux ADN de l'échantillon.

Chaque échantillon du bruit de fond atmosphérique (500 µl) est broyé pendant 45 secondes à 6,5 vpm en présence de 75 000 spores (ou 75 cfu) de *B. stearothermophilus*.

Le lysat est récupéré dans des conditions identiques à celles décrites dans le paragraphe MM.5. Puis les échantillons sont incubés toute une nuit à 37°C sous agitation douce après ajout de SDS et de protéinase K à des concentrations finales respectives de 0,5 % et de 0,1 mg/ml.

• **Extraction, précipitation**

Afin de dégrader les 10 µg d'ARNt, 7,5 µl de RNase A à 10 mg/ml sont ajoutés au broyat. L'incubation dure une heure à 37°C sous agitation douce. Cette étape évite au fragment de Klenow de présenter de l'affinité pour les ARNt lors du marquage ultérieur des acides nucléiques. En effet, de précédents marquages ont démontré qu'une telle quantité d'ARNt générerait un signal qui subsiste après les lavages malgré la présence d'ADN dans la solution de marquage.

L'extraction des ADN se fait par ajout d'un volume de phénol-chloroforme. Les tubes sont agités et la solution est transférée dans des tubes Phase Lock Gel Heavy 2 ml (Eppendorf, réf. : 0032005.152) avant d'être centrifugée une minute à 13 000 g. Ces derniers présentent l'avantage de contenir un gel qui s'intercale entre les deux phases après la centrifugation, facilitant ainsi la récupération de la phase aqueuse.

A partir de la phase aqueuse recueillie, l'ADN est précipité en présence de 5,6 µl de glycogène à 20 mg/ml, de 45 µl de NaCl 5 M et de 0,6 volume d'isopropanol. Le glycogène facilite la précipitation de faibles quantités d'ADN en permettant de visualiser le culot. Après agitation, les tubes sont incubés 30 minutes dans la glace. Ils sont ensuite centrifugés 20 minutes à 11 300 g. Puis, le surnageant est éliminé. Les culots sont alors rincés dans 1 ml d'éthanol à 70%. Les tubes sont à nouveau centrifugés pendant 20 minutes à 11 300 g. Le surnageant est éliminé et les culots sont mis à sécher pendant 1 heure 30. Ils sont finalement resuspendus dans 100 µl de TE 1x et incubés une nuit à 4°C.

L'ADN est à nouveau précipité en présence de 6 µl de NaCl 5 M et de 300 µl d'éthanol absolu. Les tubes sont agités puis incubés 30 minutes dans la glace. Ils sont ensuite centrifugés 20 minutes à 11 300 g. Lorsque le surnageant est éliminé, les culots sont mis à sécher pendant 1 heure 30. Ils sont ensuite resuspendus dans 20 µl de TE 1x puis conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation pour la réaction de marquage.

• Marquage, hybridation, lavages, exposition

Les ADN extraits de chaque échantillon sont répartis dans des plaques 96 puits pour PCR (Advanced Biotechnologies LTD, réf. : AB-0800).

10 µl des ADN extraits sont marqués avec le kit E+ dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (cf. §MM.6.).

Après le marquage, la sonde est immédiatement dénaturée pendant 5 minutes à 95°C. Puis, 50 µl de TE 1x sont ajoutés à la sonde.

L'éluion de la sonde est réalisée sur une plaque de filtration 96 puits Multiscreen®-PCR (Millipore, réf. : MANU 03010). La totalité de la sonde (soit 70 µl) est déposée sur la plaque de filtration. Les nucléotides libres, non incorporés, et les amorces traversent la membrane de filtration. En revanche, celle-ci retient les ADN radiomarqués qui sont alors resuspendus dans 50 µl de TE 1x.

L'hybridation est réalisée dans des conditions identiques à celles décrites dans le paragraphe MM.7. Par contre, elle dure la nuit en présence de la totalité de la sonde et de 750 µl de tampon Rapid-Hyb™ à 65°C.

Après trois lavages, les membranes sont exposées à un écran photosensible pendant deux jours. Les signaux sont visualisés sur le Storm® 860 (Molecular Dynamics).

MM.3. MICROBALANCE A CRISTAL DE QUARTZ (QCM)

MM.3.1. CRISTAL DE QUARTZ

La QCM (Quartz Crystal Microbalance) est un transducteur composé d'un cristal de quartz sur lequel sont fixées, de part et d'autre du quartz, deux électrodes d'or (cf. figure 61).

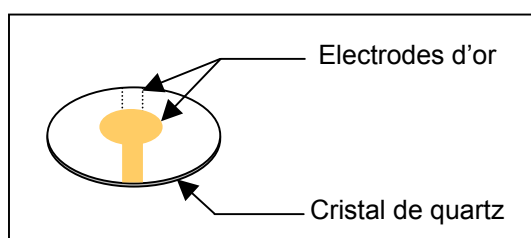


Figure 61 : Schéma d'un cristal de quartz.

Deux électrodes d'or de 5 mm de diamètre sont fixées de part et d'autre du cristal de 16 mm de diamètre.

La société CQE (Troyes) fournit les cristaux de quartz (Bizet, 1997).

Avant toute utilisation, les quartz sont nettoyés dans une solution d'acétone puis soumis à des ultrasons pendant deux à trois minutes. Après un rinçage dans de l'éthanol, ils sont séchés à l'air ambiant.

La microbalance utilisée dans cette étude fonctionne à 27 MHz (sur le partiel 3 d'un quartz à 9 MHz).

MM.3.2. MONTAGE POUR LA FIXATION D'ADN PAR CIRCULATION

Le quartz est assemblé sur la microbalance, comme indiqué par le schéma suivant (cf. figure 62).

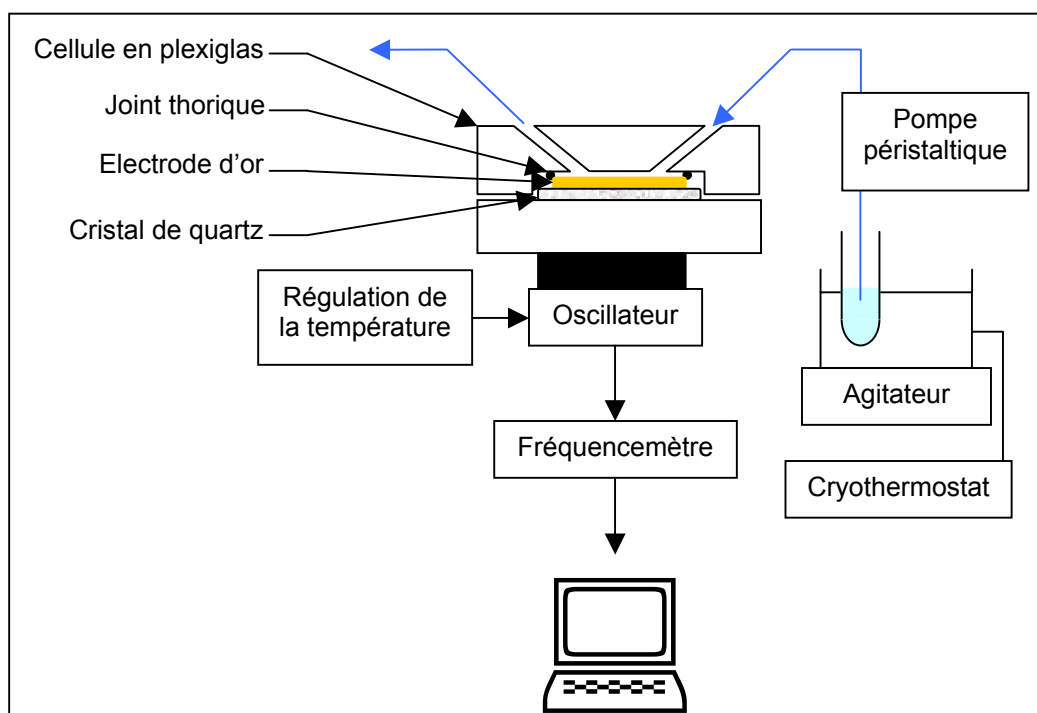


Figure 62 : Schéma du montage de la microbalance à cristal de quartz.

Le débit de la pompe péristaltique est fixé à 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Le tampon PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, réf. : P4417) sert à la fois de tampon circulant et de tampon de dilution de l'ADN. La solution initiale contient 45 $\text{ng}/\mu\text{l}$ d'ADN portant les groupes sulfhydryles. Avant le passage de l'ADN, la microbalance est équilibrée en présence de tampon PBS.

MM.3.3. MONTAGE POUR LA FIXATION D'ADN PAR EVAPORATION

Au cours de cette expérience, les cristaux de quartz sont bloqués entre deux plaques de plexiglas. Sur l'une des deux plaques, des puits ont été creusés. La solution à évaporer est déposée sur l'électrode d'or située face au puits (cf. figure 63).

Le système est conservé à température ambiante pendant 48 heures, jusqu'à ce que le liquide se soit complètement évaporé.

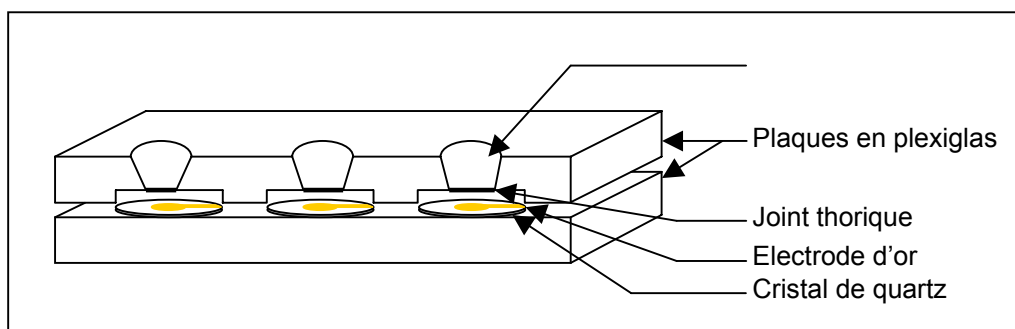


Figure 63 : Schéma du montage de la microbalance pour fixer l'ADN par évaporation (Bizet, 1997).

MM.3.4. MODIFICATION DE L'ADN A IMMOBILISER SUR LA MICROBALANCE

Le Fasttag™ Biotin Labeling Kit (Vector Laboratories, réf. : MB-2000) permet, en suivant les instructions du fabricant, de lier de façon covalente un groupe sulfhydryle sur n'importe quelle base de l'ADN. L'ADN utilisé est préparé à partir de rate de rat (Wistar Kyoto) (Strauss, 1995).

MM.4. DEPOT D'ADN SUR DES MEMBRANES DE NYLON CHARGÉES POSITIVEMENT

Les membranes employées sont les suivantes :

- GeneScreen Plus® (NEN™ Life Science Products, réf. : NEF988),
- porablot® NY plus (Macherey-Nagel, réf. : 741242),
- NYTRAN-PLUS (Schleicher & Schuell, réf. Polylabo : 46678),
- Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, réf. : RPN203B).

Les ADN sont dénaturés en présence de NaOH 0,4 N avant d'être immobilisés par filtration sur ces membranes. Leur pH est ensuite neutralisé en les plongeant dans un bain de TE 1x. Elles sont alors mises à sécher avant utilisation.

L'appareil de filtration à 96 puits, HYBRI•DOT® (LIFE TECHNOLOGIES®, réf. : 31050-016) est relié à une pompe à vide motorisée (Vacuubrand GMBH, réf. : MZ2C).

MM.5. TRAITEMENT DE L'ÉCHANTILLON POUR L'ANALYSE DE SPORES

Les conditions optimales du broyage, en particulier le type de billes, leur quantité, le temps et la vitesse de broyage, ont été définies en présence d'un grand nombre de spores. Elles sont atteintes lorsque le broyage dure 4 minutes à 2500 vpm. La lyse des cellules implique de recourir à une masse de billes dans une proportion de 100 mg pour 50 µl d'échantillon.

50 µl d'une suspension de spores de *B. subtilis* (Centre d'Etudes du Bouchet, réf. : CEB 9789) ont été ajoutés à 100 mg de billes de verre de 0,1 mm de diamètre (Poly Labo, réf. : 55623). Après un broyage (Mini-Beadbeater™, Biospec Products) de 4 minutes à 2 500 vpm dans un tube à vis de 1,5 ml, le fond de ce tube est percé avec une aiguille. Afin d'éliminer les billes de verres, les 50 µl de broyat sont récupérés dans un nouveau tube, par une centrifugation de trois minutes à 1 600 g.

Les compétiteurs testés (10 µg) sont l'acide polycytidilique (polyC, Sigma, réf. : P4903), l'ADN de saumon (Sigma, réf. : D1686), l'ARNt de levure de boulanger (Sigma, réf. : R9001) et le lait écrémé en poudre (Régilait).

Lors du choix du compétiteur, le prébroyage et le broyage durent chacun 2 minutes à 4 200 vpm en présence de 1 g de billes de verre. S'il n'est pas précisé, le volume final de l'échantillon est fixé à 500 µl. Toutes les dilutions s'effectuent dans l'eau milliQ. Les expériences sont réalisées en présence de 500 ng d'ADN de *B. subtilis* (Centre d'Etudes du Bouchet, réf. : CEB 9318).

MM.6. MARQUAGE RADIOACTIF D'ADN

Différents kits de marquage, dont les compositions sont présentées dans le tableau suivant (cf. tableau 14), ont été utilisés.

	Kit E+	Kit E-	Kit HL	Kit DL
ADN	0,2 ng/μl	0,2 ng/μl	0,5 ng/μl	0,5 ng/μl
Fragment de Klenow	Exonucléase +	Exonucléase -	Exonucléase -	Exonucléase -
Amorce	Hexanucléotide	Hexanucléotide	Hexanucléotide	Décanucléotide
Tampon de marquage	X	X	Y	Y
dATP, dTTP, dGTP	0,25 mM	0,25 mM	0,2 mM	0,2 mM
[α-³²P] dCTP	0,5 μCi/μl	0,5 μCi/μl	1 μCi/μl	1 μCi/μl
Volume réactionnel final	20 μl	20 μl	50 μl	50 μl

Tableau 14 : Différence de composition entre les quatre kits de marquage testés.

- **E+** : exonucléase +, **E-** : exonucléase -, **HL** : HexaLabel™ DNA Labeling Kit (MBI Fermentas, réf. : #K0612), **DL** : DecaLabel™ DNA Labeling Kit (MBI Fermentas, réf. : #K0622).
- **Fragment de Klenow exonucléase+/-** : fragment de Klenow avec (+) (MBI Fermentas, réf. : #EP0054) ou sans (-) (MBI Fermentas, réf. : #EP0421) activité exonucléase 3'→5'.
- Les **tampons de marquage** sont composés de la façon suivante :
 - **Tampon X 1x** : 50 mM Tris-HCl pH 7,2, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM dithiothréitol, 0,2 mg/ml BSA, 5 unités optiques/ml d'hexanucléotide.
 - **Tampon Y 1x** : 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothréitol, 1,5 unités optiques/ml d'hexanucléotide ou 2,5 unités optiques/ml de décanucléotide.
- **dATP, dTTP, dGTP** (MBI Fermentas, réf. : #R0181).
- **[α-³²P] dCTP** 10 mCi/ml, 3 000 Ci/mmol (Amersham Pharmacia Biotech, réf.: AA0005)

L'ADN, contenu dans un volume final de 10 μl, est dénaturé pendant 5 minutes à 100°C puis mis dans de la glace. S'agissant des kits HL et DL, cette dénaturation est réalisée en présence des amorces.

La réaction de marquage est réalisée à 37°C pendant une heure.

Puis, la sonde est éluée sur une colonne de Séphadex® G75 (cf. annexe 4, Amersham Pharmacia Biotech, réf. : 17-0050-01) afin d'éliminer les nucléotides libres qui n'ont pas été incorporés lors du marquage. Les 20 μl de sonde sont dilués dans 280 μl de TE 1x puis déposés sur la colonne. Un tube à vis est ensuite disposé sous chaque colonne et la sonde est éluée avec 300 μl de TE 1x.

La sonde est ensuite dénaturée à 100°C pendant 5 minutes avant toute hybridation.

Lors de l'évaluation des kits de marquage, un aliquote de 6,25 µl de la sonde est prélevé à différents temps, puis, immédiatement dilué dans un volume final de 300 µl de TE 1x.

1 µl de chaque sonde radiomarquée est déposé sur deux filtres Whatman® DE81 (Whatman, réf. : 3658023). Après séchage, pour chaque sonde, un des deux filtres est soumis à trois lavages successifs de 5 minutes dans 10 ml de Na₂HPO₄ à 0,2 M, avant d'être à nouveau mis à sécher.

Le reste de chaque sonde, soit 298 µl, est élué sur une colonne de 1 ml de Séphadex® G75 puis dénaturé à 100°C pendant 5 minutes avant d'être utilisé pour l'hybridation.

MM.7. HYBRIDATION

Les différents tampons d'hybridation utilisés dans ce travail sont :

- le tampon RapidHyb™, tampon commercial de composition inconnue (Amersham Pharmacia Biotech, réf. : RPN203B),
- le tampon Church « modifié » à base de SDS, de phosphate de sodium et utilisant le lait écrémé comme agent bloquant (cf. annexe 4) (la modification correspond à une diminution de la concentration en SDS de 7% à 2%),
- le tampon à base de sulfate de dextran et de SDS, dont la composition est également donnée en annexe 4 et dont les concentrations en SDS et en sulfate de dextran s'élèvent respectivement à 1, 2 ou 3% et à 0, 5, 10, 15 ou 20%.

Les membranes sont préalablement incubées à 65°C pendant au moins 15 minutes en présence du tampon d'hybridation.

Elles sont ensuite hybridées à 65°C dans le même tampon, en présence de la sonde radiomarquée. Les temps d'hybridation varient selon le tampon d'hybridation employé, d'une heure pour le Rapid-Hyb™ à une nuit pour le Church modifié.

Puis, les membranes sont lavées trois fois dans une solution de SSC 1x, SDS 0,1% à 65°C.

Le volume d'hybridation a été réduit au minimum. Ainsi, pour des membranes de 24x32 mm², cette étape s'effectue avec des tubes de 2 ml dans un volume final de 300 à 400 µl.

MM.8. INSTRUMENTS DE MESURE

Après l'hybridation, les membranes sont exposées pendant quatre heures sur un écran photosensible qui est ensuite lu au moyen du Storm[®] 860 (Molecular Dynamics).

Les logiciels IQTools et ImageQuant permettent, respectivement, de découper et de repositionner l'image et de quantifier l'intensité des signaux vus sur les membranes.

En ce qui concerne la correspondance entre le nombre de désintégrations par minute et les unités relevées par les instruments de mesure, le protocole suivant est exécuté. 1 µl de [α -³²P] dCTP est ajouté à 99 µl de TE 1x. Les 100 µl ainsi obtenus sont dilués de deux en deux. Ensuite, 5 µl de chaque dilution sont déposés sur un carré de Benchkote (Poly Labo, réf. : 10055).

Les intensités des signaux de chaque Benchkote sont mesurées sur un compteur étalonné (mini-monitor series 900, Leman), sur le Storm[®] 860 (Molecular Dynamics) et sur le MicroImager[™] (Biospace Mesures).

BIBLIOGRAPHIE

- Abramova**, F. A., Grinberg, L. M., Yampolskaya, O. V. and Walker, D. H. (1993). Pathology of inhalational anthrax in 42 cases from the Sverdlovsk outbreak of 1979. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(6), 2291-4.
- Adair**, D. M., Worsham, P. L., Hill, K. K., Klevitska, A. M., Jackson, P. J., Friedlander, A. M. and Keim, P. (2000). Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. *J Clin Microbiol.* **38**(4), 1516-9.
- Aldhous**, P. (1990). Biological warfare. Gruinard Island handed back. *Nature.* **344**(6269), 801.
- Alvarez**, A. J., Buttner, M. P. and Stetzenbach, L. D. (1995). PCR for bioaerosol monitoring : sensitivity and environmental interference. *Appl Environ Microbiol.* **61**(10), 3639-44.
- Amann**, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H.. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* **59**(1), 143-69.
- Andersen**, G. L., Simchock, J. M. and Wilson, K. H. (1996). Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J Bacteriol.* **178**(2), 377-84.
- Ash**, C., Farrow, J. A. E., Dorsch, M., Stackebrandt, E. and Collins, M. D. (1991). Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol.* **41**(3), 343-6.
- Ash**, C. and Collins, M. D. (1992). Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. *FEMS Microbiol Lett.* **94**, 75-80.
- Baillie**, L. W., Jones, M. N., Turnbull, P. C. and Manchee, R. J. (1995). Evaluation of the Biolog system for the identification of *Bacillus anthracis*. *Lett Appl Microbiol.* **20**(4), 209-11.
- Beaudet**, L., Bedard, J., Breton, B., Mercuri, R. J. and Budarf, M. L. (2001). Homogeneous Assays for Single-Nucleotide Polymorphism Typing Using AlphaScreen. *Genome Res.* **11**(4), 600-608.
- Belgrader**, P., Benett, W., Hadley, D., Long, G., Mariella, R., Milanovich, F., Nasarabadi, S., Nelson, W., Richards, J. and Stratton, P. (1998a). Rapid pathogen detection using a microchip PCR array instrument. *Clin Chem.* **44**(10), 2191-4.
- Belgrader**, P., Benett, W., Bergman, W., Langlois, R., Mariella, R., Milanovich, F., Miles, R., Venkateswaran, K., Long, G. and Nelson, W.. (1998b). Autonomous system for pathogen detection and identification. In Part of the SPIE conference on air monitoring and detection of chemical and biological agents. Boston. November, 1998. **3533**, 198-206.
- Belgrader**, P., Benett, W., Hadley, D., Richards, J., Stratton, P., Mariella, R. and Milanovich, F. (1999a). PCR detection of bacteria in seven minutes. *Science.* **284**(5413), 449-50.

- Belgrader**, P., Hansford, D., Kovacs, G. T. A., Venkateswaran, K., Mariella, R., Milanovich, F., Nasarabadi, S., Okuzumi, M., Pourahmadi, F. and Northrup, M. A. (1999b). A minisonicator to rapidly disrupt bacterial spores for DNA analysis. *Anal Chem.* **71**(19), 4232-6.
- Bellis**, M. and Casellas, P. (1997). La puce ADN : un multi-réacteur de pailleasse. *Médecine/Sciences.* **13**, 1317-24.
- Berche**, P., Gaillard, J. L. and Simonet, M. (1988). *Bacillus anthracis* et les autres *Bacillus*. In *Bactériologie*. Berche, P., Gaillard, J. L. and Simonet, M. Flammarion Médecine-Sciences, pp 345-53.
- Bizet**, K. (1997). Etude et développement d'une microbalance à quartz pour la réalisation d'un immunocapteur. Application à la détection d'antigènes en milieu liquide. Thèse de doctorat de l'université Paris V. Biotechnologie. Paris, décembre 1997. pp 1-177.
- Bovallius**, A., Bucht, B., Roffey, R. and Anas, P. (1978). Three-year investigation of the natural airborne bacterial flora at four localities in Sweden. *Appl Environ Microbiol.* **35**(5), 847-52.
- Bunnag**, C., Dhorraintra, B. and Plangpatanapanichya, A. (1982). A comparative study of the incidence of indoor and outdoor mold spores in Bangkok, Thailand. *Ann Allergy.* **48**(6), 333-9.
- Burge**, H. (1990). Bioaerosols : prevalence and health effects in the indoor environment. *J Allergy Clin Immunol.* **86**(5), 687-701.
- Burlage**, R. S. (1997). Emerging technologies : bioreporters, biosensors, and microprobes. In *Manual of environmental microbiology*. Hurst, C. J., Knudsen, G. R., McInerney, M. J., Stetzenbach, L. D. and Walter, M. V. Washington DC, ASM Press, pp 115-23.
- Buttner**, M. P. and Stetzenbach, L. D. (1993). Monitoring airborne fungal spores in an experimental indoor environment to evaluate sampling methods and the effects of human activity on air sampling. *Appl Environ Microbiol.* **59**(1), 219-26.
- Buttner**, M. P., Willeke, K. and Grinshpun, S. A. (1997). Sampling and analysis of airborne microorganisms. In *Manual of environmental microbiology*. Hurst, C. J., Knudsen, G. R., McInerney, M. J., Stetzenbach, L. D. and Walter, M. V. Washington DC, ASM Press, pp 629-40.
- Cage**, B. R., Schreiber, K., Barnes, C., Portnoy, J. (1996). Evaluation of four bioaerosol samplers in the outdoor environment. *Ann Allergy Asthma Immunol.* **77**(5): 401-6.
- Cheng**, J., Sheldon, E. L., Wu, L., Uribe, A., Gerrue, L. O., Carrino, J., Heller, M. J., O'Connell, J. P. (1998). Preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from *E. coli* on microfabricated bioelectronic chips. *Nat Biotechnol.* **16**(6), 541-6.
- Cherrie**, J. W. and Aitken, R. J. (1999). Measurement of human exposure to biologically relevant fractions of inhaled aerosols. *Occup Environ Med.* **56**(11), 747-52.
- Christopher**, G. W., Cieslak, T. J., Pavlin, J. A., Eitzen, E. M. (1997). Biological warfare. A historical perspective. *Jama.* **278**(5), 412-7.

- Clarke**, R. G. and Pinder, A. C. (1998). Improved detection of bacteria by flow cytometry using a combination of antibody and viability markers.
J Appl Microbiol. **84**(4), 577-84.
- Daffonchio**, D., Borin, S., Frova, G., Gallo, R., Mori, E., Fani, R., Sorlini, C. (1999). A randomly amplified polymorphic DNA marker specific for the *Bacillus cereus* group is diagnostic for *Bacillus anthracis*.
Appl Environ Microbiol. **65**(3), 1298-303.
- Daniel**, S. G., Westling, M. E., Moss, M. S., Kanagy, B. D. (1998). FastTag™ Nucleic Acid Labeling System : a versatile method for incorporating haptens, fluorochromes and affinity ligands into DNA, RNA and oligonucleotides.
Biotechniques. **24**(3), 484-9.
- DeRisi**, J., Penland, L., Brown, P. O., Bittner, M. L., Meltzer, P. S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y. A., Trent, J. M. (1996). Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer.
Nat Genet. **14**(4), 457-60.
- Dennis**, C. (2001). The bugs of war.
Nature. **411**(6835), 232-5.
- Edman**, C. F., Raymond, D. E., Wu, D. J., Tu, E., Sosnowski, R. G., Butler, W. F., Nerenberg, M., Heller, M. J. (1997). Electric field directed nucleic acid hybridization on microchips.
Nucleic Acids Res. **25**(24), 4907-14.
- Ferrari**, B. C., Vesey, G., Davis, K. A., Gauci, M., Veal, D. (2000). A novel two-color flow cytometric assay for the detection of *Cryptosporidium* in environmental water samples.
Cytometry. **41**(3), 216-22.
- Forsyth**, G., Logan, N. A., DeVos, P. (1998). Revue taxonomique du genre *Bacillus*.
Bull Soc Fr Microbiol. **13**(2), 114-29.
- Franz**, D. R., Jahrling, P. B., Friedlander, A. M., McClain, D. J., Hoover, D. L., Bryne, W. R., Pavlin, J. A., Christopher, G. W. (1997). Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents.
Jama. **278**(5), 399-411.
- Gilligan**, P. H. (1995). *Pseudomonas* and *Burkholderia*.
In *Manual of clinical microbiology*. Murray, P. R., Baron, E. J., Tenover, F. C. and Tenover, R. H. Washington DC, ASM Press, pp 509-519.
- Gray**, L. D. (1995). *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, and *Yersinia*.
In *Manual of clinical microbiology*. Murray, P. R., Baron, E. J., Tenover, F. C. and Tenover, R. H. Washington DC, ASM Press, pp 450-6.
- Harrell**, L. J., Andersen, G. L., Wilson, K. H. (1995). Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species.
J Clin Microbiol. **33**(7), 1847-50.
- Haff**, L. A. and Smirnov I. P. (1997). Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry.
Genome Res. **7**(4), 378-88.

- Heller, M. J., Forster, A. H., Tu, E. (2000).** Active microelectronic chip devices which utilize controlled electrophoretic fields for multiplex DNA hybridization and other genomic applications. *Electrophoresis*. **21**(1), 157-64.
- Henderson, I., Duggleby, C. J., Turnbull, P. C. B. (1994).** Differentiation of *Bacillus anthracis* from other *Bacillus cereus* group bacteria with the PCR. *Int J Syst Bacteriol*. **44**(1), 99-105.
- Huang, S. C., Swerdlow, H., Caldwell, K. D. (1994).** Binding of biotinylated DNA to streptavidin-coated polystyrene latex. *Anal Biochem*. **222**(2), 441-9.
- Huang, S. C., Stump, M. D., Weiss, R., Caldwell, K. D. (1996).** Binding of biotinylated DNA to streptavidin-coated polystyrene latex : effects of chain length and particle size. *Anal Biochem*. **237**(1), 115-22.
- Inglesby, T. V., Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., Friedlander, A. M., Hauer, J., McDade, J., Osterholm, M. T., O'Toole, T., Parker, G., Perl, T. M., Russell, P. K., Tonat, K. (1999).** Anthrax as a biological weapon : medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *Jama*. **281**(18), 1735-45.
- Jackson, P. J., Hill, K. K., Laker, M. T., Ticknor, L. O., Keim, P. (1999).** Genetic comparison of *Bacillus anthracis* and its close relatives using amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction analysis. *J Appl Microbiol*. **87**(2), 263-9.
- Jackson, P. J., Hugh-Jones, M. E., Adair, D. M., Green, G., Hill, K. K., Kuske, C. R., Grinberg, L. M., Abramova, F. A., Keim, P. (1998).** PCR analysis of tissue samples from the 1979 Sverdlovsk anthrax victims : the presence of multiple *Bacillus anthracis* strains in different victims. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**(3), 1224-9.
- Jordan, B. (1998).** Voyage aux pays des puces. *Médecine/Sciences*. **14**, 1097-102.
- Jordan, B. (2000).** Jusqu'où iront les puces ? *Médecines/Sciences*. **16**, 950-953.
- Kadlec, R. P., Zelicoff, A. P., Vrtis, A. M. (1997).** Biological weapons control. Prospects and implications for the future. *Jama*. **278**(5), 351-6.
- Keim, P., Kalif, A., Schupp, J., Hill, K., Travis, S. E., Richmond, K., Adair, D. M., Hugh-Jones, M., Kuske, C. R., Jackson, P. (1997).** Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *J Bacteriol*. **179**(3), 818-24.
- Keim, P., Klevytska, A. M., Price, L. B., Schupp, J. M., Zinser, G., Smith, K. L., Hugh-Jones, M. E., Okinaka, R., Hill, K. K., Jackson, P. J. (1999).** Molecular diversity in *Bacillus anthracis*. *J Appl Microbiol*. **87**(2), 215-7.
- Keim, P., Price, L. B., Klevytska, A. M., Smith, K. L., Schupp, J. M., Okinaka, R., Jackson, P. J., Hugh-Jones, M. E. (2000).** Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*. **182**(10), 2928-36.

- Kloos**, W. E. and Bannerman, T. L. (1995). *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In *Manual of clinical microbiology*. Murray, P. R., Baron, E. J., Tenover, F. C. and Tenover, R. H. Washington DC, ASM Press, pp 282-98.
- Kremer**, K., van Soolingen, D., Fronthingham, R., Haas, W. H., Hermans, P. W., Martin, C., Palittapongpim, P., Plikaytis, B. B., Riley, L. W., Yakrus, M. A., Musser, J. M., van Embden, J. D. (1999). Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains : interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol.* **37**(8), 2607-18.
- Lalitha**, M. K. and Thomas, M. K. (1997). Penicillin resistance in *Bacillus anthracis*. *Lancet.* **349**(9064), 1522.
- Le Flèche**, P., Hauck, Y., Onteniente, L., Prieur, A., Denoeud, F., Ramiise, V., Sylvestre, P., Benson, G., Ramiise, F., Vergnaud, G. (2001). A tandem repeats database for bacterial genomes : application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.* **1**(1), 2.
- Le Toullec**, M. (1998). Les puces à ADN. *Industries et Techniques.* **789**, 39-41.
- Lee**, M. A., Brightwell, G., Leslie, D., Bird, H., Hamilton, A. (1999). Fluorescent detection techniques for real-time multiplex strand specific detection of *Bacillus anthracis* using rapid PCR. *J Appl Microbiol.* **87**(2), 218-23.
- Li**, C. H. and Kuo, Y. M. (1992). Airborne characterization of fungi indoors and outdoors. *J Aerosol Sci.* **23**(suppl 1), 5667-5670.
- Livache**, T., Roget, A., Dejean, E., Barthet, C., Bidan, G., Téoule, R. (1994). Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group. *Nucleic Acids Res.* **22**(15), 2915-21.
- Livache**, T., Fouque, B., Roget, A., Marchand, J., Bidan, G., Téoule, R., Mathis, G. (1998). Polypyrrole DNA chip on a silicon device : example of hepatitis C virus genotyping. *Anal Biochem.* **255**(2), 188-94.
- Lorch**, H. J., Benckieser, G., Ottow, J. C. G. (1995). Basic methods for counting micro-organisms in soil and water. In *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. K. Alef and P. Nannipieri. London, Academic Press Inc: 146-53.
- Manchee**, R. J., Broster, M. G., Melling, J., Henstridge, R. M., Stagg, A. J. (1981). *Bacillus anthracis* on Gruinard Island. *Nature.* **294**(5838), 254-5.
- Mancinelli**, R. L. and Shulls, W. A. (1978). Airborne bacteria in an urban environment. *Appl Environ Microbiol.* **35**(6), 1095-101.
- Mandrell**, R. E. and Wachtel, M. R. (1999). Novel detection techniques for human pathogens that contaminate poultry. *Curr Opin Biotechnol.* **10**(3), 273-8.

- McGall**, G., Labadie, J., Brock, P., Wallraff, G., Nguyen, T., Hinsberg, W. (1996). Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**(24), 13555-60.
- McGovern**, T. W., Christopher, G. W., Eitzen, E. M. (1999). Cutaneous manifestations of biological warfare and related threat agents. *Arch Dermatol*. **135**(3), 311-22.
- McLaughlin**, J. C. (1995). *Vibrio*. In *Manual of clinical microbiology*. Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C. and Tenover, R. H. Washington DC, ASM Press, pp 465-76.
- Meselson**, M., Guillemin, J., Hugh-Jones, M., Langmuir, A., Popova, I., Shelokov, A., Yampolskaya, O. (1994). The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. *Science*. **266**(5188), 1202-8.
- Moyer**, N. P. and Holcomb, L. A. (1995). *Brucella*. In *Manual of clinical microbiology*. Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C. and Tenover, R. H. Washington DC, ASM Press, pp 549-555.
- Mueller**, U. G. and Wolfenbarger, L. L. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol*. **14**(10), 389-94.
- Nelson**, K. E., Paulsen, I. T., Heidelberg, J. F., Fraser, C. M. (2000). Status of genome projects for non-pathogenic bacteria and archaea. *Nat Biotechnol*. **18**(10), 1049-54.
- Nikiforov**, T. T., Rendle, R. B., Goelet, P., Rogers, Y. H., Kotewicz, M. L., Anderson, S., Trainor, G. L., Knapp, M. R. (1994). Genetic Bit Analysis : a solid phase method for typing single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*. **22**(20), 4167-75.
- Northrup**, M. A., Benett, B., Hadley, D., Landre, P., Lehew, S., Richards, J., Stratton, P. (1998). A miniature analytical instrument for nucleic acids based on micromachined silicon reaction chambers. *Anal Chem*. **70**(5), 918-22.
- Odumeru**, J. A., Steele, M., Fruhner, L., Larkin, C., Jiang, J., Mann, E., Mc Nab, W. B. (1999). Evaluation of accuracy and repeatability of identification of food-borne pathogens by automated bacterial identification systems. *J Clin Microbiol*. **37**(4), 944-9.
- Onderdonk**, A. B. and Allen, S. D. (1995). *Clostridium*. In *Manual of clinical microbiology*. Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C. and Tenover, R. H. Washington DC, ASM Press, pp 574-86.
- Pehkonen**, E. and Rantio-Lehtimäki, A. (1994). Variations in airborne pollen antigenic particles caused by meteorologic factors. *Allergy*. **49**(6), 472-7.
- Piatek**, A. S., Tyagi, S., Pol, A. C., Telenti, A., Miller, L. P., Kramer, F. R., Alland, D. (1998). Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Biotechnol*. **16**(4), 359-63.

- Pupo, G. M., Lan, R., Reeves, P. R. (2000).** Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(19), 10567-72.
- Ramisse, V. (1997).** Etude de la variabilité génétique du gène *gyrB* chez *Bacillus anthracis* et les autres espèces du groupe *Bacillus cereus*. Institut Pasteur (Paris) / Centre d'Etudes du Bouchet (Vert-Le-Petit), pp 1-29.
- Ross, P., Hall, L., Haff, L. A. (2000).** Quantitative approach to single-nucleotide polymorphism analysis using MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechniques.* **29**(3), 620-6, 628-9.
- Rudi, K., Kroken, M., Dahlberg, O. J. (1997).** Rapid, universal method to isolate PCR-ready DNA using magnetic beads. *Biotechniques.* **22**(3), 506-11.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., Brown, P. O. (1995).** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* **270**(5235), 467-70.
- Schena, M. (1996).** Genome analysis with gene expression microarrays. *Bioessays.* **18**(5), 427-31.
- Sosnowski, R. G., Tu, E., Butler, W. F., O'Connell, J. P. (1997).** Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(4), 1119-23.
- Southern, E. M., Case-Green, S. C., Elder, J. K., Johnson, M., Mir, K. U., Wang, L., Williams, J. C. (1994).** Arrays of complementary oligonucleotides for analysing the hybridisation behaviour of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **22**(8), 1368-73.
- Stetzenbach, L. D. (1997).** Introduction to aerobiology. In *Manual of environmental microbiology.* Hurst, C. J., Knudsen, G. R., McInerney, M. J., Stetzenbach, L. D. and Walter, M. V. Washington DC, ASM Press, pp 619-28.
- Staley, J. T. and Konopka A. (1985).** Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol.* **39**, 321-46.
- Stewart, S. J. (1995).** *Francisella*. In *Manual of clinical microbiology.* Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C. and Tenover, R. H. Washington DC, ASM Press, pp 545-8.
- Stine, O. C., Sozhamannan, S., Gou, Q., Zheng, S., Morris, J. G., Johnson, J. A. (2000).** Phylogeny of *Vibrio cholerae* based on *recA* sequence. *Infect Immun.* **68**(12), 7180-5.
- Stopa, P. J. (2000).** The flow cytometry of *Bacillus anthracis* spores revisited. *Cytometry.* **41**(4), 237-44.
- Strauss, W. M. (1995).** Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. *Current protocols in molecular biology.* Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston R. E. *et al.* Massachusetts, Harvard. John Wiley & Sons, Inc. **1**, 2.2.1-2.2.3.

- Taylor**, M. T., Belgrader, P. *et al.* (2001). Lysing bacterial spores by sonication through a flexible interface in a microfluidic system. *Anal Chem.* **73**(3), 492-6.
- Toma**, B. (1982). *Bacillus*. In *Bactériologie médicale*. Le Minor, L. and Veron, M. Flammarion Médecine-Sciences, pp 578-85.
- Torsvik**, V., Goksoyr, J., Daae, F. L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **56**(3), 782-7.
- Tsai**, Y. L. and Olson, B. H. (1992). Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* **58**(7), 2292-5.
- Turnbull**, P. C. B. and Kramer, J. M. (1995). *Bacillus*. In *Manual of clinical microbiology*. Murray, P. R., Baron, E. J., Tenover, F. C. and Tenover, R. H. Washington DC, ASM Press, pp 349-56.
- Turnbull**, A. B., Beswick, A. J., Brown, N. L., Harrison, R. M. (1998). Characterisation of the biological composition of the ambient aerosol. The University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham B15 2TT. Birmingham. February, 1998. pp 1-135.
- Tyagi**, S. and Kramer F. R. (1996). Molecular beacons : probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol.* **14**(3), 303-8.
- Voordouw**, G., Voordouw, J. K., Karkhoff-Schweizer, R. R., Fedorak, P. M., Westlake, D. W. S. (1991). Reverse sample genome probing, a new technique for identification of bacteria in environmental samples by DNA hybridization, and its application to the identification of sulfate-reducing bacteria in oil field samples. *Appl Environ Microbiol.* **57**(11), 3070-8.
- Voordouw**, G., Voordouw, J. K., Jack, T. R., Foght, J., Fedorak, P. M., Westlake, D. W. S. (1992). Identification of distinct communities of sulfate-reducing bacteria in oil fields by reverse sample genome probing. *Appl Environ Microbiol.* **58**(11), 3542-52.
- Voordouw**, G., Shen, Y., Harrington, C. S., Telang, A. J., Jack, T. R., Westlake, D. W. S. (1993). Quantitative reverse sample genome probing of microbial communities and its application to oil field production waters. *Appl Environ Microbiol.* **59**(12), 4101-14.
- Vos**, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., *et al.* (1995). AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**(21), 4407-14.
- Wagner**, M., Amann, R., Lemmer, H., Schleifer, K. H. (1993). Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl Environ Microbiol.* **59**(5), 1520-5.
- Wagner**, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D., Schleifer, K. H. (1994). Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl Environ Microbiol.* **60**(3), 792-800.

Wilson, K. (1995). Preparation of genomic DNA from bacteria.
In Current protocols in molecular biology. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston R. E. *et al.*
Massachusetts, Harvard. John Wiley & Sons, Inc. **1**, 2.4.1.-2.4.5.

Yershov, G., Barsky, V., Belgovskiy, A., Kirillov, E., Kreindlin, E., Ivanov, I., Parinov, S., Guschin, D., Drobishev, A., Dubiley, S., Mirzabekov, A. (1996). DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips.
Proc Natl Acad Sci U S A. **93**(10), 4913-8.

ANNEXES

ANNEXE 1

RESULTATS DE LA QUANTIFICATION DES INTENSITES DES SIGNAUX PRESENTS SUR LES MEMBRANES DE LA FIGURE 24 (PROFIL D'HYBRIDATION CROISEE)

Les valeurs sont exprimées en pourcentage.

Le 100% correspond à l'hybridation de la sonde sur le dépôt d'ADN de la même espèce.

ADN DEPOSE	Réf	95 34	98 14	98 23	98 09	98 10	98 18	99 13	97 22	97 90	99 01	99 17	98 11	93 20	99 43	99 42	98 29	97 27	96 13	99 05	99 06	99 07	C10 97	C28 97	C14 97	D17 60	D20 01	99 08	D70 11	87 06	D82 59	99 19	86 52	90 27	87 12	95 22	D16 26	86 58	86 61	86 56	99 04	85 05	87 22	85 22	87 38		
ADN SONDE		<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus lentus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus mycoïdes</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Brucella abortus</i>	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Brucella suis</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia mallei</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Francisella tularensis</i>	Homme	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella arizonae</i>	<i>Salmonella paratyphiA</i>	Saumon	<i>Shigella boydii</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia pestis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>	
<i>Bacillus anthracis</i>	95 34	100	35	52	24	0	1	1	93	1	34	0	0	1	50	33	34	81	10	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Bacillus cereus</i>	98 14	74	100	46	27	0	1	1	106	1	36	0	0	1	48	34	51	61	13	0	0	1	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	98 23	77	27	100	26	0	0	1	84	0	34	0	0	1	59	21	32	84	10	0	0	2	0	0	0	0	1	0	1	2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	
<i>Bacillus circulans</i>	98 09	46	20	28	100	0	1	1	151	1	39	0	0	1	35	5	25	47	13	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	2	3	0	3	0	0	1	
<i>Bacillus coagulans</i>	98 10	1	0	3	1	100	0	3	3	3	1	2	2	4	1	1	1	2	1	0	0	0	1	7	3	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	2	2	0	0	1	1	0	
<i>Bacillus lentus</i>	98 18	1	0	2	2	0	100	1	5	1	1	0	0	1	1	2	1	2	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	2	3	0	0	0	0	0	
<i>Bacillus megaterium</i>	99 13	2	1	2	2	1	1	100	6	2	2	1	0	2	2	1	2	3	1	0	0	0	0	3	1	1	1	0	0	1	2	0	0	5	1	1	0	2	1	3	0	1	0	0	0		
<i>Bacillus mycoïdes</i>	97 22	13	7	16	12	0	1	1	100	1	10	0	0	0	9	14	7	12	7	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	
<i>Bacillus pumilus</i>	97 90	1	2	0	1	0	0	1	3	100	0	0	0	3	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0	3	1	0	0	0	0	2	0	1	1	3	0	1	1	1	1	
<i>Bacillus sp.</i>	99 01	80	39	58	39	1	0	2	131	2	100	0	0	1	1	46	39	73	19	0	0	0	2	6	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	1	2	0	0	1	2	0
<i>Bacillus sphaericus</i>	99 17	3	7	2	2	1	1	4	6	4	1	100	0	4	1	1	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	98 11	1	0	11	1	3	1	2	6	3	3	1	100	4	1	1	2	3	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	2	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	2	0	0	0	1	
<i>Bacillus subtilis</i>	93 20	1	1	1	1	1	0	3	6	8	1	1	0	100	1	1	3	2	1	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	

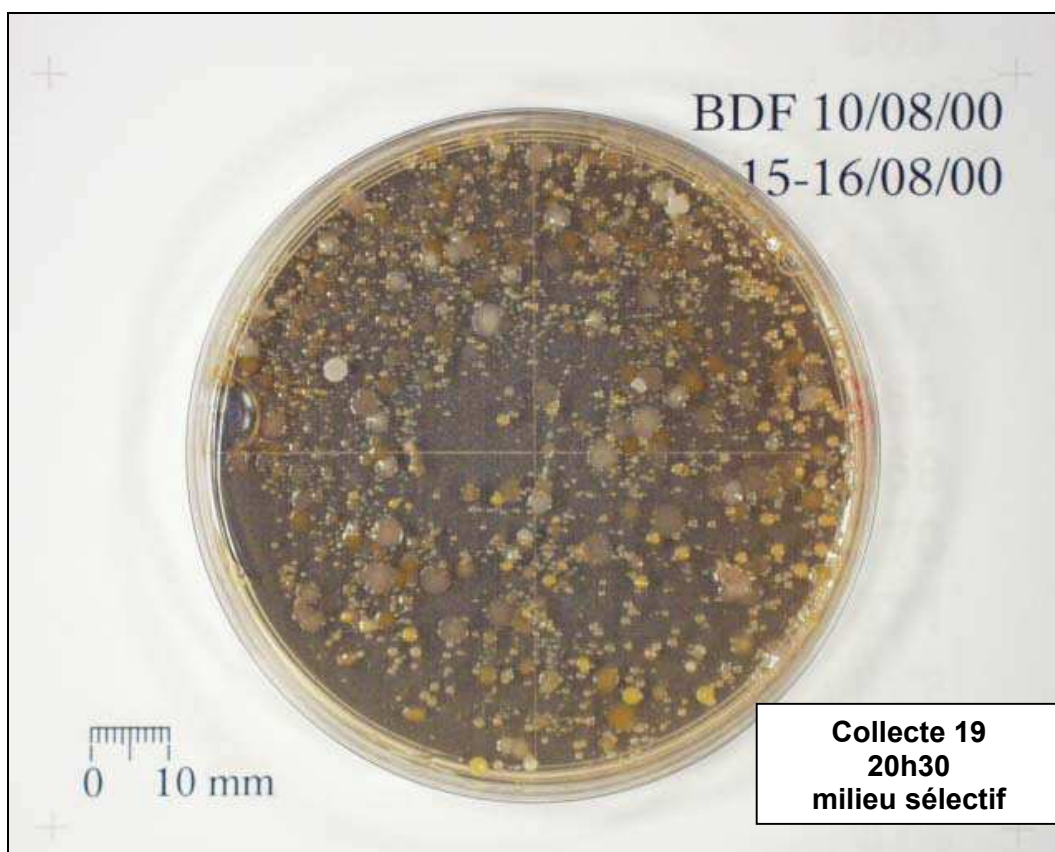
ADN DEPOSE	ADN SONDE	Réf	95 34	98 14	98 23	98 09	98 10	98 18	99 13	97 22	97 90	99 01	99 17	98 11	93 20	99 43	99 42	98 29	97 27	96 13	99 05	99 06	99 07	C10 97	C28 97	C14 97	D17 60	D20 01	99 08	D70 11	87 06	D82 59	99 19	86 52	90 27	87 12	95 22	D16 26	86 58	86 61	86 56	99 04	85 05	87 22	85 22	87 38	
			<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus lentus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Brucella abortus</i>	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Brucella suis</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia mallei</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Francisella tularensis</i>	Homme	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella arizonae</i>	<i>Salmonella paratyphiA</i>	Saumon	<i>Shigella boydii</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia pestis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	99 43	92	41	156	47	1	1	3	155	3	60	1	0	2	100	49	62	112	31	0	0	0	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	2	2	2	0	1	0	0	2	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	99 42	47	21	33	71	1	1	1	154	1	39	0	0	1	31	100	31	60	17	0	0	1	0	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	2	2	0	0	0	0	0	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	98 29	45	31	36	19	0	0	1	66	1	25	0	0	1	42	22	100	49	8	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	1	0	0	2	0	0	0	0	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	97 27	112	39	129	39	6	1	3	106	3	49	1	0	2	60	43	53	100	27	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	1	0	0	1	2	0	1	1	2	0	0	1	2	0		
<i>Bacillus thuringiensis</i>	96 13	56	28	44	45	0	1	3	132	1	47	1	0	2	38	23	37	66	100	0	0	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	1	1	0		
<i>Brucella abortus</i>	99 05	2	0	2	1	0	0	0	2	0	2	0	0	0	2	1	1	2	1	100	154	112	2	3	0	0	1	0	0	2	1	1	0	3	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	
<i>Brucella melitensis</i>	99 06	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	87	100	91	2	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Brucella suis</i>	99 07	1	1	1	1	0	1	0	3	0	1	0	0	0	1	2	1	4	0	61	129	100	1	3	1	0	2	0	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	1	4	4	0	0	0	0	0	
<i>Burkholderia cepacia</i>	C10 97	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	2	1	1	3	0	0	0	0	1	100	38	22	0	1	0	0	0	0	4	1	0	5	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1
<i>Burkholderia mallei</i>	C28 97	1	0	1	1	0	0	0	3	0	3	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	15	100	51	0	1	0	0	0	2	0	0	3	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	C14 97	0	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	14	117	100	0	1	0	0	0	1	0	0	2	1	1	0	1	4	6	0	0	0	0	0	
<i>Clostridium perfringens</i>	D17 60	1	0	1	1	0	0	0	2	0	1	0	0	2	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	D20 01	2	1	1	1	0	0	0	4	1	4	0	0	0	1	1	1	2	0	0	0	0	1	2	1	0	100	0	0	9	2	5	2	1	15	16	1	61	42	89	2	5	2	4	5		
<i>Francisella tularensis</i>	99 08	2	1	0	1	0	1	0	3	0	0	0	0	0	1	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
Homme	D70 11	1	0	2	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	87 06	1	0	1	1	1	0	1	2	0	2	1	2	1	1	1	2	2	0	0	0	0	2	3	1	0	29	0	0	100	0	0	11	1	5	18	29	0	10	11	24	3	6	5	5	7	
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	D82 59	0	0	0	0	0	0	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	26	3	0	2	0	0	0	0	100	1	0	6	1	0	0	1	1	3	0	0	0	0	0	

ADN DEPOSE	ADN SONDE	Réf	95 34	98 14	98 23	98 09	98 10	98 18	99 13	97 22	97 90	99 01	99 17	98 11	93 20	99 43	99 42	98 29	97 27	96 13	99 05	99 06	99 07	C10 97	C28 97	C14 97	D17 60	D20 01	99 08	D70 11	87 06	D82 59	99 19	86 52	90 27	87 12	95 22	D16 26	86 58	86 61	86 56	99 04	85 05	87 22	85 22	87 38
			<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus lentus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Brucella abortus</i>	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Brucella suis</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia mallei</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Francisella tularensis</i>	Homme	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella arizonae</i>	<i>Salmonella paratyphiA</i>	Saumon	<i>Shigella boydii</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia pestis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>
<i>Pantoea agglomerans</i>	99 19	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	11	0	0	4	1	100	1	2	5	8	0	4	5	10	1	5	2	3	6
<i>Providencia rettgeri</i>	86 52	1	0	0	2	0	1	0	5	0	1	0	0	0	0	1	3	1	2	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	100	0	1	1	0	1	1	2	0	2	0	1	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	90 27	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	11	3	0	1	0	0	1	5	1	0	100	1	1	0	41	1	2	0	2	0	1	1
<i>Salmonella arizonae</i>	87 12	1	0	1	2	0	0	0	5	0	1	0	0	0	0	1	1	2	2	0	0	0	2	1	1	1	1	10	0	0	2	0	2	1	0	100	46	0	6	6	11	1	2	1	1	3
<i>Salmonella paratyphiA</i>	95 22	3	1	2	1	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	1	1	1	2	0	0	0	0	1	1	0	0	17	0	0	4	0	4	1	1	51	100	0	10	10	18	1	3	2	2	5
Saumon	D16 26	1	0	1	2	1	0	0	5	0	3	0	0	0	0	0	2	1	2	2	0	0	0	0	3	1	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	100	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella boydii</i>	86 58	3	1	3	2	0	1	0	5	0	1	0	0	0	0	2	2	3	5	1	0	0	0	0	2	1	0	69	1	0	6	0	5	2	1	15	12	0	100	60	93	2	5	5	4	7
<i>Shigella dysenteriae</i>	86 61	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	3	1	4	3	1	85	0	0	9	0	8	2	2	21	30	0	89	100	139	3	6	11	4	5	
<i>Shigella sonnei</i>	86 56	1	1	0	1	0	0	3	2	2	1	0	0	0	0	1	1	1	2	1	0	0	0	1	1	0	0	61	0	0	4	1	2	1	2	8	11	0	57	48	100	1	3	2	3	5
<i>Vibrio cholerae</i>	99 04	1	0	1	0	0	0	0	2	0	1	0	0	1	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	100	1	0	1	1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	85 05	1	0	0	2	0	0	0	4	0	1	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	2	1	2	6	0	0	2	0	4	3	3	4	6	0	3	3	7	2	100	20	21	15
<i>Yersinia pestis</i>	87 22	2	2	1	1	0	0	1	3	1	1	1	1	0	0	1	0	1	2	1	0	0	0	0	1	0	0	9	1	0	5	1	5	3	1	4	5	0	4	5	12	3	26	100	103	21
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	85 22	2	0	1	1	2	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	2	1	0	3	0	0	1	0	1	1	0	2	2	1	2	2	3	1	14	59	100	13
<i>Yersinia ruckeri</i>	87 38	2	0	1	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	1	1	2	6	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	1	1	0	2	2	0	1	2	2	1	5	3	4	100	

ANNEXE 2

IMAGE DES BOITES DE CULTURE DU PRELEVEMENT DE 20H30 (collecte 19, milieux non sélectif et sélectif)

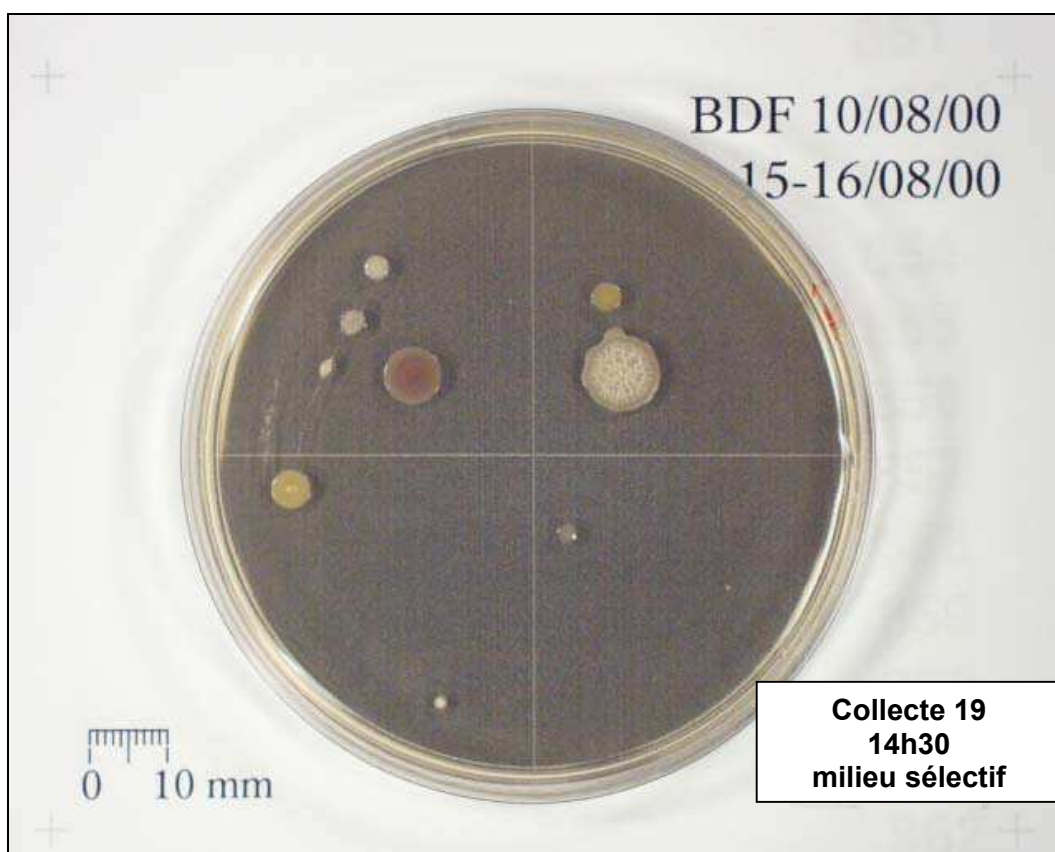
Echantillon de la collecte 19 dont le prélèvement a eu lieu de 20h30 à 21h00.



ANNEXE 3

IMAGE DE BOITES DE CULTURE DU PRELEVEMENT DE 14H30 (collecte 19, milieux non sélectif et sélectif)

Echantillon de la collecte 19 dont le prélèvement a eu lieu de 14h30 à 15h00.



ANNEXE 4

LISTE DES SOLUTIONS UTILISEES

Tampons

- **TE 1x**

Tris-HCl pH 8,0	0,01 mM
EDTA	0,001 mM

- **PBS** (Sigma, réf. : P4417) dissoudre une pastille dans 200 ml d'eau pour obtenir une solution dont les concentrations finales sont

Phosphate de sodium pH 7,4	0,01 M
KCl	0,0027 M
NaCl	0,137 M

- **TBE 0,5x**

Tris-HCl	0,045 M
Acide borique	0,045 M
EDTA	0,001 M
Ajuster à pH 8,3	

- **TNE 10x**

Tris-HCl	0,1 M
NaCl	2 M
EDTA	0,01 M
Ajuster le pH à 7,4 avec HCl	

Milieus de culture

- **Milieu gélosé LB (Lucia Broth)**

Bacto-tryptone	1%
Extrait de levure	0,5%
NaCl	0,171 M
Agar	0,7%
Ajuster le pH à 7,5	

- **Milieu 2YT**

Bacto-tryptone	1,6%
Extrait de levure	1%
NaCl	0,0855 M

Tampons d'hybridation

- **Church modifié**

Phosphate de sodium pH 7,2	0,45 M
Lait écrémé régilait	0,5%
EDTA	0,001 M
SDS	2%

- **Tampon à base de SDS et de SD**

Phosphate de sodium pH 7,2	0,02 M
Lait écrémé régilait	0,25%
EDTA	0,001 M
SSC	5x
SDS	1, 2 ou 3%
Sulfate de dextran (SD)	0, 5, 10, 15 ou 20%

Solutions diverses

- **Chloroforme/alcool isoamylique**

24 volumes de chloroforme
1 volume d'alcool isoamylique
- **CTAB 10%-NaCl 0,7 M**

Dissoudre 4,1 g de NaCl dans 80 ml d'eau
Ajouter progressivement 10 g de CTAB sous agitation
Si nécessaire, chauffer la solution à 65°C pour dissoudre le CTAB
Ajuster à 100 ml avec H₂O
- **Glycérol 30%**

Glycérol	30%
MgSO ₄	0,05 M
Tris-HCl pH 8,0	0,0125 M
- **Séphadex® G75**

Peser 10 g de Séphadex® G75 (Amersham Pharmacia Biotech, réf. : 17-0050-01)
Ajouter 300 à 400 ml de tampon TE 1x
Incuber 1 heure à 37°C
Conserver à 4°C
- **Solution à base de bleu de xylène cyanol**

Bleu de xylène cyanol (Sigma, réf. : X-4126)	0,1 mg/ml
Glycérol	50%
TE	0,5x
- **SSC 10x**

NaCl	1,5 M
Citrate de sodium	0,15 M

Ajuster à pH 7,0 avec une solution de soude

ANNEXE 5

ABREVIATIONS

A	Ames
ACPLA	Agent-Containing Particle per Liter of Air
ADN	Acide DéoxyriboNucléique
ADNr	Acide DéoxyriboNucléique ribosomal
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ANAA	Advanced Nucleic Acid Analyzer
AP-PCR	Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction
APEX	Automated Programmable Electronic matrix
ARN	Acide RiboNucléique
ARNr	Acide RiboNucléique ribosomal
ARNt	Acide RiboNucléique de transfert
BDF	Bruit De Fond
BET	bromure d'ethidium
BSA	Bovine Serum Albumine
°C	degré Celsius
CCD	Charge Coupled Device
CEB	Centre d'Etudes du Bouchet
cfu	colony forming unit
cm	centimètre
CNS	Centre National de Séquençage
Corp.	Corporation
CRSSA	Centre de Recherches du Service de Santé des Armées
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
D	Davis
Da	Dalton
dATP	déoxyadénosine triphosphate
dCTP	déoxycytidine triphosphate
ddNTP	dideoxynucleotide triphosphate
dGTP	déoxyguanosine triphosphate
DL	Decalabel™ DNA Labeling Kit
DL 50	dose létale suffisante pour tuer 50% des personnes exposées
DNTP	deoxynucleotide triphosphate
dpm	désintégration par minute
dTTP	déoxythymidine triphosphate
EIA	Enzyme ImmunoAssay
EF	Edematogen Factor
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
g	gramme, accélération de la pesanteur
h	heure
HL	Hexalabel™ DNA Labeling Kit
Hz	Hertz
Inc.	Incorporated company
ISR	Intergenic Spacer Region
km	kilomètre
kb	kilobase

LB	Lucia Broth
LF	Lethal Factor
m	mètre
M	Molaire
MATCI	Miniature Analytical Thermal Cycling Instrument
Mb	mégabase
mg	milligramme
MHz	mégahertz
min	minute
ml	millilitre
mm	millimètre
mM	milliMolaire
μCi	microcurie
μg	microgramme
μl	microlitre
μm	micromètre
μM	micromolaire
N	Normalité
N _A	Nombre d'Avogadro
ng	nanogramme
nl	nanolitre
OGM	Organisme Génétiquement modifié
PA	Protective Antigen
pb	paire de base
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-Field Electrophoresis Gel
pg	picogramme
PolyC	acide polycytidilique
QCM	Quartz Crystal Microbalance
RAPD	Random Amplified Polymorphism DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIA	Radio ImmunoAssay
RSGP	Reverse Sample Genome Probing
SD	Sulfate de Dextran
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TIGR	The Institut of Genomic Research
TSA	Tryptic Soy Agar
UI	Unité Internationale
UV	Ultra-Violet
VLSIPS	Very Large Scale Immobilized Polymer Synthesis
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat
vpm	vibration par minute
vrr	variable region with repetitive sequence