



HAL
open science

Mise au point de la spectroscopie de fluorescence pour la taxonomie des Pseudomonads. Application à la caractérisation d'isolats d'ateliers carnés

Belal Tourkya

► **To cite this version:**

Belal Tourkya. Mise au point de la spectroscopie de fluorescence pour la taxonomie des Pseudomonads. Application à la caractérisation d'isolats d'ateliers carnés. Ingénierie des aliments. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2009. Français. NNT : 2009CLF21942 . tel-00725447

HAL Id: tel-00725447

<https://theses.hal.science/tel-00725447>

Submitted on 24 Sep 2012

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.

*ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DES ALIMENTS

Par

Belal TOURKYA

**Mise au point de la spectroscopie de fluorescence pour la
taxonomie des Pseudomonads**

Application à la caractérisation d'isolats d'ateliers carnés

Réalisée à l'ENITA de Clermont Unité de Recherche Typicité des Produits Alimentaires
Site de Marmilhat – 63370 Lempdes

Soutenue le 6 juillet 2009 devant le jury :

Pr. Ph. Michaud	Polytech' Clermont-Ferrand, Univ. B. Pascal	Président
Dr. D. Bertrand	ENITIAA-INRA de Nantes	Rapporteur
Dr. X. Latour	Université de Rouen	Rapporteur
Pr. A. Kodjo	ENV Lyon	Examineur
Pr. J-L. Berdagué	INRA Centre de Clermont-Ferrand/Theix	Examineur invité
Pr. E. Dufour	DGER, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche	Directeur de thèse
Dr. F. Leriche	ENITA de Clermont-Ferrand	Encadrante de thèse

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été financée par une bourse de l'enseignement supérieur attribuée par le ministère de l'enseignement supérieur syrien et l'université ALBAATHE en Syrie selon la septième convention franco-syrienne ; elle a été réalisée au sein de l'Unité de Recherche « Typicité des Produits alimentaire » à l'Enita Clermont.

Je souhaite remercier Monsieur le Ministre de l'enseignement supérieur syrien ainsi que Monsieur le Président de l'université ALBAATHE à Homs (Syrie) de m'avoir accordé cette bourse.

Je souhaite également remercier Monsieur Georges GOSSET, Directeur de l'Enita Clermont, Monsieur Georges GIRAUD, chef du département ainsi que Madame Isabelle CHEVALLIER, responsable de l'UR TPA, de m'avoir accepté au sein de leur laboratoire.

Je tiens à exprimer mon entière reconnaissance au Dr Françoise LERICHE (co-directeur de thèse) et la remercier vivement pour sa grande disponibilité et de ces nombreux conseils tout au long de ce travail et de m'avoir offert par ses compétences scientifiques et pédagogiques les moyens de mener à bien ce projet. Je remercie également le Monsieur Eric DUFOUR, Directeur de thèse, d'avoir accepté de diriger ce travail.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Monsieur D. BERTRAND de l'ENITIAA Nantes et Monsieur X. LATOUR de l'Université de Rouen en acceptant d'être rapporteurs. De même, Je remercie Monsieur Ph. MICHAUD de Polytech'Clermont-Ferrand, Monsieur de Kodjo de l' Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon et M. Jean Louis BERDAGUÉ de l'INRA de theix d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je remercie Dr Tahar BOUBELLOUTA pour ses collaborations internes, ses conseils scientifiques surtout dans le domaine d'analyse des données et également pour les agréables moments que nous avons passé ensemble durant les années de cette thèse.

Je remercie Romdhane KAROUI pour ses collaborations et ses conseils.

Je remercie Karine FAYOLLE pour ses aides techniques sans oublier Olivier et Barbara qu'ont participé à la réalisation d'une partie des expériences de cette thèse.

Je remercie également les personnes des laboratoires : Arlette LAGUET, Marcelle CHANONAT et Sylvie LARDON et merci aussi au personnel du secrétariat, aux ingénieurs d'étude, ainsi qu'aux enseignants-chercheurs du département Qualité et Economie Alimentaires. Merci à Georges HULLO, François RAPHANEL et Béatrice DAVI pour leurs aides en Word et à Endnote.

Je remercie également les doctorants de l'unité de recherche TPA avec qui j'ai partagé le bureau.

Mes remerciements vont à ma famille et tout particulièrement mes parents, ma deuxième famille et à mes amis qui m'ont soutenu tout au long de mon parcours.

Je garde mes remerciements amoureux pour ma femme *Ezdehar* qui m'a soutenu au quotidien durant toutes ces années, sans elle je ne serais jamais arrivé à ce stade. Mon amour va également à mes enfants Ayah, Omar et Tasnim qui ont changé ma vie.

RESUME

Dans le champ des méthodologies dédiées à la caractérisation des microorganismes, les méthodes spectroscopiques comme la spectroscopie de fluorescence apparaissent des outils particulièrement sensibles. Leur puissance est renforcée par l'utilisation d'outils chimiométriques qui autorisent le traitement de l'ensemble des informations spectrales. Ce mémoire présente les étapes de mise au point de la méthode pour la caractérisation des *Pseudomonads* qui constituent une des flores les plus adaptatives et présentant la plus grande diversité phénotypique et génotypique décrite à ce jour.

Par l'utilisation de fluorophores intrinsèques (NADH, Acides aminés aromatiques + acides nucléiques ou tryptophane) l'analyse de suspensions bactériennes préparées directement à partir de colonies permet d'obtenir plus de 90 % de bonne classification pour des souches de référence même réparties en taxons proches. Cette méthode a permis, également, une identification aisée d'isolats et les résultats obtenus sont apparus cohérents avec ceux issus de PCR tout en apportant des informations complémentaires à ceux obtenus par identification sur galerie API 20 NE.

La méthode a été développée pour une lecture directe des colonies sur un milieu gélosé. Après différentes étapes de cadrage, la meilleure pertinence a été obtenue pour une lecture des colonies en fluorescence synchrone avec un décalage constant de 30 nm. L'analyse de la variance a montré une excellente répétabilité des résultats mais aussi des effets « position de la fibre optique vis à vis de la colonie » et durée d'incubation avant lecture (entre 48 et 72 heures) négligeables.

Utilisée à des fins taxonomiques, la méthode s'est révélée très cohérente et complémentaire des méthodes relevant de la génomique. Elle permet d'analyser extrêmement rapidement et sans ajout de réactifs les proximités ou distances entre souches et de décrire les zones spectrales les plus identitaires.

Enfin nous avons également montré les potentialités de la spectroscopie de fluorescence pour la mise en place d'un outil de « traçabilité bactérienne » susceptible de répondre aux besoins des producteurs agroalimentaires dans leur démarche d'analyse des risques.

Mots clés : Spectroscopie de fluorescence, synchrone, *Pseudomonas*, fibre optique, chimiométrie, traçabilité microbienne.

ABSTRACT

In the methodological field relating to microorganisms characterization, spectroscopic methods such as the fluorescence spectroscopy appear to be particularly appreciable tools. Their power is strengthened by the use of chemometrics which permit to treat all the spectral information. This work presents the elaboration stages of the method for Pseudomonads characterization, which form one of the most adaptative flora and present the biggest phenotypic and genotypic diversity so far depicted. Through the use of intrinsic fluorophores (NADH, aromatic amino acids + nucleic acids and tryptophan), the analysis of bacterial suspensions directly prepared from colonies permits to obtain more than 90% of good classification for reference strains even when divided in very related taxa. Synchronous fluorescence spectroscopy was successfully developed coupled with acquisition of spectra directly from colonies on agar plates using an optic fiber. The variance analysis has shown an excellent repeatability of the results, but also no significant effects of “the optical fibre position in the colony” nor of the incubation time before reading (between 48 and 72 hours). Sensitivity and selectivity reached 100% for bacterial discrimination at the genus, species or subspecies level.

In these conditions, the method appears as a very reliable tool for a taxonomic purpose since our results are in agreement with the generally admitted rRNA and DNA bacterial homology grouping but they also bring out additional information about strain relatedness. In the case of environmental isolates, the method allows good discrimination, even for strains for which ambiguity still remained after PCR and API 20 NE identification. It can also be a powerfull tool to study bacterial traceability.

Keywords: Fluorescence spectroscopy, synchronous, Pseudomonades, Optical fibre, chemometrics, bacterial traceability.

SOMMAIRE

abreviations.....	9
figures	10
Quelques éléments de terminologie	13
Introduction	1
Synthèse bibliographique	4
I. Méthodes spectroscopiques pour l'analyse biologique.....	4
I.1. La spectroscopie principes généraux	4
I.2. La spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF)	7
I.3. La spectroscopie de diffusion Raman	10
I.4. La spectroscopie de fluorescence.....	14
I.4.1. Principes	14
I.4.2. Les molécules fluorescentes : définition.....	16
I.4.3. Recueil des données spectrales	20
I.4.4. Les spectres de fluorescence	20
I.4.5. Chimométrie.....	23
I.5. La spectroscopie de fluorescence et ses applications dans le domaine de la	
microbiologie.....	27
I.5.1. Les fluorophores	27
I.5.2. Détection ou caractérisation des micro-organismes à des fins taxonomiques	29
I.5.3. Mesure d'activité microbienne et métabolisme	32
I.6. Conclusion	34
II. Pseudomonads	35
II.1. Généralités	35
II.2. Principales caractéristiques phénotypiques du groupe.	35
II.3. Taxonomie et phylogénie	37
II.3.1. Généralités	37
II.3.2. Approche génotypique	37
II.3.3. Approche chimiotaxonomique	47
II.4. L'identification d'un isolat : moyens disponibles aujourd'hui ou en cours de	
développement	53
II.4.1. Milieux sélectifs et/ou élitifs.....	53

II.4.2. Tests biochimiques et physiologiques basés sur la mise en évidence d'un composant ou une activité.....	55
II.4.3. Tests biochimiques et physiologiques basés sur la mise en évidence de plusieurs composants cellulaires ou d'une combinaison d'activités métaboliques	55
II.4.4. Quelques études ayant porté sur la comparaison de méthodes ou la caractérisation polyphasique d'isolats de <i>Pseudomonads</i>	59
III. Conclusion de la synthèse bibliographique.....	64
Matériels & Méthodes.....	65
I. Souches étudiées.....	65
I.1. Souches de collection	65
I.2. Souches sauvages	66
I.2.1. Prélèvements	66
I.2.2. Préparation des échantillons, incubation et dénombrement	68
I.2.3. Caractérisation phénotypique des isolats	69
II. Identification des isolats par la réaction Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)	69
III. Préparation des échantillons et analyse par spectroscopie de fluorescence.....	70
III.1. Suspensions bactériennes et spectroscopie à angle droit	70
III.1.1. Préparation des souches.....	70
III.1.2. Enregistrement des spectres de fluorescence.	71
III.2. Analyse directe des colonies par la spectroscopie de fluorescence au moyen d'une fibre optique.....	71
III.2.1. Préparation des souches.....	71
III.2.2. Enregistrement des spectres de fluorescence	72
IV. Traitements des données spectrales	73
IV.1. Analyse en Composantes Principales (ACP).....	73
IV.2. La classification hiérarchique ascendante (CHA)	73
IV.3. Analyse factorielle discriminante (AFD)	73
IV.4. Analyse de variance (ANOVA).....	75
Résultats & Discussions : chapitre 1.....	76
Présentation des potentialités de la spectroscopie de fluorescence pour la taxonomie des <i>Pseudomonas</i>	76
I. Contexte / Objectifs	76
II. Matériel et méthodes.....	77

III. Résultats/ discussion	78
Résultats & Discussions : chapitre 2.....	80
Lecture directe des colonies par fibre optique couplée au spectroscope de fluorescence :	
Mise au point des conditions expérimentales.....	80
I. Contexte /objectifs	80
II. Matériel et méthodes.....	82
III. Résultats/ discussion	85
Résultats & Discussions : chapitre 3.....	87
Quelques exemples d'application de la spectroscopie de fluorescence pour la	
caractérisation des Pseudomonads	87
I. Introduction.....	87
II. Analyse du positionnement taxonomique de 37 souches de référence sur la base des	
données spectrales recueillies par fluorescence synchrone en lecture directe des colonies	
par fibre optique.....	88
II.1. Fluorescence synchrone avec $\Delta\lambda$ de 30 nm	88
II.2. Fluorescence synchrone en $\Delta\lambda$ de 70 nm.....	99
II.3. Conclusion.....	104
III. Identification des isolats	106
III.1. Comparaison des données spectrales recueillies en spectroscopie de fluorescence	
synchrone ($\Delta\lambda$ de 30 nm) par lecture directe des colonies à l'aide d'une fibre	
optique	106
III.1.1. Comparaison des données spectrales recueillies pour les 58 isolats à celles	
recueillies, dans les même conditions, à partir des 37 souches de référence.....	109
III.1.2. Identification au niveau du genre.....	111
III.1.3. Identification au niveau de l'espèce	112
IV. Traçabilité microbienne	116
IV.1. Microbisme d'atelier ?.....	116
IV.2. Discrimination des isolats Pseudomonads selon leurs origines de prélèvement au	
sein d'un abattoir	118
Conclusion et perspectives.....	121
Références bibliographiques	126

ANNEXESI

ABREVIATIONS

ACP : Analyse en Composantes Principales
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
AFNOR : Agence Française de Normalisation
ATP : Adenosine Tri phosphate
ATR : Réflexion Totale Atténué
AFD : Analyse Factorielle Discriminante
Aw Activité de l'eau
Bp : paire de bases
CHA : Classification hiérarchique ascendante
CPG : Chromatographie en phase gazeuse
DO : Densité Optique
FAD/ FADH₂ : formes réduite et oxydée de la flavine adénine dinucléotide
GC : Gas Chromatography (chromatographie en phase gazeuse)
HPLC :High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie liquide haute performance)
IR : Infrarouge
IRTF : Infrarouge à Transformée de Fourier
MLST : Multilocus Sequence Typing
MEE : Multilocus Enzyme Electrophoresis
MS :Mass Spectroscopy
NAD/NADH : forme réduite et oxydée de la nicotinamide adénine dinucléotide
PCR : Polymerase Chain Reaction
PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis (Electrophorèse en Champs pulsé)
RAPD : Randomly Amplified Polymorphic DNA
Rep-PCR : REPetitive sequence PCR
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
SDS PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
UFC : Unité formant colonie
UV : ultra-violet
u.a : unité arbitraire
µm : micromètre
mg : milligramme

TABLEAUX

Tableau 1: Quelques fluorophores et leurs longueurs d'ondes caractéristiques	19
Tableau 2 : Résultats d'une étude portant sur l'identification de 80 isolats hospitaliers (bactéries non fermentaires) par spectrométrie de Masse MALDI-TOF	52
Tableau 3 : Souches de référence et codification	65
Tableau 4 : Résultats comparés d'identification d'isolats de Pseudomonads par PCR, API 20 NE et spectroscopie de fluorescence synchrone	110

FIGURES

Figure 1 : Le rayonnement électromagnétique.....	4
Figure 2: Ondes électromagnétiques et methods spectroscopiques associées (d'après D. A. Skoog, et al. , 1992).....	6
Figure 3 : Exemples de spectres IRFT enregistrés à partir de différents genres de bactéries à Gram négatif. <i>D'après Bosch et al. 2008</i>	9
Figure 4: Exemples de spectres Raman enregistrés à partir de différents genres de bactéries à Gram négatif : a) <i>E. coli</i> ; b) <i>S. Tennessee</i> ; c) <i>K. pneumoniae</i> ; d) <i>E. aerogenes</i> ; e) <i>P. mirabilis</i> ; f) <i>P. aeruginosa</i> (Pineda, 2006).....	12
Figure 5 : Exemples de spectres SERS enregistrés à partir de différents genres de bactéries à Gram négatif. a) <i>E. coli</i> ; b) <i>S. Tennessee</i> ; c) <i>K. pneumoniae</i> ; d) <i>E. aerogenes</i> ; e) <i>P. mirabilis</i> ; f) <i>P. aeruginosa</i> (Pineda, 2006).....	13
Figure 6 : Diagramme de Jablonski simplifié adapté de Jablonski (Jabłoński, 1935)	14
Figure 7 : Phénomène de fluorescence sur le diagramme de Jablonski	16
Figure 8 : Fluorescence à angle droit et fluorescence frontale.....	20
Figure 9 : Diagramme de Jablonski expliquant le balayage de fluorescence synchrone (Patra et Mishra, 2002) : $\Delta\lambda = \lambda_{emi} - \lambda_{exi}$ (i varie de 1 à 9).....	22
Figure 10 : Spectres d'absorption de quelques fluorophores	28
Figure 11 : Spectres d'émission de quelques fluorophores Adapté de G. Wagnieres, et al.(Wagnières et al., 1998)	28

Figure 12 : Les espèces de <i>Pseudomonas</i> et biotypes organisées sur la base des recherche d'homologies au niveau des ADN et ARN ribosomiaux. Les cercles ombrés représentent les groupes d'homologie ARNr (Palleroni, 1973)	39
Figure 13 : Arbre phylogénétique des <i>Pseudomonas</i> stricto-sensu tel que proposé par Anzai et al. (Anzai et al., 2000) sur la base de l'analyse comparative des séquences ARN 16S.* auparavant <i>P. coronofaciens</i> , † auparavant <i>P. aureofaciens</i>	41
Figure 14 : Arbre phylogénétique de 125 souches de référence de <i>Pseudomonas</i> tel que proposé par Yamamoto et al. (Anzai et al., 2000) sur la base de l'analyse comparative des séquences des genes <i>gyrB</i> et <i>rpoD</i>	44
Figure 15 : Analyse des relations phylogénétiques entre <i>Pseudomonas</i> basée sur la comparaison des séquences des gènes <i>atpD</i> , <i>carA</i> , <i>recA</i> et ARNr 16S. Les triangles symbolisent les séparations de clusters	45
Figure 16 : Analyse des relations phylogénétiques entre <i>Pseudomonas</i> basée sur l'analyse combinée des gènes <i>atpD</i> , <i>carA</i> , <i>recA</i> et ARNr 16S. Les triangles symbolisent les séparations de clusters	46
Figure 17 : Exemples de spectres enregistrés par spectrométrie MALDI-TOF à partir de bactéries appartenant à 3 genres distincts (d'après M.G. Kedney et al., 2007)	51
Figure 18 : Carte factorielle de l'AFD réalisée sur les données spectrales de 37 souches de référence recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30 nm).....	89
Figure 19 : Carte factorielle de l'AFD réalisée sur les données spectrales ($\Delta\lambda$ de 30 nm) de 37 souches de référence ; focus sur les espèces de <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. fragi</i> , <i>P. chlororaphis</i> , <i>P. syringea</i> , <i>P. stutzeri</i> pour lesquelles plusieurs biotypes ou biovars.....	90
Figure 20 : Dendrogramme de CHA réalisé à parties des données spectrales recueillies en fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30 nm) à partir des 37 souches de référence.....	92
Figure 21 : Positionnement des groupes et sous-groupes RefGA (A1, A2, A3), RefGB (B1,B2), RefGC définis d'après la classification hiérarchique construite sur la base de l'AFD réalisée sur les données spectrales ($\Delta\lambda$ de 30 nm) de 37 souches de référence....	93
Figure 22 : Spectres moyens des trois groupes RefGA, RefGB et RefGC définis par CHA à partir des données recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30 nm) depuis les 37 souches de référence.	95

Figure 23 : Spectres moyens des trois sous-groupes RefGA1, RefGA2, RefGA3 définis par CHA à partir des données recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30 nm) depuis les 37 souches de référence.	96
Figure 24 : Spectres des trois souches de <i>P. putida</i> recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30).....	97
Figure 25 : Spectres des quatre souches de <i>P. fluorescens</i> recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30).....	98
Figure 26 : Carte factorielle de l'AFD réalisée sur les données spectrales de 37 souches de référence recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 70 nm).....	99
Figure 27: Spectres des trois souches de <i>P. putida</i> recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 70 nm).....	102
Figure 28 : Spectres des quatre souches de <i>P. fluorescens</i> recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 70 nm).....	103
Figure 29: Spectres moyens des deux groupes d'isolats (atelGA, atelGB) segmentés par classification heriarchique ascendante.	107
Figure 30 : Spectes moyens des sous-groupes du groupe A (atelGA1, A2, A3, A4, A5) segmentés par classification hiérarchique ascendante	108
Figure 31 : Spectres moyens des sous-groupes du groupe B (atelGB1, B2) segmentés par classification hiérarchique ascendante	109
Figure 32 : Carte factorielle résultant de l'AFD réalisée sur les données spectrales des isolats provenant de deux abattoirs (bleu : abattoir 1, rouge : abattoir 2)	117
Figure 33 : Carte factorielle résultant de l'AFD réalisée sur les données spectrales des isoltas de l'abattoir ATEL1	118
Figure 34 : Carte factorielle résultant de l'AFD réalisée sur les données spectrales des isoltas de l'abattoir ATEL2	120

QUELQUES ÉLÉMENTS DE TERMINOLOGIE

La **taxonomie** est une science qui a pour objet la classification des êtres vivants en groupes de similitude ou taxons. Aujourd'hui, la taxonomie recouvre les approches de classification (positionner un isolat au sein d'un groupe taxonomique sur la base de similitudes), d'identification (déterminer si un isolat appartient à une unité taxonomique et lui attribuer un nom) mais également de phylogénie (analyser les relations évolutives entre souches ou isolats). On distingue généralement :

- La **taxonomie phénotypique** qui résulte de l'analyse d'un faible nombre de caractères considérés comme importants tels que la morphologie, la présence d'une spore, la mise en évidence d'un caractère biochimique jugé essentiel...
- La **chimiotaxonomie** qui résulte de l'étude de constituants cellulaires généralement spécifiques du taxon étudié.
- La **taxonomie moléculaire** qui résulte de l'étude de molécules complexes le plus souvent assimilées aux matériels génétiques.
- La **taxonomie polyphasique** ou consensuelle proposée il y a un 30aine d'années pour désigner une approche intégrant plusieurs types d'informations recueillies par différentes méthodes (phénotypique, génotypique et/ou moléculaire).

Un **taxon** (ou unité taxonomique ou groupe taxonomique) est un groupe d'organismes apparentés appartenant à un même rang hiérarchique.

L'**espèce** constitue l'unité de base de la classification bactérienne. La définition classique d'une espèce biologique (communauté d'êtres vivants reconnaissables par leurs caractères et capables de se reproduire sexuellement entre eux en donnant naissance à une progéniture fertile) n'est pas applicable aux procaryotes. En bactériologie, il n'existe pas de concept précis : **une espèce est constituée par sa souche type et par l'ensemble des souches considérées comme suffisamment proches de la souche type pour être incluses au sein de la même espèce.** Evidemment, derrière cette « définition » floue apparaît la notion de méthode d'analyse des proximités entre souches. La définition généralement admise est la suivante : une espèce procaryote est une catégorie qui rassemble des individus (isolats/souches) génotypiquement cohérents et qui présentent un haut degré de similitudes pour différents caractères comparés sous conditions standardisées.

Ensuite, Les règles de priorité sont les mêmes que pour les autres disciplines : lorsque deux espèces bactériennes sont regroupées dans un même genre, ou deux genres dans une même famille, selon de nouveaux critères, la règle d'antériorité de publication des noms de taxons prévaut pour désigner ce genre ou cette famille. Le regroupement de plusieurs genres au sein d'une sous-tribu, d'une tribu, d'une sous-famille, d'une famille, d'un sous-ordre, d'un ordre, d'une sous-classe ou d'une classe repose sur des arguments encore moins solides que ceux qui président au rassemblement des espèces dans un genre. De ce fait, certains taxonomistes sont très réticents au placement des genres dans un de ces rangs hiérarchiques ; le terme de cluster est alors utilisé.

La nomenclature des taxons d'un rang hiérarchique inférieur à la sous-espèce n'est pas couverte par les règles du Code de Nomenclature. En pratique, ces taxons peuvent donc être désignés de manières différentes selon les auteurs. Les principaux termes utilisés sont les suivants :

Biovar (ou biotype) : taxon d'un rang hiérarchique inférieur à la sous-espèce et caractérisé par ses propriétés biochimiques ou physiologiques.

Chimiovar : taxon d'un rang hiérarchique inférieur à la sous-espèce et caractérisé par la production d'un composé chimique.

Cultivar : taxon d'un rang hiérarchique inférieur à la sous-espèce et caractérisé par ses caractères culturels.

Morphovar : taxon d'un rang hiérarchique inférieur à la sous-espèce et caractérisé par sa morphologie.

Pathovar : taxon d'un rang hiérarchique inférieur à la sous-espèce et caractérisé par son pouvoir pathogène.

Phagovar (ou phagotype ou lysotype) : taxon d'un rang hiérarchique inférieur à la sous-espèce et caractérisé par sa sensibilité à différents bactériophages.

Sérovar (ou sérotype) : taxon d'un rang hiérarchique inférieur à la sous-espèce et caractérisé par ses propriétés antigéniques.

Genomovar taxon résulte d'une ségrégation de biovars en différents taxons par transfert horizontal de gènes.

Une **nomenspecies** est un taxon défini dans un but pratique (médical, industriel, etc.) par quelques caractères intéressants que doivent posséder tous les individus admis dans ce taxon.

Le rang de sous-espèce est admis et noté **subsp.** (subspecies) suivi du nom latin en italiques (ou souligné).

L'appartenance d'une souche isolée à un genre, sans précision de l'espèce, est notée du nom du genre suivi de **sp.** (species) tant que l'isolat n'est pas identifié à une espèce. Pour désigner toutes les espèces d'un genre, on fait suivre le nom du genre de **spp.**

Une **souche type** est l'élément auquel le nom d'une espèce est attaché d'une manière permanente. La souche type est d'une importance considérable pour la systématique puisqu'une espèce ou une sous-espèce est en fait constituée par la souche type et par l'ensemble des souches qui sont considérées comme suffisamment proches de la souche type pour être incluses au sein du même taxon.

Une **souche de référence** n'est pas une souche type. Il s'agit d'une souche utilisée par différentes équipes lors d'études comparatives. Une souche peut constituer une souche de référence en raison de ses caractères antigéniques ou de ses caractères biochimiques ou de son pouvoir pathogène. Bien sûr, il peut arriver qu'une souche type soit également prise comme souche de référence dans une étude comparative.

INTRODUCTION

Depuis l'ère pasteurienne et la définition des principes d'identification bactérienne, les objectifs et méthodes taxonomiques ont considérablement évolué. En effet, ces méthodes qui ont été très longtemps phénotypiques (critères morphologiques, structuraux ou fonctionnels) sont désormais supplantées par les méthodes dites moléculaires basées principalement sur l'analyse du génome. Les possibilités analytiques offertes par les techniques relevant sur séquençage notamment, ont permis d'explorer la diversité génotypique au sein des espèces ouvrant la réflexion autour de la notion même d'espèce, de biotype ou de population clonale. La précision apportée par ces nouvelles méthodes a élargi les fonctions dévolues aux sciences relevant de la systématique ou taxonomie bactérienne. Aujourd'hui, la taxonomie recouvre les approches de classification (positionner un isolat au sein d'un groupe taxonomique sur la base de similitudes), d'identification (déterminer si un isolat appartient à une unité taxonomique et lui attribuer un nom) mais également de phylogénie (analyser les relations évolutives entre isolats). Pourtant, au-delà des apports fondamentaux apportés par ces méthodes pour la connaissance des micro-organismes, leur seule utilisation apparaît actuellement restrictive, et de nombreux microbiologistes suggèrent désormais une approche polyphasique de la caractérisation des micro-organismes ; à savoir, la prise en compte aussi précisément et aussi largement que possible des informations phénotypiques et génotypiques.

Par ailleurs, d'un point de vue pratique, dans les secteurs de la bactériologie médicale, environnementale ou agroalimentaire, l'analyse microbiologique vise la détection, le dénombrement, l'identification et la traçabilité de micro-organismes pathogènes, d'altération ou d'intérêt. Les qualités attendues des méthodes mises en place dépendent des objectifs de l'analyse, mais au-delà des attentes implicites des opérateurs (fiabilité, justesse..) la rapidité et le coût modéré sont les critères les plus importants. Malgré le développement de méthodes rapides telles que le DEFT (Direct Epifluorescent Filter Technique), la cytométrie en flux, l'ATP-métrie ou l'impédance-métrie), le dénombrement sur milieux gélosés reste l'outil principal utilisé par les petites et moyennes entreprises et les laboratoires de contrôle pour le dénombrement de flores microbiennes selon les méthodes normalisées. Ce type de dénombrement repose sur l'utilisation de milieux de culture riches ou sélectifs selon les flores recherchées. Ce type d'approche qui est long et fastidieux reste très imparfait notamment pour les flores Pseudomonads, puisqu'il ne permet de dénombrer que les microorganismes cultivables et par ailleurs souffre de nombreux biais comme le manque de sélectivité des

milieux ou au contraire, une pression de sélection trop importante pour permettre le recouvrement de toutes les flores recherchées. Il présente néanmoins l'avantage de permettre une première caractérisation des flores présentes par simple observation macroscopique des caractères de croissance. Pour améliorer la fiabilité du dénombrement, l'identification des micro-organismes dénombrés est préconisé (généralement 5 colonies isolées par boîte de Petri utilisée pour le dénombrement).

La rapidité d'identification des micro-organismes développés sur milieux gélosés constitue donc un enjeu majeur pour nombre de laboratoires.

Les travaux présentés ici ont visé à la mise au point d'une méthode spectroscopique, la spectroscopie de fluorescence, apte à répondre à ces attentes. Nos objectifs ont donc été de définir les meilleures conditions de préparation des échantillons, d'enregistrement et de traitement des données mais également d'évaluer la pertinence de la spectroscopie de fluorescence dans une optique taxonomique. Le modèle d'étude choisi a été celui des Pseudomonads qui constituent une des principales flores d'altération des produits alimentaires mais aussi un des groupes bactériens présentant une des plus grandes diversités phénotypiques et génotypiques décrites à ce jour.

La partie bibliographique de ce mémoire s'articule autour de 2 parties : dans un premier temps seront présentées les méthodes spectroscopiques et leur utilisation à des fins d'identification bactérienne avec un focus particulier sur les principes de la spectroscopie de fluorescence, puis les Pseudomonads seront décrits notamment au regard des méthodes mises en place au fil du temps pour la précision de leur taxonomie.

La partie qui concerne la présentation des travaux réalisés et des résultats obtenus s'attachera à décrire les différentes étapes qui ont conduit à finaliser les conditions expérimentales optimales pour l'utilisation de cette méthode à des fins de caractérisation microbienne.

Dans un premier temps, nous nous sommes appuyés sur un article présentant les potentialités de la spectroscopie de fluorescence pour une approche polyphasique de la taxonomie des Pseudomonads.

Dans un second temps, en nous appuyant sur un second article (soumis) nous présenterons les étapes de mise au point de la méthode pour une analyse directe des colonies de Pseudomonads par l'utilisation d'une fibre optique reliée au spectroscope de fluorescence.

Enfin, nous reprendrons différents éléments des résultats obtenus pour décrire les utilisations possibles de cette méthodologie pour:

- Apporter des éléments d'analyse pour la taxonomie des Pseudomonads (travaux sur souches de référence)
- Permettre le positionnement taxonomique d'isolats (ici isolés d'abattoirs de viande)
- Permettre la traçabilité des contaminations dans les ateliers agroalimentaires (ici abattoirs de viande).

La conclusion reprendra les principaux résultats obtenus et présentera les développements et applications futures envisageables pour cette méthode.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Méthodes spectroscopiques pour l'analyse biologique

I.1. La spectroscopie principes généraux

La spectroscopie est le champ d'étude qui consiste à observer, mesurer et interpréter les spectres électromagnétiques produits par une substance qui émet ou absorbe une énergie rayonnante, autrement dit, l'étude de l'interaction d'une onde électromagnétique avec le nuage électronique des liaisons chimiques de la matière.

Le photon est la particule élémentaire du rayonnement électromagnétique. L'énergie E (en joule) d'un photon est associée à sa fréquence ν (en hertz) selon la relation :

$$E = h \nu ,$$

où h est la constante de Planck.

La relation classique entre vitesse, temps et longueur d'onde permet de lier la fréquence du photon à sa longueur d'onde λ (en centimètres) :

$$\nu = c / \lambda ,$$

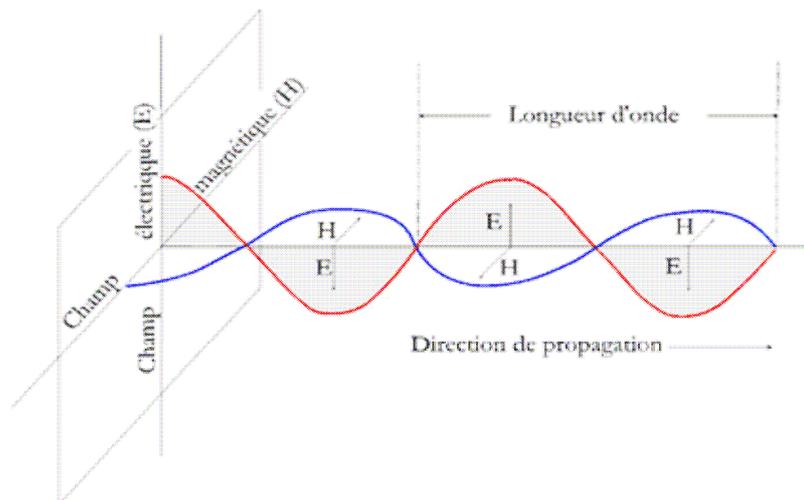


Figure 1 : Le rayonnement électromagnétique

où c est la vitesse de la lumière dans le milieu considéré (très souvent, on utilise plutôt le nombre d'onde ν (en cm^{-1}) qui correspond à l'inverse de la longueur d'onde.

Traditionnellement, le rayonnement électromagnétique qui a donc comme vecteur le photon, est décrit sous la forme d'une onde électromagnétique correspondant à la propagation d'un champ magnétique H et d'un champ électrique E , perpendiculaires entre eux, figure 1.

La spectroscopie repose sur le principe suivant : lorsqu'un rayonnement électromagnétique rencontre une molécule ou un ensemble de molécules, il peut être dispersé (sa direction de propagation est modifiée), ou absorbé (son énergie est transférée à une molécule). Si la radiation électromagnétique est absorbée, la molécule est dite excitée.

La lumière diffusée due aux vibrations des molécules est appelée diffusion Raman (elle est typiquement décalée jusqu'à 4000 cm^{-1} par rapport à la lumière incidente).

La lumière absorbée induit un état d'excitation caractérisé par un niveau d'énergie qui résulte en fait de plusieurs types d'énergies :

- l'énergie de translation, qui est l'énergie fournie ou nécessaire à la molécule pour se mouvoir selon les trois dimensions ;
- l'énergie de rotation (rayonnement micro-ondes) qui permet à la molécule de tourner autour de son centre de gravité ;
- l'énergie vibrationnelle (rayonnement infrarouge) qui est l'énergie résultante des vibrations des liaisons entre atomes ;
- l'énergie électronique (rayonnement visible ou ultraviolet) qui correspond à l'énergie des électrons dans les orbitales moléculaires.

La spectroscopie optique repose sur la séparation de la lumière en longueurs d'ondes individuelles au moyen d'un dispositif tel qu'un prisme ou un réseau de diffraction.

On distingue différentes spectroscopies selon les phénomènes étudiés. Ainsi, l'analyse des énergies ou spectres vibrationnels sont celles utilisées dans les domaines infra rouge ou raman. Les spectres associés à une variation des nombres quantiques de rotation d'une molécule sont habituellement observés dans le domaine micro-ondes et les régions adjacentes du spectre électromagnétique. Ceux qui sont associés à une variation des nombres quantiques

de vibration surviennent dans le domaine infrarouge. Les spectres électroniques sont généralement étudiés dans les domaines visible et ultraviolet.

La figure ci-après (figure 2) présente les transitions provoquées par les différentes grandes catégories d'ondes électromagnétiques et les méthodes spectroscopiques associées.

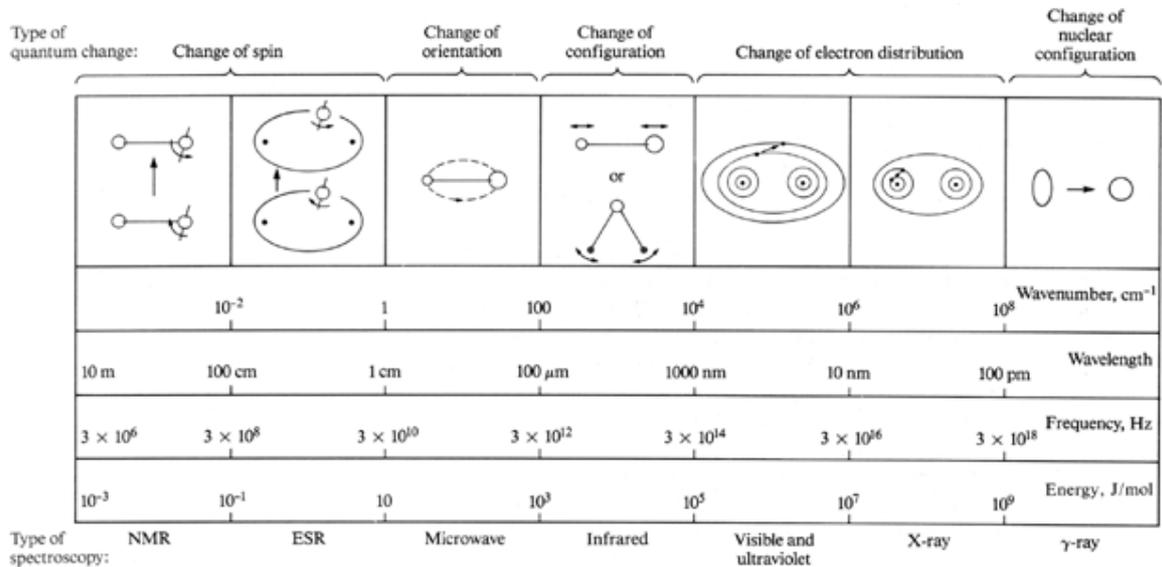


Figure 2: Ondes électromagnétiques et méthodes spectroscopiques associées (d'après D. A. Skoog, et al. , 1992)

En spectroscopie on peut distinguer 2 types de spectres :

- Le spectre d'émission qui est constitué par la superposition des ondes électromagnétiques émises après excitation de la matière à une longueur d'onde donnée.
- Le spectre d'absorption qui est exactement complémentaire du spectre d'émission puisqu'il résulte de l'excitation de la matière avec de la lumière blanche (soit toutes les longueurs d'ondes) et superposition des longueurs d'onde absorbées.

Dans les paragraphes suivants seront décrites les deux principales méthodes spectroscopiques développées pour l'analyse des phénomènes biologiques, l'accent étant porté sur le domaine de la microbiologie.

I.2. La spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF)

Dans le cas de la spectroscopie d'absorption IR, le rayonnement émis par la source polychromatique n'est généralement pas assez énergétique pour provoquer des transitions électroniques, mais il induit des transitions entre les niveaux d'énergie vibrationnelle. En spectroscopie Infrarouge, c'est donc l'énergie associée à la vibration des liaisons chimiques qui est étudiée généralement par balayage de fréquences comprises entre 4000 cm^{-1} et 625 cm^{-1} . La spectroscopie par absorption infrarouge (IR) consiste à mesurer la longueur d'onde et l'intensité d'absorption du rayonnement infrarouge moyen par un échantillon, la longueur d'onde des bandes d'absorption IR étant caractéristique de types spécifiques de liaisons chimiques.

Très largement utilisée dans de nombreux secteurs d'activité, la spectroscopie infrarouge (IR) avait été décrite comme moyen de différenciation et d'identification des bactéries dès les années 1950 grâce aux travaux de Stevenson et Bolduan (1952) (Stevenson et Bolduan, 1952) et ceux de Goulden et Sharpe (Goulden et Sharpe, 1958, Norris, 1959), mais la faible résolution des appareils à filtres et l'absence de traitement mathématique avaient alors conduit à délaissier cette méthodologie pourtant prometteuse (Norris, 1959).

Il a fallu attendre l'avènement de la spectroscopie à transformée de Fourier (IRTF) et le développement de micro-informatique pour que cette technique connaisse un regain d'intérêt. A l'initiative de Naumann et de ses collaborateurs, ce renouveau s'est d'abord manifesté dans le domaine clinique (Naumann et al., 1988, Naumann et al., 1991a, Naumann et al., 1991b), puis s'est rapidement étendu aux domaines agroalimentaires grâce notamment aux travaux de Curk et collaborateurs (Curk et al., 1994). En 1999, Kansiz et coll. (Kansiz et al., 1999) montraient que la technique IRTF combinée avec la chimométrie permettait la discrimination de différents taxons de cyanobactéries. Dans le même temps, plusieurs auteurs montraient les potentialités de la méthode pour la caractérisation des levures et moisissures (Fischer et al., 2006, Kummerle et al., 1998, Timmins et al., 1998, Tintelnot et al., 2000, Wenning et al., 2002), ou plus largement, pour la caractérisation de micro-organismes et leur discrimination en groupes taxonomiques comme les *Staphylocoques*, *Streptocoques*, *Clostridium*, et *Legionella* (Helm et al., 1991), les *Streptocoques* (van der Mei et al., 1993), les *Lactobacillus* (Amiel et al., 2000, Curk et al., 1994, Dziuba et al., 2007), les *Actinomycetales* (Haag et al., 1996), les *Listeria* (Lefier et al., 1997, Oust et al., 2006, Rebuffo-Scheer et al., 2007, Rebuffo et al., 2006), les *Bacillus* (Beattie et al., 1998), les *Enterocoques* (Kirschner et al., 2001) ou

les corynebacteries (Oberreuter et al., 2002). Dès 1999, Johnsen et ses collaborateurs décrivaient l'utilisation de la spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (Kaare Johnsen, 1999) pour la caractérisation d'isolats environnementaux préalablement identifiés au genre *Pseudomonas*. Les analyses réalisées alors indiquaient un excellent clustering au niveau de l'espèce et la sous-espèce (sans identification) et en tous cas, un clustering similaire à celui obtenu par Rep-PCR. En 2001, Z. Filip et S. Hermann (Filip et Hermann, 2001) évaluaient les zones spectrales les plus « identitaires » des *Pseudomonas* et de leurs conditions de culture mais concluaient que la méthode n'était pas suffisamment sensible pour différencier les *Pseudomonas*. En 2006, Holtze et ses collaborateurs (Holtze et al., 2006) aboutissait à la même conclusion concernant le positionnement taxonomique d'isolats de *Pseudomonads* provenant de sols chargés en mercure.

Actuellement, de large banques de données spectrales sont élaborées ou en cours de construction (Amiel et al., 2000, Bosch et al., 2008, Dziuba et al., 2007, Fischer et al., 2006, Goodacre et al., 1996, Helm et al., 1991, Kirschner et al., 2001, Maquelin et al., 2003, Mariey et al., 2001, Oberreuter et al., 2002, Oust et al., 2006, Tintelnot et al., 2000, Wenning et al., 2002). Par la multiplication des spectres de référence et la standardisation des protocoles de préparation des échantillons, elles permettent l'identification rapide et fiable d'isolats provenant d'environnements complexes (Tindall et al., 2000) ou médicaux (Bosch et al., 2008) (Amiali et al., 2008). La figure 3 présente un exemple de spectres IRFT enregistrés à partir de différents genres de bactéries à Gram Négatif.

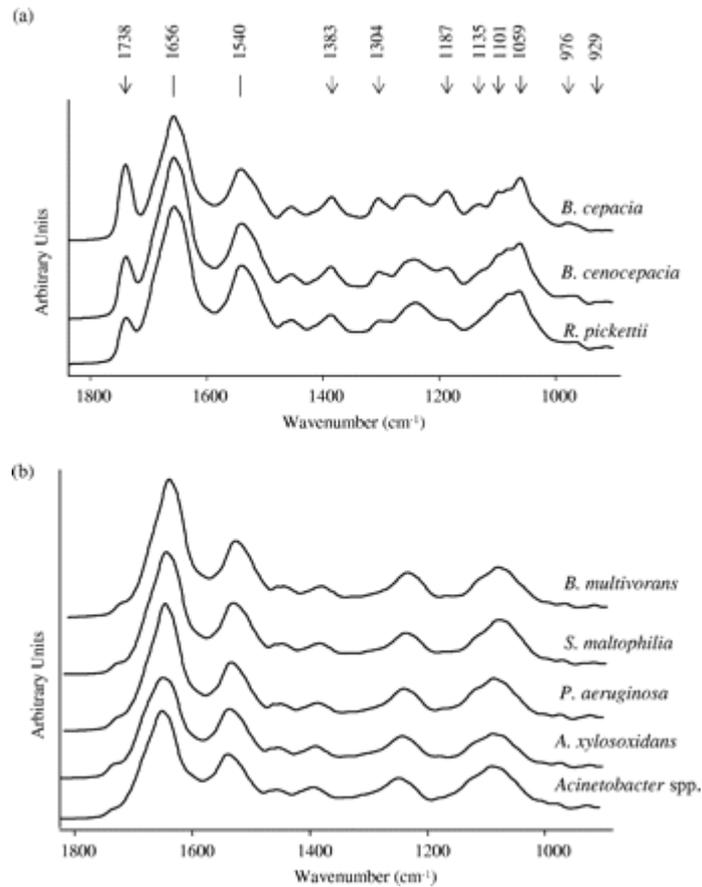


Figure 3 : Exemples de spectres IRFT enregistrés à partir de différents genres de bactéries à Gram négatif. D'après Bosch et al. 2008

Certains auteurs ont même montré la performance de cette méthode pour analyser des contaminations microbiennes artificiellementensemencées à la surface de matrices alimentaires (Yang et Irudayaraj, 2003) ou pour identifier des micro-organismes multipliés en culture mixte (Yu, 2005).

Diverses déclinaisons de la spectroscopie IR à transformée de Fourier sont également utilisées à des fins taxonomiques. Ainsi, la spectroscopie IRTF de réflexion spéculaire, la spectroscopie IRTF de diffus-réflexion ou encore microspectroscopie IRTF ont également été testées avec succès, par exemple pour l'identification rapide des différentes espèces de Streptocoques et d'Entérocoques par enregistrement des spectres à partir de microcolonies (Oust Janbu, 2008, Goodacre et al., 1996, Lang et Sang, 1998, Ngo-Thi et al., 2003, Rebuffo-Scheer et al., 2008).

Aujourd'hui, la spectroscopie Infra rouge à transformée de Fourier est certainement la méthode spectroscopique la plus aboutie pour la caractérisation des bactéries, levures et

moisissures (Wenning et al., 2007). Ses applications à des fins taxonomiques permettent la classification des micro-organismes à l'échelle du genre, l'espèce, la sous-espèce ou du biotype. Sa spécificité élevée permet également la caractérisation des propriétés de ces micro-organismes telles que la résistance aux antibiotiques ou aux bactériocines ou encore l'analyse de certains composants cellulaires et leur réponse aux stress par exemple (Santivarangkna et al., 2007). Les principaux avantages de la spectroscopie infrarouge sont la rapidité d'acquisition, le faible coût et la sensibilité de la résolution.

Mais cette méthode présente également quelques inconvénients comme par exemple, la largeur des bandes spectrales et surtout sa sensibilité à l'eau qui rend quasi impossible toute analyse en milieu aqueux. En vue d'analyse microbiologique, la préparation des cellules nécessite des calibrations extrêmement précises pour s'affranchir des variations expérimentales et instrumentales. L'état physiologique des cellules doit être standardisé et le milieu de croissance de composition exactement répétable, enfin une étape de dessiccation est indispensable qui est susceptible d'altérer les structures cellulaires.

I.3. La spectroscopie de diffusion Raman

Cousine de la spectroscopie Infraouge, l'autre spectroscopie vibrationnelle que constitue la spectroscopie Raman est souvent considérée par ses défenseurs comme « La Méthode spectroscopique à haut potentiel pour l'analyse des systèmes biologiques ».

Découverte en 1928, la diffusion Raman (du nom du physicien Chandrasekhara Venkata Raman qui découvrit l'effet) permet d'utiliser la lumière visible pour accéder au spectre vibrationnel des molécules qui interagissent avec un faisceau lumineux. Le principe de la spectroscopie Raman consiste donc à envoyer une lumière monochromatique (une seule longueur d'onde précise) sur l'échantillon à étudier et à analyser la lumière diffusée. Plus précisément, cette spectroscopie s'appuie sur le phénomène suivant : lorsque la lumière est réfléchi par la molécule, la plupart des photons sont réfléchis de façon élastique. Ces photons conservent la même énergie et par conséquent la même longueur d'onde que les photons incidents. Cependant une faible part de la lumière (environ un photon pour 10^7 photons incidents) est réfléchi à une énergie différente, le plus souvent plus faible, que celle des photons incidents. Le phénomène lié à cette réflexion non élastique de la lumière est appelé l'effet Raman. La réflexion Raman se produit avec un changement de niveau d'énergie vibrationnelle, rotationnelle ou même électronique de la molécule. La différence d'énergie entre le photon incident et le photon réfléchi correspond à l'énergie de vibration de la

molécule réfléchissante. Lorsque l'énergie du photon réfléchi est inférieure à celle du photon incident le phénomène est appelé effet Stokes. A l'inverse, et plus rarement, si l'énergie du photon renvoyé est plus élevée, on parle alors d'effet anti-Stokes. Le tracé des intensités de la lumière réfléchie en fonction de la différence d'énergie constitue le spectre Raman.

Par rapport à IRTF, les avantages de la spectroscopie Raman résident principalement dans la possibilité d'analyser des échantillons aqueux, l'absorption IR intense de l'eau étant évitée. Par ailleurs, les bandes spectrales sont plus pointues (nettes), plus étroites et mieux différenciées fournissant des informations biochimiques sur la composition moléculaire des micro-organismes étudiés. Ces propriétés ont été mises à profit dès le début des années 90 pour la classification des bactéries (Berger et Zhu, 2003, Chadha et al., 1993a, Choo-Smith et al., 1999, Harz et al., 2005, Huang et al., 2004, Kirschner et al., 2001, Krause et al., 2007, Maquelin et al., 2000, Maquelin et al., 2002, Mouwen et al., 2006, Oust et al., 2006, Rösch et al., 2006a, Rosch et al., 2006b, Rosch et al., 2005).

Cependant, l'effet de Raman est de faible intensité et les temps de collecte sont longs (plusieurs dizaines de secondes, voire quelques minutes) mais la sensibilité de la technique peut être augmentée en découplant le signal et donc par exemple, en augmentant la biomasse analysée par multiplication des micro-organismes. Mais ceci limite donc son utilité dans les laboratoires cliniques où les analyses de haut-débit sont nécessaires. La figure 4 présente un exemple de spectres Raman enregistrés à partir de différents genres de bactéries à Gram négatif.

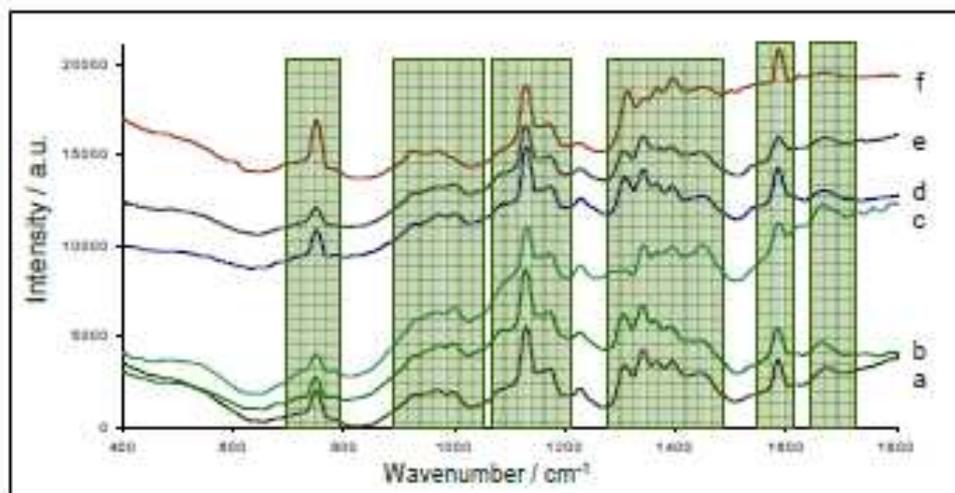


Figure 4: Exemples de spectres Raman enregistrés à partir de différents genres de bactéries à Gram négatif : a) *E. coli*; b) *S. Tennessee*; c) *K. pneumoniae*; d) *E. aerogenes*; e) *P. mirabilis*; f) *P. aeruginosa* (Pineda, 2006)

Lorsque seulement une petite quantité de l'échantillon est disponible, il est indispensable de renforcer les signaux Raman. Pour ce faire, plusieurs techniques sont possibles.

La spectroscopie de diffusion Raman de surface renforcé SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy) consiste à lier les micro-organismes à une surface avant analyse. Ces liants peuvent être de nature variable et plusieurs essais font état de résultats performants obtenus avec des substances colloïdales d'argent, d'or voire d'anticorps ou de bactériophages immobilisés (Efrima et Bronk, 1998, Efrima et al., 1999, Grow et al., 2003, Jarvis et al., 2004a, Jarvis et Goodacre, 2004, Sockalingum et al., 1999). Bien qu'encore en cours de développement, notamment pour l'optimisation des conditions expérimentales, cette technique semble très prometteuse car extrêmement sensible et produisant une information spectrale particulièrement précise autorisant l'analyse à l'échelle de la cellule ou de ses constituants (Efrima et Zeiri, 2008, Jarvis et al., 2008).

La figure 5 présente un exemple de spectres SERS enregistrés à partir de différents genres de bactéries à Gram négatif.

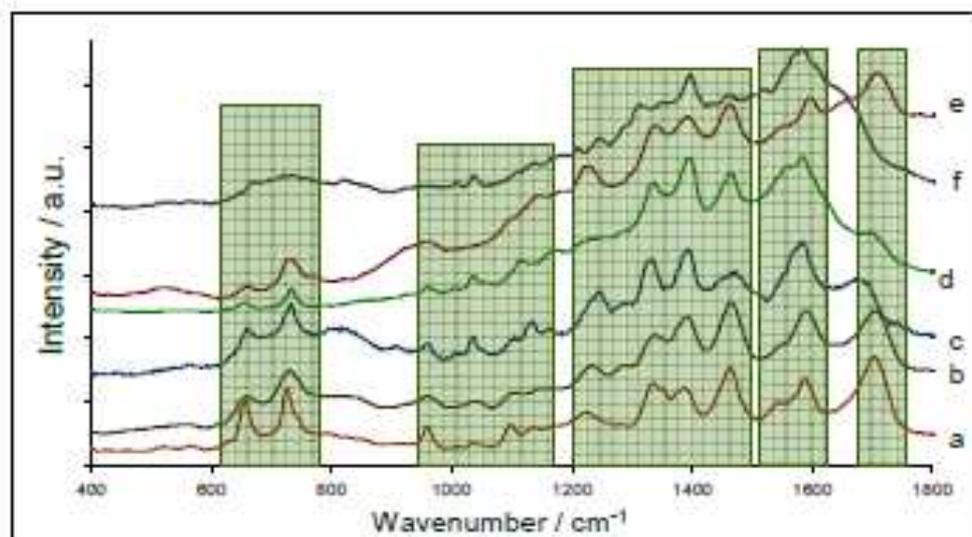


Figure 5 : Exemples de spectres SERS enregistrés à partir de différents genres de bactéries à Gram négatif. a) *E. coli*; b) *S. Tennessee*; c) *K. pneumoniae*; d) *E. aerogenes*; e) *P. mirabilis*; f) *P. aeruginosa* (Pineda, 2006)

Une autre déclinaison appelée spectroscopie Raman de résonance (RRS) permet également de renforcer les signaux et ainsi l'investigation directe de macromolécules comme les protéines ou d'ADN. Le principe est basé sur l'excitation de l'échantillon à des longueurs d'ondes voisines de 250nm. Dans ces régions, les molécules aromatiques à doubles liaisons conjuguées très présentes chez les micro-organismes (bases puriques et pyrimidiques, divers coenzymes et les trois acides aminés aromatiques que sont la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine) génèrent des bandes bien identifiées et leur assignation à des composés moléculaires est moins ambiguë que ceux générés en simple spectroscopie infrarouge. Dès 1988, Britton et ses collaborateurs, montraient la capacité de cette méthode pour analyser les modifications structurales de certains composés cellulaires (Britton et al., 1988). Par la suite, Manoharan et ses collaborateurs (Chadha et al., 1993a, Chadha et al., 1993b, Manoharan et al., 1990, Wu et al., 2001, Wu et al., 2000) ont étudié le métabolisme des micro-organismes et discriminé des espèces bactériennes : *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas fluorescens* et *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* et des protoplastes de *Bacillus megaterium* ou encore *Escherichia coli* et *Staphylococcus epidermidis*. Mais, finalement, si la RRS génère des spectres qui peuvent être considérés comme de réelles signatures phénotypiques des bactéries étudiées, le coût et la complexité des équipements requis ont limité son utilisation à l'échelle exploratoire (Jarvis et Goodacre, 2004).

La Basse Résolution en Spectroscopie de Raman (Low Resolution Raman Spectroscopy) semble également être une bonne alternative pour les analyses en spectroscopie optique vibrationnelle par l'utilisation de faisceaux laser dans le proche infrarouge. Bien que proche de la spectroscopie infrarouge, cette méthode ne souffre pas de la forte interférence de l'eau. Elle génère par ailleurs des bandes spectrales, certes larges, mais qui peuvent facilement être assignées à des composés moléculaires. A titre d'exemple, en appliquant une analyse de corrélations en 2 dimensions (2D-LRRS), Mello et ses collaborateurs (Mello et al., 2008) ont pu discriminer des souches de référence de *S. aureus*, *S. pyogenes* et *N. gonorrhoeae* en suspension qui présentaient pourtant des spectres Raman très similaires.

I.4. La spectroscopie de fluorescence

I.4.1. Principes

La spectroscopie de fluorescence s'appuie sur le phénomène de luminescence, à savoir, le rayonnement émis par des molécules qui, après avoir été excitées par une onde électromagnétique, reviennent à leur niveau d'énergie inférieur. La luminescence est divisée en 2 catégories selon la nature de l'état excité : la fluorescence et la phosphorescence.

Le diagramme de Jablonski (figure 6) permet de visualiser ces phénomènes.

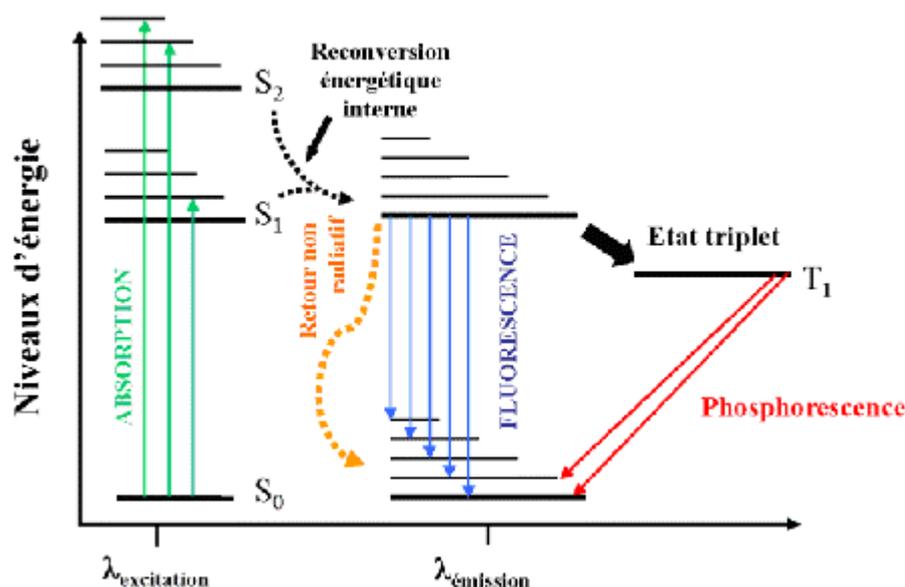


Figure 6 : Diagramme de Jablonski simplifié adapté de Jablonski (Jabłoński, 1935)

L'état fondamental d'une molécule (ici un chromophore) est un état « singulet » de repos stable dit S_0 . Lorsque la molécule est excitée par une onde électromagnétique et donc après absorption d'un photon de longueur d'onde suffisamment énergétique (dans la bande d'adsorption des molécules), il se produit un apport d'énergie $E=h \cdot \nu$ (h constante de Planck, ν fréquence = c/λ , c vitesse de la lumière, λ longueur d'onde) que les électrons absorbent. Ils accèdent alors à un niveau d'énergie plus élevé (S_1) et la molécule se trouve dans un état énergétique supérieur : elle est dite « excitée ». L'état excité persiste pendant un temps fini caractéristique de la molécule. Après l'absorption d'un photon; plusieurs phénomènes peuvent se produire. Quand une molécule est habituellement excitée vers n'importe quel état vibrationnel de S_1 ou de S_2 , les molécules retournent rapidement, à part de rares exceptions, vers l'état vibrationnel le plus bas de l'état excité. Ce phénomène qui est appelé *conversion interne* se produit généralement en 10^{-12} secondes. Suite à des collisions avec d'autres molécules, une désactivation a lieu, que ce soit nonradiativement ou radiativement, en fonction de l'environnement local. Si toute l'énergie en excès n'est pas dissipée par collisions avec d'autres molécules, l'électron retourne à l'état fondamental en émettant de l'énergie sous forme de photons. Selon le spin, on distingue 2 états excités d'énergie et de nature différente : l'état singulet instable (S) et l'état Triplet métastable (T). Si l'émission radiative se produit entre deux états de même multiplicité (singulet excité – singulet fondamental), le phénomène est appelé fluorescence. Si l'émission se produit entre deux états de multiplicité différente (Triplet – singulet fondamental), le phénomène est appelé phosphorescence. Généralement, le phénomène de conversion interne est très bref (de l'ordre de 10^{-12} secondes) et est terminé lorsque débute le phénomène de fluorescence qui dure lui de 10^{-9} à 10^{-7} secondes. La phosphorescence n'apparaît généralement que plusieurs secondes après l'excitation.

Donc, la fluorescence est tout simplement l'émission très rapide (1-10 ns) de la lumière (provenant de l'état excité singulet d'une molécule), contrairement à la phosphorescence, qui est une libération retardée de l'énergie absorbée (provenant de l'état excité). Comme la durée de vie de l'état triplet est plus grande, les collisions désactivantes sont nombreuses. Ainsi il est très difficile, voire impossible, d'observer le phénomène de phosphorescence dans un milieu liquide. Il n'est généralement observé dans des gaz ou des solides. Le temps de vie de cet état peut alors atteindre la seconde, voire plus (Kunnil, 2005). Dans la fluorescence, le photon émis aura donc une énergie moindre que le photon d'excitation : pour une molécule donnée, les longueurs d'onde d'émission seront donc supérieures à celles d'excitation.

La fluorescence habituellement observée telle que décrite précédemment est la fluorescence de Stokes. Elle correspond à la réémission de photons de plus faible énergie, donc de plus grande longueur d'onde que les photons absorbés. Si une énergie thermique est ajoutée à un état excité ou, si un composé a beaucoup de niveaux vibrationnels fortement peuplés, une émission à des longueurs d'onde plus courtes que celle utilisée pour l'excitation peut se produire, on parle, alors, de fluorescence *anti-stokes*, souvent observée dans les gaz dilués à haute température. La fluorescence de résonance est la réémission de photons ayant la même énergie que les photons absorbés. Ce type de fluorescence n'est jamais observé en solution du fait des interactions avec le solvant qui entraînent des désactivation par collision, mais peut se produire dans les gaz ou les cristaux.

La figure 7 positionne le phénomène de fluorescence sur le diagramme de Jablonski

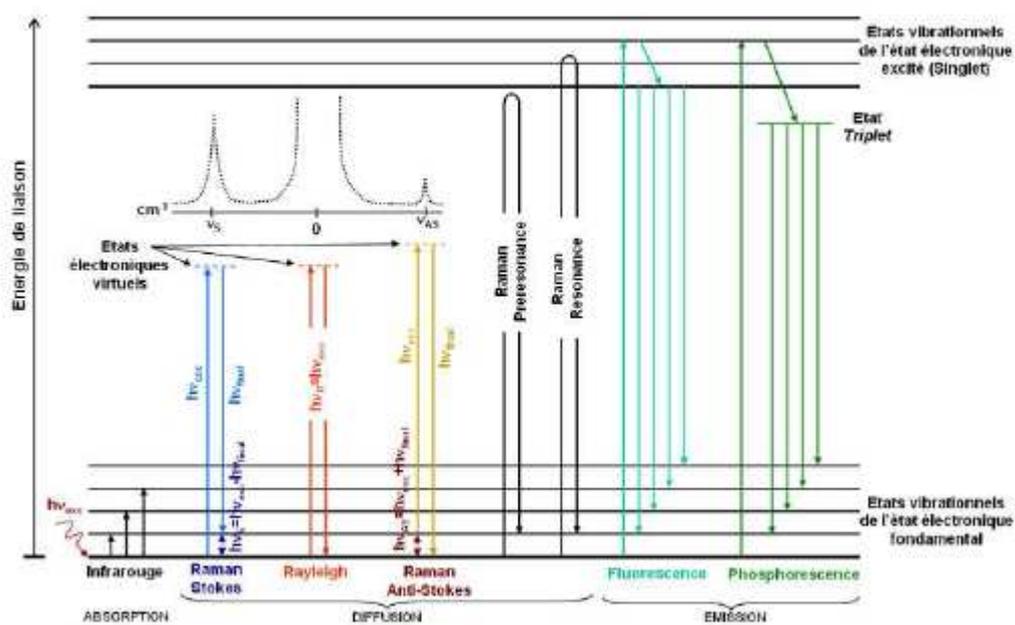


Figure 7 : Phénomène de fluorescence sur le diagramme de Jablonski(Jabłoński, 1935)

I.4.2. Les molécules fluorescentes : définition

Les molécules susceptibles de subir des transitions électroniques conduisant au phénomène de fluorescence sont appelées sondes fluorescentes, fluorochromes ou simplement

colorants. Quand le fluorochrome est lié à une macromolécule (acide aminé, lipide, enzymes ou protéine), on parle de fluorophore.

Les fluorophores constituent donc la base de la spectroscopie de fluorescence et représentent l'élément clé de cette méthode. Dans l'instrumentation pour la spectroscopie de fluorescence et dans l'analyse finale, la longueur d'onde et le temps de résolution nécessaire des instruments sont déterminés par les propriétés spectrales des fluorophores. En outre, les informations disponibles sur les expériences sont déterminées par les propriétés des sondes.

Les fluorophores sont généralement caractérisés par :

- Leurs longueurs d'onde: celles qui correspondent aux pics ou maxima des spectres d'excitation et d'émission,
- Leur coefficient d'extinction moléculaire qui relie la quantité de lumière absorbée, pour une longueur d'onde donnée, à la concentration du fluorophore en solution ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$),
- Leur rendement quantique défini par la quantité de photons émis par rapport à la quantité de photons absorbés,
- La durée de vie de leur état excité : c'est la durée caractéristique pendant laquelle la molécule reste à l'état excité avant de retourner à son état basal,
- L'aptitude au photoblanchiment: c'est à dire le phénomène résultant de réactions chimiques de la molécule sous état excité (par exemple avec l'oxygène sous forme de radicaux libres). Le fluorochrome perd alors ses propriétés de fluorescence. Autrement dit, quand on excite une solution de molécules fluorescentes, une certaine proportion d'entre elles est détruite à chaque instant et par conséquent l'intensité de fluorescence décroît au cours du temps. Ce phénomène peut être gênant, notamment en microscopie de fluorescence, mais il peut également être mis à profit pour mesurer la mobilité moléculaire par la méthode de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) ou de Perte de fluorescence au cours d'un photoblanchiment local (FLIP).

Les fluorophores sont des substances composées de plusieurs noyaux aromatiques conjugués ou encore des molécules planes et cycliques qui possèdent une ou plusieurs doubles ou triples liaisons conjuguées. Il en existe plusieurs milliers actuellement connus.

Les fluorophores sont couramment divisés en deux catégories selon leur origine : extrinsèques et intrinsèques (Lakowicz, 1999).

I.4.2.1. Fluorophores extrinsèques

Les fluorophores extrinsèques sont des molécules ajoutées à un échantillon choisi qui n'est pas fluorescent ou qui ne possède pas les propriétés spectrales souhaitées pour marquer spécifiquement un constituant de l'échantillon. Ces molécules peuvent être de nature hydrophile (solubles en milieu aqueux), hydrophobe (lipides: acides gras, phospholipides, stérols...) voire amphiphiles (petites molécules capables de s'échanger entre milieu aqueux et membranaire) (Lakowicz, 1999).

Le choix du fluorophore dépend, bien entendu, des objectifs et supports de l'expérimentation. A titre d'exemple, certains fluorophores capables de s'insérer dans diverses molécules de la cellule étudiée sont utilisés pour déterminer une activité enzymatique, le potentiel membranaire, le pH intracellulaire ou encore la viabilité des cellules (Larsen et al., 1996, Lebrun et al., 2001, Rapposch et al., 2000). D'autres fluorophores sont disponibles pour couplage avec des anticorps permettant ainsi la détection de molécules « marqueurs » au sein des cellules, les plus jolies applications concernant la détection précoce de cellules cancéreuses. Le marquage de protéines permet lui aussi l'analyse fine des phénomènes biologiques au niveau cellulaire et trouve de fascinantes applications dans le domaine médical. Il faut noter que l'ajout d'un ADNc codant pour un fluorophore à l'ADNc codant pour la protéine d'intérêt considérée est désormais possible conduisant à la construction de protéines chimères véritables traceurs de l'activité cellulaire (Zaccolo, 2004).

Le site <http://www.analytchem.tugraz.at/fluorophores/> présente une remarquable base de données des principaux fluorophores extrinsèques et de leurs utilisations potentielles.

I.4.2.2. Fluorophores intrinsèques

Les fluorophores intrinsèques sont ceux qui sont présents naturellement dans les échantillons biologiques. Ceux-ci incluent les acides aminés aromatiques, les purines, les pyrimidines, les flavines, la chlorophylle, certains cofacteurs enzymatiques comme le NADH, la riboflavine ainsi qu'un grand nombre de vitamines comme les vitamines A, E (Dufour et al., 2001, Herbert et al., 2000, Lakowicz, 1999). Les maximum d'excitation de ces fluorophores se situent entre 250-450 nm, alors que leur maximum d'émission se situent entre 280-700 nm (Cantor et Schimmel, 1980, Lakowicz, 1999).

Le tableau ci-après (Tableau 1) présente quelques fluorophores et leurs longueurs d'ondes d'excitation et d'émission.

Tableau 1: Quelques fluorophores et leurs longueurs d'ondes caractéristiques

Fluorophores intrinsèques	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)
Acides aminés		
Tryptophane	280	350
Tyrosine	275	300
Phénylalanine	260	280
Protéines structurales		
Collagène	325	400, 405
Elastine	290, 325	340, 400
Enzymes et coenzymes		
FAD, Flavines	450	535
NADH	290, 340	440, 460
NADPH	336	464
Vitamines		
Vitamine A	327	510
Vitamine K	390	480
Vitamine D	390	480
Composés dérivés de la vitamine B6		
Pyridoxine	332, 340	400
Pyridoxamine	335	400
Pyridoxal	330	385
Acide pyridoxique	315	425
Vitamine B12	275	305
Porphyries	400-450	630, 690

D'après (Ramanujam, 2000)

La détection de matériel biologique par la fluorescence est donc possible car il existe une large variété et une forte concentration de ces composants biologiques qui présentent une fluorescence intrinsèque.

Les recherches actuelles s'intéressent de plus en plus à utiliser la fluorescence pour étudier les tissus (Richards-Kortum et Sevick-Muraca, 1996), soit à partir des fluorophores intrinsèques ou de sondes extrinsèques ajoutées. La seule interrogation de la base données Medline pour les mots clés fluorescence spectroscopy fait état de 3426 articles publiés entre Mai 2008 et Mai 2009. Pour ne citer que cet exemple : le tryptophane et la tyrosine, les protéines structurales telles que le collagène ou l'élastine, ou enfin le NADH et le FAD ont été identifiés comme des marqueurs pertinents pour l'analyse du processus de carcinogénèse.

I.4.3. Recueil des données spectrales

La grande majorité des expériences de fluorescence est réalisée en solutions diluées dont l'absorbance est inférieure à 0,1 : c'est la fluorescence à angle droit (Lakowicz, 1999). Selon cette technique, le faisceau d'excitation traverse la cuve et les photons émis sont collectés perpendiculairement à la source d'excitation (A). Dans le cas où l'absorbance de l'échantillon est élevée, un effet d'écran se produit, induisant une diminution de l'intensité de fluorescence par le phénomène d'extinction (quenching) de fluorescence et une distorsion de spectres d'excitation (Genot et al., 1992a). Pour éviter ces problèmes, une dilution des échantillons est effectuée de sorte que l'absorbance des échantillons soit inférieure à 0,1. Pour analyser des échantillons opaques, la spectroscopie de fluorescence frontale peut être employée (Genot et al., 1992b). Dans ce cas, l'échantillon est examiné en surface, mais la pénétration des photons s'effectue sur plusieurs micromètres. Les photons émis sont généralement collectés sous un angle de 54° par rapport à l'échantillon afin de minimiser la collecte de photons réfléchis (B), figure 8.

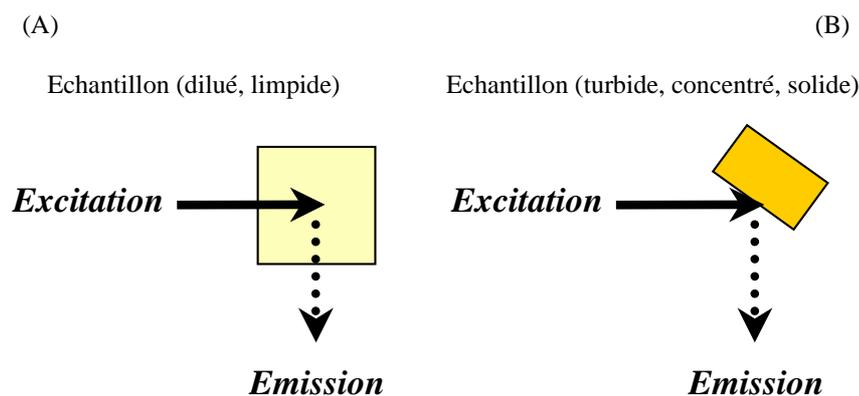


Figure 8 : Fluorescence à angle droit et fluorescence frontale

Quelle que soit la méthode utilisée, le spectromètre de fluorescence peut être équipé d'une fibre optique qui permet de déporter la mesure.

I.4.4. Les spectres de fluorescence

I.4.4.1. Les spectres d'émission et d'excitation en fluorescence

Les données de fluorescence sont généralement présentées sous forme de spectres (d'excitation ou d'émission) constitués de plusieurs centaines de points de mesure. Contrairement aux spectres IR, les spectres d'émission de fluorescence présentent souvent

une seule bande avec un seul maximum parfois accompagné d'un ou plusieurs épaulements. L'allure du spectre d'émission d'un fluorophore varie en fonction de la structure chimique de la molécule excitée mais également en fonction des caractéristiques physico-chimiques de son environnement proche. Les modes de traitement traditionnels des données spectrales en fluorescence reposent sur la seule détermination de l'intensité de fluorescence à la longueur d'onde correspondant au maximum d'émissions ou celle de la surface soutendue par le spectre (Lakowicz, 1999). De même peuvent être considérés l'observation des déplacements du maximum se produisant lorsque l'environnement du fluorophore est modifié. Les spectres d'excitation de fluorescence sont obtenus en observant à une longueur d'onde l'intensité émise en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Comme la longueur d'onde émise est proportionnelle au nombre de photons absorbés, les spectres d'excitation sont très proches, mais pas identiques, aux spectres d'absorption. Le spectre d'excitation représente l'efficacité de différentes longueurs d'ondes d'excitation à provoquer la fluorescence, et indique les longueurs d'ondes qui donnent des fluorescences intenses (Albani, 2007, Lakowicz, 1999).

I.4.4.2. Les Matrices d'excitation et d'émission de fluorescence ou fluorescence Totale.

Les matrices de fluorescence sont des cartes de fluorescence de l'ensemble des fluorophores d'un mélange. Elles permettent de caractériser plusieurs composés (ou fluorophores) dans un mélange. L'acquisition de ce type de graphe est faite généralement sur la base d'une série de spectres d'émission et d'excitation. L'expérimentation consiste à enregistrer les spectres d'émission à différentes longueurs d'onde d'excitation, puis à collecter ces données sur un diagramme en 3 dimensions, où l'on porte à la fois la longueur d'onde d'émission, la longueur d'onde d'excitation et l'intensité de fluorescence. Puis les points d'égale intensité sont reliés entre eux comme on le ferait pour des courbes de niveau. On obtient alors une carte de relief très caractéristique de l'échantillon étudié. Cependant, il faut noter que ce type d'acquisition présente plusieurs défauts : l'acquisition est lente à cause du balayage de longueur d'onde, le spectre de fluorescence totale ne peut être obtenu sans le traitement informatique adéquat, la précision en longueur d'onde se fait au détriment du temps. Cette méthode est donc peu utilisée dans les mesures de routine qui visent à caractériser rapidement un échantillon.

I.4.4.3. Les spectres de fluorescence par excitation synchrone

Une autre méthode relativement peu employée en spectroscopie classique permet d'adapter la technique à la complexité du milieu analysé. Il s'agit de la spectroscopie de fluorescence par excitation synchrone. Pour cette méthode, la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission varient simultanément, tout en conservant entre elles un décalage constant, $\Delta\lambda$ (Peuravuori et al., 2002, Taylor et Patterson, 1987). En pratique, on choisit une longueur d'onde d'émission (λ_{em}) de départ supérieure de quelques nanomètre à la longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}). Puis les deux monochromateurs se mettent en route et défilent à la même vitesse. Pour mieux comprendre la fluorescence synchrone, on peut se référer au diagramme de Jablonski Figure 9. Une molécule peut être excitée dans toute la plage d'absorption, par exemple, à partir des longueurs d'onde $\lambda_{ex1}, \lambda_{ex2}, \dots, \lambda_{ex9}$ et pourrait émettre la fluorescence aux longueurs d'onde $\lambda_{em1}, \lambda_{em2}, \dots, \lambda_{em9}$. Ainsi, en spectroscopie de fluorescence synchrone, l'émission à la longueur d'onde λ_{emi} n'est observée que lorsque le monochromateur d'excitation est placé sur la longueur d'onde λ_{exi} .

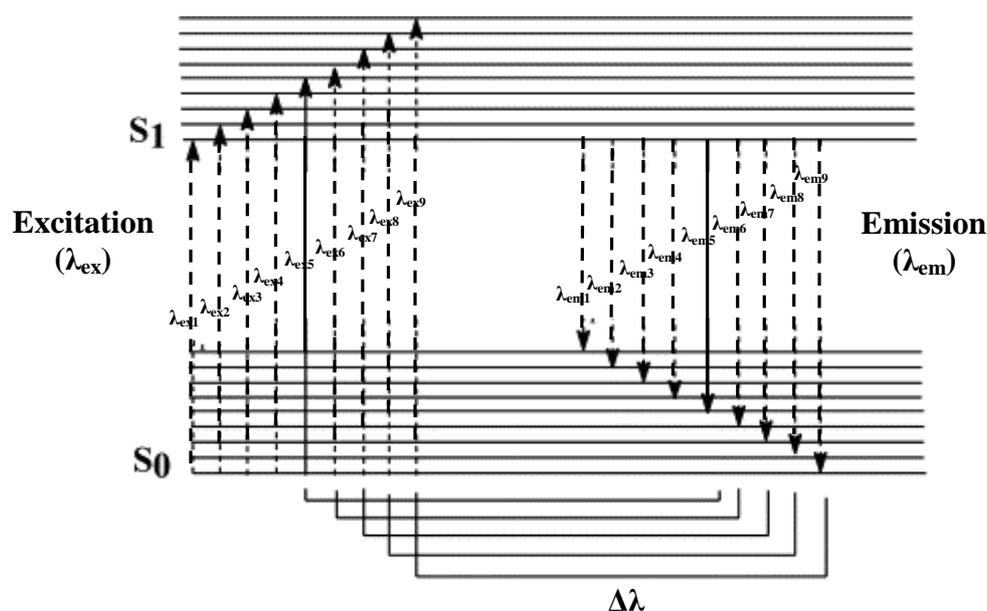


Figure 9 : Diagramme de Jablonski expliquant le balayage de fluorescence synchrone (Patra et Mishra, 2002) : $\Delta\lambda = \lambda_{emi} - \lambda_{exi}$ (i varie de 1 à 9).

Au contraire de fluorescence conventionnelle, la spectroscopie de fluorescence synchrone présente l'avantage de pouvoir caractériser plusieurs fluophores à partir d'un seul spectre. Cette méthode est simple à mettre en œuvre alors que les spectres sont recueillis en quelques secondes, elle constitue donc un bon compromis face à la spectroscopie de fluorescence

décrite précédemment (Andrade Eiroa et al., 2000, Reynolds, 2003, Taylor et Patterson, 1987, Vo Dinh, 1978).

La fluorescence synchrone, très développée dans les domaines de la chimie du pétrole (Cui et al., 2008, Patra et Mishra, 2002), demeure encore très peu utilisée dans le domaine biologique.

I.4.5. Chimiométrie

I.4.5.1. Prétraitement des données : Normalisation des spectres

Le prétraitement le plus communément appliqué aux spectres de fluorescence est la normalisation des spectres. Dans la plupart des applications de spectroscopie de fluorescence nécessitant un traitement numérique des signaux enregistrés, cette opération est réalisée. Cette normalisation a pour effet d'accorder à tous les spectres enregistrés la même importance informative (Bertrand et Scotter, 1992) c'est-à-dire de réduire les effets liés à l'intensité lors de l'application de techniques d'analyse multivariée. Par exemple, lors de l'enregistrement de matrices d'excitation-émission, l'intensité du laser excitateur, et donc l'intensité des rayonnements émis, et l'efficacité de l'optique d'excitation sont dépendantes de la longueur d'onde excitatrice. Une normalisation de la matrice d'excitation-émission corrige cette dépendance à la longueur d'onde excitatrice et annule les disparités d'intensité. La priorité est ainsi donnée à la forme des spectres et non à leurs intensités relatives.

I.4.5.2. Analyses multidimensionnelles des données

Les méthodes d'analyses multidimensionnelles sont des méthodes statistiques d'exploitation des données. Elles ont été développées pour faciliter l'interprétation et l'utilisation des tableaux de données qui contiennent un grand nombre d'individus et de variables. Pratiquées avec succès dans le domaine de la spectroscopie infrarouge depuis de nombreuses années, ces méthodes permettent d'extraire l'information pertinente et de conclure sur le niveau de signification statistique des faibles différences spectrales observées. Les mesures effectuées sur un ensemble d'individus se présentent sous la forme d'un tableau de n lignes et p colonnes $M(n, p)$. Chaque ligne représente un individu et chaque colonne une variable. Les méthodes d'analyses multidimensionnelles calculent de nouvelles variables c qui sont des combinaisons linéaires des variables d'origine.

I.4.5.2.1. Méthodes exploratoires

Les méthodes exploratoires ont comme objectif de décrire les données, sans d'introduire d'éléments de connaissances *a priori*. On peut ainsi disposer de moyens statistiques permettant de contrôler la validité de la mesure spectrale lors de l'analyse de série et s'assurer que les échantillons « inconnus » à analyser sont bien de même nature que ceux qui ont servi à la mise au point.

Analyse en Composantes Principales (ACP)

L'Analyse en Composantes Principales est une méthode statistique de projection de données multidimensionnelles, utilisée pour la réduction de la dimension de données. Cette méthode mise en place par Hotelling (Hotelling, 1933) est basée sur une technique décrite par Pearson (Pearson, 1901). La méthode s'appuie sur l'hypothèse selon laquelle il existe de fortes corrélations entre les données étudiées. Le but de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) est de condenser les données originelles en de nouveaux groupements, appelés nouvelles composantes ou composantes principales ; et orthogonales entre elles, de façon à ce qu'elles ne présentent plus de corrélation entre elles et soient ordonnées en terme de pourcentage de variance expliquée par chaque composante. Ainsi, la première composante contient les informations relatives au pourcentage maximal de variance, la deuxième contient les informations relatives au pourcentage de variance suivant. Le processus peut être répété jusqu'à l'obtention de la dernière composante. A l'aide de l'ACP, on peut souvent condenser la collection spectrale dans des proportions très importantes : dix à vingt composantes sont en général largement suffisantes pour résumer l'information utile, et la taille de la matrice des données peut être réduite par un facteur compris entre 10 et 100. L'analyse en composantes principales (ACP) est particulièrement adaptée à l'étude exploratoire des données spectrales. Elle permet une représentation synthétique et visuelle en cartes dites cartes factorielles ou cartes de ressemblance dans lesquelles chaque spectre est représenté par un point sur un graphique. Deux spectres présentant une similitude se placent à des positions voisines sur ces cartes. Les données condensées par l'ACP peuvent servir de variables de base à d'autres traitements statistiques tels que la régression ou l'analyse factorielle discriminante. Pour de nombreuses méthodes supervisées, l'orthogonalité des variables rend les calculs numériques très simples et plus fiables (Bertrand et al., 2006).

La Classification Hiérarchique Ascendante (CHA)

La classification hiérarchique ascendante fait partie des méthodes exploratoires de type classification. Ce sont des méthodes d'apprentissage non supervisées ayant pour but de segmenter la population étudiée en groupes, sans connaissance à priori d'une structure. La classification hiérarchique ascendante (CHA) consiste à procéder de manière séquentielle à des regroupements successifs des individus étudiés en classes emboîtées (Bertrand et al., 2006). Cette méthode produit une séquence complète de partition. Au sommet, on retrouve un grand nombre de classes et, à la base, l'individu étudié est représenté dans une classe unique. Les résultats peuvent alors être mis sous la forme de graphes, appelés dendrogrammes. Les individus sont donc regroupés selon leurs similitudes ou leurs dissimilitudes. Il existe différents types de calcul de distance (distance euclidienne, distance de Minkowski, coefficient de Pearson, etc...), et différentes méthodes d'agrégation (méthode de ward, distances moyennes entre groupes, etc ...).

I.4.5.2.2. Méthodes prédictives

Les méthodes prédictives ont comme objectif de prédire (ou estimer) à partir des données, les valeurs d'une ou plusieurs variables pour de nouveaux échantillons. Parmi ces méthodes, les méthodes de discrimination, appelées aussi « méthodes d'apprentissage supervisé », ont pour objet de mettre en relation une variable qualitative indiquant l'appartenance des individus à des groupes et un ensemble de variables quantitatives ; dans ce cas, la structuration de la population étudiée en groupes est connue a priori. La connaissance de l'appartenance des individus aux différents groupes est alors utilisée pour définir une règle d'affectation. Les méthodes d'analyse discriminante doivent être distinguées des méthodes de type classification « Méthodes de classification non supervisée » comme la classification hiérarchique, qui sont des méthodes d'apprentissage non supervisé ayant pour but de segmenter la population étudiée en groupes, sans connaissance a priori d'une structure. Les analyses discriminantes peuvent avoir plusieurs objectifs : prédire le groupe d'appartenance de nouveaux individus ou tester la significativité d'une partition donnée. Elles peuvent également avoir comme objectif de rechercher un sous-ensemble de variables afin d'obtenir une séparation des groupes la plus performante possible. La sélection d'un sous-ensemble de variables discriminantes permet d'une part la construction des modèles « économiques » et d'autre part de mieux cerner le rôle respectif de chacune des variables dans la discrimination.

La méthode la plus usuelle pour à la fois décrire et prédire est l'analyse factorielle discriminante (AFD) (Vigneau et al., 2006).

Analyse factorielle discriminante

L'analyse factorielle discriminante (AFD) répond à deux objectifs : le premier est de séparer au mieux les groupes d'individus identifiés au préalable à l'aide des p variables ; le second est d'affecter de nouvelles observations au groupe dont elles sont les plus proches. Elle a été introduite par Fisher en 1936 (Fisher, 1936) dans le cas particulier où il s'agit de discriminer deux groupes. L'approche intuitive de la méthode consiste à choisir des axes factoriels qui séparent au mieux les centres de gravité des groupes. Pour cela, les axes discriminants doivent restituer au mieux l'inertie du nuage de points formés par les centres de gravité des groupes. Par ailleurs, il est souhaitable que les projections des points correspondant aux observations d'un groupe donné soient les plus "concentrées" possible autour de leur centre de gravité afin d'éviter le recouvrement des groupes après projection. L'AFD permet de mettre en évidence les liaisons existantes entre un caractère à expliquer qualitatif et un ensemble de caractères explicatifs quantitatifs. Chaque individu est caractérisé par un ensemble de p variables quantitatives. Les individus sont également caractérisés par une variable qualitative qui définit leur appartenance à un groupe ou une classe d'individus. L'AFD va créer de nouvelles variables appelées "facteurs discriminants" qui seront des combinaisons linéaires des variables d'origine et qui permettent de séparer au mieux les groupes d'individus (Lebart et al., 1977). Les facteurs discriminants sont calculés de telle façon que :

- la variance à l'intérieur de chaque groupe soit minimale
- la variance entre les groupes soit maximale

Après le calcul des facteurs discriminants, les individus du jeu de validation peuvent être réaffectés aux différents groupes. Pour chaque individu, la distance qui le sépare des différents centres de gravité de chaque groupe est calculée. L'individu est affecté au groupe pour lequel cette distance est la plus courte. La comparaison du groupe d'affectation par rapport au groupe réel est un indicateur de la qualité de la discrimination des groupes. La qualité de la prédiction est estimée par comparaison des groupes d'affectations avec les groupes réels. Le pourcentage d'échantillons correctement classés est calculé en comptant le nombre d'échantillons correctement affecté et en comparant ce nombre au nombre total

d'échantillons. Un tableau d'affectation des échantillons permet d'indiquer les groupes les mieux discriminés et les confusions entre les groupes. Comme pour l'ACP des cartes de ressemblances peuvent être dessinées à partir des facteurs discriminants et des profils spectraux sont associés aux facteurs discriminants (Karoui et al., 2003, Vigneau et al., 2006).

I.5. La spectroscopie de fluorescence et ses applications dans le domaine de la microbiologie

Dans le domaine de la microbiologie, la spectroscopie de fluorescence a, à l'heure actuelle, trouvé trois types d'applications : la détection voire la quantification des micro-organismes, la caractérisation des micro-organismes à des fins taxonomiques et l'analyse de la physiologie ou du métabolisme microbien.

I.5.1. Les fluorophores

Les analyses qui s'appuient sur la fluorescence intrinsèque des cellules concernent en général les fluorophores que sont certains acides aminés aromatiques, les acides nucléiques, les co-enzymes NADH (Forme réduite du coenzyme Nicotinamide Adénine Dinucléotide), NADPH (Forme réduite du coenzyme Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate), FAD (Flavine Adénine Dinucléotide), les flavines et quelques métabolites secondaires produits par les bactéries durant leur croissance (Estes et al., 2003, Glazier et Weetall, 1994, Nealson et Hastings, 1979).

Les chaînes latérales de trois acides aminés sont fluorescentes, il s'agit du tryptophane, de la tyrosine et phénylalanine (Lakowicz, 1999). Leurs spectres d'absorption et d'émission sont présentés sur la figure 10,11. A une longueur d'onde d'excitation inférieure à 280 nm, les trois acides aminés peuvent être excités (Lakowicz, 1999). De 280 à 295 nm, la tyrosine et le tryptophane sont fluorescents, mais le transfert d'énergie de la tyrosine au tryptophane est envisageable. Aux longueurs d'onde d'excitation supérieures à 295 nm seulement le tryptophane est fluorescent.

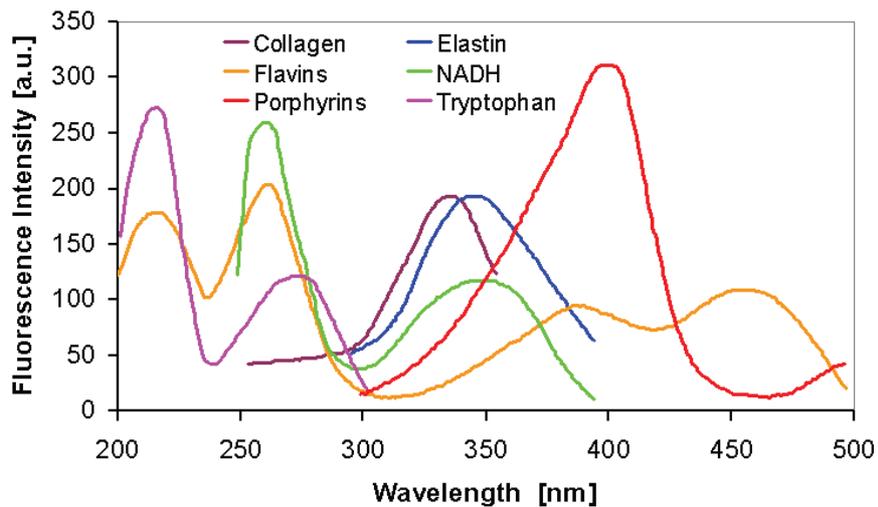


Figure 10 : Spectres d'absorption de quelques fluorophores

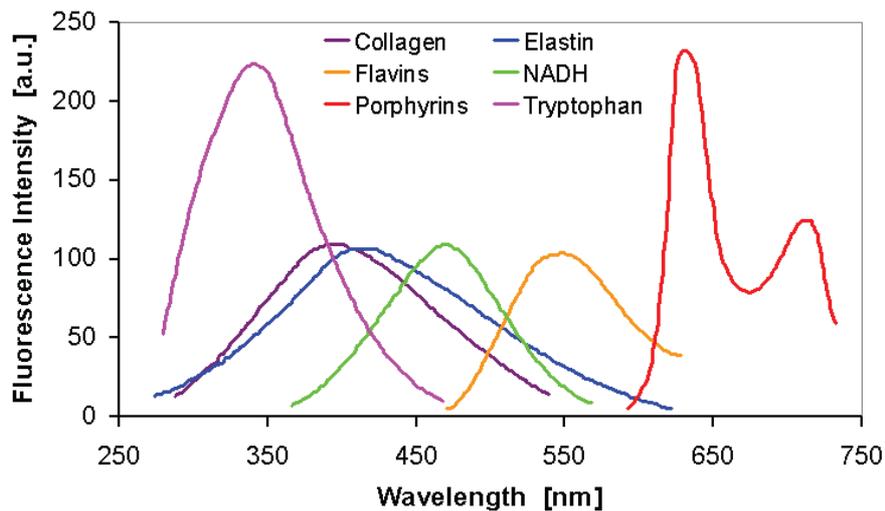


Figure 11 : Spectres d'émission de quelques fluorophores Adapté de G. Wagnières, et al.(Wagnières et al., 1998)

Le groupement indole des résidus de tryptophane est la principale source d'absorption et d'émissions des protéines. Mais la tyrosine est également un marqueur intéressant car son émission est souvent masquée (quenched), par interaction avec la chaîne peptidique ou transfert d'énergie au tryptophane. Ainsi la dénaturation des protéines se traduit souvent par une augmentation des émissions de tyrosine. Les émissions provenant de la phénylalanine ne sont observées que si l'échantillon de protéines ne présente pas des résidus de tyrosine et de tryptophane, ce qui est un événement rare (Lakowicz, 1999).

Le NADH et le FAD sont des coenzymes métaboliques ; leurs intensités de fluorescence (proportionnelles à leurs concentrations) sont donc étroitement liées à l'activité métabolique

des cellules étudiées. Le NADH présente une forte fluorescence avec des maxima d'absorption et d'émission respectivement à 340 et 450-475 nm alors que la forme oxydée du NADH, le NAD^+ , est non fluorescente. Il faut cependant noter que le NADPH présente des spectres d'absorption et d'émission similaires à celui du NADH pouvant induire une confusion mais les concentrations cellulaires en NADPH sont généralement très faibles par rapport à celles en NADH. Les autres composants moléculaires tels que les flavoprotéines le FAD ou les cytochromes présentent des spectres d'absorption et d'émission dans les mêmes régions, mais leurs concentrations sont inférieures d'un facteur 10 à 100. Ainsi, la NADH constitue « Le » marqueur d'activité métabolique de choix pour l'analyse de l'activité respiratoire et métabolique des micro-organismes (Estes et al., 2003, Kierdaszuk et al., 1996, Luong et Mulchandani, 1990).

Les 4 bases constitutives des acides nucléiques que sont l'adenine, la guanine, la cytosine et l'uracile présentent une fluorescence exploitable pour l'étude des cellules procaryotes (Lakowicz, 1999). Leurs maxima d'absorption se situent respectivement à 260, 275, 267 et 260 nm, tandis que leurs maxima d'émission se situent aux longueurs d'onde de 321, 329, 313 et 308 nm respectivement. Ils sont rarement utilisés en tant que marqueurs individuels si ce n'est dans les études visant à mettre en évidence la présence de cellules vivantes dans ou sur des matrices inertes. Les spectres d'absorption ou d'émission du complexe dit « acides nucléique » sont néanmoins exploités dans les études visant la caractérisation des bactéries à des fins taxonomiques.

Enfin, certains composants spécifiques fluorescents peuvent également être exploités. A titre d'exemple, le complexe acide dipicolinique/ Ca^{2+} a été utilisé pour différencier la forme sporulée de la forme végétative de cellules de *Bacillus* (Estes et al., 2003, Powers et al., 2005, Powers et Lloyd, 2004).

I.5.2. Détection ou caractérisation des micro-organismes à des fins taxonomiques

Dès 1985, W. H. Nelson (Nelson, 1985) avait présenté la spectroscopie de fluorescence comme une méthode prometteuse pour l'identification rapide des micro-organismes mais il a fallu attendre les années 2000 et l'émergence de méthodes chimiométriques pour que l'exploitation statistique des spectres de fluorescence autorise la différenciation des micro-organismes à l'échelle du genre, de l'espèce voire de la sous espèce. Dans le paragraphe ci-après, sont présentés les principaux travaux publiés en ce sens.

En 2006, H. Bhatta et ses collaborateurs (Bhatta et al., 2006) ont montré que la différenciation des levures et bactéries était possible par comparaison des spectres d'excitation et d'émission de fluorescence. Dans cette étude, les auteurs se sont appuyés sur 4 souches de *Saccharomyces* (3 *S. cerevisiae* et 1 *S. pastorianus*) et 1 souche de *Lactobacillus casei* cultivées en milieu liquide durant 24, 48 et 72 heures. Les spectres d'excitation ont été enregistrés entre 200 et 320 nm pour une émission à 340 nm et les spectres d'émission ont été recueillis entre 310 et 420 nm après excitation à 290 nm. Les spectres ont été recueillis sur cellules préalablement débarrassées de leur milieu de culture, lavées puis reprises en eau distillée stérile.

La différenciation entre levures et bactérie lactique a été optimale sur des cellules ayant 24 heures de croissance et pour la région 340-460 nm des spectres d'émission soit pour le fluorophore intrinsèque qu'est le tryptophane.

La différenciation des levures entre elles était correcte pour des cellules cultivées 24 ou 72 heures mais médiocre après 48 heures. Par analyse en composantes principales, 2 des levures de *S. cerevisiae* étaient peu distinguables, mais tout de même distinctes de l'autre *S. cerevisiae* et de *S. pastorianus*. La différenciation optimale était observée dans la région proche ou inférieure à 310 nm du spectre d'excitation.

Leblanc et Dufour (Leblanc et Dufour, 2002) se sont, pour leur part, attachés à différencier 25 souches de collection réparties en 1 *L. lactis ssp. cremoris*, 1 *P. pentocaseus*, 1 *K. varians*, 1 *P. fluorescens*, 1 *L. innocua*, 5 *Lactobacillus* d'espèces différentes, 1 *L. sakei*, 6 *S. carnosus*, et 7 autres *Staphylococcus* d'espèces différentes. L'analyse a été menée sur des suspensions de cellules préalablement cultivées sur milieu gélosé puis concentrées et lavées en eau distillée. Les spectres d'émission de fluorescence ont été recueillis entre 305 et 400 nm par excitation à 270 nm (résidus tryptophane), entre 280 et 480 nm après excitation à 250 nm (acides nucléiques et acides aminés aromatiques) et entre 380 et 550 nm après excitation à 316 nm (NADH). Une très bonne reproductibilité des spectres pour une même souche a été observée. D'autre part, quel que soit le fluorophore utilisé, le pouvoir discriminant a été avéré pour la discrimination des souches au niveau du genre, de l'espèce et même de la sous-espèce.

En s'appuyant sur un protocole similaire (mêmes fluorophores excités et recueil des données d'émission aux mêmes longueurs d'onde), S. Ammor et ses collaborateurs (Ammor et al., 2004) se sont intéressés à la discrimination de 20 souches de collections appartenant au

groupe des bactéries lactiques réparties en 9 *Lactobacillus*, 2 *Carnobacterium*, 2 *Weissella*, 1 *Leuconostoc*, 1 *Pediococcus*, 2 *Enterococcus*, 2 *Lactococcus* et 1 *Vagococcus* (dans chaque genre plusieurs espèces taxonomiquement proches ou éloignées étaient incluses). Par analyse factorielle discriminante, les pourcentages de classification correcte au niveau du genre ou de l'espèce ont varié de 89 à 98 % en utilisant Le FAD ou le NADH comme fluorophore, mais 100 % de classification correcte ont été obtenus en utilisant les acides aminés aromatiques + acides nucléiques comme fluorophores. Ce résultat est surprenant dans la mesure où les auteurs avaient pris la précaution de « synchroniser » les cultures bactériennes en début de phase exponentielle avant analyse. Pour parfaire leur étude, les auteurs ont testé leur modèle sur 29 isolats d'ateliers préalablement identifiés phénotypiquement. Entre 92 et 100 % de classification correcte ont été obtenus confirmant les potentialités de la méthode pour la discrimination de bactéries au niveau du genre, l'espèce ou la sous-espèce.

Plus tard S. Ammor (Ammor et al., 2007) confirmait la pertinence de cette méthode en s'appuyant sur la fluorescence produite par les acides aminés aromatiques et acides nucléiques (par excitation à 250 nm et recueil des spectres d'émission entre 208 et 480 nm) pour caractériser 53 isolats de *Bifidobacterium* par comparaison avec 9 souches de collection appartenant au même genre et 3 non-bifidobacteria comme témoins négatifs. Pour cette étude, les bactéries étaient d'abord cultivées jusqu'en phase stationnaire en bouillon nutritif puis centrifugées, lavées plusieurs fois en tampon HEPES et enfin resuspendues dans le même tampon. Dans ces conditions, 100% de classification correcte était observé au niveau de l'espèce et de la sous-espèce. Pour ces bactéries anaérobies strictes, l'utilisation des fluorophores NADH ou FAD n'était pas apparue pertinente. L'auteur précisait par ailleurs que les spectres de fluorescence des acides aminés et acides nucléiques recueillis n'étaient pas affectés par l'état physiologique (stade de croissance) des populations analysées (Ammor et al., 2007, Ammor et al., 2004).

En 2003, Giana et ses collaborateurs (Giana et al., 2003) avaient entamé une démarche similaire en analysant par spectroscopie de fluorescence, 60 isolats hospitaliers répartis en 20 *Escherichia coli*, 20 *Enterococcus faecalis* et 20 *Staphylococcus aureus* (identifiés par méthodes phénotypiques). Les suspensions bactériennes (sans précision sur les modalités de préparation) ont été analysées au moyen de matrices d'excitation /émission de fluorescence en faisant varier l'excitation entre 330 et 510 nm. Les auteurs ont obtenu 100 % de classification correcte pour les *E. coli* et *E. faecalis* et seulement 10% d'erreur pour *S. aureus* (positionnés

en *E. faecalis*). Par ailleurs, les auteurs ont précisé que les régions spectrales les plus discriminantes sont celles comprises entre 410 et 430 nm alors que l'excitation à une seule longueur d'onde n'apportait aucune discrimination pertinente.

Toujours en 2003, H.Y Mason sous l'égide de L. Powers (Mason et al., 2003) développait un protocole original basé sur une étape préalable de fixation des bactéries sur lame de verre avant analyse. Dans l'étude présentée, 50 souches de collection différentes représentatives des espèces pathogènes pour l'homme étaient d'abord cultivées jusqu'en milieu de phase exponentielle puis centrifugées 2 fois (afin d'éliminer le milieu de culture et ses métabolites) avant d'être resuspendues en milieu minimum et adsorbées via un ligand spécifique sur plaques de verre et enfin lysées par action du lysozyme. La fluorescence du NADH/NADPH était alors enregistrée. Cette méthode ne permettait pas l'identification des bactéries en tant que telle, mais conduisait au dénombrement spécifique de groupes (ici genre) bactériens au sein de mélanges complexes, et un avec un seuil de détection de l'ordre de 20 à 50 cellules.

Cette même équipe de chercheurs s'attache d'ailleurs, à développer des méthodes innovantes basées sur la spectroscopie de fluorescence pour la détection et la quantification spécifique des micro-organismes (et de spores) en temps réel. Ces auteurs ont déposé plusieurs brevets en ce sens (Estes et al., 2003, Powers et al., 2005, Powers et Lloyd, 2004).

La seule étude s'appuyant sur l'utilisation de fibre optique pour une analyse bactérienne in-situ est décrite ci-après. Il s'agit d'une étude menée par B.C Spector et ses collaborateurs en 2000 : 14 Chinchilla se sont vus contaminés artificiellement et en aveugle par une souche de collection de *H. influenzae* ou de *S. aureus* ou de *S. pneumoniae*. Pour chaque animal une seule oreille était contaminée. Après 24 à 48 heures d'infection, les oreilles de l'animal étaient examinées par fibre optique reliée au spectromètre. Les spectres de fluorescence étaient enregistrés entre 265 et 565 nm après excitation entre 250 et 550 nm. Bien que le temps d'acquisition des spectres ait été long (environ 40 minutes par oreille), les auteurs ont finalement réussi à identifier correctement tous les échantillons, laissant entrevoir les potentialités de cette technique pour un diagnostic rapide de l'infection auriculaire chez le chinchilla ! (Spector et al., 2000).

I.5.3. Mesure d'activité microbienne et métabolisme

La spectroscopie de fluorescence et ses différentes déclinaisons (non présentées ici) a été largement exploitée pour caractériser l'activité métabolique de populations microbiennes

cultivées en conditions contrôlées ou au sein de matrices complexes. Ainsi, à titre d'exemple, l'activité dénitrifiante d'une souche de *P.aeruginosa* cultivée sous différentes conditions a pu être évaluée par mesure de la fluorescence. La mesure a porté sur l'évaluation de la concentration intracellulaire en NAD(P)H, par excitation des suspensions bactériennes dans la région de 340 ± 20 nm et mesure de l'émission entre 400 et 480 nm (Chen et al., 2003). En s'appuyant sur le même fluorophore, S.C.W. Kwong et G. Rao ont développé un intéressant système de mesure en ligne permettant de suivre en continu l'activité fermentaire de souches de *Corynebacterium glutamicum* cultivées en fermenteur (Kwong et Rao, 1994). Leblanc et Dufour (Leblanc et Dufour, 2002) ont également mis en évidence la sensibilité de la méthode pour évaluer le statut physiologique de bactéries cultivées en milieu liquide. Pour 3 espèces bactériennes, à savoir, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus carnosus* et *Escherichia coli*, l'analyse comparée des spectres d'émission de tryptophane ($\lambda_{exc}=270$ nm, $\lambda_{emi}=305-400$ nm) ou des acides aminés aromatiques + acides nucléiques ($\lambda_{exc}=250$ nm, $\lambda_{emi}=280-480$ nm) a permis de différencier la croissance en phase de latence, phase exponentielle et phase stationnaire.

La fluorescence intrinsèque des cellules a également été utilisée par plusieurs auteurs pour évaluer l'effet de biocides sur différentes populations bactériennes. Ainsi, la fluorescence du tryptophane collectée entre 300 et 500nm après excitation à 275 nm a permis à A. Alimova et ses collaborateurs (Alimova et al., 2005) d'évaluer l'efficacité de l'eau de javel et du peroxyde d'hydrogène sur des populations de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* sous forme planctonique. La quasi disparition de fluorescence du tryptophane signalait la destruction des structures protéiques donc la destruction des bactéries tandis que le déplacement du pic (maximum) de fluorescence de ce même tryptophane observé pour *S. aureus* soumis au peroxyde d'hydrogène confirmait la résistance de cette bactérie à l'agent oxydant. De la même façon, Ammor et col. (Ammor et al., 2006) ont examiné les cinétiques d'absorption de la tétracycline chez 35 souches de *Bifidobacterium longum* isolées du tractus gastro-intestinal humain par spectroscopie à fluorescence. L'utilisation de méthodes descriptives et discriminantes a permis une excellente distinction entre les souches susceptibles, semi-résistantes et résistantes. En 2006, Wang et ses collaborateurs s'appuyaient sur un protocole similaire pour évaluer l'effet de l'iodure de potassium sur la croissance d'une population d' *Escherichia coli* (Wang et al., 2006). Dans cette étude, la diminution de l'intensité de fluorescence du tryptophane ($\lambda_{exc}=280$ nm, $\lambda_{emi}=350$ nm) et du NADH ($\lambda_{exc}=350$ nm, $\lambda_{emi}=430$ nm) était

interprétée comme un blocage de la synthèse protéique et du métabolisme respiratoire sous l'action d'une concentration définie de KIO_3 .

I.6. Conclusion

Les spectroscopies optiques s'appuient sur l'interaction entre les rayonnements et les molécules et les modifications énergétiques induites qui sont caractéristiques de la structure moléculaire ou de toute modification liée à un procédé chimique, énergétique ou dynamique (Lakowicz, 1999).

La spectroscopie de fluorescence est une méthode rapide et une des méthodes d'analyse les plus sensibles et les plus sélectives ; elle fournit des informations sur la présence de certaines molécules présentant des doubles liaisons conjuguées (fluorophore) et sur leur environnement dans les échantillons (Marangoni, 1992). Elle permet d'obtenir des informations sur un grand nombre de molécules. Cette technique a été largement et est toujours exploitée pour étudier les structures moléculaires et leurs fonctions dans les domaines de la chimie et de la biochimie. Les applications dans le domaine de la microbiologie ont été décrites dès 1950 (Sambursky, 1948) mais il a fallu attendre le milieu des années 80 (Bronk et Reinisch, 1993, Nelson, 1985) et l'apparition des méthodes chimiométriques pour que l'analyse et la comparaison des données contenues dans les spectres d'excitation et d'émission soient possibles (Brahma et al., 1985, Meglen, 1988).

Il existe aujourd'hui de nombreuses déclinaisons de la spectroscopie de fluorescence qui, à titre expérimental, visent à l'analyse de fonctions spécifiques de certains micro-organismes. Mais concernant la caractérisation des micro-organismes à des fins taxonomiques, très peu d'études ont été publiées à ce jour, même si les travaux initiés sont fortement encourageants quant aux potentialités de cette technique qui ne requière pas d'additif ou réactifs coûteux.

II. Pseudomonads

II.1. Généralités

Les bactéries appartenant au groupe des Pseudomonads (c'est à dire présentant des caractéristiques phénotypiques communes à celles couramment décrites pour les *Pseudomonas* stricto-sensu) sont le sujet de nombreuses études depuis plusieurs décennies. Certaines d'entre elles sont des microbes pathogènes importants pour les plantes, les fungi, les animaux et même l'humain (Lyczak et al., 2000) tandis que d'autres présentent un fort potentiel en tant qu'agents de biocontrôle (Weller, 2007) ou à des fins de bioprotection des cultures et productions végétales (Mark et al., 2006, McSpadden Gardener, 2007). Tout le long des chaînes d'approvisionnements alimentaires, la généralisation de rapport au froid a favorisé la prédominance d'un certain nombre de ces bactéries psychrotrophes. Elles représentent maintenant la flore principale impliquée dans la détérioration des produits à base de viande, de lait et de légumes pendant le stockage aérobie, et sont responsables des pertes économiques considérables.

II.2. Principales caractéristiques phénotypiques du groupe.

(D'après Le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology- Volume Two – The Gammaproteobacteria, 2nd edt)

Le groupe des Pseudomonads renferme des bacilles à Gram négatif, droits ou légèrement incurvés, de 0,5 à 1,0 μm de diamètre sur 1,5 à 5,0 μm (ou plus) de longueur, non sporulés, le plus souvent dépourvus de granules de poly-bêta-hydroxybutyrate (quelques souches de *P. pseudoalcaligenes* et *P. corrugata* accumulent de l'acide poly-bêta-hydroxybutyrique comme matériel de réserve en fin de croissance exponentielle). Ces bactéries sont très généralement mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires même si certaines espèces telles que *P. mendocina* ou *P. stutzeri* présentent également des flagelles latéraux dans certaines conditions de culture.

La grande majorité d'entre elles produisent des sidérophores (pyocianine, pyorubine, chlororaphine, oxiphenazine), macromolécules chélatrices des ions ferriques qui sont synthétisées en réponse à une carence en fer du milieu de culture. Certaines de ces molécules sont souvent considérées comme caractéristiques d'espèce telles la pyocanine, pigment vert-bleu de *P. aeruginosa*, la chlororaphine verte de *P. chlororaphis* ou la phenzine-

monocarboxilique caractéristique de *P. aureofaciens*. Il faut également préciser que certaines espèces telles que *P. stutzeri*, bien que dépourvues de pigment, forment des colonies qui deviennent marron foncé au cours de leur vieillissement par l'accumulation de cytochrome c oxydase dans les cellules

Ces bactéries sont aérobies, à métabolisme strictement respiratoire. Toutefois certaines espèces sont capables de se multiplier en conditions anaérobies par utilisation des nitrates comme accepteur final d'électrons ou par hydrolyse de l'arginine via le système dit de l'arginine dihydrolase. Dans leur grande majorité, les bactéries de ce groupe sont chimio-organotrophes, catalase positive, oxydase variable, non indologènes, et ne produisent pas d'acétoïne. Mais leur caractéristique majeure reste la diversité et pluralité des substrats carbonés qu'elles sont capables d'utiliser et leur richesse en enzymes hydrolytiques (protéases, lipases, estérases...).

Nombre de ces bactéries présentent un caractère psychrotrophe avec une température minimale de croissance voisine de 4°C et une température optimale de l'ordre de 28°C, tout en étant incapables de se multiplier à des températures supérieures à 35°C. (la croissance de certaines souches à des températures voisines de 45 °C a cependant été observée). Dans leur grande majorité, elles sont incapables de pousser à un pH inférieur à 4,5. Enfin, peu de données précisent la valeur d'AW limitée pour leur développement, mais leur présence dans des milieux à très haute concentration en sel a été souvent observée (données personnelles).

Pour conclure sur les caractéristiques générales des bactéries du groupe Pseudomonad, il convient de mentionner l'originale « fluidité » de leur génome. Celui-ci, qui est de grande taille, est riche de nombreuses séquences répétées favorisant les recombinaisons internes, mais aussi, le transfert facilité de gènes inter et intra espèces séquences régulatrices. Il s'accompagne d'une grande diversité de plasmides leur conférant, dans des circonstances définies, des propriétés de résistance à de nombreux et divers antibiotiques, de résistance à certains agents chimiques et physiques (molécules couramment biocides, sels de bore, de chrome et métaux lourds, ultraviolets...), de résistance aux bactériophages et à certaines bactériocines.

Le remarquable potentiel génétique et physiologique adaptatif de ces bactéries est, selon A.J. Spiers (Spiers et al., 2000) responsable de la distribution universelle de ces espèces dans environnements naturels et élaborés. Effectivement, leur présence a été mise en évidence dans

les sols et la rhizosphère de divers végétaux, dans des eaux douces ou marines et même dans les nuages. Ils sont présents dans la flore intestinale de l'homme et des animaux, et peuvent contaminer les denrées alimentaires et même les préparations pharmaceutiques pourtant dépourvues d'éléments nutritifs facilement métabolisables.

II.3. Taxonomie et phylogénie

II.3.1. Généralités

C'est en 1673 qu'Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723) fut le premier à observer les bactéries qu'il appela animalcules. En 1774, dans son article intitulé "Vermium terrestrium et fluviatilium, seu Animalium Infusodorum, Helminthicorum et Testaceorum, non marhorum, suzhcta", Otto Frederik Müller (Müller, 1774) publie ce qui semble être la première description d'une bactérie. Cet auteur désigne sous le nom de *Monas* des micro-organismes mobiles en forme de bâtonnet et sous le nom de *Vibrio* les micro-organismes mobiles de forme spiralée. Le genre *Monas* était en fait très hétérogène car il renfermait à la fois des organismes eucaryotes et des organismes procaryotes. En 1894, Migula proposa le genre *Pseudomonas* pour classer les bactéries initialement incluses dans le genre *Monas*. En 1895, Migula inclut dans le genre *Pseudomonas* des bactéries possédant une ciliature monotriche ou multitriche dont l'espèce "*P. pyocyaneae*" (aujourd'hui *P. aeruginosa*). Petit à petit, furent classées dans ce genre, toutes les bactéries à Gram négatif et à métabolisme non fermentaire. En 1975, la huitième édition du "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" recensait 294 espèces, le genre était alors un genre « fourre-tout ».

II.3.2. Approche génotypique

(Cette partie concerne l'approche phylogénétique et/ou classification de la taxonomie, les travaux présentés portent principalement sur des souches de référence)

Remarque préalable : ce paragraphe n'a pas prétention de présenter une liste exhaustive des études relatives à l'analyse génétique de la phylogénie des Pseudomonads, mais plutôt un regard sur l'évolution de la taxonomie et des méthodes associées.

Une équipe de chercheurs de l'Université de Berkeley (Californie) dirigée par Doudoroff et Palleroni avait initié, dès le milieu des années 60, une étude étendue sur la caractérisation de ces bactéries en s'appuyant notamment sur la mesure du contenu en G+C évaluée par le ratio de la quantité des nucléotides guanine et cytosine sur la quantité totale de nucléotides, autrement dit par le G + C %. Ce critère était et est d'ailleurs toujours considéré comme un

indicateur taxonomique intéressant ; une similitude d'au moins 90 % semblant significative d'appartenance à un même genre. Chez les procaryotes le pourcentage de G+C peut varier de 25% (*Mycoplasma capricolum*) à 75% (*Micrococcus luteus*); chez les *Pseudomonas* il varie entre 59 et 68%. Cette méthode permet, par exemple, de confirmer l'écartement du genre *Pseudomonas* des espèces du genre *Burkholderia* (G+C % de 64 à 68 %), du genre *Ralstonia* (G+C de 62 à 70 %), du genre *Acidovorax* (G+C de 62 à 67 %) ou du genre *Comamonas*, (G+C de 65 à 67%). Mais comme le signalait plus tard Palleroni (Palleroni, 1984, Palleroni et Moore, 2004), bien que les différences sensibles dans le G+C% soient susceptibles de différencier des taxons, des contenus similaires en G + C n'indiquent pas nécessairement la parenté.

Quoi qu'il en soit, le démantèlement du genre *Pseudomonas* décrit en 1976 par R.Y. Stanier (Stanier, 1976) ne faisait que débiter.

À partir de 1968, les tests d'hybridation ADN-ADN ont été décrits (Johnson et Ordal, 1968), conduisant au regroupement de souches présentant des caractères génotypiques similaires en genomovars: étaient considérées comme appartenant à un même genomovar, des souches présentant plus de 70% d'homologie ou moins de 5°C de différence pour la température de dénaturation (ΔT_m) de leur ADN. Appliquée aux *Pseudomonas*, cette méthode confirma les classifications phénotypiques puisque les espèces incluses dans un groupe étaient liées entre elles par des homologies de leur ADN alors qu'elles ne présentaient pratiquement aucune homologie avec les souches des autres groupes (Swings et al., 1983).

Ultérieurement, Doudoroff et Palleroni ont utilisé des tests d'hybridation ADN-ARN dont les premiers résultats ont été présentés par Stanier lors du "Congrès de Microbiologie Générale" de Mexico (1971). Comme le soulignait R.Y. Stanier en 1976, il était tentant d'accorder à chaque groupe d'homologie de l'ARN ribosomal le rang d'un genre, sinon d'une famille bactérienne. Doudoroff et Palleroni n'ont pas franchi ce pas car les espèces d'un même groupe étaient tellement diverses qu'il était difficile de trouver des caractères phénotypiques permettant de les différencier des autres groupes.

Néanmoins, c'est bien en s'appuyant sur les études de l'hybridation ARNr-ADN que Palleroni et ses collaborateurs (Palleroni, 1973) ont pu subdiviser le genre *Pseudomonas* en cinq groupes d'homologie des ARNr (les groupes ARNr I à V) entre lesquels l'éloignement génétique était aussi grand que l'éloignement génétique de chacun de ces groupes vis-à-vis

des entérobactéries ; ils posèrent alors les bases de la taxonomie « moderne » des *Pseudomonas* et des flores apparentées.

La figure 12 présente les résultats tels qu'ils apparaissaient dans son article « Nucleic Acid Homologies in the genus *Pseudomonas* » daté de 1973.

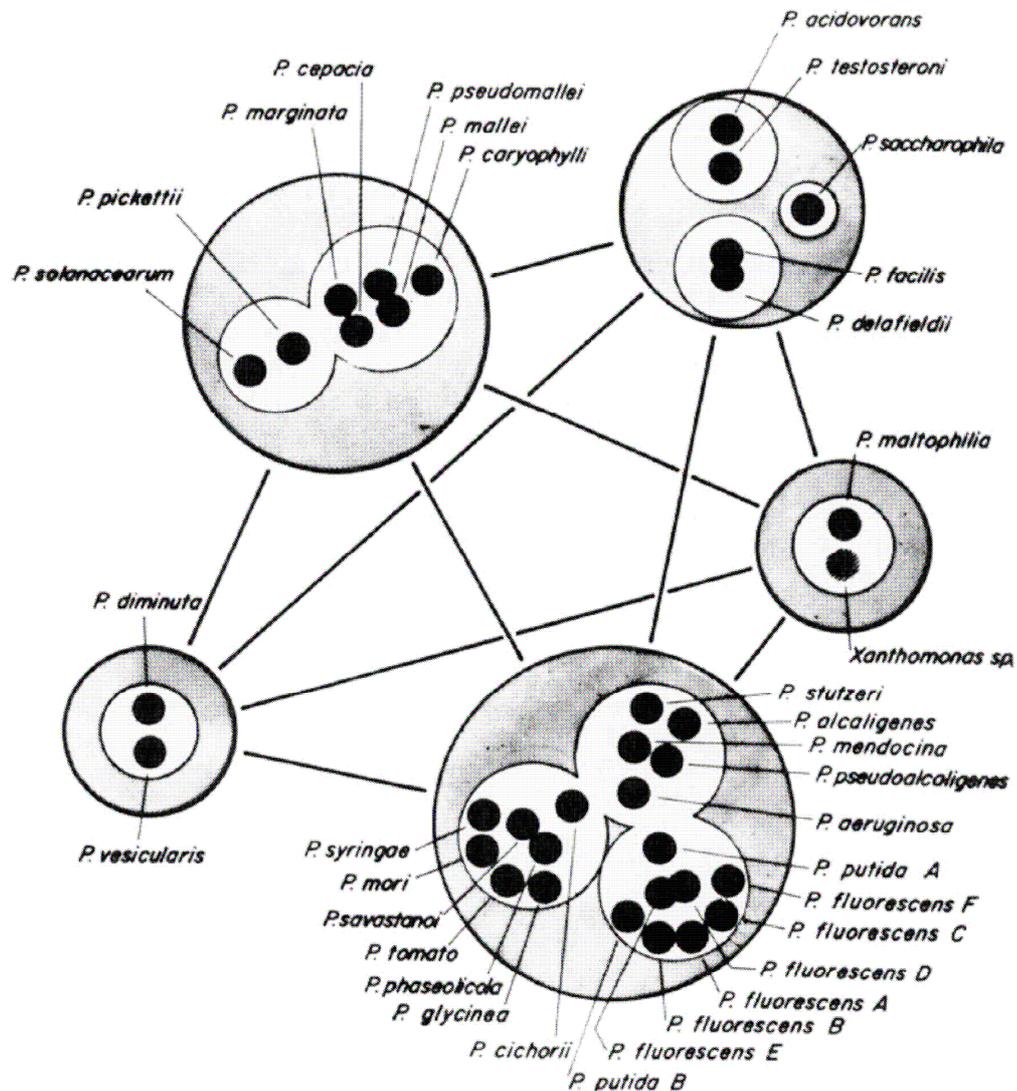


Figure 12 : Les espèces de *Pseudomonas* et biotypes organisées sur la base des recherches d'homologies au niveau des ADN et ARN ribosomiaux. Les cercles ombrés représentent les groupes d'homologie ARNr (Palleroni, 1973)

Durant les années qui suivirent, l'analyse de ces différents groupes se poursuivit et des précisions furent apportées, grâce notamment aux analyses basées sur la comparaison de séquences des ARN 16S (De Ley, 1992, De Vos et De Ley, 1983, De Vos et al., 1985, De Vos et al., 1989).

Les 5 groupes d'homologie précités comprenaient en fait des espèces largement distribuées au sein des *Proteobacteria*. Dans la revue qu'il publia en 1996, Kesters (Kersters, 1996) présenta une liste révisée de la nouvelle position taxonomique des Pseudomonads. Pour ne citer que quelques exemples, des espèces du groupe RNA II furent transférées aux genre *Burkholderia* et *Ralstonia* (Xiang Li, 1993, Yabuuchi, 1992, Yabuuchi, 1995). Des espèces du groupe d'homologie ARNr III furent transférés dans les genres *Acidovorax*, *Comamonas* ou *Hydrogenophaga* (Tamaoka et al., 1987, Willems et al., 1990, Willems et al., 1992); ces genres appartiennent à la sous classe β des *Proteobacteria*. Des espèces du groupe d'homologie ARNr IV furent transférés dans le genre *Brevundimonas* (Segers et al., 1994) qui appartient désormais à la sous classe α des *Proteobacteria*. Enfin l'espèce *P. maltophilia* initialement assignée au genre *Xanthomonas* par P. De Vos (De Vos et De Ley, 1983) était reclassée dans le genre *Stenotrophomonas* (Palleroni et Bradbury, 1993) qui appartient désormais à la sous classe γ - β des *Proteobacteria*. Le genre *Pseudomonas stricto-sensu* fut alors délimité au seul groupe I de l'ARNr qui appartient désormais à la sous classe γ des *Proteobacteria*; ce groupe comprenait alors 3 sous groupes avec *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *P. syringae* comme souches type. Moore et ses collaborateurs (Moore, 1996) délimita la lignée des *P. fluorescens* en y incluant les espèces *P. fluorescens*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. marginalis*, *P. tolaasi* et *P. viridiflava*, mais il régnait le même degré d'hétérogénéité au sein de l'espèce *P. fluorescens* qu'entre les différentes espèces de la lignée. Un constat similaire était décrit pour le groupe *P. putida*; ce point sera discuté plus loin dans ce document. Plusieurs équipes se sont attachées à la caractérisation plus fine de ces *Pseudomonas* (Anzai et al., 1997, Bennisar et al., 1996, Moore, 1996), leurs résultats étaient généralement cohérents avec ceux décrits par N.J. Palleroni. En 2000 Anzai et ses collaborateurs ont comparé les séquences des ARN16S de 128 espèces validées du groupe I de l'ARNr et mené une analyse phylogénétique étendue du genre *Pseudomonas*. Pour 57 espèces, les auteurs ont confirmé l'appartenance au genre *Pseudomonas* tel que défini par Palleroni en 1984, ces espèces ont été subdivisées en 7 clusters (Figure 13).

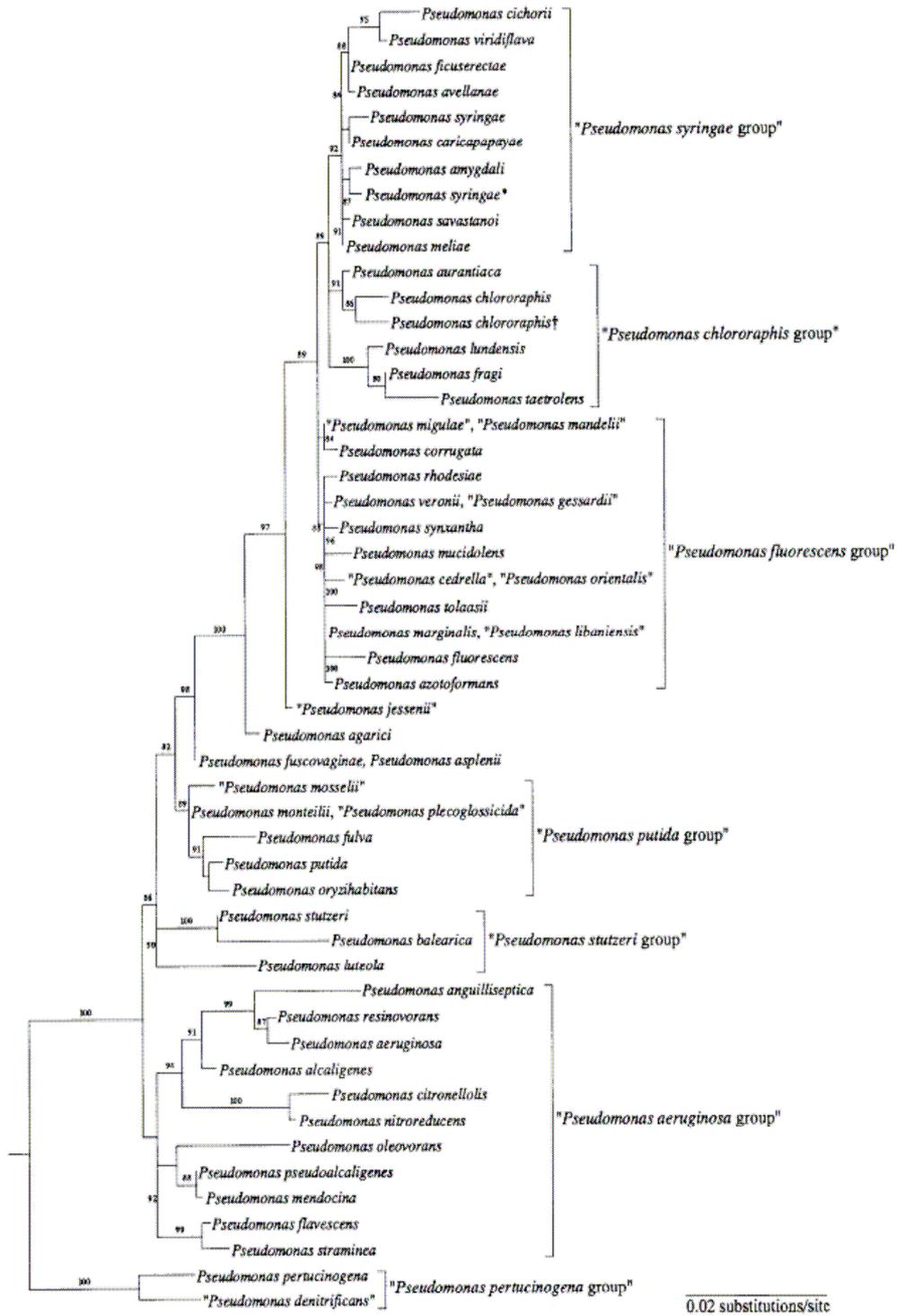


Figure 13 : Arbre phylogénétique des *Pseudomonas* stricto-sensu tel que proposé par Anzai et al. (Anzai et al., 2000) sur la base de l'analyse comparative des séquences ARN 16S.* auparavant *P. coronofaciens*, † auparavant *P. aureofaciens*.

Les autres espèces n'ont pas trouvé leur position au sein du genre *Pseudomonas* stricto-sensu et ont été redistribuées dans d'autres genres des sous classes α , β , ou γ - β des *Proteobacteria*.

Aujourd'hui, la comparaison des séquences d'ARNr est généralement admise comme une méthode pertinente pour attribuer une position phylogénétique à une souche bactérienne (avec un point de coupe de 3% de divergence maximum pour 2 souches d'un même cluster (Stackebrandt et Goebel, 1994)), elle s'appuie d'ailleurs sur de larges bases de données (GenBank-EMBL-DDBJ). Bien évidemment, cette technique a été largement exploitée pour préciser la classification des *Pseudomonas* et pour proposer une position taxonomique à un isolat. Néanmoins, plusieurs auteurs ont décrit un certain nombre de limites à cette approche (Bennasar et al., 1996, Bosshard et al., 2006, Clayton et al., 1995, Janda et Abbott, 2007, Mignard et Flandrois, 2006), et notamment pour les Pseudomonads suscitant ainsi la recherche d'autres marqueurs pertinents et proposant de nouvelles classifications sensiblement différentes

Ainsi, L. Ait Tayeb publiait en 2005 une vaste étude portant sur la comparaison de séquence du gene *rpoB* (sous unité beta de l'ARN polymerase) de 186 souches de références dont 75 espèces identifiées au genre *Pseudomonas* dans les collections de référence et les 111 restantes apparentées aux genres proches dans ces même banques de collection. Les auteurs montraient alors que le pouvoir résolutif de ce marqueur était triplé par rapport à celui de l'ARN 16S (Ait Tayeb et al., 2005).

D. De Vos, sous l'égide de P. Cornelis tenta de préciser la phylogénie des *Pseudomonas* (ARNr I) en s'appuyant sur la comparaison des séquences *oprI* (le gène codant pour la lipoprotéine I de la membrane externe) de 17 souches de référence, 20 isolats de *P. fluorescens* et 25 isolats de *P. aeruginosa* (De Vos et al., 1998). Les auteurs confirmèrent la proximité génotypique de l'ensemble de souches de *P. aeruginosa*, le bon clustering des souches de *P. chlororaphis* (3 souches), la proximité de *P. cichorii* et de *P. syringae*. *P. pseudoalcaligenes*, *P. mendocina*, et *P. oleovorans* étant plus proches de *P. aeruginosa*. Ces résultats confortèrent les résultats obtenus par ailleurs, mais mirent en évidence la très grande hétérogénéité au sein des *P. fluorescens*.

Christensen et ses collaborateurs (Christensen et al., 1994) s'étaient appuyés sur la comparaison de 4 régions des ARNS 23S pour discriminer 42 isolats ou souches de collection

préalablement identifiées par SDS-Page en tant que *P. aeruginosa* (2), *P. putida* (9), *P. syringae* (2), *P. cepacia* (1) (ultérieurement renommé *B. cepacia*), *P. fluorescens* (27) et *P. chlororaphis* (1). La classification obtenue fut très mal corrélée avec les données phénotypiques et ne fut pas suffisamment discriminante pour les *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* et *P. putida* biovar B ni pour les différents biovars de *P. fluorescens*. Mais il convient de préciser qu'à cette époque, les bases de données de séquences étaient encore restreintes concernant ces micro-organismes.

En s'appuyant sur le gène codant pour la protéine membranaire *oprF*, l'équipe de S. Barry analysa 69 isolats et souches de référence de *Pseudomonas* et construisit un arbre phylogénétique assez différent de celui basé sur l'analyse des séquences des ARN 16S mettant une fois de plus en évidence, les limites de l'utilisation de ce dernier marqueur pour la taxonomie des *Pseudomonas* (Bodilis et Barry, 2006).

A noter également, l'utilisation de la région non codante située dans la région entre les gènes 16S et 23S d'ARNr. Cet ADN est excisé au cours du processus de transcription de l'ARN ribosomal au cours de la synthèse des ribosomes et, par conséquent, est exposé à beaucoup moins de conservation évolutive que les gènes d'ARNr. Il a ainsi été possible de résoudre les différents genomovars de *P. stutzeri*, en corrélation avec la différenciation d'ADN déterminée par hybridation ADN-ADN (Guasp et al, 2000).

En s'appuyant sur les séquences des gènes *gyrB* (codant pour la sous-unité β de l'ADN gyrase) et *rpoD* (gène codant pour la sous-unité sigma de l'ARN polymérase), Yamamoto et ses collaborateurs (Yamamoto et al., 2000) comparèrent 125 souches de *Pseudomonas* réparties en 31 espèces (figure 14). L'analyse des proximités phylogéniques des espèces était très différente de celle basée sur l'analyse des ARN 16S. Ils proposèrent l'organisation du genre *Pseudomonas* en 2 clusters majeurs. Le premier comportait en fait 2 sous-complexes : le « complexe *P. aeruginosa* » qui comprenait *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. citronellolis*, *P. mendocina*, *P. oleovorans* et *P. pseudoalcaligenes*, et le complexe *P. stutzeri* qui incluait *P. balearica* et *P. stutzeri*. Le second cluster était réparti en 3 complexes : le « complexe *P. putida* » qui incluait *P. putida* et *P. fulva*, le « complexe *P. syringae* » comprenant *P. amygdali*, *P. caricapapayae*, *P. cichorii*, *P. ficuserectae*, *P. viridiflava* et *P. savastanoi*. Enfin le complexe *P. fluorescens* était lui-même divisé en 2 sous-groupes : le groupe *P. fluorescens* avec *P. fluorescens* biotypes A, B et C, *P. azotoformans*, *P. marginalis* pathovars, *P. mucidolens*, *P. synxantha* et *P. tolaasii* et celui des *P. chlororaphis* avec *P. chlororaphis*, *P.*

agarici, *P. asplenii*, *P. corrugata*, *P. fluorescens* biotypes B, G et *P. putida* biovar B. Une fois encore les ambiguïtés taxonomiques des *P. fluorescens* et des *P. putida* étaient révélées.

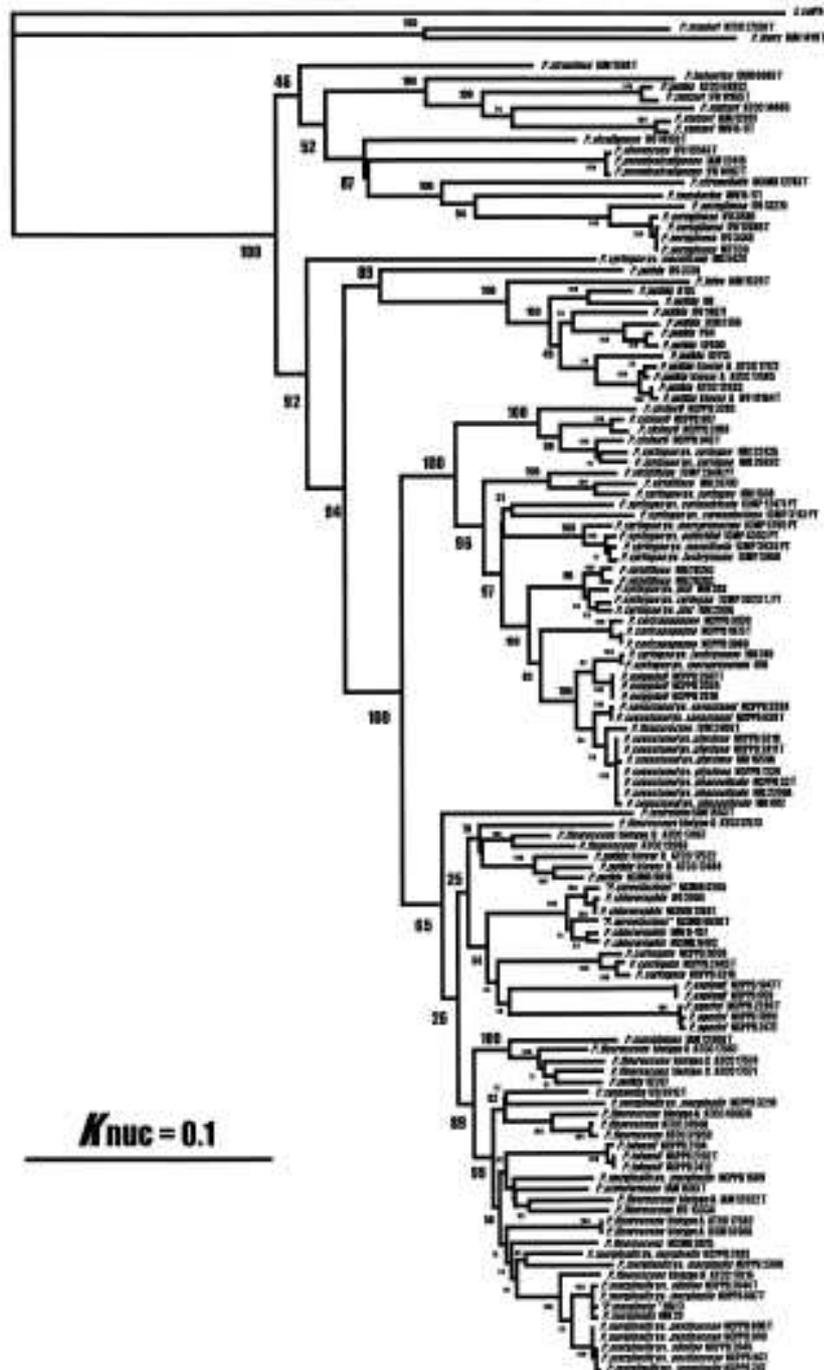


Figure 14 : Arbre phylogénétique de 125 souches de référence de *Pseudomonas* tel que proposé par Yamamoto et al., 2000 sur la base de l'analyse comparative des séquences des gènes *gyrB* et *rpoD*.

En 2004, Elena Hilario et ses collaborateurs (Hilario et al., 2004) se sont attachés à comparer les proximités phylogénétiques de 23 *Pseudomonas* (souches de collection) en

s'appuyant sur 4 séquences moléculaires provenant des gènes *atpD* (sous unité catalytique du complexe F₀F₁-ATP synthétase), *carA* (sous unité A de la carbamoyl phosphate synthase), *recA* (proteine Recombinase A) et ARN 16S (petite sous-unité de l'ARN ribosomal 16S). Les résultats sont présentés ci-après (figure 15, 16) :

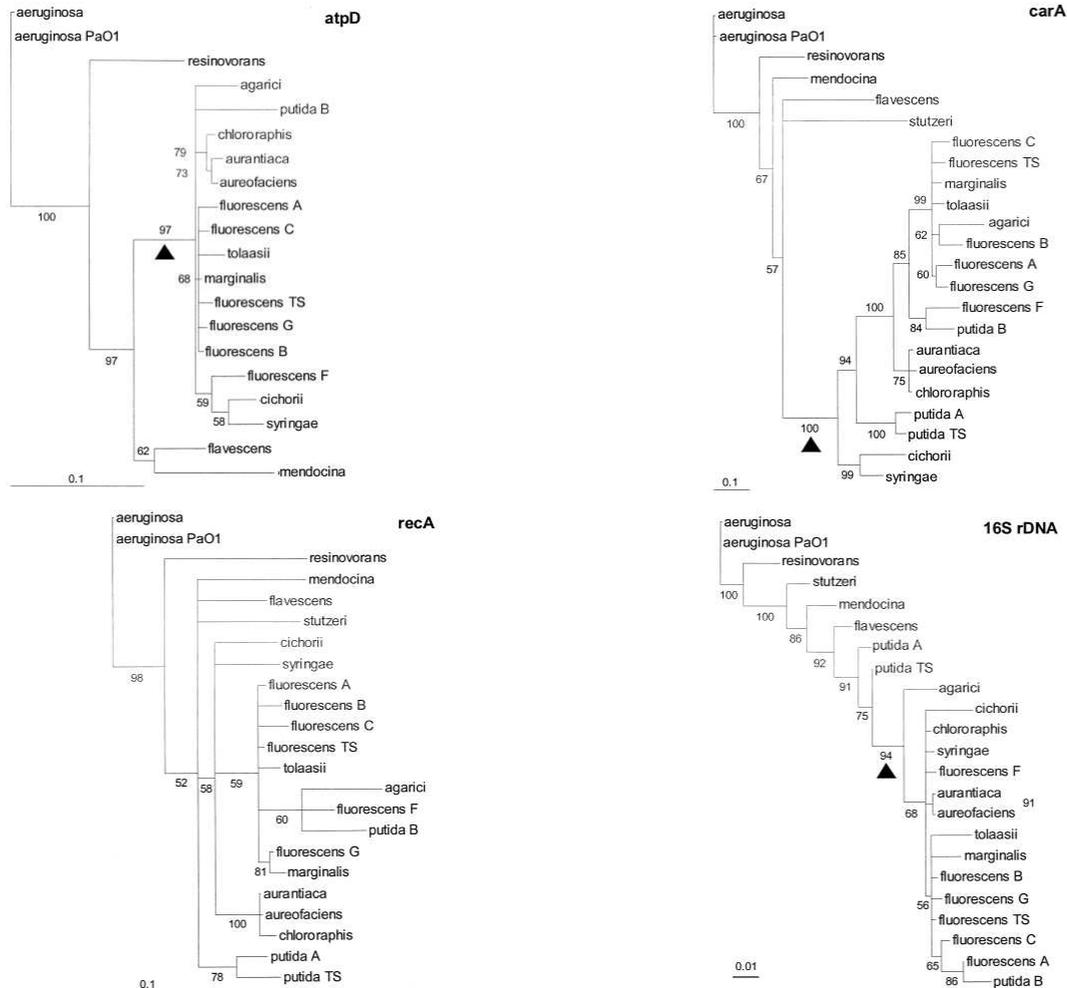


Figure 15 : Analyse des relations phylogénétiques entre *Pseudomonas* basée sur la comparaison des séquences des gènes *atpD*, *carA*, *recA* et ARNr 16S. Les triangles symbolisent les séparations de clusters (Hilario et al., 2004) .

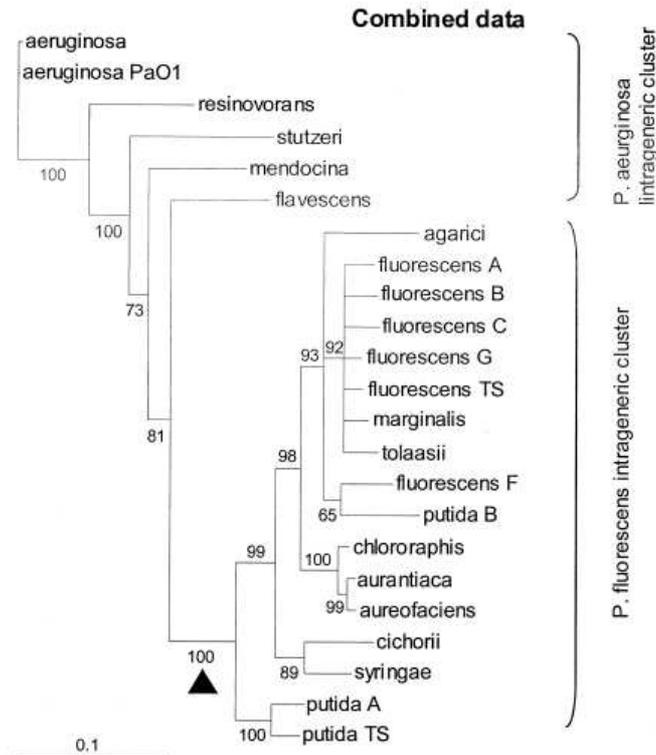


Figure 16 : Analyse des relations phylogénétiques entre *Pseudomonas* basée sur l'analyse combinée des gènes *atpD*, *carA*, *recA* et ARNr 16S. Les triangles symbolisent les séparations de clusters .

La proximité observée entre *P. flavescens*, *P. mendocina*, *P. stutzeri*, *P. resinovorans* et *P. aeruginosa* a été cohérente avec les divisions majeures observées par d'autres auteurs tels que le '*P. aeruginosa* intragenetic cluster' _IG I décrit par Moore et *col.* en 1996, le cluster I décrit par Yamamoto et *col.* en 2000 et le groupe des *P. aeruginosa* décrit par Anazai et *col.* en 2000 (sauf que pour ce dernier auteur, *P. stutzeri* forme un groupe indépendant). Les Biotypes A, B, C, F et G de *P. fluorescens* sont apparus proches de la souche type mais la proximité observée avec *P. putida*, *P. agarici* ou *P. syringae* selon les marqueurs utilisés est restée inexplicée pour les auteurs. Par l'analyse de l'ARN 16S, la position phylogénétique de *P. chlororaphis* reste ambiguë, mais l'analyse comparative des 4 gènes a clairement positionné cette espèce au sein des *P. fluorescens*, montrant par ailleurs des proximités fortes avec *P. aureofaciens* et *P. aurantiaca* comme cela avait d'ailleurs été observé auparavant par Palleroni et ses *collaborateurs*. Malgré les différences phénotypiques importantes entre ces espèces, les auteurs suggèrent que *P. aureofaciens* et *P. aurantiaca* soient considérés comme des synonymes de *P. chlororaphis*. Finalement les auteurs de cette étude confirmèrent les ambiguïtés taxonomiques des *P. fluorescens* et des *P. putida*.

Ce dernier point qui apparaît redondant dans les différentes analyses a été parfaitement décrit par les équipes de la Station de Pathologie végétale et phytobactériologie (INRA de Beaucozéz) et du laboratoire de recherche sur la flore pathogène dans le sol (INRA-CMSE, Dijon) dans leur article de revue intitulé « The taxonomy of *P. fluorescens* et *P. putida* : current status and need for revision » paru en 2000. Les auteurs ont comparé différentes approches méthodologiques pour résoudre les ambiguïtés taxonomiques qui règnent au sein des différents biotypes de ces dernières espèces, ils ont confirmé la nécessité de poursuivre les travaux en ce sens (Bossis et al., 2000).

Au vu de ces différentes publications, il apparaît nettement que le pouvoir résolutif de l'analyse moléculaire serait nettement amélioré par l'analyse combinée de plusieurs séquences génétiques. Cette approche, évidemment prometteuse, a longtemps été limitée par les difficultés méthodologiques. Aujourd'hui ces difficultés techniques sont en passe d'être surmontées et l'intérêt du concept de Multilocus Séquence Typing (ou MLSA pour Multilocus Sequence Analysis) est désormais largement partagé par la communauté scientifique. Brièvement ce concept s'appuie sur la sélection de plusieurs gènes "représentatifs" du chromosome et l'analyse de leurs séquences et de leurs produits peptidique en tant que séquences concaténées (Gevers et al., 2005). Malheureusement, à ce jour, cette méthode n'a été utilisée que pour certaines espèces de *Pseudomonas* (Johnson et al., 2007, Frapolli, 2007, Sarkar et Guttman, 2004, Wang et al., 2007) et aucune étude étendue au genre *Pseudomonas* n'a été publiée.

En parallèle de l'approche génotypique présentée ci-avant, de nombreux chercheurs ont cherché à mettre en évidence des marqueurs phénotypiques pour l'analyse phylogénétique ou le positionnement taxonomique des Pseudomonads. Le paragraphe suivant s'attache à présenter les principales études publiées en ce sens.

II.3.3. Approche chimiotaaxonomique

Remarque préalable : cette partie concerne l'approche phylogénétique et l'approche classification de la taxonomie, les travaux présentés portent sur des souches de référence ou des isolats.

II.3.3.1. SDS-PAGE et la composition protéique des cellules

Le SDS-PAGE ou Sodium Dodecyl sulfate – Polyacryamide Gel Electrophoresis, est une technique qui repose sur la séparation électrophorétique des macromolécules en gel

dénaturant. Cette technique peut être appliquée à différents composants mais c'est la séparation des protéines cellulaires totales qui est la plus couramment utilisée concernant les *Pseudomonads*. M Vancanneyt et collaborateurs (Vancanneyt et al., 1996) ont ainsi construit une vaste base de données de profils électrophorétiques à partir de 210 souches de collections appartenant au groupe des *Pseudomonads*. Les auteurs ont mis en évidence le fort pouvoir discriminant de la technique à l'échelle de l'espèce ou de la sous-espèce et sa capacité à identifier des isolats (29 dans l'étude présentée) au niveau de l'espèce. Bien que les travaux présentés ne permettent pas une comparaison avec les d'autres techniques, des informations relatives à la position taxonomique de certaines souches ont été présentées. Ainsi, une fois de plus, l'hétérogénéité au sein des *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. marginalis*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. stanieri* et *P. stutzeri* a été rappelée. La même méthode appliquée à la caractérisation de 106 isolats provenant d'échantillons de poissons et préalablement identifiés au genre *Pseudomonas* et à 9 souches de référence (*P. fluorescens* biovar V-1, *P. fluorescens* biovar V-5, *P. fluorescens* biovar III-1), *P. fluorescens* biovar I-1, *P. fragi*, *P. putida* biotype A, *P. lundensis*, *P. putida*) s'est cependant révélée inapte à différencier correctement *P. fluorescens* biovar V de *P. putida* et de *P. fragi* groupés en même cluster. Ces résultats ont confirmé l'ambiguïté qui règne quant à la position taxonomique de ces espèces telle qu'évaluée par les expériences d'hybridation ADN-ADN ou même par comparaison des ADN codant pour les ARN 23S.

II.3.3.2. FAME et les compositions lipidiques des cellules

L'analyse des Fatty acid methyl ester (FAME) consiste en la caractérisation par chromatographie en phase gazeuse des produits de méthyl-estérification des acides gras cellulaires. Cette technique, très rapide, peut être appliquée aux acides gras totaux ou à certaines fractions. Cependant, la composition en acides gras d'une bactérie étant très dépendante de la composition du milieu de croissance et de la température d'incubation, cette technique a longtemps souffert d'un manque de répétabilité et reproductibilité. Aujourd'hui il existe un système automatisé : Le Sherlock® Microbial Identification System (Newark, Delaware), qui s'appuie sur une large base de données couvrant 1500 espèces bactériennes dont 60 *Pseudomonas* stricto-sensu et quelques 30 espèces proches.

En fait, l'analyse des acides gras est considérée comme à valeur taxonomique pertinente et fait l'objet de nombreuses études depuis plus de 30 ans (Ikawa, 1967, Ratledge et Wilkinson, 1988). La composition en acides gras cellulaires 16:0 et en isomères de 18:1 et 16:1 semble

être typique de la plupart des protéobactéries mais concernant les *Pseudomonads*, les chercheurs sont cependant plus partagés (Bultreys et al., 2003, Vancanneyt et al., 1996). Plusieurs études ont été publiées dans les années 70-90, la plus vaste d'entre elles étant celle de D.E Stead qui a comparé plus de 500 profils d'acides gras cellulaires de 340 *Pseudomonads* (Stead, 1992a) mais les clusters présentés concernaient principalement l'origine écologique des isolats. Dans le même temps, par comparaison des teneurs en acides gras totaux et de la fraction phospholipidique, M. Vancanneyt (Vancanneyt et al., 1996) présentait un clustering des *Pseudomonas* cohérent avec la classification en cinq groupes d'homologie des ARNr présenté par Palleroni et ses collaborateurs en 1973 (Palleroni, 1973). Les souches du groupe I d'homologie étaient caractérisées des acides gras 10:0 3OH et 12:0 3OH, celles du groupe II par les acides gras 14:0 3OH, celles du groupe III par 10:0 3 OH, et celles du groupe IV par 10:0. La comparaison des profils de la seule fraction phospholipidique n'apportait quant à elle aucun élément additionnel à valeur taxonomique.

II.3.3.3. Typage sur siderophores

Les pyoverdines sont des pigments très tôt considérés comme des marqueurs taxonomiques potentiels des *Pseudomonas* dits fluorescents. J.M. Meyer et ses collaborateurs explorent cette possibilité depuis plus de 30 ans (Meyer et al., 2008); ils ont mis en évidence l'existence de plus de 100 composés de type pyoverdine. Tous présentent une structure centrale identique, à savoir, un chromophore quinolenique ((1 S)-5-amino-2,3-dihydro-8,9-dihydroxy-1H-pyrimido-[1,2-a]quinoline-1-carboxylic acid) sur laquelle sont branchées des chaînes peptidique dont la nature et la taille varie (globalement de 6 à 12 D et L- acides aminés). Ainsi, de faibles différences dans la structure des sidérophores peuvent être considérées comme des éléments discriminants au sein des *Pseudomonads*. La caractérisation fine de ces sidérophores a été rendue possible par l'utilisation de techniques d'électrophorèse et séparation sur point isolélectrique des sidérophores isolés des milieux de culture et maintenant par spectrométrie de masse (Meyer et al., 2008). Les résultats obtenus à partir de plusieurs centaines de souches fluorescentes et nonfluorescentes ont été en corrélation avec les résultats des analyses de génotypage, signifiant ainsi que cette approche est extrêmement prometteuse pour la différenciation au niveau de l'espèce (Fuchs, 2001, Meyer et al., 2002, Mossialos et Amoutzias, 2007). D'ailleurs, dans un article en date de 2007, J.M. Meyer et ses collaborateurs montraient l'intérêt de cette méthode pour la différenciation en 35 siderovars de 144 isolats de *Pseudomonas* préalablement identifiés à l'espèce *putida*. (Meyer et al., 2007).

II.3.3.4. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse n'est pas une méthode spectroscopique, son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Cette méthode est présentée ici car son haut pouvoir résolutif a été exploité récemment pour la caractérisation de souches de référence non fermentaires dont la plupart étaient des *Pseudomonads*.

Les méthodes s'appuyant la spectrométrie de masse ont été utilisées dès 1975 (Anhalt et Fenselau, 1975) pour caractériser les micro-organismes à des fins taxonomiques. Ces méthodes sont nombreuses et variées car les possibilités de couplage de la spectrométrie de masse à des méthodes séparatives (chromatographiques par ex) ou spectroscopiques sont très étendues; il n'est pas question d'en faire ici l'inventaire, seules les plus connues seront citées. La spectrométrie de masse sur Pyrolyse (Py-MS) a été l'une des premières techniques de spectrométrie de masse à générer des données considérées comme des empreintes digitales des bactéries étudiées. Développée dès le milieu des années 1990 parallèlement par les équipes de Goodfellow et de Goodacre (Atalan et al., 2000, Chun et al., 1993, Goodacre et Berkeley, 1990, Goodacre et Kell, 1996, Goodacre et al., 1996, Sanglier et al., 1992), cette technique permet la discrimination de bactéries jusqu'au niveau de la sous-espèce voire de variants environnementaux d'une même espèce (Goodacre et Kell, 1996, Goodfellow, 1995, Gutteridge, 1987, Helyer, 1997, Magee et al., 1993, Sisson et al., 1998). Diverses déclinaisons de cette technique telles que la laser desorption ionization (SELDI-TOF-MS) (Mellmann et al., 2008), la plasma desorption (PD-MS) et la Fast atom bombardment (FAB-MS)-spectrométrie de Masse ont également montré leur pouvoir discriminant mais ces techniques requièrent une étape limitante d'ionisation qui altère les matrices cellulaires et limite ainsi l'analyse. Des méthodes d'ionisation plus douces telles que celles utilisées electrospray ionisation (ESI-MS) ou Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF) apparaissent plus pertinentes. Cette dernière a permis l'identification à des niveaux de précision variables de différentes espèces de *Escherichia coli*, *E. coli* 0157:H et *Listeria monocytogenes* (Mazzeo et al., 2006), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* et des espèces de *Mycobacterium* (Bright et al., 2002, Fox, 2006) ou plus largement, différents isolats provenant de l'environnement (Bernardo et al., 2002, Bright et al., 2002, Jackson et Lay, 2001, Krader et D., 2004, Ryzhov et al., 2000, Smole et al., 2002, Walker et al., 2002) ou de l'homme (Hsieh et al., 2008, Williamson et al., 2008). Plusieurs sociétés telles que la société Anagnostec (<http://www.anagnostec.eu/products->

services/saramis.html proposent une version automatisée de la technique et une large base de données permettant l'identification rapide des micro-organismes couramment rencontrés dans le secteur médical, agroalimentaire, environnemental ou utilisés en biotechnologies.

La figure 17 présente les spectres enregistrés par spectrométrie MALDI-TOF de 3 genres bactériens

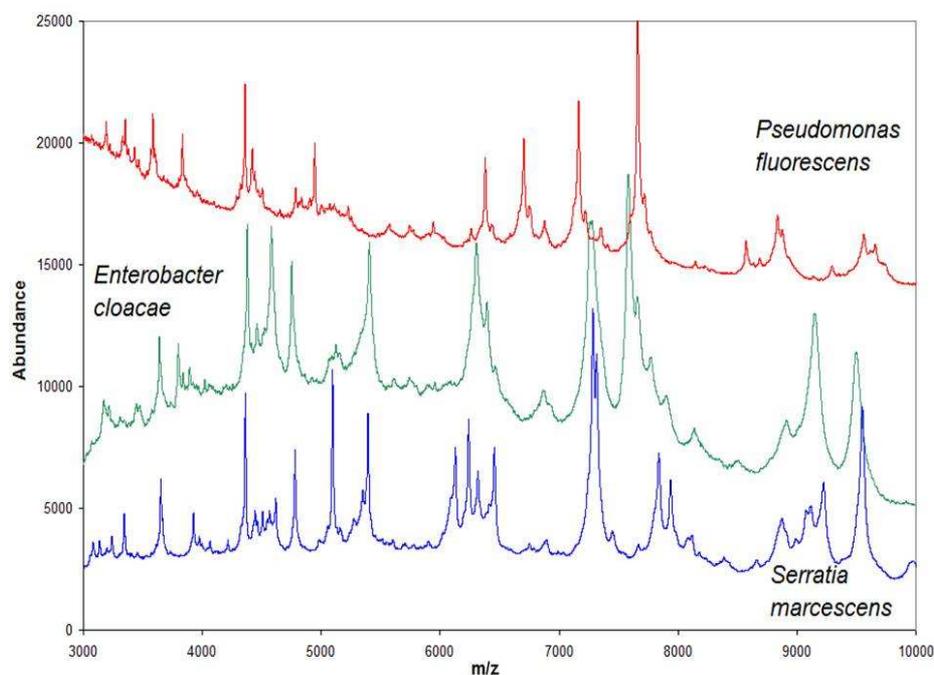


Figure 17 : Exemples de spectres enregistrés par spectrométrie MALDI-TOF à partir de bactéries appartenant à 3 genres distincts (d'après M.G. Kedney et al., 2007)

Récemment A. Mellmann et collaborateurs ont présenté (Mellmann et al., 2008) une vaste étude portant sur l'identification de 80 isolats hospitaliers (bactéries non fermentaires) par spectrométrie de Masse MALDI-TOF. Pour cette étude, une base de données portant sur des données spectrales de plus de 240 souches de références a été construite. Quant aux isolats, leur identification s'est faite par comparaison avec l'analyse partielle de la séquence de leur ARN 16S. Pour 85,9% des isolats l'identification au niveau d'espèce fut cohérente avec la méthode de référence, pour 11,5 % l'identification fut erronée et pour le reste, aucune identification de fut possible. Concernant les *Pseudomonas spp.* inclus dans l'étude, les résultats furent les suivants :

Tableau 2 : Résultats d'une étude portant sur l'identification de 80 isolats hospitaliers (bactéries non fermentaires) par spectrométrie de Masse MALDI-TOF

Identification par séquençage des ARN 16S	Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF
<i>P. aeruginosa</i> (17 isolats)	<i>P. aeruginosa</i> (17 isolats)
<i>P. stutzeri</i> (3 isolats)	<i>P. stutzeri</i> (3 isolats)
<i>P. putida</i> (2 isolats)	<i>P. putida</i> (1 isolats) et <i>P. fluorescens</i> (1 isolat)
<i>P. citronellolis</i> (1 isolat)	<i>P. citronellolis</i> (1 isolat)
<i>P. fulva</i> (1 isolat)	<i>P. fulva</i> (1 isolat)
<i>P. koreensis</i> (1 isolat)	<i>P. koreensis</i> (1 isolat)
<i>P. oleovorans</i> (1 isolat)	<i>P. oleovorans</i> (1 isolat)
<i>Pseudomonas</i> spp. (7 isolats)	<i>P. savastanoi</i> (2 isolats), <i>P. monteilii</i> (1 isolat), <i>P. putida</i> (4 isolats)
<i>P. monteilii</i> ou <i>P. putida</i> (6 isolats)	<i>P. putida</i> (4 isolats) et <i>P. monteilii</i> (2 isolats)
<i>P. psychrotolerans</i> ou <i>P. oryzohabitans</i> (1 isolat)	<i>P. oryzohabitans</i> (1 isolat)
<i>P. synxantha</i> ou <i>P. mucidolens</i> ou <i>P. libanensis</i> ou <i>P. gessardii</i> (1 isolat)	<i>P. tolaasii</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (14 isolats)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (14 isolats)
<i>Stenotrophomonas</i> spp. (3 isolats)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (3 isolats)

Par comparaison à la méthode de séquençage de l'ARN 16S, le pouvoir résolutif de la méthode spectrale apparaît très supérieur, et donc particulièrement prometteur.

L'ensemble de ces techniques repose sur la caractérisation à des niveaux plus ou moins précis de différents constituants cellulaires (protéines, lipides..) dont la composition varie très fortement en fonction des condition de croissance (température, nature des substrats..) ou de l'état physiologique des populations (phase exponentielle de croissance, phase stationnaire...). Ainsi, outre une phase de préparation des cellules (phase de lyse notamment) qui se doit d'être parfaitement répétable et reproductible, les modalités de préparation des échantillons (ici les bactéries) à analyser doivent être parfaitement calibrées.

II.4. L'identification d'un isolat : moyens disponibles aujourd'hui ou en cours de développement

II.4.1. Milieux sélectifs et/ou électifs

L'isolement des bactéries sur milieux sélectifs ou électifs peut être considéré comme la première étape d'identification puisqu'il oriente implicitement l'expérimentateur vers le groupe taxonomique recherché. Concernant les *Pseudomonads*, de nombreuses études se sont attachées à mettre au point des milieux de culture et conditions d'incubation adéquats. La plupart de ces milieux concernent l'isolement de *Pseudomonads* à partir de niches écologiques particulières mais globalement tous ces milieux s'appuient sur la polyrésistance des *Pseudomonads* aux antibiotiques (milieu gélosé à la ceftrimide) ou sur la mise en évidence de caractères métaboliques tels que la production de pigments (milieux King A et King B) couplés au caractère psychrotrophe de la plupart de ces bactéries. Actuellement, plusieurs milieux complexes sont commercialisés et largement utilisés dans les laboratoires de recherche ou les laboratoires d'analyse. Il s'agit de :

La gélose CFC (Céphalosparine / Fucidine / Ceftrimide) qui est un milieu nutritif de la composition suivante: peptone de gélatine 16 g. L⁻¹; hydrolysate de caséine 10 g. L⁻¹; sulfate de potassium 10 g. L⁻¹; chlorure de magnésium 1.4 g.L⁻¹; agar 11 g.L⁻¹ supplémenté en 3 agents antimicrobiens: cétrimide 10 mg.L⁻¹; fucidine 10 mg.L⁻¹; céphalosporine 50 mg.L⁻¹, destinés à améliorer la sélectivité de ce milieu. La gélose CFC est celle préconisée par la norme (NF V 04-504) pour le dénombrement des *Pseudomonas* dans les viandes et produits carnés. Son utilisation pour le dénombrement des *Pseudomonas* dans d'autres produits alimentaires est largement répandue et décrite dans la littérature scientifique, les auteurs modifiant, selon les travaux, les durées et températures d'incubation : 2 jours à 20°C (Tryfinopoulou et al., 2001), 2 jours à 25°C (Jeppesen, 1995, Neumeyer et al., 1997); 1 à 2 jours à 30°C (Güven Uraz, 1998), 1 à 3 jours à 30°C (Krueger et Sheikh, 1987) et 2 jours à 30°C (Cho et Tiedje, 2000).

Le milieu GSP (Glutamate Starch Phenol-red agar) qui est un milieu nutritif de la composition suivante : L-glutamate de sodium: 10 g.L⁻¹, amidon soluble: 20 g.L⁻¹, phosphate monopotassique: 2 g.L⁻¹, sulfate de magnésium: 0.5 g.L⁻¹, rouge de phénol: 0.36 g.L⁻¹, agar-agar: 12 g.L⁻¹ supplémenté par un ou deux antibiotiques : pénicilline G-sodique: 100 000 U. I et éventuellement piramicine: 0.01 g.L⁻¹. Ce milieu a été proposé pour la détection des

Pseudomonas et *Aeromonas* dans les aliments, les eaux usées et des équipements en contact avec les aliments (Flint et Hartley, 1996). Les conditions d'incubation préconisées par le distributeur Merck sont de 72 h à 25°C.

La gélose à la cétrimide est un milieu nutritif préconisé pour l'isolement et la différenciation de *P. aeruginosa* dans divers produits (Merck). Sa composition est la suivante : peptone de gélatine 20 g.L⁻¹; chlorure de magnésium 1.4 g.L⁻¹; sulfate de potassium 10 g.L⁻¹; agar-agar 13 g.L⁻¹, supplémentée par la cétrimide qui est un composé antimicrobien à large spectre de la famille des ammoniums quaternaires (Merck préconise 0.3 g.L⁻¹ dans son milieu Agar au cétrimide). Certains fournisseurs (Oxoid) préconisent l'ajout d'un deuxième agent sélectif afin d'améliorer la sélectivité, il s'agit de l'acide nalidixique (Oxoid préconise 15 mg.L⁻¹ dans son milieu *Pseudomonas* CN et 0.2g/L de cétrimide). Dans le cas de la recherche et/ou dénombrement des *P. aeruginosa*, l'incubation est suggérée à 35°, 37° voire 45°C durant 24 à 48 heures selon les fournisseurs. L'utilisation de ce milieu avec une incubation à plus basse température est parfois décrite pour le dénombrement des Pseudomonads totaux.

Quant aux milieux King's A (destiné à la mise en évidence de production de pyocyanine (Brown et Lowbury, 1965) et King B (destiné à la mise en évidence de pyoverdines (Kaare Johnsen, 1999), il ne s'agit pas de milieux sélectifs à proprement parlé et leur utilisation restreint la détection aux seuls Pseudomonads susceptibles de produire des pigments dans les conditions d'incubation.

De façon évidente, aucun de ces milieux et/ou condition d'incubation ne permet le recouvrement de l'ensemble des Pseudomonads présents dans une matrice quelle que soit sa nature. L'agent sélectif ou électif choisi, qu'il soit lié à la composition du milieu ou aux conditions d'incubation, est limitant au vu de la diversité des Pseudomonads. De la même manière, de nombreux auteurs ont mis en évidence la présence de flores non Pseudomonads sur ces milieux obligeant à une identification ou à minima, orientation d'identification de toute ou partie des colonies dénombrées.

Les méthodes mises en place pour cette démarche d'identification dépendent de l'objectif de l'analyse et des moyens disponibles dans les laboratoires.

II.4.2. Tests biochimiques et physiologiques basés sur la mise en évidence d'un composant ou une activité

Ces tests simples visent à orienter la démarche d'identification, généralement avec une précision très relative, au niveau de la famille voire du genre bactérien.

Concernant les Pseudomonads, les tests les plus couramment utilisés sont les suivants :

Description des colonies avec recherche ou non de la production de pigments par observation sous lampe UV (365 nm).

- Description des températures critiques de croissance avec pour seuils les valeurs suivantes : 4°C, 7°C, 25°C, 37°C et 42°C
- Description des caractères morphologiques et notamment la recherche de mobilité et implantation flagellaire, description de la taille et la morphologie des bactéries, réaction à la coloration de Gram.
- Description du métabolisme respiratoire avec recherche d'une activité fermentaire (test de Hugh & Leifson, (Hugh et Leifson, 1953)) et de l'enzymes catalase et enfin test oxydase.

Sont alors considérés comme des *Pseudomonas* (hors *P. aeruginosa*) les bactéries de forme bacille, à Gram négatif mobiles présentant une réaction positive aux tests oxydase et catalase et au métabolisme strictement oxydatif. Ces critères discriminants du genre *Pseudomonas* ont été décrits dès 1960 (Shewan et al., 1960); ils apparaissent bien évidemment extrêmement restrictifs au vu de la diversité phénotypique de ces micro-organismes et excluent de nombreuses espèces. Ils sont encore couramment utilisés par défaut.

II.4.3. Tests biochimiques et physiologiques basés sur la mise en évidence de plusieurs composants cellulaires ou d'une combinaison d'activités métaboliques

Ces tests reposent sur l'analyse combinée de plusieurs facteurs, ils consistent en la caractérisation des profils protéiques ou lipidiques et en tests d'assimilation des substrats carbonés ou autres activités enzymatiques.

II.4.3.1. Activités métaboliques

Dès le début des années 60, de nombreux chercheurs et entreprises ont cherché à standardiser et simplifier les tests permettant d'évaluer le potentiel d'utilisation de substrats carbonés et les activités enzymatiques des Pseudomonads. Aujourd'hui seulement 5 systèmes sont encore couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse de routine, principalement les laboratoires d'analyses médicales. Il s'agit du système manuel 20 NE (Biomerieux, Marcy l'étoile, France) et des systèmes automatisés Biolog (Biolog, Inc., Hayward, CA, USA), Microscan, VITEK (Biomerieux, Marcy l'étoile, France) et PHOENIX (Becton Dickinson Microbiology system). Tous ces systèmes sont en fait dédiés à l'identification de bactéries à Gram négatif et non fermentaires. Certains d'entre eux permettent la réalisation d'antibiogrammes. La fiabilité de ces systèmes a fait l'objet de multiples évaluations et il semble que le Microscan, et le PHOENIX soient extrêmement rapides dans la réponse mais présentent des déficiences pour l'identification des Pseudomonads. Le Vitek, dans sa dernière version comprend environ 150 taxons dans sa base de données et repose sur plus de 60 tests. Le Biolog repose sur le suivi quantitatif de la réponse à plus de 95 tests mesurés sur plusieurs périodes d'incubation.

II.4.3.2. Caractérisation de composés structuraux

Il existe actuellement de nombreuses techniques permettant de séparer les constituants cellulaires et donc de comparer les structures des cellules bactériennes. Les plus courantes s'appuient sur des techniques chromatographiques ou électrophorétiques et concernent le matériel génétique (ADN, ARN), les structures protéiques, lipidiques ou certains composés identitaires tels, les pyoverdines des Pseudomonads. Certaines de ces techniques ont été présentées en paragraphe **II.3.3** et ne seront pas évoquées ici.

Dans le paragraphe ci-après ne seront présentées que les techniques majeures appliquées aux Pseudomonads.

II.4.3.3. Techniques moléculaires sans amplification

PFGE

La PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) est une technique d'électrophorèse en champ pulsé, basée sur l'utilisation d'enzymes de restriction générant un nombre restreint de fragments d'ADN de grande taille. Développée en 1984 par (Schwartz DC, 1984), la PFGE repose sur la séparation de fragments de grande taille (> 1000 kbp) par changements de la durée et la direction du champ électrique de l'électrophorèse. Cette technique est considérée

comme une méthode de référence pour la caractérisation des *P. aeruginosa* en secteur hospitalier mais est également largement utilisée pour les non-aeruginosa. Pour ces derniers, les enzymes de restriction *XbaI*, *SpeI*, *PacI*, *SwaI* et *HindIII* sont les plus souvent utilisées. Mais, si les fragments générés et séparés reflètent la diversité des génotypes et permettent, par exemple, d'éliminer des isolats doublons, la diversité des profils de macrorestrictions est telle entre et au sein des biovars que l'utilisation taxonomique de cette méthode semble risquée et ce d'autant plus qu'aucune corrélation avec les approches phénotypiques n'a pu être mise en évidence (Rainey et al., 1994).

Finalemment cette technique présente de nombreux avantages au regard des informations générées mais reste lourde à mettre en œuvre tout en étant de peu d'intérêt pour une approche taxonomique isolée.

RFLP

La RFLP ou Restriction Fragment Length Polymorphism est une technique basée sur la comparaison sur la séparation de fragments d'ADN préalablement coupés par une enzyme de restriction puis recherche d'hybridation avec des sondes spécifiques par southern blotting. Bien que présentant une bonne reproductibilité et un haut pouvoir discriminant, cette technique est longue et laborieuse, elle est largement remplacée par la PFGE et la RAPD-PCR et ne sera développée ici.

II.4.3.4. PCR et autres techniques dérivées basées sur une phase d'amplification

La PCR, pour Polymerase Chain Reaction, est une méthode d'amplification génique in vitro, qui permet de copier en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard), une séquence d'ADN ou d'ARN connue, à partir d'une faible quantité (de l'ordre de quelques picogrammes) d'acide nucléique (séquence *spécifique* d'ADN (l'Amplicon) ou amorces spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse de 20 à 25 nucléotides).

La PCR est « La technique » de base de l'ensemble des méthodes d'analyse des génomes par amplification. Cette technique et donc l'ensemble des techniques dérivées reposent sur le choix de paramètres d'amplification adéquats mais surtout sur le choix d'amorces pertinentes pour l'identification des bactéries à l'échelle du genre, l'espèce ou la sous-espèce. L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe par PCR ou RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphism DNA), est une de ces techniques largement utilisées, elle consiste à réaliser

une amplification PCR avec des amorces d'environ 10 pb définies de façon aléatoire. Si les 2 sites d'hybridation sont suffisamment proches, l'amplification PCR est possible. Une variabilité dans la séquence des sites entre individus est détectée par un polymorphisme du nombre et de la longueur des fragments d'ADN amplifiés. Cette technique a l'avantage d'être rapide avec peu de mise au point et révèle un polymorphisme important mais ce marqueur est dominant et les conditions de PCR sont très sensibles. La repetitive-sequence-based (rep)-PCR, connue sous le terme d'amplification de séquences répétitives, permet l'amplification de nombreux fragments de tailles différentes (amplicons) représentant l'ADN au sein de séquences répétitives non codantes du génôme. La disposition de ces fragments montre les différences distinctives des microorganismes (Louws et al., 1994).

Quoi qu'il en soit, durant de longues années, la séquence ADN de l'ARN ribosomal 16S a été, de loin, le marqueur génétique le plus utilisé pour les études taxonomiques et phylogéniques des procaryotes et ce pour les raisons suivantes : (1) sa présence chez toutes les bactéries ; (2) la fonction du gène n'a pas évolué au cours du temps suggérant que les changements aléatoires soient un indice d'évolution précis et (3) la taille du gène autorise un recueil d'informations suffisamment vaste (Janda et Abbott, 2007, Jannes et al., 2004, Johnsen et al., 2002, Locatelli et al., 2002, Manceau et Horvais, 1997, Meyer et al., 2004, Olofsson et al., 2007, Porteous et al., 2002, Purohit et al., 2003, Radice et al., 2006, Scarpellini et al., 2004, Schloss et al., 2005, Segers et al., , Spilker et al., 2004, Widmer et al., 1998). Cependant, aujourd'hui la pertinence de cette approche pour la taxonomie bactérienne fait l'objet de remises en question. Ainsi, il est généralement admis que moins de 97% de similitude entre 2 souches indique l'appartenance des souches à 2 espèces différentes. Par contre plus de 97% d'homologies ne signe pas obligatoirement l'appartenance à un même taxon. Pour l'identification d'un isolat, plus de 90% des souches peuvent être identifiées au niveau du genre mais ce pourcentage chute à 65 % concernant l'identification au niveau de l'espèce. Ce point est particulièrement critique en ce qui concerne les Proteobacteria et plus particulièrement les Pseudomonads. Aussi, la recherche de marqueurs identifiants non ARN 16S fait l'objet de nombreux travaux (Bennasar et al., 1998, Bennasar et al., 1996, Christensen et al., 1994, Dawson et al., 2002, De Vos et al., 1998, Dogan et Boor, 2003, Ercolini et al., 2007, Ercolini et al., 2009, Hilario et al., 2004, Hirkala, 2006, Manceau et Horvais, 1997). Il n'est pas le propos d'en faire ici une description exhaustive ni d'ailleurs des techniques afférentes mais il apparaît au vu de l'analyse bibliographique que l'identification des Pseudomonads par méthodes moléculaires se heurte encore à des obstacles

méthodologiques. Si la distinction du genre *Pseudomonas* des autres flores « apparentées » est aisément réalisable, l'identification au niveau de l'espèce n'est, à l'heure actuelle, possible en routine que pour seulement quelques espèces (*P. aeruginosa*, *P. fragi*, *P. fluorescens* et *P. putida*, *P. putida*, *P. stutzeri*). Par ribotypage, l'Institut Pasteur s'appuie sur les gènes rrs //codant l'ARNr 16S, le gène rpoB/ ou les gènes codants pour les protéines de choc thermique hsp65 (communication personnelle).

II.4.3.5. Autres tests

Une autre approche qui exploite les caractères immunologiques des protéines cellulaires a été décrite par Tesar et al. (Bennasar et al., 1998, Tesar et al., 1996). L'électrophorèse des protéines entières de cellule réagissant avec des anticorps spécifiques dans un Western Blot, permet l'identification d'isolats répartis sur une large gamme phylogénétique. Les anticorps monoclonaux générés contre des épitopes des protéines de membrane externe spécifiques de *Pseudomonas* ont été capables de différencier les espèces de *Pseudomonas* sensu stricto à partir d'espèces des genres étroitement liés (Bennasar et al., 1998).

L'utilisation d'anticorps spécifiques a également été décrite par Kragelund et col. (Kragelund et al., 1996). Dans cette étude des anticorps anti OprF (protéine de membrane externe) étaient utilisés comme sondes pour la détection par immunoblotting de *Pseudomonas* (groupe I d'homologie) après transfert des colonies sur membrane de nitrocellulose. Cette technique bien qu'élégante, n'a été reprise que dans quelques études mais n'est pas utilisée en routine dans les laboratoires et ce malgré la commercialisation de quelques anticorps dirigés contre *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. marginalis*, *P. fluorescens* et *P. aureofaciens* (<http://www.anticorps-enligne.fr>).

II.4.4. Quelques études ayant porté sur la comparaison de méthodes ou la caractérisation polyphasique d'isolats de Pseudomonads

A partir de viande de poulet, I. Arnault-Rollier et ses collaborateurs (Arnault-Rollier et al., 1999) ont isolé sur gélose PCA (et incubation à 30°C) et sur gélose CFC (et incubation à 22°C) plus 720 souches pour une caractérisation phénotypique basée sur environ 120 caractères collectés en API 20 NE et sur Biolog. En incluant à l'étude 36 souches de référence, la taxonomie numérique qui en résulta permit aux auteurs de grouper les souches en 2 « super clusters » et 8 clusters mineurs. Le premier « super cluster » rassemblait les *P. lundensis* (21 souches) et le second rassemblait 44 *P. fragi*. Le cluster dit *P. fragi* ne

distinguaient du cluster *P. putida* que par 1 caractère métabolique et par l'absence de production de pigment. Un cluster groupait tous les *P. putida* biova A (5 isolats) et se distinguait nettement du cluster rassemblant les *P. putida* biovar B et *P. marginalis* (13 isolats). Les *P. putida* biovar B culsterisaient avec *P. marginalis*, tandis qu'un cluster rassemblait les *P. fluorescens* biovars A, B,C et F avec *P. chlororaphis*. Sans aller plus loin dans les détails de cette étude approfondie, il apparut nettement des ambiguïtés sur le positionnement de nombreux isolats pour lesquels aucune parenté ne put être décelée avec les souches de référence. Les systèmes API et Biolog, permirent cependant aux auteurs de proposer des marqueurs phénotypiques susceptibles de différencier *P. fluorescens* de *P. fragi*, *P. lundensis* mais pas de résoudre les positions taxonomiques des différents biovars de *P. fluorescens* et *P. putida*.

107 isolats cliniques de bacilles à Gram négatif non fermentaires (non *P. aeruginosa*) ont été identifiés sur une période de 26 mois par P. Bosshard et ses collaborateurs (Bosshard et al., 2006) par une approche comparative entre le système manuel API 20 NE, le système automatisé VITEK et par séquençage des ARN 16S. Par API 20 NE, 54% des isolats ont pu être identifiés au niveau de l'espèce, 0,9% au niveau du genre et 46% ne purent être identifiés. Pour 12 isolats la technique proposait 2 espèces. Enfin, par séquençage de l'ARN 16S, 79 % des isolats furent identifiés au niveau de l'espèce, 8% au niveau du genre et finalement 12 de 98 isolats identifiés au niveau d'espèce présentaient des scores similaires d'affiliation à des séquences répertoriées dans les bases de données et donc assignés à 2 espèces potentielles. A titre d'exemple, les auteurs ont cité le cas d'un isolat présentant 100% d'homologie avec les séquences de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas jessenii*. Pour 48 sur 58 souches, le séquençage de l'ARN 16S était cohérent avec le système API pour l'identification au niveau de l'espèce. Des résultats similaires étaient obtenus avec le système VITEK. Finalement les auteurs ont conclu que le système API était plus performant que le système VITEK pour l'identification du groupe bactérien étudié (respectivement 16/ 107 et 46/ 107 des isolats correspondaient des espèces non présentes dans les bases de données API 20 NE et VITEK). Les auteurs ont également émis des réserves quant à la fiabilité de l'analyse des ARN 16S puisque 35 % des isolats n'ont pu finalement être assignés sans ambiguïté à une espèce.

Dans une étude portant sur quelques 340 isolats de *Pseudomonads* psychrotrophes préalablement caractérisés par isolement sur gélose CFC et tests phénotypiques (Gram, oxydase, catalase), B. Dogan et K.J. Boor (Dogan et Boor, 2003) ont comparé les résultats

d'identification par API 20 NE et ribotypage (81 isolats). Par API 20 NE, 51% des isolats étaient identifiés à l'espèce *P. fluorescens*, 14% en tant que *P. putida* et pour 25% l'identification était ambiguë entre *P. fluorescens* et *P. putida* ; 10% des isolats n'ayant pu être identifiés au niveau d'espèce. Les 81 isolats présentant des codes API différents ont été répartis en 42 ribotypes. Ces résultats mirent en évidence le faible potentiel d'identification du système API pour des isolats environnementaux, mais aussi le potentiel discriminant du ribotypage. Néanmoins cette dernière méthode ne permettait pas l'identification des isolats mais leur clustering cohérent avec leur origine et leurs activités enzymatiques (lipolytique et protéolytique).

Dans une étude assez similaire mais menée sur 103 bactéries psychrotrophes à activité protéolytique, Marchand et ses collaborateurs (Marchand et al., 2009) ont comparé la caractérisation des isolats par API 20 NE, REP-PCR, et pour certains d'entre eux par séquençage des ARN 16S et du gène *rpoB* et enfin par hybridation ADN-ADN. Par API 20NE, 7,8% des isolats étaient identifiés en tant que *Burkholderia sp.*, *Sphingobacterium*, *Photobacterium* ou *Acinetobacter*, mais 90,3% d'entre eux étaient assimilés à des *Pseudomonas sp.* (25% du total étant des *P. putida* et 66% des *P. fluorescens*). L'analyse du contenu en acides gras totaux (cellulaires) de 29 isolats présentant des profils API différents mais identifiés en tant que *Pseudomonas* ne permit aucune identification pertinente au delà du genre que cela soit par le système automatisé MIDI ou par comparaison quantitative et qualitative aux vastes banques de données construites par le Pr P. De Vos de l'université de Gent). Le séquençage des ARN 16S ne précisa que l'appartenance des isolats à l'espèce *fluorescens* (désignée *fluorescens* lineage par les auteurs). Par contre le séquençage du gène *rpoB* et le test d'hybridation ADN-ADN identifièrent 4 des isolats à *P. fragi* et 5 à *P. lundensis*. 15 des isolats ne purent être correctement identifiés. Par PCR basée sur le gène *carA* selon le protocole proposé par Ercolini et collaborateurs (Ercolini et al., 2007) l'identification des *P. fragi* et *P. lundensis* fut confirmée. Dans cette étude, les auteurs ont constaté le manque de fiabilité du système API 20 NE (qui ne compte d'ailleurs que 14 espèces de *Pseudomonas* et ni *P. fragi* ni *P. lundensis* dans sa base de données) et du séquençage de l'ARN 16S pour une approche taxonomique d'isolats de *Pseudomonas*. La manque de potentiel discriminant de l'analyse des profils d'acides gras apparut plus surprenant. Finalement, le séquençage du gène *rpoB* apparut une méthode performante ainsi que la caractérisation rapide par PCR *carA* de *P. fragi* et *P. lundensis*.

I. Geornaras et ses collaborateurs ont présenté en 1999 (Geornaras et al., 1999), une étude portant sur la caractérisation par AFLP (amplified fragment length polymorphism) de 88 isolats d'abattoir de poulets préalablement identifiés en tant que *P. fluorescens* ou *P. putida* par croissance sur gélose CFC, tests oxydase et catalase et identification en galerie API 20 NE. L'analyse moléculaire des isolats permet de typer les souches et donc de tracer l'origine des contaminants décelés sur les produits. Les auteurs ont observé une très grande hétérogénéité génétique de ces souches de *P. fluorescens* et aussi leur proximité avec les souches de *P. putida* biovar B. Le manque de concordance entre les clusterings issus de données métaboliques et données génétiques était signalé.

Dans les mêmes années, H. Christensen et ses collaborateurs (Christensen et al., 1994) concluaient, au terme d'une étude portant sur 41 isolats de Pseudomonads, au manque de pertinence de la comparaison des séquences des ARN 23S (régions 1391 à 1545 et 1620 à 1865) pour obtenir une discrimination entre *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, et *P. putida* biovar B et même pour différencier les différents biovars de *P. fluorescens*.

Pour la préparation de son doctorat, D. L. M. Hirkala (Hirkala, 2006) a étudié 133 isolats de rhizosphère sélectionnés parmi 447 Pseudomonads préalablement identifiés par analyse FAME (Misko et Germida, 2002). Tous les isolats ont été parallèlement caractérisés par analyse de séquence des ARN 16S et du gène *cpn60* et donc par FAME. Les 3 méthodes ont permis de distinguer les isolats au niveau du genre, mais l'identification au niveau de l'espèce fut plus ambiguë. Ainsi, la cohérence sur l'identification à ce niveau entre FAME et analyse des ARN 16S ne fut obtenue que pour 13% des isolats et seulement 17% avec l'analyse du gène *cpn60*. Finalement entre les 3 méthodes, il n'y eut cohérence que pour 11% des isolats. Par exemple, des 63 isolats identifiés en tant que *P. chlororaphis* par FAME, 33 furent identifiés en tant que *P. putida*, 14 en tant que *P. fluorescens*, 13 en tant que *P. jessenii* et 3 en tant que *Pseudomonas spp.* par comparaison des ARN 16S. Pour ces mêmes isolats, la comparaison de séquence du gène *cpn60* conduisit à l'identification de 33 *P. fluorescens*, 28 *P. putida* et 2 *Pseudomonas spp.* Les isolats identifiés en tant que *P. chlororaphis* par FAME se répartissaient entre *P. fluorescens* et *P. putida* par caractérisation génotypique. D. L. M. Hirkala avança plusieurs hypothèses quant au manque de cohérence entre le positionnement taxonomique des isolats par données phénotypiques et génotypiques. L'une d'entre elles s'appuie sur le très fort pouvoir adaptatif des Pseudomonads et sur le manque de flexibilité

des bases de données (notamment celles des profils d'acides gras totaux) qui s'appuient sur le recueil de caractères des souches cultivées en conditions standardisées.

Conclusion

Au cours des deux dernières décennies, les méthodes d'analyse génomique ont joué un rôle crucial rôle dans l'amélioration de la classification de Pseudomonads. Beaucoup de ces organismes initialement décrits comme des espèces du genre *Pseudomonas* ont été reclassés aux autres genres comme : *Acidovorax*, *Aminobacter*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Halomonas*, *Herbaspirillum*, *Hydrogenophaga*, *Marinobacter*, *Methylobacterium*, *Oligotropha*, *Pseudoalteromonas*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Telluria*, *Vogesella* et *Zavarzinia*. Mais, s'il est apparu que certaines espèces du genre *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*) sont des unités taxonomiques homogènes, d'autres espèces comprennent des subdivisions complexes en différents 'biovars' pour *P. fluorescens* et *P. putida*, en 'pathovars' dans le les cas de *P. syringae* et *P. marginalis*, ou 'genomovars' dans le cas de *P. stutzeri*, tandis que la position taxonomique d'espèces telles que *P. chlororaphis* reste très discutée. Enfin, certaines espèces sont encore très peu décrites.

III. Conclusion de la synthèse bibliographique

L'hétérogénéité phylogénétique des Pseudomonads est reconnue depuis plusieurs décennies (De Vos et al., 1989) et fait l'objet de très nombreuses études qui ont d'ailleurs souvent été à la base de la mise au point de méthodologies innovantes pour la caractérisation des micro-organismes (Palleroni, 2003). Malheureusement, la connaissance des quelques 140 espèces réparties dans les classes Bêta et Gamma proteobacteria reste très inégale.

Pseudomonas aeruginosa est extrêmement bien décrite, notamment parce que cette espèce est la principale bactérie pathogène opportuniste et qu'elle constitue la souche modèle pour l'analyse des mécanismes d'interaction avec les tissus, les réponses aux stress biotiques et pour la résistance aux antibiotiques (Palleroni et Moore, 2004) ; son génome est d'ailleurs entièrement séquencé pour 3 souches, comme c'est aussi le cas, d'ailleurs, pour 2 souches de *P. fluorescens*, 3 *P. putida*, 3 *P. syringae*, 1 *P. mendocina* et 1 *P. entomophila* (Pseudomonas genome data base, <http://www.pseudomonas.com/> consulté le 10 mai 2009).

Dans le cas de *P. fluorescens* et *P. putida*, ce sont leurs propriétés cataboliques qui ont largement dominé les études réalisées, et *P. fluorescens* fut le premier micro-organisme génétiquement modifié autorisé pour diffusion dans l'environnement à des fins de bio protection des cultures, rapidement rejoint par *P. stutzeri* utilisé en protection des fruitiers contre le gel ou la production de neige artificielle (<http://www.epa.gov/>).

Très vite l'adaptabilité de ces microorganismes à leur environnement à fait l'objet de la curiosité des microbiologistes qui ont recherché au travers d'études phylogéniques les transferts horizontaux et verticaux entre séquences génétiques.

A l'heure actuelle, il n'existe que peu de cohérence entre les différents méthodologies disponibles pour la caractérisation de ces dernières espèces et nombre de microbiologistes s'accordent à considérer qu'une seule approche phénotypiques est insuffisante alors que la caractérisation génétique par les outils courants ne permet l'identification fiable que de très peu d'espèces. C'est donc le développement d'outils novateurs permettant un approche polyphasique de la taxonomie microbienne qui suscite désormais l'intérêt (Busse et al., 1996). Les méthodes spectroscopiques et les différentes déclinaisons de la spectrométrie de masse par leur sensibilité ont, en ce sens, un avenir prometteur. Mais à ce jour, ces méthodes n'ont été que très peu développées pour une approche taxonomique des Pseudomonads.

MATERIELS & METHODES

I. Souches étudiées

I.1. Souches de collection

Les souches de collection utilisées dans ce travail proviennent des collections internationales :

CIP (la Collection de l'Institut Pasteur)

DSM (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)

Toutes les souches reçues sous forme lyophilisée ont été redémarrées jusqu'en phase exponentielle dans le milieu nutritif préconisé, puis été stockées à -80°C en brouillon nutritif additionné de 15% de glycérol. La maintenance du souchier se fait de telle sorte que les souches subissent un minimum de stress susceptibles d'induire des modifications phénotypiques ou génotypiques. La liste des souches de référence utilisées pour cette étude est présentée dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Souches de référence et codification

Souches de référence	Collection ID	code
<i>Pseudomonas</i>		
<i>P. fluorescens biotype A</i>	CIP 69.13	<i>p.flu</i>
<i>P. fluorescens biotype B</i>	CIP 104377	<i>P.fluB</i>
<i>P. fluorescens biotype F</i>	CIP 59.27	<i>P.fluF</i>
<i>P. fluorescens biotype III</i>	DSM 50124	<i>P.flu3</i> ou <i>P.fluIII</i>
<i>P. putida</i>	CIP 52.191	<i>P.put</i>
<i>P. putida biotype A</i>	DSM 50208	<i>P.putA</i>
<i>P. putida biotype B</i>	DSM 50222	<i>P.putB</i>
<i>P. fragi</i>	CIP 55.4	<i>P.frg1</i>
<i>P. fragi</i>	CIP 60.46	<i>P.frg2</i>
<i>P. chlororaphis</i>	CIP 63.22	<i>P.chl1</i>
<i>P. chlororaphis</i>	DSM 50139	<i>P.chl2</i>
<i>P. stutzeri</i>	CIP 103022	<i>P.stu1</i>
<i>P. stutzeri</i>	CIP 107689	<i>P.stu2</i>
<i>P. lundensis</i>	CIP 103272	<i>P.lun</i>
<i>P. taetrolens</i>	CIP 103299	<i>P.tae</i>
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	CIP 66.14	<i>P.psalc</i>
<i>P. synxantha</i>	CIP 59.22	<i>P.synx</i>
<i>P. resinovorans</i>	CIP 61.9	<i>P.resin</i>

<i>P. mendocina</i>	CIP 75.21	<i>P.mend</i>
<i>P. alcaligenes</i>	CIP 101034	<i>P.alc</i>
<i>P. veronii</i>	CIP 104663	<i>P.ver</i>
<i>P. monteilii</i>	CIP 104883	<i>P.ment</i>
<i>P. mosselii</i>	CIP 105259	<i>P.moss</i>
<i>P. libanensis</i>	CIP 105460	<i>P.lib</i>
<i>P. migula</i>	CIP 105470	<i>P.mig</i>
<i>P. orientalis</i>	CIP 105540	<i>P.orien</i>
<i>P. viridiflava</i>	CIP 106699	<i>P.viri</i>
<i>P. agarici</i>	CIP 106703	<i>P.agar</i>
<i>P.cichorii</i>	CIP 106704	<i>P.cich</i>
<i>P.marginalis</i>	CIP 106712	<i>P.marg</i>
<i>P.aurantiaca</i>	CIP 109457	<i>P.aur</i>
<i>P.syringa-syr</i>	DSM 10604	<i>P.syr-syr</i>
<i>P.syringa-tom</i>	DSM 50315	<i>P.syr-tom</i>
<i>P.savastanoi</i>	DSM 19341	<i>P.sav</i>
<i>Xanthomonas</i>		
<i>campestris</i>	CIP 100069	<i>X.comp</i>
<i>Stenotrophomonas</i>		
<i>maltophilia</i>	CIP 60.77	<i>S.malt</i>
<i>Burkholderia</i>		
<i>cepacia</i>	CIP 80.24	<i>B.cep</i>

I.2. Souches sauvages

I.2.1. Prélèvements

Toutes les souches sauvages utilisées dans ce travail proviennent de 2 abattoirs régionaux qui procèdent à l'abattage conventionnel et rituel (halal) d'ovins et bovins (jeunes animaux et animaux adultes). Les prélèvements pour dénombrement ont été effectués tout au long de la chaîne d'abattage sur les animaux et carcasses, sur l'eau telle qu'utilisée en différents points, sur les surfaces au contact et sur l'air ambiant. Les méthodes de prélèvement sont présentées ci-après :

Sur les animaux et les carcasses, les prélèvements ont été effectués pour les étapes d'abattage suivantes :

- Après le saignement et avant la dépouille (la peau) ;
- Après la dépouille et avant l'éviscération (la surface du carcasse) ;
- Après l'éviscération et avant d'entrer les carcasses dans les chambres de ressuyage ;

- Sur les carcasses dans la chambre de ressuyage ;
- Sur les carcasses dans la chambre de stockage.

Les prélèvements ont été réalisés selon la méthode normalisée NF ISO 17604, février 2004 : Microbiologie des aliments — Prélèvement d'échantillons sur des carcasses en vue de leur analyse microbiologique., par utilisation d'un gabarit carré stérile, délimitant une superficie interne creuse de 100 cm² (10 cm × 10 cm). Les échantillons ont été prélevés à l'aide des chiffonnettes (ATL, Hemeau, La chapelle-sur-Erdre, France) imbibées de neutralisant à 10% dans des sacs plastique stériles. Après le prélèvement, les chiffonnettes ont été réintroduites dans leurs emballages et stocké à 4°C pour analyse

Les prélèvements sur surfaces ont concerné les différents matériaux et ustensiles utilisés dans les différents ateliers avant, pendant et après les opérations d'abattage de chaque espèce d'animal, ainsi que dans les salles de ressuyage et de stockage. Les prélèvements ont été réalisés selon la méthode normalisée NF ISO 18593, décembre 2004 : Microbiologie des aliments — Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, au moyen de boîtes de contact et d'écouvillons. Les prélèvements de surface ont été effectués à l'aide de chiffonnettes (ATL) imbibées de solution neutralisante à 10% ou d'écouvillons (ATL) additionnés de Peptone sel + 10% de neutralisant respectivement pour les surfaces lisses et les surfaces à rugosités. La surface à prélever était délimitée par un carré de plastique stérile de 149 cm². La chiffonnette ou l'écouvillon était réintroduit(e) dans son emballage et stocké à 4°C pour analyse.

Les échantillons d'eau ont été prélevés aux robinets d'alimentation (1ers jets et suivants), ou en sortie de tuyaux en caoutchouc; les dernières eaux de rinçage des surfaces et matériels et les eaux de trempage des matériels avant, pendant et après le travail ont également été prélevées. Toutes ces eaux ont été recueillies en flacons stériles et stockées à 4°C avant analyses.

Enfin la contamination aéroportée des salles de travail, ressuyage et stockage a été évaluée par aspiration d'un volume d'air connu (et variable selon les points de prélèvement) au moyen de Biocollecteur d'air ambiant, Air Sampler SAS-super 100 (international pbi S.p.A. Via Novara, Milano, Italy). L'air aspiré compactait des boites de pétri emplies de gélose CFC (Biokar Diagnostics, Beauvais, France).

I.2.2. Préparation des échantillons, incubation et dénombrement

Tous les échantillons ont été préparés pour analyse selon la méthode normalisée NF EN ISO 6887-2, janvier 2004 : Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 2 : Règles spécifiques pour la préparation des viandes et produits à base de viande

Brièvement, les écouvillons étaient agités de manière à disperser les microorganismes dans l'eau peptonnée qui constituait alors la dilution 10^{-1} de l'échantillon de départ et était utilisée pour la réalisation des gammes de dilution.

Les chiffonnettes dans leur liquide de suspension étaient traitées par broyage durant 3 minutes au Stomacher et la suspension qui constituait alors la dilution 10^{-1} de l'échantillon de départ était utilisée pour la réalisation des gammes de dilution.

L'eau était filtrée sur membrane millipore 0,45 μm (Sartorius, Germany).

Tous les dénombrements ont été réalisés par étalement en surface des dilutions appropriées des échantillons sur milieu *Pseudomonas* Agar Base (Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, UK) additionné avec le supplément *Pseudomonas* CFC (Oxoid) et incubation durant 48 heures à 25°C. Ce protocole est celui décrit par la norme ISO 13720:1995, Décembre 1995 : Viande et produits à base de viande. Dénombrement des *Pseudomonas* spp.

Pour les échantillons d'eau, les volumes de 10 ml, 100 ml et 500 ml ont été filtrés à l'aide d'une rampe à filtration et les membranes de nitrate de cellulose déposées sur le milieu gélosé CFC.

Pour les échantillons de l'air ambiant, les boîtes de CFC impactées étaient récupérées et directement incubées à 25°C pendant 48 h pour dénombrement.

Toutes les colonies (pigmentées ou non) ont été dénombrées sur les boîtes de Petri qui en contenaient entre 30 et 300.

Lorsque cela était possible, les ensemencements ont été réalisés grâce à l'ensemencement Spiral (Whitly Automatic Spiral Plater, AES Laboratoire, Combourg, France) et dans ce cas, le dénombrement réalisé selon les abaques fournis par le fabricant.

Pour chaque type d'échantillon, les colonies morphologiquement différentes ont été récupérées et purifiées sur une gélose nutritive ordinaire (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Les souches ainsi isolées ont ensuite été reprises en culture liquide en bouillon nutritif (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) et stockées en tube eppendorf à - 80°C après l'addition du glycérol à la concentration finale 15%. Au Total, environ 350 isolats ont ainsi été mis en conservation.

I.2.3. Caractérisation phénotypique des isolats

La caractérisation phénotypique des isolats sélectionnés a été réalisé selon le protocole décrit dans la 2^{nde} édition du Bergey's manual of systematic bacteriology, à savoir :

- Test microscopique et morphologique
- Coloration de Gram
- Réaction d'oxydase et catalase
- Détermination le type de respiration (test de fermentation/oxydation de glucose en conditions anaérobie).

Toutes les bactéries de forme bacille, mobiles, à Gram négatif, présentant une réaction positive aux tests oxydase et catalase ainsi qu'un métabolisme uniquement oxydatif (non fermentaire) étaient retenus pour identification en galerie API 20 NE (BioMérieux, France).

Les tests étaient analysés et les résultats exprimés selon les recommandations du fournisseur.

II. Identification des isolats par la réaction Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

L'extraction de l'ADN des isolats identifiés phénotypiquement au genre *Pseudomonas* a été réalisée à l'aide des kits d'extraction d'ADN (MBI Fermentas, Mundolsheim, France). L'ADN extrait a été quantifié grâce à un spectrophotomètre Cary 100 Bio UV-Visible (Varian, Australie), et les concentrations ajustées, par la suite, de façon à obtenir des concentration entre 50 et 100 ng/µl (concentration nécessaire pour la réaction PCR), l'analyse par PCR a été réalisée selon Widmer et al (Widmer et al., 1998), en utilisant les amorces spécifiques pour l'identification des *Pseudomonas* au niveau du genre :

1. **PS-FOR: 5'-GGTCTGAGAGGATGATCAGT**
2. **PS-rev: 5'-TTAGCTCCACCTCGCGGC**

La réaction PCR a été exécutée en PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA), dans un volume final de 50 μ l contenant 0,5 mM de chaque amorce (PS-FOR et Ps-rev), 2,5 MgCl₂, 200 mM de chaque deoxyribonucleoside triphosphate, 1 U de *Taq* polymérase ADN, 1X tampon + NH₂SO₄ (MBI Fermentas, Mundolsheim, France) et \approx 50-100 ng d'ADN. Le mélange de réaction a été soumis aux cycles de température suivants : 2 min à 94°C (étape primaire), puis 30 cycles de 45 s à 92°C (dénaturation), 45 s à 60°C (hybridation), 2 min à 72°C (amplification) et une étape d'arrêt de 2 min à 72°C. 2,5 ml de produits de PCR ont été soumis à l'électrophorèse à 5 V / cm pour 1h sur un gel d'agarose 1,5% (Qbiogene, Illkrich, France) chargé de 1,3 mmol L⁻¹ de bromure d'éthidium (BET) (Qbiogene) en 1X Tris-Borate-EDTA tampon pH 8,3 (TBE). Le marqueur 100 bp DNA ladder, JulesTM, (Qbiogene) a été utilisé comme marqueur de taille moléculaire. Ont été considérées comme *Pseudomonas*, les souches qui montraient un produit PCR d'environ 990 bp de taille selon le protocole décrit par Widmer et collaborateurs (Widmer et al., 1998).

III. Préparation des échantillons et analyse par spectroscopie de fluorescence

III.1. Suspensions bactériennes et spectroscopie à angle droit

III.1.1. Préparation des souches

A partir du soucier congelé, les bactéries étaient cultivées en bouillon nutritif ordinaire jusqu'en phase exponentielle de croissance puis isolées sur gélose nutritive ordinaire et incubées durant 36 heures à 27°C en conditions aérobies. Plusieurs colonies étaient alors récupérées et suspendues dans 1 ml de l'eau physiologique (2 suspensions différentes par boîte). La suspension ainsi obtenue était centrifugée à 5000 rpm pendant 10 minutes à 4 °C. Ensuite, les culots étaient récupérés et lavés avec l'eau physiologique puis les suspensions centrifugées comme décrit précédemment; cette opération était répétée deux fois. Finalement, les culots étaient suspendus dans un volume défini de l'eau physiologique de façon à obtenir une densité optique $DO_{600nm} = 0,05$. La densité optique des suspensions bactériennes était mesurée grâce à un spectrophotomètre Cary 100 Bio UV-Visible (Varian, Australie). Ces suspensions étaient ensuite utilisées, pour l'analyse en spectroscopie de fluorescence.

A partir d'un stock congelé, les cultures sur milieu gélosé ont été réalisées en triple sur trois boîtes de Petri indépendantes. A partir de chaque boîte de Petri, deux suspensions bactériennes ont été préparées comme indiqué précédemment.

Au final, six spectres d'émission indépendants sont enregistrés pour chaque souche étudiée.

Remarque : Les deux lavages à l'eau physiologique permettent d'éliminer toutes les molécules du milieu et les métabolites sécrétés durant la croissance

III.1.2. Enregistrement des spectres de fluorescence.

Les spectres de fluorescence des suspensions bactériennes ont été obtenus grâce à un spectrofluorimètre FluoroMax-2 (Spex-Jobin Yvon, Longjumeau, France) équipé d'une cellule à angle droit. Les échantillons bactériens étaient placés dans des cuves en quartz. Les spectres d'émission de fluorescence (305-400 nm ; résolution 1 nm ; fentes : 3 nm) des résidus tryptophanes des protéines étaient enregistrés avec une longueur d'onde d'excitation de 270 nm. Un autre spectre d'émission de fluorescence a été enregistré (280-480 nm ; résolution 1 nm ; fentes : 3,5 nm) avec une longueur d'onde d'excitation de 250 nm. Dans ces conditions, un grand nombre de fluorophores peut être excité. Cette plage d'étude correspond principalement aux acides aminés aromatiques des protéines et aux nucléotides des acides nucléiques (AAA + AN). Une troisième série de spectres d'émission de fluorescence enregistrée entre (380-550 nm ; résolution 1 nm ; fentes 4 nm) après excitation de 340 nm correspondant aux NADH.

III.2. Analyse directe des colonies par la spectroscopie de fluorescence au moyen d'une fibre optique

Cette partie de travail est conçue pour développer l'utilisation de la méthode pour une acquisition directe des spectres de fluorescence à partir des colonies en milieu solide au moyen d'une fibre optique liée à la spectroscopie de fluorescence.

III.2.1. Préparation des souches

A partir du souchier congelé, les bactéries étaient cultivées en bouillon nutritif ordinaire jusqu'en phase exponentielle de croissance puis isolées sur gélose nutritive ordinaire et incubées à 27°C en conditions aérobies.. Afin d'étudier l'effet « age des colonies », les

incubations ont été testées pour des durées de 48, 72 ou 96 heures. Par la suite, une incubation de 48 heures a été préconisée.

Les colonies formées étaient ensuite directement analysées par utilisation d'une fibre optique.

Pour chaque souche quatre colonies indépendantes ont été analysées avec deux positions aléatoires de la fibre optique pour chaque colonie, finalement 8 spectres ont été acquis pour chaque souche (ou 3 spectres selon l'objectif de l'étude).

III.2.2. Enregistrement des spectres de fluorescence

Les spectres de fluorescence (asynchrone et synchrone) ont été obtenus grâce à un spectrofluorimètre FluoroMax-2 (Spex-Jobin Yvon, Longjumeau, France) lié à une fibre optique. La fibre optique était positionnée à 9 mm au-dessus des colonies de telle sorte que le faisceau de lumière ait un diamètre d'au moins de 2 mm.

III.2.2.1. Spectres de fluorescence asynchrone

Les spectres d'émission de fluorescence asynchrone ont été enregistrés comme décrit précédemment à savoir : pour le complexe AAA+ AN (280-450 nm; résolution: 1nm; fentes: 20 nm) par excitation à 250 nm; pour le NADH (375-550 nm ; résolution 1 nm ; fentes 20 nm) par excitation à 340 nm.

III.2.2.2. Spectres de fluorescence synchrone

Les spectres de fluorescence synchrone ont été enregistrés entre (250-500 nm, résolution 1 nm ;) par le balayage simultanément des monochromateurs d'excitation et d'émission. Par cette méthode, la longueur d'onde d'émission λ_{em} et la longueur d'onde d'excitation λ_{ex} varient simultanément, tout en conservant entre elles un décalage constant $\Delta\lambda = (\lambda_{em} - \lambda_{ex})$. Afin de déterminer le décalage $\Delta\lambda$ approprié, l'analyse a été menée dans un premier temps sur 2 souches de référence (*P. fragi* – CIP 55.4 et *P. putida* – CIP 52.191) pour des $\Delta\lambda$ variant de 20 à 150 nm avec un pas constant de 5 nm.

Dans un second temps, les $\Delta\lambda$ de 30, 50, 70, 90, 110 et 130 nm ont été comparés sur les souches de référence et finalement le $\Delta\lambda$ de 30 et $\Delta\lambda$ de 70nm ont été retenus pour l'analyse de l'ensemble des souches référence et sauvages.

IV. Traitements des données spectrales

Toutes les analyses ont été réalisées sur les spectres normalisés en réduisant l'aire soutendue par le spectre à une valeur égale à un (Bertrand et Scotter, 1992).

IV.1. Analyse en Composantes Principales (ACP)

L'analyse en composantes principales (ACP) a été utilisée en tant que méthode exploratoire destinée à évaluer l'information contenue dans les spectres recueillis (Herbert et al., 2000, Jolliffe, 1986) et investiguer la différence entre échantillons. L'analyse a été réalisée à partir de matrices d'analyse, chaque matrice d'analyse contenant les données spectrales pour un fluorophore (fluorescence asynchrone) ou un $\Delta\lambda$ (fluorescence synchrone). Les observation sont constituées par les spectres enregistrés (par exemple, 66 observations si 6 spectres/souche et 11 souches). Les variables étaient les valeurs (intensité de fluorescence rectifiée par normalisation) recueillies pour chaque longueur d'onde d'excitation (par exemple, 200, 170 et 95 variables pour les spectres de AAA+AN (280-480 nm), NADH (380-550 nm) et tryptophane (305-400 nm) respectivement en fluorescence asynchrone.

L'analyse en composantes principales permet de transformer les variables quantitatives initiales, toutes plus au moins corrélées entre elles, en nouvelles variables quantitatives, non corrélées, appelées composantes principales (Bertrand et al., 2006), condensant ainsi les informations contenues dans les spectres. Dans nos expérimentations, 10 voire 12 composantes ont, en général, été largement suffisantes pour résumer l'information utile, permettant ainsi la réduction de la taille de la matrice de données d'un facteur 10 à 100.

Les données condensées par l'ACP ont servi de variable de base à d'autres traitements statistiques comme l'Analyse Factorielle Discriminante (AFD).

IV.2. La classification hiérarchique ascendante (CHA)

La classification hiérarchique a été réalisée sur les spectres normalisés des souches en utilisant la méthode de ward et la distance euclidienne, les résultats ont été visualisés sous forme d'un dendrogramme.

IV.3. Analyse factorielle discriminante (AFD)

L'analyse factorielle discriminante a été utilisée ici afin de décrire et prédire l'appartenance d'individus (ici les souches représentées par leurs spectres de fluorescence) à

des groupes prédéfinis. Globalement, les groupes prédéfinis correspondaient à un genre ou une espèce bactérienne en fonction du niveau taxonomique choisi pour la discrimination entre les souches.

Afin d'étudier la robustesse du modèle une étape de validation a été effectuée, les données spectrales ont été divisées en 2 jeux de données (Herbert et al., 2000, Herbert et al., 1999) : un jeu de calibration et un jeu de vérification (validation), ainsi, la pertinence de la règle d'affectation définie au moyen du jeu de calibration est vérifiée à l'aide du jeu de validation. La validation consiste à comparer la prédiction d'appartenance à un groupe à l'indication de groupe réellement observée pour chacun des individus du jeu de vérification. Ces deux jeux ont été obtenus par division des données spectrales pour chaque souche en 2 groupes. Lorsque 6 spectres étaient enregistrés pour chaque souche et chaque condition d'acquisition, 4 spectres étaient attribués aléatoirement au groupe de calibration et 2 spectres au groupe de validation.

Chaque individu est caractérisé par un ensemble de p variables quantitatives. Les individus sont également caractérisés par une variable qualitative qui définit leur appartenance à un groupe ou une classe d'individus. L'AFD va créer de nouvelles variables appelées "facteurs discriminants" qui seront des combinaisons linéaires des variables d'origine et qui permettent de séparer au mieux les groupes d'individus (Lebart et al., 1977). Les facteurs discriminants sont calculés de telle façon que :

- La variance à l'intérieur de chaque groupe soit minimum.
- La variance entre les groupes soit maximum.

Après le calcul des facteurs discriminants, les individus du jeu de validation peuvent être réaffectés aux différents groupes. Pour chaque individu, la distance qui le sépare des différents centres de gravité de chaque groupe est calculée. L'individu est affecté au groupe pour lequel cette distance est la plus courte. La comparaison du groupe d'affectation par rapport au groupe réel est un indicateur de la qualité de la discrimination des groupes.

La qualité de la prédiction est estimée par comparaison des groupes d'affectations avec les groupes réels. Le pourcentage d'échantillons correctement classés est calculé en comptant le nombre d'échantillons correctement affectés et en comparant ce nombre au nombre total d'échantillons. Un tableau d'affectation des échantillons permet d'indiquer les groupes les mieux discriminés et les confusions entre les groupes (Karoui, 2004).

Dans la majorité des cas, l'AFD était menée sur les 10 ou 12 premières composantes principales résultant de l'ACP effectué sur les spectres de fluorescence normalisés.

IV.4. Analyse de variance (ANOVA)

Dans notre étude, l'Analyse de Variance a été utilisée afin d'évaluer si les différences spectrales observées pour une même souche selon la position de la fibre optique ou l'âge des colonies étaient significatives au regard des variations observées entre 2 souches.

Lorsque l'analyse a été menée pour les spectres NADH recueillis entre 375 et 550 nm (gamme de scan : 1 nm^{-1}) à partir de 11 souches et pour chacune d'elle à partir de 4 colonies, 2 positions de fibre, après 3 durées d'incubation, le modèle utilisé pouvait être exprimé de la façon suivante : $X_{i,j,k,l,n} = \mu + TC_i + E_j + C_k + PF_l + \varepsilon_n$

où $X_{i,j,k,l,n}$ étaient les longueurs d'ondes des spectres recueillis; TC les temps de culture (ou durée d'incubation) avec $i = 3$; E l'espèce concernée $j = 11$, C la colonie avec $k = 4$ et PF la position de la fibre avec $l = 2$.

Dans ce cas de figure, au total, 175 ANOVAs ont été réalisées à partir de 264 spectres individuels.

Une analyse similaire a été menée pour 37 souches de référence dont les spectres ont été recueillis par fluorescence synchrone ($\Delta\lambda = 30 \text{ nm}$) après 48 heures d'incubation comme décrit précédemment. Dans ce cas l'Anova pouvait être décrite par le modèle : $X_{i,j,n} = \mu + E_i + C_j + \varepsilon_n$

où $X_{i,j,n}$ sont les longueurs d'ondes des spectres de fluorescence synchrone pour $\Delta\lambda = 30 \text{ nm}$ recueillies entre 250-500 nm; E l'espèce avec $i = 37$ et C la Colonie avec $j = 3$.

Dans ce cas de figure, ce sont au total, 250 ANOVAs qui ont été réalisées à partir de 111 spectres individuels.

Pour repérer directement sur les spectres les zones significativement influencées par les facteurs étudiés, les ANOVAs correspondants ont été construits et superposés aux spectres moyens des spectres de fluorescence obtenus dans chaque expérimentation (pour un fluorophore donné ou un $\Delta\lambda$ donné).

Les traitements des données ont été réalisés en utilisant le logiciel XLStat-pro (Addinsoft, Paris, France) et le logiciel statistica.

RESULTATS & DISCUSSIONS : CHAPITRE 1

Présentation des potentialités de la spectroscopie de fluorescence pour la taxonomie des *Pseudomonas*

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication :

Fluorescence spectroscopy as a promising tool for a polyphasic approach to pseudomonad taxonomy. Tourkya B, Boubellouta T, Dufour E, Leriche F. Curr Microbiol. (2009) 58 : 39-46

I. Contexte / Objectifs

Au sein de l'Unité de Recherches « Typicité des produits alimentaires » et sous l'égide du Professeur Eric Dufour, la spectroscopie de fluorescence a fait l'objet de travaux intensifs quant à son principe et ses applications éventuelles dans le domaine agroalimentaire (Allais et al., 2006, Boubellouta et Dufour, 2008, Dufour et al., 2006, Karoui et al., 2007, Karoui et al., 2007, Karoui et al., 2007, Karoui et al., 2006, Karoui et al., 2006, Le Moigne et al., 2008, Le Moigne et al., 2008). Mais l'exploitation de la méthode pour la caractérisation des micro-organismes n'avait été que peu explorée. En 2002, L. Leblanc et E. Dufour (Leblanc and Dufour, 2002) avaient cependant présenté une étude mettant en évidence sa fiabilité pour la discrimination de 5 souches de collection appartenant à des taxons distants (*Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Kocuria varians* et *Listeria monocytogenes*) mais aussi de 7 souches de *Lactobacillus* et 5 souches de *Staphylococcus* présentant des profils métaboliques nettement distincts.

Dans le même temps, le Dr Françoise Leriche s'attachait à évaluer la prévalence et le comportement des flores d'altération dans les matrices alimentaires et leur environnement et était confrontée aux limites des outils disponibles pour la caractérisation des *Pseudomonads*.

L'objectif du travail présenté dans ce premier article était donc d'évaluer les potentialités de la spectroscopie de fluorescence pour discriminer des souches de collection et des isolats appartenant à ce groupe particulièrement complexe.

II. Matériel et méthodes

Les 11 souches de référence sont issues de la collection de l'Institut Pasteur (CIP) et ont été choisies de manière à représenter des taxons phylogénétiquement distincts : *Burkholderia cepacia*- CIP 80.24, *Xanthomonas campestris* – CIP 100069, *Stenotrophomonas maltophilia*- CIP 60.77, et au sein du groupe de gammaproteobactéria des taxons bien distincts (*P. stutzeri* – CIP 103022 versus *P. chlororaphis* – CIP 63.22 ou *P. pseudoalcaligenes* – CIP 66.14) ou enfin des taxons très proches qui font l'objet de nombreuses interrogations quant à leur position taxonomique (*P. chlororaphis*, *P. fragi* – CIP 55.4, *P. lundensis* – CIP 103272, *P. taetrolens* – CIP 103299, *P. fluorescens* – CIP 69.13 et *P. putida* – CIP 52.191).

21 isolats ont été ajoutés à l'étude afin d'évaluer la pertinence de la méthode sur des souches ayant subi des pressions environnementales et donc très probablement des modifications adaptatives susceptibles d'induire des variations phénotypiques par rapport aux souches de référence les plus proches (Spiers et al., 2000). Ces isolats ont été identifiés au niveau du genre par PCR selon le protocole décrit par Widmer et al (Widmer et al., 1998).

Les spectres de fluorescence ont été recueillis à partir de suspensions bactériennes préparées par lavages répétées de colonies bactériennes reprises en solution saline. Dans ces conditions, les métabolites primaires et secondaires secrétés par les bactéries durant leur croissance sur milieu gélosé sont éliminés par les étapes de lavage, tandis que les exopolysaccharides sont inégalement éliminés selon leur force d'attachement. Par ailleurs, la suspension est constituée de bactéries en mélange hétérogène au regard de leur état physiologique (ce point sera discuté ultérieurement).

Les spectres de fluorescence des suspensions bactériennes ont été obtenus grâce à un spectrofluorimètre FluoroMax-2 (Spex-Jobin Yvon, Longjumeau, France) équipé d'une cellule à angle droit. Les spectres d'émission de fluorescence des résidus tryptophane des acides aminés aromatiques des protéines et des nucléotides des acides nucléiques (AAA + AN) et enfin du NADH selon le protocole décrit en matériels et méthodes.

L'analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée à partir de matrices d'analyse, chaque matrice d'analyse contenant les données spectrales pour un fluorophore. Les observations sont constituées par les spectres enregistrés (par exemple, 66 observations si 6 spectres/souche et 11 souches). Les variables sont les valeurs d'intensité de fluorescence (rectifiée par normalisation) recueillies pour chaque longueur d'onde d'excitation, (par

exemple et respectivement, 200, 170 et 95 variables pour les spectres de AAA+AN (280-480 nm), NADH (380-550 nm) et tryptophane (305-400 nm).

L'analyse factorielle discriminante a été réalisée sur les données spectrales à partir des 12 premières composantes identifiées par ACP. Afin d'étudier la robustesse du modèle une étape de validation a été effectuée, les données spectrales ont été divisées en 2 jeux de données (Herbert et al., 2000, Herbert et al., 1999) : Un jeu de calibration et un jeu de vérification (validation). La pertinence de la règle d'affectation définie au moyen du jeu de calibration est vérifiée à l'aide du jeu de validation. La validation consiste à comparer la prédiction d'appartenance à un groupe à l'indication de groupe réellement observée pour chacun des individus du jeu de vérification. C'est deux jeux ont été obtenus par division des données spectrales pour chaque souche en 2 groupes. Lorsque 6 spectres étaient enregistrés pour chaque souche et chaque condition d'acquisition, 4 spectres étaient attribués aléatoirement au groupe de calibration et 2 spectres au groupe de validation.

III. Résultats/ discussion

Les résultats présentés dans cet article peuvent se résumer de la façon suivante :

Les spectres de fluorescence générés par excitation des 3 fluorophores choisis sont identitaires des bactéries étudiées et les différences observées entre souches semblent suffisamment sensibles pour autoriser leur distinction par traitement chimiométrique approprié.

Le traitement des données par analyse en composantes principales puis analyse factorielle discriminante, autorise un excellent clustering des souches de référence que ce soit au niveau du genre ou au niveau des espèces. Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés par analyse des données en cross-validation.

Ce même traitement des données permet également d'étudier plus précisément les proximités entre souches et pourrait donc être d'un intérêt certain pour une approche de la taxonomie des Pseudomonads. Ce point sera discuté en troisième partie de ce rapport.

Aucune différence significative au regard du pouvoir discriminant de la méthode n'a été observée quant à l'utilisation des fluorophores (AAA + AN) ou NADH ou enfin Tryptophane.

Le fait que le « marqueur » NADH soit pertinent pour la caractérisation des bactéries à partir de colonies reprises en eau physiologique et lavage est encourageant pour la suite de nos travaux à savoir une caractérisation directe des colonies par fibre optique.

Enfin, la spectroscopie de fluorescence, dans les conditions expérimentales décrites, permet une identification aisée d'isolats. Les résultats obtenus sur les 21 isolats inclus dans l'étude apparaissent cohérents avec ceux issus des méthodes relevant de la biologie moléculaire (analyse par PCR sur amorces ARN 16S) et apportent des informations complémentaires à ceux obtenus par identification sur galerie API 20 NE.

RESULTATS & DISCUSSIONS : CHAPITRE 2

Lecture directe des colonies par fibre optique couplée au spectroscope de fluorescence : Mise au point des conditions expérimentales

Ce chapitre a fait l'objet d'un article

Discrimination of Pseudomonas and related species using optic fiber-based in situ fluorescence spectroscopy of colonies (soumis au Canadian Journal of Microbiology)

I. Contexte /objectifs

Pour le travail présenté dans ce second article (soumis au Canadian Journal of Microbiology le 3 avril 09) notre objectif a été de mettre au point les conditions expérimentales pour une lecture directe des colonies bactériennes par fibre optique reliée au spectroscope de fluorescence. Le modèle est bien sûr resté celui des flores Pseudomonads, mais l'analyse a été étendue à 37 souches de référence issues de la collection de l'institut Pasteur et de la German Collection of Micro-organisms and Cell Cultures (DSM). Le choix des souches de référence a été guidé, comme dans l'article précédent, par une diversité des proximités taxonomiques entre souches mais également par le choix d'espèces testées en séquençage sur ARN 16S par référence à l'étude de Y. Anzai (Anzai et al., 2000). La représentativité de taxons "non" *Pseudomonas* a été maintenue (*Burkholderia cepacia*, *Xanthomonas campestris*, et *Stenotrophomonas maltophilia*), et au sein des *Pseudomonas*, des espèces distantes (*P. stutzeri* versus *P. chlororaphis*) aussi bien que des espèces proches comme *P. chlororaphis*, *P. fragi*, *P. lundensis* et *P. taetrolens*. Plusieurs biotypes ou biovars d'une même espèce ont également été inclus (*P. putida*: 3 souches, *P. fluorescens*: 4 souches, *P. fragi*: 2 souches, *P. chlororaphis*: 2 souches, *P. stutzeri*: 2 souches, *P. syringae*: 2 souches).

Notre plus forte interrogation concernait les problèmes liés à l'hétérogénéité structurelle qui règne au sein des colonies bactériennes. En effet, depuis les travaux initiés par Shapiro et ses collaborateurs dans les années 80, (Shapiro, 1985, Shapiro, 1987, Shapiro, 1995, Shapiro,

1998, Shapiro, 2007), il est généralement admis que les bactéries organisées en colonies forment des complexes extrêmement hétérogènes tant sur le plan génotypique que sur le plan phénotypique (Ben-Jacob et al., 1998, Ben-Jacob et al., 2003). Ces variations peuvent être dues à l'âge des bactéries (les bactéries les plus âgées en phase stationnaire de croissance se trouvent au cœur de la colonie et les plus jeunes en phase exponentielle de croissance en périphérie de la colonie) mais surtout à des répartitions fonctionnelles dédiées (Mikkelsen et al., 2007). Par ailleurs, des changements de phase entre les morphotypes R et S des colonies de *Pseudomonas* sont fréquemment observés (Velianov et al., 1982) pouvant conduire à une hétérogénéité visuelle des colonies (Velianov et al., 1982). Enfin, la production intense de matrices polysaccharidiques par les bactéries organisées en biofilms ou en colonies (les colonies étant considérées comme des biofilms) (Costerton, 1995, Costerton et al., 1995, Stoodley et al., 2002) est susceptible de masquer nombre de caractères identitaires des bactéries. En effet, ces matrices souvent composées majoritairement de polysaccharides, renferment également quelques macromolécules (AND, ARN, protéines...) et de nombreuses petites molécules provenant du milieu extérieur ou du métabolisme des bactéries en croissance (métabolites primaires ou secondaires) (Ma et al., 2009, Macé et al., 2008).

Ces dernières années, quelques méthodes spectroscopiques ont été utilisées pour décrire l'organisation des bactéries en colonies (Goodwin et al., 2006, Lawrence et al., 1991). C'est ainsi que L.P. Choo-smith et ses collaborateurs ont comparé des données spectrales recueillies à partir de la périphérie, du centre et d'une zone intermédiaire de microcolonies de 2 souches de référence d'*Escherichia coli* ainsi que de 2 souches de référence de *Staphylococcus aureus*. Les auteurs ont utilisé 3 méthodes relevant de la microspectroscopie : la microspectroscopie Raman, la microspectroscopie infra-rouge et la microspectroscopie de fluorescence. Pour l'analyse par microspectroscopie de Raman, les colonies étaient directement lues sur milieu gélosé de croissance après 24 heures d'incubation, pour l'analyse par infra-rouge, les colonies étaient transférées sur platine de zinc, et pour l'analyse par microspectroscopie de fluorescence, les colonies étaient transférées sur plaque de verre et les spectres enregistrés après excitation à 360 nm. Les auteurs ont constaté que l'hétérogénéité des colonies apparaît significativement après 6 heures d'incubation suggérant ainsi que les analyses soient réalisées dans ces conditions. Concernant l'analyse par spectroscopie de fluorescence, le pic spectral était aux alentours de 442 nm pour le centre de la colonie d'*E. coli*, mais les spectres présentaient plutôt un épaulement suggérant la superposition de 2 maxima vers 442 et 451 nm quand les données étaient recueillies en zone périphérique des colonies. L'hétérogénéité était

déjà décelable à 6 heures d'incubation. Les auteurs suggéraient donc que cette dernière méthode n'était pas pertinente pour une discrimination taxonomique des bactéries étudiées.

Au vu de ces données, nos interrogations majeures portaient sur les points suivants :

Compte tenu de l'hétérogénéité qui règne au sein d'une population bactérienne, même clonale organisée en colonie, des modifications mineures dans la position de la fibre optique ne peuvent-elles entraîner la non répétabilité des mesures ?

Compte-tenu de la rapidité d'évolution des populations bactériennes organisées en colonies, la reproductibilité des mesures reposerait t-elle sur une lecture par fibre optique à temps d'incubation fixes et définis pour chaque espèce (en relation avec son temps de génération durant la période de d'incubation) ?

La production de sidérophores par certaines bactéries serait-elle susceptible d'introduire un biais dans l'analyse ?

La production de substances polysaccharidiques fréquemment rencontrée chez les *Pseudomonads*, n'est-elle pas susceptible de masquer les caractères identifiants des bactéries en colonie ?

Par ailleurs, nous souhaitons définir, en vue de standardisation, les conditions d'excitation et d'émission les meilleures.

Pour répondre à ces questionnements, le plan expérimental a été le suivant :

II. Matériel et méthodes

Dans un premier temps, l'analyse a porté sur les 11 souches suivantes : *Burkholderia cepacia*- CIP 80.24, *Xanthomonas campestris* – CIP 100069, *Stenotrophomonas maltophilia* - CIP 60.77, *P. stutzeri* – CIP 103022, *P. chlororaphis* – CIP 63.22, *P. pseudoalcaligenes* – CIP 66.14, *P. fragi* – CIP 55.4, *P. lundensis* –CIP 103272, *P. taetrolens* – CIP 103299, *P. fluorescens* – CIP 69.13 et *P. putida* – CIP 52.191.

Après décongélation les souches ont été mises en croissance en bouillon nutritif ordinaire puis sur milieu gélosé ordinaire (Nutrient agar Medium, Biokar diagnostic) par incubation à 27°C.

Pour chaque souche, à partir du même « bouillon de croissance », 3 boîtes de Pétri étaient ensemencées et mises en incubation de façon à pouvoir mener l'analyse après 3 durées d'incubation (48, 72 et 96 heures).

A partir de chaque boîte de Petri, 4 colonies étaient ensuite analysées, pour 2 positions aléatoires et différentes de la fibre optique (tout en veillant à ce que le faisceau de la fibre optique ne déborde pas de la colonie).

A chaque fois, 2 spectres d'émission étaient enregistrés, l'un entre 280 et 450 nm après excitation à 250 nm (AAA+NA) et l'autre entre 375 et 550 nm après excitation à 340 nm (NADH).

Une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée a été utilisée afin d'évaluer si les différences spectrales observées pour une même souche selon la position de la fibre optique ou l'âge des colonies étaient significatives au regard des variations observées entre 2 souches.

Dans cet article, l'analyse a été menée pour les spectres NADH recueillis entre 375 et 550 nm (gamme de scan : 1 nm^{-1}) à partir de 11 souches et pour chacune d'elle à partir de 4 colonies, 2 positions de fibre, après 3 durées d'incubation. Dans ce cas de figure, au total, 175 ANOVAs ont été réalisées à partir de 264 spectres individuels.

Pour l'analyse de données en composantes principales, la logique a été celle décrite dans l'article précédent : Pour la discrimination au niveau du genre quatre groupes ont été créés (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Xanthomonas* et *Stenotrophomonas*), pour la discrimination au niveau d'espèce, huit groupes ont été créés correspondant aux 8 espèces de *Pseudomonas* incluses dans l'étude (*stutzeri*, *lundensis*, *taetrolens*, *putida*, *fragi*, *chlororaphis*, *pseudoalcaligenes*, *fluorescens*) et enfin pour évaluer la discrimination de l'ensemble des souches (dite genre-espèce), 11 groupes ont été créés (*Burkholderia*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *P.stutzeri*, *P.lundensis*, *P.taetrolens*, *P.putida*, *P.fragi*, *P.chlororaphis*, *P.pseudoalcaligenes*, *P.fluorescens*).

L'AFD a été réalisé sur les 10 premières composantes principales déterminées par l'ACP. Elle a d'abord été menée sur les données de chacun des temps d'incubation (48h, 72h et 96h)

séparément. Au niveau du genre et au niveau du genre-espèce, chaque matrice consiste en 88 observations (11 souches x 8 spectres par souche) et en 10 variables (10 composantes principales). Au niveau d'espèce chaque matrice consiste en 64 observations (8 souches x 8 spectres par souche) et en 10 variables (10 composantes principales).

Ensuite, les données de trois temps de culture (âges de colonies) ont été introduits dans la même matrice (48h+72h+96h). Avant de réaliser l'AFD, des groupes ont été créés selon les différents niveaux de classification.. Au niveau du genre et au niveau du genre-espèce, chaque matrice d'analyse consiste en 264 observations (11 souches x 3 temps de culture x 8 spectres par souche) et en 10 variables (10 composantes principales). Au niveau d'espèce, chaque matrice d'analyse consiste en 192 observations (8 souches x 3 temps de culture x 8 spectres par souche) et en 10 variables (10 composantes principales).

Dans un second temps, nous souhaitons tester le pouvoir discriminant de la méthode en nous appuyant sur une analyse des colonies bactériennes par spectroscopie de fluorescence synchrone. Cette méthode est fréquemment utilisée dans les secteurs de la pétrochimie par exemple (Hua et al., 2006, Nevin et al., 2008), pour analyser la concentration ou la structure moléculaire de certains composés à structure aromatique. Par contre, aucune publication scientifique ne faisait état de son utilisation à des fins de caractérisation des micro-organismes. Pourtant, l'intérêt de cette méthode nous semblait indéniable dans la mesure où la spectroscopie de fluorescence synchrone présente l'avantage de pouvoir enregistrer les signaux de plusieurs fluorophores simultanément à partir d'une seule acquisition. En effet, par cette méthode, la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission varient simultanément, tout en conservant entre elles un décalage constant, $\Delta\lambda$ (Peuravuori et al., 2002, Rubio et al., 1986, Taylor et Patterson, 1987). Pratiquement, on choisit une longueur d'onde d'émission (λ_{em}) de départ supérieure de quelques nanomètre à la longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}). Puis les deux monochromateurs se mettent en route et défilent à la même vitesse. On peut jouer sur le rapport des deux bandes passantes, en fixant par exemple une petite bande à l'excitation pour que la structure soit bien résolue et une bande plus importante à l'émission pour augmenter la sensibilité. Les spectres synchrones sont plus riches en informations que les spectres d'excitation et d'émission.

L'analyse a d'abord porté sur 2 souches de référence, à savoir, *P. fragi* – CIP 55.4 et *P. putida* – CIP 52.191 et nous avons fait varier le $\Delta\lambda$ entre 20 et 150 nm avec un pas constant de 5 nm.

Puis, les $\Delta\lambda$ de 30, 50, 70, 90, 110, et 130 nm avec un pas constant de 5 nm, ont été utilisés pour analyser les 11 souches de référence de la première partie de cette étude.

Enfin, les $\Delta\lambda$ de 30 et 70 nm ont été sélectionnés pour analyser les 37 souches de référence précédemment évoquées. Dans l'article seuls les résultats obtenus en $\Delta\lambda$ de 30 nm ont été présentés.

Pour chaque souche, 3 spectres de fluorescence synchrone ont été enregistrés à partir de 3 colonies différentes issues de croissance sur gélose nutritive ordinaire après 48 heures d'incubation à 27°C.

L'analyse en composantes principales a été appliquée aux spectres de fluorescence synchrone normalisés de chaque $\Delta\lambda$ mesuré séparément. La logique de création des groupes a été celle décrite précédemment. Chaque matrice consistait en 33 observations (11 souches x 3 spectres par souche) et en 250 variables dans le cas de l'analyse de 11 souches avec $\Delta\lambda$ de 30, 50, 70, 90, 110 et 130 nm), ou 111 observations (37 souches x 3 spectres par souches) et $\Delta\lambda$ 70 nm et en 250 variables dans le cas d'analyse d'analyse de 37 souches avec $\Delta\lambda$ de 30 nm.

L'AFD, a été réalisée sur les données de chaque $\Delta\lambda$ séparément. Ainsi, par exemple, pour l'analyse au niveau d'espèce, 37 groupes ont été créés correspondant aux 37 souches utilisées et chaque matrice consistait en 111 observations (37 souches x 3 spectres par souche).

III. Résultats/ discussion

Les résultats que nous avons obtenus ont permis de montrer que la position de la fibre optique vis à vis de la colonie bactérienne n'avait aucune incidence significative sur le spectre obtenu.

De même aucune différence significative n'a été décelée pour des colonies ayant 48 ou 72 heures d'incubation. La méthode autorise donc une marge de manœuvre confortable pour l'expérimentateur.

Enfin, si le % de correcte classification au niveau du genre et de l'espèce atteint 100% par utilisation du NADH en tant que fluorophore, nous suggérons l'utilisation de la spectroscopie de fluorescence synchrone avec un $\Delta\lambda$ constant de 30 nm qui permet d'obtenir les mêmes scores jusqu'au niveau de la sous-espèce.

Certains détails expérimentaux peuvent tout de même être précisés :

Les essais réalisés sur le milieu de culture (hors colonie) ont montré l'absence de bruit de fond susceptible d'induire un biais dans les résultats.

Les essais réalisés sur des colonies s'étant développé sur un milieu favorisant la production de sidérophores (milieu carencé en fer) se sont révélés décevants dans la mesure où les spectres obtenus étaient très largement dominés par l'absorption des pigments aromatiques. Ce point pourrait néanmoins faire l'objet d'explorations complémentaires pour une discrimination des Pseudomonads sur la seule base de la nature de leur sidérophore par référence aux travaux de J.M. Meyer (Meyer et al., 2007).

Le manque d'homogénéité visible de certaines colonies (par changement de phase ou par nature intrinsèque) n'entache pas les résultats d'analyse.

Les applications potentielles de la spectroscopie dans le domaine de la microbiologie et au regard de nos expérimentations sont présentées dans le chapitre suivant de ce document.

RÉSULTATS & DISCUSSIONS : CHAPITRE 3

Quelques exemples d'application de la spectroscopie de fluorescence pour la caractérisation des Pseudomonads

I. Introduction

Les deux premières parties de nos résultats présentaient les potentialités et la mise au point expérimentale de la spectroscopie de fluorescence pour la caractérisation des microorganismes. Nous souhaitons, dans ce troisième chapitre présenter certaines des utilisations possibles de cette méthode (couplée aux outils statistiques relevant de la chimiométrie) pour la caractérisation des Pseudomonads. Ce chapitre s'articule ainsi en trois parties :

- La première s'attache au positionnement taxonomique de 37 souches de référence à partir des spectres de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30 nm et $\Delta\lambda$ de 70 nm) obtenus en lecture directe des colonies par fibre optique.
- La seconde présente la démarche d'identification de 58 souches isolées sur gélose sélective CFC à partir de différents points d'un abattoir, les données spectrales ayant été recueillies en spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30 nm) par lecture directe des colonies à l'aide d'une fibre optique.
- La troisième partie s'appuie sur les données spectrales recueillies à partir de 133 souches isolées sur gélose CFC à partir de différents points de deux abattoirs, pour tracer l'origine des contaminations dans les abattoirs et mettre en évidence l'existence d'un « microbisme » d'atelier. Les données spectrales ont été recueillies en spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30 nm) par lecture directe des colonies à l'aide d'une fibre optique.

II. Analyse du positionnement taxonomique de 37 souches de référence sur la base des données spectrales recueillies par fluorescence synchrone en lecture directe des colonies par fibre optique

L'objectif du travail présenté dans ce paragraphe a été d'évaluer les potentialités de la spectroscopie de fluorescence pour une analyse des proximités taxonomiques au sein des Gammaproteobacteria. Cette analyse a porté sur 37 souches de référence dont le choix a été guidé (comme décrit la seconde partie de ce chapitre) par une diversité des proximités taxonomiques entre souches mais également par le choix d'espèces testées en séquençage sur ARN 16S par référence à l'étude de Y. Anzai (Anzai et al., 2000). La représentativité de taxons "non" *Pseudomonas* a été maintenue (*Burkholderia cepacia*, *Xanthomonas campestris*, et *Stenotrophomonas maltophilia*), et au sein des *Pseudomonas*, des espèces distantes (*P. stutzeri* versus *P. chlororaphis*) aussi bien que des espèces proches comme *P. chlororaphis*, *P. fragi*, *P. lundensis* et *P. taetrolens*. Plusieurs biotypes ou biovars d'une même espèce ont également été inclus (*P. putida*: 3 souches, *P. fluorescens*: 4 souches, *P. fragi*: 2 souches, *P. chlororaphis*: 2 souches, *P. stutzeri*: 2 souches, *P. syringae*: 2 souches).

Dans un premier temps nous nous sommes appuyés sur les méthodes descriptives que sont l'analyse en composantes principales et l'analyse factorielle discriminante pour investiguer les différences et proximités des données spectrales (Herbert et al., 2000, Jolliffe, 1986). L'ACP, réalisée sur les spectres normés, a permis de sélectionner les dix premières composantes principales à partir desquelles, l'AFD a été réalisée. Les 37 groupes formés en vue de réalisation de l'AFD ont été composés sur la base des données spectrales recueillies à partir des 37 souches de référence. Les codes utilisés pour les souches de référence sont présentés en Tableau 3.

II.1. Fluorescence synchrone avec $\Delta\lambda$ de 30 nm

Sur la carte factorielle présentée en figure 18, les deux facteurs F1 et F2 ne représentent que 62,7 % de la variance totale. Ils permettent cependant une bonne discrimination de la majorité des souches. Seules les souches *P. stutzeri*1, *P. lundensis*, *P. taetrolens*, *P. putida*, *P. fragi* 1, *P. fluorescens*, *P. fragi* 2, *P. mentelii*, *P. orientalis*, *P. cichorii*, *P. marginalis*, *P.*

stutzeri 2 et *P. putida* B forment un groupe compact non différencié par la seule projection en 2 dimensions. Le facteur discriminant F3 qui présente 11,8 % de la variance totale permet une discrimination correcte de ces souches entre elles (résultats non présentés).

Cette première analyse simple confirme le potentiel discriminant de la spectroscopie de fluorescence dans les conditions utilisées.

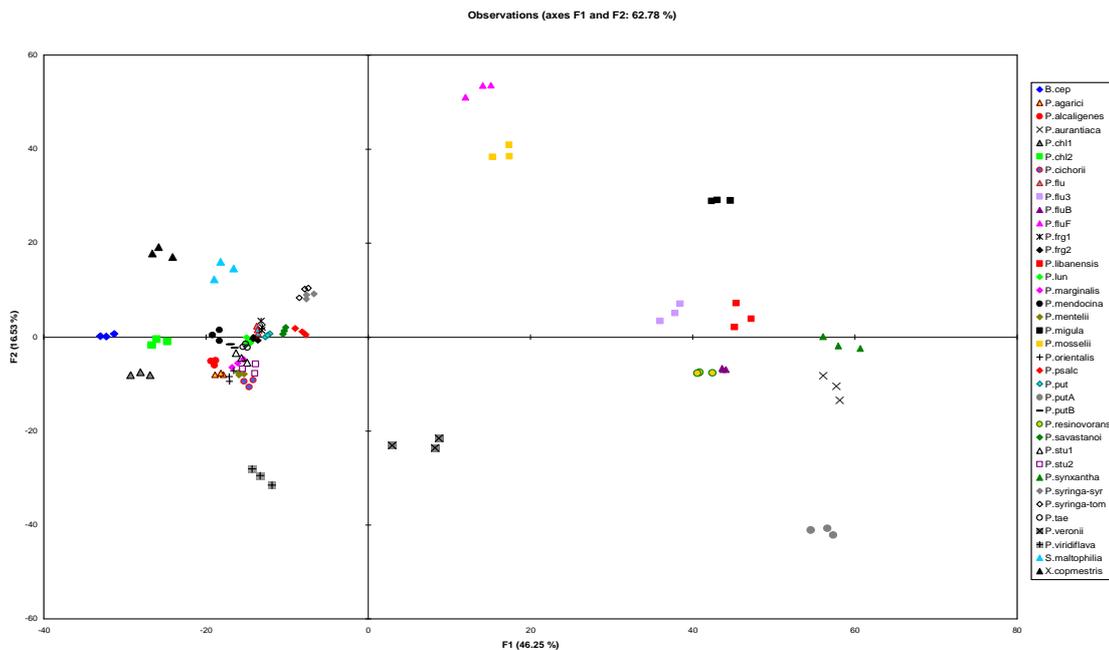


Figure 18 : Carte factorielle de l'AFD réalisée sur les données spectrales de 37 souches de référence recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30 nm).

Si l'on s'intéresse plus précisément aux souches de référence pour lesquelles plusieurs biovars ou biotypes étaient inclus dans notre analyse (*Pseudomonas fluorescence* avec P.flu : *P. fluorescens* CIP 69.13, P.fluB : *P. fluorescens* biotypeB CIP 104377, P.fluF : *P. fluorescens* biotypeF CIP 59.27, P.flu3 ou P.fluIII : *P. fluorescens* biotype III DSM 50124), *Pseudomonas putida* (P.put : *P. putida* CIP 52.191, P.putA : *P. putida* biotype A DSM 50208, P.putB : *P. putida* biotype B DSM 50222), *Pseudomonas fragi* (P.frg1 : *P. fragi* CIP 55.4, P.frg2 : *P. fragi* CIP 60.46), *Pseudomonas chlororaphis* : P.chl1 : *P. chlororaphis* CIP 63.22, P.chl2 : *P. chlororaphis* DSM 50139), *Pseudomonas stutzeri* (P.stut1 : *P. stutzeri* CIP 103022, P.stut2 : *P. stutzeri* CIP 107689), *Pseudomonas syringae* (P.syr-syr : *P. syringae* pvar *syringae* DSM 10604, P.syr-tom : *P. syringae* pvar *tomato* DSM 50315), on constate que cette méthode s'avère également très performante.

La figure 19 présente leur positionnement sur la carte factorielle résultant de l'AFD.

Pour les espèces *P. fragi*, *P. chlororaphis*, *P. stutzeri* et *P. syringae* les résultats confirment la proximité des biovars ou biotypes au sein des taxons puisque les données spectrales affichent de positionnements très rapprochés sur la carte factorielle (*P.frg1* et *P.frg2*, *P.chl1* et *P.chl2*, *P.stut1* et *P.stut2*, *P.syr-syr* et *P.syr-tom*).

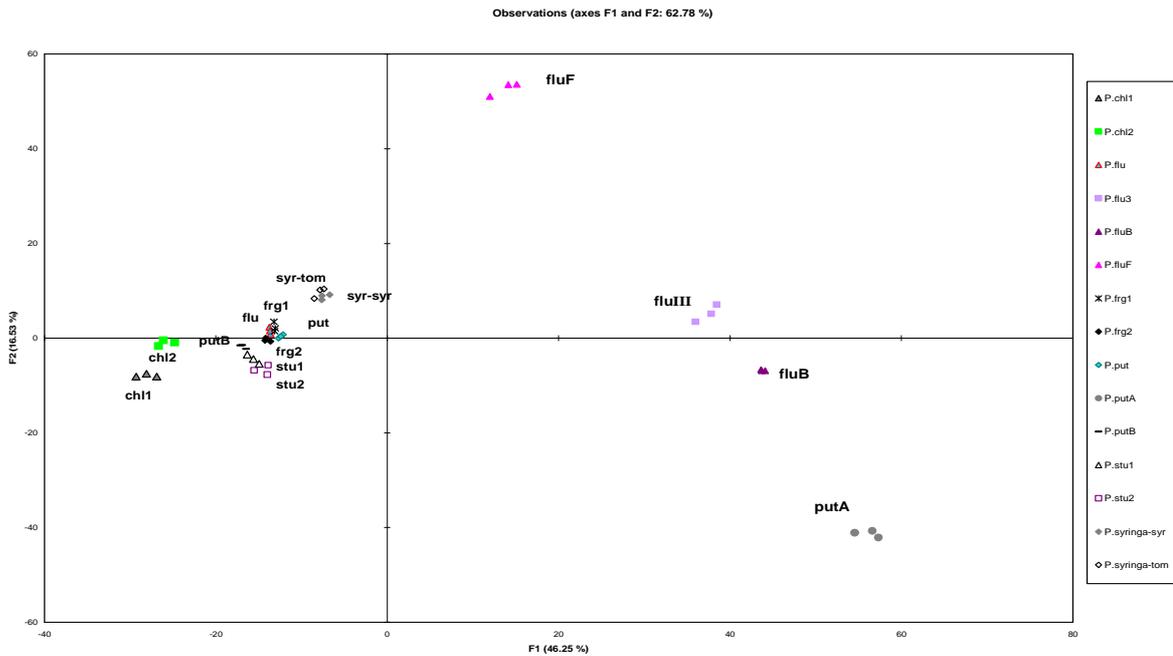


Figure 19 : Carte factorielle de l'AFD réalisée sur les données spectrales ($\Delta\lambda$ de 30 nm) de 37 souches de référence ; focus sur les espèces de *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fragi*, *P. chlororaphis*, *P. syringea*, *P. stutzeri* pour lesquelles plusieurs biotypes ou biovars

Concernant les 4 biotypes de *P. fluorescens*, les résultats sont particulièrement intéressants : Les 4 biotypes sont parfaitement discriminés mais apparaissent éloignés sur la carte définie par les facteurs F1 et F2. Notamment sur l'axe F1 qui représente 45,2 % de la variance totale, *P.flu* est bien discriminée de *P.fluB*, *P.fluF* et *P.fluIII* . Ces trois dernières souches sont quant à elles, bien discriminées selon le facteur discriminant F2 qui représente 16,5 % de la variance totale. On perçoit que *P.fluB* et *P.fluIII* possèdent des coordonnées factorielles proches alors que *P. flu* affiche plutôt des proximités avec les souches *P.frag 1* et *P. frag 2*.

Concernant les 3 biovars de *P. putida* (*P.put*, *P.putA*, *P.putB*), le constat suivant a pu être fait : les biovars sont nettement séparés notamment selon l'axe F1. Cependant, si *P.put B* et

P.put affichent des proximités, ils sont nettement éloignés de la souche P.put A qui se positionne plutôt à proximité des souches P.fluB, P.fluIII et P.flu F.

Ces résultats mettent en avant le fort pouvoir discriminant de la méthode et confirment par ailleurs l'hétérogénéité de ces deux dernières espèces telle qu'observée par de nombreux auteurs (Ait Tayeb et al., 2005, Anzai et al., 2000, Bossis et al., 2000).

Afin de mieux visualiser la distribution des souches et les groupes qu'elles forment, une analyse par classification hiérarchique ascendante a été menée tel que décrit en « Matériel et Méthodes ». La classifications hiérarchique a été réalisée sur les spectres normalisés des 37 souches de référence en utilisant la méthode de ward et la distance euclidienne. Les résultats ont été visualisés sous forme d'un dendrogramme (Figure 20).

Cette représentation permet de visualiser la bonne séparation des souches mais met également en évidence les « erreurs » de positionnement. Ces spectres mal positionnés (car non similarité des 3 spectres obtenus à partir d'une même souche) concernent des souches de *P. lundensis*, *P. taetrolens*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. agarici*, *P. alcaligenes* et sont signalées par une flèche bleue. Nous n'avons pas d'explication pertinente à avancer pour ces positionnements qui ne représentent que 5 % d'erreur sur la totalité des données. Les 2 souches de *P. chlororaphis* sont proches et il en est de même pour les 2 souches de *P. syringae*. Par contre l'hétérogénéité au sein des groupes de *P. putida* et *P. fluorescens* telle qu'observée par AFD a été confirmée. Par ailleurs, ce traitement a permis de mettre en évidence une distance non négligeable entre les souches de *P. fragi* et également entre les souches de *P. stutzeri* alors que cette distance n'avait pas été décelée par AFD. Ces résultats sont très cohérents avec ceux qui décrivent l'énorme diversité qui règne au sein de ces deux taxons (Porteous et al., 2002) et surtout la proximité non parfaitement élucidée qui existe entre *P. stutzeri* et *P. mendocina*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, et *P. balearica* (Lalucat et al., 2006).

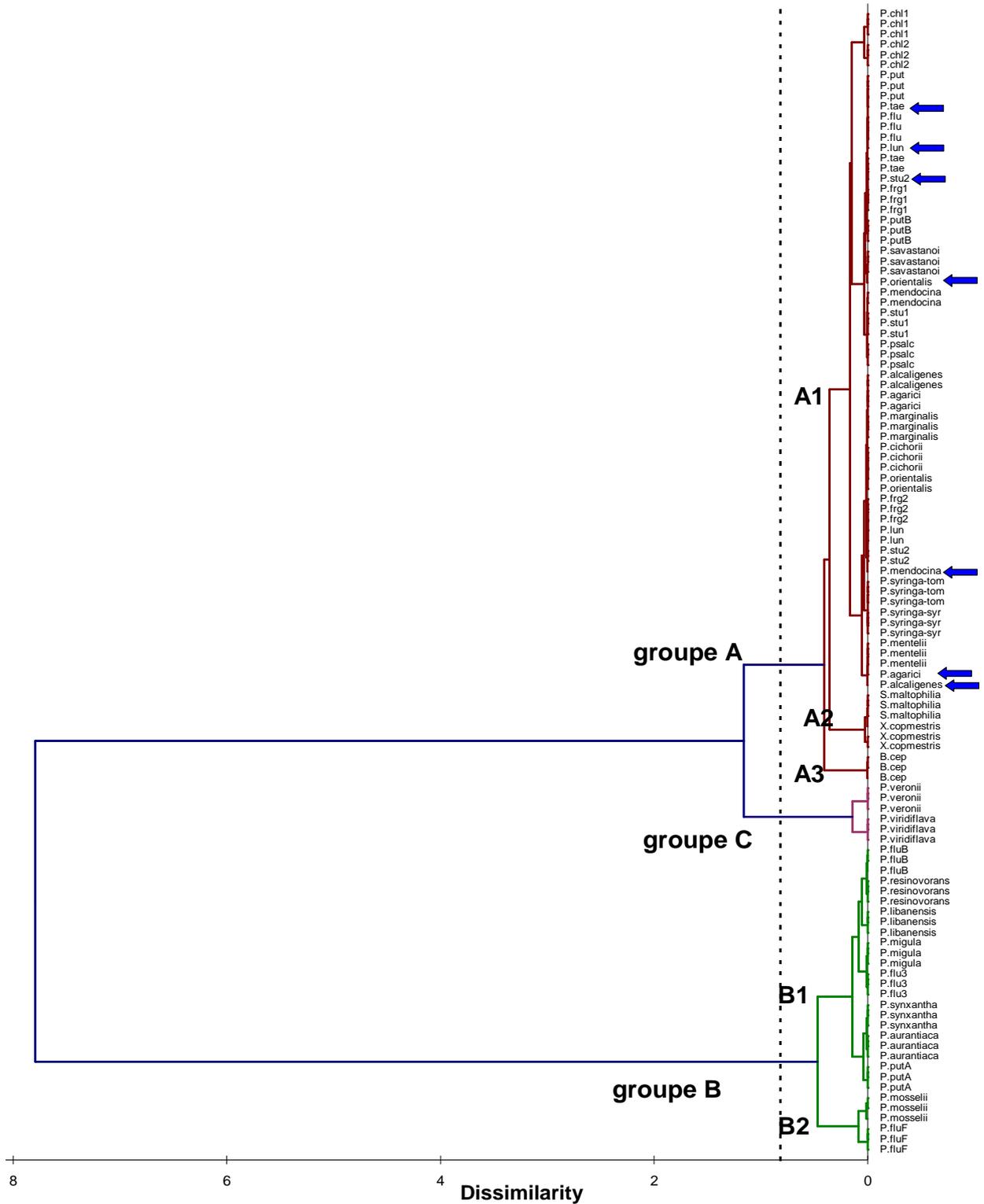


Figure 20 : Dendrogramme de CHA réalisé à partir des données spectrales recueillies en fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30 nm) à partir des 37 souches de référence.

Pour illustrer le positionnement de ces groupes dans la carte factorielle de l'AFD, nous avons renommé les souches selon leur distribution dans les différents groupes (RefGA, RefGB, RefGC), ainsi qu'en sous groupes, comme cela est présenté en figure 21

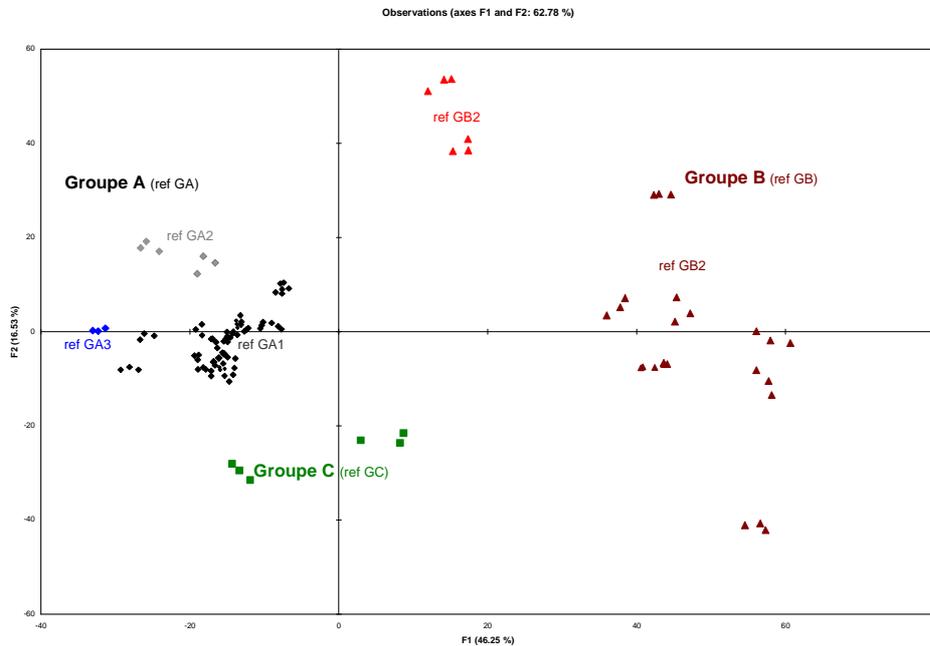


Figure 21 : Positionnement des groupes et sous-groupes RefGA (A1, A2, A3), RefGB (B1,B2), RefGC définis d'après la classification hiérarchique construite sur la base de l'AFD réalisée sur les données spectrales ($\Delta\lambda$ de 30 nm) de 37 souches de référence.

Le groupe **RefGA** a pu être séparé en 3 sous-groupes définis comme suit :

RefGA 1 : *P.stu1*, *P.lun*, *P.tae*, *P.put*, *P.frg1*, *P.chl1*, *P.psalc*, *P.flu*, *P.frg2*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes*, *P. mentelii*, *P. orientalis*, *P. cichorii*, *P. agarici*, *P. marginalis*, *P.stu2*, *P.putB*, *P. syringa-syr*, *P. syringa-tom*, *P.chl2*, *P. savastanoi*.

RefGA 2 : *X. campestris*, *S. maltophilia*.

RefGA 3 : *B. cep*

Le groupe **RefGB** a pu être distingué en 2 sous-groupes :

RefGB1 : *P. synxantha*, *P. resinovorans*, *P. fluB*, *P. libanensis*, *P. migula*, *P. aurantiaca*, *P. fluIII*, *P. putA*.

RefGB2 : *P. fluF*, *P. mosselii*.

Le groupe **RefGC** comprenait *P. verronii*, *P. viridiflava*

La distribution des souches dans les différents groupes montre une fois de plus l'hétérogénéité des souches de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*. Ainsi P.flu, P.put et P.putB sont dans le groupe RefGA 1 tandis que P.fluB, P.fluIII et P.putA sont dans le groupe RefGB1 et enfin P.fluF est dans RefGB2. Il faut également noter que les trois souches *X. campestris*, *S. maltophilia* et *B. cepacia* apparaissent dans le groupe RefGA mais nettement séparées des *Pseudomonas* stricto-sensu de ce groupe, *X. campestris* et *S. maltophilia* étant assemblées en RefGA2. Pour mémoire ces trois genres étaient autrefois affiliés au groupe des *Pseudomonas* et l'analyse des ARN 16S a conduit à leur redistribution au sein de taxons non *Pseudomonas*. *Burkholderia cepacia* est désormais positionné au sein des Betaproteobacteria, tandis que l'espèce *P. maltophilia* initialement assignée au genre *Xanthomonas* par P. De Vos (De Vos et De Ley, 1983) a été reclassée dans le genre *Stenotrophomonas* (Palleroni et Bradbury, 1993) qui appartient désormais à la sous classe γ - β des *Proteobacteria*.

Le clustering que nous obtenons à partir des données recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30 nm) est donc parfaitement cohérent avec celui généralement admis pour ces micro-organismes.

Les figures en annexe 1 et 2 explicitent le positionnement de ces groupes en utilisant ces codes de classement évoqués plus haut sur la carte factorielle résultant de l'AFD menée sur chaque groupe individuellement.

Pour tenter d'aller plus loin dans l'analyse des données, les spectres moyens des différents groupes et sous-groupes ont été tracés.

En figure 22 sont présentés les spectres moyens des groupes RefGA, RefGB et RefGC.

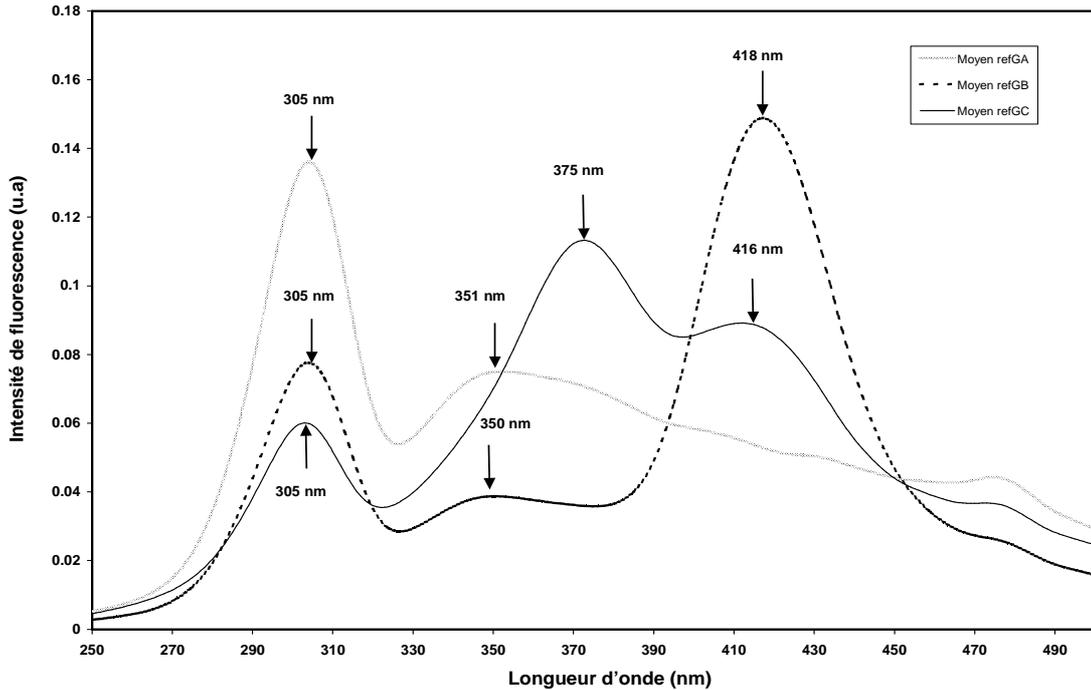


Figure 22 : Spectres moyens des trois groupes RefGA, RefGB et RefGC définis par CHA à partir des données recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30 nm) depuis les 37 souches de référence.

Ces spectres représentent les spectres d'excitation synchrone entre 250 et 500 nm avec un décalage constant de $\Delta\lambda$ de 30 nm. La longueur d'onde d'émission précisée sur les graphiques a été obtenue comme suit : $\lambda_{em} = \lambda_{exc} + \Delta\lambda$.

D'un premier abord, on observe que les formes des spectres varient nettement d'un groupe à l'autre. Le spectre moyen du groupe RefGA est caractérisé par un maximum vers 306 nm (intensité de fluorescence vers 0,14). Ce pic existe également pour les spectres des autres groupes mais son intensité est moindre pour RefGB (intensité de fluorescence vers 0,07) et pour RefGC (intensité de fluorescence vers 0,06). Le spectre de RefGA est également caractérisé par un pic large (ou épaulement) vers 351 nm.

Le spectre moyen du groupe RefGB présente un pic vers 306 nm (intensité vers 0,08), un épaulement vers 350 nm, et second pic vers 418 nm qui présente quant à lui, une forte intensité de fluorescence (vers 0,15).

Enfin le spectre du groupe RefGC présente le même premier pic que les spectres des deux autres groupes à 306 nm, un second pic à forte intensité vers 376 nm qui n'apparaît pas pour les autres groupes et enfin un net épaulement vers 418 nm.

La figure 23 présente les spectres moyens obtenus à partir des souches appartenant aux sous-groupes RefGA1, RefGA2 et RefGA3.

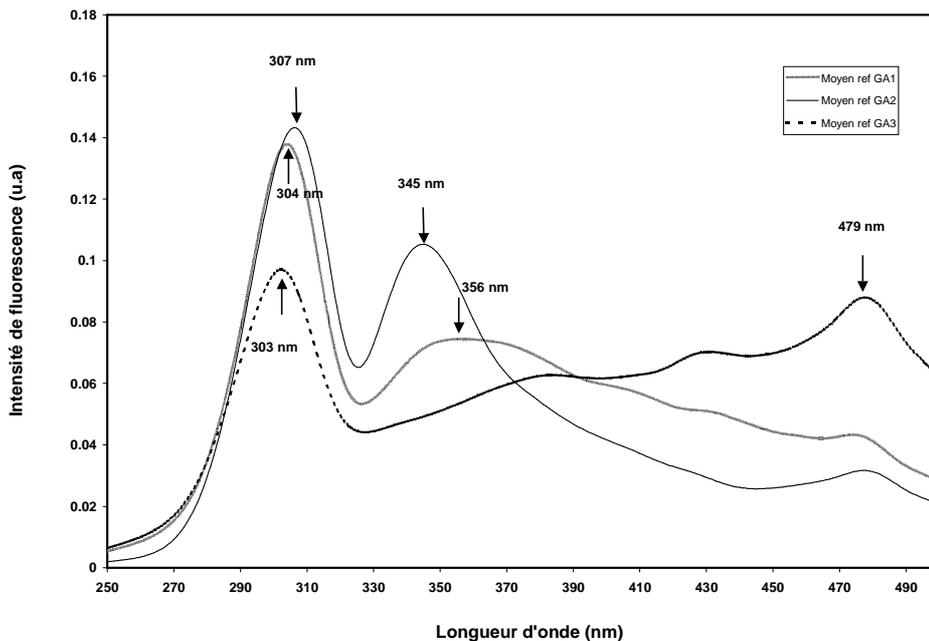


Figure 23 : Spectres moyens des trois sous-groupes RefGA1, RefGA2, RefGA3 définis par CHA à partir des données recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30 nm) depuis les 37 souches de référence.

Une fois de plus l'allure des spectres est très nettement différente : Le spectre moyen des souches du groupe RefGA1 est caractérisé par un maximum 304 nm (intensité de fluorescence vers 0,145) et un épaulement vers 356 nm. Le spectre moyen des souches du groupe RefGA2 (pour les souches *X. campestris*, *S. maltophilia*) est caractérisé par un maximum vers 307 nm (intensité de fluorescence vers 0,14) et par un autre pic vers 345 nm mais avec intensité de fluorescence moins élevée. Enfin concernant le sous-groupe de RefGA3 (*B. cepacia*), son spectre moyen est caractérisé par un maximum vers 303 nm (intensité de fluorescence 0,1) et un épaulement vers 350 nm qui remonte vers un autre pic vers 479 nm.

Les spectres moyens des sous-groupes RefGB1 et RefGB2 sont présentés en annexe 3. De la même façon que décrit précédemment, leurs spectres varient nettement.

Sur la figure 24 sont présentés les spectres moyens des 3 souches de *P. putida* : P.put, P.putB et P.putA. Cette figure permet de visualiser nettement l'hétérogénéité mainte fois décrite pour les *Pseudomonas putida*. Le spectre de la souche P.putA se distingue nettement des deux autres par un pic de forte intensité dans la région de 414 nm.

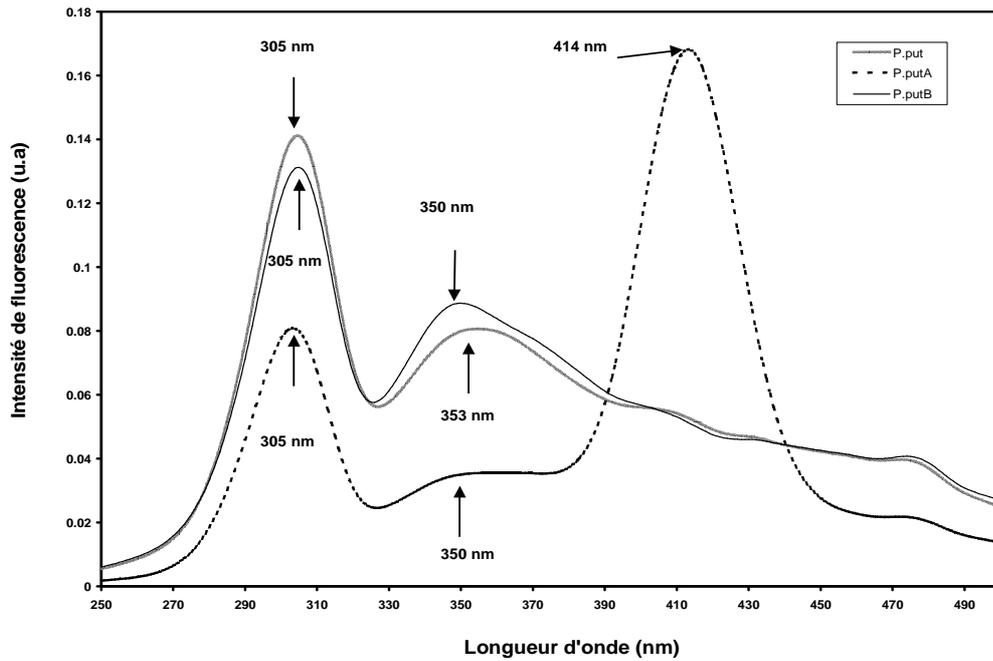


Figure 24 : Spectres des trois souches de *P. putida* recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30)

Pour comparaison, les spectres des 4 souches de *Pseudomonas fluorescens* sont présentés sur la figure 25. Là encore, l'hétérogénéité des souches est visualisée. La proximité taxonomique entre la souche P.putA et les souches de *P. fluorescens* P.fluB et P.fluIII trouve son explication en la présence d'un même pic dans la région de 415-417 nm.

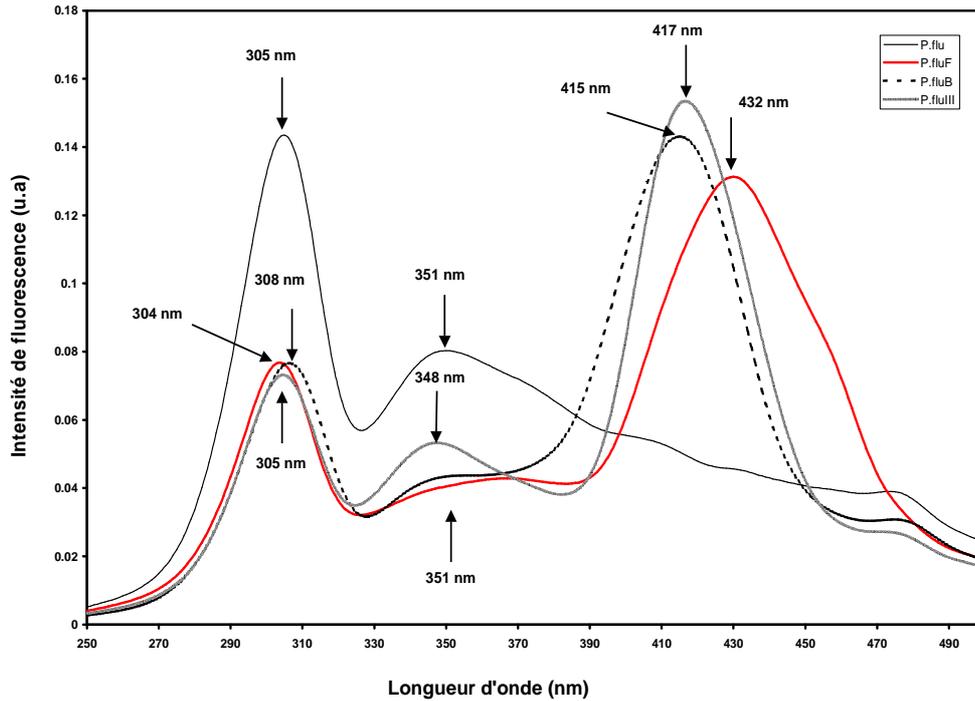


Figure 25 : Spectres des quatre souches de *P. fluorescens* recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30)

Pour préciser les positionnements et les relations entre les souches, deux autres AFD ont été réalisées sur les données spectrales recueillies à partir des souches des groupes RefGA et RefGB séparément (le groupe RefGC n'étant composé que de deux souches a été exclu de cette étude). Concernant le groupe RefGA, l'AFD a été réalisée sur les 10 premières composantes principales de l'ACP menée sur les spectres de fluorescence synchrone des souches de ce groupe. Avant d'appliquer l'AFD 25 groupes ont été créés correspondant aux 25 souches qui construisent la groupe RefGA (*X. campestris*, *P.stu1*, *P.lun*, *P.tae*, *P.put*, *P.frg1*, *S. maltophilia*, *P.chl1*, *P.psalc*, *P.flu*, *B.cep*, *P.frg2*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes*, *P. mentelii*, *P. orientalis*, *P. cichorii*, *P. agarici*, *P. marginalis*, *P.stu2*, *P.putB*, *P.syringa-syr*, *P.syringa-tom*, *P.chl2*, *P.savastanoi*). Les résultats de la matrice de confusion pour l'échantillon d'estimation de l'AFD montrent une discrimination de 100 %, tandis que les résultats de la validation croisée réalisée à partir de l'AFD montrent 97.3 % de discrimination. Deux spectres ont été mal classés l'un affilié à *P.stu1* a été considéré comme *P. marginalis*, et l'autre affilié à *P.lun* a été aussi considéré comme *P. marginalis*.

Nous n'avons pas d'explication pour ces mauvais positionnements qui peuvent résulter d'une simple erreur de manipulation.

II.2. Fluorescence synchrone en $\Delta\lambda$ de 70 nm

Nous avons mené des analyses similaires sur les données spectrales recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone avec un $\Delta\lambda$ de 70 nm.

La logique suivie a été celle décrite précédemment et ne sera pas détaillée ici. La plupart des graphiques générés par l'analyse sont renvoyés en annexe.

L'analyse factorielle discriminante des 37 souches a été réalisée à partir des 10 premières composantes principales résultantes de l'ACP appliquée sur les spectres de fluorescence synchrone à $\Delta\lambda$ de 70 nm. La figure 26 représente la carte factorielle selon les deux premières facteurs F1 et F2:

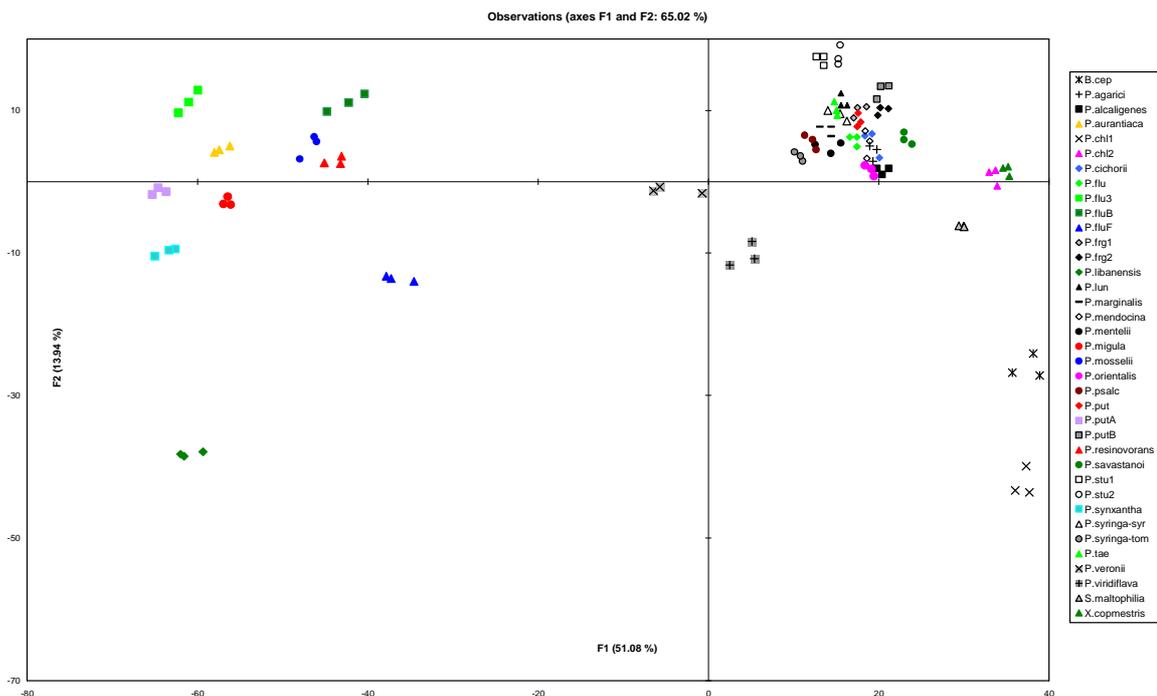


Figure 26 : Carte factorielle de l'AFD réalisée sur les données spectrales de 37 souches de référence recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 70 nm)

Une division nette des souches en deux groupes séparés sur l'axe F1 qui représente 51,08 % de la variance totale est observée, tandis que les souches suivantes restent groupés selon les deux axes : P.psalc, P.stu1, P.lun, P.tae, P.put, P.frg1, P.flu, P.frg2, *P. mentelii*, *P. orientalis*,

P. cichorii, *P. mendocina*, *P. alcaligenes*, *P. agarici*, *P. syringa-syr*, *P. marginalis*, P.stu2, P.putB . Leur séparation est cependant nettement améliorée selon l'axe F3 qui représente 11,2 % de la variance totale (résultats non présentés).

Même si le graphique ne donne qu'une vision partielle des distances entre souches, les résultats générés par la matrice de confusion montrent 100 % de bonne classification pour l'échantillon d'estimation, alors que les résultats de la validation croisée résultant de l'AFD ont montré 99,1 % de bonne classification (un spectre de *P.frg1* a été considéré comme *P.put*).

Si l'on s'intéresse plus précisément aux souches de référence pour lesquelles plusieurs biovars ou biotypes étaient inclus dans notre analyse (figure en annexe 5), on constate la même hétérogénéité au sein des *P. fluorescens* et *P. putida* que constaté précédemment. Les souches de *P. chlororaphis* apparaissent cependant plus distinctes selon l'axe F1 qui présente 51,08 % de la variance totale.

Les résultats sont globalement similaires à ceux obtenus par recueil des données en spectroscopie de fluorescence avec un $\Delta\lambda$ de 30 nm.

L'analyse par classification hiérarchique ascendante réalisée tel que décrit dans le paragraphe précédent (voir figure en annexe 5) apporte globalement les mêmes informations que celles recueillies en fluorescence synchrone à un $\Delta\lambda$ de 30 nm. Curieusement, seulement 3 spectres sont mal positionnés et ne correspondent pas (sauf *P. agarici*) à ceux observés en fluorescence à $\Delta\lambda$ de 30 nm. Une fois de plus nous n'avons d'explication à proposer si ce n'est une erreur de manipulation.

La répartition des souches en trois groupes principaux RefGA(70), RefGB(70) et RefGC(70) est similaire à celle décrite pour les données recueillies en fluorescence synchrone à $\Delta\lambda$ de 30 nm (voir figure en annexe 5).

Par contre la répartition en sous groupes a été quelque peu différente.

Remarque : les règles de codage des souches sont similaires à celles adoptées précédemment.

RefGA(70) comprenait 3 sous groupes :

RefGA1(70) : P.stu1, P.lun, P.tae, P.put, P.frg1, P.psalc, P.flu, P.frg2, *P. mendocina*, *P. alcaligenes*, *P. mentelii*, *P. orientalis*, *P. cichorii*, *P. agarici*, *P. marginalis*, P.stu2, P.putB, *P. syringa-syr*, *P. syringa-tom*, P.chl2, *P. savastanoi*.

RefGA2 (70) : *X. campestris*, *S. maltophilia*.

RefGA3 (70): *B. cep*, P.chl1.

RefGB(70) comprenait 2 sous-groupes

RefGB1(70) : *P. synxantha*, P.fluF, *P. mosselii*, *P. libanensis*, *P. migula*,

RefGB2(70): *P. resinovorans*, P.fluB, *P. aurantiaca*, P.fluIII, P.putA.

Et **RefGC(70)** comprenait les souches *P. verronii*, *P. viridiflava*,

Comme il a été remarqué avec les spectres à $\Delta\lambda$ de 30 nm, les souches des espèces *P. fluorescens* et *P. putida* se répartissent entre les différents sous groupes, puisque l'on trouve P.flu, P.put et P.putB dans RefGA1(70), P.fluB, P.fluIII et P.putA dans RefGB2(70), et enfin P.fluF dans RefGB1(70). Ce clustering est tout à fait cohérent avec celui observé précédemment. La seule différence notable observée concerne le positionnement de l'une des 2 souches de *P. chlororaphis* (P.chl1) qui affiche ici des proximités avec la souche de *Burkholderia cepacia* RefGA3 (70) (figure en annexe 6).

Comme dans le paragraphe concernant les données recueillies en fluorescence synchrone à $\Delta\lambda$ de 30 nm, nous avons cherché à préciser les longueurs d'onde discriminantes en analysant les spectres moyens des isolats au sein de chaque groupe et sous-groupe.

Les spectres moyens des souches des groupes RefGA (70), RefGB(70) et RefGC(70) sont présentés en annexe 7.

Les spectres moyens des souches des sous-groupes RefGA1(70), RefGA2 (70), et RefGA3(70) sont présentés en annexe 8.

Les spectres moyens des souches des sous-groupes RefGB1(70) et RefGB2 (70) sont présentés en annexe 9.

Pour comparer avec les données acquises à $\Delta\lambda$ de 30 nm, les spectres d'excitation synchrone ($\Delta\lambda$ de 70 nm) générés à partir des 3 souches de *P. putida* ont été présentés sur un même graphique (Figure 27).

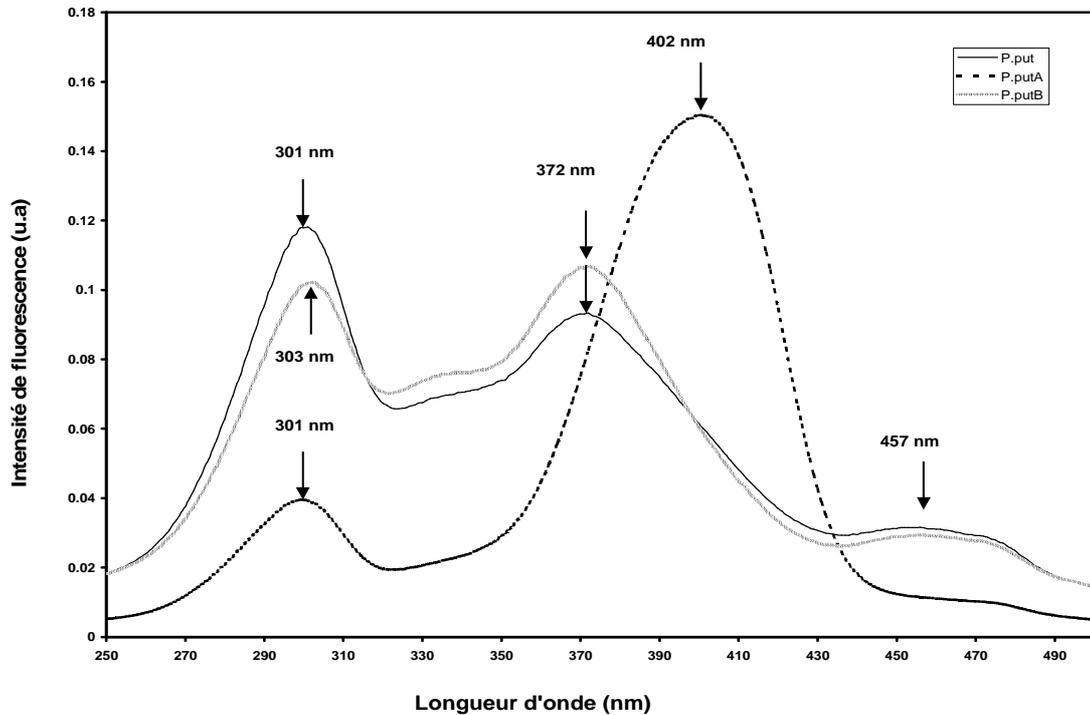


Figure 27: Spectres des trois souches de *P. putida* recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 70 nm)

On retrouve la même différence flagrante entre la souche P.putA et les autres souches. Cette différence provenant principalement du pic à forte intensité présente vers 402 nm et de l'absence d'épaulement vers 372 nm observé pour les autres souches. Les longueurs d'onde des maxima et épaulements sont légèrement décalés par rapport à celle observées par $\Delta\lambda$ de 30 nm.

Concernant les spectres des 4 souches de *P. fluorescens* (P.flu, P.fluF, P.fluB, P.fluIII), les observations sont similaires à celles décrites en $\Delta\lambda$ de 30 nm, à savoir de nettes différences entre les allures des spectres et un même pic à 402 nm que celui observé pour P.putA, pic dont la présence pourrait expliquer la proximité taxonomique entre ces souches (figure 28).

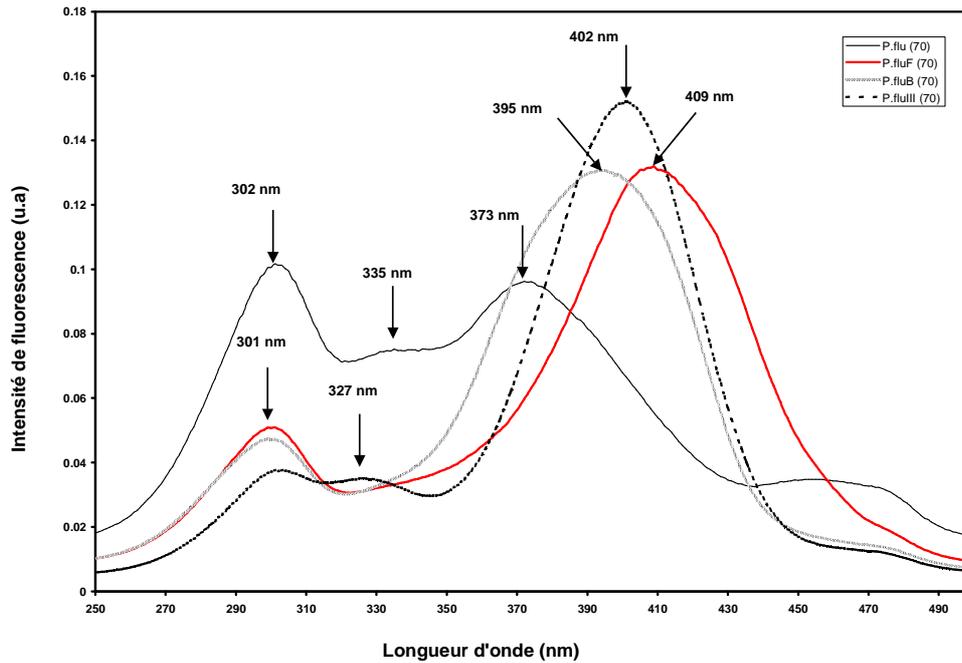


Figure 28 : Spectres des quatre souches de *P. fluorescens* recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 70 nm)

Comme dans le paragraphe précédent, pour préciser les positionnements et les relations entre les souches, deux autres AFD ont été réalisées sur les données spectrales recueillies à partir des souches des groupes RefGA(70) et RefGB(70) séparément (le groupe RefGC(70) n'étant composé que de deux souches a été exclu de cette étude). Concernant le groupe RefGA, l'AFD a été réalisé sur les 10 premières composantes principales de l'ACP réalisée sur les spectres de fluorescence synchrone des souches de ce groupe. Avant d'appliquer l'AFD 25 groupes ont été créés correspondant aux 25 souches qui construisent la groupe RefGA(70) (*X. campestris*, *P.stu1*, *P.lun*, *P.tae*, *P.put*, *P.frg1*, *S. maltophilia*, *P.chl1*, *P.psalc*, *P.flu*, *B.cep*, *P.frg2*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes*, *P. mentelii*, *P. orientalis*, *P. cichorii*, *P. agarici*, *P. marginalis*, *P.stu2*, *P.putB*, *P.syringa-syr*, *P.syringa-tom*, *P.chl2*, *P. savastanoi*.). Les résultats de matrice de confusion pour l'échantillon d'estimation de l'AFD montrent une discrimination de 100 %, tandis que les résultats de la validation croisée de l'AFD montrent 97,3% de discrimination ; un spectre a été mal classé, il s'agit d'un *P.frg1* considéré comme *P.put*.

Nous n'avons pas d'explication pour ces mauvais positionnements qui peuvent résulter d'une simple erreur de manipulation.

Les cartes factorielles réalisées sur la base des données spectrales recueillies à partir des souches des groupes RefGA(70) et RefGB(70) sont présentées en annexes 10 et 11.

II.3. Conclusion

Depuis l'avènement des méthodes moléculaires, de nombreux auteurs ont cherché à préciser la taxonomie des Pseudomonads (Palleroni et al., 1973, Kersters, 1996) en s'appuyant d'abord sur l'analyse de l'hybridation ARNr-ADN puis des séquences des ARN 16S. Ces travaux ont permis, entre autres de délimiter le genre *Pseudomonas* stricto-sensu et de repositionner diverses espèces au sein des Gammaproteobacteria (De Ley, 1992, De Vos et De Ley, 1983, De Vos et al., 1985, De Vos et al., 1989). Mais ces méthodes ont montré leurs limites et de nombreux auteurs se sont attachés à rechercher des marqueurs plus pertinents (Ait Tayeb et al., 2005, Anzai et al., 2000, Anzai et al., 1997, Bennasar et al., 1996, Christensen et al., 1994, De Vos et al., 1998, Moore, 1996, Yamamoto et Harayama, 1998, Yamamoto et al., 2000).

Leurs résultats ont confirmé ou infirmé les résultats décrits précédemment. Par exemple en s'appuyant sur les séquences des gènes *gyrB* et *rpoD*, Yamamoto et collaborateurs (Yamamoto et al., 2000) ont construit un arbre phylogénique des espèces très différent de celui basé sur l'analyse des ARN 16S. Dans une autre étude s'appuyant sur le gène codant pour la protéine membranaire *oprF*, l'équipe de S. Barry a analysé 69 isolats et souches de référence de *Pseudomonas* et a présenté une approche assez différente de celle proposée par les autres auteurs. Ainsi, il apparaît nettement que la taxonomie des *Pseudomonas* et flores apparentées est loin d'être finalisée et de nombreuses espèces sont encore taxonomiquement extrêmement hétérogènes (Bodilis et Barry, 2006).

Les résultats que nous avons obtenus par analyse de souches de référence en fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30 et de 70 nm) sont, dans leur globalité, cohérents avec ceux générés par analyse génomique. Par exemple, l'hétérogénéité des espèces *P. fluorescens* et *P. putida* et la proximité de certains de leurs biovars telle que nous l'avons décrite est en accord avec les constatations de nombreuses équipes (Bossis et al., 2000, De Vos et al., 1998, Hilario et al., 2004, Yamamoto et al., 2000). A titre d'exemple, Moore et ses collaborateurs (Moore, 1996) ont délimité la lignée des *P. fluorescens* en y incluant les espèces *P. fluorescens*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. marginalis*, *P. tolaasi* et *P. viridiflava*, mais il régnait le même degré d'hétérogénéité au sein de l'espèce *P. fluorescens* qu'entre les différentes espèces de la lignée. Plus précisément, *P. fluorescens* peut être séparé en un certain nombre

de biotypes A, B, C, F et G également été nommés biovars I, II, III, IV et V, (Palleroni, 1984). Il est généralement admis que le biotype G est hétérogène. Au moins une partie des membres du biotype G peut être considéré comme *Pseudomonas tolaasii* (Vancanneyt et al., 1996), tandis que le biotype B a intégré *Pseudomonas marginalis* (Arnaut-Rollier et al., 1999), les biotype D et E ayant accueilli *Pseudomonas chlororaphis* et *Pseudomonas aureofaciens* (ce dernier étant un synonyme subjectif de *Pseudomonas chlororaphis* (Johnson, 1989). Le biotype C détient une position taxonomique jusqu'ici anonyme, selon les hybridations ADN-ADN (Brosch, 1996), et au moins quelques souches du biotype F peuvent être couvertes par *Pseudomonas lini* (Delorme et al., 2002). Il faut également noter qu'un nombre important de nouvelles espèces de *Pseudomonas* ont été décrites durant la dernière décennie (Dabboussi et al., 1999, Reddy et al., 2004, Verhille et al., 1999) comme étant membres de *P. fluorescens*, rendant encore plus dramatique la confusion taxonomique de ce groupe.

Les résultats de classification que nous avons obtenus par traitement des données spectrales recueillies en fluorescence sont particulièrement intéressants dans la mesure où ils apparaissent corrélés aux données globales résultants des analyses génomiques. Ils apportent par ailleurs un éclairage nouveau sur la proximité de certaines souches. Le recueil de ces données est particulièrement rapide et dans les conditions de l'expérimentation, leur traitement statistique aisé et rapide.

Ces traitements ne permettent pas encore d'ouvrir « la boîte noire » que constitue le spectre enregistré par excitation en fluorescence d'un micro-organisme. Cependant, il est possible d'identifier très rapidement les longueurs d'onde discriminantes ou au contraire similaires pour les souches étudiées. La caractérisation des composés à l'origine de ces pics d'émission semble à priori complexe mais possible.

III. Identification des isolats

Comme précisé dans le chapitre « Matériel et Méthodes » toutes les souches présentées dans ce chapitre proviennent de différents prélèvements réalisés sur une journée dans un abattoir. L'objectif de l'analyse était de d'une part : (i) de comparer les données spectrales recueillies pour ces souches à celles des 37 souches de référence présentées précédemment et, d'autre part (ii) de comparer le positionnement taxonomique de ces souches à celui obtenu en galerie API 20 NE et / ou par PCR (au niveau du genre). Tous les isolats ayant, par ailleurs, été caractérisés en coloration de Gram, par test oxydase et par test d'assimilation fermentaire du glucose.

III.1. Comparaison des données spectrales recueillies en spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30 nm) par lecture directe des colonies à l'aide d'une fibre optique

Pour précision, trois différents spectres ont été réalisés pour chaque isolat à partir de trois différentes colonies.

Dans un premier temps, **toutes** les données spectrales recueillies à partir des isolats ont été regroupées dans une même matrice. C'est à partir de cette matrice qu'une classification hiérarchique ascendante a été réalisée selon la méthode de Ward et la distance euclidienne (figure non présentée). L'objectif a été d'établir une typologie des données spectrales (les souches) et donc une première visualisation de leur répartition en clusters et sous-clusters. Ainsi, les isolats ont montré une répartition en 2 groupes principaux dits groupe A et groupe B.

Le groupe A (atelGA) contenait 46 isolats codés comme suit : AB, AM, AV, BA, BQ, EA, EB, EI, EJ, EK, EN, AD, AE, AQ, AR, BB, BC, BL, CG, CV, DH, DM, DO, DV, EM, EO, W.AH, AI, AJ, AT, AZ, B, BE, BG, BK, BN, CL, DD, DJ, DW, E, EP, N, T, AK, AY, Q

Le groupe B (atelGB) contenait les 12 isolats restants codés comme suit : AL, AN, BP, BY, CI, CQ, CY, DF, DQ, DS, M, Z.

Sur la figure suivante (figure 29) sont présentés les spectres moyens de ces deux groupes :

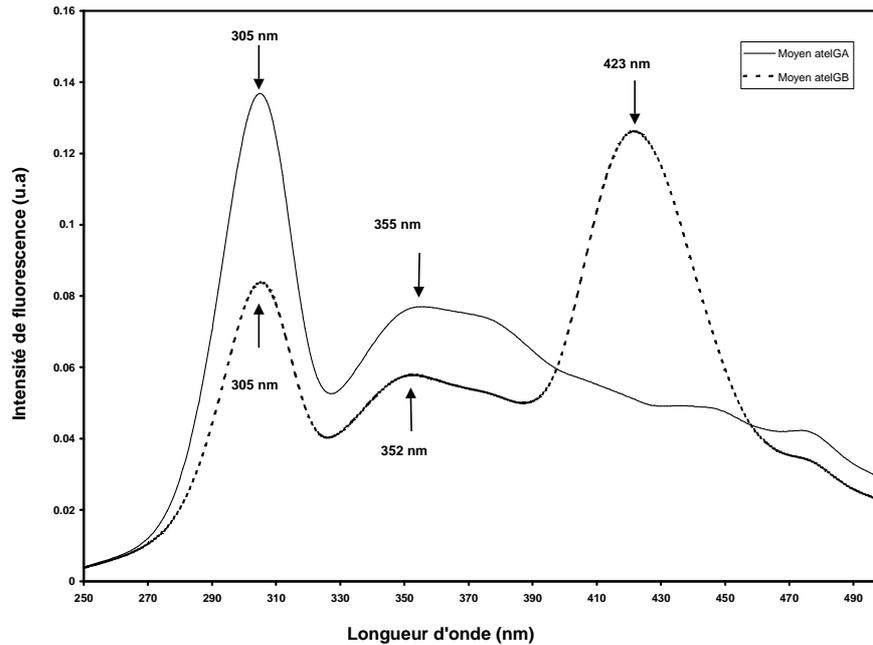


Figure 29: Spectres moyens des deux groupes d'isolats (atelGA, atelGB) segmentés par classification hiérarchique ascendante.

On constate effectivement une nette distinction entre les spectres moyens des deux groupes et un profil particulier des souches du groupe B qui présentent 2 maxima localisés à 306 nm et 423 nm.

Le clustering du Groupe A a permis de distinguer 5 sous groupes répartis comme suit :

atelGA1: AB, AM, AV, BA, BQ, EA, EB, EI, EJ, EK, EN.

atelGA2: AD, AE, AQ, AR, BB, BC, BL, CG, CV, DH, DM, DO, DV, EM, EO, W.

atelGA3: AH, AI, AJ, AT, AZ, B, BE, BG, BK, BN, CL, DD, DJ, DW, E, EP, N, T.

atelGA4: AK

atelGA5: AY, Q

Leurs spectres moyens sont présentés ci-après (figure 30) :

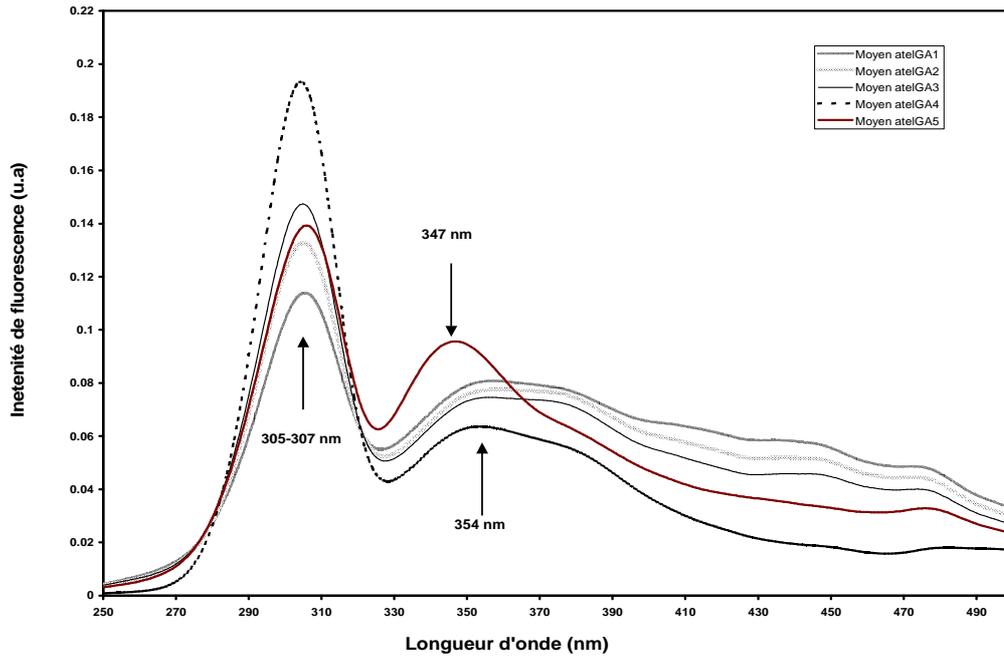


Figure 30 : Spectres moyens des sous-groupes du groupe A (atelGA1, A2, A3, A4, A5) segmentés par classification hiérarchique ascendante

Les spectres des souches du groupe atelGA5 se distinguent des autres par un épaulement marqué à 347 nm. Ces spectres correspondent à des isolats qui ont par la suite été identifiés en tant que *Stenotrophomonas maltophilia* par spectroscopie de fluorescence.

Le clustering du Groupe B a permis de distinguer 5 sous groupes répartis comme suit :

AtelGB1: AL, BY, CI, DF, DQ, DS, M.

AtelGB2: AN, BP, CQ, CY, Z.

La figure 31 présente les spectres moyens de ces sous-groupes

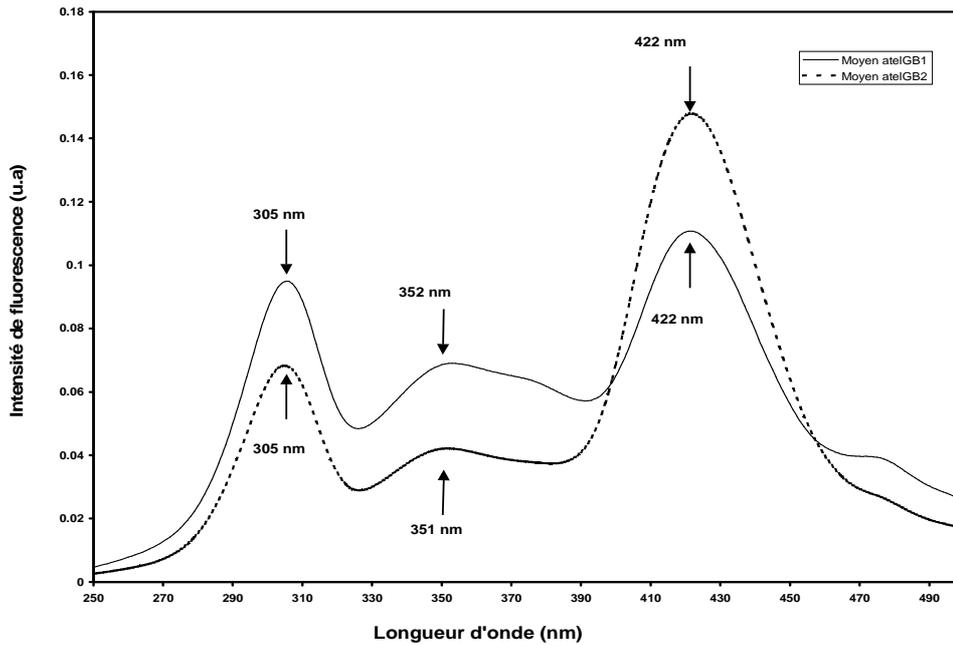


Figure 31 : Spectres moyens des sous-groupes du groupe B (atelGB1, B2) segmentés par classification hiérarchique ascendante

Globalement, ces spectres semblent similaires notamment quant à la position de leurs maxima ; les différences semblent résider dans l'intensité de l'excitation au niveau de ces maxima.

Cette première approche ne permet pas, bien entendu, une identification des isolats, mais elle permet une visualisation de la diversité des souches étudiées et leur regroupement en clusters qui semblent caractérisés par une proximité taxonomique comme le confirment les résultats présentés ci-après.

III.1.1. Comparaison des données spectrales recueillies pour les 58 isolats à celles recueillies, dans les mêmes conditions, à partir des 37 souches de référence

L'ensemble des données spectrales recueillies à partir des isolats et des souches de référence ont été regroupées en une seule matrice sur laquelle a été menée une analyse en composantes principales. Les dix premières composantes principales ont été retenues pour mener l'analyse factorielle discriminante. Les données des souches types ont constitué les observations principales alors que les données des isolats constituaient les observations supplémentaires. Dans ces conditions, les données recueillies sur les isolats sont considérées comme des observations et ne contribuent pas au modèle de départ.

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-après qui donne, par ailleurs, les résultats d'identification obtenus par galerie API 20 NE et PCR ainsi que les résultats de quelques tests de caractérisation des isolats.

Tableau 4 : Résultats comparés d'identification d'isolats de Pseudomonads par PCR, API 20 NE et spectroscopie de fluorescence synchrone

Souches atell	Gram	Oxydase	Fermentation du Glucose	Api20NE	PCR	Résultats de spectroscopie de fluorescence	observations
B	-	+	-	0347455: Non-ID	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.agarici</i>	3/3
E	-	+	-	1143557 : Non-ID mais 1143555 : <i>P.fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.flu</i>	3/3
M	-	+	-	1156555: <i>P.fluorescens</i> 49.1%, <i>P.pseudomallei</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.fluIII</i>	3/3
N	-	+	-	0340455 : Non-ID	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg1</i>	3/3
Q	-	-	-	1452341: <i>X.maltophilia</i> Exc.Ident	Non- <i>Pseudomonas</i>	<i>S.maltophilia</i>	3/3
T	-	-	-	0047441: <i>P.Chlororaphis</i> faible discrimination	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2</i>	3/3
W	-	-	-	0047455: <i>P.chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2</i>	3/3
Z	-	+	-	0147555: <i>P.fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.fluF</i>	3/3
AB	-	+	-	0000063 : <i>Bordetella avium</i> , tr.b.ide	Non- <i>Pseudomonas</i>	<i>P.chl2</i>	3/3
AD	-	-	-	0040445: Non-ID	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2</i>	3/3
AE	-	+	-	01341555 : Non-ID	Non- <i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2</i>	3/3
AH	-	+	-	0347455 : Non-ID	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2</i>	3/3
AI	-	+	-	0157555 : <i>P.fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2 (lun)</i>	3/3
AJ	-	+	-	0351455 : Non-ID	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg1</i>	3/3
AK	-	+	-	0047651 : <i>Flavi.oryzihabitas</i>	Non- <i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2</i>	3/3
AL	-	-	-	1156555 : <i>P.fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.fluIII</i>	3/3
AM	-	+	-	0040405 : Non-ID	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.mentelii</i>	3/3
AN	-	+	-	1156555 : <i>P.fluorescens</i>	Non- <i>Pseudomonas</i>	<i>P.fluIII</i>	3/3
AQ	-	+	-	0346455 Non-ID	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2</i>	3/3
AR	-	+	-	0141455: <i>P.putida</i> .	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.put</i>	3/3
AT	-	+	-	0151455 : Non-ID mais 0152455 : <i>P.fluorescens</i> .	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.flu</i>	3/3
AV	-	+	-	0341455 : Non-ID	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2</i>	3/3
AY	-	+	-	0470345 : <i>X.maltophilia</i>	Non- <i>Pseudomonas</i>	<i>S.maltophilia</i>	3/3
AZ	-	+	-	0041445: <i>P.pickettii</i> (68%), <i>P.putida</i> : (14%); 0041447 : <i>P.putida</i> (très bonne ID au genre)	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.flu</i>	3/3
BA	-	+	-	0042555 : <i>P.fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.flu</i>	3/3
BB	-	+	-	0041445: <i>P.pickettii</i> (68%), <i>P.putida</i> : (14%); 0041447 : <i>P.putida</i> (très bonne ID au genre)	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.mentelii</i>	3/3
BC	-	+	-	0141445 : <i>P.putida</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2</i>	3/3
BE	-	+	-	1241465: <i>P.picketti</i>	Non- <i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2</i>	3/3
BG	-	+	-	0145455: <i>P.fluorescens</i> 50.1%, <i>P.putida</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2</i>	3/3
BK	-	+	-	0142455: <i>P.putida</i> ; 0142555 <i>P.fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.flu</i>	3/3
BL	-	+	-	0347455 : Non-ID	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2</i>	3/3
BN	-	+	-	0347455 : Non-ID	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg1</i>	3/3
BP	-	+	-	0157475: <i>P.fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.fluIII</i>	3/3

BY	-	+	-	1156575 : <i>P.pseudomallei</i> (Très bonne ID au genre) ;1156555 <i>P.fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.fluIII</i>	3/3
BQ	-	+	-	0157555 : <i>P.fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>flu</i>	3/3
CG	-		-	0342455 : Non-ID	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2</i>	3/3
CI	-	+	-	1156555 : <i>P.fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.fluIII</i>	3/3
CQ	--	+	-	1156575 : <i>P.pseudomalli</i> (Très bonne ID au genre);1156555 <i>P.fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.migula</i>	3/3
CV	-	+	-	0343445 : Non-ID	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2</i>	3/3
CY	-	+	-	1156557: <i>P.pseudomallei</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.mosselii</i>	2/3mosselii 1/3fluIII
DD	-	+	-	0147455: <i>P.fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.flu</i>	3/3
DF	-	+	-	1156575 : <i>P.pseudomallei</i> (Très bonne ID au genre) ;1156555 <i>P.fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.fluIII</i>	3/3
DH	-	+	-	0157555 : <i>P.fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.flu</i>	3/3
DJ	-	+	-	1140455: <i>P.mendocina</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.mendocina</i>	3/3
DO	-	+	-	0341455 : Non-ID	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2</i>	3/3
DQ	-	+	-	1156555: <i>P.fluorescens</i> 49.1%, <i>P.pseudomallei</i> 22.7%.	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.fluIII</i>	3/3
DS	-	+	-	1156575 : <i>P.pseudomalli</i> (très bonne ID au genre) ;1156555 <i>P.fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.fluIII</i>	3/3
DV	-	+	-	0043445 : <i>P.chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2</i>	3/3
DW	-	+	-	0346455 : Non-ID	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2</i>	3/3
EA	-	+	-	1146575 : Non-ID	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg1</i>	3/3
EB	-	+	-	1146575 : Non-ID	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg1</i>	3/3
EI				1156575 : <i>P.pseudomallei</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.agarici</i>	3/3
EJ	-	+	-	0157555 : <i>P.fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.flu</i>	3/3
EK	-	+	-	0157555 : <i>P.fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.flu2</i>	3/3
EM	-	+	-	0156575 : Non-ID	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.lun</i>	2/3lun 1/3 flu
EN	-		-	1156575 : <i>P.pseudomallei</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.marginalis</i>	3/3
EO	-	+	-	1156575: <i>P.pseudomalli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg2</i>	3/3
EP	--	+	-	5341455 : Non-ID	<i>Pseudomonas</i>	<i>P.frg1</i>	3/3

III.1.2. Identification au niveau du genre

Par API 20 NE, des 58 souches, 4 ont été identifiées comme Non-*Pseudomonas* : Q et AY qui sont considérés comme des *Xanthomonas maltophilia* (renommé désormais *Stenotrophomonas*) , AB en tant que *Bordetella avium*, et enfin, AK comme *Flavbacterium oryzihabitans*. 54 souches ont été identifiées en tant que *Pseudomonas* ou Non identifiées.

Par PCR : des 58 souches, 7 ont été identifiées comme Non-*Pseudomonas*. 4 des ces souches étaient celles déjà identifiées en Non-*Pseudomonas* par API 20 NE. Les trois autres souches consistaient en AE, Non-identifiée par API 20 NE, AN identifiée en tant que *P.*

fluorescens par API 20 NE et BE identifiée en tant que *P. picketti* par API 20 NE. Concernant cette dernière souche, il convient de préciser que cette espèce a été reclassée en tant que *Rastolnaria* récemment. Finalement 51 souches ont été identifiées en tant que *Pseudomonas*.

Par spectroscopie de fluorescence : deux souches ont été identifiées en tant que Non-*Pseudomonas* : les isolats Q et AY. Il s'agit, dans les 2 cas, de souches identifiées en tant que *S. maltophilia* par API 20 NE et exclues du genre *Pseudomonas* par PCR. 56 souches ont été identifiées en tant que *Pseudomonas*. La souche AN a été identifiée comme *Pseudomonas (fluorescens)* par la spectroscopie de fluorescence et API 20 NE mais cette souche n'était pas identifiée par PCR en tant que *Pseudomonas* ; Cette différence peut être liée à un résultat erroné par PCR ou une erreur de manipulation.

III.1.3. Identification au niveau de l'espèce

Il faut noter en premier lieu que l'identification des isolats au niveau de l'espèce n'a été réalisée que par le système API 20 NE tout simplement car la recherche d'amorces spécifiques pour PCR pour chaque espèce n'était pas possible dans le temps imparti et ne faisait d'ailleurs pas partie de nos objectifs.

Parmi les 58 isolats testés par le système API 20 NE, 21 n'ont pas pu être identifiées. Des 37 autres, 15 l'ont été en tant que *P. fluorescens*, 8 en tant que *P. pseudomallei* (désormais classé en tant que *Burkholderia pseudomallei*), 3 en tant que *P. putida*, 3 en tant que *P. chlororaphis*, 3 en tant que *P. picketti* (désormais classé en tant que *Ralstonia picketti*), 2 en tant que *X. maltophilia* (désormais classé en tant que *Stenotrophomonas maltophilia*), 1 en tant que *P. mendocina*, 1 en tant que *Bordetella avium*, et enfin, 1 en tant que *Flavi. oryzihabitans* (Tableau 4).

Le système automatisé d'identification API 20 NE s'est révélé de peu d'intérêt pour ces isolats qui ont probablement subi des pressions adaptatives complexes. Ce résultat est d'ailleurs cohérent avec celui déjà observé par de nombreux auteurs (Bosshard et al., 2006) et peu surprenant dans la mesure où ce système n'intègre, dans sa base données actuellement commercialisée, que 14 espèces de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. mendocina*, *P. stutzeri*, *P. alcaligenes* et *P. pseudoalcaligenes*, *P. vesicularis*, *P. diminuta*, *P. paucimobilis*, *P. mesophilica* et *P. putrefaciens*).

Par spectroscopie de fluorescence et en utilisant l'analyse factorielle discriminante pour le traitement des données et la comparaison des spectres d'isolats à ceux des souches de référence, toutes les souches sauf une ont pu être positionnées avec une cohérence pour les 3 spectres enregistrés par souche (sauf pour la souche EM).

Des 15 souches identifiées en tant que *P. fluorescens* par API 20 NE, 13 ont été identifiées en tant que *P. fluorescens* par spectroscopie de fluorescence, 1 en tant que *P. lundensis* et 1 en tant que *P. fragi*. Ce résultat est peu surprenant dans la mesure où ni *P. fragi* ni *P. lundensis* ne font partie des souches de référence de la base de données API 20 NE.

Des 8 souches identifiées en tant que *P. pseudomallei* (en fait *Burkholderia pseudomallei*) par galerie API 20 NE, 3 qui présentaient le même profil métabolique (même code API 1156575 et très bonne identification au genre mais présomptive au niveau d'espèce) ont été identifiées en tant que *P. fluorescens* biotype III par spectroscopie de fluorescence. Les 5 autres ont été positionnées en tant que *P. migula*, *P. mosselii*, *P. agarici*, *P. marginalis* et *P. fragi*. Les résultats de spectroscopie de fluorescence semblent donc pertinents, d'autant que ces huit souches avaient été identifiées en tant que *Pseudomonas* spp. par PCR. Il convient tout de même de préciser qu'aucune des espèces *migula*, *mosselii*, *agarici*, *marginalis* et *fragi* ne sont pas intégrées dans les bases de référence API.

Des 3 souches identifiées en tant que *P. putida* (3/58) par API 20 NE, une a été identifiée en tant que *P. putida* par spectroscopie de fluorescence, une en tant que *P. fragi* et une en tant que *P. fluorescens*.

3 souches identifiées en tant que *P. chlororaphis* par API 20 NE, ont été identifiées par spectroscopie de fluorescence en tant que *P. fragi*.

3 souches ont été identifiées en tant que *P. picketti* (reclassée en tant que *Ralstonia pickettii*) par API 20 NE. En fait, pour 2 d'entre elles, le code API proposait *P. picketti* à 68 % et *P. putida* à 14 % ; par spectroscopie de fluorescence, l'une a été identifiée en tant que *P. fluorescens* et l'autre en tant que *P. mentelii*, il faut noter que ces deux souches ont été identifiées en tant que *Pseudomonas* spp. par PCR. La troisième souche a été identifiée en tant que *P. fragi*.

Les deux souches identifiées par API 20 NE en tant que *Xanthomonas maltophilia* (reclassé en tant que *Stenotrophomonas maltophilia*) ont été identifiées en tant que *Stenotrophomonas maltophilia* par spectroscopie de fluorescence.

Les souches identifiées en tant que *P. mendocina*, *Bordetella avium* et *Flavibacterium oryzihabitans*, par API 20 NE, et considérées comme *Non-Pseudomonas* par PCR ont été identifiées en tant que *P. mendocina*, *P. chlororaphis* et *P. fragi* respectivement par spectroscopie de fluorescence.

Enfin, concernant les souches Non-identifiées par le système API 20 NE (21/58 souches), 16 souches ont été identifiées spectroscopie de fluorescence en tant que *P. fragi* (*P.frg1*, *P.frg2*), 2 en tant que *P. fluorescens*, une en tant que *P. agarici*, une en tant que *P. lundensis* et une en tant que *P.mentelii*.

Conclusion

L'objectif de cette analyse était d'évaluer les potentialités de la spectroscopie de fluorescence synchrone (avec lecture directe des colonies par fibre optique) pour l'identification d'isolats préalablement caractérisés en tant que *Pseudomonas* ou apparentés par isolement sur milieu sélectif.

Les résultats que nous avons obtenus sont très encourageants mais nous en présenterons d'abord les limites :

- L'assignation d'un spectre d'isolat (ou plutôt de 3 spectres d'un isolat) à un groupe préformé correspondant aux spectres d'une souche de référence ne peut se conduire, à des fins de taxonomie, que sur la base de très larges bases de données qui comprennent toutes les espèces de référence d'un genre et tous les genres du groupe phylogénétique. Ces bases de données se doivent également d'intégrer des isolats représentatifs des niches écologiques des espèces étudiées. Or les Pseudomonads sont distribuées dans toute la nature, les sols et la rhizosphère de divers végétaux, dans des eaux douces ou marines et même dans les nuages. Ils sont présents dans la flore intestinale de l'homme et des animaux, et peuvent contaminer les denrées alimentaires et même les préparations pharmaceutiques, et possèdent un pouvoir adaptatif génétique et physiologique puissant. Nous ne nous sommes appuyés, dans cette étude préliminaire que sur une base de données très restreinte même si représentative des principales espèces isolées des ateliers carnés. Pour rappel, cette base est constituée de 37

souches de référence, dont 34 souches du genre *Pseudomonas* et 3 souches appartenant aux trois autres genres (*Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*).

- Le logiciel de traitement des données spectrales s'est avéré être très limitant quant à la rapidité et au potentiel de comparaison des spectres. Il est très probable que des logiciels mieux adaptés, basés sur une approche en réseaux de neurones par exemple permettraient d'accroître la vitesse de traitement des résultats.

- La validation de nos résultats devrait s'appuyer sur des méthodes fiables d'identification des isolats. Or à ce jour, concernant les Pseudomonads et plus précisément les espèces du groupe des Gammaproteobacteria, cette méthode n'existe pas (cf bibliographie). Nous avons néanmoins réalisé plusieurs essais pour identifier les souches au niveau de l'espèce par PCR en utilisant des amorces spécifiques décrites dans la littérature pour certaines espèces : les amorces SPSEFluF et SPSEr (Scarpellini Mauro et al., 2004) pour *P. fluorescens*, les amorces putF, lunF, fraF et le gène *carA* en PCR multiplex pour les espèces *P. fragi*, *P. lundensis* et *P. putida* (Ercolini Danilo et al., 2007), (Hilario Elena et al., 2003). Malheureusement, malgré nos essais répétés, nous ne sommes pas parvenus à amplifier toutes les souches de référence des espèces concernées (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fragi* et *P. lundensis*).

Néanmoins et compte-tenu des limites précédemment évoquées, nos travaux présentent des résultats très encourageants.

Dans tous les cas où les isolats étaient identifiés sans ambiguïté par galerie API, les résultats d'identification par spectroscopie de fluorescence se sont révélés cohérents. Ceci était le cas pour les souches AY et Q (*S. maltophilia*), DJ (*P. mendocina*), AR (*P. putida*), M, Z, AL, AN, BA, BP, BQ, CI, DD, DH, DQ, EJ, EK (*P. fluorescens*).

La spectroscopie de fluorescence a également permis une identification au niveau des biotypes dans des cas où cela s'était avéré impossible par API et PCR. Ceci était net pour certaines souches de *P. fluorescens* et *P. putida*. A titre d'exemple, les souches M, AL, AN, BP, BY, DF, CI, DH, DQ et DS ont pu être identifiées en tant que *P. fluorescens* biotype III, tandis que la souche Z a été identifiée en tant que *P. fluorescens* biotype F et les souches E, AT, AZ, BA, BK, BQ, DD, DH, EJ et EK ont été identifiées en tant que *P. fluorescens* Biotype A.

Dans l'état actuel de nos données, la méthode que nous avons présentée ne peut être considérée comme une méthode alternative aux méthodes existantes mais comme une méthode complémentaire susceptible d'apporter très rapidement des informations quant aux proximités taxonomiques des souches.

La méthode est précise répétable et extrêmement rapide pour l'acquisition des données spectrales. Elle ne requière aucun réactif ou additif et, sous réserve de construction de larges bases de données, pourrait présenter un intérêt certain pour le secteur hospitalier ou agroalimentaire des pays ayant difficilement accès aux réactifs de laboratoire.

IV. Traçabilité microbienne

Comme précisé dans le chapitre « Matériel et Méthodes » toutes les souches présentées dans ce chapitre proviennent de différents prélèvements réalisés sur une journée dans deux abattoirs. L'objectif de l'analyse était de d'une part : (i) de comparer les données spectrales recueillies dans les deux abattoirs (existe-t-il un microbisme d'atelier » ?) (ii) de comparer les données spectrales des isolats au sein d'un même atelier afin d'identifier l'origine de contamination des produits par les Pseudomonads.

Les données spectrales ont été recueillies en spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30 nm) par lecture directe des colonies à l'aide d'une fibre optique.

IV.1. Microbisme d'atelier ?

Pour cette analyse, les données spectrales correspondant à l'ensemble des isolats (133) analysés ont été réunies en une matrice puis analysés par ACP suivie d'une AFD. Avant d'appliquer l'analyse discriminante, 2 groupes ont été créés, chacun d'entre eux rassemblant les isolats d'un même atelier ATEL1(63 isolats, ATEL2 70 isolats). Les résultats de l'analyse en matrice de confusion pour l'échantillon d'estimation ont montré 100 % de bonne classification, les résultats de la validation croisée résultant de l'AFD ont montré 80,4 % de bonne classification, la présentation en est donnée sur la figure 32 :

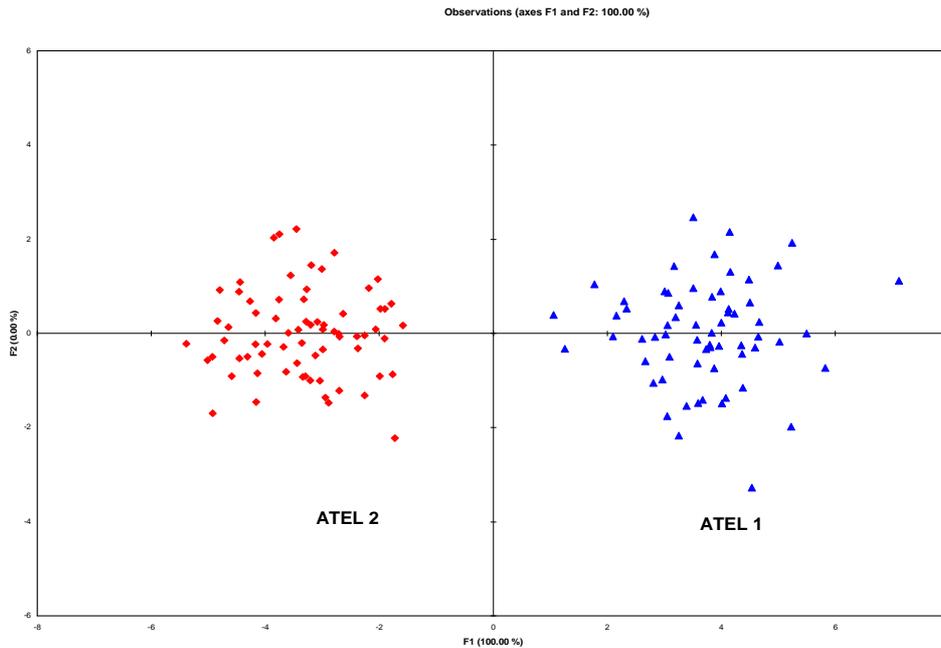


Figure 32 : Carte factorielle résultant de l'AFD réalisée sur les données spectrales des isolats provenant de deux abattoirs (bleu : abattoir 1, rouge : abattoir 2)

Le facteur discriminant F1 présente une forte pertinence puisqu'il explique 100 % de la variance totale. Selon celui ci, la différence est nette entre les isolats provenant des deux ateliers. Bien que l'objectif du travail présenté ne soit pas d'analyser les raisons des différences observées, nous pouvons tout de même émettre l'hypothèse qu'il existe bien un écosystème microbien propre à chaque atelier dit microbisme d'atelier. Cette idée conforte les résultats présentés par M.C. Montel dans son analyse comparative de la croissance de *Listeria* dans différents ateliers fromagers (Saubusse et al., 2007).

Ceci nous amène à penser qu'il serait possible de construire une base de données spectrales spécifique des isolats de chaque atelier ce qui permettrait de prédire l'origine de contaminations d'un produit final, et d'en identifier l'origine ce qui serait d'autant plus intéressant lorsqu'il existe plusieurs fournisseurs des matières premières. L'intérêt de cette approche vient aussi de la rapidité de réponse puisqu'il suffit analyser les colonies sur les milieux d'isolement. Ces résultats confirment, aussi la sensibilité de cette méthode.

IV.2. Discrimination des isolats Pseudomonads selon leurs origines de prélèvement au sein d'un abattoir

- Dans le premier atelier, les données spectrales correspondant à l'ensemble des 63 isolats analysés ont été réunies en une matrice puis analysés par ACP suivie d'une AFD. Avant d'appliquer l'analyse discriminante, 5 groupes ont été créés correspondant aux 5 « lieux » des prélèvements réalisés au sein de cet abattoir (Carcasses, Eau, Equipements, Peau, surfaces) chacun d'entre eux rassemblant les isolats d'un même lieu de prélèvement. La figure 33 présente la carte factorielle de l'AFD définie par les deux premiers facteurs discriminants F1 et F2 qui représentent 64,5 % de la variance totale. Selon le facteur F1 qui représente 38,6 % de la variance totale, on observe un fort degré d'homologie pour les spectres issus des isolats provenant des surfaces et ceux des carcasses. Ces deux groupes sont également bien discriminés des autres groupes selon le facteur F2 qui représente 25,8 % de la variance totale. On observe également que les isolats provenant de la peau sont bien discriminés des autres groupes, sauf quelques isolats (3 spectres) qui montrent une homogénéité avec les isolats des surfaces et des carcasses. La même observation peut être faite pour quelques spectres dans le groupe des isolats provenant de l'eau. Il apparaît donc cohérent, dans ce cas de figure, de suspecter que la contamination trouvée en carcasses provient principalement des surfaces de contact.

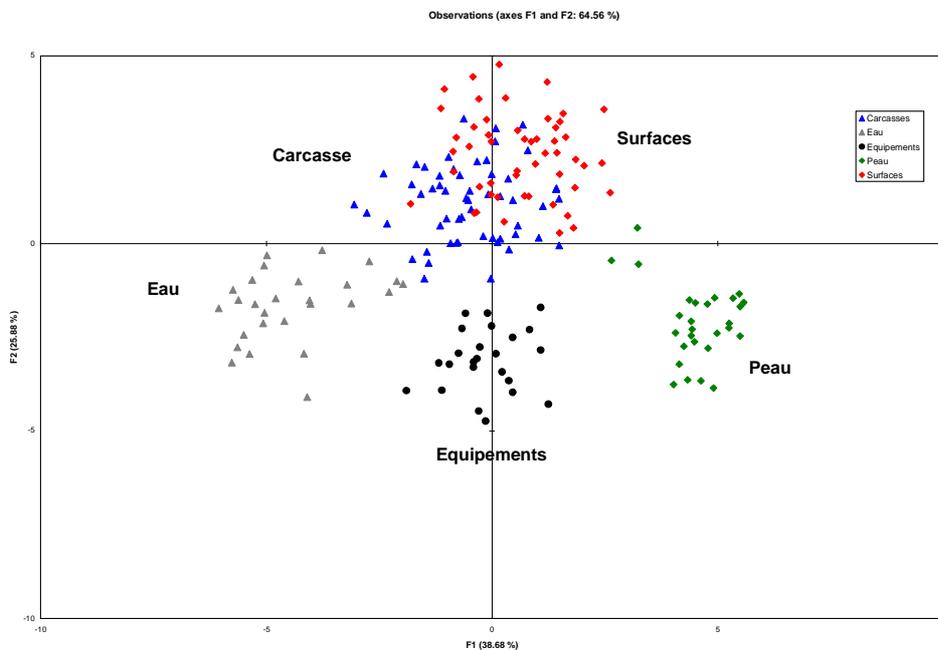


Figure 33 : Carte factorielle résultant de l'AFD réalisée sur les données spectrales des isolats de l'abattoir ATEL1

- Dans le seconde atelier, les données spectrales correspondant à l'ensemble des 70 isolats analysés ont été réunies en une matrice puis analysés par ACP suivie d'une AFD. Avant d'appliquer l'analyse discriminante, 5 groupes ont été créés correspondant aux 5 sites de prélèvement réalisés au sein de cet atelier (Carcasses, Eau, Equipements, Air, surfaces). Par comparaison avec le premier atelier, il convient de préciser qu'aucun isolat n'a pu être récupéré au niveau des peaux alors que des prélèvements d'air ont été effectués ce qui n'avait pas été possible dans le premier abattoir pour des raisons techniques. La figure 34 présente la carte factorielle de l'AFD définie par les deux premiers facteurs discriminants F1 et F2 qui représentent 76,2 % de la variance totale. On observe une forte homologie entre les spectres issus des isolats provenant de l'air, des équipements et des carcasses. Les spectres issus des isolats provenant de l'eau et des surfaces sont très bien discriminés entre eux et nettement distincts de ceux provenant du premier groupe précité. On peut donc suspecter que la contamination des carcasses provient principalement de l'air et des équipements.

Ces résultats montrent la capacité de la spectroscopie de fluorescence à discriminer les souches selon leur origine à partir de leurs spectres de fluorescence et à déterminer les vecteurs de contaminations. Ces résultats avaient déjà été observés lors d'une étude menée au sein de l'Unité de Recherche de Typicité des Produits Alimentaires et concernant la contamination en Pseudomonads d'ateliers fromagers (Leriche et al., 2004). Les différences remarquées entre les isolats de chaque lieu de prélèvement surtout la peau dans le premier cas et l'eau et les surfaces dans le deuxième cas, évoquent l'adaptation de ces bactéries aux différents paramètres environnementaux et très probablement aux biocides utilisés pour la désinfection des petits matériels.

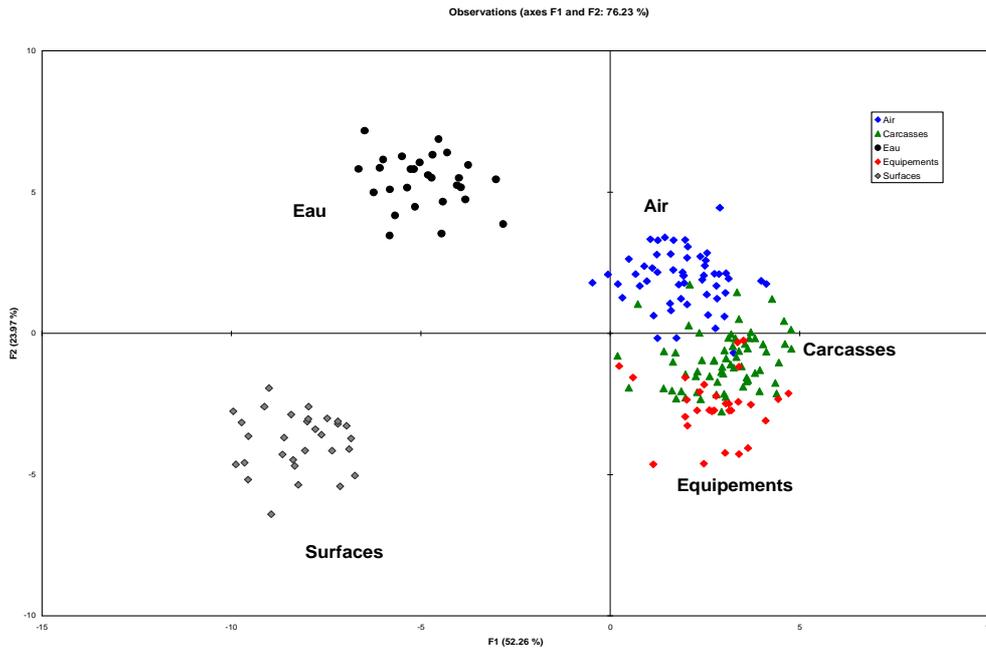


Figure 34 : Carte factorielle résultant de l'AFC réalisée sur les données spectrales des isolats de l'abattoir ATEL2

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les bactéries appartenant au groupe des Pseudomonads sont très largement répandues dans différents environnements et font l'objet de multiples travaux depuis plusieurs décennies. Pourtant, malgré les progrès des méthodes de génomique moléculaire, la taxonomie de ces bactéries reste encore ambiguë voire non aboutie pour de nombreuses espèces.

Les méthodes traditionnelles d'identification et de classification ces bactéries reposent sur l'étude des caractères phénotypiques (morphologie cellulaires, coloration de Gram, tests physiologiques et biochimiques...). Elles sont toujours longues à mettre en oeuvre, présentent des limites en terme de reproductibilité et de précision et sont très consommatrices en temps et en réactifs tout en impliquant l'utilisation d'une grande diversité de méthodes.

L'étude des caractères génomiques a bénéficié des progrès spectaculaires des techniques de biologie moléculaire, ce qui a permis de confirmer et, dans certains cas, de modifier les classifications et identifications phénotypiques précédemment proposées. Ces méthodes moléculaires sont plus rapides et plus précises mais elles ont l'inconvénient d'être lourdes à exécuter techniquement et nécessitent des consommables souvent très onéreux. La fiabilité, la justesse et la sensibilité des méthodes de caractérisation des microorganismes sont des critères très importants, mais la rapidité et le coût modéré sont également des critères impératifs et parfois prioritaires pour les laboratoires à fin de répondre aux différentes contraintes auxquelles ils sont confrontés (médicales, production, etc..).

En se basant sur ce constat, nous nous sommes attachés à développer une méthode de caractérisation des microorganismes, rapide, sensible, précise et peu coûteuse, basée sur la spectroscopie de fluorescence. Le modèle d'étude choisi a été celui des Pseudomonads qui constituent une des principales flores d'altération des produits alimentaires mais aussi un des groupes bactériens présentant une des plus grandes diversités phénotypique et génotypique décrites à ce jour.

En premier lieu, et afin de définir les meilleures conditions de préparation des échantillons, d'enregistrement et de traitement des données, nous avons travaillé sur 11 souches de référence de Pseudomonads dont 8 espèces du genre *Pseudomonas* et trois souches appartenant à trois autres genres apparentés. Dans cette étape nous avons exploité la

potentialité de cette spectroscopie pour discriminer les souches de référence et étudier leurs taxonomies au niveau du genre et de l'espèce.

Depuis plusieurs années notre équipe utilisait cette méthode à des fins d'identification bactérienne au niveau du genre de l'espèce voire du biotype (Leblanc & Dufour, 2002, Ammor, S. *et al*, 2004, Leriche, F. *et al*, 2004) mais, pour ces expérimentations, les isolats étaient repris en bouillon nutritif et mis en croissance de telle sorte que l'analyse porte sur une culture « synchronisée » en phase exponentielle. Nous souhaitons nous affranchir de cette étape, c'est pourquoi, nos premières expériences ont porté sur des suspensions bactériennes (DO_{600nm} de 0,05) préparées directement à partir des colonies prélevées sur un milieu solide. Les spectres d'émission de trois fluorophores intrinsèques, le NADH (ex 340, em 380-550), le tryptophane (ex 270, em 305-400), et le complexe des acides aminés aromatiques et acides nucléiques (ex 250, em 280-480) ont été recueillis. Les traitements de données ont été effectués par l'analyse en composantes principales (ACP) et l'analyse factorielle discriminante (AFD). Les souches de référence appartenant des genres *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia* et *Pseudomonas* ont été bien discriminées, avec des sensibilités et sélectivités supérieures à 90%. Un pouvoir discriminant similaire a été observé lorsque l'analyse était menée au niveau du genre *Pseudomonas* (stricto-sensu) de ses espèces. Ainsi, par exemple, par excitation du complexe acide aminés + acides nucléiques, les espèces *P. lundensis*, *P. taetrolens*, *P. fragi*, *P. chlororaphis* et *P. stutzeri* ont été séparées et positionnées dans un groupe distinct de *P. putida*, *P. pseudoalcaligenes*, et *P. fluorescens* ; dans cas, les pourcentages de bonnes prédictions étaient de 97,9 %. Ces résultats sont en accord avec la phylogénie basée de l'analyse comparatives des séquences ARN 16S (Anzai et al., 2000).

La méthode a ensuite été testée sur 21 souches sauvages isolées d'abattoirs. La comparaison des résultats d'identification par spectroscopie de fluorescence, PCR et identification phénotypique en galerie API 20 NE a montré une excellente pertinence de la méthode notamment pour les souches pour lesquelles l'ambiguïté demeurait après les tests génotypiques et phénotypiques.

Encouragés par ces premiers résultats, nos objectifs ont donc été de nous affranchir des étapes laborieuses de préparation (synchronisation de culture, lavages des cellules bactériennes, mesure de densité optique) pour développer la méthode par acquisition des

spectres de fluorescence en analyse directe des colonies bactériennes au moyen d'une fibre optique liée à un spectroscope.

Nous nous sommes attachés à évaluer la répétabilité des résultats obtenus par l'utilisation de fibre optique. Pour ce faire, pour chaque souche, 3 colonies différentes issues d'une même suspension bactérienne ont été analysées. Pour chaque colonie, nous avons comparé les spectres générés à partir de 2 positions aléatoires de la fibre optique. Pour chaque souche, les analyses ont été réalisées de la même façon sur des colonies après 48, 72 et heures de croissance. Malgré l'hétérogénéité bien connue des populations clonales organisées en colonies, l'analyse de la variance a montré que l'ensemble des facteurs testés avait un effet statistiquement négligeable au regard des variations observées entre souches même si ces dernières appartenaient à des espèces taxonomiquement identifiées comme proches.

Nous avons également cherché à élargir la gamme des informations recueillies à partir des bactéries par l'utilisation de la méthode d'excitation synchrone. Dans cette méthode, la longueur d'onde d'émission et la longueur d'onde d'excitation varient simultanément, tout en conservant entre elles un décalage constant, $\Delta\lambda$. La comparaison des données générées à partir de différentes valeurs de décalage, ($\Delta\lambda$ de 30, 50, 70, 90, 110, 130 nm) a permis de finaliser le choix d'un $\Delta\lambda$ de 30 nm pour lequel 100 % de correcte classification des souches de référence aux niveau genre et espèce était obtenu par test de validation croisée (à partir des données testées en AFD sur les 10 premières composantes principales générées par l'ACP).

Finalement, dans les conditions expérimentales ainsi définies nous avons évalué les utilisations potentielles de la méthode pour la taxonomie des Pseudomonads et l'identification de souches sauvages.

Les résultats des analyses que nous avons réalisées sur 37 souches de référence ont été en accord avec les observations décrites par comparaison de séquences génomiques (Ait Tayeb et al., 2005, Anzai et al., 2000, Bodilis et al., 2004, Bossis et al., 2000, De Vos et al., 1998, Hilario et al., 2004, Moore, 1996, Porteous et al., 2002, Yamamoto et al., 2000) tout en apportant un éclairage nouveau sur le positionnement de certaines souches appartenant à des taxons particulièrement complexes tels que les *Pseudomonas fluorescens* ou *Pseudomonas putida* (Bossis et al., 2000).

Pour cet objectif taxonomique, la méthode est apparue particulièrement adaptée. En effet, le recueil des informations à partir des colonies se fait en quelques minutes et l'utilisation de

méthodes discriminantes descriptives telles que l'analyse factorielle discriminante (sur ACP) ou la classification hiérarchique ascendante permet de comparer extrêmement rapidement l'ensemble des données spectrales tout en identifiant les zones d'excitation (et d'émission) identitaires.

Pour l'identification de souches sauvages, le principe repose sur la comparaison des spectres générés à partir des isolats à ceux générés à partir de souches de référence ou autres souches sauvages pour lesquelles le positionnement taxonomique est bien défini. Compte tenu du nombre limité de souches en référence, nos travaux ne peuvent être considérés qu'exploratoires. Néanmoins, et compte tenu de cette restriction, les résultats des analyses que nous avons menées sur 58 isolats d'abattoir ont été encourageants puisque qu'il a été possible de classer l'ensemble des souches au niveau de l'espèce ou de la sous-espèce. La robustesse de la méthode a été confirmée et les conditions expérimentales de recueil des données spectrales sont apparues tout à fait adaptées à une analyse en laboratoire. Cependant, dans l'objectif de faire de cette méthode une méthode de routine, plusieurs points devront être développés. Ils concernent : (i) la construction d'une large banque de données spectrales (sachant que la pertinence de l'identification est directement corrélée à la taille de la souchothèque qui se doit d'inclure des souches de référence et des souches sauvages), (2) l'utilisation de méthodes chimiométriques et/ou logiciels statistiques mieux adaptés, (3) la comparaison des données spectrales recueillies sur colonies s'étant développées sur différents milieux de culture.

Enfin, nous nous sommes appuyées sur les méthodes descriptives relevant de la chimiométrie pour comparer les données spectrales de 133 Pseudomonads isolés de 2 abattoirs régionaux. Les bactéries ont été parfaitement discriminées selon l'abattoir dont elles provenaient ce qui a souligné une fois de plus le fort pouvoir adaptatif de ces bactéries et la notion de microbisme écologique. Au sein de chaque abattoir, la comparaison des données spectrales a permis de grouper les micro-organismes selon leur origine et par comparaison des proximités entre groupes, d'identifier l'origine des contaminations sur produits. Cette application très simple et rapide permet d'envisager, par exemple, la construction de bases de données spectrales spécifiques de chaque abattoir fournissant ainsi un outil de « traçabilité bactérienne » répondant aux besoins des producteurs agroalimentaires pour une démarche d'analyse des risques.

Pour la taxonomie en terme de phylogénie et d'identification des micro-organismes et plus particulièrement ici des Pseudomonads, la spectroscopie de fluorescence s'est révélée être une méthode sensible, robuste et fiable qui présente de nombreux avantages. Les premiers d'entre eux résident en la rapidité et la facilité d'acquisition des données qui ne repose sur aucune préparation spécifique et donc modification éventuelle des structures et ne requière aucun réactif.

La spectroscopie de fluorescence comporte encore des « boites » noires » qui ne permettent de l'envisager qu'en complément des approches phénotypiques classiques et des approches génomiques mais font d'elle un outil puissant pour une approche polyphasique de la taxonomie microbienne.

Dans le champ exploratoire de la caractérisation physiologique des micro-organismes, les possibilités qui s'ouvrent sont également très nombreuses et très prometteuses.

La spectroscopie de fluorescence n'en est qu'aux prémices de son utilisation et nous espérons avoir contribué, par notre travail, à la reconnaissance de ses performances auprès des microbiologistes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ait Tayeb, L., Ageron, E., Grimont, F., Grimont, P.A.D., 2005. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on rpoB sequences and application for the identification of isolates. *Res Microbiol.* 156, 763-773.
- Albani, J.R., 2007. principles and applications of fluorescence spectroscopy, Blackwell, Iowa.
- Alimova, A., Katz, A., Siddique, M., Minko, G., Savage, H.E., Shah, M.K., Rosen, R.B., Alfano, R.R., 2005. Native fluorescence changes induced by bactericidal agents. *Sensors Journal, IEEE.* 5, 704-711.
- Allais, I., Edoura-Gaena, R.B., Dufour, E., 2006. Characterisation of lady finger batters and biscuits by fluorescence spectroscopy-Relation with density, color and. *J Food Eng.* 77, 896-909.
- Amiali, N.M., Mulvey, M.R., Berger-Bächli, B., Sedman, J., Simor, A.E., Ismail, A.A., 2008. Evaluation of Fourier transform infrared spectroscopy for the rapid identification of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 61, 95-102.
- Amiel, C., Laurence Mariey, L., Curk-Daubié, M.C., Pichon, P., Travert, J., 2000. Potentiality of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for discrimination and identification of dairy Lactic acid bacteria. *Lait* 80, 445-459.
- Ammor, M.S., Delgado, S., Alvarez-Martin, P., Margolles, A., Mayo, B., 2007. Reagentless identification of *human bifidobacteria* by intrinsic fluorescence. *J Microbiol Methods.* 69, 100-106.
- Ammor, M.S., Flórez, A.B., Margolles, A., Mayo, B., 2006. Fluorescence spectroscopy: a rapid tool for assessing tetracycline resistance in *Bifidobacterium longum*. *Can J Microbiol.* 52, 740-746.
- Ammor, S., Yaakoubi, K., Chevallier, I., Dufour, E., 2004. Identification by fluorescence spectroscopy of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *J Microbiol Methods.* 59, 271-281.
- Andrade Eiroa, A., Vázquez Blanco, E., López Mahía, P., Muniategui Lorenzo, S., Prada Rodríguez, D., Fernández Fernández, E., 2000. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a complex mixture by second-derivative constant-energy synchronous spectrofluorimetry. *Talanta.* 51, 677-684.

- Anhalt, J.P., Fenselau, C., 1975. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem.* 47, 219-225.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J., Wakabayashi, H., Oyaizu, H., 2000. Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonads* based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50, 1563 - 1589.
- Anzai, Y., Kudo, Y., Oyaizu, H., 1997. The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. *Int J Syst Bacteriol.* 47, 249-251.
- Arnaut-Rollier, I., De Zutter, L., Van Hoof, J., 1999. Identities of the *Pseudomonas spp.* in flora from chilled chicken. *Int J Food Microbiol.* 48, 87-96.
- Arnaut-Rollier, I., Vauterin, L., De Vos, P., Massart, D.L., Devriese, L.A., De Zutter, L., Van Hoof, J., 1999. A numerical taxonomic study of the *Pseudomonas* flora isolated from poultry meat. *J Appl Microbiol.* 87, 15-28.
- Astrid Oust Janbu, T.M.D.B.A.K., 2008. FT-IR microspectroscopy: a promising method for the rapid identification of *Listeria* species. *FEMS Microbiol Lett.* 278, 164-170.
- Atalan, E., Manfio, G.P., Ward, A.C., Kroppenstedt, R.M., Goodfellow, M., 2000. Biosystematic studies on novel *streptomycetes* from soil. *Antonie van Leeuwenhoek.* 77, 337-353.
- Beattie, S.H., Holt, C., Hirst, D., Williams, A.G., 1998. Discrimination among *Bacillus cereus*, *B. mycoides* and *B. thuringiensis* and some other species of the genus *Bacillus* by Fourier transform infrared spectroscopy. *FEMS Microbiol Lett.* 164, 201-206.
- Ben-Jacob, E., Cohen, I., Gutnick, D.L., 1998. Cooperative organization of bacterial colonies: from genotype to morphotype. *Annu Rev Microbiol.* 52, 779-806.
- Ben-Jacob, E., Shapira, Y., Becker, I., Raichman, N., Volman, V., Hulata, E., Baruchi, I., 2003. Communication-based regulated freedom of response in bacterial colonies. *Physica A.* 330, 218-231.
- Bennasar, A., Guasp, C., Tesar, M., Lalucat, J., 1998. Genetic relationships among *Pseudomonas stutzeri* strains based on molecular typing methods. *J Appl Microbiol.* 85, 643-656.
- Bennasar, A., Rossello-Mora, R., Lalucat, J., Moore, E.R.B., 1996. 16S rRNA Gene Sequence Analysis Relative to Genomovars of *Pseudomonas stutzeri* and Proposal of *Pseudomonas balearica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 46, 200-205.
- Berger, A.J., Zhu, Q., 2003. Identification of oral bacteria by raman microspectroscopy. *J Mod Opt.* 50, 2375 - 2380.

- Bernardo, K., Pakulat, N., Macht, M., Krut, O., Seifert, H., Fler, S., Hüniger, F., M., K., 2002. Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics*. 2, 747-753.
- Bertrand, D., Courcoux, P., Qannari, E.M., 2006. Méthodes exploratoires In: D. Bertrand, E. Dufour (Eds.), *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*, Lavoisier Paris, pp. 317-345.
- Bertrand, D., Scotter, C.N.G., 1992. Application of Multivariate Analyses to NIR Spectra of Gelatinized Starch. *Appl Spectrosc*. 46, 1420-1425.
- Bhatta, H., Goldys, E.M., Learmonth, R.P., 2006. Use of fluorescence spectroscopy to differentiate yeast and bacterial cells. *Appl Microbiol Biotechnol*. 71, 121-126.
- Bodilis, J., Barray, S., 2006. Molecular evolution of the major outer-membrane protein gene (*oprF*) of *Pseudomonas*. *Microbiology*. 152, 1075-1088.
- Bodilis, J., Calbrix, R., Guérillon, J., Mérieau, A., Pawlak, B., Orange, N., Barray, S., 2004. Phylogenetic relationships between environmental and clinical isolates of *Pseudomonas fluorescens* and related species deduced from 16S rRNA gene and *OprF* protein sequences. *Syst Appl Microbiol*. 27, 93-108.
- Bosch, A., Minan, A., Vescina, C., Degrossi, J., Gatti, B., Montanaro, P., Messina, M., Franco, M., Vay, C., Schmitt, J., Naumann, D., Yantorno, O., 2008. Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Rapid Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacteria Isolated from Sputum Samples from Cystic Fibrosis Patients. *J. Clin. Microbiol*. 46, 2535-2546.
- Bosshard, P.P., Zbinden, R., Abels, S., Böddinghaus, B., Altwegg, M., Böttger, E.C., 2006. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 44, 1359-1366.
- Bossis, Lemanceau, P., Latour, X., Gardan, L., 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, 20, 51-63
- Boubellouta, T., Dufour, E., 2008. Effects of mild heating and acidification on the molecular structure of milk components as investigated by synchronous front-face fluorescence spectroscopy coupled with parallel factor analysis. *Appl Spectrosc*. 62, 490-496.

- Brahma, S.K., Baek, M.P., Gaskill, D., Force, R.K., Nelson, W.H., Sperry, J., 1985. The Rapid Identification of Bacteria Using Time-Resolved Fluorescence and Fluorescence Excitation Spectral Methods. *Appl Spectrosc.* 39, 869-872.
- Bright, J.J., Claydon, M.A., Soufian, M., Gordon, D.B., 2002. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *J Microbiol Methods.* 48, 127-138.
- Britton, K.A., Dalterio, R.A., Nelson, W.H., Britt, D., Sperry, J.F., 1988. Ultraviolet Resonance Raman Spectra of *Escherichia coli* with 222.5-251.0 nm Pulsed Laser Excitation. *Appl. Spectrosc.* 42, 782-788.
- Bronk, B.V., Reinisch, L., 1993. Variability of Steady-State Bacterial Fluorescence with Respect to Growth Conditions. *Appl Spectrosc.* 47, 436-440.
- Brosch, R., Lefevre, M., Grimont, F., Grimont, P.A.D. , 1996. Taxonomic diversity of Pseudomonads revealed by computer-interpretation of ribotyping data, *Syst Appl Microbiol.* 19, 541-555.
- Brown, V.I., Lowbury, E.J.L., 1965. Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Pathol.* 18, 752-756.
- Bultreys, A., Gheysen, I., Wathélet, B., Maraite, H., de Hoffmann, E., 2003. High-Performance Liquid Chromatography Analyses of Pyoverdin Siderophores Differentiate among Phytopathogenic Fluorescent *Pseudomonas* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1143-1153.
- Busse, H.-J., Denner, E.B.M., Lubitz, W., 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J Biotechnol.* 47, 3-38.
- Cantor, C.R., Schimmel, P.R., 1980. Part II: techniques for the study of biological structure and function. In: S. P. Cantor CR (Ed.), *Biophys Chem*, Freeman, New York, pp. 409–480.
- Chadha, S., Manoharan, R., Mo, nne-Loccoz, P., Nelson, W.H., Peticolas, W.L., Sperry, J.F., 1993a. Comparison of the UV Resonance Raman Spectra of Bacteria, Bacterial Cell Walls, and Ribosomes Excited in the Deep UV. *Appl Spectrosc.* 47, 38-43.
- Chadha, S., Nelson, W.H., Sperry, J.F., 1993b. Ultraviolet micro-Raman spectrograph for the detection of small numbers of bacterial cells. *Rev Sci Instrum.* 64, 3088-3093.
- Chen, F., Xia, Q., Ju, L.-K., 2003. Aerobic Denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* Monitored by Online NAD(P)H Fluorescence. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6715-6722.

- Cho, J.-C., Tiedje, J.M., 2000. Biogeography and Degree of Endemicity of Fluorescent *Pseudomonas* Strains in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5448-5456.
- Choo-Smith, L.P., Maquelin, K., Endtz, H.P., Bruining, H.A., Puppels, G.J., 1999. A novel method for rapid identification of micro-organisms using confocal Raman microspectroscopy. *Spectrosc. Biol. Mol. New Dir.* 8, 537-540.
- Christensen, H., Boye, M., Poulsen, L.K., Rasmussen, O.F., 1994. Analysis of fluorescent Pseudomonads based on 23S ribosomal DNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2196-2199.
- Chun, J., Atalan, E., Ward, A.C., Goodfellow, M., 1993. Artificial neural network analysis of pyrolysis mass spectrometric data in the identification of *Streptomyces* strains. *FEMS Microbiol Lett.* 107, 321-325.
- Clayton, R.A., Sutton, G., Hinkle, P.S.J., Bult, C., Fields, C., 1995. Intraspecific Variation in Small-Subunit rRNA Sequences in GenBank: Why Single Sequences May Not Adequately Represent Prokaryotic Taxa. *Int J Syst Bacteriol.* 45, 595-599.
- Costerton, J.W., 1995. Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol.* 15, 137-140.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 49, 711-745.
- Cui, F., Qin, L., Zhang, G., Liu, X., Yao, X., Lei, B., 2008. A concise approach to 1,11-didechloro-6-methyl-4'-O-demethyl rebeccamycin and its binding to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy and molecular modeling method. *Bioorg Med Chem.* 16, 7615-7621.
- Curk, M.C., Peledan, F., Hubert, J.C., 1994. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett.* 123, 241-248.
- Dabboussi, F., Hamze, M., Elomari, M., Verhille, S., Baida, N., Izard, D., Leclerc, H., 1999. *Pseudomonas libanensis* sp. nov., a new specie isolated from Lebanese spring waters. *Int J Syst Bacteriol.* 49, 1091-1101.
- Dawson, S.L., Fry, J.C., Dancer, B.N., 2002. A comparative evaluation of five typing techniques for determining the diversity of fluorescent Pseudomonads. *J Microbiol Methods.* 50, 9-22.
- De Ley, J., 1992. The proteobacteria: Ribosomal RNA cistron similarities and bacterial taxonomy. In *The Prokaryotes*, 2nd ed., ed. by Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K. H., Springer Verlag, Germany, 2111–2140.

- De Vos, D., Bouton, C., Sarniguet, A., De Vos, P., Vauterin, M., Cornelis, P., 1998. Sequence Diversity of the *oprI* Gene, Coding for Major Outer Membrane Lipoprotein I, among rRNA Group I Pseudomonads. *J. Bacteriol.* 180, 6551-6556.
- De Vos, P., De Ley, J., 1983. Intra- and Intergeneric Similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* Ribosomal Ribonucleic Acid Cistrons. *Int J Syst Bacteriol.* 33, 487-509.
- De Vos, P., Goor, M., Gillis, M., De Ley, J., 1985. Ribosomal Ribonucleic Acid Cistron Similarities of Phytopathogenic *Pseudomonas* Species. *Int J Syst Bacteriol.* 35, 169-184.
- De Vos, P., van Landschoot, A., Segers, P., 1989 Genotypic relationships and taxonomic localization of unclassified *Pseudomonas* and *Pseudomonas*-like strains by deoxyribonucleic acid : ribosomal ribonucleic acid hybridizations. *Int J Syst Bacterio.* 39, 35-49.
- De Vos, P., Van Landschoot, A., Segers, P., Tytgat, R., Gillis, M., Bauwens, M., Rossau, R., Goor, M., Pot, B., Kersters, K., Lizzaraga, P., De Ley, J., 1989. Genotypic Relationships and Taxonomic Localization of Unclassified *Pseudomonas* and *Pseudomonas*-Like Strains by Deoxyribonucleic Acid : Ribosomal Ribonucleic Acid Hybridizations. *Int J Syst Bacteriol.* 39, 35-49.
- Delorme, S., Lemanceau, P., Christen, R., Corberand, T., Meyer, J.M., Gardan, L., 2002. *Pseudomonas lini* sp. nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52, 513-523.
- Dogan, B., Boor, K.J., 2003. Genetic Diversity and Spoilage Potentials among *Pseudomonas* spp. Isolated from Fluid Milk Products and Dairy Processing Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 130-138.
- Dufour, E., Devaux, M.F., Fortier, P., Herbert, S., 2001. Delineation of the structure of soft cheeses at the molecular level by fluorescence spectroscopy--relationship with texture. *Int. Dairy J.* 11, 465-473.
- Dufour, E., Letort, A., Laguet, A., Lebecque, A., Serra, J.N., 2006. Investigation of variety, typicality and vintage of French and German wines using front-face fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta.* 563, 292-299.
- Dziuba, B., Babuchowski, A., Nalecz, D., Niklewicz, M., 2007. Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. *Int. Dairy J.* 17, 183-189.
- Efrima, S., Bronk, B.V., 1998. Silver Colloids Impregnating or Coating Bacteria. *J. Phys. Chem. B.* 102, 5947-5950.

- Efrima, S., Bronk, B.V., Czege, J., 1999. Surface-enhanced Raman spectroscopy of bacteria coated by silver, *Advances in Fluorescence Sensing Technology IV*, Vol. 3602, SPIE, San Jose, CA, USA, pp. 164-171.
- Efrima, S., Zeiri, L., 2008. Understanding SERS of bacteria. *J Raman Spectrosc.* 9999, n/a.
- Ercolini, D., Russo, F., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., Villani, F., 2007. Simultaneous Detection of *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, and *P. putida* from Meat by Use of a Multiplex PCR Assay Targeting the *carA* Gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2354-2359.
- Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I., Villani, F., 2009. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology.* 26, 228-231.
- Estes, C., Duncan, A., Wade, B., Lloyd, C., Ellis, W., Powers, L., 2003. Reagentless detection of microorganisms by intrinsic fluorescence. *Biosens Bioelectron.* 18, 511-519.
- Filip, Z., Hermann, S., 2001. An attempt to differentiate *Pseudomonas spp.* and other soil bacteria by FT-IR spectroscopy. *Eur. J. Soil Biol.* 37, 137-143.
- Fischer, G., Braun, S., Thissen, R., Dott, W., 2006. FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *J Microbiol Methods.* 64, 63-77.
- Fisher, R.A., 1936. The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Ann. Of Eugenics.* 7, 179-188.
- Flint, S., Hartley, N., 1996. A modified selective medium for the detection of *Pseudomonas* species that cause spoilage of milk and dairy products. *Int. Dairy J.* 6, 223-230.
- Fox, A., 2006. Mass Spectrometry for Species or Strain Identification after Culture or without Culture: Past, Present, and Future. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2677-2680.
- Fuchs, R.S., M.; Geoffroy, V.; Meyer, J-M., 2001. Siderotyping A Powerful Tool for the Characterization of Pyoverdines. *Curr Top Med Chem.* 1, 31-57.
- Genot, C., Tonetti, F., Montenay-Garestier, T., Drapron, R., 1992a. Front-face fluorescence applied to structural studies of proteins and lipid-protein interactions of visco-elastic food products. I: Designing of front-face adaptor and validity of front-face fluorescence measurements. *Science des Aliments* 12, 192-212.
- Genot, C., Tonetti, F., Montenay-Garestier, T., Drapron, R., 1992b. Front-face fluorescence applied to structural studies of proteins and lipid-protein interactions of visco-elastic food products. 2- application to wheat gluten, *Science des Aliments.* 12, 687-704.

- Geornaras, I., Kunene, N.F., von Holy, A., Hastings, J.W., 1999. Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting of *Pseudomonas* Strains from a Poultry Processing Plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3828-3833.
- Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E.J., Stackebrandt, E., de Peer, Y.V., Vandamme, P., Thompson, F.L., Swings, J., 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Micro.* 3, 733-739.
- Giana, H.E., Silveira, L., Zângaro, R.A., Pacheco, M.T.T., 2003. Rapid Identification of Bacterial Species by Fluorescence Spectroscopy and Classification Through Principal Components Analysis. *J Fluoresc.* 13, 489-493.
- Glazier, S.A., Weetall, H.H., 1994. Autofluorescence detection of *Escherichia coli* on silver membrane filters. *J Microbiol Methods.* 20, 23-27.
- Goodacre, R., Berkeley, R.C.W., 1990. Detection of small genotypic changes in *Escherichia coli* by pyrolysis mass spectroscopy. *FEMS Microbiol Lett.* 71, 133-137.
- Goodacre, R., Kell, D.B., 1996. Pyrolysis mass spectrometry and its applications in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 7, 20-28.
- Goodacre, R., Timmins, E.M., Rooney, P.J., Rowland, J.J., Kell, D.B., 1996. Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. *FEMS Microbiol Lett.* 140, 233-239.
- Goodfellow, M., 1995. Inter-strain comparison of pathogenic microorganisms by pyrolysis mass spectrometry. *Binary-Comp. Microbiol.* 7, 54-60.
- Goodwin, J.R., Hafner, L.M., Fredericks, P.M., 2006. Raman spectroscopic study of the heterogeneity of microcolonies of a pigmented bacterium. *J Raman Spectrosc.* 37, 932-936.
- Goulden, J., Sharpe, M., 1958. The infra-red absorption spectra of *lactobacilli*, *J. Gen. Microbiol.*, 19, 66-86.
- Grow, A.E., Wood, L.L., Claycomb, J.L., Thompson, P.A., 2003. New biochip technology for label-free detection of pathogens and their toxins. *J Microbiol Methods.* 53, 221-233.
- Guasp, C., Moore, E.R.B., Lalucat, J., Bennisar, A., 2000. Utility of internally transcribed 16S--23S rDNA spacer regions for the definition of *Pseudomonas stutzeri* genomovars and other *Pseudomonas* species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50, 1629-1639.
- Gutteridge, C.S., 1987. Characterization of microorganisms by pyrolysis mass spectrometry. *Methods in Microbiology* 19, 227-272.

- Güven Uraz, S.Ç., 1998. The isolation of *Pseudomonas* and other Gram(-) psychrotrophic bacteria in raw milks. *J Basic Microbiol.* 38, 129-134.
- Haag, H., Gremlich, H.-U., Bergmann, R., Sanglier, J.-J., 1996. Characterization and identification of *actinomycetes* by FT-IR spectroscopy. *J Microbiol Methods.* 27, 157-163.
- Harz, M., Rösch, P., Peschke, K.-D., Ronneberger, O., Burkhardt, H., Popp, J., 2005. Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus *Staphylococcus* and dependence on their cultivation conditions, *Analyst.* 130, 1543-1550.
- Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G., Naumann, D., 1991. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy, *J Gen Microbiol,* 137, 69-79.
- Helyer, R.J.K., T. Berkeley R. C. W., 1997. Pyrolysis mass spectrometry studies on *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and their close relatives. *Zentralblatt für Bakteriologie* 285, 319–328.
- Herbert, S., Mouhous Riou, N., Devaux, M.F., Riaublanc, A., Bouchet, B., Gallant, D.J., Dufour, E., 2000. Monitoring the identity and the structure of soft cheeses by fluorescence spectroscopy. *Lait.* 80, 621-634
- Herbert, S., Riaublanc, A., Bouchet, B., Gallant, D.J., Dufour, E., 1999. Fluorescence Spectroscopy Investigation of Acid-or Rennet-Induced Coagulation of Milk. *J. Dairy Sci.* 82, 2056-2062.
- Hilario, E., Buckley, T.R., Young, J.M., 2004. Improved resolution on the phylogenetic relationships among *Pseudomonas* by the combined analysis of atp D, car A, rec A and 16S rDNA. *Antonie van Leeuwenhoek.* 86, 51-64.
- Hirkala, D.L.M., 2006. Phenotypic and genetic diversity of Pseudomonads associated with the roots of field-grown canola. Thesis.
- Holtze, M.S., Nielsen, P., Ekelund, F., Rasmussen, L.D., Johnsen, K., 2006. Mercury affects the distribution of culturable species of *Pseudomonas* in soil. *Appl. Soil Ecol.* 31, 228-238.
- Hotelling, H., 1933. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J. Educational Psychology.* 27, 417--441.
- Hsieh, S.-Y., Tseng, C.-L., Lee, Y.-S., Kuo, A.-J., Sun, C.-F., Lin, Y.-H., Chen, J.-K., 2008. Highly Efficient Classification and Identification of Human Pathogenic Bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol Cell Proteomics.* 7, 448-456.

- Hua, G., Killham, K., Singleton, I., 2006. Potential application of synchronous fluorescence spectroscopy to determine benzo[a]pyrene in soil extracts. *Environmental Pollution* (Barking, Essex : 1987). 139, 272-278.
- Huang, W.E., Griffiths, R.I., Thompson, I.P., Bailey, M.J., Whiteley, A.S., 2004. Raman Microscopic Analysis of Single Microbial Cells. *Anal. Chem.* 76, 4452-4458.
- Hugh, R., Leifson, E., 1953. The Taxonomic Significance Of Fermentative Versus Oxidative Metabolism Of Carbohydrates By Various Gram Negative Bacteria. *J. Bacteriol.* 66, 24-26.
- Ikawa, M., 1967. Bacterial phosphatides and natural relationships. *Bacteriol Rev.* 31, 54-64.
- Jackson, O., Lay, J., 2001. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom Rev.* 20, 172-194.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2761-2764.
- Jannes, G., Rossau, R., Van Heuverswyn, H., 2004. Detection and identification of *Pseudomonas* species using the 16S-23S rRNA spacer, United States Patent And Trademark Office Granted Patent.
- Jarvis, R.M., Brooker, A., Goodacre, R., 2004a. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bacterial Discrimination Utilizing a Scanning Electron Microscope with a Raman Spectroscopy Interface. *Anal. Chem.* 76, 5198-5202.
- Jarvis, R.M., Goodacre, R., 2004. Discrimination of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* 76, 40-47.
- Jarvis, R.M., Law, N., Shadi, I.T., Brien, P., Lloyd, J.R., Goodacre, R., 2008. Surface-Enhanced Raman Scattering from Intracellular and Extracellular Bacterial Locations. *Anal. Chem.* 80, 6741-6746.
- Jeppesen, C., 1995. Media for *Aeromonas spp.*, *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas spp.* from food and environment. *Int J Food Microbiol.* 26, 25-41.
- Johnsen, K., Enger, Å., Jacobsen, C.S., Thirup, L., Torsvik, V., 2002. Quantitative Selective PCR of 16S Ribosomal DNA Correlates Well with Selective Agar Plating in Describing Population Dynamics of Indigenous *Pseudomonas spp.* in Soil Hot Spots. *Appl Environ Microbiol.*
- Johnson, J.K., Arduino, S.M., Stine, O.C., Johnson, J.A., Harris, A.D., 2007. Multilocus Sequence Typing Compared to Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3707-3712.

- Johnson, J.L., Ordal, E.J., 1968. Deoxyribonucleic Acid Homology in Bacterial Taxonomy: Effect of Incubation Temperature on Reaction Specificity. *J. Bacteriol.* 95, 893-900.
- Johnson, J.L.a.P., NJ., 1989. Deoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species. *Int. J Syst. Bacteriol.*, 39, 230-235.
- Jolliffe, I.T., 1986. *Principal Component Analysis*, Springer, New York.
- Kaare Johnsen, P.N., 1999. Diversity of *Pseudomonas* strains isolated with King's B and Gould's S1 agar determined by repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction, 16S rDNA sequencing and Fourier transform infrared spectroscopy characterisation. *FEMS Microbiol Lett.* 173, 155-162.
- Kansiz, M., Heraud, P., Wood, B., Burden, F., Beardall, J., McNaughton, D., 1999. Fourier Transform Infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of *cyanobacterial* strains. *Phytochemistry.* 52, 407-417.
- Karoui, R., 2004. Contribution à l'étude des propriétés rhéologique et à la détermination de l'origine géographique des fromages aux moyen des méthodes spectroscopiques et chimiométriques., *Qualité et Economie Alimentaires* , ENITAC, Vol. ph. Doctor, Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.
- Karoui, R., Dufour, E., Bosset, J.O., De Baerdemaeker, J., 2007. The use of front face fluorescence spectroscopy to classify the botanical origin of honey samples produced in Switzerland. *Food Chem.* 101, 314-323.
- Karoui, R., Dufour, E., De Baerdemaeker, J., 2007. Front face fluorescence spectroscopy coupled with chemometric tools for monitoring the oxidation of semi-hard cheeses. *Food Chem.* 101, 1305-1314.
- Karoui, R., Mazerolles, G., Bosset, J.O., de Baerdemaeker, J., Dufour, E., 2007. Utilisation of mid-infrared spectroscopy for determination of the geographic origin of Gruyere PDO and L'Etivaz PDO. *Food Chem.* 105, 847-854.
- Karoui, R., Mazerolles, G., Dufour, É., 2003. Spectroscopic techniques coupled with chemometric tools for structure and texture determinations in dairy products. *Int. Dairy J.* 13, 607-620.
- Karoui, R., Mouazen, A.M., Dufour, E., Pillonel, L., Schaller, E., De Baerdemaeker, J., Bosset, J.O., 2006. Chemical characterisation of European Emmental cheeses by near infrared spectroscopy using chemometric tools. *Int. Dairy J.* 16, 1211-1217.
- Karoui, R., Thomas, E., Dufour, E., 2006. Utilisation of a rapid technique based on front-face fluorescence spectroscopy for differentiating between fresh and. *Food Res. Intern.* 39, 349-355.

- Kerstens, K.L., W; Vancanneyt, M; De Vos, P; Gillis, M; Schleifer, K H. , 1996. Recent changes in the classification of Pseudomonads: an overview. *Syst Appl Microbiol.* 19, 465–477.
- Kierdaszuk, B., Malak, H., Gryczynski, I., Callis, P., Lakowicz, J.R., 1996. Fluorescence of reduced nicotinamides using one- and two-photon excitation. *Biophys Chem.* 62, 1-13.
- Kirschner, C., Maquelin, K., Pina, P., Ngo Thi, N.A., Choo-Smith, L.-P., Sockalingum, G.D., Sandt, C., Ami, D., Orsini, F., Doglia, S.M., Allouch, P., Mainfait, M., Puppels, G.J., Naumann, D., 2001. Classification and Identification of *Enterococci*: a Comparative Phenotypic, Genotypic, and Vibrational Spectroscopic Study. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1763-1770.
- Krader, P., D., E., 2004. Identification of Archaea and some extremophilic bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Extremophiles.* 8, 259-268.
- Kragelund, L., Leopold, K., Nybroe, O., 1996. Outer Membrane Protein Heterogeneity within *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida* and Use of an OprF Antibody as a Probe for rRNA Homology Group I Pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 480-485.
- Krause, M., Radt, B., Rösch, P., Popp, J., 2007. The investigation of single bacteria by means of fluorescence staining and Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc.* 38, 369-372.
- Krueger, C.L., Sheikh, W., 1987. A new selective medium for isolating *Pseudomonas spp.* from water. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 895-897.
- Kummerle, M., Scherer, S., Seiler, H., 1998. Rapid and Reliable Identification of Food-Borne Yeasts by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2207-2214.
- Kunnil, J., 2005. Identification Studies of *Bacillus* Spores Using Fluorescence Spectroscopy, Department of Physics and Astronomy, Vol. Doctor of Philosophy in Medical Physics, University of Canterbury, Christchurch, New Zealand, pp. 174.
- Kwong, S.C., Rao, G., 1994. Metabolic monitoring by using the rate of change of NAD(P)H fluorescence. *Biotechnol Bioeng.* 44, 453-459.
- Lakowicz, J.R., 1999. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Publishers, New York.
- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., Garcia-Valdes, E., Palleroni, N.J., 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 510-547.
- Lang, P.L., Sang, S.C., 1998. The in situ infrared microspectroscopy of bacterial colonies on agar plates. *Cell Mol Biol(1):231-8.* 44, 231-238.

- Larsen, R.W., Jasuja, R., Hetzler, R.K., Muraoka, P.T., Andrada, V.G., Jameson, D.M., 1996. Spectroscopic and molecular modeling studies of caffeine complexes with DNA intercalators. *Biophys. J.* 70, 443-452.
- Lawrence, J.R., Korber, D.R., Hoyle, B.D., Costerton, J.W., Caldwell, D.E., 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol.* 173, 6558-6567.
- Le Moigne, M., Dufour, E., Bertrand, D., Maury, C., Seraphin, D., Jourjon, F., 2008. Front face fluorescence spectroscopy and visible spectroscopy coupled with chemometrics have the potential to. *Analytica Chimica Acta.* 621, 8-18.
- Le Moigne, M., Dufour, E., Bertrand, D., Maury, C., Seraphin, D., Jourjon, F., 2008. Front face fluorescence spectroscopy and visible spectroscopy coupled with chemometrics have the potential to characterise ripening of Cabernet Franc grapes. *Analytica Chimica acta.* 621, 8-18.
- Lebart, L., Morineau, A., Tabard, N., 1977. *Techniques de la description statistique : méthodes et logiciels pour l'analyse des grands tableaux / L. Lebart, A. Morineau, N. Tabard, Paris : Dunod.*
- Leblanc, L., Dufour, E., 2002. Monitoring the identity of bacteria using their intrinsic fluorescence. *FEMS Microbiol Lett.* 211, 147-153.
- Lebrun E., Boireau M., Bouix M., Leveau J-Y., Deteurtre B., 2001. Applications de marqueurs fluorescents au suivi de la croissance de *Oenococcus oeni* au cours de la fermentation malolactique. *Agroal.* 13.
- Lefier, D., Hirst, D., Holt, C., Williams, A.G., 1997. Effect of sampling procedure and strain variation in *Listeria monocytogenes* on the discrimination of species in the genus *Listeria* by Fourier transform infrared spectroscopy and canonical variates analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 147, 45-50.
- Leriche, F., Bordessoules, A., Fayolle, K., Karoui, R., Laval, K., Leblanc, L., Dufour, E., 2004. Alteration of raw-milk cheese by *Pseudomonas spp.*: monitoring the sources of contamination using fluorescence spectroscopy and metabolic profiling. *J Microbiol Methods.* 59, 33-41.
- Locatelli, L., Tarnawski, S., Hamelin, J., Rossi, P., Aragno, M., Fromin, N., 2002. Specific PCR Amplification for the Genus *Pseudomonas* Targeting the 3' Half of 16S rDNA and the Whole 16S-23S rDNA Spacer. *Syst Appl Microbiol.* 25, 220-227.
- Luong, J.H., Mulchandani, A., 1990. Applications of NADH-dependent fluorescence sensors for monitoring and controlling bioprocesses. *Bioprocess Technol.* 6, 75-94

- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B., 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist¹. *Microbes Infect.* 2, 1051-1060.
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., Wozniak, D.J., 2009. Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *PLoS Pathogens.* 5, e1000354
- Macé, C., Seyer, D., Chemani, C., Cosette, P., Di-Martino, P., Guery, B., Filloux, A., Fontaine, M., Molle, V., Junter, G.-A., Jouenne, T., 2008. Identification of Biofilm-Associated Cluster (bac) in *Pseudomonas aeruginosa* Involved in Biofilm Formation and Virulence. *PLoS ONE.* 3.
- Magee, J.T., Brazier, J.S., Hosein, I.K., Ribeiro, C.D., Hill, D.W., Griffiths, A., Dacosta, C., Sinclair, A.J., Duerden, B.I., 1993. An investigation of a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile* by pyrolysis mass spectrometry. *J. Med. Microbiol.* 39, 345-351.
- Manceau, C., Horvais, A., 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 498-505.
- Manoharan, R., Ghiamati, E., Dalterio, R.A., Britton, K.A., Nelson, W.H., Sperry, J.F., 1990. UV resonance Raman spectra of bacteria, bacterial spores, protoplasts and calcium dipicolinate. *J Microbiol Methods.* 11, 1-15.
- Maquelin, K., Choo-Smith, L.P., van Vreeswijk, T., Endtz, H.P., Smith, B., Bennett, R., Bruining, H.A., Puppels, G.J., 2000. Raman Spectroscopic Method for Identification of Clinically Relevant Microorganisms Growing on Solid Culture Medium. *Anal. Chem.* 72, 12-19.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L.-P., Ngo-Thi, N.A., van Vreeswijk, T., Stammler, M., Endtz, H.P., Bruining, H.A., Naumann, D., Puppels, G.J., 2003. Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures. *J. Clin. Microbiol.* 41, 324-329.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L.P., van den Braak, N., Endtz, H.P., Naumann, D., Puppels, G.J., 2002. Identification of medically relevant microorganisms by Vibrational Spectroscopy. *J Microbiol Methods.* 51, 255-271.
- Marangoni, A.G., 1992. Steady-state fluorescence polarization spectroscopy as a tool to determine microviscosity and structural order in food systems. *Food Res. Intern.* 25, 67-80.

- Marchand, S., Heylen, K., Messens, W., Coudijzer, K., De Vos, P., Dewettinck, K., Herman, L., De Block, J., Heyndrickx, M., 2009. Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. *Environ Microbiol.* 11, 467-482.
- Mariey, L., Signolle, J.P., Amiel, C., Travert, J., 2001. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vib Spectrosc.* 26, 151-159.
- Mark, G., Morrissey, J.P., Higgins, P., O'Gara, F., 2006. Molecular-based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications. *FEMS Microbiol Ecol.* 56, 167-177.
- Mason, H.-Y., Lloyd, C., Dice, M., Sinclair, R., Ellis, W., Powers, L., 2003. Taxonomic identification of microorganisms by capture and intrinsic fluorescence detection. *Biosens Bioelectron.* 18, 521-527.
- Mazzeo, M.F., Sorrentino, A., Gaita, M., Cacace, G., Di Stasio, M., Facchiano, A., Comi, G., Malorni, A., Siciliano, R.A., 2006. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Discrimination of Food-Borne Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1180-1189.
- McSpadden Gardener, B.B., 2007. Diversity and Ecology of Biocontrol *Pseudomonas spp.* in Agricultural Systems. *Phytopathology.* 97, 221-226.
- Meglen, R.R., 1988. Chemometrics: Its role in chemistry and measurement sciences. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* 3, 17-29.
- Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T., Keckevoet, U., Ramminger, I., Iwen, P., Dunn, J., Hall, G., Wilson, D., LaSala, P., Kostrzewa, M., Harmsen, D., 2008. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1946-1954.
- Mello, C., Severi, E., Coelho, L., Marangoni, A., Dezuane, C., Ricci, E., Ribeiro, D., Poppi, R.J., 2008. Two-dimensional low resolution Raman spectroscopy applied to fast discrimination of microorganisms that cause pharyngitis: A whole-organism fingerprinting approach. *J Mol Struct.* 883-884, 61-65.
- Meyer, A.F., Lipson, D.A., Martin, A.P., Schadt, C.W., Schmidt, S.K., 2004. Molecular and Metabolic Characterization of Cold-Tolerant Alpine Soil *Pseudomonas Sensu Stricto*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 483-489.

- Meyer, J.-M., Geoffroy, V.A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak, W., Palleroni, N.J., 2002. Siderophore Typing, a Powerful Tool for the Identification of Fluorescent and Nonfluorescent Pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2745-2753.
- Meyer, J.-M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schäfer, M., Budzikiewicz, H., 2008. Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas* : molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *BioMetals.* 21, 259-271.
- Meyer, J.-M., Gruffaz, C., Tulkki, T., Izard, D., 2007. Taxonomic heterogeneity, as shown by siderotyping, of strains primarily identified as *Pseudomonas putida*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57, 2543-2556.
- Michele Frapolli, G.D.Y.M.-L., 2007. Multilocus sequence analysis of biocontrol fluorescent *Pseudomonas spp.* producing the antifungal compound 2,4-diacetylphloroglucinol. *Environ Microbiol.* 9, 1939-1955.
- Mignard, S., Flandrois, J.P., 2006. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. *J Microbiol Methods.* 67, 574-581.
- Mikkelsen, H., Duck, Z., Lilley, K.S., Welch, M., 2007. Interrelationships between colonies, biofilms, and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 189, 2411-2416.
- Misko, A.L., Germida, J.J., 2002. Taxonomic and functional diversity of Pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. *FEMS Microbiol Ecol.* 42, 399-407.
- Moore, E.R.B., M. Mau, A. Arnscheidt, E. C. Bottger, R. A. Hutson, M. D. Collins, Y. Van de Peer, R. DeWachter, and K. N. Timmis, 1996. The determination and comparison of the 16S rRNA gene sequences of species of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) and estimation of the natural intrageneric relationships. *Syst. Appl. Microbiol.* 19, 478-492.
- Mossialos, D., Amoutzias, G.D., 2007. Siderophores in fluorescent Pseudomonads: new tricks from an old dog. *Future Microbiology.* 2, 387-395.
- Mouwen, D.J.M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Prieto-Gómez, J., Prieto, M., 2006. Artificial neural network based identification of *Campylobacter* species by Fourier transform infrared spectroscopy. *J Microbiol Methods.* 67, 131-140.
- Müller, O.F., 1774. *Vermium terrestrium et fluviatilum, seu Animalium Infusodorum, Helminthicorum et Testaceorum, non marhorum, suczhcta.* Copenhagen.

- Naumann, D., Fijala, V., Labischinski, H., Giesbrecht, P., 1988. The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using Fourier-transform infrared spectroscopic and multivariate statistical analysis. *J Mol Struct.* 174, 165-170.
- Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H., 1991a. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature.* 351, 81-82.
- Naumann, D., Labischinski, H., Giesbrecht, P., 1991b. The characterization of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). . In: Nelson, W.H. (Ed.), *Modern Techniques, for Rapid Microbiological Analysis.* VCH Publishers, New York, 43- 96.
- Nealson, K., Hastings, J., 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Reviews.* 43, 496-518
- Nelson, W.H., 1985. *Instrumental Methods for Rapid Microbiological Analysis* VCH Pub, New York.
- Neumeyer, K., Ross, T., Thomson, G., McMeekin, T.A., 1997. Validation of a model describing the effects of temperature and water activity on the growth of psychrotrophic *Pseudomonads*. *Int J Food Microbiol.* 38, 55-63.
- Nevin, A., Cather, S., Burnstock, A., Anglos, D., 2008. Analysis of protein-based media commonly found in paintings using synchronous fluorescence spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. *Appl Spectrosc.* 62, 481-489.
- Ngo-Thi, N.A., Kirschner, C., Naumann, D., 2003. Characterization and identification of microorganisms by FT-IR microspectrometry. *J Mol Struct.* 661-662, 371-380.
- Norris, K., 1959. Infra-red spectroscopy and its application to microbiology, *J. Hyg.* 57 326-345.
- Oberreuter, H., Seiler, H., Scherer, S., 2002. Identification of coryneform bacteria and related taxa by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52, 91-100.
- Olofsson, T.C., Ahrne, S., Molin, G., 2007. Composition of the bacterial population of refrigerated beef, identified with direct 16S rRNA gene analysis and pure. *Int J Food Microbiol.* 118, 233-240.
- Oust, A., Moretro, T., Naterstad, K., Sockalingum, G.D., Adt, I., Manfait, M., Kohler, A., 2006. Fourier Transform Infrared and Raman Spectroscopy for Characterization of *Listeria monocytogenes* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 228-232.
- Palleroni, N.J., 1984. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894 In: N. R. Krieg, J. G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of systematic Bacteriology Vol. 1*, Williams and Wilkins Baltimore.

- Palleroni, N.J., 2003. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studied on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiol.* 149, 1 - 7.
- Palleroni, N.J., Bradbury, J.F., 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int J Syst Bacteriol.* 43, 606-609.
- Palleroni, N.J., Kunisawa R., Contopoulou R., Doudoroff M., 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int J Syst Bacteriol.* 23, 333-339.
- Palleroni, N.J., Moore, E.R.B., 2004. Taxonomy of *Pseudomonas*: experimental approaches In: J.-L. Ramos (Ed.), *Pseudomonas* Vol. 1, plenum publishers, New York, pp. 3-47.
- Patra, D., Mishra, A.K., 2002. Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis. *Trends Anal. Chem.* 21, 787-798.
- Pearson, K., 1901. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine.* 2, 559-572.
- Peuravuori, J., Koivikko, R., Pihlaja, K., 2002. Characterization, differentiation and classification of aquatic humic matter separated with different sorbents: synchronous scanning fluorescence spectroscopy. *Water Res.* 36, 4552-4562.
- Pineda, T.L., 2006. Bacterial species spectroscopic characterization by FTIR, normal raman and surface enhanced raman scattering, Vol. MASTER OF SCIENCE In Chemistry UNIVERSITY OF PUERTO RICO MAYAGÜEZ CAMPUS.
- Porteous, L.A., Widmer, F., Seidler, R.J., 2002. Multiple enzyme restriction fragment length polymorphism analysis for high resolution distinction of *Pseudomonas* (sensu stricto) 16S rRNA genes. *J Microbiol Methods.* 51, 337-348.
- Powers, L., Jr., E., Lloyd, C., 2005. Taxonomic identification of pathogenic microorganisms and their toxic proteins, US patent 20050026141 United States.
- Powers, L., Lloyd, C., 2004. Method for detecting the presence of microbes and determining their physiological status, Vol. US patent 6750006, Microbiosystems, Limited Partnership (Cheyenne, WY), US patent 6750006, United States.
- Purohit, H.J., Raje, D.V., Kapley, A., 2003. Identification of signature and primers specific to genus *Pseudomonas* using mismatched patterns of 16S rDNA sequences. *BMC Bioinformatics.* 4, 19.
- Radice, F., Orlandi, V., Massa, V., Cavalca, L., Demarta, A., Wood, T.K., Barbieri, P., 2006. Genotypic characterization and phylogenetic relations of *Pseudomonas* sp. (Formerly *P. stutzeri*) OX1. *Curr Microbiol.* 52, 395-399.

- Rainey, P.B., Bailey, M.J., Thompson, I.P., 1994. Phenotypic and genotypic diversity of fluorescent *Pseudomonads* isolated from field-grown sugar beet. *Microbiology*. 140, 2315-2331.
- Ramanujam, N., 2000. Fluorescence Spectroscopy of Neoplastic and Non-Neoplastic Tissues. *Neoplasia*. 2, 89-117.
- Rapposch, S., Zangerl, P., Ginzinger, W., 2000. Influence of Fluorescence of Bacteria Stained with Acridine Orange on the Enumeration of Microorganisms in Raw Milk. *J. Dairy Sci.* 83, 2753-2758.
- Ratledge, C., Wilkinson, S.G., 1988. An overview of microbial lipids. , Academic Press, London.
- Rebuffo-Scheer, C., Dietrich, J., Wenning, M., Scherer, S., 2008. Identification of five *Listeria* species based on infrared spectra (FTIR) using macrosamples is superior to a microsample approach. *Anal Bioanal Chem.* 390, 1629-1635.
- Rebuffo-Scheer, C.A., Schmitt, J., Scherer, S., 2007. Differentiation of *Listeria monocytogenes* Serovars by Using Artificial Neural Network Analysis of Fourier-Transformed Infrared Spectra. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1036-1040.
- Rebuffo, C.A., Schmitt, J., Wenning, M., von Stetten, F., Scherer, S., 2006. Reliable and Rapid Identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* Species by Artificial Neural Network-Based Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 994-1000.
- Reddy, G.S.N., Matsumoto, G.I., Schumann, P., Stackebrandt, E., Shivaji, S., 2004. Psychrophilic *Pseudomonads* from Antarctica: *Pseudomonas antarctica* sp. nov., *Pseudomonas meridiana* sp. nov. and *Pseudomonas proteolytica* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54, 713-719.
- Reynolds, D.M., 2003. Rapid and direct determination of tryptophan in water using synchronous fluorescence spectroscopy. *Water Res.* 37, 3055-3060.
- Richards-Kortum, R., Sevick-Muraca, E., 1996. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annu Rev Phys Chem.* 47, 555-606.
- Rösch, P., Harz, M., Peschke, K.D., Ronneberger, O., Burkhardt, H., Popp, J., 2006a. Identification of single eukaryotic cells with micro-Raman spectroscopy. *Biopolymers.* 82, 312-316.
- Rosch, P., Harz, M., Peschke, K.D., Ronneberger, O., Burkhardt, H., Schule, A., Schmauz, G., Lankers, M., Hofer, S., Thiele, H., Motzkus, H.W., Popp, J., 2006b. On-Line Monitoring and Identification of Bioaerosols. *Anal. Chem.* 78, 2163-2170.

- Rosch, P., Harz, M., Schmitt, M., Peschke, K.-D., Ronneberger, O., Burkhardt, H., Motzkus, H.-W., Lankers, M., Hofer, S., Thiele, H., Popp, J., 2005. Chemotaxonomic Identification of Single Bacteria by Micro-Raman Spectroscopy: Application to Clean-Room-Relevant Biological Contaminations. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1626-1637.
- Rubio, S., Gomez-Hens, A., Valcarcel, M., 1986. Analytical applications of synchronous fluorescence spectroscopy. *Talanta.* 33, 633-640.
- Ryzhov, V., Hathout, Y., Fenselau, C., 2000. Rapid Characterization of Spores of *Bacillus cereus* Group Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3828-3834.
- Sambursky, S., 1948. Measurement of Fluorescence Spectra. *J. Opt. Soc. Am.* . 38, 735-739.
- Sanglier, J.-J., Whitehead, D., Saddler, G.S., Ferguson, E.V., Goodfellow, M., 1992. Pyrolysis mass spectrometry as a method for the classification, identification and selection of *actinomycetes*. *Gene.* 115, 235-242.
- Santivarangkna, C., Wenning, M., Foerst, P., Kulozik, U., 2007. Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *J Appl Microbiol.* 102, 748-756.
- Sarkar, S.F., Guttman, D.S., 2004. Evolution of the Core Genome of *Pseudomonas syringae*, a Highly Clonal, Endemic Plant Pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1999-2012.
- Saubusse, M., Millet, L., Delbès, C., Callon, C., Montel, M.C., 2007. Application of Single Strand Conformation Polymorphism --PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 116, 126-135.
- Scarpellini, M., Franzetti, L., Galli, A., 2004. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. *FEMS Microbiol Lett.* 236, 257-260.
- Schloss, P.D., Hay, A.G., Wilson, D.B., Gossett, J.M., Walker, L.P., 2005. Quantifying bacterial population dynamics in compost using 16S rRNA gene probes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66, 457-463.
- Schwartz DC, C.C., 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 37, 67-75.
- Segers, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Torck, U., Dewettinck, D., Falsen, E., Hansen, W., Gillis, M., Kersters, K., A polyphasic approach to the classification of some misnamed *Pseudomonas* isolates from clinical origin. *Macromolecular. Belgian journal of botany, Congrès: Macromolecular identification and classification of organisms. Symposium, Antwerp, BELGIQUE(07/12/1991), 1992, vol. 125, n° 2 (17 ref.), pp. 214-220.*

- Segers, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Torck, U., Hoste, B., Dewettinck, D., Falsen, E., Kersters, K., De Vos, P., 1994. Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Busing, Doll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., Respectively. Int J Syst Bacteriol. 44, 499-510.
- Shapiro, J.A., 1985. Scanning electron microscope study of *Pseudomonas putida* colonies. J Bacteriol. 164, 1171-1181.
- Shapiro, J.A., 1987. Organization of developing *Escherichia coli* colonies viewed by scanning electron microscopy. J Bacteriol. 169, 142-156.
- Shapiro, J.A., 1995. The significances of bacterial colony patterns. BioEssays : news and reviews in molecular, Cellular and Developmental Biology. 17, 597-607.
- Shapiro, J.A., 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. Annu Rev Microbiol. 52, 81-104.
- Shapiro, J.A., 2007. Bacteria are small but not stupid: cognition, natural genetic engineering and socio-bacteriology. Studies in History and Philosophy of Biol & Biomed Sci. 38, 807-819.
- Shewan, J.M., Hobbs, G., Hodgkiss, W., 1960. A determinative scheme for the identification of certain genera of Gram-negative Bacteria, with special reference to the Pseudomonaceae. J Appl Microbiol. 23, 379-390.
- Sisson, P.R., Nagy, E., Kòczián, Z., Veszelyovsky, E., Freeman, R., 1998. Inter-strain comparison by pyrolysis mass spectrometry of *Staphylococcus aureus* isolates associated with nosocomial infection. Antonie van Leeuwenhoek. 73, 327-330.
- Smole, S.C., King, L.A., Leopold, P.E., Arbeit, R.D., 2002. Sample preparation of Gram-positive bacteria for identification by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight. J Microbiol Methods. 48, 107-115.
- Sockalingum, G.D., Lamfarraj, H., Beljebbar, A., Pina, P., Delavenne, M., Witthuhn, F., Allouch, P., Manfait, M., 1999. Vibrational spectroscopy as a probe to rapidly detect, identify, and characterize micro-organisms, Biomedical Applications of Raman Spectroscopy, Vol. 3608, SPIE, San Jose, CA, USA, pp. 185-194.
- Spector, B.C., Reinisch, L., Smith, D., Werkhaven, J.A., 2000. Noninvasive Fluorescent Identification of Bacteria Causing Acute Otitis Media in a Chinchilla Model. Laryngoscope 110, 1119–1123.
- Spiers, A.J., Buckling, A., Rainey, P.B., 2000. The causes of *Pseudomonas* diversity. Microbiology. 146, 2345-2350.

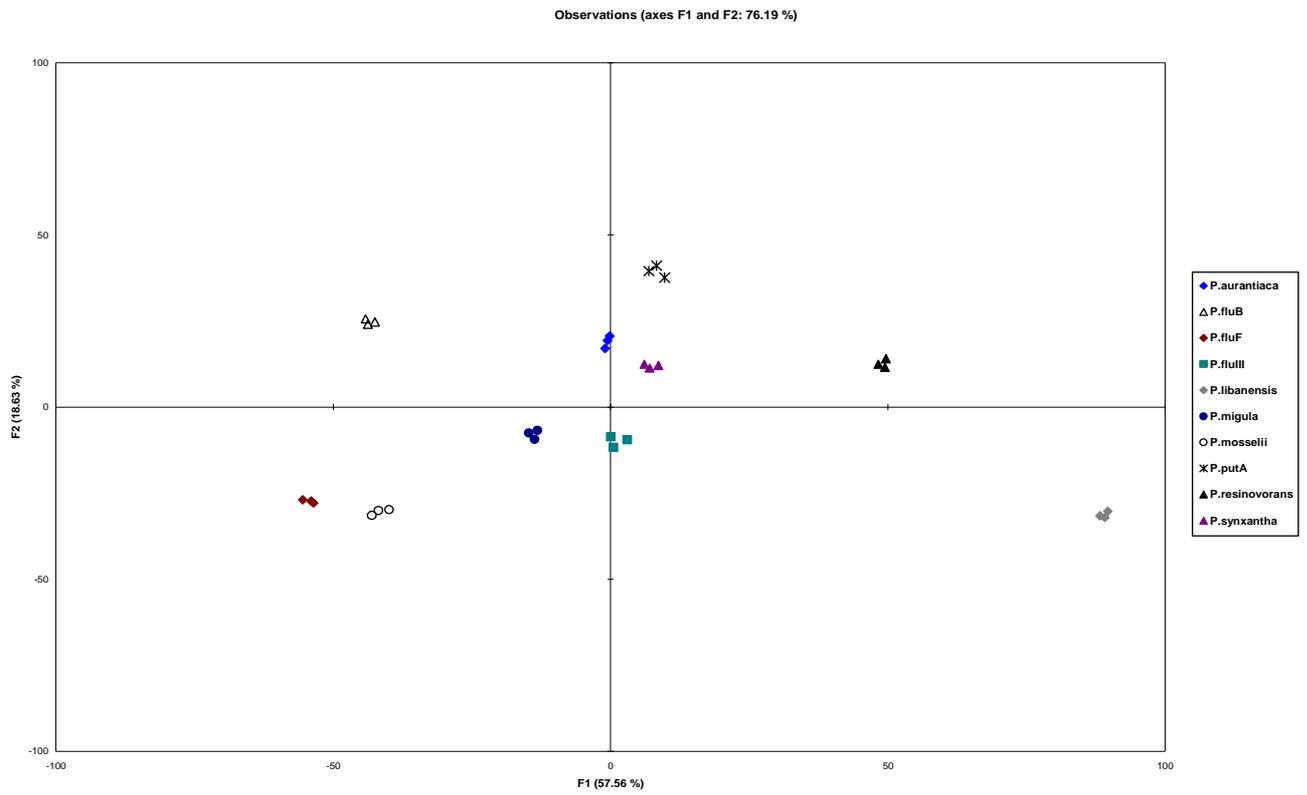
- Spilker, T., Coenye, T., Vandamme, P., LiPuma, J.J., 2004. PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from Other *Pseudomonas* Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2074-2079.
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M., 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* 44, 846 - 849.
- Stanier, R., 1976. Reflexions sur la taxonomie des *Pseudomonas*. *Bulletin de l'institut Pasteur.* 74, 255-270.
- Stead, D.E., 1992a. Grouping of Plant-Pathogenic and Some Other *Pseudomonas spp.* by Using Cellular Fatty Acid Profiles. *Int J Syst Bacteriol.* 42, 281-295.
- Stevenson, H.J.R., Bolduan, O.E.A., 1952. Infrared spectrometry as a mean for identification of bacteria, *Science.* 116, 111-113.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 56, 187-209.
- Swings, J., De Vos, P., Van den Mooter, M., De Ley, J., 1983. Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the Genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 33, 409-413.
- Tamaoka, J., Ha, D.-M., Komagata, K., 1987. Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosteroni* comb. nov., with an Emended Description of the Genus *Comamonas*. *Int J Syst Bacteriol.* 37, 52-59.
- Taylor, T.A., Patterson, H.H., 1987. Excitation resolved synchronous fluorescence analysis of aromatic compounds and fuel oil, *Anal. Chem.* 59, 2180 - 2187.
- Tesar, M., Hoch, C., Moore, E.R.B., Timmis, K.N., 1996. Westprinting : Development of a rapid immunochemical identification for species within the genus *Pseudomonas sensu stricto*. *Syst Appl Microbiol.* 19, 577-588.
- Timmins, E.M., Howell, S.A., Alsberg, B.K., Noble, W.C., Goodacre, R., 1998. Rapid Differentiation of Closely Related *Candida* Species and Strains by Pyrolysis-Mass Spectrometry and Fourier Transform-Infrared Spectroscopy. *J. Clin. Microbiol.* 36, 367-374.
- Tindall, B.J., Brambilla, E., Steffen, M., Neumann, R., Pukall, R., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E., 2000. Cultivable microbial biodiversity: gnawing at the Gordian knot. *Environ Microbiol.* 2, 310-318.

- Tintelnot, K., Haase, G., Seibold, M., Bergmann, F., Staemmler, M., Franz, T., Naumann, D., 2000. Evaluation of Phenotypic Markers for Selection and Identification of *Candida dubliniensis*. J. Clin. Microbiol. 38, 1599-1608.
- Tryfinopoulou, P., Drosinos, E.H., Nychas, G.J.E., 2001. Performance of *Pseudomonas* CFC-selective medium in the fish storage ecosystems. J Microbiol Methods. 47, 243-247.
- van der Mei, H.C., Naumann, D., Busscher, H.J., 1993. Grouping of oral *streptococcal* species using fourier-transform infrared spectroscopy in comparison with classical microbiological identification. Arch Oral Biol. 38, 1013-1019.
- Vancanneyt, M., Torck, U., Dewettinck, D., Vaerewijck, M., Kersters, K., 1996. Grouping of Pseudomonads by SDS-PAGE of whole-cell proteins. Syst Appl Microbiol 19, 556-568.
- Vancanneyt, M., Witt, S., Abraham, W-R., Kersters, K., Fredrickson, H.L., 1996. Fatty acid content in whole-cell hydrolysates and phospholipid fractions of Pseudomonads: A taxonomic evaluation. . Syst Appl Microbiol. 19, 528-540.
- Velianov, D., Kharbov, D., Dimova, I., 1982. [Studies of R and S forms of *Pseudomonas pseudomallei*. I. Morphology of colonies and virulence for albino mice and guinea pigs]. Acta Microbiologica Bulgarica. 11, 104-108.
- Verhille, S., Baida, N., Dabboussi, F., Hamze, M., Izard, D., Leclerc, H., 1999. *Pseudomonas gessardii* sp. nov. and *Pseudomonas migulae* sp. nov., two new species isolated from natural mineral waters. Int J Syst Bacteriol. 49, 1559-1572.
- Vigneau, E., Qannari, E.M., Jaillais, B., Mazerolles, G., Bertrand, D., 2006. Méthodes prédictive. In: D. Bertrand, E. Dufour (Eds.), La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques, Lavoisier Paris, pp. 347-401.
- Vo Dinh, T., 1978. Multicomponent analysis by synchronous luminescence spectrometry. Anal. Chem. 50, 396 - 401.
- Wagnières, G.A., Star, W.M., Wilson, B.C., 1998. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. Photochem Photobiol. 68, 603-632.
- Walker, J., Fox, A.J., Edwards-Jones, V., Gordon, D.B., 2002. Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. J Microbiol Methods. 48, 117-126.
- Wang, H., Wang, J., Xu, J., Cai, R.-X., 2006. Study on the influence of potassium iodate on the metabolism of *Escherichia coli* by intrinsic fluorescence. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 64, 316-320.

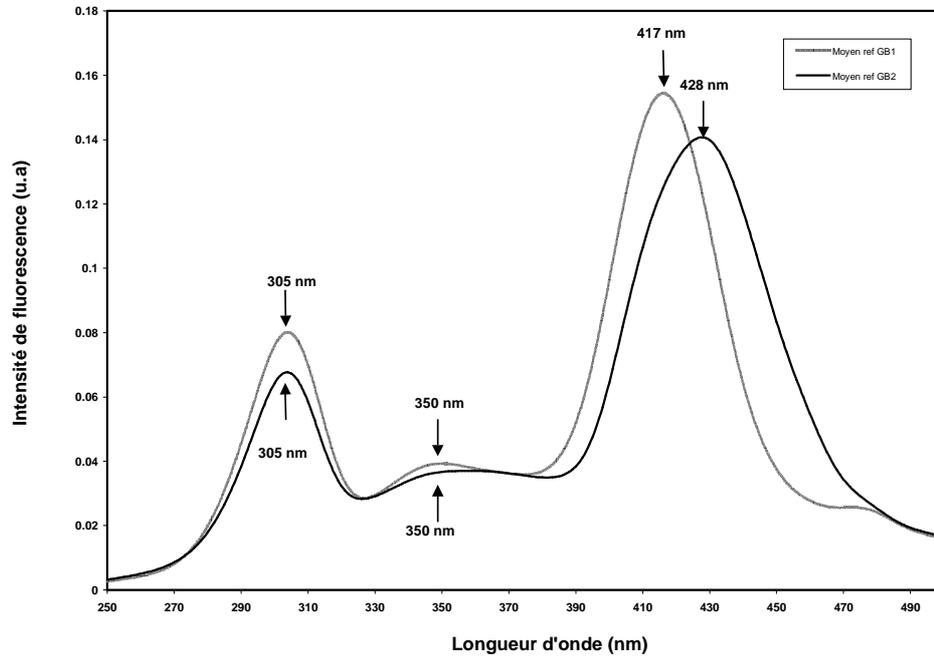
- Wang, P.W., Morgan, R.L., Scortichini, M., Guttman, D.S., 2007. Convergent evolution of phytopathogenic Pseudomonads onto hazelnut. *Microbiology*. 153, 2067-2073.
- Weller, D.M., 2007. *Pseudomonas* Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years. *Phytopathology*. 97, 250-256.
- Wenning, M., Scherer, S., Naumann, D., 2007. Infrared Spectroscopy in the Identification of Microorganisms. In *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis*, Diem M , Griffith P , Chalmers JM (eds). Wiley : Chichester, UK; 71-96.
- Wenning, M., Seiler, H., Scherer, S., 2002. Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy, a Novel and Rapid Tool for Identification of Yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4717-4721.
- Widmer, F., Seidler, R.J., Gillevet, P.M., Watrud, L.S., Di Giovanni, G.D., 1998. A Highly Selective PCR Protocol for Detecting 16S rRNA Genes of the Genus *Pseudomonas* (Sensu Stricto) in Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2545-2553.
- Willems, A., Falsen, E., Pot, B., Jantzen, E., Hoste, B., Vandamme, P., Gillis, M., Kersters, K., De Ley, J., 1990. *Acidovorax*, a New Genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E. Falsen (EF) Group 13, EF Group 16, and Several Clinical Isolates, with the Species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 40, 384-398.
- Willems, A., Goor, M., Thielemans, S., Gillis, M., Kersters, K., De Ley, J., 1992. Transfer of Several Phytopathogenic *Pseudomonas* Species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. *Int J Syst Bacteriol.* 42, 107-119.
- Williamson, Y.M., Moura, H., Woolfitt, A.R., Pirkle, J.L., Barr, J.R., Carvalho, M.D.G., Ades, E.P., Carlone, G.M., Sampson, J.S., 2008. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* Conjunctivitis Outbreak Isolates by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5891-5897.
- Wu, Q., Hamilton, T., Nelson, W.H., Elliott, S., Sperry, J.F., Wu, M., 2001. UV Raman Spectral Intensities of *E. Coli* and Other Bacteria Excited at 228.9, 244.0, and 248.2 nm. *Anal. Chem.* 73, 3432-3440.
- Wu, Q., Nelson, W.H., Elliot, S., Sperry, J.F., Feld, M., Dasari, R., Manoharan, R., 2000. Intensities of *E. coli* Nucleic Acid Raman Spectra Excited Selectively from Whole Cells with 251-nm Light. *Anal. Chem.* 72, 2981-2986.

- Xiang, L., Dorsch, M., Dot, T.D., Sly, L.I., Stackebrandt, E., Hayward, A.C., 1993. Phylogenetic studies of the rRNA group II Pseudomonads based on 16S rRNA gene sequences. *J Appl Microbiol.* 74, 324-329.
- Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki, and M. Arakawa, 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov.; and transfer of seven species of the *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 36, 1251-1275.
- Yabuuchi, E., Y. Kosako, I. Yano, H. Hotta, and Y. Nishiuchi, 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. . *Microbiol. Immunol.* 39, 897-904.
- Yamamoto, S., Harayama, S., 1998. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *Int J Syst Bacteriol.* 48 Pt 3, 813-819.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D.L., Jackson, R.W., Vivian, A., Harayama, S., 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology.* 146, 2385-2394.
- Yang, H., Irudayaraj, J., 2003. Rapid detection of foodborne microorganisms on food surface using Fourier transform Raman spectroscopy. *J Mol Struct.* 646, 35-43.
- Yu C, I.J., 2005. Spectroscopic characterization of microorganisms by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biopolymers.* 77, 368-377.
- Zaccolo, M., 2004. Use of chimeric fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer to monitor cellular responses. *Circ Res.* 94, 866-873.

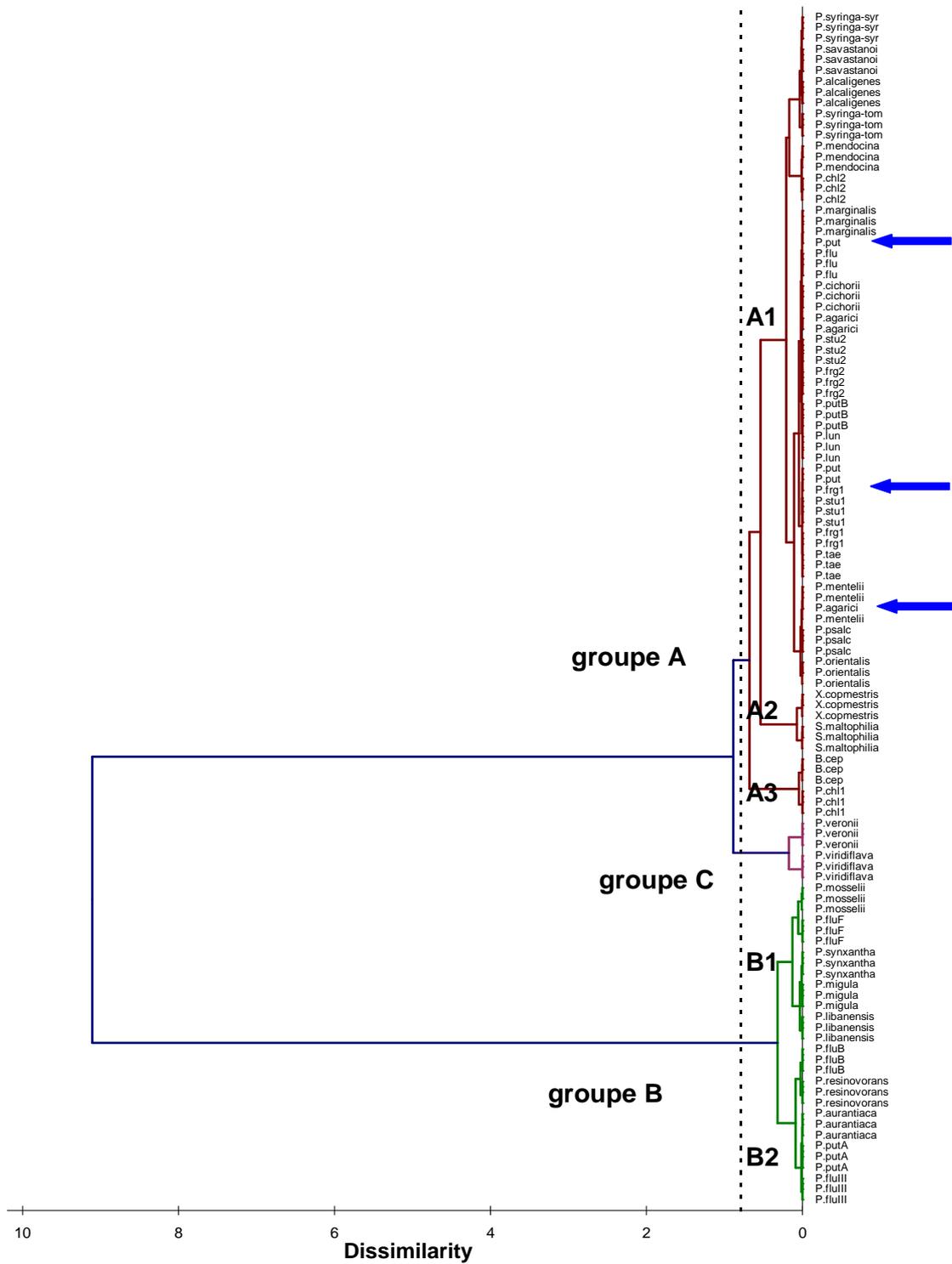
Annexe 2 : Carte factorielle de l'AFD du groupe RefGB ($\Delta\lambda$ de 30) défini par CHA à partir des 37 souches de référence



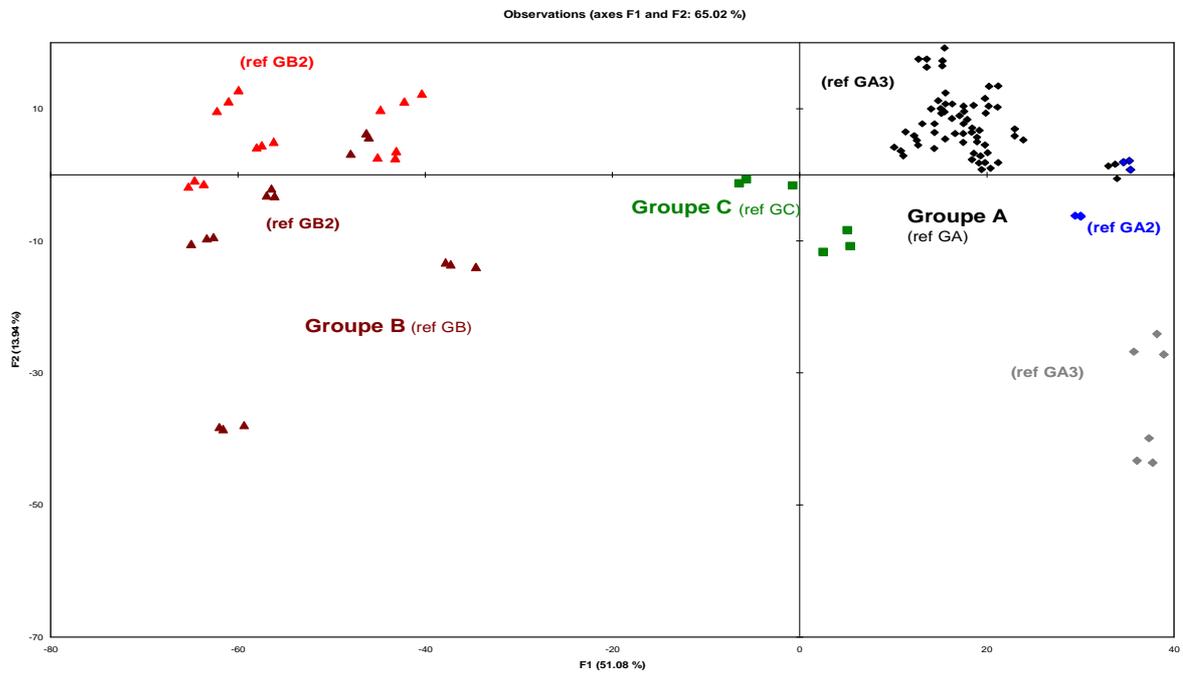
Annexe 3 : Spectres moyens des 2 sous-groupes RefGB1 et RefGB2 définis par CHA à partir des données recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 30) depuis les 37 souches de référence



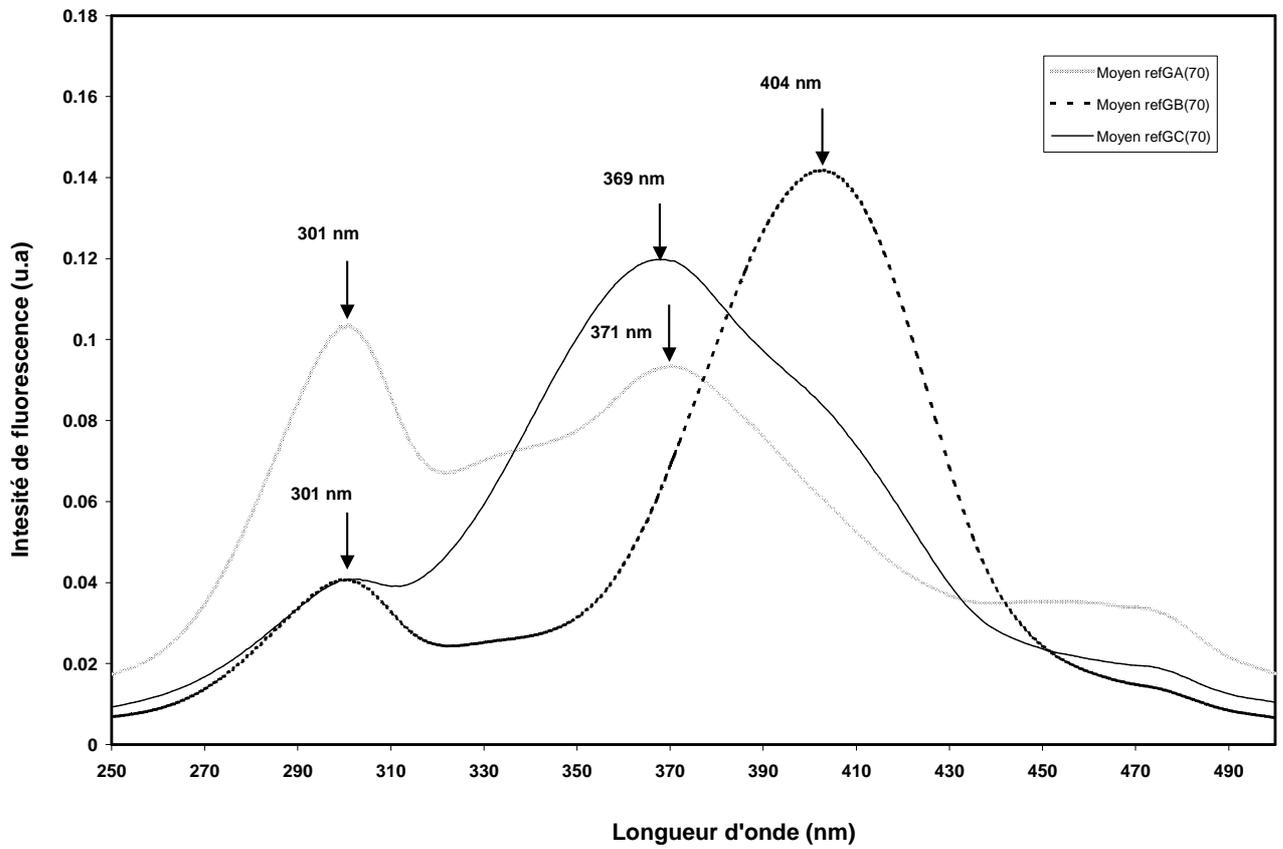
Annexe 5 : Dendrogramme de CHA réalisé à parties des données spectrales recueillies en fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 70 nm) à partir des 37 souches de référence



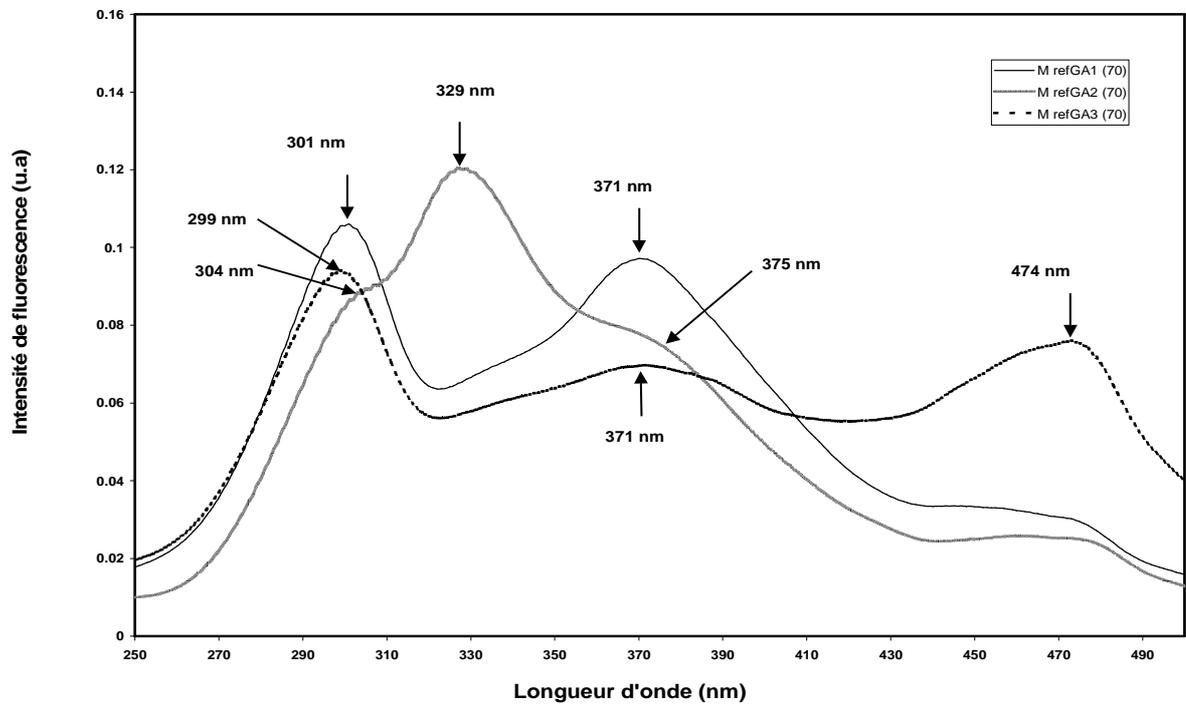
Annexe 6 : Positionnement des groupes et sous-groupes RefGA(70) (A1, A2, A3), RefGB(70) (B1,B2), RefGC(70) définis d'après la classification hiérarchique construite sur la base de l'AFD réalisée sur les données spectrales ($\Delta\lambda$ de 70) de 37 souches de référence



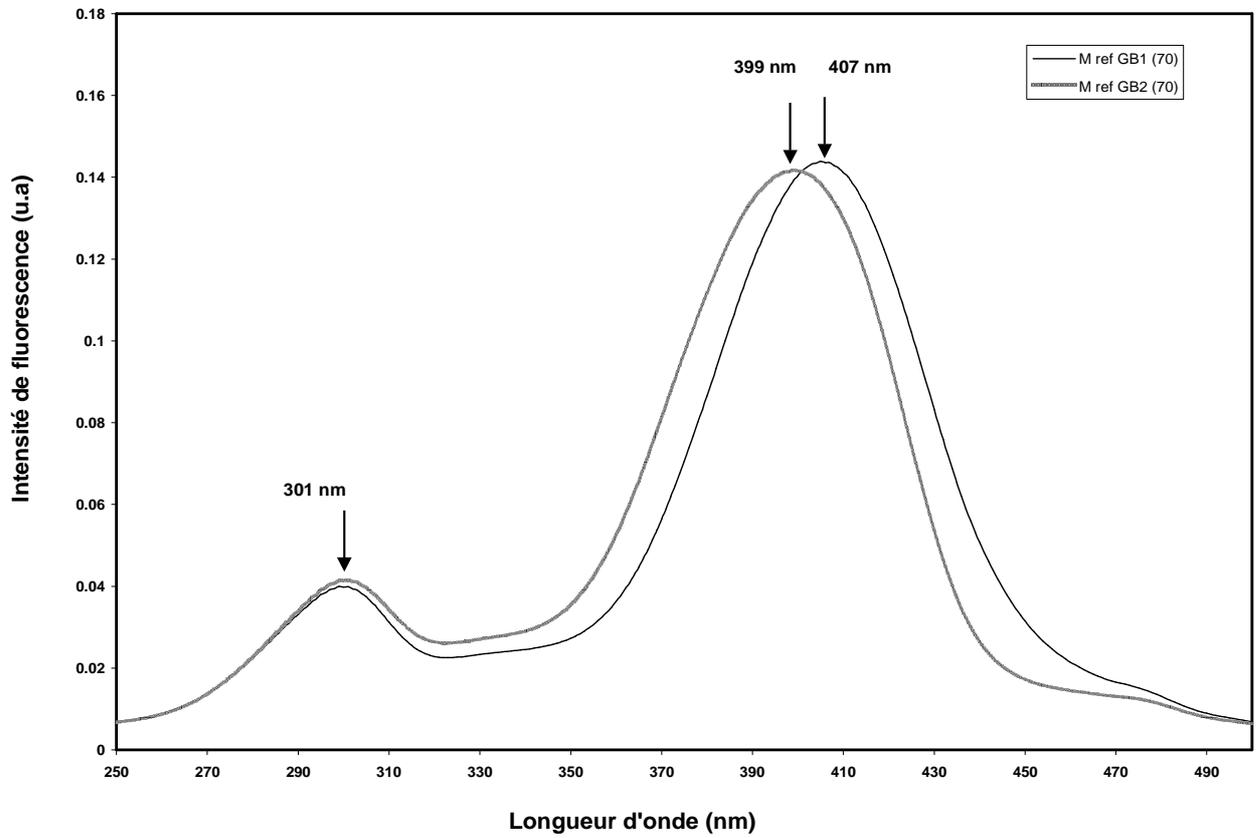
Annexe 7 : Spectres moyens des trois groupes RefGA(70), RefGB(70) et RefGC(70) définis par CHA à partir des données recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 70 nm) depuis les 37 souches de références.



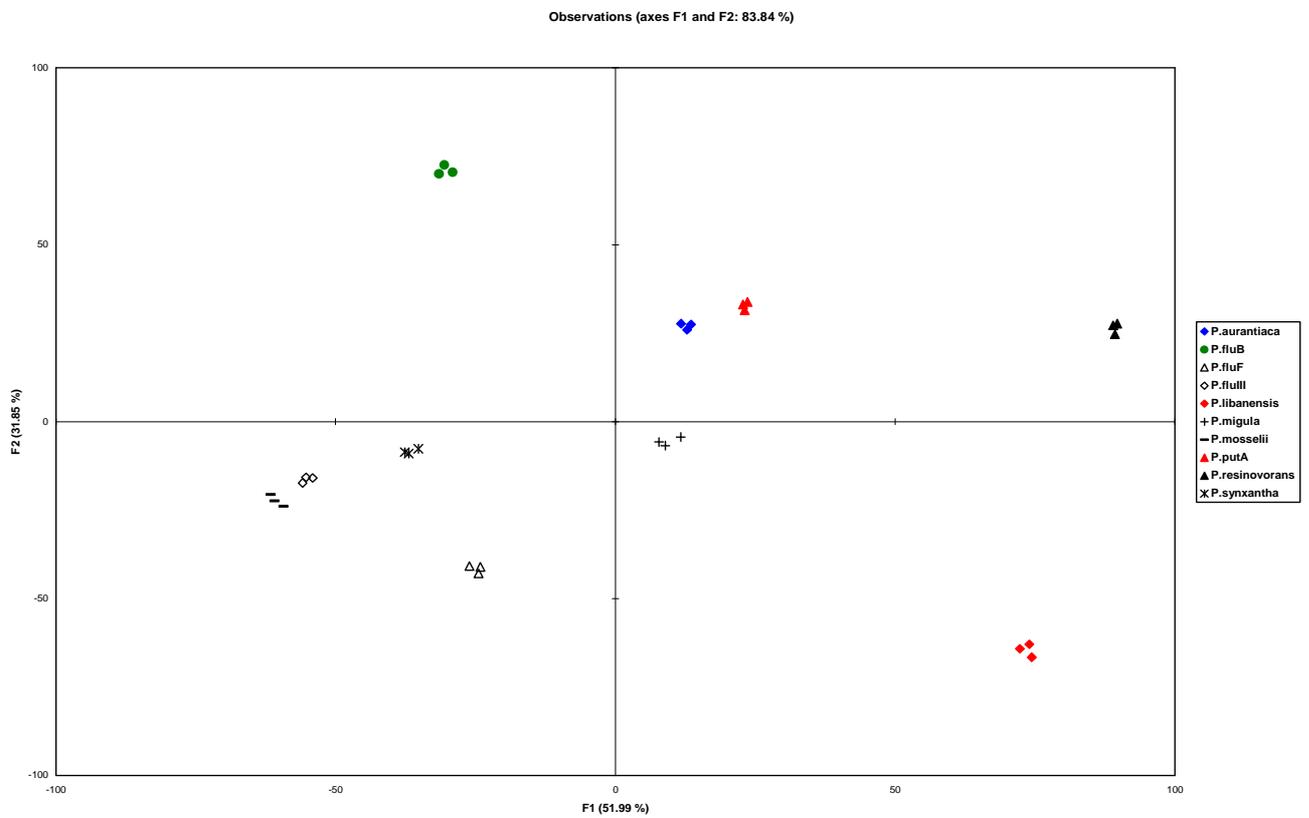
Annexe 8 : Spectres moyens des trois sous-groupes RefGA1(70), RefGA2(70) et RefGA3(70) définis par CHA à partir des données recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 70) depuis les 37 souches de références



Annexe 9 : Spectres moyens des sous-groupes RefGB1(70) et RefGB2(70) définis par CHA à partir des données recueillies par spectroscopie de fluorescence synchrone ($\Delta\lambda$ de 70) depuis les 37 souches de références



Annexe II : Carte factorielle de l'AFD du groupe RefGB70 défini par CHA à partir des 37 souches de référence



Annexe 12 : liste des communications avec actes

TOURKYA B., DUFOUR E., LERICHE F. Discrimination of *Pseudomonas* species using optical fiber-based in situ fluorescence spectroscopy of colonies. II International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2007), 28 November – 10 December 2007, Seville, Spain- Actes- Poster

TOURKYA B., BOUBELLOUTA T., DUFOUR E., LERICHE F. La spectroscopie de fluorescence : une méthode prometteuse pour la discrimination des espèces bactériennes, l'exemple des *Pseudomonas* et apparentés, 7^{ème} Congrès National de la Société Française de Microbiologie, 30 mai – 01juin 2007, Nantes, France- Communication orale, Actes, Poster

TOURKYA B., DUFOUR E., LERICHE F. La spectroscopie de fluorescence au service de la discrimination des bactéries: l'exemple de *Pseudomonas* et apparentés, Ateliers de fluorescence, 10 octobre 2007, Clermont-ferrand, France- Poster

TOURKYA B., DUFOUR E., LERICHE F.(2007) La spectroscopie de fluorescence : une méthode prometteuse pour la discrimination des espèces bactériennes, l'exemple des *Pseudomonas* et apparenté (communication écrite, journée de l'école doctorale JED Sciences de la vie et de la Santé 26 & 27 avril 2007 – Clermont-Fd)

TOURKYA B., BOUBELLOUTA T. , KAROUI R., DUFOUR E., LERICHE F.(2008) Identification de *Pseudomonas* et apparentés par analyse directe des colonies au moyen d'un fluorimètre couplé à une fibre optique. 5^{ème} Rencontres des Microbiologistes du Pôle Clermontois, Clermont-Fd, 27 Mars 2008, Communication orale

TOURKYA B., BOUBELLOUTA T. , DUFOUR E., LERICHE F.(2009) Fluorescence spectroscopy as a promising tool for a polyphasic approach of *Pseudomonas* taxonomy, *Curr Microbiol* 58:39–46

TOURKYA B., KAROUI R., BERDAGUÉ J-L., BOUBELLOUTA T., DUFOUR E. AND LERICHE F. (2009) Discrimination of *Pseudomonas* and related species using optic fiber-based in situ fluorescence spectroscopy of colonies. *Canadian journal of microbiology* (soumis).

Communications orales, journées doctoriales de l'ENITAC (2006, 2007, 2008), Clermont-Ferrand, France.

ABSTRACT

In the methodological field relating to microorganisms characterization, spectroscopic methods such as the fluorescence spectroscopy appear to be particularly appreciable tools. Their power is strengthened by the use of chemometrics which permit to treat all the spectral information. This work presents the elaboration stages of the method for Pseudomonads characterization, which form one of the most adaptative flora and present the biggest phenotypic and genotypic diversity so far depicted. Through the use of intrinsic fluorophores (NADH, aromatic amino acids + nucleic acids and tryptophan), the analysis of bacterial suspensions directly prepared from colonies permits to obtain more than 90% of good classification for reference strains even when divided in very related taxa. Synchronous fluorescence spectroscopy was successfully developed coupled with acquisition of spectra directly from colonies on agar plates using an optic fiber. The variance analysis has shown an excellent repeatability of the results, but also no significant effects of “the optical fibre position in the colony” nor of the incubation time before reading (between 48 and 72 hours). Sensitivity and selectivity reached 100% for bacterial discrimination at the genus, species or subspecies level.

In these conditions, the method appears as a very reliable tool for a taxonomic purpose since our results are in agreement with the generally admitted rRNA and DNA bacterial homology grouping but they also bring out additional information about strain relatedness. In the case of environmental isolates, the method allows good discrimination, even for strains for which ambiguity still remained after PCR and API 20 NE identification. It can also be a powerfull tool to study bacterial traceability.

Keywords: Fluorescence spectroscopy, synchronous, Pseudomonades, Optical fibre, chemometrics, bacterial traceability.

RESUME

Dans le champ des méthodologies dédiées à la caractérisation des microorganismes, les méthodes spectroscopiques comme la spectroscopie de fluorescence apparaissent des outils particulièrement sensibles. Leur puissance est renforcée par l'utilisation d'outils chimiométriques qui autorisent le traitement de l'ensemble des informations spectrales. Ce mémoire présente les étapes de mise au point de la méthode pour la caractérisation des *Pseudomonas* qui constituent une des flores les plus adaptatives et présentant la plus grande diversité phénotypique et génotypique décrite à ce jour.

Par l'utilisation de fluorophores intrinsèques (NADH, Acides aminés aromatiques + acides nucléiques ou tryptophane) l'analyse de suspensions bactériennes préparées directement à partir de colonies permet d'obtenir plus de 90 % de bonne classification pour des souches de référence même réparties en taxons proches. Cette méthode a permis, également, une identification aisée d'isolats et les résultats obtenus sont apparus cohérents avec ceux issus de PCR tout en apportant des informations complémentaires à ceux obtenus par identification sur galerie API 20 NE.

La méthode a été développée pour une lecture directe des colonies sur un milieu gélosé. Après différentes étapes de cadrage, la meilleure pertinence a été obtenue pour une lecture des colonies en fluorescence synchrone avec un décalage constant de 30 nm. L'analyse de la variance a montré une excellente répétabilité des résultats mais aussi des effets « position de la fibre optique vis à vis de la colonie » et durée d'incubation avant lecture (entre 48 et 72 heures) négligeables.

Utilisée à des fins taxonomiques, la méthode s'est révélée très cohérente et complémentaire des méthodes relevant de la génomique. Elle permet d'analyser extrêmement rapidement et sans ajout de réactifs les proximités ou distances entre souches et de décrire les zones spectrales les plus identitaires.

Enfin nous avons également montré les potentialités de la spectroscopie de fluorescence pour la mise en place d'un outil de « traçabilité bactérienne » susceptible de répondre aux besoins des producteurs agroalimentaires dans leur démarche d'analyse des risques.

Mots clés : Spectroscopie de fluorescence, synchrone, *Pseudomonas*, fibre optique, chimiométrie, traçabilité microbienne.