

# IDENTIFICATION DES MICROORGANISMES PAR SPECTROSCOPIE INFRA-ROUGE

(Résumé de l'intervention de M. GRAPPIN de l'INRA Poligny lors de l'Assemblée Générale de CECALAIT)

**D**epuis peu, le développement des techniques et des outils d'exploitation des spectres a permis la mise en route de travaux qui utilisent la spectroscopie infra-rouge, à transformée de Fourier pour identifier les microorganismes. En soumettant les spectres à des traitements mathématiques, puis à des techniques de classification statistique, on a pu différencier nettement des espèces bactériennes, notamment dans le genre *Listeria*. Il semble même possible de séparer ainsi des sérotypes différents. Cette technique simple et rapide, quoiqu'onéreuse au départ, ouvre de larges perspectives pour l'identification de pathogènes ou la caractérisation d'espèces d'intérêt industriel, ainsi que pour la taxonomie en général. Des mises au point méthodologiques restent cependant nécessaires.

**L**a spectroscopie infra-rouge (IR) a principalement été utilisée pour l'analyse chimique, mais l'idée de l'employer pour différencier des microorganismes a été émise depuis longtemps déjà. Grâce à l'amélioration des techniques et des outils d'exploitation des spectres, il est maintenant possible d'exploiter la spectroscopie infra-rouge pour identifier des microorganismes. De fait, les travaux sur ce thème se multiplient et concernent un grand nombre d'espèces bactériennes, notamment les pathogènes. M. GRAPPIN a ainsi plus particulièrement présenté des travaux sur *Listeria*, qui sont en cours au Hannah Research Institute en Ecosse, et auxquels collabore D. LEFIER, de l'INRA de Poligny, qui y est détaché pour un an. Malgré les mises au point encore nécessaires, les perspectives ainsi ouvertes sont susceptibles d'intéresser aussi bien les industriels que les chercheurs.

## HISTORIQUE ET ETENDUE DES TRAVAUX

L'analyse IR mesure l'interaction entre l'énergie IR et l'énergie de liaison des molécules de la matière. Or les microorganismes sont constitués de molécules de protéines, de glucides, de lipides et d'acides nucléiques, dans leur cytoplasme et dans leur paroi. De ce fait, la caractérisation de microorganismes par leur spectre IR doit être *a priori* possible.

## Identification d'espèces et même de souches

Les premiers travaux en ce domaine remontent aux années 1950 et avaient abouti à l'identification de 76 souches de Lactobacilles (GOULDEN et SHARPE, 1958). Mais les choses en étaient restées là jusqu'en 1988, où NAUMAN et ses collaborateurs différencient parfaitement les catégories Gram en utilisant l'infra-rouge à transformée de Fourier (IR - TF). Cette technique, qui permet d'exploiter la totalité du spectre IR, ainsi que l'amélioration des outils statistiques et des moyens informatiques de traitement des spectres ont depuis entraîné une multiplication des travaux en ce domaine. Ainsi, de 1991 à 1995, a-t-on vu la publication de résultats sur des lactobacilles, des *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, des *Listeria*... par IR - TF. Selon les travaux, les taux d'identification des espèces varient de 75% - pour *Clostridium* sous microscope - à 94% pour les lactobacilles et diverses espèces pathogènes (CURK et al., 1994; HELM et al., 1991), voire 100% pour les 6 espèces de *Listeria*, étudiées par HOLT et al., en 1995. A l'intérieur d'une même espèce, le taux d'identification des souches varie de 83% pour

différents pathogènes à 91% pour les souches de Lactobacilles (HELM et al., 1991; CURK et al., 1994).

## PRINCIPES DE MESURE

### PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les souches sont issues le plus souvent de collections, mais aussi de produits alimentaires. Une phase de mise en culture et d'enrichissement en milieu solide ou liquide est indispensable. Il y a trois possibilités de conditionner l'échantillon. La plus courante consiste à déshydrater la culture sur une plaque de Zn/Se, puis après lavage à mesurer l'échantillon en IR par transmission. On peut également procéder à un prélèvement direct sur milieu solide et l'appliquer sur un cristal pour une mesure en ATR. Une dernière possibilité, qui n'a toutefois été essayée qu'une seule fois consiste à mesurer directement sur la colonie, à l'aide d'un microscope IR (RUDZIK et al., 1994).

### ANALYSE IR ET STATISTIQUE

La zone spectrale utile est le moyen Infra-Rouge, de 4000 à 750  $\text{cm}^{-1}$ , avec des bandes spécifiques correspondant aux groupements  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}$ , aux  $\text{COO}^-$ , aux peptides, aux OH, aux  $\text{PO}_4$ , aux acides nucléiques.

Le spectre obtenu est ensuite soumis à un traitement mathématique de dérivation -1ère ou 2e-. Puis, après avoir procédé à une réduction (ACP), on cherche à appliquer une technique de classification :

- \* Analyse factorielle des correspondances (AFC)
- \* Analyse factorielle discriminante (canonique)
- \* Analyse hiérarchique (dendrogramme)

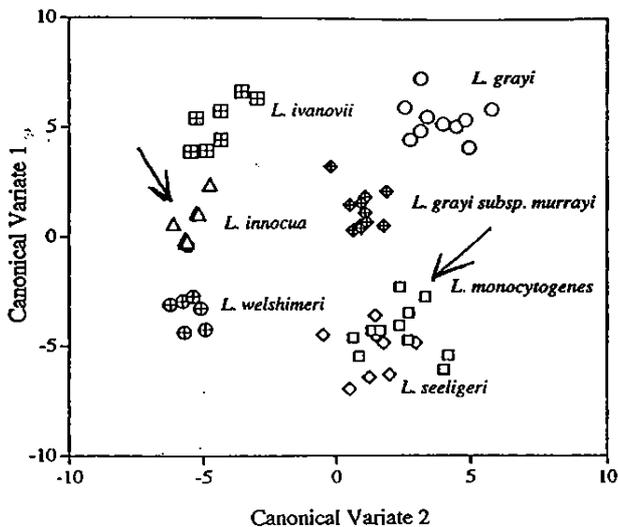
## RESULTATS OBTENUS AVEC LISTERIA

Dans des échantillons contenant un mélange de diverses espèces de *Listeria*, l'observation de l'ensemble des spectres obtenus montre des zones où les différentes espèces se distinguent naturellement.

Après traitements statistiques, ces différences sont encore bien plus nettes. Ainsi HOLT et al. (1995), en appliquant un traitement

d'analyse canonique à 4 dimensions aux spectres obtenus avec un mélange de 6 espèces et une sous-espèce de *Listeria*, à savoir *L. monocytogenes*, *L. innocua*; *L. grayi*, *L. grayi subsp. murrayi*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* et *L. welshimeri* aboutissent au schéma ci-dessous. Les différentes espèces y sont clairement séparées, (d'autant plus que les deux groupes désignés par des flèches ne se situent pas en réalité dans le même plan que les autres.)

**Analyse canonique à 4 dimensions de 6 espèces de *Listeria* (n = 59), d'après HOLT et al., 1995**



Une analyse du même type, effectuée cette fois avec un mélange de différents sérotypes de *Listeria monocytogenes* montre qu'il pourrait y avoir de bonnes possibilités de discrimination entre groupes de sérotypes, voire entre sérotypes différents.

### Des mises au point encore nécessaires

Cependant, le développement et l'utilisation plus facile de cette technique passent, à la fois par la mise au point des conditions de mesure et par l'amélioration des outils.

L'amélioration des mesures suppose, dans un premier temps, de bien définir les conditions de mesure. En effet, des modifications de la durée d'incubation de la culture utilisée, comme de la température d'incubation provoquent des changements dans les spectres observés pour une même espèce. Les spectres obtenus avec des espèces différentes restent cependant différents. Dans un deuxième temps, perfectionner la technique de mesure directe sur une colonie constituerait une avancée importante. La standardisation des conditions de préparation des échantillons, surtout dans le cadre d'une mesure directe est également nécessaire.

Les utilisateurs auraient un grand intérêt à voir se développer des outils tels que des « spectrothèques » pour aider à l'identification

des microorganismes et des procédures de transfert de calibrage entre différents types d'appareils.

Il n'en demeure pas moins que cette technique est séduisante à plus d'un titre. Elle est en effet simple à mettre en oeuvre et rapide, encore que la phase d'enrichissement de la culture soit toujours indispensable. Certes, elle demande de s'équiper d'un appareil onéreux, mais susceptible néanmoins d'avoir d'autres utilisations. En revanche, elle présente ensuite un coût de fonctionnement moins élevé que d'autres techniques de pointe dans ce domaine, telles que les techniques d'immunochimie ou de biologie moléculaire.

### Des applications évidentes

Les possibilités d'identification d'espèces et de souches que donne cette technique offrent de grandes perspectives pour la taxonomie et la classification des microorganismes. D'un point de vue industriel, les possibilités d'identification des pathogènes, mais aussi des microorganismes d'intérêt industriel seraient déterminantes. Enfin, en fabrication fromagère, cette technique permettrait d'arriver à une caractérisation technologique des levains.

Pour l'heure, la plupart de ces travaux reste du ressort des centres de recherche et l'analyse quantitative n'a pas encore été abordée. Mais certaines études ont déjà été réalisées en collaboration avec des constructeurs de matériel, ce qui laisse augurer un passage à moyen terme aux applications industrielles.

### Bibliographie

- CURK, M.C.; PELADAN, F.; HUBERT J.C. Fourier infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. FEMS Microbiology Letters, 1994, V. 123, p. 241-248
- GOULDEN, J.D.S.; SHARPE, M.E. The infrared absorption spectra of *lactobacilli*. Journal of General Microbiology, 1958, V. 19, p. 76-86
- HELM, D.; LABISCHINSKI, H.; SHALLEHN, G.; NAUMANN, D. Classification and identification of bacteria by Fourier transform infrared spectroscopy. Journal of General Microbiology, 1991, V. 137, p. 69-79
- HOLT, C.; HIRST, D.; SUTHERLAND, A.; MAC DONALD, F. Discrimination of species in the genus *Listeria* by Fourier transform infrared spectroscopy and canonical variate analysis. Applied Environmental Microbiology, 1995, V. 61, N. 1, p. 377-378
- NAUMANN, D.; FIJALA, V.; LABISCHINSKI, H.; GIESBRECHT P. The rapid differentiation of pathogenic bacteria using Fourier transform spectroscopic and multivariate statistical analysis. Journal of Molecular Structure, 1988, V. 174, p. 165-170
- RUDZIK, L.; HOFFMANN, A.; FEHRMANN, A.; WUST, A.; FRANZ, M. Identifizierung von Clostridien mittels FT - IR Spektroskopie. Deutsche Milchwirtschaft, 1994, V. 45, p. 130-132