

50376
1973

N° d'ordre : 421

169

50376
1973
169

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3^e CYCLE

Discipline : BIOCHIMIE

par

Pierre-André TRINEL

Maître ès Sciences

**LA DECARBOXYLASE DE L'ACIDE GLUTAMIQUE
CHEZ ESCHERICHIA COLI : SA MESURE AUTOMATIQUE ;
APPLICATION AU CONTROLE BACTERIOLOGIQUE
DE L'EAU EN CONTINU.**

Membres du Jury :

M. MONTREUIL Président
M. LECLERC Rapporteur
M. GUILLAUME Examineur
M. GENTY Membre invité



030 021921 1

Soutenue le 28 novembre 1973

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. H. LEFEBVRE, R. DEFRETIN

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit et
Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BEGHIN, BROCHARD, CAU, CHAPPELON,
CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DEHORS, FAUVEL,
FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERRET,
KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, LIEBAERT, MARTINOT-
LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER,
PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE

DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. PARREAU

Professeur

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie générale
M. BECART Maurice	Physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie et physico-chimie industrielle
M. BONTE Antoine	Géologie appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. CELET Paul	Géologie
M. CONSTANT Eugène	Physique industrielle-électronique
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques générales
M. DELATTRE Charles	Géologie générale
M. DURCHON Maurice	Zoologie générale et appliquée
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Radio-électricité-électronique
M. GLACET Charles	Chimie organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique

.../...

M. GUILLAUME Jean	Biologie végétale
M. HEUBEL Joseph	Chimie minérale
M. LANSRAUX Guy	Physique
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique expérimentale
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques et sociales
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie appliquée
M. MONTREUIL Jean	Chimie biologique
M. POUZET Pierre	Informatique (Lille)
M. PROUVOST Jean	Géologie minéralogie
Mme SCHWARTZ Marie Hélène	Analyse supérieure
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie animale
M. WERTHEIMER Raymond	Physique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mathématiques

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BOUISSET Simon	Physiologie animale
M. DELHAYE Michel	Chimie
M. DERCOURT Jean Michel	Sciences de la terre
M. LEBRUN André	Electronique (Lille)
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
M. LINDER Robert	Botanique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. PARREAU Michel	Mathématiques appliquées
M. SCHILTZ René	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BILLARD Jean	Physique
M. BODARD Marcel	Botanique
M. BOILLET Pierre	Physique
M. BONNOT Ernest	Biologie
M. BRIDOUX Michel	I.U.T. Béthune
M. CAPURON Alfred	Chimie minérale
M. DEPREZ Gilbert	I.U.T. Lille
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GRUSON Laurent	Mathématiques

.../...

M. GUILBAULT Pierre	Biologie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie
M. LACOSTE Louis	Biologie
M. LANDAIS Jean	Chimie
Mme LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LOUCHEUX Claude	Chimie
M. MAES Serge	Physique
Melle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTEL Marc	Physique
M. MONTUELLE Bernard	I.U.T. Lille
M. PANET Marius	I.E.E.A.
M. SALMER Georges	I.E.E.A.
M. SEGUIER Guy	I.U.T. Béthune

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions)

M. ADAM Michel	Economie politique
M. ANDRE Charles	Sciences économiques
M. ANGRAND Jean Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Mathématiques
M. AUBIN Thierry	Mathématiques
M. BART André	Biologie
M. BEGUIN Paul	Mécanique des fluides
M. BKOUICHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNEMAIN Jean Louis	Biologie végétale
M. BOSCOQ Denis	Mathématiques
M. BREZINSKI Claude	I.E.E.A.
M. BRUYELLE Pierre	Géographie et aménagement spatial
M. CARREZ Christian	I.E.E.A.
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COQUERY Jean Louis	Biologie
M. COULON Jean	I.E.E.A.
Mlle DACCHARI Monique	Géographie et aménagement spatial
M. DEBOURSE Jean Pierre	Sciences économiques et sociales
M. DEBRABANT Pierre	Sciences appliquées
M. DELAUNAY Jean Claude	Sciences économiques et sociales
M. DERIEUX Jean Claude	Biologie (I.U.T.)
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique
M. DRIEUX Baudouin	I.E.E.A.
M. DUEE Gérard	Sciences de la terre
M. DYMENT Arthur	Mathématiques
M. ESCAIG Bertrand	Physique

.../...

Mme EVRARD Micheline	Chimie (I.U.T.)
M. FONTAINE Jacques Marie	I.U.T. Lille
M. FOURNET Bernard	I.U.T. Lille
M. FROELICH Daniel	Sciences appliquées
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Mathématiques
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences économiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences économiques et sociales
M. HECTOR Joseph	S.E.N. Calais
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD DE LA MARRE Pierre	I.E.E.A.
M. JOURNEL Gérard	Sciences appliquées
Mlle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. KREMBEL Jean	Chimie
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Mathématiques
Mlle LEGRAND Solange	Mathématiques
M. LENTACKER Firmin	Géographie et aménagement spatial
M. LEROY Jean Marie	E.N.S.C.L.
M. LEROY Yves	Electronique (Lille)
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique
M. LOUAGE Francis	Sciences appliquées
M. MAHIEU Jean Marie	Physique (I.U.T. Lille)
Mme MAILLET Monique	Sciences économiques et sociales
M. MAIZIERES Christian	I.E.E.A.
M. MALAUSSENA Jean Louis	Sciences économiques et sociales
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Chimie (Sciences appliquées)
M. MOTZKIN Joseph	Mathématiques
M. MONTUELLE Bernard	I.U.T. Lille
M. NICOLE Jacques	Chimie (E.N.S.C.L.)
M. PAQUET Jacques	Sciences appliquées
M. PARSY Fernand	Mathématiques
M. PECQUE Marcel	Chimie (Béthune)
M. PERROT Pierre	Chimie
M. PERTUZON Emile	Biologie
M. PONSOLLE Louis	Chimie (Valenciennes)
M. POVY Jean Claude	Sciences appliquées
M. RACZY Ladislas	Physique
M. ROGALSKI Marc	Mathématiques

.../...

M. ROUSSEAU Jean Paul	Physiologie animale
M. ROY Jean Claude	Biologie
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie et aménagement spatial
M. SIMON Michel	Psychologie
M. SLIWA Henri	Chimie
M. SMET Pierre	Physique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Chimie biologique
M. THERY Pierre	Calais
M. TOULOTTE Jean Marc	Sciences appliquées
M. TREANTON Jean René	Sciences économiques et sociales
M. VANDORPÉ Bernard	Chimie physique
M. VILETTE Michel	Génie mécanique (Béthune)
M. WERNER Georges	Informatique (I.U.T. Lille)
M. WATERLOT Michel	Géologie
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Mathématiques

A MON MAITRE

Monsieur Henri LECLERC

Professeur de Bactériologie à la Faculté de Médecine

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur de Lille

A MES PARENTS

Témoignage de reconnaissance

A MA FEMME

Témoignage d'affection

Les recherches que nous nous proposons de décrire ont été effectuées sous la direction de Monsieur le Professeur H. LECLERC, au Laboratoire d'Hydrobiologie de l'Institut Pasteur de Lille dirigé par Monsieur le Docteur R. BUTTIAUX.

Nous remercions Monsieur le Professeur J. MONTREUIL de nous avoir fait l'honneur de présider notre Jury. Nous lui exprimons notre profonde gratitude pour les connaissances et l'esprit critique qu'il nous a permis d'acquérir pendant nos années de Faculté. Qu'il soit assuré de notre profond respect.

Tous nos remerciements vont aussi à Monsieur le Professeur J. GUILLAUME qui nous a initié clairement à la bactériologie. Nous avons pu bénéficier de ses conseils toujours judicieux qui nous ont beaucoup aidé. Nous le prions de bien vouloir accepter l'expression de toute notre reconnaissance.

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude à Monsieur le Professeur H. LECLERC qui nous a accueilli dans ses laboratoires. Il nous a fait découvrir le sens profond de la recherche et nous a toujours donné les moyens de la réaliser. Sa constante attention, ses conseils et ses encouragements nous ont permis de résoudre nos difficultés et de réaliser ce travail. Nous l'assurons de nos sentiments respectueux et dévoués.

Nous sommes reconnaissant à Monsieur A. GENTY, Ingénieur de la compagnie Technicon, de l'amabilité avec laquelle il a bien voulu accepter de faire partie de notre Jury. Monsieur A. GENTY, ainsi que Monsieur C. ABRY, Directeur du Département industrie à la compagnie Technicon, nous ont fait profiter de leur expérience de l'automation et nous ont aidé efficacement, malgré leurs nombreuses occupations, à résoudre nos problèmes techniques.

Nous prions Monsieur le Docteur R. BUTTIAUX, Directeur de l'Institut Pasteur de Lille, de croire à notre sincère gratitude pour les facilités dont l'Institut nous a fait bénéficier au cours de ce travail.

Que Monsieur C. BURG, Directeur de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, trouve ici l'expression de nos plus sincères remerciements pour nous avoir accepté dans la grande famille des chercheurs de l'INSERM.

Nous n'oublierons pas nos camarades de laboratoire qui trouveront ici mention de l'immense plaisir que nous avons eu à travailler parmi eux.

Nous exprimons au personnel technique et administratif du Laboratoire d'Hydrobiologie et tout particulièrement à Mademoiselle Annie BERNIGAUD, nos remerciements pour l'aide efficace qu'ils nous ont apportée dans la réalisation de nos problèmes pratiques.

PLAN

Introduction

Bibliographie

Chapitre I : Matériel et méthodes

I - Suspensions bactériennes

A) suspensions pures

B) suspensions mixtes

II - L'auto-analyseur

Chapitre II : Etude de la décarboxylase de l'acide glutamique

I - Recherche des conditions optimales de mise en évidence de l'enzyme

A) influence du facteur temps

1) principe de la cinétique

2) mode opératoire

3) résultats

B) influence du facteur température

C) influence du facteur pH

D) influence de la concentration en acide glutamique

1) principe

a) réalisation d'un gradient de concentration par l'auto-analyseur

b) dispositif d'étude de la cinétique en fonction de la concentration en substrat

2) mode opératoire

3) résultats

.../...

II - Conditions optimales de formation de l'enzyme dans
les cultures pures d'E. coli

- A) induction de l'enzyme
- B) influence de la phase de culture
- C) influence de la température de culture
 - 1) cultures en milieu D.T.B.
 - 2) cultures simultanées en bouillon D.T.B. et en bouillon lactosé au BCP
- D) influence du pH de culture

Chapitre III : Application de la recherche de la décarboxylase de
l'acide glutamique : la colimétrie

A) Culture des échantillons d'eau

I - cultures en milieu D.T.B. à température élevée

II - cultures en milieu sélectif

a) matériel et méthodes

1) milieux de culture

2) dosage de la décarboxylase de l'acide glutamique

3) méthodes

b) résultats

1) estimation du nombre d'E. coli par le calcul de
l'indice MPN (nombre le plus probable)

2) étude comparative de la sélectivité des milieux
de culture

B) Appareillage de culture automatique discontinue

I - description

II - facteurs conditionnant la fiabilité du dispositif

a) décontamination du circuit

b) composition du bullage

III - essais de colimétrie sur une eau polluée

.../...

C) Recherche en continu des E. coli dans une eau de rivière

I - influence de la concentration du milieu sélectif

lors de l'autoclavage sur la sensibilité de la méthode

II - dispositif automatique de recherche en continu des

E. coli dans l'eau

a) matériel et méthodes

b) résultats

Conclusion

INTRODUCTION

Si l'analyse chimique bénéficie actuellement de techniques de dosage sensibles et rapides en progrès constants, l'analyse microbiologique doit se contenter d'une technologie embryonnaire.

En microbiologie s'est imposée depuis plus d'un siècle la méthode pastoriennne dont la rigueur et l'efficacité ne sont plus à démontrer. Cependant cette méthode voit ses applications se limiter : en effet, elle ne fait toujours appel qu'aux seules techniques manuelles et ses délais d'analyse sont importants ; les analyses microbiologiques nécessitent d'abord une mise en culture sélective ou non des germes à identifier puis une étape d'isolement des différentes espèces bactériennes présentes car l'identification procède généralement de la "culture pure". L'identification des espèces bactériennes est alors possible ; elle nécessite un nombre souvent élevé de tests biochimiques.

Les délais importants, le nombre des opérations et le travail stérile que nécessitent ces analyses sont difficilement compatibles avec leur automation.

En microbiologie de l'eau où le contrôle de la potabilité se résume à la mise en évidence des germes tests de la contamination fécale, de nombreuses méthodes manuelles ont été proposées. Elles sont toutes précises, sensibles et efficaces. Mais il est parfaitement vain d'améliorer la sensibilité de ces méthodes pour des échantillons qui ne sont aucunement représentatifs de l'eau

.../...

à analyser : comment en effet un échantillon de quelques millilitres d'eau prélevé dans une rivière ou une canalisation d'eau de distribution peut-il être représentatif des milliers de mètres cubes précédant ou suivant la lame d'eau dans laquelle a été réalisé le prélèvement ?

Ce problème d'échantillonnage ne peut être résolu que par un appareil automatique permettant l'analyse microbiologique en continu de l'eau.

La mesure de la décarboxylase de l'acide glutamique et ses applications ouvrent actuellement une voie vers cette automatisation souhaitable en microbiologie de l'eau.

BIBLIOGRAPHIE

On doit à GALE (4, 5, 6, 7) les premières études relatives aux décarboxylases chez les Enterobacteriaceae.

Plus tard, MØLLER (19, 20, 21) comprend l'importance de leur recherche en vue de l'identification bactérienne : il met en évidence le pH optimal d'action des décarboxylases de la lysine, de l'arginine, de l'ornithine et de l'acide glutamique ; il démontre aussi l'effet bénéfique de solvants tels que le toluène ou l'éther éthylique qui, en agissant sur les membranes, libèrent les enzymes endo-cellulaires et augmentent l'activité décarboxylasique des suspensions bactériennes. Enfin et surtout il évalue la répartition des décarboxylases de ces acides aminés chez les différentes espèces apportant ainsi un nouveau facteur d'appréciation de ces espèces.

En 1967, LAWSON et QUINN (11), utilisant des préparations très purifiées des décarboxylases de l'acide glutamique, de l'arginine et de l'histidine, mettent fin aux contradictions de GALE (7), GUIRARD (8), ROSENTHALER (27), SCHUKUYA (28) et de UMBREIT et GUNSALUS (34) et confirment définitivement la dépendance des décarboxylases vis-à-vis de leur coenzyme, le phosphate de pyridoxal ; ils mettent en évidence la rigoureuse spécificité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat, fait discuté par EKLADIUS et KING (2), LOVENBERGER (18), ROBERTS (25) et UMBREIT et GUNSALUS (34) et étudient l'influence du pH et l'action de composés capables de réagir avec le phosphate de pyridoxal sur l'activité enzymatique.

.../...

De nombreux autres travaux ont été réalisés sur l'une ou l'autre des décarboxylases : ils étaient consacrés à des techniques de purification des différentes enzymes, à leur structure primaire ou quaternaire ou à des méthodes de dosage de l'activité enzymatique. Les relater tous dépasserait le cadre de notre étude ; nous nous contenterons de mentionner uniquement les travaux consacrés à la plus importante d'entre elles, en raison de son importance en taxonomie bactérienne, la décarboxylase de l'acide glutamique.

En 1960, SCHUKUYA et SCHWERT (28) proposent une méthode de purification poussée de la décarboxylase de l'acide glutamique à partir d'"extrait acétonique" d'Escherichia coli, purification réalisée par fractionnements au sulfate d'ammonium et chromatographie d'échange d'ions sur D.E.A.E. cellulose. Une étude détaillée du spectre de l'enzyme purifiée à différents pH en présence ou en absence d'acide glutamique leur permet d'émettre des hypothèses sur la structure du site actif de l'enzyme et sur son mécanisme d'action : le phosphate de pyridoxal serait lié à l'apoenzyme par une fonction imine déplacée en présence d'acide glutamique par formation d'une base de Schiff entre le coenzyme et le substrat ; la décarboxylation elle-même mettrait en jeu les doubles liaisons conjuguées du noyau pyridine et de la fonction imine.

En 1967, LAWSON et QUINN (11) et STRAUSBACH (32) obtiennent des préparations pures d'enzyme, le premier à partir d'"extrait acétonique" d'E. coli, le second en purifiant la pyruvate oxydase.

.../...

Ces préparations pures permettent à STRAUSBACH en 1970 (33) d'isoler et d'identifier le composé responsable de la fixation du phosphate de pyridoxal sur l'enzyme : le coenzyme forme avec un résidu ϵ -NH₂ d'une lysine une base de Schiff, ce qui est en accord avec les hypothèses de SCHUKUYA et SCHWERT (28).

L'étude détaillée de la décarboxylase de l'acide glutamique s'est avérée d'une grande utilité en raison de l'importance que ce caractère représente comme facteur d'identification des souches bactériennes. MØLLER (21), discutant de la valeur du test de la recherche de la décarboxylase de l'acide glutamique a été jusqu'à dire : "quelques réactions seulement ou aucune autre apparaissent apporter une différenciation aussi nette entre E. coli et les autres groupes étroitement apparentés". KAUFFMAN (10) à la lumière des résultats de MØLLER (19, 20) a proposé un intéressant système de classification des Enterobacteriaceae fondé sur la recherche des décarboxylases d'acides aminés parmi lesquelles la décarboxylase de l'acide glutamique occupe une place importante : sa recherche et le test au KCN permettent de diviser les Enterobacteriaceae en 4 grands groupes comme le montre le tableau I.

MØLLER (19, 20, 21) et surtout LECLERC (15, 16) ont démontré que la production de la décarboxylase de l'acide glutamique est un privilège de l'espèce E. coli et de quelques autres telles que les Shigella, les Proteus et les Alcalescens qui en produisent aussi couramment ; mais dans les eaux, on ne rencontre ces dernières qu'exceptionnellement et toujours accompagnées d'E. coli qui y subsistent en nombre plus élevé. La détection

.../...

	KCN	GAD
<u>Salmonella</u>	-	-
<u>Arizona</u>	-	-
<u>Shigella</u>	-	+
<u>E. coli</u>	-	+
<u>Citrobacter</u>	+	-
<u>Klebsiella</u>	+	-
<u>Cloacae</u>	+	-
<u>Hafnia</u>	+	-
<u>Erwinia</u>	+	-
<u>Serratia</u>	+	-
<u>Proteus</u>	+	+
<u>Morganella</u>	+	+
<u>Rettgerella</u>	+	+
<u>Providencia</u>	+	+

Tableau I : Classification de KAUFFMAN



de cette décarboxylase dans une culture mixte de germes à partir d'une eau peut donc sans ambiguïté être envisagée comme un test valable de la mise en évidence d'une contamination fécale de cette eau.

Cette hypothèse pleine de promesses s'est révélée difficilement applicable en pratique courante par suite des difficultés qu'il y a de sélectionner la culture des E. coli pour obtenir une concentration enzymatique mesurable. De plus, les méthodes permettant la recherche de la décarboxylase de l'acide glutamique étaient généralement longues et fastidieuses et donc incompatibles avec les impératifs des analyses courantes.

GALE (7), dans ses travaux sur les décarboxylases des Enterobacteriaceae utilisait des suspensions bactériennes vivantes dont il déterminait l'activité selon les méthodes manométriques de WARBURG. MØLLER (19) au contraire s'adressait à des suspensions broyées ou traitées au toluène afin d'obtenir une libération de l'enzyme.

WOIWOD (37), PROOM et WOIWOD (23, 24) mettent en évidence la décarboxylase de l'acide glutamique par séparation chromatographique et identification du produit de dégradation, l'acide γ -aminobutyrique. Cependant la complexité de cette méthode n'a pas permis son application en pratique courante.

Pour simplifier la recherche, MØLLER (21) relate une nouvelle technique fondée sur la modification du pH du milieu de culture en présence d'acide glutamique, par suite de formation

.../...

d'amines. Une nouvelle fois, la méthode se heurte à l'incompatibilité entre le pH de croissance des bactéries et le pH optimal d'activité de l'enzyme.

Une nouvelle technique d'identification par chromatographie est proposée par STEWART (31) en 1963. Bien que rapide, cette méthode exige elle aussi des nombreuses manipulations.

Plus récemment VOGLER (36) a proposé une méthode de détermination de l'activité décarboxylasique de souches bactériennes par chromatographie sur "bandelettes en coin" et identification de l'acide γ -aminobutyrique. Bien que qualifiée "de routine" par l'auteur cette méthode est longue (28 h) et complexe (centrifugations).

Après avoir décrit en 1963 une méthode électrophorétique avec la collaboration d'OSTEUX et GUILLAUME (12), LECLERC (13), reprenant le système auto-analyseur décrit par SKEGGS (29) puis FERRARI (3) l'applique à la recherche de la décarboxylase de l'acide glutamique produite par des suspensions bactériennes vivantes. Cette dernière méthode permet d'obtenir des résultats quantitatifs rapides et sensibles.

Depuis, les recherches sur la décarboxylase de l'acide glutamique avec l'auto-analyseur ont emprunté des voies sensiblement différentes : CAMIER et GONNARD (1) ont travaillé sur l'enzyme purifiée et perfectionné le système ; LECLERC (15, 17) l'a adapté aux suspensions cellulaires intactes en vue de la recherche systématique de l'activité décarboxylasique chez les souches bactériennes.

.../...

Le même auteur (14) en 1966 a effectué des essais de dénombrement des E. coli dans les eaux par cette technique après culture enrichie, mais les résultats, prometteurs en ce qui concerne les eaux peu polluées, se sont avérés aléatoires dans le cas des eaux naturellement très polluées.

Le but de cette étude est donc de reprendre et de poursuivre les travaux entrepris par LECLERC. Nous avons précisé en premier lieu les conditions optimales d'activité de l'enzyme en utilisant le système auto-analyseur. Nous avons recherché en second lieu les conditions les plus favorables à la synthèse de l'enzyme. Une nouvelle méthode de recherche rapide des E. coli a ensuite pu être définie. Sa spécificité et sa rapidité ont permis la réalisation d'un appareil d'analyse bactériologique automatique de l'eau.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

I - SUSPENSIONS BACTERIENNES

A - Suspensions pures

Toutes les études concernant l'activité et la formation de la décarboxylase de l'acide glutamique ont été effectuées sur une souche d'E. coli isolée des eaux.

La suspension était facilement obtenue par une culture de cette souche 16 h à 37°C dans 400 ml d'un bouillon DTB dont la composition est la suivante :

Extrait de viande.....	3 g
Bactotryptose.....	10 g
Glucose.....	4 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Phosphate dipotassique...	1 g
Extrait de levure.....	3 g
Eau distillée.....	QSP 1000 ml

pH 7,2

Dans quelques cas particuliers que nous préciserons, la souche a été incubée en flacons ou en tubes de Lactose Broth. Ce milieu permet lui aussi une croissance rapide des coliformes ;

.../...

il contient :

Peptone.....	5 g
Extrait de viande (Liebig)	3 g
Lactose.....	5 g
Eau distillée.....	QSP 1000 ml

Ajuster à pH 6,7, filtrer et ajouter 5 ml d'une solution de bromocresol pourpre à 1 % par litre de milieu. Répartir et autoclaver 15 minutes à 120°C.

Les cultures obtenues sont utilisées selon les expériences brutes ou centrifugées à 3000 tours/minute (centrifugeuse JOUAN) pendant 15 minutes et resuspendues à la densité optique désirée dans un tampon acétate 0,1 M au pH convenable choisi. Cette dernière méthode est la plus souvent employée car le pH du tampon généralement situé vers 4 empêche toute croissance cellulaire et permet donc des expériences prolongées sans risque de modification importante du matériel enzymatique. Il a en outre l'avantage d'éliminer le CO₂ de respiration dégagé dans le milieu au cours de la culture qui, dans le cas d'une activité décarboxylasique faible, peut interférer de façon non négligeable au cours des mesures.

B - Suspensions mixtes

Pour les études concernant la sélectivité des conditions de culture et la mise au point du dispositif automatique, les expériences ont été réalisées à partir d'échantillons purs ou dilués d'eau de la Deule.

.../...

II - L'AUTO-ANALYSEUR

Le dosage des différents échantillons est réalisé automatiquement grâce à l'auto-analyseur "Technicon". Cet appareil et son principe sont actuellement trop connus pour que nous exposions très en détail son mécanisme. Le système particulier employé au laboratoire a été décrit par LECLERC (13, 15) en 1966 et 1967 (figure 1). Les cultures, aspirées par une pompe, sont mélangées successivement en des proportions déterminées à une solution de coenzyme et à une solution tamponnée contenant l'acide glutamique. Puis au cours d'un passage de trente minutes dans une bobine d'incubation en verre maintenue à 37°C, les germes capables de synthétiser l'enzyme dégradent l'acide glutamique en acide γ -aminobutyrique et en anhydride carbonique qui restent en solution dans le milieu. Le CO₂ est libéré sous forme gazeuse dans une phase suivante par l'action conjuguée de la température et de l'acidification du milieu obtenue par addition d'acide sulfurique N. Il vient alors enrichir les bulles d'air qui segmentent régulièrement le flux liquide individualisant les micro-réactions.

Une trappe à CO₂ permet de récupérer la plus grande partie du CO₂ qui, dans un nouveau cycle, vient segmenter un réactif à la phénol-phtaléine stabilisé par un tampon carbonate ; il a la composition suivante :

Solution de phénol-phtaléine à 1 % dans le méthanol.....	5 ml
Tampon CO ₃ HNa - CO ₃ Na ₂ (2v, 1v) molaire	1,8 ml
Eau distillée bouillie.....	QSP 1000 ml

.../...

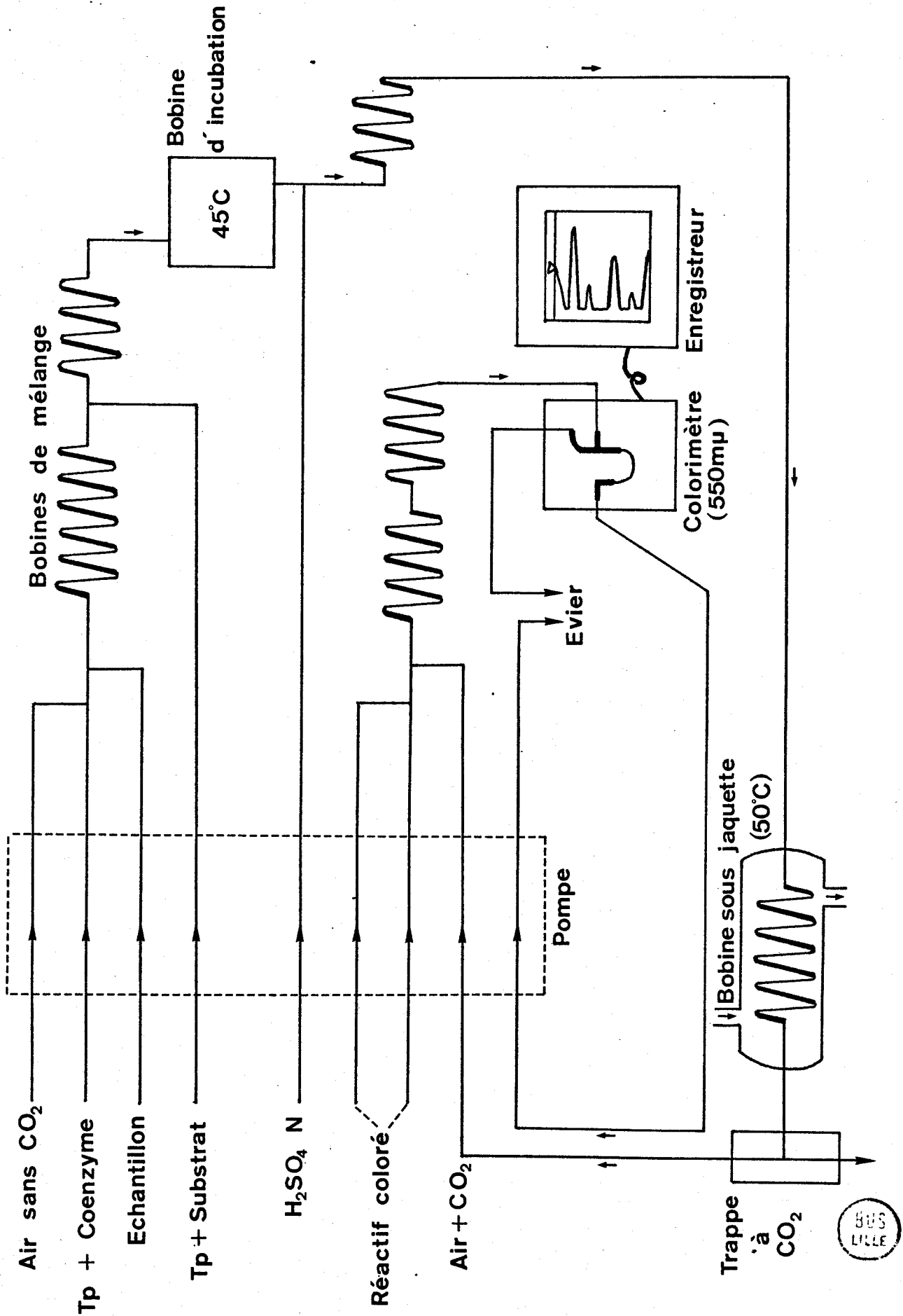


Fig 1 : Mise en évidence de la décarboxylase de l'acide glutamique : schéma du montage

Le réactif est décoloré proportionnellement à la concentration du CO_2 . Un colorimètre ($\lambda = 555 \text{ m}\mu$) mesure la décoloration et un enregistreur inscrit la variation sous forme de pic.

Il faut noter que la proportionnalité de la réponse du réactif coloré en fonction de la concentration en CO_2 n'est pas rigoureusement constante et il est nécessaire pour un réactif donné de rester dans une zone de concentration en CO_2 bien définie si de faibles différences d'activité entre deux suspensions cellulaires doivent être détectées.

Le système décrit précédemment sera fréquemment modifié au cours de plusieurs expériences, en particulier lors des cinétiques en fonction du temps, du pH, de la température et de la concentration en acide glutamique réalisées en continu avec l'auto-analyseur.

CHAPITRE II

ETUDE DE LA DECARBOXYLASE DE L'ACIDE GLUTAMIQUE

I - RECHERCHE DES CONDITIONS OPTIMALES DE MISE EN EVIDENCE DE L'ENZYME

Nos premières expériences ont eu pour but de rechercher les conditions optimales d'activité de l'enzyme. Prenant exemple sur les travaux réalisés par POSEN et al (22), nous avons utilisé au maximum les possibilités de l'auto-analyseur dans l'étude en continu de l'activité enzymatique. Cependant, pour nous plier aux conditions habituelles de l'analyse, nous avons travaillé sur des suspensions ou des cultures d'E. coli et non pas sur l'enzyme purifiée. Il ne s'agit donc pas d'un travail d'enzymologie au sens strict du terme mais seulement de la recherche de l'activité optimale de l'enzyme sur des cultures proliférantes.

A - Influence du facteur temps

1) Principe de la cinétique

Le montage que nous avons employé pour cette étude est schématisé dans la figure 2 : il exclut la bobine d'incubation. La réaction se développe dans un erlen placé à 37°C, qui contient le mélange réactionnel (suspension bactérienne + autres facteurs) soumis à une agitation douce afin d'éviter la sédimentation des bactéries et de favoriser le contact enzyme-substrat. A tout moment, le milieu est prélevé par la pompe et dosé automatiquement en continu.

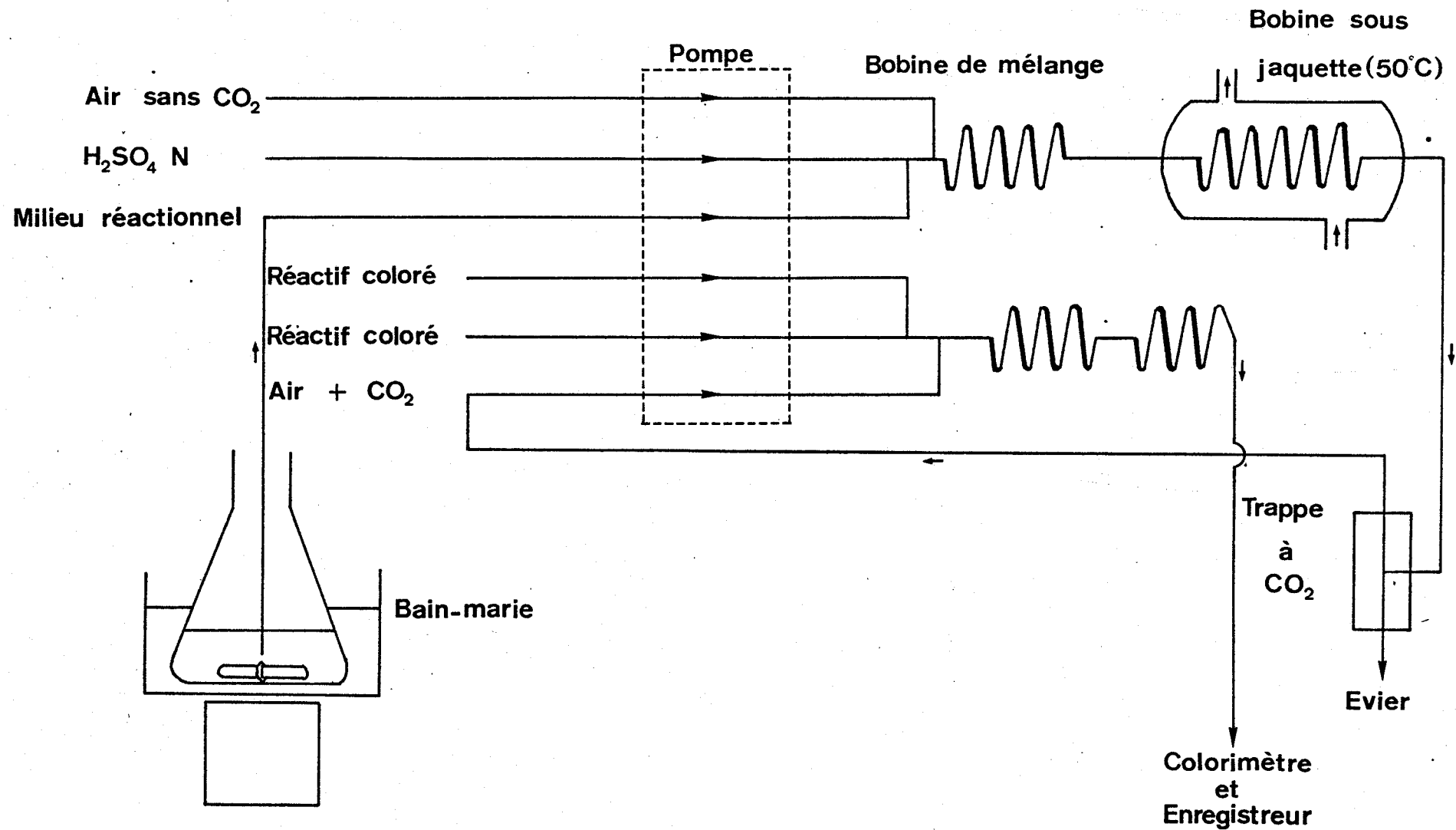


Fig 2 : Cinétiques d'activité de la décarboxylase de l'acide glutamique : schéma du montage.



2) Mode opératoire

Une souche d'E. coli est cultivée dans un bouillon DTB 16 H à 30°C et centrifugée 15 minutes à 3000 tours/minute. Le culot obtenu est remis en suspension dans un tampon acétate de sodium 0,1 M pH 4 de façon à obtenir une densité optique de 1,50 (spectrophotomètre M. Jean et R. Constant). 70 ml de cette suspension sont prélevés, mis dans l'erlen et additionnés de 70 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 4 contenant 1g p 10000 de phosphate de pyridoxal. L'erlen est alors plongé dans un bain-marie à 37°C et soumis à l'agitation magnétique. Lorsque la température dans l'erlen se stabilise, le mélange est prélevé en continu : en l'absence du substrat, la teneur en CO₂ ne varie pas comme le témoigne la droite dessinée par la plume de l'enregistreur (ligne de base).

Au temps zéro, 70 ml de tampon acétate de sodium à pH 4 contenant 1,5 pour 100 d'acide glutamique préalablement amenés à 37°C sont ajoutés à la solution enzymatique. La réaction démarre aussitôt : la cinétique de la réaction s'inscrit alors automatiquement sur l'enregistreur.

3) Résultats

Le graphique fourni par l'enregistreur montre que la vitesse est maximale pendant huit minutes (figure 3). Elle diminue ensuite continuellement pour s'annuler après 25 minutes : le palier de la courbe traduit la fin de la réaction.

.../...

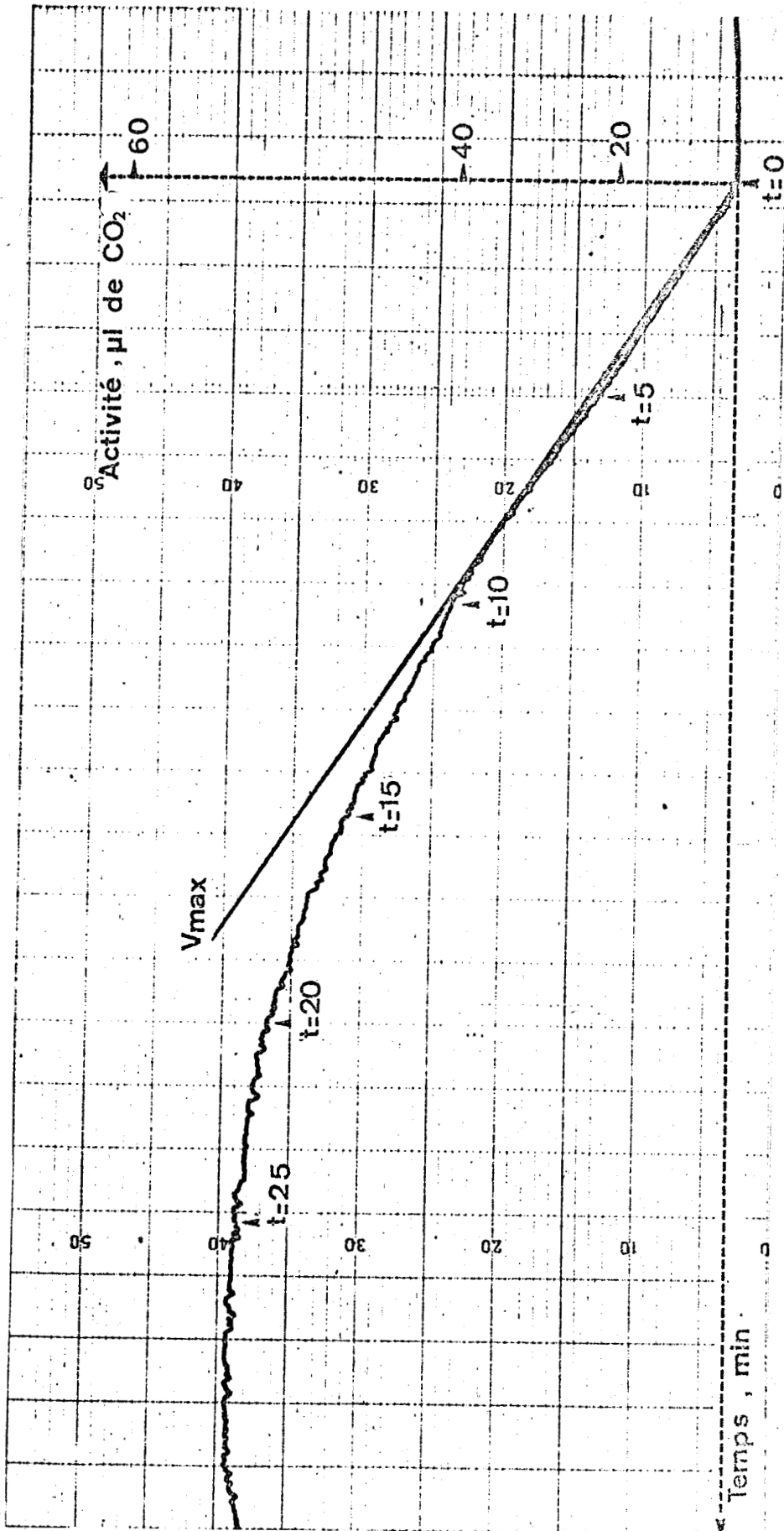
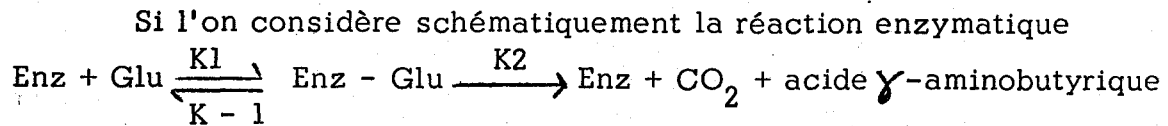


Fig 3 : Cinétique d'activité : résultat.





le palier peut s'expliquer par le déplacement du premier équilibre : la concentration en acide glutamique diminue avec le temps entraînant une augmentation de la constante k-1 : c'est l'arrêt de la réaction. Un autre phénomène peut intervenir à savoir l'inhibition de l'enzyme par les produits de la réaction mais des essais d'inhibition de la décarboxylase par l'acide γ -aminobutyrique n'ont fourni aucun résultat positif et susceptible de confirmer cette seconde hypothèse.

Lors des dosages d'activité, la longueur de la bobine d'incubation devra donc nécessairement permettre un temps de réaction de trente minutes si l'on désire faire la mesure avec une sensibilité optimale c'est-à-dire enregistrer la totalité de la réaction.

B - Influence du facteur température

En 1966, CAMIER et GONNARD (1), à l'aide du même système auto-analyseur, emploient la température de 37°C pour les dosages de la décarboxylase de l'acide glutamique.

Un an plus tard, l'influence de la température sur l'activité de la décarboxylase de l'acide glutamique purifiée est étudiée par LAWSON et QUINN (11) qui notent un optimum d'activité vers 30°C et précisent que cette activité décroît avec la température à partir de 30°C ; l'enzyme a encore une activité non négligeable à 70°C.

.../...

Simultanément, LECLERC (15), travaillant sur des suspensions d'E. coli intactes, démontre une augmentation de l'activité lorsque la température croît de 25°C à 40°C.

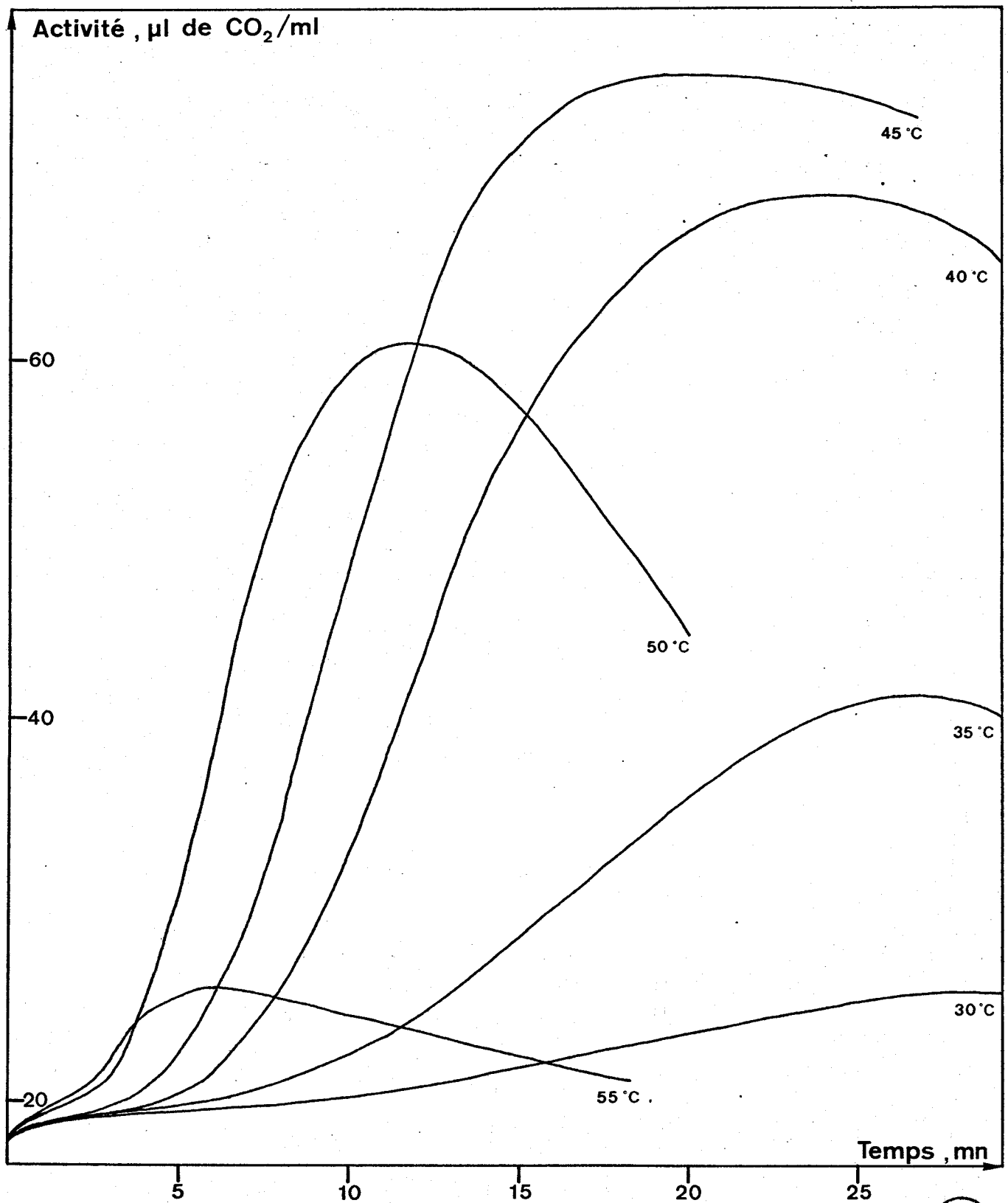
A la lecture de ces résultats contradictoires, il semble que le comportement de l'enzyme purifiée diffère sensiblement de celui de l'enzyme dépendante de la bactérie et de ses structures cellulaires : dans le cas de suspensions bactériennes, l'arrivée de l'acide glutamique au niveau des sites actifs de l'enzyme serait tributaire de la perméabilité cellulaire elle-même dépendante de la température. Cette hypothèse est cependant peu concevable car, selon HALPERN et UMBARGER (9), les souches sauvages d'E. coli ne posséderaient pas de système actif de transport de l'acide glutamique contrairement à certains mutants isolés.

Nous nous sommes donc attachés à vérifier et à préciser les résultats de LECLERC par l'étude des cinétiques en fonction du temps réalisées à différentes températures.

L'appareillage et le mode opératoire utilisés dans ces conditions sont identiques à ceux de la cinétique en fonction du temps (figure 2). L'étude de ces cinétiques est réalisée successivement à 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C et 55°C en utilisant dans chaque cas la même suspension bactérienne de D.O. = 1,3 dans un tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 4 et les mêmes réactifs afin d'éviter toute interférence de facteurs autres que la température.

La comparaison des courbes des différentes cinétiques indique nettement une activité optimale vers 45°C (figure 4). On remarque que la vitesse de réaction croît progressivement

.../...



BUS
LILLE

Fig 4 : Influence de la température sur les cinétiques d'activité.

lorsque la température s'élève et que les équilibres sont plus vite atteints. D'autre part, les taux de CO_2 correspondant à l'état d'équilibre de chaque réaction varient eux aussi avec la température : il sont de plus en plus instables au cours du temps et subissent une diminution d'autant plus rapide que la température est élevée. Cette instabilité témoigne de la chute du taux de CO_2 de décarboxylation dans le tampon, chute facilement explicable aux conditions que nous avons employées : l'anhydride carbonique est peu soluble en milieu acide et les températures de plus en plus élevées diminuent la quantité maximale de CO_2 soluble dans le tampon et accélère sa libération spontanée hors du milieu réactionnel.

Il est aisé de vérifier ce phénomène en remplaçant la solution enzymatique par un témoin carbonate de sodium dans un tampon acétate de sodium à pH 4 : à température ordinaire le taux de CO_2 de ce témoin est constant. Par contre s'il est placé à 50°C son taux de CO_2 décroît rapidement jusqu'à n'atteindre que 10 % de son taux primitif.

Ce dégagement spontané du CO_2 , inévitable lors des réactions en erlen, nous a conduits à confirmer l'influence de la température en système clos sur l'activité de la décarboxylase de l'acide glutamique à l'aide d'une bobine d'incubation placée à différentes températures. Dans ce cas, le gaz carbonique, s'il se dégage à nouveau au cours de la réaction, malgré les pressions plus importantes qui régissent dans la bobine, ne fait qu'anticiper l'action de l'acide sulfurique N ajouté en fin de réaction.

.../...

Les résultats obtenus dans ce système démontrent une activité optimale à 45°C, confirment les résultats précédents et témoignent de la stabilité peu commune de l'enzyme (figure 5) : à 50°C son activité est supérieure à celle qui nous était indiquée précédemment (figure 4) : cette activité est plus grande qu'à 40°C. A 55°C et à 60°C elle n'est pas négligeable. Le dégagement spontané du CO₂ faussait donc partiellement les résultats obtenus lors des cinétiques réalisées en système ouvert.

Les résultats contradictoires de LAWSON et QUINN nous ont amenés à étudier plus amplement l'action de la température et tout d'abord son influence possible sur la perméabilité des membranes. Cependant, même après mise en contact des cultures 1 h avec le toluène à 1 %, l'activité est encore nettement supérieure à 45°C.

Pour vérifier nos résultats, nous avons travaillé sur un extrait enzymatique que nous avons préparé de la façon suivante : 500 ml de culture d'E. coli sont centrifugés à 16.300 g durant une heure. Le culot obtenu est lavé dans 50 ml d'eau physiologique stérile. Après une nouvelle centrifugation à 1.000 g durant 15 minutes, le culot est pesé, mis dans un mortier maintenu dans un bain de glace et additionné progressivement de deux fois son poids de zéolithes. Le mélange est broyé pendant quinze minutes énergiquement. On obtient une poudre que l'on resuspend dans 40 ml d'un tampon Trismaleate 0,02 M à pH 5,6. La suspension est centrifugée à 5.000 g quinze minutes et le culot de zéolithes est repris par 40 ml du même tampon et centrifugé à nouveau.

.../...

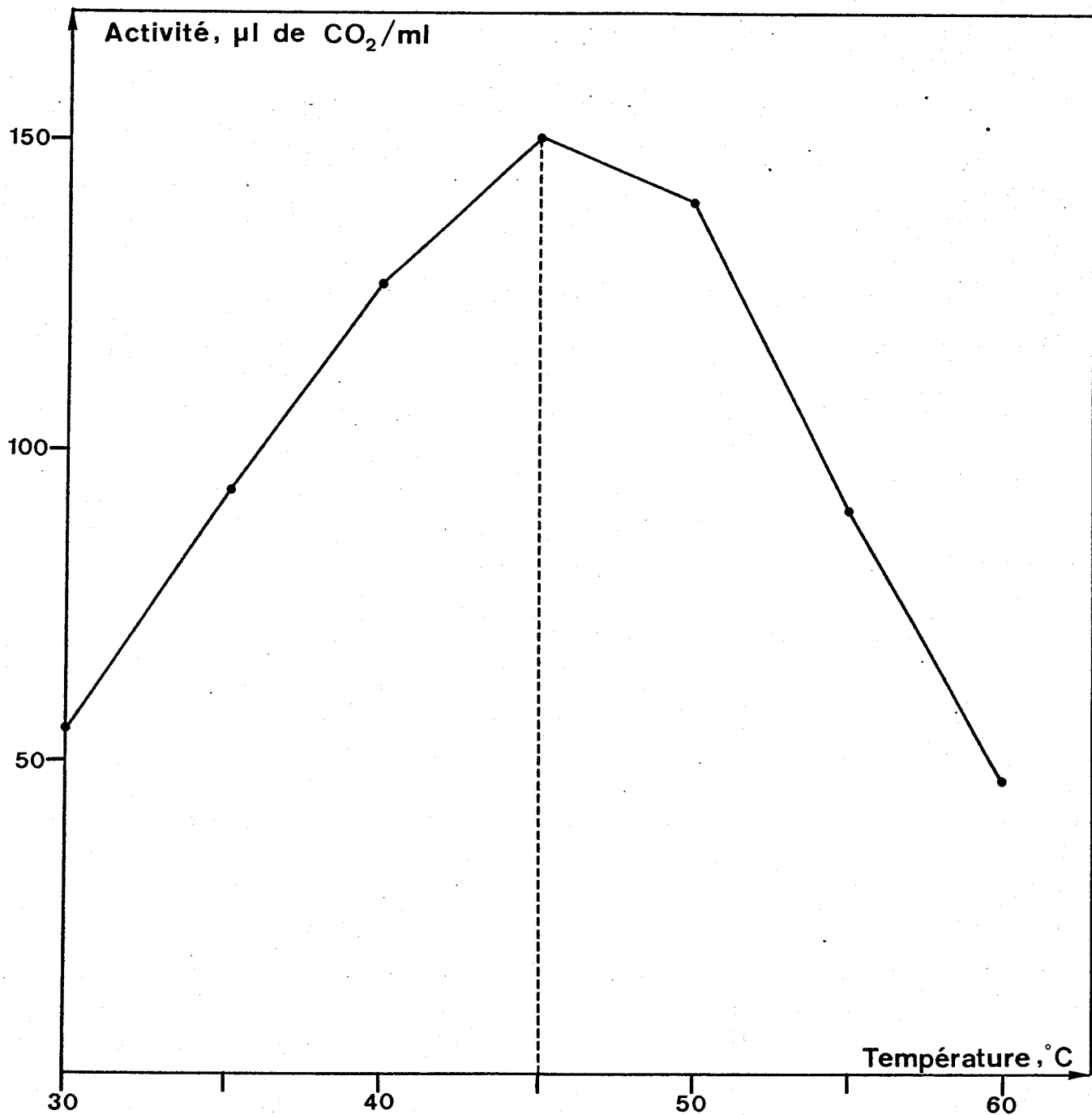


Fig 5 : Influence de la température sur l'activité de la décarboxylase de l'acide glutamique.



Les surnageants sont alors rassemblés et centrifugés à 12.000 g quinze minutes afin de faire sédimenter les bactéries intactes ou éclatées et les membranes. La solution surnageante, légèrement trouble, est récupérée et maintenue à 0°C.

L'activité de la solution enzymatique est dosée selon le principe de la figure 1 successivement à des températures variant de 5 en 5°C de 30°C à 55°C. La solution enzymatique, à l'image des suspensions cellulaires, à une activité optimale à 45°C (figure 6). Cependant, au dessus de 45°C, l'activité décroît plus rapidement que celle des suspensions cellulaires : la structure cellulaire jouerait probablement un rôle protecteur vis-à-vis de la décarboxylase. Comme SCHUKUYA et SCHWERT (28) nous avons remarqué une inactivation partielle de la décarboxylase lors du passage à 0°C, inactivation parfaitement réversible par un séjour d'une heure à température ordinaire.

En définitive, le pH réactionnel utilisé par LAWSON et QUINN au cours de leurs expériences pourrait expliquer les divergences que nous avons soulignées. L'état d'ionisation de l'enzyme à pH 4,4 est différent de celui observé au pH optimal de l'enzyme (pH 3,8) et sa stabilité pourrait en être affectée.

C - Influence du facteur pH

GALE (7) et MØLLER (19) ont montré que le pH optimal d'activité de l'enzyme était situé autour de 4. Plus récemment LECLERC (15) montre que l'activité augmente régulièrement avec le pH et qu'elle est optima entre les pH 3,6 et 4,0 tandis que STRAUSBACH (32), et LAWSON et QUINN (11), travaillant sur l'enzyme purifiée, mettent en évidence une activité maxima à pH 3,8.

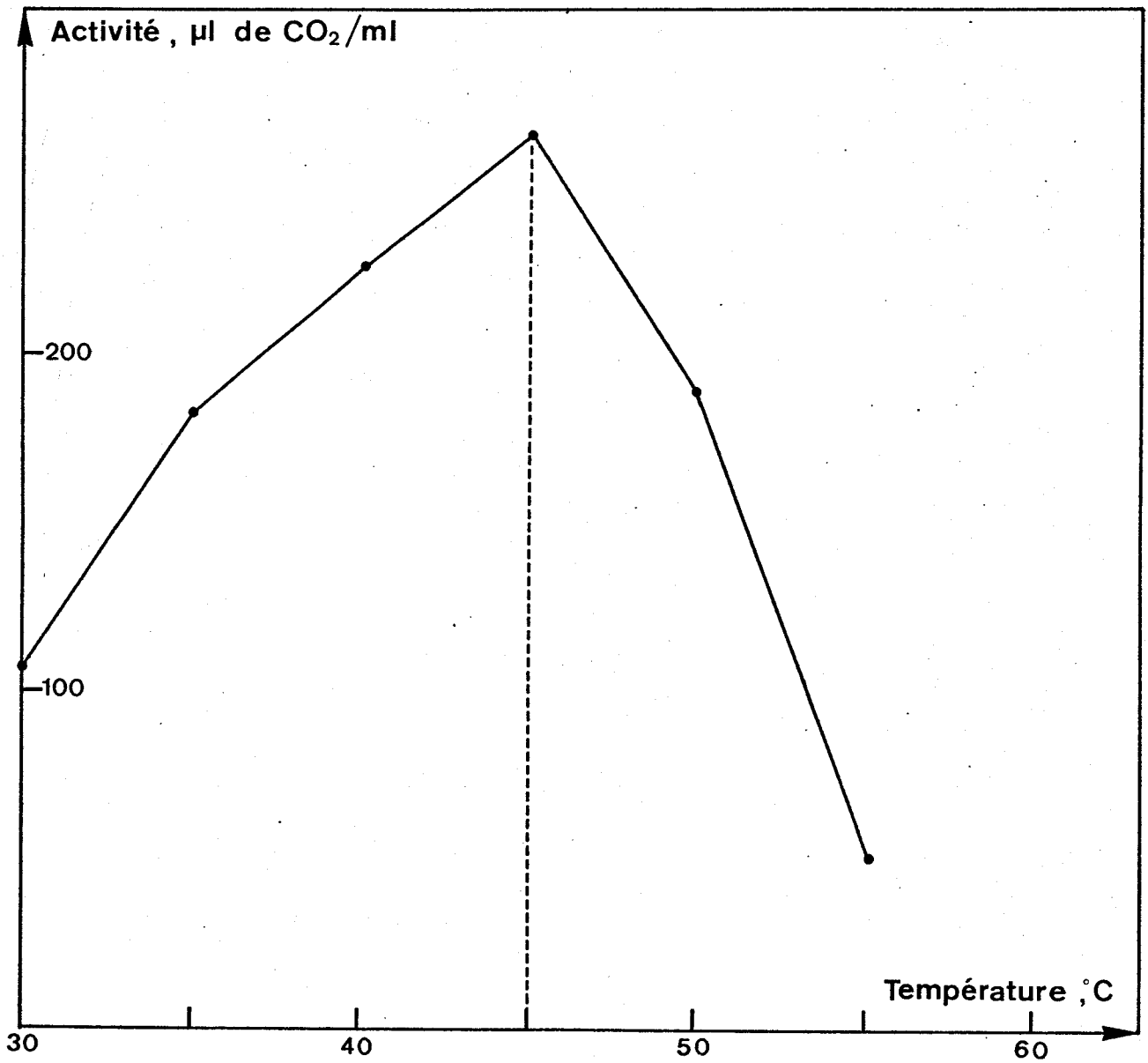


Fig 6 : Influence de la température sur l'activité d'un extrait enzymatique brut.

Nous avons voulu vérifier ces données en réalisant des cinétiques d'activité en fonction du temps à différents pH. Le protocole suivi est celui décrit initialement à propos de la température : mêmes réactifs, mêmes solutions tampons et même suspension d'E. coli de D.O. = 2,05 dans un tampon acétate 0,1 M au pH choisi.

Pour chaque étude de courbe, 20 ml de cette suspension bactérienne sont additionnés de 20 ml de tampon au pH choisi en présence du coenzyme. Le mélange est laissé durant cinq minutes à 45°C pour le porter à la température d'activité optimale. Au temps zéro, on ajoute 20 ml de tampon acétate 0,1 M au même pH contenant 1,5 % d'acide glutamique. L'anhydride carbonique produit par la réaction est dosé en continu selon le principe de la figure 2.

Les résultats obtenus confirment ceux de STRAUSBACH (32) fixant pour la décarboxylase de l'acide glutamique une activité optimale à pH 3,8 (figure 7). Une diminution du pH au delà de 3,8 entraîne une inactivation rapide de l'enzyme totale vers pH 3. D'autre part, les vitesses de réaction augmentent lentement au fur et à mesure de l'abaissement du pH mais la diminution d'activité peut être provoquée en partie par le dégagement spontané du CO_2 comme en témoignent les courts équilibres de réaction et la chute rapide du taux de CO_2 aux pH les plus acides.

L'interférence de ce dégagement spontané du CO_2 , en particulier aux pH les plus bas peut être importante. Son influence peut amener des erreurs supérieures à celles que nous avons pu

.../...

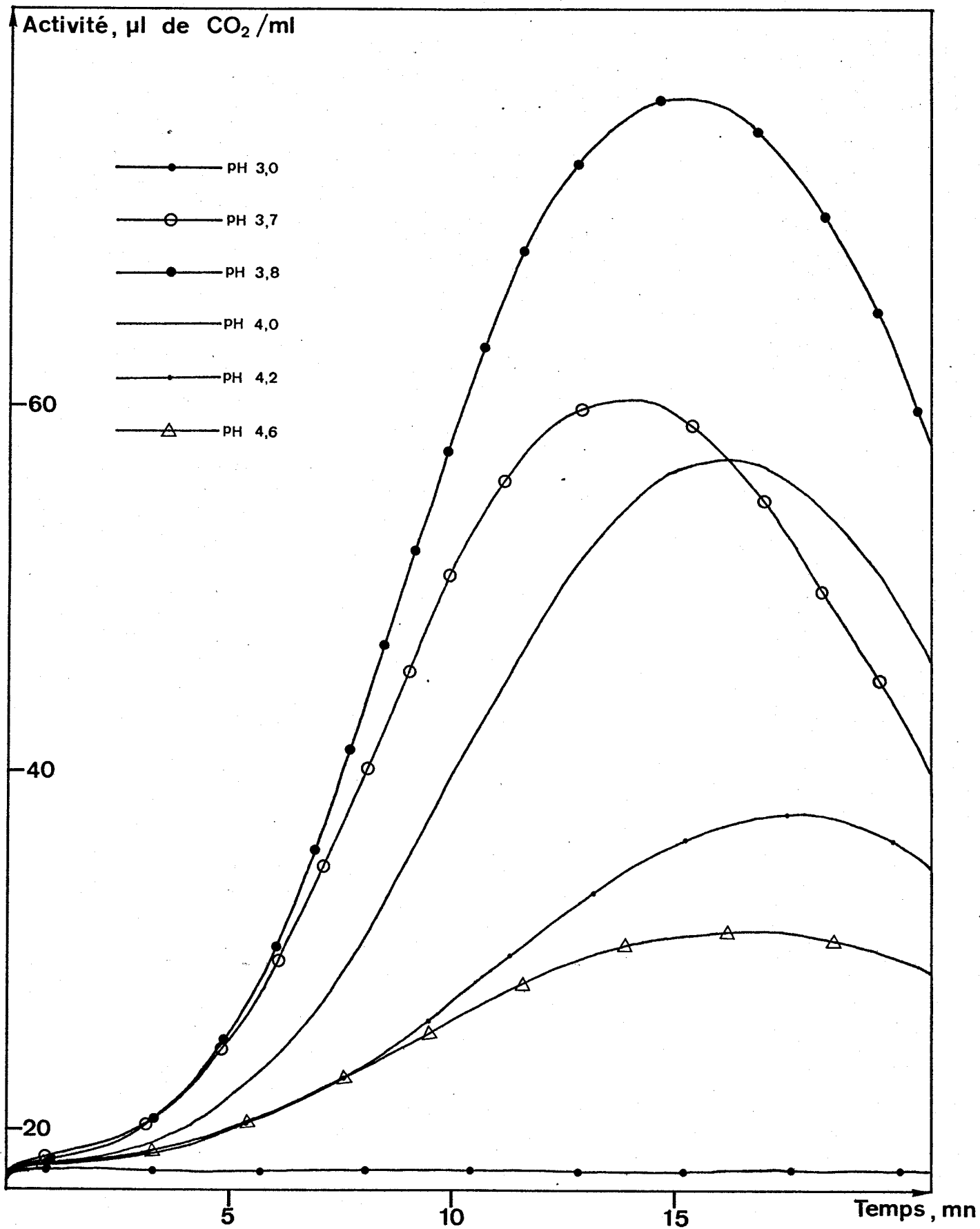


Fig 7 : Influence du pH sur les cinétiques d'activité.



constater antérieurement avec l'élévation de la température. Une expérience de confirmation en système clos s'avérait donc nécessaire ; elle a été réalisée à l'aide de la bobine d'incubation placée à 45°C. Les résultats sont en accord avec les précédents bien que les différences entre les pH proches du pH optimal soient moins accentuées comme en témoigne la figure 8.

Cette faible différence d'activité en système clos pour des pH variant de 0,1 unité autour du pH optimal permet d'admettre de légères variations du pH du milieu au cours des dosages, variations toujours possibles en raison de l'acidification plus ou moins forte du milieu de culture surtout lorsqu'il contient une concentration importante de glucides.

D - Influence de la concentration en acide glutamique

1) Principe

a) Réalisation d'un gradient de concentration par l'auto-analyseur

L'auto-analyseur permet, grâce à un dispositif simple, de réaliser des gradients de concentration convexes (figure 9). Le gradient est obtenu dans un erlen contenant un volume déterminé d'excipient qui reçoit avec un débit rigoureusement défini une solution concentrée du soluté. La solution obtenue, homogénéisée rapidement par un agitateur magnétique, est aspirée en continu, en vue de la réaction, avec un débit identique à celui de l'addition du soluté afin de maintenir constant le volume de l'erlen. L'évolution du gradient suit alors une loi exponentielle

.../...

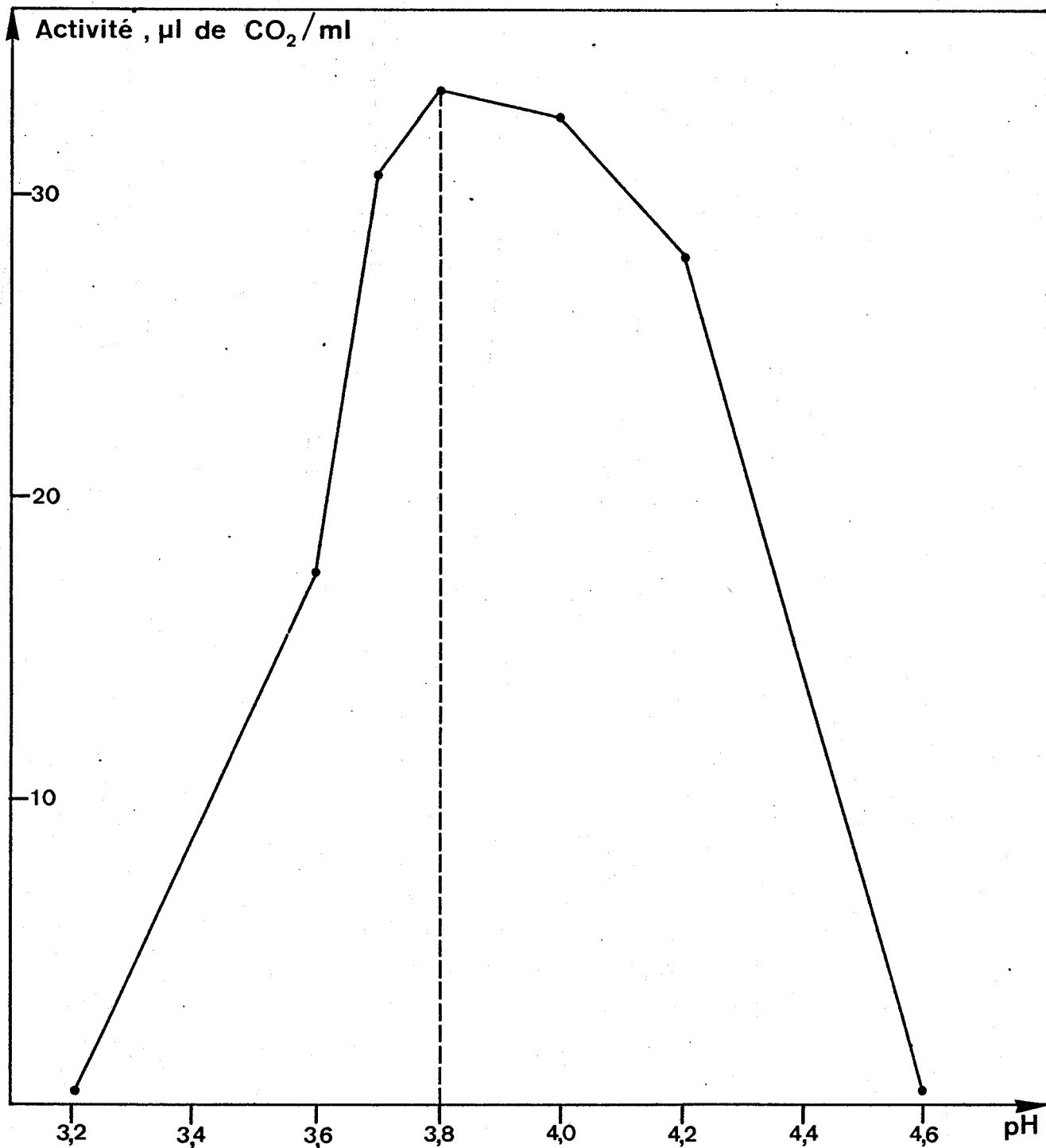


Fig 8 : Influence du pH sur l'activité de la décarboxylase de l'acide glutamique.



où interviennent de nombreux facteurs tels que le débit de prélèvement, le temps, la concentration du soluté additionné et le volume d'excipient dans lequel s'effectue le gradient. Cette loi peut être résumée dans la formule suivante :

$$C_t = C_o \left(1 - e^{-\frac{Rt}{V}} \right)$$

C_t = concentration du soluté dans l'erlen au temps t

C_o = concentration du soluté additionné

R = débit d'arrivée du soluté concentré et d'aspiration de la solution (ml/mn)

t = temps en minutes de formation du gradient

V = volume d'excipient contenu dans l'erlen en ml

Comme nous l'avons laissé entrevoir ci-dessus, la variation de la concentration en soluté de l'erlen, rapide au début, ralentit progressivement au cours du gradient (tableau II).

Temps (minutes)	3'	6'	9'	12'	15'	18'	21'	24'
Evolution du gradient (en g/100 ml)	0,282	0,535	0,755	0,953	1,129	1,283	1,420	1,542

Tableau II : Vitesse d'évolution du gradient au cours du temps. Conditions expérimentales : erlen à volume constant contenant 20 ml d'excipient et recevant une solution à 2,5 % de soluté avec un débit de 0,8 ml/minute.

b) Dispositif d'étude de la cinétique en fonction du substrat

L'utilisation de la bobine d'incubation en vue de l'étude de la cinétique en fonction de la concentration en substrat présente ici un double avantage : elle permet un temps de réaction uniforme de 25 minutes et élimine l'enregistrement du facteur temps : le système colorimètre-enregistreur peut dès lors mesurer la variation d'activité de la décarboxylase de l'acide glutamique en fonction d'autres facteurs influençant son action tels que le pH, la concentration en acide glutamique ou en inhibiteur. Le facteur que nous avons choisi d'étudier ici est la concentration en acide glutamique qui, au cours de la cinétique, varie continuellement par l'utilisation d'un gradient de concentration réalisé automatiquement par l'auto-analyseur.

2) Mode opératoire

La suspension bactérienne de D.O. = 1,6 dans un tampon acétate de sodium à pH 4 est aspirée en continu et soumise à une agitation magnétique afin d'obtenir une bonne homogénéisation. Le substrat en solution est aspiré à partir d'un erlen contenant 20 ml de tampon recevant la solution concentrée d'acide glutamique à un débit défini. Cet erlen retient un volume rigoureusement constant de 20 ml qui permet une variation rapide sans être brutale de la concentration en acide glutamique. Le volume contenu initialement par l'erlen doit être de 25 ml, les 5 ml supplémentaires permettant de définir la ligne de base. Lorsque ce volume est réduit à 20 ml, on ajoute alors la solution concentrée d'acide glutamique à un débit uniforme égal à celui du prélèvement. Les réactions elles-mêmes se déroulent selon le processus schématisé dans la figure 9.

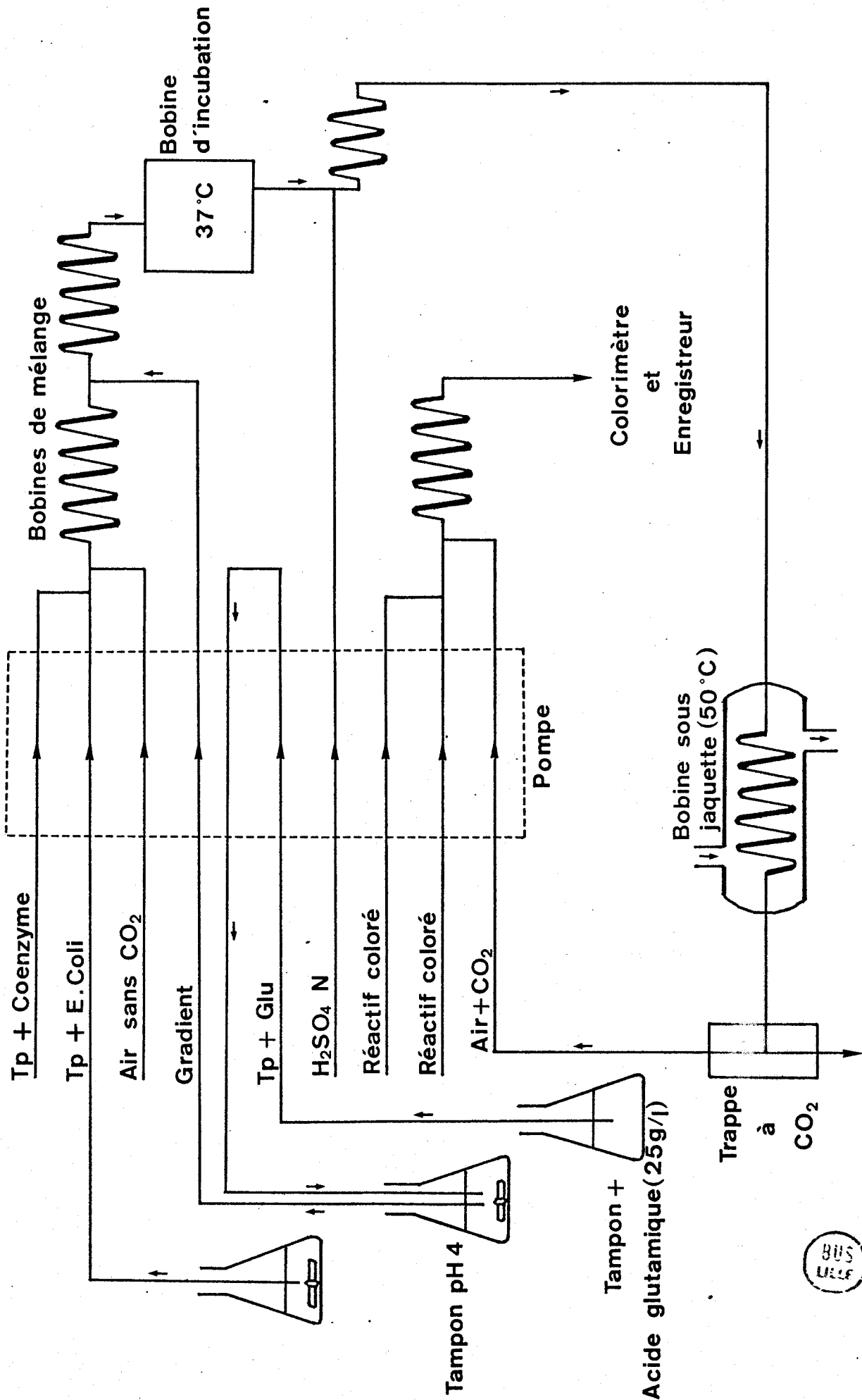


Fig 9 : Influence de la concentration en acide glutamique sur l'activité de la décarboxylase de l'acide glutamique : schéma du montage utilisé.

3) Résultats

L'activité maximale est atteinte pour une concentration en acide glutamique de 1,8 % (figure 10) mais elle est encore excellente pour une teneur de 1,5 %, teneur que nous avons choisie pour toutes nos expériences en raison de la difficile dissolution de l'acide glutamique à pH acide.

Les conditions optimales d'activité de l'enzyme sont dès à présent précisées : elles nous autorisent maintenant à rechercher dans des conditions rigoureusement définies les conditions optimales de formation de la décarboxylase chez E. coli.

II - CONDITIONS OPTIMALES DE FORMATION DE L'ENZYME DANS LES CULTURES PURES d'E. COLI

Pour étudier les meilleures conditions de formation de l'enzyme nous nous sommes servis du dispositif général complété par un système d'élimination du CO_2 de respiration des cultures (figure 11). Ce système, qui découle des observations faites au cours des cinétiques d'activité, permet l'élimination de ce CO_2 grâce à l'acidité du tampon qui contient le phosphate de pyridoxal (pH 3,4) et à une température élevée fournie par une bobine sous jaquette. Sous l'action de ces deux facteurs, le CO_2 est libéré dans une phase gazeuse et éliminé par un débulleur. Le mélange enzyme-coenzyme est ensuite bullé à nouveau et additionné d'une solution tamponnée d'acide glutamique (pH 3,9) qui tend à réduire l'acidité du mélange et ramène le pH au niveau le plus favorable

.../...

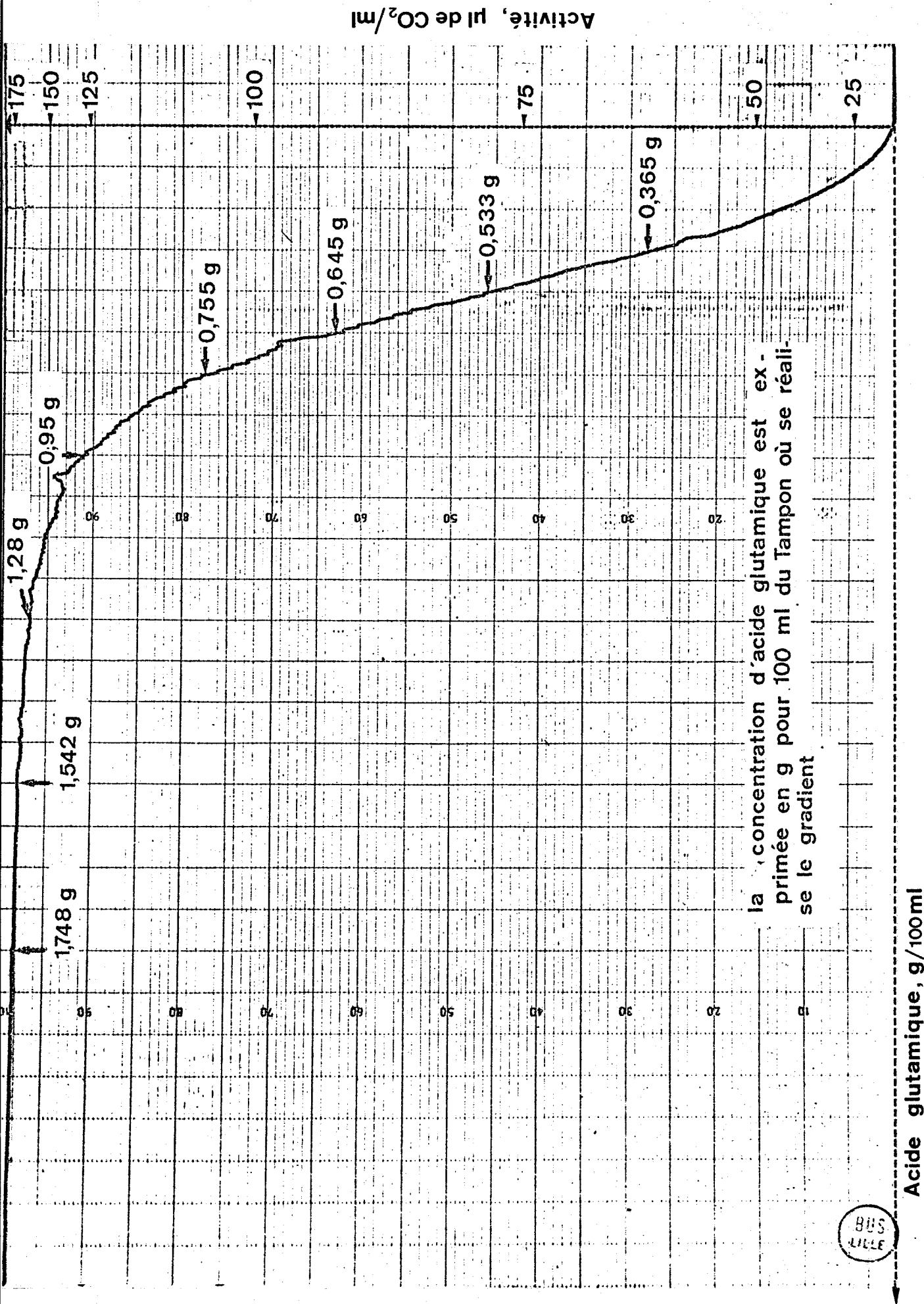


Fig 10 : Influence de la concentration en acide glutamique sur l'activité de la décarboxylase de l'acide glutamique : résultat.

BUS
LILLE

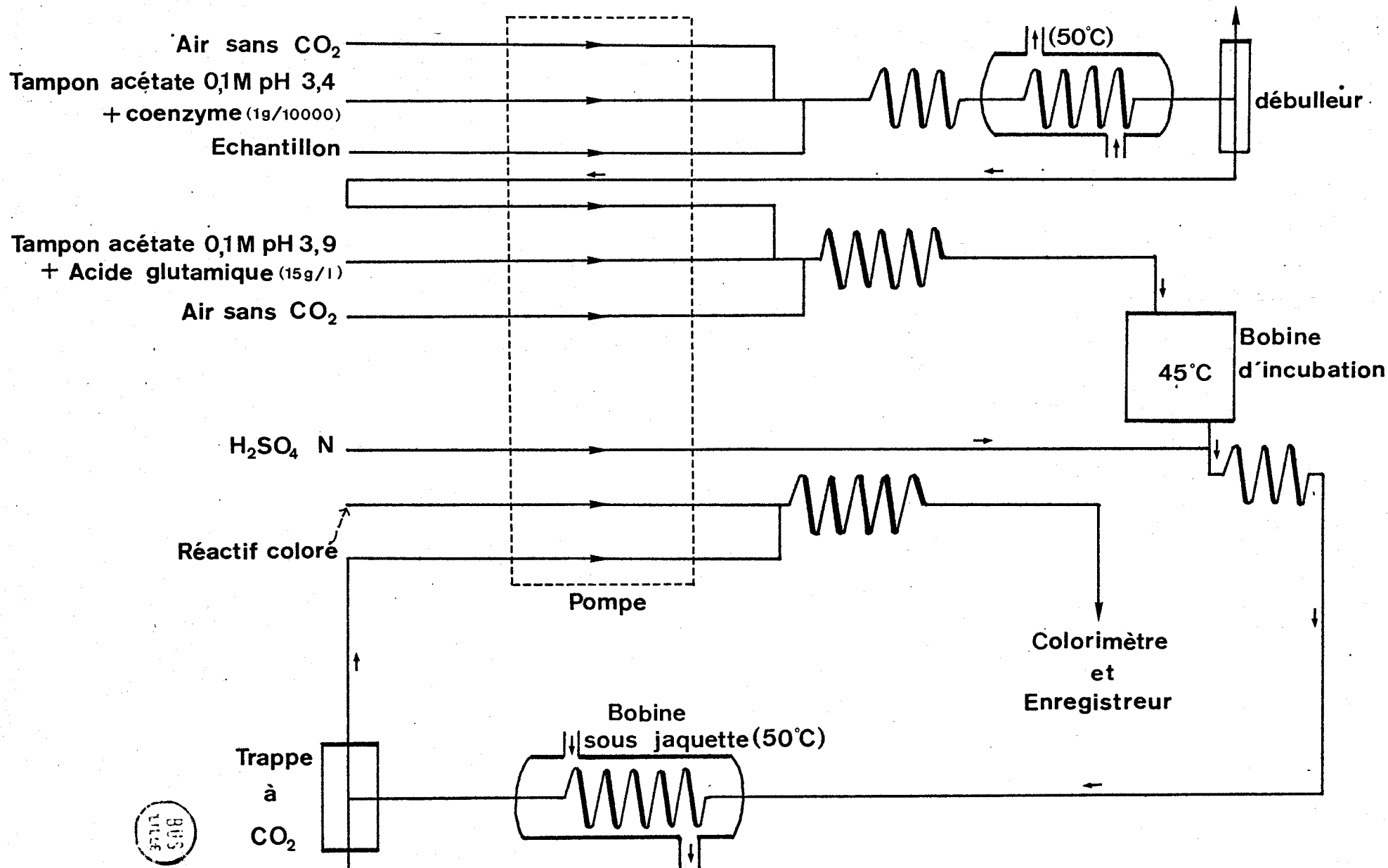


Fig 11 : Mise en évidence de la décarboxylase de l'acide glutamique à partir de suspensions bactériennes proliférantes : schéma comportant le dispositif d'élimination du CO₂ de respiration.

à l'activité de l'enzyme. Dès lors le CO_2 dosé en fin de réaction n'est plus la somme du CO_2 de respiration (préexistant) et du CO_2 de décarboxylation (produit dans la bobine de délai) mais uniquement ce dernier.

Il nous faut préciser aussi que, pour rester proches des conditions habituelles de l'analyse, nous avons mesuré, dans toutes les études réalisées, l'activité enzymatique totale, c'est-à-dire l'activité par ml de suspension et non pas l'activité par mgr de poids sec de bactéries. Pour nous les conditions de culture optimale ne seront donc pas celles permettant une activité enzymatique par mgr de poids sec de bactéries la plus importante mais celles permettant, par la conjonction d'une densité optique importante et d'une bonne synthèse de la décarboxylase, une activité enzymatique totale la plus optimale.

A - Induction de l'enzyme

Nous avons recherché l'inductibilité de la décarboxylase de l'acide glutamique à l'aide d'un bouillon lactosé contenant des concentrations croissantes d'acide glutamique s'échelonnant de 0,015 à 0,75 g par litre. Les mesures d'activité effectuées au cours de la phase de croissance et en fin de croissance n'ont permis d'établir aucune différence significative, que les cultures soient incubées en présence ou en absence d'acide glutamique. L'activité est uniformément égale : elle est de 300 μl de CO_2 par ml de culture.

.../...

B - Influence de la phase de culture

Des expériences préliminaires effectuées sur une culture en bouillon D.T.B. dont une fraction était prélevée horairement en vue d'une étude parallèle de la croissance et du taux de formation de la décarboxylase nous avaient apporté des renseignements sur la formation de la décarboxylase : celle-ci était synthétisée au cours de la phase de croissance atteignant très rapidement une activité optimale.

Pour suivre plus précisément la courbe de formation de la décarboxylase, nous avons dosé en continu l'activité enzymatique au cours de la croissance à l'aide du système auto-analyseur.

Dans ce but, nous avonsensemencé un ballon contenant 1 litre de bouillon D.T.B. par 50 ml d'une suspension d'E. coli pré-incubée à 37°C afin de réduire le temps de latence. Le ballon, soumis à une agitation magnétique, est placé au bain-marie à 37°C et son contenu aspiré et dosé sans interruption pendant six heures selon le schéma de la figure 11. Toutes les heures, des prélèvements sont effectués en vue de la mesure de la densité optique.

La lecture des résultats indique que la décarboxylase n'est pas synthétisée d'emblée dès le début de la croissance mais qu'elle n'est produite qu'au dernier tiers de la phase exponentielle de croissance, son taux augmentant alors très rapidement pour atteindre en quelques heures son maximum (figure 12). La formation de la décarboxylase se stabilise ensuite mais si l'incubation des cultures est poursuivie au delà de 24 h, elle augmente légèrement en raison de la lyse partielle des cultures.

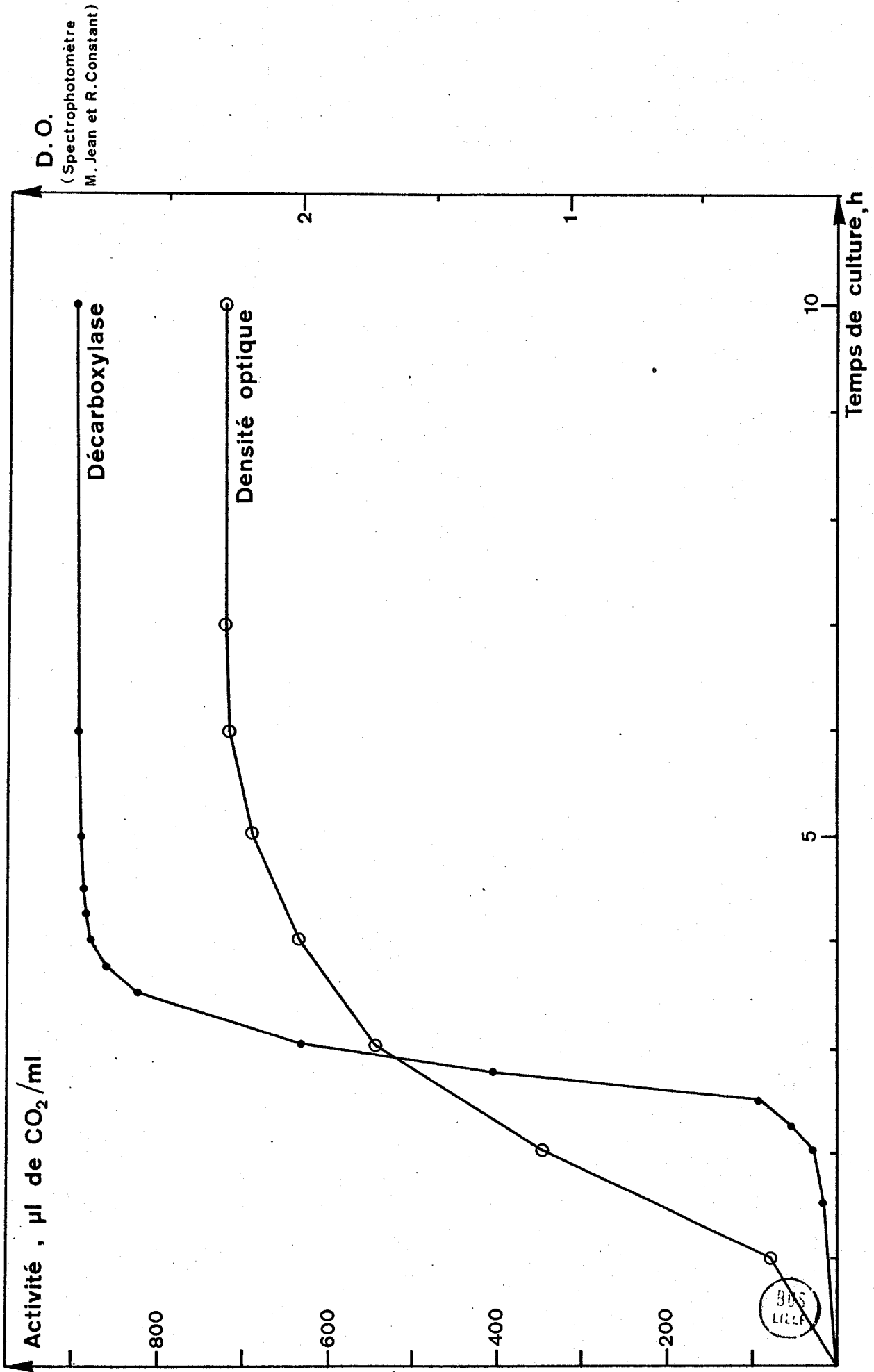


Fig 12 : Production de la décarboxylase de l'acide glutamique par E.coli : effet de la phase de culture.

C - Influence de la température de culture

Le grand rôle joué par la température dans l'évolution et le devenir d'une culture est connu et incontesté : dans la zone des températures dites dysgénésiques, la croissance des germes peut être inhibée complètement et leur survie mise en cause ; à l'intérieur même de la zone des températures eugénésiques, le métabolisme des germes peut se modifier de façon non négligeable d'une température à l'autre, modification qui peut affecter l'utilisation des sources d'énergie, le métabolisme lui-même ou les produits synthétisés par la bactérie. Cette zone est située pour E. coli entre 10°C et 46°C.

La température prend donc présentement une double importance, d'une part par son action possible sur le métabolisme de la décarboxylase de l'acide glutamique et d'autre part pour son influence sur la croissance du germe E. coli. Des cultures réalisées parallèlement à 30°C, 37°C, 40°C, 42°C et 44°C nous ont permis de situer le problème et de lui trouver des solutions.

1) Cultures en bouillon D.T.B.

Les premières expériences ont été réalisées sur des flacons contenant 60 ml de bouillon D.T.B.ensemencés par 5 ml de la dilution 10^{-1} d'une culture d'E. coli. Les flacons sont incubés respectivement aux différentes températures indiquées précédemment sans agitation et toutes les heures une fraction des milieux de culture est dosée en vue de l'étude de la production de la décarboxylase.

.../...

L'étude des courbes obtenues indique une formation optimale de la décarboxylase entre 37°C et 42°C (figure 13). Il est à noter surtout que les températures de 40°C et 42°C permettent, pendant les dix premières heures de la culture une synthèse de l'enzyme plus active qu'à 37°C et que les différences observées dans la formation de la décarboxylase à ces trois températures suivent étroitement les différences entre les densités optiques des cultures : en effet les mesures de D.O. effectuées aussi toutes les heures indiquent que la vitesse de croissance est plus rapide à 40°C et 42°C qu'à 37°C pendant les cinq premières heures de la culture, les écarts se réduisant ensuite. A 30°C, la croissance des germes est au contraire très lente : l'apparition de la décarboxylase est tardive et son activité maximale est lentement atteinte. A 44°C son évolution est très différente ; la croissance encore rapide des E. coli à cette température permet une synthèse appréciable de l'enzyme en début de culture mais le taux maximum est rapidement atteint en raison de la température limite que représente 44°C pour la croissance des E. coli.

2) Cultures simultanées en bouillon D.T.B. et en bouillon lactosé

Nous avons remarqué qu'au cours d'expériences, les cultures réalisées en bouillon lactosé synthétisaient une quantité de décarboxylase moins abondante que les cultures en bouillon D.T.B. Nous avons donc vérifié les différences dans la synthèse de la décarboxylase dans les deux milieux et l'action éventuelle de la température sur ces différences.

.../...

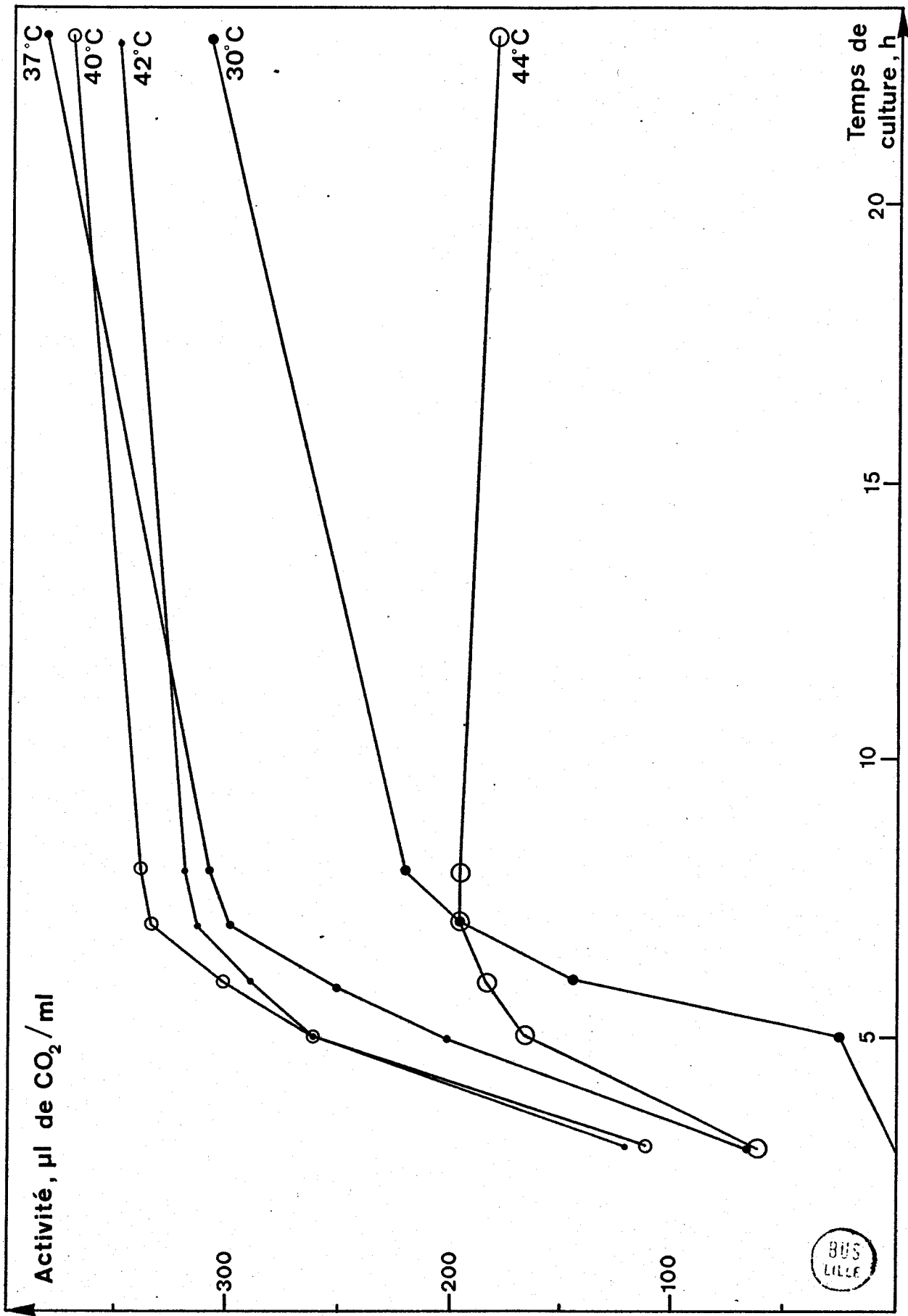


Fig 13 : Production de la décarboxylase de l'acide glutamique par E.coli cultivé à différentes températures: résultats comparatifs en bouillon D.T.B.

Pour cela, nous avonsensemencé cinq flacons contenant 60 ml de D.T.B. et cinq flacons contenant 60 ml de bouillon lactosé par 5 ml de la dilution 10^{-1} d'une suspension d'E. coli. Un flacon de chaque bouillon était ensuite incubé à 30°C, 37°C, 40°C, 42°C et 44°C et toutes les heures, une fraction de chaque culture était prélevée stérilement et dosée en vue de l'étude de la production de la décarboxylase.

Les résultats obtenus mettent en évidence l'action bénéfique du bouillon D.T.B. qui, par sa richesse, permet aux bactéries de supporter plus facilement les températures élevées (figure 14). Ce rôle protecteur du D.T.B. est très net à 42°C, température à laquelle il permet une synthèse presque optimale de la décarboxylase alors qu'en bouillon lactosé, la formation de l'enzyme subit une régression nette par rapport à 37°C et 40°C.

A 44°C, cette différence d'action des deux milieux s'accroît : en bouillon D.T.B., la décarboxylase est synthétisée activement presque aussi rapidement qu'à 37°C mais le palier relativement élevé est vite atteint conformément à l'expérience précédente. Cette action inhibitrice de la température est plus marquée en bouillon lactosé : la quantité de décarboxylase produite est extrêmement faible, difficilement dosable et son niveau maximum extrêmement bas est atteint lentement.

A la lumière des résultats, on constate d'une manière générale qu'à toutes les températures, la décarboxylase de l'acide glutamique apparaît en bouillon lactosé avec une heure de retard sur le bouillon D.T.B. et que ce dernier milieu permet une synthèse plus conséquente de l'enzyme dans tous les cas.

.../...

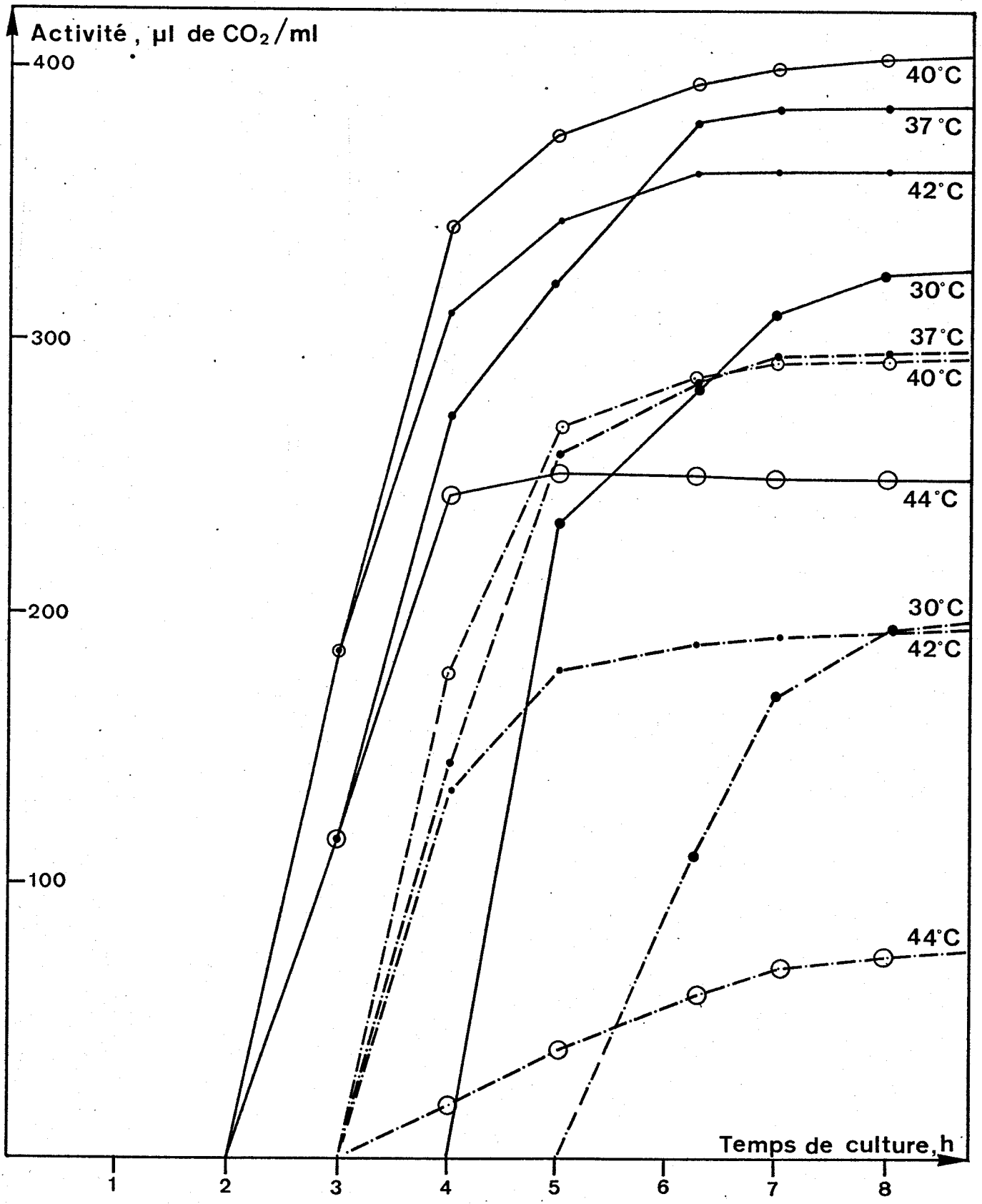


Fig 14 : Production de la décarboxylase de l'acide glutamique par E.coli cultivé à différentes températures : résultats comparatifs en bouillon D.T.B. (—) et en bouillon lactosé au B.C.P. (---).



Le bouillon D.T.B. semble donc particulièrement indiqué lorsqu'on désire détecter ou doser la décarboxylase de l'acide glutamique dans une culture pure. Cette culture peut être réalisée indifféremment à des températures comprises entre 30°C et 42°C mais il est nécessaire de resserrer cette fourchette entre 37°C et 42°C si l'on désire obtenir une synthèse quantitative rapide de l'enzyme. De même, si l'on souhaite obtenir une formation abondante de la décarboxylase, les milieux relativement pauvres comme le bouillon lactosé doivent être proscrits pour les cultures.

Dans le cas de cultures mixtes, ces données restent à vérifier et à préciser : le bouillon D.T.B. peut favoriser plus fortement la croissance des germes autres qu'E. coli. De plus, suivant les espèces présentes dans la culture mixte, la température peut avoir une action plus ou moins prononcée sur le devenir de cette culture : la température doit donc être précisée pour les cultures mixtes.

D - Influence du pH de culture

Les variations de pH du milieu de culture peuvent influencer directement sur le métabolisme des bactéries en modifiant leur activité respiratoire, leur perméabilité ou l'élaboration de leurs enzymes. Or il est très courant de constater lors d'une culture intense d'E. coli un abaissement progressif du pH du milieu de culture, des pH de l'ordre de 5 et même 4,6 pouvant être atteints. Ces pH acides, néfastes à la croissance des bactéries, inhibent peut-être la production de la décarboxylase.

.../...

Pour étudier l'influence du pH sur la synthèse de la décarboxylase de l'acide glutamique, nous avons cherché à stabiliser le pH des milieux de culture par adjonction de tampons phosphate en concentrations variables. Les concentrations en phosphate utilisées étaient respectivement de 0,1 mole/l ; 0,2 mole/l et 0,3 mole/l et pour chaque concentration en tampon trois pH étaient étudiés : 6,1 ; 6,4 et 6,7.

Les flacons contenant chacun 75 ml des différents milieux D.T.B. tamponnés ainsi qu'un flacon témoin non tamponné étaient ensemencés par 5 ml de la dilution 10^{-4} d'une culture récente d'E. coli et incubés en agitation à 40°C.

Dans chaque flacon, la densité optique de la culture était mesurée à 640 m μ deux fois par heure et l'activité décarboxylasique de ces mêmes cultures était dosée horairement à partir de 5 h de culture (nous avons vu précédemment que la décarboxylase n'était pas synthétisée d'emblée par les cultures).

La comparaison des courbes de croissance obtenues dans les différents flacons (figure 15) montre que les milieux tamponnés permettent une phase exponentielle de croissance plus importante ainsi qu'une culture finale nettement plus dense que le milieu non tamponné. On remarque aussi que les milieux tamponnés à pH 6,1 permettent une croissance moins importante que les milieux tamponnés à un pH plus favorable ; ceci est particulièrement vrai pour le milieu tamponné à pH 6,1 par de faibles concentrations en phosphates qui subit lui aussi une nette acidification (pH 5,1 en fin de croissance).

Enfin, plus le milieu est tamponné, plus la phase de latence est importante.

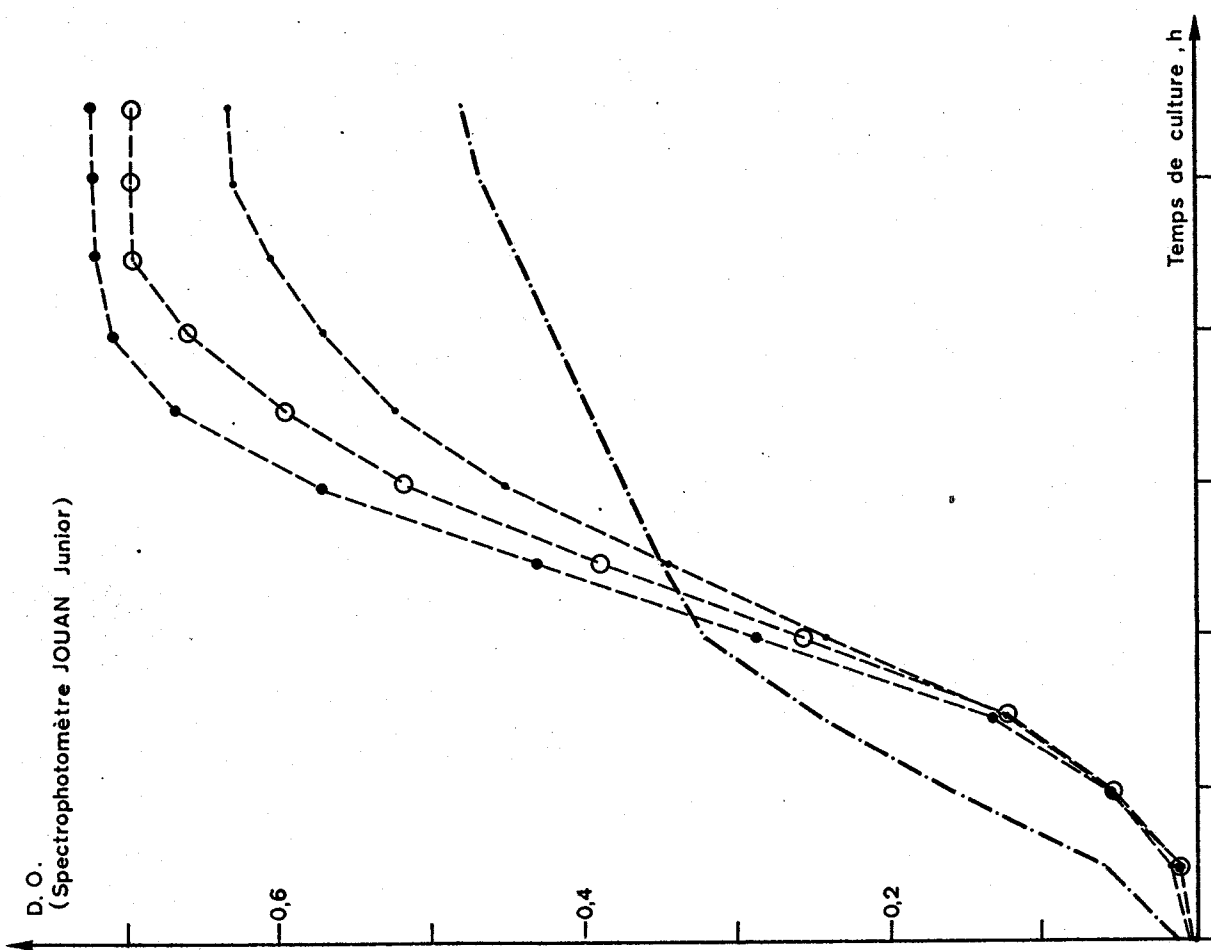
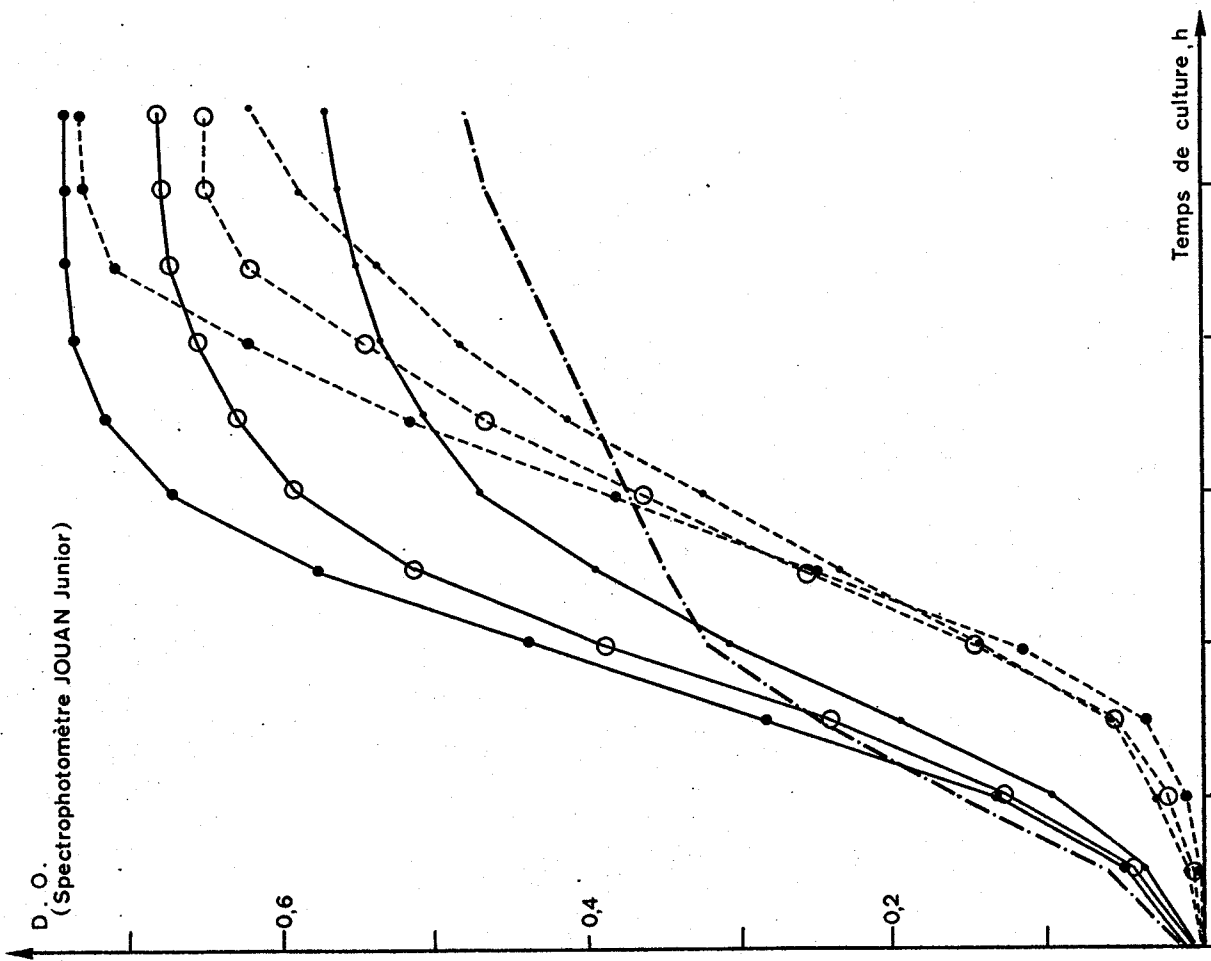


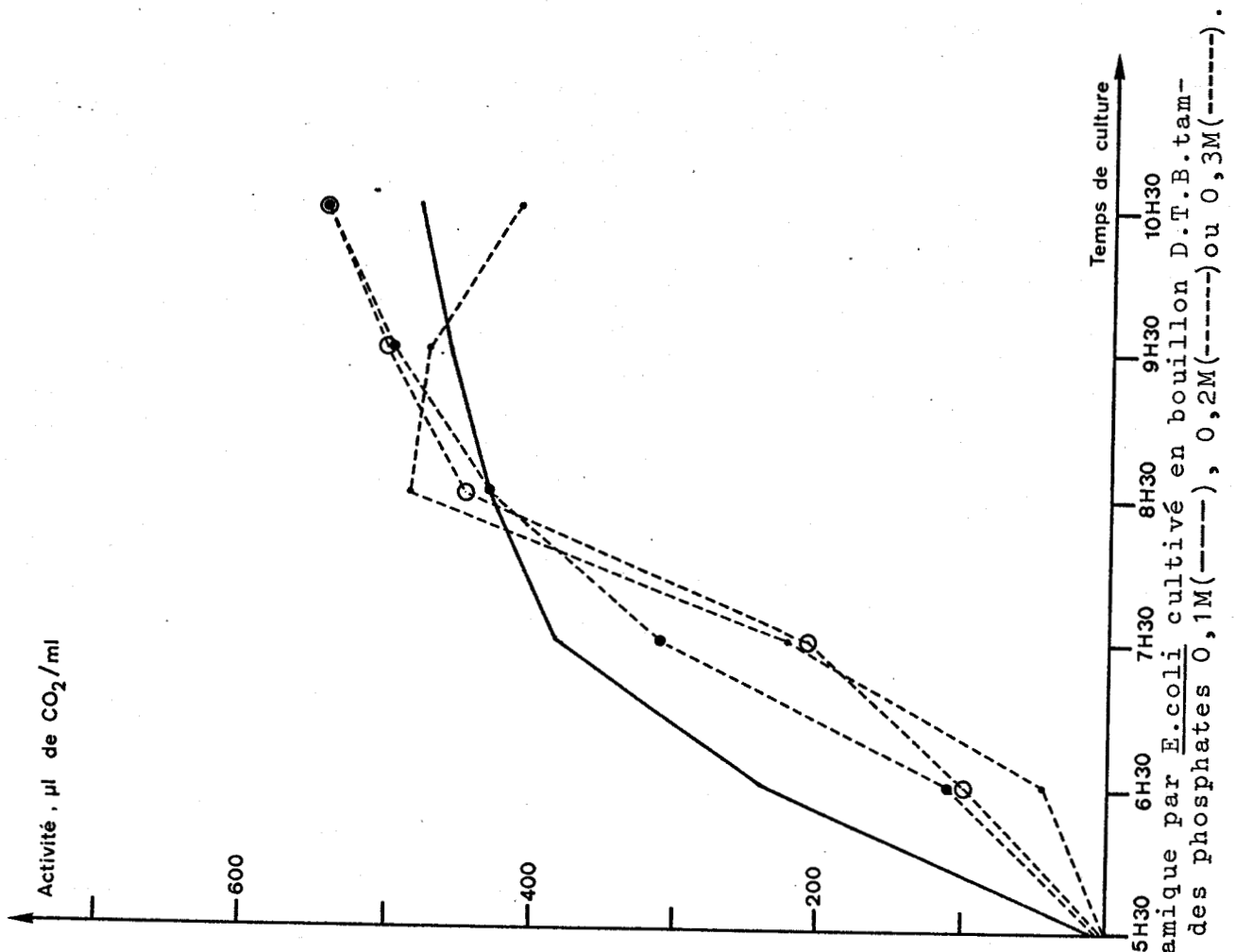
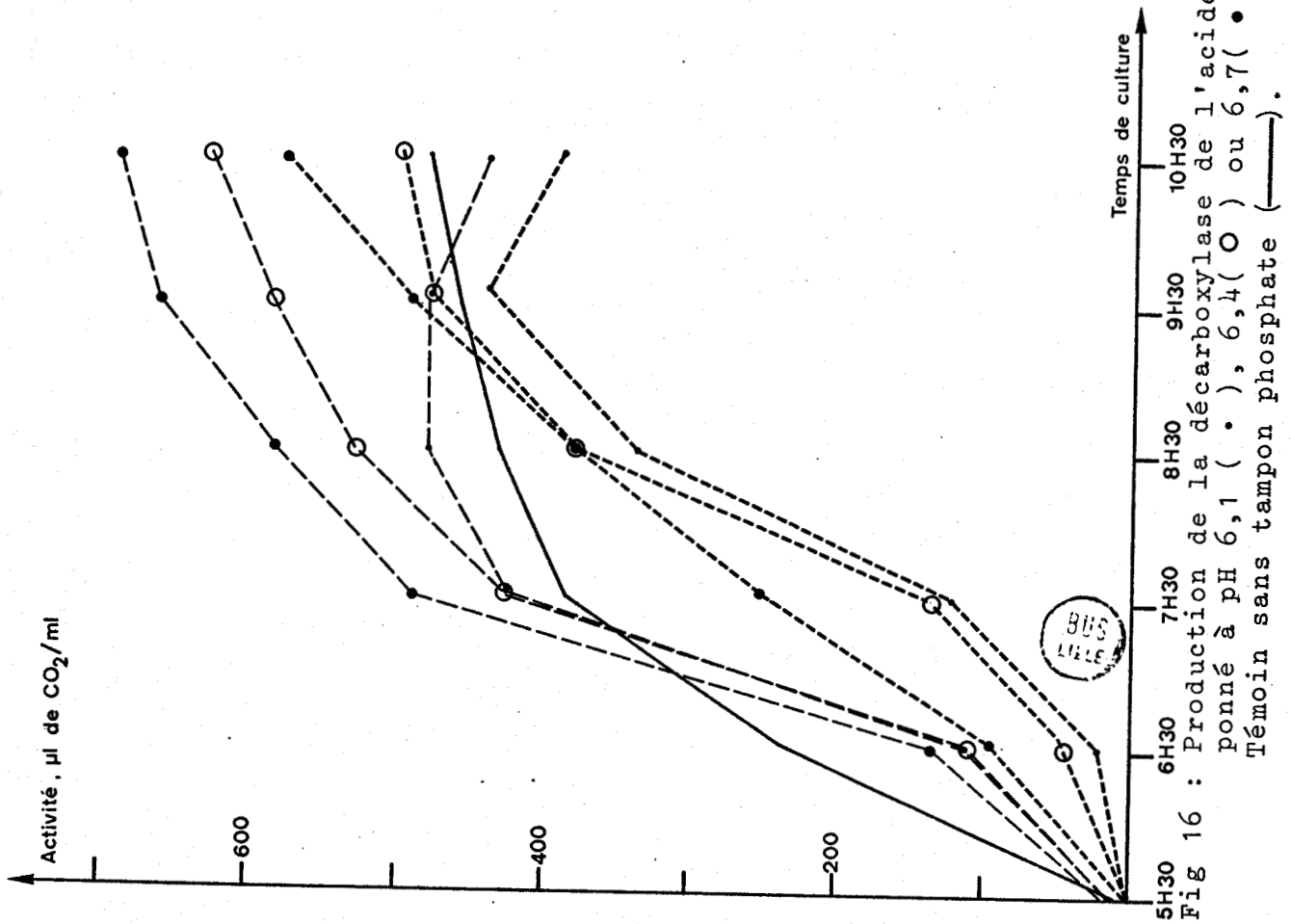
Fig 15 : Croissance d'*E. coli* en bouillon D.T.B. tamponné à pH 6,1 (●); 6,4 (○); 6,7 (●) par des phosphates 0,1M(—), 0,2M(---); 0,3M(-.-.-); Témoin sans tampon phosphate (.....).

BUS
LILLE

Les résultats des dosages de l'activité enzymatique dans les cultures (figure 16) mettent en évidence une formation maximale de la décarboxylase en milieu faiblement tamponné et légèrement acide mais l'acidification franche du milieu est au contraire néfaste à la croissance des germes et par conséquent à la production de la décarboxylase : ceci se concrétise dans les milieux tamponnés à pH 6,1 où l'activité décarboxylasique atteint rapidement un palier à peine plus important que celui du témoin pour diminuer ensuite ; le cas du témoin lui-même est significatif : le milieu possédant au départ un pH favorable permet une synthèse très rapide de l'enzyme mais son acidification progressive inhibe ensuite rapidement la croissance des germes et empêche une synthèse optimale de la décarboxylase.

D'une manière générale, la courbe de synthèse de la décarboxylase de l'acide glutamique dans les flacons suit l'évolution de la croissance des bactéries : aux retards de croissance observés dans les milieux les plus tamponnés, correspondent des retards de synthèse de l'enzyme dans ces mêmes milieux.

Le pH du milieu de culture joue donc un rôle dans l'activité décarboxylasique finale d'une culture plus par une action sur la croissance elle-même des bactéries que par une action sur les processus de synthèse de l'enzyme.



CHAPITRE III

APPLICATION DE LA RECHERCHE DE LA DECARBOXYLASE DE L'ACIDE GLUTAMIQUE : LA COLIMETRIE

Une fois fixées les conditions optimales d'activité et de formation de la décarboxylase de l'acide glutamique, nous avons tenté de définir de nouvelles conditions de culture des échantillons d'eau permettant la recherche et la numération des E. coli à l'aide du test de la décarboxylase de l'acide glutamique, test qui remplacerait alors le test de Mackenzie beaucoup plus long.

A - Culture des échantillons d'eau

Les conditions de culture dans notre méthode, comme celles définies dans les méthodes déjà existantes devaient tout d'abord permettre la recherche des E. coli avec une sensibilité optimale : ceci est essentiellement un problème de régénération des E. coli présents dans l'eau en état de vie ralentie et dont la survie peut avoir été plus ou moins mise en cause par les produits chimiques ou les détergents parfois présents dans l'eau.

Dans le cas présent, les conditions de culture devaient remplir une condition supplémentaire, à savoir favoriser la culture des E. coli tout en inhibant au maximum les autres espèces bactériennes présentes dans l'eau, en particulier les Pseudomonas et les Aeromonas. Nous avons vu en effet qu'il fallait une culture abondante des E. coli pour que l'enzyme soit synthétisée. Dans le cas de cultures non sélectives, il était à craindre que la synthèse de la décarboxylase soit généralement faible ou non détectable.

I - Cultures en milieu D.T.B. à température élevée

Les premiers essais de colimétrie ont été réalisés en bouillon D.T.B. : des tubes de 9 ml de bouillon étaient ensemencés par 1 ml de différentes dilutions d'eau de la Deule ; une incubation à 44°C pendant des temps variant de 1 h à 7 h permettait l'inhibition des coliformes non fécaux et de certains Pseudomonas sans bloquer la croissance des E. coli. Un retour de la température de culture à 37°C permettait en un second temps, par l'action conjointe de la richesse du milieu et de sa bonne oxygénation, d'obtenir une culture finale abondante. Les échantillons étaient ensuite analysés selon le protocole décrit précédemment (figure 11) et les résultats comparés à ceux de la méthode classique qui utilise le bouillon lactosé comme test présomptif et le test de MACKENZIE, TAYLOR et GILBERT (culture avec gaz en vert brillant et production d'indole dans l'eau peptonée à 44°C) comme test confirmatif.

Les résultats obtenus étaient difficilement reproductibles en raison d'antagonismes bactériens incontrôlables qui subsistaient malgré la sélection à 44°C entraînant une formation faible ou non détectable de la décarboxylase (tableau III) : de nombreuses espèces bactériennes étaient en effet isolées à partir des cultures. Ces mêmes antagonismes expliqueraient les différences de résultats observées avec les échantillons d'eau brute, différences entre la technique automatique et la technique classique. Il est normal en effet que ces antagonismes soient plus nets avec les eaux brutes qu'avec les eaux plus propres (dilutions).

Toutes les expériences réalisées dans ces conditions ont révélé ce même paradoxe.

Dilutions	Conditions de culture		7 h		6 h		5 h		4 h		3 h		2 h		1 h		0 h		Témoins LB 48 h à 30°
	44°C	37°C	agitation	17 h	agitation	17 h	agitation	17 h	agitation	17 h	agitation	17 h	agitation	17 h	agitation	17 h	agitation	17 h	
Echantillon	Mackenzie		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	. Décarboxylase		±	+++	+	+	-	±	+++	+	-	±	±	+	-	+	+++	+	+
10 ⁻¹	Mackenzie		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	. Décarboxylase		+++	+++	+	+	+++	+	+++	+++	+	+	+++	+	+++	+	+++	+	+
10 ⁻²	Mackenzie		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	. Décarboxylase		+++	+++	+	+	+++	+	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	Mackenzie		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	. Décarboxylase		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau III : Essais de colimétrie en tubes de bouillon D.T.B. : résultats comparatifs

Pour chaque échantillon l'importance de la décarboxylase se traduit comme suit :

- ± résultat douteux
- +++ résultat fortement positif
- ++++ résultat très fortement positif



II - Cultures en bouillon sélectif

Nous avons donc poursuivi nos essais de colimétrie en utilisant un autre milieu plus sélectif, ce milieu permettant dès les premiers essais une bonne reproductibilité des résultats. Nous avons comparé par une série d'expériences la sensibilité et la sélectivité de ce milieu à celles du bouillon lactosé au B.C.P. (bromocrésol pourpre). Nous avons en même temps vérifié la concordance entre la production de la décarboxylase par une culture dans ce milieu et la positivité du test de Mackenzie réalisé à partir de cette même culture.

a) Matériel et méthodes

1) Milieus de culture

- Le bouillon lactosé au B.C.P. est celui couramment utilisé pour l'analyse bactériologique des eaux ;

- bouillon sélectif : il est utilisé pour le test de la décarboxylase de l'acide glutamique.

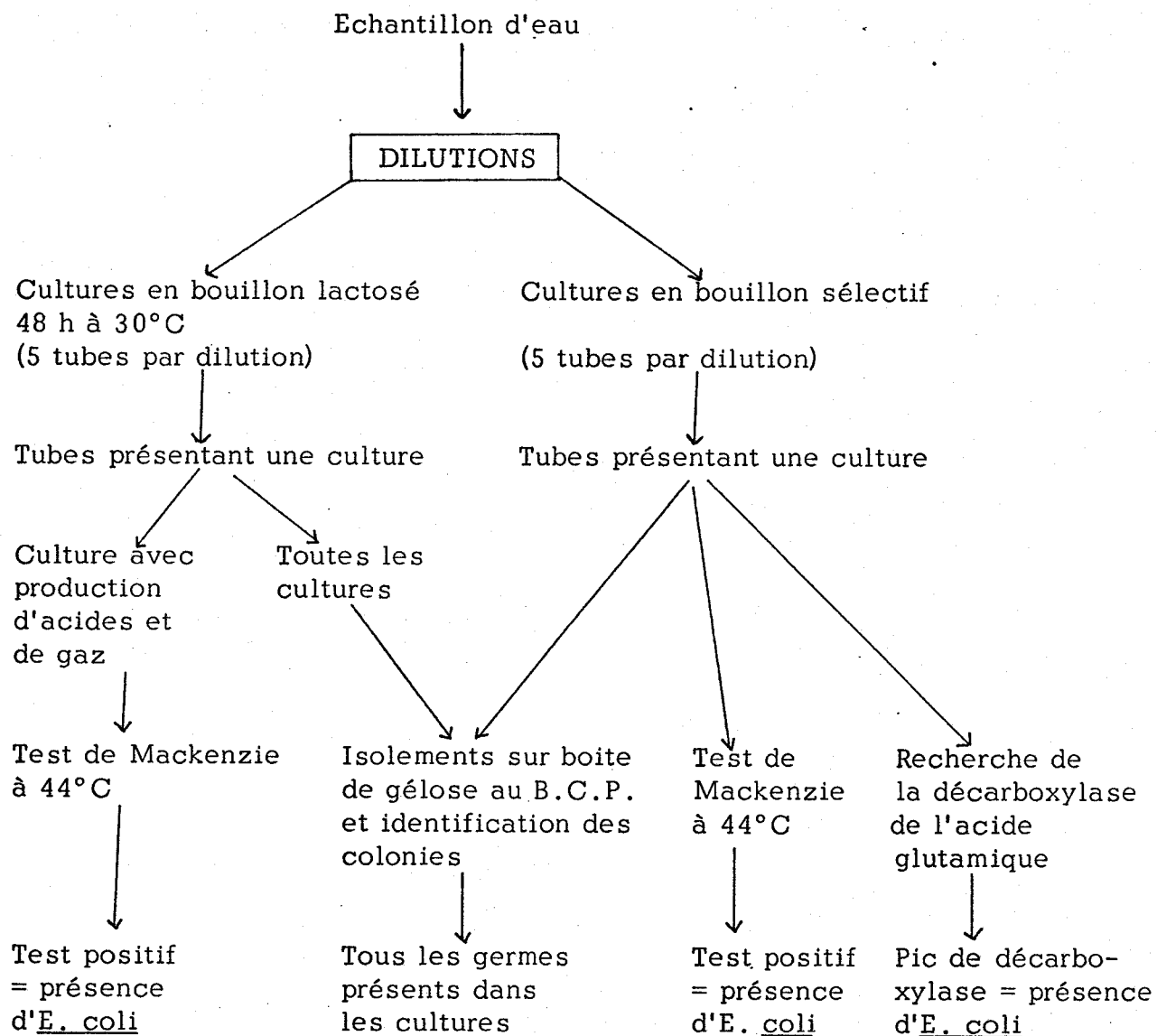
2) Dosage de la décarboxylase

Il a été réalisé à l'aide de l'auto-analyseur technicon (figure 11).

3) Méthodes

Pour cette étude, nous avons procédé selon le schéma suivant :

.../...



Comme nous le voyons, nous avons deux possibilités de recherche des E. coli à partir des cultures en bouillon sélectif :

- le test de Mackenzie couramment utilisé en colimétrie manuelle ;



- le dosage de la décarboxylase de l'acide glutamique produite par E. coli.

Ce second moyen de détection des E. coli n'était pas concevable dans les cultures réalisées en bouillon lactosé au B.C.P. en raison du taux de production de la décarboxylase très faible dans ce milieu du à la trop faible sélectivité du milieu permettant la croissance compétitive de tous les germes de l'eau.

b) Résultats

Ils portent sur quinze prélèvements échelonnés sur 4 mois.

- 1) Estimation du nombre d'E. coli par le calcul du MPN (nombre le plus probable)

La comparaison des résultats obtenus (tableau IV) montre que le bouillon sélectif permet pour les 2/3 des prélèvements une recherche plus sensible des E. coli dans l'eau quel que soit le test identificatif (Décarboxylase ou test de Mackenzie) utilisé pour ce milieu.

Le second avantage de ce milieu réside dans la rapidité des cultures qu'il permet : en effet 15 à 17 h suffisent pour ce milieu alors que le bouillon lactosé au B.C.P. nécessite 48 h d'incubation. De plus, les tests de Mackenzie réalisés à partir des cultures en bouillon sélectif peuvent être généralement révélés en 24 h au lieu des 48 h normalement nécessaires, ceci en raison du grand nombre d'E. coli présents en fin de culture. Les résultats sont obtenus encore plus rapidement si l'on choisit comme test identificatif la décarboxylase de l'acide glutamique : en effet 1 h suffit pour effectuer cette recherche dans une série de dilutions.

		NOMBRE D' <u>E. COLI</u> /100 ML	
MILIEU DE CULTURE	BOUILLON SELECTIF		BOUILLON LACTOSE AU BCP
Test identifica tif utilisé N° du prélèvement	Décarboxylase	Test de Mackenzie	Test de Mackenzie
D 1	-	221000	79000
D 2	-	240000	49000
D 3	175000	278000	2 400000
D 4	70000	70000	49000
D 5	23000	23000	79000
D 6	33000	79000	27000
D 7	33000	23000	33000
D 8	13000	23000	11000
D 9	130000	33000	31000
D 10	33000	79000	130000
D 11	13000	8000	13000
D 12	130000	130000	79000
D 13	49000	79000	34000
D 14	221000	221000	130000
D 15	79000	49000	33000

Tableau IV : Résultats comparatifs de colimétrie
en bouillon sélectif et en bouillon
lactosé au BCP



D'autre part, la concordance entre la présence de la décarboxylase de l'acide glutamique dans une culture et le test de Mackenzie positif qu'elle donne s'est vérifié dans 90 % des cultures, les exceptions provenant généralement de souches d'E. coli anormales. En effet, certaines souches rencontrées :

- ne cultivent pas à 44°C
- ne produisent pas de gaz à 44°C
- ne produisent pas d'indole

Les autres exceptions provenaient de cultures où des espèces bactériennes étaient entrées en compétitions avec les E. coli avec comme résultat une synthèse négligeable de la décarboxylase.

2) Etude comparative de la sélectivité des milieux de culture

Les résultats (figure 17) des identifications des germes présents sur les isolements réalisés à partir des cultures en bouillon sélectif ou en bouillon lactosé au B.C.P. montrent que 67 % des isolements révèlent la présence d'E. coli dans le premier milieu. Ce pourcentage de présence n'est que de 20 % dans le second milieu. En outre la prédominance d'E. coli dans ces isolements est 20 fois plus fréquente en bouillon sélectif qu'en bouillon lactosé au B.C.P.

Ces résultats tendent à démontrer la bonne sélection des germes qu'opère le premier milieu. Cette sélection est amplement démontrée si on compare les pourcentages de présence, dans les isolements, des germes autres qu'E. coli. En effet, on constate

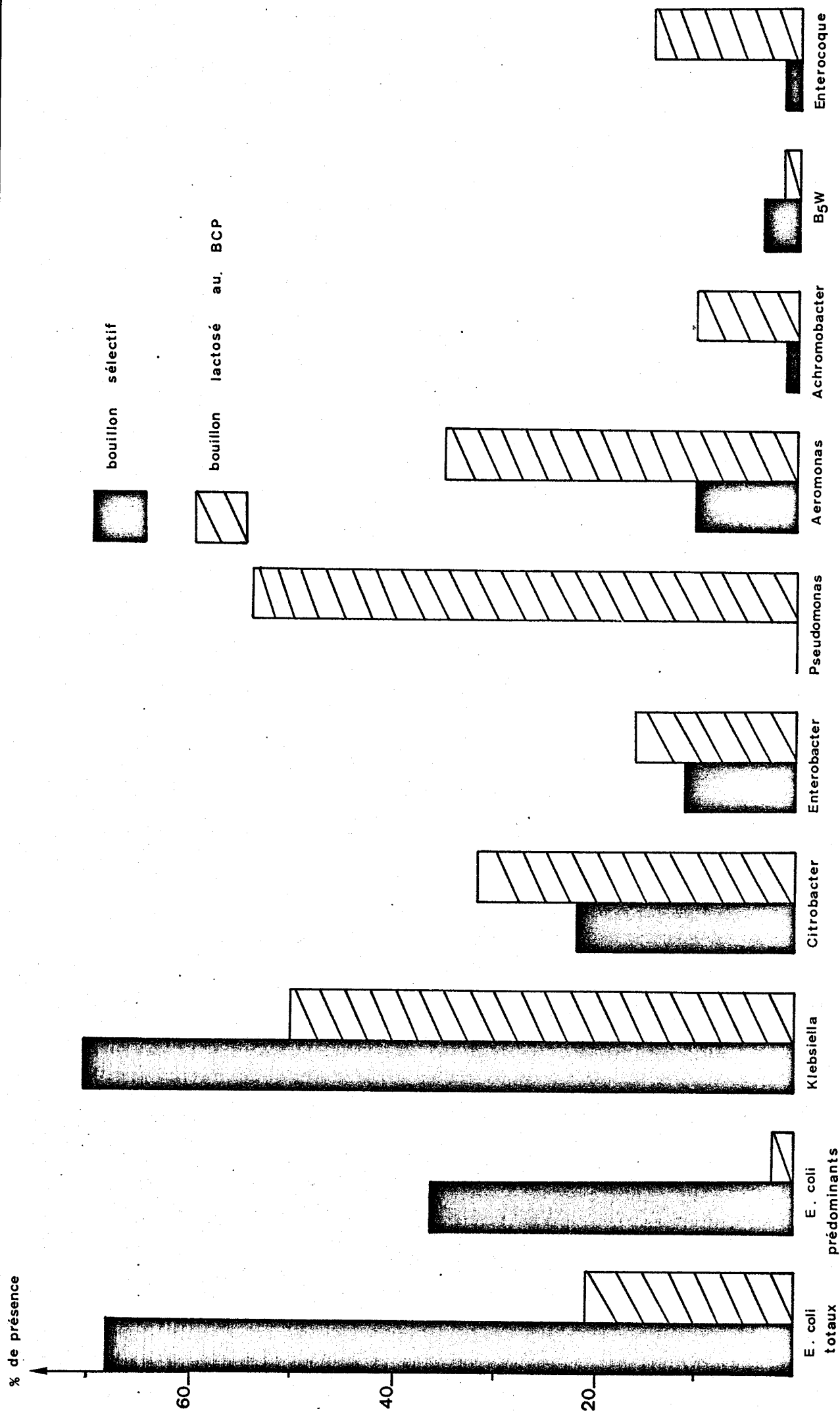


Fig 17 : Etude comparative de la sélectivité de deux milieux de culture pour coliformes : pourcentage de présence des différentes espèces bactériennes rencontrées dans les isollements réalisés à partir de cultures d'eau de rivière.



que pour toutes les espèces rencontrées, exception faite pour B 5 W et Klebsiella, ces pourcentages de présence dans les isolements réalisés à partir du bouillon sélectif sont nettement inférieurs aux pourcentages de présence dans les isolements réalisés à partir du bouillon lactosé au B.C.P. Ceci est particulièrement vrai pour les Pseudomonas jamais rencontrés dans notre milieu alors qu'ils sont fréquemment prédominants dans les isolements réalisés à partir des cultures en bouillon lactosé au B.C.P.

Cette sélection a pour conséquence directe des cultures très riches en E. coli dans le bouillon sélectif : en effet si l'on ne tient compte que des isolements réalisés à partir des tubes ayant donné un test de Mackenzie positif, E. coli est identifié dans 90 % de ces isolements pour le bouillon sélectif. Ce pourcentage ne dépasse pas 41 % dans le milieu lactosé au B.C.P.

Nous pouvons donc conclure que les conditions de culture des échantillons d'eau utilisés pour notre méthode permettent une recherche sensible et rapide des E. coli par la sélection qu'elles opèrent sur la population bactérienne des eaux.

La rapidité de la méthode rendait possible la réalisation de l'appareil d'analyse bactériologique automatique en complétant le système initial de dosage de l'enzyme d'un dispositif permettant la culture des échantillons d'eau. Ce dernier est composé de bobines doubles de bain-marie permettant des temps d'incubation variables.

B - Appareillage de culture automatique discontinue

I - Description

Dans ce dispositif représenté sur la figure 18, l'échantillon d'eau ou la dilution d'une culture d'E. coli mélangé au milieu

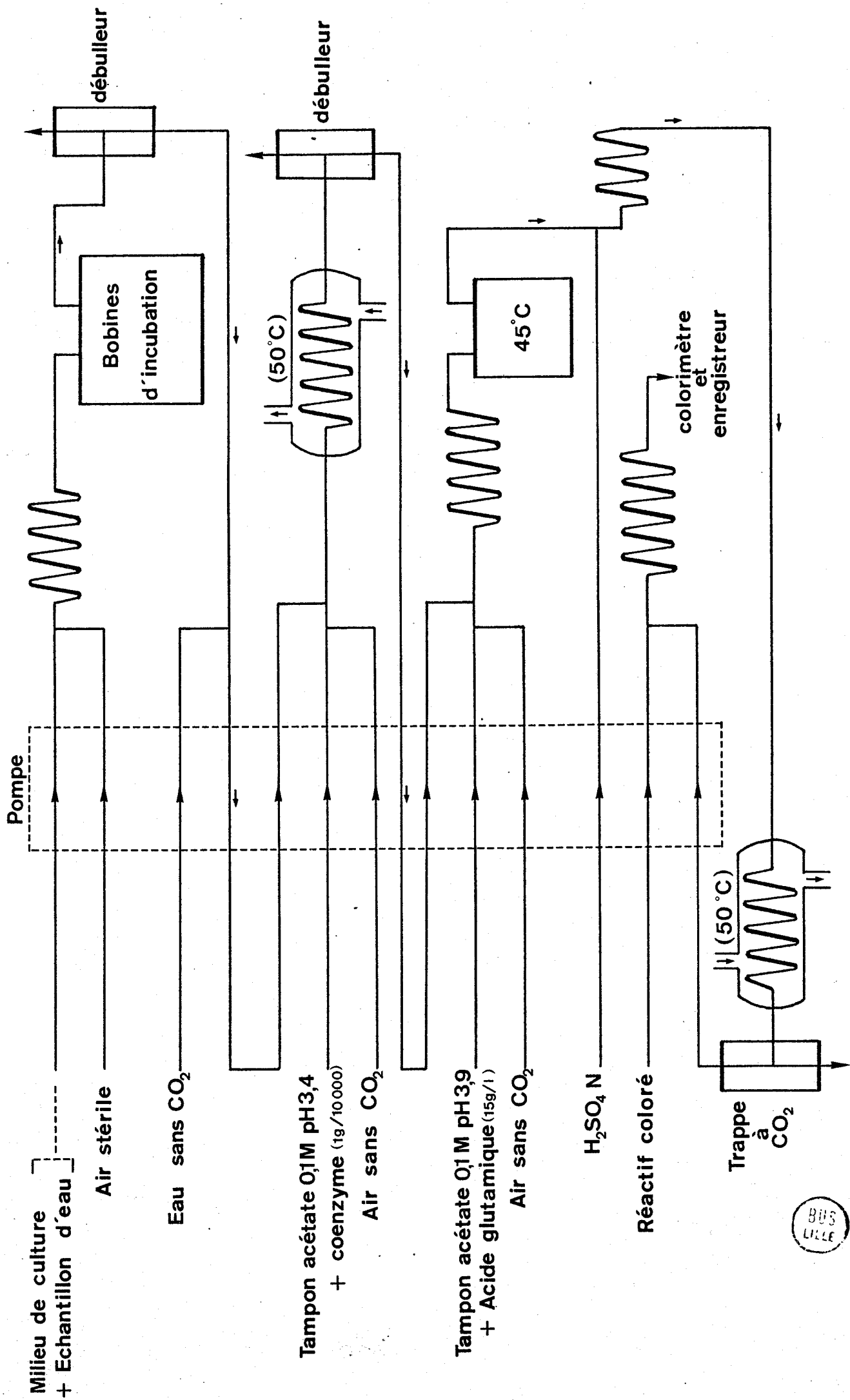


Fig 18 : Appareillage de recherche en discontinu des E.coli dans l'eau : schéma du montage.



de culture parcourt les bobines d'incubation en verre placées dans un bain-marie réglé à la température de culture désirée. Les cultures obtenues traversent ensuite un débulleur qui élimine l'air semgentant le flux liquide ainsi que les gaz de fermentation très abondants. Le flux liquide après avoir été dilué de moitié est ensuite dosé selon la méthode décrite précédemment.

II - Facteurs conditionnant la fiabilité du dispositif

a) Décontamination du circuit

C'est avec des suspensions très diluées d'E. coli que nous avons réalisé nos premiers essais de culture dans ce système. D'emblée, nous nous sommes heurtés au principal problème inhérent au type d'échantillon utilisé et à l'appareillage même, à savoir celui du rinçage. En effet le problème de séparation des échantillons commun à tous les dosages chimiques réalisés au "technicon" et conditionnant la vitesse d'échantillonnage est devenu ici plus précisément un problème de décontamination rendu complexe pour deux raisons principales :

- tout d'abord la longueur inaccoutumée du circuit et le temps de passage des échantillons dans ce circuit sont sans commune mesure avec ceux des circuits chimiques et favorisent des contaminations progressives plus importantes.

- ensuite le circuit envisagé ici est un circuit vivant qui peut donc être en perpétuelle évolution : dans les circuits chimiques, une molécule ou un atome, passant d'un échantillon à l'autre, reste tel quel dans l'échantillon contaminé ; au contraire, dans notre circuit bactériologique, si un E. coli passe d'un échantillon au suivant, il s'y multiplie rapidement en l'absence d'une solution de décontamination appropriée.

Ceci explique facilement le fait que dans les premières expériences, des échantillons stériles au départ se contaminaient toujours lorsqu'ils étaient séparés par de l'eau stérile. Il était même courant de constater une production de décarboxylase plus abondante dans l'échantillon stérile (au départ) que dans la suspension diluée d'E. coli prélevée antérieurement. L'adjonction de Tween 20 à l'eau distillée utilisée pour le rinçage n'apportant aucune amélioration sensible, nous avons utilisé, dans les essais suivants, comme solution de décontamination des solutions de formol de concentration variant de 0,2 à 2 %. Nous n'avons alors observé ni culture, ni synthèse de décarboxylase en raison de la diffusion du formol dans tous les échantillons au cours du passage des bobines d'incubation.

Nous nous sommes adressés ensuite à des tampons afin d'inhiber les bactéries par passage en milieu acide. Nous avons donc testé l'efficacité à décontaminer de cinq tampons acides à l'aide de notre dispositif. Dans le tableau V regroupant les enregistrements obtenus, nous voyons que la décontamination est beaucoup plus dépendante de la nature du tampon utilisé que de leur acidité. En effet, le tampon KCl - HCl beaucoup plus acide que les autres (pH 1,9 au lieu de 2,5) est cependant un décontaminant médiocre aussi peu actif dans le cas présent que l'eau distillée avec comme conséquence une culture abondante dans les échantillons stériles au départ. Les tampons glyocolle - HCl et citrate-phosphate, bien que tous deux tamponnés à pH 2,5 ont des activités différentes : le premier est sans action tandis que le deuxième permet une décontamination partielle. Celle-ci est totale avec le tampon acétate.

Nous voyons donc que le simple passage en milieu acide est insuffisamment inhibiteur vis-à-vis des bactéries utilisées et que comme l'a écrit STANIER (30), "les effets toxiques que l'on peut observer aux pH défavorables ne sont pas le résultat

DECARBOXYLASE APRES 10 H DE CULTURE *					
Solution de rinçage utilisée	Tampon KCl-HCl	Tampon glycocolle-HCl	Tampon citrate-phosphate	Tampon acetate	Eau distillée stérile
Dilutions	0,1 M pH 1,9	0,1 M pH 2,5	0,1 M pH 2,5	0,1 M pH 3,1	
10 ⁻⁵	++++	++++	++++	++++	++++
échantillon stérile	++++	++++	++	0	++++
10 ⁻⁵	++++	++++	++++	++++	++++
10 ⁻⁵	++++	++++	++++	++++	++++
échantillon stérile	++++	++++	++	0	++++

Tableau V : Influence de plusieurs tampons acides sur la décontamination des circuits de culture : résultats

* l'importance de la décarboxylase se traduit comme suit :

++++ échantillon très fortement positif

++ échantillon positif



direct de fortes concentrations en ions hydrogènes (ou hydroxyles)". En effet la membrane bactérienne est peu perméable aux ions hydrogènes ou hydroxyles. Par contre elle est beaucoup plus perméable aux molécules non dissociées de substances acides ou basiques qui peuvent pénétrer rapidement dans la cellule et l'altérer en modifiant son pH interne ou en réagissant avec certains métabolites essentiels de la cellule.

Nous avons précisé l'action de ces tampons par des cultures comparées en flacons après des temps de contact bactéries-tampons variables. Les tampons suivants ont été utilisés aux concentrations indiquées :

Tampon 1 : tampon KCl-HCl 0,2 M pH 1,9

Tampon 2 : tampon Glycocolle-HCl 0,1 M pH 2,4

Tampon 3 : tampon Citrate-PO₄H₂ 0,1 M pH 2,5

Tampon 4 : tampon acétate 0,1 M pH 3,3

Pour cette étude, 1 ml d'une culture récente d'E. coli est additionné à 9 ml des différents tampons 1, 2, 3, 4. Après 1 minute et 1 h de contact, 1 ml des différentes suspensions est prélevé et mis en culture en agitation à 37°C dans 50 ml de bouillon sélectif. Le témoin est obtenu par l'incubation de 1 ml de la dilution au dixième de la même culture d'E. coli dans 50 ml de bouillon sélectif. La croissance est suivie en Densité optique à 640 m μ (Spectrophotomètre Jouan Junior).

Nous constatons qu'une minute de séjour dans le tampon KCl-HCl n'amène aucun retard de croissance (figure 19). Ce retard est négligeable pour les autres tampons. Même 1 h de séjour dans les différents tampons ne provoque que des retards de croissance peu importants pour la plupart des tampons. Ce retard est plus considérable avec le tampon acétate puisqu'il

D.O. (Spectrophotomètre JOUAN Junior)

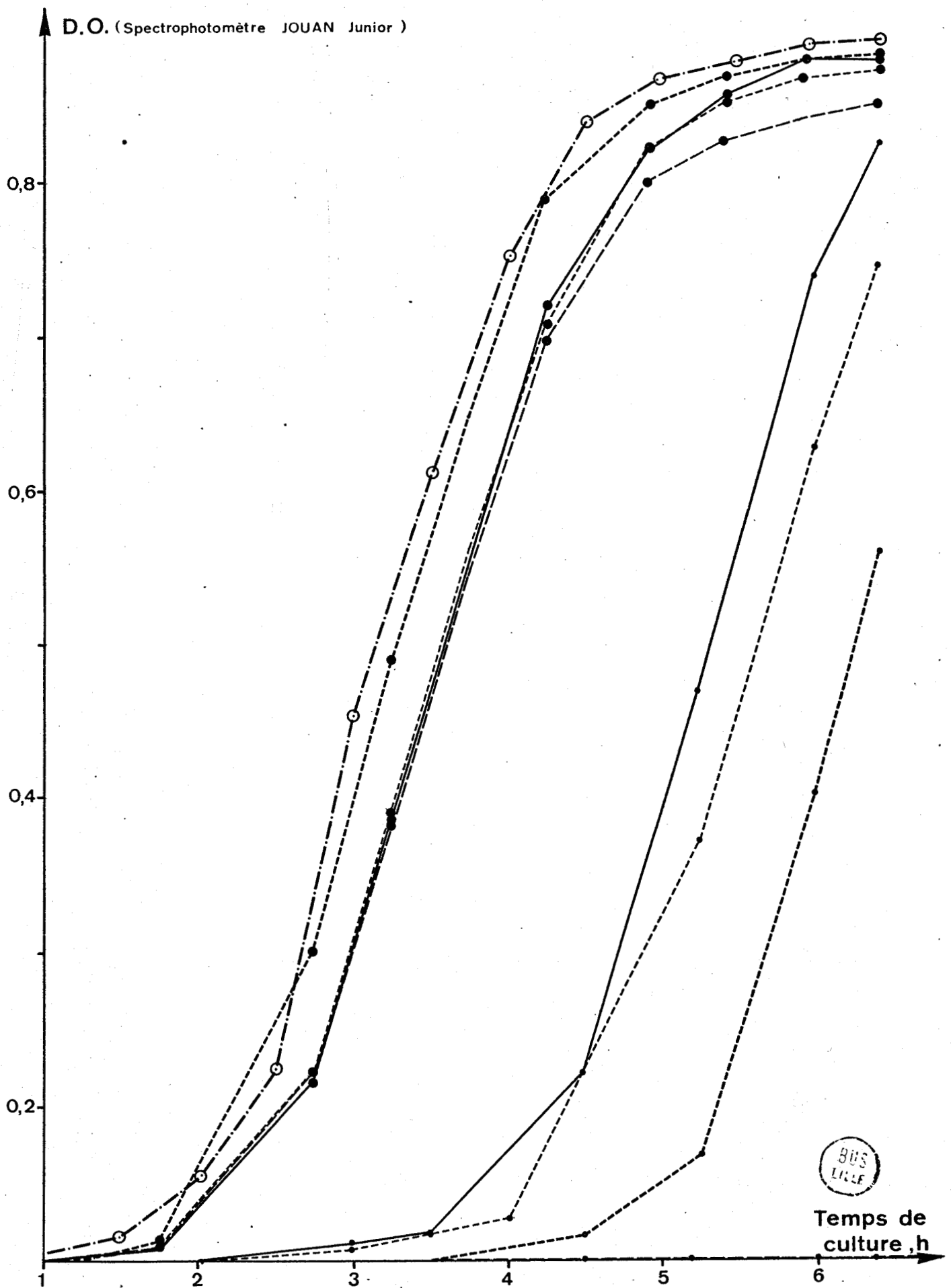


Fig 19 : Croissance d'*E.coli* en bouillon sélectif après une minute (●) ou une heure (•) de séjour dans les tampons KCl-HCl (-----), Glycocolle-HCl (———), Citrate-Phosphate (-----) et acétate (-----); Témoin (---○---).

dépasse 8 h. Ces tampons ne pouvaient donc pas être utilisés efficacement dans notre circuit pour une décontamination optimale puisque le temps de décontamination n'y dépasse pas une minute, temps nettement insuffisant pour que ces tampons puissent efficacement décontaminer.

Il nous fallait donc rechercher une solution capable de provoquer un retard de croissance important des bactéries mises une minute à son contact ou mieux possédant un pouvoir bactéricide en 1 minute de contact. Cette solution devait en outre n'avoir aucune action bactériostatique lorsqu'elle diffuserait partiellement dans les cultures au cours du passage des bobines d'incubation.

L'étude d'une solution décontaminante particulière a révélé qu'elle remplissait ces deux principales conditions :

1. - Etude du pouvoir bactéricide de la solution décontaminante

* A pH 3, cette solution possède un pouvoir bactéricide sur E. coli en 1 minute ; bien que l'inoculum soit important (10^9 bactéries) l'expérience montre qu'aucune bactérie n'est viable après une minute de séjour dans la solution décontaminante choisie : en effet aucune culture n'est constatée après incubation prolongée de 1 ml du mélange solution décontaminante - bactéries dans 50 ml de milieu de culture (la dilution au cinquantième arrête immédiatement l'action létale de la solution).

* Influence du pH sur l'activité bactéricide

Le pouvoir bactéricide de cette solution est étroitement dépendant du pH comme le montre l'expérience suivante :

Des solutions décontaminantes de même concentration ayant été préparées à des pH différents (solution I à pH 3 ; solution II à pH 4 ; solution III à pH 5), 1 ml d'une culture récente d'E. coli est mélangé à 9 ml de chacune des solutions I, II et III ainsi qu'à 9 ml d'eau distillée (témoin). Après une minute de contact, 1 ml des différents mélanges est prélevé et incubé dans 50 ml de milieu de culture. La représentation graphique (figure 20) de l'évolution de la densité optique dans les différents flacons montre que le devenir des cultures diffère largement suivant les conditions subies : une minute de contact avec la solution à pH 5 n'amène aucun retard de croissance tandis qu'une minute de contact avec la solution à pH 3 empêche toute croissance ultérieure des bactéries comme précédemment. Une minute de contact avec la solution à pH 4 provoque un retard de croissance de deux heures du à une phase de latence plus longue, la vitesse de croissance étant ensuite aussi rapide que chez le témoin. Si une numération des E. coli est réalisée avant et après une minute de séjour dans cette solution décontaminante à pH 4, on constate que 68 % des bactéries sont tuées au cours de ce temps de contact. Cette perte ne suffit pas à expliquer le retard de croissance observé : les bactéries survivantes doivent donc être partiellement inhibées.

+ Spectre d'action

Il était nécessaire, pour que la solution décontaminante choisie puisse être utilisable en toute quiétude dans notre dispositif, de vérifier son action bactéricide sur les souches bactériennes autres qu'E. coli. En effet, pour que cette solution s'avère un décontaminant valable, elle doit non seulement assurer la décontamination des circuits vis-à-vis des E. coli mais aussi vis-à-vis des différentes espèces bactériennes couramment présentes dans les eaux.

.../...

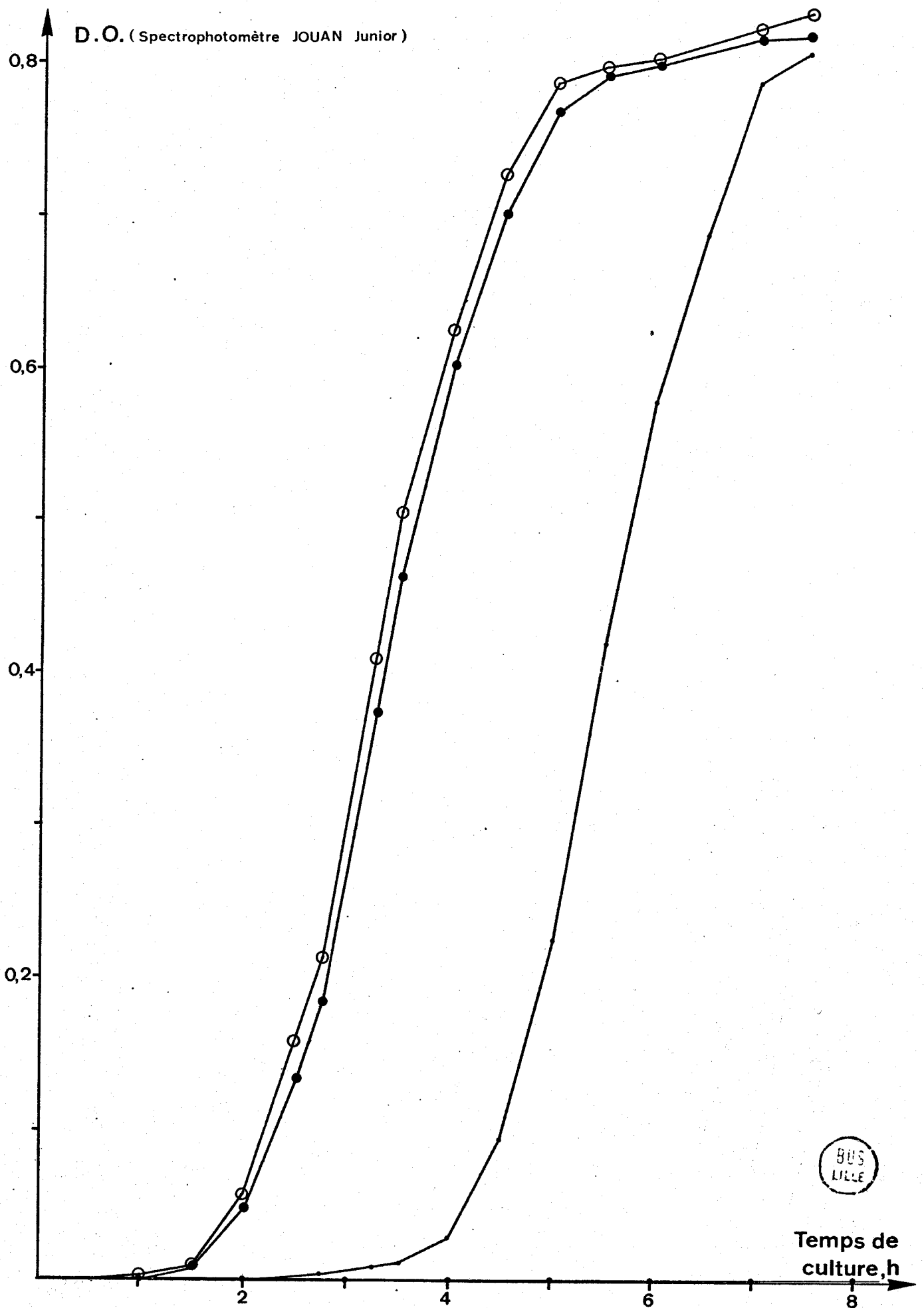


Fig 20 : Croissance d'*E.coli* en bouillon sélectif après une minute de séjour dans la solution décontaminante à pH 3 (—●—), pH 4 (—●—), pH 5 (—●—); Témoin (—○—).

Pour cette étude, nous avons procédé comme précédemment en mélangeant 1 ml d'une culture récente de l'espèce bactérienne testée à 9 ml de la solution décontaminante. Après 1 minute de contact, 1 ml des différents mélanges était prélevé et incubé dans 50 ml de milieu de culture. Les témoins sont toujours obtenus par incubation de 1 ml de la dilution au dixième de ces mêmes cultures dans 50 ml de milieu.

Dans le tableau VI groupant les résultats obtenus, nous constatons que, pour toutes les espèces bactériennes testées, une minute de séjour dans la solution décontaminante à pH 3 suffit à inhiber totalement leur culture. Ces résultats positifs étaient nécessaires car la solution choisie devait inhiber totalement toutes les espèces bactériennes présentes dans les eaux et capables de se développer dans notre système automatique. Sinon, il était fort pensable que l'espèce non inhibée, une fois introduite dans le système, pouvait entraver totalement la croissance des E. coli par la contamination progressive de tous les échantillons.

2. Influence de la concentration en solution décontaminante du milieu de culture sur la croissance d'E. coli

Toutes les expériences précédentes, concernaient la première propriété que devait posséder la solution de décontamination, à savoir un pouvoir bactéricide très rapide. La seconde propriété toute aussi importante que devait posséder cette même solution et que nous avons déjà énoncée était l'absence d'action bactéricide lors d'une diffusion partielle de cette solution dans le milieu de culture, condition que le formol précédemment utilisé ne remplissait pas.

.../...

Conditions opératoires avant la mise en culture espèce étudiée	CULTURE APRES 24 H D'INCUBATION A 37°C	
	Témoin	1 minute dans la solution décontaminante
<u>E. coli</u>	+	-
<u>Klebsiella</u>	+	-
<u>Citrobacter</u>	+	-
<u>Enterobacter</u>	+	-
<u>Aeromonas</u>	+	-
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	+	-
<u>Staphylococcus</u>	+	-
<u>Streptococcus</u>	+	-
<u>Bacillus</u> *	+	-

Tableau VI : Mise en évidence de l'action bactéricide de la solution décontaminante sur différentes espèces bactériennes

* La solution décontaminante n'est pas active sur les spores de Bacillus



Pour vérifier ce deuxième point, des cultures simultanées d'E. coli ont été réalisées dans des flacons contenant 80 ml de milieu de culture et possédant des concentrations croissantes en solution décontaminante :

Flacon I : témoin sans solution décontaminante

Flacon II : concentration finale en solution décontaminante
= $\frac{1}{9}$ de la concentration bactéricide de la solution décontaminante

Flacon III : concentration finale en solution décontaminante
= $\frac{2}{9}$ de la concentration bactéricide de la solution décontaminante

Flacon IIII : concentration finale en solution décontaminante
= $\frac{3}{9}$ de la concentration bactéricide de la solution décontaminante

Flacon V : concentration finale en solution décontaminante
= $\frac{4}{9}$ de la concentration bactéricide de la solution décontaminante

Si l'on compare l'évolution des cultures dans les différents flacons (figure 21), nous voyons que la croissance d'E. coli dans les flacons 2, 3 et 4 est peu ou pas retardée par les différentes concentrations de solution décontaminante qu'ils contiennent. Dans le flacon 5, où la concentration en solution décontaminante est cependant proche de la moitié de la concentration bactéricide

.../...

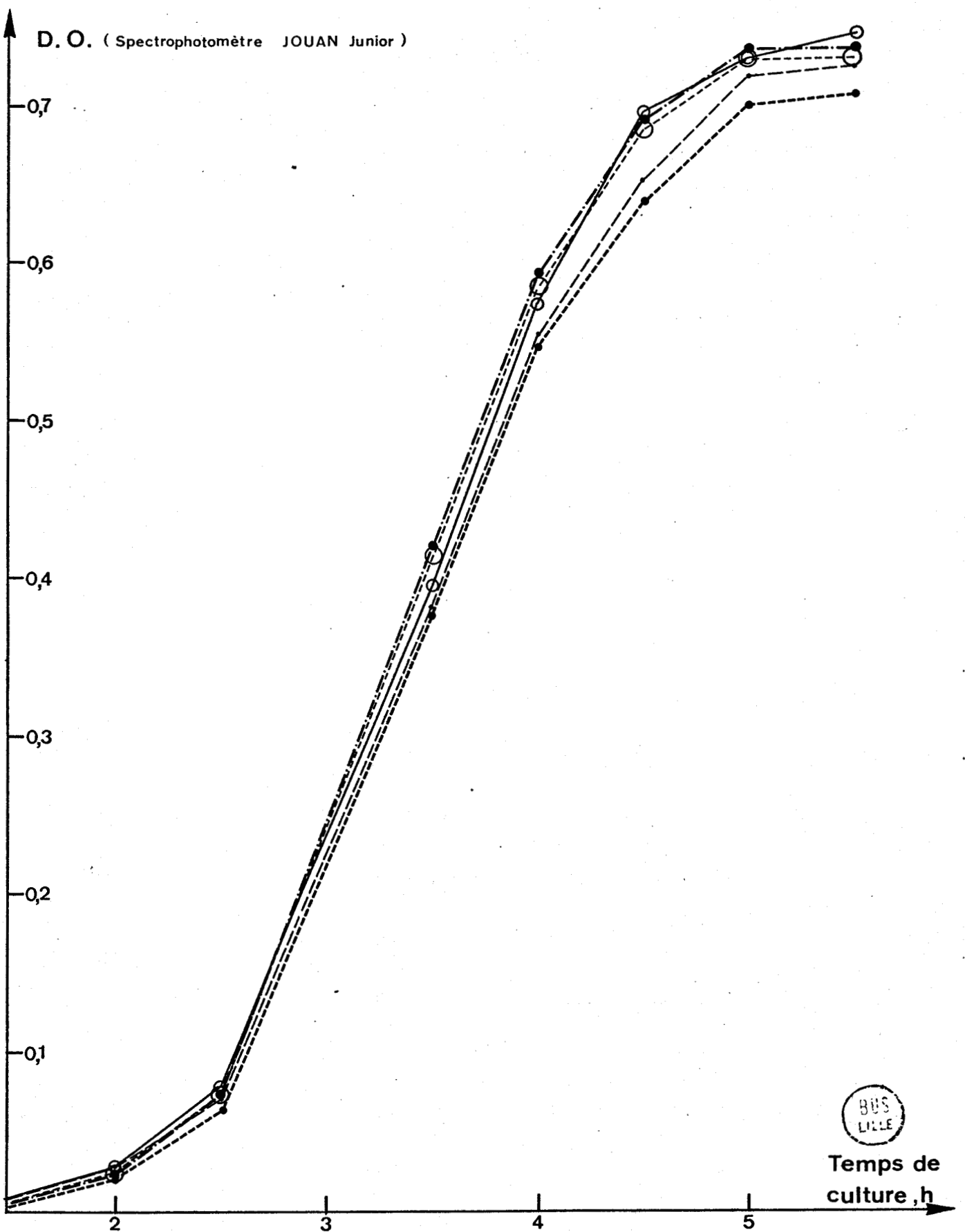


Fig 21 : Croissance d'E.coli en bouillon sélectif en présence de concentrations croissantes en solution décontaminante. Les concentrations finales en solution décontaminante des milieux de culture sont respectivement égales à 1/9 (●), 2/9 (⊖), 3/9 (→), 4/9 (---) de la concentration bactéricide de la solution décontaminante; Témoin. ○

utilisée précédemment, la croissance est aussi rapide que dans le flacon témoin ; on remarque uniquement une densité optique légèrement inférieure lorsque la phase stationnaire est atteinte ; ceci est une conséquence de l'acidification partielle du milieu de culture favorisant l'action bactériostatique de la solution de décontamination.

Il est douteux que la diffusion de la solution de décontamination dans le milieu de culture lors de cultures en bobines permette une telle concentration en cette solution du milieu de culture si ce n'est dans la faible partie du flux liquide correspondant à la transition rinçage-prélèvement.

Ces résultats s'avèrent donc très encourageants pour notre dispositif de culture où nous ne pouvons empêcher la diffusion partielle de la solution décontaminante. Nous voyons que cette diffusion sera sans conséquence importante pour les cultures présentes et que la sensibilité de la méthode de culture ne sera pas affectée par l'utilisation de cette solution de décontamination.

Nous pouvons donc utiliser en toute quiétude cette solution pour décontaminer les circuits entre les échantillons : les premiers essais de culture d'E. coli réalisés en bobines d'incubation en employant cette solution de rinçage ont révélé une bonne décontamination du dispositif, confirmant les résultats précédents. Nous pouvons dès lors étudier l'influence de la composition du bullage sur l'évolution des cultures.

b) Composition du bullage

Dans cette expérience, les échantillons, composés d'une dilution d'une culture d'E. coli (10^{-5}) et du milieu de culture,

étaient bullés par de l'air contenant des concentrations croissantes en oxygène. Après 9 heures d'incubation, la décarboxylase produite par les cultures était dosée par l'auto-analyseur. Les résultats obtenus montrent que de fortes concentrations en oxygène inhibaient les cultures (tableau VII) mais il devront être vérifiés : en effet, dans les différentes expériences réalisées pour cette étude, le bullage devenait toujours irrégulier au cours du passage des bobines lorsque les bulles comportaient de fortes concentrations en oxygène. Les résultats étaient donc partiellement faussés par cette mauvaise qualité du bullage.

III - Essais de colimétrie sur une eau polluée

Les cultures d'échantillons d'eau comportant toujours une phase de latence assez importante, il était tout d'abord nécessaire, pour rechercher les E. coli dans une eau donnée, d'ajouter au circuit d'incubation des bobines supplémentaires afin d'obtenir un temps de culture final de quatorze heures.

Les premiers essais de recherche des E. coli ont été effectués sur une eau de rivière fortement polluée avec une cadence de prélèvement de 20 échantillons/heure. Ils ont révélé immédiatement des résultats non fiables en raison d'une contamination encore fréquente et importante d'un échantillon par le précédent et d'une perte de sensibilité marquée. Aucune amélioration n'a pu être apportée aux résultats au cours des expériences suivantes par des modifications du circuit d'incubation.

.../...

Composition du bullage (%)		DECARBOXYLASE APRES 9 H DE CULTURE*					
		0	20	40	60	80	100
Echantillons	O ₂	100	80	60	40	20	0
	Air						
1		++	++	+	+	+	±
2		++	++	+	+	+	±
3		++	++	+	+	+	±

Tableau VII : Influence de la composition du bullage sur la synthèse de la décarboxylase de l'acide glutamique par des cultures en bobines d'E. coli

- * ++ : résultat positif
- + : résultat faiblement positif
- ± : résultat très faiblement positif



Ceci a motivé la nouvelle cadence d'échantillonnage (10 échantillons/heure) utilisée dans les expériences suivantes permettant le doublement du temps de décontamination.

Les essais de colimétrie réalisés à cette cadence ont démontré que la décontamination devenait effective. Cependant une perte de sensibilité de notre méthode vis-à-vis de la technique manuelle classique était à nouveau constatée (tableau VIII).

Cette perte de sensibilité pouvait être imputée à la fréquente irrégularité du bullage d'air dans le circuit de culture. En effet, le bullage, très régulier à l'entrée du circuit, devenait de plus en plus anarchique (rassemblements ou fragmentations de bulles) au fur et à mesure du parcours des différentes bobines d'incubation. Cette irrégularité pouvait avoir un double impact sur la sensibilité :

- en empêchant la culture homogène des échantillons



- en favorisant les mélanges milieu de culture-solution de décontamination avec comme conséquence l'inhibition partielle des cultures.

Cette irrégularité était en fait provoquée par les fortes pressions régnant dans les bobines d'incubation par suite de la dilatation des liquides et des gaz portés dans le système à une température supérieure à la température ambiante et de la production abondante de gaz par les cultures.

Ces fortes pressions ont pu être minimisées en abaissant les galets de la tête de pompe sur les tubes de pompe seulement après mise à température du bain-marie contenant les bobines d'incubation et en utilisant des petites bobines de refroidissement avant chaque pompage du flux.

Technique Utilisée ° de expérience	NOMBRE D'E. COLI/100 ML	
	AUTOMATIQUE	MANUELLE
1	17.200	54.200
2	33.000	41.000
3	23.000	17.000
4	49.000	130.000
5	17.000	79.000

Tableau VIII: Comparaison des dénombrements obtenus sur une eau de rivière par la méthode automatique et par la méthode manuelle classique.



Ces précautions toujours employées depuis permettent un bullage parfaitement régulier au cours du passage complet des bobines d'incubation. Les facteurs permettant une sensibilité optimale du système pouvaient dès lors être étudiés d'une façon plus sûre.

Ces études ont concerné principalement la composition du milieu de culture et la température d'incubation des échantillons. Elles ont permis une nette amélioration de la sensibilité du système favorisée par une meilleure adaptation des circuits à la culture des échantillons.

Ceci est démontré dans la dernière série d'expériences réalisées pour vérifier la sensibilité du système discontinu avant de passer au système automatique d'analyse bactériologique en continu de l'eau (tableau IX).

C - Recherche en continu des E. coli dans une eau de rivière

I - Influence de la concentration du milieu sélectif lors de l'autoclavage sur la sensibilité de la méthode

En raison du débit limité du flux liquide dans le circuit de culture, il était nécessaire d'employer un milieu 3, 6 fois concentré pour les expériences réalisées en continu afin de pouvoir analyser une quantité maximale d'eau par jour.

.../...

Technique Utilisée ° de expérience	NOMBRE D' <u>E. COLI</u> /100 ml	
	AUTOMATIQUE	MANUELLE
35	4.900	3.300
36	13.000	2.700
37	3.300	3.300
38	7.900	24.000
39	24.000	54.200
40	130.000	79.000
41	130.000	130.000
42	172.000	130.000

Tableau IX : Comparaison des dénombrements des E. coli effectués à l'aide du système automatique et de la méthode manuelle classique.



Avant d'entreprendre avec notre dispositif des essais de numération en continu des E. coli dans une eau de rivière, nous avons voulu vérifier l'influence de la concentration du milieu sélectif à l'autoclavage sur la sensibilité de la méthode automatique. Nous avons en effet déjà remarqué que le mode d'autoclavage pouvait avoir un impact sur la sensibilité de notre méthode.

Pour mener cette étude rapidement, nous n'avons pas utilisé le dispositif complet mais nous avons réalisé des cultures en tubes et dosé la décarboxylase de l'acide glutamique synthétisée dans les cultures par le dispositif simplifié.

Dans chaque expérience, deux milieux sélectifs étaient testés :

- l'un à concentration normale lors de l'autoclavage (1ère série)
- l'autre 3, 6 fois concentré lors de l'autoclavage puis dilué ensuite (2ème série)

5 tubes de chaque série étaient ensemencés par dilution et incubés 17 h au bain-marie. La présence d'E. coli était alors recherchée dans les cultures conjointement par le test de Mackenzie et par le dosage de la décarboxylase de l'acide glutamique.

Les résultats obtenus étaient comparés à ceux de la technique manuelle classique (tableau X).

.../...

NOMBRE D' <u>E. COLI</u> /100 ML*					
Milieu Utilisé	Milieu Sélectif				Bouillon lactosé au BCP
	1ère série		2ème série		
Test N° utilisé de l'expérience	Décarboxylase	Mackenzie	Décarboxylase	Mackenzie	Mackenzie
1	70.000	70.000	70.000	79.000	49.000
2	49.000	79.000	130.000	130.000	109.000
3	49.000	49.000	49.000	49.000	49.000
4	23.000	23.000	49.000	31.000	79.000
5	33.000	79.000	109.000	70.000	63.000
6	79.000	79.000	79.000	79.000	49.000
7	79.000	49.000	130.000	79.000	109.000
8	79.000	79.000	49.000	49.000	46.000
9			542.000	542.000	348.000
10	46.000	46.000	130.000	130.000	172.000
11	130.000	130.000	94.000	94.000	79.000
12	221.000	109.000	109.000	109.000	240.000
13	348.000	348.000	542.000	542.000	1.300.000
14	33.000	33.000	79.000	79.000	130.000
15	542.000	542.000	542.000	542.000	348.000
16	79.000	130.000	130.000	130.000	49.000

Tableau X : Influence de la concentration du milieu sélectif lors de l'autoclavage sur la sensibilité du test à la décarboxylase

* résultats obtenus par le calcul du M.P.N. (nombre le plus probable)



Les résultats fournis par le milieu sélectif sont pour le moins équivalents à ceux fournis par le bouillon lactosé au B.C.P. quelque soit le mode d'autoclavage du premier milieu.

Il semble cependant que le milieu sélectif concentré à l'autoclavage permet généralement une recherche plus sensible des E. coli. Une confirmation de cette constatation par une nouvelle série d'expériences sera nécessaire : les résultats pourront alors être interprétés d'une manière statistique avec plus de précision. Mais il semble déjà certain que l'emploi d'un milieu concentré à l'autoclavage n'amène aucune perte notable de sensibilité.

II - Dispositif automatique de recherche des E. coli en continu dans l'eau

a) Matériel et méthode

Les essais de recherche en continu des E. coli dans l'eau nécessitent l'utilisation de vannes électro-magnétiques à trois voies pour passer du prélèvement au rinçage et vice-versa. En effet, ces vannes dont l'ouverture et la fermeture sont commandées par le distributeur d'échantillons, permettent l'introduction dans le circuit d'un nombre illimité d'échantillons contrairement au distributeur d'échantillons simple utilisé précédemment où le nombre de ces échantillons était réduit à 40.

Le premier montage de ces vannes que nous avons employé est schématisé dans la figure 22. Dans ce montage, l'échantillon d'eau, mélangé au milieu de culture traverse la vanne I et arrive dans le circuit d'incubation par l'intermédiaire d'un T de faible section (Pt. 11) tandis que la vanne II envoie la solution de

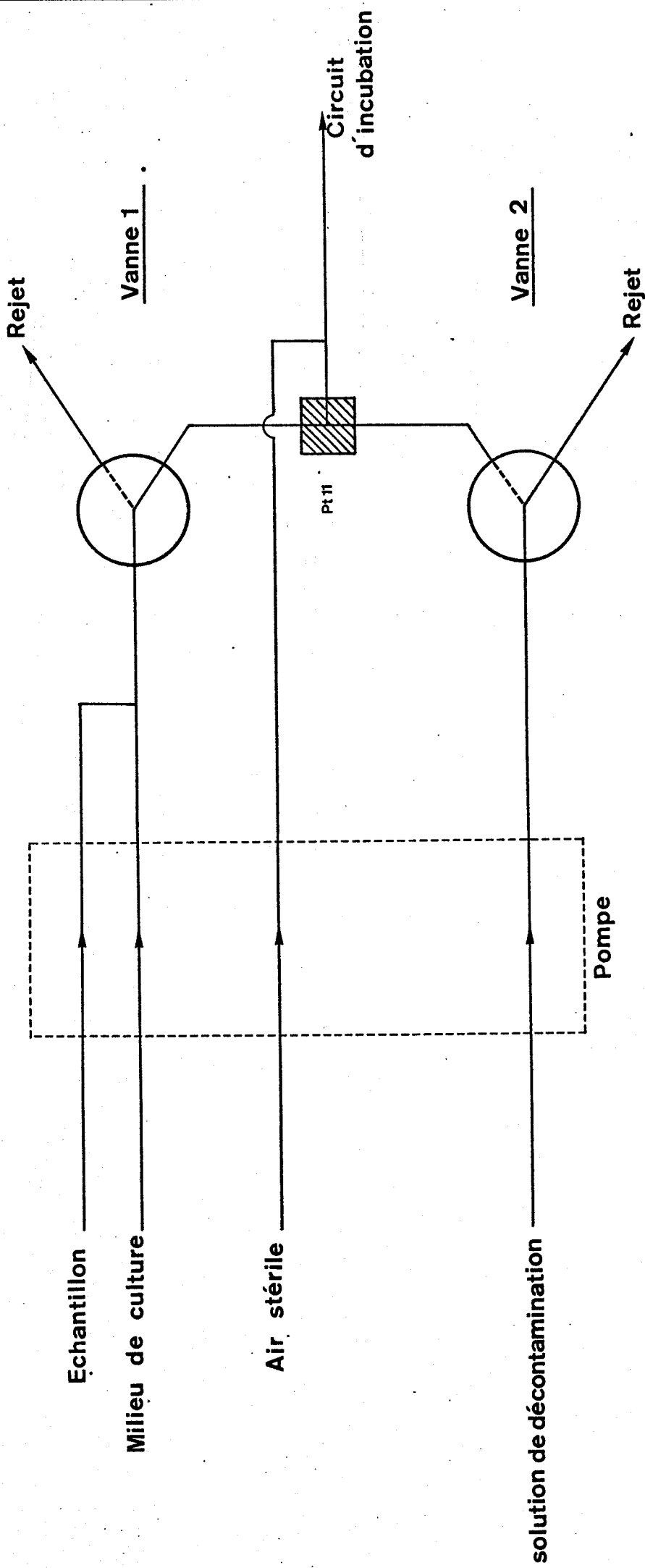


Fig 22 : Schéma du premier montage des vannes électro-magnétiques.

voie ouverte pendant le prélèvement (—)

vannes I et II

voie ouverte pendant le rinçage (-----)



décontamination en rejet. Au cours de la période de rinçage, l'opération inverse se produit : l'échantillon est rejeté tandis que la solution décontaminante est envoyée dans le circuit. Le flux liquide est immédiatement bullé à la sortie du T afin d'éviter des mélanges solution de décontamination - échantillon trop importants.

Dans le dispositif, la dilution du milieu de culture 3, 6 fois concentré est assurée directement par l'eau à analyser constituée par une dilution au millième d'une eau de rivière maintenue à + 7°C. La cadence d'échantillonnage pour les premières expériences était de 10 échantillons/heure comme précédemment.

b) Résultats.

Au cours des premiers essais réalisés avec ce dispositif automatique en continu, nous avons limité le temps de dosage à 8 heures, correspondant au passage de 80 échantillons. Les résultats obtenus nous ont révélé une légère perte de sensibilité de notre système vis-à-vis de la technique manuelle classique : six à huit échantillons sur 10 révélant la présence d'E. coli avec notre système au lieu de 9 pour la technique manuelle classique. De plus les résultats n'étaient pas toujours parfaitement reproductibles.

Dans les expériences ultérieures, lorsque nous avons voulu dépasser 8 heures de dosage, nous avons toujours observé une contamination parfois brutale mais le plus souvent progressive de tous les échantillons après un temps de dosage variant de 9 à 12 heures.

Nous avons cherché à déterminer la cause de cette contamination : l'observation attentive des résultats graphiques fournis par l'enregistreur ne semblait pas mettre en cause une insuffisance d'action de la solution décontaminante car pendant les 8 premières heures, la décontamination était parfaitement effective, des échantillons stériles faisant suite à des échantillons fortement positifs.

Il paraissait donc à priori que le circuit de distribution comprenant les vannes électro-magnétiques devait être mis en cause : en effet la contamination pouvait provenir de la partie du circuit comprise entre le cactus de mélange échantillon d'eau-milieu de culture et le T (Pt 11) d'entrée dans le circuit où la solution de décontamination ne passe pas : la contamination peut donc s'y réaliser progressivement par une croissance des E. coli adsorbés sur les parois de cette partie du circuit.

L'utilisation d'une troisième vanne électro-magnétique permettant une séparation plus prononcée de l'échantillon et du milieu de culture avant le T aurait apporté une solution idéale à ce problème mais le manque de matériel nous a amenés à brancher différemment les deux vannes afin d'éliminer ce risque de contamination.

Comme le montre la figure 23, les vannes ne sont plus disposées entre la pompe à galets et le circuit d'incubation mais avant la pompe. Dans ce montage il n'existe plus de zone où l'échantillon est déjà mélangé au milieu de culture mais où la solution décontaminante ne passe pas. Cependant cette disposition a deux inconvénients par rapport à la première :

.../...

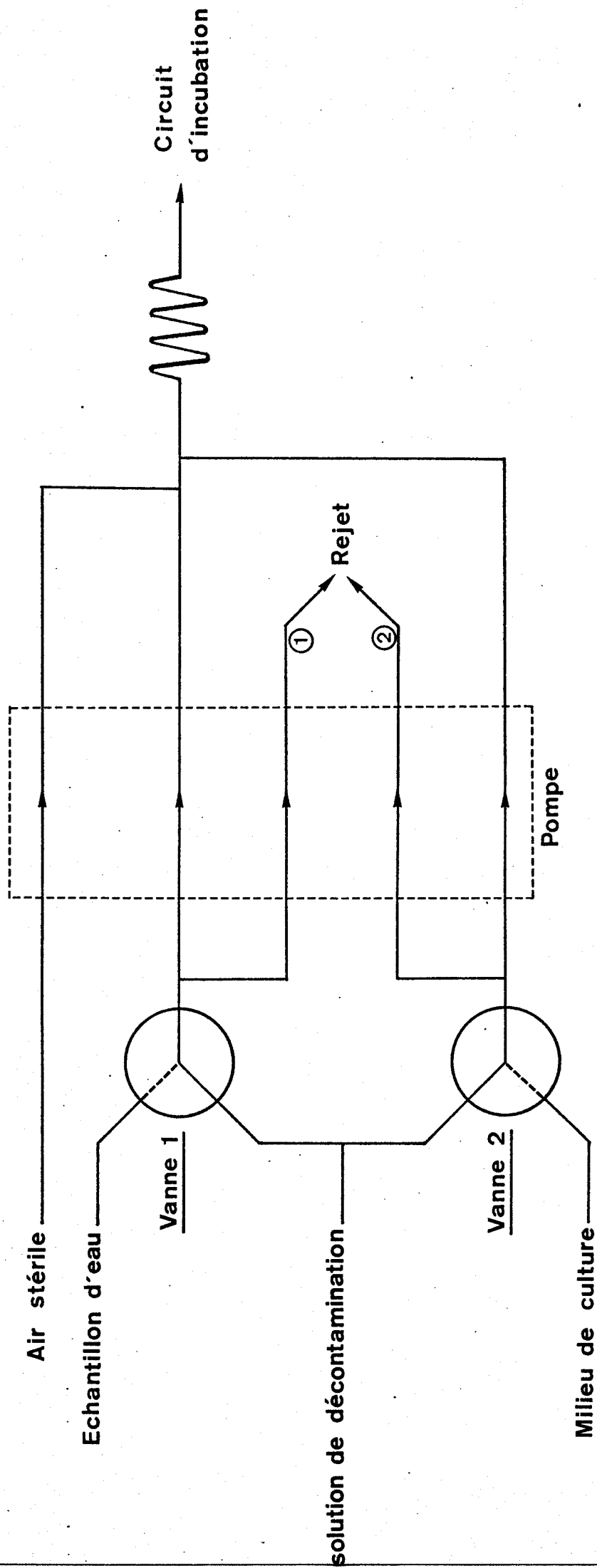


Fig 23 : Schéma du montage final des vannes électro-magnétiques.

voie ouverte pendant le prélèvement. (-----)

Vannes I et II

voie ouverte pendant le rinçage. (———)



- elle nécessite une très bonne synchronisation de l'arrivée de l'échantillon et de celle du milieu de culture

- elle nécessite aussi l'emploi de débits d'aspiration supplémentaires (circuits I et II en dérivation à la sortie des vannes) afin d'accélérer le renouvellement des liquides dans les vannes. En effet, les vannes, possédant un volume mort, provoquent dans le cas présent des mélanges échantillon-solution de décontamination plus importants lors des transitions prélèvement-rinçage et vice-versa.

Malgré ces modifications, les expériences ultérieures ont révélé à nouveau des contaminations progressives après un même laps de temps.

Au cours du passage des échantillons contaminés, des prélèvements ont été réalisés à partir des cultures obtenues afin d'en isoler les espèces bactériennes. A toutes les expériences les espèces bactériennes isolées étaient tuées par une minute de séjour dans la solution de décontamination. Les contaminations n'étaient donc pas provoquées par des souches insensibles à l'action de la solution décontaminante. Il était alors pensable que la solution de décontamination devenait moins effective après 8 heures de dosage en raison d'un temps de culture devenu plus important permettant de plus fortes contaminations ou de formations de dépôts sur les parois des tubes protégeant partiellement les bactéries sous-jacentes.

La cadence d'échantillonnage a donc été réduite de moitié, afin d'obtenir un temps de décontamination double. Malgré cette modification, des contaminations progressives ont été à nouveau observées.

L'inefficacité de la solution de décontamination après un temps prolongé de dosage ne pouvant plus être mise en cause en raison d'un temps de décontamination nettement suffisant, seul le circuit d'incubation dont la conception classique était mal adaptée aux impératifs bactériologiques pouvait être à l'origine des contaminations progressives. Le mode d'assemblage des différentes bobines du circuit d'incubation a donc été totalement modifié afin d'éviter toute formation de poches au niveau de la jonction de deux bobines d'incubation. Ces poches, ne subissant pas ou très peu l'action bactéricide de la solution décontaminante, favorisaient le développement de cultures anarchiques localisées et sont à l'origine des contaminations constatées.

Si la première expérience n'a pu être poursuivie au delà de sept jours en raison d'une rupture accidentelle d'une bobine d'incubation, elle a cependant permis de démontrer que la nouvelle conception du circuit favorisait l'action de la solution décontaminante et empêchait toute contamination d'un échantillon par le précédent : en effet la lecture des résultats graphiques n'a révélé aucune contamination progressive, des échantillons stériles suivant fréquemment des échantillons fortement positifs. Cette décontamination totale des circuits entre les échantillons a été d'ailleurs vérifiée au cours d'expériences ultérieures poursuivies pendant trois semaines consécutives sans aucune contamination progressive.

Les résultats obtenus, résumés dans le tableau XI, étaient généralement sensiblement identiques pour les deux méthodes, le nombre d'échantillons positifs sur 10 obtenus avec la méthode automatique variant de part et d'autre du nombre d'échantillons

NOMBRE D'ECHANTILLONS REVELANT LA PRESENCE D'E. COLI
PAR SERIE DE 10 ECHANTILLONS

Méthode utilisée ° de dilution	NOMBRE D'ECHANTILLONS REVELANT LA PRESENCE D' <u>E. COLI</u> PAR SERIE DE 10 ECHANTILLONS	
	AUTOMATIQUE	MANUELLE
1ère dilution	7 5 5 4 6 8 6 4 7	6
2ème dilution	8 6 5 6 6 7 4 6	8
3ème dilution	7 6 6 8 5 5 8 6 6 5 6 6	10
4ème dilution	3 4 5 4	4



5ème dilution	1 3 1 1 5 4 2 0	6
6ème dilution	10 9 8 10 10 9 10 10 10 9	8
7ème dilution	10 8 6 9 9 10 10 9 7 9 9 6 9 10 8 8 9 10 10 10 10 10 10 9	8



Tableau XI : Essais de colimétrie automatique en continu : comparaison des résultats obtenus avec ceux de la méthode manuelle sur des dilutions au millième de l'eau de la Deule maintenue à 7°C.

positifs obtenus avec la méthode manuelle suivant la dilution utilisée. Cependant il faut déplorer la fiabilité non encore totale de la méthode automatique, certaines séries totalisant un nombre d'échantillons positifs nettement inférieur à ceux des autres séries, bien qu'en raison du faible nombre d'E. coli présents par millilitre, l'échantillonnage des E. coli ne puisse être rigoureusement constant d'une série à l'autre et soit en partie responsable des variations constatées.

De plus, si la décarboxylase synthétisée est généralement abondante, certains échantillons produisent une quantité de décarboxylase faible ou négligeable. Mais on constate que ces écarts sont beaucoup moins fréquents en particulier en ce qui concerne la synthèse de la décarboxylase de l'acide glutamique quand les cultures en bobines sont réalisées non pas à partir d'une dilution d'eau de rivière mais à partir de la dilution 10^{-10} d'une culture pure d'E. coli maintenue 24 h à + 7°C.

Il semble donc que la variabilité des résultats obtenus avec des eaux de rivière soit due essentiellement à une régénération insuffisante de certains E. coli de l'eau. En effet, les E. coli présents dans les eaux ont des origines très diverses et ont séjourné pendant des temps variables dans l'eau. La longueur de ce séjour, ainsi que l'action, au cours de ce séjour, des substances toxiques ou des détergents présents dans l'eau peuvent influencer fortement leur vitalité ou mettre en cause leur viabilité avec comme conséquence une croissance trop lente de ces E. coli dans le circuit de culture et une synthèse insuffisante de la décarboxylase de l'acide glutamique.

.../...

Cette reproductibilité imparfaite des résultats, facile à constater dans le cas d'une méthode automatique où le nombre d'échantillons analysés est important, est aussi en fait l'apanage de la plupart des méthodes manuelles classiques où des résultats par défaut sont souvent constatés.

Une amélioration de la sensibilité du dispositif et de la reproductibilité des résultats sera possible par une augmentation des temps de culture permettant la détection des E. coli à croissance lente et par une préincubation des cultures à basse température (20 à 30°C) favorisant la régénération des E. coli difficilement viables.

CONCLUSION

Bien que la mise en évidence de la décarboxylase de l'acide glutamique représente un test sensible et spécifique de contamination fécale traduisant la présence d'E. coli, ce test était peu utilisable en raison d'une absence totale de méthode simple et rapide de dosage de cette enzyme dans les cultures proliférantes.

Cette lacune est à présent comblée grâce à l'auto-analyseur "Technicon" qui permet une recherche sensible et rapide de la décarboxylase de l'acide glutamique sur des suspensions bactériennes intactes.

La spécificité de ce test ainsi que sa rapidité dans les conditions de culture et de dosage que nous avons définies a permis de réaliser un appareil permettant la recherche automatique des E. coli dans l'eau.

Le dispositif utilisé actuellement assure le prélèvement en continu de l'eau à analyser, la culture et la mise en évidence des E. coli présents ; c'est un appareil expérimental qui fonctionne sur des niveaux de pollution approximativement connus. Des dispositifs complémentaires seront donc nécessaires pour adapter étroitement l'appareil au type d'eau à analyser : un dispositif de concentration des bactéries de l'eau actuellement en étude lui permettra de fonctionner avec une sensibilité maximale sur les eaux de distribution où le nombre des bactéries présentes est très faible. Par contre les analyses d'eaux de rivières fortement polluées seront possibles grâce à un système de dilution automatique.

L'appareil automatique répondra alors parfaitement aux exigences de représentativité de l'échantillonnage, „nouvel impératif du contrôle bactériologique de l'eau.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - CAMIER M. et GONNARD P.
In "automat. anal. chem." Technicon symp. II. Paris, 1966
Dosage automatique de décarboxylase d'acides aminés.
- 2 - EKLADIUS L., KING H.K. and SUTTON C.R.
Decarboxylation of neutral amino acids in Proteus vulgaris
J. Gen. Microbiol., 1957, 17, 602
- 3 - FERRARI A., RUSSO ALESI F.M. and KELLY J.M.
A completely automated system for the chemical determination
of streptomycin and penicillin in fermentation media
Anal. chem., 1959, 31, 1710
- 4 - GALE E.F.
The production of amines by bacteria
Biochem. J., 1940, 34 (3), 392
- 5 - GALE E.F.
Studies on bacterial amino acid decarboxylases
Biochem. J., 1944, 38, 232
- 6 - GALE E.F.
Studies on bacterial amino acid decarboxylases
Biochem. J., 1945, 39 (1), 52
- 7 - GALE E.F.
In "advances in Enzymology", vol VI, Interscience, New-York,
1946, 1

.../...

- 8 - GUIRARD B.M. and SNELL E.E.
Pyridoxal phosphate and metal ions as cofactors for histidine decarboxylase
J. Amer. chem. Soc. 1954, 76, 4745
- 9 - HALPERN Y.S. and UMBARGER H.E.
Utilization of L-glutamic and 2-oxoglutaric acid as sole source of carbon by Escherichia coli
J. Gen. Microbiol., 1961, 26, 175
- 10 - KAUFFMAN F.
Enterobacteriaceae 2e edit. E. Munksgaard, Copenhagen, 1954, 382
- 11 - LAWSON A. and QUINN A.G.
Studies on amino acid decarboxylases in Escherichia coli
Biochem. J., 1967, 105, 483
- 12 - LECLERC H., OSTEUX R. et GUILLAUME J.
Absence d'acides-amino-acides decarboxylases chez certaines souches d'Escherichia coli : démonstration par les méthodes électrophorétiques
Ann. Inst. Pasteur, 1963, 104, 477
- 13 - LECLERC H.
Automation des analyses microbiologiques : application à la mesure des décarboxylases bactériennes
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1966, 17, 21
- 14 - LECLERC H.
Essai d'automation des analyses bactériologiques de l'eau : la colimétrie
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1966, 17, 203

15 - LECLERC H.

Mise en évidence de la décarboxylase de l'acide glutamique
chez les bactéries à l'aide d'une technique automatique
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1967, 112, 713-731

16 - LECLERC H.

Un caractère constant chez l'Escherichia coli : la présence
d'une decarboxylase de l'acide glutamique
Bull. Ass. Dipl. Microb. Fac. Pharm. Nancy, 1967, 107, 39

17 - LECLERC H.

Etude de la decarboxylase de l'acide glutamique dans le groupe
Proteus - Providencia
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1968, 114, 713

18 - LOVENBERGER W., WEISSBACH H. and UDENFRIEND S.

Aromatic L-amino acid decarboxylase
J. Biol. chem., 1962, 237, 89

19 - MØLLER V.

Activity determination of amino acid decarboxylases in Enterobacteriaceae
Acta. Pathol. Microbiol. Scandin., 1954, 34, 102

20 - MØLLER V.

Distribution of amino acid decarboxylases in Enterobacteriaceae
Acta. Pathol. Microbiol. Scandin., 1954, 35, 259

21 - MØLLER V.

Simplified test for some amino acid decarboxylase and for the
arginine dihydrolase system
Acta. Pathol. Microbiol. Scandin., 1955, 36, 158

.../...

- 22 - POSEN S., BIRKETT D.J., CONYERS A.J., CORNFISH C.J.
and NEALE F.C.
In "automat. anal. chem." Technicon symp., New-York, 1967
Automated methods in the study of enzyme kinetics
- 23 - PROOM H. and WOIWOD A.J.
The examination by partitions paper chromatography of the
nitrogen metabolism of bacteria
J. Gen. Microbiol., 1949, 3, 319
- 24 - PROOM H. and WOIWOD A.J.
The distribution of glutamic acid decarboxylase in the family
Enterobacteriaceae, examined by a simple chromatographic
method
J. Gen. Microbiol., 1951, 5, 681
- 25 - ROBERTS E. and FRANKEL S.
Glutamic acid decarboxylase in Brain
J. Biol. chem., 1951, 188, 789
- 26 - RODWELL A.W.
The histidine decarboxylase of a species of Lactobacillus :
apparent dispensability of pyridoxal phosphate as coenzyme
J. Gen. Microbiol., 1953, 8, 233
- 27 - ROSENTHALER J. GUIRARD B.M., CHANG G.W. and SNELL E.E.
Purification and properties of histidine decarboxylase from
Lactobacillus 30 a
Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 1965, 54, 152

.../...

- 28 - SCHUKUYA R. and SCHWERT G.W.
Glutamic acid decarboxylase
J. Biol. chem., 1960, 235 (6), 1649-1661
- 29 - SKEGGS L.T.
An automatic method for colorimetric analysis
Ann. S. Clin. Path., 1957, 28, 311-22
- 30 - STANIER R.Y., DOUDOROFF M., ADELBERG Ed. A.
Microbiologie générale
Masson et Cie, Ed., 1966, 289
- 31 - STEWART D.J.
A rapid unequivocal method for detecting glutamic acid decarboxylase in primary plate culture of Enterobacteriaceae
J. Applied. Bact., 1963, Apr., v 26, n° 1, 75-9, 1
- 32 - STRAUSBACH P.H., FISCHER E.H., CONNINGHAM C. and HA GER L.P.
Cristallization and properties of glutamate decarboxylase from Escherichia coli Strain W +
Biochem. Biophys. Res. Communic., U.S.A., 1967, 28, n° 4, 525
- 33 - STRAUSBACH P.H. and FISCHER E.H.
Structure of the binding site of pyridoxal 5'-phosphate to Escherichia coli glutamate decarboxylase
Biochem. U.S.A., 1970, 9, n°2, 233

.../...

34 - UMBREIT W.W. and GUNSALUS I.C.

The function of pyridoxine derivatives : arginine and glutamic acid decarboxylases

J. Biol. chem., 1945, 159, 333

35 - UMBREIT W.W. and HENEAGE

β -hydroxy-glutamic acid decarboxylase

J. Biol. chem., 1953, 201, 15

36 - VOGLER G.

Ein eidentiger Routinenachweis von E. coli faecalis aus wasser mit der Bestimmung der Glutaminsäuredekarboxylase - Aktivität durch keilstreifenchromatographie

Z. ges. hyg. Grenzgeb. Dtsch, 1971, 17, n° 8, 585-88

37 - WOIWOD A.J.

A technique for examining large numbers of bacterial culture filtrates by partition chromatographie

J. Gen. Microbiol., 1949, 3, 312

