

RÉSUMÉ

de la thèse de doctorat intitulée:

RECHERCHE SUR L'UTILISATION DE MÉTHODES MODERNES DE DÉTECTION ET D'ANALYSE DES PATHOGÈNES DANS DIFFÉRENTES MATRICES ALIMENTAIRES

Doctorand: **ALZAIDI Quthama Jasmin**

Coordonateur scientifique: **Prof. Univ. Dr. MATEI Florentina**

MOTS CLÉS: viabilité-qPCR, acide lactique, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*

La promotion d'un mode de vie plus sain et plus durable au cours de la dernière décennie a entraîné une demande croissante de légumes frais et d'autres produits prêts à consommer. Avec cette vague de produits préemballés ayant une durée de conservation plus longue, les épidémies d'infections d'origine alimentaire sont également apparues plus fréquemment. La détection des agents pathogènes et des micro-organismes d'altération est un aspect crucial du maintien de la santé publique, de la prévention des épidémies et de la garantie de la sécurité des aliments, du sol, de l'eau et d'autres échantillons biologiques.

La technique de PCR en temps réel (qPCR) a amélioré la détection et la quantification des agents pathogènes grâce à une sensibilité et une spécificité accrues des tests. Aussi, la rapidité des analyses offerte par le multiplexage et l'automatisation des appareils est un plus important pour diverses industries, comme celle de l'alimentaire ou de la pharmaceutique. Cependant, cette technique présente un certain nombre de limitations liées à la précision des résultats, notamment dans le cas d'échantillons contenant des mélanges de cellules viables et non viables, générant des résultats faussement négatifs. Une stratégie prometteuse pour éviter ce problème est la « viabilité-qPCR » (v-qPCR), qui repose sur une série de perméabilisants qui peuvent faciliter le processus de pénétration de la membrane externe dans le cas des bactéries à Gram négatif par des colorants photoactifs (propidium monoazide PMA), augmentant ainsi la précision des résultats.

L'objectif général de la recherche visait le développement de méthodes moléculaires rapides pour la détection et la quantification de micro-organismes d'altération (*Botrytis cinerea*) ou d'agents pathogènes (*E. coli*, *Salmonella sp.*) à partir de différentes matrices alimentaires, respectivement fruits et légumes périssables (framboises, mélanges de salades conditionnées) et du lait. Plus précisément, il s'agissait d'optimiser la technique v-qPCR en identifiant une substance accessible, sûre et efficace qui permet aux colorants photoactifs (PMA) de pénétrer efficacement dans tout type de matrice, à savoir l'acide lactique.

Ainsi, les objectifs spécifiques étaient les suivants :

1. Développement d'une méthode qPCR pour quantifier la contamination des framboises fraîches par *B. cinerea* ;
2. Développement d'une méthode de détection et de quantification d'*E. coli* et de *Salmonella* par v-qPCR ;
3. Utilisation de la méthode v-qPCR pour la détection d'*E. coli* dans les matrices alimentaires.

Dans la partie théorique de l'article, une documentation approfondie, structurée en plusieurs chapitres a été réalisée concernant les principaux pathogènes rencontrés dans l'industrie alimentaire ainsi que le développement et l'amélioration des méthodes de détection. Ainsi, les méthodes moléculaires (PCR, qPCR, v-qPCR) et leur évolution, ainsi que leurs inconvénients et limites, ont été décrites. De plus, l'utilisation de

perméabilisants pour la détection et la quantification des agents pathogènes à Gram négatif a été décrite afin d'obtenir les résultats les plus précis.

La deuxième partie de l'article, structurée en 3 chapitres expérimentaux et un chapitre de conclusions, aborde le développement d'une méthode moléculaire pour quantifier la contamination des fruits de framboise par *Botrytis cinerea*, les améliorations apportées à la technique de viabilité qPCR et les tests de la nouvelle analyse sur des matrices alimentaires telles que le lait et les feuilles d'épinards.

Le premier chapitre expérimental visait à l'étude comparative des résultats de détection du micro-organisme d'altération *B. cinerea* sur des échantillons de framboises conditionnés, en utilisant la méthode traditionnelle de culture sur plaque et une méthode qPCR développée en laboratoire.

En étalant des échantillons de framboises sur un milieu spécifique, aucun mycélium indiquant la présence de l'espèce *B. cinerea* n'a été détecté sur aucun des trois échantillons commerciaux conditionnés et en rayon. Compte tenu des résultats incertains obtenus par la technique microbiologique classique, la technique qPCR a été utilisée, et la méthode de détection avec le couple d'amorces Bc3F/Bc3R a été développée. La linéarité de la courbe étalon obtenue a été observée sur toute la plage utilisée, présentant un coefficient de corrélation ($R^2=0,9929$) indiquant une très faible variabilité inter-essais.

Une efficacité d'amplification de 85,18 % a été obtenue. Dans les conditions décrites, la valeur Ct maximale pouvant être utilisée était de 32 et correspond à une concentration en ADN de 9,8 fg. Grâce à la technique développée, la présence de *B. cinerea* a été détectée dans deux des trois échantillons commerciaux, avec des valeurs autour de 3,8-4,2 fg.

Ainsi, la méthode qPCR développée peut détecter même la plus petite quantité de *B. cinerea* présente dans l'échantillon, en utilisant les amorces Bc3F et Bc3R, obtenant ainsi des résultats précis. La technique simple proposée peut être efficace pour l'examen de routine de plusieurs échantillons par jour.

Les deux chapitres expérimentaux suivants, liés aux bactéries pathogènes, visaient spécifiquement à optimiser la technique v-qPCR en identifiant une substance accessible, sûre et efficace qui permet aux colorants photoactifs (PMA) de pénétrer efficacement tout type de matrice, à savoir l'acide lactique. Une méthode v-q-PCR a été développée qui utilise l'acide lactique comme perméabilisant pour la détection et la quantification d'*E.coli* et de *Salmonella sp.*

Dans une première phase, il a été constaté que l'acide lactique en faible concentration (5-20 mM) n'affecte pas la viabilité de la souche d'*E.coli*, tandis que la souche de *Salmonella sp.* n'est pas inhibée à des concentrations inférieures à 10 mM. Dans les deux souches, l'acide lactique (AL) agit en synergie avec l'antibiotique ciprofloxacine (CIP 1) et peut être utilisé pour augmenter l'action antibactérienne. Le prétraitement avec 10 mM AL a l'effet maximum de perméabilisation de la membrane cellulaire chez *E. coli*, et dans ce cas, l'indice dCt non viable qui quantifie la réduction du signal qPCR a une valeur moyenne de 14,5. Dans la souche *S. Typhimurium*, le PMA pénètre efficacement dans la membrane externe et les valeurs de réduction du signal (dCt non viable) pour les échantillons traités au PMA et les échantillons 10 mM PMA + AL n'étaient pas statistiquement différentes. La limite de détection et la courbe standard de la souche *E. coli* ont également été calculées pour évaluer les performances de la technique de détection mise en œuvre.

Par la suite, des tests de perméabilisation à l'acide lactique et une analyse qPCR avec un colorant PMA ont été appliqués à des échantillons de lait et à des feuilles d'épinards achetées dans le commerce. L'utilisation de l'acide lactique avec la v-qPCR s'est avérée être une nouvelle avancée pour la détection spécifique et la quantification précise d'agents pathogènes Gram-négatifs viables, à la fois dans des conditions de culture et dans la matrice alimentaire. Cette approche peut contribuer à faire progresser les méthodologies de détection des agents pathogènes et à soutenir les efforts visant à protéger la santé publique et la sécurité alimentaire.

Les études réalisées fournissent des informations utiles sur l'utilisation de l'acide lactique, qui s'avère être un perméabilisant efficace, bon marché et peu toxique, qui a le potentiel d'être utilisé dans la détection et la quantification d'agents pathogènes à Gram négatif par la méthode PMA-qPCR. car elle améliore l'efficacité de la réaction.