

EPREUVE E5. UNITE U51.
ETUDE D'OPERATIONS TECHNIQUES

**DIAGNOSTICS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DANS
L'INDUSTRIE ALIMENTAIRE**

Dictionnaire français-anglais et calculatrice autorisés

Maladie infectieuse commune à l'homme et aux animaux, la listériose est provoquée par une bactérie, *Listeria monocytogenes*. La contamination se fait essentiellement par voie digestive suite à la consommation d'aliments préparés à partir d'animaux malades ou porteurs sains. La fréquence de cette maladie augmente depuis plusieurs années sans qu'il soit possible d'établir s'il s'agit réellement d'une extension ou d'une meilleure détection. Depuis 1981, date à laquelle la transmission alimentaire a été prouvée, de nombreux tests de dépistage ont été développés : méthode bactériologique traditionnelle, immunodétection automatisée, hybridation moléculaire.

**PREMIERE PARTIE : recherche et identification des *Listeria monocytogenes* dans
l'industrie fromagère par méthode bactériologique traditionnelle (20 points)**

Les bactéries appartenant au genre *Listeria* ont en commun les caractères suivants : petits bacilles Gram +, en palissade ; catalase + ; oxydase - ; esculine + ; aéro-anaérobies ; halophiles ; auxotrophes vis-à-vis de nombreux facteurs de croissance ; mobiles (à 20-25°C) grâce à une ciliature péritriche ; non sporulés.

1) Recherche de *Listeria monocytogenes*

1-1) D'une manière générale, les produits laitiers doivent se conformer aux standards impératifs suivants :

	n	c	m
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	absence dans 25 g

1-1-1) Que signifient : m, n et c ?

1-1-2) Que doit-on faire pour réaliser la recherche de *Listeria monocytogenes* en se conformant aux données ci-dessus ?

1-2) A partir du protocole fourni **document 1**, dégager les différentes étapes et préciser leur intérêt.

1-3) Justifier l'emploi du bouillon de Fraser 1/2 dont la composition figure dans le **document 2**.

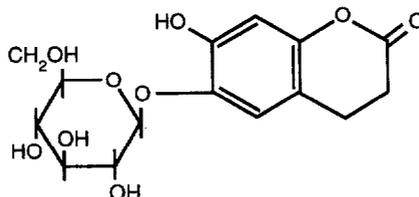
1-4) Comment peut-on, à partir de colonies suspectes sur milieu ALOA, s'orienter rapidement vers le genre *Listeria* ?

2) Identification des colonies suspectes sur galerie API *Listeria* (document 4)

2-1) La galerie d'identification permet la différenciation entre *Listeria innocua* et *Listeria monocytogenes* grâce au test DIM lu après addition d'un réactif ZYM B.

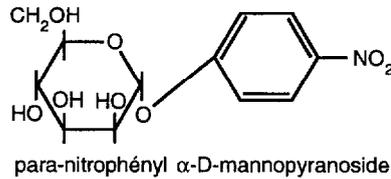
A partir du **document 3**, dégager les précautions à prendre lors de l'utilisation du ZYM B.

2-2) L'esculine a pour formule :



Ecrire la réaction catalysée par les bactéries appartenant au genre *Listeria* (formules chimiques exigées)

2-3) L' α -mannosidase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse du substrat suivant :



Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une coloration jaune. Expliquer pourquoi.

2-4) Pour les sept derniers tubes de la galerie Api *Listeria*, un résultat positif se traduit par un virage à la coloration jaune. Pourquoi ?

2-5) Une colonie suspecte ensemencée sur galerie Api *Listeria* a donné le profil biochimique suivant :

DIM	ESC	α MAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	G1P	TAG
-	+	+	+	-	+	+	-	+	-

2-5-1) Identifier la bactérie contaminante en justifiant la démarche.

2-5-2) Le logiciel API LAB donne un indice de typicité : $T = 0,68$.

Qu'est-ce que l'indice de typicité ?

Pourquoi l'indice de typicité est-il inférieur à 1 ?

2-6) Lorsqu'une *Listeria monocytogenes* est identifiée, la souche est envoyée au Centre de Références des *Listeria* où un sérotypage est réalisé.

D'autre part, l'Institut Pasteur de Paris peut en réaliser le lysotypage.

Définir les termes : sérotypage, lysotypage.

DEUXIEME PARTIE : immunodétection automatisée de *Listeria monocytogenes* dans différents lots de fromages (25 points)

Une méthode d'immunodétection est testée en parallèle à la méthode traditionnelle bactériologique.

1) Préparation des échantillons

Les protocoles diffèrent selon les produits alimentaires, comme le montre le **document 5**. A partir du document, indiquer les conditions de réalisation de l'étape 2 dans le cadre d'une recherche sur des fromages préparés à partir de laits pasteurisés (volume de culture ensemencé, matériel, conditions de travail).

2) Principe d'un test « E.L.F.A. »

Coffret VIDAS *Listeria monocytogenes* (VIDAS LMO), bioMérieux.

Le **document 6** donne une représentation schématique du principe d'une telle détection des antigènes de surface de *Listeria monocytogenes*.

2-1) Que représentent les éléments a, b et c ?

2-2) Caractériser la méthode d'immunodétection.

2-3) Quel type de signal le détecteur reçoit-il ? En déduire la signification d' « E.L.F.A. ».

2-4) S étant du 4-méthylumbelliférylphosphate, quelle est l'enzyme utilisée ?

2-5) Quel est l'avantage principal de cette méthode par rapport à la méthode bactériologique traditionnelle ?

1-1-1) Compléter le **document 9b** en écrivant la séquence du brin d'ADN complémentaire puis en positionnant les amorces, sachant que les élongations s'effectueront à partir de l'amorce dans le sens 5'→3'.

1-1-2) Déterminer en paires de bases la longueur théorique de l'amplifiat.

1-2) Protocoles utilisés

1-2-1) Extraction et purification préalables de l'ADN de *Listeria* (**Document 10**)

Analyser le protocole en expliquant d'une part les rôles respectifs du lysosyme, du saccharose, du SDS, de l'EDTA, de la protéinase K, et d'autre part ceux du phénol, du NaCl, de l'éthanol, de la RNase.

1-2-2) Amplification d'un fragment d'ADN spécifique du gène HlyA.

1-2-2-1) Préparation du milieu réactionnel (**Document 11a**)

Oligonucléotides amorces :

Calculer le volume des solutions A1 et A2 nécessaires à la réalisation du milieu réactionnel.

Donnée : masses molaires de PCRG0 et de PCRDO = 7500 g.mol⁻¹.

dNTP :

A partir d'une solution stock à 50 mmol.L⁻¹, indiquer comment préparer une solution fille telle que 10 µL apportent 20 nanomoles du mélange de dNTP.

Donnée : tampon de dilution = Tris-HCl 5 mmol.L⁻¹, pH 9.

Taq-polymérase :

3 µL de la solution B incorporent 0,03 micromoles de dNTP en 15 minutes à 70°C ; calculer le volume de la solution B à ajouter dans le milieu réactionnel.

Donnée : 1 unité de Taq-polymérase est la quantité d'enzyme qui incorpore 10 nanomoles de dNTP dans un ADN en 30 minutes à 70°C.

1-2-2-2) Protocole d'amplification (**Document 11**)

Justifier les différentes étapes présentées dans le **document 11b** et dégager la notion de cycle d'amplification.

2) Détection de la séquence amplifiée

2-1) Par électrophorèse en gel d'agarose

Les amplifiats [A] sont déposés dans les puits d'un gel d'agarose à 1,4 % contenant 1 % de bromure d'éthidium.

De plus, pour augmenter la spécificité du test, on dépose également les amplifiats hydrolysés [AH] en présence de l'enzyme de restriction Rsa I spécifique du site 5'GTAC 3' (**Document 9b**).

Les résultats sont fournis (**Document 12**) (**12a** = schéma de l'électrophorégramme ; **12b** = distance de migration des fragments d'ADN).

Tracer sur papier millimétré la courbe d'étalonnage log (paires de bases) = f (distance de migration) grâce au témoin de taille : ADN du phage λ hydrolysé par Bst EI. Déterminer la taille des fragments obtenus. Sont-ils en accord avec la taille théorique de l'amplifiat non hydrolysé [A] et hydrolysé [AH] ?

Conclure sur la présence de *Listeria monocytogenes* dans les cinq lots étudiés.

Les résultats obtenus avec cette méthode sont-ils concordants avec ceux obtenus avec la méthode immunologique (lots numérotés de 1 à 5) ?

2-2) Par sonde marquée avec une peroxydase

Une sonde de détection, longue de 20 nucléotides, permet aussi de détecter l'amplifiat du fragment du gène de la listériolysine.

On étudie l'influence de la concentration en H_2O_2 sur le développement du signal peroxydase. Pour cela, on détermine, dans les mêmes conditions expérimentales, la vitesse initiale (v_i) de la réaction catalysée par la peroxydase en fonction de différentes concentrations en H_2O_2 (0,0003%, 0,015%, 0,3%), la concentration en chromogène TMB demeurant quant à elle inchangée.

TMB : 3,3', 5, 5' tétraméthylbenzidine.

2-2-1) Protocole de mesure des v_i de la réaction

Dans une cuve thermostatée pour photométrie, on dépose 2 mL de substrat H_2O_2 -TMB en tampon citrate, à la concentration choisie. On préchauffe quelques minutes à $37^\circ C$, puis on déclenche la réaction par ajout de 10 μL d'une solution de peroxydase du commerce diluée au 1/1000.

L'évolution de l'absorbance est suivie pendant 2 minutes à 655 nm.

Etablir la formule permettant de déterminer les concentrations d'activité catalytique peroxydasique en $mol \cdot min^{-1} \cdot L^{-1}$ de solution enzymatique.

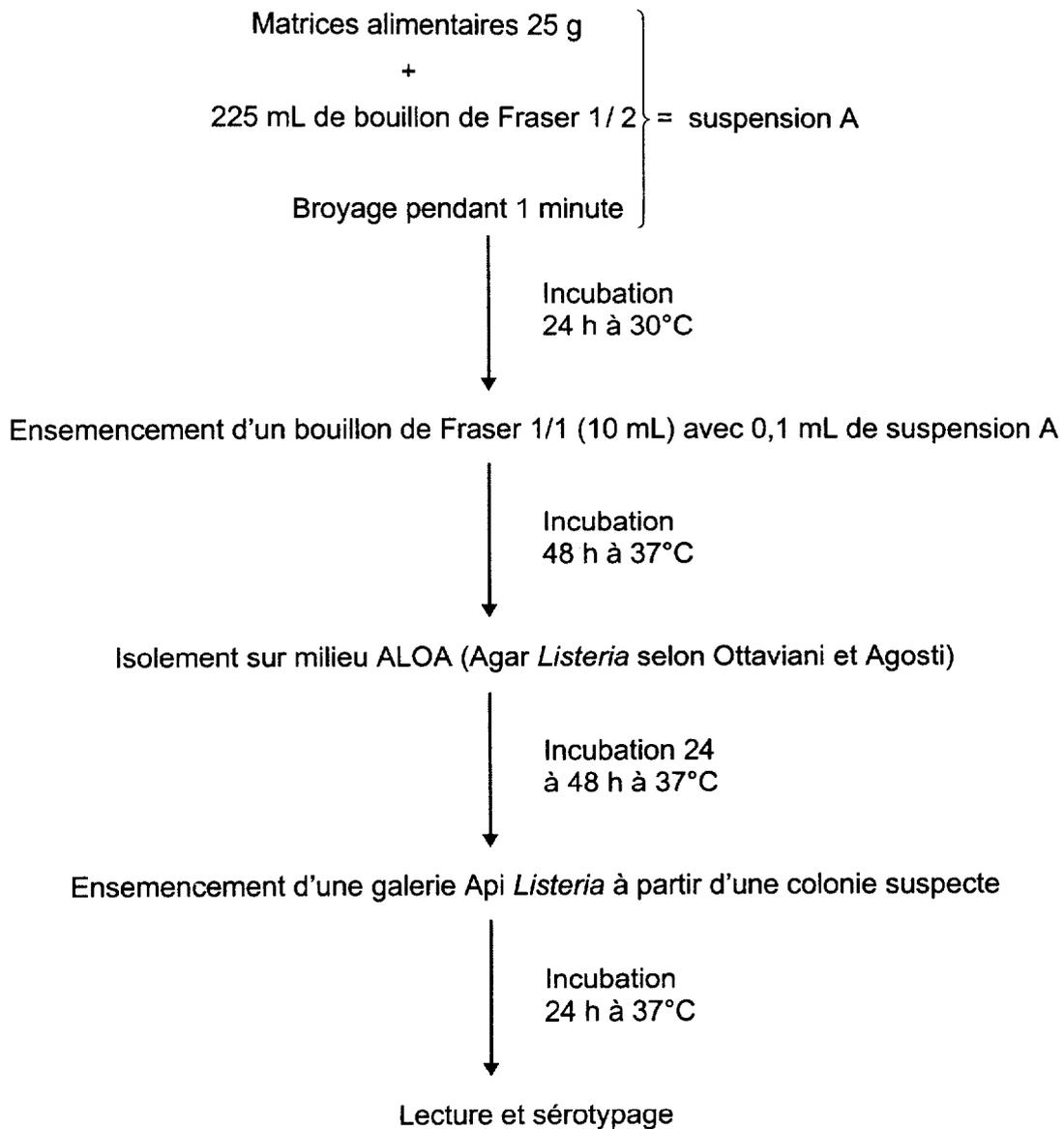
Données : $\epsilon = 4,56 \cdot 10^3 L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$;
trajet optique = 1 cm.

2-2-2) Application

Utiliser les valeurs expérimentales suivantes pour choisir la concentration en H_2O_2 qui optimise la détection.

Concentrations en H_2O_2 en %	$\Delta A / \Delta t$ en min^{-1}
0,0003	0,001
0,015	0,200
0,3	0,015

**DOCUMENT 1 : METHODE POUR LA DETECTION ET L'IDENTIFICATION DE
LISTERIA MONOCYTOGENES DANS LES MATRICES ALIMENTAIRES**



DOCUMENT 2 : BOUILLON DE FRASER 1/2
(Laboratoire BOKAR)

Pour 1 litre de milieu :

- polypeptone	10 g
- extrait autolytique de levure	5 g
- extrait de viande	5 g
- chlorure de sodium	20 g
- phosphate disodique anhydre	9,6 g
- phosphate monopotassique	1,3 g
- esculine	1 g
- chlorure de lithium	3 g
- acide nalidixique	10 mg
- acriflavine	12,5 mg

pH du milieu : 7,2

Remarque : dans le bouillon de Fraser 1/1, les concentrations des trois derniers composants sont doublées.

DOCUMENT 3 : REACTIF ZYM B

- Fast Blue BB : 0,35 g
- 2-méthoxy éthanol : 100 mL

TOXIQUE

R60 : peut altérer la fertilité.

R61 : risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant.

R10 : inflammable.

R20/21/22 : nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.

S53 : éviter l'exposition (éviter le contact avec la peau et les yeux – l'inhalation des vapeurs et toute surchauffe brutale).

S45 : en cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette).

DOCUMENT 4 : GALERIE API LISTERIA : (laboratoire BIOMERIEUX)**Principe :**

La galerie API *LISTERIA* comporte 10 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, qui permettent la réalisation de tests enzymatiques ou des fermentations de sucres.

Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des changements de coloration spontanés ou révélés par l'addition de réactif.

Après incubation 18 – 24 heures à 35 – 37°C, la lecture des réactions est réalisée visuellement avec le tableau de lecture et l'identification obtenue grâce à la liste des profils ou d'un logiciel d'identification.

Mode opératoire :

- Préparation de l'inoculum :

A l'aide d'une pipette, prélever quelques colonies bien isolées et réaliser une suspension en eau distillée d'opacité égale à 1 de Mc Farland.

- Inoculation de la galerie :

Inoculer tube et cupule du test DIM avec la suspension bactérienne ajustée à 1 de Mc Farland.

Diluer l'inoculum de manière à obtenir une suspension d'opacité égale à 0,5 de Mc Farland.

Inoculer les tubes des tests ESC à TAG.

- Incubation.

Lecture :

Ajouter une goutte de réactif ZYM B au test DIM.

Lire les réactions en se référant au tableau de lecture.

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	REACTIONS	RESULTATS	
		NEGATIF	POSITIF
<u>DIM</u>	Différenciation <i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i>	ZYM B / < 3 min	
		orange pâle rose beige gris beige	orange
ESC	ESCuline (Hydrolyse)	jaune pâle	noir
α MAN	α -MANnosidase	incolore	jaune
DARL	D-Arabitol	rouge rouge orangé	jaune jaune orangé
XYL	D-XYlose		
RHA	RHAmnose		
MDG	α -Méthyl-D-Glucoside		
RIB	RIBose		
G1P	Glucose-1-Phosphate		
TAG	D-TAGatose		

TABLEAU D'IDENTIFICATION

% de réactions positives après 18-24 h à 35-37°C

API LISTERIA V 1.1	DIM	ESC	α MAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	G1P	TAG
<i>Listeria grayi</i>	99	100	99	100	1	16	98	100	0	0
<i>Listeria innocua</i>	99	100	98	100	2	65	98	0	0	0
<i>Listeria ivanovii</i>	88	100	0	99	97	4	99	99	91	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	100	98	97	0	98	100	0	5	0
<i>Listeria seeligeri</i>	97	100	5	99	99	0	99	0	0	0
<i>Listeria welshimeri</i>	90	100	96	100	98	76	99	0	0	97

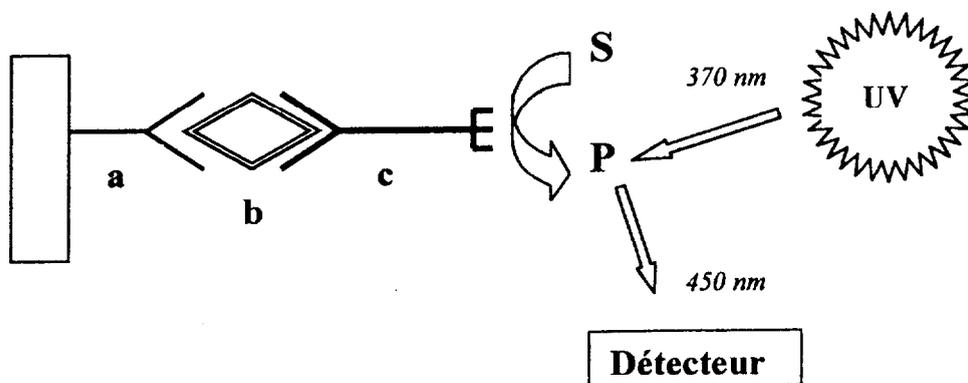
DOCUMENT 5 :
PROTOCOLES DE PREPARATION DES ECHANTILLONS AVANT
IMMUNODETECTION
 (bioMérieux, AFNOR n° BIO-12/3-03/96)

		Fromages au lait cru	Autres produits laitiers	Autres produits alimentaires, non laitiers
ETAPE 1	Masse de produit	25 g	25 g	25 g
	Volume de bouillon	225 mL	225 mL	225 mL
<i>Incuber 24/26 h à 30°C</i>				
ETAPE 2		Ensemencer sur gélose sélective	Ensemencer à 1 % (v/v) dans le même bouillon (volume final de bouillon : 10 mL)	Ensemencer à 10 % (v/v) dans le même bouillon (volume final de bouillon : 10 mL)
		<i>incuber 24/26 h à 30°C Ajouter 10 mL de bouillon sélectif 300h Laisser 10 min à température ambiante</i>	<i>incuber 24/26 h à 30°C</i>	<i>incuber 24/26 h à 30°C</i>

500 µL de suspension bactérienne
IMMUNODETECTION

par **TEST VIDAS LMO**
 (Antigène recherché : Ag de surface de *Listeria monocytogenes*)
 Résultats en 70 minutes.

DOCUMENT 6 :
REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PRINCIPE D'UNE DETECTION E.L.F.A.

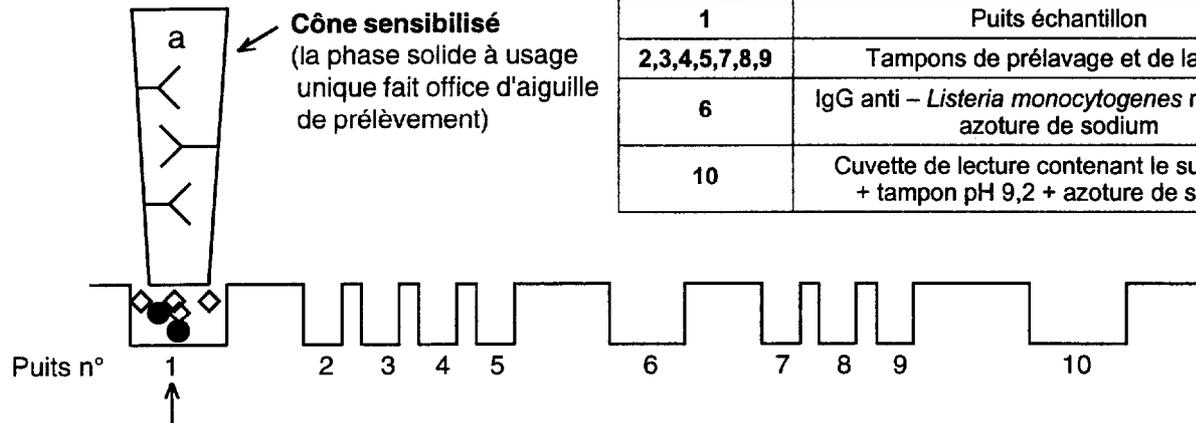


DOCUMENT 7 :**DISPOSITIF AUTOMATISE VIDAS POUR IMMUNODETECTION ELFA**

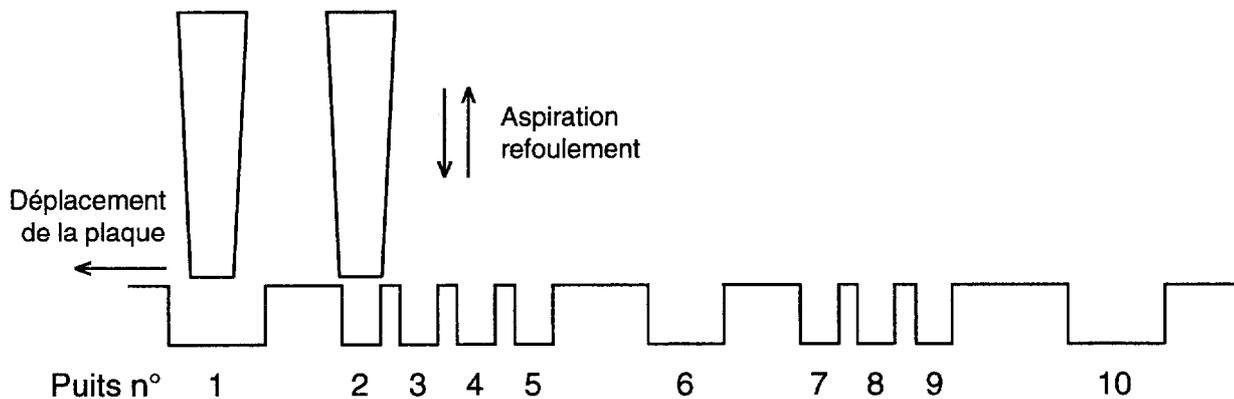
N.B. : Les éléments a et S sont de même nature que dans le document 7.

1 – Schéma technique du dispositif VIDAS**Contenu des différents puits de la cartouche :**

N° des puits	Réactifs
1	Puits échantillon
2,3,4,5,7,8,9	Tampons de prélavage et de lavage
6	IgG anti - <i>Listeria monocytogenes</i> marqués + azoture de sodium
10	Cuvette de lecture contenant le substrat S + tampon pH 9,2 + azoture de sodium



Échantillon (500 µL de bouillon ensemencé, après incubation: ◇ Ag recherché ● Autres antigènes)
ou standard (Ag de *L. monocytogenes* purifié et inactivé de concentration connue + azoture de sodium)
ou contrôles : - positif C+ (Ag de *L. monocytogenes* purifié et inactivé + azoture de sodium)
 - négatif C- (Tampon Tris-NaCl (150 mmol/L)-Tween pH 7,6 + azoture de sodium)

2 – Déroulement des étapes techniques

A chaque étape, le cône aspire et refoule plusieurs fois le réactif contenu dans la cupule : les cinétiques de réaction sont augmentées.

Académie :	Session :
Examen ou Concours	Série* :
Spécialité/option* :	Repère de l'épreuve :
Épreuve/sous-épreuve :	
NOM :	
<i>(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)</i>	
Prénoms :	N° du candidat
Né(e) le :	<input type="text"/>

(le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

Repère : BCFTU

SESSION 2002

Durée : 4 H

Page : 11/14

Coefficient : 4

DOCUMENT 8 :**TABLEAU DE RESULTATS (à compléter et à rendre avec la copie)**

Série 1	RFV standard	If ₁ BF	If ₂ essai	RFV essai	VT = RFV _{essai} / RFV _{std}	Interprétation (positif ou négatif)	Série 2	RFV standard	If ₁ BF	If ₂ essai	RFV essai	VT = RFV _{essai} / RFV _{std}	Interprétation (positif ou négatif)
Lot 1	3858	89	2713				Lot 6	3795	104	180			
Lot 2	3858	88	3753				Lot 7	3795	105	143			
Lot 3	3858	90	513				Lot 8	3795	104	218			
Lot 4	3858	90	167				Lot 9	3795	106	182			
Lot 5	3858	86	163				Lot 10	3795	103	140			
C+	3858	88	3869				C+	3795	105	290			
C-	3858	90	94				C-	3795	104	107			

BF : bruit de fond ; If : signal en unités arbitraires.

C+ : VT attendu : 0,8-1,2

Académie :	Session :
Examen ou Concours	Série* :
Spécialité/option* :	Repère de l'épreuve :
Épreuve/sous-épreuve :	
NOM :	
<i>(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)</i>	
Prénoms :	N° du candidat
Né(e) le :	<input type="text"/>

(le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

Repère : BCFTU

SESSION 2002

Durée : 4 H

Page : 12/14

Coefficient : 4

A COMPLETER ET A RENDRE AVEC LA COPIE**DOCUMENT 9 :****DOCUMENT 9a :**

A partir d'informations sur les séquences situées de part et d'autre du locus désiré, on construit des amorces oligonucléotidiques.

Ces amorces sont complémentaires de brins opposés.

L'ADN total (double brin) est dénaturé par chauffage en présence d'un excès de ces oligonucléotides.

En refroidissant, les amorces s'associent à chacun des brins de l'ADN matrice.

On effectue leur élongation en présence de désoxynucléotides et d'une polymérase thermostable.

Après un cycle de synthèse, on recommence les mêmes étapes de chauffage, refroidissement, élongation.

DOCUMENT 9b : (à compléter et à rendre avec la copie)

Extrait de la séquence du gène Hly A.

Brin 5'

3'

747

986

1134

↓

↓

↓

.....GAATGTAACCTTCGGCGCAATCAG.....|GTAC|.....GATGAAGTTCAAATCATCGACGGC.....

Rsa I

L'enzyme de restriction Rsa I est spécifique du site 5' GTAC 3'.

DOCUMENT 10 :**EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'ADN DE *LISTERIA***

Infection and Immunity, apr. 1988

MENGAUD et al.

Listeria chromosomal DNA was prepared by a method adapted from that of Flamm et al. [15]. Overnight cultures (5 mL) of *Listeria* in brain heart infusion were centrifuged. Pellets were washed in 1 mL of 0,1 x SSC (1 x SSC is 0,15 M NaCl plus 0,015 M sodium citrate) and suspended in 0,6 mL of lysosyme solution (0,01 M sodium phosphate, 20 % sucrose [pH 7], 2,5 mg of lysosyme per mL, freshly added). The mixture was incubated for 1 h at 37°C, and then 5,4 mL of proteinase K solution (10 mM Tris hydrochloride [pH 8], 1 mM EDTA, 1 % sodium dodecyl sulfate [SDS], 500 µg of proteinase K per mL, freshly added) was added. After 1 or 2h at 37°C, the mixture was gently extracted three times with 6 mL of saturated phenol. Then, 600 µL of sodium chloride was added, and DNA was ethanol precipitated for at least 2 h at - 20°C. DNA was then suspended in 0,5 mL of TE (10⁻² M Tris hydrochloride [pH 8], 10⁻³ M EDTA) containing RNase (50µg/mL). Yield was about 10 µg of DNA per mL of overnight culture.

DOCUMENT 11 :**AMPLIFICATION D'UN FRAGMENT D'ADN SPECIFIQUE DU GENE *hly A*****DOCUMENT 11a : composition du milieu réactionnel**

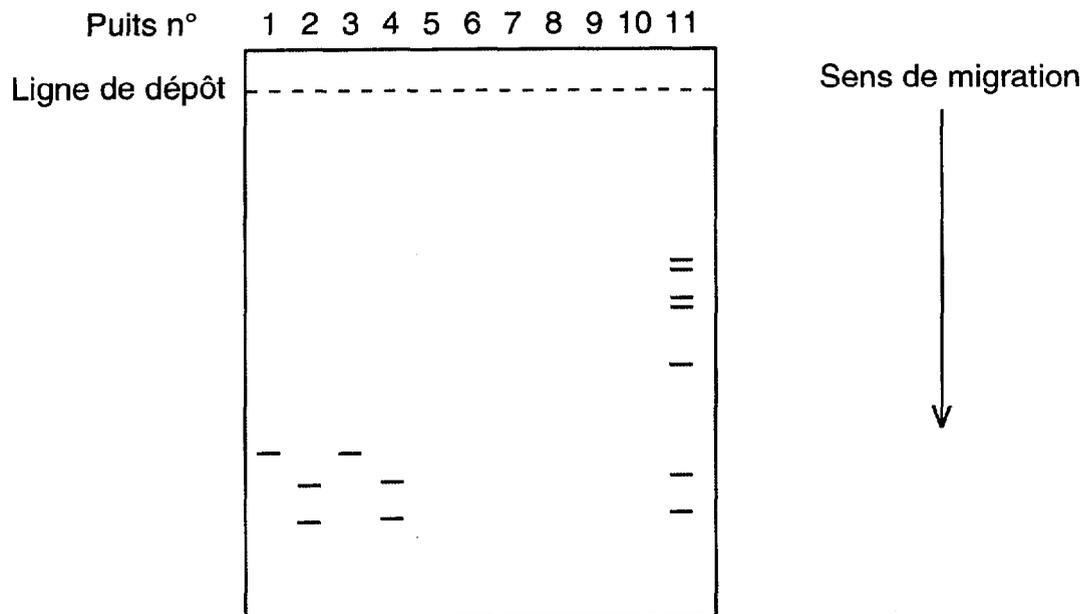
- extrait d'ADN.....	10 µL
- solution A1 d'oligonucléotides amorces à 20µmol/L (PCRGO).....	300 ng
- solution A2 d'oligonucléotides amorces à 20µmol/L (PCRDO).....	300 ng
- solution fille : mélange de dNTP (désoxyribonucléosides triphosphates).....	10 µL
- solution B de Taq-polymérase.....	2 unités
- MgCl ₂ à 25 mmol/L.....	6µL
- tampon PCR 10X.....	10 µL
- eau distillée.....	59 µL

DOCUMENT 11b : protocole d'amplification

L'ADN à amplifier est traité 5 minutes à 94°C, puis il subit les étapes suivantes : 1 minute à 94°C, 1 minute à 65°C, 2 minutes à 70°C... qu'on répète 30 fois.

DOCUMENT 12 :
DETECTION DE LA SEQUENCE AMPLIFIEE PAR ELECTROPHORESE EN
GEL D'AGAROSE

DOCUMENT 12a : schéma de l'électrophorégramme



Témoin de taille : ADN du phage λ coupé par Bst E1 = puits 11

Echantillons (lots de la série 1 testés par la méthode VIDAS) :

Lots	1		2		3		4		5	
	[A]	[AH]								
Puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

DOCUMENT 12b : distance de migration des différents fragments d'ADN

Témoin de taille :

Paires de bases	15 500	9 800	4 000	3 595	1 450	290	160
Distances de migration en mm	22	23	27	28	36	51	56

Echantillons :

Lots	1			2		
	[A]	[AH]		[A]	[AH]	
Distances de migrations en mm	48	52	57	48	52	57