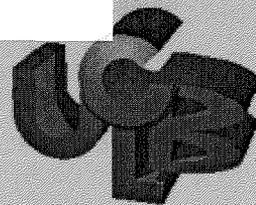


CONSULTATION SUR PLACE
OUI

PRET
OUI

PEB
OUI



DESS Ingénierie Documentaire
Rapport de recherche bibliographique

**Quantification bactérienne par
techniques de biologie moléculaire**

LAMRIRI Nouredine

Sous la direction de

PERNELLE Jean-jacques

CEMAGREF - UR QHAN
Parc de Tourvoie BP 44
92163 Antony

Année 1999 – 2000

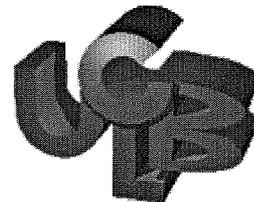
BIBLIOTHEQUE DE L'ENSIB



8141684



M 2000 ID 18



DESS Ingénierie Documentaire
Rapport de recherche bibliographique

**Quantification bactérienne par
techniques de biologie moléculaire**

LAMRIRI Nouredine

Sous la direction de

PERNELLE Jean-jacques

CEMAGREF - UR QHAN
Parc de Tourvoie BP 44
92163 Antony

Année 1999 – 2000

QUANTIFICATION DES BACTERIES PAR TECHNIQUE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.

LAMRIRI Nouredine

Résumé :

Les bactéries sont impliquées dans de nombreux phénomènes. Or, la quantification d'une population microbienne, appartenant à un groupe phylogénétique spécifique, est sans aucun doute une première réussite dans une meilleure connaissance de ces micro-organismes. Ainsi, ce travail se propose de faire un bilan sur les différentes techniques de quantification existantes, utilisant des concepts appartenant à la biologie moléculaire.

Mots-clés : bactérie, analyse quantitative, quantification, réaction chaîne polymérase, dénombrement, méthode, technique.

Abstract :

Bacteria are involved in lots of phenomenum. However, a microbial population quantification, for example of a specific phylogenetic group, is without doubt a first success in a better knowledge of these microorganisms. Moreover, this work aims to review on the different existing quantification techniques using concepts which belong to molecular biology.

Keywords : bacteria, quantitative analysis, quantization, polymerase chain reaction, enumeration, method, technique.

SOMMAIRE

Introduction	4
PREMIERE PARTIE : Recherche bibliographique	5
1) Etude préalable	6
2) recherche manuelle	6
3) Recherche sur CD-ROM	6
a) Bases de données interrogées.....	7
b) Equations de recherche.....	8
c) Résultats.....	9
4) Recherche en ligne	10
a) Détermination des bases de données pertinentes.....	10
b) Equations de recherche.....	11
c) Résultats.....	12
5) Recherche sur internet	12
a) Listes de discussion.....	13
b) Le World Wide Web.....	13
6) Optimisation de la recherche	14
a) Sur les notices au niveau du champ auteur et descripteur.....	14
b) Sur les documents au niveau de la bibliographie.....	14
7) Schéma récapitulatif	15
8) Exploitation des résultats	16
a) Bilan.....	16
b) Evaluation du coût financier.....	17
c) Evaluation du temps.....	17
d) conclusion.....	17
DEUXIEME PARTIE : Synthèse	18
Introduction	19
1) Techniques dérivées de la PCR	19
a) La PCR.....	19
b) Exemple de techniques.....	20

b.1) Quantitative-MPN-PCR.....	20
b.2) PCR-ELISA.....	20
b.3) Quantitative-competitive-PCR.....	20
2) Technique d'hybridation des acides nucléiques.....	21
a) Par quantification d'ADN.....	21
a.1) Principe.....	21
a.2) Exemple : Slot-blot.....	22
b) Hybridation in situ de sondes fluorescente (FISH).....	22
b.1) Principe et application.....	22
Conclusion.....	23
 TROISIEME PARTIE : Bibliographique.....	 24

Introduction

Les micro-organismes font partie intégrante des écosystèmes. Ils influent, par exemple, directement sur la santé des organismes supérieurs en prévenant ou en causant des maladies, et sont essentiels pour le cycle global des nutriments.

Une meilleure compréhension du rôle et de l'impact des bactéries impliquent de connaître les caractéristiques spécifiques d'une population bactérienne au cours du temps. Or, la quantification d'une population microbienne, appartenant par exemple à un groupe phylogénétique spécifique, constitue sans aucun doute une première réussite dans la connaissance de ces micro-organismes.

Face à l'existence de différents problèmes de quantification des bactéries, dus à des problèmes d'environnement, ou de spécificité de détection, de nombreuses techniques de biologie moléculaire ont été développées et ont abouti à l'élaboration de méthodes ayant chacune leur spécificité.

Ce travail de recherche bibliographique a surtout vocation de servir d'amorce à tout chercheur désirant effectuer des recherches dans ce domaine ou voulant prendre connaissance des différentes techniques existantes à ce jour. Le but étant d'offrir des documents dédiés uniquement à la quantification des bactéries via des techniques de biologie moléculaire.

PREMIERE PARTIE : Recherche bibliographique

1) Etude préalable.

Ce sujet se situe dans le domaine de la biologie moléculaire et plus spécifiquement aux techniques, associées à ce domaine, impliquées dans la quantification des bactéries.

Pour débiter dans cette recherche, mon commanditaire m'a aiguillé en m'indiquant quelques références et mots-clés. A l'issue des différentes conversations que nous avons eu, et de l'analyse de l'ensemble des informations en ma possession (références, mots-clés,...), un pool de termes en langage naturel a été établi. Ce pool de termes se veut exhaustif, car il n'a pas vocation d'être utilisé directement pour une interrogation. En effet, il présente un éventail de termes pouvant être utilisé pour une recherche après être, bien sûr, passé par un crible tel qu'un thésaurus ou un index.

Enfin, suite à l'analyse des besoins de mon commanditaire de grandes directions ont conjointement été définies qui consistent à rechercher uniquement des documents en anglais dans la période allant de 1994 , à nos jours, et de ne rechercher que des références d'articles.

2) Recherche manuelle.

Le principal langage d'interrogation, dans les bases de données touchant au domaine de la biologie moléculaire, est l'anglais. Ainsi, préalablement à toute recherche, il fut nécessaire de traduire l'ensemble des termes via l'utilisation du dictionnaire français/anglais Robert et Collins et du thésaurus biomédical français/anglais adapté au Mesh (réalisé par l'INSERM 1998).

La détermination des descripteurs pertinents pour les différentes bases interrogées a été réalisée grâce à l'utilisation de différents thésaurus dont le Mesh et EmTree.

Enfin, lors de l'interrogation en ligne, il fut nécessaire de consulter les Blues Sheet (serveur DIALOG) qui constituent de véritables fiches d'identité des bases de données proposées par le serveur Dialog (*cf.recherche en ligne*).

3) Recherche sur CD-ROM.

Lorsque l'on a la possibilité d'explorer différentes sources, commencer par une recherche sur CD-ROM semble être une bonne alternative car elle présente plusieurs avantages :

- Dans le domaine de la biologie il existe de nombreuses bases sur ce support.
- L'interrogation n'est pas payante, donc possibilité de réaliser une interrogation très complète sur différents champs. Ceci permettant d'avoir une bonne base de références à traiter et à exploiter pour la suite du travail.
- Enfin, lors de l'interrogation des bases sur CD-ROM, on a la possibilité d'établir sereinement une stratégie en vue de la recherche sur les bases de données en ligne.

Mais une interrogation sur CD-ROM présente également certains inconvénients qu'il est important de considérer :

- Aucune possibilité de réaliser un dédoublement automatique des références obtenues, donc opération réalisée manuellement qui se révèle longue et fastidieuse.
- Une base sur CD-ROM est un stock d'information fini qui, contrairement aux bases en ligne, n'est pas régulièrement mis à jour, ce qui ne permet pas d'obtenir des références très récentes.

a) Bases de données interrogées.

Caractéristiques des bases sur CD-ROM

Nom de la Base	Producteur	Nature des Documents	Domaine	Date d'existence de la forme papier et de la base informatique.
Biosis	Biosciences (Philadelphie)	10000 revues analysées, plus quelques livres et actes de congrès	Science de la vie, humaine, animale ou végétale	Biological abstract: 1969 CD : 1990
EMBASE	Elsevier (Amsterdam)	3800 revues analysées, dont 155 revues françaises	Biomédical au sens large, avec une spécialisation en pharmacologie et toxicologie	Excerpta Medica : 1947 CD : 1974
Pascal	INIST (Nancy)	4000 revues analysées, dont 2000 du secteur biomédical, contient aussi thèses, rapports, actes de congrès, et également les notices de la BDSP*	Sciences, technologies, Médecine, Biologie, Biotechnologie	CD : 1973
Medline	National library of Medicine (NLM) Bethesda (USA)	3800 revues analysées, 60% des USA et UK.	Biomédical, Biologie, Biochimie.	Index Medicus : 1879 CD: 1966

* BDSP = Banque de données en Santé Publique, CD = CD-ROM

b) Equations de recherche.

Les interrogations ont été réalisées à la BU Science et BU Rockefeller sur les bases **Pascal**, **Embase**, **Biosis**, interrogeables sous un accès unique: WinSPIRS (édité par SilverPlatters).

La recherche sur les bases **Embase** et **Medline** a été réalisée, via l'utilisation de leur thésaurus qui se nomme respectivement EmTree et Mesh, et a donné lieu aux mêmes équations de recherche, ceci étant certainement dû aux grandes similitudes structurelles relatives à ces deux thésaurus :

= (quantification OR enumerat*) AND bacteria AND (method* OR technique*)

Pour la base **Biosis** n'ayant pas trouvé de thésaurus spécifique à cette base, j'ai réutilisé l'équation ci-dessus (choix confirmé lors de la consultation de l'index disponible sur le CD-ROM). Mais il faut avouer que ceci a certainement dû augmenter le bruit et le silence dans le lot de références obtenu.

Lors de l'interrogation de la base **Pascal**, l'équation de recherche a été établie grâce à l'index disponible sur le CD-ROM Pascal, qui a permis d'établir l'équation ci-dessous :

= (DEA='quantization' OU DXA='quantitative analysis' OU DEA='quantification' OU DEA='enumerat*') ET (DEA='bacteria' OU DEA='bacterial' OU DEA='bacterium') ET (DEA='method*' OU DEA='technique*')

Dans cette équation il y a volontairement très peu de troncatures car au cours de l'interrogation de la base **Pascal**, un bruit beaucoup trop élevé a été obtenu lorsque :

quanti* a été utilisé au lieu de **quantization**, **quantitative-analysis**, **quantification**

Et

bacteri* a été utilisé au lieu de **bacteria**, **bacterium**, **bacterial**.

Ceci s'expliquant uniquement par le fait que beaucoup de descripteurs non pertinents ont été rapatriés et utilisés dans l'équation de recherche à cause de ces troncatures.

Exemple d'une interrogation : Biosis :

- quantification OR enumerat*	= 21738	
- bacteri*	= 254286	--
PCR OR 'polymerase chain reaction'	= 177230	
- dot-blot*	= 1473	
- quanti*	= 225243	
- (quanti* OR enumerat*) AND bacteri*	= 8211	
- (quanti* OR enumerat*) AND bacteri* AND (PCR OR 'polymerase chain reaction' OR dot-blot*)	= 1520	
- (quanti* OR enumerat*) AND bacteria AND (PCR OR 'polymerase chain reaction' OR dot-blot*)	= 440	
- (quantification OR enumerat*) AND bacteria AND (PCR OR 'polymerase chain reaction' OR dot-blot*)	=	76

c) Résultats.

Le tableau ci-dessous indique pour chacune des bases le nombre de références:

- qui ont été rapatriées suite à l'interrogation.
- qui se sont révélées pertinentes. Et obtenues par un premier filtrage que j'ai réalisé (afin d'offrir une valeur ajoutée à mon commanditaire) et où seront éliminées les références qui sont nettement hors sujet. Puis par second filtrage, réalisé cette fois par mon commanditaire, qui validera définitivement les références.

Après dédoublement, **30** références ont finalement été retenues pour la bibliographie.

Résultat de la recherche sur CD-ROM

Nom de la Base	Biosis	EMBASE	Medline	Pascal	Total
Références totales	76	20	47	62	181
Références pertinentes	15	6	13	18	52

DEDOUBLONNAGE

30

4) Recherche en ligne.

Cette recherche a été réalisée sur le serveur **DIALOG** à l'ENSSIB. Ce serveur, qui appartient à la société Knight-Ridder, regroupe actuellement environ 980 Bases dans tous les domaines de connaissance.

L'interrogation en ligne, dans le cadre de ma recherche, a eu essentiellement comme rôle de compléter le travail réalisé sur CD-ROM. Ceci pouvant être décliné en deux facettes bien distinctes qui sont :

- d'interroger les bases pertinentes qui n'étaient pas disponibles sur CD-ROM.
- De réinterroger en ligne les bases sur CD-ROM les plus pertinentes, sur la période où elles n'ont plus été mises à jour. Les bases choisies ont été **BIOSIS, PASCAL**

Sur DIALOG, la principale contrainte reste sans aucun doute la facturation. Pour pallier à ceci, il est préférable d'établir préalablement une stratégie de recherche (dans mon cas sur CD-ROM).

Les principaux avantages, d'une interrogation en ligne, sont que:

- les bases sont régulièrement mises à jour, ce qui permet d'obtenir des références très récentes.
- le serveur offre un large éventail de bases.
- De nombreuses fonctions facilitant tout type de recherche sont proposées (dédoublonnage automatique, dial index, profil...).

a) Détermination des bases de pertinentes.

Dans le but de déterminer les bases pertinentes, disponibles sur DIALOG mais pas sur CD-ROM, j'ai utilisé un outil proposé par ce serveur nommé le Dial-Index qui a la suite d'une interrogation simple m'a proposé les dix bases les plus pertinentes :

Your last SELECT statement was: :

S (ENUMERATION OR QUANTIZATION OR QUANTIFICATION) AND BACTERI???

Ref Items File

<i>Ref</i>	<i>Items</i>	<i>File</i>
N1	2018	654: US Pat.Full._1990-1999/Nov 16
N2	1425	5: Biosis Previews(R)_1969-1999/Oct W5
N3	1235	440: Current Contents Search(R)_1990-1999/Dec W1
N4	863	144: Pascal_1973-1999/Oct
N5	766	34: SciSearch(R) Cited Ref Sci_1990-1999/Nov W3
N6	608	73: EMBASE_1974-1999/Nov W2
N7	604	155: MEDLINE(R)_1966-1999/Dec W4
N8	580	348: European Patents_1978-1999/Nov W45
N9	391	76: Life Sciences Collection_1982-1999/Sep
N10	388	50: CAB Abstracts_1972-1999/Oc

Suite à ce résultat, j'ai consulté les blues sheet (fiche descriptive des bases sur DIALOG) associées à ces bases afin de sélectionner celles qui seront interrogées. A l'issue, les bases choisies ont été **Current Content, Life Science Collection, Embase, Pascal** (cf caractéristique 3) a).

Caracteristiques des bases en ligne

Nom de la Base	Current Content	Life Science Collection	PASCAL	BIOSIS
Date d'existence de la base	De 1990 à nos jours	De 1978 à nos jours	<i>(voir caractéristiques des bases CD- ROM)</i>	
Producteur	ISI, Institut de l'Information Scientifique. (Philadelphie)	Cambridge Scientific Abstract (Cambridge)		
Nature des Document	6500 périodiques	5000 périodiques, rapport de conférence, brevet		
Domaine	Scientifique, science social, art.	Biologie, biotechnologie, toxicologie		
Mise à jour	Toutes les semaines	Tous les mois	Tous les mois	Tous les mois

b) Equations de recherche.

Pour les quatre bases l'interrogation fut identique, sauf à l'étape **S4** les bases **PASCAL** et **BIOSIS** furent interrogées uniquement sur l'année 1999 et 2000. Car les années précédentes ,pour ces deux bases, ont été couvertes sur CD-ROM.

Exemple : Interrogation des bases Current content et LifeScience Collection

S1 1226150 METHOD OR TECHNIQUE
S2 482 (QUANTIFICATION??(N)BACTER???) OR (ENUMERAT???(N)BACTER???)
S3 111 S1 AND S2
S4 72 S3 AND (PY=2000 OR PY=1999 OR PY=1998 OR PY=1997 OR
PY=1996 OR PY=1995 OR PY=1994)
S5 56 RD (unique items)

c) Résultats.

Résultat de la recherche en ligne

Nom de la base	Biosis	Pascal	Life Science Collection	Current Content	Total
Références Totales	14	16	20	36	86
Références Pertinentes	6	11	15	7	39

Les 39 références pertinentes obtenues ont été ajoutées au pool de références total (cf. schéma 7) et à l'issue du dédoublement (par rapport aux documents sur CD-ROM) 15 documents ont été retenus pour la bibliographie.

5) Recherche sur INTERNET.

L'Internet, réseau de réseaux offre de multiples opportunités de part la variété des ressources et des outils disponibles. Ainsi, face à l'océan d'information qu'est l'Internet, il fallut, dans un soucis d'efficacité, définir une stratégie de recherche. Celle-ci a été établie en fonction des besoins de mon commanditaire qui ne désirait obtenir, essentiellement, que des références d'articles (fiables, bien sûr).

Pour ce faire, j'ai utilisé : les **listes de discussions**, et les **moteurs de recherche**.

a) Listes de discussions.

Dans le cadre de ma recherche, les listes de discussions pertinentes, déterminées via les moteurs de recherche, ont été interrogées dans le but :

- de m'orienter en sollicitant des conseils sur d'éventuels sites dans le domaine.
- de m'indiquer des références d'articles traitant du sujet (et le cas échéant vérifier la pertinence de la référence proposée).

Listes interrogées:

www.molbio.org

www.protocol-online.net/discussion/index.htm

www.nwfsc.noaa.gov/protocols/resources.html#prot

La question posée fut : " I'm a french student, owing to my studies, I'm searching all information concerning sites or articles references in the bacteria's quantification by molecular biology technique "

A l'issue, il ressort que, malgré l'avantage de ce type de recherche qui demande très peu de temps et permet de toucher un large segment de population spécialisé dans le domaine, les résultats n'ont pas été concluants. Car, suite à l'ensemble des messages envoyés, aucune réponse exploitable n'a été obtenue. En effet, au cours de mon travail de recherche bibliographique ce moyen n'a constitué en aucun cas une source fiable d'information mais plus une opportunité.

b) Le World Wide Web.

Sur l'ensemble du travail de recherche effectué sur Internet, Excite, Alta Vista, Google ont permis d'obtenir des résultats intéressants.

Google :

Equation : Bacteria quantification technique

Réalisant des recherches par popularité, ce moteur a permis d'obtenir des adresses de sites références dans le domaine de la bactériologie, mais aucun de ces sites n'offraient des informations sur des articles spécifiques à mon sujet.

Alta Vista et Excite:

Equation Alta vista : (method OR technique) AND bacteria AND (quantification OR enumerate)

Equation Alta vista : discussion AND biology

Equation Excite : method bacteria quantification

Les résultats obtenus avec ces deux moteurs furent principalement des adresses de sites d'université, ou d'industriel spécialisé dans le domaine, ou enfin des sites dédiés à des congrès.

L'analyse de toutes ces pages fut longue et fastidieuse, et n'a permis de trouver que 1 référence pouvant s'ajouter à la bibliographie. Obtenue à partir du site Zoopole (visité le 07/01/2000) à l'adresse : www.cbb.developpement.com/00/\10\1049.htm

Le site de la National Ligue of Medecine offre la possibilité d'interroger la base **Medline** gratuitement et a permis d'obtenir 3 références qui n'étaient pas disponibles lors de l'interrogation de

cette même base sur CD-ROM. De plus, dans un souci d'efficacité à moindre coup, la base Medline a été régulièrement interrogée sur ce site jusqu'au 1 mars 2000.

Equation : (quantification OR enumerat*) AND bacteria AND (method* OR technique*)

La base de l'INIST interrogeable, via leur site, a également permis de trouver **1** référence.

Ainsi de manière générale, l'Internet est source qui n'a pas été pertinente pour la recherche de références d'articles. Mais part contre, cette source est très utile pour obtenir des informations relative à des organismes ou des produits, et également pour se constituer un carnet d'adresse. Malheureusement se type d'information n'était pas utile dans le cadre de ma recherche.

6) Optimisation de la recherche.

Jusqu'à cette étape, toutes les recherches décrites ci-dessus suivent fondamentalement le même plan, qui est d'interroger une source d'information afin d'obtenir des références de documents que l'on ne possède pas.

Or, dans cette étape l'optique diffère quelque peu, car à présent, le but est d'exploiter le pool de références obtenu afin d'extraire des informations permettant de rapatrier de nouvelles références. Pour ce faire, ce travail a été réalisé :

a) Sur les notices au niveau des champs auteur et descripteur.

L'analyse du champ descripteur a eu comme rôle de compléter et de confirmer la pertinence des descripteurs choisis pour l'équation, et éventuellement d'apporter de nouveaux descripteurs.

Le champ auteur a été analysé afin de dégager le nom des auteurs qui ont publié les références les plus pertinentes. Suite à cela, les bases sur CD-ROM ont été réinterrogées sur le champ auteur. Ce travail a permis d'ajouter **2** références de plus à notre bibliographie.

b) Sur les documents au niveau de la bibliographie.

N'ayant pas le temps d'analyser l'ensemble des références pertinentes obtenues, la décision a été prise d'analyser uniquement la bibliographie des **articles de références** (cf.bibliographie). Ceci a permis de m'informer sur toutes les techniques de quantification bactérienne existantes, et de compléter mon pool de **3** références.

7) Schéma récapitulatif.

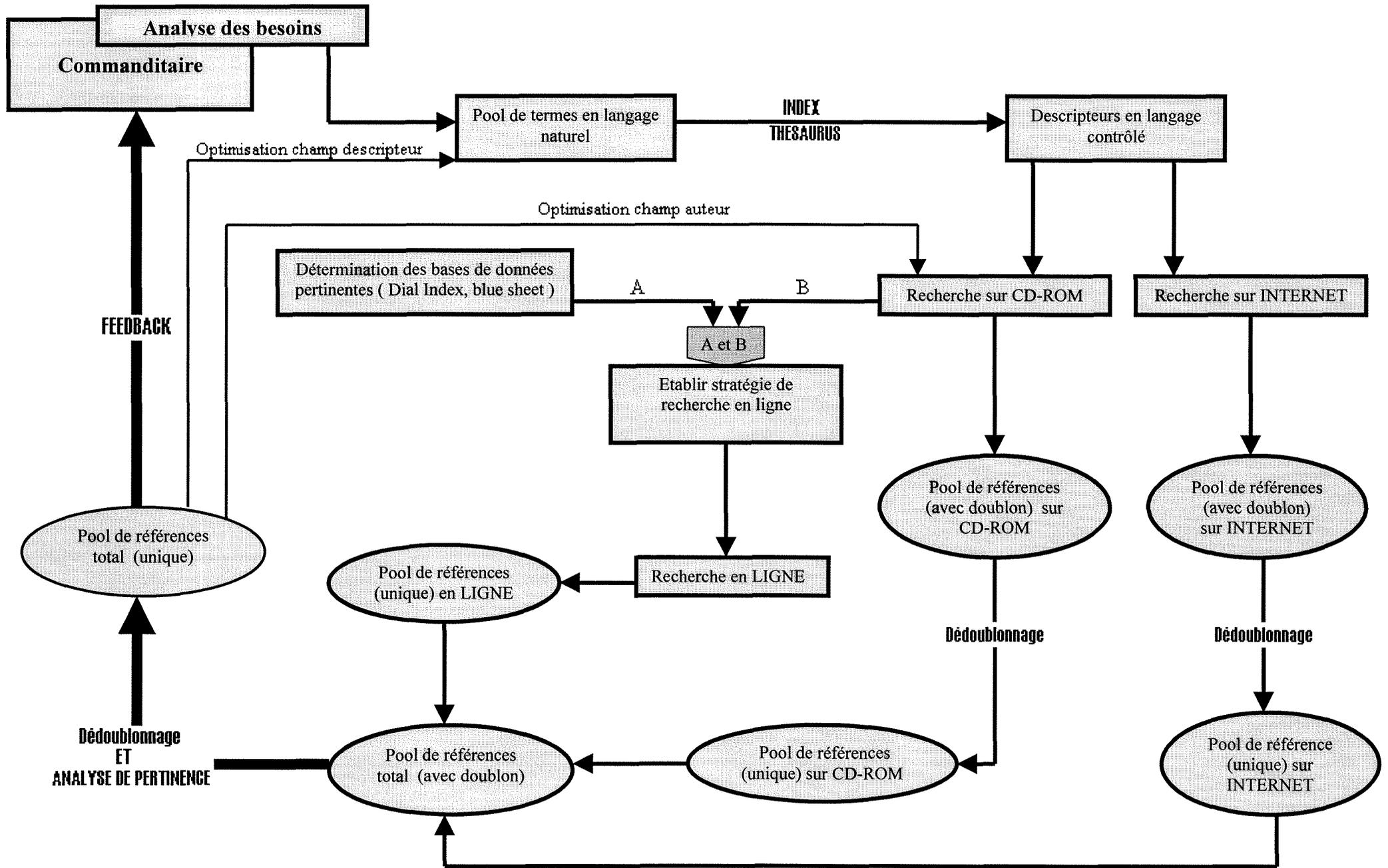
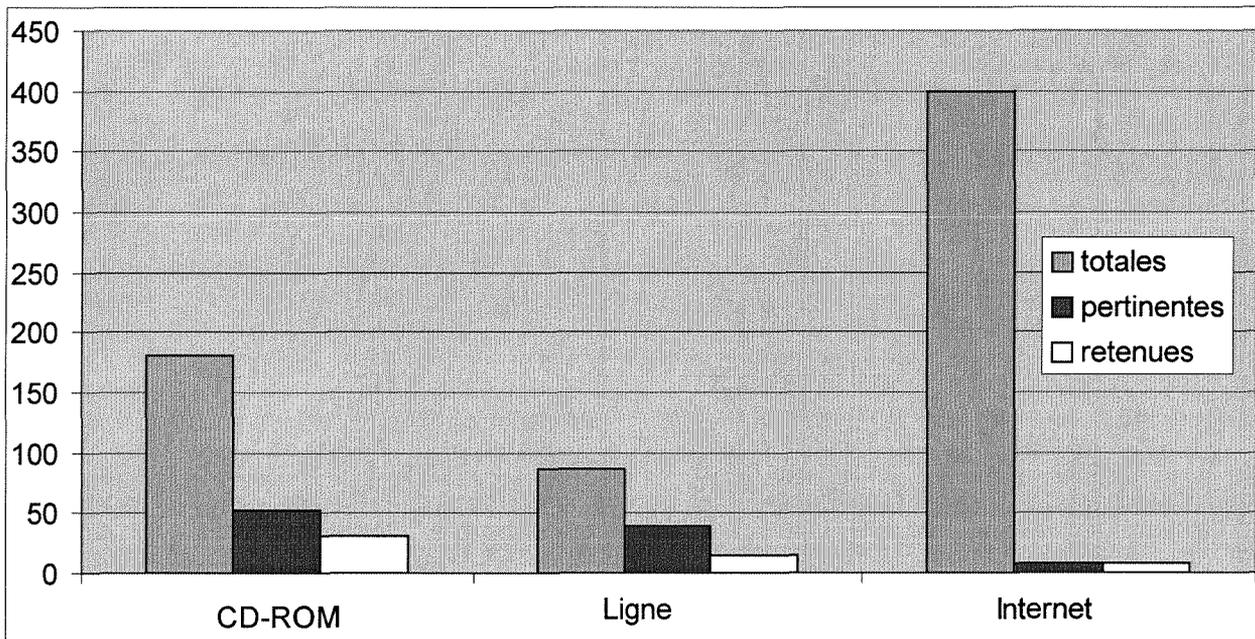


Schéma récapitulatif de la stratégie de recherche

8) Exploitation des résultats.

a) Bilan.

A la fin de ma recherche, j'ai obtenu un total de **55** références pertinentes qui ont toutes été retenues pour la bibliographie. La synthèse a été réalisée avec **8** références qui ont pu être physiquement obtenues grâce à l'utilisation du CD-ROM Myriade. L'ensemble des références a pu être obtenu à la BU Science.



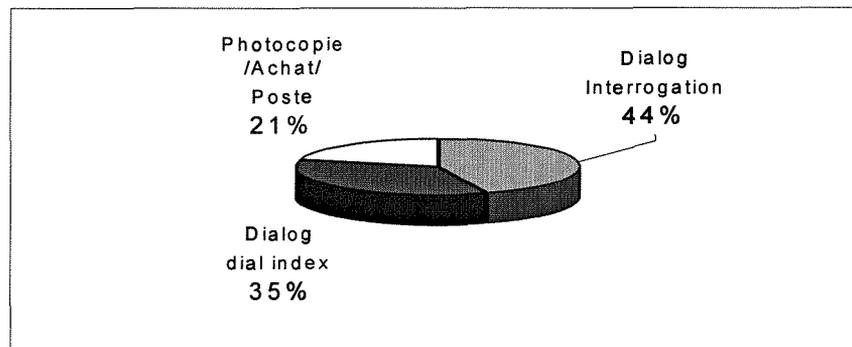
Répartition des références en fonction des sources.

Le graphique ci-dessus met clairement en évidence la pertinence des résultats en fonction des sources consultées. Pour la recherche sur CD-ROM, sur l'ensemble des références obtenues avec cette source 18% ont été retenues pour la bibliographie; alors que pour la recherche en Ligne 17% ont été retenue et pour la recherche sur Internet moins de 1%. Ceci confirme le fait que l'Internet n'est pas une source très pertinente pour la recherche de références bibliographiques. La recherche en Ligne et sur CD-ROM ont, par contre, donné des résultats assez similaires mais pour des raisons inhérentes à aux défauts de ces sources (coût élevé sur DIALOG, mise à jour sur CD-ROM) elles restent complémentaires.

Egalement, 60% des références pertinentes obtenues sur CD-ROM ont été retenues pour la bibliographie, ceci étant dû principalement au dédoublement (cf. *méthodologie 7*). Alors que pour la recherche en Ligne seulement 40% des références ont été retenue, la raison pouvant expliquer ce chiffre est qu'il y ait une zone de couverture identique importante entre les bases consultées sur CD-ROM et en Ligne (beaucoup de références éliminées au dédoublement). Enfin 100% des références sur Internet ont été conservées, mais ce résultat n'est pas exploitable au vue du faible nombre de références obtenues avec cette source.

b) Evaluation du coût financier.

Dialog : *dial index* : 148 fr.
Interrogation : 115 fr.
Photocopie/achat/poste : 70 fr.



Estimation (en %) de la répartition de la somme totale

On peut remarquer au vue de ces résultats, que l'utilisation de la fonction "dial index" proposée par le serveur Dialog a un coût élevé, car il constitue à lui seul 35% de la somme totale allouée à cette recherche bibliographique. Donc convient d'utiliser cette fonction que si l'on désire interroger ce serveur et que l'on ne connaît vraiment pas les bases qui se révèlent pertinentes.

c) Evaluation du temps .

Dialog : 50 min
Internet : 15 h
CD-ROM : 2 h
Analyse, tri, traduction : 50 h

Après avoir mis en exergue la faible pertinence de l'Internet pour la recherche de références d'articles, il convient également de signaler que ceci a surtout été mis en évidence par le rapport nombre de références retenue/temps de recherche.

d) conclusion.

En conclusion, on peut dire que pour qu'une recherche soit de qualité, il est important d'avoir bien cerné qu'elle sont les besoins, et les attentes du commanditaire. Mais ceci, pas dans le but de visualiser le résultat final; mais plutôt dans un soucis de collecte d'informations fiables conduisant à ce résultat. Car paradoxalement, ce travail a pour but de répondre à un besoin, qui est souvent difficile à définir au départ, et chaque conversation, chaque dialogue, doit être analysé et constitué le principal fil directeur.

S'ajoutant à cela, il y a également d'autres compétences très importantes telles que la maîtrise des outils utilisés au cours de la recherche (réduit silence et bruit), et la capacité d'identifier les sources les mieux adaptées.

DEUXIEME PARTIE : Synthèse

Introduction

Initialement, certaines techniques de biologie moléculaire, comme les sondes à ADN ou la PCR, étaient utilisées afin de déterminer uniquement la présence ou l'absence d'un micro-organisme. Actuellement, de plus en plus de ces techniques sont développées dans le but de quantifier des populations bactériennes spécifiques. Or, l'identification et la détermination du nombre de cellules bactériennes d'une souche spécifique, dans un échantillon, relève du véritable défi, certainement parce que les populations microbiennes sont complexes et très diverses. Il faut savoir qu'il peut y avoir jusqu'à un millier de génotypes différents dans un seul gramme de terre. Les méthodes mises en place doivent par conséquent cibler une caractéristique spécifique de la bactérie d'intérêt. Ceci a conduit à l'établissement de nombreuses techniques offrant aux microbiologistes un large éventail de possibilités.

Cette synthèse n'a pas pour objectif de traiter l'ensemble des méthodes existantes dans le domaine de la quantification des bactéries; mais plutôt de présenter les principales techniques.

1) Techniques dérivée de la PCR.

a) La PCR.

Réaction de polymérisation en chaîne, ou P.C.R (pour *polymerase chain reaction*) est une technique d'amplification génique qui confère au diagnostic génotypique une sensibilité permettant de détecter parfois jusqu'à une seule copie d'une séquence génomique spécifique. Elle utilise la propriété de l'enzyme ADN polymérase de synthétiser le brin complémentaire d'un ADN simple brin servant de matrice en assemblant des nucléotides (comme dans le mécanisme naturel de répllication de l'ADN). La réaction débute par l'hybridation d'une courte séquence d'ADN (quelques dizaines de bases) spécifique de l'ADN à amplifier (amorce d'amplification) sur chacun des deux brins de l'ADN dénaturé par chauffage, le choix de ces amorces est déterminant, car c'est ce facteur qui permettra d'amplifier spécifiquement l'ADN d'intérêt (séquence 16S rDNA très souvent utilisée pour les techniques de quantification). L'adjonction d'une ADN polymérase thermorésistante (extraite de *Thermus aquaticus*, une espèce bactérienne adaptée aux eaux chaudes) permet d'aboutir en quelques minutes à deux copies de l'ADN original. Après n cycles consécutifs, le nombre de copies d'ADN amplifié (amplicon) atteindra au plus 2^n en quelques heures, offrant ainsi une sensibilité de détection extraordinairement élevée par comparaison avec les méthodes de culture les plus performantes.

Concrètement, la PCR a l'avantage d'être à la fois rapide et peu coûteuse; il convient pourtant d'être très prudent lorsque l'on utilise cette technique

Le produit obtenu suite à une PCR classique ne permet pas de quantifier des bactéries car le nombre de copie de 2^n après n cycle est théorique, il est en fait variable et non reproductible, il fut donc nécessaire d'optimiser cette technique. Les méthodes décrites, ci-dessous, en sont quelques exemples.

b) Exemples de techniques.

b.1) Quantitative-MPN-PCR.

Une Quantitative-MPN-PCR (*MPN comme Most Probable Number*), se réalise par de multiples PCR sur des échantillons qui ont été dilués en série, chaque dilution est amplifiée en trois exemplaires. Ensuite, le nombre de réactions positives (lorsque le produit de réaction atteint un certain seuil de détectabilité) est comparé à la table MPN éditée permettant une estimation du nombre de copies d'ADN dans l'échantillon. Cette technique a déjà été utilisée pour, par exemple, énumérer une population de "Nitrobacter", où il ressort que pour que cette technique soit efficace avec cette population, il est nécessaire de limiter l'ADN et les cellules perdus au cours du protocole pour que les résultats de la PCR soit fiable [25].

b.2) PCR-ELISA.

Une technique de PCR-ELISA (*pour enzyme linked immunosorbent assay*) se compose d'une PCR classique réalisée en utilisant des amorces permettant d'amplifier l'ADN d'intérêt et d'une méthodologie d'immunodosages quantitatifs fondée sur l'interaction primaire Ag-Amorce.

Cette réaction immunologique est fondée sur une technique de marquage par une enzyme de l'un des éléments, l'antigène ou l'anticorps, qui intervient dans la réaction. L'utilisation d'enzymes comme marqueur présente l'avantage considérable de conférer une grande sensibilité à la réaction Ag-Ac en raison de la propriété de l'enzyme liée à l'un des partenaires de la réaction (le plus souvent l'anticorps) de transformer un très grand nombre de molécules de substrat, c'est-à-dire à l'amplification du signal servant de révélateur de la réaction. Une étude via une PCR-ELISA a été réalisé afin d'énumérer les bactéries se trouvant dans le lait cru, dans cette étude il était important de quantifier l'ensemble des bactéries pouvant se développer dans ce milieu. Pour ce faire, des amorces ont été réalisées en utilisant le gène de la région 16S de l'ARNr afin de construire des amorces communes à une large partie des bactéries se développant dans cet environnement[12].

b.3) Quantitative-Competitive-PCR.

Cette technique est basée sur l'incorporation d'un standard interne pour chaque réaction de PCR. Ce standard interne ou ADN compétiteur devrait ressembler autant que possible à l'ADN cible et être amplifié avec le même jeu d'amorces, mais se distinguerait toujours de la cible, par exemple, par sa taille. Une courbe standard est élaborée en utilisant, une concentration constante d'ADN compétiteur additionné à une dilution en série de l'ADN cible, et du rapport entre le rendement d'amplification de l'ADN par PCR et la concentration initiale d'ADN cible. Cette courbe standard peut ensuite être utilisée pour calculer les concentrations d'ADN cible dans des échantillons environnementaux. L'ADN cible et le compétiteur sont sujets aux mêmes conditions ceci pouvant influencer sur les performances de la Taq polymérase, mais le rapport résultant du produit de la PCR reste toujours valide.

Il existe différents points, dans une procédure d'extraction classique où l'ADN compétiteur peut être ajouté (fig.4). L'addition du compétiteur en "post extraction" peut permettre de calculer précisément le nombre de copies d'ADN cible dans l'ADN qui a été isolé. Ainsi, par utilisation des courbes standards appropriées, il est possible de déterminer le nombre de bactéries qu'il y avait initialement dans l'échantillon. Concrètement, les résultats obtenus avec cette technique semblent être d'aussi bonne qualité que ceux obtenus avec des méthodes de culture classique [33]. De plus, cette technique est plus rapide, car dans le cas de la quantification de la bactérie "Bordetella pertussis" la PCR compétitive a été réalisée en 1 jour, contre 3 à 10 jours avec des cultures [29].

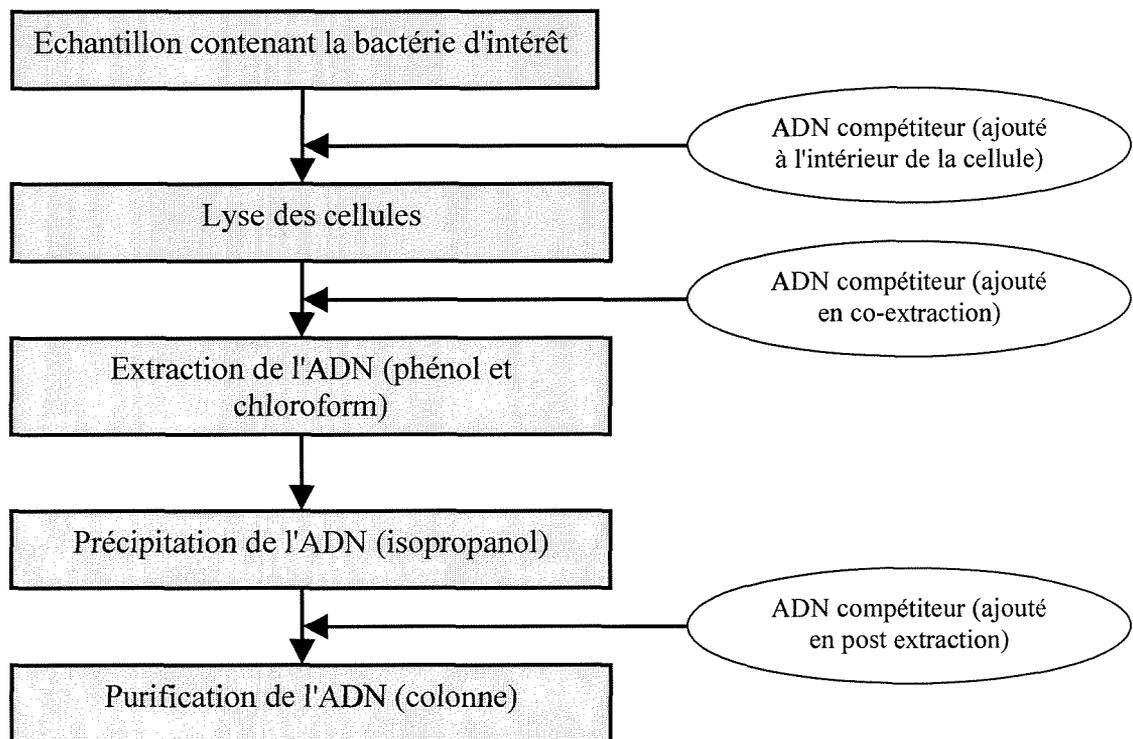


Fig.1: représentation schématique indiquant les différents points où peut être ajouté l'ADN compétiteur au cours d'un protocole d'isolation d'ADN à partir d'un échantillon environnemental.

2) Technique d'hybridation des acides nucléiques.

a) Par quantification d'ADN.

a.1) Principe.

La manière la plus simple de détecter une séquence spécifique d'acide nucléique, ou un gène d'intérêt se fait par hybridation directe d'une sonde ADN ou ARN avec un extrait d'acide nucléique

bactérien. L'ADN ou l'ARN de cellules entières est extrait du microbe se trouvant dans l'échantillon expérimental par des techniques de centrifugation différentielle ou d'extraction directe, et est fixé sur une membrane chargée positivement (nitrocellulose, nylon). Les acides nucléiques fixés sur la membrane sont hybridés avec un oligonucléotide ADN ou ARN constitué d'une séquence complémentaire à la séquence cible. Cette sonde est marquée avant hybridation. Une sonde ADN peut être utilisée pour détecter des gènes d'un génome bactérien, ou pour détecter des ARNm ou des ARNr. Dans la mesure où l'extraction des acides nucléiques est quantitative, le signal obtenu par la suite par hybridation l'est également.

a.2) Exemple : Slot-Blot.

Cette technique peut être utilisée pour quantifier des bactéries, ainsi après extraction de l'ADN, une séquence d'ADN cible spécifique peut être quantifiée par Slot-Blot en utilisant la séquence cible comme une sonde. L'intensité d'hybridation de la sonde sur l'ADN concentré dans les dépôts sur la membrane est comparée à une série de dilution de l'ADN cible. Les fentes avec une intensité d'hybridation identique sont jugées comme ayant la même concentration de cette ADN cible. Cette méthode peu efficace a une sensibilité de 10^4 cells/g de sol [1].

b) Hybridation in situ de sondes fluorescente (FISH).

b.1) Principe et application.

Une des caractéristiques intéressantes inhérente à cette technique est qu'elle permet d'intervenir sur une communauté microbienne sans en modifier la structure, ceci permettant d'obtenir des informations sur l'organisation générale du système. Cette technique permet également de quantifier des bactéries directement dans leur environnement sans les avoir préalablement cultivées.

Le principe est le suivant, sur un support (biofilm...) les cellules entières sont traitées par du paraformaldéhyde. Ces cellules ainsi fixées et perméabilisées sont exposées à une sonde, souvent un oligonucléotide, qui a été marquée par un agent fluorescent tel que la fluorescéine. La sonde ADN se lie à la séquence ADN ou ARN qui lui est complémentaire à l'intérieur de la cellule. Ainsi grâce à cette méthode, il est possible de détecter via l'utilisation d'un microscope à épifluorescence les bactéries qui contiennent la séquence complémentaire qui s'est hybridé à la sonde.

La méthode FISH (*pour fluorescente in situ hybridation*) peut donc permettre de marquer, détecter, et quantifier des bactéries dans de nombreux environnements comme par exemple dans l'eau de mer [5], et ceci sans avoir à les cultiver. L'intensité de marquage est plus importante si les sondes ciblent des ARNr. Quelques réserves toutefois, car les résultats obtenus avec cette technique sont souvent inférieurs à ceux obtenus avec des techniques classiques de culture en plaque, car l'intensité de marquage des bactéries cibles dépend de la perméabilité de celles-ci à la sonde, et également de son activité si les sondes ciblent des ARNr.

Conclusion

Les techniques de biologie moléculaire sont actuellement les meilleurs moyens pour quantifier les bactéries dans des milieux naturels (terre, boue, eau...) et dans les aliments, ceci offrant une alternative fiable pour l'énumération des bactéries non-cultivable. L'on constate que cette voie de recherche est en pleine expansion, avec par exemple la technique de Taq Man PCR qui a permis de quantifier dans les aliments la bactéries "Salmonella" en quelques heures [50] ou de quantifier la bactérie "Stachybotrys chartarum conidia" avec la même efficacité que les méthodes de comptages direct mais avec un temps de réalisation beaucoup plus court [49]. Ceci conduisant ce domaine à s'enrichir de méthodes qui sont de plus en plus pointues, et qui sont en général complémentaires, dans le sens où chaque technique de quantification est plus ou moins adaptée à tels type d'études ou de milieu.

TROISIEME PARTIE : Bibliographie

La formalisation des références bibliographiques a été réalisée en suivant la norme AFNOR Z 44-005 (ISO 690).

Le classement des références bibliographiques est deux niveaux, avec un classement par type de technique et chaque technique est ordonnée par ordre alphabétique des auteurs.

SLOT-BLOT.

[1] **Ross J L, Boon P I, Ford P, Hart B T.** Detection and quantification with 16S rRNA probes of planktonic methylotrophic bacteria in a floodplain lake. *Microbial Ecology*. 1997, vol.34, no.2, p.97-108, ISSN 0095-3628.

DOT-BLOT.

[2] **Oude Elferink S J W H, Boschker Henricus T S, Stams Alfons J M.** Identification of sulfate reducers and Syntrophobacter sp. In anaerobic granular sludge by fatty-acid biomarkers and 16S rRNA probing. *Geomicrobiology Journal*. 1998, vol.15, no.1, p.3-17, ISSN 0149-0451.

[3] **Oude Elferink S J W H, Rinia H A, Bruins M E, De Vos W M, Stams A J M.** Detection and quantification of *Desulforhabdus amnigenus* in anaerobic granular sludge by dot blot hybridization and PCR amplification. *Journal of Applied Microbiology*. 1997, vol.83, no.1, p.102-110, ISSN 1364-5072.

FISH.

[4] **Delong E F, Taylor L T, Marsh T L, Preston C M.** Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, vol.65, no.12, p.5554-5563, ISSN 0099-2240.

[5] **Harmsen H J M, Prieur D, Jeanthon C.** Group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify thermophilic Bacteria in marine hydrothermal vents. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997, vol.63, no.10, p.4061-4068, ISSN 0099-2240.

[6] **Harmsen H J, Gibson G R, Elfferich P, Raangs G C, Wildeboer-Veloo A C, Argaziz A, Roberfroid M B, Welling G W.** Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. *FEMS Microbiological Letters*. 2000, vol.183, no.1, p.125-134.

[7] **Noble M, Agutter P A, Bradley M I, Ward J M, Titchener-Hooker N J, Buss A D, Turner M K.** Computational fluid dynamics and a quantitative polymerase chain reaction as tools for measuring bioprocess containment. *Process Safety and Environmental Protection*. 1999, vol.77, no.1, p.13-21, ISSN 0957-5820.

[8] **Morris C E, Monier J M, Jacques M A.** A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, vol.64, no.12, p.4789-4795, ISSN 0099-2240.

[9] **Karner M, Fuhrman J A.** Determination of active marine bacterioplankton : a comparison of universal 16S rRNA probes, autoradiography, and nucleoid staining. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997, vol.63, no.4, p.1208-1213, ISSN 0099-2240.

Sondes.

[10] **Jansen G J, Wildeboer Veloo A C M, Tonk R H J, Franks A H, Welling G W.** Development and validation of an automated, microscopy based method for enumeration of groups of intestinal bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 1999, vol.37, no.3, p.215-221, ISSN 0167-7012.

[11] **Fritz E, Thiele D, Willems H, Wittenbrink M M.** Quantification of *Coxiella burnetii* by polymerase chain reaction (PCR) and a colorimetric microtiter plate hybridization assay (CMHA). *European Journal of Epidemiology*. 1995, vol.11, no.5, p.549-557, ISSN 0393-2990.

PCR-ELISA.

[12] **Gutierrez R, Garcia T, Gonzalez I, Sanz B, Hernandez P E, Martin R.** A quantitative PCR-ELISA for rapid enumeration of bacteria in refrigerated raw milk. *Journal of Applied Microbiology*. 1997, vol.83, no.4, p.518-523, ISSN 1364-5072.

[13] **Kunakorn M, Markham R B.** Clinically practical seminested PCR for *Burkholderia pseudomallei* quantitated by enzyme immunoassay with and without solution hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995, vol.33, no.8, p.2131-2135, ISSN 0095-1137.

PCR Quantitative.

[14] **Baumann L, Baumann P.** Growth kinetics of the endosymbiont *Buchnera* in the aphid *Schizaphis graminum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994, vol.60, no.9, p.3440-3443, ISSN 0099-2240.

[15] **Kolk A H J, Nootdhoek G T, De Leeuw O, Kuijper S, Van Embden J D A.** *Mycobacterium smegmatis* strain for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR used as internal control for inhibition of amplification and for quantification of bacteria. *Journal of Clinical microbiology*. 1994, vol.32, no.5, p.1354-1356, ISSN 0095-1137.

[16] **Marsh P, Morris Nathan Z, Wellington E M H.** Quantitative molecular detection of *Salmonella typhimurium* in soil and demonstration of persistence of an active non culturable population. *FEMS Microbiology Ecology*. 1998, vol.27, no.4, p.351-363, ISSN 0168-6496.

[17] **Morrison T B, Ying M A, Weis J J, Weis J H.** Rapid and sensitive quantification of *Borrelia burgdorferi*-infected mouse tissues by continuous fluorescent monitoring of PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999, vol.37, no.4, p.987-992, ISSN 0095-1137.

[18] Mukoda T J, Todd L A, Sobsey M D, Ho J, Griffiths W D. PCR and gene probes for detecting bioaerosols, *Bioaerosols. Journal of Aerosol Science*. 1994, vol.25, no.8, p.1523-1532, ISSN 0021-8502.

[19] Nozawa M, Hu H Y, Fujie K, Tanaka H, Urano K. Quantitative detection of enterobacter cloacae strain HO-1 in bioreactor for chromate wastewater treatment using polymerase chain reaction (PCR). *Water research*. 1998, vol.32, no.11, p.3473-3476, ISSN 0043-1354.

[20] Noble M, Agutter P A, Bradley M I, Ward J M, Titchener-Hooker N J, Buss A D, Turner M K. Computational fluid dynamics and a quantitative polymerase chain reaction as tools for measuring bioprocess containment. *Process Safety and Environmental Protection*. 1999, vol.77, no.1, p.13-21, ISSN 0957-5820.

[21] Park Y M, So J S. Quantitative counting of Bifidobacterium spp. In a sample mixed with Lactobacillus acidophilus. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1998, vol.8, no.2, p.182-184, ISSN 1017-7825.

[22] Rong F W, Wei W C, Cerniglia C E. PCR detection and quantification of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, vol.62, no.4, p.1242-1247, ISSN 0099-2240.

[23] Venkitanarayanan K S, Faustman C, Crivello J F, Khan M I, Hoagland T A, Berry B W. Rapid estimation of spoilage bacterial load in aerobically stored meat by a quantitative polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*. 1997, vol.82, no.3, p.359-364, ISSN 1364-5072.

[24] Watanabe K, Yamamoto S, Hind S, Harayama S. Population dynamics of phenol-degrading bacteria in activated sludge determined by gyrB-targeted quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, vol.64, no.4, p.1203-1209, ISSN 0099-2240.

PCR-MPN.

[25] Malhater L, Degrange V, Guay R, Degorce Dumas J R, Bardin R, Le Cloirec P. Estimating size and diversity of nitrifying communities in deodorizing filters using PCR and immunofluorescence. *Journal of Applied Microbiology*. 1998, vol.85, no.2, p.255-262, ISSN 1364-5072.

[26] Miwa N, Nishina T, Kubo S, Atsumi M, Honda H. Amount of enterotoxigenic Clostridium perfringens in meat detected by nested PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, vol.42, no.3, p.195-200, ISSN 0168-1605.

[27] Mantynen V, Niemela S, Kaijalainen S, Pirhonen T, Lindstrom K. MPN-PCR-quantification method for staphylococcal enterotoxin c1 gene from fresh cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 1997, vol.36, no.2-3, p.135-143, ISSN 0168-1605.

PCR Competitive.

[28] **Cooper S K, Berent L M, Messick J B.** Competitive, quantitative PCR analysis of *Haemobartonella felis* in the blood of experimentally infected cats. *Journal of Microbiological Methods*. 1999, vol.34, no.3, p.235-243, ISSN 0167-7012.

[29] **Erlandsson A, Backman A, Nygren M, Lundeberg J, Olcen P.** Quantification of *Bordetella pertussis* in clinical samples by colorimetric detection of competitive PCR products. *APMIS. Acta pathologica, microbiologica et immunologica Scandinavica*. 1998, vol.106, no.11, p.1041-1048, ISSN 0903-4641.

[30] **Furata T, Kaneko E, Suzuki M, Arai H, Futami H.** Quantitative study of *Helicobacter pylori* in gastric mucus by competitive PCR using synthetic DNA fragments. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996, vol.34, no.10, p.2421-2425, ISSN 0095-1137.

[31] **Hinnebusch B J, Gage K L, Schwan T G.** Estimation of vector infectivity rates for plague by means of a standard curve-based competitive polymerase chain reaction method to quantify *Yersinia pestis* in fleas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998, vol.58, no.5, p.562-569, ISSN 0002-9637.

[32] **Hu X, Lai F M, Reddy A S N, Ishimaru C A.** Quantitative detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology*. 1995, vol.85, no.12, p.1468-1473, ISSN 0031-949X.

[33] **Johnsen K, Enger O, Jacobsen C S, Thirup L, Torsvik V.** Quantitative selective PCR of 16S ribosomal DNA correlates well with selective agar plating in describing population dynamics of indigenous *Pseudomonas* spp. in soil hot spots. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, vol.65, no.4, p.1786-1788, ISSN 0099-2240.

[34] **Lee S Y, Bollinger J, Bezdicek D, Ogram A.** Estimation of the abundance of an unculturable soil bacterial strain by competitive quantitative PCR method. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, vol.62, no.10, p.3787-3793, ISSN 0099-2240.

[35] **Leser T D.** Quantification of *Pseudomonas* sp. strain B13(FR1) in the marine environment by competitive polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*. 1995, vol.22, no.3, p.249-262, ISSN 0167-7012.

[36] **Levesque M J, Beaudet R, Bisailon J G, Villemur R.** Quantification of *Desulfitobacterium frapperi* strain PCP-1 and *Clostridium*-like strain in mixed bacterial populations by competitive polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*. 1998, vol.32, no.3, p.263-271, ISSN 0167-7012.

[37] **Ligozzi M, Pelosi E, Fontana R.** Development of a rapid method for quantitative evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* growth based on competitive polymerase chain reaction. *Journal of Medical Microbiology*. 1998, vol.47, no.10, p.933-936, ISSN 0022-2615.

[38] **Liu H W, Goodwin P H, Kuske C R.** Quantification of DNA from the aster yellow mycoplasma-like organism in aster leafhoppers (*Macrostelus fascifrons* stal) by a competitive polymerase chain reaction. *Systematic and Applied Microbiology*. 1994, vol.17, no.2, p.274-280, ISSN 0723-2020.

- [39] **Moller A, Jansson J K.** Quantification of genetically tagged cyanobacteria in Baltic Sea sediment by competitive PCR. *Biotechniques*. 1997, vol.22, no.3, p.512-518, ISSN 0736-6205.
- [40] **Monteiro L, Hua J, Birac C, Lamouliatte H, Megraud F.** Quantitative polymerase chain reaction for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease*. 1997, vol.16, no.2, p.143-149, ISSN 0934-9723.
- [41] **Rupf S, Kneist S, Merte K, Eschrich K.** Quantitative determination of streptococcus mutans by using competitive polymerase chain reaction. *European Journal of Oral Sciences* . 1999, vol.107, no.2, p.75-81, ISSN 0909-8836.
- [42] **Rudi K, Skulberg O M, Larsen F, Jacoben K S.** Quantification of toxic cyanobacteria in water by use of competitive PCR followed by sequence-specific labeling of oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, vol.64, no.7, p.2639-2643, ISSN 0099-2240.
- [43] **Rupf S, Merte K, Eschrich K.** Quantification of bacteria in oral samples by competitive polymerase chain reaction. *J,Dent,Res*. 1999, vol.78, no.4, p.850-856, ISSN 0022-0345.
- [44] **Sidhu M K, Abbas R, Testa D, Mei June L.** Competitor internal standards for quantitative detection of mycoplasma DNA. *FEMS Microbiology Letters*. 1995, vol.128, no.2, p.207-211, ISSN 0378-1097.
- [45] **Sidhu H, Holmes R P, Allison M J, Peck A B.** Direct quantification of the enteric bacterium *Oxalobacter formigenes* in human fecal samples by quantitative competitive-template PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999, vol.37, no.5, p.1503-1512.
- [46] **Van Elsas J D, Rosado A S, Wolters A C, Moore E, Karison U.** Quantitative detection of *Sphingomonas chlophenolica* in soil via competitive polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*. 1998, vol.85, no.3, p.463-471, ISSN 1364-5072.

PCR CMHA.

- [47] **Sidhu H, Holmes R P, Allison M J, Peck A B.** Direct quantification of the enteric bacterium *Oxalobacter formigenes* in human fecal samples by quantitative competitive-template PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999, vol;37, no.5, p.1503-1509, ISSN 0095-1137.

PCR Taq Man.

- [48] **Gut M, Leutenegger C M, Huder J B, Pedersen N C, Lutz H.** One tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantification of feline coronaviruses. *Journal of Virological Methods*. 1999, vol.77, no.1, p.37-46, ISSN 0166-0934.
- [49] **Haugland R A, Vesper S J, Wymer L J.** Quantitative measurement of *Stachybotrys chartarum* conidia using real time detection of PCR products with the TaqMan(TM)fluorogenic probe system. *Mol.Cell.Probes*. 1999, vol.13, no.5, p.329-369.

[50] **Nogva H K, Lillehaug D.** Detection and quantification of Salmonella in pure cultures using 5'-nuclease polymerase chain reaction. *Int. Journal Food Microbiol.* 1999, vol.51, no.2-3, p.191-197.

[51] **Pahl A, Kuhlbrandt U, Brune K, Rollinghoff M, Gessner A.** Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real time PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 1999, vol.37, no.6, p.1958-1963, ISSN 0095-1137.

[52] **Pusterla N, Huder J B, Leutenegger C M, Braun U, Madigan J E, Lutz H.** Quantitative real -time PCR for detection of members of the Ehrlichia phagocytophila genogroup in host animals and Ixodes ricinus ticks. *Journal of Clinical microbiology.* 1999, vol.37, no.5, p.1329-1331, ISSN 0095-1137.

Articles références.

[53] **Jansson J K, Prosser J I.** Quantification of the presence and activity of specific microorganisms in nature. *Mol. Biotechnol.* 1997, vol.7, no.2, p.103-123, ISSN 1073-6085.

[54] **Felske A.** Rewriting the DA001-files: a 16S rRNA chase on suspect #X99967, a Bacillus and Dutch underground activist. *Journal of Microbiological Methods.* 1999, vol.36, no.1-2, p.77-93, ISSN 0167-7012.

[55] **Feray C, Volat B, Degrange V, Clays Josserand A, Montuelle B.** Assessment of three methods for detection and quantification of nitrite-oxidizing bacteria and Nitrobacter in freshwater sediment (MPN-PCR, MPN-Griess, immunofluorescence). *Microbial Ecology.* 1999, vol.37, no.3, p.208-217, ISSN 0095-3628.

