

R & D METHODES D'ANALYSE LAITIERE

DENOMBREMENT DES SPORES BUTYRIQUES DANS LE LAIT :

APPLICATION DE LA MICRORESPIROMETRIE

Début 2001 un nouveau schéma d'organisation pour la Recherche et le Développement des méthodes d'analyse laitière voit le jour avec, au niveau national, la création d'un organe de coordination, le Comité d'Orientation de la Recherche Analytique Laitière ou CORAL. Mis en place avec une implication forte de CECALAIT, il est destiné à développer des méthodes adaptées aux besoins des laboratoires de la filière laitière.

Le premier projet R&D mené actuellement dans le cadre du CORAL s'attelle à la recherche d'une alternative à la méthode officielle du CNERNA qui présente des inconvénients importants en termes d'encombrement, de coût, de pénibilité, de déchets et de temps de réponse. La solution retenue réside dans la réduction des volumes mis en œuvre. Elle est rendue possible grâce à un appareil automatisé pouvant effectuer des dosages sur plaques de microtitration de 96 puits, le Manovolumate Nano 95, inventé par Bruno Verdier (CNRS) et fabriqué par AISSOR.

Le programme développé devrait se conclure fin 2004.

UN NOUVEAU SCHEMA D'ORGANISATION R&D

En 2000-2001, la construction d'un nouveau bâtiment a permis à CECALAIT - parallèlement à une organisation et un fonctionnement en adéquation avec les exigences de l'accréditation - de mettre en place, une activité nouvelle centrée sur la recherche et le développement en matière d'analyse laitière.

CECALAIT a été missionné par l'interprofession laitière pour mettre en place et animer des instances de concertation et de travail destinées à garantir, aux différents niveaux, une bonne coordination des actions menées.

Au niveau local la création à Poligny de la Cellule Recherche et Développement INRA-CECALAIT en méthodes d'analyse (CRD) permet les échanges nécessaires entre l'INRA et CECALAIT pour une réflexion commune sur des projets R&D à proposer ou à développer. Ceci en raison du lien historique existant entre les deux organismes.

Pour mémoire, la fonction de recherche de l'INRA sert depuis les années soixante les besoins analytiques de la filière laitière. Quant à CECALAIT, il a repris et développé les activités de service et de contrôle mises en place par l'INRA avant 1990.

Au niveau national, la filière s'est dotée d'une instance intitulée Comité d'Orientation de la Recherche Analytique Laitière (CORAL). Les différents acteurs, utilisateurs ou bénéficiaires du développement des méthodes d'analyse y sont représentés.

Le système a commencé à fonctionner en 2001 par la mise en place d'un premier projet de développement de méthode qui constitue une phase de test pour la nouvelle organisation.

Ce projet concerne le développement d'une méthode d'estimation de la concentration en spores butyriques des laits de producteurs, susceptible d'apporter des solutions aux faiblesses et limites actuelles de la méthode officielle du CNERNA (en usage dans les laboratoires interprofessionnels laitiers). Cette méthode intitulée "Recommandations pour l'estimation de la contamination du lait en spores de *Clostridia* par la méthode de culture en milieu liquide", est basée sur l'estimation du nombre le plus probable (NPP) et appliquée dans le cadre du paiement du lait.

Le projet émerge d'un besoin des laboratoires interprofessionnels exprimé à de nombreuses occasions et remontant par le canal du CNIEL et du Comité Scientifique de CECALAIT.

Un projet d'étude a été préparé par CECALAIT R&D et a été porté comme proposition au CORAL après avoir reçu un avis consultatif favorable de la CRD, selon l'organisation locale de concertation pré-établie.

Après une étude de faisabilité demandée par le CORAL, le projet a reçu son aval. Depuis lors, le projet se déroule dans le cadre d'une convention multi-partenariat regroupant :

- la partie maîtrise d'ouvrage et financement : le CNIEL.
- le collège fabricant : le CNRS, les sociétés AISSOR et R-Biopharm France,
- la partie expérimentation : CECALAIT, LIAL MC, ITFF, CEDILAC.

Le projet est mené sous la conduite de CECALAIT R&D (O. LERAY) et d'un comité de pilotage auquel participent tous les partenaires.

LA RECHERCHE D'UNE ALTERNATIVE A LA METHODE OFFICIELLE DU CNERNA

Les spores butyriques sont des formes de survie des bactéries butyriques apparaissant lorsque les conditions du milieu deviennent difficiles. Non détruites par la pasteurisation, elles présentent un risque majeur dans la fabrication des fromages à pâte pressée cuite. Elles sont à l'origine de gonflements et d'éclatements de meules, et sont également accompagnées de défauts organoleptiques marqués. Dans tous les cas elles occasionnent une perte de valeur marchande partielle ou totale.

Les spores butyriques contenues dans le lait proviennent essentiellement d'une contamination à la ferme (terre, fèces, ensilage). Aussi, pour limiter la contamination dans les élevages, a-t-on introduit des plans de surveillance techniques avec la prise en compte de la charge en spores butyriques dans l'analyse du paiement du lait aux producteurs.

La méthode adoptée est la méthode du CNERNA développée par J.L. BERGERE dans les années 80 et publiée au Journal Officiel.

Cette méthode est basée sur la capacité des spores butyriques contaminant le lait à se développer en anaérobiose et à générer du gaz après un traitement thermique à 75°C pendant 10 minutes (pour éviter de prendre en compte la flore végétative et désoxygéner le milieu).

De manière à conférer à la méthode un seuil de détection approprié, les faibles teneurs en spores recherchées rendent indispensable la mise en œuvre de volumes d'essais nettement plus importants que ce qui est habituel en microbiologie. Ainsi l'accroissement du volume global de prise est-il rendu possible grâce à la multiplication des mesures de présence/absence à différents niveaux de dilution du lait. Ce qui permet également, grâce à la théorie statistique, d'établir le nombre le plus probable (NPP) de spores butyriques à partir du nombre de positifs à chaque dilution (nombre caractéristique NC). L'ensemble étant désigné comme méthode NPP.

Telle qu'elle est utilisée actuellement, la méthode CNERNA met en œuvre par dosage

- 10 tubes de 20 ml contenant chacun 10 ml de milieu
- dont 5 tubes avec 1 ml de lait pour une dilution 0 (absence de dilution)
- et 5 autres tubes avec 0,1 ml pour une dilution au 10^{ème} (dilution -1).
- Le volume total de 5,5 ml détermine un seuil minimal d'estimation de 180 spores/L.

La période d'incubation en anaérobiose pendant laquelle se déroulent la germination et la croissance des germes butyriques a été fixée à 7 jours.

Un bouchon de paraffine en contact direct avec le milieu empêche la pénétration de l'oxygène de l'air dans le milieu et sert de témoin en cas de dégagement de gaz significatif,

c'est-à-dire capable de soulever le bouchon de 1 cm ou plus.

Les tubes positifs de chaque dilution sont comptabilisés par des opérateurs qui saisissent les nombres caractéristiques (NC) sur l'ordinateur. La machine établira ensuite la correspondance avec les nombres les plus probables (NPP), par comparaison avec des tables statistiques.

OBJECTIFS DU PROJET

Les objectifs visés consistent :

1- dans la réduction des inconvénients de la méthode CNERNA :

- Encombrement : espace laboratoire important lié à la taille des équipements nécessaires (bain-marie, étuves ou chambres chaudes, salle de lecture/saisie).
- Coût des consommables : tubes de verre, milieu de culture BBMB, paraffine en quantités importantes
- Coût d'élimination des déchets : traitement et recyclage.
- Coût en personnel : automatisation limitée et absente au niveau de l'acquisition et de la saisie des résultats
- Pénibilité : nuisances olfactives, lecture visuelle et saisie manuelle

Le cas échéant :

- Longueur du temps de réponse (incubation < 7 jours)

2- et, moyennant les contraintes minima, d'obtenir de la méthode alternative :

- des caractéristiques équivalentes à la méthode officielle (seuil, précision statistique, répétabilité, spécificité et justesse ou concordance avec la méthode officielle, cadence analytique), et
- une automatisation compatible avec les besoins des laboratoires modernes et de l'assurance qualité (acquisition et gestion des résultats informatisées, traçabilité).

LE CHOIX DES MOYENS

Une évidence s'est imposée : la réduction d'échelle de la méthode (réduction obligée des volumes mis en œuvre) apportait la solution à la plupart des inconvénients évoqués. Le volume de la prise d'essai ne pouvant être modifié sans toucher au seuil de la méthode constituait toutefois une limite incontournable.

Par ailleurs, le risque d'erreur humaine devenant trop important sur de petits volumes - si tant est que la mesure soit encore possible - un moyen sûr et automatisable de la détection des dégagements gazeux devait remplacer le comptage visuel par des opérateurs.

Dans les années 80, le CNRS avait résolu avec succès le difficile problème de la mesure des faibles variations de volume/pression gazeux et développé des modules de mesure manovolumétrique, résultats qui ont fait l'objet de brevet. Ce n'est que dans les années 90 que des applications ont été proposées dans le domaine laitier et que, notamment, un appareil automatisé pouvant effectuer des dosages sur plaque de microtitration de 96 puits (8 x 12), le Manovolumate Nano95, a été développé conjointement par le CNRS (UMR 7625) – et par la société AISSOR.

La base de démarrage du projet résulte donc de l'association de l'objectif de réduction de taille de la méthode avec l'existence d'un matériel susceptible de fournir la détection souhaitée.

Une meilleure sensibilité du système de mesure et un encombrement moindre permettait en outre une ouverture sur une évolution de la méthode NPP, par exemple vers des détections anticipées (< 7 jours) ou un abaissement du seuil d'estimation actuel (< 180 spores/L) en mettant en œuvre plus de lait.

Les premiers essais ont commencé à l'automne 2002 et des adaptations techniques sont en cours depuis lors, tant sur le module de mesure Nano95 que sur les éléments de la méthode préalable à la mesure.

BASES ET CHOIX INITIAUX

D'une manière générale, l'objectif est de rester aussi proche que possible de la méthode officielle et de ne modifier que ce qui est strictement nécessaire pour adapter la méthode à une réduction de taille. L'objet de l'étude consiste en effet à établir les conditions de concordance/discordance avec la méthode officielle ne résultant que de la seule réduction d'échelle.

Si l'usage de faibles volumes ouvre la voie à un possible accroissement de la précision et à une réduction du seuil d'estimation du NPP - en jouant sur le nombre des répétitions (tubes = puits) et des dilutions - ceci n'entre pas dans le cadre de l'étude et pourra faire l'objet de développements ultérieurs.

L'option a donc été prise de réduire le volume (lait + milieu) de manière à aboutir à un volume total n'excédant pas 1100 µL, ce qui rend possible l'utilisation de plaques de microtitration de volume de puits de 1200µL (volume maximal autorisé par la géométrie de l'appareil dans la configuration actuelle).

En même temps, la concentration de l'apport en milieu nutritif (BBMB) a été ajustée pour permettre une germination et une activité gazogène en accord avec le mode de détection manovolumétrique et les résultats de la méthode CNERNA.

ETAPES DE LA METHODE ALTERNATIVE

- Préparation du milieu concentré stérile (conditions de pH et concentration)
- Distribution dans la plaque de microtitration
- Distribution des inoculums de lait : prise d'essai 1 mL seul à la dilution 0 et prise d'essai de 100µL et 900µL de lait UHT (sans spore) à la dilution -1.
- Thermisation 10 minutes à 75°C avec
- Fermeture hermétique de la plaque en anaérobiose.
- Refroidissement et mise en incubation 7 jours à 37°C.
- Préparation de la plaque à l'analyse.
- Mesure manovolumétrique au Nano95, enregistrement, édition.

L'APPAREIL



Le Manovolumate Nano 95

*Brevet CNRS – Inventeur Bruno Verdier
Brevet AISSOR (Metz) - Fabricant Jean-Pascal Urban*

Une fois la membrane de fermeture des puits percée à l'aplomb de chacun des puits, les plaques de microtitration sont introduites dans le Nano95 et le cycle de mesures est alors géré automatiquement jusqu'à l'obtention des résultats. Chaque ouverture de puits est mise en vis-à-vis d'un capteur d'états (système capillaire dans lequel une colonne de liquide manovolumétrique est mise en mouvement par la variation de quantité gazeuse dans la chambre (puits) de mesure. Les déplacements des ménisques aux interfaces liquide/gaz sont alors enregistrés et interprétés.

D'ores et déjà, l'appareil de mesure permet :

- l'enregistrement des cinétiques de dégagements gazeux pour chacun des 96 puits,
- l'interprétation automatique en terme de Nombre Caractéristique et sa correspondance en Nombre le Plus Probable - la traçabilité des résultats et la possibilité de transfert informatique étant acquises.

EVOLUTION DU PROJET

Le projet a connu depuis son démarrage une évolution significative des matériels initialement prévus, notamment pour répondre aux problèmes posés par l'amplitude importante des volumes gazeux dégagés. Le CNRS et AISSOR ont ainsi développé des solutions originales et modifié sensiblement le Manovolumate Nano95 d'origine en adaptant le système de convoyage de plaques, la sensibilité et le paramétrage de l'appareil pour aboutir à l'heure actuelle à un ensemble prêt à subir une première phase de test en condition de routine.

Plusieurs étapes sont prévues dans l'ensemble de l'étude :

■ Phase 0 – Phase test initiale (pré-validation)

Permettant les ajustements nécessaires de l'appareil et de la méthode et la vérification du bon fonctionnement du système de mesure avant d'autoriser le passage à l'étape suivante. Cette phase, en cours au moment de la rédaction de cet article, se déroule de manière partagée au LIAL MC d'Aurillac dans un premier temps, puis à CECALAIT.

■ Phase 1 - Etude de la méthode

Prévue au laboratoire de CECALAIT, elle permettra d'établir les caractéristiques de la nouvelle méthode (spécificité, linéarité, sensibilité) et de la comparer avec la méthode CNERNA (répétabilité et justesse/concordance).

■ Phase 2 – Evaluation en condition de routine

La méthode sera testée sur le plan de la répétabilité et de la concordance avec la méthode officielle sur un nombre important de laits de producteurs afin d'acquérir une information statistiquement robuste dans le cadre de l'analyse de routine d'un laboratoire interprofessionnel. Le LIAL MC assurera la réalisation de cette phase qui permettra parallèlement d'évaluer d'autres caractéristiques d'ordre économique (cadence analytique, robustesse du matériel, maintenance, etc). La phase 2 sera en principe

renouvelée et les résultats confirmés dans un second laboratoire interprofessionnel.

Le projet devrait voir sa conclusion en fin d'année 2004.

O. LERAY

Remerciements

à M. Bruno Verdier, inventeur du Manovolumate Nano 95, pour la relecture de cet article.

Abréviations

BBMB : milieu de culture Bryant-Bukey modifié Bergère
NC : nombre caractéristique
NPP : nombre le plus probable

Sigles

CEDILAC : Compagnie Européenne de Diffusion de Produits Lactés
CNERNA : Centre National d'Etudes et de Recommandations sur la Nutrition et l'Alimentation
CNIEL : Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière
CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique
CRD : Cellule Recherche et Développement Méthodes d'Analyses
CORAL : Comité d'Orientation de la Recherche Analytique Laitière
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
ITFF : Institut Technique Français des Fromages
LIAL MC : Laboratoire Interprofessionnel d'Analyses Laitières Massif Central
R & D : Recherche et développement

Bibliographie

CNERNA, **Recommandations pour l'estimation de la contamination du lait en spores de *Clostridia* par la méthode de culture en milieu liquide**, RLF, n°451, avril 1986.

LERAY Olivier, **Compte-rendu d'activité R&D**, Assemblée générale de CECALAIT, 27 mai 2003, 5 p.

CARNET D'ADRESSES : MANOVOLUMATE NANO 95

Pour contacter :

- l'inventeur : Bruno Verdier

Laboratoire d'Ecologie de l'Ecole Normale Supérieure
46 rue d'Ulm
75005 PARIS
France
Tél. 01 44 32 38 78

- le fabricant : AISSOR

11 rue de Pouilly
57000 Metz
France
Tél. 03 87 66 33 34

- le distributeur : R-Biopharm France

Parc d'Affaires de Crécy
17 avenue Charles de Gaulle
69370 Saint Didier au Mont d'Or
France
Tél. 04 78 64 32 00