

Dr Alain RAMBACH nous raconte sa démarche de mise au point des milieux chromogènes

Comment le Dr Alain Rambach fut à l'origine d'une révolution en matière d'identification des microorganismes : les géloses chromogènes CHROMagar™.

Les grandes découvertes partent souvent d'une intuition instantanée. Mon invention des « milieux chromogènes » fut de ce genre. Tout commença il y a plus de quarante ans, en 1978, lors d'une simple conversation avec un autre scientifique mais le développement de cette invention nécessita ensuite des dizaines d'années d'effort.

Dès 1978 j'ai conçu puis fabriqué le premier milieu chromogène, la gélose COLITEST™ pour *Escherichia coli*. Les milieux chromogènes allaient se répandre bien plus tard comme un raz de marée dans le domaine, et de nos jours, mon invention constitue la méthode la plus utilisée et la plus simple dans la recherche et l'identification de microorganismes, profitant aussi bien au domaine médical qu'au secteur de l'industrie agro-alimentaire.

Je vais évoquer comment, à la suite de la mise au point d'une première gélose chromogène pour *Escherichia coli* en 1978, cela m'a pris plusieurs dizaines d'années pour développer et faire accepter dans les laboratoires une gamme complète de milieux chromogènes que j'ai désignés sous la marque protégée CHROMagar™. Ceci entraîna plus tard le développement d'une série de produits concurrents chez les grands fabricants de diagnostic microbiologique.

► **Contrairement à l'image d'Épinal, il ne suffit pas d'une bonne idée, il faut souvent plusieurs dizaines d'années pour faire accepter une invention et l'on dit qu'il faut attendre... une nouvelle génération d'utilisateurs.**

Faisons un retour dans le passé pour découvrir mon histoire scientifique et les cheminements qui m'ont conduit à ce concept de gélose chromogène qui impacte largement aujourd'hui le domaine du diagnostic microbiologique dans les laboratoires d'analyse.

Des mathématiques au Génie génétique

Né à Paris en 1946 d'une lignée d'ingénieurs, j'orientais mes études vers les mathématiques. J'intégrais, en 1965, l'École Polytechnique, renommée pour inclure dans son enseignement presque toutes les sciences (figure 1).

Pourtant, une fois ingénieur diplômé, j'ai choisi de me lancer dans la biologie pour la raison assez cocasse que c'était une des rares matières que l'on n'enseignait pas à l'École Polytechnique et cela suscitait ma curiosité. De plus j'avais été séduit par la lecture du livre tout récent de Joël de ROSNAY, *Les Origines de la vie : de l'atome à la cellule* (1966).



Alain RAMBACH
alain.rambach@me.com

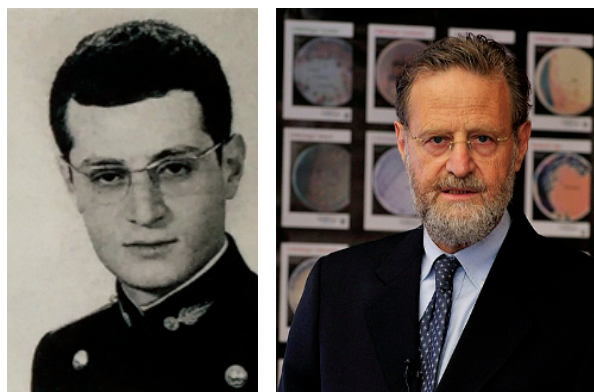


FIGURE 1
Alain RAMBACH
moins vieux puis...
moins jeune

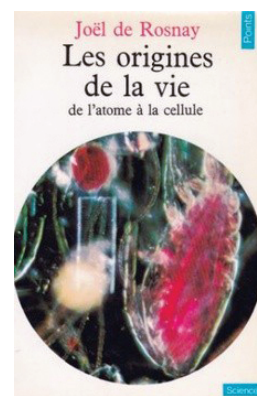


FIGURE 2 – Ouvrage
de Joël De ROSNAY

Donc en 1966, je ne connaissais quasiment rien du domaine de la biologie et encore moins de la microbiologie. Pour me renseigner sur ce que pouvait être la recherche en biologie, j'ai visité de nombreux laboratoires de recherche biologique et je découvris notamment le domaine naissant de la biologie moléculaire moderne. En 1966, j'obtins de faire deux semaines de stage chez l'immunologiste Alain PARAF, dans son laboratoire de l'INRA. À la fin du stage, PARAF me donna un conseil qui constitua un tournant majeur pour ma formation future : « *Je ne saurais pas t'enseigner la biologie moléculaire, essaie de trouver une place chez François JACOB à l'Institut Pasteur* ».

L'année suivante, j'ai pu être pris à l'Institut Pasteur comme jeune chercheur chez le professeur François JACOB, prix Nobel de médecine en 1965 et j'ai commencé à préparer un doctorat en sciences naturelles spécialisé en génétique bactérienne, tout en suivant en même temps des cours de biologie à la faculté des sciences. Plus tard, c'est dans ce même Institut Pasteur que j'ai rencontré celui qui avait tissé chez moi les premières bribes de connaissances en biologie, Joël de ROSNAY, qui était alors directeur des applications de la recherche à l'Institut Pasteur (figure 2).

La génétique bactérienne est certes un domaine de la biologie, mais le raisonnement y est parfois proche de celui des mathématiques. Ainsi la localisation de gènes ou de mutations spécifiques le long du chromosome bactérien ou viral se faisait à cette époque par des analyses mathématiques de proportions de recombinants obtenus lors de recombinaisons naturelles *in vivo*. Bien avant qu'on ne sache faire du séquençage d'ADN ces analyses étaient déjà très fines, à quelques nucléotides près. Ce passage du macroscopique, exprimé par le phénotype du bactériophage, au domaine ultra-microscopique de l'ADN formant le génotype, est incroyable : comment le changement d'une seule paire de bases peut-il modifier le génotype et surtout comment l'être humain peut-il s'en apercevoir au laboratoire ? Aucune balance ne peut mesurer une différence si infime, aucun microscope ne peut la voir. Cela me semblait aller contre les règles de la physique mais je pense que l'explication est qu'il y a amplification sur la boîte de Pétri : il s'agit d'un clone du mutant, lors de la formation d'une plage de lyses pour les bactériophages ou lors de la formation d'une colonie pour les bactéries, avec environ 100 millions d'individus identiques (figure 3). C'est un peu ce raisonnement qui m'a aidé à concevoir les milieux chromogènes où deux espèces peuvent être quasi-identiques mais avec cependant des génotypes et des phénotypes différents pour certains caractères.

Durant mon doctorat, j'ai concentré mes travaux sur le bactériophage λ d'*Escherichia coli*, et plus spécifiquement sur le réplicateur de ce virus, c'est-à-dire une séquence spécifique d'une cinquantaine de nucléotides où la réplication devait commencer, d'après une intuition qu'avait eue quelques années plus tôt François JACOB. La bactérie *Escherichia coli* allait devenir et rester un élément central de mon travail pendant les cinquante années à venir.

► **Patience et longueur de temps font mieux que force ni que rage. Parfois il faut rester longtemps dans un même domaine pour susciter l'innovation : en observant le même objet, mais avec un regard nouveau.**

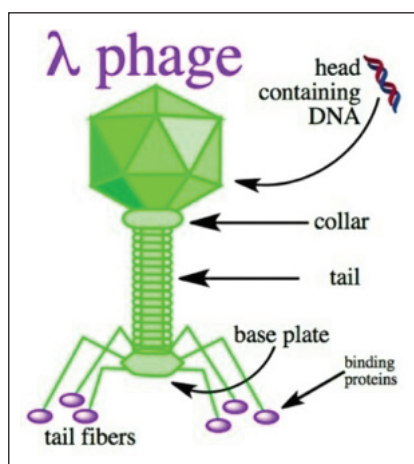


FIGURE 3 – Le bactériophage λ se colle sur la surface des bactéries, injecte son ADN et se multiplie en centaines d'exemplaires dans la bactérie, puis lyse la bactérie

Après six années de recherches, de lectures et d'expériences pour préparer ma thèse, j'en achevai l'écriture et présentai ma soutenance début 1973 devant le jury et devant mes pairs. À la fin de cette soutenance de thèse de doctorat, le Président du jury me demanda ce que je voudrais faire ensuite. J'expliquais que je voulais cloner de l'ADN dans le bactériophage λ , faire du « Génie génétique ». J'avais choisi ce vocable de Génie génétique qui pouvait paraître prétentieux mais c'était dans la ligne de termes traditionnels d'ingénierie, comme le « Génie électrique ».

En quelques instants j'évoquais mes futurs objectifs de recherche et dessinais l'ADN sur un tableau en utilisant des craies de deux couleurs : une craie bleue pour la structure « réceptrice auto-répliquante », le « vecteur » viral d'ADN procaryote, et une craie orange pour un fragment d'ADN étranger, à extraire d'un eucaryote par exemple, que je cherchais à « insérer » dans le vecteur viral. Mon idée de « manipulation génétique » à l'aide de bactériophage était un concept innovant et fut une surprise pour l'assistance.

Alors que j'expliquais avec simplicité ce champ nouveau de recherche que je proposais, il m'a semblé en même temps sentir comme un étonnement ou de la gêne dans certains regards de l'assistance. C'est alors qu'un des chercheurs de la salle s'est moqué de moi ouvertement en demandant devant un parterre incluant un Prix Nobel : « *Mais comment verras-tu les deux couleurs de l'ADN ?* ».

Je fus interloqué par cette boutade assez méchante et bête. Ce qui me semblait évident – que les ADN étant essentiellement d'un seul type, ils devaient être interchangeables et manipulables à l'infini – n'était pas dans l'air du temps.

De manière similaire, lorsque je suis parti l'été de la même année pour un stage de trois mois dans un laboratoire spécialisé dans l'étude du bactériophage λ , le patron m'a simplement interdit de poursuivre mon thème de vecteur phagique pour recombinaison *in vitro*, ce qui m'a fait perdre trois mois dans mon projet.

► **Je n'ai pas changé mon projet d'essayer de faire un vecteur viral mais j'ai compris qu'il n'est pas toujours facile d'être en avance.**

Après mon doctorat, dans mon petit laboratoire à l'Institut Pasteur, je me suis donc attelé, de 1973 à 1974, à inventer un vecteur phagique pour clonage d'ADN étranger. Pour ce faire, j'ai modifié génétiquement le bactériophage λ d'*E. coli*. Le principe de cette invention a combiné dans un premier temps une évolution accélérée puis dans un deuxième temps la recombinaison *in vivo* des génomes, deux techniques purement naturelles pour espérer obtenir à la fin un nouvel outil pour le futur « Génie génétique » ou technique de l'« ADN recombinant » (figure 4).

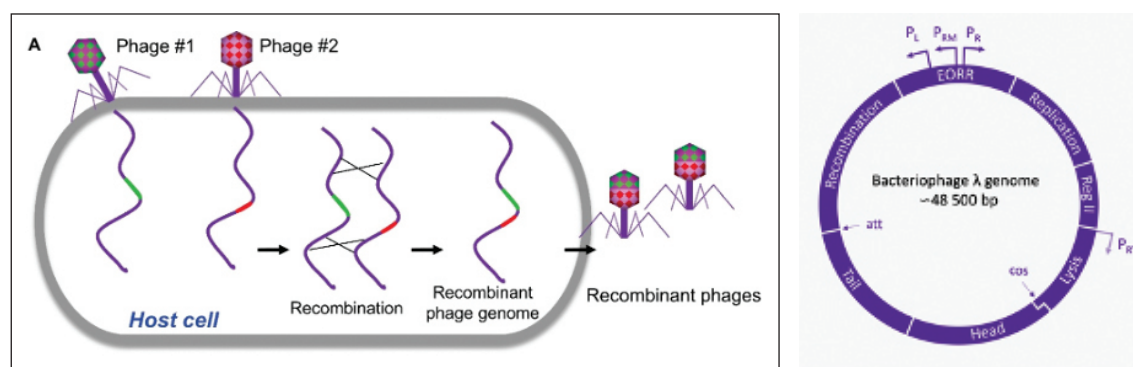


FIGURE 4 – Deux bactériophages différents infectent une même bactérie dans laquelle leurs génomes vont se recombiner *in vivo*

J'avais au départ le bactériophage λ qui possédait 5 sites de restriction EcoRI. Par croissance alternative sur des souches restrictives (restriction EcoRI) et non restrictives (méthylation EcoRI), j'ai pu isoler, après 22 cycles successifs de croissance alternative, un dérivé ayant acquis une efficacité d'étalement de 100 % sur la souche restrictive EcoRI (phénotype). J'étais convaincu que cette fertilité de 100% signifiait que par mutations cumulées, tous les sites de restriction EcoRI avaient disparu (génotype) : j'avais réalisé une expérience d'évolution accélérée.

Depuis ce nouveau bactériophage n'ayant plus de sites EcoRI, j'ai effectué un croisement génétique *in vivo* avec le bactériophage λ plac5 imm21, qui portait des sites EcoRI originaux, pour donner naissance à des recombinants dont je pouvais mesurer, toujours *in vivo*, les rapports restrictifs intermédiaires (phénotype) ce qui me permit de les classer pour étudier ensuite les différentes classes (génotype). L'analyse de ces recombinants variés, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de l'ADN clivé par l'endonuclease EcoRI, permet d'identifier les sites de clivage de l'endonuclease EcoRI.

L'un des génotypes obtenus, λ plac5 CI857 sRI λ 2 sRI λ 1, avait conservé comme sites de clivage EcoRI restants, les sites sRI λ ac sRI λ 4 sRI λ 3, tous situés dans une région non essentielle pour la multiplication des bactériophages. Ceci est décrit dans notre article¹ de 1974 et montrait que ces bactériophages artificiels pouvaient servir de vecteurs de clonage de gènes étrangers. L'objectif était atteint.

Cette même année 1974 le professeur David HOGNESS du département de biochimie de l'université de Stanford, qui travaillait aussi sur l'ADN, était venu donner une conférence à l'Institut Pasteur. Je lui ai montré mon lecteur « BIPOLE », un appareil que j'avais inventé, avec des rhéostats circulaires, des réglettes, le tout lié à un ordinateur, pour permettre de mesurer, sur des photographies par microscopie électronique, la longueur de morceaux d'ADN. D'ailleurs sous le conseil amical de Jacques MONOD j'avais déposé un brevet pour cette invention. C'est peut-être cet appareil qui fit que le professeur HOGNESS m'invita pour un stage postdoctoral dans son laboratoire californien. J'acceptais l'invitation avec intérêt. Entre 1974 et 1976, je suis ainsi parti avec ma famille en Californie pour effectuer mon stage postdoctoral aux États-Unis, dans le département de biochimie de l'université de Stanford. Le professeur David HOGNESS y dirigeait son laboratoire spécialisé dans les techniques d'ADN et d'ARN pour l'étude d'un modèle biologique eucaryote, la drosophile ou mouche du vinaigre. Ce sujet biologique ne m'intéressait pas particulièrement mais je voulais apprendre les techniques américaines de l'ADN et l'ARN.

En plus de la science de l'ADN en plein développement j'ai pu observer aux USA comment les chercheurs américains se passionnaient pour les applications de la science, et en particulier pour les manipulations

¹ Alain Rambach et Pierre Tiollais, « Bacteriophage Having EcoRI Endonuclease Sites Only in the Nonessential Region of the Genome », PNAS, 1^{er} octobre 1974, vol. 71 (10), pp. 3927-3930.

d'ADN à l'université de Stanford et à l'université de San Francisco. En France au contraire, la plupart des chercheurs visaient des carrières plutôt linéaires dans le milieu académique en se consacrant uniquement à la recherche pure, en méprisant les applications de la recherche et même en qualifiant les chercheurs appliqués de « marchands de soupe ». Inversement en 1974 les biologistes américains menaient de front des recherches pures de très haut niveau et des contacts pour la recherche appliquée, voire montaient des start-ups en biologie. Ils reproduisaient ce qui s'était passé, aux USA quelques années plus tôt, autour de l'électronique moderne (transistor, etc.).

► Il est extraordinaire de combiner science de haut niveau et développement de ses applications pratiques. Souvent de nos jours le système s'est emballé : sans résultats scientifiques significatifs on crée une start-up pour recueillir des financements.

La chimiotypie et Jean BUISSIÈRE

Après ce voyage aux États-Unis, enrichi de nouvelles connaissances sur l'ADN et passionné par les applications de la Science, je retournais à l'Institut Pasteur dans l'unité de Génie génétique nouvellement créée par Jacques MONOD, directeur de l'Institut Pasteur.

L'existence de cette unité montrait que les chercheurs français avaient désormais compris l'intérêt du Génie génétique et je pouvais me dire que j'avais accompli mon travail de pionnier en voyant désormais mes collègues pastoriens se jeter tous sur ce nouvel eldorado du Génie génétique.

En trainant à l'étage situé au-dessus de l'unité de Génie génétique, vers 1978, c'est un peu par hasard que j'allais m'intéresser à un nouveau sujet, très différent de l'étude de l'ADN. Il s'agissait d'un sujet « à l'ancienne », sans manipulations génétiques : le diagnostic médical des infections bactériennes par des entérobactéries à l'aide de caractères biochimiques. À cet étage se trouvait l'unité des Entérobactéries mais il n'y avait pratiquement aucun contact entre les scientifiques tenants de l'ancienne science, la microbiologie pastoriennne, et ceux de la nouvelle science, la biologie moléculaire, qu'on développait, avec une certaine prétention, dans l'unité de Génie génétique.

Je n'avais pas de tels *a priori* et j'aimais bien aller discuter avec des spécialistes de la vieille école. Par exemple j'allais voir les recherches sur la lysotypie du chercheur atypique Elie WOLMANN, qui classifiait les bactéries selon leur sensibilité aux bactériophages, les virus des bactéries². C'est dans un laboratoire attendant que j'ai rencontré le Docteur Jean BUISSIÈRE, un peu isolé et atypique lui aussi, invité dans l'unité des Entérobactéries. C'était un médecin militaire lyonnais et un inventeur connu. Il me raconta avec passion comment il avait inventé en Afrique du Nord un lit de médecine militaire à la ventilation naturelle forcée permettant de rafraîchir le malade en plein désert.

► Les rencontres entre individus, souvent atypiques, sont essentielles au développement scientifique et pour en voir les applications pratiques.

BUISSIÈRE (1927-1999) était surtout l'inventeur génial qui avait créé et développé, quand il était encore médecin militaire, les galeries API³. Suite à une demande de l'Armée française d'essayer d'identifier rapidement des microbes pathogènes qu'un ennemi potentiel lancerait lors d'une guerre microbiologique, BUISSIÈRE avait inventé des galeries miniaturisées d'identification biochimique rapide. Il les avait dénommées AUXOTAB puis API et elles furent une véritable révolution dans le domaine, encore beaucoup utilisées aujourd'hui dans les laboratoires d'analyse (figure 5).

BUISSIÈRE eut l'idée de miniaturiser ses galeries, à l'aide de plastique souple comme dans les imperméables fabriqués par l'industriel local qui finança la fabrication et la commercialisation de ces galeries. BUISSIÈRE miniaturisa ses galeries biochimiques pour obtenir, à partir d'une seule colonie cultivée sur boîte de Pétri, des concentrations élevées de bactéries ce qui diminuait considérablement le délai de réponse biochimique. Ainsi, après l'obtention de la colonie sur la boîte de Pétri en 24 h, l'identification pouvait désormais se faire en 7 h avec ces galeries miniaturisées, au lieu de 24 h avec les galeries classiques en tubes de verre.

Les identifications traditionnelles étaient fondées sur des galeries classiques en verre pour l'examen de caractères biochimiques, généralement la fermentation de carbohydrates (glucides), tout en combinant des observations au microscope sur la taille et la forme du microorganisme.

BUISSIÈRE a privilégié l'approche de n'employer que des caractères biochimiques⁴ pour réussir à obtenir l'identification microbienne par « chimiotypie » uniquement. Avec cette approche il était alors nécessaire, comme l'avait compris BUISSIÈRE, d'employer un grand nombre de tests pour atteindre une spécificité suffisante et couvrir une large gamme de bactéries ou d'autres microorganismes.

² De temps de temps, cette approche à l'ancienne redevient à la mode dans le domaine du diagnostic microbien ou du traitement des infections. Les bactériophages ont été souvent proposés comme un outil dans la lutte contre les bactéries pathogènes, ce, bien avant la découverte des antibiotiques. Cette approche a aussi été développée par un microbiologiste hors norme, Felix D'Herelle, dès 1917.

³ Nicole LESQUIER et Jean-Noël JOFFIN, « API, une nouvelle aventure industrielle en biotechnologies », *Journal OPÉRON*, n°82, février 2017.

⁴ L. Joubert et Jean Buissière, « Le chimiotypage bactérien en épidémiologie », *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, tome 122, n° 2, 1969, pp. 81-91.

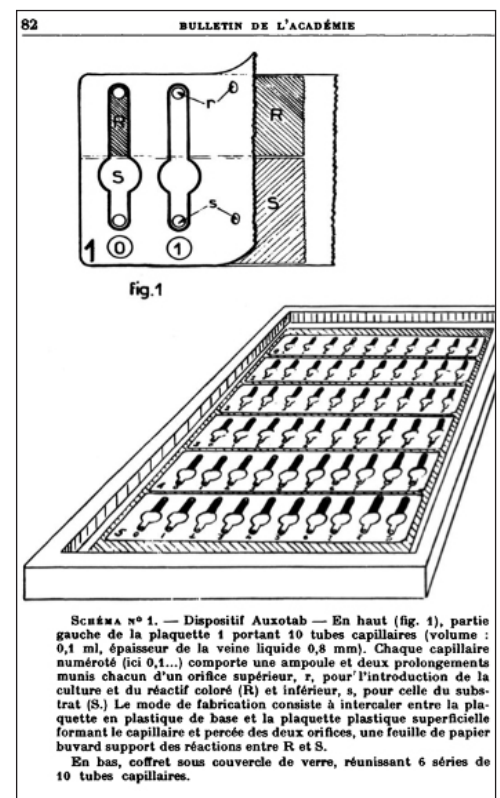


FIGURE 5 – Le dispositif AUXOTAB incluant 60 tests

30 — D (+) mélibiose.....	néant	jaune	rouge
1 — saccharose.....	néant	jaune	rouge
2 — D (+) tréhalose.....	néant	jaune	rouge
3 — inuline.....	néant	jaune	rouge
4 — D (+) mélézitose.....	néant	jaune	rouge
5 — D (+) raffinose.....	néant	jaune	rouge
6 — dextrine.....	néant	jaune	rouge
7 — amylose.....	néant	jaune	rouge
8 — amidon.....	néant	jaune	rouge
9 — glycogène.....	néant	jaune	rouge
40 — phénolphtaléine diphos- phate.....	NaOH N/10	rouge	incolor
1 — β naphthyl acétate.....	diazo-bleu	violet	jaune
2 — β naphthyl laurate.....	diazo-bleu	violet	jaune
3 — β naphthyl palmitate.....	diazo-bleu	violet	jaune
4 — β naphthyl stéarate.....	diazo-bleu	violet	jaune
5 — β naphthyl nonanoate.....	diazo-bleu	violet	jaune
6 — DL alanyl β naphthylamide.....	diazo-bleu	rouge	jaune
7 — L leucyl β naphthylamide.....	diazo-bleu	rouge	jaune
8 — N benzoyl DL arginine β naphthylamide.....	diazo-bleu	violet	jaune
9 — N benzoyl DL phénylalanine β naphthyl ester.....	diazo-bleu	violet	jaune
50 — O. N. P. G.		jaune	incolor
1 — urée.....	néant	rouge	jaune
2 — tryptophane.....	Fe Cl3 1/3	rouge-brun	jaune
3 — phénylalanine.....	Fe Cl3 1/3	vert	jaune
4 — indole (recherche).....	réactif de Ko- vacs	rouge	jaune

FIGURE 6 – Quelques-uns des tests employés par le Dr BUISSIÈRE dans ses galeries miniaturisées

Pour atteindre cette performance, en plus du concept de miniaturisation, BUISSIÈRE compléta son innovation par l'utilisation d'une cinquantaine de tests de caractères biochimiques, par exemple en examinant une quarantaine de substrats classiques visant à tester la fermentation des sucres, et une dizaine de tests de réaction avec des substrats synthétiques. Il avait trouvé ces substrats synthétiques dans des catalogues de chimie, essentiellement des produits chimiques constitués du fluorophore Naphthyl conjugué avec par exemple un acide aminé ou un acide gras (figure 6).

En fin de réaction, le Naphthyl, incolore, nécessitait l'ajout de réactifs révélateurs secondaires qui créaient alors une couleur visible à l'œil nu après quelques minutes. BUISSIÈRE pouvait donner une réponse semi-quantitative, de 0 à 5, pour chaque caractère enzymatique.

Au fil des années, BUISSIÈRE accumula un grand nombre de substrats synthétiques de telle sorte que son invention de galeries API, utilisant à ses débuts surtout la fermentation de sucres, incorpora de plus en plus de caractères de substrats artificiels dérivés des Naphthyl.

Pour m'expliquer la puissance de l'approche choisie pour ses galeries biochimiques, le Dr BUISSIÈRE m'indiqua que M. KILIAN et P. BULOW avaient montré en 1976 que le caractère β-Glucuronidase était assez spécifique de la bactérie *Escherichia coli*, justement la bactérie que je connaissais bien.

Médecin, il me précisa que cette bactérie *Escherichia coli* était responsable de nombreuses infections urinaires, un problème récurrent en médecine humaine.

Les grands esprits se rencontrent

J'étais fasciné par BUISSIÈRE, médecin et parachutiste, qui racontait avec passion comment il avait inventé puis développé avec patience, compétence et imagination, des galeries miniaturisées pour identification microbienne. BUISSIÈRE n'hésitait jamais à aller chercher dans l'industrie de nouveaux composants chimiques, des matières particulières, des plastiques, des papiers ou des billes d'alumine qui pourraient améliorer son invention.

En l'observant manipuler j'ai remarqué qu'après l'incubation qui durait 16-24 h de ses galeries d'identification, BUISSIÈRE devait ajouter aux substrats Naphthyl le réactif révélateur, nécessaire pour voir apparaître une couleur dans les cupules positives.

Ce délai supplémentaire de 16-24 h était particulièrement long car BUISSIÈRE avait remplacé les galeries AUXOTAB à 7h d'incubation par les galeries API à 16-24 h d'incubation, sans doute pour augmenter la robustesse du résultat.

Il m'a semblé évident qu'on pouvait partir sur une autre approche, sur une autre méthode, en fait radicalement différente, et j'en ai aussitôt fait part à BUISSIÈRE en lui suggérant qu'il devrait :

1. «Bouleverser la méthodologie en incorporant des chromogènes dans la gélose elle-même c'est à dire avant l'étape d'isolement de l'échantillon biologique sur la boîte de Pétri;
2. Utiliser des substrats synthétisés à partir d'un chromophore précipitant, c'est-à-dire ne diffusant pas en milieu aqueux;
3. Partir d'un chromophore se colorant spontanément sans besoin d'ajout ultérieur de révélateur pour obtenir la couleur et donc pas le fluorophore Naphthyl qui requerrait l'ajout d'un réactif supplémentaire pour se colorer;
4. Choisir un chromophore qui présente une couleur nettement différente de la couleur jaune-orangée des milieux de culture.»

BUISSIÈRE prenait des colonies cultivées sur boîtes de Pétri incubées pendant 24 h mais devait ensuite attendre à nouveau 16 à 24 h pour faire la caractérisation *via* ses galeries d'identification.

Je prédisais, en prévoyant d'inclure des chromogènes dans la boîte de Pétri elle-même, c'est-à-dire dans le milieu de culture solide, que l'identification serait immédiate. Cela ne prendrait plus 16-24 h d'incubation de galeries dont l'interprétation nécessitait des ordinateurs et des tables de données. Il suffirait juste de regarder à l'œil nu les couleurs des colonies pour connaître le résultat d'identification... instantanément !

► Une fois l'objectif bien défini, il faut parfois passer à une autre technologie pour changer radicalement la performance de la méthode.

J'ai dit à BUISSIÈRE que le 5-Bromo-4-Chloro-5-Indoxyl répondait aux critères ci-dessus pour être un chromophore parfait. On connaissait dans les laboratoires de génétique le 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl-Galactoside, appelé X-gal, qui pouvait être mis dans une gélose en boîte de Pétri pour obtenir, si la souche produisait une β-Galactosidase, une coloration précipitante bleue sans nécessiter d'ajout de révélateur.

Face à cette idée inventive, BUISSIÈRE manifesta son adhésion immédiate et approuva dans la foulée en disant : « *Faites-le, je vous financerai* » ! Cette marque de confiance spontanée de la part d'un inventeur à la carrière éprouvée fut déterminante pour que je prenne la décision de me lancer à inventer mes futurs milieux chromogènes.

Curieusement en fin de compte, BUISSIÈRE ne finança jamais l'opération, mais cette absence de financement ne me fit pas abandonner mon idée et j'ai continué de chercher à réaliser mon intuition.

► **Un inventeur se passionne et s'implique pour développer et financer sa propre invention, moins celle d'un autre.**

Dans une première étape je choisis de détecter et d'identifier *Escherichia coli* et j'ai cherché du 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl-Glucuronide. Malheureusement, en 1978, j'ai découvert que ce produit n'existait pas dans les catalogues de produits chimiques.

Alors j'ai décidé d'essayer une autre molécule chromophore que j'avais repérée : la 8-hydroxyquinoléine qui, dans un milieu contenant du fer, donne une coloration noire lorsqu'elle est libérée. J'avais repéré que le chromogène hydroxyquinoline-Glucuronide existait dans le catalogue d'une société anglaise. Cette molécule, m'avait-on dit, pouvait être fabriquée en faisant ingérer de la 8-hydroxyquinoléine à un chien. Le foie de l'animal conjugait naturellement la 8-hydroxyquinoléine avec le Glucuronide de telle sorte qu'on pouvait récupérer le substrat enzymatique hydroxyquinoline-Glucuronide dans l'urine du chien, l'extraire et le purifier.

M'étant fourni d'un tout petit peu d'hydroxyquinoline-Glucuronide, j'entrepris des tests en incorporant dans des milieux gélosés en tubes de diamètre de 1cm, de façon qu'avec seulement 1 ml de milieu, je puisse obtenir une surface de culture inclinée d'environ 4 cm², c'est-à-dire juste assez pour isoler une culture pure de bactérie ou un échantillon d'urine, où l'on voulait détecter *Escherichia coli*. En réalité, je ne savais même pas si la bactérie n'allait pas être inhibée par ce composant.

Le résultat fut frappant. Comme je l'avais espéré et prévu, on pouvait voir à l'œil nu, sans aucune difficulté, des colonies de couleur noire intense avec *Escherichia coli*. Au contraire les autres bactéries donnaient des colonies incolores (figure 7).

► **Souvent, pour tester une hypothèse nouvelle, des quantités faibles d'un composant critique suffisent.**

Ce nouveau procédé était véritablement révolutionnaire, car comme je l'avais imaginé, la coloration noire était bien précipitante et ne diffusait pas autour des colonies. Ceci permettait d'anticiper que le repérage de colonies d'*Escherichia coli* fonctionnerait même dans des cas où la culture ne serait pas pure et contiendrait d'autres bactéries, l'échantillon conduisant alors à plusieurs types de colonies différentes sur une même boîte de Pétri.

Il s'agissait d'une nouvelle technologie de détection et d'identification des microbes offrant des perspectives innovantes : on allait pouvoir détecter des espèces minoritaires dans un mélange et surtout on allait gagner 16-24h de délai dans le diagnostic.

À la suite de cette réussite totale, je déposais un brevet et la marque COLITESTTM (figure 8).

En cette année 1978 je suis allé présenter et expliquer mon invention à plusieurs sociétés de diagnostic en montrant mes petits tubes avec les colonies d'*Escherichia coli* colorées en noir intense. Malgré l'avantage évident de cette découverte, je me suis retrouvé face à un mur de refus.

Aucune société ne fut intéressée, ni aucune société concurrente ne s'est mise à développer des « milieux chromogènes » après mon premier milieu chromogène.

Pour développer ma technologie j'ai aussi voulu durant cette année 1978, en parallèle de l'hydroquinoline-Glucuronide, essayer des dérivés Glucuronide, Glucoside et Phosphate avec le chromophore 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl pour espérer obtenir une coloration bleue précipitante des colonies. Mais aucun de ces produits n'existait sur le marché. Que faire ?

J'ai décidé d'essayer de les faire synthétiser. Pour cela, je me suis adressé à un grand chimiste californien du nom de Rao MAKINENI. Après une prise de contact, je l'invitais dans le café du 56^{ème} et dernier étage de la tour Montparnasse, une tour qui venait d'être construite. Tout en profitant de la vue sur Paris, autour d'un verre de Coca Cola, je discutais avec ce scientifique et nous nous accordâmes sur un petit contrat : MAKINENI acceptait le défi de fabriquer 1g de chaque produit X-Glu, X-Phos, X-Glucu contre quelques milliers de dollars. De fait, environ 6 mois plus tard, je reçus les produits mais j'ai constaté que pour le dérivé Glucuronide, le 5Bromo-4Chloro-3Indoxyl-Glucuronide, MAKINENI n'avait fabriqué que 350mg. Ce brillant chimiste m'a

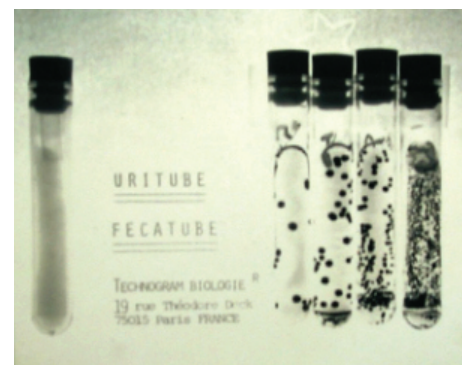


FIGURE 7 – Le premier milieu chromogène, en 1978 pour *E.coli*, au nom commercial ColitestTM

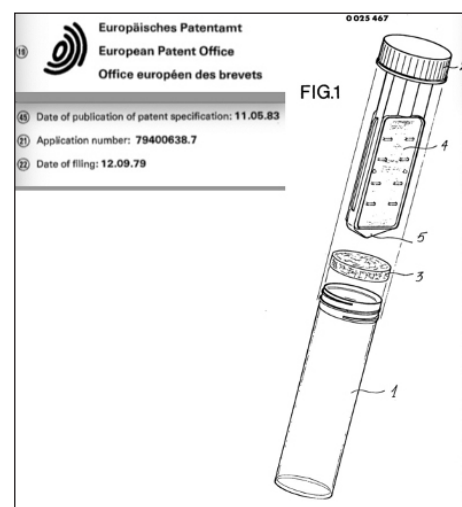


FIGURE 8 – Le brevet de 1978 déposé en Europe en 1979 pour le premier milieu chromogène

alors expliqué qu'il avait finalement renoncé à aller plus loin que ces 350mg tant la synthèse du composé s'était avérée difficile.

Cela ne m'empêcha pas de m'émerveiller devant la potentialité de ces nouveaux produits. Je fis quelques essais préliminaires très encourageants, mais le destin voulut que rapidement ces produits extraordinaires sont restés dans leurs flacons pendant 10 ans... avant que je ne fasse moi-même resurgir à nouveau ce projet de milieux chromogènes en 1989. Et pourquoi donc ?

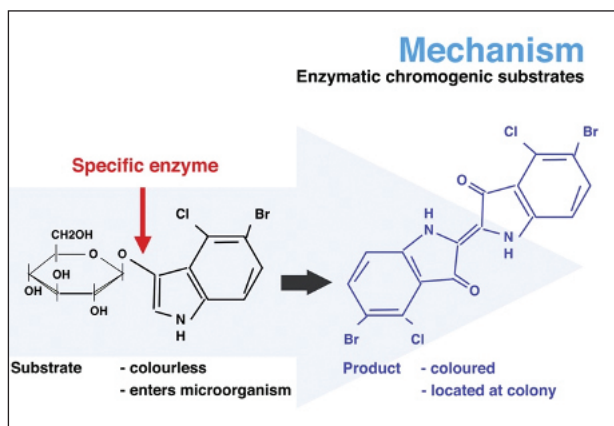


FIGURE 9 – La technologie des milieux chromogènes (avec substrats enzymatiques précipitants)

Les différentes étapes de la technologie des milieux chromogènes avec substrats enzymatiques précipitants

1. Le milieu contient des molécules appelées chromogènes. Une molécule chromogène se compose d'un substrat (la « clé » d'une enzyme spécifique « verrou »), ainsi que d'un chromophore. Le chromogène est incolore car le chromophore n'absorbe pas la lumière visible lorsqu'il est conjugué au substrat.
2. Lorsqu'un organisme bactérien ayant une activité enzymatique spécifique entre en contact avec la molécule chromogène, cette enzyme clive la molécule chromogène, libérant le chromophore.
3. Lorsque le chromophore est libéré et n'est plus conjugué, sa couleur devient visible. En utilisant un chromophore qui ne diffuse pas dans le milieu environnant, la couleur reste localisée dans la zone où la colonie bactérienne exprime l'activité enzymatique et où pendant les 24 h de croissance de la colonie, celle-ci a pu se colorer. Ainsi, la colonie prend la couleur du chromophore choisi (figure 9).

La raison a été qu'en février 1980, on m'a proposé une autre aventure : la création de la société GENETICA en partenariat avec le groupe Rhône Poulenc, le numéro 1 français de la pharmacie, devenu plus tard le groupe AVENTIS. Il s'agissait de monter ce qu'on appellerait aujourd'hui une start-up de Génie génétique que Rhône Poulenc financerait. Ce grand groupe pharmaceutique de 80.000 employés m'avait courtoisé et nous avons discuté plusieurs fois dans un restaurant chic de Montparnasse. Rhône Poulenc a précisé son désir de s'engager avec moi dans une structure qui ferait la totalité de leur futur Génie génétique appliqué, ce qui incluait le domaine de la pharmacie et de l'alimentaire.

Cette opportunité m'a semblée passionnante car justement la biotechnologie qui, à l'époque, signifiait la « biosynthèse par fermentation industrielle », était mon grand projet, comme je l'évoque dans mon article⁵ publié en 1978.

J'ai donc créé début 1980 la société GENETICA, start-up de Génie génétique appliqué. J'ai construit à Joinville le Pont en banlieue de Paris un local très original avec un unique immense laboratoire central incluant une bibliothèque en plein milieu avec des fauteuils confortables, faisant communiquer les paillasses entre elles. Je me suis consacré à nouveau au Génie génétique et cela a duré environ 10 ans, au cours desquels Rhône Poulenc a préféré intégrer le Génie génétique dans ses structures propres.

⁵ Alain Rambach, « Le médicament de demain et les recombinaisons génétiques », *Le Cahiers du Médecine Vétérinaires*, décembre 1978, pp. 203-206.

Quand la recherche diagnostique rencontre l'entrepreneuriat

En 1989 je suis revenu à mon idée des milieux chromogènes. Quoique mon invention des milieux chromogènes datait déjà de 1978, aucun fabricant n'avait vu le potentiel du système d'identification chromogène des micro-organismes. J'avais pourtant déposé un brevet pour faire connaître mon invention, j'avais pourtant développé ma « preuve de concept » dès 1978, montrant qu'on pouvait réaliser la gélose chromogène que j'avais développée, le COLITEST™ pour *Escherichia coli*.

Quand je suis revenu à mon idée des milieux chromogènes, plus de dix années s'étaient donc écoulées. C'était en 1989 et le domaine était resté vierge ! J'avais vraiment été pionnier en 1978.

► Être un peu en avance sur son temps c'est bien, être beaucoup en avance... bonjour les dégâts.

Je me remis au travail sur ces milieux chromogènes et j'inventais en 1989 une nouvelle gélose chromogène : le Rambach™ Agar, capable de détecter *Salmonella* par la couleur rouge vif des colonies.

En 1989 je tentais logiquement une nouvelle fois d'approcher de nombreux grands fabricants du diagnostic microbiologique afin de leur présenter l'intérêt de ma gélose chromogène Rambach™ Agar pour *Salmonella* et la perspective de plans ambitieux de développement de futurs milieux chromogènes supplémentaires (figure 10).

Ce fut, hélas, une nouvelle déception. Ma gélose Rambach™ Agar fut rejetée par toutes les entreprises que j'approchais. Et même certaines exigèrent de moi de cesser de les contacter !

Et pourtant, je pressentais l'importance de ma découverte. Malgré tous les refus subis, je décidais de me lancer tout seul dans l'aventure.

► **Devant le rejet des entreprises compétentes il faut souvent abandonner pour ne pas aller dans le mur, mais pas toujours.**

Ce fut un parcours compliqué pour moi car j'étais plutôt un « rat de laboratoire », et me confronter à la « vraie vie industrielle et commerciale » ne fut pas évident, mais l'aventure fut étonnante. Cela débuta dans un studio de 16 m² situé dans le 15^{ème} arrondissement de Paris. Je ne comptais plus les soirs où je rentrais à mon domicile les cheveux colorés du rouge neutre de la formule, coloration que je ne pouvais retirer qu'avec des lavages répétés ou... de l'eau de Javel !

J'avais recruté un technicien pour m'aider pour la R&D mais je faisais moi-même les fabrications de poudres de gélose chromogène : ce fut au départ quelques dizaines de grammes puis des centaines de grammes puis des kilogrammes, qui s'accumulaient comme la montagne de défis qu'il fallait gravir à chaque pas (défis pratiques, administratifs, etc.).

Je dus me décider, malgré mon ignorance du commerce, à mettre progressivement en vente les produits que je fabriquais ; d'abord, en France puis dans le reste du monde. Il me fallut deux ans pour développer très progressivement, en m'auto-finançant, une première clientèle encore modeste mais qui couvrait d'assez nombreux pays. En 1992, la société allemande Merck me contacta pour signer un accord mondial de licence de fabrication pour le RambachTM Agar.

► **Pour convaincre de l'intérêt d'une invention et ne pas rester un pionnier méconnu, il faut parfois passer par les cases « inventer » « fabriquer » et « vendre » pour ne pas rester à la case « parking ».**

Une fois les négociations terminées et l'accord signé je proposais à Merck une collaboration pour que je développe pour eux mes futurs milieux chromogènes.

Ce fut encore un refus tout net, probablement car cette grande société avait déjà sa propre stratégie de développement, orientée dans le domaine de la microbiologie de l'eau et le domaine agroalimentaire. J'étais déçu car cela me ramenait à la case départ, je n'avais pas désiré continuer d'être un fabricant.

J'ai constitué la société CHROMagarTM pour la fabrication et la vente de ces milieux chromogènes.

Je me suis lancé, cette même année, dans le développement et la fabrication de nouveaux milieux de cultures chromogènes. J'ai développé des formules innovantes pour la détection d'*Escherichia coli* et des coliformes, puis chaque année j'ai dû trouver des nouvelles formules pour de nouveaux microorganismes. Mon approche fut encore plus innovante en 1994 quand je réussis à créer le premier milieu bi-chromogène, CHROMagarTM Orientation (figure 12), qui combinait des substrats avec deux chromophores différents, tels le 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl (bleu) et le 5-Bromo-6-Chloro-3-Indoxyl (rouge). A cette époque l'industrie concurrente naissante préférait combiner l'utilisation d'un chromophore et d'un fluorophore. J'ai noté que quelques années plus tard ils imitèrent tous mon choix d'employer plusieurs chromogènes. Le chromophore 5-Bromo-6-Chloro-3-Indoxyl (rouge) avait lui aussi l'avantage d'être précipitant et sa couleur rouge se combinait merveilleusement avec le bleu pour donner une couleur tierce violacée⁶.

⁶ « Method for the identification of microorganisms with at least two chromogens Brevet RAMBACH Jan 26, 1996 ».

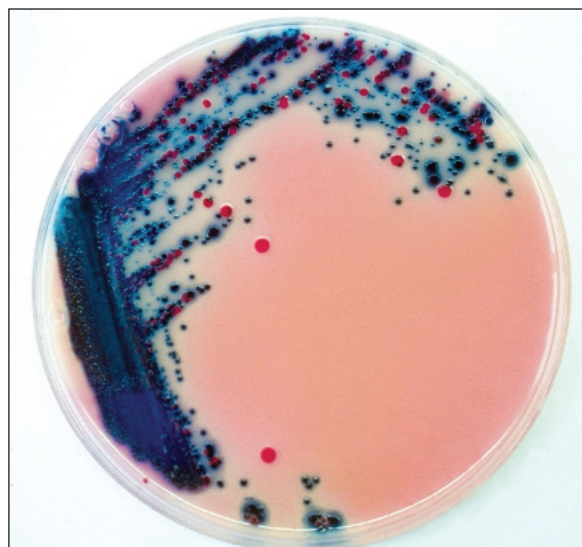


FIGURE 10 – Le milieu chromogène RambachTM Agar pour *Salmonella* développé en 1989

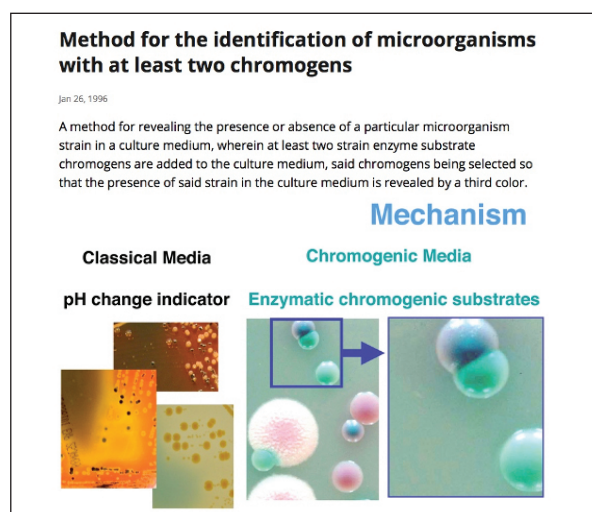


FIGURE 11 – brevet et image de milieux bi-chromogènes montrant des couleurs obtenues très variées et ne diffusant pas hors des colonies même lorsque les colonies sont côte à côte

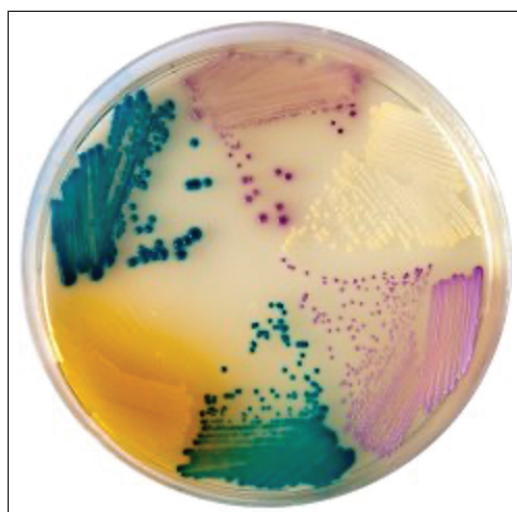


FIGURE 12 – Le milieu CHROMagarTM Orientation (1994) qui oriente pour l'identification des microorganismes urinaires ou de l'environnement

Ce chromogène 5-Bromo-6-Chloro-3-Indoxyl, qu'en 1994 le chimiste Mike BURTON avait su retrouver dans la littérature scientifique et qu'il s'était mis à synthétiser en Angleterre dans ses petits réacteurs semi-industriels de 20 litres, fut très efficace dans mes milieux chromogènes CHROMagar™.

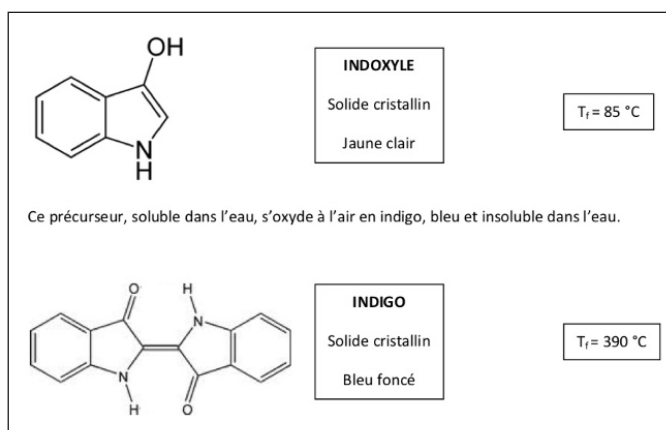
En remontant dans le temps, l'utilisation de chromophores similaires au Bromo-Chloro-Indoxyl remonte à des périodes très anciennes.

L'indigo par exemple est un des plus anciens colorants connus : il a été identifié sur des bandelettes de momies. L'indigo, l'Indoxyl- β -Glucoside, était extrait d'un petit arbuste qui appartient à la famille des légumineuses : l'indigotier.

L'utilisation du dérivé 6-Bromo-3-Indoxyl remonte également à fort longtemps. En effet le bromo-indigo, qui est un colorant pourpre, était déjà utilisé depuis l'Antiquité par les Phéniciens. Le produit était alors connu sous le nom de « pourpre de Tyr » et obtenu à partir des escargots de mer *Murex branderis*. Pour obtenir un seul gramme de colorant pur, il fallait 10 000 individus de cette espèce ! (figure 13)



FIGURE 13 – Le pourpre impérial de l'Antiquité, un dérivé de l'indoxyl avec un atome de brome en position 6.



Plus tard, l'importance des enjeux économiques de la production d'indigo justifia la recherche et la mise au point de nombreuses méthodes de synthèses. La première fut publiée par Adolf von BAEYER en 1878. Mais c'est le procédé très économique que Karl HEUMANN publia en 1890 qui fut retenu par le fabricant BASF. En 1900, la production d'indigo naturel était de 10 000 t/an à comparer aux 600 t/an synthétisées en usine. En 1914, cette tendance s'était déjà inversée considérablement : 870 t/an de produit naturel contre 22 000 t/an d'indigo de synthèse ! De nos jours, c'est le colorant utilisé pour les blue jeans.

Et moi qui en 1978 avais tant de mal à faire synthétiser 350 mg de 5Bromo-4Chloro-3Indoxyl-Glucuronide ! Grâce à ce chromophore 5-Bromo-6-Chloro-3-Indoxyl on obtenait une coloration rouge.

Vers 1994, à mon grand étonnement j'ai découvert qu'en 1953 une autre idée de substrat chromogène - conjugaison d'un chromophore et d'une molécule chimique pour donner substrat enzymatique - avait germé dans l'esprit du très grand chercheur Jacques MONOD (figure 14). J'avais choisi pour mon invention de combiner des sucres au chromophore Indoxyl pour obtenir par exemple le X- β -glucoside, X- β -glucuronide, etc. mais dès 1953, Jacques MONOD, futur Prix Nobel et excellent biochimiste, avait déjà eu une idée complémentaire qu'il avait confiée dans un écrit à Joshua LEDEBERG, autre futur Prix Nobel.

Il lui avait expliqué qu'il voulait faire synthétiser l'indoxyl alpha-Galactoside, avec une liaison alpha plutôt que bêta. Ceci montre que Jacques MONOD avait également eu l'idée d'étendre à d'autres enzymes la détection à l'aide d'un chromophore indoxyl.

Il n'avait pas poursuivi cette approche, sans doute du fait qu'il visait des études fondamentales sur *Escherichia coli* et non, comme moi vingt-quatre ans plus tard, le champ du diagnostic, lequel requiert une énorme variété de tests pour viser un très grand nombre de microorganismes différents à rechercher dans les hôpitaux et les laboratoires d'analyse.

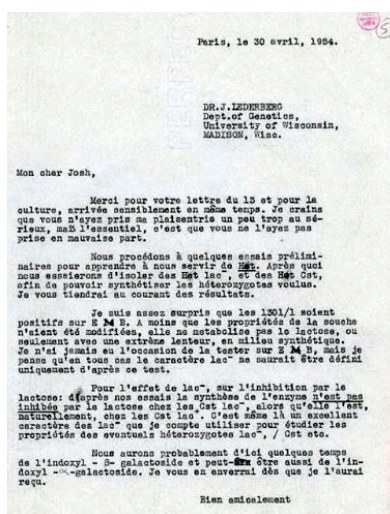


FIGURE 14 – l'intuition de Jacques MONOD (1953) pour un dérivé Galactoside avec une liaison alpha.

Les excellentes performances du milieu bi-chromogène CHROMagar™ Orientation, utilisé surtout pour les examens d'échantillons d'urines, me confortèrent dans mon projet de continuer à étendre la gamme des milieux chromogènes.

La même année 1994, je me suis aventuré en mycologie avec le milieu CHROMagar™ Candida qui permet d'identifier une demi-douzaine d'espèces de levures simplement par la couleur et l'aspect des colonies sur boîtes de Pétri.

La mycologie était un domaine à part en diagnostic microbien, représentant un marché relativement modeste. Mais avec l'explosion du problème du sida, causant fréquemment des infections à *Candida* opportunistes pouvant s'installer jusqu'à causer la mort du malade, les intérêts économiques et médicaux pour ce milieu CHROMagar™ Candida se multiplièrent car il permettait notamment de cribler les infections contenant des

espèces de *Candida* résistantes au fluconazole, même minoritaires dans un échantillon, par la seule couleur de colonie. Cela permettait de détecter ces *Candida* résistantes qui risquaient de se multiplier sous traitement du patient par le fluconazole.

Repérer la résistance aux antifongiques par la couleur de colonies sur des boîtes de Pétri qui ne contiennent pas d'antifongiques fut très utile pour les raisons suivantes. La levure *Candida* est un organisme fréquent à l'origine d'infections modérées ou graves. Certes, *Candida albicans* est le coupable le plus fréquemment isolé, mais les espèces non-*albicans* sont devenues plus fréquentes ces dernières années et sont associées à une mortalité plus élevée et à des taux de résistance aux antifongiques plus élevés que *Candida albicans*. Or, le taux de croissance plus lent des espèces de levures, par rapport aux bactéries qui se multiplient rapidement, conduit à ce que les tests de sensibilité aux antifongiques peuvent prendre beaucoup trop de temps.

Avec le milieu CHROMagar™ *Candida* qui ne contient pas d'antifongiques, la levure pousse plus rapidement et de plus l'on peut sans fluconazole, grâce à la couleur de colonie, distinguer des espèces fluconazole résistantes et fluconazole sensibles (figure 15).

Savoir rapidement quel type d'espèce de *Candida* est présent chez un patient peut aider le clinicien à sélectionner un traitement antifongique approprié, ce qui est décisif en cas d'infection grave.

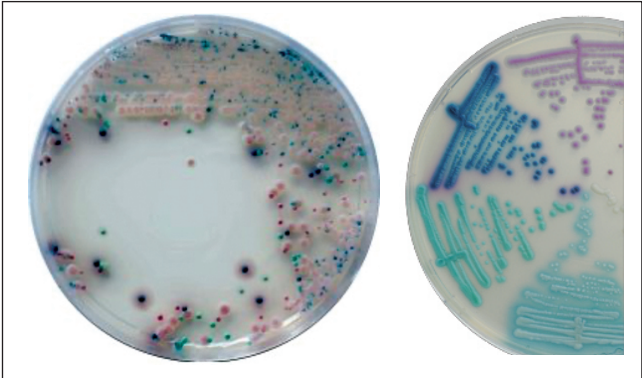


FIGURE 15 – Le milieu CHROMagar™ *Candida* (1994) qui permet l'identification de levures

Le milieu chromogène CHROMagar™ *Candida*, capable de détecter et de différencier des espèces de *Candida*, devint un outil important pour identifier les principales espèces de *Candida* cliniquement significatives. Il permit de repérer trois des espèces les plus cliniquement significatives *Candida albicans*, *Candida tropicalis* et *Candida krusei*, avec une spécificité de 99 % ou plus. Sur ce milieu, *Candida albicans* apparaît vert, *Candida tropicalis* apparaît bleu métallique, *Candida krusei* apparaît rose et duveteux ; quant aux autres espèces, elles donnent des colonies de couleur blanc à mauve.

Par la suite, le développement de nombreux milieux chromogènes pour divers microorganismes se poursuivit, années après années, comme le résume le tableau 1.

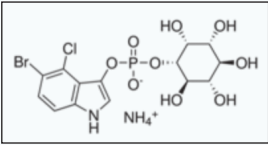
ESPÈCES	FORMULES	SUBSTRATS
<i>Bacillus cereus</i>	1	X-β-D-glucopyranoside (X-βGlc) Soy lecithin (lécithine de soja)
	2	X-myo-inositol-1-phosphate
<i>Campylobacter</i>	1	Triphényltetrazolium chloride (TTC)
	2	Aldol-acétate
<i>Clostridium perfringens</i>	1	X-β-D-glucopyranoside (X-βGlc) Phénolphtaléin-biphosphate (pyrophosphate ?) Sucrose (saccharose) et rouge de phénol
<i>Cronobacter sakazakii</i>	1	X-α-D-glucopyranoside (X-αGal)
<i>Escherichia coli</i>	1	X-β-D-glucuronide (X-βGlcA)
<i>Escherichia coli</i> / Coliformes	1	X-β-D-glucuronide (X-βGlcA) Salmon-β-D-galactopyranoside
<i>Escherichia coli</i> O157	1	Magenta-α-D-galactopyranoside (MαGal) X-β-D-glucuronide (X-βGlcA)
<i>Listeria spp</i> et <i>L. monocytogenes</i>	1	X-β-D-glucopyranoside (X-βGlc) Soy lecithin
	2	X-myo-inositol-1-phosphate (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-myo-inositol 1-phosphate ammonium)  Xylose et rouge de phénol
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella</i>	1	β-alanyl-7-amido-pentyl-3H-phenoxazin-3-one (β-ala-APP)
	1	X-β-D-galactopyranoside (X-βGal) Propylene glycol
	2	Magenta-octanoate (M-octanoate) X-β-D-galactopyranoside (X-βGal)
	3	X-α-D-galactopyranoside (X-αGal) CHE-β-D-galactopyranoside (CHE-Gal) et citrate d'ammonium et de fer III ??? CHE = cyclohexenoesculétin ???
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	X-α-D-glucopyranoside (X-αGlc)

TABLEAU 1 – TAB: microorganismes détectés & formules variées selon les fabricants

CHROMagar™ licencié à la société Becton Dickinson

Courant 1993, la société américaine Becton Dickinson me proposa un contrat d'achat de mes poudres CHROMagar™ pour fabriquer des boîtes prêtes à l'emploi et les vendre sous le nom BBL™ CHROMagar™. C'est ainsi que débuta une co-promotion de cette marque innovante CHROMagar™.

Quelques années plus tard, en 1997, Becton Dickinson me proposa de renforcer la collaboration par un contrat de licence, leur permettant de fabriquer eux aussi les poudres et de développer leurs propres formulations.

Cette co-promotion entre la société CHROMagar™ et la société Becton Dickinson a fait que la marque CHROMagar™ a peu à peu acquis une grande renommée internationale d'innovation et de qualité, qui se poursuit aujourd'hui.

CHROMagar™ et le laboratoire de microbiologie clinique

Un nouveau thème, la résistance aux antibiotiques: la grande diversité des microbes pathogènes peut donner l'impression que les laboratoires de microbiologie clinique sont semblables à une cuisine où le chef doit comprendre les préférences de croissance de tout microbe mais en fait ce beau ballet peut être perturbé par l'existence de bactéries résistantes aux antibiotiques.

Des méthodes très spécifiques ont pu être développées pour repérer les bactéries résistantes aux antibiotiques à l'aide des milieux chromogènes CHROMagar™ pour accélérer la détection et le criblage différentiel lors du processus d'identification. On peut ainsi aider à sélectionner plus vite l'antibiothérapie appropriée à choisir pour un traitement efficace ou pour aider à contrôler et améliorer l'hygiène hospitalière.

Un exemple important dans le domaine clinique est relatif à *Staphylococcus* qui est un genre de cocci à Gram positif avec un certain nombre d'espèces, y compris *Staphylococcus aureus*, un agent pathogène qui peut provoquer des infections allant des formes simples (boutons et furoncles) aux formes mortelles (septicémie et pneumonie). Par contre les staphylocoques à coagulase négative (CoNS), considérés comme partie de la flore d'une peau normale, provoquent rarement des infections dangereuses. Traditionnellement, les *Staphylococcus aureus* répondent bien au traitement avec une classe d'antibiotiques appelés pénicillines résistantes aux bêta-lactamases, comme la méthicilline. Malheureusement, des souches de *Staphylococcus aureus* ont développé une résistance à ce groupe d'antibiotiques et sont connues sous le nom de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM). Il est impératif que les laboratoires médicaux identifient rapidement le SARM pour déterminer le meilleur schéma thérapeutique et éviter les antibiotiques qui ne fonctionneront pas.

Cependant, les tests de sensibilité aux antibiotiques peuvent prendre du temps et requérir une grande expertise. Il est donc d'intérêt public d'améliorer et de simplifier la recherche des SARM. Becton Dickinson affirme par exemple que les maladies nosocomiales, dont les infections à SARM dans les hôpitaux, causent 80 000 décès par an aux États-Unis.

En m'inspirant de mon milieu chromogène pour *Staphylococcus aureus*, j'ai lancé en 2002 une approche innovante pour la détection des SARM, en développant un milieu CHROMagar™ MRSA. Ce milieu contient un système de criblage avec une haute sensibilité, effectué via la couleur de colonie des *Staphylococcus aureus* due aux substrats chromogènes spécifiques. Ce criblage est combiné à l'incorporation dans le milieu de produits sélectifs de telle sorte que le milieu inhibe les souches méthicilline sensibles sur boîte de Pétri, avec les autres bactéries inhibées ou donnant des colonies bleues ou incolores. Le milieu atteint pour les SARM une sensibilité et une spécificité proches de 100%.

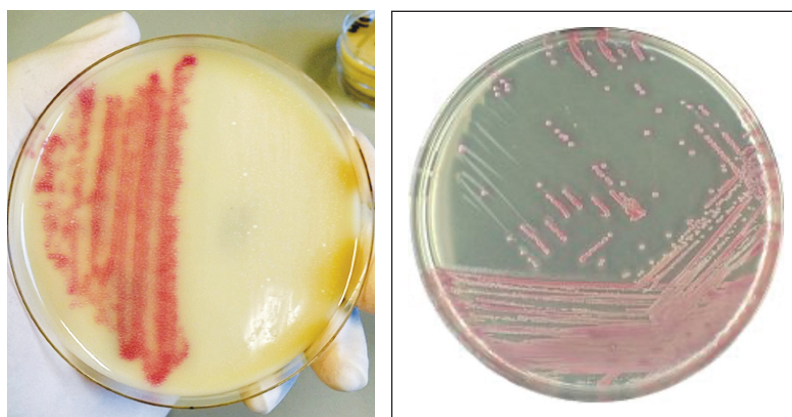


FIGURE 16 – Le milieu CHROMagar™ MRSA (2002) qui détecte les SARM comme colonies mauves

Par simple isolement de l'échantillon hospitalier sur le CHROMagar™ MRSA puis observation à l'œil nu et recherche de colonies de couleur mauve, on détecte la présence ou l'absence de SARM. On dispose ainsi d'une option de dépistage très rapide, à grande échelle et très peu coûteuse comparée aux méthodes à ADN développées par d'autres entreprises, d'autant plus importante que l'identification systématique et rapide d'un agent pathogène, chez les patients ou par exemple sur les poignées de porte dans un hôpital, est cruciale pour la lutte contre ces infections nosocomiales (figure 16).

Cette approche CHROMagar™ MRSA combinant une excellente sélection par antibiotique et la coloration mauve est devenue le standard mondial pour ce screening : elle est aujourd'hui la méthode la plus simple, la plus directe avec une grande sensibilité et spécificité.

► **À l'heure où des méthodes sophistiquées comme la PCR se sont développées, les géloses chromogènes sont parfois l'outil le plus utilisé comme compromis entre efficacité, simplicité et prix.**

CHROMagar™ et le laboratoire de microbiologie agroalimentaire

Revenons au cas de *Salmonella*, l'identification rapide, simple et peu coûteuse de la bactérie pathogène *Salmonella* n'est pas seulement importante dans le domaine clinique, mais elle est cruciale pour la surveillance de la santé publique et l'endiguement rapide des épidémies, en particulier d'origine alimentaire. Le *Center for Disease Control* (CDC) estime que *Salmonella* cause chaque année 1,35 million d'infections, 26 500 hospitalisations et 420 décès aux États-Unis.

J'ai continué de pister cette bactérie *Salmonella*. Il existe maintenant une large variété de géloses chromogènes CHROMagar™ disponibles pour la détection de *Salmonella*, notamment le milieu CHROMagar™ *Salmonella* Plus, sur lequel les colonies de bactérie *Escherichia coli*, souvent rencontrées en grand nombre dans la flore commensale lors de la recherche de *Salmonella*, sont incolores et ne dérangent plus la lecture. Cette amélioration permet une réduction de la charge de travail et des coûts, donnant un milieu facile à employer et à interpréter (figure 17).

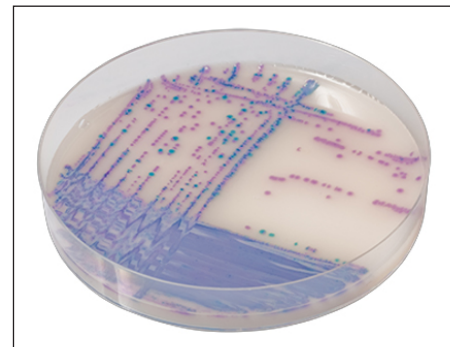


FIGURE 17 – Le milieu CHROMagar™ *Salmonella* Plus (2005) qui détecte aussi les *Salmonella* lactose positives

Une autre particularité avantageuse de ce milieu CHROMagar™ *Salmonella* Plus est qu'il permet de détecter aussi les souches lactose-positives de *Salmonella*. L'identification des salmonelles lactose-positives est exigée en microbiologie alimentaire par la norme ISO 6579-1 et ces souches atypiques ne pourraient pas être détectées si seuls les milieux traditionnels à base de lactose étaient utilisés (tels que les géloses Mac Conkey et Hektoen, par exemple).

► **Un milieu « user-friendly » aide à le rendre performant.**

L'avenir des géloses chromogènes CHROMagar™

La recherche et le développement des produits CHROMagar™ continue.

De nos jours, l'entreprise CHROMagar™ se targue d'un engagement pour une science de qualité, incluant de nombreux partenariats et la nécessité d'une implication sans relâche dans la recherche. La société CHROMagar™ a à cœur de persévérer dans la découverte de nouvelles solutions de détection et d'identification rapides et efficaces capables de relever les défis majeurs de contrôle des infections, dont les bactéries multirésistantes.

Aujourd'hui, le marché mondial des géloses chromogènes atteint probablement 100 000 000 de boîtes chromogènes par an, soit l'utilisation d'environ trois boîtes de milieu chromogène chaque seconde. Pourtant l'histoire du développement de cette invention enseigne que les idées nouvelles en science ne sont pas toujours populaires. Elle nous montre aussi que les intuitions et les rêves nécessitent de la patience pour se réaliser et déployer leur potentiel. J'ai dû démontrer ténacité, détermination et passion pour développer et faire connaître mes milieux chromogènes. Parfois la persévérance peut nous aider à changer le monde et les petits pas font les grands voyages !

► **Inventer, développer, commercialiser une nouvelle approche en microbiologie est une aventure. Contrairement à l'informatique où les résultats, bons ou mauvais, sont presque instantanés, contrairement à la recherche en physique nucléaire où la moindre manipulation prend des mois ou des années, la recherche en microbiologie permet, d'avoir chaque matin l'excitation de voir le résultat (souvent mauvais mais parfois bon) de l'expérience incubée le soir précédent.**

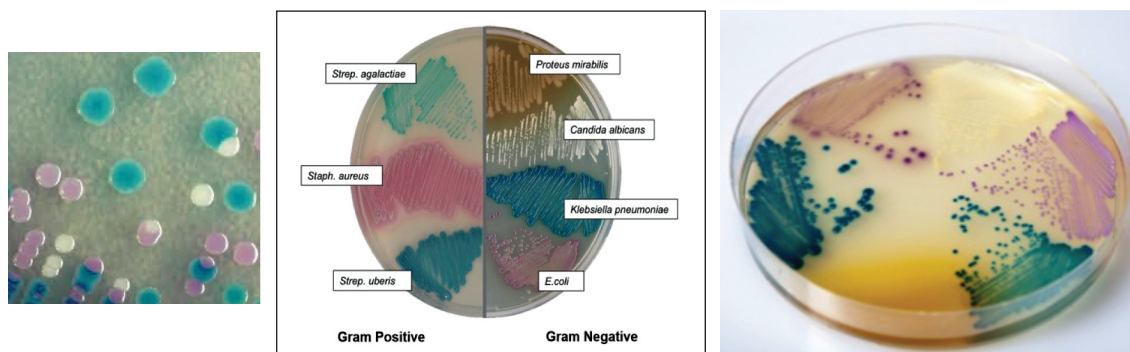
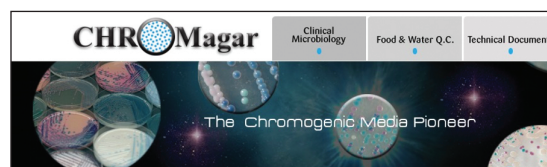


FIGURE 18 – des milieux CHROMagar™ pour flore gram négative et gram positive, etc.

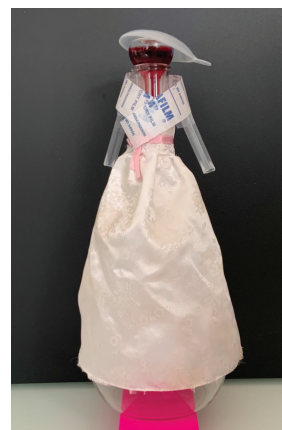
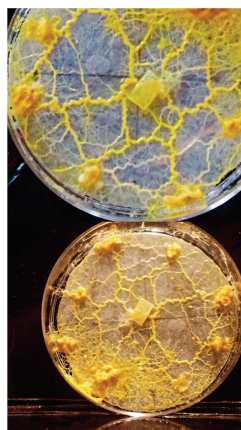
► **Avoir une carrière professionnelle qui combine Application médicale ou agro-alimentaire avec l'excitation de la Recherche scientifique chaque jour, a été un rêve.**

Pour les scientifiques, les laboratoires... et les artistes: des chefs-d'œuvre d'Agar Art !

La gélose chromogène est curieusement devenue au fil des années une nouvelle toile pour l'« agar art » avec des pièces étonnantes soumises chaque année aux divers concours de par le monde.



CONCOURS PHOTO « LES COURBES »



- Caroline BONNEFOY primée par le jury du concours – Courbe de vin
- Solène PORET – Courbes blobesques
- Christelle LARCHER – Courbes féminines
- Thierry VESIN – C dans la boîte