

L'OPÉRON



42^{ÈME} ANNÉE - JUIN 2017 - BULLETIN DE L'UPBM - TRIMESTRIEL : 12,50 €

api

UNE AVENTURE INDUSTRIELLE EN BIOTECHNOLOGIE

Nicole LESQUIR et Jean-Noël JOFFIN

Avec l'aide précieuse de Jean-Pierre GAYRAL, Jean-Pierre MARCEL, Robert PIERRON, Nicole DUFFAUD, Éveline GUÉHO

Les systèmes API (Analytab Products Incorporated, traduit pas DOUCET et PIERRON en Appareils et Procédés d'Identification) existent depuis presque un demi-siècle. L'évolution des techniques microbiologiques entraîne petit à petit la disparition de ce matériel qui a marqué les laboratoires de biologie médicale et nos TP durant cette longue période. Il nous a semblé utile d'en tenter un historique avec toutes les difficultés liées à l'éparpillement des informations de cette innovation.

Un petit historique de l'aventure industrielle des galeries API peut nous apporter une vision utile sur la démarche scientifique, technique et financière d'une application biotechnologique qui, aujourd'hui, après 45 ans tient encore face à des techniques plus performantes de biologie moléculaire ou de spectrométrie de masse. Cet historique s'est inspiré au départ d'un article de G. BLANCHET, pharmacien chimiste au Service de Santé des Armées (SSA), paru en 2001.

UN INVENTEUR, Jean BUISSIÈRE

Jean BUISSIÈRE, né le 8 mai 1927 à Grenoble, fait ses études de médecin militaire à Lyon ce qui le conduit en Algérie où il réalise tous les actes dévolus à un médecin militaire. À son retour en France, il s'intéresse à la microbiologie et devient assistant de bactériologie au Val de Grâce à Paris de 1959 à 1963. Il est alors recruté au Centre de Recherche du Service de Santé des Armées (CRSSA) de Lyon. Passionné par la bactériologie médicale, la miniaturisation, remplaçant les tubes en verre, lui apparaît très vite comme incontournable pour améliorer l'identification bactérienne en utilisant plus de caractères, en réduisant le coût et le nombre de gestes techniques ainsi que la durée d'obtention des résultats, ce dernier facteur étant essentiel en médecine. Il quitte le CRSSA fin 1974 en prenant sa retraite militaire, ayant mis à profit cette décennie pour créer l'essentiel des systèmes API d'identification rapide des bactéries et des levures médicales (figure 1).



FIGURE 1 - Jean BUISSIÈRE
A. En 1980 au congrès de microbiologie tropicale.
B. Une de ses interventions au Lycée de la Plaine de l'Ain d'Ambérieu-en-Bugey, dans la classe de BTS (vers 1997)

■ Nicole LESQUIR
Retraitée
(Lycée de la Plaine de l'Ain,
01 AMBÉRIEU-EN-BUGEY)
■ Jean-Noël JOFFIN
Retraité
(Lycée Paul Éluard,
75 SAINT-DENIS)
■ Jean-Pierre GAYRAL
Jean-Pierre MARCEL
Robert PIERRON
Anciens d'API
■ Nicole DUFFAUD
Néo-retraîtée responsable
formation puis responsable
qualité de la société bioMérieux
à La Balme-les-Grottes
■ Éveline GUÉHO
Ancienne de l'Institut Pasteur
de Paris

1. L'ÈRE PRÉ GALERIE API

1.1. UNE PREMIÈRE APPROCHE DE MINIATURISATION : DISQUES DE PAPIER

Jean BUISSIÈRE a conduit des expérimentations en fabriquant des disques de papier imprégnés de substrats (glucides le plus souvent) ou de réactifs (essentiellement des indicateurs de pH). Ils les disposent, soit superposés, soit côte à côte. Pour assurer une anaérobiose favorable à la fermentation, les disques sont recouverts d'une substance imperméable à l'air, la paraffine par exemple. La culture microbienne est alors ajoutée sous forme d'une suspension très dense qui va imprégner le disque de substrat et celui du réactif associé. Pour que la culture puisse se faire, il manque les peptones : les disques préparés sont déposés sur une gélose peptonée, la paraffine maintenant une anaérobiose.

L'utilisation du substrat se traduira le plus souvent par une acidification facile à détecter sur les disques, pour une durée faible d'incubation (1 à 6 heures).

La [figure 2](#) montre les dispositifs.

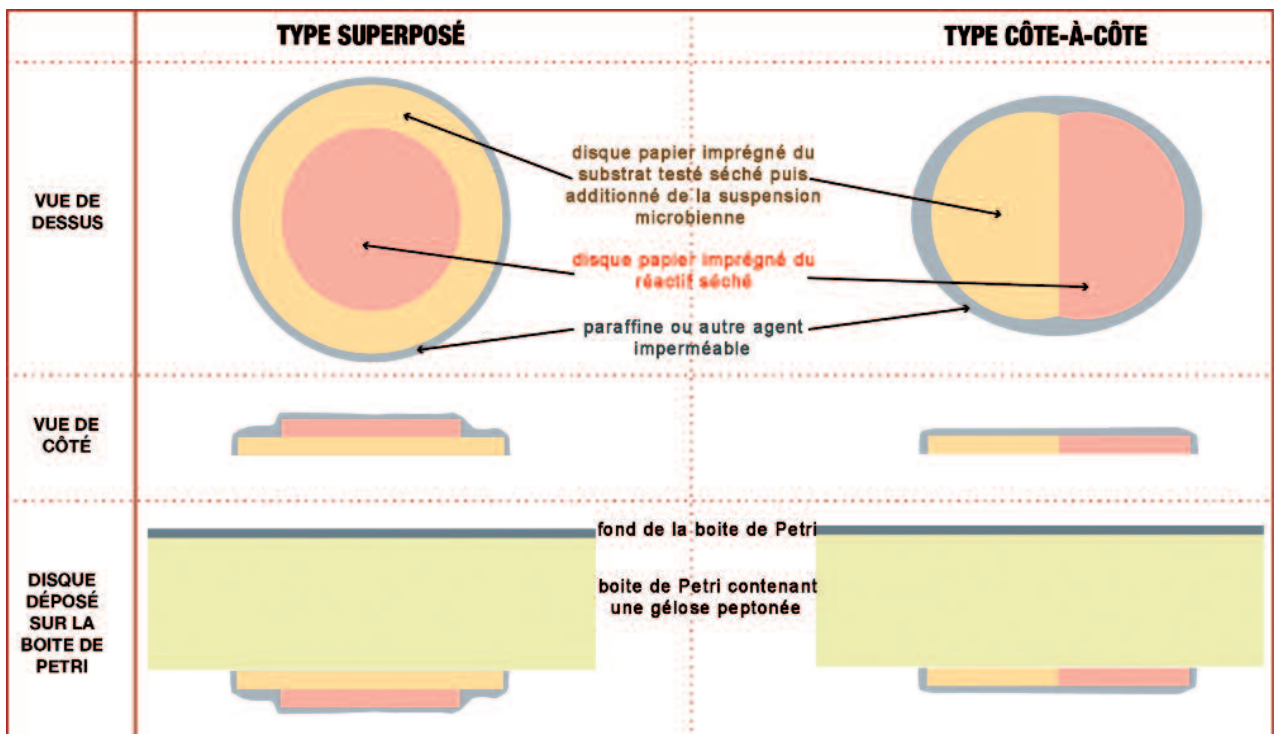
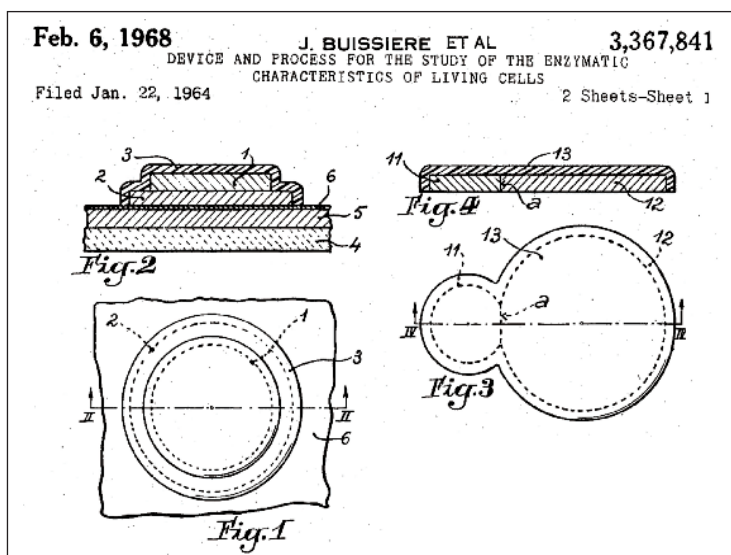


FIGURE 2 - DISQUES ET FERMENTATION
(d'après le brevet d'invention n° 1 356 317 délivré en 1964)

Les disques étaient préparés avant en série et conservés dans une enceinte déshydratée.

Dans un brevet de 1968 (Jean BUISSIÈRE et Pierre LACROIX - brevet US 3 367 841) un dispositif analogue est retrouvé ([figure 3](#)).



**FIGURE 3 - EXTRAIT DU BREVET US 3 367 841
POUR LA MÉTHODE DES DISQUES**

1.2. UNE DEUXIÈME APPROCHE : DES TUBES MINIATURES

Dans l'idée de la miniaturisation, Jean BUISSIÈRE et Paul NARDON (Ingénieur de l'INSA) imaginent en 1968 un système plus astucieux : un tube en PVC préformé emprisonnant un papier filtre imprégné des substrats et éventuellement des réactifs, est ensemencé par une suspension microbienne placée dans le tube (figure 4).

■ Soudure du plastique

Se pose toutefois un délicat problème technologique : comment assurer la soudure entre les deux lames de plastique ? C'est alors que, lors d'un voyage en train vers Paris, beaucoup plus long qu'aujourd'hui, Jean BUISSIÈRE rencontre, par hasard, un fabricant d'imperméables, Monsieur Paul MONTAGNON créateur de la société MANUDO (manufacture dauphinoise). Celui-ci, après une carrière dans les métiers de bouche, est devenu un expert du plastique et notamment "la technique de soudure minutieuse, à l'aide d'ondes de haute fréquence, de deux lames plastique formées sous vide enserrant un support" sur la base du brevet Thimmonnier. MONTAGNON utilise ce brevet pour des emballages, notamment ceux des étuis des stylos-billes BIC, des imperméables, des sachets de sel pour l'armée française, etc.

■ Le papier

"À cette époque, les papèteries Condat-sur-Vézère mettent au point un nouveau produit à base de fibres de cellulose compactées, très lâches". C'est ce produit qui donnera naissance au SOPALIN (SOciété, PApier, LINge) ! C'est un papier non tissé, sans colle.

Jean BUISSIÈRE montre que le procédé de soudure envisagé et les fibres de cellulose retenues sont tout à fait compatibles.

■ Le système

La figure 4 montre le système réalisé.

- Le tube est préformé par la soudure des plaques de PVC emprisonnant le papier. Le volume du tube est alors de 0,2 mL à comparer aux 5 à 10 mL des tubes classiques.
- Les substrats et réactifs (par ex. glucide + indicateur de pH) sont introduits par les ouvertures (43).
- Un séchage sous vide est réalisé fixant substrat et réactifs dans le papier filtre.

Ces plaques sont ensemencées en utilisant une suspension bactérienne obtenue par culture sur bouillon, centrifugation et dilution du culot dans de l'eau distillée. Cet inoculum est introduit par les ouvertures 43.

Après incubation, la lecture est réalisée directement (en général changement de couleur d'un indicateur de pH) ou après addition d'un réactif par une ouverture 43.

La surface de contact entre le substrat et la suspension bactérienne est plus importante que sur une surface lisse. La réaction est donc beaucoup plus sensible. Un suivi au spectrophotomètre est possible pour estimer la vitesse de la réaction.

Le nouveau procédé prend alors le nom de AUXOTAB. L'aide de Henri LABRUYÈRE, un mécanicien formé sur le tas, est alors très importante.

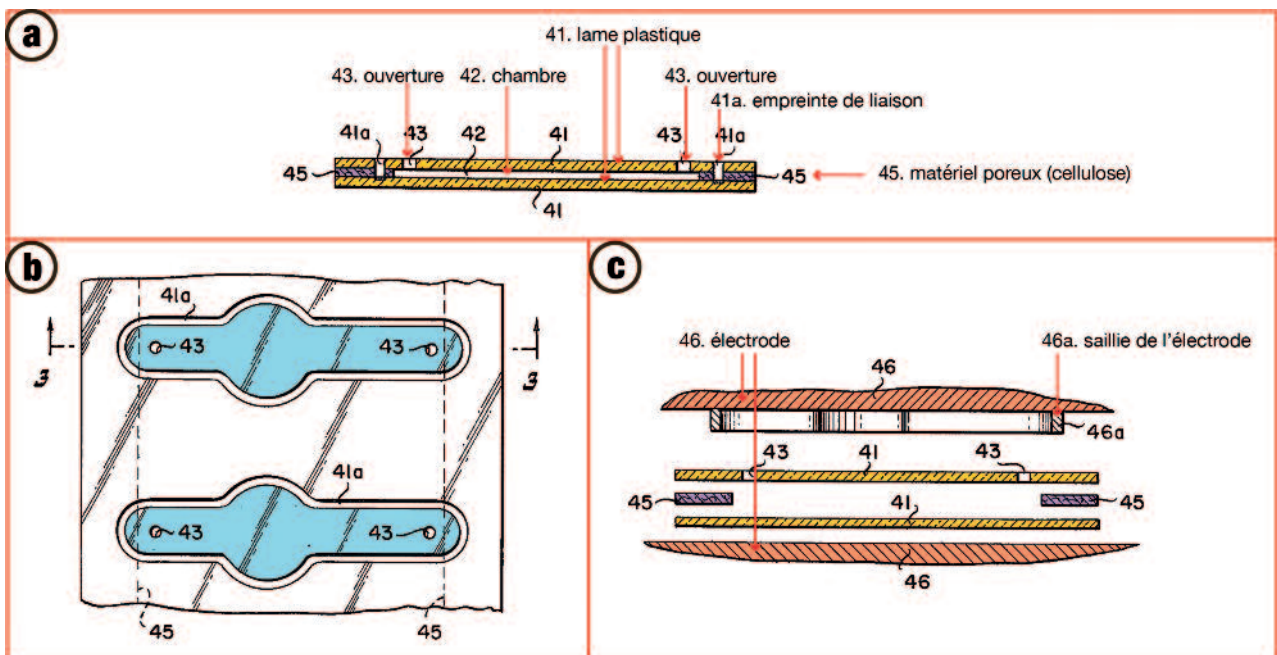


FIGURE 4 - DESSIN ADAPTÉ ET COLORISÉ DU BREVET US 3690836 MONTRANT LES DIFFÉRENTS ÉLÉMENTS DU SYSTÈME
A : vue de côté de la plaque. B : vue de dessus. C : système de soudure pour l'assemblage.
 D'autres configurations sont décrites dans le brevet.

Toutefois, il semblerait que le nom ait été déjà utilisé (référence trouvée dans le brevet US3856628 datant de mai 1972) et que le nouveau procédé et l'entreprise aient alors pris le nom de VIXO-TAB que l'évolution du système vers les galeries API fera tomber dans l'oubli. Des conflits juridiques avec la société SOBIODA sur la commercialisation et/ou l'utilisation des noms entraînent l'intervention de la justice donnant raison à la société API.

Il semble qu'une société américaine ait commercialisé le système (figure 5). Dans cette figure, le brevet invoqué est de Jean BUISSIÈRE. Les tubes sont légèrement différents sans que l'on puisse apporter plus de précisions.

Les dix tests réalisés étaient : Réduction de la résazurine (test de viabilité) / Malonate / PDA / H₂S / Saccharose / ONPG / LDC / ODC / Uréase / Indole.

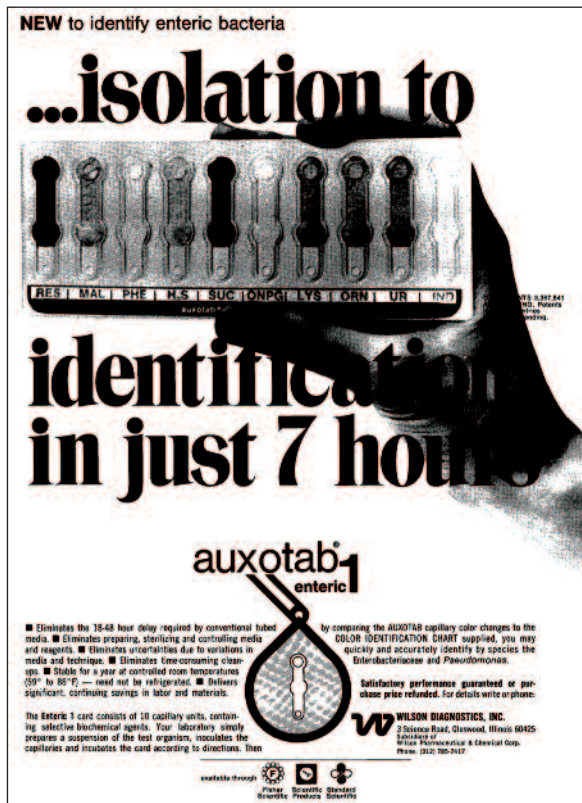


FIGURE 5 - PUBLICITÉ POUR LE SYSTÈME AUXOTAB (Système commercialisé par Wilson Diagnostics INC.)

Dans un article de 1975 "Étude comparée du sérum sanguin et du liquide folliculaire préovulatoire chez la vache" (Y. MENEZO et J. TESTART, *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 1975, 1511), 1-8), ce dispositif a été utilisé, non dans un but bactériologique, mais pour la caractérisation des activités enzymatiques rassemblées dans le tableau I. Cette approche avait déjà été utilisée dans un travail de 1970 par J. BUISSIÈRE et J. PENY sur l'identification du genre *Staphylococcus* en complément de l'étude du métabolisme glucidique. L'utilisation d'enzymes du même type se généralisera dans les nouvelles galeries APIZYM, puis d'autres.

Enzyme	Substrat
Phosphatase alcaline 1	Phénolphtaléine diphosphate (tampon alcalin)
Phosphatase alcaline 2	2-naphthyl-phosphate
Estérases	2-naphthyl-éthanoate et 2-naphthyl-butanoate
Lipases	2-naphthyl-nonanoate, laurate, myristate, palmitate, stéarate
Trypsine	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthyl amide
Chymotrypsine	N-benzoyl-DL-phényl-alanyl-2-naphthyl amide
Aminopeptidases	DL-alanyl-2-naphthyl amide, L-leucyl-2-naphthyl amide, L-Valine-2-naphthyl amide
Phosphatase acide	Phénolphtaléine diphosphate (tampon acide)
α-D-Glucosidase	2-naphthyl-α-D-glucopyranoside
β-D-Glucosaminidase	Naphthol ASBI N-Acétyle-β-D-glucosaminide
β-D-Glucuronidase	Acide 2-naphthyl-β-D-glucuronique
β-D-Galactosidase	ONPG

TABLEAU I - ENZYMES RECHERCHÉES AVEC LE SYSTÈME AUXOTAB DE LA FIGURE 5

2. GALERIES API

2.1. LES PREMIERS PAS

Poursuivant ses recherches, Jean BUISSIÈRE s'oriente vers des tubes ouverts d'un seul côté en leur donnant une forme de sabot. Le fond du tube contient les substrats et les réactifs éventuels sous forme déshydratée. Ces tubes sont ensemencés, par une suspension bactérienne par le côté ouvert, autrement dit les galeries actuelles, sans le papier utilisé dans Auxotab. (figure 6). L'apport de Jean-Pierre GAYRAL (ingénieur INSA), développeur, est fort précieux de même que celui de Henri LABRUYÈRE qui inventa les machines de production et installa progressivement l'automatisation de la production dans l'usine créée par Paul MONTAGNON, le capital nécessaire étant apporté par lui-même, sa famille, des amis ainsi que Jean BUISSIÈRE.

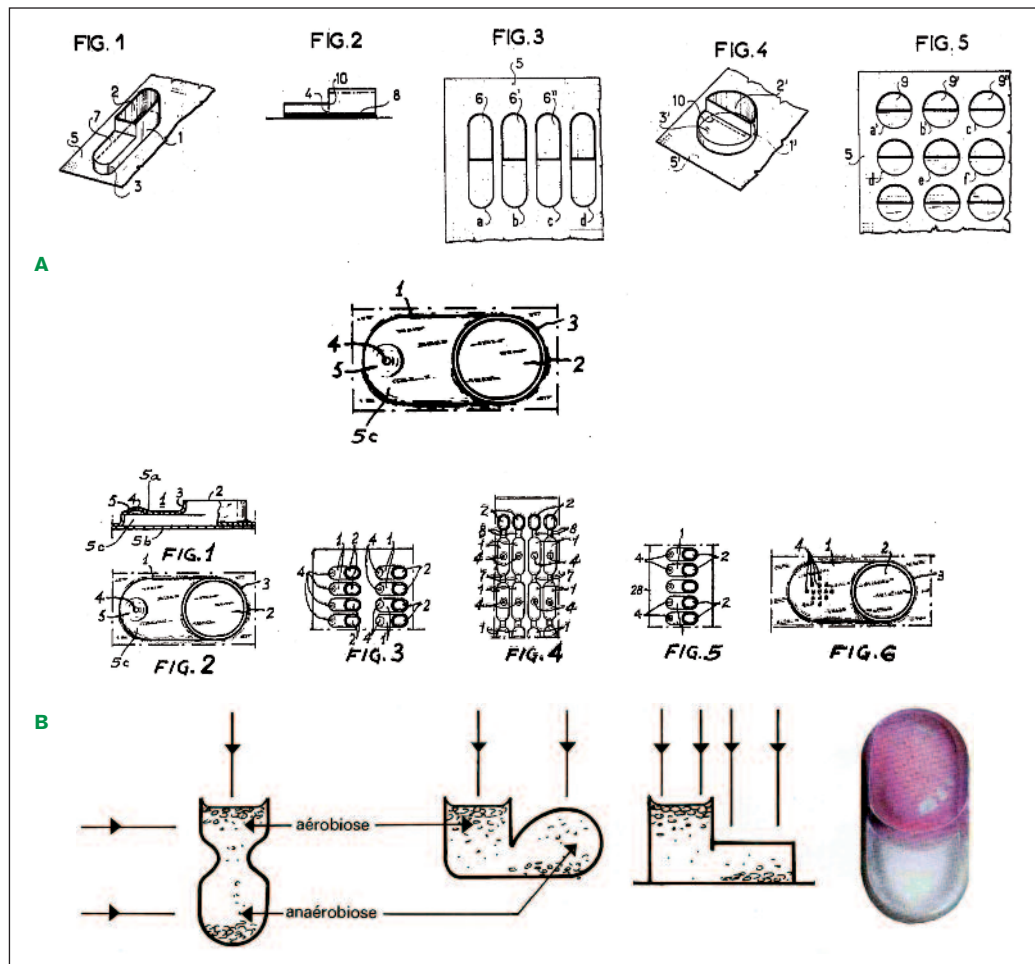


FIGURE 6 - LES PREMIERS PAS DES GALERIES API
A. Dessins extraits des brevets (US 3 694 320 et 1.592.878 de l'INPI).
B. Dessins d'une documentation API.

Vers 1968, la première galerie réalisée est la galerie api 20E, probablement à l'état de prototype, avec des tubes un peu plus grands que la galerie définitive. Sa commercialisation semble commencer en 1970-1972 et elle est toujours sur le marché ! Elle comprend vingt cupules en forme de sabot avec une partie aérobie ouverte liée à une partie basse fermée en relative anaérobiose, une anaérobiose quasi complète étant obtenue par obturation de la cupule, avec une goutte d'huile de paraffine (figure 7). Elle est alors testée avec succès à l'hôpital des armées Desgenettes de Lyon. Le problème étant de commercialiser à grande échelle une telle galerie dans un monde de bactériologistes où l'innovation a quelque peine à s'implanter



FIGURE 7 - GALERIE API 20E (*Escherichia coli*)
Photographie de Pascal FRAPERIE

2.2. LE DÉVELOPPEMENT ET LE SUCCÈS D'API

Après avoir finalisé la production technique de la galerie api 20E dans sa propre maison, Paul MONTAGNON, l'industriel du plastique qui avait compris l'intérêt du produit et son potentiel économique dans un marché en plein développement, construit en 1974 à La Balme-les-Grottes (Isère) l'usine API SYSTEM (figure 8A). Cette usine dédiée aux produits API existe toujours et poursuit son extension avec un nouveau Centre de Recherche et Développement (R&D) créé en 2014 et entièrement financé par bioMérieux (figure 8B). Entre 1970 et 1975, toutes les deux secondes une galerie était utilisée dans le monde. Parallèlement la société Manudo à Montalieu reste spécialisée dans la soudure des plastiques (fabrique des poches médicales diverses en plastiques et est toujours fournisseur exclusif des galeries API de la société bioMérieux).

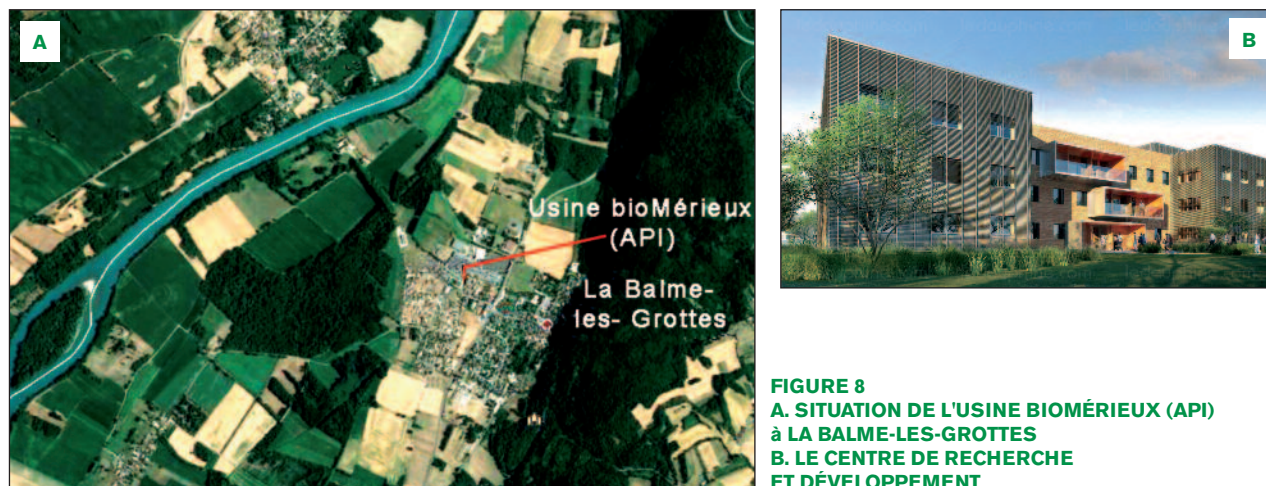


FIGURE 8
A. SITUATION DE L'USINE BIOMÉRIEUX (API)
à LA BALME-LES-GROTTES
B. LE CENTRE DE RECHERCHE
ET DÉVELOPPEMENT

■ Pourquoi un tel succès ?

Les clés du succès des galeries sont nombreuses.

● La reconnaissance internationale

La traversée de l'Atlantique s'avère très tôt déterminante. Un banquier français travaillant à la banque Worms de New-York et dont le fils souffre d'infections du tractus urinaire récidivantes liées à un *spina bifida*, présente les galeries API (probablement en 1968 sous forme de prototypes) au docteur EISENBERG, célèbre microbiologiste du *Mont Sinai Hospital*. L'enthousiasme du docteur conduit le CDC (*Center of Disease Control*) d'Atlanta, en la personne du Docteur EWING, à confirmer la faisabilité du procédé, et contribue de façon majeure à la reconnaissance des galeries API. Nous sommes alors en pleine guerre du Vietnam avec des blessures infectées sur des jeunes hommes : la galerie permet de montrer que des bactéries réputées peu pathogènes voire non pathogènes comme *Providencia stuartii* sont bien responsables d'infections. Les bactériologistes américains sont alors convaincus de l'intérêt de la méthode API. Cet intérêt leur sera confirmé plus tard grâce à la capacité d'une autre galerie API (probablement la galerie api 50E) de différencier deux bactéries très proches, *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus* lors d'une infection dans des troupeaux de vaches ayant consommé de la poudre d'os contaminée.

● Le développement rapide de nombreuses galeries

Sous l'impulsion de Michel DOUCET, pharmacien, directeur général de l'entreprise API SYSTEM de Paul MONTAGNON, une structure de recherche et développement est alors mise en place : le laboratoire de recherche API dirigé par Robert PIERRON (pharmacien), Jean-Pierre GAYRAL (docteur ingénieur, responsable de l'équipe de recherche et développement) et LABAN (ingénieur responsable de la partie informatique, indispensable au traitement des données des expérimentations et la construction des bases de données). N'oublions pas que l'informatique de l'époque était embryonnaire...

Les problèmes technologiques étant résolus, d'importantes recherches ont été mises en œuvre pour déterminer les caractères utiles à l'identification, en particulier enzymatiques, d'autres groupes bactériens que les Entérobactéries. De nouvelles molécules devaient être fabriquées par les chimistes. Des microbiologistes extérieurs, grâce à des collections de microorganismes bien identifiés, apportaient leurs connaissances et testaient les prototypes de galeries pour la sélection finale des tests.

Ce développement de tests, rendu rapide par l'efficacité des équipes inventant de nouveaux tests et des méthodes originales d'échantillonnage a permis la création de nombreuses galeries adaptées à d'autres groupes de microorganismes : api 20A, api 20NE, api Coryne, api Strep, api Staph, api NH, api Listeria et beaucoup d'autres.

En outre, des galeries destinées à la recherche taxonomique et au typage des souches ont été



2017

XXXXII

L'OPÉRON N°92

prises au point, telles les galeries de 150 caractères biochimiques ou de 200 caractères enzymatiques. Celles-ci étaient mises à la disposition de centres de recherche (universités, hôpitaux) dans des accords de collaboration qui donnaient à API la primeur sur les résultats. Ces nouvelles galeries ne sont pas de simples copies de l'api 20E : introduction de l'auxanogramme (api 20NE, api 20aux), cupules de forme différentes (api 20 Strep), recherche d'activités enzymatiques originales (api 20 Strep), etc.

● Un codeur

La galerie api 20E comprend vingt tests, beaucoup plus que les galeries classiques de l'époque, ce qui rendait fastidieux l'interprétation des résultats par les biologistes. Pour simplifier ce travail, un système de codage (en base 8) est mis au point par Robert PIERRON en 1972, aboutissant à un profil numérique. Il adjoint un codeur pour la lecture directe des galeries (figure 9). Il suffit ensuite de lire dans le catalogue analytique correspondant à la galerie ou d'utiliser un système informatique développé à ce moment-là.

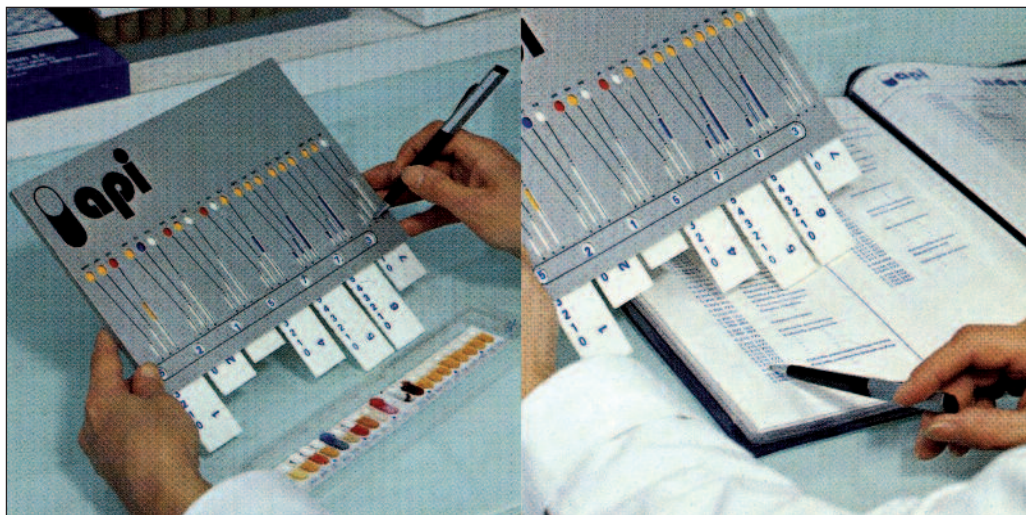


FIGURE 9 - LE CODEUR API ET LE CATALOGUE ASSOCIÉ

● La création d'une importante souchothèque

Un autre facteur important a été la constitution, depuis les toutes premières années, de la collection de microorganismes API : toutes les souches testées dans les diverses études collaboratives étaient caractérisées et conservées congelées dans la souchothèque qui, aujourd'hui, contient près de 100 000 souches.

● Une démarche commerciale à travers le monde (une internationalisation)

Pierre JANIN a joué un rôle essentiel en présentant la (les) galerie(s) API aux leaders d'opinion : CDC (*Center of Disease Control*) aux USA, NIH (*National Institute of Health*) au Japon, NIH (*National Institute of Health*) à Bethesda USA, NHS (*National Health Society*) en Angleterre, etc. Il a créé la société *Analytab Products Incorporated* (API) qui avait les droits de distribution exclusifs dans le monde entier sauf la France ; il a ensuite sélectionné dans de nombreux pays des distributeurs locaux puis il a créé des filiales en Europe (Suisse, UK). En France la distribution par la société Institut Pasteur Production ayant échoué, Paul MONTAGNON choisit de vendre directement aux clients (laboratoires d'analyses médicales et hôpitaux).

● Une cohésion de l'organisation

Les équipes techniques étaient constituées de nombreuses compétences qui ont été mises à profit : microbiologistes, biochimistes, informaticiens, médecins, pharmaciens, ingénieurs. La collaboration établie entre les personnes a été très fructueuse pour le développement et la production des galeries. Il s'agissait souvent de jeunes diplômés, détachés au CRSSA pour leur service militaire.

La force commerciale était aux USA mais toutes les relations techniques avec les distributeurs et les clients passaient par les équipes techniques de France.

La création d'un réseau mondial de contact avec les leaders d'opinion a permis très tôt dans l'histoire de la compagnie d'établir des collaborations scientifiques avec de grands centres hospitalo-universitaires à travers le monde.

● Une approche qualité avant l'heure

Un contrôle qualité des produits utilisés pour la fabrication, a été mis en place, en particulier en raison de la variabilité des produits chimiques à l'époque, mais aussi un contrôle des galeries avec, par exemple, une chromatographie en couche mince des glucides et un dosage HPLC des antibiotiques des cupules des galeries ATB.

• Une approche moderne de la microbiologie

Le passage de l'identification dichotomique à l'identification adansonienne, fondée sur l'égalité de poids de chaque caractère, est un autre aspect innovant essentiel de la démarche et bien déroutant pour les microbiologistes de l'époque, ou d'aujourd'hui. Ce passage se traduit par l'apparition de tableaux de pourcentages de positivité au lieu des tableaux en +, - ou V, tableaux issus de bases de données américaines. Avant les microordinateurs dont la diffusion ne faisait alors que commencer, l'établissement et la diffusion des catalogues de profils numériques comme aide à l'interprétation des résultats obtenus avec les galeries a été un autre facteur clé du succès.

• Une intégration très rapide de l'informatique

Un premier appareil fondé sur l'utilisation d'un microordinateur apparaît très vite. La date exacte de sa commercialisation n'a pas pu être retrouvée mais il existait déjà en 1984 à la Balme-les-Grottes. Il s'agit de l'ATB 1510 puis 1530 (figure 10A), ATB signifiant probablement *Automatic Testing Bacteriology*. Le même sigle ATB a été utilisé ensuite pour une galerie (ATB 32 GN), puis pour les galeries antibiogramme. Cet ordinateur permettait la gestion des analyses microbiologiques incluant le logiciel APILAB pour l'identification des microorganismes.

Autant qu'on puisse aujourd'hui le dire, cet appareil était conçu autour d'un Apple II et fonctionnait avec les disquettes 13 cm (5,25" = 13,3 cm). En termes de datation, l'Apple II apparaît vers 1977 et reste commercialisé probablement jusqu'en 1984, date d'apparition du Macintosh. Les lecteurs les plus jeunes ne peuvent pas facilement comprendre que l'informatique des années 1970 puis 1980 est pour le moins débutante.

Cet appareil évolue vers une version ATB 1535 (puis ATB 1545 avec les premiers "PC") (figure 10B) incluant un lecteur semi-automatique des galeries ATB (présentées ci-après) et des galeries API. Le système ATB était équipé du logiciel ATB Plus (interprétation galeries + stockage de données + impression) incluant, au moins vers 1991, un logiciel expert pour l'interprétation des résultats des antibiogrammes.

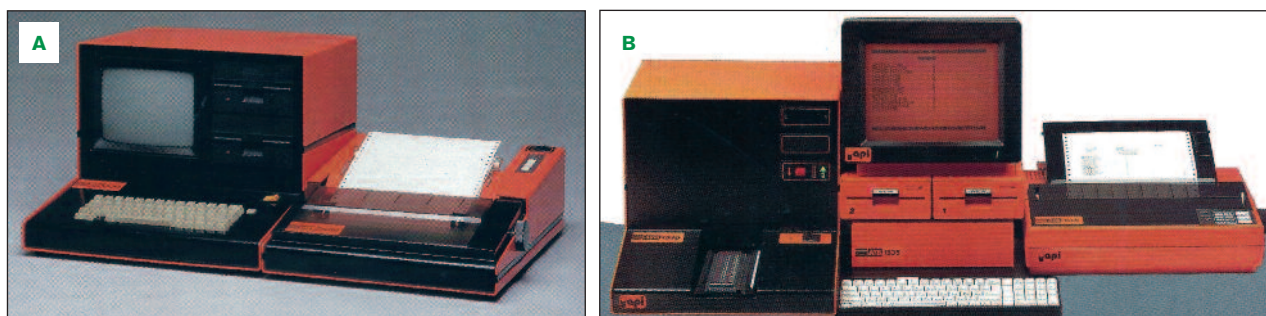


FIGURE 10 - GESTION DES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES À L'AIDE D'UN ORDINATEUR
A. ATB 1530 (Apple II). B. ATB 1535 (PC)

■ L'antibiogramme

Si l'identification microbienne est un aspect essentiel du développement des galeries API, l'importance de l'antibiogramme n'a pas échappé au fabricant. Michel DOUCET et Jean-Pierre GAYRAL développent, sur le même principe de cupules plastique le système qui portera le nom d'ATB à partir de 1977. Le choix de ne réaliser des tests que dans deux cupules (aux deux concentrations critiques), le choix des antibiotiques réalisé par le fabricant et non le biologiste ont été difficiles à imposer. La semi-automatisation a permis au système de s'implanter malgré la concurrence de la méthode des disques. L'implantation d'un système expert était alors simple à réaliser. La figure 11 montre ces différentes galeries.

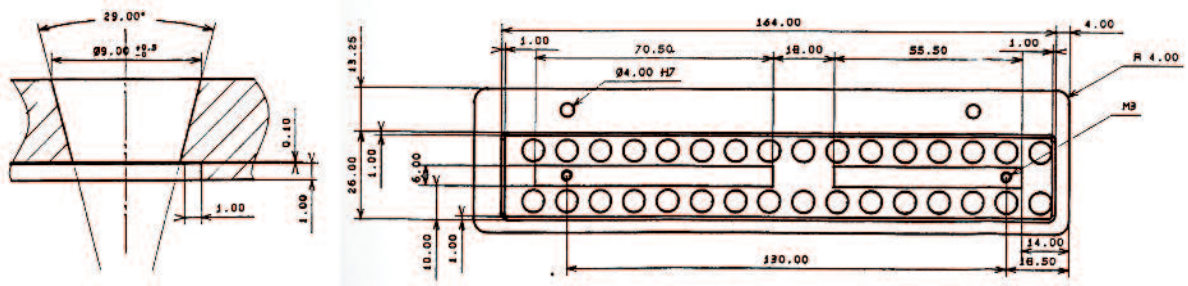
■ De nombreux obstacles juridiques et financiers s'ajoutent aux obstacles techniques...

Avertissement : les données qui suivent peuvent être contredites par de nouvelles informations. Elles reposent sur des témoignages limités.

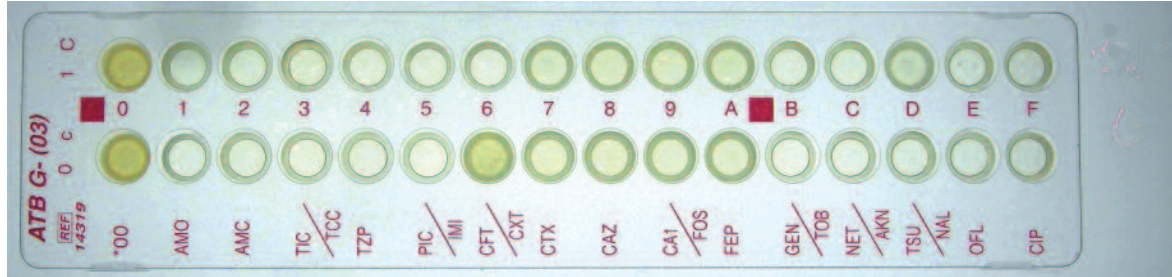
La société SOBIODA qui devait développer le système AUXOTAB revendique la propriété industrielle du procédé VIXOTAB. Elle est finalement déboutée mais le nom de VIXOTAB, trop proche de AUXOTAB, doit être changé et devient API. Le service de santé des armées ne peut, par manque de moyens, assurer le financement du développement qui se fera donc uniquement par fonds privés.

Les galeries API ont été commercialisées dans un premier temps par des filiales créées dans différents pays (USA, Australie, etc) qui ont distribué les galeries. En France, le distributeur était, en 1970-73, l'*Institut Pasteur Production* racheté, des années plus tard, par Biorad. Mais cette entreprise n'a pas compris alors le potentiel scientifique et commercial de cette méthode, avec d'importantes résistances conservatrices.

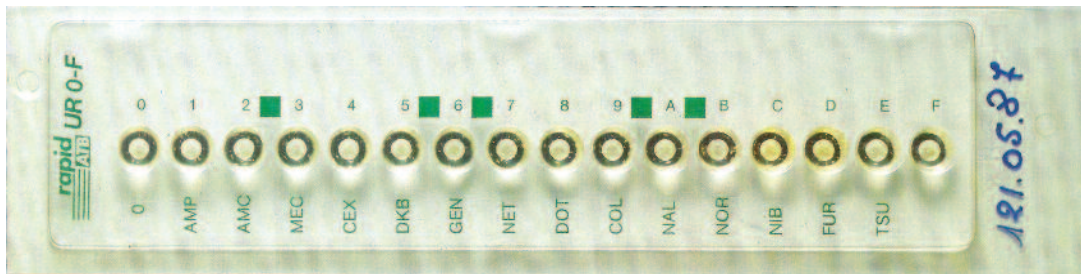
Aux USA, sous la direction de Pierre JANIN, très actif commercial d'API, le développement est au



A



B



C

FIGURE 11 - LES GALERIES ATB

A. Le modèle de la galerie plastique (d'après le brevet).

B. Une galerie ATB (pour les bactéries Gram -).

C. Modèle de galerie ATB rapide (lecture en 4 heures par automate)

contraire très important. Il crée, comme prévu au contrat, la société ANALYTAB qui vend les galeries aux USA, puis les fabrique dans une usine à Long Island selon un procédé légèrement différent avec une déshydratation des galeries sous vide et non par séchage comme à La Balme. Des divergences apparaissent avec des galeries nouvelles différentes des deux côtés de l'Atlantique. Dix ans plus tard (1984), la société ANALYTAB est vendue à une grosse société américaine (*American Home Products*). C'est le début du divorce : les relations entre les sociétés deviennent alors houleuses. API System crée alors une filiale aux USA (*DMS Laboratoires Inc*), concurrente, pour y commercialiser les galeries nouvelles. Notons que l'expédition des galeries fabriquées à La Balme était réalisée déjà par avion, en particulier pour le meilleur contrôle des températures de ce mode de transport.

Les équipes de recherche développement d'API System introduisent, avec un grand succès au début des années 1980, un système d'antibiogramme semi-automatisé accompagné d'un système expert d'interprétation de l'antibiogramme.

Alain MÉRIEUX, président de bioMérieux, entretenant des relations personnelles avec Paul MONTAGNON, rachète API System en 1987 pour l'intégrer à bioMérieux en 1989, et développer le pôle bactériologique de l'entreprise. Puis, sur les conseils de M. DOUCET, il achète VITEK en 1989. Ce système permet une automatisation plus importante, complète et concurrence les galeries API. L'intégration des points forts des équipes de recherche et développement américaines et françaises rassemblées pour un projet unique (Vitek2, nouvelle génération de Vitek) conduit à un grand succès commercial.

Le système Vitek avait été développé pour la NASA et un appareil a été effectivement envoyé dans l'espace pour réaliser des analyses microbiologiques.

Puis en 1990, il achète ANALYTAB, en chute, pour réduire des aspects juridiques négatifs dans le montage. L'usine américaine est fermée vers 1992. Toute la technologie et la propriété intellectuelle d'API reviennent alors dans des mains uniques ce qui est encore le cas aujourd'hui.

Coopération entre le lycée de la Plaine de l'Ain d'Ambérieu-en-Bugey, API et Korano

Marc et Nicole LESQUIR (retraités d'Ambérieu), se souviennent d'entretiens avec Jean BUISSIÈRE à son domicile, avec passage par le salon pour rejoindre son laboratoire installé dans sa maison. Dans les premières années de la section ambarroise, entre 1986 et 1989, avec à l'époque une classe de 1^{ère} F7, une convention avait été signée entre le lycée et API pour tester des souches lyophilisées, conditionnées dans des tubes en verre scellés et apportées par leur voisin (Christophe MEUNIER) qui travaillait à la Balme-les-Grottes chez API.

Dans l'aventure Korano, le BTS biochimiste a permis un travail sur l'in vitro végétal dans les années 1992-1995 ainsi qu'une étude sur des milieux de culture mis au point par la société pour détecter des résistances bactériennes à certains antibiotiques en 1998.

Un exemple d'application de l'identification

Les différentes galeries ensemencées dans la figure 12 ont été réalisées par les étudiants sur des souches isolées de leurs selles normales. Tous les taxons identifiés sont des *E. coli* mais, à la grande surprise de nombre d'étudiants, ils n'ont pas tous exactement les mêmes caractères, le plus souvent le caractère saccharose mais pas seulement, sans pour autant engendrer une pathogénicité (figure 13).



FIGURE 12 - COMPARAISON D'UNE SÉRIE D'*Escherichia coli* ISOLÉS DE SELLES NORMALES



FIGURE 13 - DÉMONSTRATION PAR UN PROFESSEUR DE L'ENSEMENCEMENT D'UNE GALERIE API 20E

2.3. API SYSTEM ET LES LEVURES. UN TÉMOIGNAGE

Éveline GUÉHO-KELLERMANN, Chercheur INSERM, détachée à l'Institut Pasteur dans l'Unité de Mycologie Médicale de début 1983 à fin 99, considère que Jean BUISSIÈRE a été son "premier véritable maître de recherche" de 1972 à fin 1974. De plus sans sa rencontre improbable avec le pur bactériologiste Jean BUISSIÈRE, est-ce que les galeries API levures auraient existées ? Nombre de progrès scientifiques doivent d'exister à cette part du hasard.

● **En janvier 1965**, je suis officiellement recrutée par l'Institut National d'Hygiène (INH) qui prendra peu après le nom de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) dans le laboratoire de Pneumo-Allergologie dirigé par le Pr Jacques CHARPIN à Marseille après deux ans de travail en attendant la création de ce poste. Je quitte ce laboratoire en octobre 1965 pour la naissance de notre fille et suivre son père nommé à Lyon au Lycée La Martinière. Le Pr CHARPIN me recommande à son collègue lyonnais le Pr Roger TOURAINE chez qui je reprends le travail en septembre 1966.



2017

XXXXII

L'OPÉRON N°92

● **En 1972**, l'INSERM, mon organisme de tutelle m'avertit suite à mon rapport d'activité annuel qu'il s'agit davantage d'un travail de routine et non pas d'un travail de recherche à proprement parler. Le Pr TOURAINE demande alors au Dr FONTANGES du CRSSA de me prendre dans son équipe. Sous sa direction je finis la préparation d'une thèse de 3^{ème} Cycle qui reste dans la lignée de ce que je faisais précédemment, à savoir les inventaires des allergènes respiratoires, pollens et spores de champignons. Je soutiens cette thèse en 1973. Entre temps, consciente que cela me menait dans une impasse, j'ai contacté le Dr Jean BUISSIÈRE qui travaillait dans le laboratoire voisin. En effet un jeune pharmacien profitait de son service militaire pour préparer une thèse sur les entérobactéries en utilisant les toutes nouvelles galeries api 20E. J'ai alors demandé au Dr BUISSIÈRE si je pouvais essayer ses systèmes pour mes champignons. Surpris mais intéressé, il a accepté et j'ai commencé ce travail en cherchant à améliorer l'identification des champignons levuriformes du genre *Geotrichum*. L'identification de ces champignons reposait principalement sur leurs caractères morphologiques au demeurant peu différenciés. Ce travail déboucha sur une publication en 1975 (É. GUÉHO, J. BUISSIÈRE) laquelle a été écrite avec difficulté (un véritable accouchement de hérisson selon l'expression du Dr BUISSIÈRE). Toutefois ce premier travail avec des champignons ayant donné des résultats prometteurs donna l'idée au Dr BUISSIÈRE de concevoir une galerie plus adaptée à l'identification des levures d'intérêt médical. Pour ce faire, il contacta à la Faculté de Médecine de Grenoble le Professeur Pierre AMBROISE-THOMAS, chef du service de Parasitologie-Mycologie. En effet, ce dernier avait fait ses études de Médecine à la Faculté Française de Médecine d'Alger où il avait probablement rencontré Jean BUISSIÈRE. En 1962 à la fin de la Guerre d'Algérie, P. AMBROISE-THOMAS avait d'abord été accueilli à la Faculté de Médecine de Lyon dans le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie par les professeurs J. COUDERT et J.P. GARIN puis nommé à Grenoble en 1969 à la suite de ses travaux sur la séro-immunologie des parasites par immunfluorescence.

● **La galerie api 20C** (*Candida*) est alors créée en 1975 avec l'aide de Pierre AMBROISE-THOMAS dans le cadre d'une Thèse d'Université de Renée GRILLOT qui sera nommée Professeur de Parasitologie-Mycologie en 1988 et terminera sa carrière en tant que Doyenne de la Faculté de Pharmacie de 2007 à 2011. Cette première galerie *Candida* comporte huit microtubes, avec obturation par une goutte d'huile de paraffine pour les fermentations et 12 pour les auxanogrammes dont le premier comme témoin négatif (voir la figure 14).



FIGURE 14 - GALERIE API 20C
De haut en bas : *Cryptococcus neoformans* (aucune fermentation donc pas de virage de l'indicateur de pH par acidification du milieu suite à la production de CO₂), *Candida glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. albicans*.

En fait cette galerie parfaitement adaptée à l'identification des espèces de *Candida* rencontrées en pathologie s'est vite avérée insuffisante pour un plus large spectre de levures. La galerie ID 32C sera imaginée pour cette raison. C'est la seule galerie d'identification rapide de levures qui comporte un aussi grand nombre de caractères. Dans cette galerie, pas de tubes mais seulement des cupules, puisque seuls les auxanogrammes sont pris en compte (figure 15). En effet toutes les levures affiliées aux Basidiomycètes comme celles des genres *Cryptococcus* et *Trichosporon* ne fermentent aucun substrat.

Cette galerie, malgré l'absence des fermentations permet d'identifier en routine un grand nombre de levures médicales justement grâce aux 30 caractères utiles (+ un témoin négatif et un témoin positif, le glucose), à condition bien sûr de mettre à jour sa base de données avec l'arrivée de nouvelles espèces en pathologie. Les levures phylogénétiquement reconnues comme des Ascomycètes (telles les *Candida*) assimilent un nombre plus restreint de substrats que les Basidiomycètes (type les *Cryptococcus*). Le profil obtenu donne donc déjà une orientation.

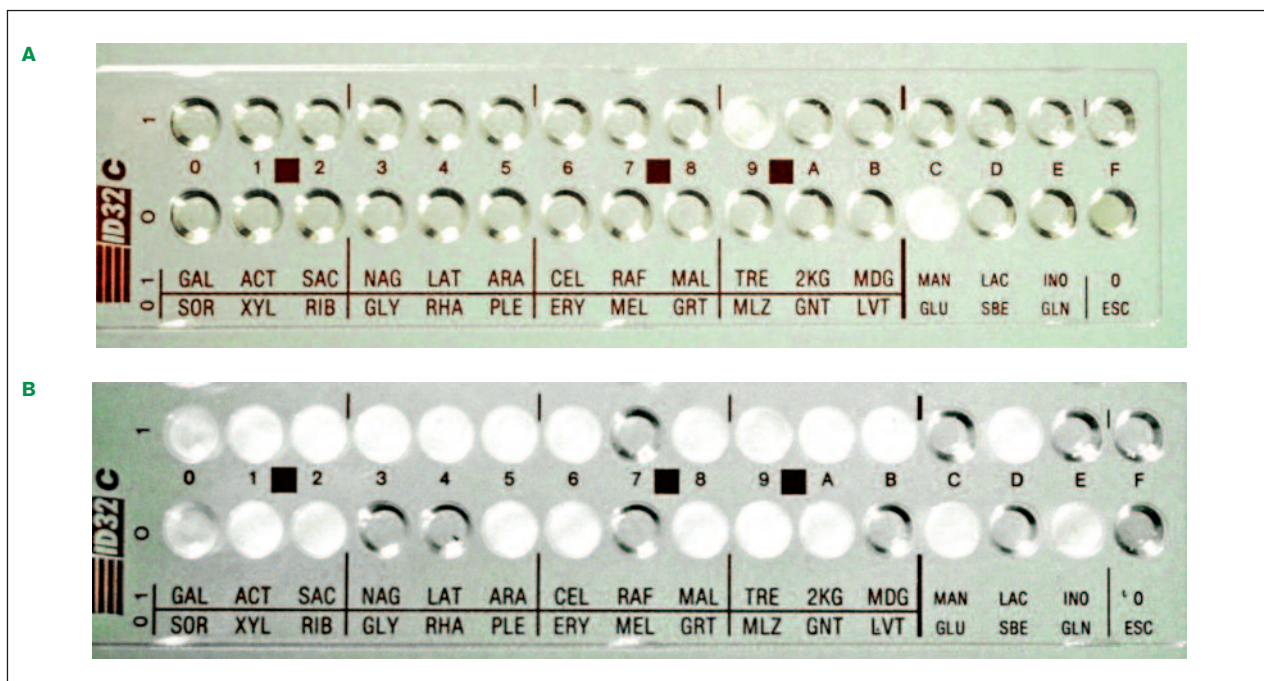


FIGURE 15 - GALERIE ID 32C

A. *Candida glabrata* avec glucose et tréhalose, seuls substrats assimilés.

B. *Trichosporon asahii* avec plus des deux tiers des substrats assimilés, un nombre encore plus important avec *Cryptococcus neoformans* et *C. curvatus*.

En 1975, grâce aux conseils et le parrainage de Jean BUISSIÈRE, je suis le cours de Mycologie Médicale de l'Institut Pasteur ce qui me permettra d'intégrer cette équipe début 1983. J'ai heureusement pu garder le contact avec API en bénéficiant gracieusement de leurs systèmes selon l'avancement de mes travaux et, en retour, j'ai pu leur apporter mon expertise pour des levures nouvellement rencontrées en pathologie en améliorant leurs galeries ATB. En effet il faut passer des souches de référence, tout particulièrement la souche type de chaque espèce, pour valider les profils. Ce problème est souvent la limite des systèmes industriels d'identification, particulièrement après les immenses progrès réalisés pour la systématique des microorganismes avec l'apport des techniques de biologie moléculaire.

Revenons à la préhistoire des systèmes API. Le Dr BUISSIÈRE était un savant tel que d'aucuns peuvent se l'imaginer, toujours en train de penser comment, avec des billes et des bouts de ficelles, il pouvait arriver à ses fins. Je n'exagère pas car je l'ai vu travailler comme je n'ai vu personne d'autre le faire. Fin bactériologiste, il savait exactement quels caractères associer pour arriver à une identification rapide des entérobactéries, son groupe de prédilection. Il savait les caractères qu'il voulait utiliser mais se heurtait à de nombreux problèmes techniques, difficiles à imaginer aujourd'hui, qu'il lui fallait résoudre : comment introduire et fixer les substrats dans des tubes, reproduisant en miniature les tubes à essais des méthodes conventionnelles ou les cupules, quel milieu utiliser, ni liquide, ni solide (milieu faiblement gélosé). Pour les problèmes industriels de ces systèmes miniaturisés, il m'a raconté qu'un jour, lors d'un déplacement à Paris (le TGV n'existait pas encore et Lyon-Paris était un voyage de plus de 4 heures) il s'est trouvé dans un compartiment en présence de Mr Paul MONTAGNON, un industriel spécialisé dans la fabrication de cirés, type cirés de pêcheurs. Cet industriel, avec plus tard l'aide de son fils Pierre, s'est complètement passionné pour ce problème de soudure de plastique et après plusieurs années de recherches et d'investissement la première galerie api 20E a vu le jour en 1970. Elle sera suivie de beaucoup d'autres même après la vente d'API à bioMérieux en 1987 et le décès de Paul MONTAGNON. Au cours de la dizaine d'années passées à l'Institut Pasteur le Dr BUISSIÈRE a créé des kits d'identification rapide, ou plus précisément d'orientation vers un groupe ou un autre de bactéries ou de champignons tel le kit commandé par le Pr Édouard DROUHET, chef de l'Unité de Mycologie Médicale à ce moment-là.



2017

XXXXII

L'OPÉRON N°92

Ce kit comportait de gauche à droite (figure 16) :

- 1) un milieu permettant la formation des chlamydo-spores spécifique à *Candida albicans*,
 - 2) un milieu Urée-Tryptophane (Indole) révélant la présence d'une uréase absente chez les ascomycètes,
 - 3) un milieu au tétrazolium,
 - 4) un milieu avec de l'actidione, enfin en
 - 5), 6) et 7) trois glucides pour les assimilations (probablement fermentations en semi anaérobiose ?).
- Renée GRILLOT ne se souvient plus exactement mais il n'y a pas d'huile de paraffine avec toutefois un ensemencement en profondeur.

Aucun de ces kits n'a jamais pu égaler les systèmes API car de durée de conservation limitée et de prix de revient plus élevé. Leur commercialisation n'a donc pas été très longue.



FIGURE 16 - KIT D'IDENTIFICATION RAPIDE
A. *Candida albicans* : les 3 osides sont assimilés. B. *Candida glabrata* : seul le glucose est assimilé.

2.4. QUELQUES COMMENTAIRES SUR L'AVENTURE API

L'aventure industrielle d'API nous montre bien des choses :

- API était, dans les années 1970, un incubateur (une "start-up") où, comme dans celles d'aujourd'hui, la vision du fondateur et la rapidité des prises de décision ont permis une progression rapide.
- Quelques "génies" comme Jean BUISSIÈRE avaient des idées et la volonté de les mettre en pratique. Notre société, et plus particulièrement celle des années 1970 en France, avait des réticences à les suivre et à les encourager. Le passage par les USA révèle un conservatisme excessif de l'institution scientifique française et probablement mondiale.
- Le génie ne suffit pas, et c'est la constitution d'une équipe pluridisciplinaire large qui a permis la mise en pratique des idées du Dr BUISSIÈRE. N'oublions pas non plus que l'ambiance mise dans l'équipe, la confiance accordée à la jeunesse ont été aussi des facteurs importants de réussite.
- Ces personnalités hors du commun n'ont pas hésité à changer de métier et à acquérir, sur le "tas", de nouvelles compétences : passer de la médecine générale à la conception de systèmes microbiologiques ou des métiers de bouche à l'industrie du plastique puis ses applications microbiologiques à 60 ans. Cela doit nous interroger sur les diplômes et leur valeur, et les parcours professionnels.
- Des hommes jeunes et motivés n'hésitent pas à quitter des situations confortables (carrière militaire, hospitalière, travail dans de grandes sociétés) pour se lancer dans une aventure à risque. API, s'implantant dans un village un peu perdu de 400 habitants (pas tout à fait perdu quand même car proche de Lyon !), petite société (12 personnes en 1973, 250 personnes en 1982), s'avère beaucoup plus efficace que de grosses "boîtes". Pour ceux qui ont vécu l'aventure, il est clair qu'un management proche des personnes de terrain, avec de vrais meneurs d'Hommes, dans une entreprise à taille humaine basée sur des relations de confiance sont des facteurs essentiels de la réussite.
- Une petite société peut devenir leader sur le marché contre une grosse société de diagnostic, Roche en l'occurrence.
- L'utilisation des outils les plus modernes du moment, avant tout l'informatique encore embryonnaire, a été essentielle.

2.5. HISTORIQUE DES GALERIES API

Le **tableau II** tente de recenser les différentes galeries API commercialisées. Les dates indiquées sont souvent approximatives car nous n'avons pas réussi à les retrouver. Il en est de même des dates de retrait (ou d'abandon) de certains produits.

Deux systèmes cohabitent :

- le système API est basé sur un ensemble de 20 cupules, de type api 20E (cupules identiques sous formes des tubes classiques) ou de type api 20 Strep (cupules simples et tubes classiques),
- le système ID est basé sur une galerie de 32 cupules simples, identique aux galeries ATB.

Date de création probable	Date de retrait éventuel	
1968		Phase de développement
1971	■	api 20E
1971	■	api 50L (=CHL) (<i>Lactobacillus</i>) (*)
1971	■	api 50E (=CHE) (*)
1971		Api 50 CHB (<i>Bacillus</i>) (*)
1974	■	api 20A
1975	■	api 20C
1977	■	api STREP (puis 20 STREP)
1978	■	api 20C et api 20C AUX (**)
1978	■	api STAPH
1982	■	RapiD 20 E
1982	?	api Z (puis en 91 RAPIDEC Z)
1983	■	api 20 NE
1984	1991	api 20 EC (<i>Coliformes</i>)
1985	?	ID 32 GN (ATB 32 C) (<i>Gram négatif</i>)
1987	■	ID 32 C (ATB 32 C)
1988	?	RAPIDEC <i>Staph</i>
1989	1993	RAPIDEC <i>Coli</i>
1989	?	RAPIDEC <i>ur</i>
1989	■	Rapid ID 32 E
1989	■	ID 32 STAPH
1989	■	Rapid ID 32 A
1990	■	api CORYNE
1991	1993	RAPIDEC <i>albicans</i>
1991	1993	RAPIDEC <i>pylori</i>
1991	■	api CAMPY
1991	■	api LISTERIA
1992	■	ID 32 E De
1992	■	Rapid ID 32 STREP
1992	■	api NH (<i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i>)
1996	■	api Candida
Date inconnue (avant 1995)	■	api 10S (<i>Entérobactéries</i>)
Date inconnue (avant 1995)	■	Rapid 20E
Date inconnue (avant 1995)	?	api 10E (<i>Entérobactéries</i>)

TABLEAU II - CHRONOLOGIE DE PRODUCTION DES GALERIES LES PLUS UTILISÉES

(*) Les galeries api 50 sont probablement toutes identiques et que la seule variation porte sur la nature du milieu d'inoculation. (**) Il semble étonnant que ces deux galeries soient créées à la même date. Il n'a pas été possible de retrouver les dates exactes de leur production.

A l'inverse certaines galeries ont été produites mais rapidement abandonnées. La **figure 17** en montre deux, adaptées à une identification (ou une orientation).

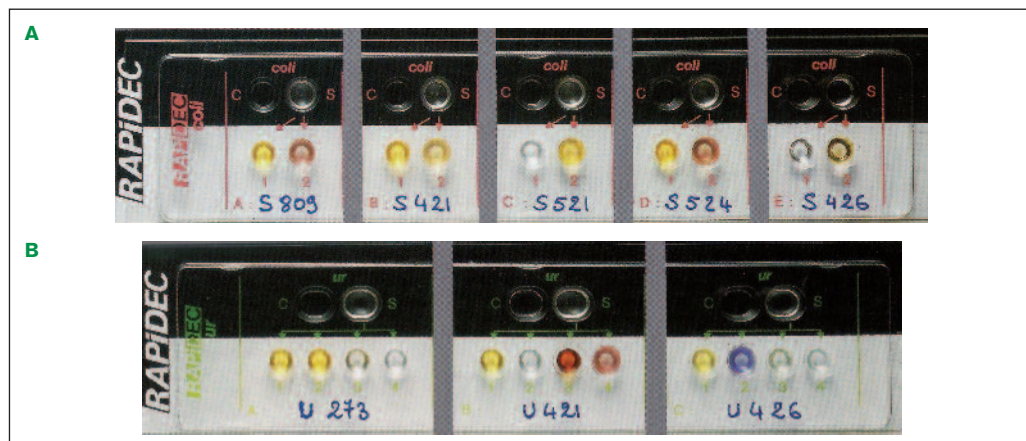


FIGURE 17 - GALERIES RAPIDEC (coli et urine, produits abandonnés)

La galerie RAPIDEC Ur, avec ses 6 cupules, testait les activités enzymatiques suivantes dans le but d'une quasi-identification de microorganismes urinaires :

- *Cupule C* : étalon de turbidimétrie (Mac Farland 3,5).
- *Cupule S* : suspension pour permettre un test de mobilité.
- *Cupule 1* : Lala-aminopeptidase test chromogénique + pour les Gram - (jaune) et - pour les Gram +.
- *Cupule 2* : trois enzymes testées :
 - β -glucuronidase test chromogénique (jaune : + ; incolore -),
 - catalase (classique),
 - oxydase (classique).
- *Cupule 3* : trois enzymes testées :
 - PDA (classique avec ajout de fer III),
 - Proline aminopeptidase par fluorescence,
 - β -galactosidase avec ajout de ZymA + Zym B (pourpre : + ; incolore -).
- *Cupule 4* : trois enzymes testées
 - Ensemble, par fluorescence, β -glucosidase et β -xylosidase,
 - Tryptophanase (Indole) par ajout de réactif de James.

La combinaison des différents tests permet une identification présomptive de la plupart des pathogènes rencontrés dans les infections du tractus urinaire.

Remarquons que nombre de ces tests sont aujourd'hui repris dans des géloses chromogéniques utilisées pour le dénombrement des urines (β -glucuronidase, β -glucosidase, test de la TDA et de l'Indole par ajout des réactifs sur les colonies).

3. L'ÈRE POST API DE Jean BUISSIÈRE

3.1. L'INSTITUT PASTEUR

Jean BUISSIÈRE n'a pas travaillé chez API, où il n'était que consultant, puisqu'au moment de sa création il travaillait encore dans le cadre de l'armée (CRSSA). Après sa retraite de l'armée fin 1974, il rejoint l'Institut Pasteur de Paris comme chef de laboratoire dans l'Unité des Entérobactéries dirigée à ce moment-là par le Pr Léon LE MINOR. À la demande de ce dernier il s'investit dans la mise au point de kits simplifiés, sinon d'identification au moins d'orientation rapide vers un groupe ou un autre. Il fera le même type de travail pour le Pr Édouard DROUHET alors chef de l'Unité de Mycologie Médicale (voir le témoignage d'Éveline GUÉHO). Il quitte ses fonctions à l'Institut Pasteur en 1984.

3.2. LA SOCIÉTÉ KORANO

Il se consacre alors, avec Marie-José BROCHON, qui était stagiaire dans son laboratoire de l'Institut Pasteur, au développement d'une nouvelle Société KORANO avec toujours des innovations intéressantes mais différentes des systèmes d'identification.

- Création de milieux de culture de qualité dans un monde ultra-concurrentiel.
- Idée d'un conditionnement différent des milieux avec des doses de 100 mL, 200 mL ou autres, de milieu à préparer, ce qui supprime la pesée et assure une meilleure conservation dans l'emballage étanche.
- Création de kits de culture pour la production de plantules à partir des cellules apicales de végétaux, tels les cépages de vigne. Avec sa collaboratrice il présentera ce travail dans les écoles avec comme exemple des plantules de *Saintpaulia*.
- Détournement d'un four à microondes (figure 18) pour la préparation de milieux de culture. Le four est un four de cuisine du commerce dont il modifie simplement le système de déclenchement des ondes pour l'adapter à la préparation et au maintien en surfusion des milieux. Chaque milieu est relié, pour le volume désiré, à une carte magnétique qui règle le chauffage. Au lycée Paul Éluard à Saint-Denis, Jean BUISSIÈRE est venu installer ce four en 1995 et il restait toujours fonctionnel en 2015. Un autre a été installé au lycée d'Ambérieu-en-Bugey. Son avantage majeur est la possibilité de fabriquer une gélose stérile en moins de 20 à 30 minutes et de la couler directement en boîte de Petri. Cet appareil permet des préparations de milieux très rapides grâce à l'économie de plusieurs étapes (dissolution dans une casserole, conditionnement en flacons ou tubes, autoclavage, stockage, fusion puis coulage dans la méthode traditionnelle). Inconvénient majeur pour les laboratoires : difficulté d'intégrer cette fabrication, qui reste artisanale, dans le processus d'accréditation. Pour les lycées, ce problème ne se pose pas, mais le procédé n'a pas été implanté ailleurs à notre connaissance. Conservatisme ?
- Détournement de la saucière SEB (figure 19) pour la fabrication de milieux non autoclavables (SS, Hektoen)



FIGURE 18 - LE FOUR À MICROONDES KORANO
Avec le lecteur de cartes magnétiques, le flacon de préparation des milieux, les doses de milieux de culture.

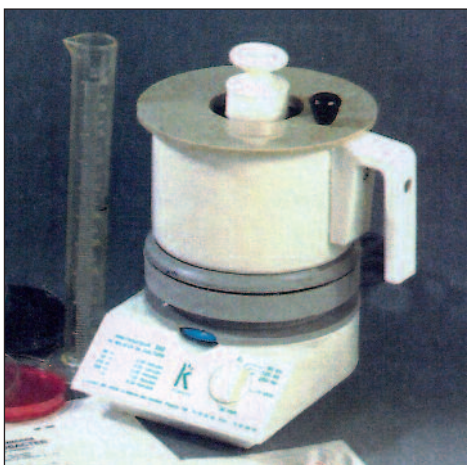


FIGURE 19 - PRÉPARATEUR 300

La société KORANO disparaît en 1997 après l'incendie de la petite usine, située à Ambérieu-en-Bugey. Elle est juridiquement clôturée en 2007.

Jean BUISSIÈRE décède le 11 septembre 1999 à l'âge de 72 ans seulement et cette disparition est celle d'un grand bactériologiste, mais au-delà d'un grand inventeur de matériel biotechnologique. Il aura marqué durablement la microbiologie de la deuxième moitié du vingtième siècle.

RÉFÉRENCES

- G. BLANCHET. API SYSTEM. Histoire d'un transfert technologique réussi. *Revue Médecine et Armées*, 2001, 29, 185-188.
- J. BUISSIÈRE et P.NARDON. Microméthode d'identification des bactéries, *Ann. Inst Pasteur* (Paris).1968, 115, 218-231.
- É. GUÉHO et J. BUISSIÈRE. Méthode d'identification biochimique de champignons filamenteux arthrosporés, appartenant au genre *Geotrichum* Link ex Pers. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur*, 1975, 126A, 483-500.
- J. PENY et J. BUISSIÈRE. Microméthode d'identification des bactéries. II.-Identification du genre *Staphylococcus*, *Ann. Inst. Pasteur* (Paris), 1970, 118, 10-18.
- R. GRILLOT. Contribution à l'identification des levures du genre *Candida* : étude du métabolisme des glucides par une méthode normalisée. Thèse d'Université pour obtenir le titre de Docteur en Pharmacie (Grenoble), 1974.
- R. GRILLOT. Étude de l'utilisation fermentative et oxydative des glucides chez les levures du genre *Candida* par une méthode normalisée. *Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd.*, 1974, 3: 183-185.

Tous les documents utilisés pour établir ce texte sont téléchargeables sur internet librement. Pour faciliter le travail de ceux qui souhaiteraient aller plus loin, ils sont rassemblés dans un dossier sur <http://techmicrobio.eu>, menu Laboratoire, article de menu Documents_biologie.

Les annales de l'Institut Pasteur sont accessibles par Gallica (<http://gallica.bnf.fr/>) qui permet de consulter de très nombreux documents anciens de tout type.

Les brevets peuvent être trouvés par un outil spécifique de google (https://www.google.com/advanced_patent_search?hl=fr), par l'INPI (<http://bases-brevets.inpi.fr/fr/accueil.html>) notamment.