

Comparaison des techniques de culture et d'immuno-fluorescence dans l'étude de *Bacteroides* à pigmentation noire

ROBERT, J.C.¹, MOUTON, C.², SIXOU, J.L.¹, CORMIER, M.³

¹ U.F.R. Odontologie, Rennes (France);

² Ecole de Médecine Dentaire, Québec (Canada);

³ U.F.R. Pharmacie, Rennes (France).

RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude est de comparer les techniques de culture et d'immuno-fluorescence dans leurs capacités à retrouver *B.gingivalis* et les autres B.P.N. dans la plaque sous gingivale de l'enfant.

Les échantillons sont recueillis au niveau du sulcus lingual des incisives mandibulaires, dispersés et dilués de 1 à 10⁻⁵; 15 µl de chaque dilution sont étalés sur milieux gélose Trypticase-soja et Todd-Hewitt enrichis de sang, de Vit K 1 et d'hémine. Les mêmes dilutions sont déposées sur lames de verre pour immuno-fluorescence indirecte en utilisant des antisérum cellules entières polyclonales spécifiques contre *B.gingivalis* ATCC 33 277. Les colonies représentatives à coloration brun-noire sont isolées, purifiées et identifiées.

Par culture, BPN est retrouvé chez 46 % des enfants (19/41). *B.gingivalis* est cultivé à partir de 6 enfants.

Par un test d'immuno-fluorescence (Fluotec*), 90 % de 309 enfants de 3 ans et plus présentent des B.P.N., mais *B.gingivalis* n'est pas retrouvé par ce test. *B.gingivalis* est retrouvé par immuno-fluorescence chez 72 % des enfants (30/41) dans la plaque des incisives.

MOTS-CLÉS:

Bacteroides - Culture - Immunofluorescence - Enfants

SUMMARY

The aim of that study was to compare culture and immunofluorescence (IF) methods to determine whether *B.gingivalis* and other B.P.B. can be detected in subgingival plaque of children.

Samples were collected from the lingual sulcus of mandibular incisors, dispersed and diluted from 1 to 10⁻⁵; 15 µl of each dilution were plated on Trypticase soja agar and Todd-Hewitt agar supplemented with blood, Vit K 1 and hemin. The same dilutions were smeared on glass slides for indirect IF using an species-specific polyclonal rabbit whole cell antiserum to *B.gingivalis* ATCC 33 277. Representative colonies producing brown-to-black pigment were isolated, purified and further characterized.

Using culture, BPB were detected in 46 % of children (19/41). *B.gingivalis* was cultured from 6 children.

Using immuno-fluorescence test (Fluotec*), 90 % of 309 children 3 years old and more harbour detectable B.P.B., but *B.gingivalis* don't react with that test. *B.gingivalis* were detected by immuno-fluorescence in 72 % of children (30/41) in the incisor plaque.

KEY WORDS:

Bacteroides - Culture - Immunofluorescence - Children

INTRODUCTION

Les techniques de cultures permettent d'isoler les micro-organismes sans que l'on puisse savoir la proportion obtenue du début à la fin des manipulations, aussi dès 1970, Griffin utilise l'anticorps fluorescent pour la détection et l'identification rapides des espèces *Bacteroides* à pigmentation noire (B.P.N.) et Stauffer et coll. en 1975, développent et évaluent une technique d'immuno-fluorescence indirecte pour *Bacteroides* et *Fusobacterium*.

La technique immuno-fluorescence avait déjà été utilisée pour révéler l'hétérogénéité des souches de B.P.N. (Weiss, 1937, Courant et Gibbons, 1967, Lambe et Jerris, 1976, Abshire et coll., 1977).

L'immuno-fluorescence s'appuie sur une réaction immunitaire antigène-anticorps spécifique permettant éventuellement des dosages, mais surtout l'observation au microscope. En effet, en utilisant une source d'ultra-violet de longueur d'onde définie, le corps fluorescent réémet des rayons de longueur d'onde différente et qui sont visibles. Ainsi une bactérie sur laquelle est fixé un anticorps marqué à la fluoresceine apparaît comme entourée d'un halo fluorescent vert. Cette méthode n'a pu être appliquée aux *Bacteroides* que par une connaissance approfondie de la structure antigénique des germes.

Notre propos est donc d'apprécier l'efficacité de méthodes d'immuno-fluorescence pour détecter dans les mélanges pluri-microbiens de la plaque dentaire de l'enfant les souches B.P.N. à l'aide d'un test d'immuno-fluorescence en kit (Fluoretect) et plus particulièrement les souches de *Bacteroides gingivalis* (*B.gingivalis*) grâce à un anti-sérum spécifique.

MATERIEL ET MÉTHODES

Population étudiée

Tous nos prélèvements et examens ont été réalisés chez des enfants âgés de 3 à 16 ans.

Une première étude en immuno-fluorescence a été effectuée sur un groupe de 309 enfants âgés de 3 à 16 ans en utilisant le test commercial Pfizer; elle a permis la mise en évidence des B.P.N. à l'exception des *B.gingivalis*.

Dans un second groupe de 41 enfants âgés de 6 à 15 ans l'incidence de B.P.N. a été étudiée par culture et complétée par une recherche en immuno-fluorescence indirecte de *B.gingivalis*.

Prélèvement et transport

Après irrigation abondante au spray, de la zone linguale des incisives inférieures, les dents sont isolées avec des rouleaux de coton et le site de prélèvement est essuyé doucement avec une boulette de coton. Les échantillons sont recueillis à l'excavateur fin stérile émoussé en remontant du fond de la poche par un simple passage dans le sulcus.

Les échantillons sont déposés immédiatement dans un milieu de transport (1 ml de milieu Schaedler), glyceriné à 2,5%. Au laboratoire ils sont dispersés par agitation au vortex pendant 30 secondes.

Les opérations suivantes, jusqu'au dépôt des boîtes en anaérobiose continue sont effectuées sur un chariot (Bioblock scientific) permettant de conserver les conditions d'anaérobiose après le prélèvement en bouche.

Des dilutions 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , sont ensuite réalisées.

Exploitation des prélèvements pour cultures

Une goutte de 15 μ l de chaque dilution permet d'ensemencer, par la technique du râteau, 6 boîtes de gélose au sang et de Todd Hewitt modifiés. Après culture dans une chambre d'anaérobiose continue, les boîtes sont lues à 5 et 10 jours pour apprécier le nombre total des bactéries et la proportion de colonies noires. Le compte est effectué sous la loupe binoculaire à partir des boîtes permettant la pousse de 200 colonies au maximum.

Chaque colonie noire est repiquée sur des milieux Todd Hewitt (T.H.), enrichis. La pousse secondaire permet:

- une identification
- un repiquage pour lyophilisation

Milieux de culture

Après une étude préliminaire (Robert, 1989), nous avons sélectionné 2 milieux pour la pousse et le recueil des *Bacteroides* à pigmentation noire:

GELOSE AU SANG

Composition:	Pour 1 litre:
— Gélose trypticase de soja	— 40 g
— Eau distillée	— 1 litre

Stérilisation pendant 20 minutes à 120°

A 47° addition de:	
— sang humain lysé à la saponine	— 25 ml/l
— Ménadione	1000 μ g
— Hémimine	5000 μ g

TODD-HEWITT modifié

Composition:	pour 1 litre
– B.B.C. (Becta Dickinson and company)	– 30 g
– Infusion de cœur de bœuf	– 500 g
– Peptone (Pasteur)	– 20 g
– Chlorure de sodium	– 2 g
– Phosphate disodique anhydre	– 0,4 g
– Bicarbonate de sodium	– 2,5 g
– Gélose Agar	– 20 g

Stérilisation pendant 30 minutes à l'autoclave

A 47° addition de:

– sang humain lysé à la saponine	– 25 ml/l
– Ménadione	1000 µg
– Hémine	5000 µg

Les boîtes sont préréduites pendant 24 heures avant utilisation.

Identification

Outre la coloration de Gram, nous avons choisi l'utilisation de galeries d'identification.

– Le système API ZYM est une microméthode semi-quantitative (Slots, 1981) qui utilise des réactions colorées pour détecter l'activité de 19 enzymes à partir de très faibles quantités d'un échantillon. Nous avons appliqué la technique décrite par Laughon et coll. en 1982.

– Le système API ATB 32 A a été développé récemment pour l'identification des anaérobies. Il comporte des tests enzymatiques standardisés et une base de données spécifiques.

Exploitation des prélèvements pour Immuno-fluorescence

Une goutte de chaque dilution est déposée sur une lame pour la recherche de B.P.N. puis de *B.gingivalis* en immuno-fluorescence indirecte.

Les lames sont fixées à la flamme.

– Le principe de la détection des B.P.N. par la méthode Pfizer (Inc New York NY) est d'éviter l'adsorption non spécifique des anticorps sur le corps bactérien par une « précoloration » de la préparation avec des gamma globulines. Ces gamma globulines ont pour but de saturer la protéine A. Dans ces conditions les immunoglobulines qui sont ultérieurement mises en contact avec les bactéries, ne peuvent s'y fixer que par une réaction spécifique.

– Pour *B.gingivalis* la coloration aux anticorps fluorescents indirecte est préférable à la méthode directe,

car plus simple d'emploi, on peut jouer sur les deux variables sérum-conjugué, l'antisérum a été évalué sur plusieurs souches.

On vérifie la spécificité de l'antisérum sur 32 souches différentes. Le sérum est bien spécifique sauf pour la souche de *Bacteroides intermedius* 145/9B/918.

2 anti sérum ont été sélectionnés, pool RLC cellules entières, fabriqués par C. Mouton.

Nous avons utilisé 2 conjugués: en France l'Anti-corps anti Ig G (Diagnostics Pasteur) et au Québec le conjugué 65-173-2 Anti Rabbit Ig G (Miles Scientific).

On prépare l'antisérum au 1/40ème et le conjugué au 1/50ème à Rennes et aux 1/100ème et 1/50ème à Québec.

TABLEAU I:

Liste des souches utilisées pour valider les anti-sérums et les conjugués.

Genres et espèces	N° des souches	Provenance
<i>Bacteroides asaccharolyticus</i>	25 260	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides corporis</i>	33 547	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides denticola</i>	33 185	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides endodontalis</i>	H 370	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides gingivalis</i>	381	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides gingivalis</i>	19A4	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides gingivalis</i>	33277	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides gingivalis</i>	A7A3	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides gingivalis</i>	Jaguar 2	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides gingivalis</i>	W83	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides intermedius</i>	489K3	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides intermedius</i>	5W7	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides intermedius</i>	ATCC 25 611	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides intermedius</i>	BH 20/30	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides intermedius</i>	Cg 12 655	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides intermedius</i>	Cg 150	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides intermedius</i>	MS.SB 918	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides intermedius</i>	NCTC 9336	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides intermedius</i>	SA 17	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides intermedius</i>	SA 18	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides intermedius</i>	145/9B/918	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides intermedius</i>	MS/5B/367	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides intermedius</i>	MS/5B/372	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides loeschei</i>	15 930	Mouton (Québec)
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	25 845	Mouton (Québec)
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	3013	Sixou (Rennes)
<i>Escherichia. coli</i>	K 1258 161	Vadeboncœur (Québec)
<i>Lactobacillus casei</i>	4646	Vadeboncœur (Québec)
<i>Lactobacillus casei</i>	C116	Vadeboncœur (Québec)
<i>Streptococcus mutans</i>	27 352	Mouton (Québec)
<i>Staphylococcus aureus</i>	clinique	Vadeboncœur (Québec)

Le titre du sérum est la dernière dilution à laquelle on obtient encore 4⁺ selon le schéma:

- 4=Halo fluorescent net
- 3=Le halo est encore visible
- 2=Plus de halo mais une tache
- 1=Pas de fluorescence

Observations microscopiques

Après préparation des lamelles avec du glycérol-carbonate 9,0 (1:2 v/v), les observations se font au grossissement 100, en immersion avec un microscope NACHET 200, équipé en épifluorescence.

Nous observons d'abord, sur le témoin PBS, la morphologie en contraste de phase. Toutes les manipulations sont destinées à obtenir des bactéries isolées pour que la fluorescence soit bien spécifique.

Nous n'avons retenu comme positifs que les puits donnant une fluorescence de type 3 ou 4.

RÉSULTATS

19 enfants sur 41 (46,3%) ont des cultures positives dans la recherche des B.P.N. à la face linguale des incisives inférieures.

Bacteroides gingivalis est retrouvé en culture chez 6 enfants de 6 à 16 ans (9,7%). On a également retrouvé 6 *Bacteroides intermedius*, 4 *Bacteroides melanogenicus*, 6 souches de B.P.N. n'ont pas été identifiées.

Le nombre de bactéries anaérobies prélevées varie jusqu'à 5×10^8 sur gélose au sang et sur Todd Hewitt. Le nombre des B.P.N. peut atteindre 3×10^7 .

Par la technique d'immuno-fluorescence Pfizer, la proportion des enfants présentant des B.P.N. (en excluant *B.gingivalis*) est forte avant 6 ans (82%), tombe à 68% après 6 ans et se maintient après 12 ans à 70%. La prévalence semble baisser à partir de 12 ans.

L'évaluation par immuno-fluorescence de la présence et de la quantité de *B.gingivalis* dans la plaque dentaire de l'enfant montre que sur 41 enfants, 30 présentent au niveau incisif une fluorescence (73%). Sur les 11 n'en présentant pas, nous avons pu en retrouver au niveau molaire pour certains.

DISCUSSION

Nos résultats indiquent que l'on retrouve beaucoup plus de B.P.N. avec la technique d'immuno-fluorescence qu'avec celle de culture. Ils indiquent également que le nombre d'enfants présentant des *B.gingivalis* est sensiblement égal à ceux avec des B.P.N. saccharolytiques.

On connaît les raisons de la perte des *Bacteroides* dans la techniques par culture:

— Les conditions d'anaérobiose continue sont difficiles à garder. On sait que B.P.N. a une certaine tolérance à l'oxygène (Syed et coll., 1980) surtout à la fin de leur phase exponentielle. En 24 heures, en aérobie, le nombre de B.P.N. chute de 50% (Van Winkelhoff et coll., 1986).

— On a pu rechercher quel était le meilleur milieu de transport pour B.P.N. (Delplanche et Deveaux, 1988 et Stalons et coll., 1974). Le milieu Schaedler pour sa ressemblance avec le milieu PY (Carlsson et Sundqvist, 1980) limite la perte de bactéries.

— L'isolement, indispensable aux identifications ne tient pas compte du rôle des interrelations bactériennes. On peut se demander si certaines souches ne disparaissent pas par perte des conditions de synergisme (Grenier et Mayrand, 1983).

— Quelque soit la technique d'étalement, l'adhérence au matériel de verre utilisé pour les dilutions et les étalements, jointe à une dispersion inadéquate, conduisent à une perte d'environ 5 à 10% du nombre des bactéries (Manganiello et coll., 1977). La technique douce, que nous avons choisie par passage sur vibreur pendant 30 secondes, va détruire un minimum de bactéries fragiles. Une goutte de 15 μ l ne s'étale pas si l'échantillon est très dense.

— Aucun milieu de culture ne renferme tous les éléments indispensables à la poussée de l'ensemble des B.P.N., on ne peut que choisir les milieux supposés les mieux adaptés.

— Le décompte est difficile. Il faut multiplier les échantillons (Bonta et coll., 1985). C'est ce que nous avons constaté dans nos décomptes sur boîtes et même sur lames pour immuno-fluorescence. Les chiffres trouvés ne suivent jamais la progression logique des dilutions.

L'immuno-fluorescence est bien adaptée à une recherche clinique puisqu'elle allie rapidité, spécificité et fiabilité sans nécessiter un matériel trop important.

Une première évaluation clinique du kit fluoretec-M (Holland et coll., 1979) montre que des souches de B.P.N. retrouvées par culture à partir de 15 spécimens cliniques (sur un total de 76 examinés) sont aussi identifiées par le réactif Fluoretec-M. 5 résultats faussement positifs sont également décrits (Fluoretec-M positif, culture négative), mais aucun résultat faussement négatif.

Mouton et coll. (1980) ont évalué cette méthode. Le conjugué polyvalent Fluoretec-M réagit par 3⁺ ou 4⁺ avec toutes les souches testées de *B.intermedius* et *B.melaninogenicus* qui possèdent probablement des antigènes communs, par contre il se révèle incapable de détecter *Bacteroides gingivalis* alors qu'il réagit avec les souches asaccharolytiques non buccales. Les souches buccales sont en effet sérologiquement différentes des souches non buccales et des *intermedius* et *melaninogenicus* (Lambe, 1974, Lambe et Jerris, 1976). Ces résultats avaient déjà été présentés par Holland et coll. (1979) qui détectent 93% de B.P.N., dont 100% du sous groupe melaninogeniens, 0,8% de sous groupe *intermedius* et 88% d'*asaccharolyticus*. Le kit Pfizer-M doit donc être limité dans son emploi pour les souches buccales de *Bacteroides* saccharolytiques.

Certains spirochètes buccaux sont également révélés par le kit Fluoretec M (Chan et coll., 1981). La différence morphologique entre ces spirochètes et les cocco-bacilles des *Bacteroides* aide l'identification.

Notre première étude ayant surtout porté sur les germes saccharolytiques des *Bacteroides* à pigmentation noire, il était alors important de la compléter par une étude plus précisément consacrée à *Bacteroides gingivalis* qui est le sérotype le plus pathogène.

L'utilisation des anticorps monoclonaux pour étudier la plaque sous gingivale est prometteuse. La technique a de nombreux avantages par rapport à l'examen direct et aux cultures. Elle permet en particulier d'apprécier rapidement la présence et la quantité de certains germes dits pathogènes. Des études sont menées actuellement chez l'adulte et le sujet atteint de parodontite (Gmür, 1988, Gmür et coll., 1988), nous avons entrepris ce même travail chez l'enfant sans pathologie apparente.

CONCLUSION

La technique par culture a l'avantage de conserver les souches mais un ensemble de facteurs rendent inévitable la perte d'un certain nombre de micro-organismes dont il est difficile d'apprécier la proportion. C'est pourquoi l'utilisation de l'immuno-fluorescence peut apporter un complément d'information important dans la recherche de la présence des bactéries.

On ne peut exclure pourtant la possibilité de réactions croisées avec d'autres souches du mélange bactérien. On sait, en effet, que certaines souches de la plaque dentaire n'ont pu encore être isolées et donc identifiées. Le risque est donc que certaines de ces souches réagissent positivement avec notre anti-sérum. C'est pourquoi nous avons effectué les colorations et apprécié les résultats à la fois à Rennes et à

Québec avec 2 antisérums et 2 conjugués, ce qui ne peut exclure totalement le risque. L'avenir de cette technique est sans doute dans la recherche d'une spécificité accrue.

BIBLIOGRAPHIE

- Abshire, R.L., Lombard, G.L., Dowell, V.R. — Fluorescent antibody studies on selected strains of *Bacteroides fragilis* subspecies *fragilis*. *J. Of. Clinical Microbiology*, 6: 425-432, 1977.
- Bonta, Y., Zambon, J.J., Genco, R.J., Neiders, M. — Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival plaque: comparison of indirect immuno fluorescence microscopy with bacterial culture for detection of A. a. *J. Dent. Res.*, 64: 793-798, 1985.
- Carlsson, J., Sundqvist, G. — Evaluation of methods of transport and cultivation of bacterial specimens from infect dental root canals. *Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol.*, 49: 451-454, 1980.
- Chan, E.C., Devries, J., Harvey, R.F., Tam, V.C. — Use of fluorescence microscopy for monitoring periodontal disease state. *Can. J. Microbiol.*, 27: 675-678, 1981.
- Courant, P.R., Gibbons, R.J. — Biochemical and immunological heterogeneity of *Bacteroides melaninogenicus*. *Arch. Oral Biol.*, 12: 1605-1613, 1967.
- Delplanque, P., Deveaux, E. — Les *Bacteroides* à pigmentation noire des maladies parodontales et endodontiques: études méthodologiques. Thèse Troisième Cycle, 222 pages, 1988.
- Gmur, R. — Applicability of monoclonal antibodies to quantitatively monitor subgingival plaque for specific bacteria. *Oral Microb. Immun.*, 3: 187-191, 1988.
- Gmur, R., Werner-Felmayer, G., Guggenheim, B. — Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Bacteroides gingivalis*. *Oral Microb. Immun.*, 3: 181-186, 1988.
- Grenier, D., Mayrand, D. — Etudes d'infections mixtes anaerobics comportant BG. *Can. J. Microbiol.*, 29: 612-618, 1983.
- Griffin, M.H. — Fluorescent antibody techniques in the identification of the gram negative non sporeforming anaerobes. *Health Lab. Sci.*, 7: 78-83, 1970.
- Holland, J.W., Stauffer, L.R., Altemeier, W.A. — Fluorescent antibody test kit for rapid detection and identification of members of the *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides melaninogenicus* groups in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 10: 121-127, 1979.
- Lambe, D.W. — Determination of *Bacteroides melaninogenicus* serogroups by fluorescent antibody staining. *Appl. Microbiol.*, 28: 561-567, 1974.
- Lambe, D.W., Jerris, R.J. — Description of a polyvalent conjugate and a new serogroup of *Bacteroides melaninogenicus* by fluorescent antibody staining. *J. Clin. Microbiol.*, 3: 506-512, 1976.
- Manganiello, A.D., Socransky, S.S., Smith, C., Propas, D., Oram, V., Dogan, I.L. — Attempts to increase viable counts recovery of human supragingival dental plaque. *J. Periodont. Res.*, 12: 107-119, 1977.
- Mouton, C., Hammond, P., Slots, J., Genco, R.J. — Evaluation of fluoretec. M. for detection of oral strains of *Bacteroides asaccharolyticus* and *Bacteroides melaninogenicus*. *J. Clin. Microb.*, 11: 682-686, 1980.

Robert, J.C. — Bacteriologie du parodonte de l'enfant, incidence des *Bacteroides gingivalis* et autres *Bacteroides* à pigmentation noire. Thèse de Doctorat d'Etat en Odontologie, 199 pages, 1989.

Slots, J. — Enzymiatic characterization of some oral nonoral gram negative bacteria with API Zym system. *J. Clin. Microbiol.*, 14: 288-294, 1981.

Stalons, D.R., Thornsberry, C., Dowell, V.R. — Effect of culture medium and carbon dioxide concentration on growth of anaerobic bacteria commonly encountered in clinical specimens. *Applied Microbiology*, 27: 1098-1104, 1974.

Stauffer, L.R., Hill, E.O., Holland, J.W., Altemeier, W.A. — Indirect fluorescent antibody procedure for the rapid detection and identification of *Bacteroides* and *Fusobacterium* in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 2: 337-344, 1975.

Syed, S.A., Morrison, E.C., Loesche, W.J., Ramfjord, S.P. — Bacterial flora of treated periodontal pockets, I.A.D.R., Ann. Meet. Osaka, ABSTR. 76, 1980.

Van Winkelhoff, A.J., Van Steenberghe, T.J.M., De Graaff, J. — Oxygen tolerance of oral and non oral black-pigmented *Bacteroides* species, *F.E.M.S. Microbiol. Lett.*, 33: 215-218, 1986.

Weiss, C. — Observations on B.M.: Demonstration of fibrinolytic, pathogenicity and serological types. *Proc. Soc. Biol. Med.*, 37: 473-476, 1937.

Adresse des auteurs:

Dr. J.C. Robert, U.F.R. Odontologie,
Rennes (France).