

Évolution, biodiversité, taxonomie

Utilisation d'une technique d'empreinte moléculaire dans l'étude d'écosystèmes microbiens complexes. Application à la fabrication d'un fromage au lait cru « l'AOC Salers »

Jean-Jacques GODON^{a*}, Frédérique DUTHOIT^b, Céline DELBÈS^a,
Liliane MILLET^b, Marie-Christine MONTEL^b

^a Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA,
avenue des étangs, 11100 Narbonne, France

^b Laboratoire de Recherches Fromagères, INRA, 36 rue de Salers, 15000 Aurillac, France

Abstract — Use of molecular fingerprint for the study of complex microbial ecosystem. Application to AOC Salers cheese. SSCP technique (Single Strand Conformation Polymorphism) linked to molecular identification of the microflora based on 16S rDNA sequence allowed to perform a molecular fingerprinting of microbial ecosystems. Without cultural step this fingerprint carried out the characterisation of the microbial diversity, the comparison of closed microflora. The dynamic of the microflora can be followed either by the 16S rDNA molecules for the presence of microorganisms or by the 16S rRNA molecules for the activity of microorganisms. These new possibilities were shown either on the cheese "AOC Salers" or on anaerobic digester microflora.

16S rDNA / Salers cheese / SSCP / lactic acid bacteria

Résumé — L'article présente la technique de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) associée à une identification moléculaire de la microflore basée sur la séquence de l'ADNr 16S. Cette technique permet d'obtenir une empreinte moléculaire des écosystèmes microbiens. Cette empreinte permet de caractériser sans mise en culture la diversité d'une microflore, de comparer des microflores semblables, d'en suivre la dynamique en terme de présence grâce à l'ADNr 16S et/ou en terme d'activité grâce à l'ARNr 16S. Ces nouvelles possibilités sont illustrées par des exemples pris sur la microflore d'un fromage AOC Salers ou à défaut sur la microflore d'un digesteur anaérobie.

ADNr 16S / Salers / SSCP / bactérie lactique

* Correspondance et tirés-à-part
Tél. : (33) 4 68 42 51 54 ; fax : (33) 4 68 42 51 60 ; e-mail : godon@ensam.inra.fr

1. INTRODUCTION

L'élaboration des qualités sensorielles et hygiéniques des fromages est, entre autres, tributaire du développement et de l'activité des micro-organismes. Pour caractériser les micro-organismes qui composent ces écosystèmes, variables d'un fromage à l'autre, les microbiologistes se sont longtemps uniquement appuyés sur l'isolement des micro-organismes. Ils identifient ainsi les isolats, les caractérisent au niveau moléculaire (génome, protéome). Ils les étudient donc dans des conditions ne reflétant pas l'environnement naturel de ces communautés qui évoluent, co-évoluent, interagissent et échangent les unes avec les autres pour former un écosystème microbien encore imparfaitement connu. Si l'écosystème créé est maîtrisé dans le cas du yaourt, il n'en est pas de même pour les fromages au lait cru où la complexité native n'est souvent ni reconstituée, ni étudiée de façon exhaustive. Ainsi l'utilisation des levains reste assez empirique. Une approche directe de ces écosystèmes peut donner une vision autre et rapide de la structure et de la dynamique des populations en cours de fermentation.

De nouveaux outils moléculaires ont surtout été développés pour la connaissance de génome d'espèces bien définies. Mais leur universalité permet d'envisager un changement d'échelle en les appliquant à l'étude des écosystèmes microbiens en s'affranchissant de l'isolement et de la culture des micro-organismes [5]. D'abord développées pour l'étude d'environnement extrême (ex : hypertermophilie barophile) [3, 8] ces techniques s'avèrent indispensables pour des écosystèmes difficiles à isoler et à cultiver (ex : digestion anaérobie) [4] et voire, très informatives dans l'assez connu (fermentation lactique).

Cet article a pour objet de présenter le potentiel d'une approche d'écologie microbienne combinant différentes techniques et s'affranchissant de certaines limitations des techniques de culture et donnant un éclairage nouveau sur la structure des commu-

nautés microbiennes. Pour illustrer cette approche, quelques exemples seront pris soit sur des écosystèmes de digestion anaérobie, soit sur la fabrication d'un fromage au lait cru : l'AOC Salers. Le fromage AOC Salers est pris comme modèle car sa technologie laisse supposer que la flore microbienne y est complexe. En effet c'est un fromage fermier au lait cru, et le lait de la traite séjourne dans un récipient en bois – « gerle » – dès l'emprésurage et jusqu'à l'égouttage. Le passage dans la gerle enrichit le lait en micro-organismes [1].

2. DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

La figure 1 schématise les différentes étapes de la démarche. Par postulat, chaque bactérie est identifiée par la séquence de son ADNr 16S. Après extraction des ADN totaux et amplification par PCR d'une zone variable de l'ADNr 16S (environ 200 pb), la communauté microbienne est représentée par un mélange d'ADNr 16S. La technique de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) permet de séparer les molécules d'ADNr 16S en fonction de leur séquence [6, 11]. Ainsi une communauté microbienne est représentée par un profil où chaque pic correspond à une séquence et par extension à une « espèce » de micro-organisme, l'aire de chaque pic donnant une indication sur l'abondance du micro-organisme dans sa communauté. La séquence de l'ADNr 16S correspondant à chaque pic peut être déterminée en comparant la migration de séquences préalablement isolées par clonage à la migration du profil total. Les clones correspondant à un pic du profil sont séquencés et identifiés par comparaison avec des bases de données de séquences d'ADNr 16S.

Cette approche permet ainsi de comparer rapidement, sans mise en culture, des microflore entre elles, de suivre leur dynamique dans le temps ou même de comparer présence et activité à partir respectivement de l'ADNr 16S et l'ARNr 16S.

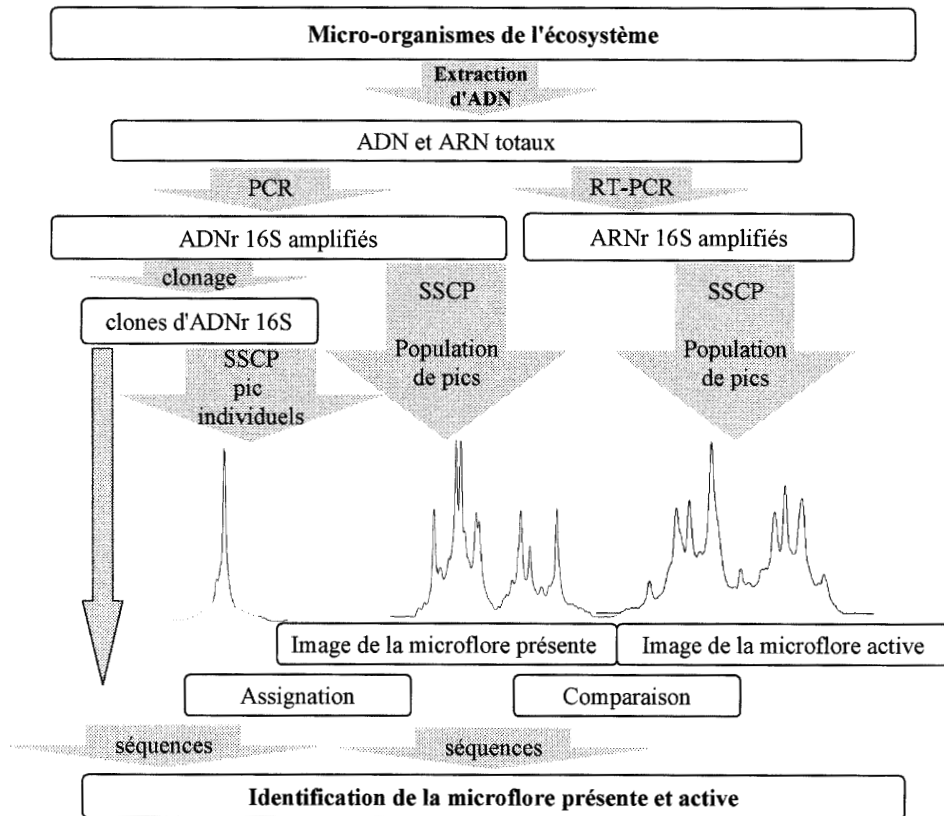


Figure 1. Stratégie moléculaire pour l'identification et la dynamique structurelle et fonctionnelle des écosystèmes microbiens.

Figure 1. Molecular strategy to: (i) identification of the micro-organisms, (ii) structural dynamic of the ecosystem, (iii) functional dynamic of the ecosystem.

3. RÉSULTATS

3.1. Diversité de l'écosystème

La SSCP a permis de mettre en évidence la diversité des écosystèmes anaérobies de dépollution.

La figure 2 présente la diversité des bactéries dans un digesteur anaérobie de laboratoire alimenté par du glucose. Les micro-organismes ont été identifiés par la séquence de leur ADNr 16S selon la stratégie schématisée sur la figure 1. La précision de l'affiliation phylogénétique dépend de la similarité

de la séquence avec une séquence connue. Chaque pic correspond à la séquence de la région variable V3 de l'ADNr 16S. L'aire de chaque pic donne une indication semi-quantitative de la fréquence de cette séquence dans l'écosystème. L'amplification des molécules par la PCR peut biaiser les rapports finaux.

3.2. Comparaison des écosystèmes microbiens de lait

La figure 3 présente la comparaison de 3 laits crus prélevés dans la gerle avant

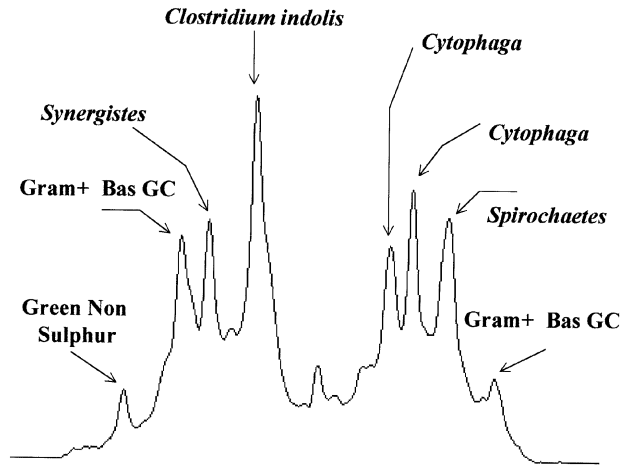


Figure 2. Profil ADNr 16S des bactéries dans un digesteur anaérobie. L'identification phylogénétique des pics d'après la séquence de l'ADNr 16S dépend du pourcentage de similarité avec la séquence la plus proche.

Figure 2 . Bacterial 16S rDNA pattern of an anaerobic digester. The phylogenetic identification of the peaks corresponded to the closed 16S rDNA sequence.

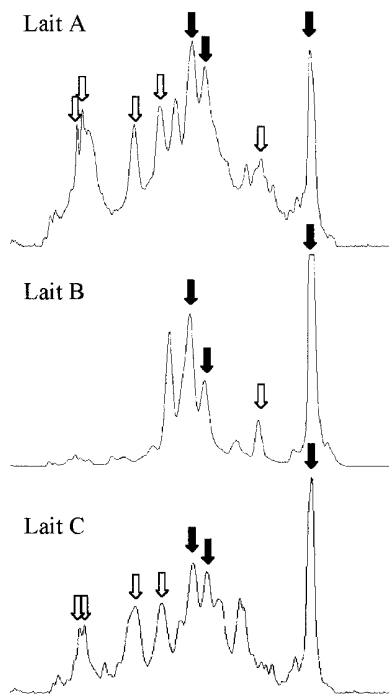


Figure 3. Profils ADN 16S des bactéries de 3 laits crus. Les flèches noires indiquent les pics toujours présents, les flèches blanches indiquant les pics présents sur 2 des profils.

Figure 3 . Bacterial 16S rDNA patterns of three raw milks. Black arrows indicated peaks present on the three patterns, white indicated peaks present only on two patterns.

empréurage. Trois pics sont communs aux trois microflore, 5 pics sont communs à deux des trois microflore et au moins 10 pics ne sont présents que dans une des microflore.

3.3. Dynamique dans le temps d'un écosystème

La figure 4 présente la dynamique de la flore lactique du lait A et des fromages à 1 à 60 j issus de ce lait. Un des pics devient majoritaire et risque de masquer la diversité des populations sous-dominantes.

3.4. Dynamique fonctionnelle d'un écosystème

La figure 5 présente la réaction des bactéries d'un écosystème de digestion anaérobie 48 h après un choc pH acide. Le profil issu de l'ADNr 16S (non présenté) demeure identique sur cet intervalle de temps, par contre les 2 profils réalisés à partir d'ARNr 16S montrent l'activation métabolique de 4 bactéries sous ces nouvelles conditions environnementales.

4. CONCLUSION

Les techniques d'empreinte moléculaire d'écosystèmes microbiens comme la SSCP [6, 12] la DGGE [9] ou la T-RFLP [7] donnent une information rapide et globale sur la structure et l'évolution de ces systèmes. À partir de ces profils, l'identification en terme d'espèces moléculairement caractérisées est possible. La molécule d'ADNr 16S ciblée dans tous les exemples peut être remplacée par d'autres fragments d'ADN amplifiables

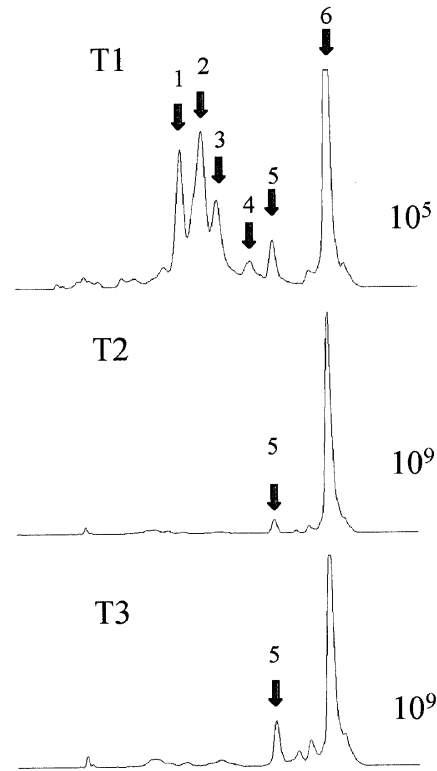


Figure 4. Évolution dans le temps, profil d'ADNr 16S d'un des laits (lait A) lors de la fabrication du fromage. Les profils T1, T2 et T3 correspondent respectivement au lait dans la gerle, au caillé de 1 j et au fromage à 60 j. Le nombre de cellules par mL est indiqué à droite des profils.

Figure 4 . Behaviour of one milk (A) over time. Patterns T1, T2 and T3 correspond to raw milk on the "gerle", curd, 60 day cheese. The number of cells by millilitre are indicated on the right of the patterns.

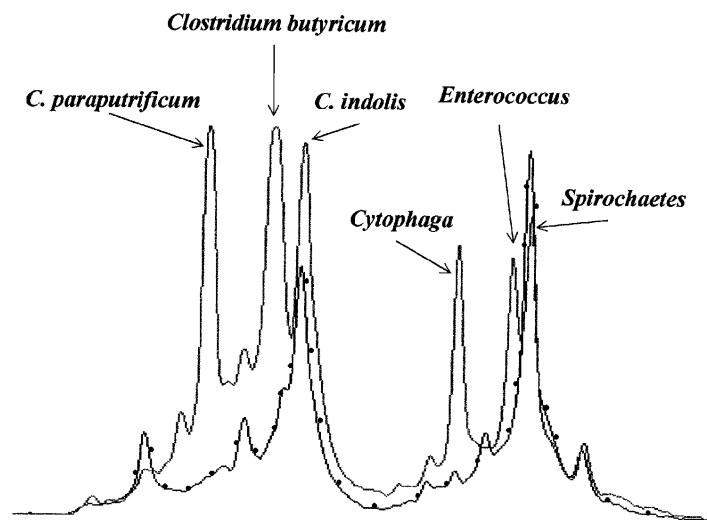


Figure 5. Profils d'ARNr 16S des bactéries d'un digesteur anaérobie avant et après un choc pH acide. L'électrophorégramme témoin à pH constant de 7 est indiqué par des points noirs.

Figure 5 . Bacterial 16S rDNA pattern of an anaerobic digester before and after a pH chock. The control electrophoregram at pH 7 is indicated by black dots.

ciblant soit une activité plus précise soit un groupe phylogénétique particulier.

Il est malheureusement évident que l'on n'obtient qu'une image partielle de la réalité. Car seuls les micro-organismes dominants sont « visibles ». De plus, les différentes étapes du protocole – extraction des acides nucléiques, amplification par PCR – entraînent les résultats d'inévitables et inquantifiables biais [2, 10]. L'extraction des acides nucléiques des matrices est une étape limitante puisqu'il est difficile d'appliquer une méthode universelle conduisant à l'lyser l'ensemble de la communauté microbienne. Par ailleurs, l'amplification par PCR peut donner une image biaisée de la communauté microbienne en amplifiant préférentiellement les flores dominantes. Il est prématuré de conclure sur l'ampleur des artefacts par rapport à ceux des approches classiques impliquant des cultures microbiennes, mais, il est d'ores et déjà certain que ces techniques apportent une vision plus dynamique et rapide des communautés microbiennes.

5. REMERCIEMENTS

Le travail sur les flores de l'AOC Salers est financé grâce à un projet « Aliment Qualité Sécurité » sur le « Développement de méthodes moléculaires pour l'inventaire in situ des populations microbiennes des aliments : application à l'inventaire microbien des fromages AOC Salers ».

RÉFÉRENCES

- [1] Devoyod J.-J., Millet L., Rousseau M., Rôle de la vaisselle laitière dans les fabrications fromagères traditionnelles (cas des fromages à pâte pressée demi-dure), in: Brunet P. (Ed.), Actes du Colloque Histoire et Géographie des Fromages, Caen, France, 1987, pp. 53–65.
- [2] Farrelly V., Rayney F., Stackebrandt E., Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 2798–2801.
- [3] Giovannoni S.J., Britschgi T.B., Moyer C.L., Field K.G., Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton, *Nature* 345 (1990) 60–62.
- [4] Godon J.J., Zumstein E., Dabert P., Habouzit F., Moletta R., Molecular microbial diversity of an anaerobic digester determined by small-subunit rRNA sequence analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 2802–2813.
- [5] Hugenholtz P., Goebel B.M., Pace N.R., Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 4765–4774.
- [6] Lee D.H., Zo Y.G., Kim S.J., Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 3112–3120.
- [7] Liu W.T., Marsh T.L., Cheng H., Forney L.J., Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 4516–4522.
- [8] Moyer C.L., Dobbs F.C., Karl D.M., Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 1555–1562.
- [9] Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G., Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 695–700.
- [10] Suzuki M.T., Giovannoni S.T., Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 625–630.
- [11] Zumstein E., Moletta R., Godon J.J., Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis, *Environ. Microbiol.* 2 (2000) 69–78.