

## Le potentiel de la TTGE pour l'étude bactérienne de quelques laits crus

Véronique LAFARGE<sup>a\*</sup>, Jean-Claude OGIER<sup>b</sup>, Victoria GIRARD<sup>a</sup>,  
Véronique MALADEN<sup>a</sup>, Jean-Yves LEVEAU<sup>c</sup>, Agnès DELACROIX–BUCHET<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire d'Études et de Recherches en Hygiène et Qualité des Aliments, AFSSA,  
39–41 rue du 11 novembre 1918, 94700 Maisons-Alfort, France

<sup>b</sup> Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée, INRA, Domaine de Vilvert,  
78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

<sup>c</sup> Laboratoire de Microbiologie Industrielle, ENSIAA, 1 avenue des Olympiades,  
91744 Massy Cedex, France

**Abstract – Potential of TTGE for the bacterial study of several raw milks.** Recently, novel molecular biological methods based on the direct analysis of DNA (or RNA) have been used to identify bacteria in the environment. Such studies contribute to a better knowledge of the microbial community of complex ecosystems such as dairy products, and therefore to a better understanding of the behaviour of some micro-organisms. The potential of one of these methods, temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE), was evaluated by analysing the bacterial composition of several raw milks. Total bacterial DNA is extracted from raw milks, and a discriminating zone of the 16S rDNA (V3 region) is amplified by PCR. The resulting DNA fragments are separated using denaturing electrophoresis. The bacterial community is represented by an electrophoresis profile where each band corresponds to a defined species or to a group of species. Bacteria in the unknown ecosystem are assigned an identity by comparison with a bacterial reference database (83 species) previously determined using DNA fragments amplified from pure bacterial strains. Ten raw milks (five un-cooled samples from the morning milking and five cooled samples of pooled milks) were analysed by TTGE. Species with a low % GC V3 sequence (<55%) are reported in this study. TTGE is proven to be a powerful and simple method to rapidly identify (by assignment using the reference database) a broad range of bacterial species within raw milk samples. A combined TTGE and specific PCR approach is found to be necessary for an accurate and full species identification.

**Raw milk / temporal temperature gradient gel electrophoresis / 16S rDNA / microbial ecology**

**Résumé –** Les nouvelles techniques de biologie moléculaire basées sur l'analyse directe de l'ADN (ou ARN) dans son milieu contribuent à l'heure actuelle à une meilleure connaissance de la communauté microbienne des écosystèmes complexes comme les produits laitiers, et ainsi à mieux appréhender le comportement de certains micro-organismes. Le potentiel d'une de ces techniques, la TTGE ou temporal temperature gradient gel electrophoresis, a été évalué pour l'étude bactérienne de quelques laits crus. Après extraction de l'ADN bactérien total des laits crus, une région discriminante de l'ADNr 16S (la région variable V3) est amplifiée par PCR. Les fragments d'ADN obtenus sont ensuite séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes. La communauté bactérienne est ainsi représentée par un profil électrophorétique où chaque bande peut correspondre

\* Auteur correspondant : v.lafarge@afssa.fr

à une espèce ou à un groupe d'espèces taxonomiquement proches ou non. L'identification se fait à l'aide d'une base de données de référence préalablement établie à partir de fragments d'ADNr 16S (région V3) de souches pures de bactéries. Dix laits crus (5 laits non refroidis de la traite du matin et 5 laits refroidis de mélange) ont été analysés par TTGE. Seule la flore bactérienne dont la teneur en bases GC de la séquence V3 est inférieure à 55 % a été effectivement décrite dans cette étude. L'identification par référence des bandes à une base de données suffisamment représentative de la flore bactérienne bas GC des laits crus nous a permis d'obtenir en 3 jours une vision globale de la communauté bactérienne majoritaire de ces laits. L'approche combinée de la TTGE avec une PCR spécifique s'est avérée cependant indispensable pour une identification précise et complète des espèces bactériennes.

## Lait cru / électrophorèse TTGE / ADNr 16S / écologie microbienne

### 1. INTRODUCTION

Les qualités organoleptiques des fromages au lait cru sont essentiellement attribuées à la diversité de la flore microbienne du lait [5]. Ces produits ont en effet des saveurs plus marquées que les produits au lait pasteurisé [1]. La composition de la microflore du lait cru et les interactions entre micro-organismes jouent un rôle primordial dans le développement de cette saveur. Ils ont de plus un rôle soit favorable [13] soit défavorable [16] sur la croissance de certains germes indésirables [3]. Par exemple, la présence de substances métaboliques produites par certains micro-organismes (acide lactique, ions hydrogène, bactériocines, acides gras, et diacétyl) [10] inhibent la croissance de *Listeria monocytogenes*.

La communauté microbienne du lait cru était jusqu'à présent décrite par des techniques de microbiologie classique [6, 14]. Dans la pratique, ces méthodes longues et fastidieuses ne prennent en compte que la microflore viable et cultivable.

Les nouvelles approches moléculaires (SSCP, DGGE, TTGE) basées sur l'analyse directe de l'ADN (ou ARN) dans son milieu, sans culture préalable des micro-organismes, permettent de décrire des écosystèmes microbiens complexes (tube digestif, fromages) et d'étudier leur dynamique [9, 17, 21]. Nous avons utilisé au cours de cette étude la méthode TTGE pour décrire la flore bactérienne bas GC

(< 55 %) de quelques laits crus. Le potentiel de cette technique a été évalué.

### 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 2.1. Échantillons de laits crus

Dix laits crus de vache de la région Ile-de-France (9 échantillons) et de la région Basse Normandie (1 échantillon, lait H) ont été analysés par TTGE. Parmi ces échantillons, 5 laits individuels ont été prélevés au cours de la traite du matin dans 5 fermes (laits A, B, C, D et E) et 5 laits de mélange ont été prélevés soit dans le tank de réfrigération de 3 fermes (laits F, G et H ; 4 °C – 8 °C pendant 12 h) soit dans la citerne de collecte de 2 entreprises laitières (laits I et J ; 4 °C – 8 °C pendant 24–48 h).

Les échantillons de lait cru (~ 250 mL) ont été collectés stérilement puis transportés à 4 °C dans une glacière jusqu'au laboratoire pour l'analyse. L'extraction de l'ADN a été réalisée au plus tard 3 h après le prélèvement.

#### 2.2. Extraction de l'ADN

À 35 mL de lait cru sont ajoutés 50 mg de pronase (Roche Diagnostics, Meylan, France) et 100 µL de β-mercaptoéthanol (Serva, Heidelberg, Allemagne). Après incubation du mélange à 37 °C pendant 1h30 dans un bain d'eau puis centrifugation à 12 000 ×g pendant 15 min à 4 °C, les culots de cellules sont lavés une fois avec

de l'eau stérile et une fois avec 10 mL du tampon TES (Tris EDTA saccharose). Après élimination du surnageant, les culots de cellules sont stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Les culots cellulaires sont re-suspendus dans 500  $\mu\text{L}$  de tampon TES puis lysés par broyage au vortex avec des billes de zirconium (0.5 V de billes de zirconium de 0.1 mm de diamètre : Sigma, Saint Louis, USA). La procédure permettant une lyse cellulaire efficace comprend six cycles de broyage de 30 s à vitesse maximale séparés par une minute de stockage dans la glace.

La purification de l'ADN est réalisée par la méthode phénol chloroforme sur le surnageant ( $\sim 400\ \mu\text{L}$ ) [4]. L'ADN purifié est ensuite précipité par ajout d'isopropanol froid. Le culot obtenu après centrifugation ( $12\ 000 \times g / 20\ \text{min} / 5^{\circ}\text{C}$ ) est lavé avec 500  $\mu\text{L}$  d'éthanol à 70 %, séché à  $42^{\circ}\text{C}$ , re-suspendu dans 10  $\mu\text{L}$  de tampon TE (Tris-HCl 25  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , EDTA 25  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8) contenant 0.02  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de RNase (Roche Diagnostics) et incubé pendant 15 min à  $37^{\circ}\text{C}$ . L'ADN est alors conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3. Amplification PCR

Deux amplifications successives par PCR sont réalisées sur l'extrait d'ADN (1  $\mu\text{L}$ ). L'ADNr 16S bactérien contenant la région variable V3 est d'abord amplifié sur 700 bp. L'amplification PCR est réalisée dans un volume final de 100  $\mu\text{L}$  contenant le tampon de réaction (Tris-HCl 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2$  1.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , KCl 50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Q-BIOgène, Illkrich, France), les nucléotides à une concentration de 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 60 pmol de chaque amorce : W01 « 5'-AGA GTT TGA TC(AC) TGG CTC-3' » et W012 « 5'-TAC GCA TTT CAC C(GT)C TAC A-3' » (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Allemagne), et 2.5 U de Taq polymérase 5  $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (Q-BIOgène). Les cycles d'amplification sont programmés sur un thermocycleur GenAmp modèle 2400 (Perkin Elmer, Courtabœuf, France) : dénaturation initiale à  $96^{\circ}\text{C} / 4\ \text{min}$ , 30 cycles de  $96^{\circ}\text{C} / 10\ \text{s}$  (dénaturation des brins),  $-50^{\circ}\text{C} / 30\ \text{s}$  (fixa-

tion de l'enzyme) et  $-72^{\circ}\text{C} / 2\ \text{min}$  (élongation).

La région variable V3 de l'ADNr 16S d'une longueur de 200 pb est ensuite amplifiée. Un  $\mu\text{L}$  de la première amplification est ajouté à 99  $\mu\text{L}$  de solution de réaction contenant le tampon de réaction (Tris-HCl 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2$  1.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , KCl 50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Q-BIOgène), les nucléotides à une concentration de 200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 60 pmol de chaque amorce : HDA1 « 5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3' » et HDA2 « 5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA-3' » (MWG-Biotech AG), et 2.5 U de Taq polymérase 5  $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (Q-BIOgène). Les cycles d'amplification sont programmés comme suit :  $94^{\circ}\text{C} / 4\ \text{min}$  (dénaturation initiale), 30 cycles de  $94^{\circ}\text{C} / 30\ \text{s}$  (dénaturation des brins),  $-58^{\circ}\text{C} / 30\ \text{s}$  (fixation de l'enzyme),  $-68^{\circ}\text{C} / 1\ \text{min}$  (élongation) et une élongation finale de  $68^{\circ}\text{C} / 7\ \text{min}$ .

### 2.4. Analyse TTGE

Le système « Dcode Universal Mutation Detection System » (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) est utilisé pour la séparation des produits d'amplification. Cinq  $\mu\text{L}$  du produit d'amplification ajoutés à 10  $\mu\text{L}$  du tampon de charge (EDTA 100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , bleu de Bromophénol 1.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , saccharose 40 %) sont déposés sur un gel de polyacrylamide 8 % (acrylamide et bisacrylamide à 40 % (p/v), Biorad) ayant une concentration en urée de 6  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Un marqueur de standardisation contenant 4 espèces de référence (*Lactococcus garvieae* CNRZ1323, *Lactococcus raffinolactis* CNRZ1214, *Enterococcus faecalis* CE17 et *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biov. *diacetylactis* CNRZ260) est déposé dans trois puits situés aux extrémités et au centre du gel. Les conditions de migration sont de 41 V avec un gradient de température de 63 à  $70^{\circ}\text{C}$  sur 16 h dans un tampon de migration (TAE 1.25X). Les gels sont ensuite révélés 20 min dans un bain de

TAE 1X contenant du bromure d'éthidium ( $100 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ , Biorad) puis rincés 20 min dans un bain de TAE 1X avant d'être photographiés. Les photographies converties en fichiers image (Photo Capt Imager Software) sont analysées par le logiciel Gel Compar (Applied Maths, Kortrijk, Belgique).

### 2.5. Analyse des gels d'électrophorèse

Le logiciel Gel Compar (Applied Maths) permet de normaliser les différences de migration entre gels, par alignement des marqueurs de standardisation avec un gel standard [19]. Les espèces bactériennes des laits crus sont identifiées par assignation des bandes TTGE avec une base de données préalablement établie sur Gel Compar et comprenant les empreintes électrophorétiques d'espèces bactériennes de référence et d'espèces bactériennes isolées de produits laitiers [15] et Ogier et al. (communication personnelle).

### 2.6. Base de données

La plupart des bandes ont été identifiées à l'aide de la base de données préalablement établie [15] et Ogier et al. (communication personnelle), regroupant 83 espèces et sous-espèces bactériennes rencontrées dans les produits laitiers [12]. Seule la flore bactérienne dont la composition en bases GC de la séquence V3 de l'ADNr 16S est inférieure à 55 % constitue cette base de données. Les empreintes électrophorétiques ont été validées pour la plupart par au moins trois souches pures différentes, provenant soit de collections (CIP, Collection Institut Pasteur ; LMG, Collection of the Laboratorium voor Microbiologie ; CNRZ, Collection du Centre National de la Recherche Zootechnique ; IL, Collection de la Génétique Microbienne (INRA, Jouy-en-Josas) ; ATCC, American Type Culture Collection ; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen ; JCM, Japan Collection of microorganisms ; NCIMB, National Col-

lection of Industrial and Marine Bacteria ; NCFB, National Collection of Food Bacteria ; NCDO, National Collection of Dairy Organisms), soit de lait cru ou de lait pasteurisé, identifiées par galeries API (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) à plus de 99 %.

### 2.7. Clonage et séquençage des bandes découpées sur gels

Après découpage des bandes sur gels, l'ADN est extrait en incubant à  $37^\circ\text{C}$  les bandes dans un tampon d'éluion ( $\text{NaCl } 0,3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{EDTA } 3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  et tris pH 7,6 à  $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [15]. L'ADN est récupéré dans le surnageant après centrifugation à  $13\,000 \times g$  pendant 15 min à  $4^\circ\text{C}$ . L'ajout au surnageant de  $500 \mu\text{L}$  d'éthanol absolu,  $20 \mu\text{L}$  d'acétate de sodium  $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 7 et  $1 \mu\text{L}$  de glycogène (Euromedex, Mundolsheim, France) permet de précipiter l'ADN. Après un stockage à  $-20^\circ\text{C}$  pendant 1 h, la solution est centrifugée à  $13\,000 \times g$  pendant 15 min à  $4^\circ\text{C}$ . Le culot obtenu est lavé avec de l'éthanol à 70 %, centrifugé à  $13\,000 \times g$  pendant 15 min à  $4^\circ\text{C}$ , séché à  $42^\circ\text{C}$  pendant 30 min puis resuspendu dans  $10 \mu\text{L}$  de tampon TE. La région variable V3 des fragments d'ADN est alors amplifiée grâce aux amorces HDA1 (sans le GC-clamp) et HDA2. Les produits de PCR sont ensuite quantifiés sur gel d'agarose à 2 %, purifiés en utilisant le kit Concert Rapid PCR purification System (Lifetechnologies, Gaithersburg, USA), puis clonés chez *E. coli* grâce au kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen, Carlsbad, USA). Pour vérifier la nature de l'insert, une amplification de la région variable V3 avec les amorces HDA1-GC et HDA2 suivie d'une analyse TTGE est réalisée pour chaque clone. Les clones ayant intégré les fragments d'ADN V3 recherchés sont séquencés (ABI PRISM 310, Applied Biosystems, Courtabœuf, France) après une amplification d'une région de 500 pb contenant l'insert avec les amorces M13 Reverse et M13 Forward contenu dans le kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen).

### 2.8. PCR spécifique sur l'ADN total

L'amplification PCR est réalisée dans un volume final de 100 µL contenant le tampon de réaction (Tris-HCl 10 mmol·L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol·L<sup>-1</sup>, KCl 50 mmol·L<sup>-1</sup>; Q-BIOgène), les nucléotides à une concentration de 200 µmol·L<sup>-1</sup>, 60 pmol de chaque amorce, 2.5 U de Taq polymérase 5 U·µL<sup>-1</sup> (Q-BIOgène) et 1 µL de l'ADN total conservé à -20 °C. Les amorces utilisées sont pour *Streptococcus uberis* « UbI » et « UbII » [8], pour *Listeria monocytogenes* « LIMRE<sup>b</sup> » et « LIM2<sup>b</sup> » [11], pour *Streptococcus dysgalactiae* « Sdy 105 » et « Sdy 386 » [18] et pour *Enterococcus casseliflavus* « Ec1 » et « Ec2 » (résultats non publiés). Les cycles d'amplification sont programmés sur un thermocycleur GenAmp modèle 2400 (Perkin Elmer) : dénaturation initiale à 94 °C / 4 min, 30 cycles de 94 °C / 30 s (dénaturation des brins) – ( *St. uberis* 55 °C / 30 s, *St. dysgalactiae* 59 °C / 30 s, *Ec. casseliflavus* 52 °C / 30 s, *L. monocytogenes* 58 °C / 30 s) (fixation de l'enzyme) et - 72 °C / 1 min (élongation). Les produits de PCR sont ensuite quantifiés et analysés sur un gel d'agarose à 2 %.

### 3. RÉSULTATS

Les profils électrophorétiques des 10 laits de l'étude obtenus par TTGE sont présentés dans la figure 1 pour les laits A à E et dans la figure 2 pour les laits F à J.

Les laits réfrigérés ou non refroidis présentent soit des profils simples avec moins de 5 bandes (laits A, E et I), soit des profils plus complexes jusqu'à 10 bandes (laits B, C, D, F, G H et J) et de nombreuses bandes communes dont une bande majoritaire (bande o) identique dans 9 laits sur 10.

#### 3.1. Laits frais non refroidis

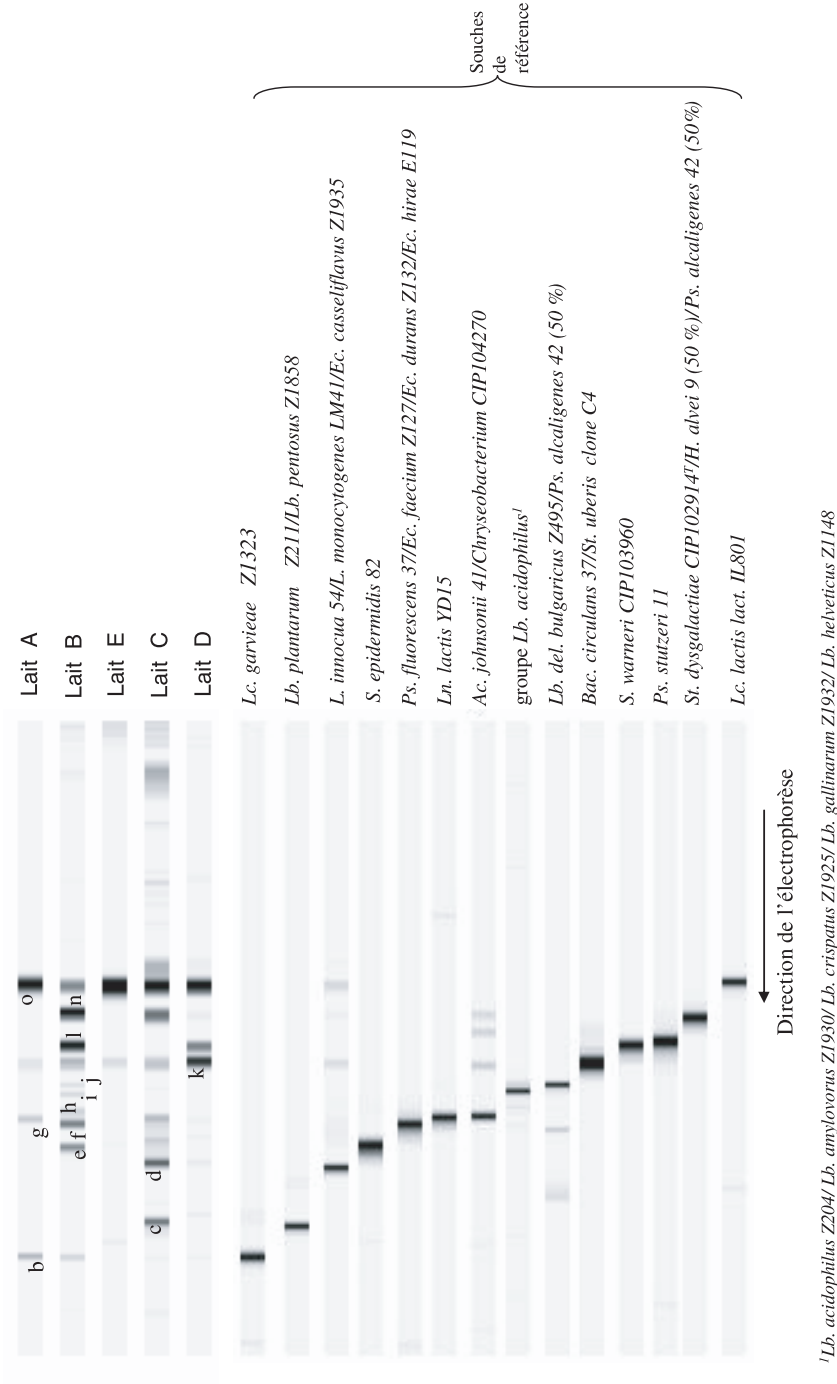
Dans les laits frais de la traite du matin, la bande o assignée à *Lactococcus lactis* selon la base de données correspond à l'espèce majoritaire dans la plupart des échantillons (Fig. 1). L'espèce *Staphylococcus warneri* est également retrouvée de

façon majoritaire dans les laits B et D (bande l de forte intensité, surtout dans le lait B). La plupart des bandes composant les profils TTGE sont assignées à plusieurs espèces co-migrantes. Par exemple, la bande d est assignée aux espèces *Listeria innocua/Listeria monocytogenes/Enterococcus casseliflavus* et la bande f aux espèces *Pseudomonas fluorescens/Enterococcus faecium/Enterococcus durans/Enterococcus hirae*. Ces espèces qui co-migrent sur les gels TTGE ont soit leurs séquences V3 identiques, soit différentes mais de même Tm (température de demi-dénaturation). Certaines bandes ont été découpées, clonées puis séquencées afin de permettre leur identification précise. Le tableau I indique les résultats du séquençage avec le numéro d'identification de la séquence la plus proche obtenue sur GenBank et le pourcentage d'homologie. Pour d'autres bandes, nous avons réalisé des tests de PCR spécifique afin d'affiner ou de confirmer leurs identifications (Fig. 3).

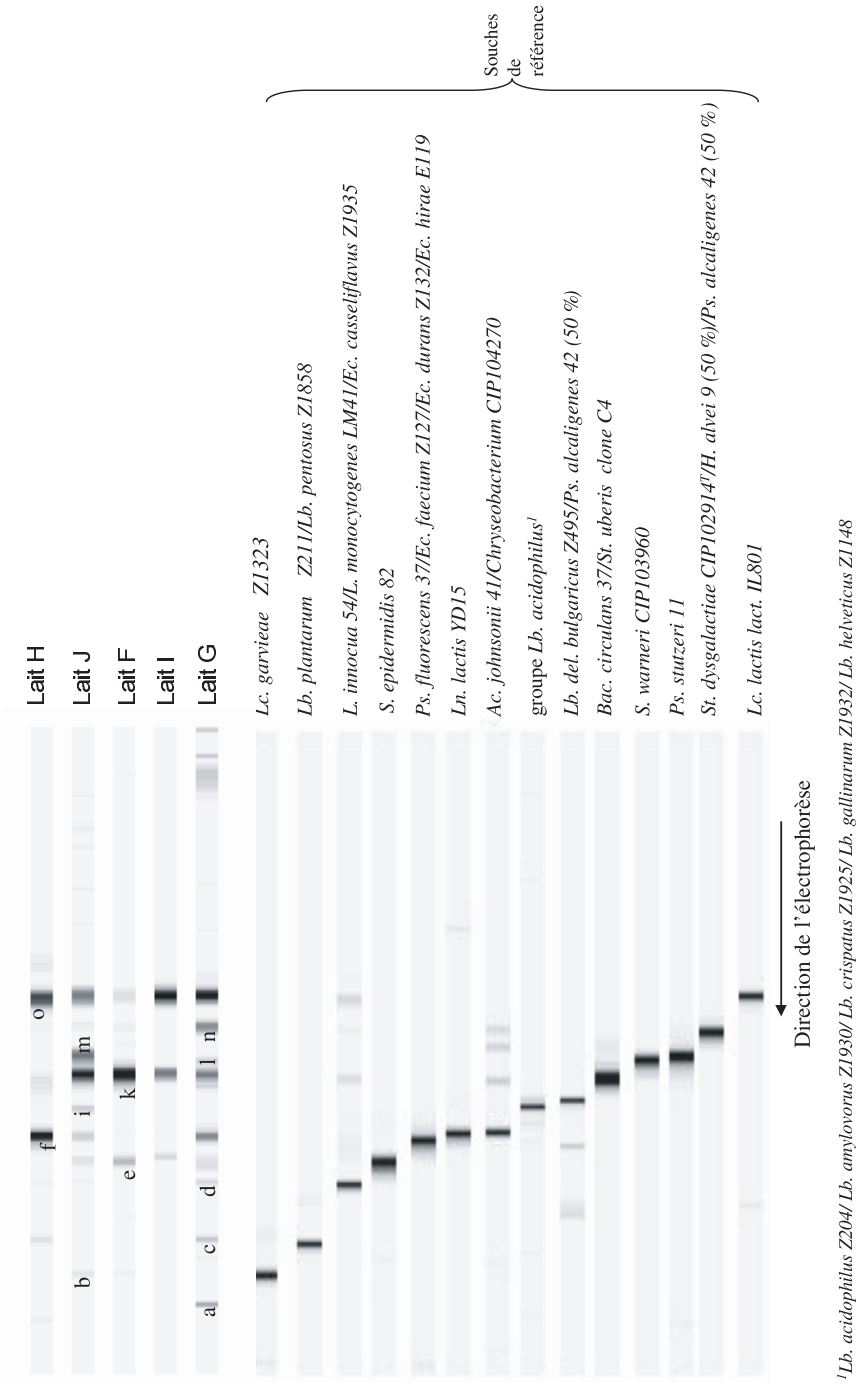
Par séquençage, la bande k du lait D assignée aux espèces *Bacillus circulans/Streptococcus uberis* a été identifiée comme étant *Streptococcus uberis* à 99 % (Tab. I) ; la bande d du lait C assignée aux espèces *Listeria monocytogenes/Listeria innocua/Enterococcus casseliflavus* a donné *Listeria* à 91 %, et la bande o assignée à *Lactococcus lactis* a été identifiée comme étant *Lactococcus lactis* à 99 %. Par des tests de PCR spécifique, nous avons confirmé que la bande k présente également dans les laits A, B, C et E correspondait à l'espèce *Streptococcus uberis* et la bande n des laits B et C à *Streptococcus dysgalactiae* (Fig. 3). La bande d du lait D ne correspondait ni à *Listeria monocytogenes* (Fig. 3) ni à *Enterococcus casseliflavus*.

#### 3.2. Laits de mélange refroidis

*Lactococcus lactis* est également l'espèce majoritaire des laits crus de mélange refroidis (Fig. 2) excepté pour le lait F. La bande k assignée aux espèces *Bacillus circulans/Streptococcus uberis* est également



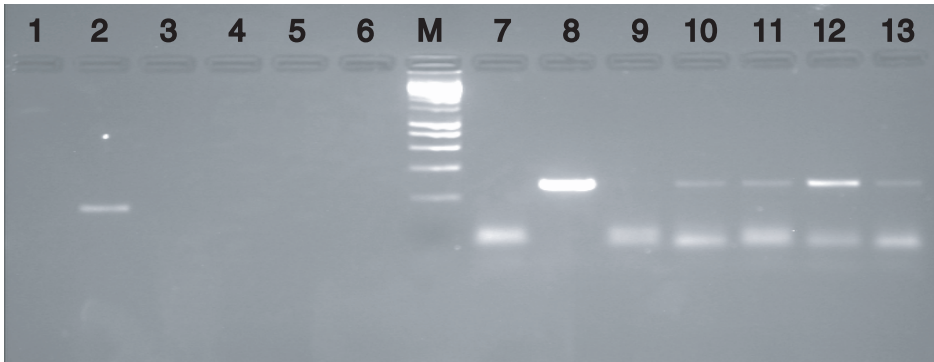
**Figure 1.** Profils TTGE des fragments d'ADNr 16S (région V3) des 5 laits crus individuels non refroidis de la traite du matin. **Figure 1.** TTGE profiles of 16S rDNA (V3 region) fragments of 5 individual un-cooled samples from the morning milking.



**Figure 2.** Profils TTGE des fragments d'ADNr 16S (région V3) des 5 laits crus de mélange refroidis.  
**Figure 2.** TTGE profiles of 16S rDNA (V3 region) fragments of 5 cooled samples of pooled milks.

**Tableau I.** Identification des séquences des ADNr 16S (région V3) clonés.  
**Table I.** Identification of 16S rDNA (V3 region) cloned sequences.

Bande	Lait	Espèce assignée	Analyse de la séquence		
			Espèce	N° accession GenBank	Homologie %
k	D	<i>St. uberis</i> / <i>B. circulans</i>	<i>St. uberis</i>	AB023573	99
d	C	<i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i> /	<i>L. monocytogenes</i>	AJ549929	91
		<i>Ec. casseliflavus</i>	<i>L. innocua</i>	AJ549928	91
k	F	<i>St. uberis</i> / <i>B. circulans</i>	<i>St. uberis</i>	AB002527	100
d	G	<i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i> /	<i>L. monocytogenes</i>	AJ549929	99
		<i>Ec. casseliflavus</i>	<i>L. innocua</i>	AJ549928	99
f	G	<i>Ps. fluorescens</i> / <i>Ec. faecium</i>	<i>Ec. faecium</i>	AJ420800	100
k	I	<i>St. uberis</i> / <i>B. circulans</i>	<i>St. uberis</i>	AB023576	99
o	D	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i>	AF515226	99
n	G	<i>St. dysgalactiae</i> / <i>H. alvei</i>	<i>St. dysgalactiae</i>	AY121362	99



**Figure 3.** Résultat des PCR : – PCR spécifique *L. monocytogenes* (amorces LIMRE<sup>b</sup>, LIM2<sup>b</sup> [11]) sur l'ADN total des laits. **1** : témoin négatif, **2** : témoin positif *L. monocytogenes* (Scott A), **3** : lait J, **4** : lait G, **5** : lait D et **6** : lait C.

M : marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec, Angers, France).

– PCR spécifique *St. dysgalactiae* (amorces Sdy 105, Sdy 386 [18]) sur l'ADN total des laits. **7** : témoin négatif, **8** : témoin positif *St. dysgalactiae* (CIP55119), **9** : lait J, **10** : lait G, **11** : lait F, **12** : lait C et **13** : lait B.

**Figure 3.** PCR results: – Specific PCR *L. monocytogenes* (primers LIMRE<sup>b</sup>, LIM2<sup>b</sup> [11]) on the total DNA of milks. **1**: negative control, **2**: positive control *L. monocytogenes* (Scott A), **3**: milk J, **4**: milk G, **5**: milk D, and **6**: milk C.

M: molecular weight marker Smart Ladder (Eurogentec, Angers, France).

– Specific PCR *St. dysgalactiae* (primers Sdy 105, Sdy 386 [18]) on the total DNA of milks. **7**: negative control, **8**: positive control *St. dysgalactiae* (CIP55119), **9**: milk J, **10**: milk G, **11**: milk F, **12**: milk C, and **13**: milk B.



présente avec une forte intensité dans tous les échantillons de lait, excepté pour le lait H. Le découpage/séquençage de la bande k du lait F, et les tests de PCR spécifique pour les autres laits ont permis de confirmer son assignation à l'espèce *Streptococcus uberis* (100 % d'homologie avec la souche AB002527 de *Streptococcus uberis*, Tab. I). Le découpage/séquençage de certaines bandes co-migrantes pour le lait G a donné pour la bande d « *Listeria* » (99 %), la bande f « *Enterococcus faecium* » (100 %) et la bande n « *Streptococcus dysgalactiae* » (99 %) (Tab. I). Des tests de PCR spécifiques ont permis d'affiner l'identification de certaines bandes pour les autres laits, notamment dans le cas de bandes assignées à des espèces co-migrantes. La bande n du lait F a été confirmée « *St. dysgalactiae* » (Fig. 3) et la bande d du lait J ne correspondait ni à *Listeria monocytogenes* (Fig. 3) ni à *Enterococcus casseliflavus*.

#### 4. DISCUSSION – CONCLUSION

En 3 jours, la TTGE a permis en une seule analyse d'obtenir une image certes partielle (uniquement la flore bactérienne dont la teneur en bases GC % de la région variable V3 est inférieure à 55 %) mais relativement fine (comparativement aux méthodes de microbiologie classique) des espèces majoritaires de la communauté bactérienne de quelques laits crus. Qu'il s'agisse de laits refroidis ou non refroidis, les profils moléculaires obtenus sont assez variables avec un nombre de bandes compris entre 3 et 10. La plupart des bandes ont été assignées à une ou plusieurs espèces de la base de données existante. Le référentiel préalablement établi était donc assez exhaustif et représentatif de la flore bactérienne des laits étudiés. Sur les 15 bandes électrophorétiques identifiées seule la bande « a » n'a pas été assignée à une espèce de la base de données. La composition de la flore bactérienne des laits crus étudiés est conforme aux résultats des études réalisées antérieurement par de nombreux auteurs [6, 12, 14]. Le recours

au séquençage ou à l'utilisation d'amorces spécifiques a permis de confirmer que « *Lactococcus lactis* » était l'espèce majoritaire de ces laits. Il a mis en évidence la présence de bactéries de mammites « *Streptococcus uberis* » et « *Streptococcus dysgalactiae* » ainsi que de *Listeria* dans plusieurs laits. Ces résultats vont dans le sens d'études récentes montrant que *Streptococcus uberis* est aujourd'hui l'espèce bactérienne majeure responsable de mammites dans le troupeau français [2].

La TTGE présente ici un avantage par rapport à la méthode SSCP en électrophorèse capillaire qui n'autorise pas la récupération et le séquençage des fragments moléculaires constituant les profils SSCP [7]. L'utilisation des tests de PCR spécifique pour confirmer l'identité taxonomique des fragments constituant les profils TTGE est une méthode plus facile et plus rapide que le découpage/séquençage des bandes. De plus, les espèces bactériennes ayant la même région variable V3 « comme les espèces du genre *Listeria* » peuvent être différenciées par un test de PCR spécifique car les amorces choisies ne sont plus universelles mais au contraire spécifiques de l'espèce ou du groupe d'espèces ciblés. Ainsi, l'absence de *Listeria monocytogenes* a été confirmée dans les échantillons analysés. Comme dans toute méthode, il existe des limites relatives à la méthode TTGE. Seules les espèces dominantes (proportion d'ADN extrait supérieure à 1 % de l'ADN de la population totale) sont mises en évidence lorsque des amorces universelles sont utilisées [15]. En effet, les molécules présentes à moins de 1 % par rapport aux molécules dominantes sont généralement peu amplifiées et donc peu détectées. D'autres limites sont généralement citées dans la littérature, comme par exemple les biais provoqués lors de l'extraction de l'ADN (lyse cellulaire) et de l'amplification PCR [20]. Avec l'approche PCR spécifique couplée à la TTGE, il nous sera possible de mettre en évidence certaines espèces bactériennes minoritaires comme

par exemple les espèces qui pourraient avoir une éventuelle interaction avec certains micro-organismes pathogènes (*Listeria monocytogenes*).

L'analyse de la flore bactérienne possédant un haut GC (> 55 %) est en cours.

**Remerciements :** Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une thèse sur le comportement de *Listeria monocytogenes* en technologie laitière en fonction des traitements thermiques appliqués au lait. Ce travail fait l'objet d'une collaboration entre l'AFSSA, l'INRA et l'ENSIA.

## RÉFÉRENCES

- [1] Beuvier E., Berthaud K., Cegarra S., Dasen A., Pochet S., Buchin S., Duboz G., Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk, *Int. Dairy J.* 7 (1997) 311–323.
- [2] Bradley A.J., Bovine mastitis: An evolving disease, *Vet. J.* 164 (2002) 116–128.
- [3] Brouillaud-Delattre A., Maire M., Collette C., Mattei C., Lahellec C., Predictive microbiology of dairy products: Influence of biological factors affecting growth of *Listeria monocytogenes*, *J. AOAC Int.* 80 (1997) 913–919.
- [4] De los Reyes-Gavilan C., Limsowtin G.K.Y., Tailliez P., Séchaud L., Accolas J.P., A *Lactobacillus helveticus*-specific DNA probe detects restriction fragment length polymorphisms in this species, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 3429–3432.
- [5] Demarigny Y., Beuvier E., Buchin S., Pochet S., Grappin R., Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses: II. Biochemical and sensory characteristics, *Lait* 77 (1997) 151–167.
- [6] Desmasures N., Guéguen M., Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over two years, *J. Dairy Res.* 64 (1997) 271–280.
- [7] Duthoit F., Godon J.J., Montel M.C., Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 3840–3848.
- [8] Forsman P., Tilsala-Timisjarvi A., Alatosava T., Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions, *Microbiology* 143 (1997) 3491–3500.
- [9] Godon J.J., Duthoit F., Delbes C., Millet L., Montel M.C., 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 », *Lait* 81 (2001) 257–262.
- [10] Hechard Y., Renault D., Cenatiempo Y., Letellier F., Maftah A., Jayat C., Bressolier P., Ratinaud M.H., Julien R., Fleury Y., Delfour A., Les bactériocines contre *Listeria* : une nouvelle famille de protéines ?, *Lait* 73 (1993) 207–213.
- [11] Hein I., Klein D., Lehner A., Bubert A., Brandl E., Wagner M., Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay, *Res. Microbiol.* 152 (2001) 37–46.
- [12] Hermier J., Lenoir J., Weber F., Les groupes microbiens d'intérêt laitier, CEPIL Paris, 1992.
- [13] Marshall D.L., Schmidt R.H., Physiological evaluation of stimulated growth of *Listeria monocytogenes* by *Pseudomonas* species in milk, *Can. J. Microbiol.* 37 (1991) 594–599.
- [14] Michel V., Hauwuy A., Chamba J.F., La flore microbienne des laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production, *Lait* 81 (2001) 575–592.
- [15] Ogier J.C., Son O., Gruss A., Tailliez P., Delacroix-Buchet A., Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 3691–3701.
- [16] Pitt W.M., Harden T.J., Hull R.R., Behavior of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk during fermentation with lactic acid bacteria, *J. Food Prot.* 63 (2000) 916–920.
- [17] Randazzo C.L., Torriani S., Akkermans A.D.L., de Vos W.M., Vaughan E.E., Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 1882–1892.
- [18] Riffon R., Sayasith K., Khalil H., Dubreuil P., Drolet M., Lagace J., Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR, *J. Clin. Microbiol.* 39 (2001) 2584–2589.
- [19] Tailliez P., Quénée P., Chopin A., Estimation de la diversité parmi les souches de la collection CNRZ : application de la RAPD à un groupe de lactobacilles, *Lait* 76 (1996) 147–148.
- [20] Tailliez P., Beaud D., Ogier J.C., Le point sur les outils moléculaires de classification et d'écologie microbienne, *Sci. Aliments* 22 (2002) 5–21.
- [21] Zhu X.Y., Zhong T., Pandya Y., Joerger R.D., 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 124–137.