



HAL
open science

Quantification des populations bactériennes des laits crus par hybridation fluorescente in situ (FISH)

Rémy Bosviel, Geneviève Gagne, Caroline Chatelard-Chauvin,
Marie-Christine M.-C. Montel

► **To cite this version:**

Rémy Bosviel, Geneviève Gagne, Caroline Chatelard-Chauvin, Marie-Christine M.-C. Montel. Quantification des populations bactériennes des laits crus par hybridation fluorescente in situ (FISH). congrès CNR IUT, Jun 2013, Corte, France. hal-03030372

HAL Id: hal-03030372

<https://uca.hal.science/hal-03030372>

Submitted on 30 Nov 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Quantification des populations bactériennes des laits crus par hybridation fluorescente *in situ* (FISH).

Rémy Bosviel¹, Geneviève Gagne¹, Caroline Chatelard-Chauvin², Marie-Christine Montel³

¹Clermont Université, Université d'Auvergne, Laboratoire de Biologie, IUT Antenne d'Aurillac, Département Génie Biologique, 100 rue de l'égalité, 15013 Aurillac Cedex

²Pôle fromager AOP Massif Central, 20 Côte de Reyne, 15 000 Aurillac

³Unité de Recherches Fromagères INRA, 20 Côte de Reyne, 15 000 Aurillac



Contexte.

Préserver la microflore des laits crus est un atout pour la diversité et la richesse sensorielle des fromages au lait cru et peut exercer un effet barrière vis-à-vis des bactéries pathogènes. Les mesures d'hygiène drastiques dans les élevages ont réduit les niveaux de microflore d'intérêt technologique, rendant les laits beaucoup moins fromageables et affectant les caractéristiques sensorielles des fromages au lait cru. Face à ce constat, les producteurs de lait souhaitent donc augmenter les niveaux de ces flores dans les laits tout en conservant la

biodiversité déjà présente. Pour mettre en place une démarche de changement des pratiques de production du lait, il convient de trouver des indicateurs simples et rapides pour évaluer les populations microbiennes des laits crus.

Dans cette optique, le laboratoire de biologie de l'IUT d'Aurillac, l'Unité de Recherches Fromagères INRA et le pôle fromager AOP massif central collaborent pour adapter la technique d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) à la quantification des populations bactériennes.

Objectifs

- Vérifier la spécificité de sondes ciblant 5 grands groupes bactériens sur 24 espèces fréquemment rencontrées dans les laits crus.
- Comparer deux méthodes : quantification bactérienne obtenue par FISH avec une sonde universelle et dénombrement par culture bactérienne sur milieu non-sélectif (méthode de référence) pour évaluer les niveaux de populations microbiennes des laits et leurs proportions.

Matériel & méthode

Choix des sondes et des espèces

- Une sonde universelle et quatre sondes ciblant 4 grands groupes bactériens ont été choisies :

| Sonde | Cible | Référence |
|----------|--------------------------------------------|----------------------------|
| Lab158 | Lactobacillales (ordre) | Harmsen <i>et al.</i> 1999 |
| HGC69a | Actinobactéries (classe) | Roller <i>et al.</i> 1994 |
| Gama42a | Gammaproteobactéries (classe) | Manz <i>et al.</i> 1992 |
| Staph462 | <i>Staphylococcus</i> (genre) | Gory 2000 |
| EUB338 | Toutes les eubactéries (sonde universelle) | Amann <i>et al.</i> 1990 |

- 24 espèces de bactéries fréquemment retrouvées dans les laits crus et appartenant à ces quatre grands groupes ont été sélectionnées.

Cultures bactériennes

- Les bactéries sont cultivées en bouillons BHI ou MRS jusqu'en phase exponentielle de croissance pour être directement hybridées ou utilisées pour ensemencher le lait.

Transparisation du lait

Afin de récupérer les cellules bactériennes du lait, une étape de transparisation selon la méthode de Gunasekera *et al.* (2000) a été utilisée pour éliminer les protéines et la matière grasse du lait.

Hybridation fluorescente *in situ* (FISH)

Les cellules bactériennes cultivées en bouillon ou ajoutées dans le lait sont hybridées selon le protocole suivant, optimisé pour les 24 espèces bactériennes :

- Fixation (paraformaldéhyde 3%)
- Fixation sur lame de verre (bains successifs d'éthanol à 50, 80 puis 100%)
- Perméabilisation des membranes (lysozyme 1 ou 5mg/ml selon la sonde, 10 minutes à 37°C)
- Hybridation des sondes à 48°C. Optimisation de la durée d'hybridation, du pourcentage de formamide et de la concentration de chaque sonde spécifique (en association avec la sonde universelle à 1ng/μl).
- Lavage 20 minutes à 51°C.

| Sonde | Concentration en sonde | % formamide | Temps d'hybridation |
|-------------------|------------------------|-------------|---------------------|
| Lab158 + EUB338 | 5ng/μl | 20 | 5h |
| HGC69a + EUB338 | 1ng/μl | 25 | 2h30 |
| Gama42a + EUB338 | 5ng/μl | 35 | 2h30 |
| Staph462 + EUB338 | 1ng/μl | 20 | 2h30 |

- Test de la spécificité et de l'efficacité des sondes sur 24 espèces par observation des lames au microscope et calcul des % d'hybridation :

- Pour EUB338 :

$$\% \text{hybridation} = \frac{\text{nb cellules marquées}}{\text{nb cellules en fond clair}} \times 100$$

- Pour les sondes spécifiques :

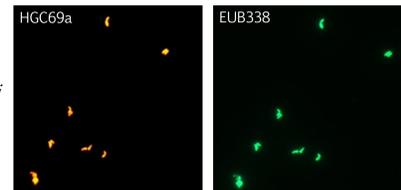
$$\% \text{hybridation} = \frac{\text{nb cellules marquées avec la sonde spécifique}}{\text{nb cellules marquées avec la sonde universelle}} \times 100$$

Quantification des bactéries dans le lait par FISH et par dénombrement sur milieu de culture

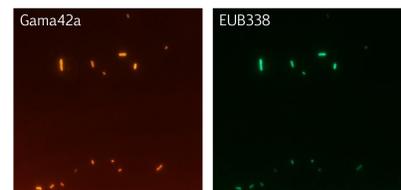
- 3 espèces inoculées à 3 concentrations différentes (10⁴, 10⁵ et 10⁶ bactéries/ml) dans du lait écrémé ou entier :
 - *Klebsiella oxytoca*
 - *Staphylococcus saprophyticus*
 - *Lactobacillus plantarum*
- 3 répétitions de transparisation par lait et 3 hybridations pour chaque répétition.
- Dénombrement des flores bactériennes dans le lait par comptage des colonies sur milieu de culture (en UFC=unité formant colonie/ml).
- Comptage des cellules marquées avec la sonde universelle EUB338 (en cellules/ml).
- Comparaison des deux comptages.

Images obtenues au microscope à fluorescence après marquage par FISH (1000x) pour le calcul du % d'hybridation des sondes spécifiques :

Corynebacterium casei



Acinetobacter spp.



Résultats

Spécificité des sondes sur 24 espèces cultivées en bouillon

| Classes/ordres | Espèces | EUB338 | Lab158 | HGC69a | Gama42a | Staph462 |
|----------------------|-------------------------------------|--------|--------|--------|---------|----------|
| Bactéries à Gram - | <i>Lactococcus lactis</i> | 91% | - | - | - | - |
| | <i>Lactococcus garviae</i> | 95% | - | - | - | - |
| | <i>Lactococcus plantarum</i> | 100% | - | - | - | - |
| | <i>Streptococcus uberis</i> | 87% | - | - | - | - |
| | <i>Lactobacillus casei</i> | 64% | 137% | - | - | - |
| | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 82% | 101% | - | - | - |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | 89% | 104% | - | - | - |
| | <i>Pediococcus acidilactis</i> | 95% | 86% | - | - | - |
| | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | 98% | 93% | - | - | - |
| | <i>Corynebacterium casei</i> | 92% | - | 100% | - | - |
| Bactéries d'affinage | <i>Brevibacterium linens</i> | NC* | - | 100% | - | - |
| | <i>Arthrobacter arilaitensis</i> | 90% | - | 115% | - | - |
| | <i>Microbacterium oxydans</i> | 100% | - | 105% | - | - |
| | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 94% | - | - | - | 116% |
| | <i>Staphylococcus xylosus</i> | 89% | - | - | - | 98% |
| | <i>Staphylococcus equorum</i> | 92% | - | - | - | 160% |
| | <i>Bacillus pumilus</i> | 99% | - | - | - | - |
| | <i>Macrococcus caseolyticus</i> | 96% | - | - | - | - |
| | <i>Pseudomonas putida</i> | 100% | - | - | 103% | - |
| | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 96% | - | - | 100% | - |
| Bactéries à Gram - | <i>Acinetobacter spp.</i> | 95% | - | +/- | 116% | - |
| | <i>Citrobacter freundii</i> | 100% | - | - | 103% | - |
| | <i>Serratia liquefaciens</i> | 99% | - | - | 101% | - |
| | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 91% | - | - | - | - |

*bactérie non visible en fond clair.

Résultats de la spécificité des sondes et des % d'hybridation avec la sonde EUB338 (universelle) et les sondes spécifiques.

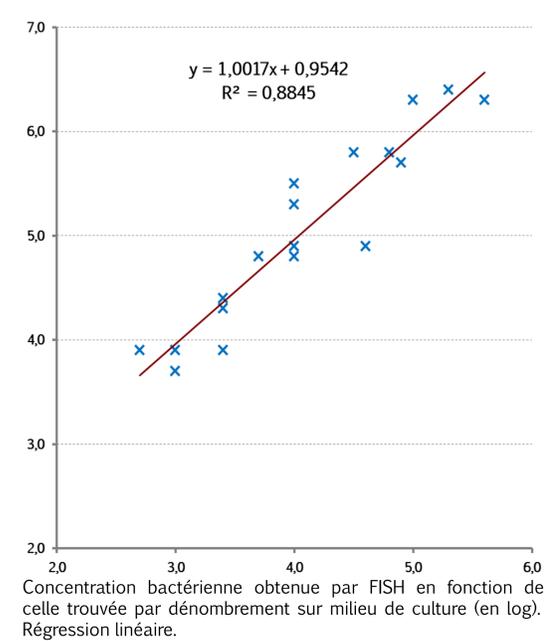
- Le pourcentage d'hybridation de la sonde EUB (par rapport au nombre de cellules observées en fond clair) est compris entre 87 et 100% pour toutes les espèces à l'exception des Lactobacilles.
- Les 4 autres sondes sont bien spécifiques des groupes bactériens ciblés et leur hybridation est souvent supérieure à celle obtenue avec la sonde universelle (% hybridation > 100%).

Comparaison des deux méthodes : FISH et dénombrement sur milieu de culture

| Espèce | Lait | FISH (Cellules/ml) | Dénombrement (UFC/ml) |
|--------------------------------|--------|--------------------|-----------------------|
| <i>Corynebacterium casei</i> | Entier | 3,4 | 4,4 |
| | | 4,0 | 5,5 |
| | | 5,3 | 6,4 |
| | | 2,7 | 3,9 |
| | | 3,7 | 4,8 |
| | | 4,5 | 5,8 |
| <i>Acinetobacter spp.</i> | Entier | 3,4 | 4,3 |
| | | 4,6 | 4,9 |
| | | 5,6 | 6,3 |
| | | 3,0 | 3,9 |
| | | 4,0 | 4,9 |
| | | 4,9 | 5,7 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | Ecrémé | 3,4 | 3,9 |
| | | 4,0 | 5,3 |
| | | 5,0 | 6,3 |
| | | 3,0 | 3,7 |
| | | 4,0 | 4,8 |
| | | 4,8 | 5,8 |

Résultats (en log) de la quantification des bactéries dans les laits par FISH (sonde EUB338) ou par dénombrement.

- Les niveaux bactériens obtenus par FISH sont en moyenne inférieurs de 1 log ±0,14 à ceux obtenus par dénombrements sur boîtes.
- Pas de différences significatives entre le lait entier ou écrémé.
- Des différences significatives sont observées :
 - entre espèces (*Klebsiella* plus faiblement retrouvée).
 - entre concentrations (plus la concentration est grande, plus l'écart entre les deux méthodes est grand).



- Bonne corrélation, en laits inoculés, entre la quantification par FISH avec sonde universelle et celle par culture bactérienne sur un milieu non spécifique (R²=0,88)

Conclusion

- Optimisation du protocole de FISH pour chaque grand groupe bactérien d'intérêt pour les laits crus.
- Sous-estimation des niveaux bactériens dans les laits par FISH par rapport au dénombrement par culture sur milieu.
- Méthode exploitable pour des concentrations bactériennes comprises entre 10⁴ et 10⁶ cellules/ml, avec une bonne corrélation entre les deux méthodes.

Perspectives

- Trouver d'autres sondes permettant de quantifier les Lactocoques et les Streptocoques.
- Appliquer la comparaison des méthodes dans des laits crus.
- Transposer la méthode en cytométrie de flux pour proposer une alternative au dénombrement sur milieux.

Cette étude a été financée par le Casdar FlorAcQ (DGER)