



**HAL**  
open science

## L'utilisation de la PCR digitale en gouttelettes comme outil de suivi des populations de lactocoques lors de procédés fermentaires

Marie-Aurore Caillaud, Martine Abeilhou, Ignacio González, Marjorie Audonnet, Frédéric Gaucheron, Muriel Cocaign-Bousquet, Helene Tormo, Marie-Line Daveran-Mingot

### ► To cite this version:

Marie-Aurore Caillaud, Martine Abeilhou, Ignacio González, Marjorie Audonnet, Frédéric Gaucheron, et al.. L'utilisation de la PCR digitale en gouttelettes comme outil de suivi des populations de lactocoques lors de procédés fermentaires. 16ème congrès National de la SFM: Microbes 2021, Sep 2021, Nantes (France), France. hal-04754261

**HAL Id: hal-04754261**

**<https://insa-toulouse.hal.science/hal-04754261v1>**

Submitted on 25 Oct 2024

**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.

# L'utilisation de la PCR digitale en gouttelettes comme outil de suivi des populations de lactocoques lors de procédés fermentaires

M-A. Caillaud<sup>1,2</sup>, M. Abeilhou<sup>1</sup>, I. Gonzalez<sup>1</sup>, M. Audonnet<sup>1</sup>, F. Gaucheron<sup>3</sup>, M. Coccain-Bousquet<sup>1</sup>, H. Tormo<sup>2</sup>, M-L. Daveran-Mingot<sup>1</sup>

1 - TBI, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, France

2 - Université de Toulouse, Ecole d'Ingénieurs de Purpan, INPT, Toulouse, France

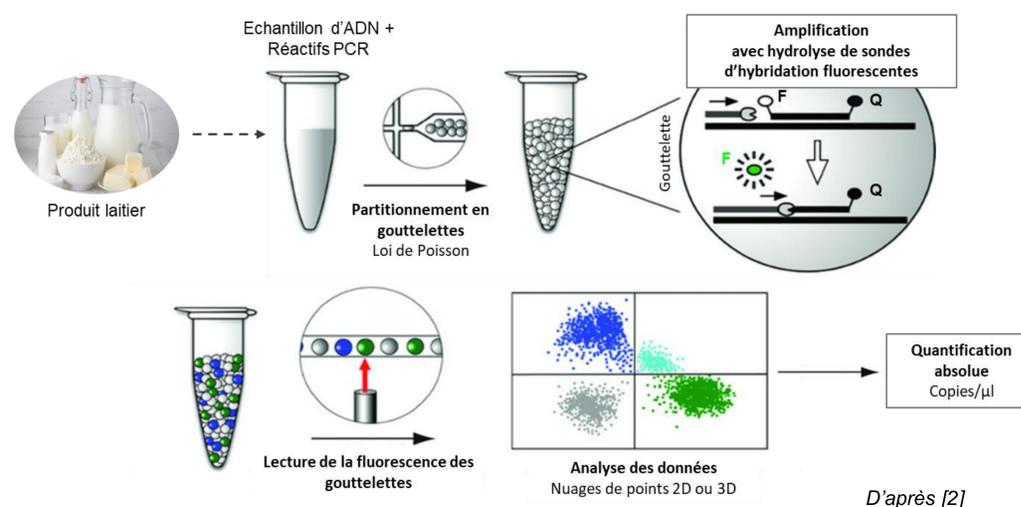
3 - Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL), Paris, France

## Contexte

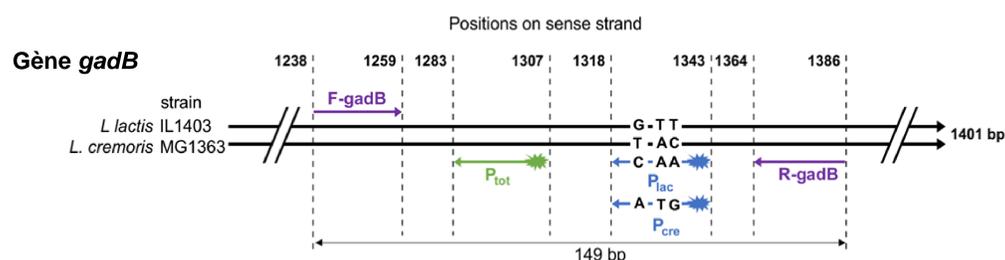
Le groupe « *Lactococcus lactis* » composé des espèces *lactis*, *cremoris* et du biovar diacetylactis, joue un rôle majeur dans les fermentations laitières. Ces populations rentrent dans la composition de starters puisqu'elles contribuent à l'acidification et à la signature aromatique des produits fermentés grâce à la production de diacétyl. Leur suivi est particulièrement important lors de divers procédés fermentaires mais difficile car ces populations sont phylogénétiquement proches. La PCR digitale en gouttelettes a été proposée comme outil particulièrement pertinent pour ce suivi.

## Principe de la ddPCR avec sondes fluorescentes

- La technologie de PCR digitale en gouttelettes (digital droplet PCR, ddPCR) permet une quantification absolue selon la Loi de Poisson, sensible, précise et rapide [1].
- La ddPCR est aussi moins sensible que la qPCR aux inhibiteurs de PCR souvent rencontrés dans les matrices alimentaires [1].



## Stratégie de suivi population-spécifique



- Les SNP spécifiques associés au gène *gadB* (figure ci-dessus), codant la glutamate décarboxylase, et le gène *citD*, codant la citrate lyase, ont été utilisés pour développer un test quantitatif permettant de tracer respectivement les espèces *lactis* et *cremoris*, et le biovar diacetylactis dans un mélange [3].
- Les sondes fluorescentes ont été testées en duplex afin de connaître les proportions de chaque espèce ( $P_{lac}$  et  $P_{cre}$ ) et du biovar ( $P_{cit}$ ) au sein du groupe « *lactis* » ( $P_{tot}$ ).

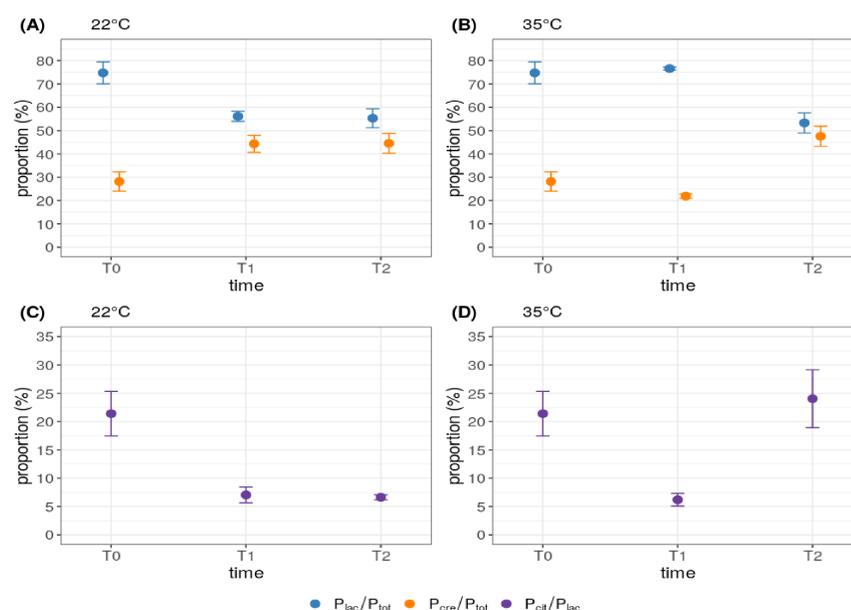
## Performance du test

Spécificité à 59°C	Limites de quantification*		Tests sur ferments reconstitués
	Copies/µl de mix réactionnel	Copies/ml de lait	
Vérifiée sur 8 espèces différentes usuellement rencontrées en fermentation laitière	26.1 à 176 copies/µl	2.6 x 10 <sup>4</sup> à 1.8 x 10 <sup>5</sup> copies/ml	Validation des ratios théoriques pour 5 mélanges à 2 souches, ' <i>L. lactis</i> : <i>L. cremoris</i> ': '5:95', '20:80', '50:50', '80:20', '95:5'

\*mesurées pour chaque sonde. Les limites de détection en lait sont 10 fois plus faible. [3]

## Suivi de populations de lactocoques durant un procédé de fermentation laitière

- La composition du ferment commercial MM100 a été étudiée à différents stades du procédé: à pH initial (T0), à pH 4.5 (T1) et à pH 4.3 (T2) après une période prolongée en stress acide.
- La proportion des espèces *lactis* et *cremoris* par rapport au groupe « *lactis* », et la proportion du biovar diacetylactis par rapport à l'espèce *lactis*, varient au cours du procédé selon la température et le pH [3]. A 22°C (A), les proportions initiales des deux espèces sont modifiées à pH 4.5 comparativement aux conditions d'utilisation usuelles du ferment (35°C, B).



## Conclusion

- La ddPCR montre des avantages techniques et de performance comparativement à la qPCR.
- L'utilisation de sondes d'hybridation fluorescentes permet la discrimination d'espèces proches mais peut également permettre de différencier des souches appartenant à une même espèce grâce à une détection résolutive au SNP près.
- Largement utilisée dans le domaine du diagnostic clinique, le transfert de la ddPCR en microbiologie alimentaire peut notamment aider au pilotage de populations spécifiques lors de procédés fermentaires. Elle peut aussi compléter des analyses de métagénomique pour une description plus précise d'écosystèmes relativement complexes.

## Références bibliographiques

[1] Wang et al. (2018) 'Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of *Salmonella typhimurium* in milk'. *Int J Food Microbiol* 266: 251–256

[2] Mazaika E & Homsy J (2014) 'Digital Droplet PCR: CNV Analysis and Other Applications.' *Curr Protoc Hum Genet* 82: 7.24.1-7.24.13

[3] Caillaud et al. (2020) 'Precise Populations' Description in Dairy Ecosystems Using Digital Droplet PCR: The Case of *L. lactis* Group in Starters'. *Frontiers in Microbiology*