



HAL
open science

Potentiel de la chromatographie liquide haute performance dénaturante (D-HPLC) en écologie bactérienne des produits laitiers

Marina Aigle, Agnès Delacroix-Buchet, Jean-Claude Ogier

► **To cite this version:**

Marina Aigle, Agnès Delacroix-Buchet, Jean-Claude Ogier. Potentiel de la chromatographie liquide haute performance dénaturante (D-HPLC) en écologie bactérienne des produits laitiers. Colloque Club des Bactéries Lactiques, 2007, Rennes, France. hal-03164499

HAL Id: hal-03164499

<https://hal.science/hal-03164499>

Submitted on 10 Mar 2021

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.

Potentiel de la chromatographie liquide haute performance dénaturante (D-HPLC) en écologie bactérienne des produits laitiers

Marina Aigle, Agnès Delacroix-Buchet, Jean-Claude Ogier

INRA, Unité Bactéries Lactiques et pathogènes Opportunistes, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France

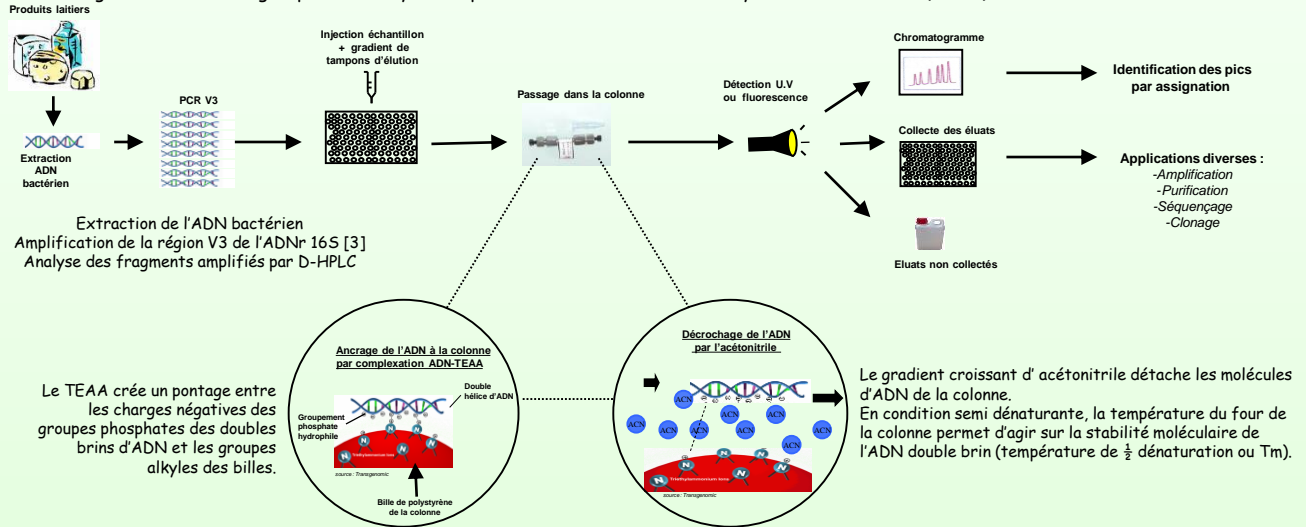
Marina.Aigle@jouy.inra.fr

Depuis les années 1990, la D-HPLC est largement utilisée dans le domaine médical, dans le but de détecter des mutations chromosomiques [1]. Plus récemment, des applications ont vu le jour dans le domaine de l'écologie microbienne [2].

Nous avons testé le potentiel de la D-HPLC (Système WAVE, Transgenomic Ltd) en écologie bactérienne des produits laitiers pour : i) analyser la biodiversité bactérienne des produits laitiers, ii) identifier l'agent infectieux dans des laits de mammites, iii) suivre la dynamique des populations bactériennes du lait au fromage affiné et iv) identifier et séparer des souches pures (bactéries lactiques, staphylocoques). Nous présentons ici l'identification de souches pures de staphylocoques et son application à l'analyse d'échantillons de laits de brebis.

Principe de la D-HPLC

La D-HPLC est une chromatographie en phase inverse de paires d'ions. La phase stationnaire de la colonne est composée de billes de polystyrène greffées avec des groupements alkyles. La phase mobile contient du triéthylammonium acétate (TEAA) et de l'acétonitrile.



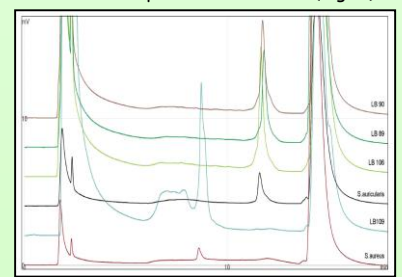
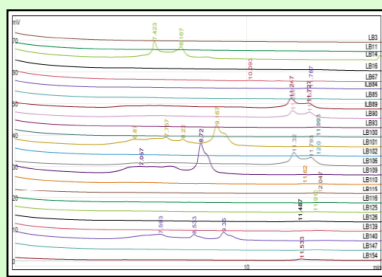
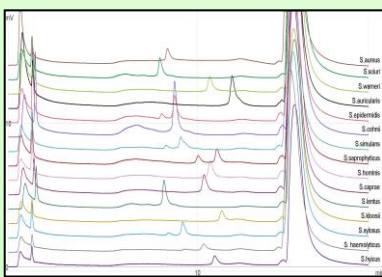
Un exemple : l'identification des Staphylocoques en laits de brebis

L'étude a porté sur des laits de brebis car les petits ruminants sont sensibles aux mammites à staphylocoques. Elle a été réalisée en 4 étapes.

Etape 1 : un référentiel de profils d'éluants de fragments V3 d'ADNr16s de souches pures des différentes espèces de staphylocoques a été créé (Fig. 1).

Etape 2 : un ensemble d'échantillons de laits de brebis a été analysé en D-HPLC pour identifier les laits potentiellement infectés (signal fort en U.V.) (Fig. 2).

Etape 3 : les chromatogrammes des échantillons suspects infectés ont été comparés aux chromatogrammes du référentiel staphylocoques pour identifier l'espèce contaminante (Fig. 3).



Etape 4 : Les pics élués des échantillons de laits ont été collectés pour vérifier par séquençage l'identification des espèces. La technique D-HPLC permet, moyennant quelques mises au point, de réaliser un séquençage direct des fragments collectés et de s'affranchir de l'étape de clonage.

En conclusion, la technique D-HPLC entièrement automatisée offre des perspectives très prometteuses dans le domaine du diagnostic bactériologique. Les échantillons de laits infectés sont facilement détectables par D-HPLC et la méthodologie mise en place permet d'identifier rapidement l'espèce de staphylocoque contaminante.

Plus généralement, nos résultats montrent l'intérêt de la D-HPLC dans le domaine de l'écologie microbienne des produits alimentaires pour compléter le répertoire actuel des méthodes d'analyse des écosystèmes complexes.

Références :

- [1] Le Maréchal, C., Audrézet, M.P., Quérel, I., Raguénès, O., Langonné, S., Férec, C., 2001. Complete and rapid scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC): major implications for genetic counseling. Hum. Genet. 108, 290-298.
- [2] Goldenberg, O., Herrmann, S., Marjoram, G., Noyer-Weidner, M., Hong, G., Bereswill, S., Göbel, U.B., 2007. Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. J. Microbiol. Methods 68, 94-105.
- [3] Ogier, J.C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., Leveau, J.Y., Delacroix-Buchet, A., 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 70, 5628-5643.