

# La spectroscopie de fluorescence : un outil pour l'identification des bactéries lactiques

YAAKOUBI K., AMMOR S., HAYDERSAH J., DUFOUR E. & CHEVALLIER I.

Unité de Recherches "Typicité des Produits Alimentaires", ENITA Clermont, Site de Marmilhat,  
BP 35, F-63370 LEMPDES.

## Introduction

Les bactéries lactiques constituent un acteur essentiel dans les processus de fermentation. Dans le cas de la fabrication des saucissons secs fermiers où il n'y a pas d'ajout de ferments industriels, il apparaît indispensable de connaître les genres, voir même les espèces et les souches, qui interviennent dans ce processus de fermentation. Ceci dans une perspective de mise en place de procédures d'amélioration de la qualité hygiénique et technologique du saucisson sec, sans en altérer la typicité.

L'identification des micro-organismes par les procédures phénotypiques conventionnelles basées sur les tests morphologiques et biochimiques présentent des limites en terme de reproductibilité et de précision et sont très consommatrices en temps et en réactifs. Les méthodes moléculaires (PCR, RAPD, ...) sont venues diminuer remarquablement la durée de l'analyse; néanmoins elles restent très coûteuses. Dans cette étude, nous avons testé l'aptitude d'une méthode développée au niveau de notre équipe de recherche (Leblanc & Dufour, 2002), en l'occurrence la spectroscopie de fluorescence pour l'identification des bactéries lactiques.

## Matériel et méthodes

### Souches et conditions de croissance

Vingt souches de références appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Vagococcus* et issues de collections internationales (ATCC, CIP, ... ) ont été utilisées pour constituer le jeu de calibration.

Quatre vingt-huit isolats de la flore lactique provenant d'un atelier de Haute Loire ainsi que 60 isolats provenant de deux ateliers sélectionnés (F02-F08) parmi les 10 ateliers impliqués dans l'étude Tradisausage ont été identifiées par les techniques classiques et ont constitué le jeu de validation. Les bactéries lactiques ont été cultivées à 30°C sur milieu APT et analysées en phase exponentielle de croissance. La culture a été centrifugée et le culot a été lavé 2 fois par une solution physiologique. Après la dernière centrifugation, le culot est repris par de l'eau physiologique de manière à obtenir une D.O. à 620 nm de 0,05 et l'échantillon est ensuite placé dans une cuve en quartz.

### Méthodes d'identification par spectroscopie de fluorescence:

Les spectres de fluorescence ont été obtenus en utilisant un spectrofluorimètre FluoroMax-2 (Spex-Jobin Yvon, NJ, USA). Le principe consiste à exciter des sondes fluorescentes naturellement présentes dans les cellules bactériennes (tryptophane, acides aminés aromatiques, ...). Nous nous sommes attachés à développer un modèle de prédiction en se basant sur les 20 espèces lactiques de référence. Dans un premier temps, trois types de sondes ont été retenues pour l'analyse: Tryptophane (Excitation: 270; Excitation: 280-480), acides aminés aromatiques (Ex: 250; Em: 280-480) et NADH (Ex: 316; Em: 380-550). Puis, dans un second temps, seule la sonde des acides aminés aromatiques a été retenue pour l'analyse et les spectres ont été enregistrés entre 280-480 nm pour les souches de référence et les isolats des ateliers fermiers. Les données acquises ont été traitées par des méthodes chimométriques (ACP, ACH, etc.).

Les techniques de biologie moléculaire et de spectroscopie de fluorescence ont été appliquées à l'identification de l'ensemble des isolats provenant des ateliers fermiers.

## Résultats et discussion

Les résultats des analyses factorielles discriminantes (AFD) réalisées sur les collections spectrales indiquaient des pourcentages de bonne classification à l'échelle du genre de respectivement 98,3%, 97,8% et 95,6% pour les sondes AAA+AN, NADH et FAD. Il est à noter que la carte factorielle obtenue suite à l'AFD réalisée sur la collection spectrale de la sonde NADH montrait une nette discrimination du genre *Leuconostoc* par rapport aux autres genres. Cette discrimination pourrait être reliée au métabolisme des bactéries hétérofermentaires. En effet, ces dernières ont l'aptitude d'utiliser les accepteurs d'électrons externes pour régénérer le NADH et donc produire plus d'énergie (Axelsson, 1998).

A l'échelle de l'espèce, nous avons obtenu des pourcentages de bonne classification de respectivement 100%, 88,9% et 88,9% pour les spectres AAA+AN, NADH et FAD. Enfin, à l'échelle du genre-espèce, les analyses ont donné des pourcentages de bonne classification de respectivement 100%, 88,9% et 97,8% à partir des spectres AAA+AN, NADH et FAD.

A l'issue de ces résultats, nous avons adopté la sonde AAA+AN pour tenter d'identifier les espèces isolées au niveau des ateliers fermiers. Parmi les 88 souches identifiées par approches phénotypique et génotypique, 33 % des isolats identifiés pour chaque espèce ont été retenus : 12 *Lb. sakei*, 7 *Ec. faecium*, 5 *Lc. garvieae*, 4 *Vc. carniphilus* et 1 *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 2 ont été utilisés pour cette étude.

Parmi les 29 espèces considérées, 28 ont été correctement identifiées. Seul *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 2 n'a pas été correctement classé. Ceci peut s'expliquer par le choix de la souche de référence qui était *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Ce résultat laissant présumer la possibilité de discrimination de la méthode à l'échelle de la sous-espèce, d'autres analyses ont été réalisées. Les résultats ainsi obtenus ont montré une discrimination de 100% pour 12 espèces de *Lb. sakei* divisées en 2 sous-espèces : subsp. *sakei* et subsp. *carnosus*.

Par ailleurs, les spectres de 60 isolats des deux autres ateliers français de l'étude Tradisusage ont été enregistrés et les résultats des analyses ont montré une bonne corrélation avec les identifications PCR espèces spécifiques, montrant que le F02 était essentiellement colonisé par *Lb. sakei* alors que F08 possédait une flore essentiellement dominée par *Enterococcus spp.*

## **Conclusion**

L'ensemble des résultats d'identification par spectroscopie de fluorescence indique que la fluorescence intrinsèque d'une bactérie constitue une empreinte digitale puisque le traitement multidimensionnel (méthodes exploratoires et méthodes discriminantes) des données spectrales nous a permis d'identifier correctement la totalité des bactéries lactiques de références de notre modèle au niveau du genre, de l'espèce et même de la sous-espèce. Un total de 92% des souches isolées des ateliers a été correctement identifié au niveau de l'espèce.

## **Remerciements :**

Fifth European Community Framework Programme, Quality and Life Management of Living Resources  
N°QLK1 CT-2002-0224 – TRADISAUSAGE - Coordinateur : R. Talon (INRA), France