

Apport des techniques moléculaires au contrôle des produits laitiers

Importance of molecular techniques for the control of dairy products

LEONE P., CREMONESI P.

CNR, Istituto di biologia e biotecnologia agraria, via Einstein, 26900 LODI, Italia

INTRODUCTION

Le diagnostic moléculaire appliqué à des échantillons issus des produits laitiers et fromagers doit être défini en cohérence avec la technologie de production mise en oeuvre. En effet, celle-ci varie en fonction du produit et les différences se traduisent par des transformations du matériel biologique qui peuvent affecter la quantité et la qualité de l'ADN. Pour utiliser des techniques moléculaires, il faut donc déterminer à la fois les points critiques dans la filière de production, la meilleure technique d'extraction de l'ADN et les marqueurs à utiliser.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. ECHANTILLON D'ETUDE

A l'aide d'un tableau synoptique des techniques de production des plus importants groupes typologiques de fromages italiens, nous avons identifié des points critiques pour la disponibilité d'ADN d'origines animale, végétale et microbienne. Des échantillons de lait, caillé, sérum et fromage (pâte et croûte) ont été collectés à différentes étapes de la chaîne de production des fromages *Taleggio DOP*, *Toma* de Bergame et *Mozzarella* de buffle de Lombardie. Les fromages choisis ont des caractéristiques technologiques assez différentes : le *Taleggio DOP* est un fromage à pâte molle et croûte lavée à maturation courte, la *Toma* de Bergame est un fromage à pâte semi-dure à maturation prolongée, tandis que la *Mozzarella* est une pâte filée fraîche.

1.2. ANALYSE

L'extraction de l'ADN a été faite par deux méthodes. L'une est manuelle et nécessite un étape d'écémage du lait et d'homogénéisation du fromage, tandis que l'autre, automatisée (*Maxwell 16® System Promega*), permet d'utiliser les prélèvements originaux. Les caractéristiques de l'ADN ont été évaluées par gel d'agarose et analyse spectrophotométrique. Les échantillons ont été analysés par PCR pour le dépistage du *Staphylococcus aureus* et de gènes de ses souches toxigènes. Pour vérifier la positivité aux marqueurs cibles, les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse capillaire (*Agilent BioAnalyzer 2100*), qui permet d'en déterminer même des quantités réduites (< 0,10 ng / µl). Le témoin de qualité de l'ADN fut l'amplification d'une séquence du gène de la caséine β. La vérification de l'espèce produisant le lait a été faite par amplification du fragment du gène de la caséine β spécifique pour vache et buffle.

2. RESULTATS

Les deux méthodes d'extraction de l'ADN ont donné des résultats comparables en termes de quantité et de qualité. Dans les filières *Taleggio* et *Toma*, le taux d'ADN étaient plus élevés dans les échantillons issus du caillé et du fromage, par rapport à ceux issus du lait, suite au mélange avec de la présure et à la perte d'eau (tableau 1). Dans les mêmes filières, on peut observer un taux d'ADN plus élevé dans les échantillons issus de la croûte à partir du trentième pour la *Toma* et du trente cinquième jour pour le *Taleggio*. Chaque échantillon a été correctement attribué à l'espèce attendue comme produisant le lait.

Tableau 1 : concentration d'ADN, en ng / µl.

Jour	Matrice	<i>Taleggio</i>	<i>Toma</i>	<i>Mozzarella</i>
1	Lait cru	15,1	22,6	132,6
	Lait pasteurisé			68,5
2	Caillé	55,5	43,4	24,7
	Sérum	3,7	3,6	19,8
	Pâte			78,3
	Pâte			42,0
7	Pâte	129,5	36,6	
	Croûte	75,5	41,8	
9	Pâte			42,1
	Croûte			
25	Pâte	71,2		
	Croûte	54,1		
30	Pâte		22,3	
	Croûte		76,5	
35	Pâte	157,7		
	Croûte	486,3		
45	Pâte	160,1		
	Croûte	292,5		
90	Pâte		59,4	
	Croûte		185,1	
180	Pâte		47,2	
	Croûte		270,1	

S. aureus a été identifié dans des échantillons de chaque filière, tandis que les souches toxigènes ont été identifiées seulement dans les échantillons de *Mozzarella* (tableau 2) ; la co-présence des deux gènes entérotoxiques D (*sed*) et J (*sej*) est due à leur présence sur le même plasmide.

Tableau 2 : dépistage de *S. aureus* (SA) et des souches toxigènes

Jour	Matrice	<i>Mozzarella</i>		<i>Taleggio</i>		<i>Toma</i>	
		SA	gènes	SA	gènes	SA	gènes
1	Lait cru	+	<i>sed, sej</i>				
	Pasteurisé	+	<i>sed, sej</i>	+	-	+	-
	Caillé	+	<i>sed, sej</i>	+	-	+	-
	Sérum	+	-,-	+	-	-	-
	Fromage	+	<i>sed, sej</i>	-	-	-	-
2	Fromage	+	<i>sed, sej</i>				
7	Fromage			-	-	-	-
9	Fromage	+	<i>sed, sej</i>				
25	Fromage			-	-		
30	Fromage					-	-
35,45	Fromage			-	-		
90,180	Fromage					-	-

CONCLUSION

Pour l'analyse du lait, on peut extraire l'ADN avec différent méthodes, tandis que pour le caillé et les produits fromagers, l'analyse doit être effectuée à partir du matériel intégral, cela n'étant possible que par la méthode automatisé. Les technologies qui affectent le plus la qualité de l'ADN sont le chauffage du lait et du caillé et le salage. La maturation et la durée d'affinage influencent le taux d'ADN : positivement au niveau de la croûte et négativement à niveau de la pâte. L'analyse par PCR et électrophorèse capillaire permet de révéler la présence d'un fragment d'ADN cible même dans des quantités réduites (< 0,10 ng / µl).