

L'analyse métagénomique ciblée au service de la microbiologie des aliments : applications concrètes

Bernard Taminiau, Carine Nezer, Laurent Delhalle,
Ysabelle Adolphe, Pedro Imazaki, Amélie Darcis,
Antoine Clinquart et Georges Daube



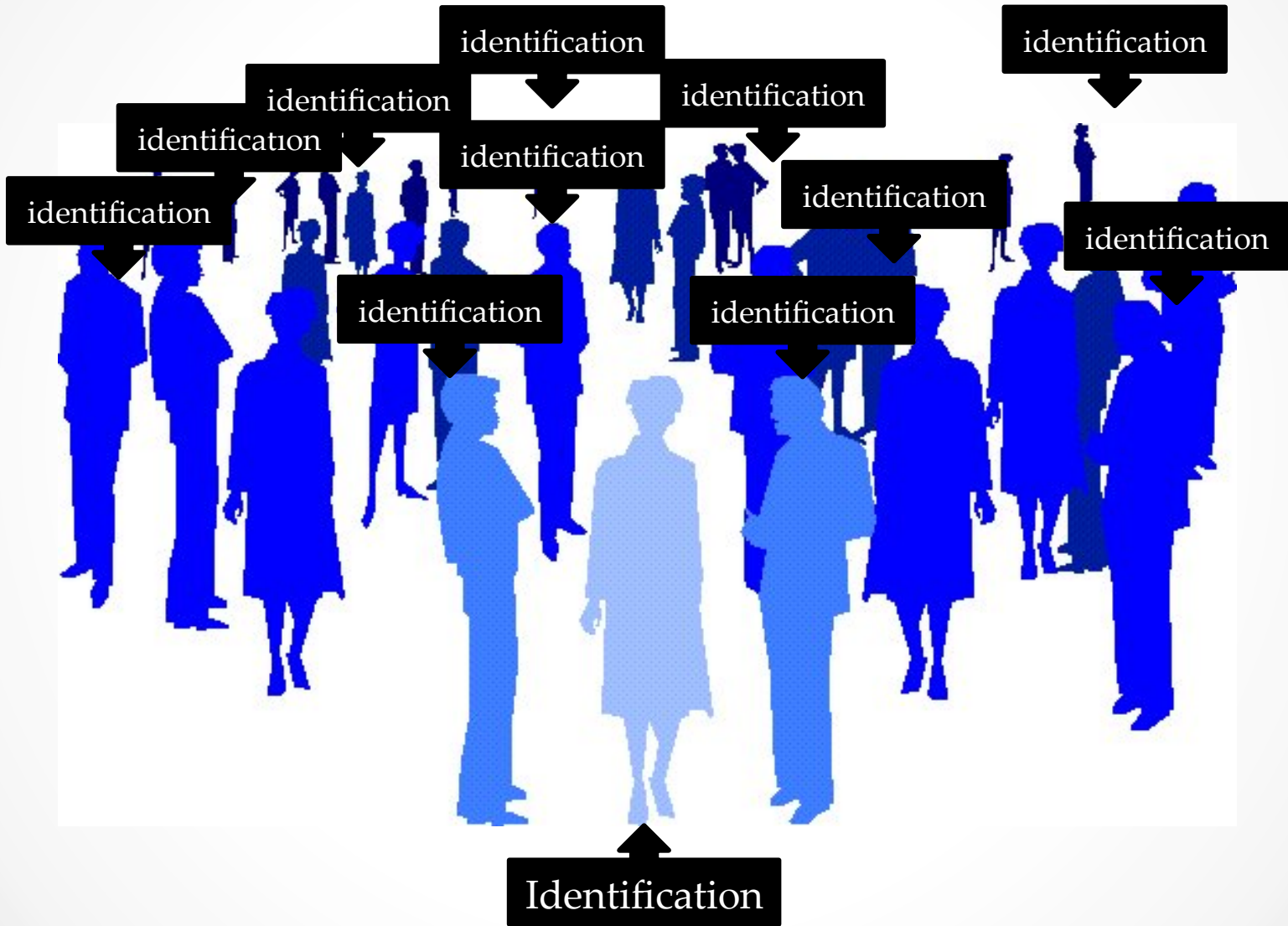
La caverne de PLATON



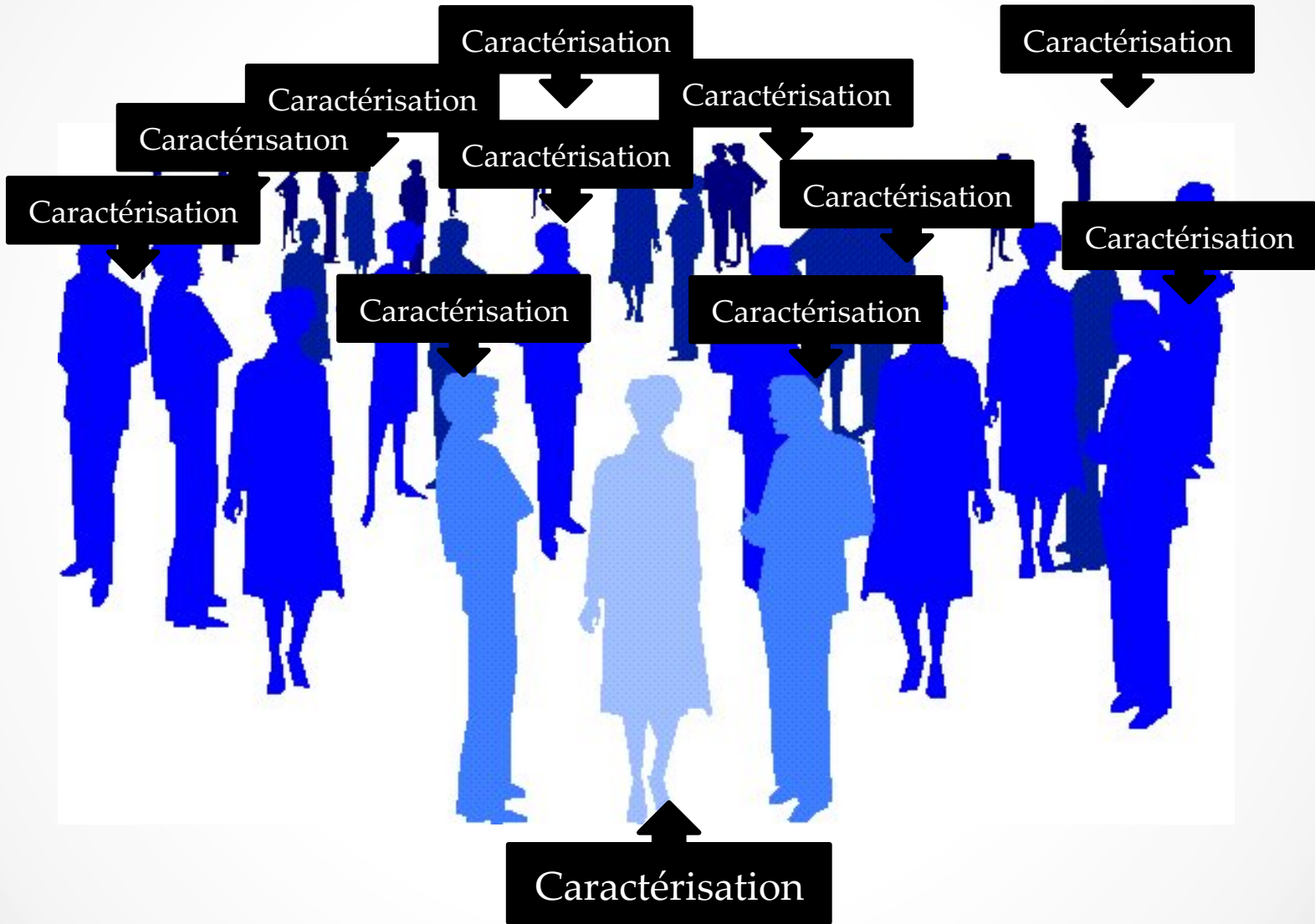
Approche classique



Approche Métagénomique



Approche Métagénomique



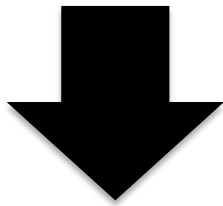
L'analyse métagénomique ciblée,

C'est l'identification des membres de la communauté microbienne d'un biotope afin:

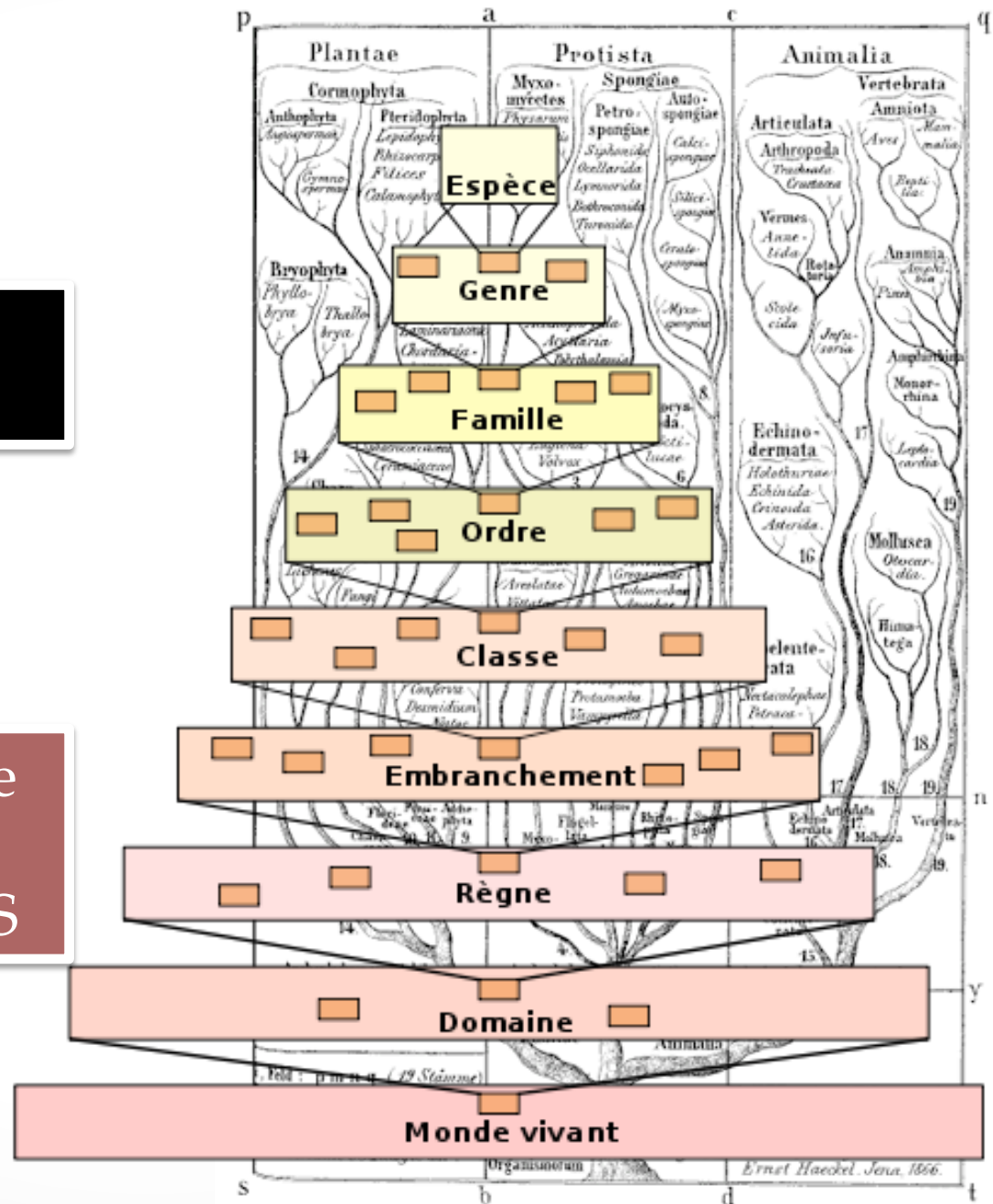
- d'en étudier la composition
 - en étudier les évolutions
- déduire les parentés entre communautés.

WHO is in there ???

Réalise une analyse taxonomique



Taxonomie bactérienne est basée sur la séquence de l'ARN 16S



Technique de séquençage
massif en parallèle

- 454 pyrosequencing
- Illumina (Solexa) sequencing
- SOLiD sequencing
- Ion semiconductor sequencing
- DNA nanoball sequencing
- Helioscope(TM) single molecule sequencing
- Single molecule SMRT(TM) sequencing
- Single molecule real time (RNAP) sequencing
- Nanopore DNA sequencing
- VisiGen Biotechnologies approach

Fournit un grand nombre de séquences
désordonnées

Tri et nettoyage
des séquences

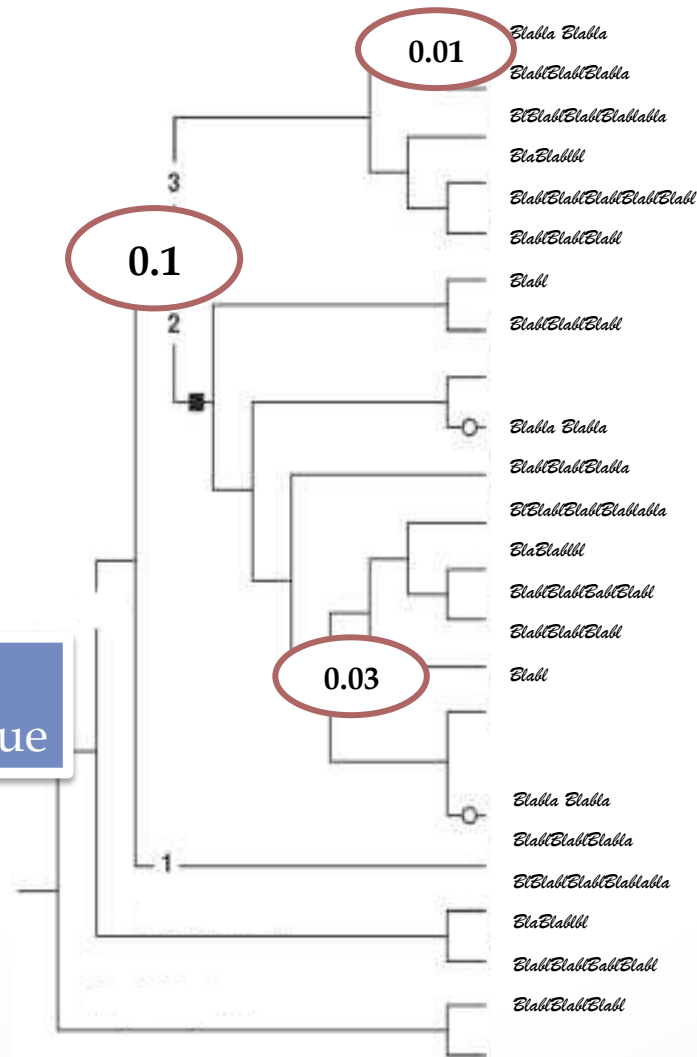
Alignement des
séquences sur des
séquences de
référence

Regroupement et
définition des
OTUs

L'OTU : unité taxonomique opérationnelle

Regroupe des éléments qui partagent un consensus au niveau :

- De la séquence
- Du chemin taxonomique





Quel avantage ?

- Analyse à large spectre !!!
 - 10.000 individus vs 5 colonies
- Analyse culture-indépendante
- Reproductible
- Portable et stockable
- Analyse quantitative



Quel limite?

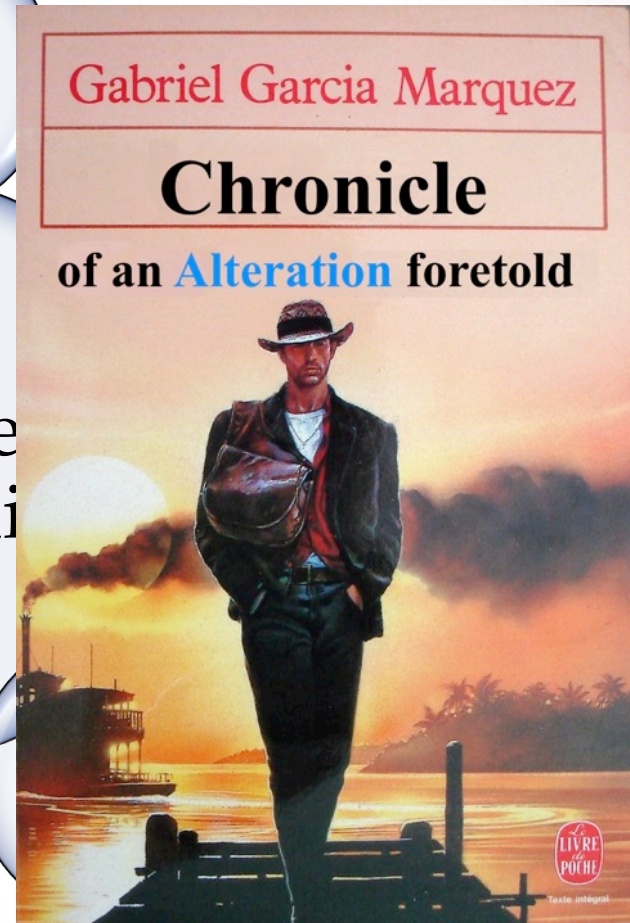
- Tributaire de l'état des connaissances actuelles
- La précision de l'identification est dépendante de la séquence ciblée et obtenue
- La profondeur de l'analyse est à fixer arbitrairement
- Basée sur l'ADN (possibilité de détection d'organismes morts)
- Analyse coûteuse dont le prix diminue

Métagénomique et industrie agro-alimentaire

Flores
altérantes

Matrice alimentaire est
un biotope de choix !!

DLC





Chimie alimentaire

Biologie moléculaire

- séquenceur
- Rt-PCR

Unité pilote

- Production produits crus/cuits

Etude du vieillissement de deux matrices à base de viande



WP_D0

Workplan



AIR - 4°C

WP_FW_D6

30% CO2 70% N2 - 4°C

WP_MAP30_D21

50% CO2 50% N2 - 4°C

WP_MAP50_D21

MM_D0



AIR - 4°C

MM_FW_S4_D3

AIR - 4-8°C

MM_FW_S4-8_D3

AIR - 12°C

MM_FW_S12_D3

30% CO2 70% O2 -
4°C

MM_MAP_S4_D6

30% CO2 70% O2 -
4-8°C

MM_MAP_S4-8_D6

30% CO2 70% O2 -
12°C

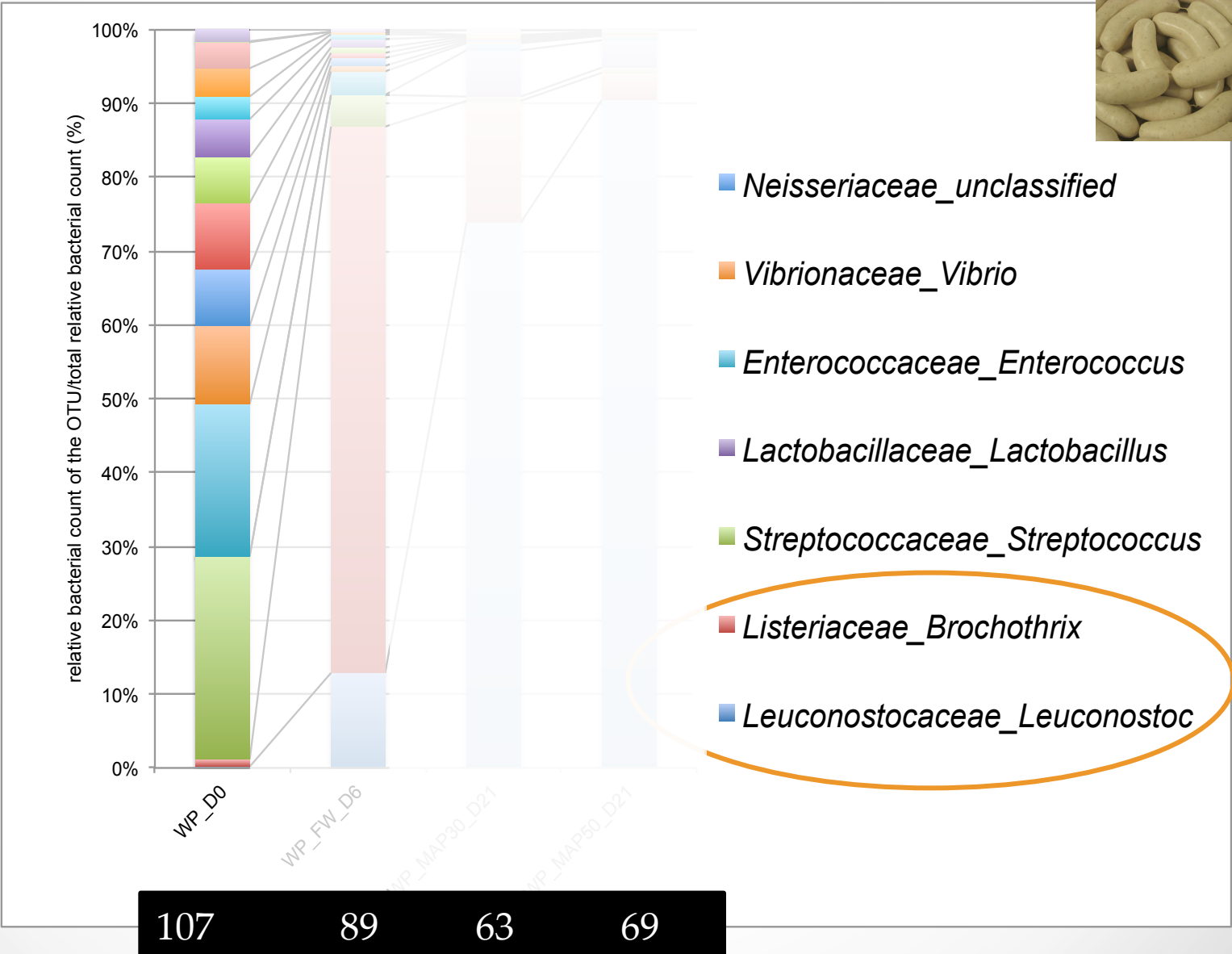
MM_MAP_S12_D6

Microbiological Analysis

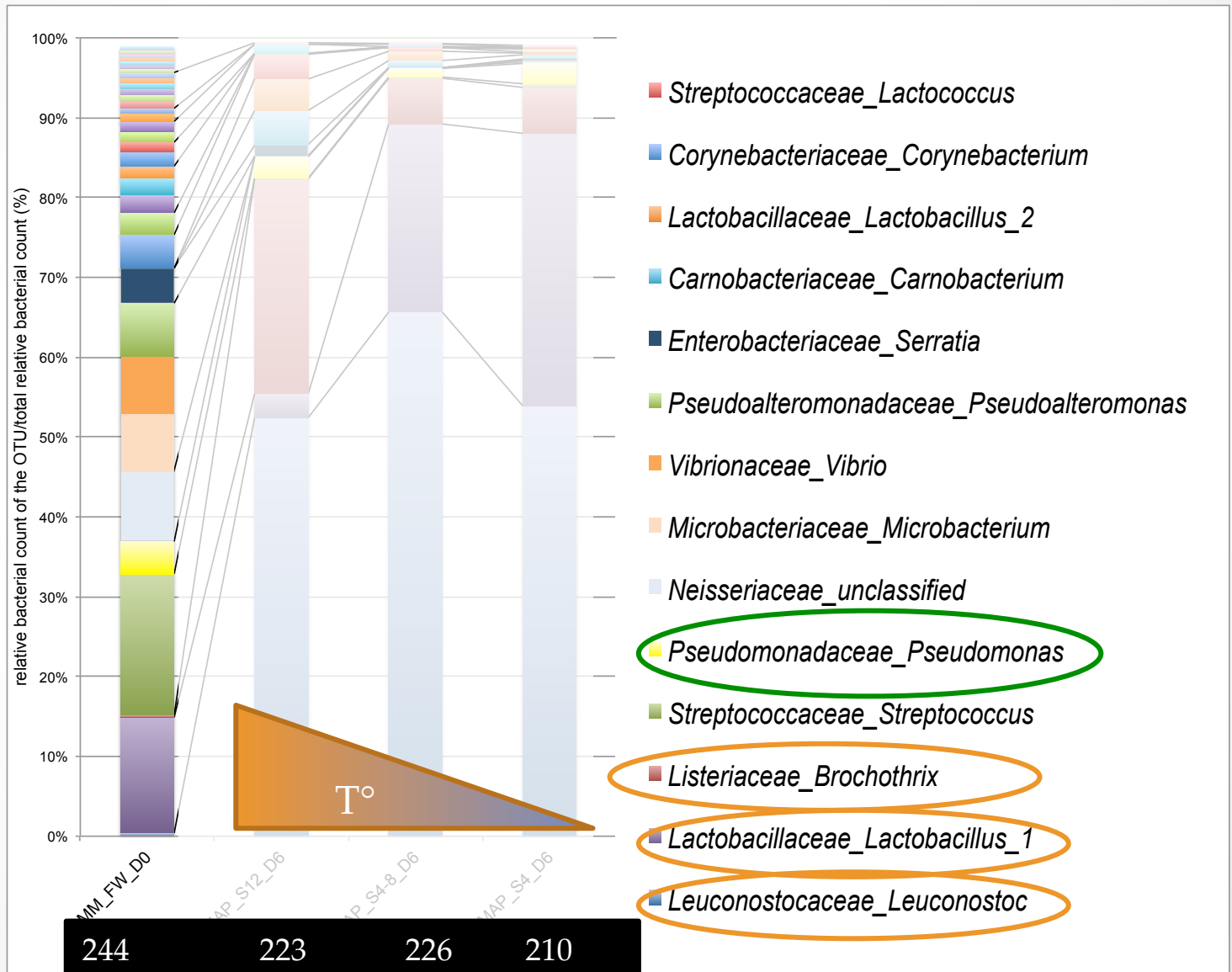
Label	TOTAL AEROBIC	LACTIC ACID BACTERIA	ENTEROBACTERIACEA <i>E</i>	PSEUDOMONADACEAE
WP_D0	3,13	<3	<3	<3
WP_FW_D6	6,83	<3	<3	<3
WP_MAP30_D21	8,54	7,07	<3	<3
WP_MAP50_D21	8,64	6,61	<3	<3
MM_D0	3,92	<3	<3	<3
MM_FW_S4_D3	6,48	<3	<3	4,70
MM_FW_S4-8_D3	7,94	<3	<3	5,37
MM_FW_S12_D3	8	5,30	4,63	5,33
MM_MAP_S4_D6	7,56	4,34	<3	<3
MM_MAP_S4-8_D 6	7,39	4,67	<3	<3
MM_MAP_S12_D6	9,38	7,02	<3	<3

Data in Log UFCg⁻¹

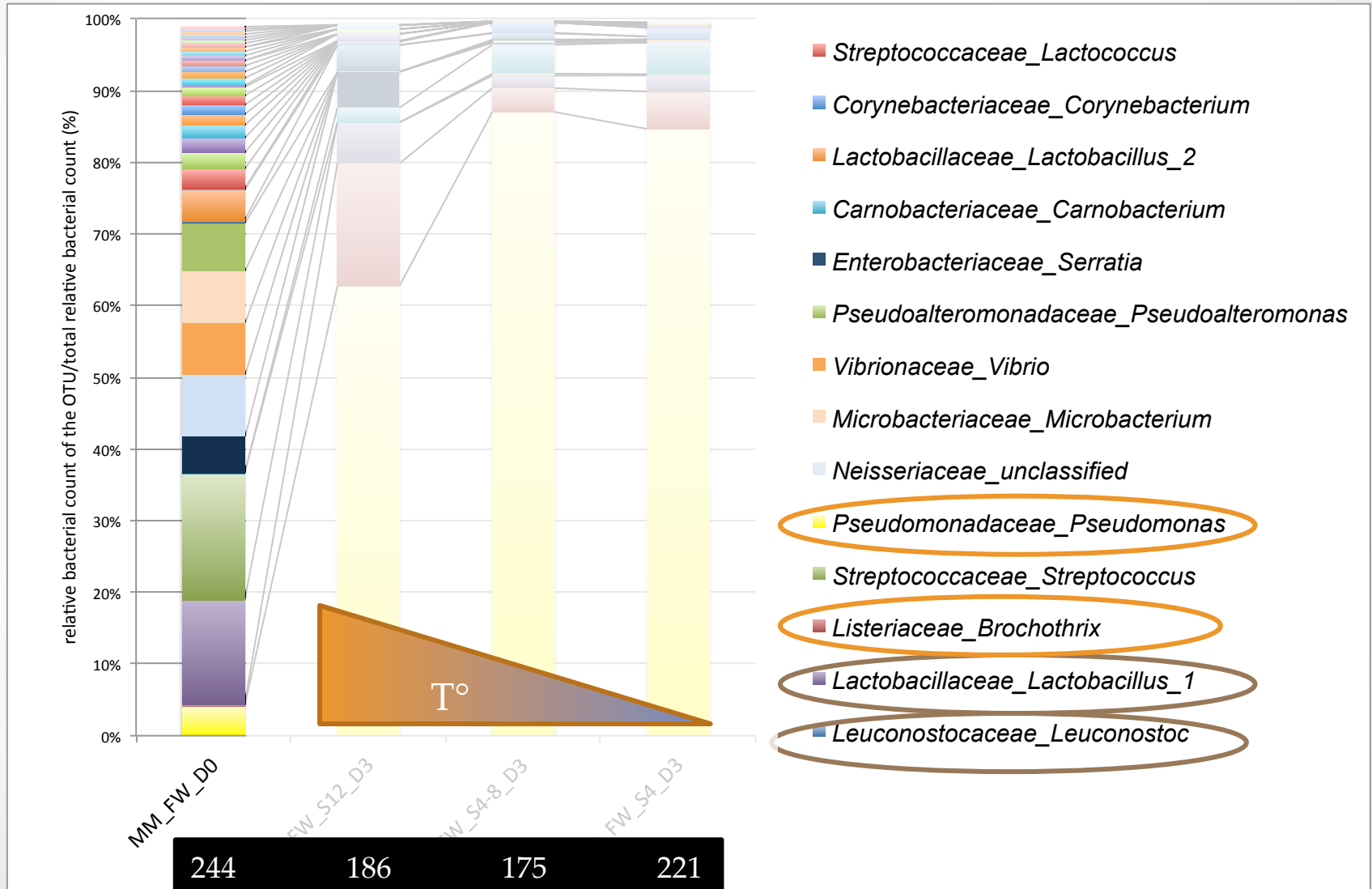
Populations bactériennes – boudin blanc



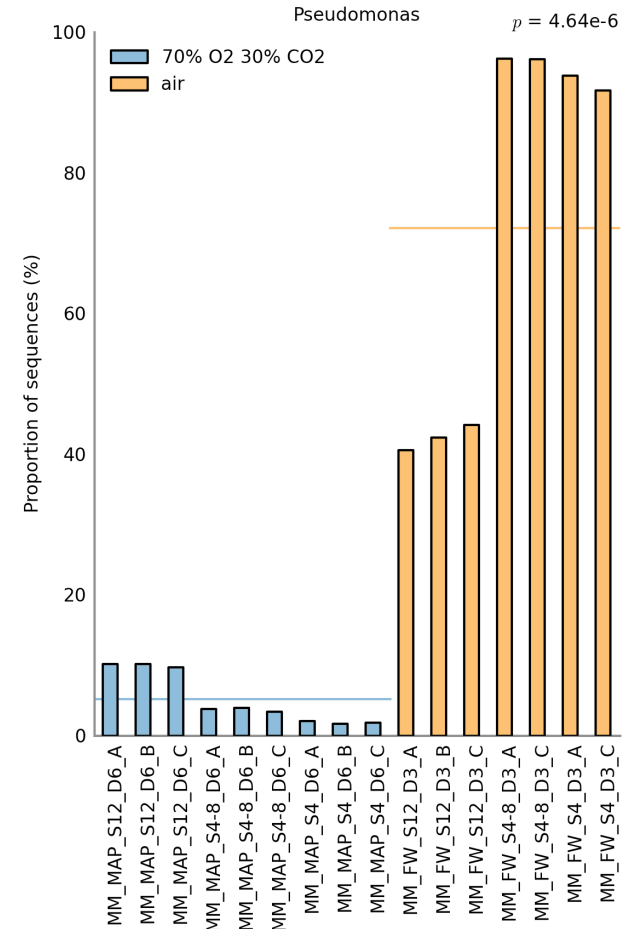
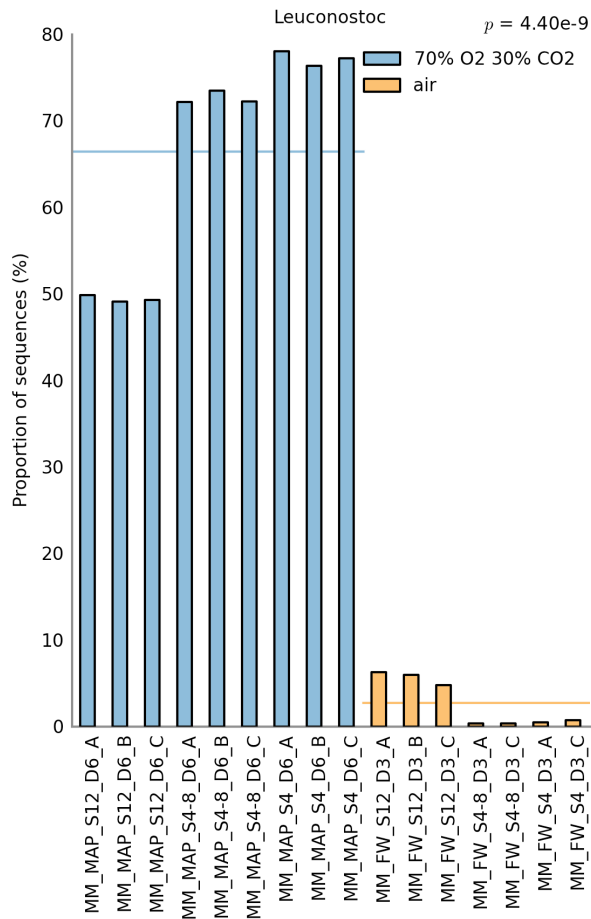
Viande hachée – MAP



Viande hachée – AIR



Analyse est reproductible





Corrélation
l'analyse
microbiologique et
métagénomique

Sensibilité
élevée

Très utile pour la
validation de la
qualité des denrées
alimentaires

Qualité de la viande de bœuf emballée sous vide

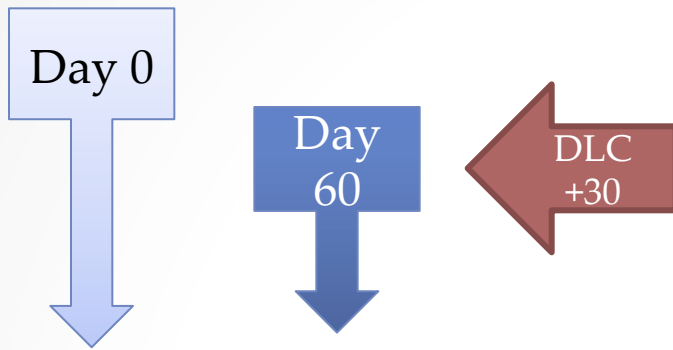


- « Prêt à trancher » reconditionné en unités de vente
- Facilité logistique pour les distributeurs

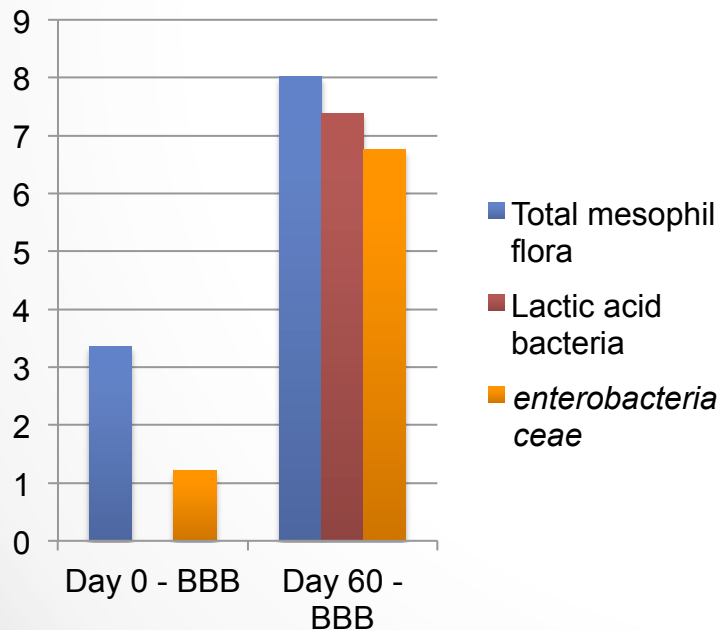
Deux catégories de viandes :

- viande produite en Belgique – Blanc bleu belge
- viande importée arrivant sous-vide par bateau : viande irlandaise ou australienne ou sud-américaine

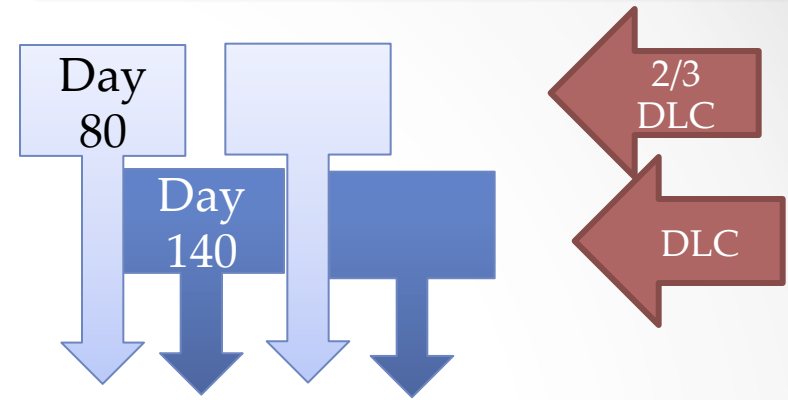
Belgian Blue beef Meat



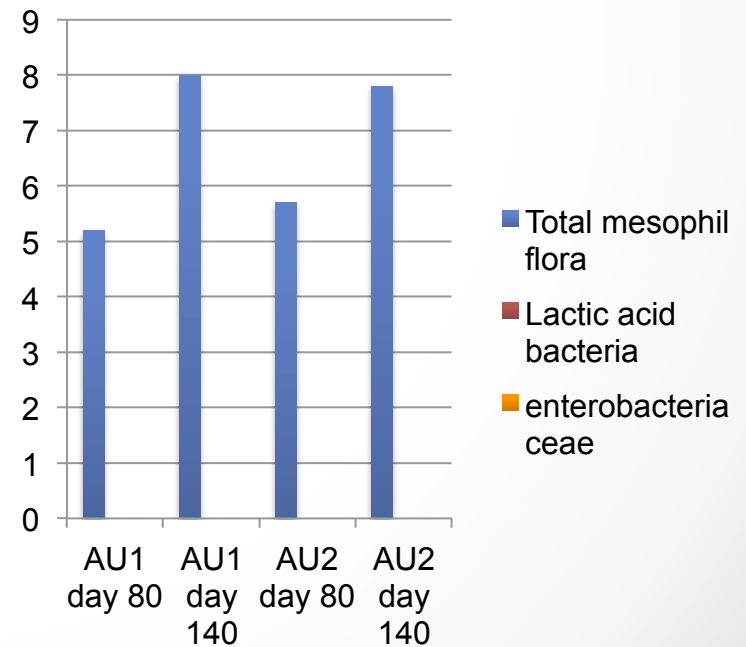
analyse microbiologique BBB (TEMPO)



Australian beef Meat

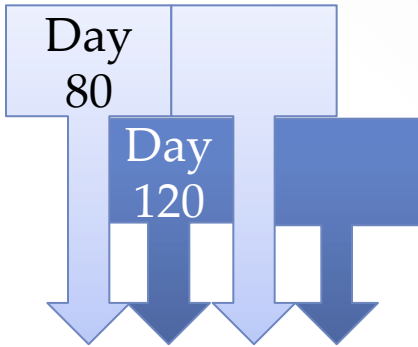
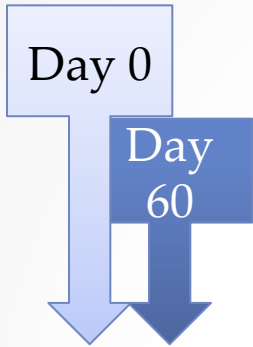


analyse microbiologique viande australienne (TEMPO)

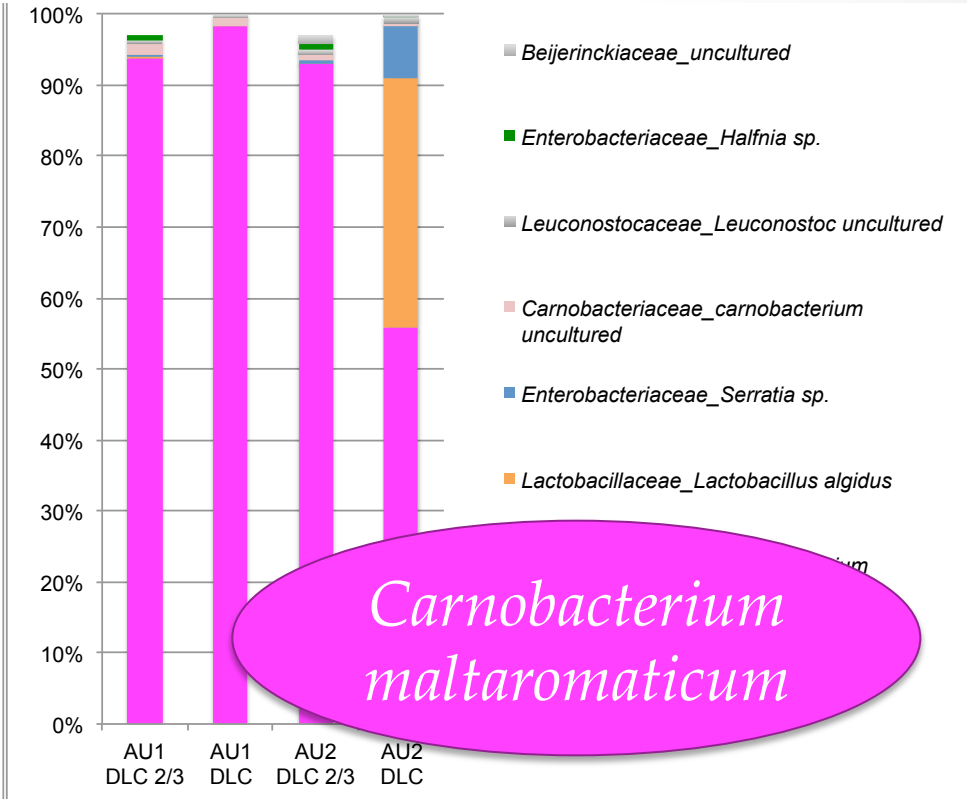
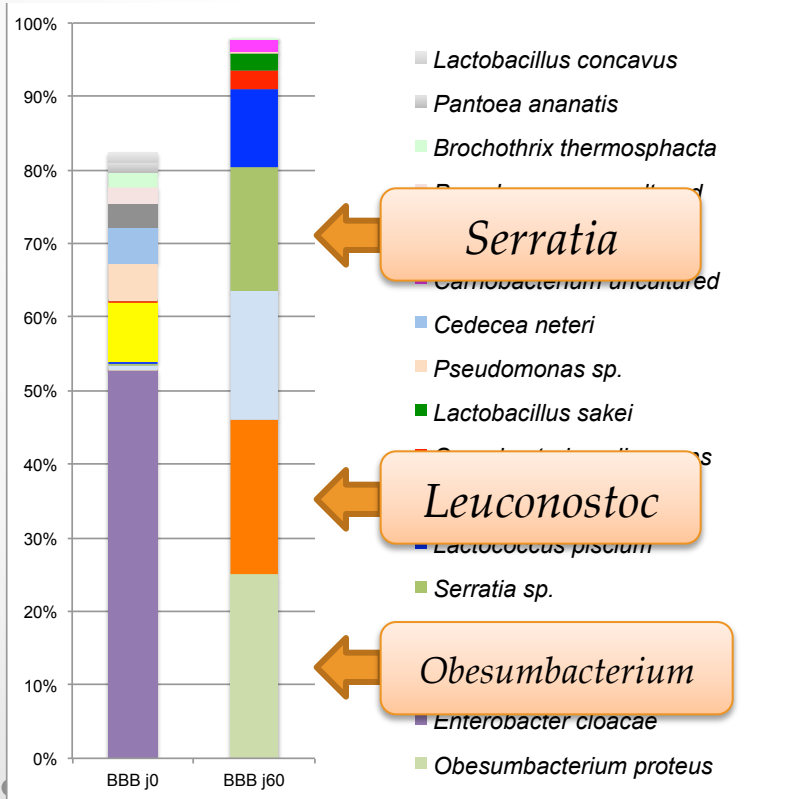


Belgian Blue beef Meat

Australian beef Meat



Populations > 1%





Utile pour des
problématiques
diverses

Contourne les
limitations des
milieux de culture

Un produit de viande crue de bœuf, souvent accompagné d'épices et autres végétaux

Dîno BUZZATTEND

BLOGBOINTS

Le désir de tartare



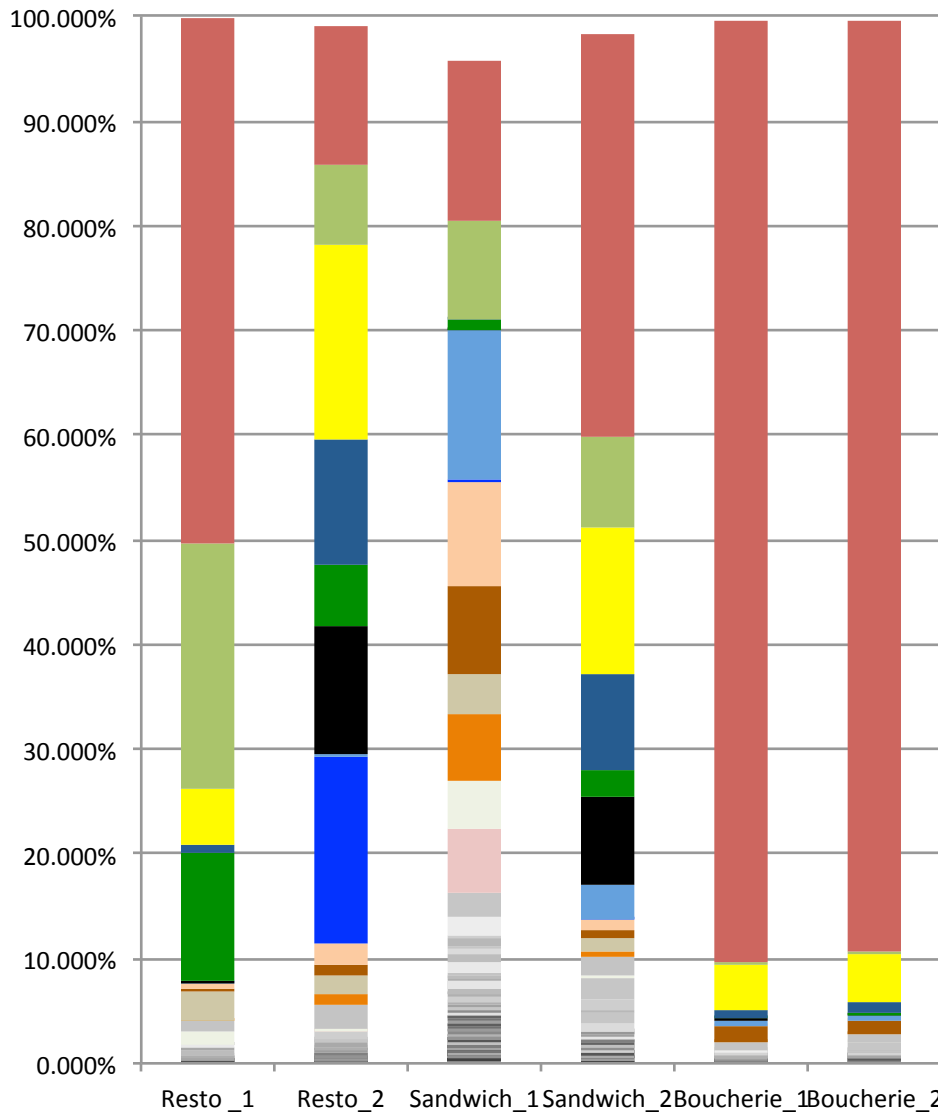


2 échantillons de boucherie
2 échantillons de restaurant
2 échantillons de sandwich

Soumis à l'analyse métagénomique
Soumis à l'analyse microbio

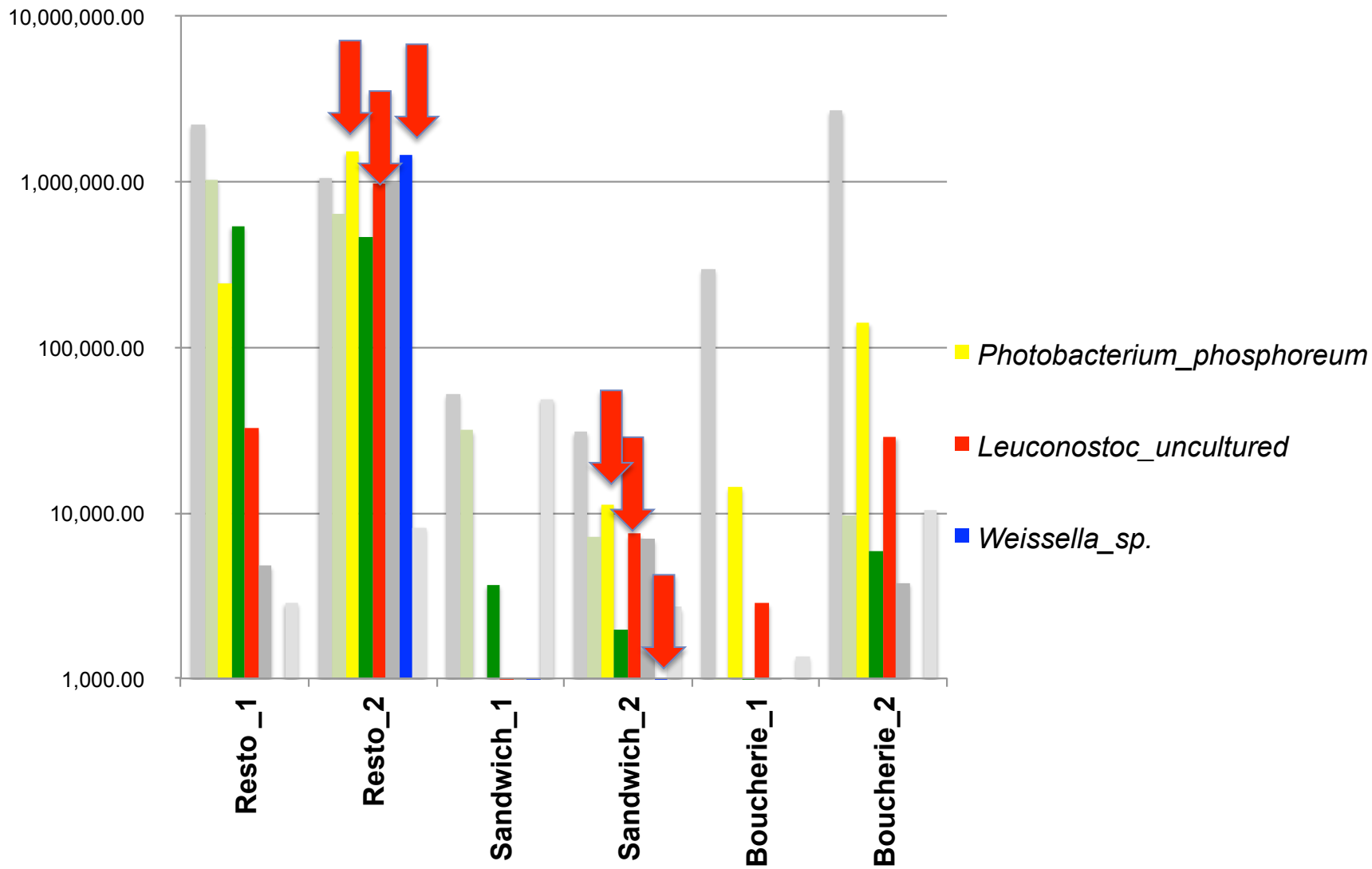


Proportions des taxons dans le steak tartare



- *Lactobacillus algidus*
- *Pseudomonas sp.*
- *Photobacterium phosphoreum*
- *Leuconostoc uncultured*
- *Brochothrix thermosphacta*
- *Lactococcus piscium*
- *Lactobacillus sakei*
- *Weissella sp.*
- *Acinetobacter sp.*
- *Xanthomonas campestris*
- *Psychrobacter sp.*
- *Acinetobacter uncultured*
- *Photobacterium uncultured*
- *Pseudomonas uncultured*
- *Lactobacillus paraplantarum*
- *Uncultured unclassified*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Carnobacterium divergens*
- *Enterobacter cloacae*
- *Carnobacterium uncultured*
- *bacterium uncultured*
- *Aeromonas uncultured*
- *Psychrobacter uncultured*

Représentativité des populations suivant le taux de contamination observé sur PCA (CFU/g)





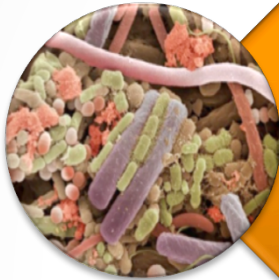
**Diversité élevée
dans une même
matrice**

**Complémentarité
dans les analyses**



Aspect technique et analytique

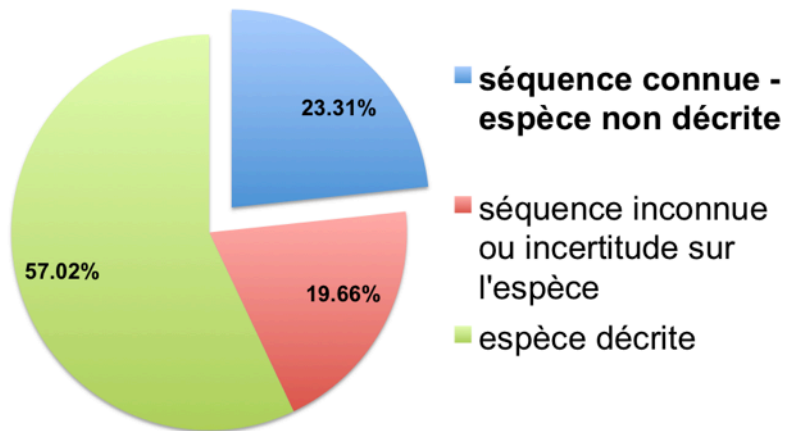
+++



Interprétation analytique et microbiologique

+/-

Répartition des taxons identifiés - steak tartare (%)



- Manque de connaissance des microorganismes
- Avenir ouvert pour la caractérisation de ces germes
- Besoin de spécialistes dans les différents taxons découverts



L'équipe Méta :

Carine Nezer

Laurent Delhalle

Ysabelle Adolphe

Pedro Imazaki

Amélie Darcis

Pr Antoine Clinquart

Pr Georges Daube