

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



**ÉTUDES
SUR LE VIN**

911
SES MALADIES
CAUSES QUI LES PROVOQUENT
PROCÉDÉS NOUVEAUX
POUR LE CONSERVER ET POUR LE VIEILLIR

PAR M. L. PASTEUR

MEMBRE DE L'INSTITUT

ÉTUDES GOUBERNÉES PAR LE COMITÉ CENTRAL AGRICOLE DE SOLOGNE

PARIS

IMPRIMÉ PAR AUTORISATION DE SON EXC. LE GARDE DES SCAUX

A L'IMPRIMERIE IMPÉRIALE

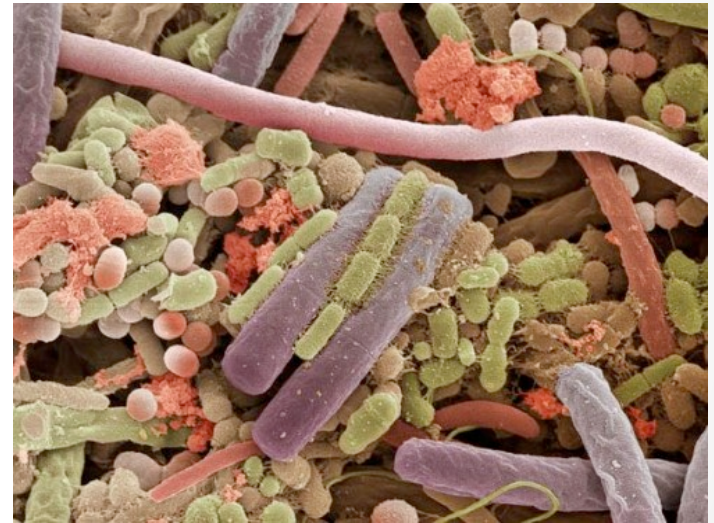
M DCCC LXVI



Quels sont les liens entre les bactéries et les mots ?

Sed vulputate tellus eget lorem. ¶

Sed a elit. Praesent pede. Nam pulvinar, felis vel pretium lobortis, magna turpis pulvinar sapien, at lacinia diam dolor ac enim. Nunc euismod mi id massa. Mauris mi metus, interdum a, egestas et, accumsan ac, tortor. Nullam in elit. Donec vel quam vel elit viverra luctus. Morbi cursus arcu at eros. Nulla tellus. Nam vitae dolor. Proin a dui. Pellentesque habitant morbi tristique senectus et netus et malesuada fames ac turpis egestas. Morbi pellentesque venenatis purus. Ut orci. Donec massa justo, suscipit non, ultricies ut, consequat at, ipsum. Vivamus posuere fringilla nibh. ¶



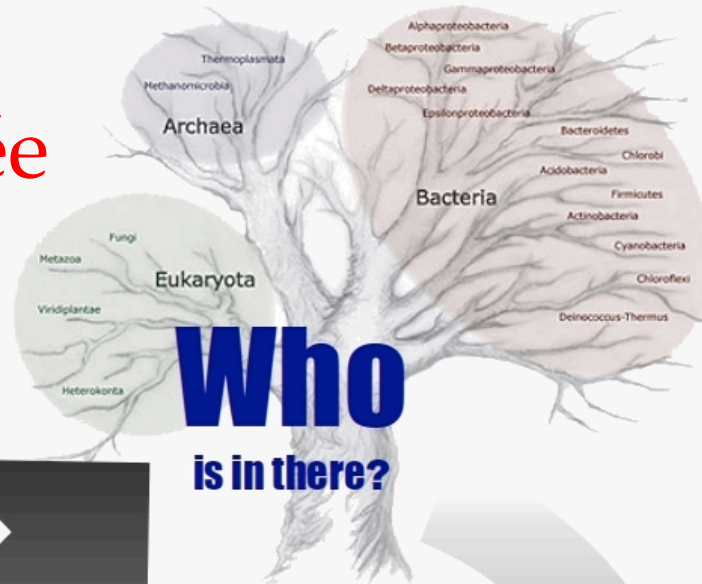
- Les mots sont organisés en phrases ce qui forme un texte cohérent.
- Les bactéries s'organisent populations formant des communautés
- Chaque mot véhicule un sens, une fonction voire plusieurs...
- Chaque bactérie peut être associée à une ou plusieurs fonctions ou à une activité donnée.
- La modification de la structure du texte a une signification
- La modification de la structure de la communauté microbienne a aussi un sens.
- ...

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.

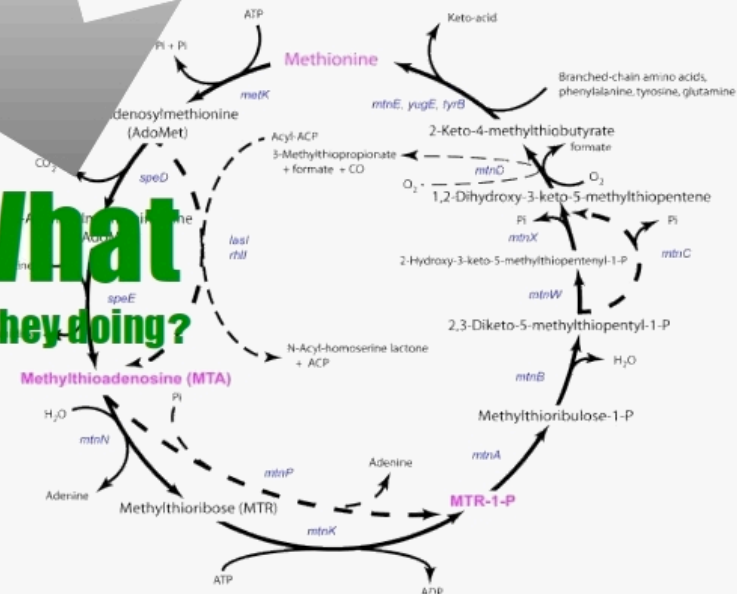
Analyse ciblée



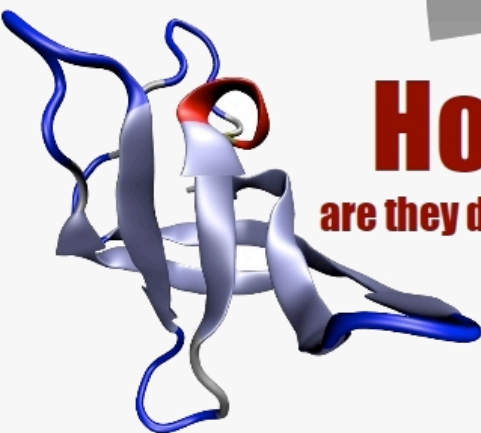
Who
is in there?

Analyse fonctionnelle

What
are they doing?

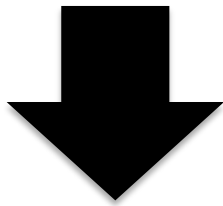


How
are they doing it?

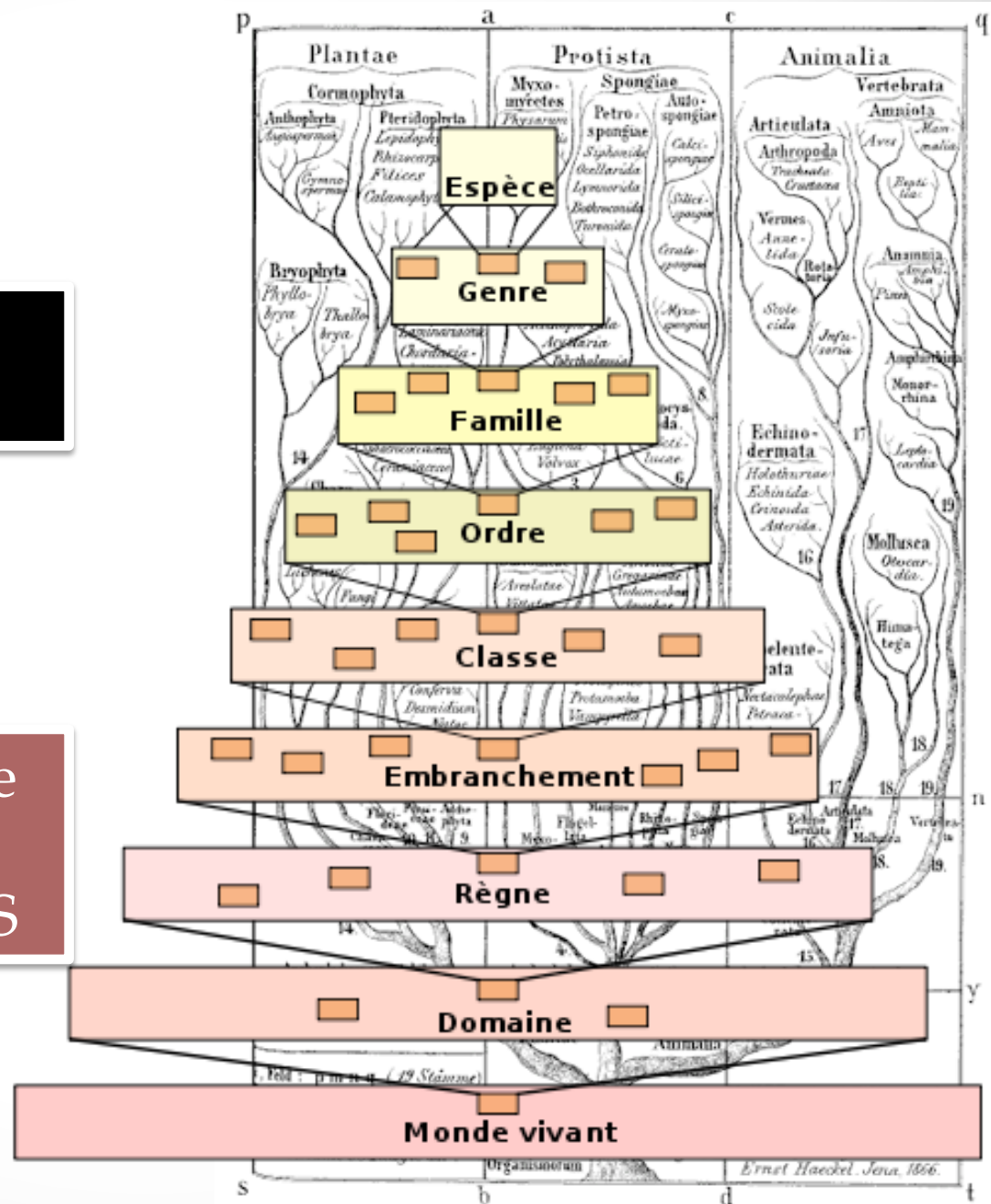


WHO is in there ???

Réalise une analyse taxonomique



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



Tri et nettoyage
des séquences

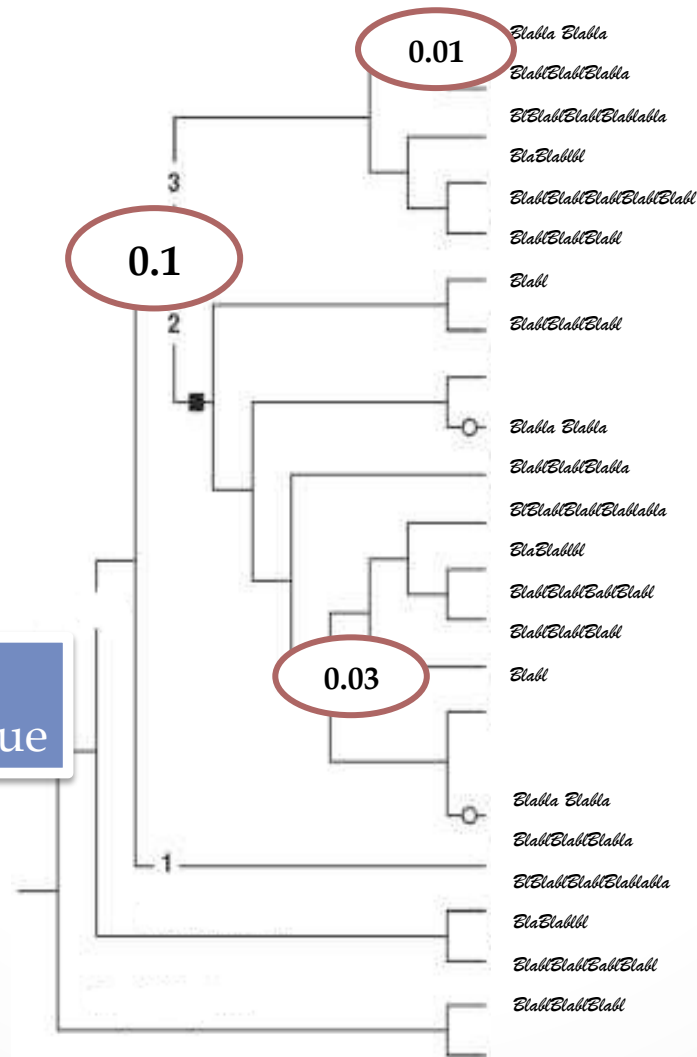
Alignement des
séquences sur des
séquences de
référence

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 ?

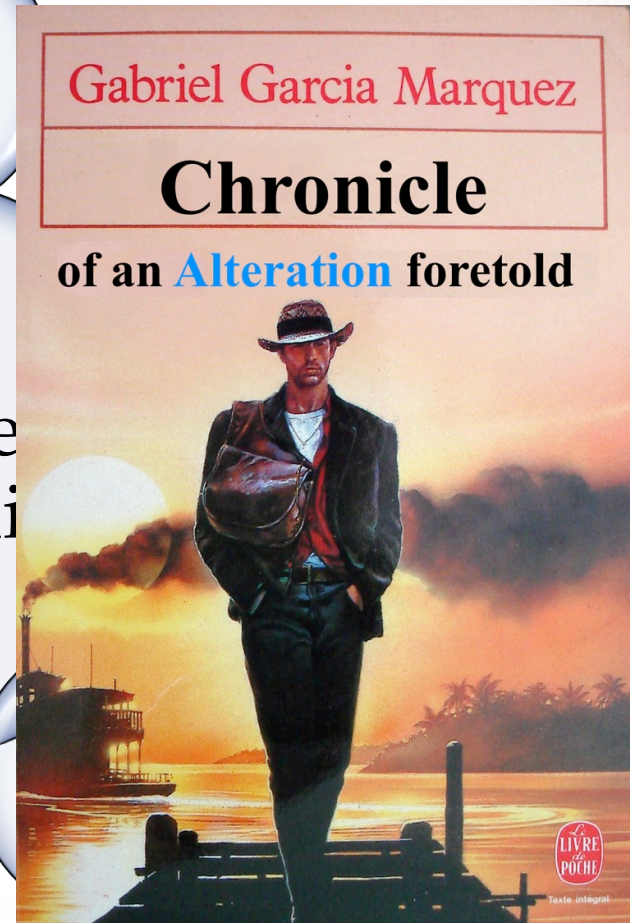
- Analyse à large spectre !!!
 - 1000 individus vs 300 colonies
- Analyse culture-indépendante
- Reproductible
- Portable et stockable
- Analyse quantitative

Métagénomique et industrie agro-alimentaire

DLC

Matrice alimentaire est un biotope de choix !!

Aspect sensoriel





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

Plan de travail



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

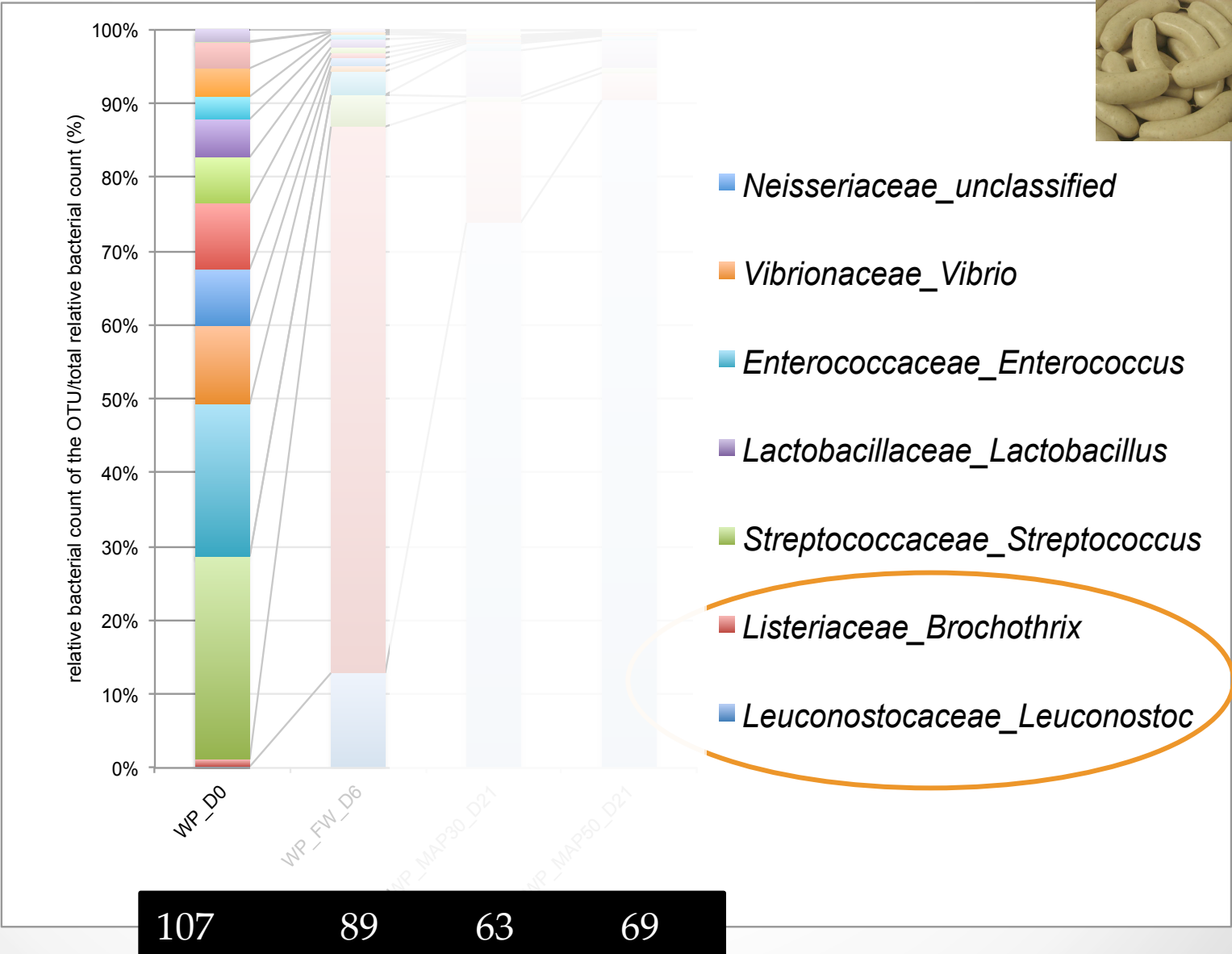
MM_MAP_S12_D6

Microbiological Analysis

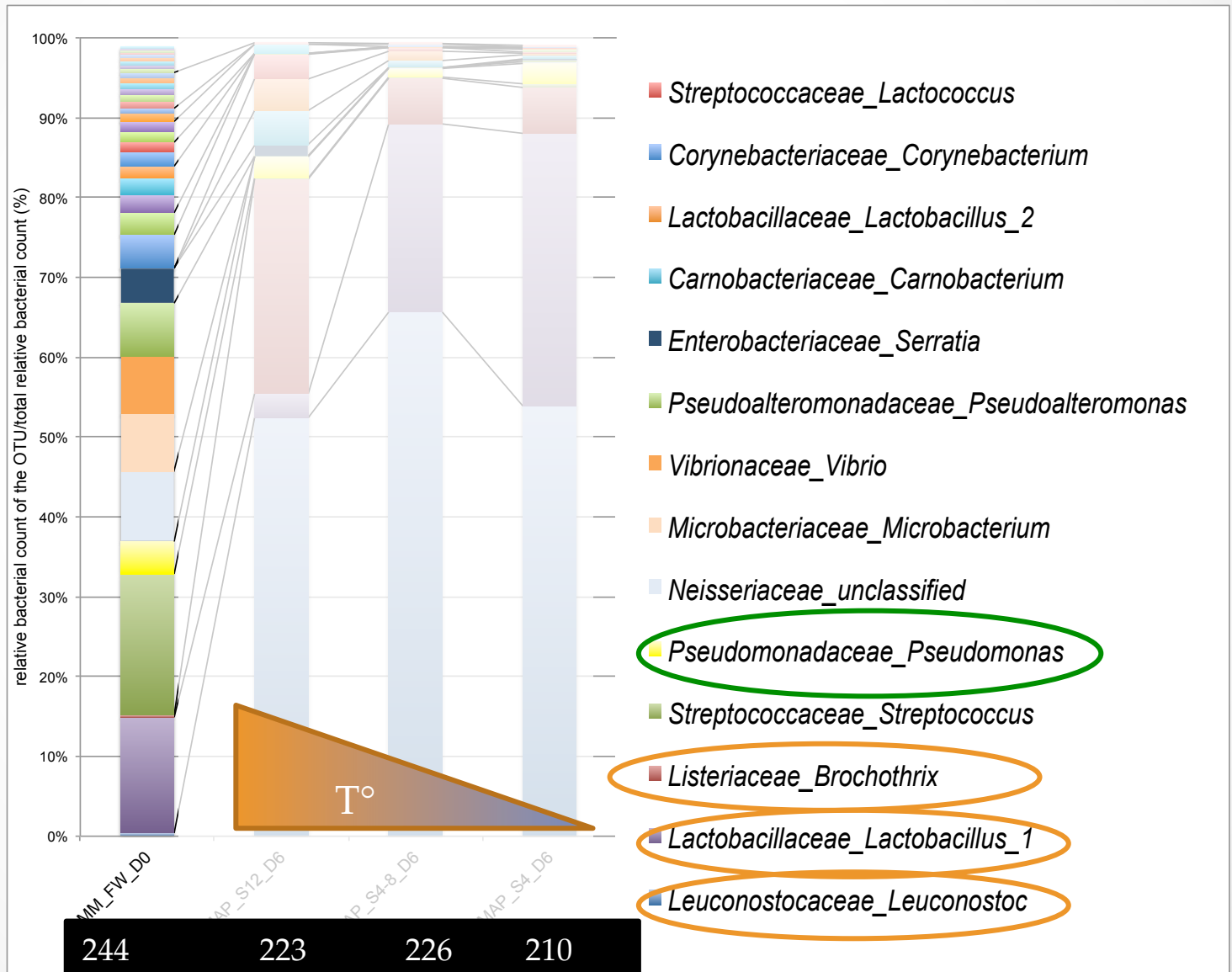
Label	TOTAL AEROBIC	LACTIC ACID BACTERIA	ENTEROBACTERIACEA <i>E</i>	PSEUDOMONADACEAE
WP_D0	3,13	<3	<3	<3
WP_FW_D6	6,83	<3	<3	<3
WP_MAP30_D21	8,54	7,07	<3	<3
WP_MAP50_D21	8,64	6,61	<3	<3
MM_D0	3,92	<3	<3	<3
MM_FW_S4_D3	6,48	<3	<3	4,70
MM_FW_S4-8_D3	7,94	<3	<3	5,37
MM_FW_S12_D3	8	5,30	4,63	5,33
MM_MAP_S4_D6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

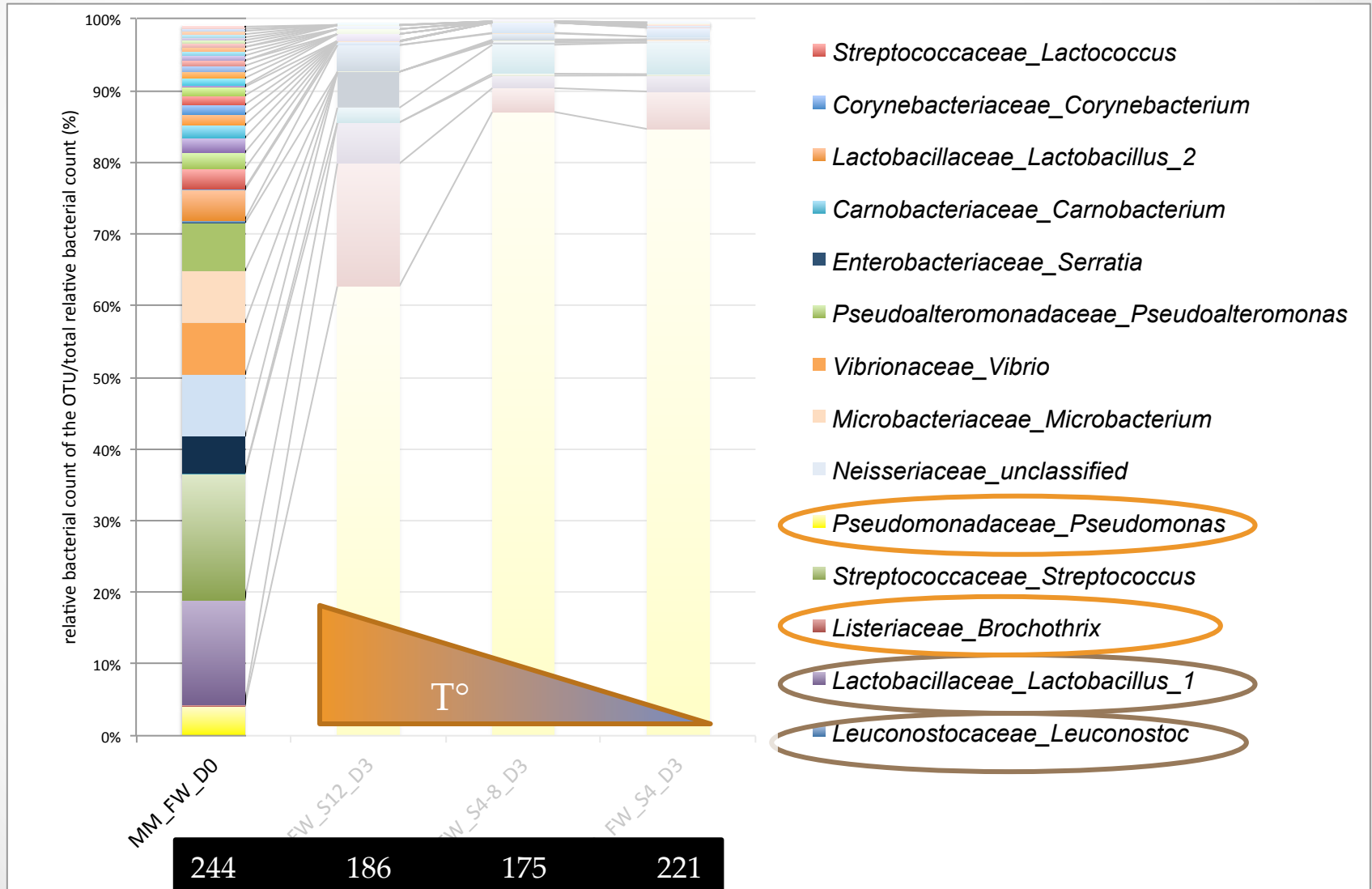
Populations bactériennes – boudin blanc



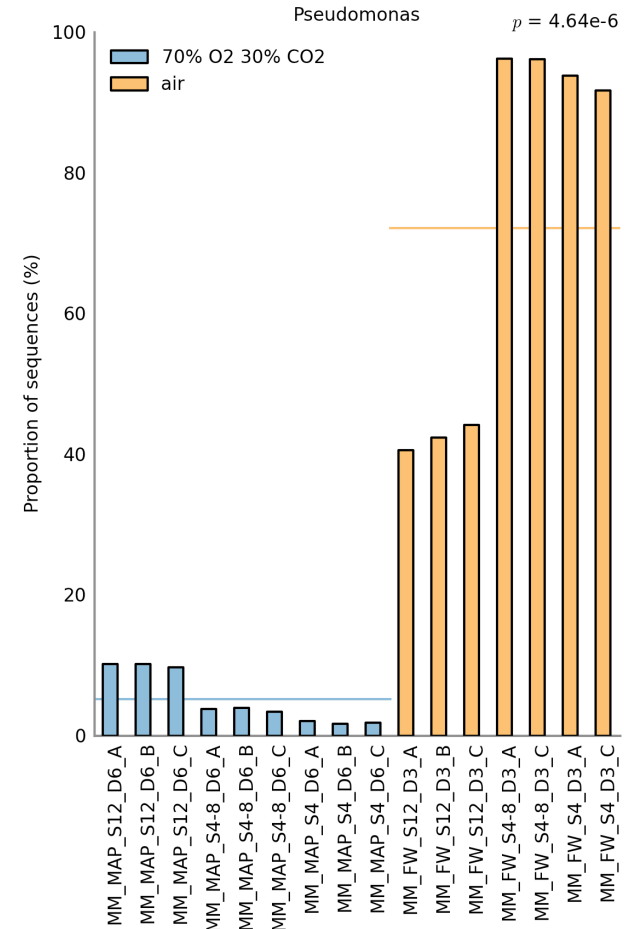
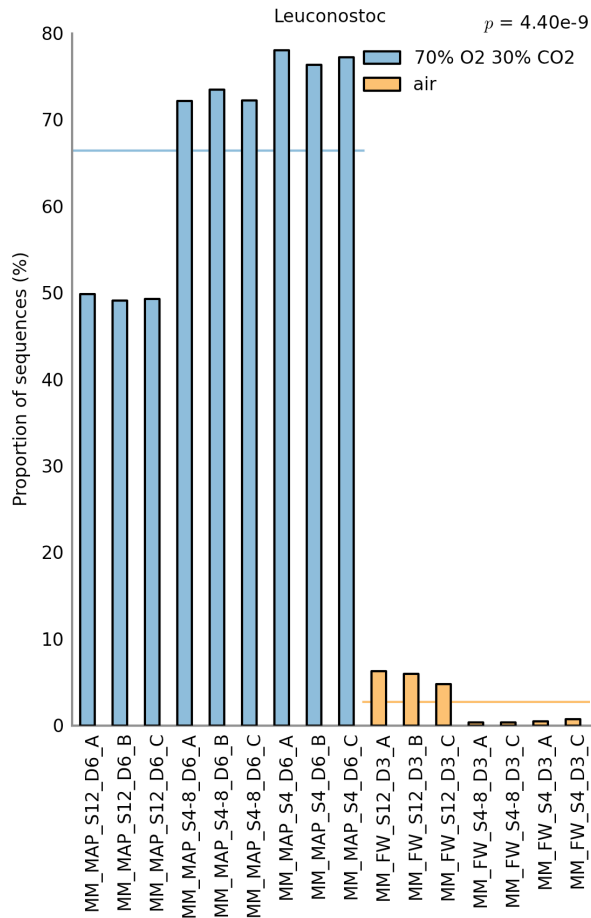
Viande hachée – MAP



Viande hachée – AIR



Analyse est reproductible



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

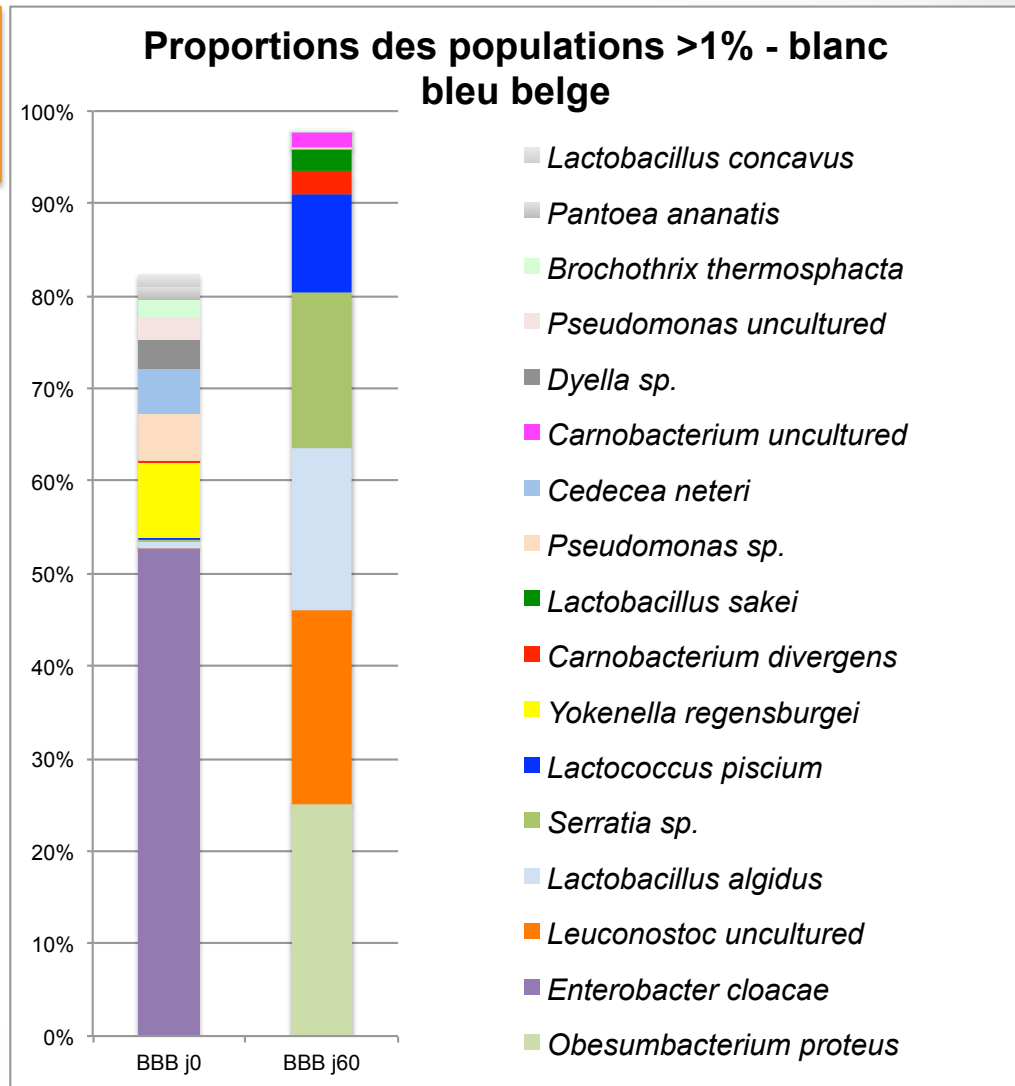
Contre-filet de Blanc Bleu Belge

- Conservé sous vide
- À 4°C

• Echantillon j0

PAT issu de l'abattoir

• Echantillon j60

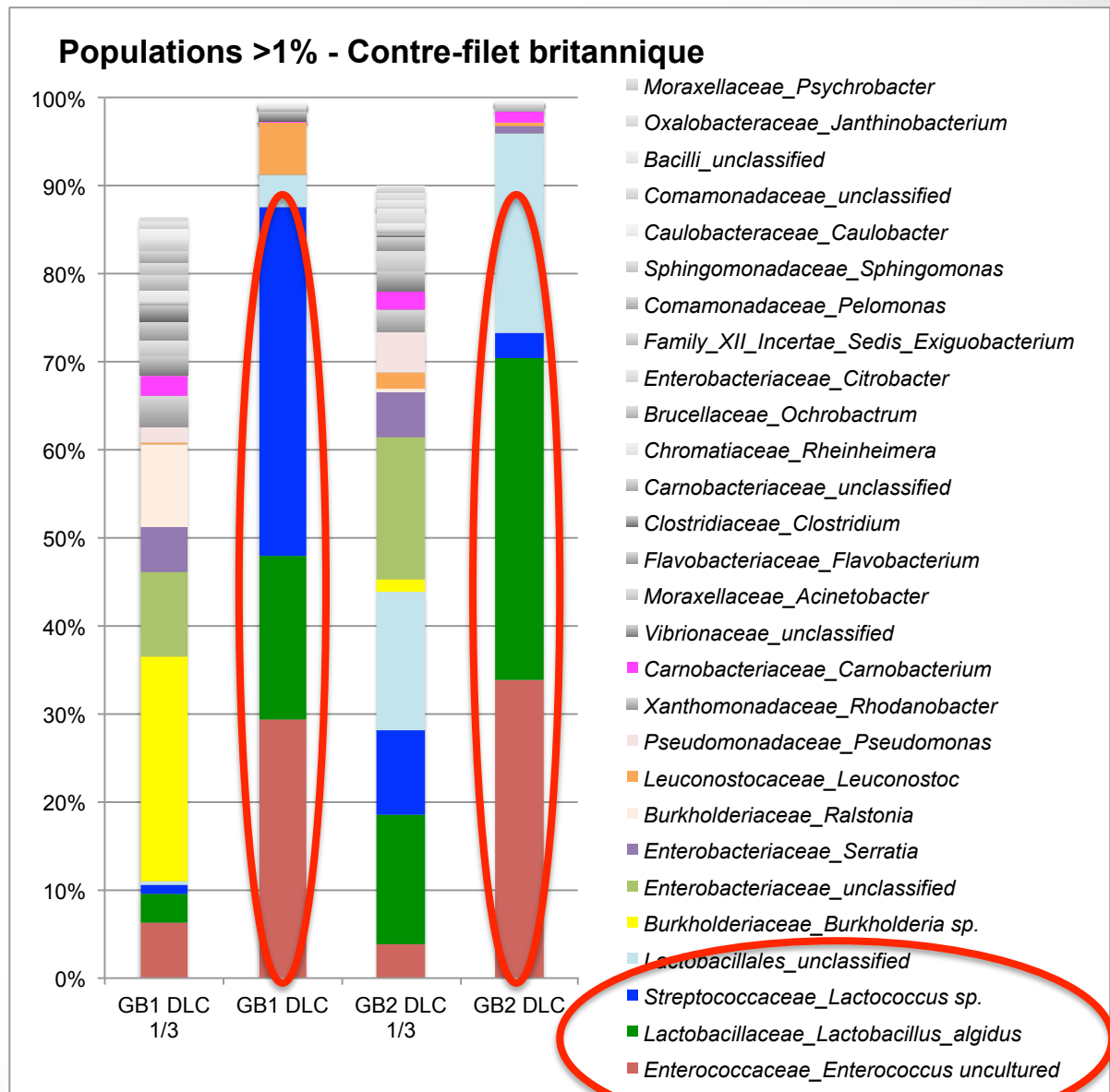


Du contre-filet d'importation

Viande britannique

- Echantillon blanc = DLC 1/3 !

- Echantillon DLC

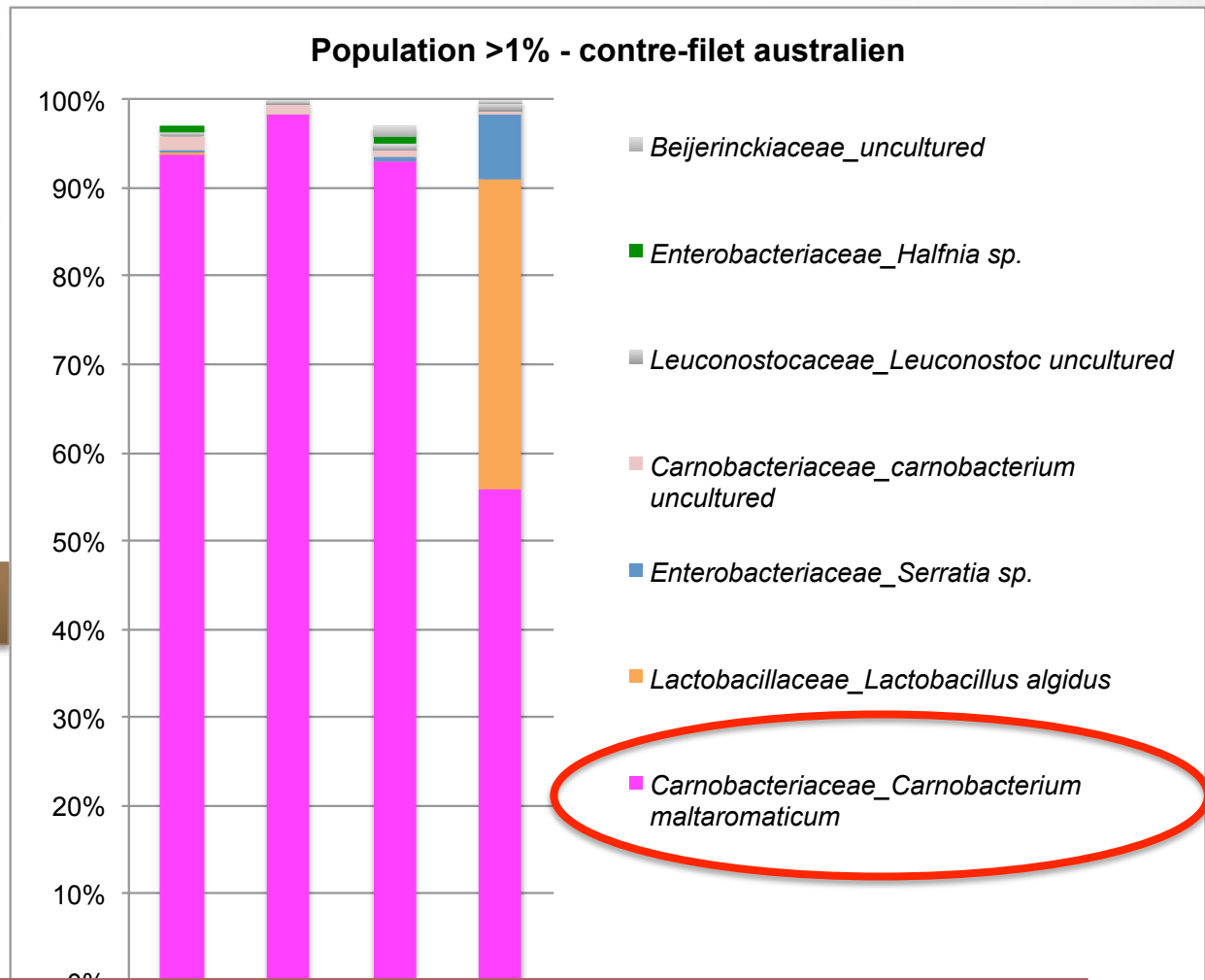


Du contre-filet d'importation

Viande
australienne

- Echantillon blanc = DLC 2/3 !!

- Echantillon DLC



Est-ce un ajout d'une flore spécifique ?
Pose la question du status de viande fraîche

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

Dîno BUZZATTEND

BLOGBOINTS

Le désir de tartare



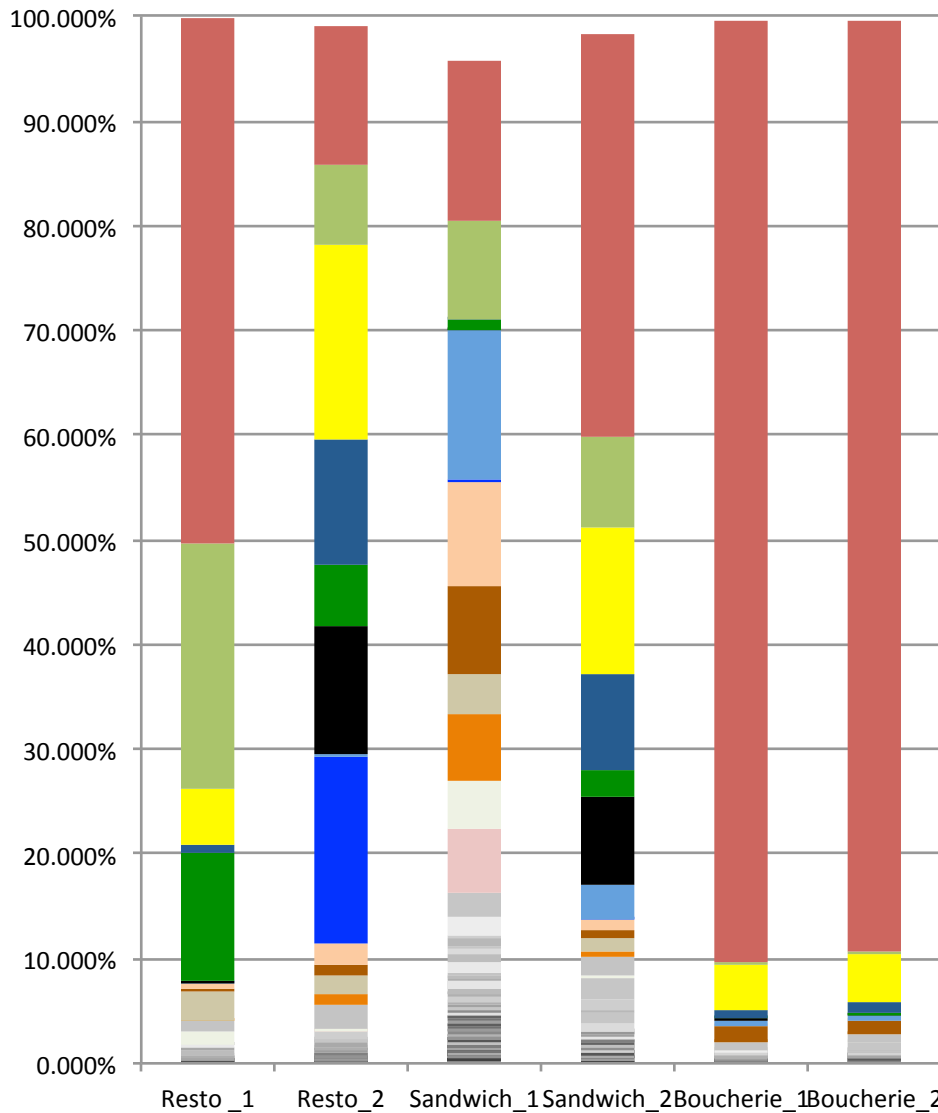


2 échantillons de boucherie
2 échantillons de restaurant
2 échantillons de sandwich

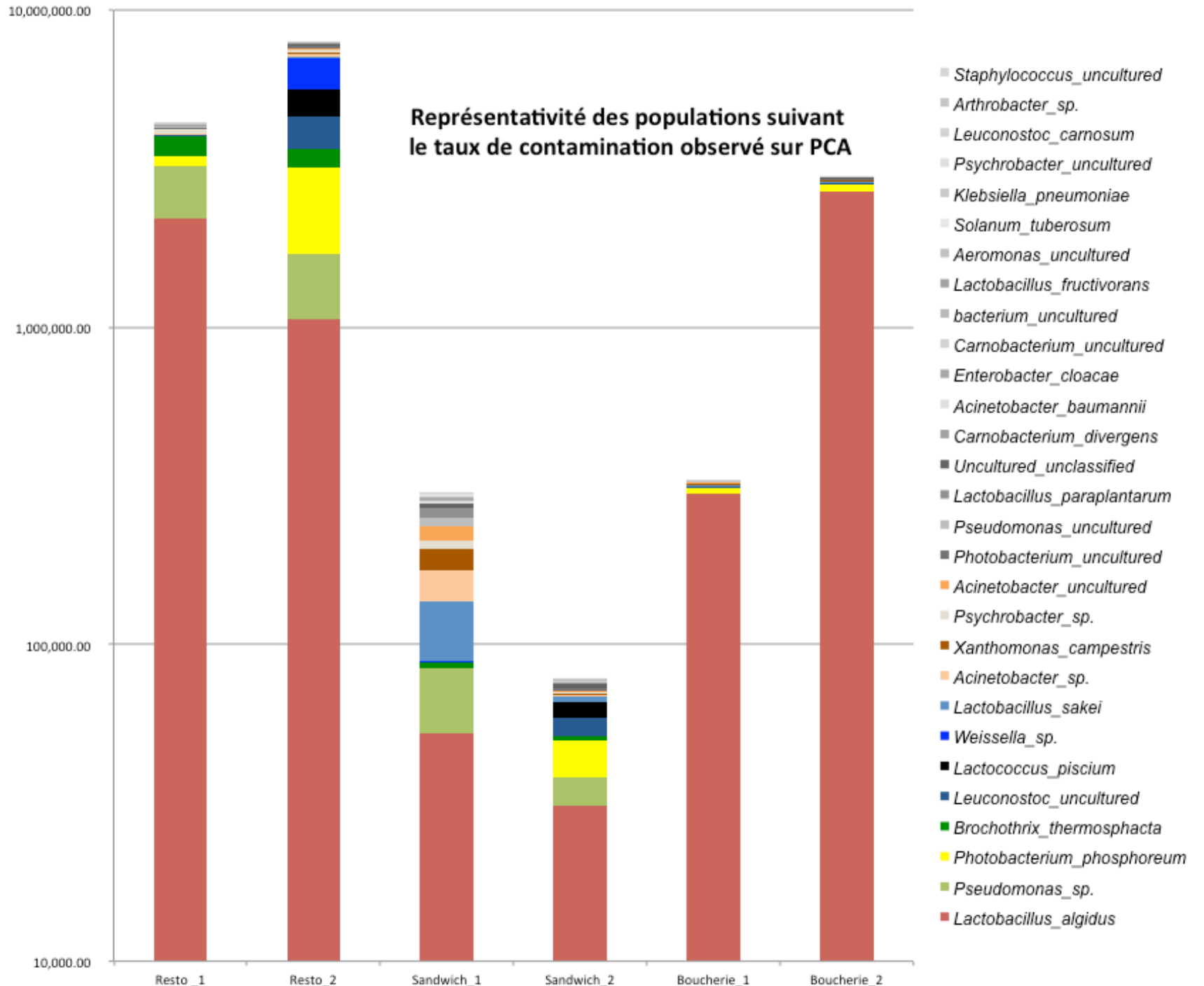
Soumis à l'analyse métagénomique
Soumis à l'analyse microbio



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*



On a testé d'autres matrices...

Il est pas frais
mon
poisson ??!



Se poser les bonnes questions...

- Est-ce reproductible ?

Oui c'est reproductible, avec des échantillons standardisés

- Combien faut-il de séquences par échantillon ?

Ca dépend, entre autres, de la charge bactérienne du produit

- Est-ce valorisable ?

Oui car les séquences obtenues sont des données durables

Dans des domaines variés : biopréservation, biologie prédictive, contrôle des procédés,...

Les chantiers actuels

- Analyse simultanée pour les bactéries et les levures/moisissures

Et surtout....

RETOURNER AU LABO !!!

- Améliorer l'obtention de données quantifiables pour les populations



L'équipe Méta :

Carine Nezer

Laurent Delhalle

Ysabelle Adolphe

Pedro Imazaki

Amélie Darcis

Pr Antoine Clinquart

Pr Georges Daube