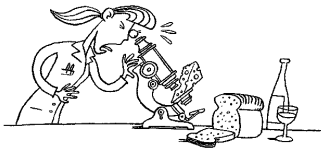


# Caractérisation des populations microbiennes dans les aliments : du phénotype aux génomes

Prof. Georges Daube  
Dr Bernard Taminiau

Université de Liège  
Faculté de Médecine vétérinaire, FARAH  
Département des Sciences des Denrées alimentaires  
Microbiologie  
[Georges.Daube@ulg.ac.be](mailto:Georges.Daube@ulg.ac.be)

Déclaration de conflit d'intérêt: Georges Daube est fondateur, actionnaire et conseiller scientifique de la société Quality Partner s.a., société spin-off spécialisée en contrôle-qualité à destination de l'agro-alimentaire et réalise de nombreuses recherches avec des sociétés agro-alimentaires



## Objectifs de l'exposé

- Pourquoi caractériser la microflore des aliments?
- Comment la caractériser aujourd'hui et demain?
- **Caractériser les populations microbiennes**
- **Caractériser les souches isolées**
- **Détecter et typer certaines sous-populations**
- **Etudier la fonctionnalité liée à la microflore**
- Conclusions

## Pourquoi caractériser la microflore des aliments ?

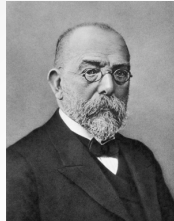
- Une meilleure gestion de la microflore des aliments va permettre de **réduire le gaspillage** des aliments périssables et les **risques de maladies** infectieuses.
- Nos aliments vont de plus en plus servir de **vecteurs pour les microbes** favorables à la santé.
- Ces propriétés dépendent d'**interactions complexes** entre les micro-organismes présents c'est pourquoi l'ensemble de l'écosystème doit être connu et maîtrisé.

## Méthodes de détection, de dénombrement et d'identification des micro-organismes





Louis Pasteur, 1822-1895

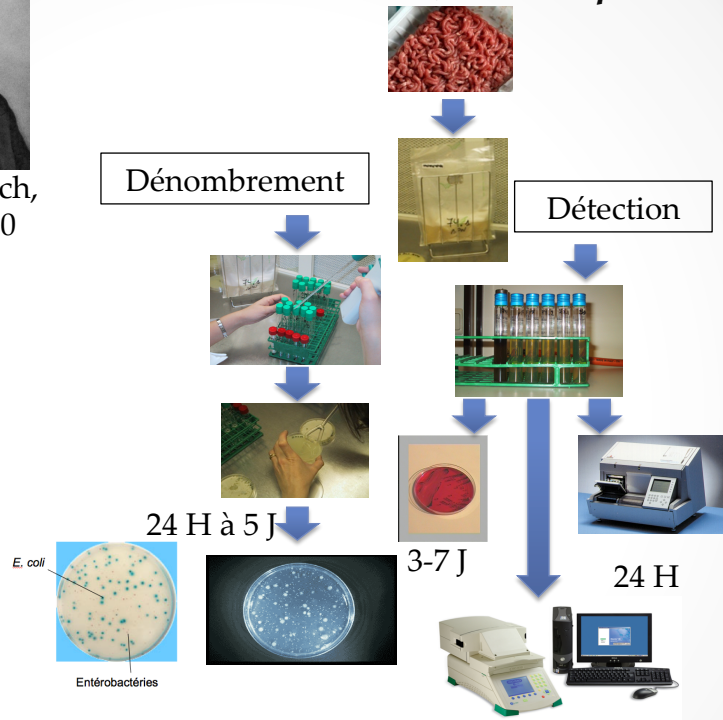


Robert Koch, 1843-1910



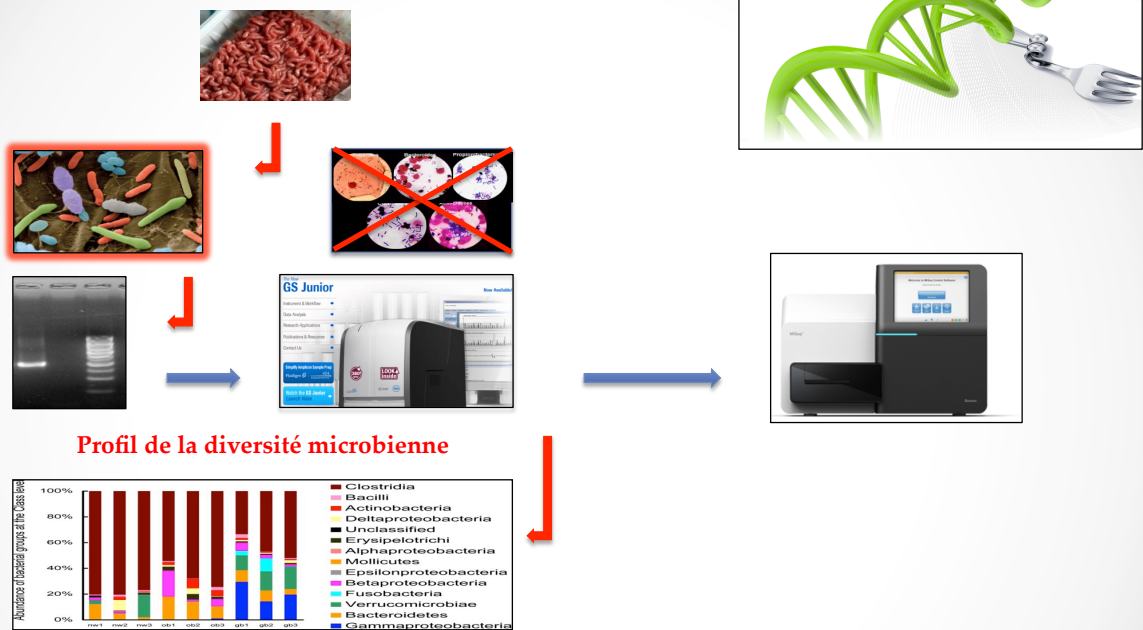
Julius Pétri, 1852-1921

## Les détecter, les compter



Les méthodes par culture sont lentes et ne permettent la détection, le dénombrement que d'une population microbienne à la fois

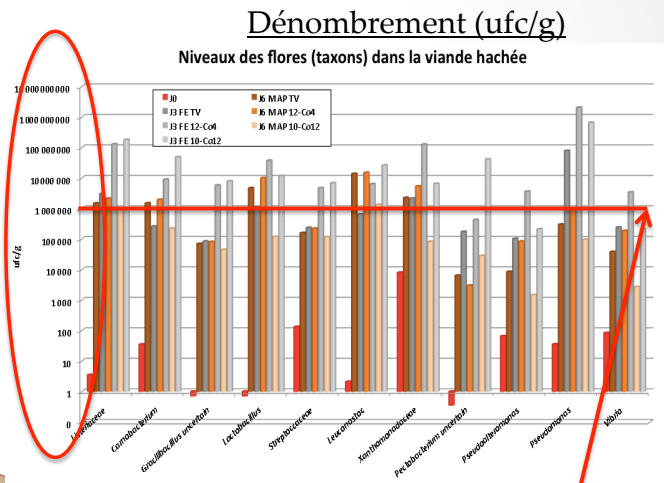
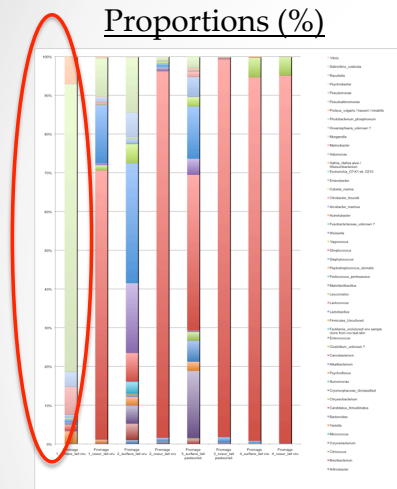
## Métagénomique (ciblée)



1 analyse → Plus de 5.000 identifications/éch 20 échantillons à la fois → Plus de 50.000 identifications/éch 200 échantillons à la fois

Le séquençage haut débit permet, sans culture, de connaître la composition des écosystèmes microbiens en quelques jours

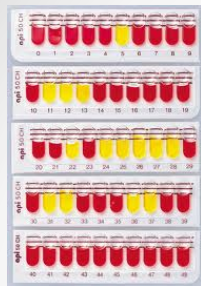
# Métagénomique



Détermination des proportions et de la concentration de chaque type de bactérie dans l'aliment

**Seuil pour altération potentielle**

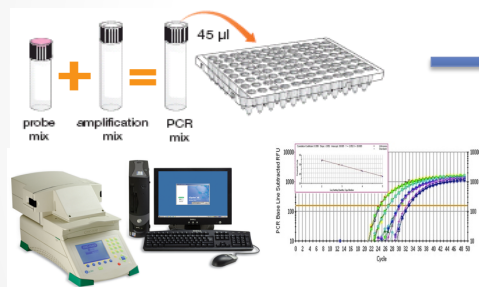
# Génomique microbienne



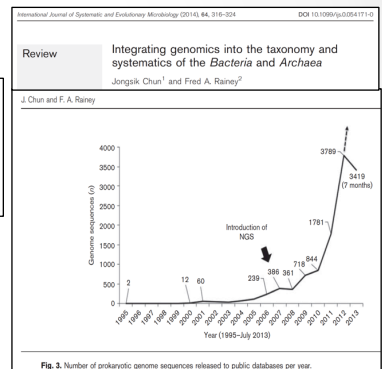
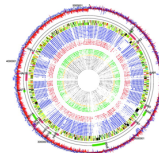
Tests biochimiques



Tests sérologiques



Tests génétiques



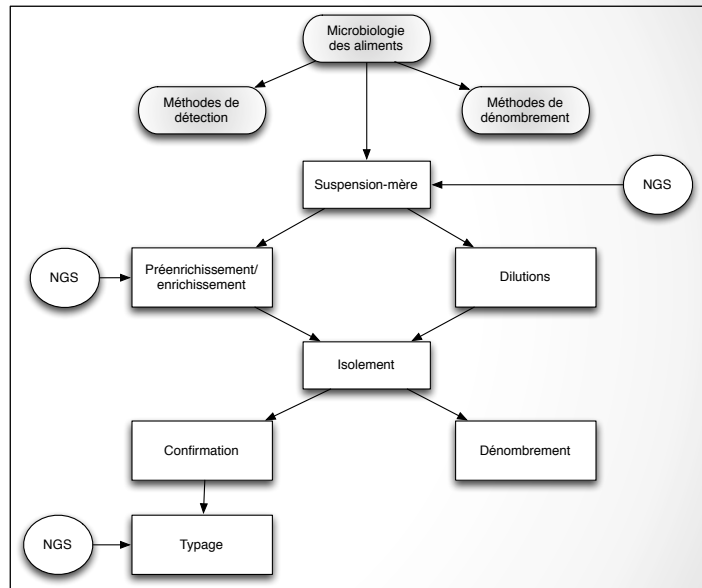
1 analyse → Maximum 50 propriétés par souche isolée → Tous les gènes de cent souches à la fois

Le séquençage haut débit permet de connaître **la séquence, voire l'expression, de tous les gènes** à la fois de nombreuses souches



# Applications du séquençage haut débit en microbiologie des aliments

- Vue globale sur les populations microbiennes dominantes
- Typage microbien
- Détection et typage direct de sous-populations microbienne
- Etude des fonctions (exprimées)



## Populations microbiennes de "steaks tartares"



**Préemballé supermarché (SM1)**



$J_0$   
 $J_2 (J_1 4^\circ\text{C} + J_2 8^\circ\text{C})$

**Boucherie supermarché (SM2)**  
**Boucherie indépendante (butchery)**



**Restaurant**

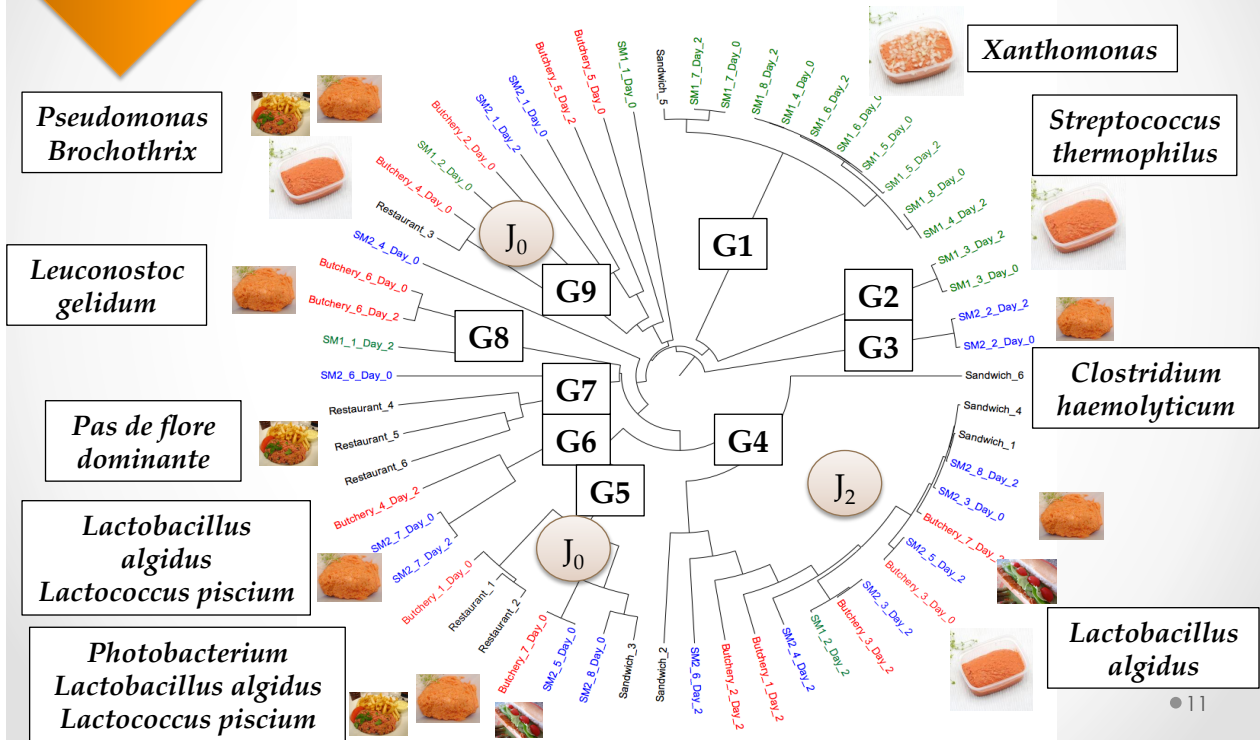


**Sandwicherie (sandwich)**

$J_{achat}$

**Etude par métagénomique ciblée (16S rDNA V1-V3) de 58 échantillons de steaks tartares achetés sur le marché belge.**

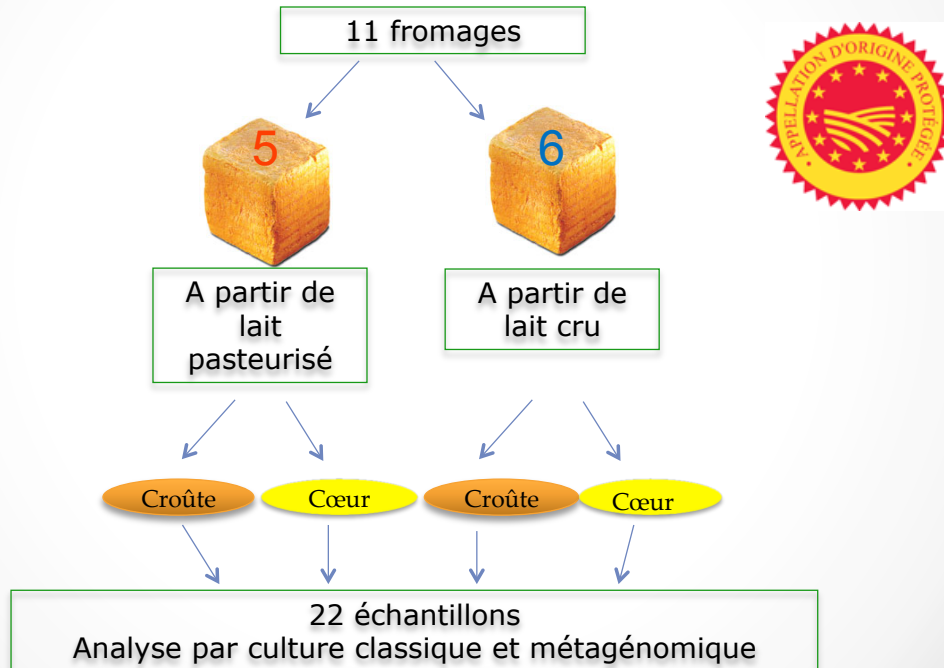
## Populations microbiennes de "steaks tartares" (Bray-Curtis index)



## Populations microbiennes de "steaks tartares"

- La caractérisation de la microflore de ces préparations de viande par métagénomique ciblée a permis différencier les échantillons en fonction de:
  - la **qualité** (contamination initiale, conditions de conservation, fraîcheur) **des viandes** utilisées pour leur préparation,
  - des **ingrédients utilisés** (végétaux, fromage, épices),
  - des **conservateurs utilisés** dans la sauce et du type de conditionnement qui permettent de stabiliser:
    - toute la microflore présente,
    - une bonne partie de la microflore sauf *Lactocillus algidus*,
    - Insuffisamment la microflore altérante (*Leuconostoc*, *Brochothrix*).
- Certains produits industriels préemballés se distinguent des produits préparés à la demande et sont souvent plus stables.
- L'amplification de l'ADN des organites végétales doit être inhibée .

## Populations microbiennes d'un fromage AOP



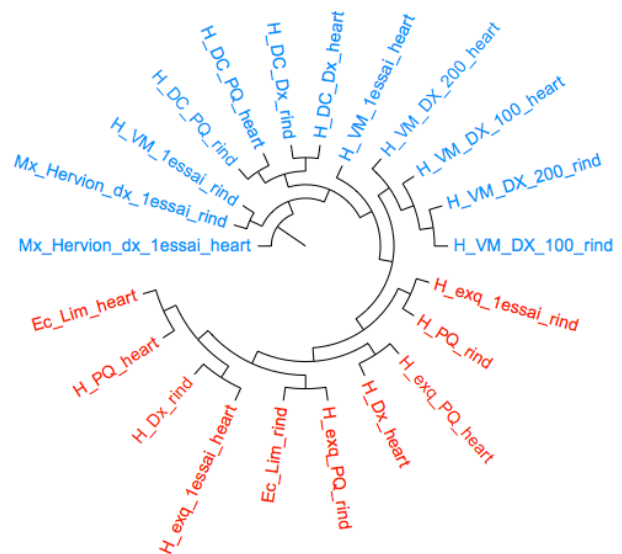
## Populations microbiennes d'un fromage AOP

(Indice de richesse de Jacquard – distance 0.03)

Lait cru

Lait pasteurisé

Clairement, la richesse en populations des échantillons et la richesse partagée entre les échantillons ne sont pas les mêmes entre les échantillons au « lait cru » et ceux au lait pasteurisé



## Populations microbiennes d'un fromage AOP

(Index de dissimilarité de Bray – curtis – distance 0.03)

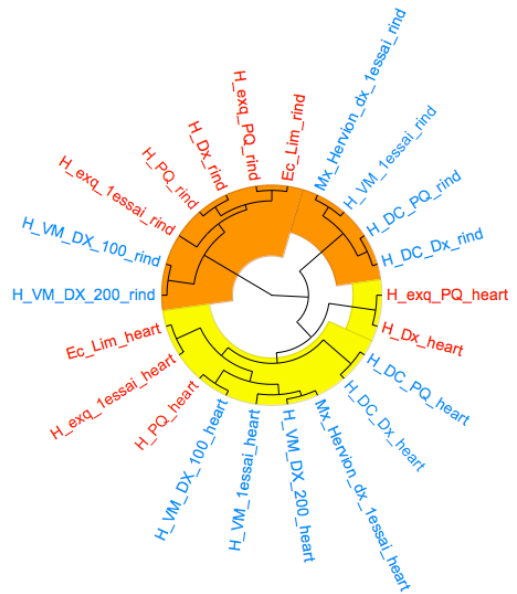
Lait cru

Croûte

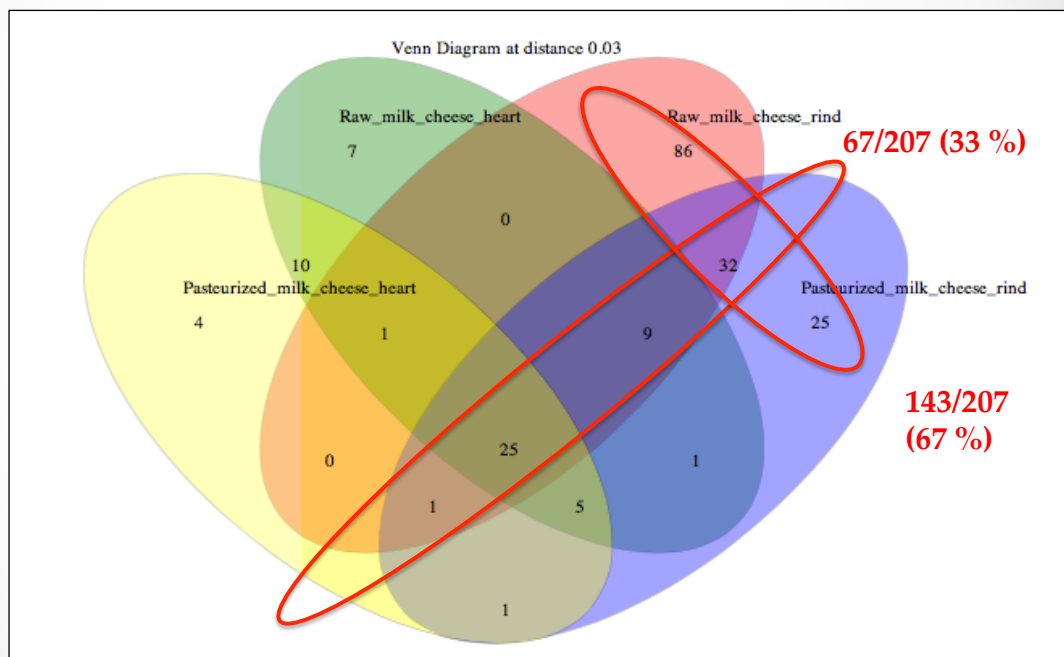
Lait pasteurisé

Cœur

- Même si la richesse est différente suivant le critère « lait cru/pasteurisé », la composition en population n'est pas fondamentalement différente entre les catégories
- Par contre, le critère « croute-cœur » se distingue facilement et donc montre que la composition microbienne est clairement différente dans ces 2 cas.

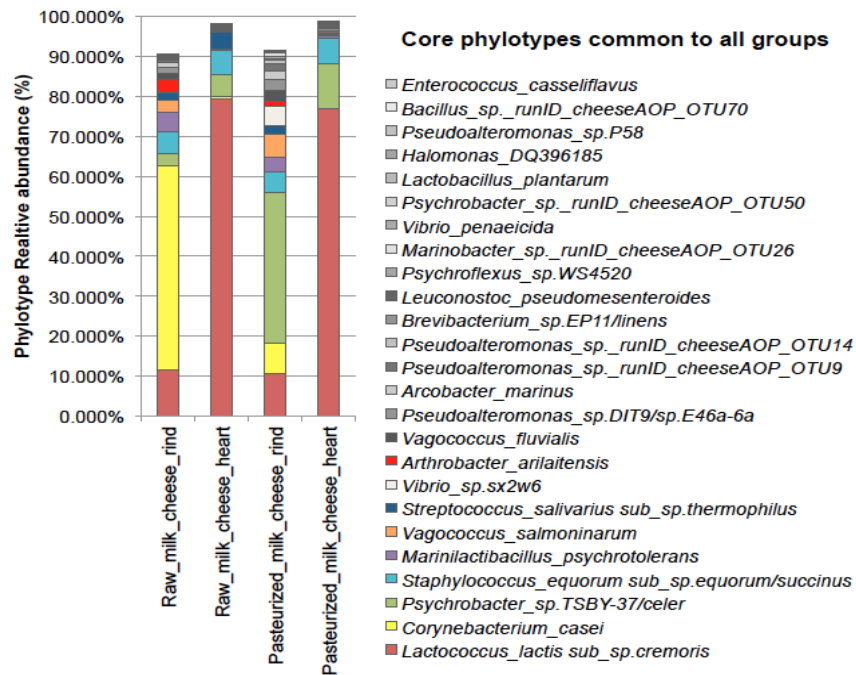


## Populations microbiennes d'un fromage AOP



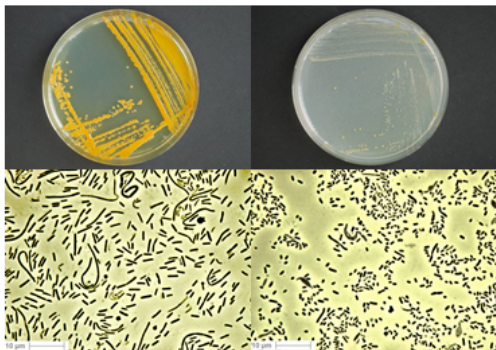


## Populations microbiennes d'un fromage AOP



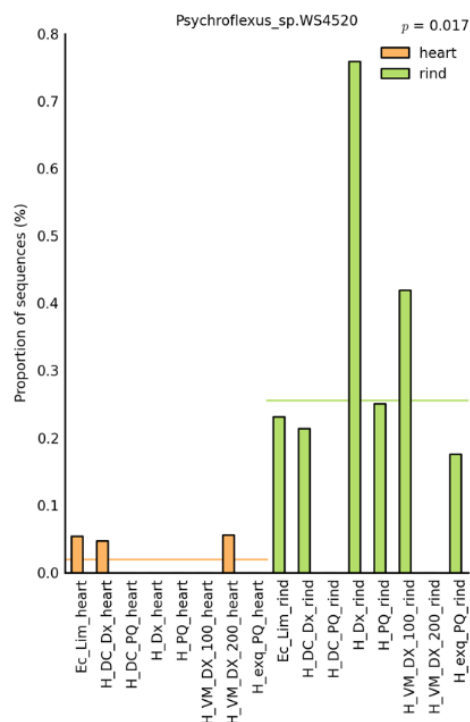
## Populations microbiennes d'un fromage AOP

Présence de *Psychroflexus halocasei*



"Supplementary Fig. S1. Colonies and photomicrographs of cells of *Psychroflexus halocasei* sp. nov. WCC 4520<sup>T</sup> grown for 7 days at 28 °C on TSGA7 (left) and on MA (right)."

Seiler H., Bleicher A., Busse H.-J., Hüfner J., Scherer S., *Psychroflexus halocasei* sp. nov., isolated from a microbial consortium on a cheese, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012.



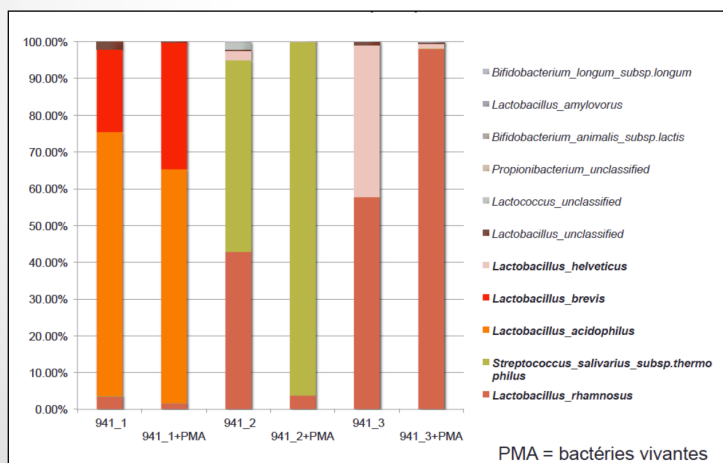
## Populations microbiennes d'un fromage AOP

- La caractérisation de la microflore par métagénomique ciblée a permis de:
  - Identifier les **207 taxons bactériens** et les **16 taxons « fungi »** présents dans ce fromage AOP
  - Établir le **microbiote commun** à tous les producteurs et caractéristique de ce fromage AOP qui pourrait être intégré dans le cahier des charges
  - Détecter des **flores « naturelles » responsables de sa typicité**
  - Montrer les **spécificités des différents producteurs et du lait cru** par rapport au lait pasteurisé
  - Détecter de **nouveaux taxons d'intérêt** technologique et bioprotecteur
- L'inhibition de l'amplification de certaines flores très dominantes (*Lactococcus lactis*) est parfois nécessaire pour caractériser les taxons sous-dominants dans des échantillons fort contaminés ( $>10^5$  ufc/g).

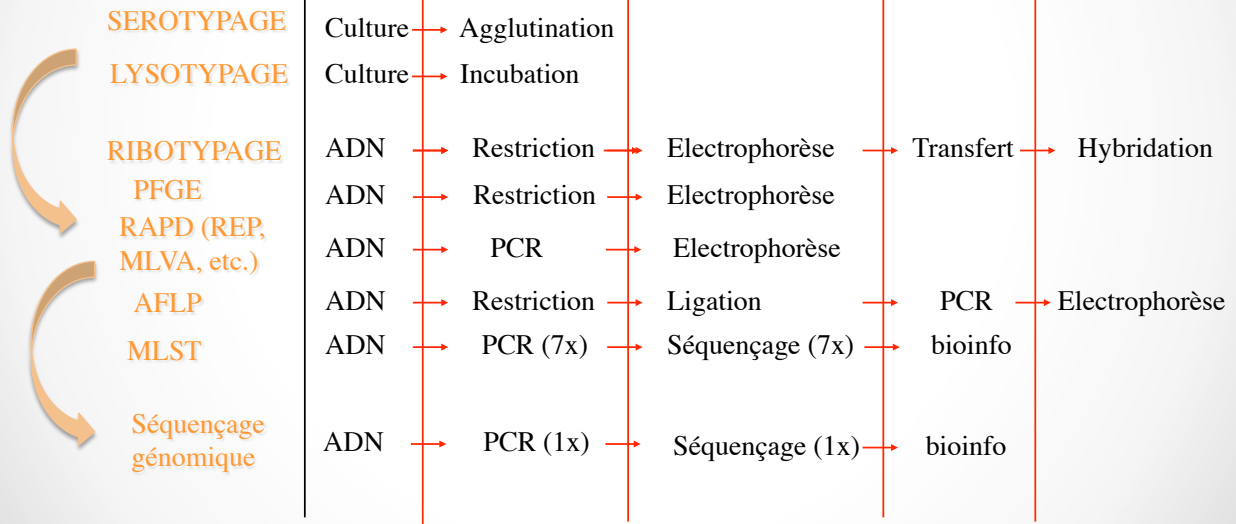
## Contrôle-qualité des probiotiques

### European Scientific League for Probiotics

- Label de qualité sur les produits probiotiques



- Valider la composition
- Valider les concentrations
- Valider la viabilité des différents taxons



OPEN ACCESS Freely available online

**Evaluation of Whole Genome Sequencing for Outbreak Detection of *Salmonella enterica***

Pimlapas Leekitchaophon<sup>1,2\*</sup>, Eva M. Nielsen<sup>3</sup>, Rolf S. Kaas<sup>1,2</sup>, Ole Lund<sup>2</sup>, Frank M. Aarestrup<sup>1</sup>

For publication in *Journal of Clinical Microbiology (JCM)*

**Evaluation of Real-Time WGS for Routine Typing, Surveillance and Outbreak Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli***

Katrine G. Joensen<sup>1,2\*</sup>, Flemming Scheutz<sup>2</sup>, Ole Lund<sup>3</sup>, Henrik Hasman<sup>1</sup>, Rolf S. Kaas<sup>1,3</sup>, Eva M. Nielsen<sup>2</sup> and Frank M. Aarestrup<sup>1</sup>

efsa

European Food Safety Authority  
Committed to ensuring that Europe's food is safe

Home > News & events > Events > Experts to debate use of whole genome sequ...

**Experts to debate use of whole genome sequencing in food safety in Parma**

Parma, 16 June 2014

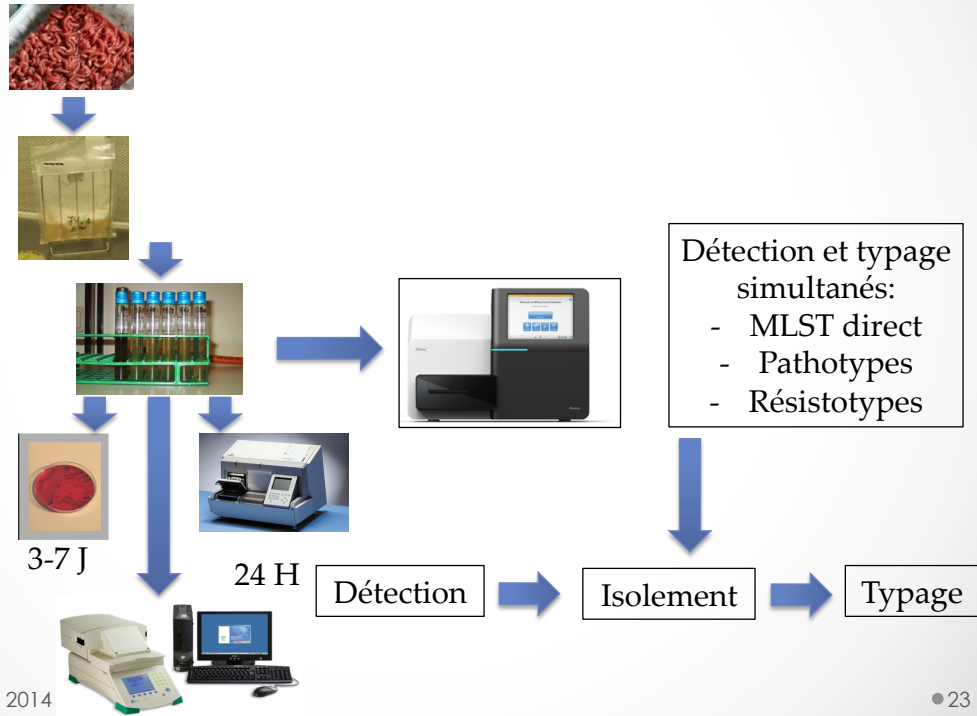
EFSA's 20th Scientific Colloquium will take place on 16 - 17 June 2014 in Parma.

Journal of  
Clinical Microbiology

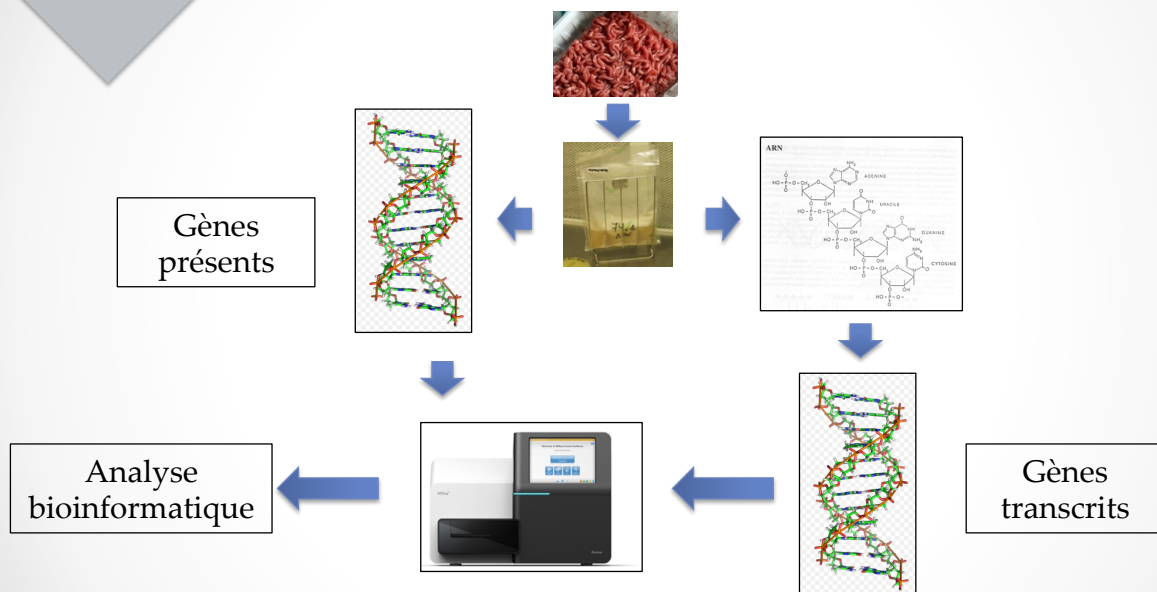
**Multilocus Sequence Typing of  
Total-Genome-Sequenced Bacteria**

Mette V. Larsen, Salvatore Cosentino, Simon Rasmussen, Carsten Friis, Henrik Hasman, Rasmus Lykke Marvig, Lars Jelsbak, Thomas Sicheritz-Pontén, David W. Ussery, Frank M. Aarestrup and Ole Lund  
*J. Clin. Microbiol.* 2012, 50(4):1355. DOI: 10.1128/JCM.06094-11.  
Published Ahead of Print 11 January 2012.

## Détection et typage direct de certaines sous-populations



## Etude de la fonctionnalité de la microflore des aliments



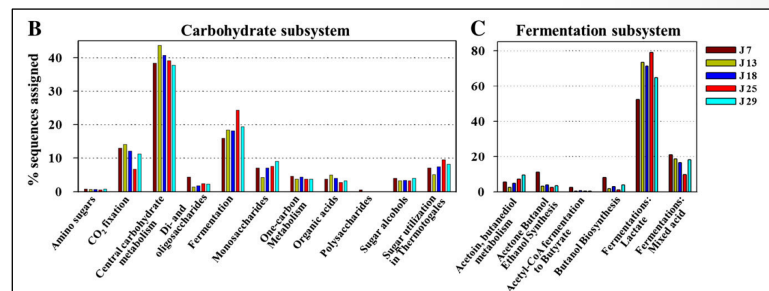


Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits

Marie-Christine Montel, Solange Buchin, Adrien Mallet, Céline Delbes-Paus,  
Dominique A. Vuitton, Nathalie Desmasures, Françoise Berthier

PII: S0168-1605(14)00106-8  
DOI: doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019  
Reference: FOOD 6459

To appear in: *International Journal of Food Microbiology*



Métaprotéomique,  
métabolomique

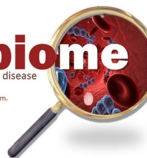
## Les nouvelles approches de maîtrise de la flore microbienne des aliments

- La maîtrise des microbes de nos aliments entre dans une nouvelle ère grâce aux nouvelles techniques analytiques afin de
  - Sélectionner et favoriser les **flores compétitives** adéquates pour protéger toutes les catégories d'aliments périssables
  - **Solutionner** rapidement les **problèmes** technologiques et de contamination
  - Valider et contrôler la **typicité** et la variété de nos aliments
  - Développer une nouvelle génération de méthodes de **contrôle de qualité** basées sur le suivi de l'ensemble de l'écosystème
  - Réaliser des **études épidémiologiques** rapides et performantes

# Conclusions

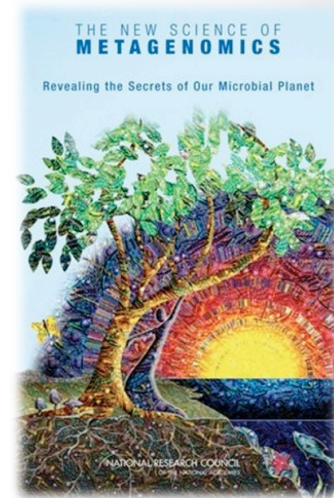
- On vit actuellement la plus grande **révolution** depuis un siècle (et l'invention des boîtes de Pétri) pour la connaissance des écosystèmes microbiens grâce aux **séquenceurs à haut débit**
- La limitation n'est plus au niveau de la capacité des analyses de laboratoire mais repose sur
  - Les **capacités d'analyse bio-informatique** de la masse de données disponible
  - La disponibilité de **bases de données pertinentes** pour interpréter les données générées dans les différents contextes, environnements:
  - L'**interprétation des résultats** par des équipes pluridisciplinaires
  - L'**imagination et la créativité**

● Paris, 31 mars 2014



The human **Microbiome**  
its impact on digestive health & disease

Join us **Tues. Nov 5, 2013** 1:00 – 5:30 p.m.  
at the Alstream Centre in Toronto for the  
**4<sup>th</sup> Annual Digestive Health Summit**  
for **Health Care Professionals**



## The Hygiene Hypothesis: An Explanation for the Increased Frequency of Insulin-Dependent Diabetes

Jean-François Belk<sup>1,2</sup> and Lucienne Châteauneuf<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Université Paris Descartes, 75015 Paris, France  
<sup>2</sup>INSERM UMR 1015, 75015 Paris, France  
Correspondence: jeanfrancois.belk@parisdescartes.fr

The steadily increasing frequency of insulin-dependent diabetes in several countries is best explained today by the hygiene hypothesis, epidemiologic and animal data support this conclusion, which, however, requires confirmation by intervention trials in man. The mechanism of the protective effect of infections on diabetes onset are diverse including competition for immune cells and stimulation of regulatory T cells and of Toll-like receptors. These considerations might have interesting therapeutic applications for the prevention of the disease.

Perspectives in Medicine  
14

● 27