




BSFM  

Les nouveaux outils génomiques, bases pour la caractérisation microbiologique des aliments

Prof. Georges Daube
Dr Bernard Taminiau

Université de Liège
Faculté de Médecine vétérinaire, FARA H
Département des Sciences des Denrées alimentaires
Microbiologie
Georges.Daube@ulg.ac.be



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

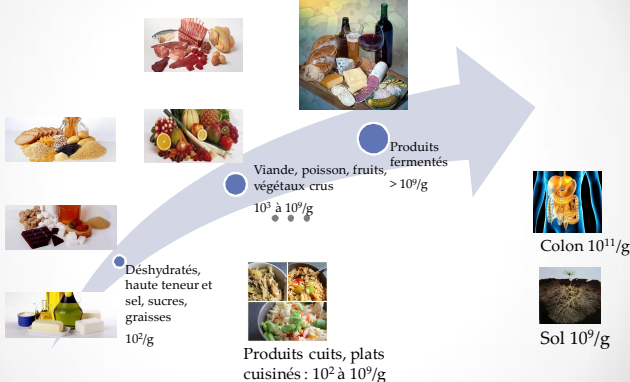
● Bruxelles, 18 septembre 2014 ●2

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.
- " Ces propriétés dépendent d'**interactions complexes** entre les micro-organismes présents c'est pourquoi l'ensemble de l'écosystème doit être connu et maîtrisé.

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ●3

Microbiote des aliments



Viande, poisson, fruits, végétaux crus: 10^3 à 10^9 /g

Produits fermentés: $>10^9$ /g

Déshydratés, haute teneur et sel, sucres, graisses: 10^2 /g

Produits cuits, plats cuisinés: 10^2 à 10^9 /g

Colon: 10^{11} /g

Sol: 10^9 /g

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ●4

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



● Bruxelles, 18 septembre 2014

● 5

Les détecter, les compter

Louis Pasteur,
1822-1895

Robert Koch,
1843-1910

Julius Pétri, 1852-1921

Dénombrement → **Détection**

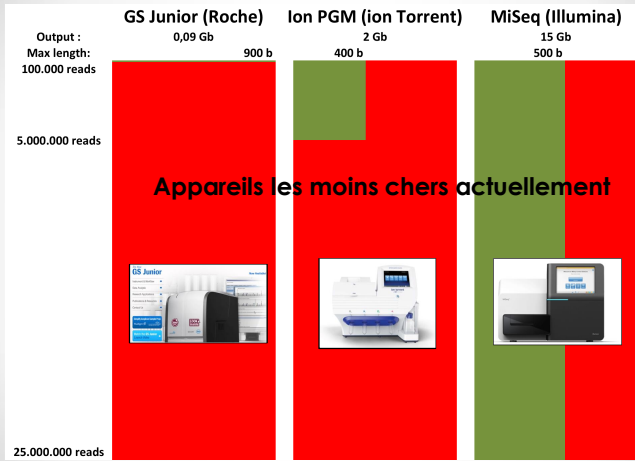
24 H à 5 J → 3-7 J → 24 H

E. coli → Entrobactéries

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

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ● 6

Les méthodes de séquençage de nouvelles générations



Métagénomique (ciblée)

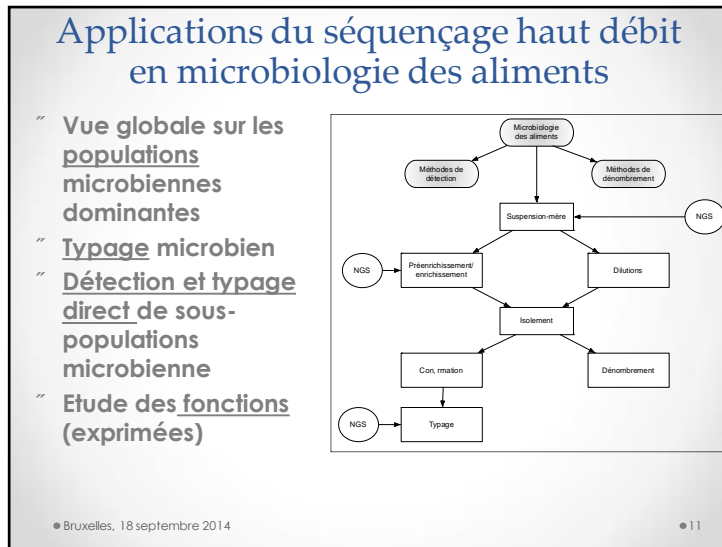
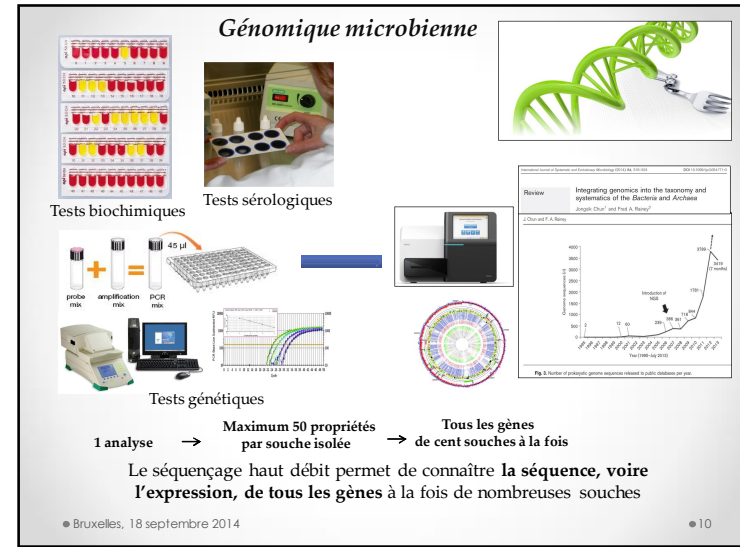
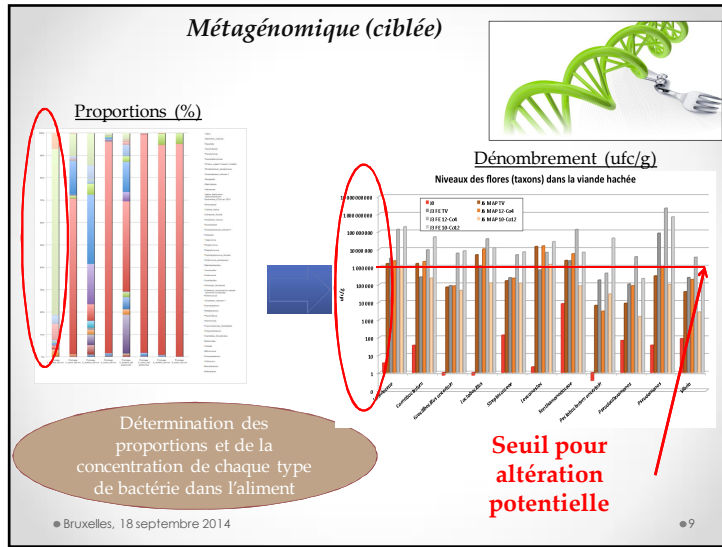
Profil de la diversité microbienne

1 analyse → Plus de 5.000 identifications/éch → Plus de 50.000 identifications/éch

→ 20 échantillons à la fois → 200 échantillons à la fois

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

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ● 8



Applications

- Caractériser les populations microbiennes
- Caractériser les souches isolées
- Détecter et typer certaines sous-populations
- Etudier la fonctionnalité liée à la microflore

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ● 12

Populations microbiennes

Populations microbiennes de "steaks tartares"

Prémallé supermarché (SM1)

Boucherie supermarché (SM2)
Boucherie indépendante (butchery)

Restaurant

Sandwicherie (sandwich)

J0
J2 (J1 4°C + J2 8°C)

Jachat

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

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ● 13

Populations microbiennes

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

Pseudomonas Brochothrix

Leuconostoc gelidum

Pas de flore dominante

Lactobacillus algidus
Lactococcus piscium

Photobacterium
Lactobacillus algidus
Lactococcus piscium

Xanthomonas

Streptococcus thermophilus

Clostridium haemolyticum

Lactobacillus algidus

● 14

Populations microbiennes

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 prémallés se distinguent des produits préparés à la demande et sont souvent plus stables.

L'amplification de l'ADN des organites végétales doit être inhibée.

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ● 15

Populations microbiennes

Caractériser le microbiote du fromage de Herve (AOP)

207 phylotypes

Core phylotypes common to all groups

- Enterococcus_casseliflavus
- Bacillus_sp._runID_cheeseAOP_OTU70
- Pseudomonas_sp._P58
- Xanthomonas_OTU396185
- Lactobacillus_plantarum
- Polynucleotide_sp._runID_cheeseAOP_OTU50
- Vibrio_penaeicida
- Alphaproteobacter_sp._runID_cheeseAOP_OTU26
- Polynucleotide_sp._P646309
- Leuconostoc_pseudomonasteroides
- Brevibacterium_sp._EPT11865
- Pseudomonas_sp._runID_cheeseAOP_OTU4
- Pseudomonas_sp._runID_cheeseAOP_OTU9
- Acetobacter_pinnatus
- Pseudomonas_sp._D1781tp_E164-6a
- Vagococcus_Ruvialis
- Actinobacter_sarstensis
- Vibrio_sp._sz2w6
- Streptococcus_salinarum_ssp._sp._thermophilus
- Vagococcus_salinarum
- Marinilactibacillus_psychrotolerans
- Staphylococcus_equorum_ssp._sp._equorum/suocinus
- Polynucleotide_sp._T581p-3706a
- Corynebacterium_casei
- Lactococcus_lactis_ssp._oreniensis

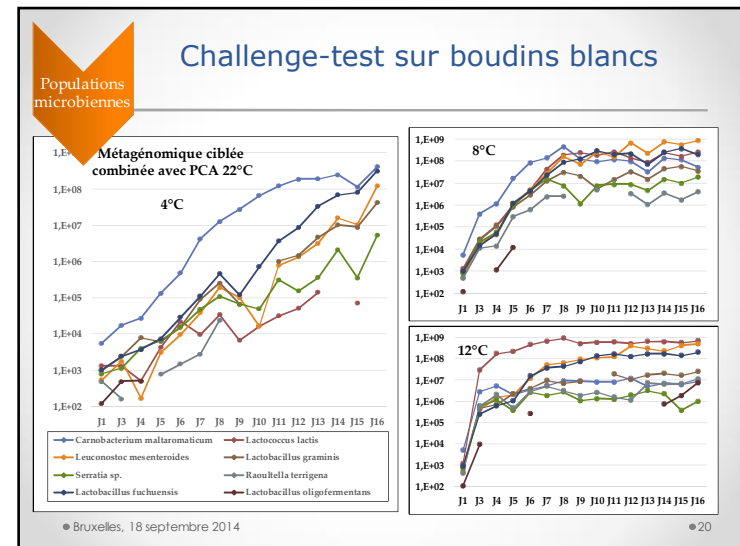
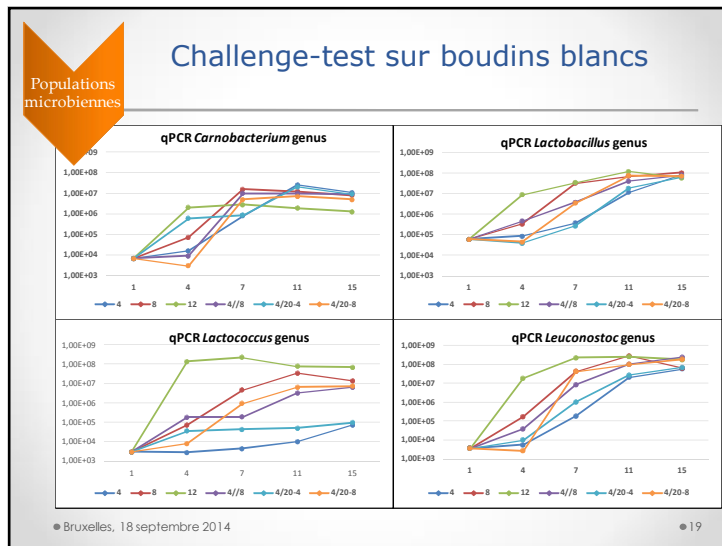
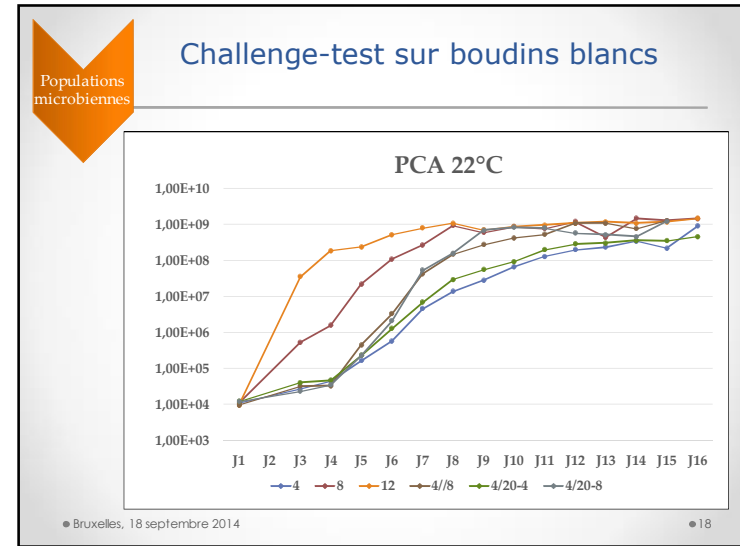
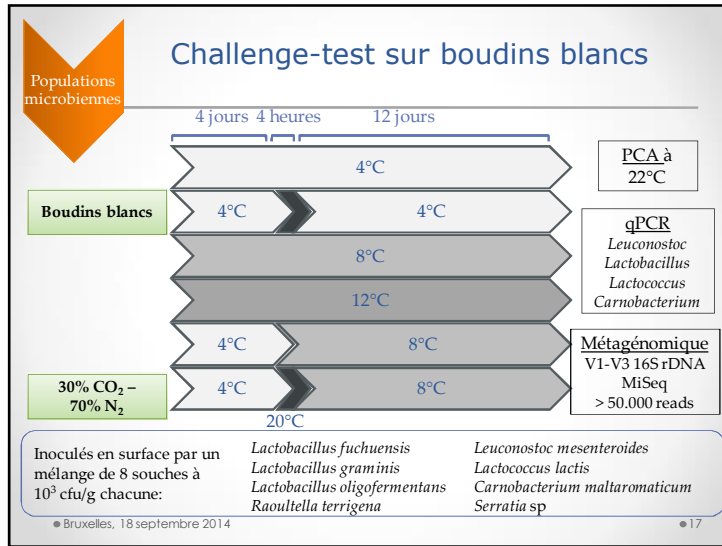
Delcenserie et al 2014, J Dairy Sci, 97:1-11

BEIGIAN PROTECTED DESIGNATION OF ORIGIN HERVE CHEESE MICROBIOTA

Comparer 22 fromages
Diversité surtout dans la croûte des fromages au lait cru

Décrire le microbiote
Une base commune aux fromages au lait cru et pasteurisé

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ● 16



Populations microbiennes

Challenge-test sur boudins blancs

“ La métagénomique ciblée couplée au dénombrement par culture ou par PCR en temps réel permet de déterminer **la cinétique de croissance** de toutes les composantes d'un écosystème afin de:

- Comprendre les **interactions** entre souches
- Comprendre l'**effet des facteurs** intrinsèques (composition, teneur en sels, acides organiques, pH, etc) et extrinsèques (T°, atmosphère, etc.) sur les différentes souches
- Choisir des flores à utiliser pour la **biopréservation**
- Fixer les **DLC** et les **températures de conservation**
- Après validation, démontrer aux autorités et aux clients que les **flores dominantes ne sont ni altérantes, ni pathogènes** même à haute concentration

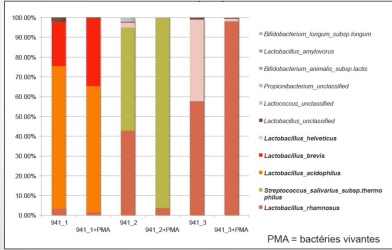

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ●21

Populations microbiennes

Contrôle-qualité des probiotiques

European Scientific League for Probiotics

“ Label de qualité sur les produits probiotiques

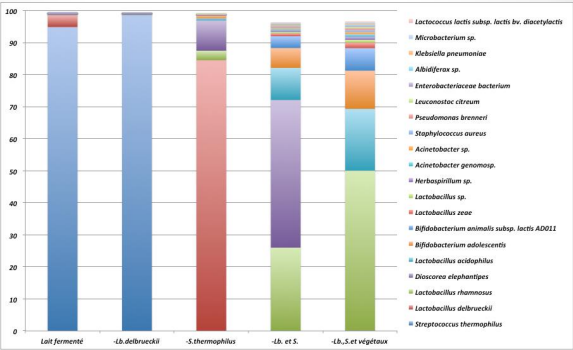
- Valider la composition
- Valider les concentrations
- Valider la viabilité des différents taxons

Possibilité de masquer spécifiquement l'ADN des micro-organismes-morts

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ●22

Populations microbiennes

Détection et quantification de flores minoritaires



Possibilité de masquer spécifiquement certaines populations

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ●23

Applications

- “ Caractériser les populations microbiennes
- “ **Caractériser les souches isolées**
- “ Détecter et typer certaines sous-populations
- “ Etudier la fonctionnalité liée à la microflore

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ●24

Typage par recherche de séquences génomiques

Typage microbien

SEROTYPAGE	Culture	→	Agglutination						
LYSOTYPAGE	Culture	→	Incubation						
RIBOTYPAGE	ADN	→	Restriction	→	Electrophorèse	→	Transfert	→	Hybridation
PFGE	ADN	→	Restriction	→	Electrophorèse				
RAPD (REP, MLVA, etc.)	ADN	→	PCR	→	Electrophorèse				
AFLP	ADN	→	Restriction	→	Ligation	→	PCR	→	Electrophorèse
MLST	ADN	→	PCR (7x)	→	Séquençage (7x)	→	bioinfo		
Séquençage génomique	ADN	→	PCR (1x)	→	Séquençage (1x)	→	bioinfo		

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ●25

Typage par recherche de séquences génomiques

Typage microbien

Evaluation of Whole Genome Sequencing for Outbreak Detection of *Salmonella enterica*
Pirotas Leekitcharoenphan^{1,2}, Eva M. Nielsen³, Rolf S. Kaas^{1,2}, Ole Lund³, Frank M. Aarestrup¹

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^{1,2}, Flemming Scheutz², Ole Lund³, Henrik Hasman¹, Rolf S. Kaas^{1,2}, Eva M. Nielsen³ and Frank M. Aarestrup¹

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 Jøllebak, Thomas Sichertz-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.

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ●26

Applications

- Caractériser les populations microbiennes
- Caractériser les souches isolées
- Détecter et typer certaines sous-populations**
- Étudier la fonctionnalité liée à la microflore

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ●27

Détection et typage direct de certaines sous-populations

Détection et typage microbien

Détection et typage simultanés:
 - MLST direct
 - Pathotypes
 - Résistotypes

Détection → Isolement → Typage

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ●28

Applications

- ” Caractériser les populations microbiennes
- ” Caractériser les souches isolées
- ” Détecter et typer certaines sous-populations
- ” Etudier la fonctionnalité liée à la microflore

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ● 29

Etude de la fonctionnalité de la microflore des aliments

Fonctionnalité microbienne

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ● 30

Etude de la fonctionnalité de la microflore des aliments

Fonctionnalité microbienne

Métagénomique aléatoire

Métranscriptomique

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*

Metatranscriptomic analysis of lactic acid bacterial gene expression during kimchi fermentation

Young Jung¹, Se Hee Lee¹, Hyun Mi Joo¹, Younsu Hahn¹, Eugene L. Madara², Che Ok Joo¹

Métaprotéomique, métabolomique

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ● 31

Etude de la fonctionnalité de la microflore des aliments

Fonctionnalité microbienne

● Bruxelles, 18 septembre 2014 ● 32

Les nouvelles approches de maîtrise de la flore microbienne des aliments

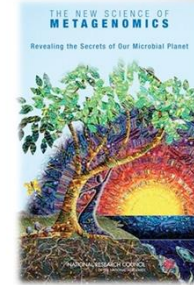
- “ La maîtrise des microbes de nos aliments entre dans une nouvelle ère grâce aux nouvelles techniques analytiques afin de
 - Sélectionner et favoriser les **flores compétitives** adéquates pour protéger toutes les catégories d'aliments périssables
 - **Solutionner** rapidement les **problèmes** technologiques 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

● Bruxelles, 18 septembre 2014

● 33

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**



The Hygiene Hypothesis: An Explanation for the Increased Frequency of Insulin-Dependent Diabetes?
 Insulin-Dependent Diabetes (IDDM) is a chronic autoimmune disease characterized by the destruction of pancreatic islets by T lymphocytes. The incidence of IDDM has increased worldwide over the past few decades, and this increase is thought to be related to changes in the human microbiome. The hygiene hypothesis suggests that a lack of exposure to diverse microbial environments during early childhood may lead to an overactive immune system that attacks the body's own tissues. This hypothesis is supported by studies showing that children who grow up on farms or in rural areas, where they are exposed to a greater variety of microbes, have a lower risk of developing IDDM. The hygiene hypothesis is a complex one, and more research is needed to fully understand the role of the microbiome in the development of autoimmune diseases like IDDM.



● Bruxelles, 18 septembre 2014

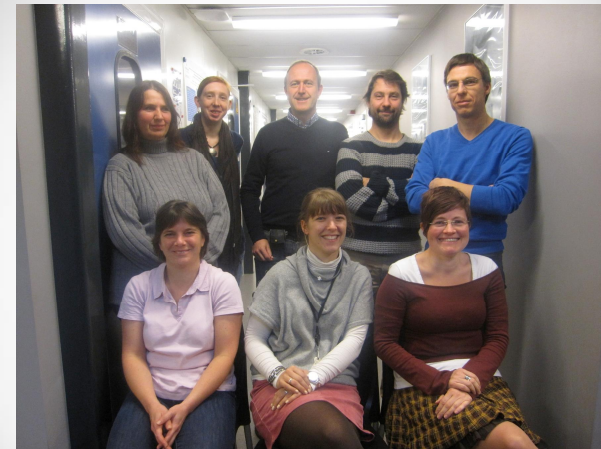
● 34



Une équipe de choc en microbiologie des denrées alimentaires

● Bruxelles, 18 septembre 2014

● 35



Deux équipes de choc en génétique moléculaire (LMDA et Quality Partner s.a.)

● Bruxelles, 18 septembre 2014

● 36