

La métagénomique au service de la microbiologie alimentaire :

étude de l'évolution des populations microbiennes
lors du vieillissement de deux matrices alimentaires

Bernard Taminiau, Carine Nezer, Jean-Baptiste Poulet,
Ysabelle Adolphe, Antoine Clinquart et Georges Daube



La Métagénomique

Analyse du métagénome d'une population complexe

Nouveaux organismes

Nouveaux gènes
- protéines

Métagénomique

Analyse de la biodiversité

Principe

Séquençage

- Cible zone hypervariable du 16S rDNA
- Obtention d'un ensemble de séquences indépendantes

Bioinformatique

- Définition des Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTU)
- Assignment taxonomique des OTU

Atouts

indépendante de
la culture

Large spectre

Analyse haut débit

Analyse
quantitative

Application en microbiologie alimentaire

Suivi de la flore microbienne lors du stockage de denrées alimentaires
(tests de vieillissement)

4° C

4-8° C

12° C

MAP

Film étirable

Boudin blanc



Viande hachée



Deux matrices étudiées

Boudin blanc

- Viande de porc
- Produit cuit
- Composé de plusieurs ingrédients



Flore composées de :

- Contamination post cuisson
- Population thermorésistante

Viande hachée

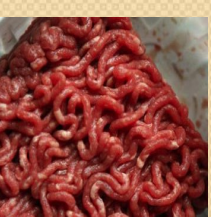
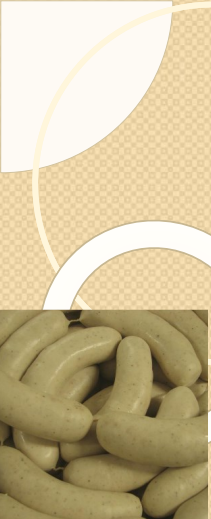
- Viande de porc
- Produit non cuit
- Composé d'un seul ingrédient



Flore composées de :

- Populations issues des ingrédients
- Contamination originelle

Deux matrices étudiées



Label	Atmosphère	T° de conservation	Jours de stockage
WP_D0	-	-	0
WP_FW_D6	air	4	6
WP_MAP30_D21	30% CO ₂ /70% N ₂	4	21
WP_MAP50_D21	50% CO ₂ /50% N ₂	4	21
MM_D0	-	-	0
MM_FW_S4_D3	air	4	3
MM_FW_S4-8_D3	air	4-8	3
MM_FW_S12_D3	air	12	3
MM_MAP_S4_D6	30% CO ₂ /70% O ₂	4	6
MM_MAP_S4-8_D6	30% CO ₂ /70% O ₂	4-8	6
MM_MAP_S12_D6	30% CO ₂ /70% O ₂	12	6

FW (film étirable); WP (boudin blanc); MM (viande hachée)

Analyse microbiologique

Pour chaque échantillon

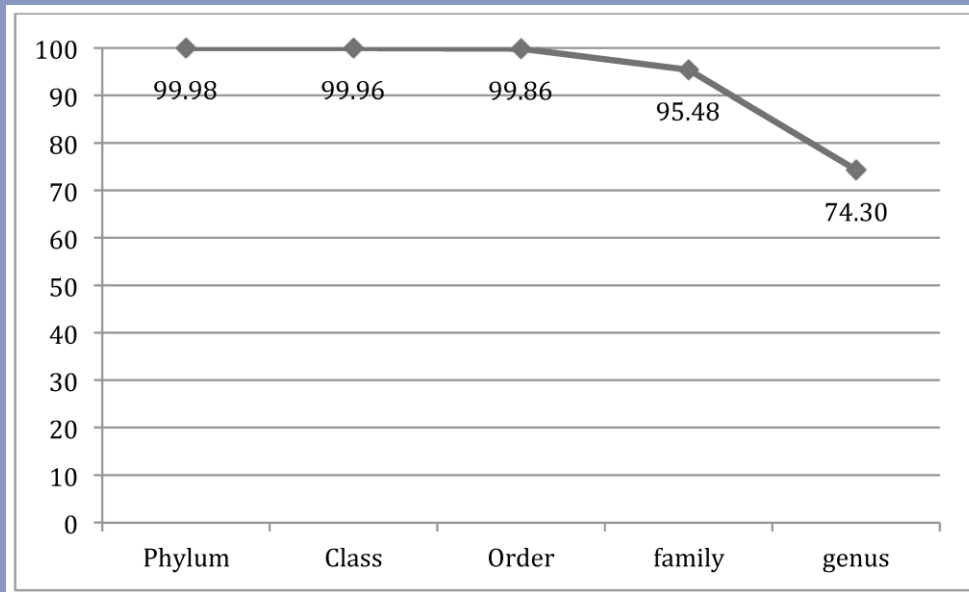
- Détermination de la population totale aérobie (PCA 22° C)
- Bactéries lactiques (MRS 25° C)
- Entérobactéries (VRBG 30° C)
- *Pseudomonadaceae* (Ps. Agar CFC 22° C)

Analyse microbiologique

Label	Log UFCg⁻¹ aérobies 22°C	Log UFCg⁻¹ bactéries lactiques	Log UFCg⁻¹ <i>Enterobacteriaceae</i>	Log UFCg⁻¹ <i>Pseudomonadaceae</i>
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_D6	7,39	4,67	<3	<3
MM_MAP_S12_D6	9,38	7,02	<3	<3

Analyse métagénomique

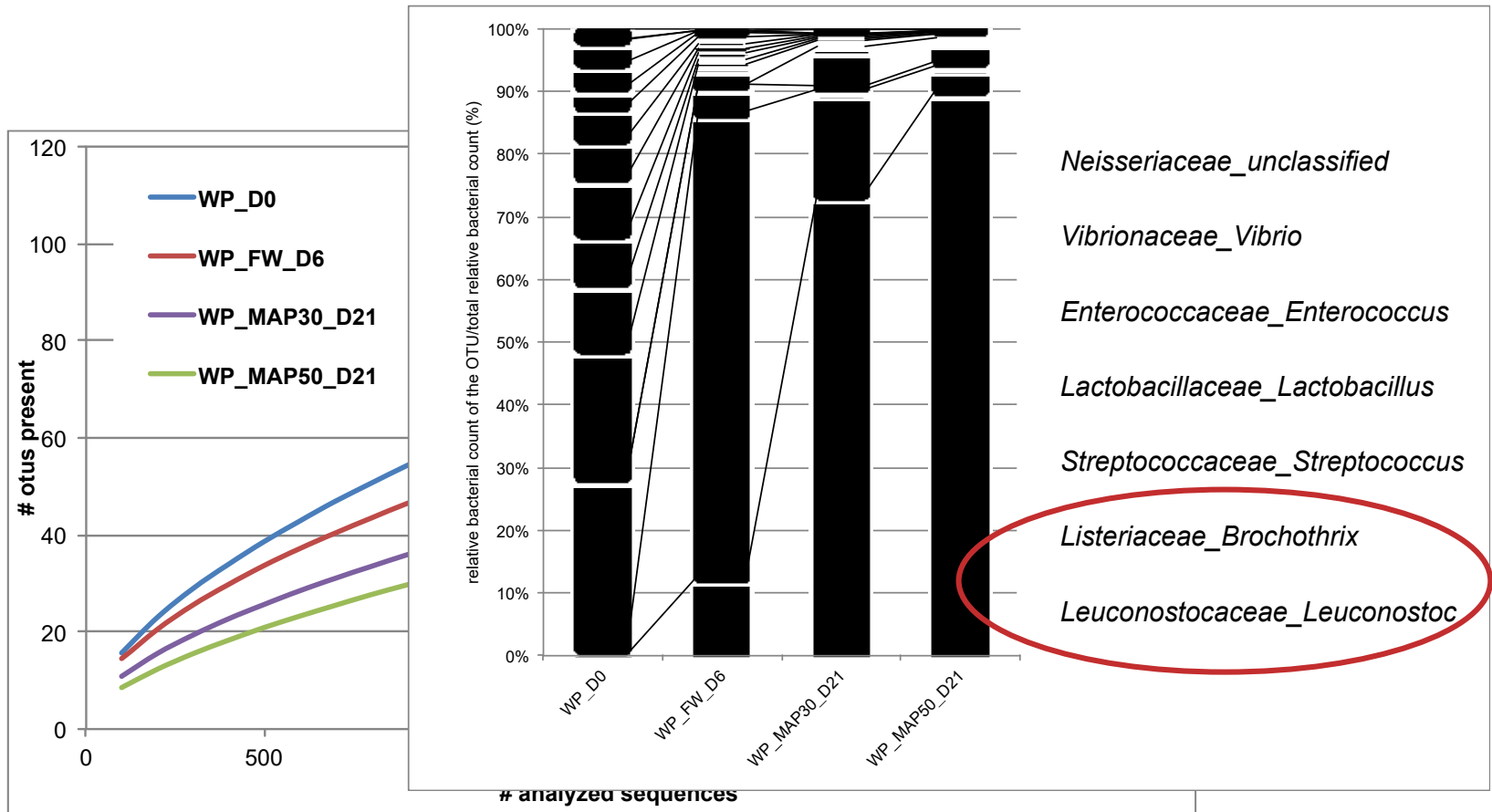
=> 130.000 séquences à analyser pour les 11 échantillons
3% de séquences ne satisfaisant pas le QC



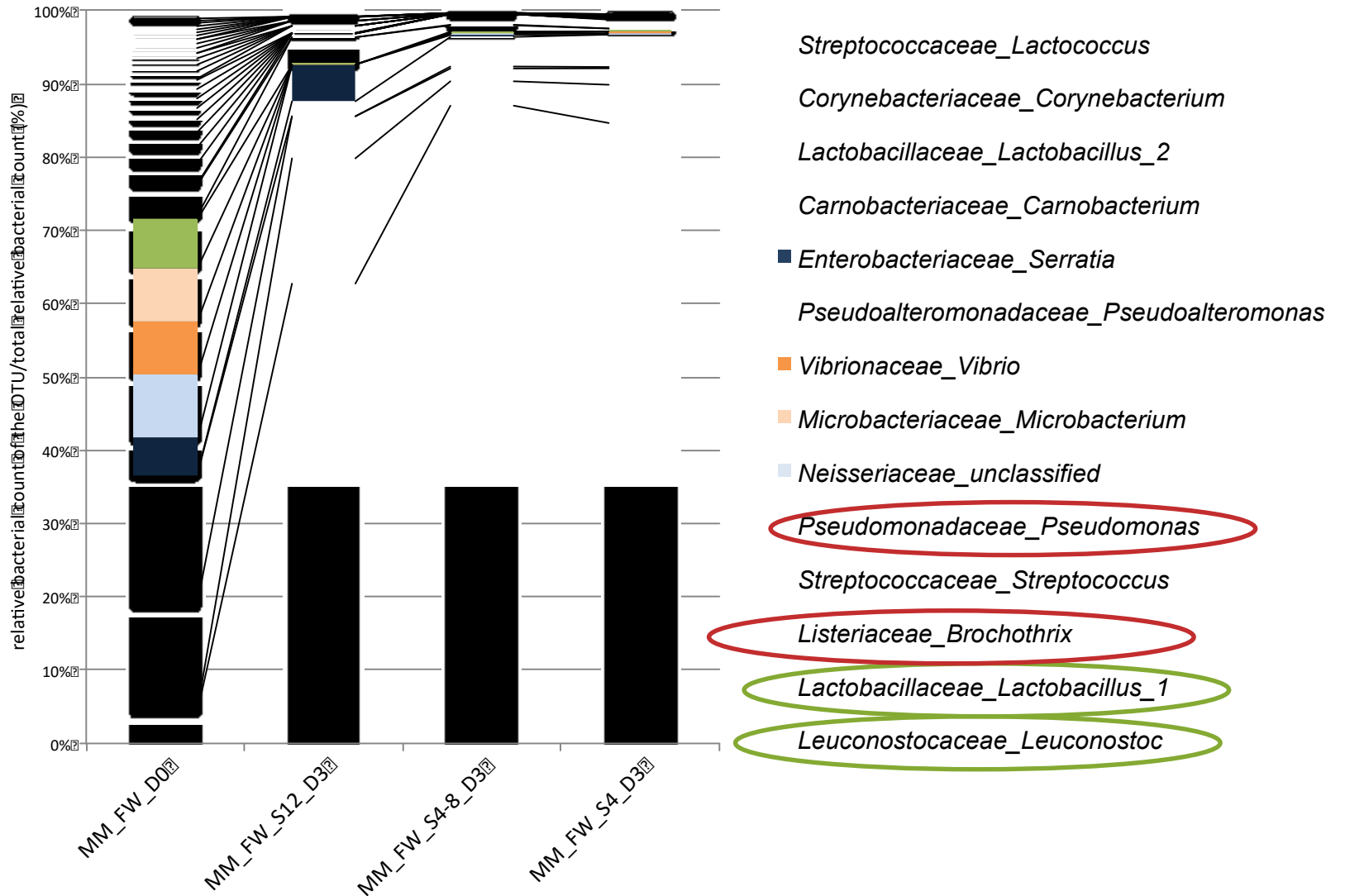
Assignation
Taxonomique

=> Etablissement des proportions de populations
après pondération sur le nombre de copies du 16S
rDNA dans le génome

Boudin : Proportions populations



Haché: Proportions populations - air

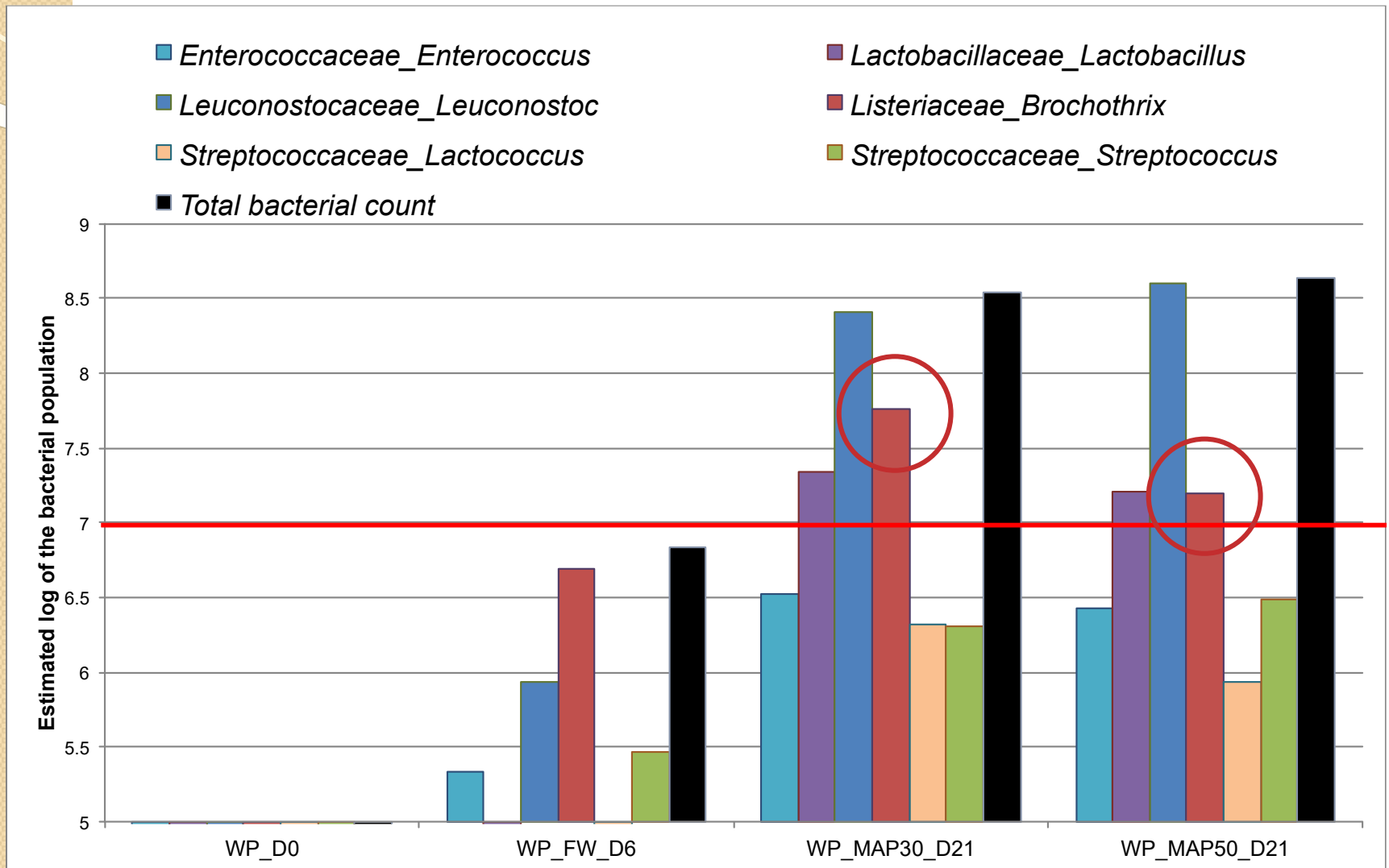


Analyse métagénomique

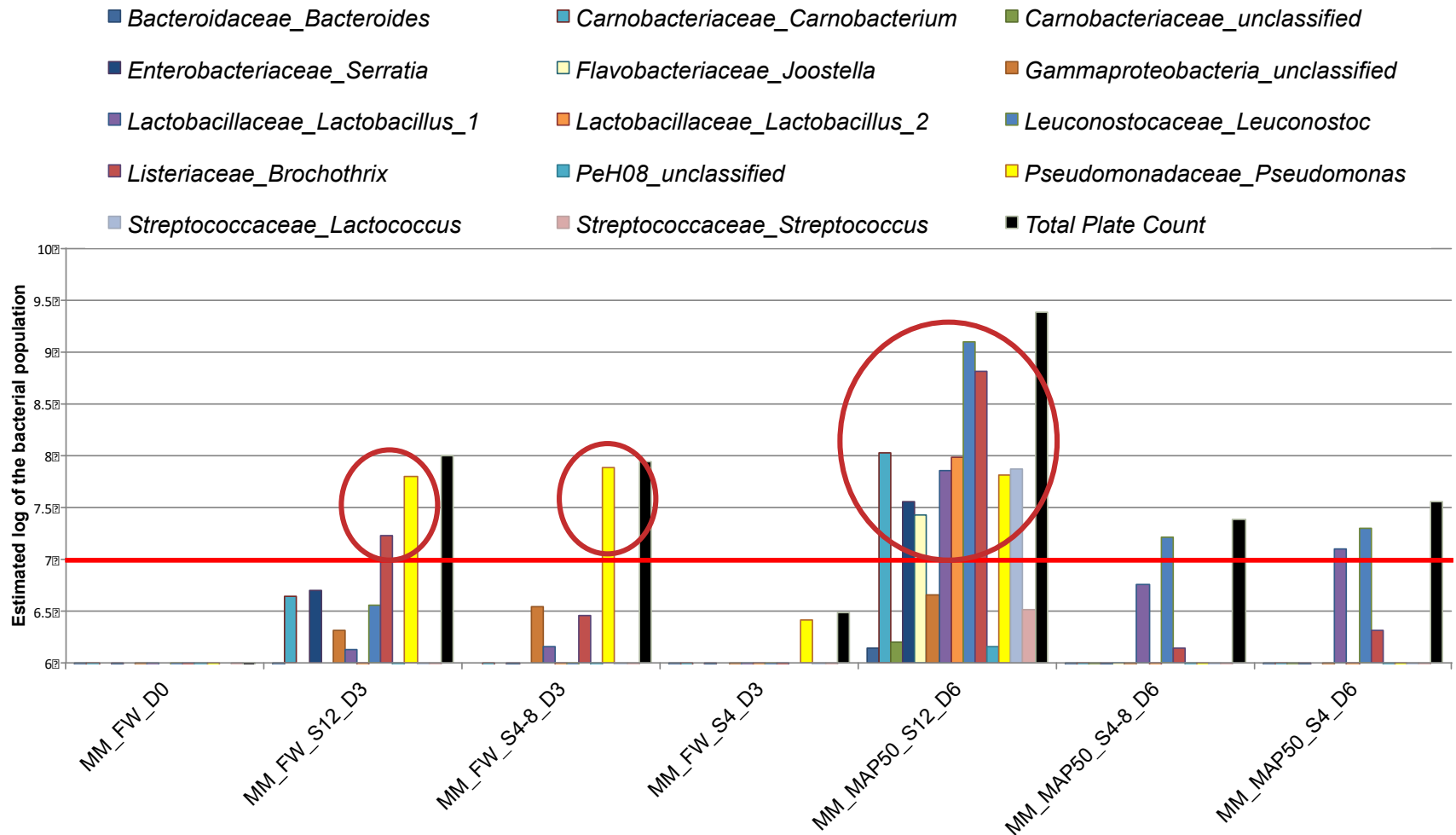
=> Détermine un niveau absolu de population estimée par rapport à la population totale aérobie

- Détermination de la taille des populations sur base de leurs proportions et de la flore totale dénombrée
- Situation où on sous-estime le niveau de contamination mais qui permet de visualiser les populations qui dépasse un certain seuil (par exemple lié à la limite de perception d'une altération)

Boudin : niveaux absolus estimés



Haché: niveaux absolus estimés



Conclusions

- L'analyse métagénomique offre une vue sans a priori sur la totalité de la flore bactérienne présente
 - ! Utilité pour les flores difficilement cultivables ou différenciables
- Elle permet de pouvoir travailler sur des échantillons faiblement contaminés
 - ! Intérêt pour la microbiologie prédictive
- Elle est un bon outil pour la validation de la DLC de nouveaux produits

Perspectives

- Travail sur la validation par PCR temps réel des flores principales afin d'améliorer l'estimation des populations
- Définition de la zone d'analyse optimale pour le 16S rDNA
- Evaluer l'influence du biais bactéries mortes/vivantes dans l'analyse.
- Modélisation des interactions entre les flores