



HAL
open science

Mise au point d'une méthode d'extraction de particules virales à partir de légumes fermentés à des fins d'analyse de métaviromes.

Julia Gendre, Claire Le Marrec, Marie-Agnès Petit, Sophie Landaud, Eric Dugat-Bony

► To cite this version:

Julia Gendre, Claire Le Marrec, Marie-Agnès Petit, Sophie Landaud, Eric Dugat-Bony. Mise au point d'une méthode d'extraction de particules virales à partir de légumes fermentés à des fins d'analyse de métaviromes.. 17e congrès intitulé "La microbiologie dans tous ses états", Oct 2022, Montpellier (FR), France. 2022. hal-03966973

HAL Id: hal-03966973

<https://hal.science/hal-03966973>

Submitted on 1 Feb 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

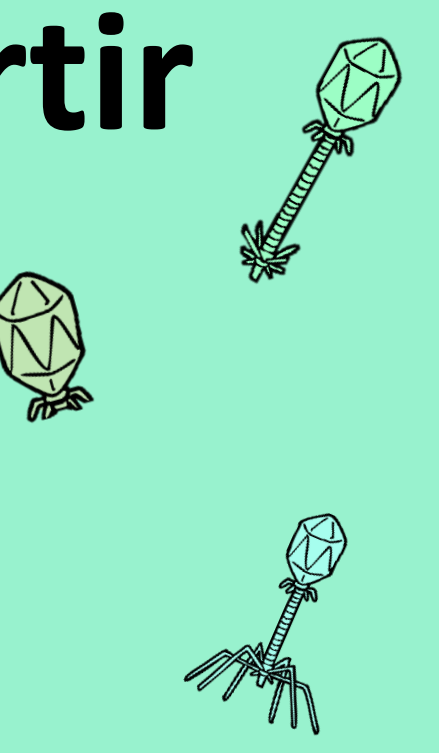


Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

Mise au point d'une méthode d'extraction de particules virales à partir de légumes fermentés à des fins d'analyse de métaviromes

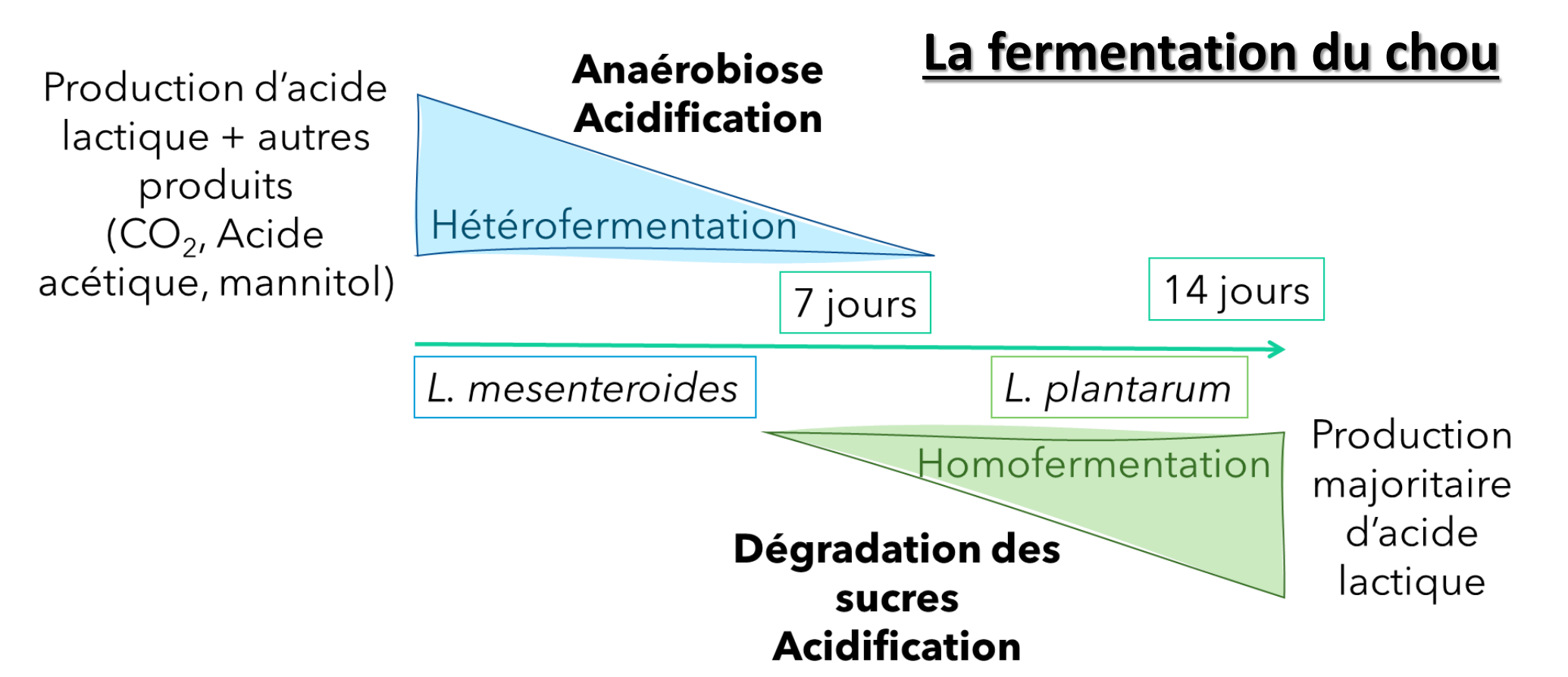
Julia Gendre¹ (julia.gendre@inrae.fr), Claire Le Marrec², Marie-Agnès Petit³, Sophie Landaud¹, Eric Dugat-Bony¹

¹ Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR SayFood, Palaiseau, France; ² UMR 1366 Oenologie, INRAE, Univ. Bordeaux, Bordeaux INP, France; ³ Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, Jouy-en-Josas, France



Introduction

Les légumes fermentés abritent une communauté de microorganismes incluant des levures, des bactéries lactiques et des protéobactéries. Leur développement se fait de manière séquentielle au cours de la fermentation. Notre étude porte sur la fermentation du chou. Le procédé est caractérisé par une première phase hétérofermentaire, généralement assurée par *Leuconostoc mesenteroides*, qui permet l'acidification et la mise en condition anaérobie de l'environnement. La seconde phase, homofermentaire, est assurée majoritairement par *Lactiplantibacillus plantarum*. Les bactériophages, les virus infectant des bactéries, pourraient jouer un rôle clé dans cette dynamique microbienne. Cependant la communauté virale des légumes fermentés est à ce jour mal connue. L'objectif de ce travail consiste à mettre au point une méthode d'extraction de la fraction virale, pour la caractériser à l'aide des techniques actuelles de métagénomique virale.



Méthode

Extraction et concentration de la fraction virale à partir de 10 g de chou fermenté (matrice F1)

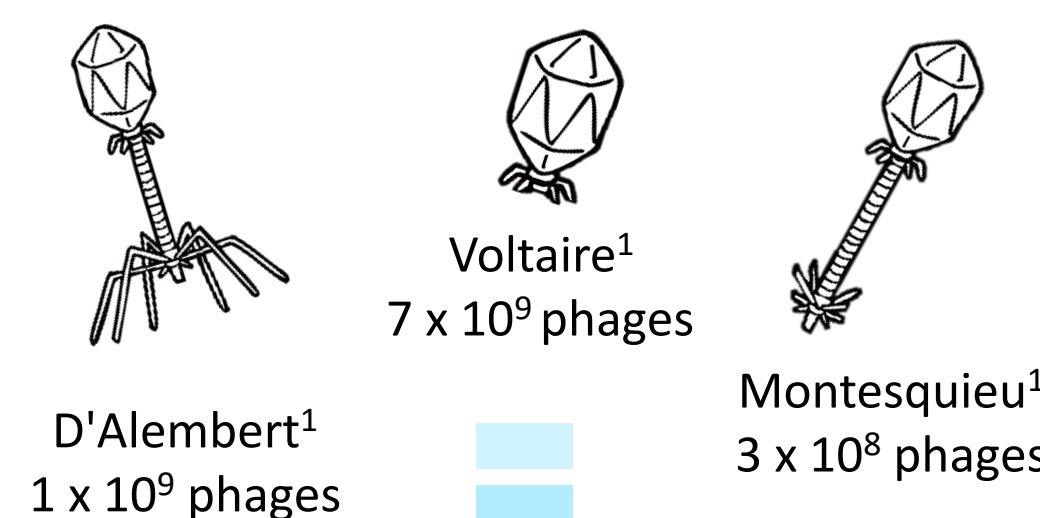
- Dilution de la matrice**: 1. Homogénéisation par stomacher dans 1 L Tris 10 mM, NaCl 200 mM pH 7,5
2. Incubation Overnight à 4°C
- Élimination des cellules microbiennes**: 3. Centrifugation: 5000 x g 30 min à 4°C
4. Filtration : 0.8 µm ou 0.45 µm ou 0.22 µm (PES)
- Concentration de la fraction virale**: 5. Concentration: précipitation PEG 10% Overnight 4°C
6. Centrifugation 5000 x g 30 min à 4°C
7. Resuspension du culot dans 1 mL de tampon SM (Tris-HCl 50 mM, MgSO₄ 10 mM, NaCl 200 mM) (= Fraction virale F1)

Dénombrement des particules virales par microscopie à épifluorescence / Métagénomique

Le protocole permet-il d'extraire des bactériophages ?

Spiking

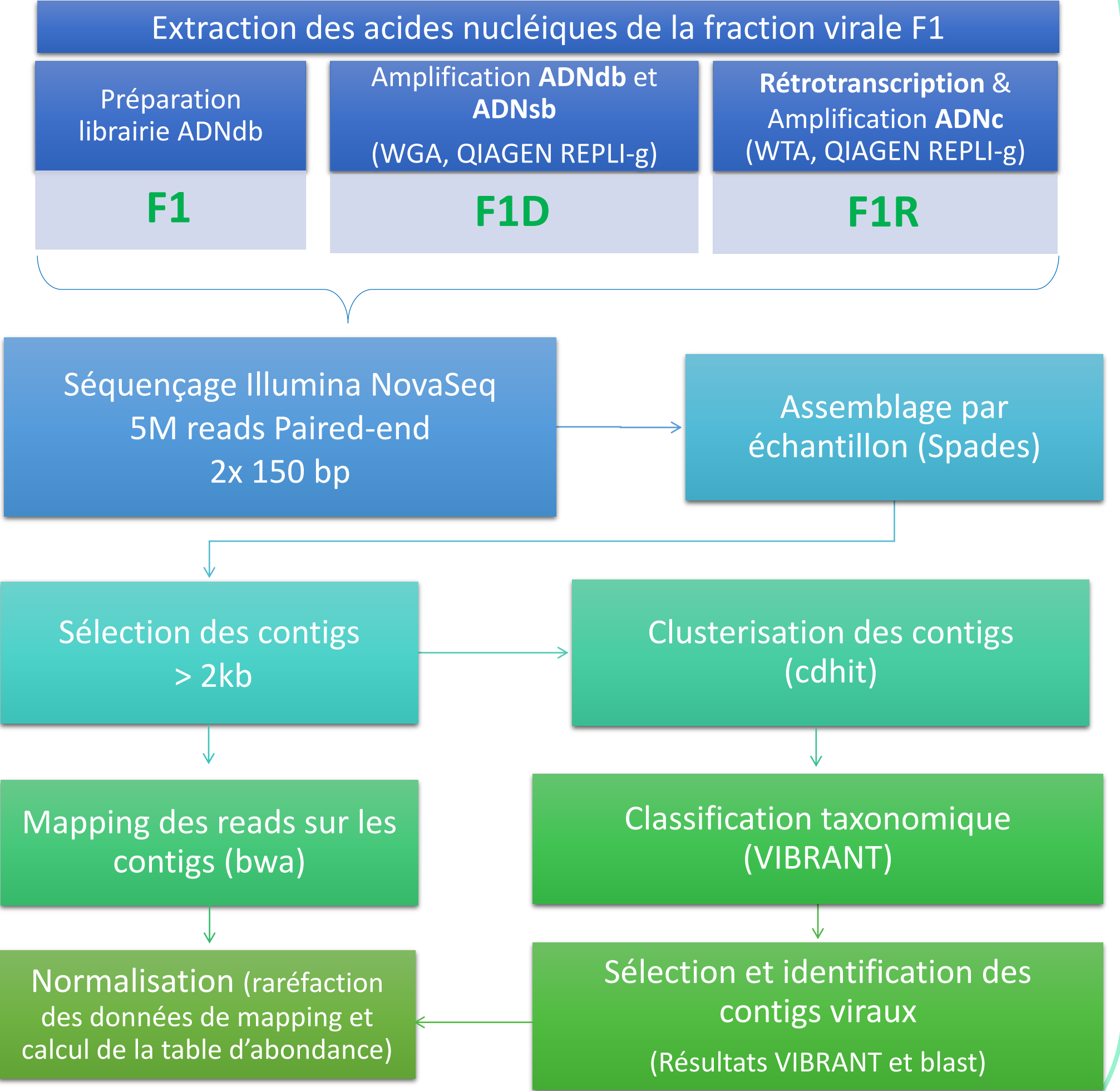
Introduction d'une quantité contrôlée de phages connus dans l'échantillon initial afin d'évaluer l'efficacité de récupération du protocole



Dénombrement microbiologique par méthode en double-couche (plages de lyse)

Le protocole permet-il de séquencer seulement le matériel génétique viral ?

Métagénomique



Spiking

Pourcentage récupéré (Δ logs)	D'Alembert ¹ (Myovirus)	Voltaire ¹ (Podovirus)	Montesquieu ¹ (Siphovirus)
Filtration 0.22 µm	3% (Δ 1.57)	98% (Δ 0.01)	2% (Δ 1.76)
Filtration 0.45 µm	52% (Δ 0.29)	52% (Δ 0.14)	19% (Δ 0.73)
Filtration 0.8 µm	68% (Δ 0.17)	73% (Δ 0.29)	24% (Δ 0.63)

Perte importante des siphophages et myophages après filtration à 0.22 µm

Présence de bactéries contaminantes uniquement après filtration à 0.8 µm

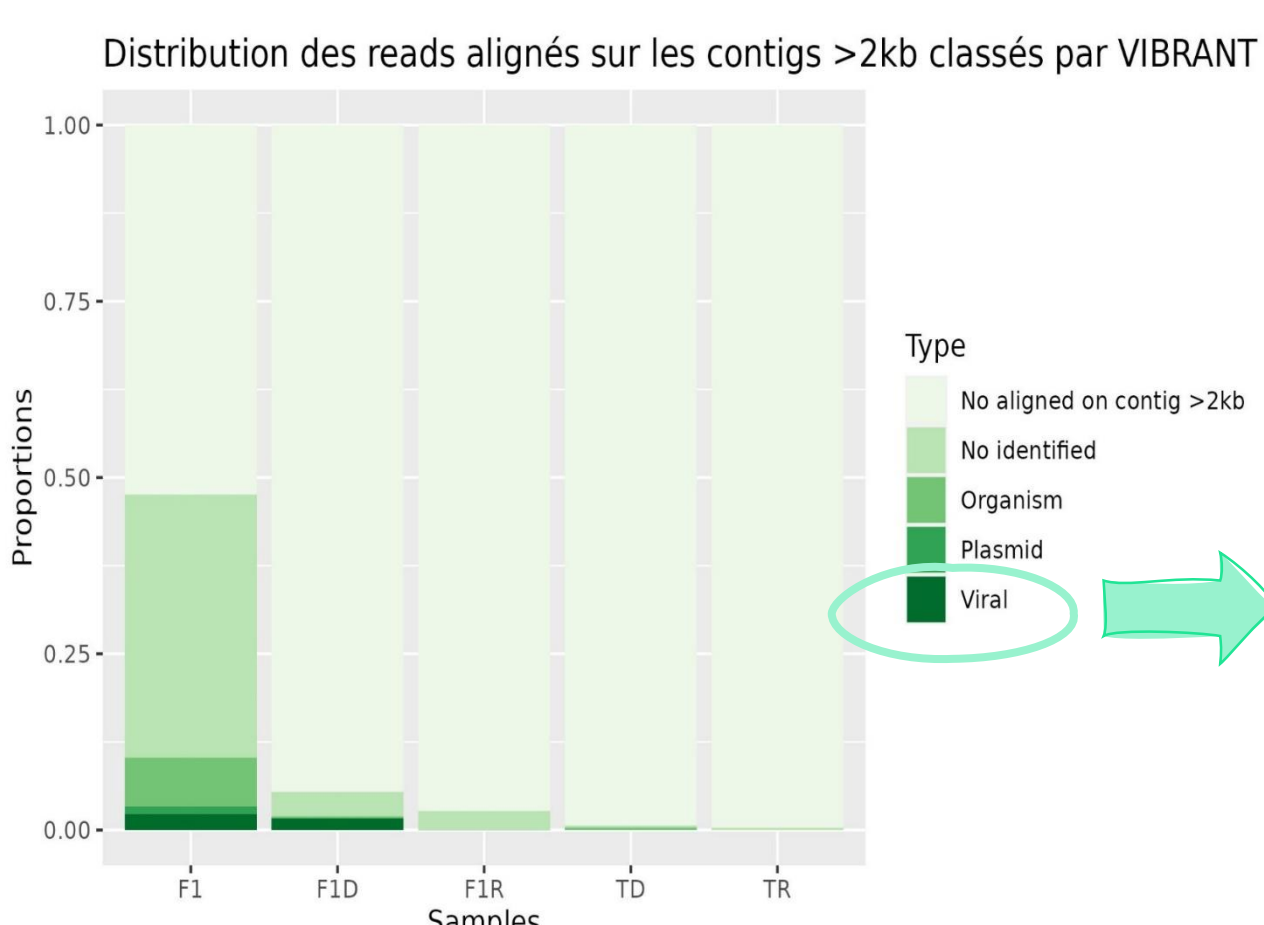
Dénombrement par microscopie en épifluorescence

La fraction virale F1 (étape 7) contient en moyenne **5 x 10⁸ particules/mL** environ **5 x 10⁷ particules/g de chou fermenté.**

Grossissement x1000
Luminosité et contraste +40%

Métagénomique de la fraction virale extraite

D'après les prédictions VIBRANT, la part des contigs prédit comme viraux est relativement faible (9% des contigs >2kb)

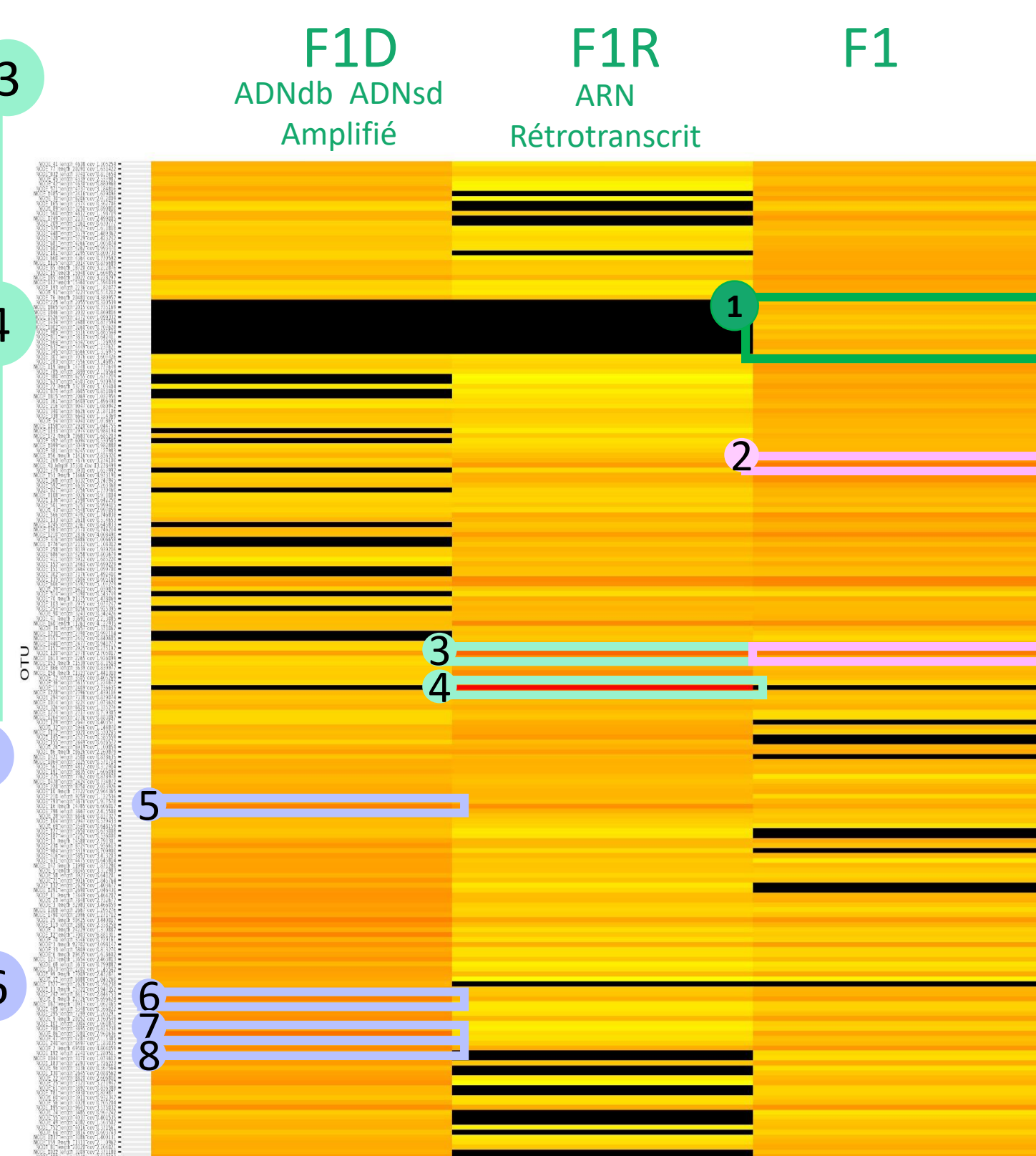


Contig 2 kb de faible qualité correspondant à un phage lytique (AR: 0.035 (F1) et 0.07 (F1R)). Fragment de génome phagique semblable à des *Siphoviridae* identifiés dans des métagénomiques de microbiotes de GI humains (blastx)

Contig 2 kb (phage lytique; faible qualité par VIBRANT; AR: 0.36). Prédiction d'un gène codant pour la chaîne β de la réplicase ARN et d'un gène codant pour une protéine de maturation A (MATA_BPGA). Une protéine nécessaire à l'infection de l'hôte, notamment en formant un complexe avec l'ARN permettant son insertion dans la cellule hôte. Fragment de génome de phage ARN, homologue par blastx à la polymérase du phage *ssRNA SRR7976357_8* (e-value 3^{e-29}, % id. 36.80%)

Contig 14 kb prédit comme provenant d'un phage lytique et de faible qualité (AR: 0.028). Homologue avec le phage *Leuconostoc phiMH1* (e-value 0.0, % id. 89.83%)

Contig 22 kb prédit comme provenant d'un phage lytique et de haute qualité (AR: 0.027). Semblable au phage *Leuconostoc Ln-9* (e-value 0.0, % id. 92.22%)



- 12 contigs (2-6 kb) dont 11 correspondant à des phages lytiques et 1 tempéré (gène codant pour une intégrase/recombinase) fragment homologue au phage *Lactobacillus ATCCB* avec BBH intégrase, e-value 9e⁻¹³⁴, % id. 73.25%
- Contig 35 kb de haute qualité associé à un phage lytique (Abondance relative, AR: 0.035). Proche de siphophages identifiés dans des métagénomiques de microbiotes GI humains (BBH e-value 0.0, % id. 86.05%), et infectant des *Lactobacillus* (BBH e-value 0.0, % id. 83.94%)
- Contig 3 kb prédit comme lytique et de faible qualité (AR: 0.047). Fragment de génome phagique homologue au phage *Leuconostoc Ln-9* (e-value 0.0, % id. 91.58%)
- Contig 69 kb prédit comme lysogène et de haute qualité (AR: 0.021). Homologue au phage *Lactococcus CHPC974* (e-value 1^{e-80}, % i. 81.77%)

Conclusions

Le protocole permet-il d'extraire des bactériophages ?

- ✓ Phages ajoutés (spiking) retrouvés dans l'échantillon final = protocole de récupération efficace.
- ✓ La porosité idéale du filtre est de 0.45 µm (récupération siphophages et myophages plus élevée et absence de bactéries).
- ✓ Obtention d'un extrait viral concentré (>10⁸ particules/ml) à partir de 10 g de chou fermenté, d'après la microscopie en épifluorescence.
- ✓ Qualité et quantité d'ADN extrait suffisantes pour une approche de métagénomique virale.

Le protocole permet-il de séquencer seulement le matériel génétique viral ?

- ✓ Proportion relativement faible des contigs d'origine virale et nombreux contigs d'origine bactérienne.
- ✓ Nombreux reads non alignés sur les contigs > 2 kb
- ✓ 4 contigs viraux de haute qualité (22 à 92 kb):
 - Le contig de 92 kb semble abriter le génome complet du phage *Bacchae Lactobacillus* (evalue 0.0, % id. 95.06%).
 - Les 3 autres contigs contiennent des génomes complets de phages infectant les genres *Leuconostoc* et *Lactobacillus* (nouvellement *Lactiplantibacillus*) = cohérent avec les genres retrouvés dans le chou fermenté par approche culturale (excepté pour *Lactococcus*).
- ✓ L'étape de rétrotranscription et d'amplification de l'ARN a permis l'identification d'un phage à ARN, non détecté dans la librairie d'ADN double brin.
- ✓ Amplification des ADNdb efficace: présence des contigs présents dans l'échantillon non amplifié mais de façon plus abondante.

¹Paillet et al. 2022, *Virulent Phages Isolated from a Smear-Ripened Cheese Are Also Detected in Reservoirs of the Cheese Factory*. *Viruses* 2022, 14, 1620.

Financement : Ce travail a été financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) au travers du projet MetaSimFood (ANR-21-CE21-0003).

