

| FICHE PROJET EUROPEEN | | | |
|--|---|---|-----------------|
| ACRONYME : RNAMB | | | |
| NOM COMPLET DU PROJET | | Réseau Normand d'Analyse Microbiotes et Biofilm (RNAMB) | |
| NUMERO DE CONVENTION | | 17P04296 / 17E01520 / 17P04295 | |
| DATE DE DEBUT | | 01/02/2018 | |
| DATE DE FIN | | 31/01/2020 | |
| COORDINATEURS | | Marc FEUILLOLEY | |
| • Etablissement(s) | • Laboratoire(s) | • Responsable(s) | • Partenaire(s) |
| | LMSM | NBC | UCN |
| | PBS | NTM | N2S |
| | | | |
| | | | |
| CONTACT | | | |
| SITE INTERNET DU LABORATOIRE ET PROJET | | | |
| DESCRIPTION DU PROJET | | | |
| RESUME | <p>Contexte, présentation générale de l'opération :</p> <p>Le terme « Microbiote » désigne des communautés microbiennes complexes et est aujourd'hui au centre de multiples préoccupations. Dans l'organisme humain, où on estime la population microbienne à 1,5 kg soit 10¹⁴ microorganismes et 10 fois plus que de cellules eucaryotes humaines, on distingue 2 principaux microbiotes, le microbiote intestinal (1kg) et le microbiote cutané (200 g). Le microbiote intestinal a été fortement étudié mais ce n'est que bien plus récemment que la structure et les fonctions du microbiote cutané ont été abordées, en particulier sous la pression de l'industrie cosmétique. On trouve aussi un microbiote aérien lié aux aérosols, essentiel dans la diffusion des agents pathogènes, et dans les aliments où il participe à la fois à leur maturation et à leur altération. Ces microbiotes sont composés de bactéries mais aussi de moisissures (microbiote fongique), de levures et de virus. Certains virus {bactériophages, ayant pour cible les bactéries) sont suspectés d'exercer un rôle essentiel sur la dynamique du microbiote bactérien, et donc sur les qualités finales, technologiques et sanitaires, des aliments. Dans les différents environnements et dès qu'ils sont en contact avec des surfaces stables, les microorganismes s'organisent sous la forme de biofilms qui peuvent être considérés comme des « tissus transitoires » au sein desquels ils produisent une matrice extracellulaire et communiquent par des signaux chimiques, voire électriques. Ce développement sous la forme de biofilms s'associe à d'importantes modifications physiologiques qui confèrent généralement aux microorganismes une résistance accrue aux biocides. La croissance en biofilms de bactéries telles <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Acinetobacter baumannii</i> ou <i>Legionella pneumophila</i> est ainsi associée à une résistance accrue aux antibiotiques et au développement d'infections chroniques fortement morbides, comme dans le cas de la mucoviscidose. Parallèlement, dans l'environnement le développement des biofilms</p> | | |

microbiens conduit à des modifications de la surface des matériaux et à leur altération (corrosion), voire comme dans le cas des biofilms marins {biofouling), à la fixation d'organismes indésirables (invertébrés, algues...) ou à la contamination des aliments.

Les modifications des microorganismes liées à la transition du mode vie planctonique {libre) au mode de vie biofilm ont fait l'objet d'études sur des germes isolés ou sur des biofilms modèles généralement simples ou reconstitués à partir d'un nombre limité d'espèces alors que dans leur réalité les biofilms présentent une très grande diversité. D'autre part, il existe des formes de vie transitoires ou permanentes des microorganismes sur des surfaces comme la peau qui à quelques exceptions ne semblent pas réellement structurées en biofilm mais impliquent cependant un haut niveau d'adaptation à leur micro et macro-environnement. Il a ainsi été montré que des signaux de l'hôte {hormones, neurohormones) et des polluants atmosphériques {N₂) peuvent être détectés par les microorganismes {bactéries) et moduler leur virulence et leur capacité à former des biofilms. Il s'avère donc nécessaire dans un grand nombre de cas d'étudier la composition et la fonctionnalité des microbiotes complexes réels que ce soit sous forme libre (air), en interaction avec leur hôte (peau) ou parasites {bactériophages) et leur environnement (polluants atmosphériques de type N₂) et sous forme de biofilms (aliments) afin de mieux comprendre leurs effets positifs et/ou délétères et si nécessaire définir de nouveaux actifs permettant de contrôler la sécurité sanitaire, le bien-être et la durabilité des aliments. Ce dernier objectif passe par la caractérisation des mécanismes de régulation impliqués dans la formation de ces microbiotes. Ce projet repose ainsi sur le développement de techniques de criblage haut-débit spécifiques.

Caractère innovant de l'opération :

Au niveau Régional, ce projet vise à structurer un plateau technique et un réseau d'analyse haut-débit (stations de calcul et logiciels communs) dédié à la Microbiologie et accessible à tous les membres de la CornUE.

Sur le plan scientifique, la microbiologie et en particulier la compréhension de la composition, des flux et des échanges au sein des populations microbiennes complexes libres (air), associés/liés à une surface (eau - aliments) ou structurés en biofilms est un des challenges principaux du début du XXIème siècle avec des impacts tant en termes de santé, de technologies et de production industrielle. Il faut savoir que les techniques « classiques de microbiologie ne permettent tout au plus de cultiver de 0.1 à 1% de la population microbienne totale, l'essentiel échappant à ce jour à toute compréhension, que ce soit en terme d'activité, de virulence, voire d'espèces. L'analyse de l'ensemble des génomes microbiens permet ainsi d'obtenir une image complète des communautés et par la recherche de séquences spécifiques la présence de bactériophages capables de moduler la dynamique de ces populations. Cependant même ainsi ces techniques ne fournissent qu'une image statique des populations microbiennes. Cela impacte grandement notre compréhension des microbiotes car dans l'air comme sur toutes les surfaces (peau aliments biofilms) ces surfaces sont en interactions directes avec l'environnement. De nombreux facteurs exogènes

| | |
|------------------|---|
| | <p>(pollution, conservateurs, cosmétiques) peuvent impacter l'activité réelle de ces populations certains germes pouvant voir leur métabolisme (et leur virulence) baisser ou au contraire augmenter comme cela a déjà été démontré par de nombreux travaux réalisés au sein du LMSM. De plus, au sein d'une population microbienne des germes peuvent rester à un état quiescent, voire non cultivables simplement dans la mesure où étant issus d'un autre environnement ils sont incapables de se multiplier dans celui où ils ont été transférés par l'air, le vent ou les manipulations humaines. Les espèces microbiennes identifiées par leurs seules séquences ADN ne permettent donc pas de caractériser l'état de la population. Pour cela il est nécessaire de passer à des approches méta-transcriptomiques permettant, par l'analyse des ARN messagers (molécules à durées de vie très courte) de définir les espèces réellement actives. De telles approches commencent à être développées en biologie cellulaire eucaryote (cellules humaines) mais restent encore à développer en microbiologie. Dans ce domaine la diversité extrême des espèces bactériennes, fongiques et virales complexifie à l'extrême les approches à développer et à ce titre le projet RNAMB représente un réel challenge qui conduira à un « breakthrough avec des impacts tant au niveau fondamental qu'industriel. Il faut noter à cet égard que l'industrie cosmétique s'intéresse particulièrement à ces techniques même si à notre connaissance elle n'est pas en état de les appliquer à ce jour. Le projet RNAMB est une ambition scientifique et industrielle avant que, comme le laissent espérer une technique apparue très récemment, on ne soit en mesure de commencer à cultiver l'incultivable.</p> |
| <p>OBJECTIFS</p> | <p>Objectifs recherchés, résultats escomptés et public visé :</p> <p>Etude du microbiote cutané et de l'effet des polluants atmosphériques de type NO₂ (LMSM). Le microbiote cutané joue un rôle central dans l'homéostasie (équilibre) de la peau et des études ont montré que des bactéries cutanées voient leur virulence et leur capacité de formation de biofilm affectées par le dioxyde d'azote (NO₂). Une étude de l'effet du NO₂ sur le microbiote cutané a été proposée (Thèse NO₂MC, RIN Doctorants 2017) et vise à caractériser les espèces bactériennes présentes par criblage haut-débit des ADNs (Illumina MiSeq + station de calcul), à rechercher les signatures virales indicatrices de la pression de sélection induite par les bactériophages et à déterminer l'activité métabolique des espèces bactériennes du microbiote par des approches physiologiques et de méta-transcriptomiques (MiSeq + PCR digitale). Un Post-Doctorant (CDD 2 ans) sera affecté à cette étude et permettra de répondre aux demandes des autres partenaires du projet. Cette étude permettra de définir au sein du microbiote cutané les espèces bactériennes non pas seulement présentes mais fonctionnelles et de définir de nouvelles cibles pour maintenir l'équilibre de la peau face à la pollution atmosphérique par NO₂.</p> <p>Etude du microbiote bactérien et fongique aérien (ABTE, équipe ToxEMAC) Cette approche permettra d'établir un « profil (diversité fongique et bactérienne obtenue par séquençage des ADN à l'aide de la station Illumina MiSeq + station de calcul) au sein d'environnements intérieurs et extérieurs. Les séquences d'intérêt pourront être confirmées par qPCR (Q-PCR). Ces travaux permettront de progresser dans l'étude de</p> |

| | |
|-------------------------------------|--|
| | <p>l'exposition humaine aux bioaérosols en milieu professionnel (secteur agricole, hospitalier,) ainsi que dans les habitats dégradés. Une meilleure caractérisation et compréhension de la diversité et de la dynamique des espèces microbiennes présentes ainsi que les paramètres environnementaux qui influencent la virulence (mycotoxines par exemple) contribuera à une meilleure connaissance de l'impact des contaminants aériens dans le développement de maladies respiratoires. Cette approche pourra être utilisée pour évaluer l'efficacité des mesures prises pour réduire le risque lié à la présence de microorganismes pathogènes aériens, en particulier d'origine fongique.</p> <p>Etude du rôle des bactériophages sur la dynamique du microbiote au sein de matrices alimentaires (ABTE, équipe MALIM). De nombreux travaux se sont penchés sur la diversité et les flux au sein des communautés bactériennes dans les produits alimentaires fermentés (fromages, boissons fermentées). On connaît en revanche très mal l'impact des populations de bactériophages, ou phageomes, sur la dynamique de ces communautés bactériennes alimentaires. Cette partie du projet vise donc à mieux comprendre la composition et la diversité du phageome en lien avec la composition bactérienne d'aliments fermentés de Normandie. Ceci sera possible par la mise en œuvre de séquençage à haut débit de phageomes et de microbiotes issus de différentes matrices alimentaires. Un Ingénieur d'étude sera affecté à ce travail sur 1 an. Ce travail permettra de poser les bases pour améliorer l'étude des fluctuations de la composition en bactériophages des matrices alimentaires en lien avec la composition bactérienne.</p> <p>Identification de nouvelles cibles permettant de lutter plus efficacement contre le microbiote structuré en biofilm (PBS- BRICS). La formation du biofilm mobilise des mécanismes de régulation spécifiques qui restent peu caractérisés. Ces mécanismes régulateurs, impliqués dans l'adhésion, la formation du consortium et sa résistance aux agents biocides constituent des cibles moléculaires intéressantes. Les modifications post-traductionnelles sont des événements clés ces régulations, comme le montrent les travaux récents réalisés par l'équipe BRICS. Ce projet vise à caractériser de ces modifications chez le microbiote bactérien structuré en biofilm.</p> |
| <p>IMPACTS ATTENDUS ET FINALITE</p> | <p>Impacts attendus – diffusion et capitalisation des résultats :</p> <p>Ce projet vise au développement d'un outil commun d'étude à haut-débit de la composition des microbiotes bactériens et fongiques. Il repose en particulier sur l'utilisation d'un outil de pointe (Illumina MiSeq) et de stations de travail identiques entre les 3 équipes et faisant appel à un même logiciel (DNA star). Ce projet contribue ainsi à la structuration des liens entre des équipes de Normandie Université (LMSL, PBS-BRICS, ABTE) et conduit à l'organisation d'un réseau commun d'analyse haut-débit des microbiotes qui pourra être accessible à l'ensemble des équipes de microbiologie Normandes. Il bénéficie de l'expérience et du réseau spécialisé de la PFT N2S qui assurera la diffusion de ces travaux auprès des partenaires industriels. Pour le LMSM ce projet permettra de structurer un</p> |

| | |
|-----------|--|
| | <p>nouveau champ thématique dont le développement répond pleinement aux prescriptions de l'HCERES dans son rapport d'évaluation de 2016. Pour ABTE ce projet constitue une première étape dans le développement d'actions communes avec le LMSM et PBS. Pour PBS, ce projet fait suite aux nombreuses collaborations avec le LMSM et vient compléter la plateforme d'interactomique développée au sein du LMSM mais largement utilisée aussi par PBS et d'autres unités de recherche en normandes (COBRA, DC2N). Les discussions engagées permettent dès maintenant de prévoir la mise en place d'un autre futur projet collaboratif entre ABTE, le LMSM et PBS. Ce projet s'inscrit ainsi pleinement dans la structuration d'une Fédération de Recherche Sécurité Sanitaire et Microbiologie qui regroupera à terme tous les laboratoires et équipes de microbiologie du champ scientifique en Normandie. Il s'agit aussi d'un projet largement interdisciplinaire en biologie, associant des microbiologistes, biologistes moléculaires mais aussi des chimistes et des biochimistes.</p> <p>En termes de valorisation, au-delà de la publication des travaux dans des revues scientifiques internationales et colloques (les 3 unités de recherche concernées ont reçu des évaluations très positives de l'HCERES correspondant à des notes A ou A+), ce projet peut avoir plusieurs impacts :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Au niveau (pré)-réglementaire, le manque de données sur les relations entre le risque d'exposition aux mycotoxines et le microbiote aérien limite encore la définition de seuils d'exposition professionnels acceptables. Ces travaux peuvent donc conduire à des transpositions en terme réglementaire. - Au niveau industriel, le LMSM est parallèlement en discussion sur un projet de « cosmétique personnalisée (Projet soutenu par le Pôle de Compétitivité Cosmetic Valley) intégrant des partenaires de l'industrie cosmétique qui pourra largement bénéficier des outils développés dans le cadre du projet MBF. D'autre part plusieurs demandes de partenaires industriels ont déjà contacté le LMSM et la PFT N2S pour des applications (prestations) auxquelles les équipements acquis dans le présent projet permettraient pleinement de répondre. Parallèlement, de par l'étude du lien entre la diversité des communautés de bactériophage et celle des communautés bactériennes des matrices alimentaires, ABTE sera en mesure de présenter une cartographie des microbiotes alimentaires, permettant, sur le long terme, une meilleure maîtrise de ces communautés pour la production d'aliments de qualité durable. -Le développement d'actifs anti-biofilm par PBS, qui est membre du tremplin CARNOT 12C, est aussi un challenge qui motive directement de nombreuses applications industrielles. <p>En termes d'emploi, ce projet permet de financer 3 ans de chercheur en CDD, 1 an d'ingénieur d'étude et 1 poste d'Assistant de recherche à temps partiel. Il est important de noter que l'implantation d'un réseau Normand en Microbiologie et d'un outil tel que l'Illumina MiSeq impliquera à terme de devoir disposer d'un poste permanent affecté à cet équipement. Le LMSM inscrira dans ses demandes à l'Université de Rouen un poste technique (BIATSS) spécifique.</p> |
| RESULTATS | Principales actions présentées : |

I - Etude du microbiote cutané et de l'effet des polluants atmosphériques de type N02 (LMSM)

Acquisition d'équipement: Séquenceur Illumina MiSeq Station de calcul PCR digitale Logiciels Lasergene Fonctionnement: 1 chercheur COD sur 2 ans (en charge de l'ensemble des études Haut-Débit du projet), consommables de laboratoire.

Production scientifique :

- Identification de l'effet des polluants atmosphériques de type N02 sur la diversité de la microflore cutanée
- Développement d'une nouvelle approche de méta-transcriptomique bactérienne permettant d'identifier les bactéries réellement métaboliquement actives au sein du microbiote cutané. Détermination de l'effet du N02 sur ces micro-organismes

II -Etude du microbiote bactérien et fongique aérien (ABTE)

Acquisition d'équipement : Logiciels Lasergene et Station de travail - Q-PCR- bioimageur Fonctionnement : 1 Ingénieur d'Etude sur 6 mois, consommables de laboratoire.

Production scientifique :

- Identification des microbiotes fongique et bactérien présent dans des environnements intérieurs (professionnels) et extérieurs, évaluation de leurs potentiels toxigènes et proinflammatoires

III -Etude du rôle des bactériophages sur la dynamique du microbiote au sein de matrices alimentaires (ABTE)

Acquisition d'équipement: Equipement pour un laboratoire « phage (PSM -Centrifugeuse Qubit) Logiciels Lasergene et Station de travail

Fonctionnement : 1 Ingénieur d'Etude sur 12 mois, consommables de laboratoire.

Production scientifique :

- Identification de la diversité des bactériophages au sein du microbiote associé à des matrices alimentaires fermentées (fromages, cidres).
- Mise en évidence de l'impact des bactériophages sur les communautés bactériennes

IV-Identification de nouvelles cibles permettant de lutter plus efficacement contre le microbiote structuré en biofilm (PBS-BRICS)

Acquisition d'équipement : Nana AITC et équipement support (Incubateur, Vacusafe) Fonctionnement : 1 Chercheur COD sur 18 mois, consommables de laboratoire.

Production scientifique :

- Caractérisation du rôle régulateur des modifications post-traductionnelles dans la formation du microbiote structuré en biofilm
- Mise en évidence des interactions régulateur/cibles potentielles

V-Diffusion et valorisation industrielle des travaux et méthodologies développées (PFT N2S) Fonctionnement : 1 Chargé de Mission sur 2 ans (temps partiel)

Production :

- Organisation de 2 colloques



| | |
|---|--|
| | -Diffusion et communication du projet dans le cadre de conventions d'affaire |
| MODALITES DE FINANCEMENT | |
| BUDGET TOTAL | 562 017€ |
| • Niveau de soutien FEDER / FSE / FAEDER | 281 008,50€ |
| • Niveau de soutien région | 281 008,50€ |
| • Niveau de soutien Etat | |
| • Autofinancement | |
| • Autre | |
| NOMBRE D'ALLOCATIONS DOCTORANTS | 0 |
| NOMBRE D'ALLOCATIONS ET POST-DOCTORANTS | 0 |
| <i>L'Europe s'engage en Normandie avec le Fonds Européen de Développement Régional</i> | |