Un nouveau regard sur les écosystèmes laitiers et fromagers :
Adaptation, développement et appropriations des méthodes omiques à des fins d'écologie microbienne

AVEC LA CONTRIBUTION FINANCIÈRE DU COMPTE D'AFFECTATION SPÉCIALE DÉVELOPPEMENT AGRICOLE ET RURAL
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

Séminaire métagénomique et fromages de terroirs : quel nouveau regard sur la microflore ? Des prairies au fromage.

Atelier BAba de la métagénomique

Animatrices : Nadège BEL (Actalia) et Sarah CHUZEVILLE (Actalia)

Projet affilié au RMT
Filières Fromagères Valorisant leur Terroirs

Zoom,
le 19 Novembre 2020

Microbiologie Pasteurienne versus méthodes -omiques

Analyses bactériologiques dites pasteuriennes (boîte de Pétri) :

► Limite de la spécificité des milieux de culture : Pas d'appréciation de l'espèce bactérienne et parfois, doute sur le genre bactérien

► Focalisation sur les espèces dominantes et cultivables

► Minimisation du rôle des espèces sous-dominantes et/ou non cultivables

Ouverture d'une nouvelle ère

► Nouvelles technologies de séquençage : New Generation Sequencing (NGS)

► Diminution des coûts de séquençage inversement proportionnel à la quantité de données produites

Aujourd'hui, grâce aux analyses -omiques :

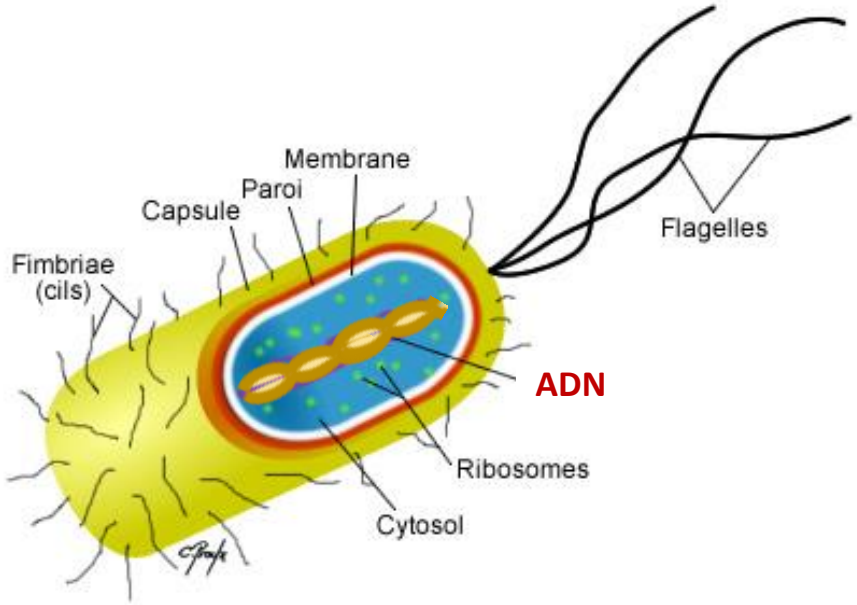
► Possibilité d'une **description simultanée de l'ensemble des espèces/genres microbiens** des échantillons

► Possibilité de description des fonctions potentielles ou exprimées de l'écosystème fromager

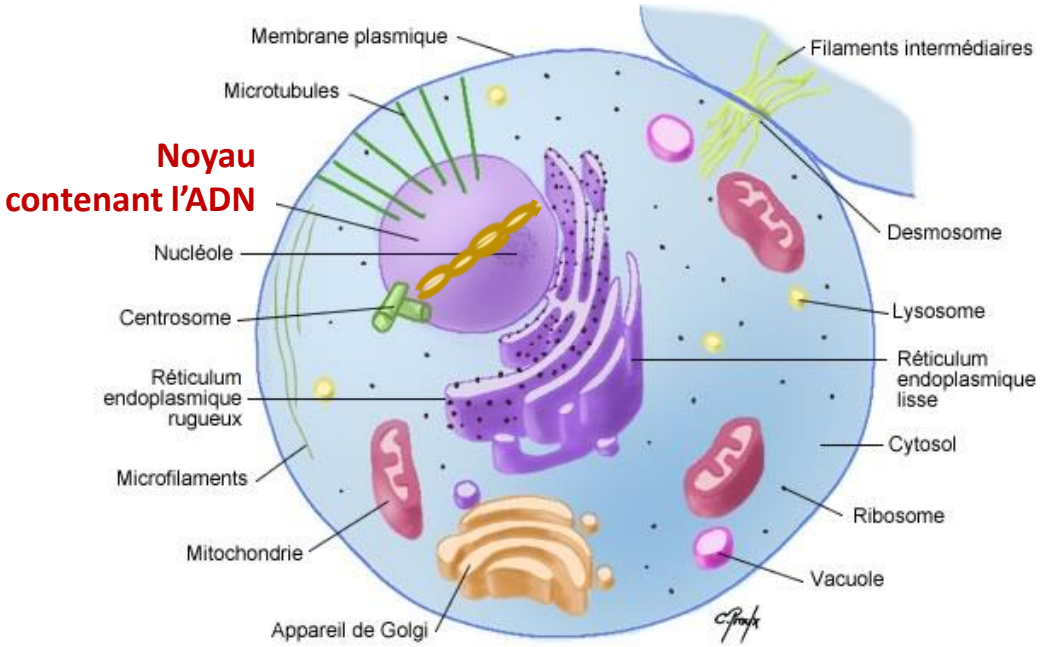
► Méthodes basées sur l'ADN et l'ARN

Projet affilié au RMT
Filières Fromagères Valorisant leur Terroirs

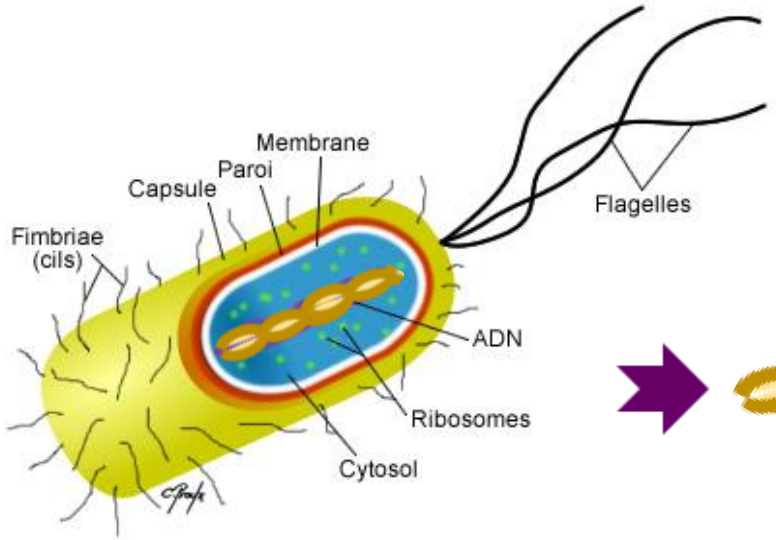
Les bactéries

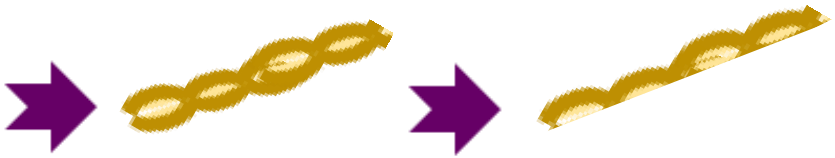


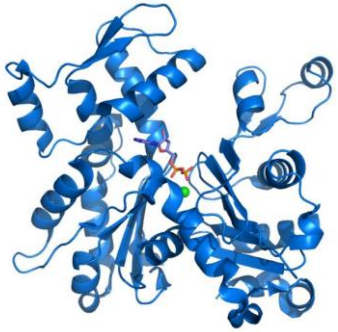
Les levures et moisissures



- **Génome :** ensemble du matériel génétique d'un organisme = ensemble de son ADN.
- **ADN** : support de l'information génétique, permettant notamment le développement, le fonctionnement physiologique et métabolique des êtres vivants.
- **ADN** : composé de deux brins complémentaires , enroulés en hélice. C'est un acide nucléique, au même titre que l'acide ribonucléique (ARN).







Enzymes du métabolisme du lactose

Acides aminés

Acides gras volatils

Bactériocines

Etc…

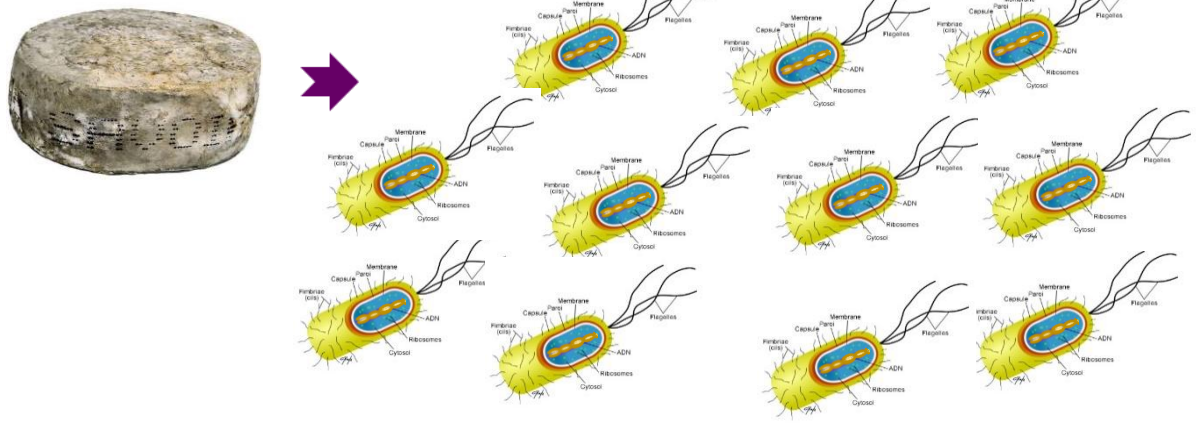
Cellule **ADN** **ARN** **Protéine**

Projet affilié au RMT
Filières Fromagères Valorisant leur Terroirs

ADAMOS

Souche

Ecosystème

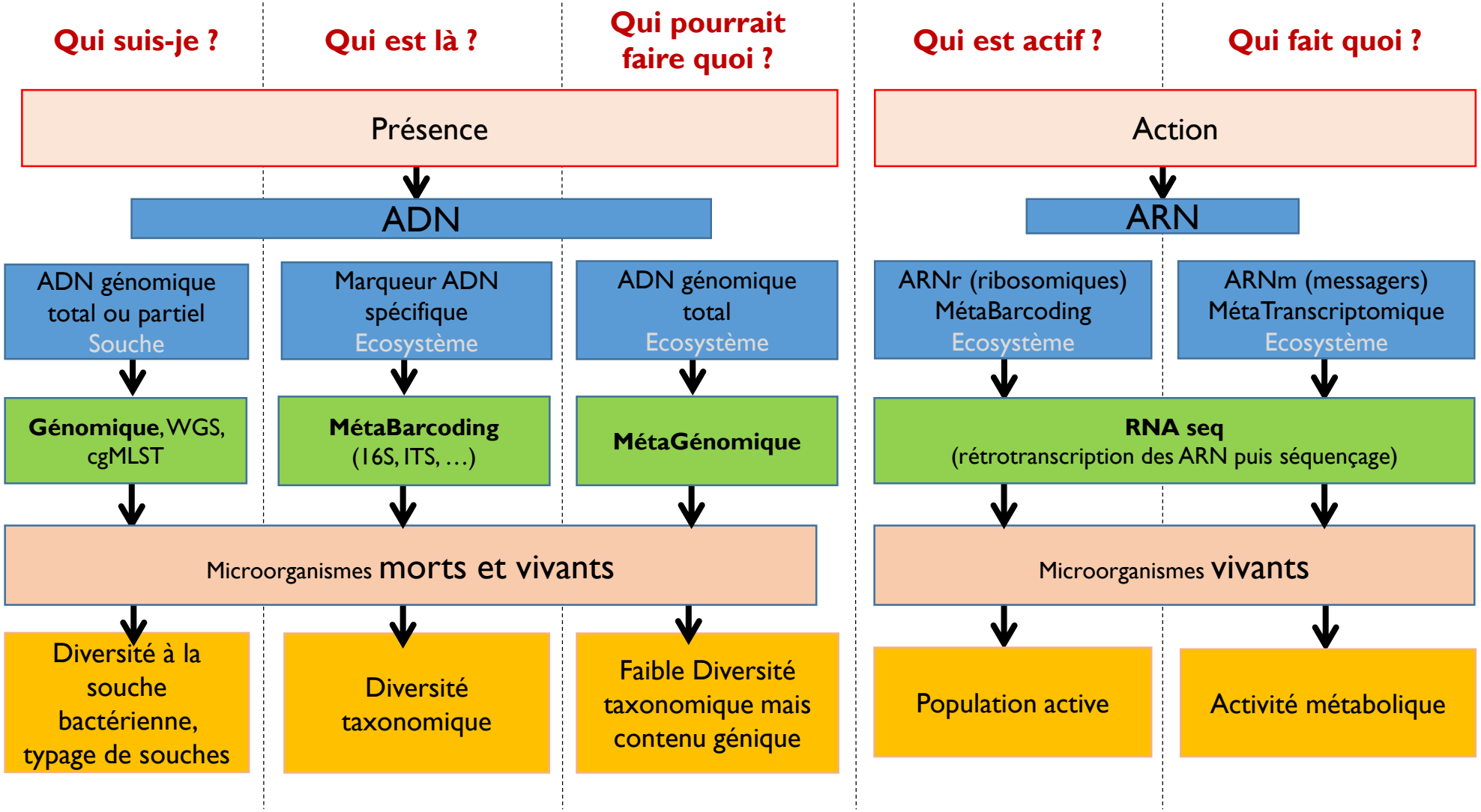


réseau Fromages de Terroirs

Projet affilié au RMT
Filières Fromagères Valorisant leur Terroirs

ADAMOS

AVEC LA CONTRIBUTION FINANCIÈRE DU COMPTE D'AFFECTATION SPÉCIALE DÉVELOPPEMENT AGRICOLE ET RURAL
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION



réseau Fromages de Terroirs

Projet affilié au RMT
Filières Fromagères Valorisant leur Terroirs

ADAMOS

AVEC LA CONTRIBUTION FINANCIÈRE DU COMPTE D'AFFECTATION SPÉCIALE DÉVELOPPEMENT AGRICOLE ET RURAL
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

Quelles sont les grandes étapes des méthodes –omiques ADN ?

réseau Fromages de Terroirs

Projet affilié au RMT
Filières Fromagères Valorisant leur Terroirs

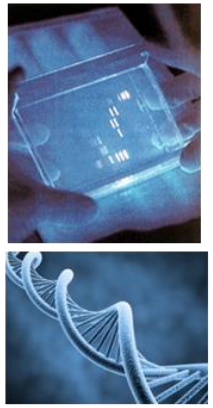
Les grandes étapes

AVEC LA CONTRIBUTION FINANCIÈRE DU COMPTE D'AFFECTATION SPÉCIALE DÉVELOPPEMENT AGRICOLE ET RURAL
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

Se questionner → **Echantillonner** → **Extraire** → **Amplifier** → **Séquencer** → **Identifier, caractériser**

Prélèvements

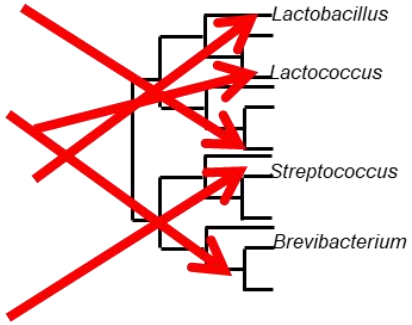
Extraction de l'ADN total



Amplification de 16S (bactéries), ITS (champignons)…

Si MétaBarcoding uniquement

Séquençage



Identification, recherche de gènes spécifiques (métaG),…

réseau Fromages de Terroirs

Projet affilié au RMT
Filières Fromagères Valorisant leur Terroirs

La 1ère étape : bien penser son besoin et son protocole d'échantillonnage !

AVEC LA CONTRIBUTION FINANCIÈRE DU COMPTE D'AFFECTATION SPÉCIALE DÉVELOPPEMENT AGRICOLE ET RURAL
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

Est-ce que la méthode utilisée me permettra d'obtenir des réponses ?

► Quelle(s) question(s) ?

Il est important de poser la ou les bonnes questions en lien avec la problématique !
Les outils omiques ne sont pas adaptés à toutes les questions !

► Quel outil utiliser pour répondre à la question ?

MétaBarcoding?
MétaGénomique ?
Génomique (WGS) ?
Outils transcriptomiques ?

Méthodes non quantitatives

Difficultés de perception des flores sous-dominantes

Exploitation des résultats en comparatif

réseau Fromages de Terroirs

Projet affilié au RMT
Filières Fromagères Valorisant leur Terroirs

La 1ère étape : bien penser son besoin et son protocole d'échantillonnage !

► **Importance du protocole de prélèvement** pour répondre correctement à la (aux) question(s) !

Echantillonnage suffisant ?

Adaptation de la prise d'essai -> quantité d'ADN suffisante

Représentativité de l'échantillonnage ?

Séparation pâte et croûte
Importance de la zone de prélèvement sur un gros fromage (géographie)
Brassage / homogénéisation si liquide
Prise en compte de la variabilité (entre les fromages, les cuves, les journées…)

« Blocage en l'état » des échantillons

Pour les analyses ADN, blocage de l'évolution de l'échantillon : d'autant plus pour les prélèvements en cuve ou en cours d'acidification (évolution rapide de T° / niveaux de flores)

Projet affilié au RMT
Filières Fromagères Valorisant leur Terroirs

La 1ère étape : bien penser son besoin et son protocole d'échantillonnage !

Variables explicatives

Métadonnées : caractéristiques des échantillons et données technologiques associées (suivi technique, questionnaire, enregistrements…)

Approche semi-quantitative

Une analyse microbio pasteurienne globale (GT, levures…) ou ciblée suivant la question permettra de donner un niveau au % affiché par le résultat -omique

Lien avec des références connues

Besoin pour les utilisateurs de « connecter » ces nouvelles données avec leur référentiel habituel

► **Importance des analyses complémentaires** en fonction des questions et de la **collecte des métadonnées associées**

Ne pas négliger les traditionnelles méthodes dans la construction de l'approche omique!

Relativiser les résultats

Ex : un écart constaté entre 2 échantillons en Lb bulgaricus a-t-il un impact -> lien avec le résultat en Lactates D

réseau Fromages de Terroirs

Projet affilié au RMT
Filières Fromagères Valorisant leur Terroirs

2ème étape : préparation des échantillons

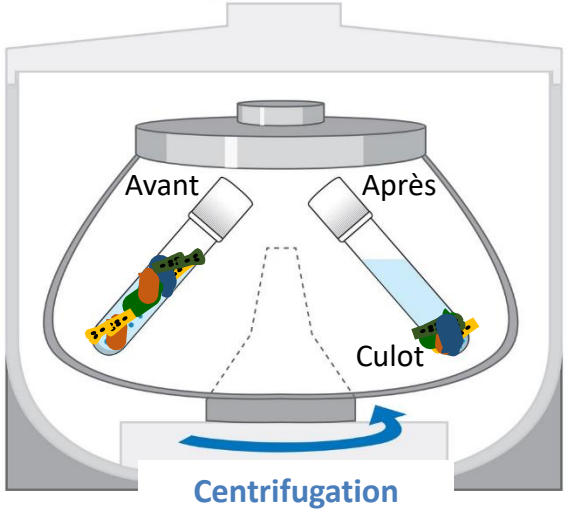
AVEC LA CONTRIBUTION FINANCIÈRE DU COMPTE D'AFFECTATION SPÉCIALE DÉVELOPPEMENT AGRICOLE ET RURAL
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

A privilégier quand possible

Conservation

Pesée

Lavages, élimination MG, centrifugation



Collecte des cellules microbiennes

réseau Fromages de Terroirs

Projet affilié au RMT
Filières Fromagères Valorisant leur Terroirs

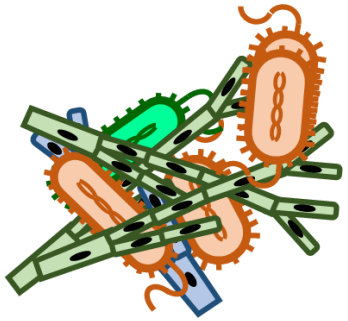
3ème étape : extraction d'ADN des cellules

AVEC LA CONTRIBUTION FINANCIÈRE DU COMPTE D'AFFECTATION SPÉCIALE DÉVELOPPEMENT AGRICOLE ET RURAL
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

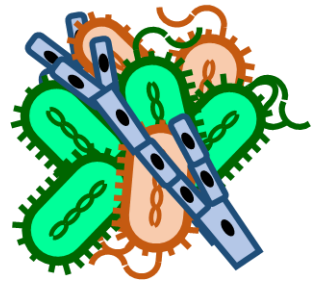
Eclatement des parois des cellules

Elimination des débris & contrôles qualité

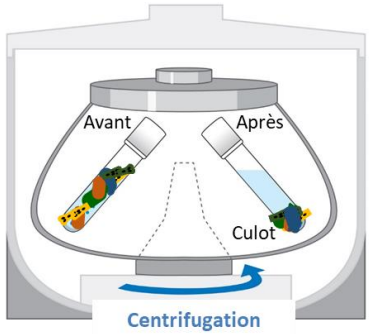
Lait 1

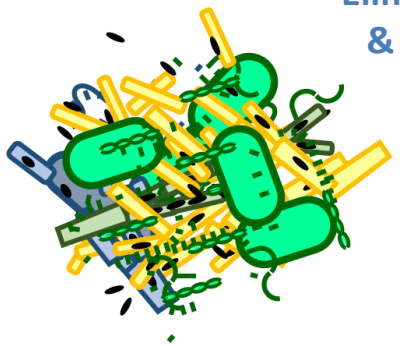


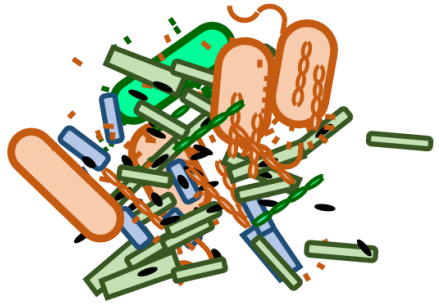
Lait 2

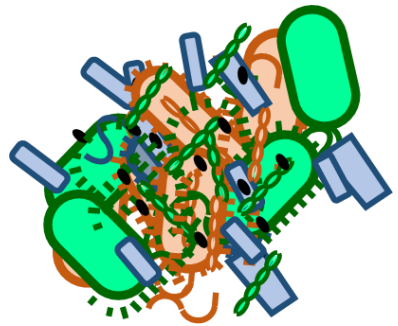


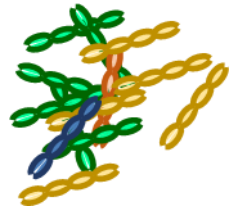
Fromage 1

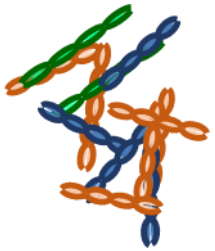


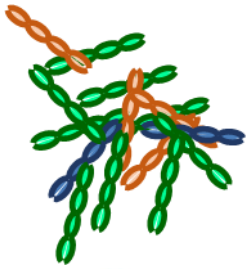








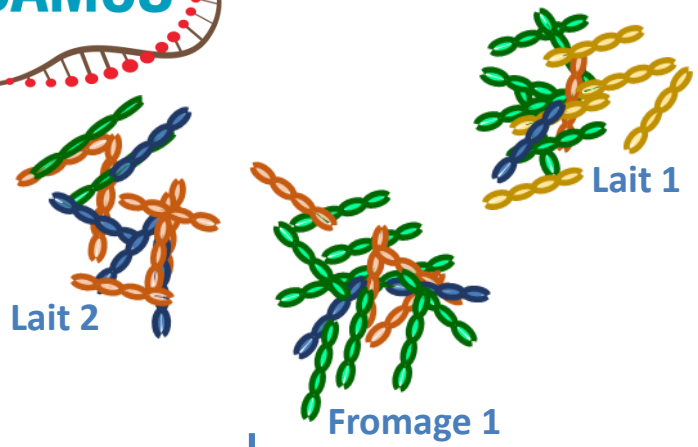




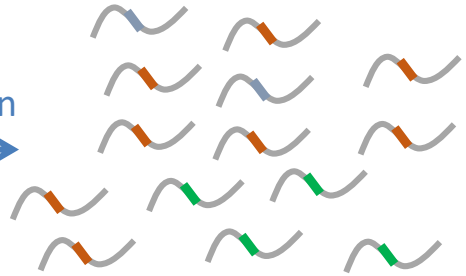
réseau Fromages de Terroirs

Projet affilié au RMT
Filières Fromagères Valorisant leur Terroirs

4ème étape : amplification (si MétaBarcoding) & séquençage



Amplification

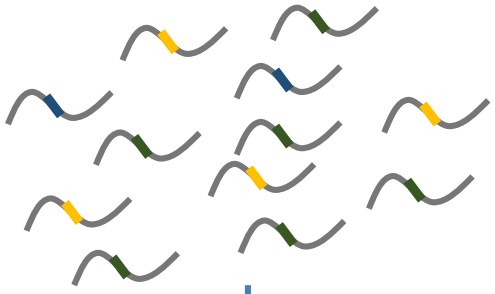


Sélection du marqueur bactérien

Séquençage

lectures

Amplification



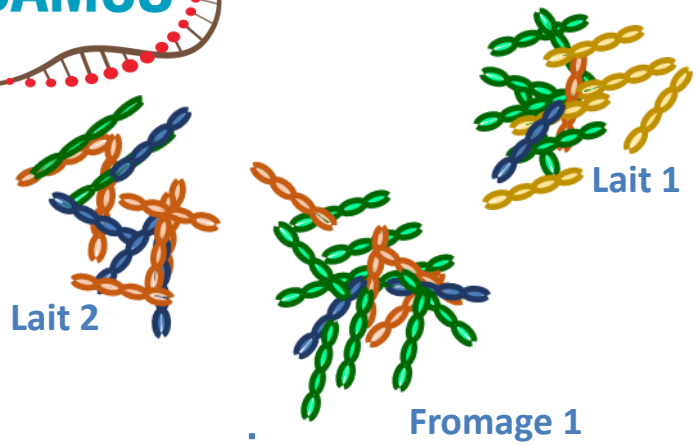
Sélection du marqueur « moisissures »

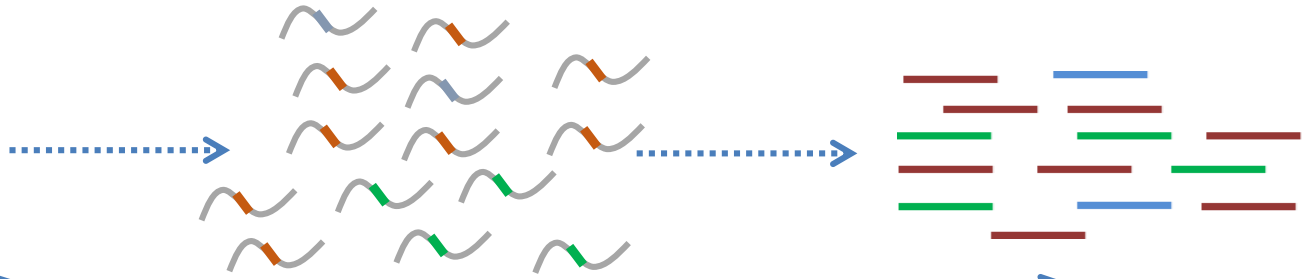
Séquençage

lectures

Projet affilié au RMT
Filières Fromagères Valorisant leur Terroirs

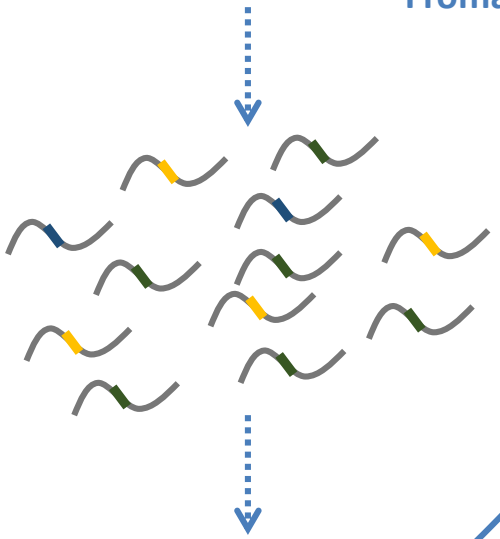
4ème étape bis : séquençage directement si MétaGénomique





lectures

Séquençage directement si MétaGénomique



Séquençage directement si MétaGénomique

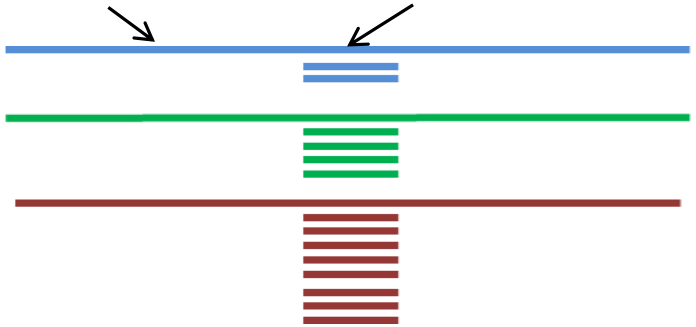
lectures

Projet affilié au RMT
Filières Fromagères Valorisant leur Terroirs

5ème étape : traitement bioinformatique pour le MétaBarcoding

AVEC LA CONTRIBUTION FINANCIÈRE DU COMPTE D'AFFECTATION SPÉCIALE DÉVELOPPEMENT AGRICOLE ET RURAL
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

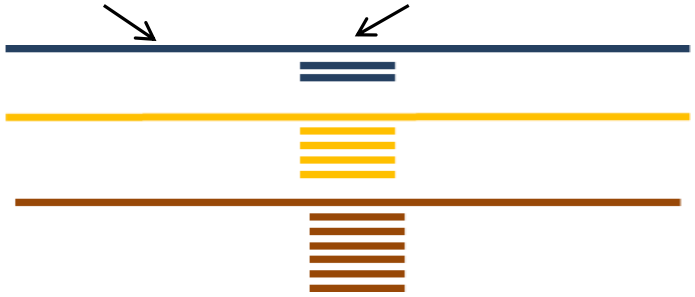
Génomes bactériens de référence — Marqueur bactérien



ATTGGCGCTGTACAGGTACGA *Lactococus lactis*
ATTGGCGCTGTACAGGTACGA *Lactobacillus delbrueckii*
ATTGGCGCTGTACAGGTACGA *Leuconostoc spp.*

	Comptage
Lactococcus lactis	2
Lactobacillus delbrueckii	4
Leuconostoc spp.	8

Génomes moisissure de référence — Marqueur « moisissures »



ATTGGCGCTGTACAGGTACGA *Geotrichum candidum*
ATTGGCGCTGTACAGGTACGA *Saccharomyces spp.*
ATTGGCGCTGTACAGGTACGA *Fusarium spp.*

	Comptage
Geotrichum candidum	2
Saccharomyces spp.	4
Fusarium spp.	6

Clustering
Regroupement des séquences (presque) identiques entre elles

Affiliation taxonomique
Identification des OTUs présents. Précision jusqu'au niveau du genre et parfois jusqu'à l'espèce.

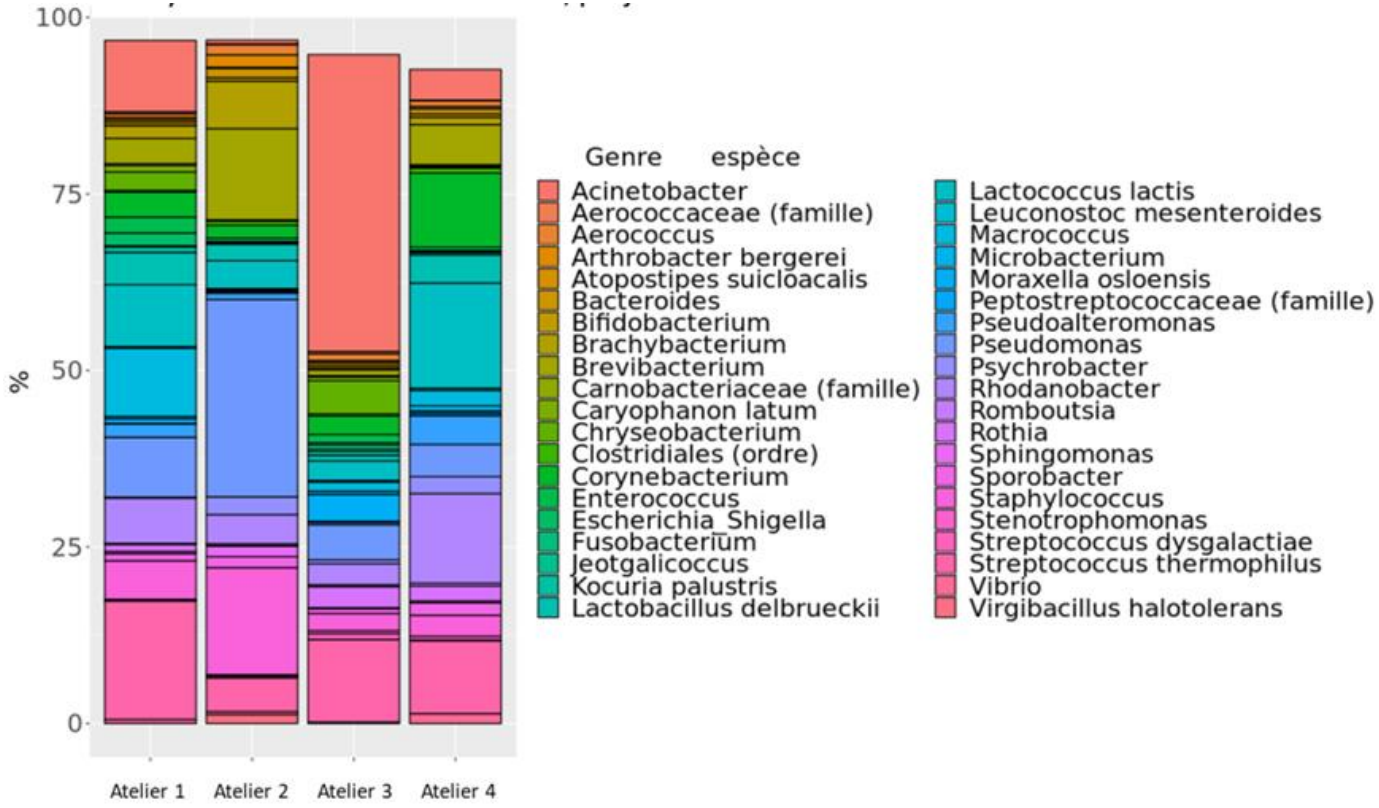
Production de la table de comptage
Tableau permettant de récapituler le nombre de reads obtenus pour chacun des clusters

Projet affilié au RMT
Filières Fromagères Valorisant leur Terroirs

5ème étape : traitement bioinformatique pour le MétaBarcoding

AVEC LA CONTRIBUTION FINANCIÈRE DU COMPTE D'AFFECTATION SPÉCIALE DÉVELOPPEMENT AGRICOLE ET RURAL
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

Exemple : diversité bactérienne au sein de laits crus de différents ateliers (Projet Erasmo)



- ► Travail en comparatif
- ► Ne pas oublier de remettre à la lumière des analyses complémentaires (GT, senso,…)