

# Intérêt des méthodes -omiques appliquées aux fromages

## Pourquoi utiliser les méthodes -omiques?

Près de 10 ans après le séquençage du premier microbiote intestinal humain, grâce au développement des séquenceurs haut-débit ou NGS (« New Generation Sequencing »), le champ d'application des nouvelles approches -omiques s'est ouvert à une grande variété d'écosystèmes microbiens.

Ces techniques permettent le séquençage d'un grand nombre de séquences d'ADN simultanément (plusieurs millions) à l'échelle d'un organisme ou d'un écosystème. Il existe différentes méthodes de NGS selon qu'elles ciblent l'ADN (le patrimoine génétique d'un individu) ou l'ARN (représentant les fonctionnalités métaboliques exprimées à un instant T). Il est ainsi possible de répondre à plusieurs questions sur les écosystèmes :

Qui est là ? Qui pourrait faire quoi ?  
 Qui est actif ? Qui fait quoi ?

Pour les filières agroalimentaires, le **potentiel de ces nouvelles méthodes de séquençage est énorme**. Elles permettent entre autres d'identifier les microorganismes responsables d'une altération, de suivre la dynamique de l'écosystème durant une phase de maturation, d'évaluer l'impact des intrants et des process sur les écosystèmes ...

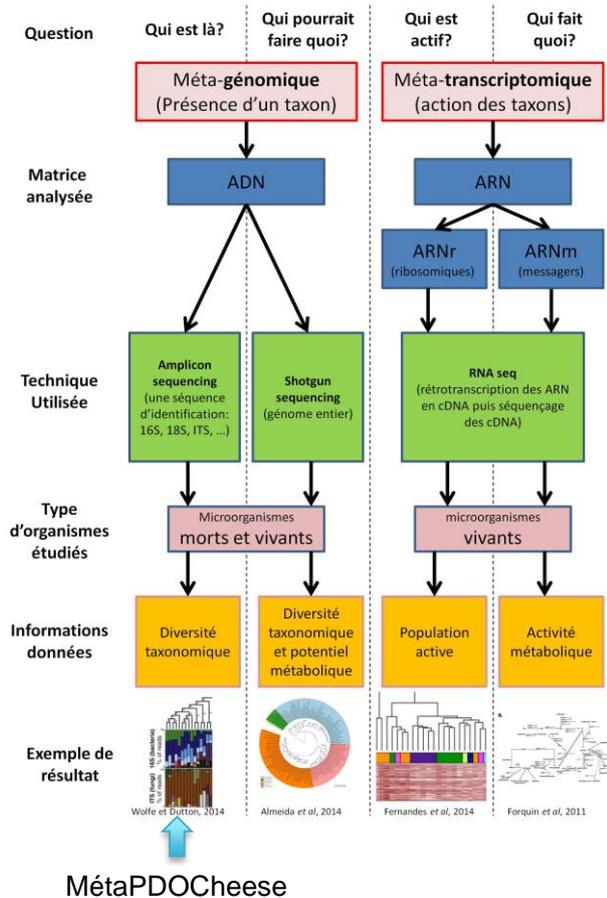
Un fromage est un écosystème diversifié dans lequel se côtoie des bactéries, des levures et des moisissures. **Grâce au metabarcoding, on peut détecter plus d'une centaine de taxons** (espèce, genre ou grand groupe d'espèces). Il serait impossible de les étudier avec les méthodes de microbiologie classiques dites « pasteurienne ».

La première phase du **projet MétaPDOCheese** a pour but d'évaluer la biodiversité microbienne des AOP fromagères françaises. C'est la technique « amplicon sequencing » ou « metabarcoding » qui a été choisie.

### Exemple de microorganismes fromagers

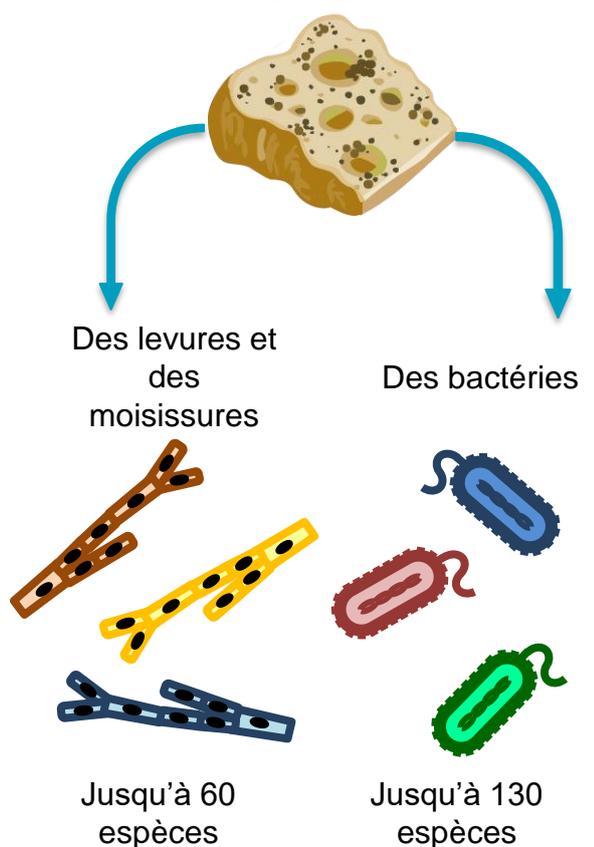
Nom	Groupe	Rôle
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Espèce bactérienne	acidification
<i>Brevibacterium</i>	Genre bactérien	affinage
<i>Pseudomonas</i>	Genre bactérien	altération
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Espèce de Levure	affinage
<i>Fusarium domesticum</i>	Espèce de Moisissure	affinage de la croûte
<i>Penicillium</i>	Genre de Moisissure	affinage de la croûte

## Les méthodes « omiques »



MétaPDOCheese

## Le microbiote fromager est diversifié



# Comment fonctionne le métabarcoding?

Dans un premier temps, il est nécessaire de réaliser une **extraction d'ADN (1)** à partir de la matrice laitière/fromagère.

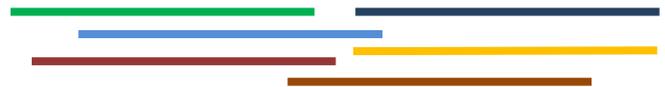
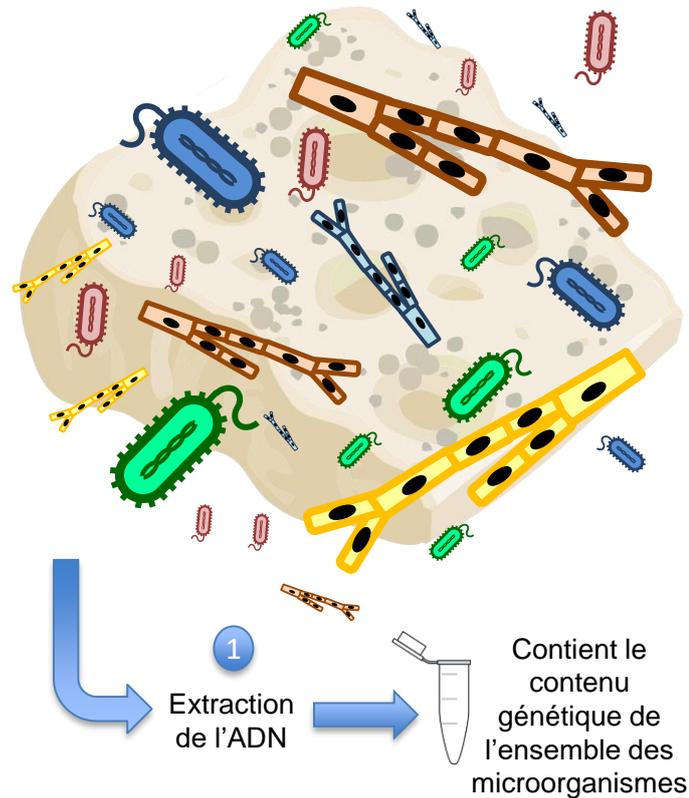
Ensuite, une portion ciblée d'ADN, appelée « marqueur taxonomique », présente chez tous les microorganismes mais dont la séquence varie d'une espèce (ou d'un genre) à l'autre, est amplifiée (2) par PCR (plusieurs milliers de fois). Chez les bactéries, il s'agit du marqueur ADNr 16s, chez les levures et les moisissures, c'est l'ITS 1 ou l'ITS 2. **Les marqueurs amplifiés** sont appelés amplicons.

Tous les **amplicons sont alors séquencés (3)** grâce à une méthode de séquençage haut débit qui permet d'établir le contenu des séquences d'ADN amplifiées. 25 millions de séquences ou « lectures » peuvent être obtenues en quelques jours.

Un **traitement bio-informatique** permet de « nettoyer » les séquences et de les regrouper par homologie en **OTU** (Unité Taxonomique Opérationnelle). Une table d'OTU est ainsi générée avec le comptage des séquences pour chaque OTU. Une séquence représentative de chaque OTU est ensuite assignée à un nom d'espèce ou de genre en comparant cette séquence à une banque de référence (4) (ex. Silva).

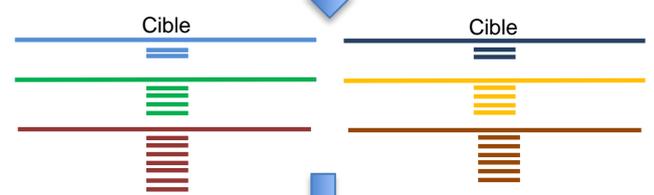
On peut alors déduire **l'abondance relative** de chaque espèce ou genre (% de chaque OTU), composant la communauté microbienne (5) d'un échantillon de fromage.

## Analyse de l'écosystème microbien fromager au moyen du métabarcoding

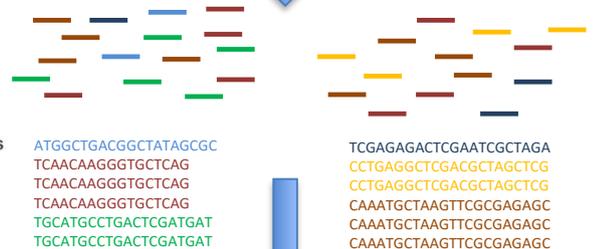


Sur l'ensemble du contenu génétique, un marqueur taxonomique est ciblé, et amplifié par PCR

Limite : 0,01 %



3 Les amplicons sont séquencés

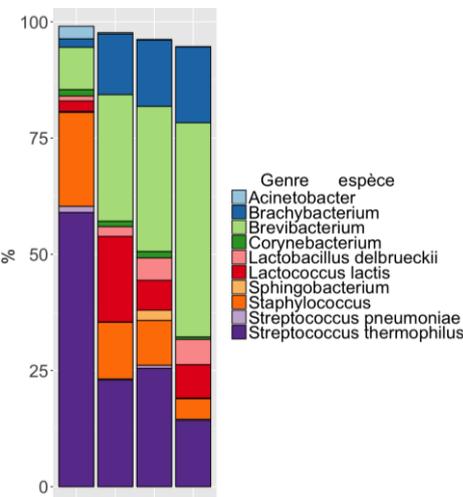


4 Les séquences sont nettoyées, regroupées en OTU, comptées et annotées en les comparant à une base de données de référence

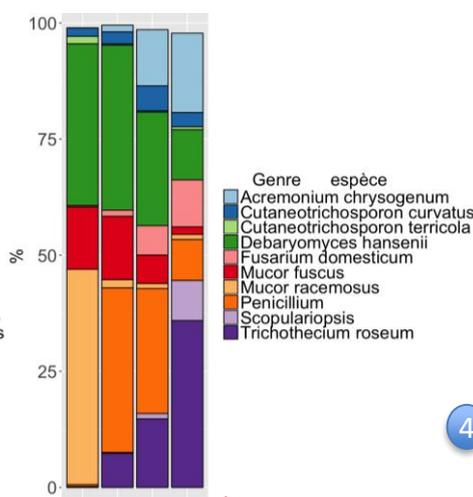
ATGGCTGACGGCTATAGCGC -> *Lactococcus lactis* : 1  
 TCAACAAGGGTGCTCAG -> *Streptococcus thermophilus* : 3  
 TGCATGCCTGACTCGATGAT -> *Lactobacillus delbrueckii* : 2

## Exemple de résultats

### Bactéries Croûte



### Levures moisissures Croûte



Affinage

Affinage

5 Abondance relative (en %) de chaque taxon