



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



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

Atelier BAba de la métagénomique

Valérie Barbe (Génoscope) et Sarah Chuzeville (Actalia)



Projet affilié au RMT
Filières Fromagères Valorisant leur Terroirs

Maison du Lait, Paris,
le mardi 21 janvier 2020



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

Quelles possibilités avec les outils –omiques ?

► *ADN versus ARN*

Question

Qui est là?

Qui pourrait faire quoi?

Matrice analysée

Technique Utilisée

Type d'organismes étudiés

Informations données

Présence

ADN

MétaBarcoding
(un marqueur spécifique
16S, 18S, ITS, ...)

MétaGénomique
(génomes entiers)

Microorganismes morts et vivants

Diversité
taxonomique

Faible Diversité
taxonomique mais
contenu génique

Action

ARN

ARNr (ribosomiques)
MétaBarcoding

ARNm (messagers)
MétaTranscriptomique

RNA seq
(rétrotranscription des ARN puis séquençage)

Microorganismes vivants

Population active

Activité métabolique

Quelles sont les grandes étapes des méthodes –omiques ADN ?

Echantillonner



Extraire



Amplifier



Séquencer



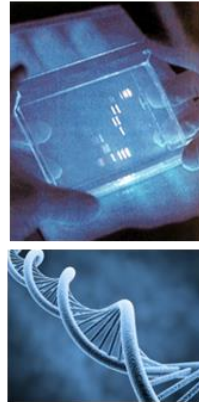
Identifier, caractériser



Prélèvements



Extraction de
l'ADN total

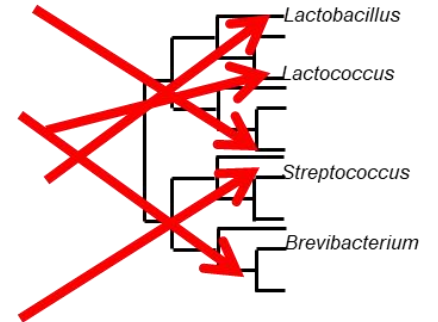


Amplification de
16S (bactéries), ITS
(champignons)...

*Si
MétaBarcoding
uniquement*



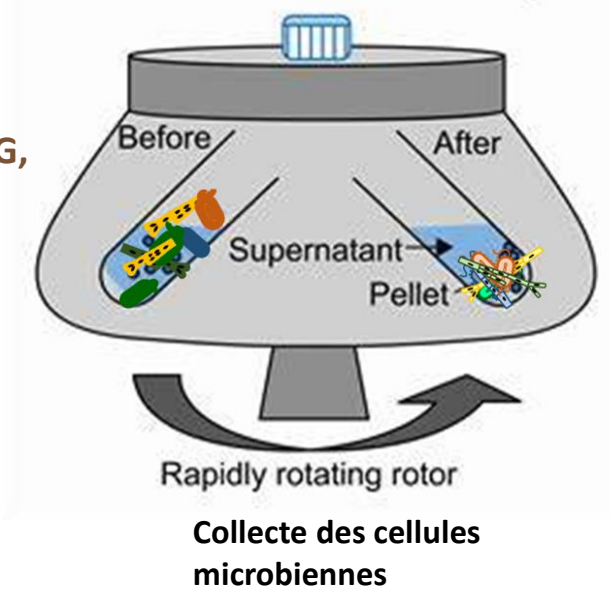
Séquençage

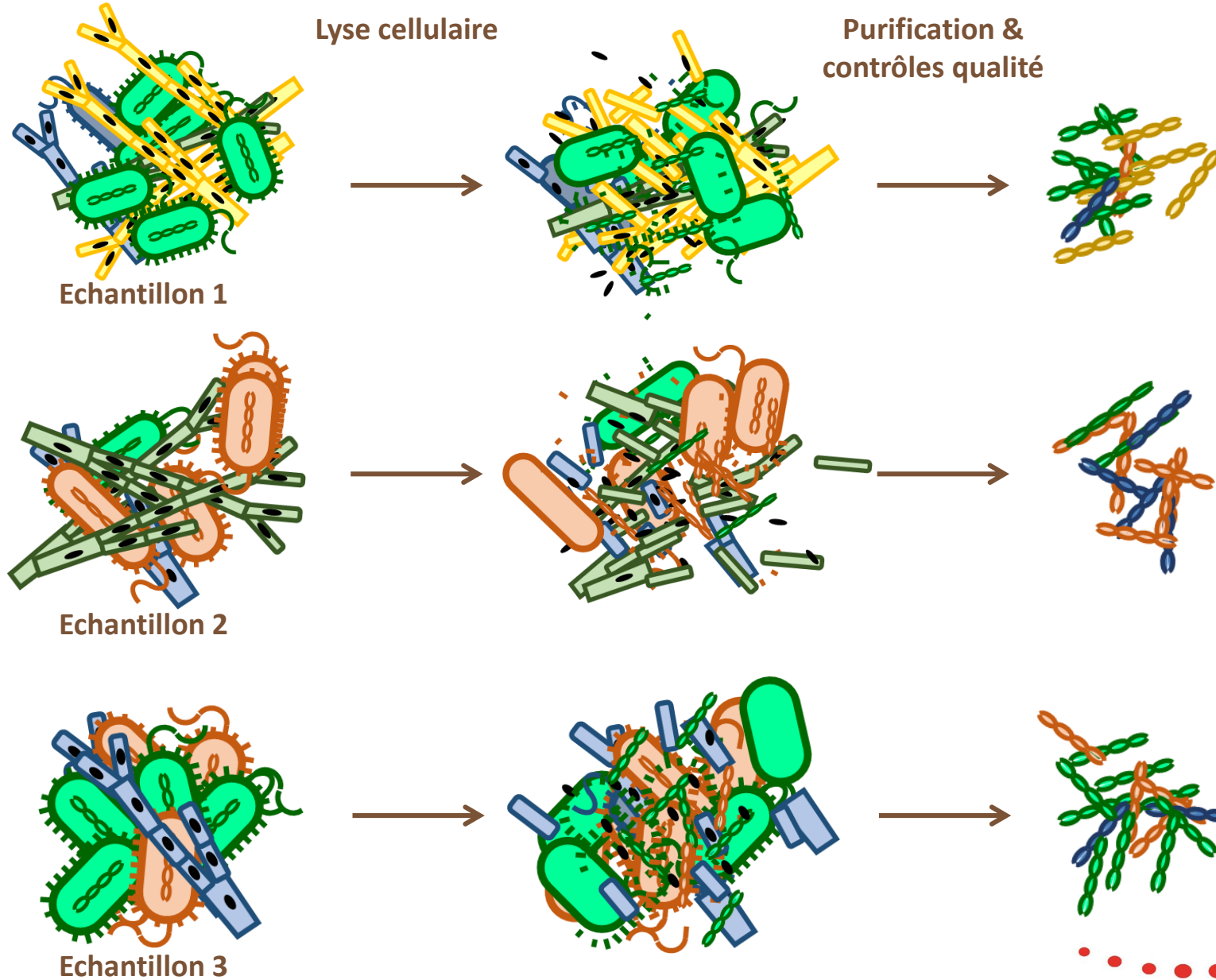
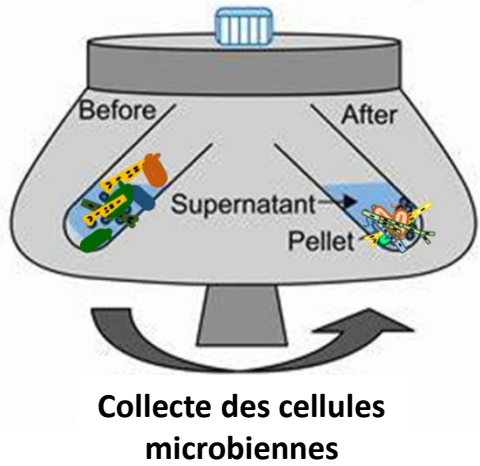


Identification, recherche
de gènes spécifiques
(métaG),...



- ▶ **Quelle(s) question(s) ?** Importance de poser les bonnes questions en lien avec la problématique !
- ▶ **Quel outil utiliser pour répondre à la question ?** MétaBarcoding ou MétaGénomique ? Outils transcriptomiques ? Est-ce que la méthode utilisée me permettra d'obtenir des réponses ?
- ▶ **Importance du protocole de prélèvement** pour répondre correctement à la (aux) question(s) ! Echantillonnage suffisant ? Représentativité de l'échantillonnage ? Profondeur de séquençage ? Importance d'avoir les mêmes protocoles pour comparer et utiliser des BDD communes...
- ▶ **Importance des analyses complémentaires** en fonction des questions : ne pas négliger les « anciennes » méthodes (physicochimiques, microbiologiques dont germes totaux, ...)

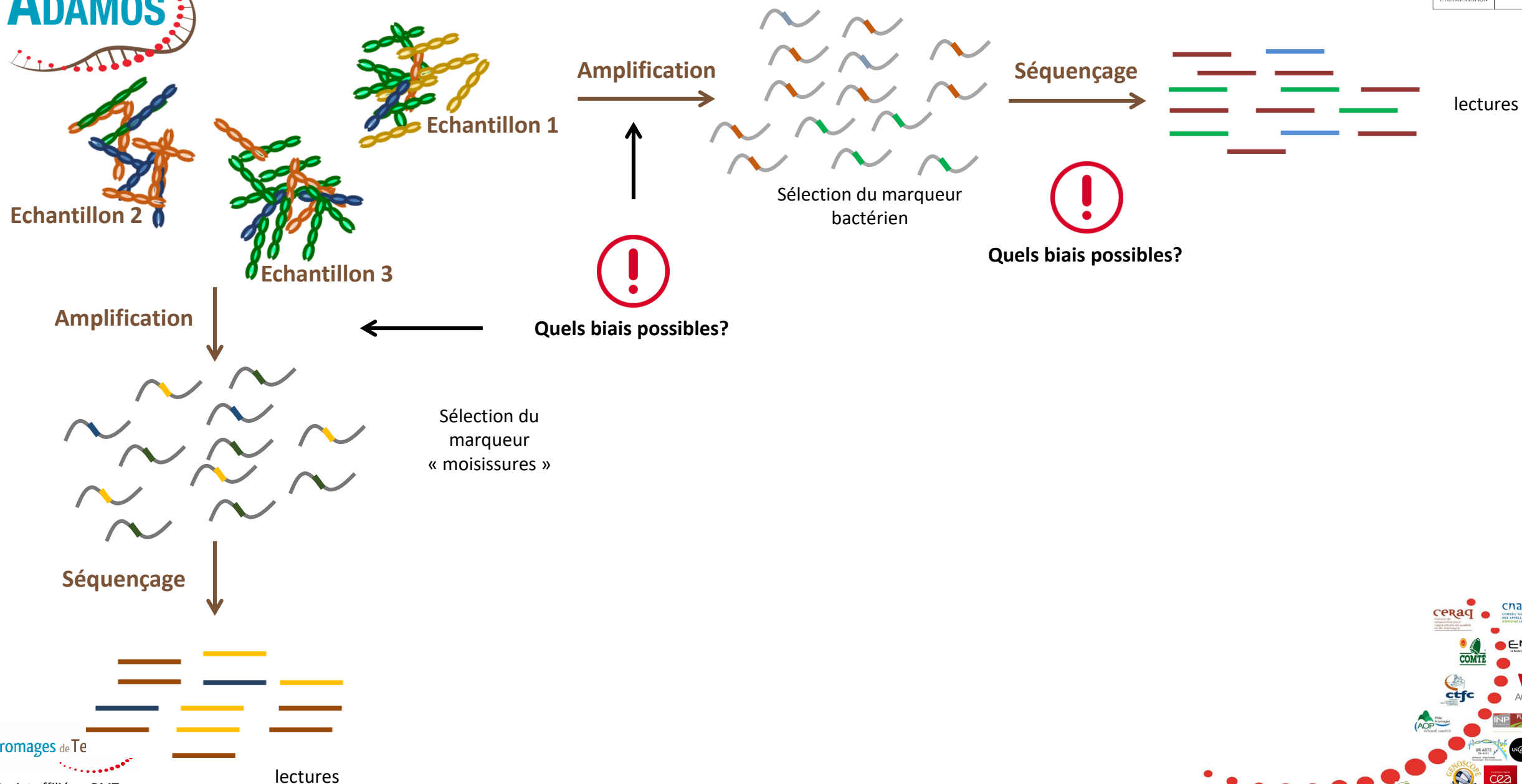




Quels biais possibles?

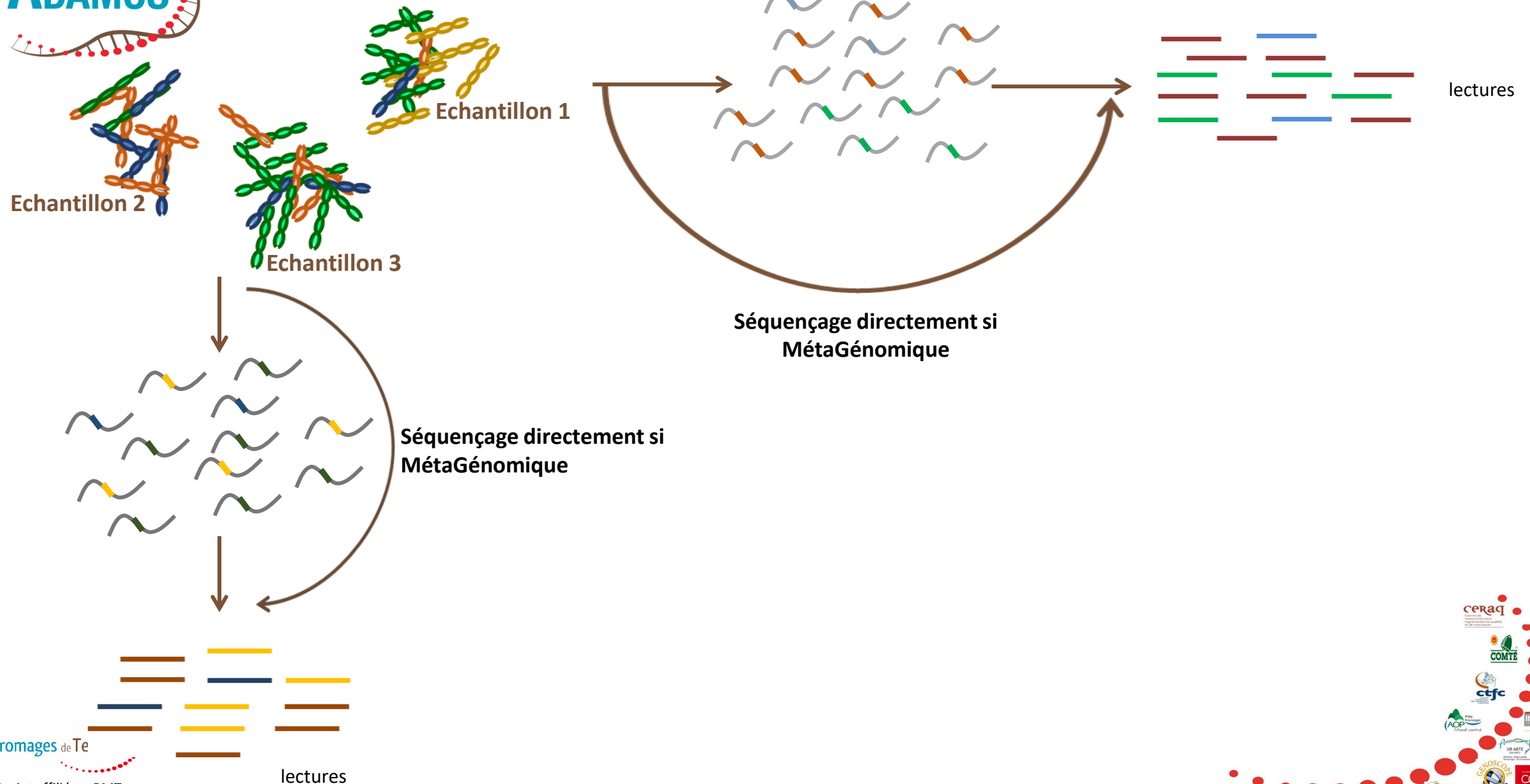


4^{ème} étape : amplification (si MétaBarcoding) & séquençage





4ème étape bis : séquençage directement si MétaGénomique

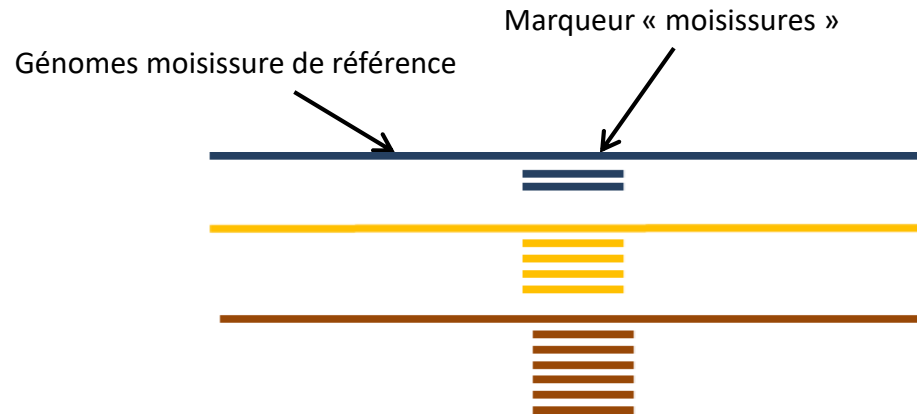
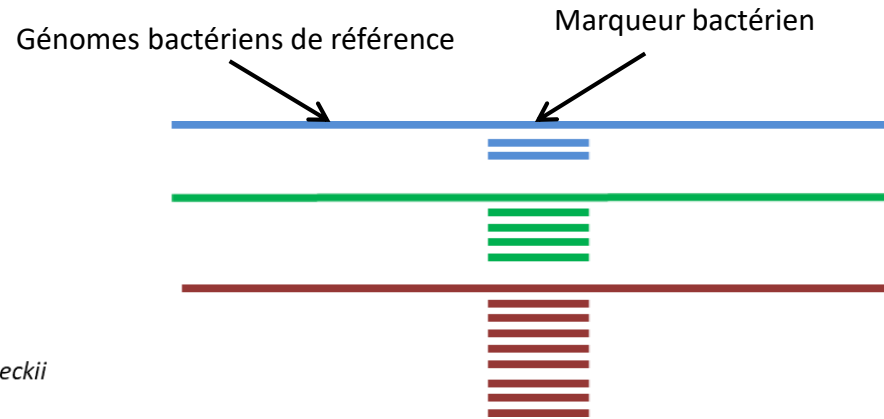




5^{ème} étape : traitement bioinformatique pour le MétaBarcoding

Passer des lectures brutes à un comptage par taxon

- ATTGGCGCTGTACAGGTACGA *Lactococcus lactis*
- ATTGGCGCTGTACAGGTACGA *Lactobacillus delbrueckii*
- ATTGGCGCTGTACAGGTACGA *Leuconostoc spp.*
- ATTGGCGCTGTACAGGTACGA *Geotrichum candidum*
- ATTGGCGCTGTACAGGTACGA *Saccharomyces spp.*
- ATTGGCGCTGTACAGGTACGA *Fusarium spp.*



► Nettoyage des données brutes

► **Clustering** : regroupement des Séquences (presque) identiques (dépend de l'outil utilisé).

► Production de la table de comptage

► **Inventaire taxonomique** : qui est là ?



Biais

Dans quel cadre utiliser ces outils ?

- ▶ *Quels exemples d'applications pourriez-vous imaginer ?*
- ▶ *Quelles applications avez-vous besoin ?*