



*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
CASDAR

 **MINISTÈRE
DE L'AGRICULTURE
ET DE L'ALIMENTATION**
*Liberté
Égalité
Fraternité*

Les méthodes meta-omiques

Eric Dugat-Bony (INRAE SAYFOOD)

Séminaire final • 26/04/2023 • Paris



Projet affilié au RMT
Filières Fromagères Valorisant leur Terroirs



INRAE



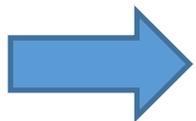
*Un nouveau regard sur les écosystèmes laitiers et fromagers :
Adaptation, développement et appropriations des méthodes
omiques à des fins d'écologie microbienne*

Contexte

Un écosystème microbien... qu'est-ce que c'est ?

Définitions :

- Écosystème : un assemblage d'êtres vivants interagissant avec son environnement physique associé et localisé en un lieu spécifique (Tansley, 1935)
- Microorganisme : un organisme vivant invisible à l'oeil nu. Comprend les bactéries, les archées, les eucaryotes unicellulaires (champignons et protistes) et les virus

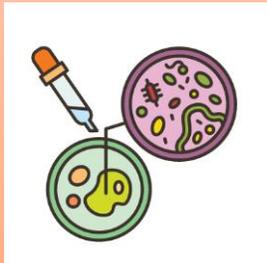


Un écosystème microbien est un écosystème dont la composante biologique est constituée de microorganismes

Comment les étudier ?

Des méthodes basées sur l'isolement (culture-dependantes)

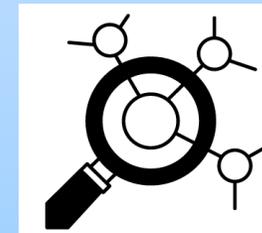
- Dénombrements (flore totale ou milieux spécifiques)
- Etudes physiologiques sur des isolats
 - Etudes de propriétés technologiques d'intérêt sur des isolats



...

Des méthodes basées sur l'étude de molécules signales (culture-independantes)

- ADN
- ARN
- Protéines
- Métabolites
- ...

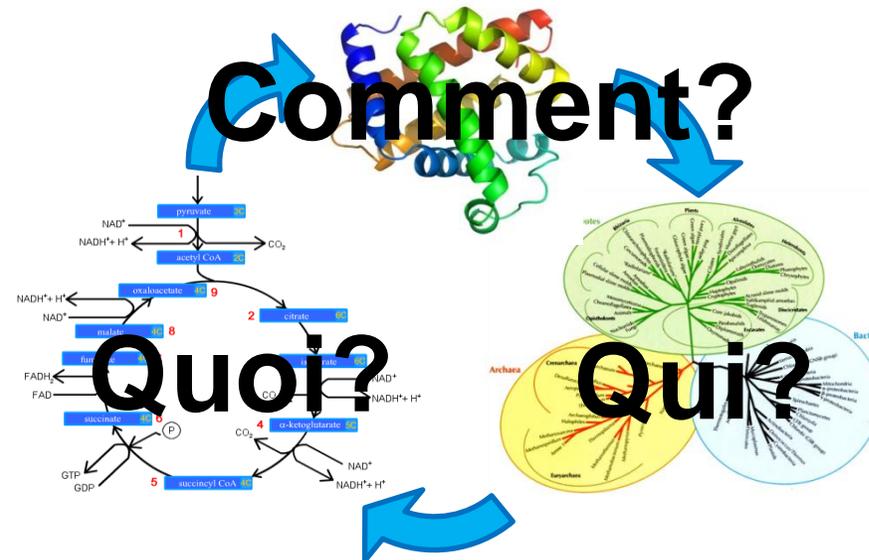


Les méthodes omiques... qu'est-ce que c'est ?

- Un large panel de méthodes cultures indépendantes
- dont le principe est d'étudier des molécules du vivant

Pourquoi faire ?

Ces molécules sont porteuses d'informations, qui peuvent permettre de répondre à certaines questions précises...

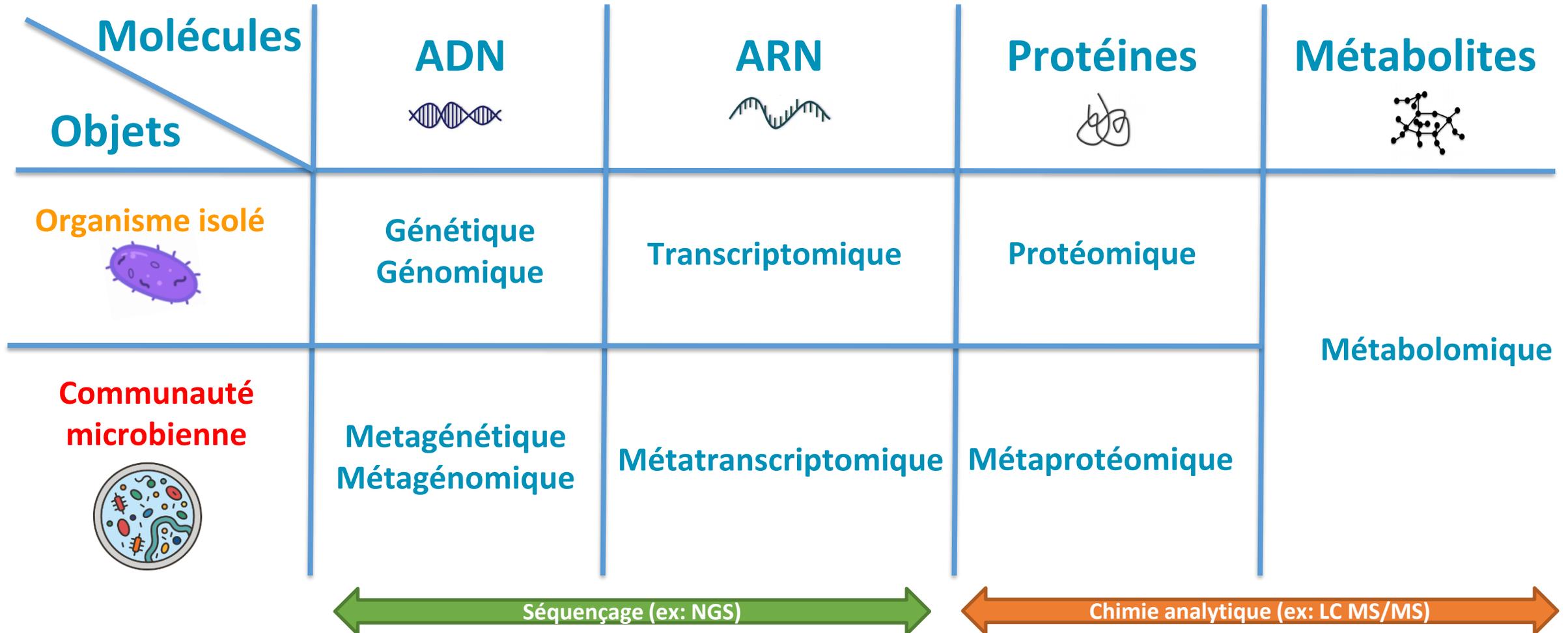




*Un nouveau regard sur les écosystèmes laitiers et fromagers :
Adaptation, développement et appropriations des méthodes
omiques à des fins d'écologie microbienne*

Les différentes méthodes omiques

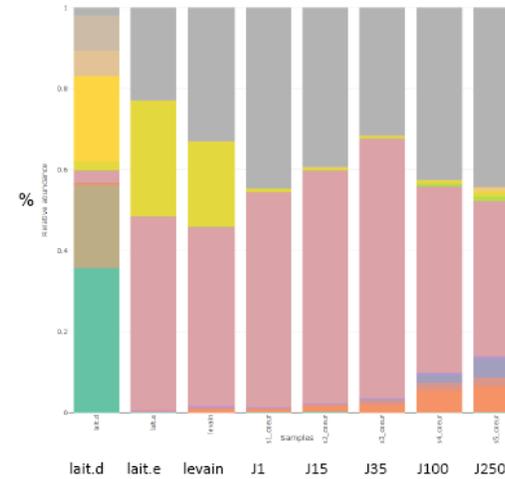
Vue d'ensemble des méthodes omiques



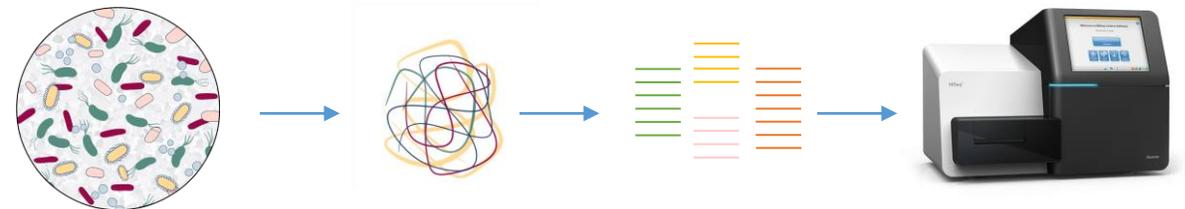
La métagénétique (= metabarcoding)



Objectif : obtenir un profil de la composition microbienne et de son potentiel fonctionnel dans une série d'échantillons



Méthode : amplification d'un marqueur phylogénétique à partir de l'ADN métagénomique puis séquençage massif et comparaison des séquences à des bases de données



La métagénétique (= metabarcoding)



Informations collectées :

- Profils de composition microbienne au niveau genre/espèce
- Inventaire des microorganismes majoritaires et minoritaires
- Abondances relatives de séquences : idée de l'abondance des taxons

Limites :

- ADN : reflet des populations vivantes et mortes
- Abondances relatives \neq abondances absolues
- Echelle souche non accessible



Exemples de questions :

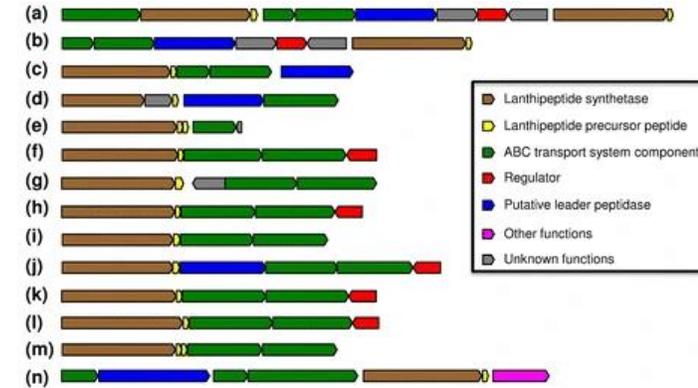
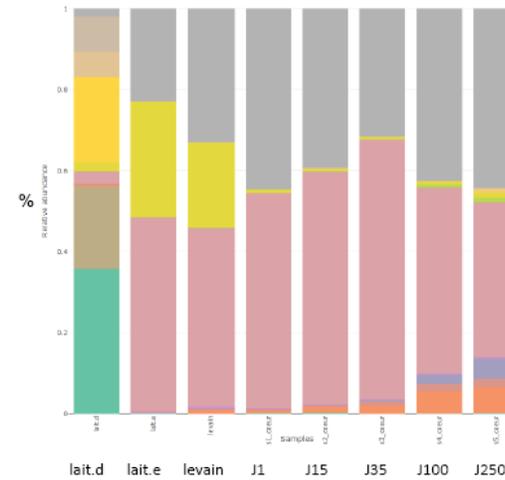
Quelles sont les espèces présentes dans mon produit?

Quel est l'impact de telle pratique sur la composition microbienne?

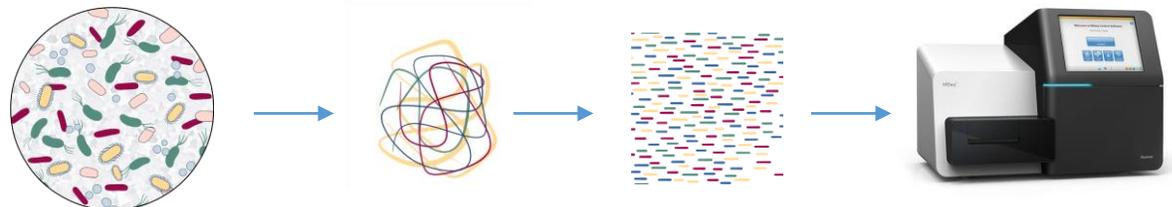
La métagénomique (shotgun)



Objectif : obtenir un profil de la composition microbienne et un inventaire de l'ensemble des gènes portés par les microorganismes (= potentiel fonctionnel)



Méthode : séquençage massif de l'ADN métagénomique, assemblage des lectures et comparaison des séquences (contigs = fragments de génomes) à des bases de données



La métagénomique



Informations collectées :

- Profils de composition microbienne au niveau espèce/souche
- Abondances relatives de séquences : idée de l'abondance des taxons
- Inventaire de gènes présents : potentiel fonctionnel

Limites :

- ADN : reflet des populations vivantes et mortes
- Abondances relatives \neq abondances absolues
- Détection des microorganismes majoritaires principalement
- Pas d'information sur l'expression



Exemples de questions :

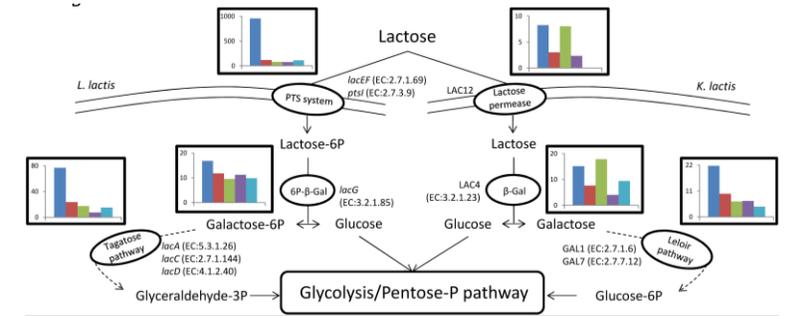
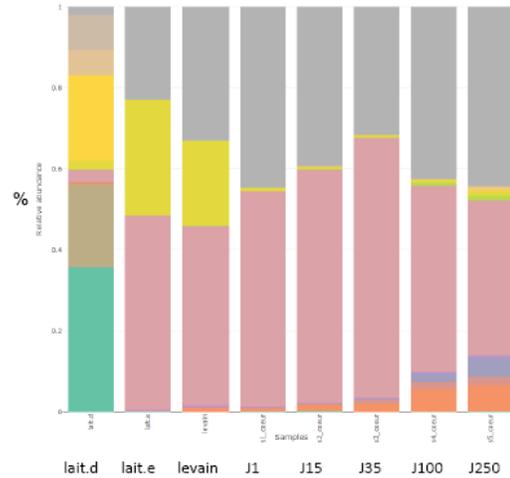
Quelles sont les espèces majoritaires présentes dans mon produit et sont-elles composées de plusieurs souches?

Quelles sont les voies métaboliques présentes dans mon produit? Enrichies dans telle condition de production?

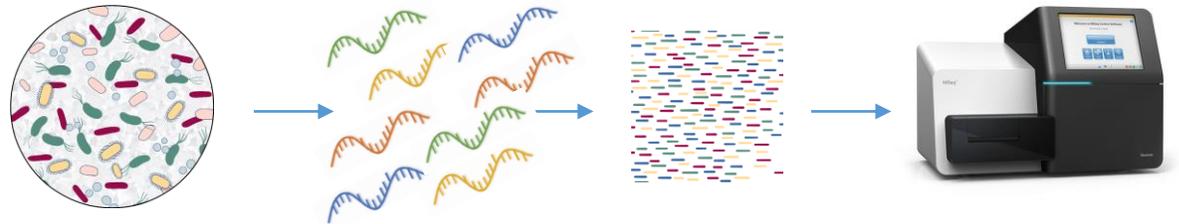
La métatranscriptomique



Objectif : connaître les microorganismes actifs dans un échantillon donné et les principaux gènes exprimés qui témoignent de l'activité métabolique en cours



Méthode : séquençage massif de l'ARN microbien, alignement des lectures sur des génomes de référence et comptage du nombre de lecture s'alignant sur chacun des gènes présents



La métatranscriptomique



Informations collectées :

- Profils de composition microbienne active (vivante) au niveau espèce/souche
- Etat physiologique des microorganismes majoritaires (croissance, stress...)
- Niveaux de transcription de certains gènes codants pour des enzymes responsables de fonctions d'intérêt

Limites :

- ARN : témoigne d'une activité de transcription soit un intermédiaire seulement de l'activité en question
- Certains gènes sont exprimés de manière constitutive, d'autres sont activés ou réprimés en fonction des conditions (régulation transcriptionnelle)
- Détection de l'activité des microorganismes majoritaires principalement



Exemples de questions :

Quelles sont les espèces actives dans mon produit? Dans quel état physiologique se trouvent-elles?

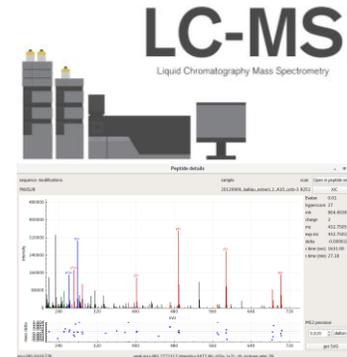
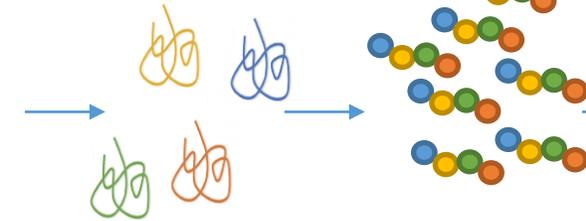
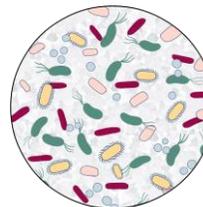
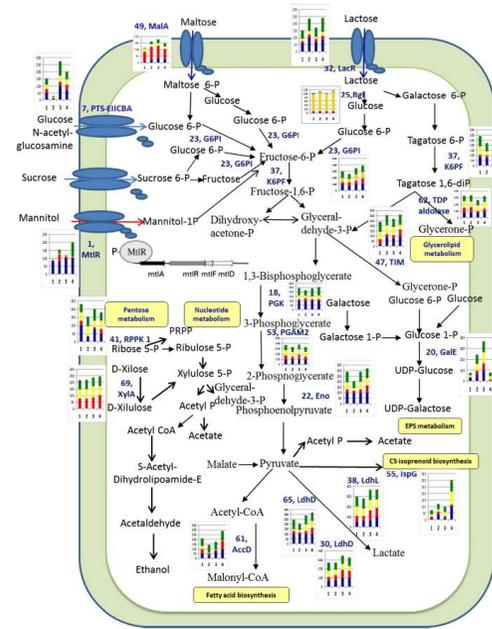
Quelles sont les voies métaboliques exprimées dans mon produit à tel moment?
Sont-elles activées ou réprimées en fonction d'un paramètre de production?

La métaprotéomique



Objectif : connaître les enzymes exprimés dans un échantillon donné pour en déduire l'activité microbienne en cours (métabolisme)

Méthode : digestion des protéines extraites en peptides (trypsine), séparation par chromatographie liquide (LC), analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), comparasion des séquences peptidiques à des bases de données de protéines





Informations collectées :

- Abondance des protéines majoritaires présentes dans l'échantillon
- Expression de métabolismes microbiens en cours (plus proche de l'activité que l'ARN)

Limites :

- Détection des protéines majoritaires principalement
- Difficulté de séparer le signal provenant des protéines d'origine microbienne (ex : enzymes) et des protéines de la matrice (ex : caséine)



Exemples de questions :

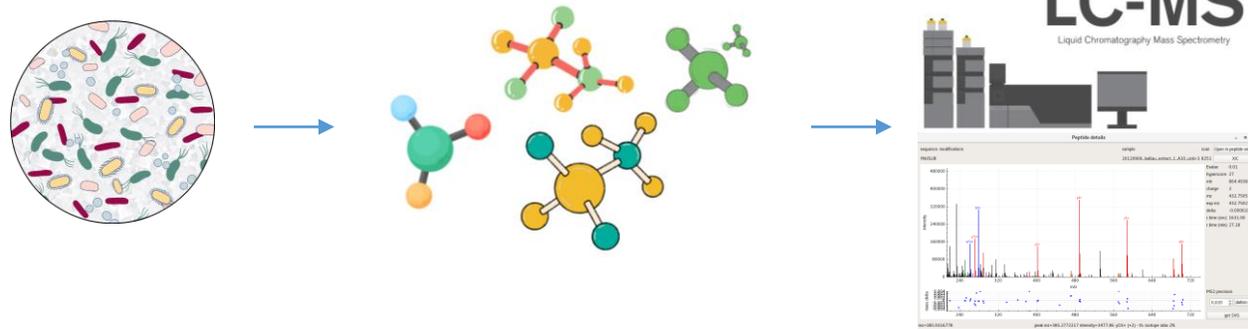
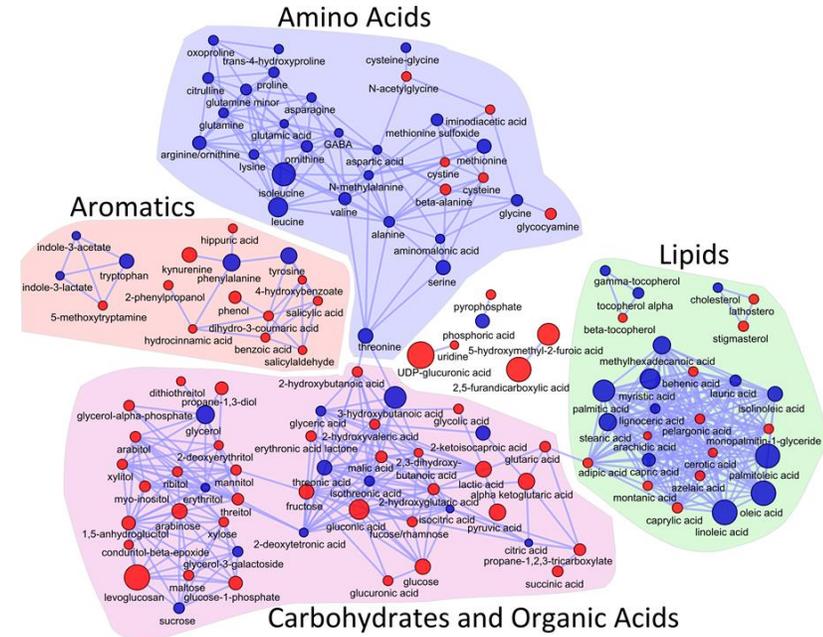
Quelles sont les protéines ou voies métaboliques exprimées dans mon produit à tel moment de la fabrication?

Cette expression varie-t-elle en fonction d'un paramètre de production?

La métabolomique

Objectif : identifier, tracer et cartographier les principaux métabolites (petites molécules) présents dans un échantillon donné

Méthode (la plus courante): extraction des métabolites à partir de l'échantillon, séparation par chromatographie liquide (LC), identification par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)



La métabolomique

Informations collectées :

- Nature des principaux métabolites consommés et produits
- Analyse ciblée ou empreinte métabolique (= métabolome)
- Mesure quantitative possible pour un certain nombre de molécules
- Lien entre les activités microbiennes détectées par d'autres approches et les caractéristiques sensorielles du produit

Limites :

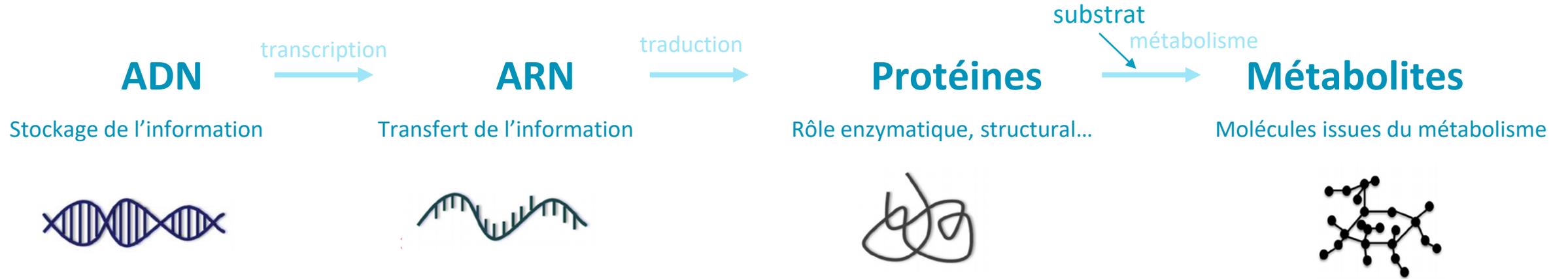
- La nature des métabolites détectés dépend fortement de la méthode d'extraction utilisée (molécules de la phase aqueuse, liposolubles, volatiles, solvants, ...) et de la méthode d'ionisation (positive ou négative)
- L'identification des métabolites à partir des ions est encore délicate et nécessite une forte expertise
- Les métabolites détectés ne sont pas nécessairement le fruit d'une activité microbienne



Exemples de questions :

Quels substrats ont été consommés? Quels produits ont été générés? Quelles classes de composés sont produites en plus/moins grande quantité selon une condition de production?

Pour résumer :



A l'échelle de la communauté microbienne d'un échantillon :

Métagénome

Métagénétique Métagénomique

Quels microorganismes sont présents ?
Que pourraient-ils faire ?

Méatranscriptome

Méatranscriptomique

Quels gènes s'expriment ? Lesquels s'expriment le plus ? Le moins ?
Quelles espèces sont actives ?

Méaprotéome

Méaprotéomique

Quelles protéines sont produites ?
En quelle quantité ?
Quel est leur rôle ?

Métabolome

Métabolomique

Quels métabolites sont produits ?
En quelle quantité ?

Fonction microbienne

Activité microbienne

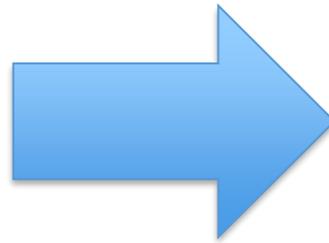
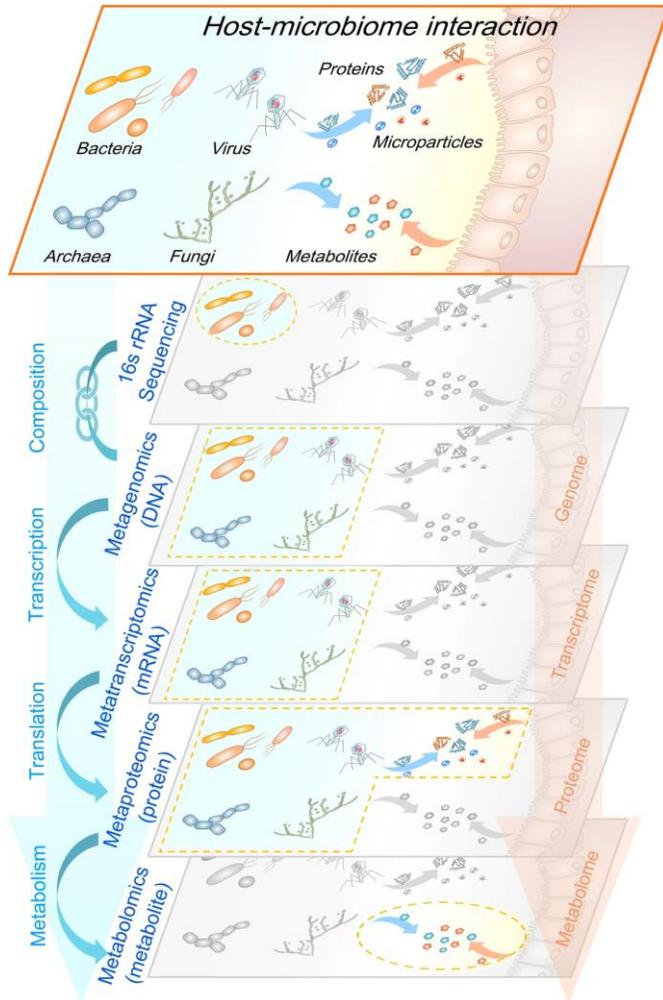
Potentiel microbien



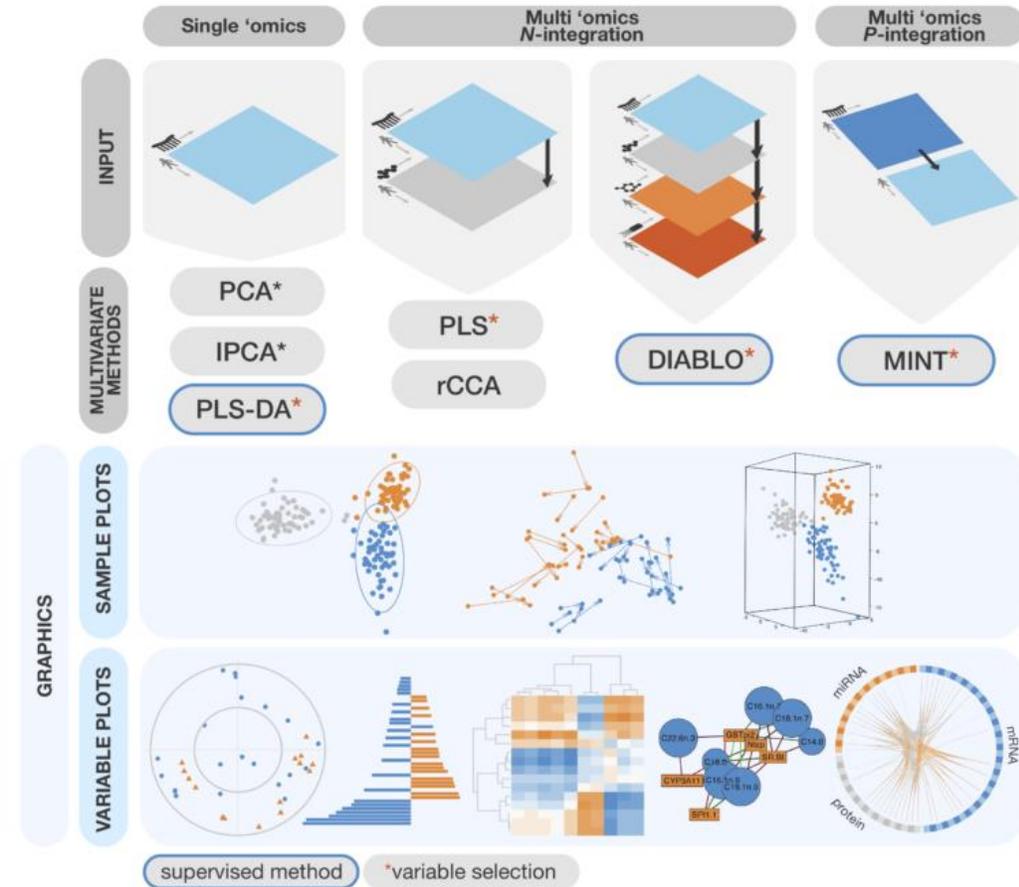
*Un nouveau regard sur les écosystèmes laitiers et fromagers :
Adaptation, développement et appropriations des méthodes
omiques à des fins d'écologie microbienne*

Et après?

L'intégration de données multi-omiques



Exploration and
Integration of
Omics datasets



Merci de votre attention

