



Acquisition et utilisation des données de séquençage dans les projets soutenus par le CNIEL

Présentation de la méthodologie

Frédéric GAUCHERON,
Science et Technologie Laitière
CNIEL, Maison du Lait, 42 rue de Châteaudun, 75009 Paris

Email : fgaucheron@cniel.com

Discussion/échanges avec Charlotte Navarro

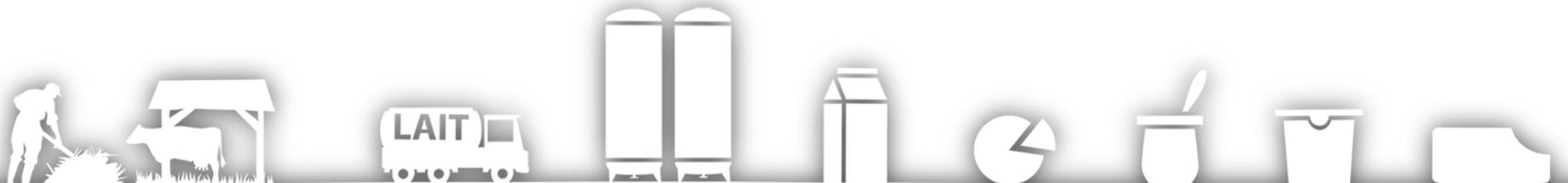
Lundi 8 octobre 2018, Maison des Océans, PARIS





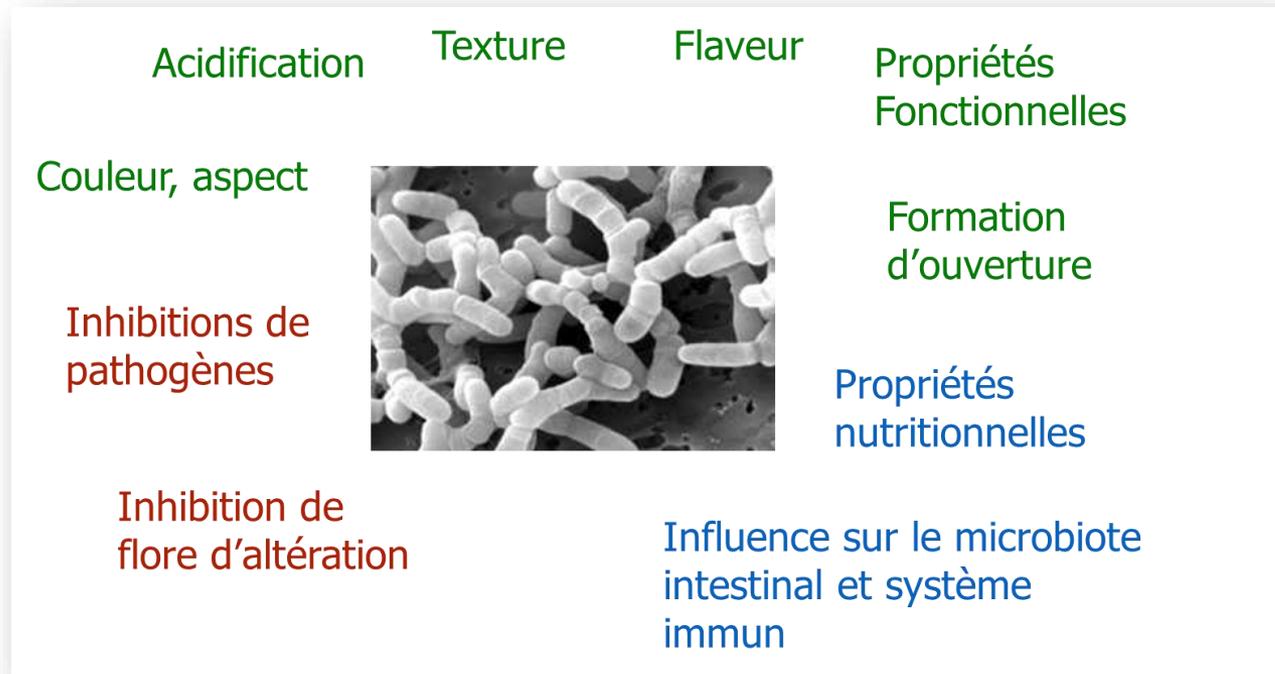
Les missions du CNIEL

- 1. AMÉLIORER LA COMPÉTITIVITÉ DE LA PRODUCTION ET DE LA TRANSFORMATION LAITIÈRES FRANÇAISES**
 - ↳ Implication du CNIEL dans des programmes de recherche avec diffusion du progrès scientifique à travers de nombreux colloques et conférences.
- 2. FOURNIR LES ÉLÉMENTS NÉCESSAIRES À UN DIALOGUE OBJECTIF ENTRE PRODUCTEURS ET TRANSFORMATEURS ET ANCRER LA FILIÈRE DANS LES TERRITOIRES**
- 3. SOUTENIR LE DÉVELOPPEMENT DES EXPORTATIONS**
- 4. DÉVELOPPER ET FAIRE CONNAÎTRE LES QUALITÉS DU LAIT ET DES PRODUITS LAITIERS**
- 5. DONNER UNE IMAGE POSITIVE ET DURABLE DE LA FILIÈRE LAITIÈRE**



Les écosystèmes fromagers : un véritable défi scientifique, sanitaire et économique.

- Enjeu de taille ↪ survie d'un patrimoine alimentaire
- Communauté microbienne **complexe** ↪ composée de micro-organismes en partie responsable **des caractéristiques des fromages**



↪ **Nécessité d'acquérir des connaissances sur les mécanismes d'action de la communauté microbienne contribuant à la qualité**

Augmenter la connaissance sur les communautés microbiennes fromagères en lien avec les paramètres technologiques et environnementaux

Transférer le savoir sur l'outil métagénomique et utiliser par les professionnels de la filière lait

Multiplés intérêts de mieux comprendre les écosystèmes fromagers et leur dynamique (outil métagénomique)

Etudier des génomes microbiens de souches représentatives de la diversité des fromages ↘
constituer une banque de référence génomique commune contenant les catalogues de gènes présents dans les fromages

Révéler la présence de nouvelles espèces microbiennes sous-dominantes et potentiellement d'intérêt technologique

Caractériser/contrôler les levains de fabrication fromagères

Laits crus vs laits pasteurisés

Suivre les écosystèmes au cours de la fabrication (lait, caillé avant et après salage, affinage)



Intérêt de l'approche métagénomique

Ne pas passer par une étape de culture en laboratoire

- Extraire l'ADN présent dans l'échantillon et vérification qualitative et quantitative de l'ADN
- Séquençage direct ou après amplification
- Traitement des résultats (filtrage, affinage, comparaison/identification *via* des banques de données (élément clé), \Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow mise en forme des résultats)

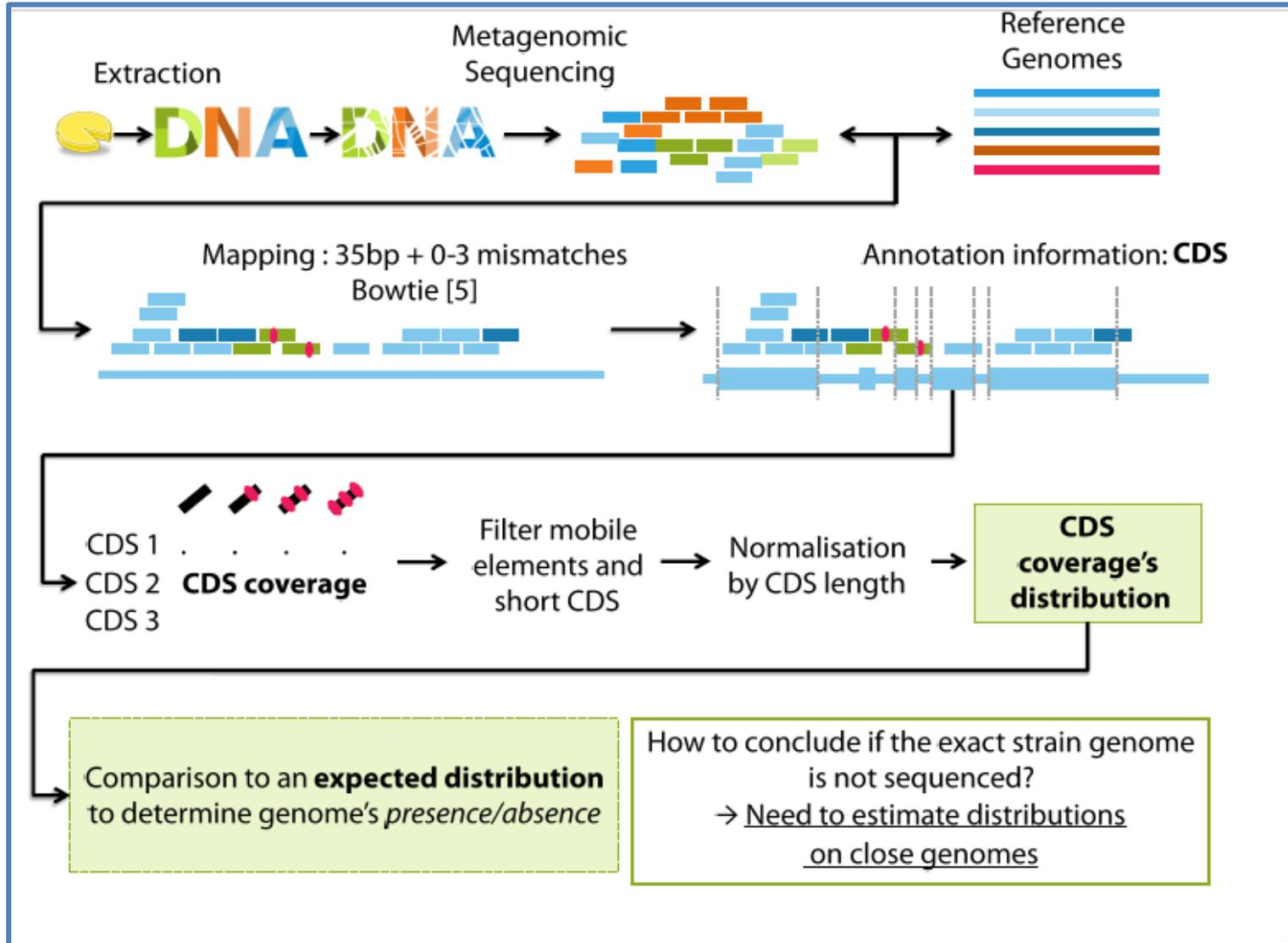
↳ Description génomique du contenu de l'échantillon et détermination de la liste et la répartition des espèces présentes.

Disciplines : microbiologie, biologie moléculaire, statistique, bioinformatique

Partenaires : Toulouse, Rennes, Génoscope, Jouy en Josas, GATC (société de séquençage),.....



Pour les initiés.....



Caractéristiques des outils de métagénomiques transférés vers les professionnels laitiers



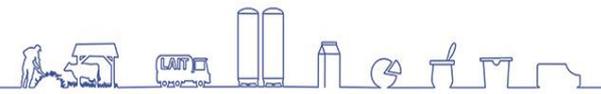
↳ projet « Food Microbiome Transfert »

- Outil performant allant de l'extraction à la base de données
- Détection possible d'espèces sous-dominantes jusqu'à 1 /100 000
- Bon accord avec les mesures microbiologiques
- Nette amélioration dans la convivialité de traitement des séquences



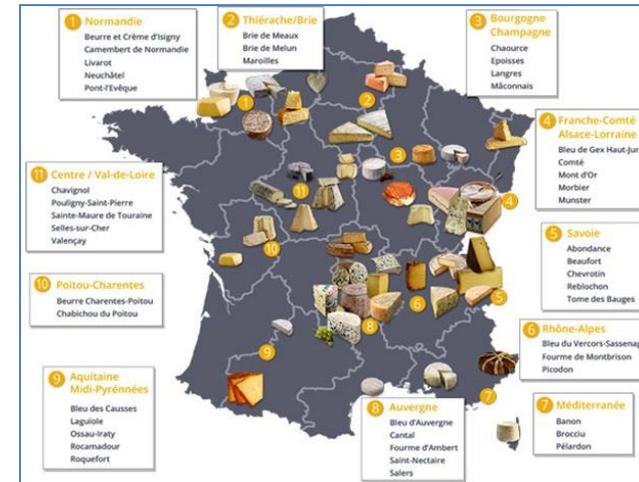
- Nécessité d'améliorer le perfectionnement de l'outil pour
 - Gérer le manque de génome de référence
 - accélérer le temps des analyses
 - Gérer des potentielles contaminations lors des séquençages
 - Avoir des indices de confiance sur les résultats





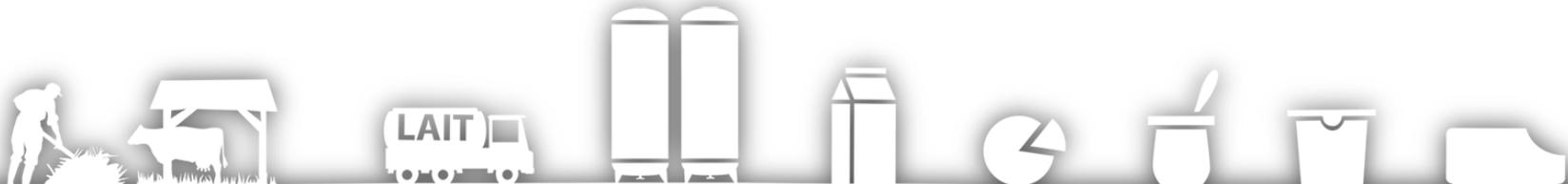
Cartographie génomique des 45 fromages AOP français

- Fromages français AOP = produits typiques et très diversifiés
- Issus de la combinaison de pratiques variées de production laitière et de transformation du fromage.
- Importance de la composante microbiologique dans l'élaboration et la typicité des fromages mais complexe et différente d'un type de fromage à un autre.
- Manque de connaissance de la diversité des communautés microbiennes naturelles
- Perte progressive de la diversité microbienne dans les laits et les fromages résultant de la pression sanitaire



Objectif : Etablir un catalogue exhaustif des communautés microbiennes présentes dans l'ensemble des fromages AOP français.

Stratégie expérimentale : Utilisation d'approches métagénomiques associées à l'utilisation de nouvelles technologies de séquençage à haut débit.



Cartographie génomique des 45 fromages AOP français

- Recenser toutes les espèces microbiennes présentes
- Lister les gènes de fonctions associés aux espèces
- Enrichir la banque de données de génomes de référence
- Comprendre la dynamique des populations et des fonctions associées

↳ «Gestion» des communautés microbiennes (écologie microbienne dirigée), en lien avec des pratiques de production fromagère

- ✓ 1200 fromages et 400 laits de collectés.
- ✓ Extraction d'ADN
- ✓ Utilisation de l'outil métagénomique en 2019

Autres projets incluant des « suivis séquençages » lors d'itinéraires technologiques

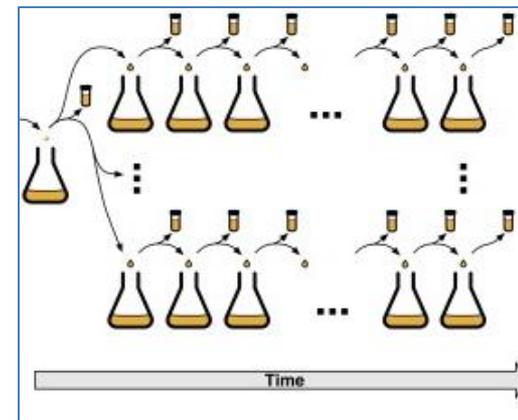
Modèle d'étude : *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

Un système
modèle simplifié

- 3 souches de *L. lactis* ssp. *lactis* (choix « raisonné » des souches)
- Lait stérile
- Lait cru

La méthodologie
proposée

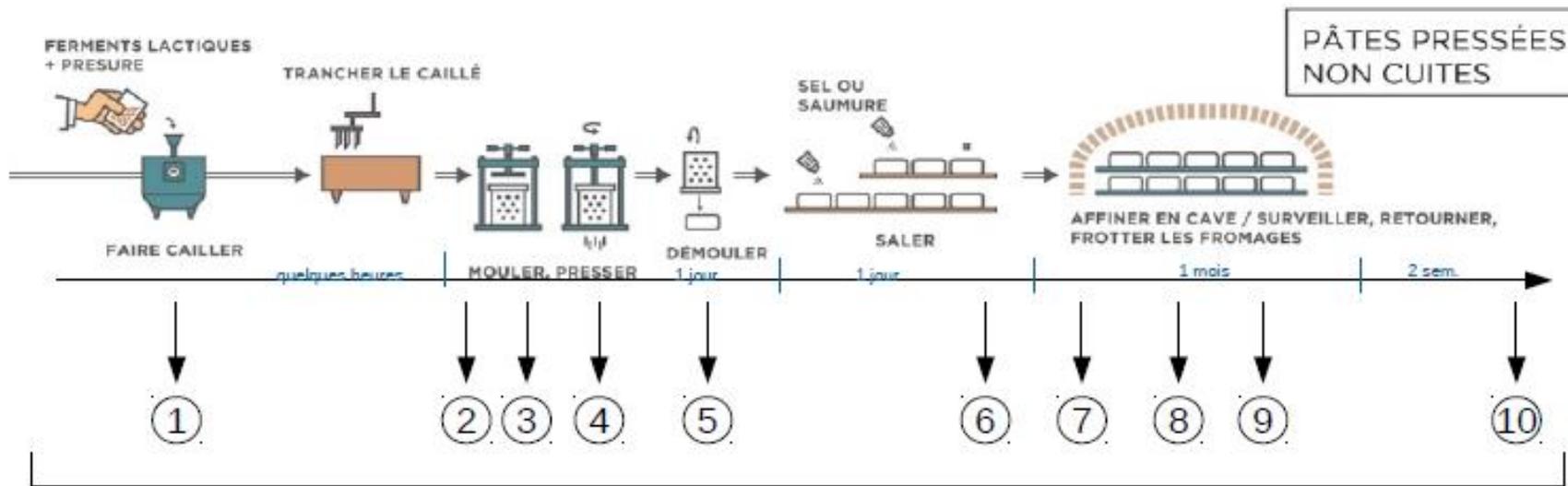
- Evolution expérimentale (backslopping)
- 3 mois (~ 800-900 générations)
- Conditions standardisées (repiquage phase stat, 22°C, 10⁶ UFC/ml...)



Les descripteurs du
système

- **Dynamique des souches (traçage)**
- Cinétique d'acidification (souches seules vs mélange, mélange seul vs mélange dans du lait cru)
- Niveau de protéolyse (dosage acides aminés libres)
- Pouvoir aromatique (diacétyle/acétoïne, COV...)

Autres projets incluant des « suivis séquençages » lors d'itinéraires technologiques



- enregistrement des paramètres physico-chimiques (pH, T°, Aw)
- dénombrements bactériens
- ADN pour quantification d'espèces
- ARN pour quantification des transcrits
- dosages de métabolites bactériens (sucres, acides organiques et aminés, volatils, lipides, AGCC ?)



Les collections

- Privées appartenant aux groupes industriels (laitiers ou fournisseurs de ferments)
- Instituts de recherche (INRA, Cirad, Pasteur, autres ??)
- CIRM (Rennes, Tours, Jouy)
- Autres ???
- Actalia/CIMIL pour le CNIEL / (voir diapo suivante)



Collection CIMIL (gérée par Actalia)



FranceMIL
Collection Nationale de
microorganismes d'intérêt laitier

Résomil Collections Passer commande Les participants à Résomil Espace client

FranceMIL est la Collection Nationale de ressources génétiques pour les microorganismes d'intérêt laitier

Collection de Référence

Collection composée de 126 souches d'origine laitière

Souches citées dans des publications scientifiques, utilisées comme référence ou possédant un intérêt patrimonial

EN SAVOIR PLUS

Collection Biodiversité

Collection mise à disposition par l'interprofession laitière (CNIEL)

Ressources diversifiées isolées de lait et de produits laitiers d'origine géographiques variées

EN SAVOIR PLUS

Collection Bactériophages

Collection unique de bactériophages lactiques mise à disposition par l'interprofession laitière (CNIEL)

Bactériophages de Lactocoques et de Streptocoques

EN SAVOIR PLUS

Dernières actualités

16/07/2015
26 nouvelles souches dans la collection Biodiversité
La collection Biodiversité propose désormais 25 souches de *Lactobacillus paracasei* et 1 souche de *Lactobacillus casei* [Lire plus](#)

11/06/2015
8 nouvelles souches dans la collection Biodiversité
8 souches de *Lactococcus* ont été ajoutées à la collection Biodiversité :
• 1 *Lactococcus*
• 7 *Lactococcus lactis lactis lactis* [Lire plus](#)

01/06/2015
Lancement de la collection FranceMIL
Cette collection mise à disposition des professionnels et de la communauté scientifique rassemble 3 collections :
• une collection de Référence
• une collection.. [Lire plus](#)

Résomil

Maison du lait
42 rue du Châteaudun
75314 PARIS Cedex 9

Site internet : www.francemil.fr

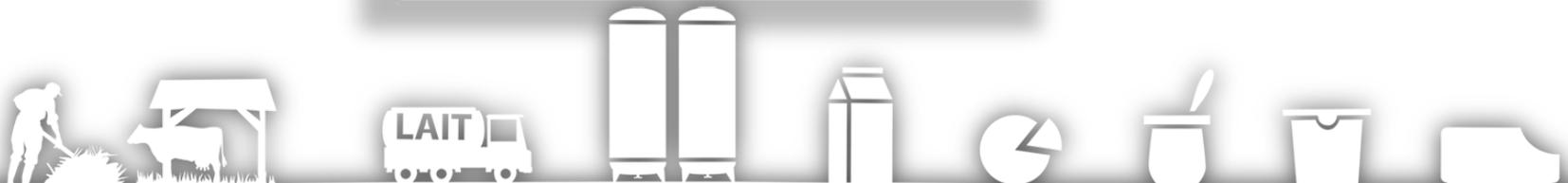
- Différentes collections (Référence, Biodiversité et Phages) qui sont mis à disposition de l'interprofession laitière.
- En 2018, 1445 souches bactériennes et 156 bactériophages de bactéries lactiques disponibles

OBJECTIFS :

1. Innover, améliorer ou compléter les rotations avec un large choix de souches de la collection biodiversité
 2. Tester la résistance des ferments avec la collection Phage
 3. Utiliser les souches de références connues dans des expérimentations.
- En parallèle de cette activité de mise à disposition ↪ recherche sur purification de souches et identification de souches et de sous espèces, les biodiversités génétique et métabolique



Accord de transfert de matériel Biologique (MTA)





Merci de votre attention

