

Métagénomique et transcriptomique appliqués au management des écosystèmes de méthanisation

M. MOLETTA-DENAT, C. GENTHON,
N. WERY et R. CRESSON



INRA TRANSFERT ENVIRONNEMENT est régulièrement sollicité pour apporter des réponses à des problématiques liées à la microbiologie.



Par exemples :

Choisir un inoculum ?

Diagnostiquer un dysfonctionnement de la biomasse ?

Identifier et **surveiller** les espèces pathogènes présentes dans un procédé ou une filière ?

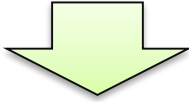
Prévenir une dérive de la microflore d'un bioprocédé ?

Suivre l'impact microbiologique d'un rejet dans l'environnement ?

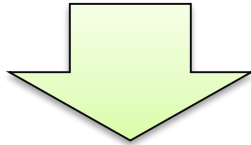
Suivre et tracer la microflore d'une matrice ?

Etc...

Collecte et extraction des acides nucléiques



PCR et RT-PCR quantitative en temps réel, Séquençage Illumina MiSeq, HiSeq, Séquençage long fragment PacBio RS II et Oxford Nanopore Minion.



Diagnostiquer un dysfonctionnement de la biomasse,

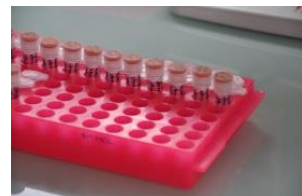
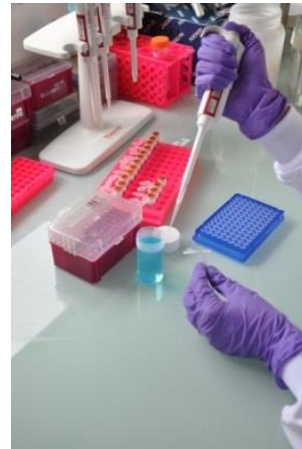
Identifier et **surveiller** les espèces pathogènes présentes dans un procédé,

Prévenir une dérive de la microflore d'un méthaniseur,

Suivre l'impact microbiologique d'un rejet dans l'environnement,

Evaluer les potentialités fonctionnelles d'un inoculum,

Comparer l'expression des fonctions selon les paramètres procédés...



Séquence unique

Séquençage « NGS »

Sanger



Nombre de séquences : 96

Cout séquence : €€€

Productivité : 🐌

NGS – « short reads »

Illumina

Nombre de séquences : 5 milliards

Cout séquence : €€

Productivité : 🚀🚀

2x HiSeq 3000



3 x MiSeq



NGS – « long reads »

PacBio RsII



Nombre de séquences : 70.000

Cout séquence : €

Productivité : 🚀

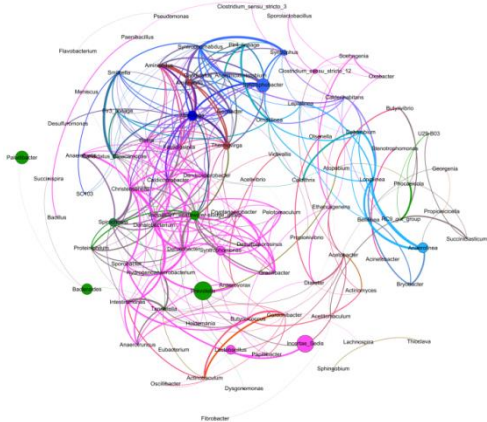
➤ A partir de communautés microbiennes complexes

Technologie compatible MiSeq



Permet d'identifier et de mesurer l'abondance des groupes microbiens présents dans un échantillon, de développer des outils de gestion

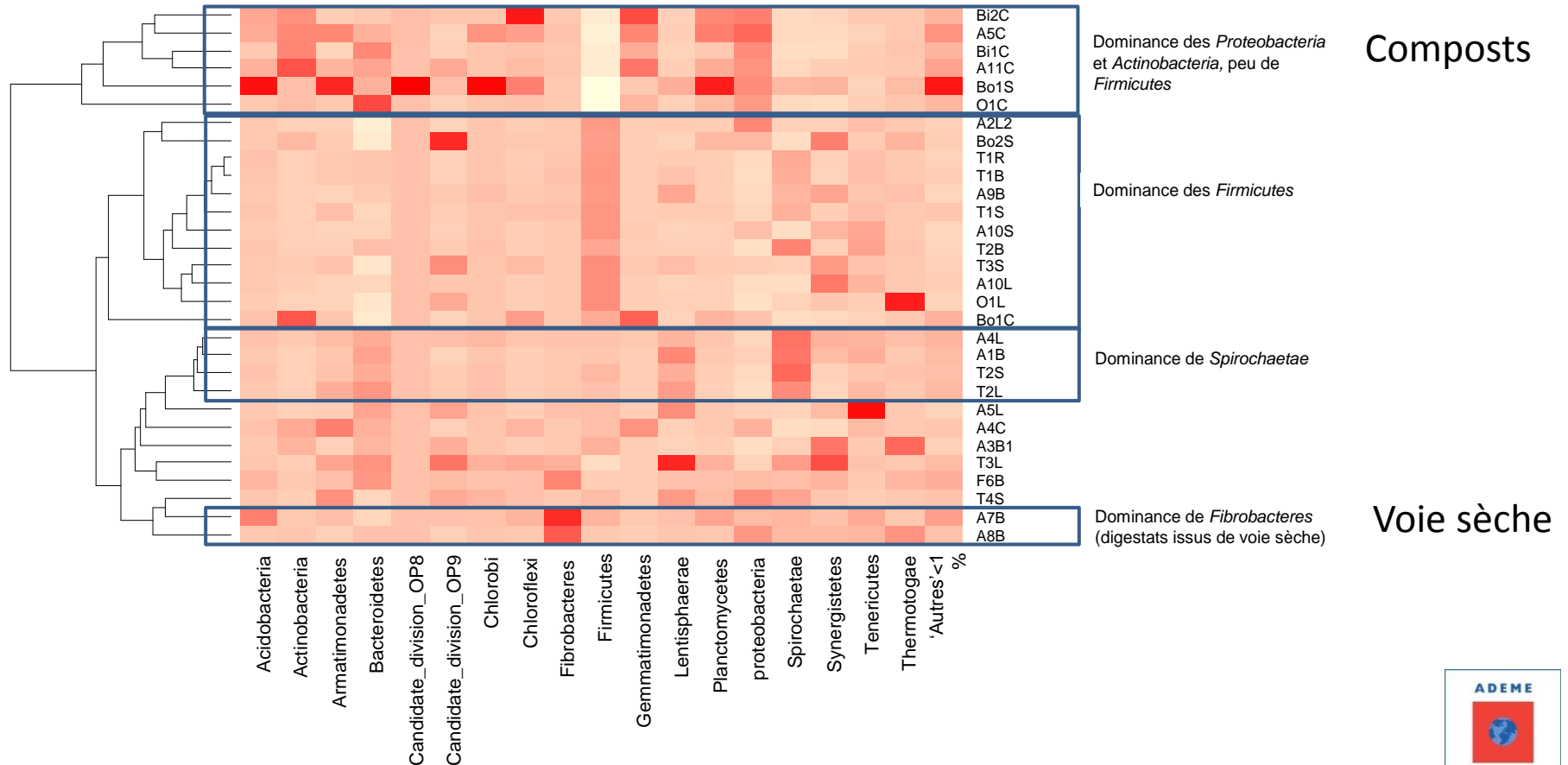
- Création **de base de données** sur des écosystèmes spécifiques
- Référence dans le diagnostic de fonctionnement d'un procédé
ex: Diversité/abondance des méthanogènes
Diversité/abondance de groupes fonctionnels
- Aide à la conduite des procédés
ex: Appui au choix d'inoculum
- Identification **d'espèces clés**
- Exploration des **cooccurrences** des groupes microbiens
- Développement de **nouveaux bio-indicateurs**



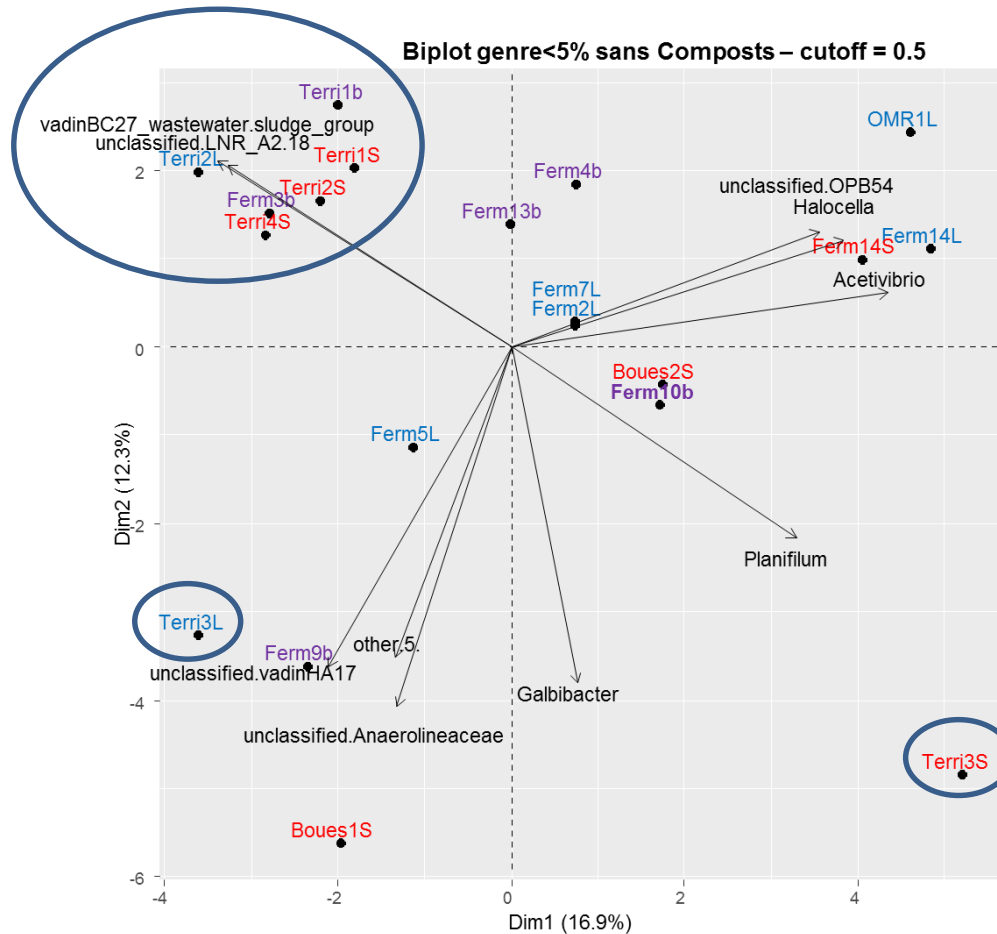
Signature bactérienne des digestats

29 PROs provenant de 19 sites français de méthanisation :

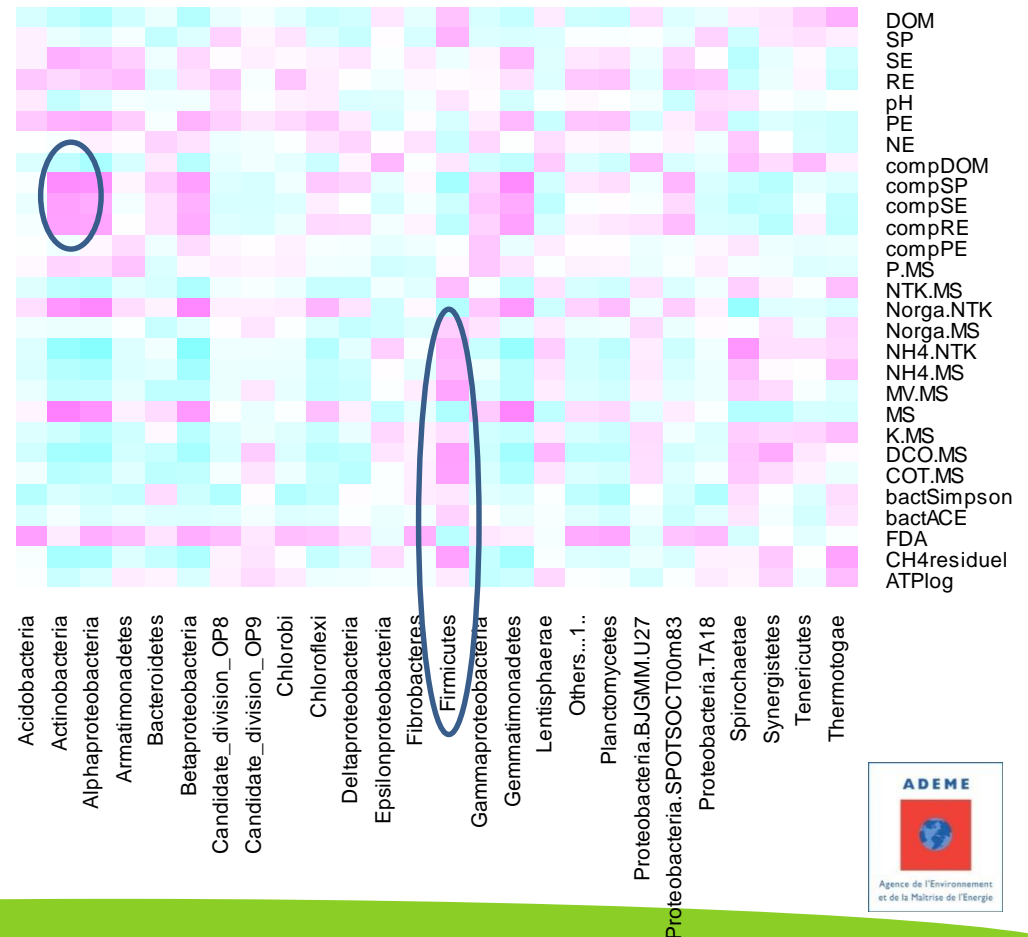
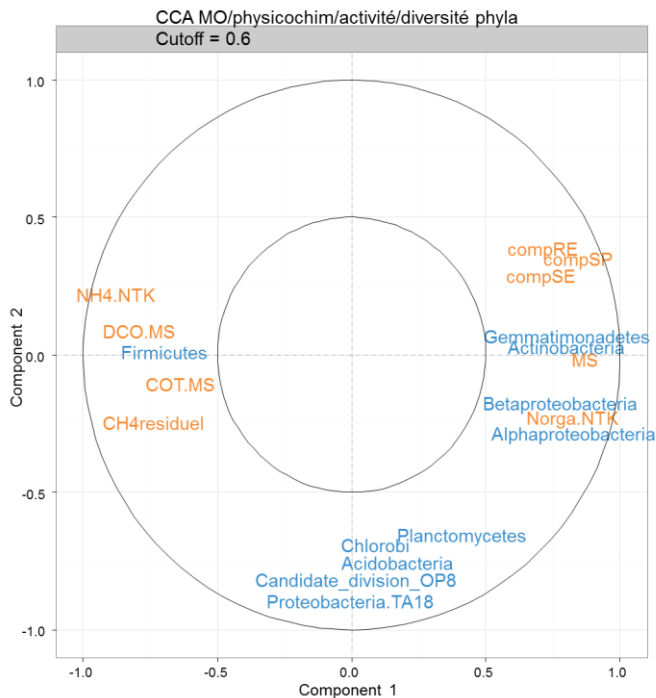
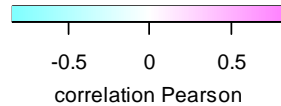
2 digestats de biodéchets compostés, 3 digestats de boues de station d'épuration, 14 digestats de déchets et effluents agricoles, 2 digestats d'OMR, 8 digestats de sites de méthanisation territoriale.



Influence du type de digesteurs sur la communauté bactérienne



Comparaison des niveaux d'abondance des phyla et des paramètres de caractérisation des digestats



➤ Analyse de l'expression des gènes

Permet d'identifier et de mesurer l'abondance des gènes présents dans un échantillon, de développer des outils de gestion basés sur des données fonctionnelles

- Identification de nouveaux transcrits
- Quantification des niveaux d'expression des gènes

Par séquençage (= RNA seq)

Par qPCR-haut débit : 9000 points de qPCR en parallèle

- Evaluer l'efficacité de paramètres procédés sur le transcriptome des microorganismes

Technologie compatible

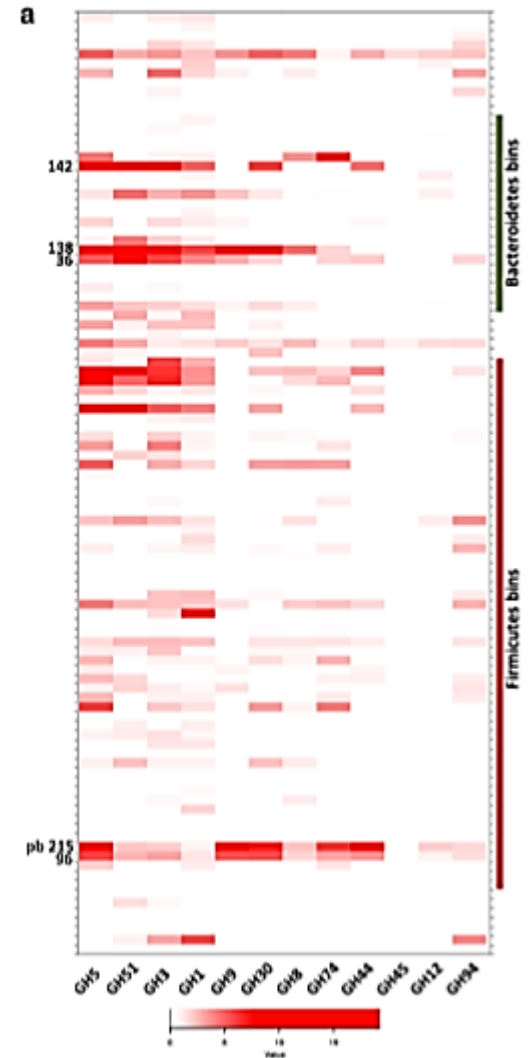
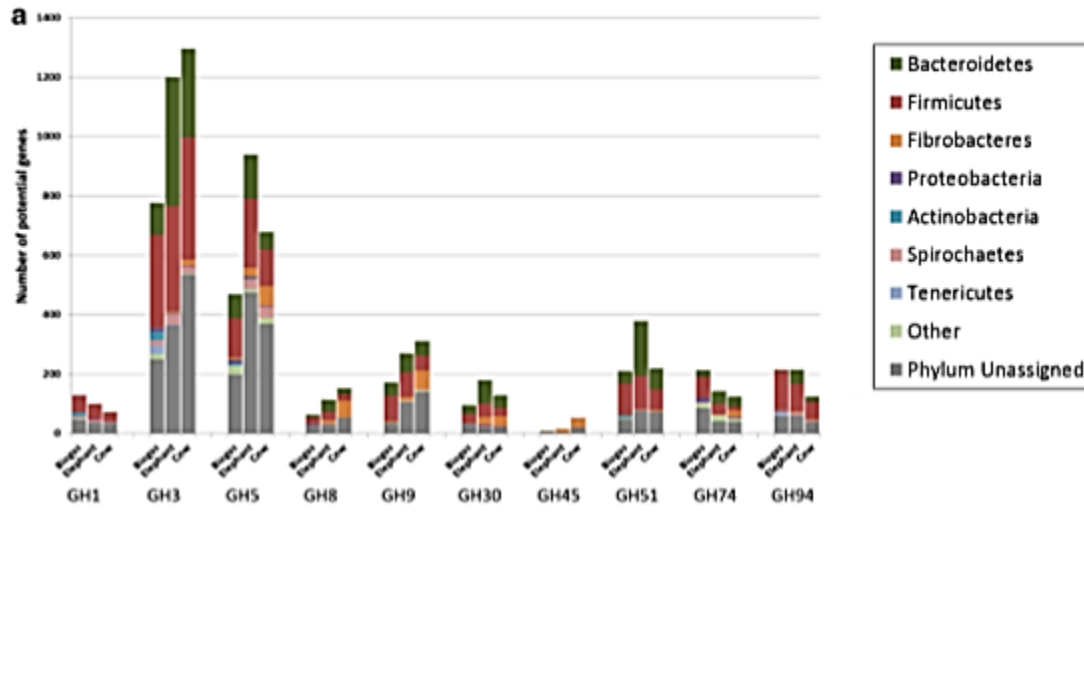
Illumina HiSeq



Biomark - Fluidigm



Métagenome et de métatranscriptome de communautés microbiennes affiliées à un méthaniseur, à un rumen bovin et à des fèces d'éléphants révèlent des différences majeures dans les stratégies d'hydrolyse des glucides



➤ A partir d'un génome Procaryote

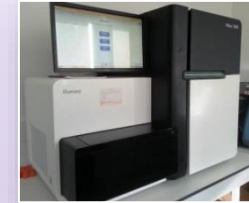
Permet de disposer des génomes des espèces majoritaires dans un environnement

SEQUENCAGE SANS A PRIORI (avec ou sans génome de référence)

- Etudier la composition génétique de microorganismes nouveaux
- Assembler de nouveaux génomes couvrant des régions génomiques répétitives et complexes
- Génie génétique,
- Exploration et utilisation des souches d'intérêts.

Technologies compatibles

Illumina HiSeq 3000



PacBio RSII



MiSeq



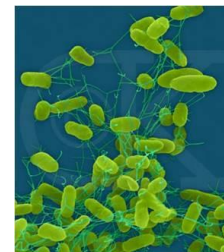
Métagénome et construction de nouveaux génomes

Taxon	Biogas microbiome	Core microbiome		Previous assembly		Present assembly	
	Total GBs	GBs	%	GBs	%	GBs	%
<i>Firmicutes</i>	154	56	36	13	8	85	55
<i>Syntrophomonadaceae</i>	48	24	50	0	0	24	50
<i>Bacteroidetes</i>	30	5	17	1	3	24	80
<i>Proteobacteria</i>	29	4	14	6	21	19	66
<i>Synergistetes</i>	10	3	30	3	30	4	40
<i>Spirochaetes</i>	8	1	13	1	13	6	75
<i>Actinobacteria</i>	6	0	0	1	17	5	83
<i>Chloroflexi</i>	6	0	0	0	0	6	100
<i>Euryarchaeota</i>	6	4	67	1	17	1	17
<i>Tenericutes (Firmicutes)</i>	6	3	50	1	17	2	33
<i>Verrucomicrobia</i>	3	0	0	0	0	3	100
<i>Thermotogae</i>	2	1	50	1	50	0	0
<i>Fibrobacteres</i>	1	0	0	0	0	1	100
<i>Acidobacteria</i>	1	0	0	0	0	1	100
<i>Chlamydiae</i>	1	0	0	0	0	1	100
<i>Planctomycetes</i>	1	0	0	0	0	1	100
<i>TM7</i>	1	0	0	1	100	0	0
Total	265	77	29	29	11	159	60

GB : Genome Bin

Treu et al, 2016

- Sensibles
- Permet d'accéder à la microflore non cultivable (environ 99% de la diversité microbienne)
- Rapides (réponse en 48h)
- Génériques et applicables à tous les écosystèmes (air, surfaces, résidus, matrice alimentaire, sols, matériaux de construction...)
- Encore coûteux et lourds en analyses bioinformatiques pour certaines applications
- Depuis 2005, ces nouveaux outils sont intégrés dans la réglementation (Microbiologie des aliments, Qualité de l'eau, Qualité des sols...)
- Une vitesse d'évolution technologique qui promet de belles évolutions scientifiques dans la compréhension des écosystèmes microbiens complexes



Merci de votre attention

SAVE THE DATE :

Journées recherche industrie

Management des ressources microbiennes

Narbonne, 29 au 31 mai 2018