

## TP : analyse metabarcoding

GOUPILLE Valentin  
M2 BV PHP

Pour étudier la diversité du microbiote des plantes différentes approches sont utilisées. La plus ancienne est la **culturomique** et consiste à utiliser différentes méthodes (milieux sélectifs, dilution jusqu'à extinction...) afin d'obtenir une collection d'isolats. La culturomique offre l'avantage de permettre l'observation et la manipulation directes de microorganismes spécifiques, mais elle sous-estime la diversité réelle en ne tenant compte que des microorganismes qui peuvent être cultivés (ex : seulement 1 à 10% des bactéries).

D'autres approches complémentaires (dites cultures indépendantes) basées sur notamment sur le séquençage permettent de pallier ce problème. Il s'agit de la métagénomique et du metabarcoding. Ces méthodes présentent chacune des avantages et des inconvénients distincts. Le **metabarcoding** se concentrant sur l'amplification et le séquençage d'un gène ciblé et amplifié issu d'ADN environnementale. Ce gène doit être conservé mais suffisamment polymorphe pour discriminer les différentes espèces (chez les bactéries : 16S, *gyrB* ; chez les champignons : ITS, 18S). Cette résolution taxonomique peut être limitée en fonction de la région génomique ciblée, rendant parfois difficile la distinction entre certaines espèces proches. Malgré la sensibilité élevée de cette méthode qui permet une description rapide et quasi exhaustive du microbiote d'un échantillon, il peut introduire des biais d'amplification PCR en favorisant par exemple certaines séquences au détriment d'autres, ce qui peut conduire à une sous-représentation ou à une surestimation de la diversité. La **métagénomique**, qui consiste en un séquençage non ciblé de fragments d'ADN environnementaux pour la reconstruction de métagénomes d'un échantillon, permet une exploration encore plus approfondie de la diversité génétique des communautés, révélant même des espèces encore non identifiées. De plus, elle évite les biais PCR, mais son coût peut être élevé, et l'analyse des vastes ensembles de données générées peut s'avérer complexe. Elle possède l'avantage de fournir des informations sur les fonctions métaboliques des microorganismes. Le choix entre métagénomique et metabarcoding dépend des objectifs spécifiques de l'étude, du budget disponible et de la complexité de l'échantillon. Dans de nombreux cas, l'approche la plus judicieuse pourrait être une combinaison des deux, capitalisant sur les forces respectives de chaque méthode pour obtenir une image plus holistique et précise de la diversité microbienne dans un environnement donné.

Dans ce TP, nous avons exploité une partie des résultats de l'étude de Barret et al, 2015. L'objectif principal de ce travail était d'**évaluer l'influence relative des génotypes de l'hôte et du terroir sur l'assemblage du microbiote (fongique et bactérienne) des graines**.

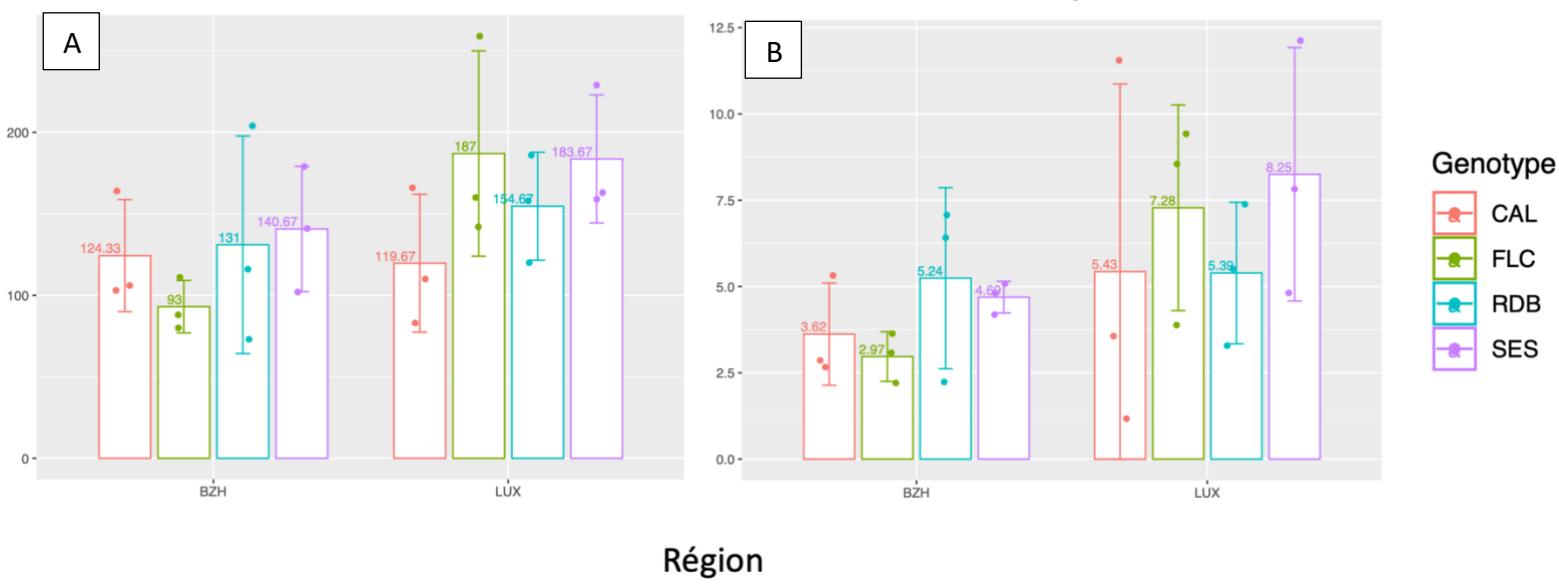
L'effet de ces deux processus sur la structure des assemblages microbiens associés aux graines a été étudié sur des échantillons de graines de **haricots**. Ces échantillons de semences ont été obtenus en multipliant **quatre lots de graines** de différents cultivars de haricots, à savoir 'Calima' (Cal), 'Flageolet Chevrier' (FIC), 'Roi des Belges' (RdB), 'Saint Esprit à Oeil Rouge' (SES) et 'Rognon de Coq' (RdC) pendant **deux années consécutives** dans **deux fermes** situées en Bretagne (BZH) et au Luxembourg (LUX). **Trois répliques par conditions ont été réalisé**.

La structure des assemblages microbiens associés à ces échantillons de graines a été évaluée par **metabarcoding** de la région V4 du gène de l'ARNr 16S pour les bactéries et de la région ITS1 de l'espaceur transcrit interne fongique (ITS) pour la partie fongique.

Pour ce compte-rendu, j'ai fait le choix de présenter uniquement les résultats de l'influence des génotypes de l'hôte et du terroir sur l'assemblage **du microbiote fongique** des graines de haricots.

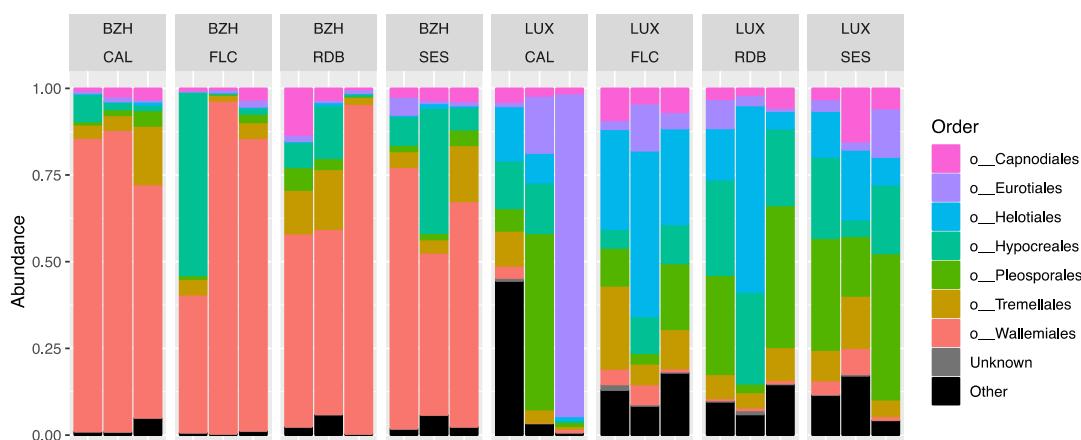
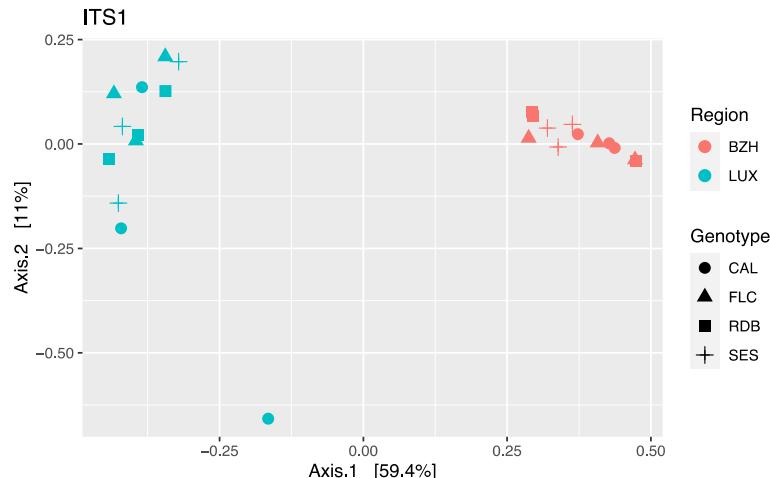
## Observed

## InvSimpson



**Figure 1 : Estimation de la diversité  $\alpha$  fongique**

La richesse spécifique (A) et la diversité (inverse de l'indice de Simpson) (B) ont été estimées dans des échantillons de 4 génotypes de semences de haricot (CAL ; FLC ; RDB ; SES) récoltés en Bretagne (BZH) et au Luxembourg (LUX). Les échantillons de graines de chaque cultivar de haricot sont représentés par des couleurs différentes. Chaque point correspond à un échantillon. L'écart-type des 3 répliques pour chaque condition (génotype-région) est également représenté. Une analyse unidirectionnelle de la variance par Kruskal-Wallis a été effectuée pour évaluer l'effet de la région de production sur la richesse spécifique et la diversité.



## **Analyse des résultats :**

La diversité  $\alpha$  fait référence à la diversité au sein d'une communauté locale qui correspond ici à chacun de nos échantillons de graines caractérisé par leur génotype et lieu de production spécifique. Elle est souvent évaluée en utilisant des indices de diversité qui tiennent compte du nombre d'espèces présentes et de leur abondance relative au sein de la communauté. Dans notre cas, nous avons utilisé deux indices. Le premier est la **richesse spécifique** qui est simplement le nombre total d'espèces dans une communauté. Un site avec une richesse spécifique élevée a un grand nombre d'espèces. Le second est l'**inverse de l'Indice de Simpson**. L'indice de Simpson mesure la probabilité que deux individus choisis au hasard appartiennent à la même espèce. Si l'indice de Simpson est proche de zéro, cela signifie que la communauté est très équitable, et donc son inverse serait élevé. Si l'indice de Simpson est proche de 1, cela indique une domination par une ou quelques espèces, et donc son inverse serait plus proche de zéro. Ainsi, nous avons observé que la **richesse spécifique** (figure 1A) et la diversité (figure 1B) de l'assemblage fongique sont plus élevé dans les graines de haricot produites sur au Luxembourg par rapport à ceux produits en Bretagne ( $P < 0,05$  et  $P < 0,05$ ), alors qu'aucune différence significative n'a été observée entre les cultivars de haricots ( $P = 0,61$  et  $P = 0,46$ ) (Kruskal-Wallis). Par ailleurs, nous pouvons également remarquer une variabilité assez importante de la richesse spécifique et de la diversité entre les différents échantillons de graines de même génotype provenant d'un même endroit de production.

Étant donné que la richesse spécifique et la diversité des assemblages fongiques associés aux graines ont été affectées par les sites expérimentaux, la contribution relative du terroir et du cultivar de haricots sur la **diversité fongique entre les échantillons (diversité  $\beta$ )** a été ensuite inspectée par une Analyse des Coordonnées Principales (PCoA) sur la matrice de dissimilarité de Bray-Curtis (figure 2). Les analyses de la PCoA et de l'AMOVA ont d'une part révélé que **les variétés de haricots n'ont pas expliqué la variation de la diversité  $\beta$  fongique** ( $P = 0,50$ ). Mais que **la majorité de la variation de la diversité fongique entre les échantillons de graines s'explique par le terroir** ( $R^2 = 58\%$  ;  $P = 0,0001$ ). La figure 3 donne un aperçu très clair de ce phénomène. En effet, nous constatons que les échantillons de graines produites en Bretagne sont tous constitués majoritairement par des champignons de l'ordre des Wallemiales (40 à 95% de l'abondance relative selon les échantillons) tandis que cet ordre ne représente qu'une part très faible (<10%) de l'abondance relative dans les échantillons provenant de la ferme située au Luxembourg. Le facteur terroir paraît très clairement un facteur bien plus structurant de la diversité fongique par rapport au facteur variété qui lui ne semble pas avoir de conséquence sur l'abondance relative des différents ordres fongiques.

Pour conclure, nous avons vu que **le terroir a été le principal facteur à l'origine de la structure de l'assemblage fongique des graines de haricots (diversité  $\alpha$  et  $\beta$ )**, il semble que **le génotype de la plante n'explique pas de manière significative la variation de la diversité fongique entre les échantillons de graines de haricots**. Toutefois, il est important de noter que des travaux récents ont démontré que chez d'autres espèces (notamment de céréales), le génotype était capable d'influencer la structure du microbiote fongique des semences (Malacrinòce et al, 2023).