



HAL
open science

Microbiote des produits fermentés par approches culturales et métagénomiques Exemple d'un fromage artisanal : le Pélardon

Marine Penland, Hélène Falentin, S Parayre, A Pawtowski, M-B Maillard,
Anne Thierry, J Mounier, M Coton, Stéphanie-Marie Deutsch

► To cite this version:

Marine Penland, Hélène Falentin, S Parayre, A Pawtowski, M-B Maillard, et al.. Microbiote des produits fermentés par approches culturelles et métagénomiques Exemple d'un fromage artisanal : le Pélardon. 23ème édition du colloque du Club des Bactéries Lactiques, UMR INRAE - Institut Agro STLO (Science et Technologie du Lait et de l'Œuf), Jun 2022, Rennes, France. hal-03693861

HAL Id: hal-03693861

<https://hal.inrae.fr/hal-03693861v1>

Submitted on 13 Jun 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License

➤ **Microbiote des produits fermentés par approches
culturales et métagénomiques**
Exemple d'un fromage artisanal : le Pélardon

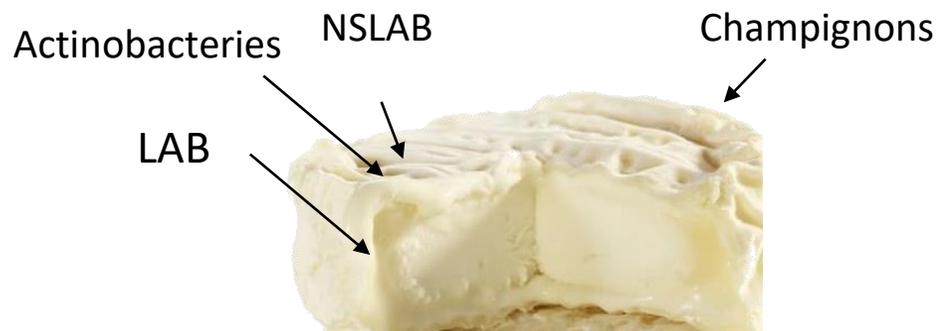
Marine Penland

Co-auteurs : H. Falentin, S. Parayre, A. Pawtowski, M-B. Maillard, A. Thierry,
J. Mounier, M. Coton & S-M. Deutsch

> Contexte

Fromages : écosytèmes microbiens complexes

↳ Caractéristiques organoleptiques



Étudier la diversité microbienne



Comprendre les contributions des micro-organismes

Qui est là ?

Approche culture-dépendante

- Dénombrement sur milieux sélectifs
- Isolement de micro-organismes
- Identification



Préservation des ressources microbiennes

Approches culture-indépendantes

Séquençage ADN microbien

Gène ciblé
métagénomique amplicon

ADN total
métagénomique « *shotgun* »



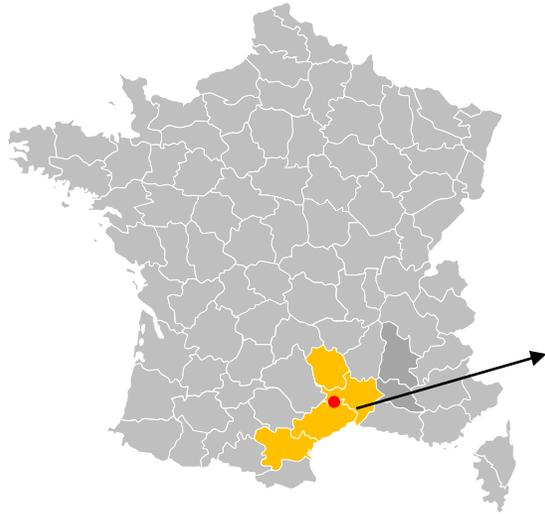
Vision plus exhaustive diversité microbienne



Évolution de la diversité bactérienne : les méthodes concordent-elles ?

➤ Objet d'étude : exemple du Pélardon

Fromage artisanal (Appellation Origine Protégée depuis 2000)



Lait cru de chèvre

Sans starters commerciaux

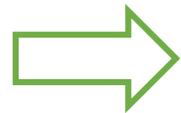
Backslopping de lactosérum

Affinage : 14 j à 3 mois



Croûte fine
blanche, jaune

Affinage



3 stades échantillonnés :
(triplicats)

Caillé (2j)

Affinage 14j

Affinage 62j



Croûte et cœur
séparés

➤ Stratégie



Analyse culture-dépendante

Enumération des populations bactériennes & isolement

4 milieux de culture

- PCA (30°C, aérobiose)
- M17 (30°C, aérobiose)
- MRS (37°C, anaérobiose)
- KF (37°C, aérobiose)

20 isolats/échantillon

Déréplication MALDI-TOF

n = 912

Identification d'isolats représentatifs
(séquençage 16S)

n = 149

Curation des identifications
n = 857 bactéries

Analyses culture-indépendantes

Extraction ADN microbien total

Métagénomique amplicon

- Séquençage Illumina
- Région **V3-V4** gène **ARNr 16S**¹
- Analyse bioinformatique :
Pipeline **FROGS**²
(db Silva 132)

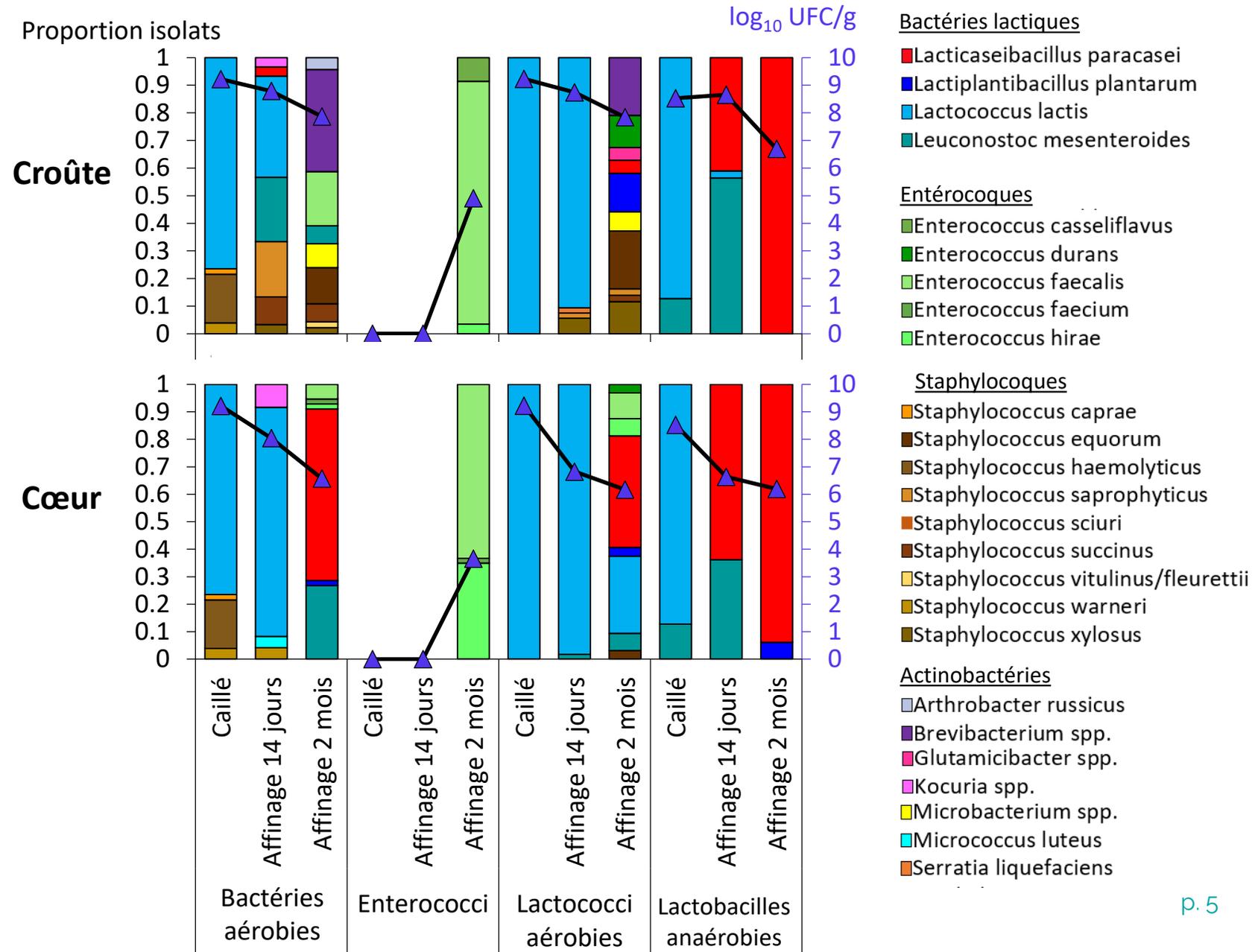
Métagénétique *shotgun*

- Séquençage Illumina
- ADN total
- Analyse bioinformatique :
Outil **Kaiju**³
(NCBI BLAST-nr protein db)

Communautés microbiennes

➤ Diversité bactérienne par approche culturale

25 espèces (13 genres) ont été identifiées.



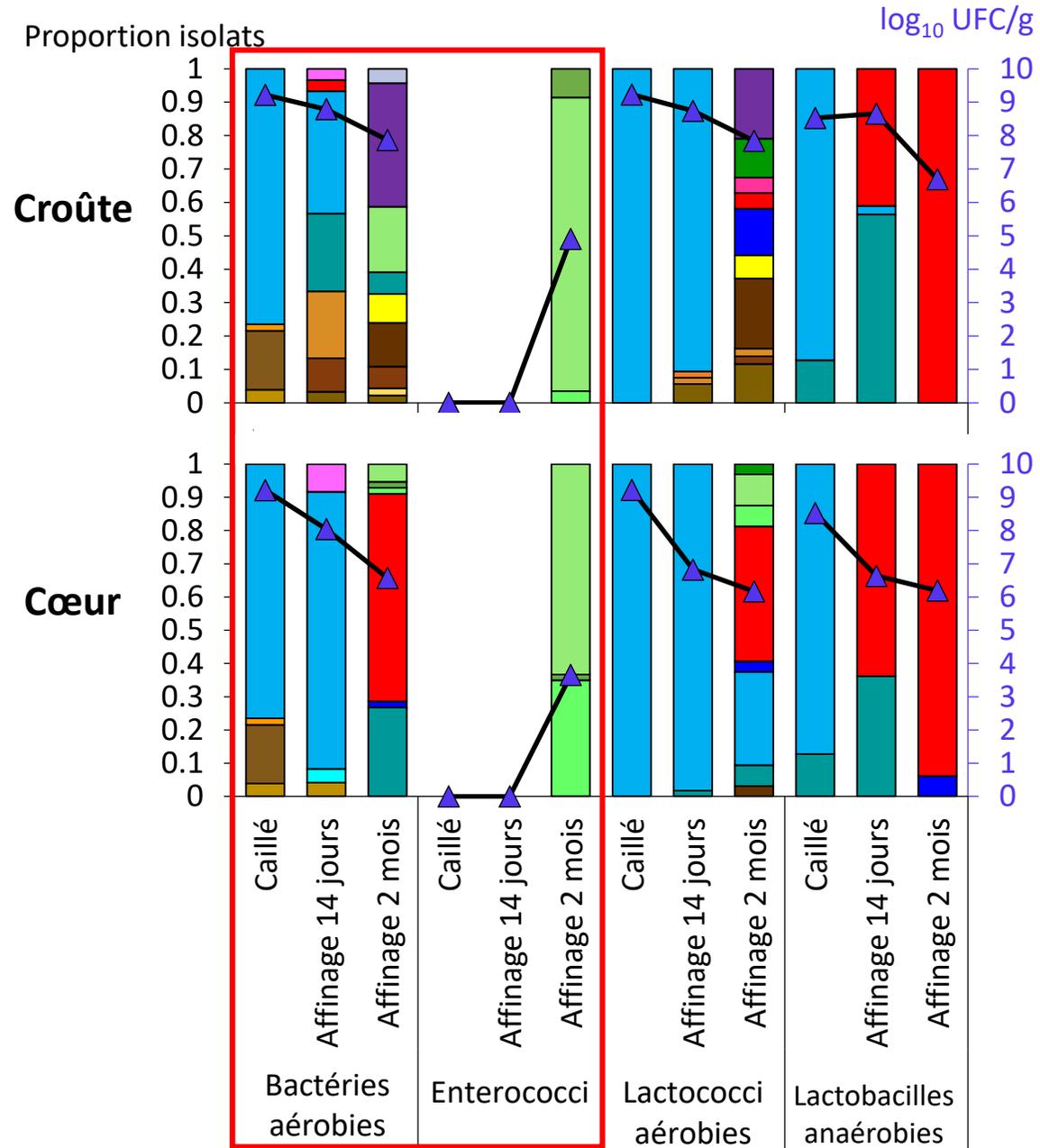
➤ Diversité bactérienne par approche culturale

25 espèces (13 genres) ont été identifiées.

Le caillé acidifié est dominé par *Lactococcus lactis*.

L'affinage est marqué par :

- une baisse des populations
- le développement de *Lb. paracasei* au coeur
- une hausse de la diversité dans la croûte



Bactéries lactiques

- *Lactococcus lactis*
- *Lactiplantibacillus plantarum*
- *Leuconostoc mesenteroides*

Entérocoques

- *Enterococcus casseliflavus*
- *Enterococcus durans*
- *Enterococcus faecalis*
- *Enterococcus faecium*
- *Enterococcus hirae*

Staphylocoques

- *Staphylococcus caprae*
- *Staphylococcus equorum*
- *Staphylococcus haemolyticus*
- *Staphylococcus saprophyticus*
- *Staphylococcus sciuri*
- *Staphylococcus succinus*
- *Staphylococcus vitulinus/fleurettii*
- *Staphylococcus warneri*
- *Staphylococcus xylosus*

Actinobactéries

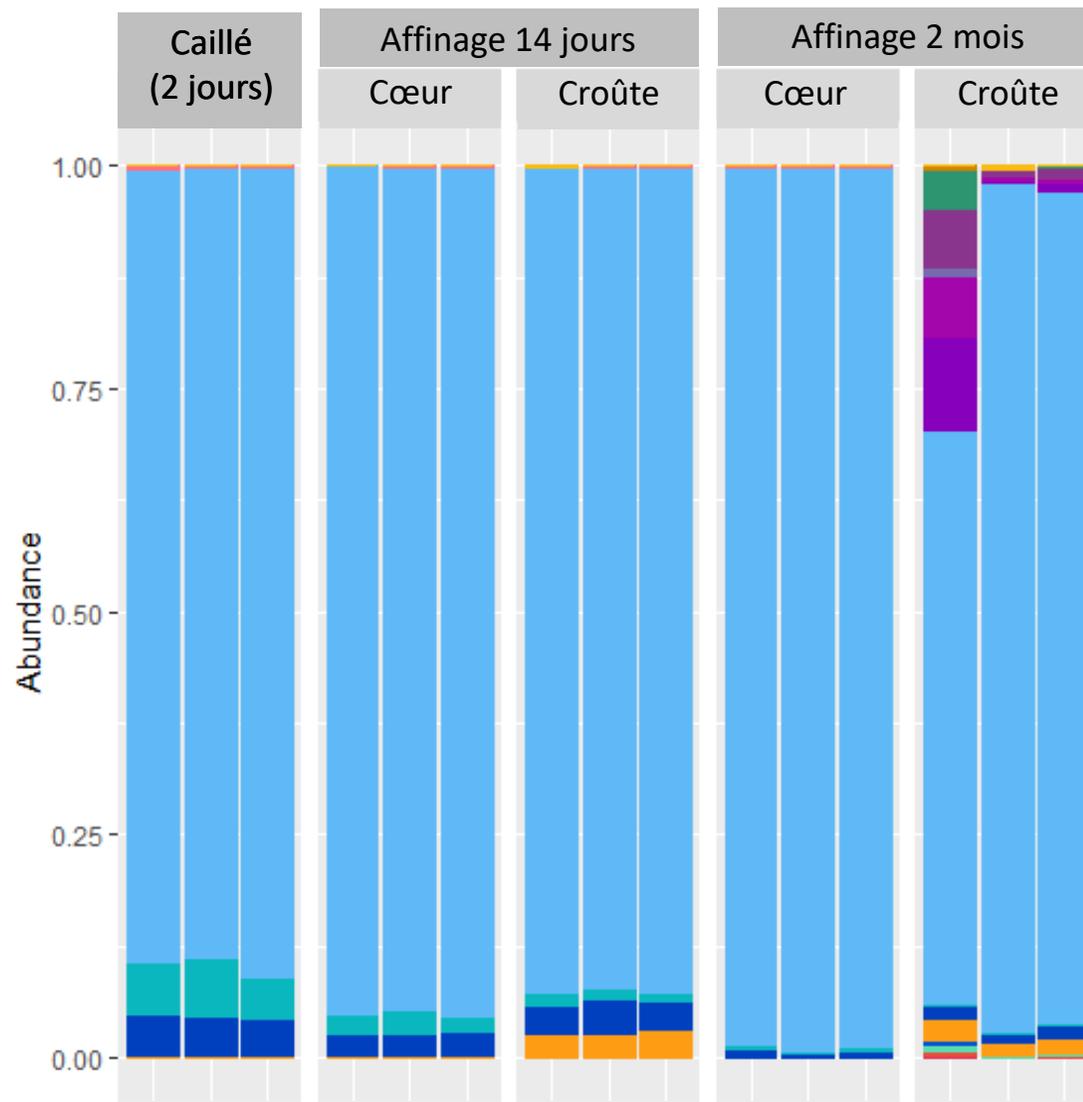
- *Arthrobacter russicus*
- *Brevibacterium* spp.
- *Glutamicibacter* spp.
- *Kocuria* spp.
- *Microbacterium* spp.
- *Micrococcus luteus*
- *Serratia liquefaciens*

➤ Diversité bactérienne par approche métagénomique amplicon

La métagénomique amplicon a permis d'identifier **18 espèces** (12 genres).

L'**affinage** est marqué par une **hausse de la diversité** dans la croûte.

La communauté microbienne reste **dominée par *Lactococcus lactis***.



Données Métag. 16S :

89% séquences affiliées au genre ou à l'espèce

Filtre : abondance > 0, 05%

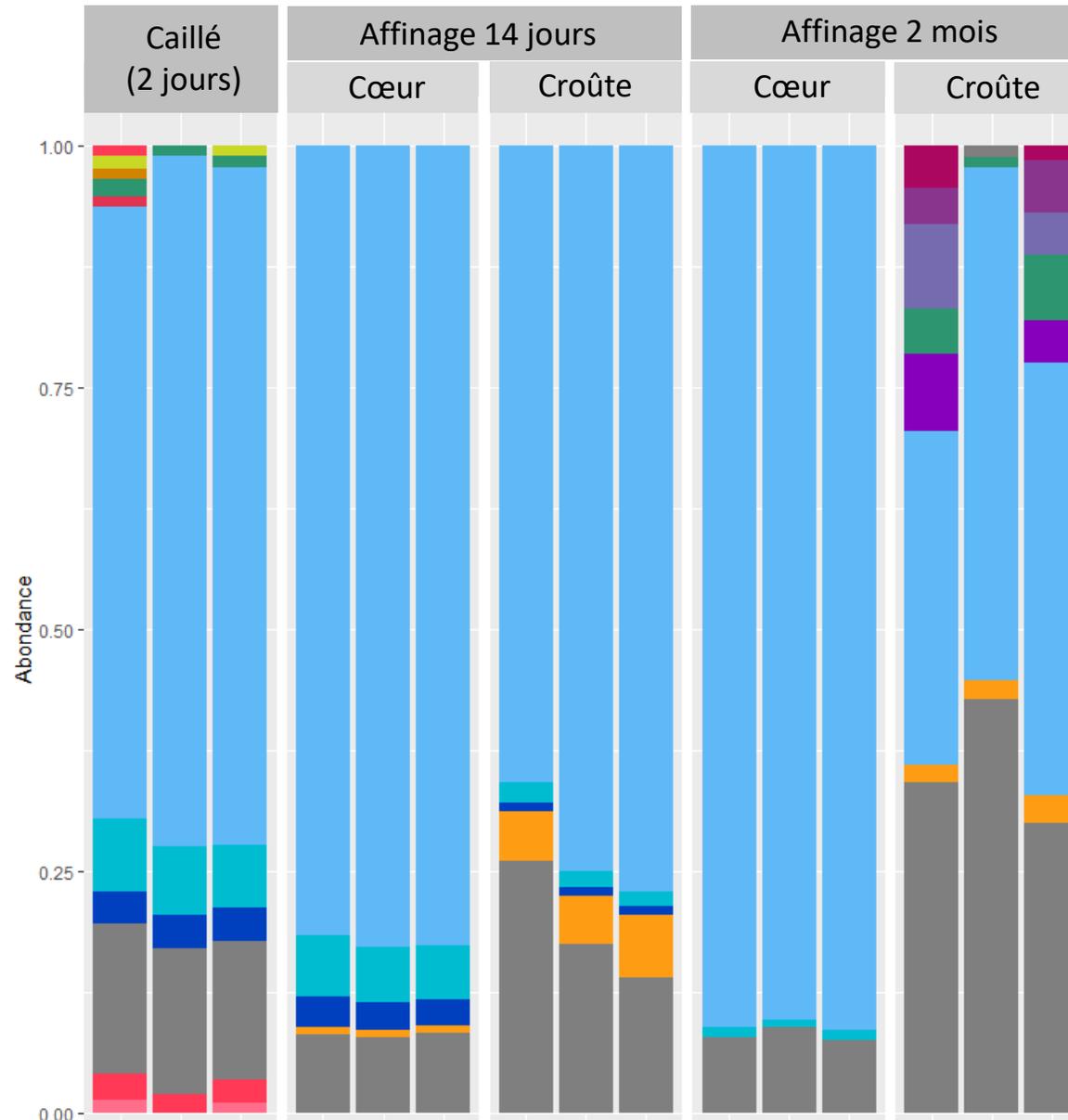
Normalisation 67540 seq/ech

Species

- Staphylococcus succinus
- Staphylococcus saprophyticus/xylosus
- Staphylococcus equorum
- Salinicoccus kunmingensis
- Psychrobacter alimentarius
- Marihabitans sp.
- Leuconostoc mesenteroides
- Lactococcus sp.
- Lactococcus raffinolactis
- Lactococcus lactis
- Klebsiella pneumoniae
- Glutamicibacter arilaitensis/bergerei/nicotianae
- Brevibacterium sp.
- Brevibacterium aureum/linens/oceani
- Brachybacterium sp.
- Brachybacterium massiliense
- Arthrobacter sp.
- Acetobacter cibinongensis

➤ Diversité bactérienne par approche métagénomique *shotgun*

Image des communautés bactériennes **similaire à la métagénomique amplicon**



Données *shotgun* :
 $4,5 \cdot 10^6$ reads/ech
 Filtre : 0,01%

Diversité spécifique :
 abondance > 1%

- Lactococcus lactis
- Lactococcus laudensis
- Lactococcus raffinolactis
- Leuconostoc mesenteroides
- Streptococcus pneumoniae
- Enterococcus faecalis
- Enterococcus faecium
- Escherichia coli
- Campylobacter coli
- Anaplasma phagocytophilum
- Staphylococcus aureus
- Glutamicibacter arilaitensis
- Brevibacterium aurantiacum
- Brachybacterium tyrofermentans
- Brachybacterium alimentarium
- Corynebacterium xerosis
- Other (< 1%)



INRAE

23^{ème} colloque du CBL
 9 juin 2022 - Marine Penland

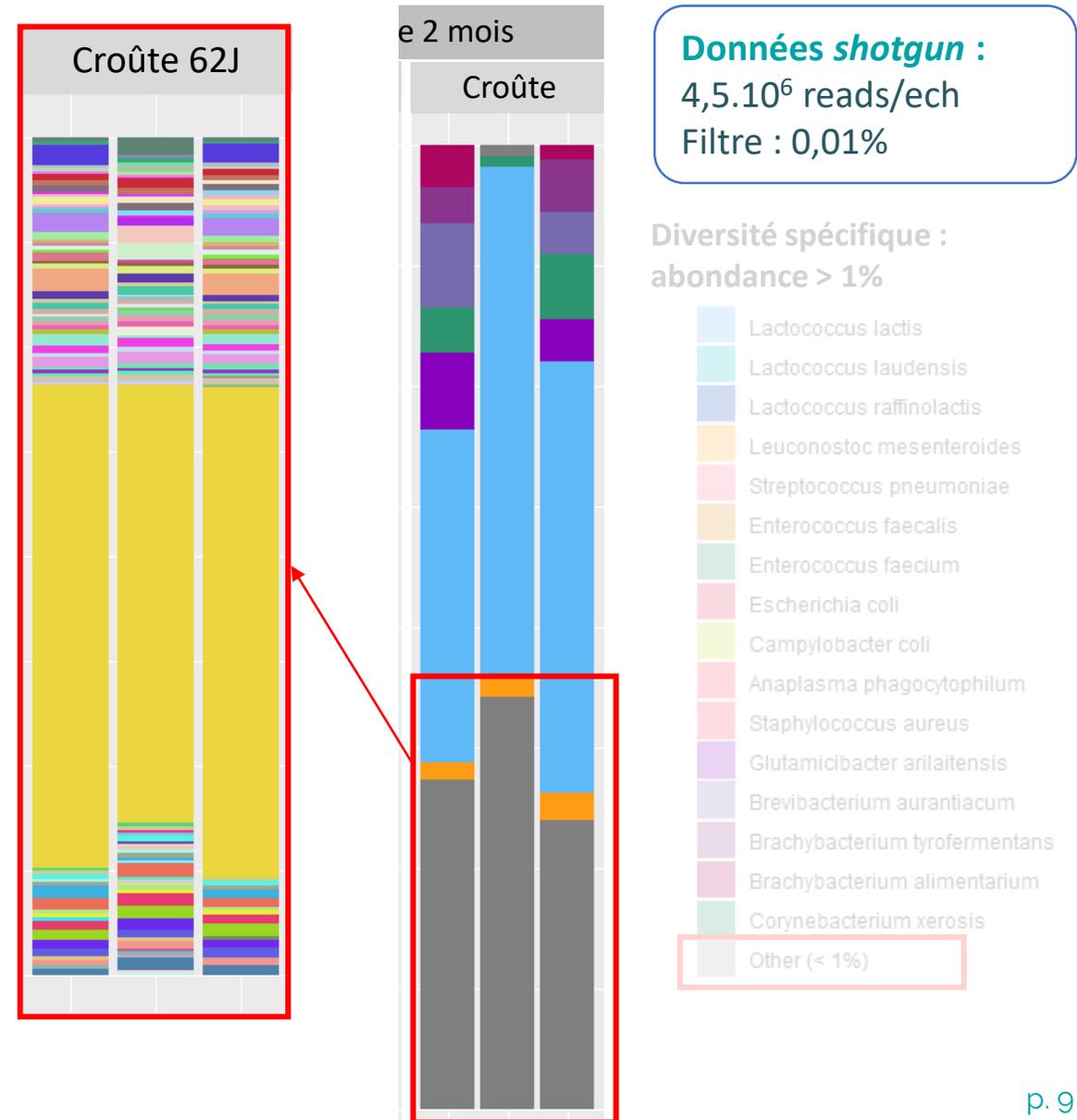
➤ Diversité bactérienne par approche métagénomique *shotgun*

Image des communautés bactériennes **similaire à la métagénomique amplicon**

L'approche *Shotgun* révèle une grande diversité mais avec des espèces très dominantes.

➔ **80 espèces** identifiées
mais seulement **17** avec une
abondance > **1%**

- Brachybacterium alimentarium
- Brachybacterium aquaticum
- Brachybacterium faecium
- Brachybacterium ginsengisoli
- Brachybacterium massiliense
- Brachybacterium nesterenkovii
- Brachybacterium sp.
- Brachybacterium tyrofermentans
- Other (<0.1%)
- Staphylococcus agnetis
- Staphylococcus aureus
- Staphylococcus equorum
- Staphylococcus pseudoxylus
- Staphylococcus saprophyticus
- Streptococcus agalactiae
- Streptococcus equi
- Streptococcus intermedius
- Streptococcus mutans
- Streptococcus pneumoniae
- Streptococcus sanguinis
- Streptococcus thermophilus
- Streptomyces sp.
- Streptomyces termitum



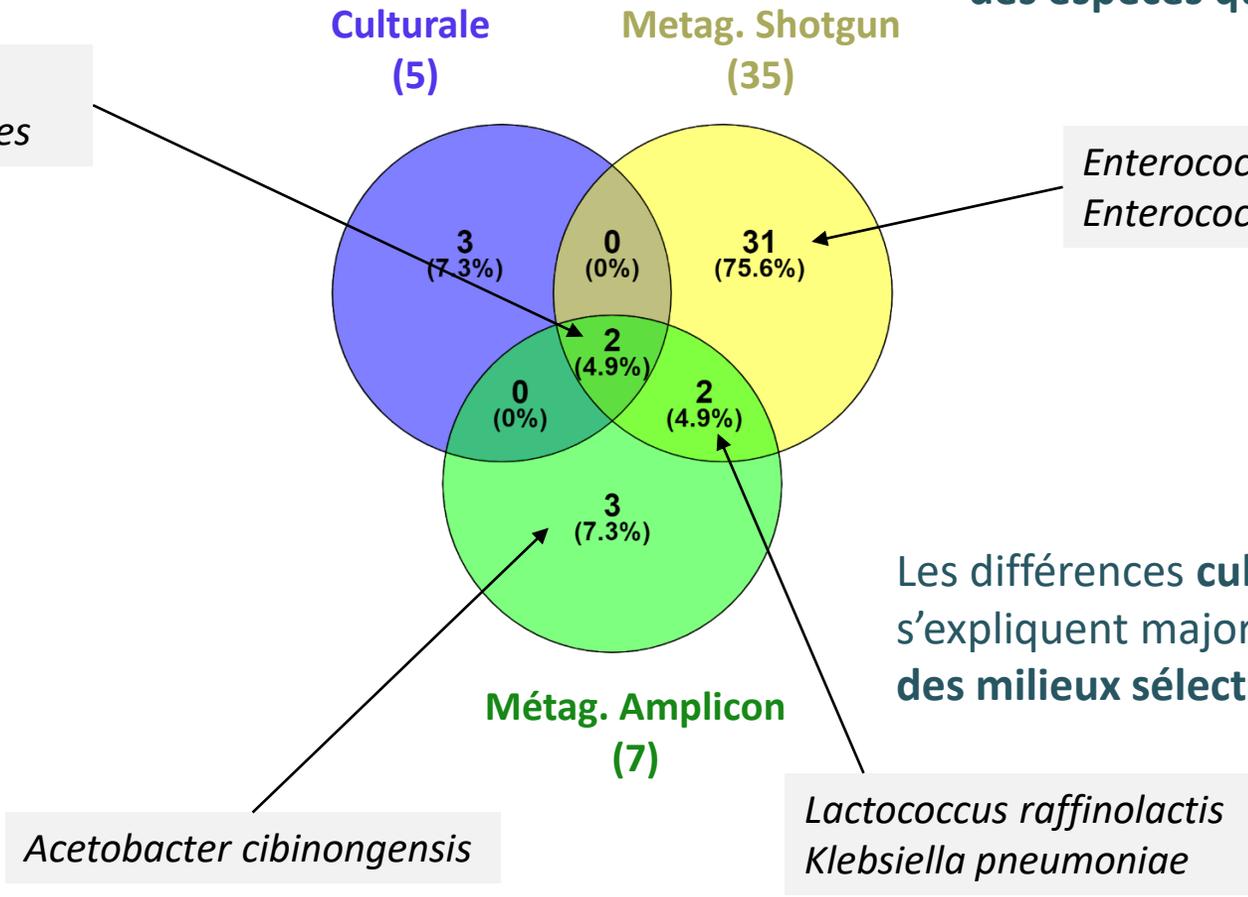
➤ Trois méthodes, trois images différentes ? Au stade « Caillé »

Les trois méthodes s'accordent sur les espèces dominantes

La méthode *shotgun* détecte dès le stade caillé des espèces qui seront isolées durant l'affinage

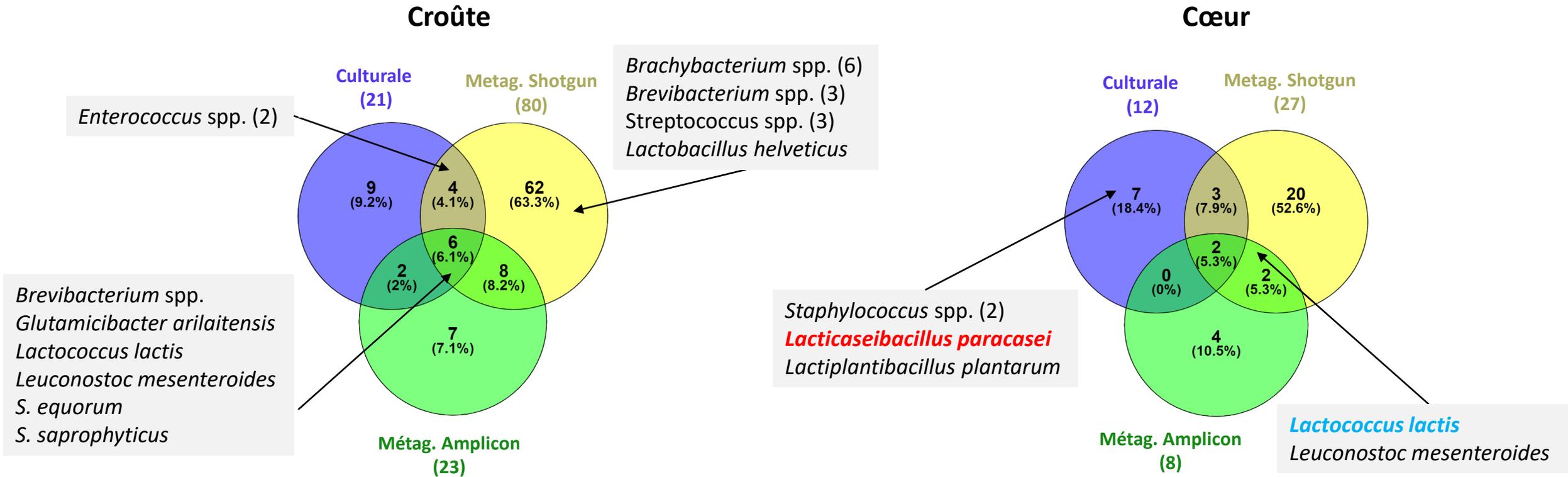
Lactococcus lactis
Leuconostoc mesenteroides

Enterococcus faecium
Enterococcus faecalis



Les différences **culturelles VS indépendantes** s'expliquent majoritairement par le **choix des milieux sélectifs**

➤ Trois méthodes, trois images différentes ? Aux stades « Affinage »



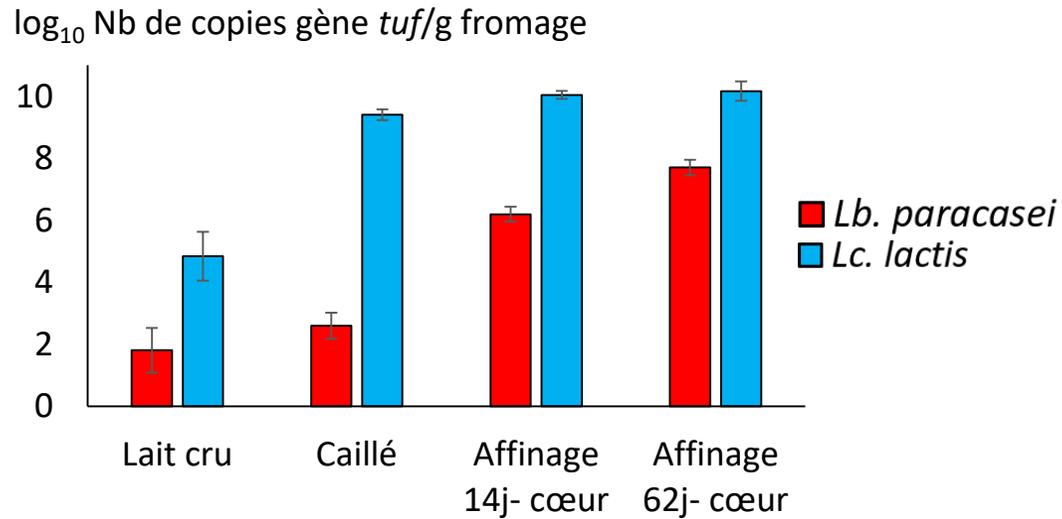
Les trois méthodes montrent une augmentation de la diversité dans la croûte au cours de l'affinage.

Divergence majeure des espèces dominantes au cœur

➤ Comment expliquer cette disparité *L. lactis* Vs *Lb. paracasei* ?

Biais techniques ?

- Amplification ? Test amorces (métag. Amplicon) sur isolats *Lb. paracasei* ✓
- Problème d'extraction ADN ? → Quantification qPCR



Lb. paracasei augmente au cours de l'affinage dans le cœur mais reste 3 log₁₀ sous *L. lactis*

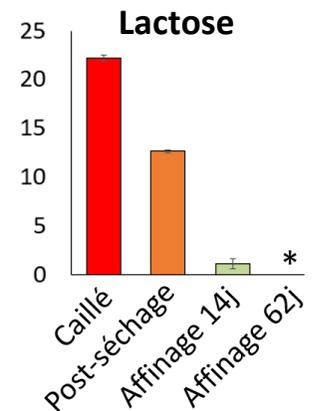
➔ Accumulation ADN *L. lactis* (cellules mortes) ?

Shotgun : faibles abondances des espèces durant l'affinage

➔ *L. lactis* : état Viable Non Cultivable (VBNC) ?

Observé sur certains fromages¹

Corrélation possible avec épuisement du lactose ?



➤ Conclusion

Trois méthodes, deux images



stade caillé ✓

stade affinage ✗

Espèces dominantes pendant acidification

Masquage possible ?



Approche culturelle essentielle...

Meilleure vision des **dynamiques** des espèces

30 souches autochtones mises en collection

- A nécessité une collecte isolats conséquente
- Déréplication Maldi-tof efficace
- Conditionnée par le choix des milieux

...mais pas suffisante

Approches culture-indépendantes :

Avantage Shotgun :

biais possible des abondances relatives

→ profondeur supérieure à la métagénomique amplicon

→ détection précoce de certaines espèces

Qui est présent ? ✓

Qui est présent et quand ?

1^{ère} approche : métagénomique *Shotgun*

Milieux sélectifs adéquats ↓

2^{ème} approche : approche culture-dépendante

Populations bactériennes et fongiques
Accès potentiel aux fonctionnalités



INRAE

23^{ème} colloque du CBL

9 juin 2022 - Marine Penland

➤ Remerciements

Partenaires

Producteur de Pélardon

 Olivier Rué
Géraldine Pascal

Financeurs

Projet
ProMedFoods

AGENCE NATIONALE DE LA RECHERCHE




Co-auteurs



Hélène
Falentin



Stéphanie-Marie
Deutsch



Monika
Coton



Jérôme
Mounier



Anne
Thierry



Sandrine
Parayre

Marie-Bernadette
Maillard

Audrey
Pawtowsky

Merci de votre attention



INRAE

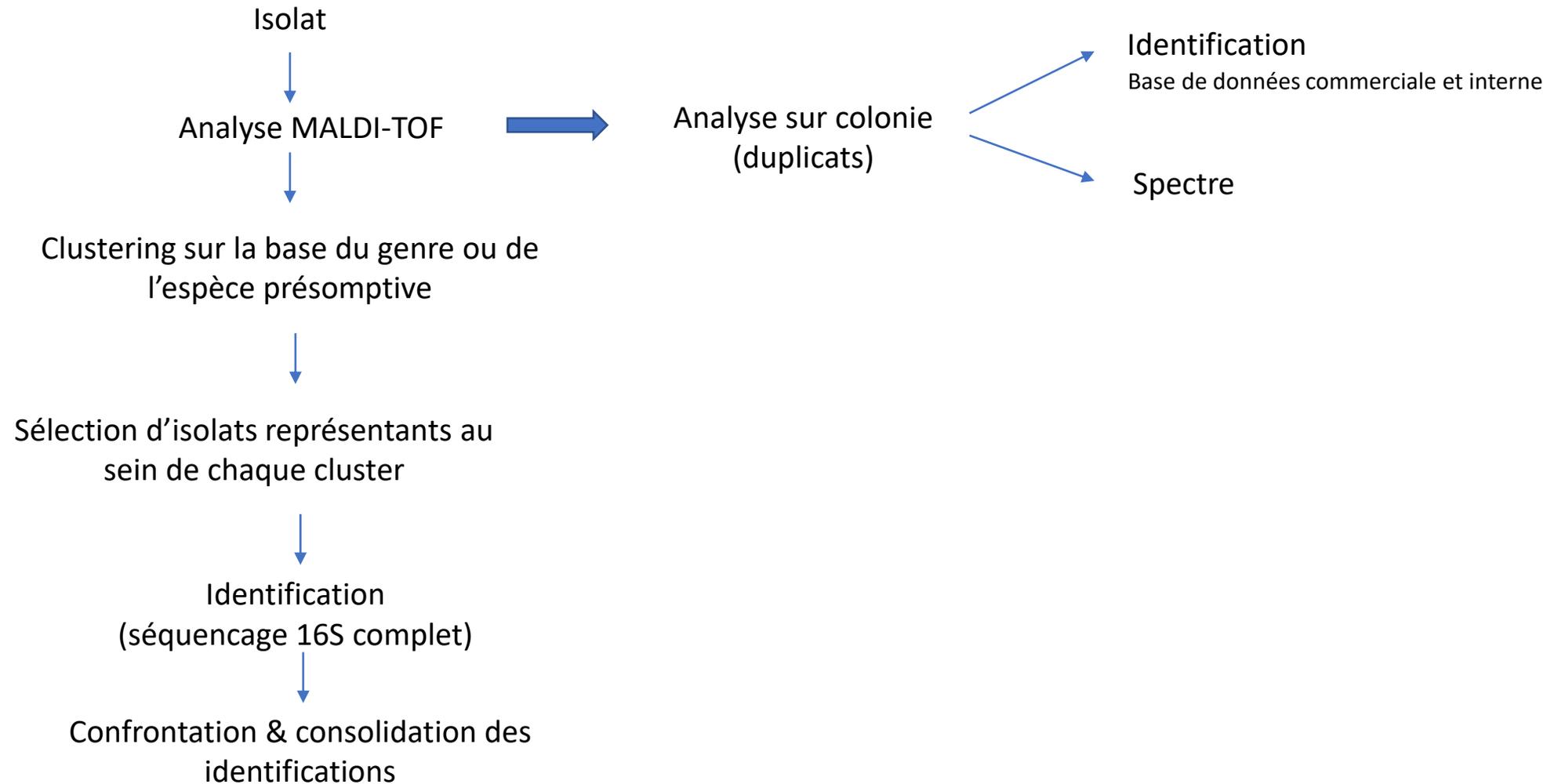
23^{ème} colloque du CBL

9 juin 2022 - Marine Penland

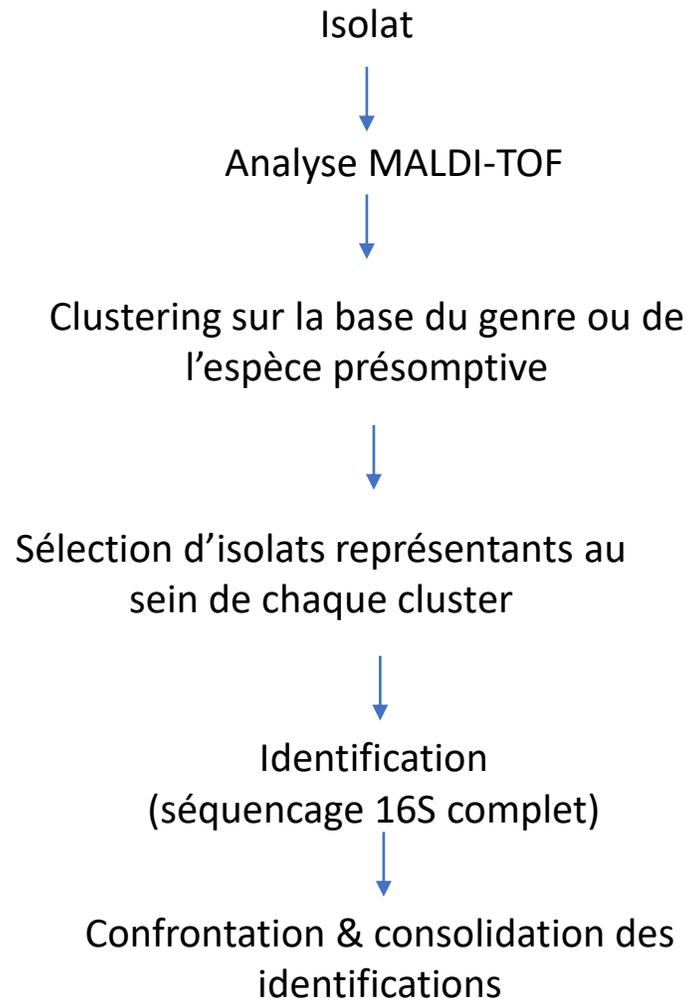
➤ Diapositives supplémentaires



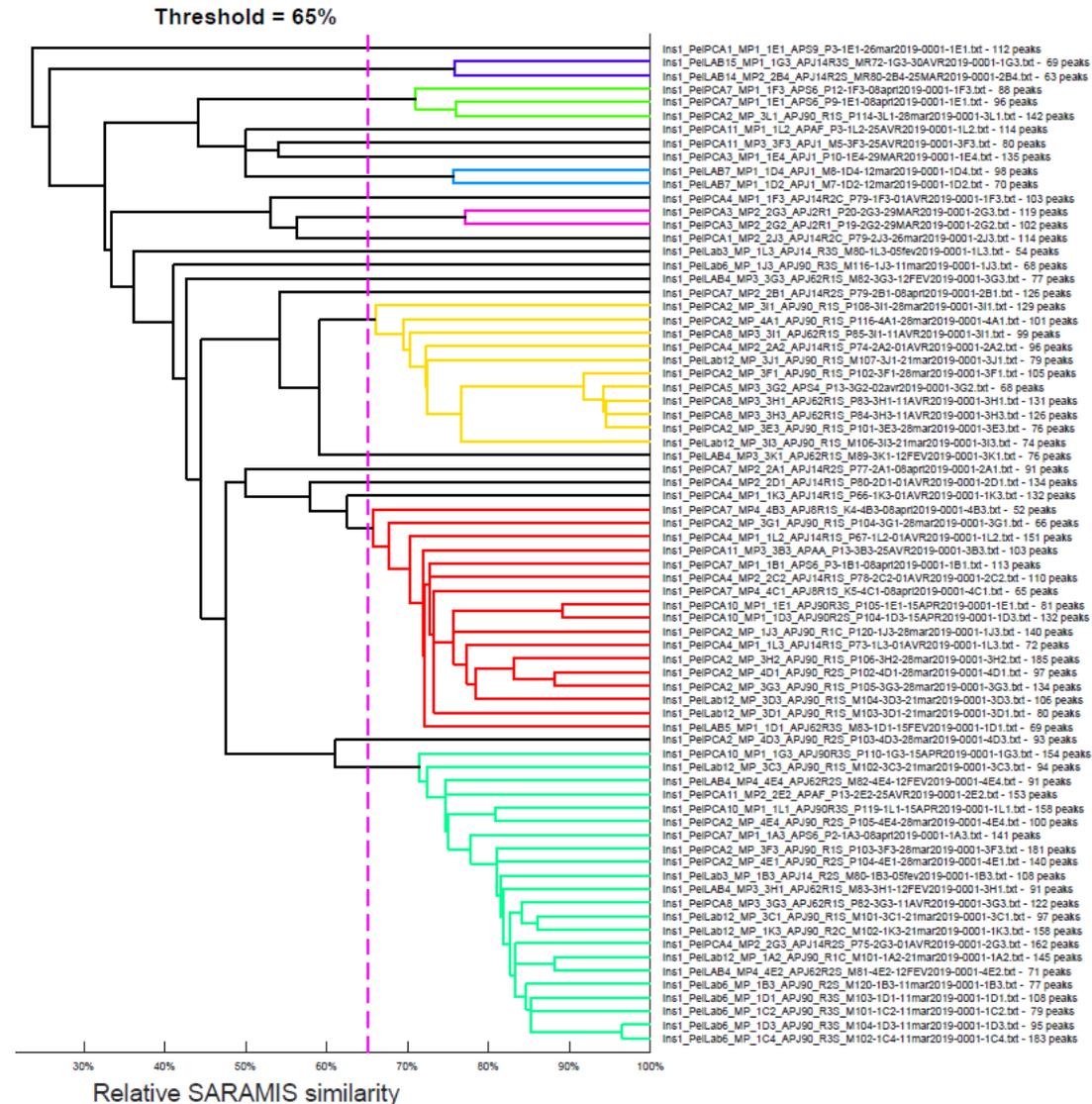
Procédé de déréplication



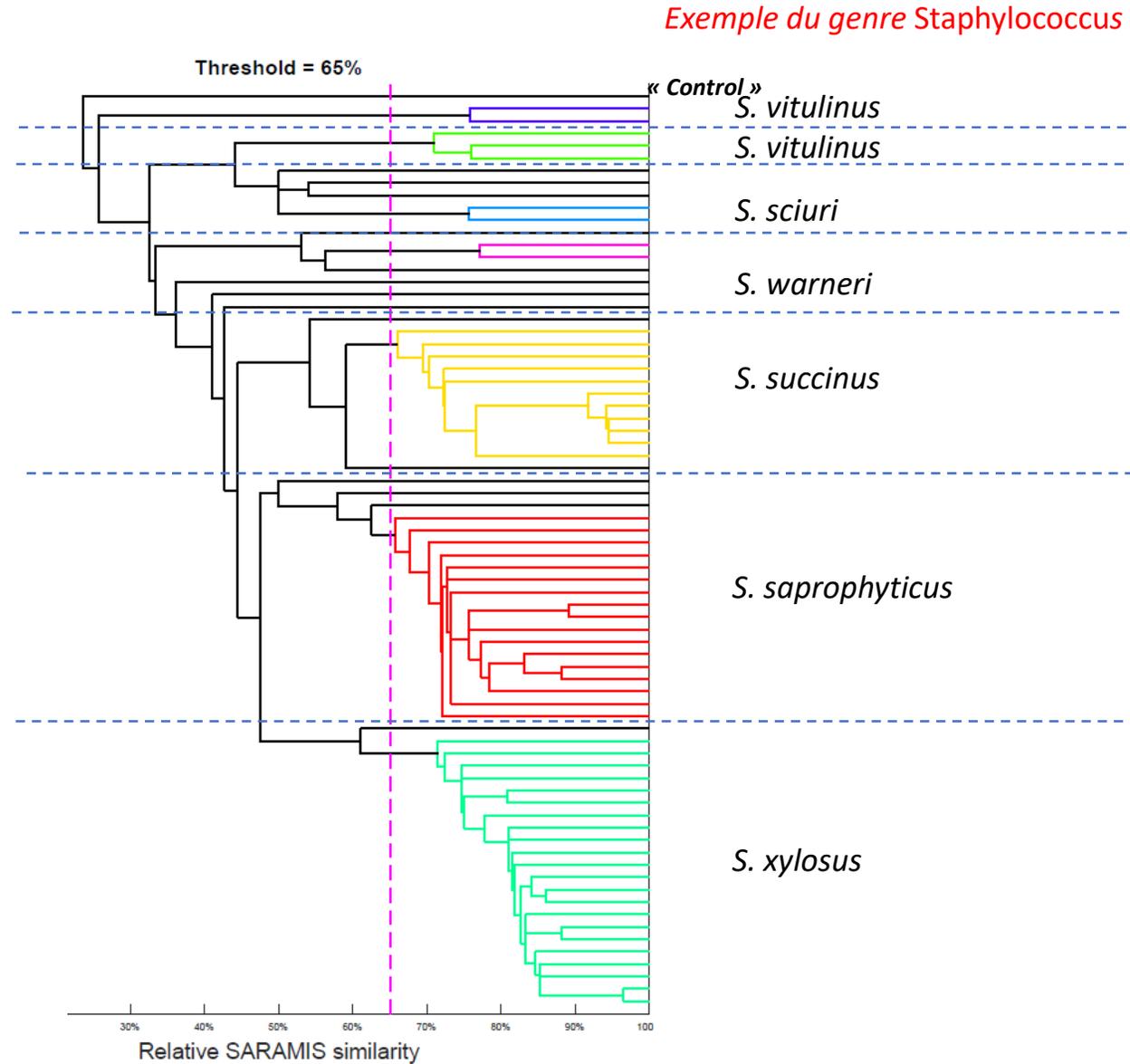
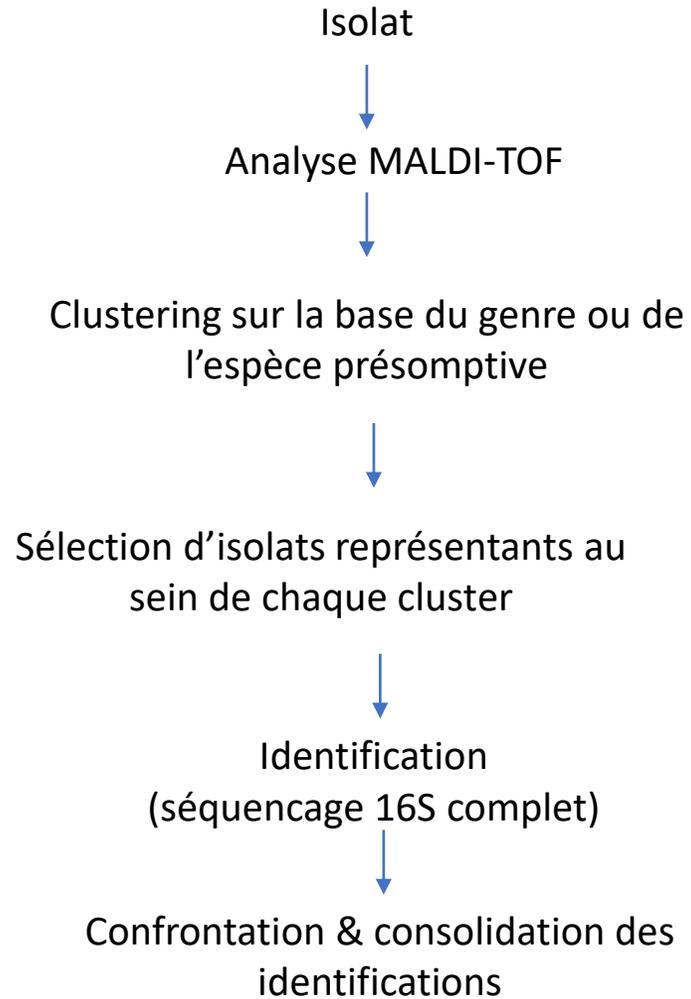
Procédé de déréplication



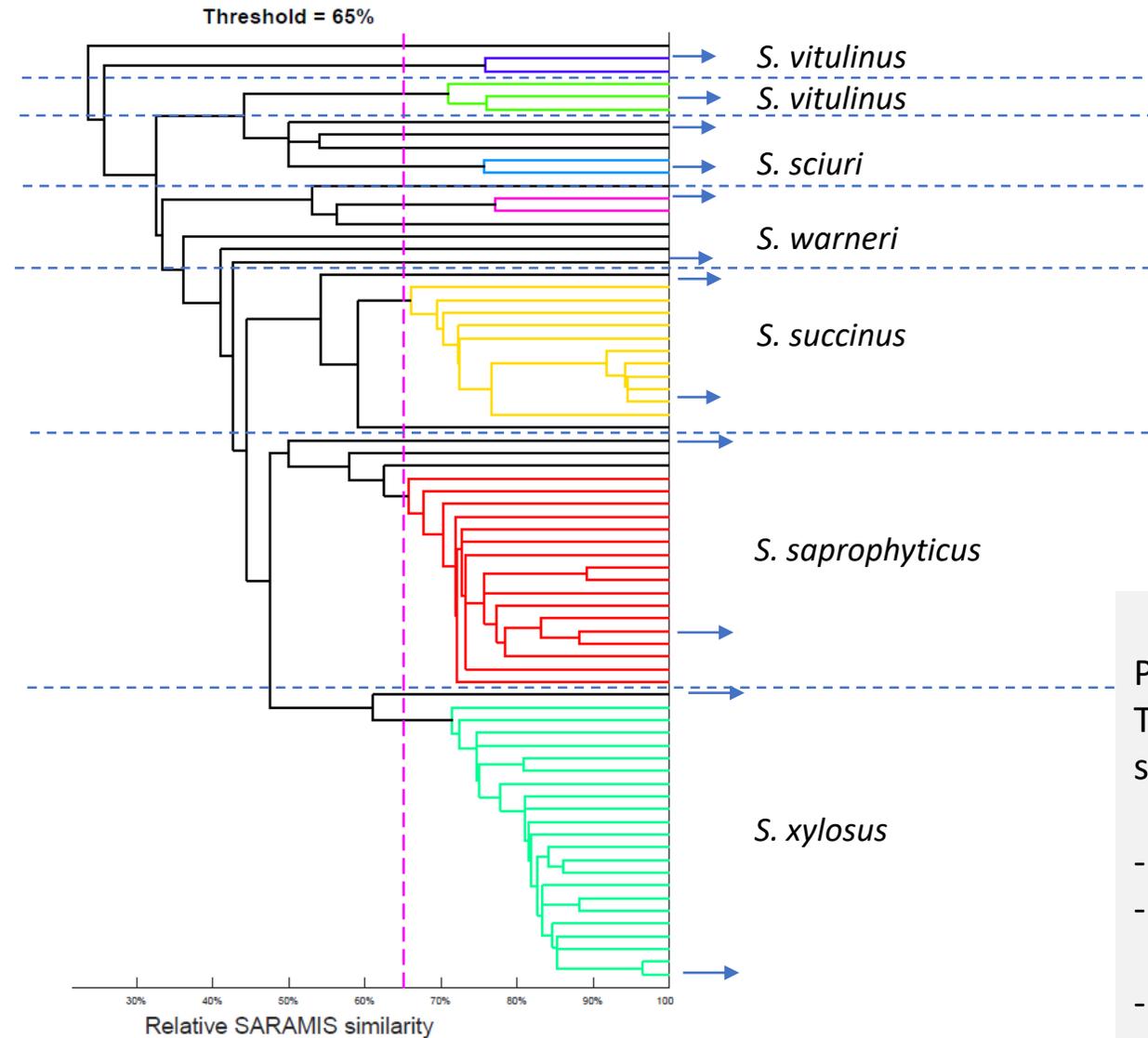
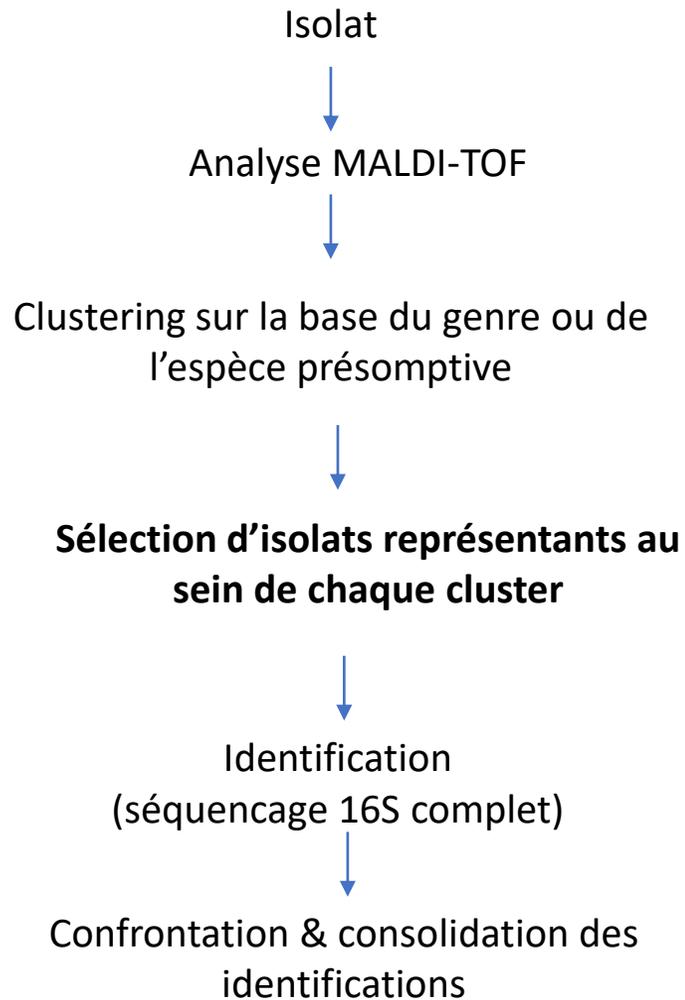
Exemple du genre Staphylococcus



Procédé de déréplication



Procédé de déréplication



Pour chaque espèce,
Trois critères de
sélection

- dissimilarité
- Jour de prélèvement
- ID incohérente au sein d'un cluster

Procédé de déréplication

