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 culturales 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-03693861

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

23ème congrès du CBL – 9 juin 2022

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

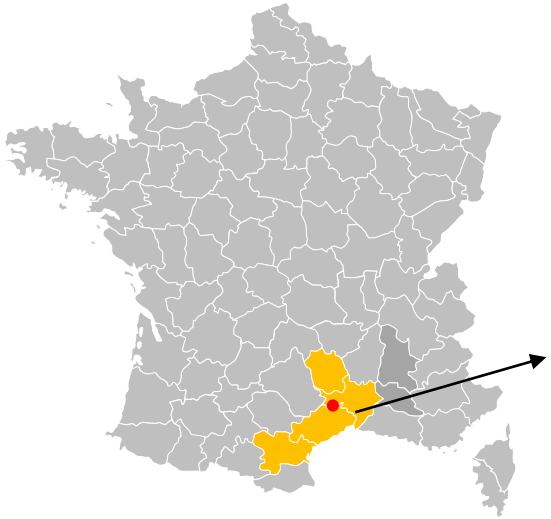
Gène ciblé **métagénomique amplicon**	ADN total **métagénomique « *shotgun* »**

☺ 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

Échantillons

Caillé (2 j)

Affinage 14 j

Affinage 62 j

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

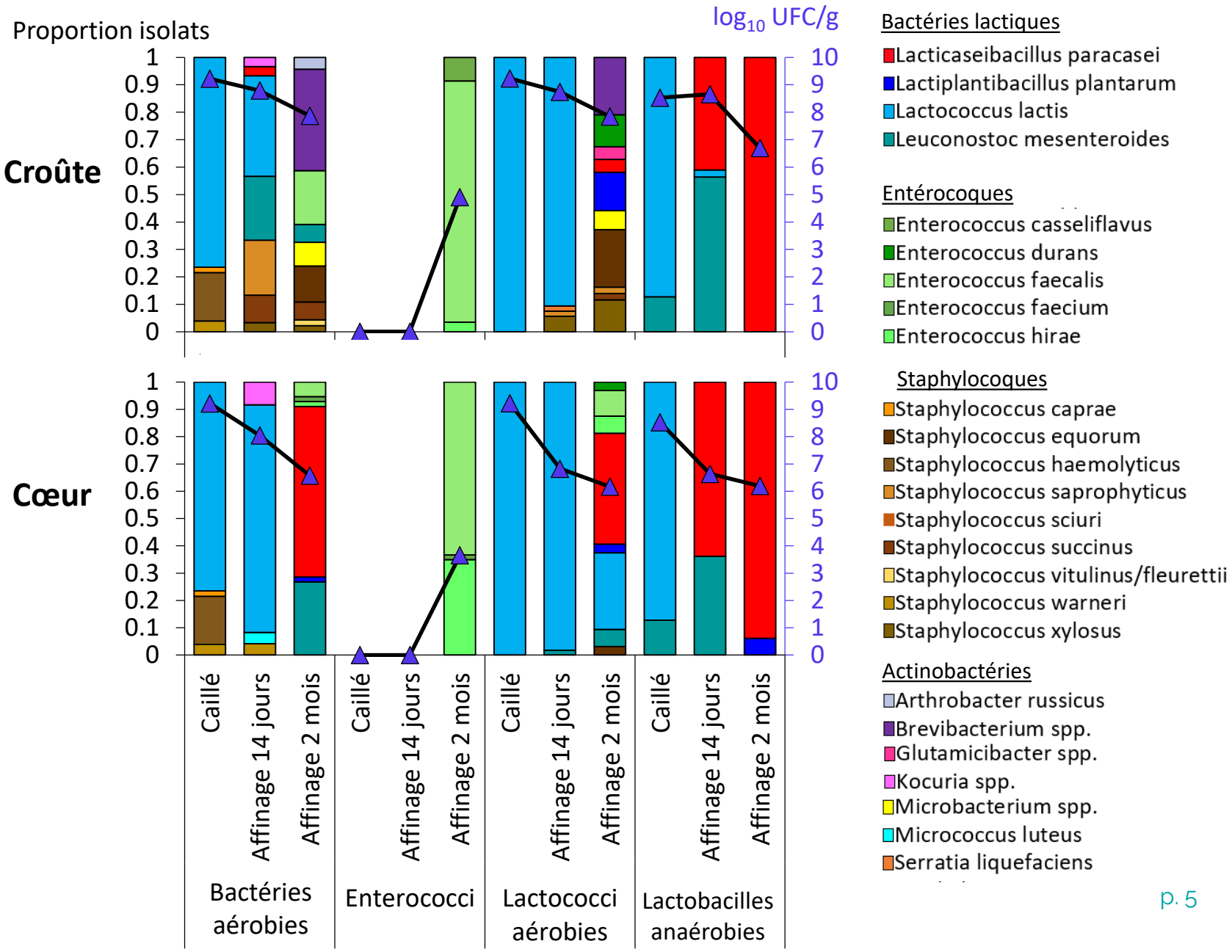
[1] amorces (S-D-Bact-0341-b-S-17/S-D-Bact-0785-a-A-21) (Klindworth *et al.*, 2013)

[2] Escudié *et al.* (2018)

[3] Menzel *et al.* (2016)

Diversité bactérienne par approche culturale

25 espèces (13 genres) ont été identifiées.

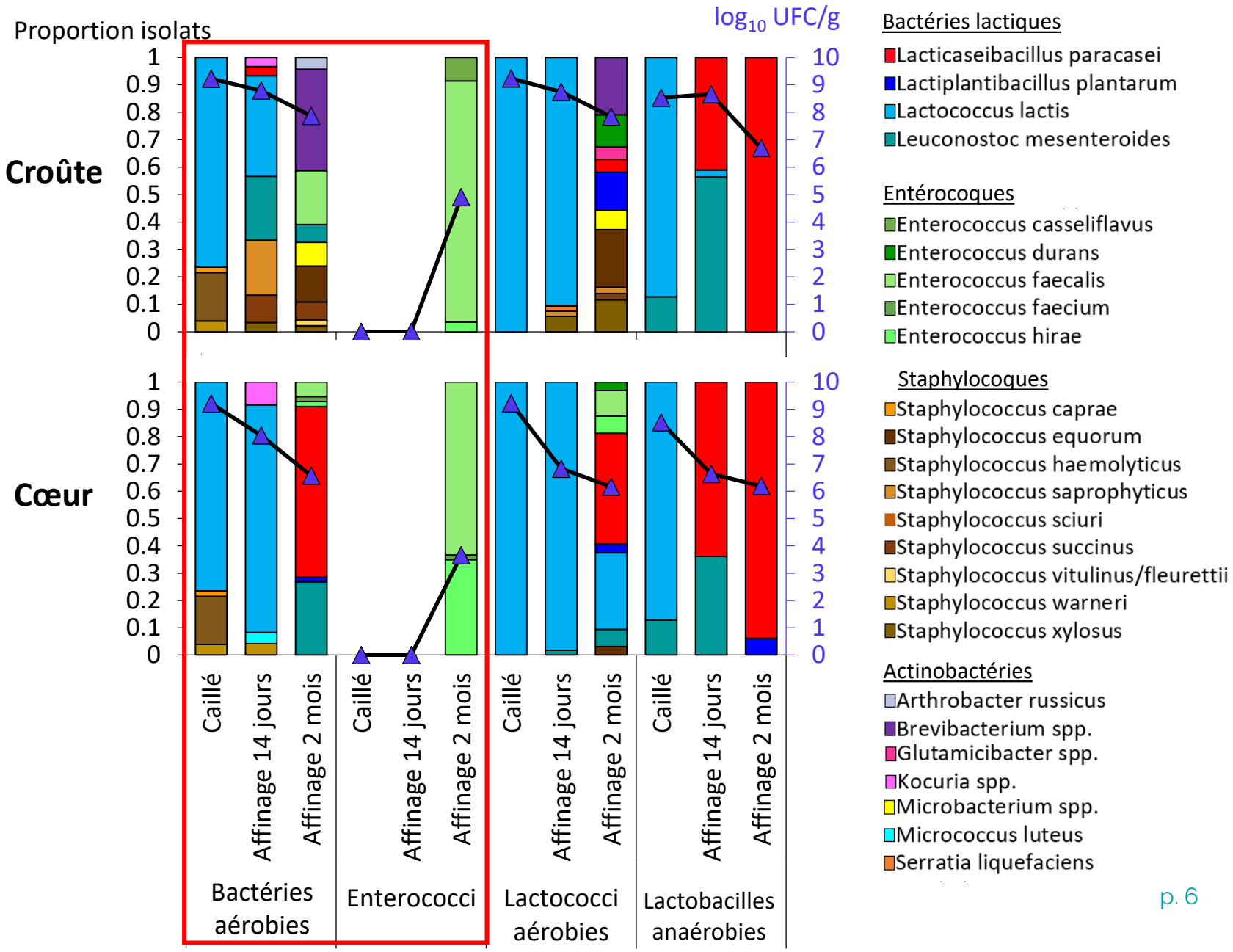


Diversité bactérienne par approche culturale

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

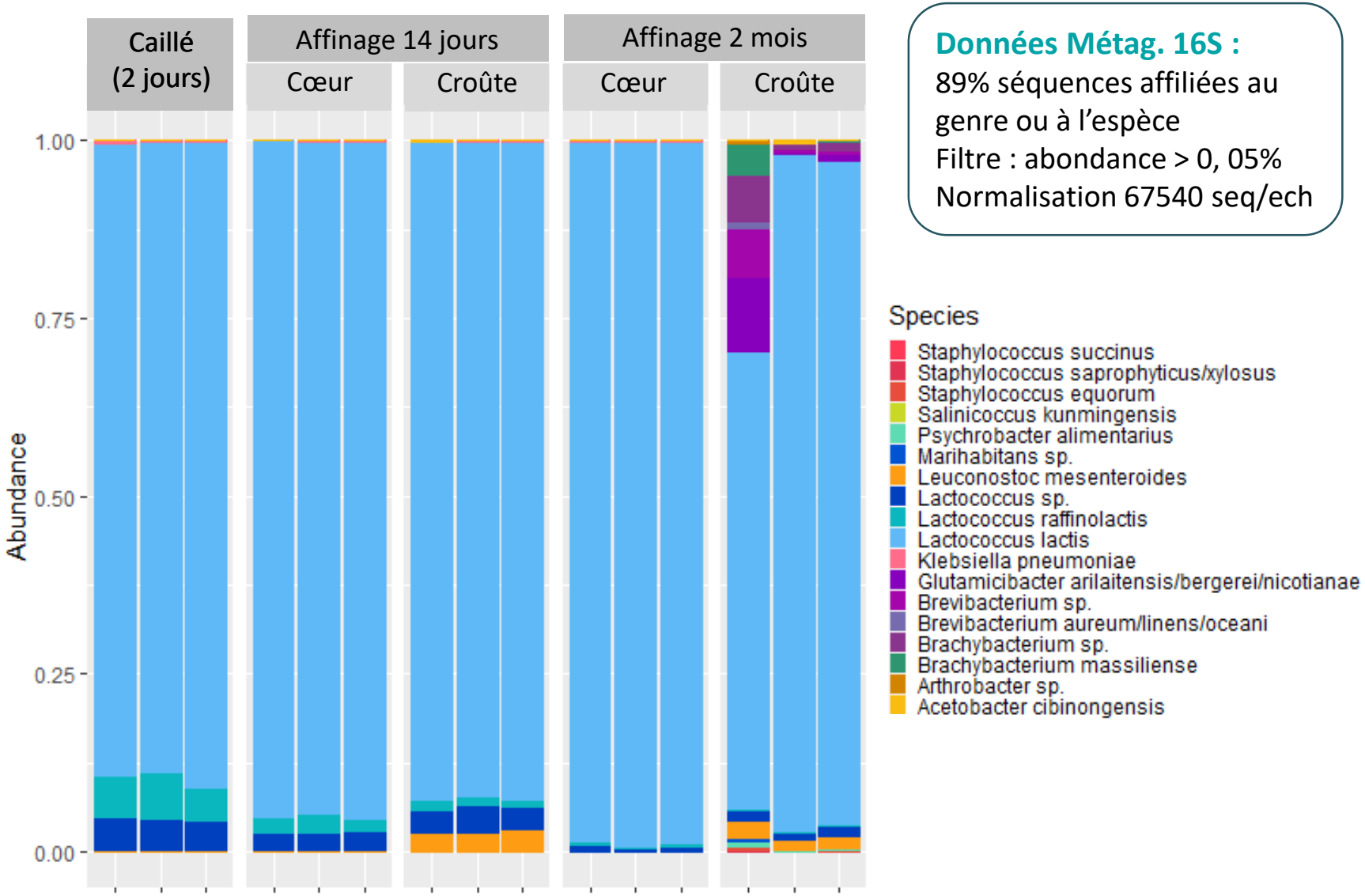


Diversité bactérienne par approche métagénomique amplicon

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***.

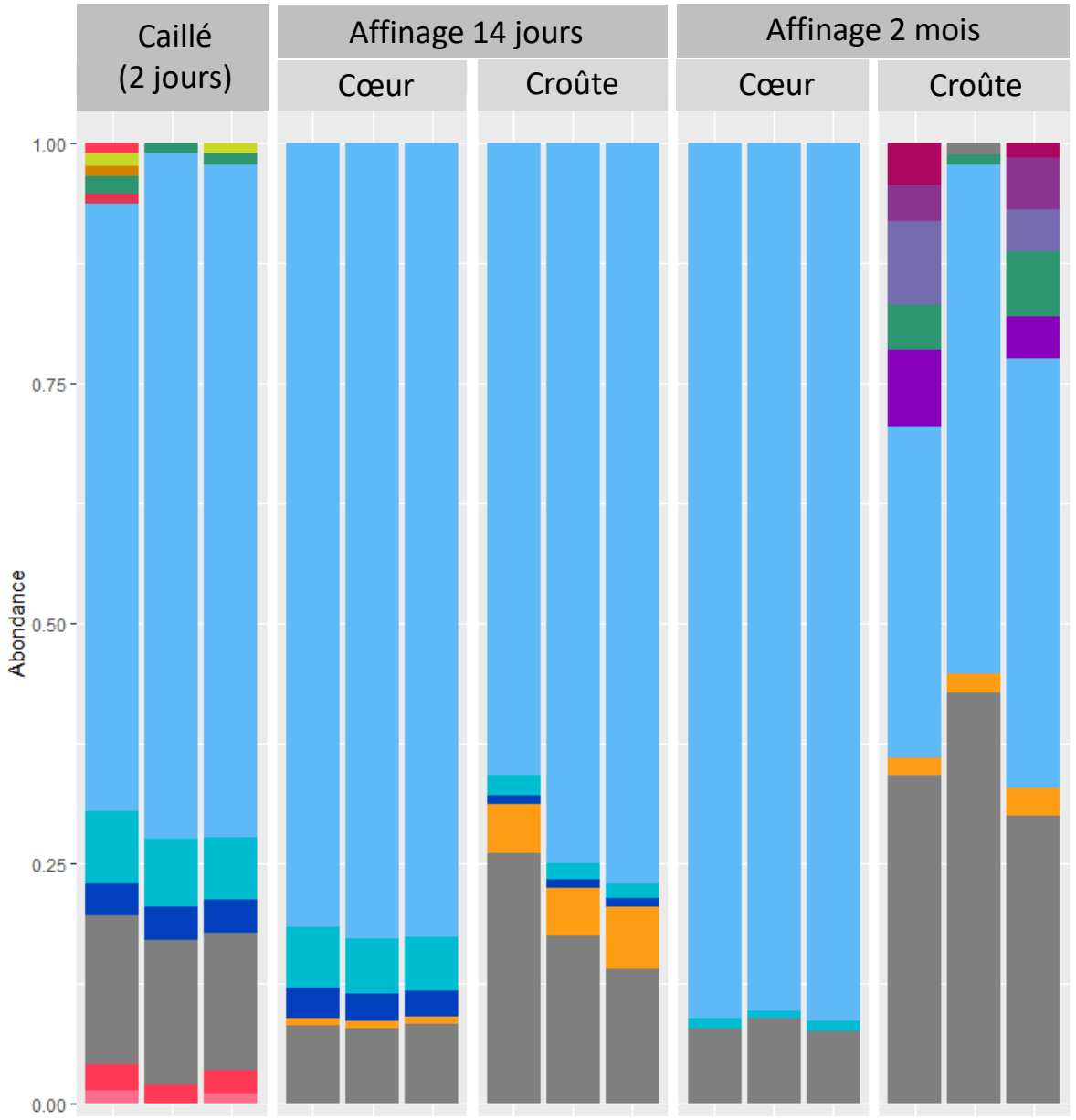


Données Métag. 16S :
89% séquences affiliées au genre ou à l'espèce
Filtre : abondance > 0, 05%
Normalisation 67540 seq/ech

Penland *et al.* (2020)

Diversité bactérienne par approche métagénomique *shotgun*

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



Données *shotgun* :
$4{,}5.10^6$ reads/ech
Filtre : 0,01%

Diversité spécifique : abondance > 1%

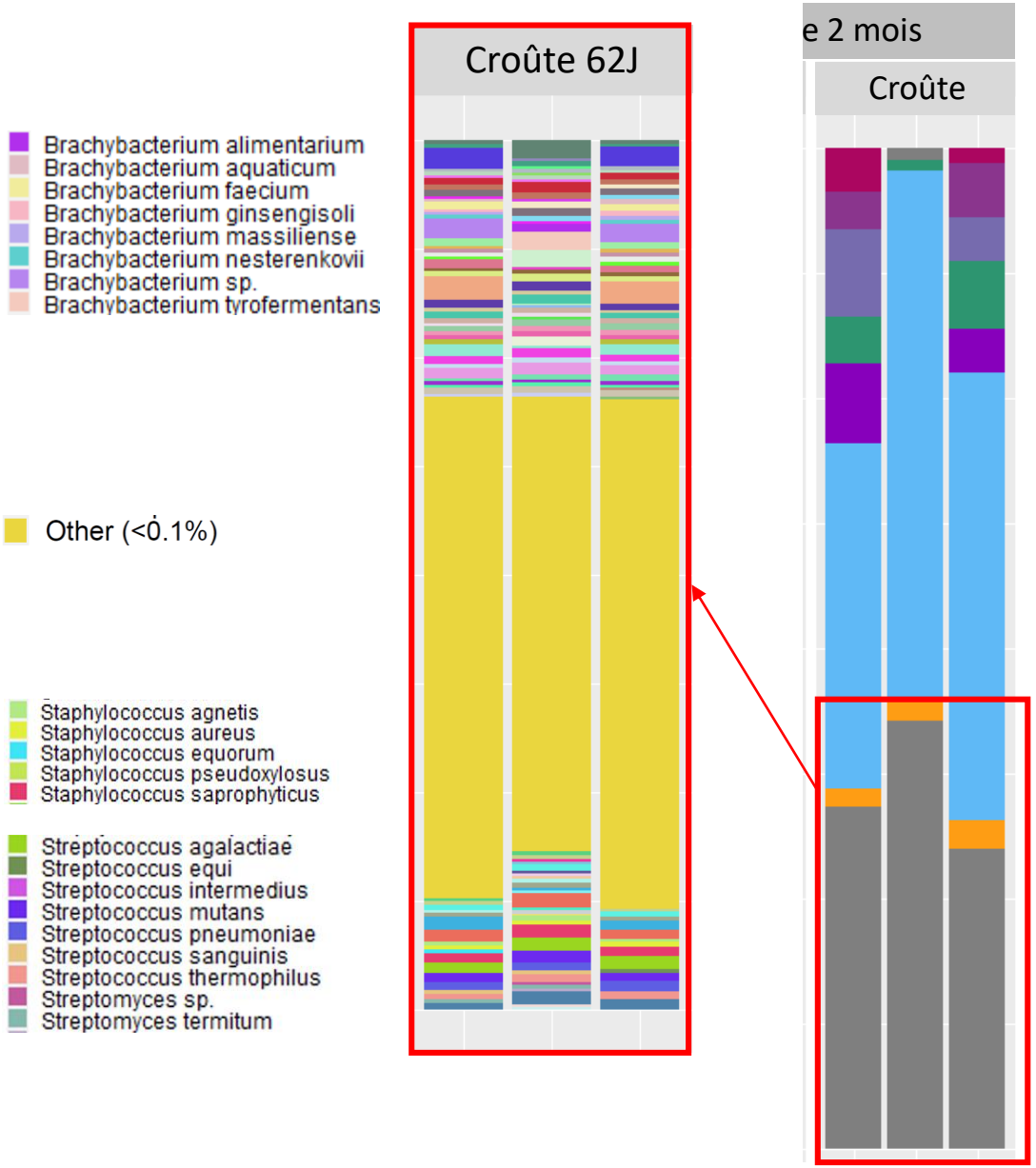
- Lactococcus lactis
- Lactococcus laudensis
- Lactococcus raffinolactis
- Leuconostoc mesenteroides
- Streptococcus pneumoniae
- Enterococcus faecalis
- Enterococcus faecium
- Escherichia coli
- Campylobacter coli
- Anaplasma phagocytophilum
- Staphylococcus aureus
- Glutamicibacter arilaitensis
- Brevibacterium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

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%**



Données *shotgun* :
4,5.10^6 reads/ech
Filtre : 0,01%

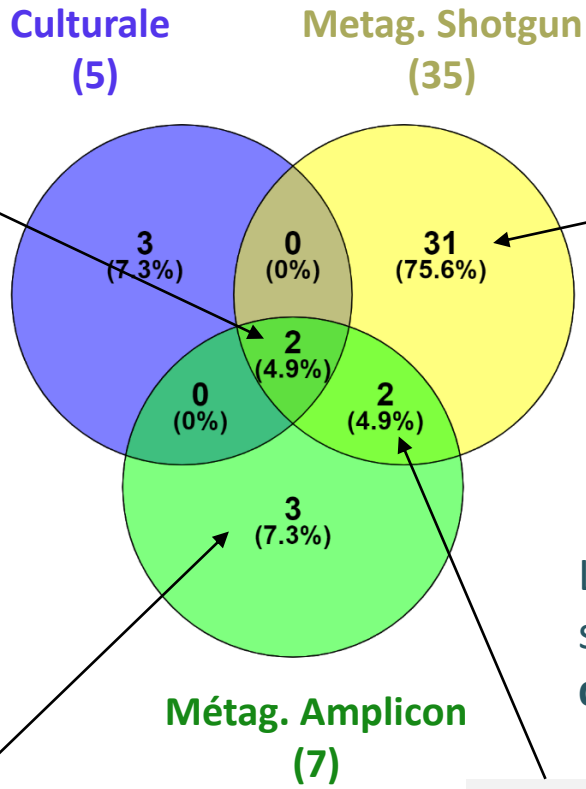
Diversité spécifique : abondance > 1%

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 **culturales VS indépendantes** s'expliquent majoritairement par le **choix des milieux sélectifs**

Acetobacter cibinongensis

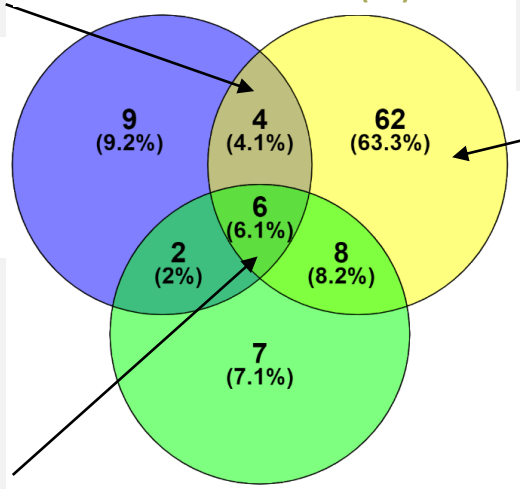
Lactococcus raffinolactis
Klebsiella pneumoniae

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

Croûte

Enterococcus spp. (2)

Brachybacterium spp. (6)
Brevibacterium spp. (3)
Streptococcus spp. (3)
Lactobacillus helveticus

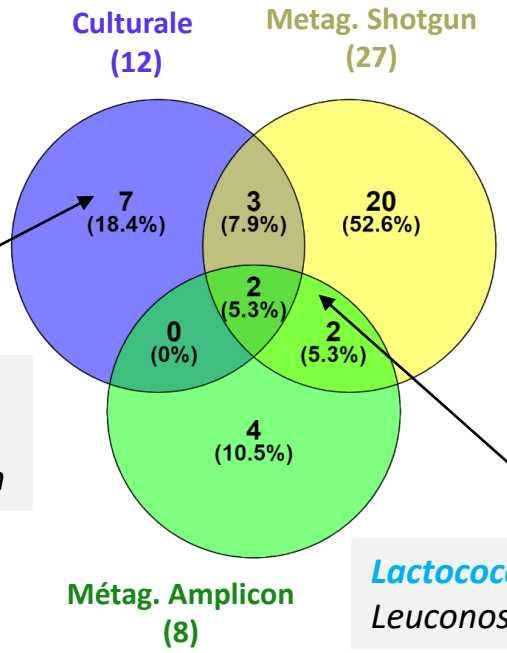


Brevibacterium spp.
Glutamicibacter arilaitensis
Lactococcus lactis
Leuconostoc mesenteroides
S. equorum
S. saprophyticus

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

Cœur

Staphylococcus spp. (2)
Lacticaseibacillus paracasei
Lactiplantibacillus plantarum



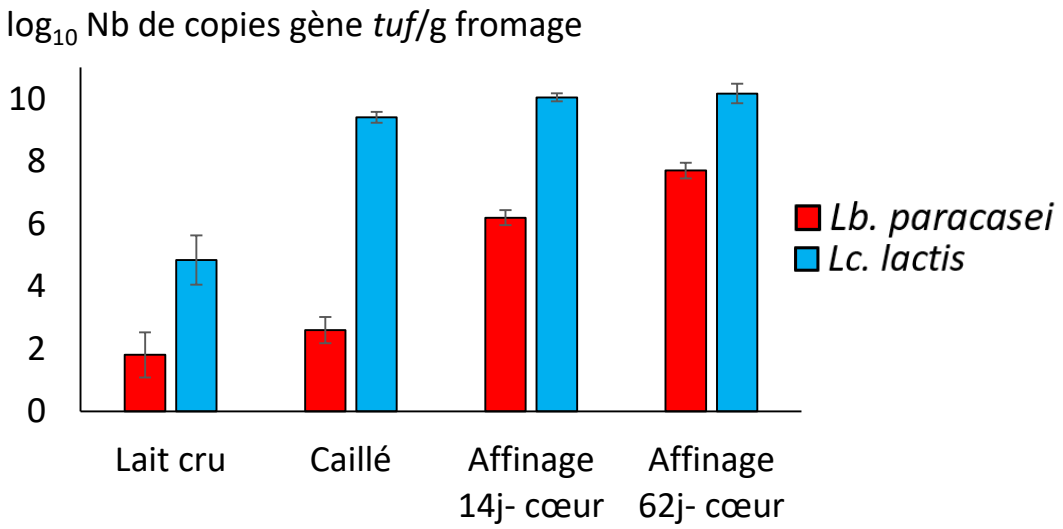
Lactococcus lactis
Leuconostoc mesenteroides

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 $\log_{10}$ sous *L. lactis*

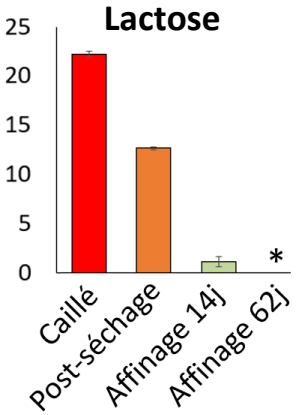
Accumulation ADN *L. lactis* (cellules mortes) ?

Shotgun : faibles abondances des espèces durant l'affinage

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

Observé sur certains fromages[1]

Corrélation possible avec épuisement du lactose ?



[1] Edalatian *et al.* (2012) ; Ruggirello *et al.* (2014)

Conclusion

Trois méthodes, deux images

stade caillé ✔

stade affinage ✗

Espèces dominantes pendant acidification

Masquage possible ?

Approche culturale 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 ?

1ère approche : métagénomique *Shotgun*

Milieux sélectifs adéquats ⇩

2ème approche : approche culture-dépendante

Populations bactériennes et fongiques
Accès potentiel aux fonctionnalités

Remerciements

Partenaires

Producteur de Pélardon

Olivier Rué
Géraldine Pascal

Financeurs

Projet
ProMedFoods

Co-auteurs

Hélène
Falentin

Stéphanie-Marie
Deutsch

Monika
Coton

Jérôme
Mounier

Anne
Thierry

Sandrine
Parayre

Marie-Bernadette
Maillard

Audrey
Pawtowsky

Merci
de votre attention

Diapositives supplémentaires

Procédé de déréplication

Isolat

↓

Analyse MALDI-TOF

↓

Clustering sur la base du genre ou de l'espèce présomptive

↓

Sélection d'isolats représentants au sein de chaque cluster

↓

Identification
(séquencage 16S complet)

↓

Confrontation & consolidation des identifications

→

Analyse sur colonie
(duplicats)

→ Identification
Base de données commerciale et interne

→ Spectre

Procédé de déréplication

Isolat

↓

Analyse MALDI-TOF

↓

Clustering sur la base du genre ou de l'espèce présomptive

↓

Sélection d'isolats représentants au sein de chaque cluster

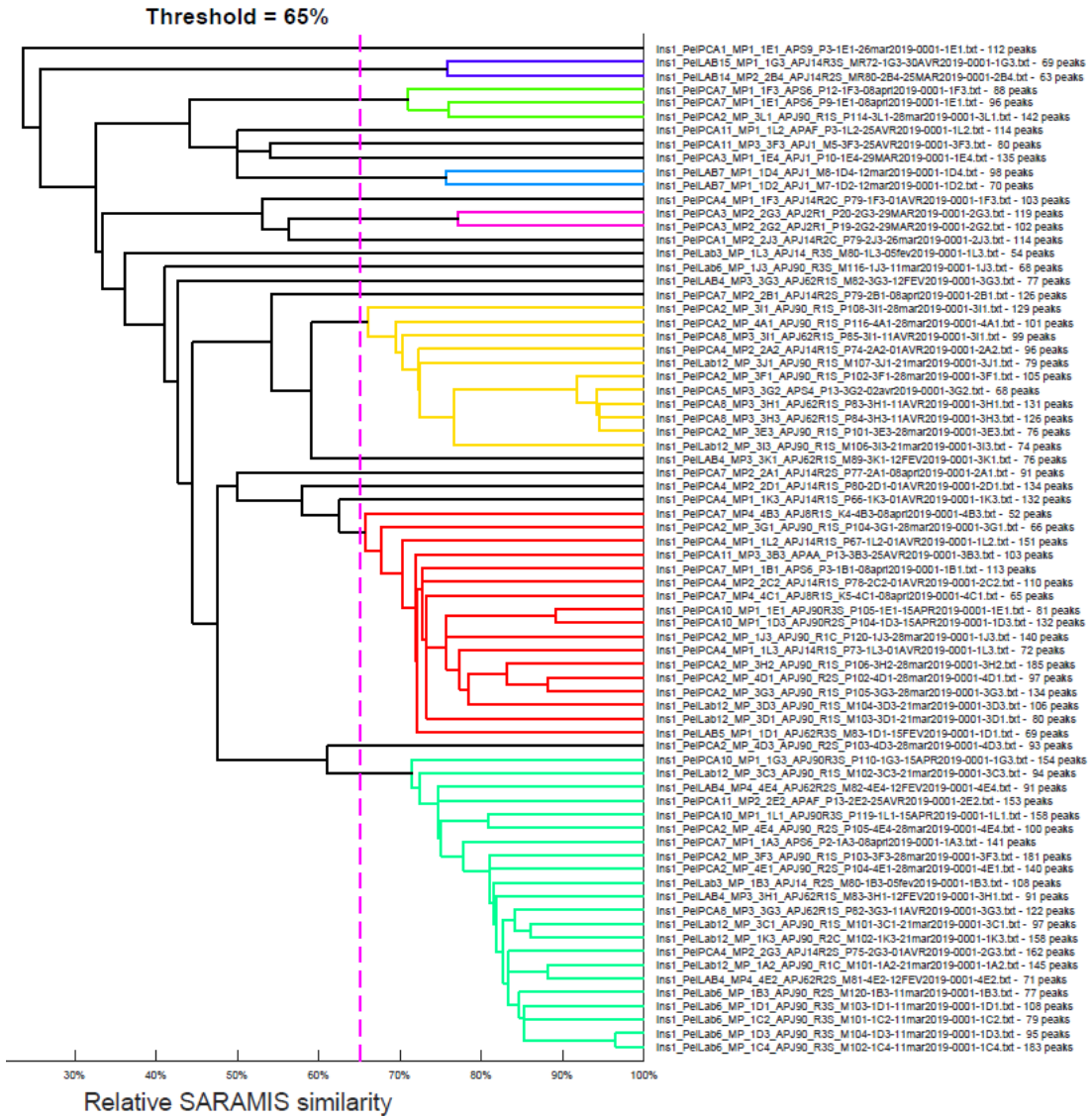
↓

Identification (séquencage 16S complet)

↓

Confrontation & consolidation des identifications

Exemple du genre Staphylococcus



Procédé de déréplication

Isolat

↓

Analyse MALDI-TOF

↓

Clustering sur la base du genre ou de l'espèce présomptive

↓

Sélection d'isolats représentants au sein de chaque cluster

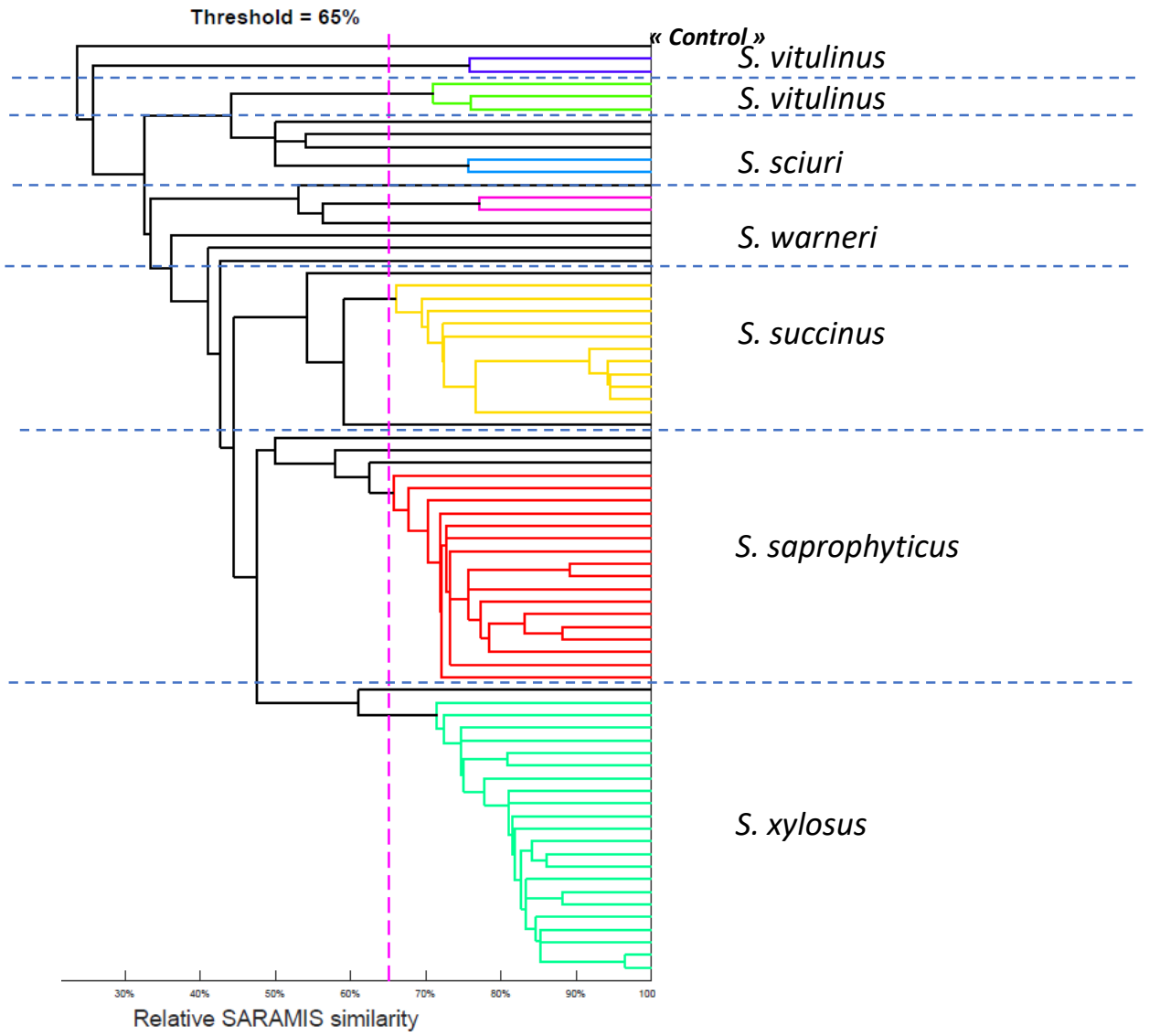
↓

Identification (séquencage 16S complet)

↓

Confrontation & consolidation des identifications

Exemple du genre Staphylococcus



Procédé de déréplication

Isolat

↓

Analyse MALDI-TOF

↓

Clustering sur la base du genre ou de l'espèce présomptive

↓

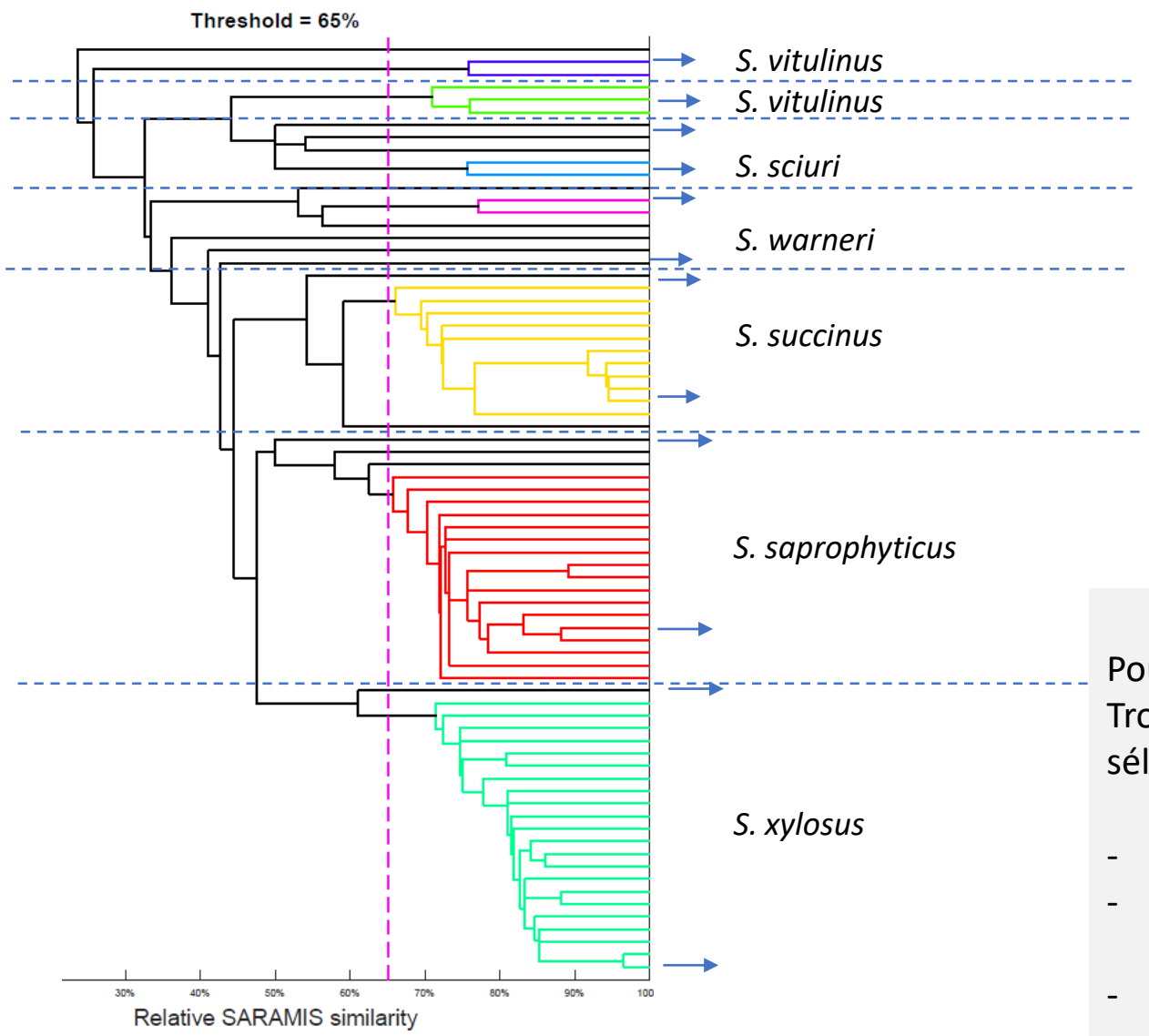
Sélection d'isolats représentants au sein de chaque cluster

↓

Identification
(séquencage 16S complet)

↓

Confrontation & consolidation des identifications



Pour chaque espèce, Trois critères de sélection

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

Procédé de déréplication

Isolat

↓

Analyse MALDI-TOF

↓

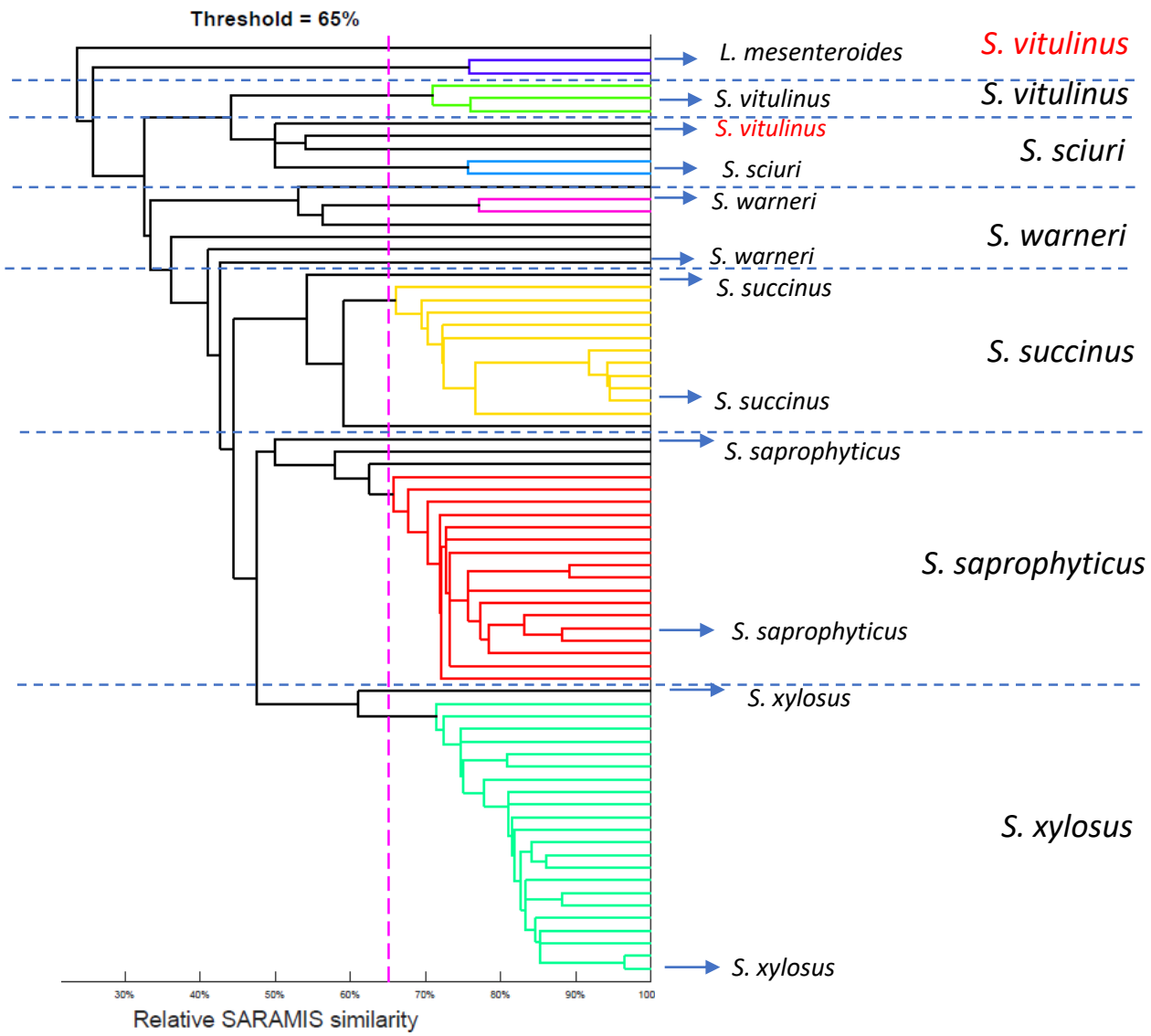
Clustering sur la base du genre ou de l'espèce présomptive

↓

Sélection d'isolats représentants au sein de chaque cluster

↓

Identification
(séquencage 16S complet)

↓

Confrontation & consolidation des identifications