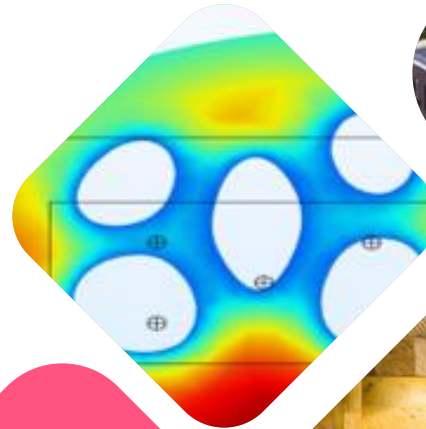
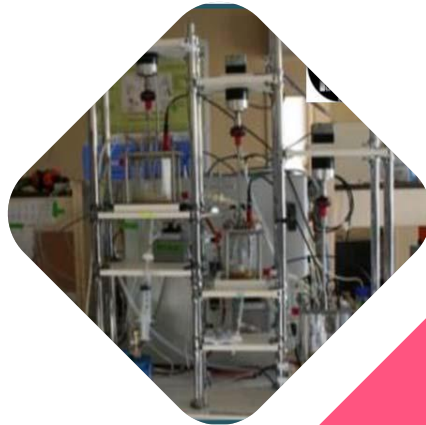


Nouveau regard sur les communautés microbiennes des aliments fermentés grâce aux approches « méta-omiques »

Eric Dugat-Bony



Les écosystèmes microbiens

- Ecosystèmes dont la composante vivante est constituée de microorganismes
- Ecologie microbienne: discipline scientifique pour l'étude de la diversité, la distribution et l'abondance des microorganismes, leurs interactions spécifiques et leur impact sur les écosystèmes



Très variés et de complexité différentes

Soutiennent plusieurs services indispensables à la vie humaine et à celle d'autres organismes

Certains présentent un intérêt d'un point de vue économique

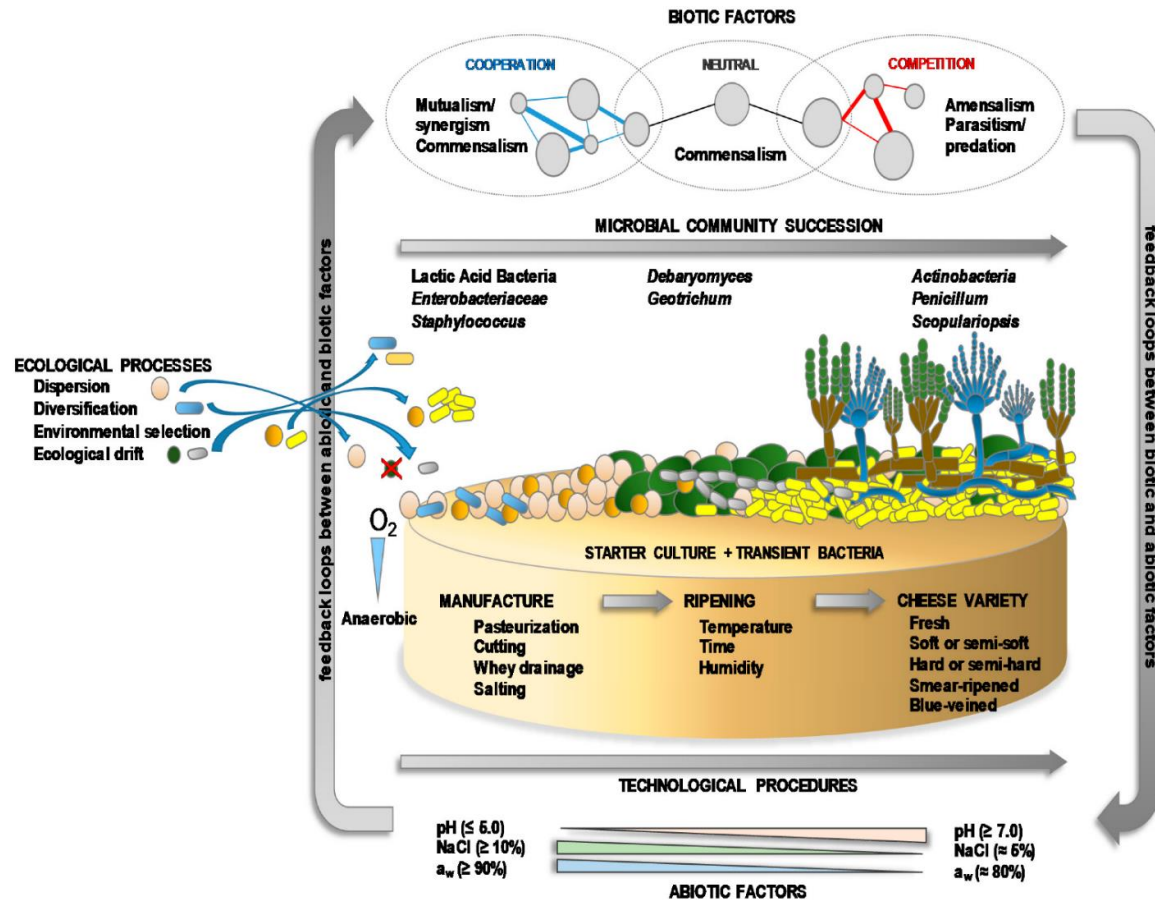
Les aliments fermentés



Illustration générée par intelligence artificielle

- Aliments ou boissons transformés naturellement par l'**action de microorganismes**
- **Fermentation** : procédé permettant d'étendre la durée de **conservation** des denrées alimentaires
- Principaux **microorganismes** impliqués : bactéries, levures et champignons filamenteux
- Modification de la **qualité sensorielle** des produits : goût, texture, odeur

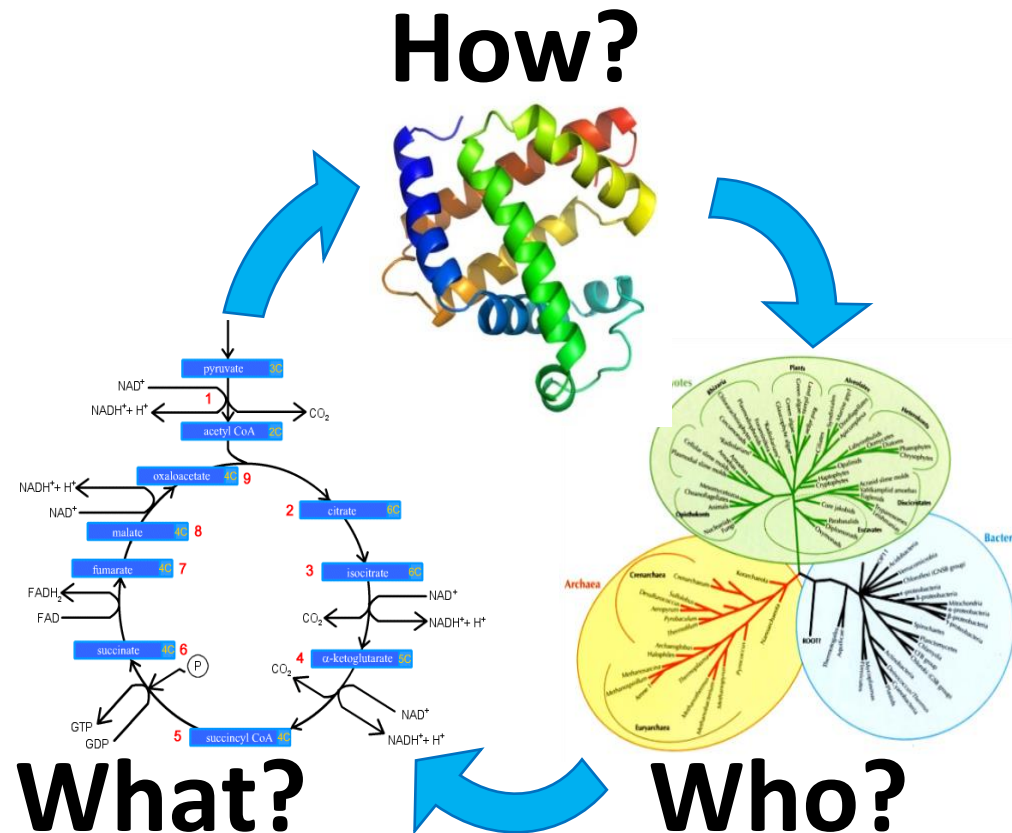
Ecologie microbienne des aliments fermentés : l'exemple du fromage



- **Développement successif** de différents microorganismes
- **Assemblage de communautés** gouverné par :
 - Des facteurs abiotiques imposés par la composition de la matière première et le procédé de transformation (pH, température, NaCl, disponibilité en micronutriments...)
 - Nombreuses interactions microbiennes (positives et négatives) = facteurs biotiques
 - Des processus écologiques complexes

Mayo et al., 2021, <https://doi.org/10.3390/foods10030602>

Les principales questions



- Quels sont les **microorganismes présents** ? Quelle est leur **abondance** dans l'écosystème ?
- Quels sont les **fonctions portées** par ces microorganismes ? Quelles sont celles qui sont **exprimées** dans les conditions étudiées ?
- Comment le système **fonctionne** ? Comment est-il **régulé** ? Quelles sont les **interactions** mises en jeu ?
- Comment le système **réagit** et **s'adapte** suite à une **perturbation** ?

La collecte de données « Omiques »



Métagénome - Métagenomique

Un métagénome correspond à l'ensemble du contenu génomique des microorganismes présents dans un échantillon donné.

La métagenomique est la méthodologie permettant l'étude des metagenomes et donc du contenu en gènes des échantillons.

Métatranscriptome - Métatranscriptomique

Le métatranscriptome correspond au niveau d'expression de tous les gènes exprimés par les microorganismes dans un échantillon donné et à un instant donné.

La métatranscriptomique est la méthodologie utilisée pour étudier les métatranscriptomes.

Métabolome - Métabolomique

Le Métabolome correspond à l'ensemble des protéines détectées dans un échantillon donné et à un instant donné.

La métraproteomique est la methodology utilisée pour étudier les métabolomes.

Métabolome - Métabolomique

Le métabolome correspond à l'ensemble des métabolites détectés dans un échantillon donné.

La métabolomique est la méthodologie utilisée pour étudier les métabolomes.

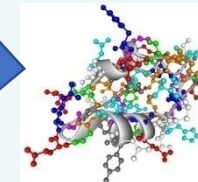
ADN



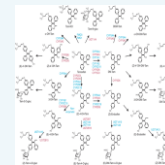
ARN



Protéines



Métabolites



Méthodes de
séquençage à
haut débit

Chimie Analytique
(UHPLC-MS/MS, GC-
MS, RMN)

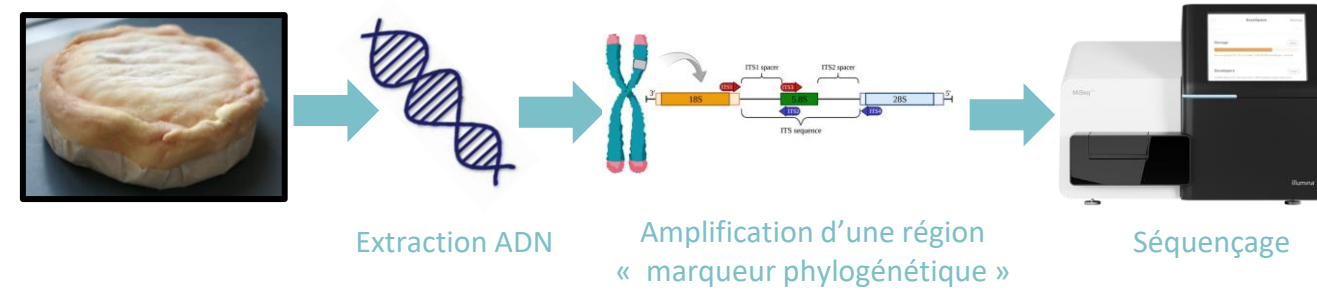
La métagénomique pour répondre à quelles questions ?

Métagénomique shotgun



- Quels sont les microorganismes majoritaires présents ?
- Quelle est leur diversité ?
- Quelles sont les gènes présent dans leur génomes (potentiel fonctionnel) ?

Métagénomique ciblée (= metabarcoding)



- Quels sont les microorganismes majoritaires et minoritaires présents ?
- Quelle est leur diversité ?

Exemple du projet MetaPDOcheese : Cartographie de la diversité microbienne des laits et des fromages AOP français et exploration des déterminants technologiques



SayFood
Food & Bioproduct Engineering



INRAE



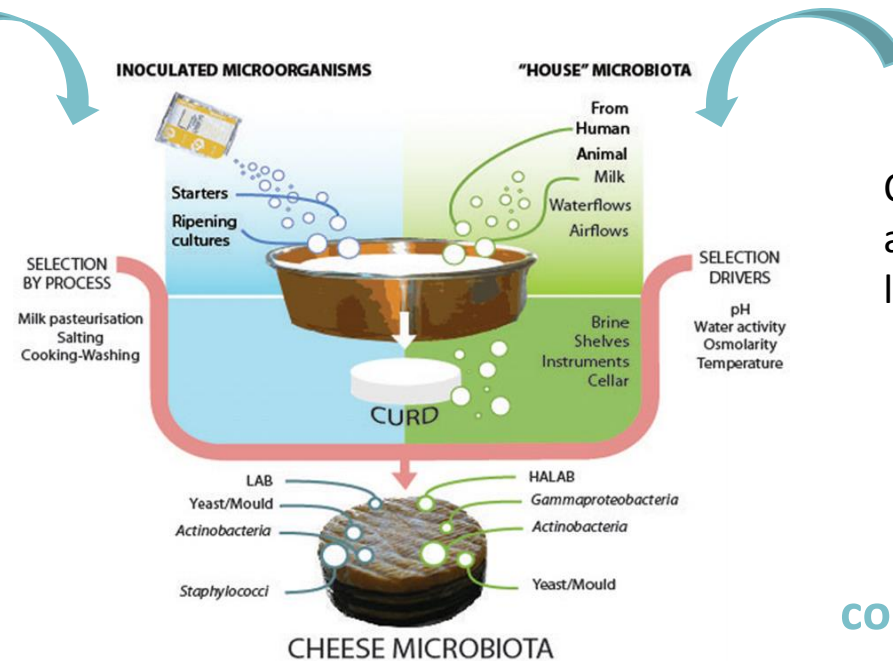
La communauté microbienne des fromages

Dense, moyennement complexe,
évoluant au cours de la fabrication et de l'affinage

Des levains commerciaux:

(acidification et d'affinage)

Non représentatifs de l'ensemble de la
communauté microbienne fromagère



Des communautés microbiennes « locales »

Construites par les pratiques : animal,
alimentation, traite, saumure, matériel et
locaux...

Essentielles mais peu de
connaissances sur cette biodiversité
et les règles de structuration

Irlinger et al., 2015,
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnu015>

Des questions socio-économiques et scientifiques convergentes

Projet construit au sein du RMT Fromages de Terroirs (2015-2016)



46 filières AOP



- 201 176 Tonnes/an, 53 000 emplois
- 14 000 producteurs de lait AOP et 1 350 producteurs fermiers
- 470 établissements de transformation – affinage
- 1/3 du chiffre d'affaires 'fromages autres que frais et fondus' des entreprises laitières françaises

Hypothèse : Diversité impactée par la pression sanitaire et l'intensification des pratiques de production

besoins des filières de pistes innovantes pour maintenir *in situ* une biodiversité microbienne élevée à fort potentiel technologique

questions académiques sur la diversité microbienne des fromages et les traits génétiques d'adaptation au contexte fromager

Objectifs

→ *Acquisition de connaissances sur :*

- ✓ *la diversité microbienne abritée par les laits et les fromages des filières AOP*
- ✓ *le fonctionnement de l'écosystème fromager en lien avec les pratiques technologiques*

→ *Transfert de méthodologies :*

- ✓ *appropriation des méthodes métagénomiques par les acteurs des filières AOP*

Une campagne d'échantillonnage sans précédent

2800 laits et fromages

- 44 AOP, ~ 10 ateliers /AOP
- 10 laits + 10 productions (3 fromages / production) / AOP
- 370 laits et 2291 fromages (cœur et surface en triplicat)



Enquête sur les pratiques de production:

100 variables couvrant :

- Origine parmi 11 régions françaises
- Facteurs imposés par l'AOP (topographie, espèce laitière, temps d'affinage...)
- Pratiques d'élevage (alimentation, hygiène...)
- Facteurs conditionnels (saison, type de production, méthode de salage...)



Analyses de diversité bactérienne et fongique par
métagénomique ciblée



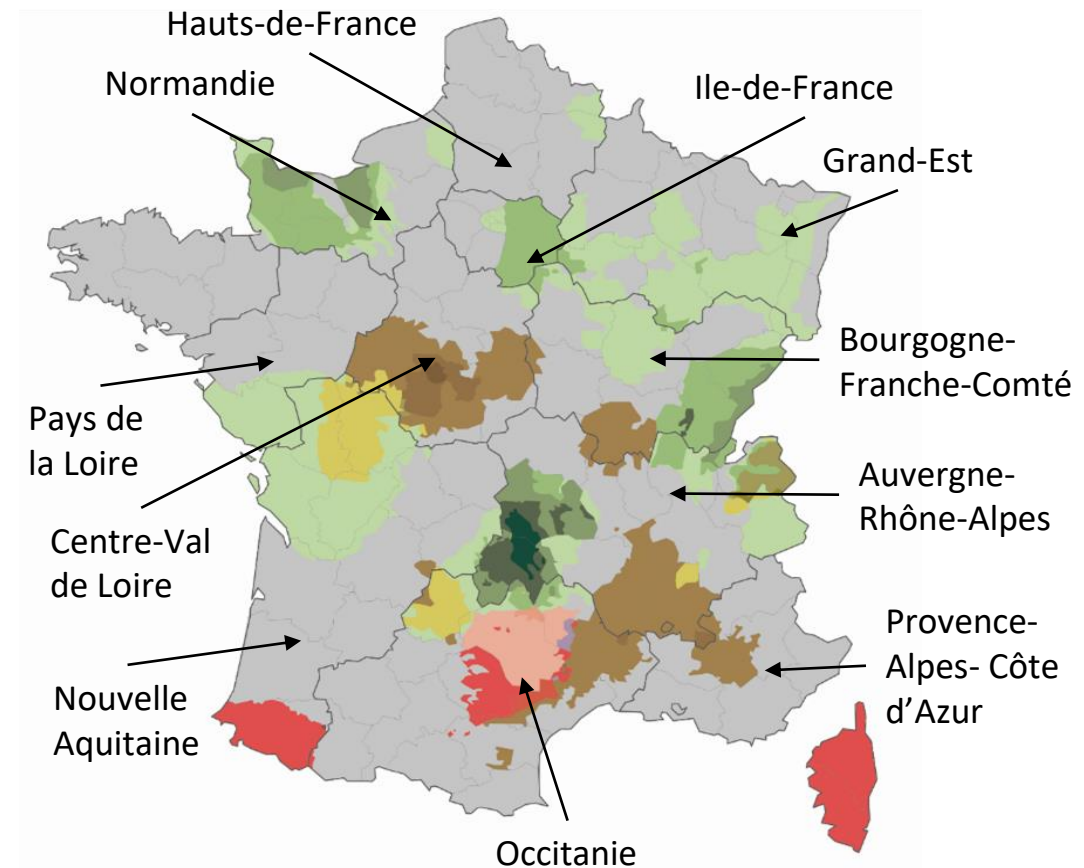
Vache



Chèvre

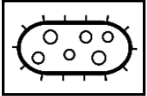


Brebis

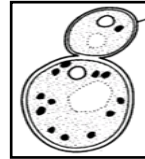




Diversité microbienne des laits

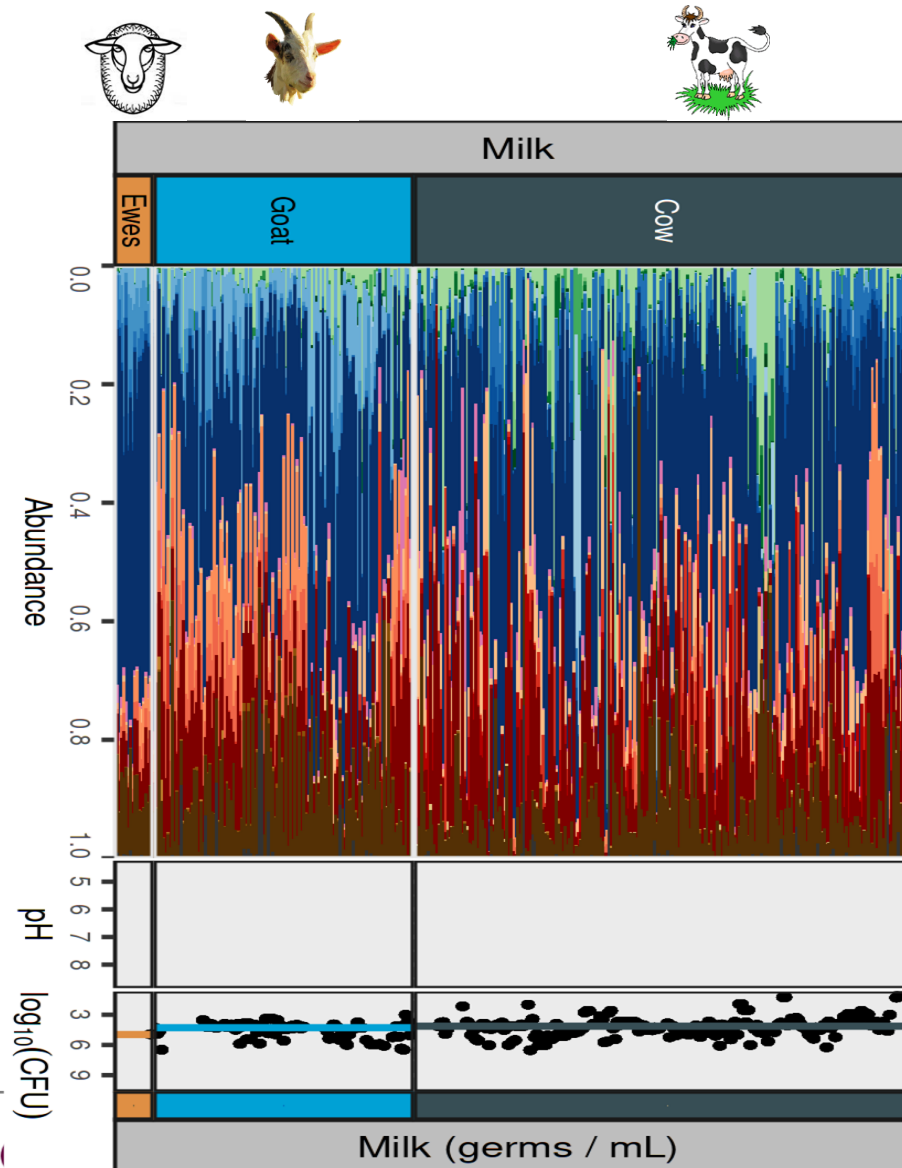
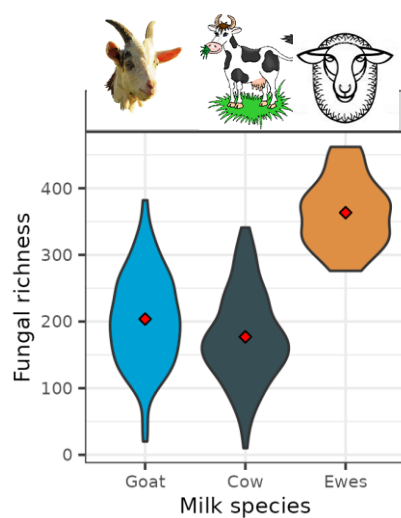
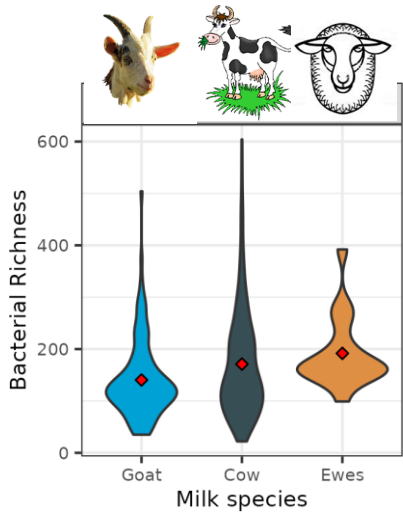


1230 espèces
bactériennes



1367 espèces
fongiques

Richesse bactérienne Richesse fongique



Species

Firmicutes

- Lactococcus lactis* ▲●
- Lactococcus mult. species* ▲
- Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ▲
- Lactocaseibacillus mult. species* ▲
- Leuconostoc mult. species* ▲
- Leuconostoc pseudomesenteroides* ▲
- Streptococcus thermophilus* ▲
- Staphylococcus epidermidis* ●
- Staphylococcus simulans* ●
- Romboutsia timonensis* ●
- Eubacterium tenue* ●
- Other Firmicutes

Bacteroidetes

Bacteroidetes

Proteobacteria

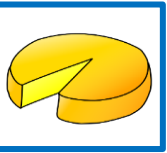
- Moraxella osloensis* ●
- Serratia quinivorans* ●
- Serratia mult. species* ●
- Acinetobacter johnsonii* ●
- Vulcaniibacterium thermophilum* ●
- Other Proteobacteria

Actinobacteria

- Brevibacterium aurantiacum* ▲
- Corynebacterium variabile* ▲
- Corynebacterium casei* ▲
- Other Actinobacteria

Other

- Other



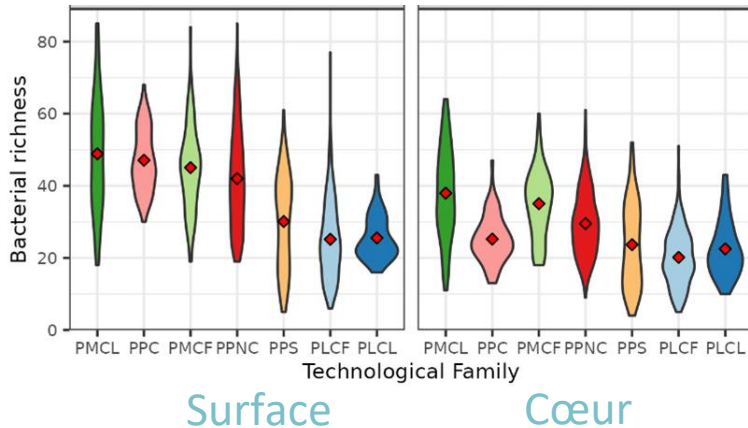
Diversité microbienne des fromages



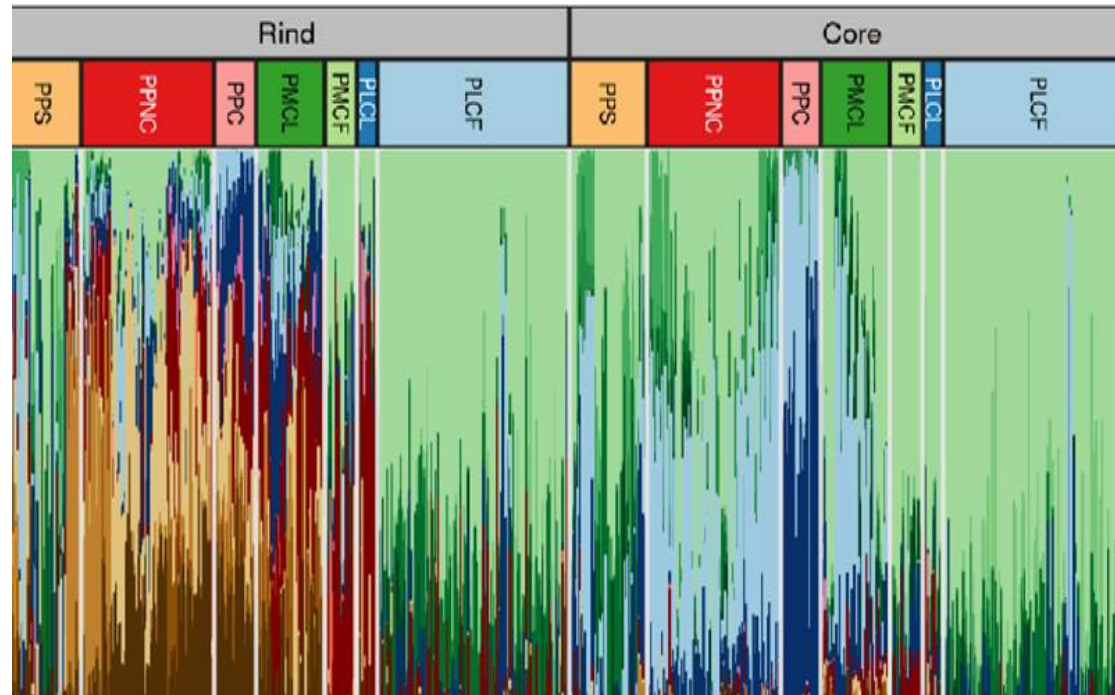
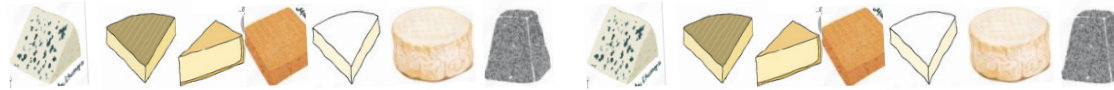
820 espèces bactériennes



Richesse bactérienne



333 espèces
fongiques

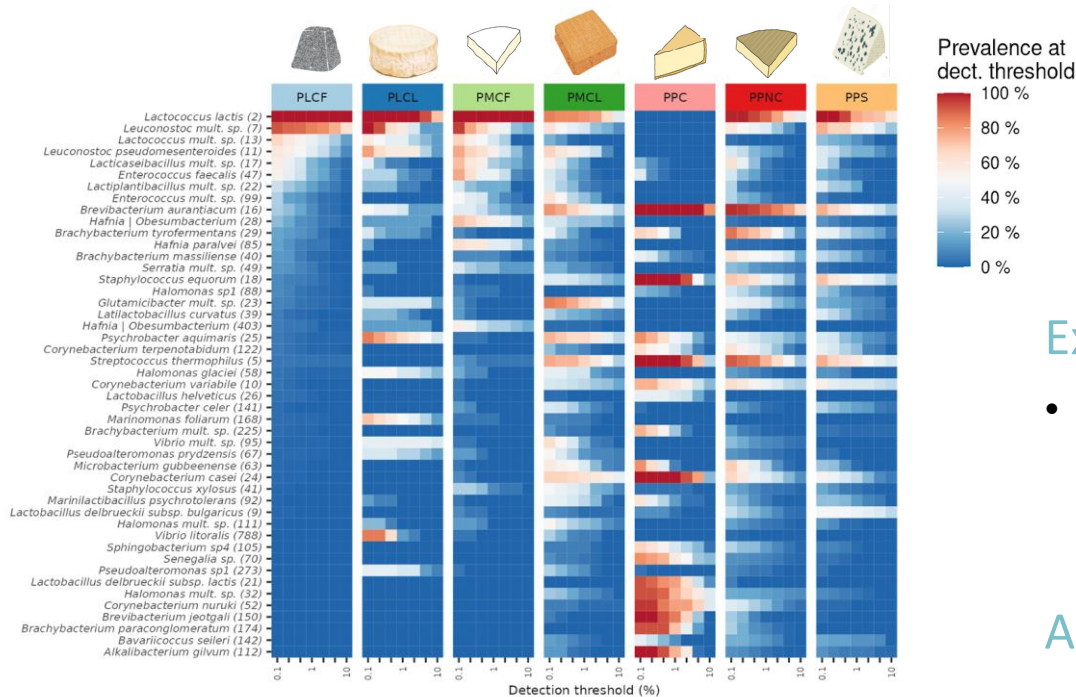
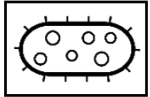


- Firmicutes**
- Lactococcus lactis* ▲●
 - Lactococcus mult. species* ▲
 - Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ▲
 - Lactocaseibacillus mult. species* ▲
 - Leuconostoc mult. species* ▲
 - Leuconostoc pseudomesenteroides* ▲
 - Streptococcus thermophilus* ▲
 - Staphylococcus epidermidis* ●
 - Staphylococcus simulans* ●
 - Romboutsia timonensis* ●
 - Eubacterium tenue* ●
 - Other Firmicutes
- Bacteroidetes**
- Bacteroidetes
- Proteobacteria**
- Moraxella osloensis* ●
 - Serratia quinivorans* ●
 - Serratia mult. species* ●
 - Acinetobacter johnsonii* ●
 - Vulcanibacterium thermophilum* ●
 - Other Proteobacteria
- Actinobacteria**
- Brevibacterium aurantiacum* ▲
 - Corynebacterium variabile* ▲
 - Corynebacterium casei* ▲
 - Other Actinobacteria
- Other**
- Other

- La composition bactérienne et fongique varie en fonction de la famille technologique en surface et au cœur des fromages

Les espèces abondantes et prévalentes

Bactéries



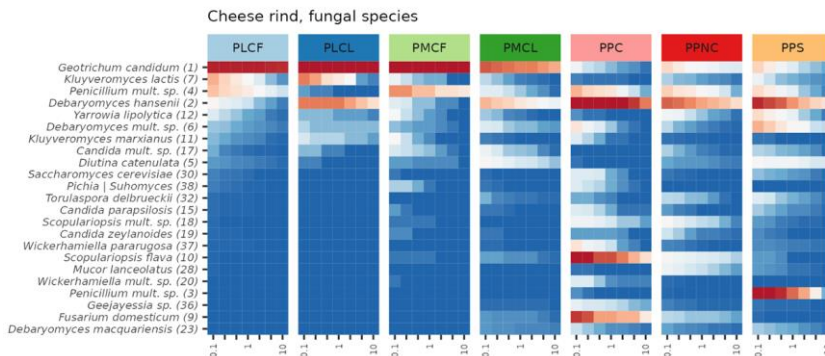
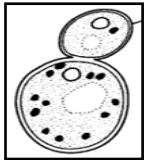
Exploration du core microbiote :

- Aucune espèce microbienne partagée par tous les fromages étudiés

A l'échelle de la famille technologique :

- Un core microbiote distinct pour chaque famille
- Comprenant principalement des espèces connues pour être inoculées pendant la fabrication du fromage (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus*, *Lactococcus laudensis*, *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii*)

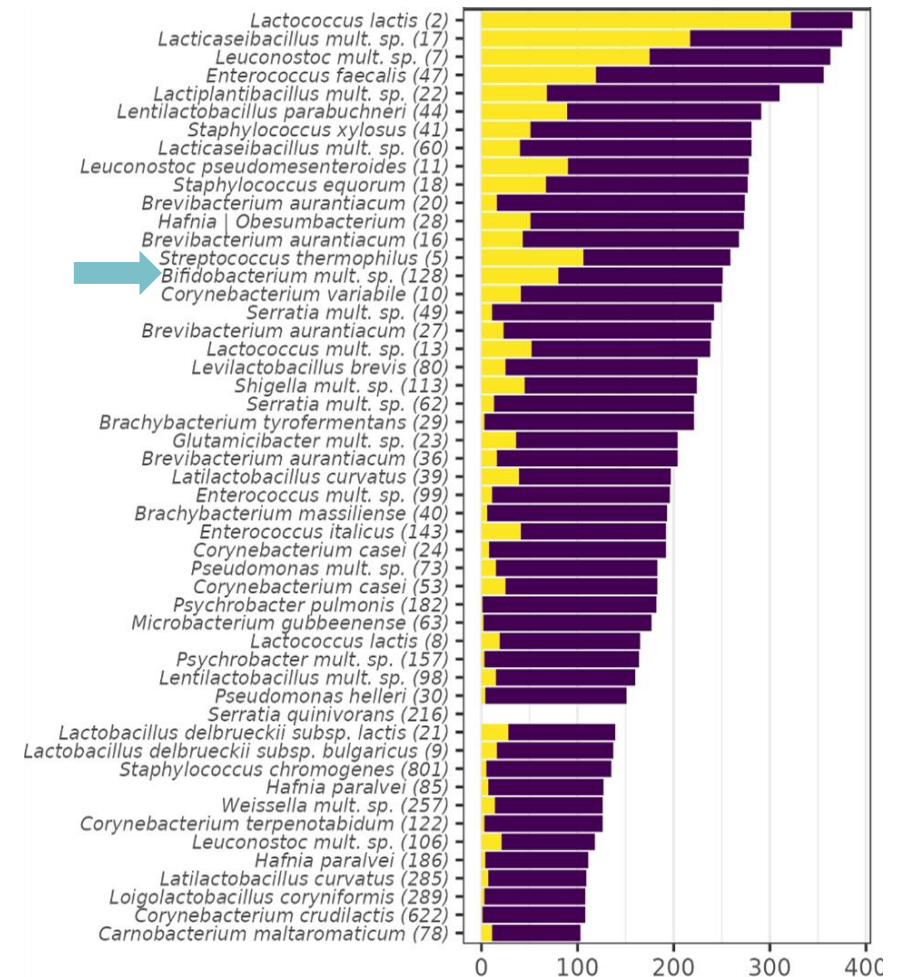
Champignons



Contribution des microbiotes des laits aux microbiotes des fromages

- *Lactococcus lactis* est partagée entre le lait et le fromage dans 84% des productions.
- Au total, **116 espèces bactériennes** différentes partagées entre le lait et le fromage
- Une majorité des espèces partagées ne sont pas des ferments
- *Bifidobacterium crudilactis* - *psychraerophilum* est partagée dans 20,7% des productions à cœur et distingue l'AOP40

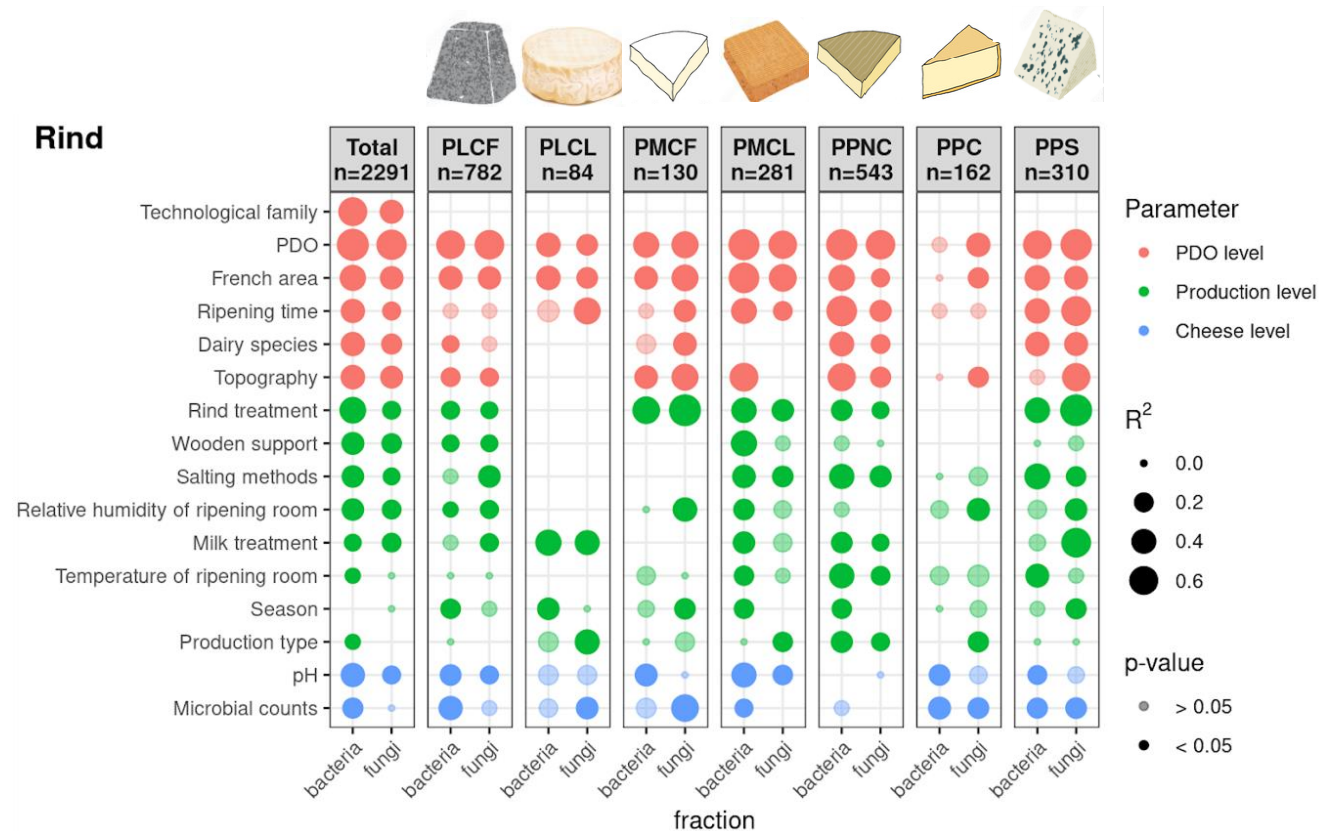
→ Près de 15% de la diversité microbienne des fromages, représentant plus de 60% de l'abondance, pourrait provenir des laits



Nombre de productions dans lesquelles l'espèce est :

- partagée entre le lait et le fromage
- détectée seulement dans le fromage

Les facteurs corrélés à la richesse microbienne



Les facteurs les plus significatifs de la richesse microbienne des fromages :

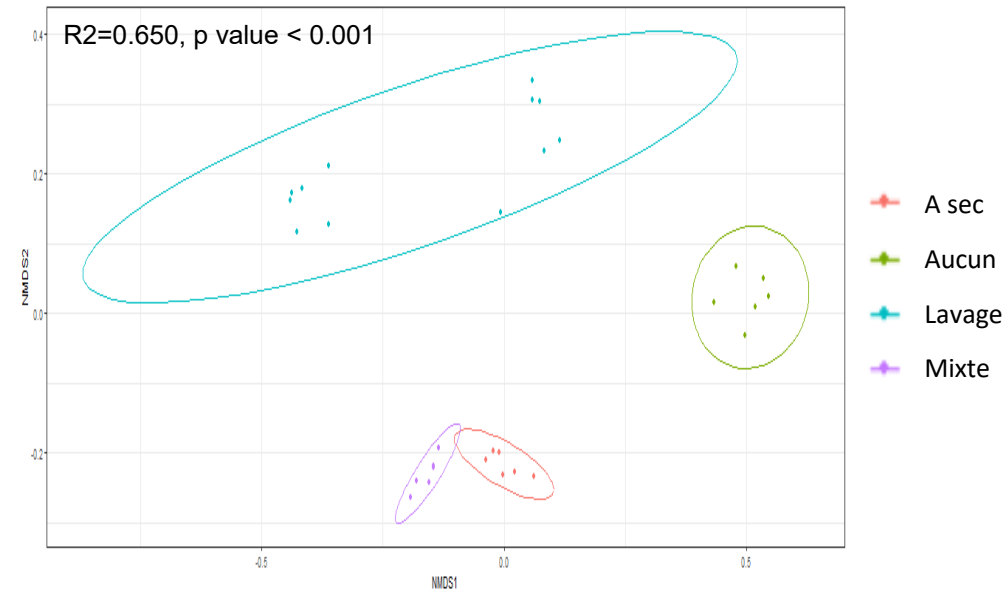
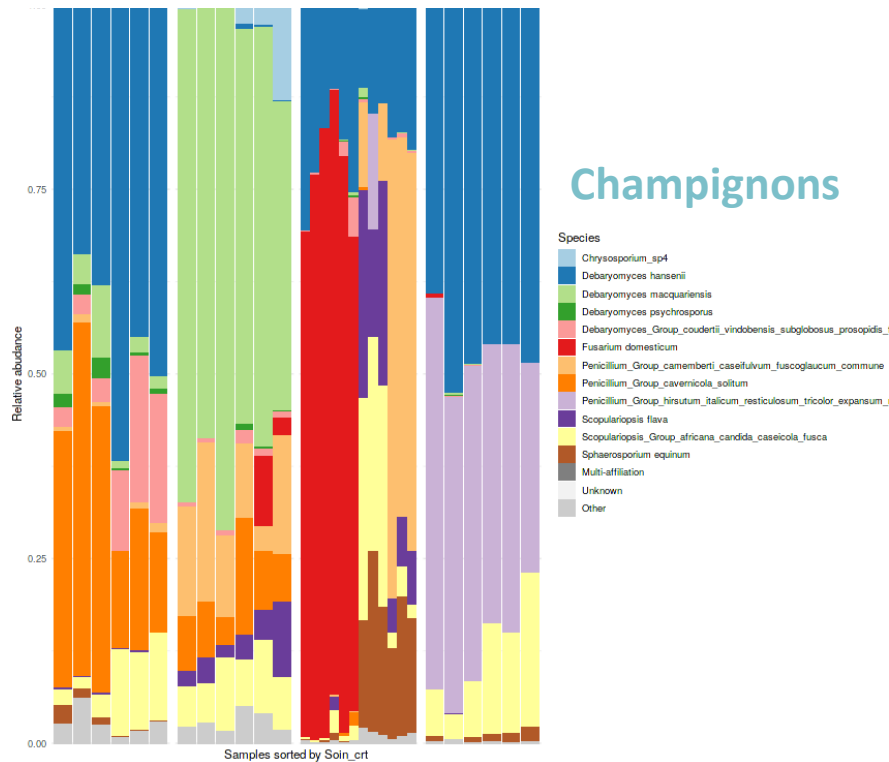
- La famille technologique, le label AOP et les facteurs dépendants de l'AOP (région française, durée d'affinage) dans toutes les familles de fromages, en cœur et sur la croûte
- La topographie, les pratiques de soin de la croûte, l'utilisation de planches en bois, la méthode de salage dans certaines familles technologiques.

Influence des pratiques sur la structuration du microbiote du fromage : exemple de l'AOP38



Type de soin de croûte

À sec Aucun Lavage Mixte



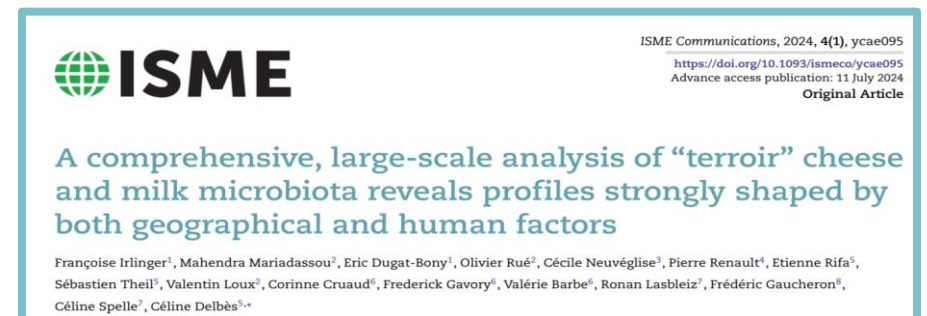
Les Profils fongiques à la surface des fromages de l'AOP38 varient fortement en fonction de la nature des soins de croûte appliqués par les producteurs

Conclusions

MetaPDOcheese, une étude métagénomique à grande échelle qui a fait la lumière sur :

- **Un core microbiote spécifique au sein de chaque famille technologique** - en accord avec le concept de "types de microbiome fromager" (Wolfe and Dutton, 2014; Reuben et al., 2023)
- **Une grande diversité d'espèces microbiennes indigènes** dans les fromages, dépassant les cultures microbiennes connues pour être ajoutées pour la fabrication des fromages (Bulletin de la FIL N° 495/ 2018 : 95 espèces bactériennes et 40 espèces fongiques)
- **Des profils microbiens façonnés principalement par les facteurs AOP et dépendants de l'AOP** comme la région de production et les pratiques d'affinage pour les fromages, ainsi que les espèces animales, la zone géographique et les pratiques d'élevage pour les laits

→ Mise en évidence de la contribution de la biogéographie et du savoir-faire spécifique à l'AOP dans la formation du microbiote des laits et des fromages AOP



Perspectives

Poursuivre la **caractérisation des communautés microbiennes** des fromages :

- liens entre **diversité** et **fonctionnement** de l'écosystème
- compréhension fine des **interactions** mises en jeu
- **prédiction** de fonctionnalités et caractéristiques macroscopiques (ex : texture, couleur, arômes...)
- meilleure connaissance de la **fraction virale** de ces communautés

Approches multi-omiques
+
modélisation

Approches culturelles
+
métaviromes



2021-2025



Avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale développement agricole et rural CASDAR
Avec le MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
Liberté Égalité Fraternité

2025-2028

Exploiter cette connaissance pour le **design de communautés microbiennes** adaptées pour les **fermentations végétales** :

- meilleure maîtrise des **fermentations spontanées** (ex : légumes)
- **anticiper l'impact des changements** (climatique, attentes sociétales)
- amélioration de l'**acceptabilité des produits fermentés** à base de légumineuses
- proposer de nouvelles **alternatives végétales fermentées durables** et bonnes pour la **santé**

Approches multi-omiques
+
Ecologie microbienne synthétique
+
modélisation métabolique



RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
anr[®] agence nationale de la recherche
Liberté Égalité Fraternité

2022-2026



2024-2028



2023-2028

Remerciements



CNAOL (C. Spelle, R. Lasbleiz)



CNIEL (F. Gaucheron)

INRAE

INRAE

SAYFOOD (F. Irlinger, C. Monnet, E. Dugat-Bony, A.S. Sarthou, S. Thomas),

UMRF (C. Delbès, E. Rifa, S. Theil, B. Desserre),

MICALIS (P. Renault)

SPO (C. Neuvéglise),

MAIAGE (V. Loux, M. Mariadassou, O. Rué)



Génoscope (V. Barbe, C. Cruaud, F. Gavory)