

# La biodiversité des ferments au service de l'innovation alimentaire

► Jeudi 25 juin 2015



# Objectifs / problématiques

1. Comprendre les **flux microbiens structurels et fonctionnels** des environnements de **production de lait aux fromages**
2. Identifier les facteurs régissant les **dynamiques de populations microbiennes** dans les fromages et **l'expression de leurs activités**



## Finalités

Contrôle de la qualité des fromages par un pilotage de la biodiversité microbienne de la production de lait aux fromages affinés

# Plan de la présentation

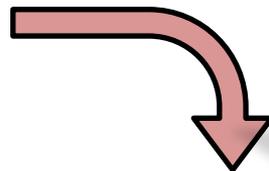
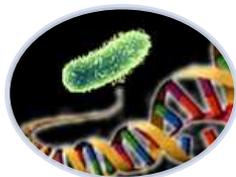
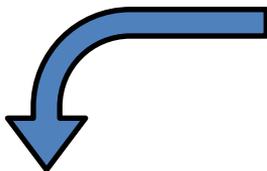
1. **Quelles techniques NGS pour l'étude des communautés microbiennes ?**
2. **Comprendre les flux microbiens**
3. **Quelle est la diversité bactérienne détectée dans les fromages français?**
  - a. Impact des systèmes de production de lait sur la composition microbienne des fromages
  - b. Biodiversité de 13 fromages (croûte lavée, naturelle, fleurie)
4. **Suivi d'activité biologique : quantification de bio-indicateurs d'affinage**

# Quelles techniques NGS pour l'étude des communautés microbiennes ?

NGS (Nouvelle Génération de Séquençage)

ADN

ARN



Metagenomics

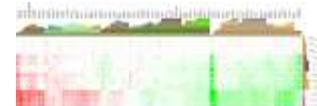
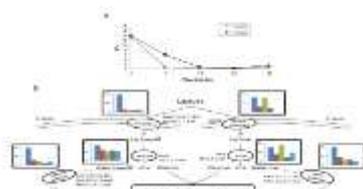
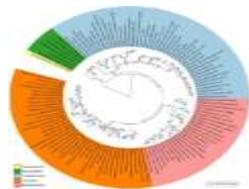
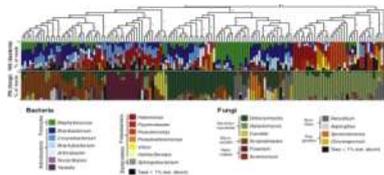
(Meta)transcriptomics

Amplicon sequencing

Shotgun sequencing

RNA sequencing

PCR-Q



Wolfe *et al.*, 2014; Irlinger *et al.*, 2015

Almeida *et al.*, 2014

Dugat-Bony *et al.*, 2015

Castellote *et al.*, 2015

Qui est là ?

Qui peut faire quoi ?

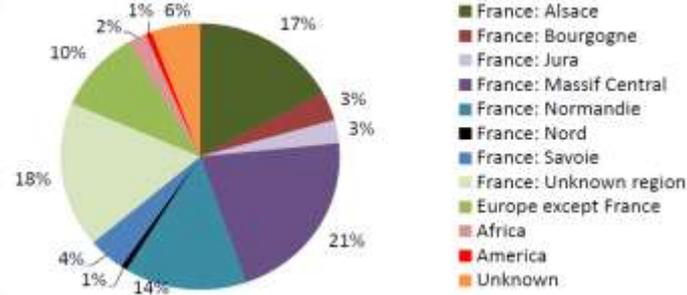
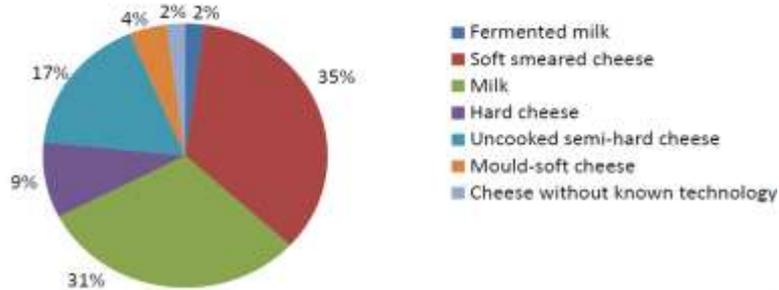
Que font ils ?

# Des progrès permettant une application plus facile des NGS aux fromages

- **Disponibilité de séquences génomiques** des espèces fromagères [www.genomesonline.org](http://www.genomesonline.org) : **Projet ANR Food Microbiome + Projet CNIEL «Collective genomes»** : séquences déposées sur le site EBI (European Bioinformatics Institute) - numéro d'accèsion PRJEB6314

➤ **117 isolats laitiers et fromagers séquencés**

- 67 genres dont 4 sans aucun génome disponible (Mai 2014): *Kluyvera*, *Luteococcus*, *Marinilactibacillus*, *Mycetocola*



(Almeida et al., 2015)

(Irlinger et al., 2012)

(Monnet et al., 2012)

- **Amélioration des protocoles/kits** d'extraction d'ADN, d'ARN, de déplétion, de RT et PCR-Q (stabilisation des échantillons, seuils détection, sensibilité, débits)

- **Baisse de coût de séquençage** à haut débit, des kits et des réactifs

(Monnet et al., 2008)

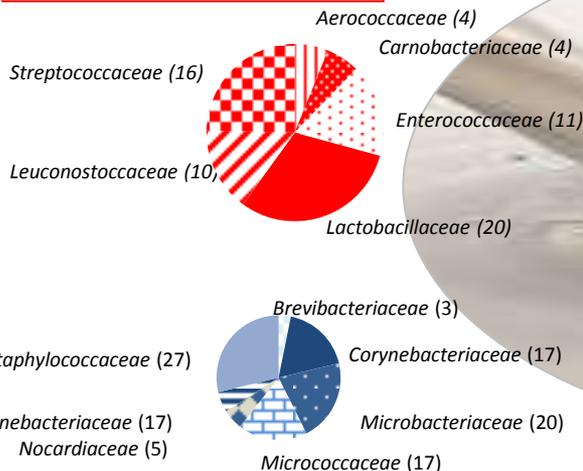


# Richesse microbienne des laits crus :

*nombre d'espèces recensées dans environ 50 études (lait de vache)*

## Bactéries lactiques

- 65 espèces
- Niveaux : 100-1000 ufc/ml



~ 300 espèces bactériennes

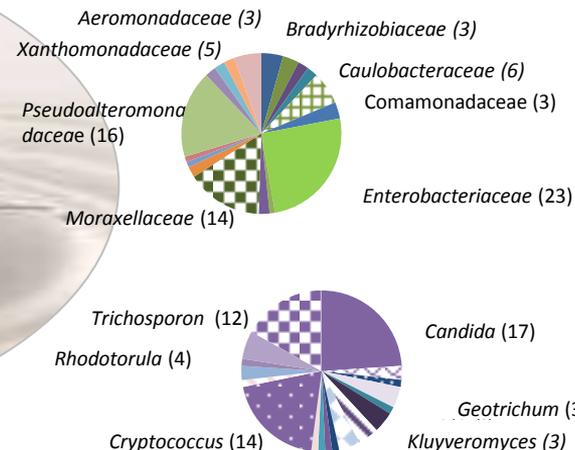
~ 74 espèces de levures

Diversité souches



## Proteobactéries et Bacteroidetes

- 94 espèces
- Niveaux : 10\_1000 ufc/ml



Un microbiote de lait =  
environ 40 espèces microbiennes

## Levures

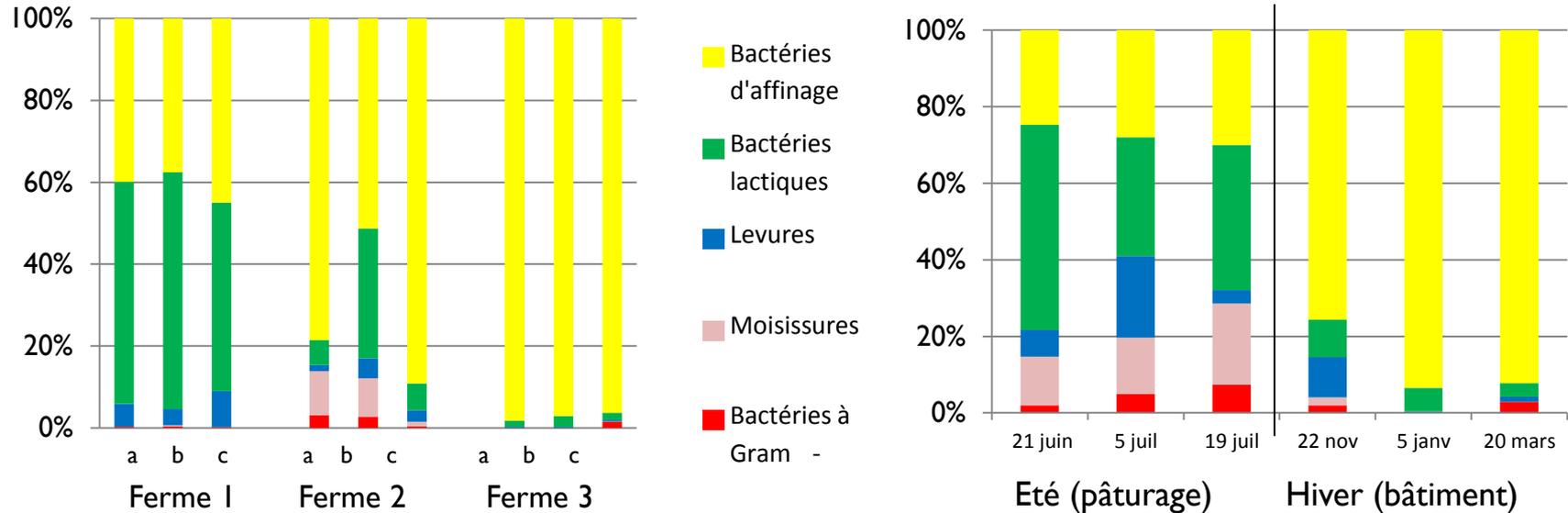
- 74 espèces
- Niveaux : 10\_100 ufc/ml

Montel et al., 2014. Delbès et al., 2007. Coton et al., 2012

# Equilibres microbiens des laits crus:

## évaluation d'un indicateur de qualité des laits pour la production de fromages au lait cru

Quantification de 5 groupes microbiens dans 629 laits crus en utilisant 4 milieux de culture



D'après Chatelard-Chauvin C., Monsallier F. Rapport collectif FlorAcQ, 2014

# Quelle est la diversité bactérienne détectée dans les fromages français?



Avancées dans la connaissance de la diversité par la mise en œuvre de **méthodes métagénomiques** « amplicon sequencing » (séquençage massif de **marqueurs taxonomiques**)

# Impact des systèmes de production de lait sur la composition microbienne et les caractéristiques sensorielles des fromages

2 systèmes



Même salle de traite



Même fromagerie



Même condition d'affinage

**Bota**

prairies très diversifiées

Sans concentré

**Pepi**

prairies peu diversifiées

Concentré = limité (4kg/j)

2 laits x 2 périodes (juillet et septembre) x 3 répétitions

**12 laits crus**



**12 fromages de type Cantal**

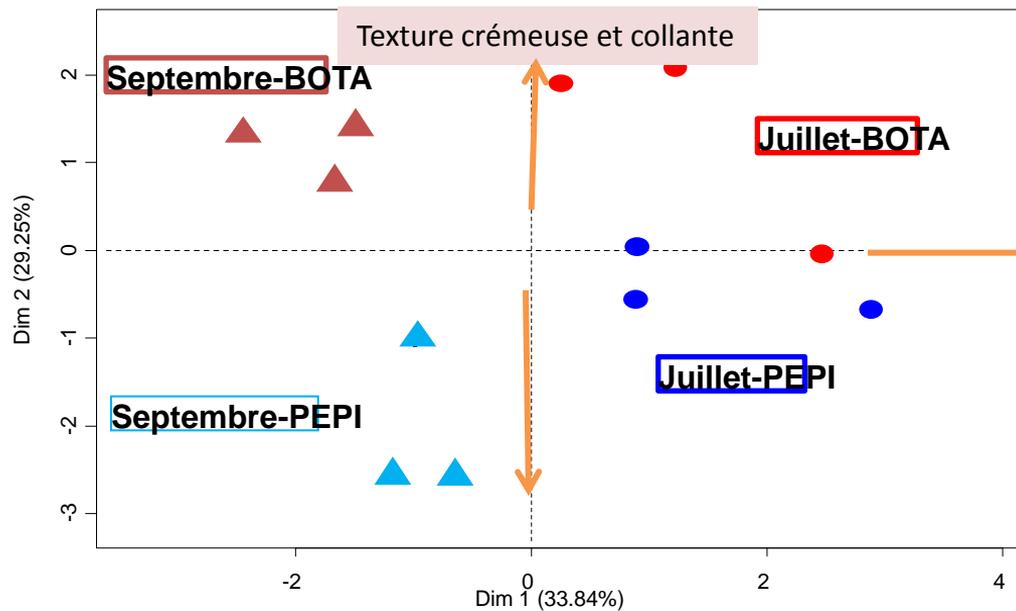


**Affinage pendant 5 mois**



*Thèse Marie FRETIN, URF, 2013-2016*

# Différences sensorielles entre fromages au lait cru en fonction du système de production et de la période



Pâte jaune  
Quantité de boutoné ++

Texture granuleuse  
Odeur et goût intense

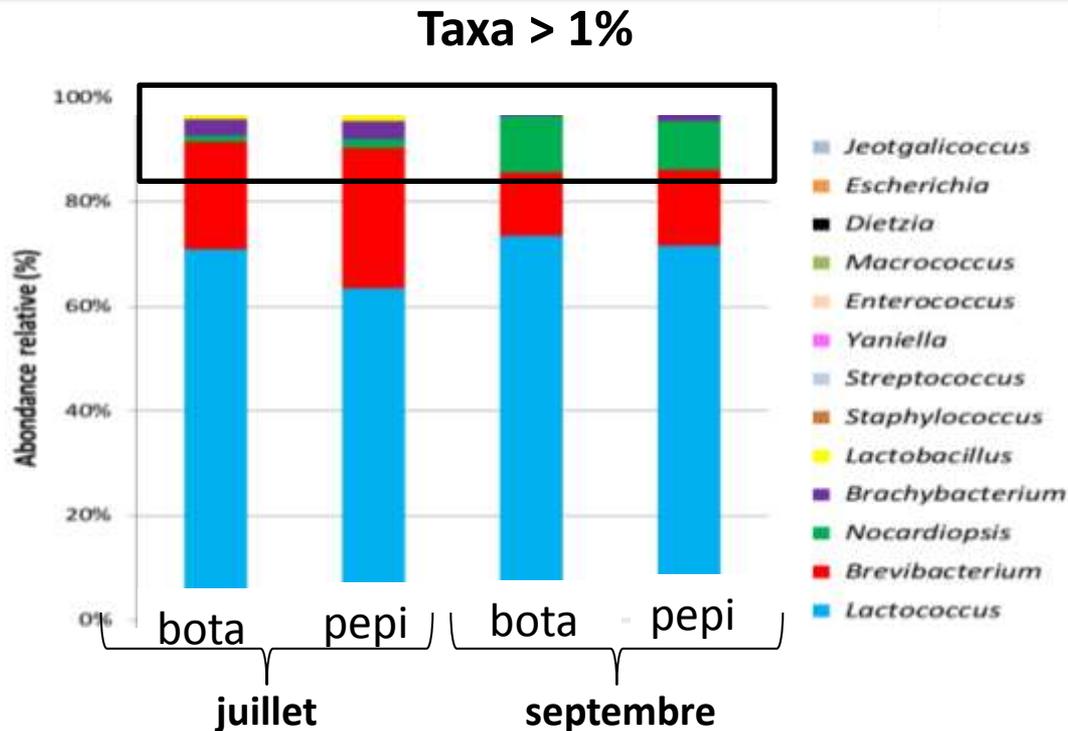
➤ **Effet du système de production :** fromages Bota : texture plus fondante et flaveur plus intense (**Protéolyse, teneur en matière grasse Bota > Pési**)

➤ **Lien avec composition microbienne ?**

*Thèse Marie FRETIN, URF, 2013-2016*

# Diversité bactérienne de la croûte des fromages:

Abondance relative des 13 taxa majoritaires



2 genres principaux

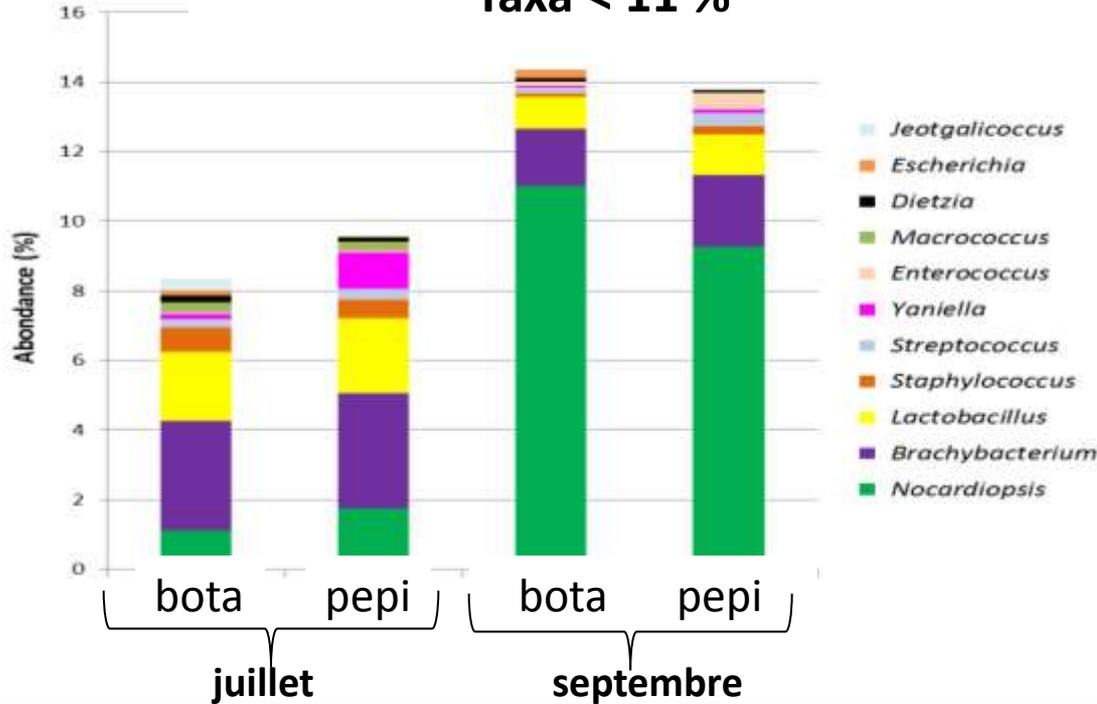
*Lactococcus*

*Brevibacterium*

Thèse Marie FRETIN, URF, 2013-2016

# Impact du système de production et de la période sur les taxa sous-dominants de la croûte

Taxa < 11 %



Effet du système : sur *Yaniella*  
bota < pepi ( $p < 0,1$ )

Effet de la période : sur  
*Nocardioopsis*  
juillet < septembre  
( $p < 0,05$ )  
*Macrococcus*  
juillet > septembre  
( $p < 0,01$ )

# Conclusions et perspectives

Diversité bactérienne (nombre d'OTU) dans la pâte et la croûte des fromages au lait cru :

- **Croûte** (172) > **Pâte** (153)
- **Croûte** : juillet ~ septembre    mais    bota < pepi
- **Pâte** :    juillet > septembre    et    bota ~ pepi

Impact des systèmes de production laitiers et de la période sur la composition de la communauté bactérienne des fromages

- ✓ à assigner jusqu'à l'espèce, également levures et moisissures
- ✓ Lien avec composition microbienne et biochimique **des laits** ?
- ✓ Rôles des **activités métaboliques** des microorganismes en lien avec la composition biochimique (lipidique) des fromages ?

*Thèse Marie FRETIN, URF, 2013-2016*

# Quelle est la diversité bactérienne détectée dans les fromages français?

Exemple de 13 fromages (croûte lavée, naturelle, fleurie) :



Saint-Nectaire



Abbaye de Cîteaux



Saint-Marcellin



Munster



Epoisses

Reblochon



Pont l'Evêque



Livarot



Langres

**Séquençage des régions V3-V4 de l'ADNr 16S (Prok) et ITS1-ITS2 (Euk)**

- 13 technologies fromagères
- 63 échantillons de croûtes
- 36 échantillons de cœur



Maroilles



Mont d'Or

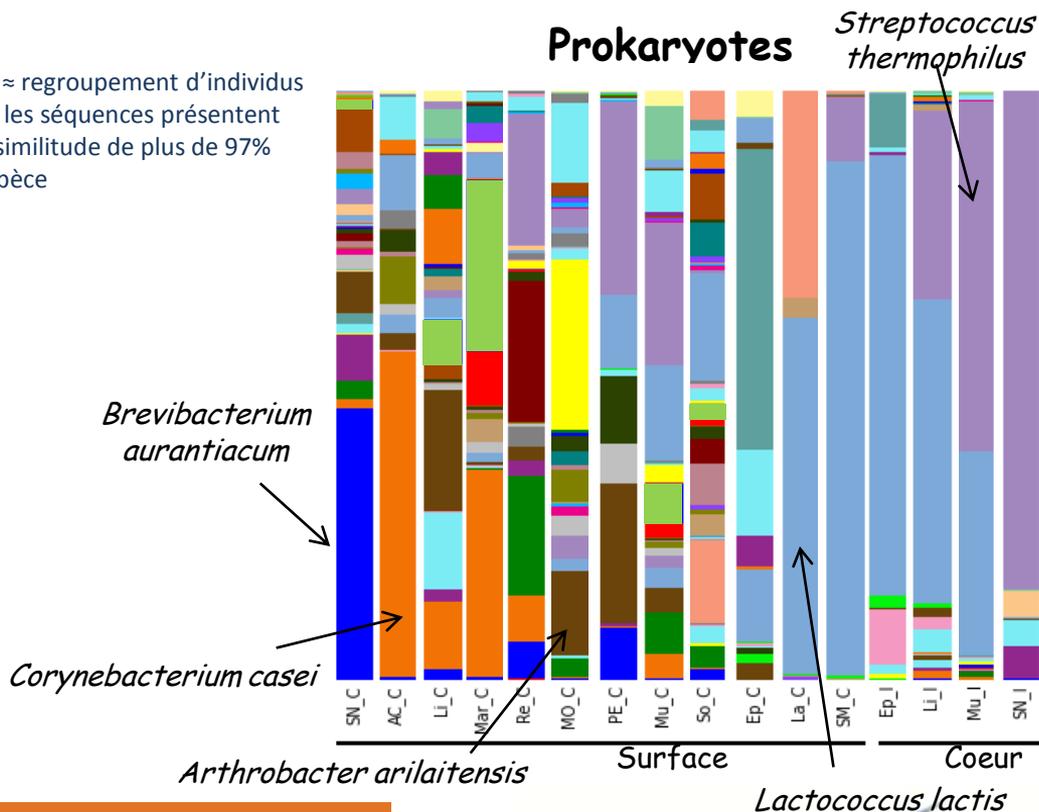


Soumaintrain

# Quelle est la diversité bactérienne détectée dans les fromages français ?

	OTUs Prok	OTUs Euk
Mont d'Or	46	9
Soumaintrain	44	6
Reblochon	39	14
Livarot	35	16
Maroilles	34	7
Saint-Nectaire	32	13
Munster	30	5
Abbaye de Citeaux	25	7
Pont l'Evêque	21	9
Langres	20	6
Epoisses	17	7
Saint-Marcellin	17	17

OTU ≈ regroupement d'individus dont les séquences présentent une similitude de plus de 97% ≈ espèce



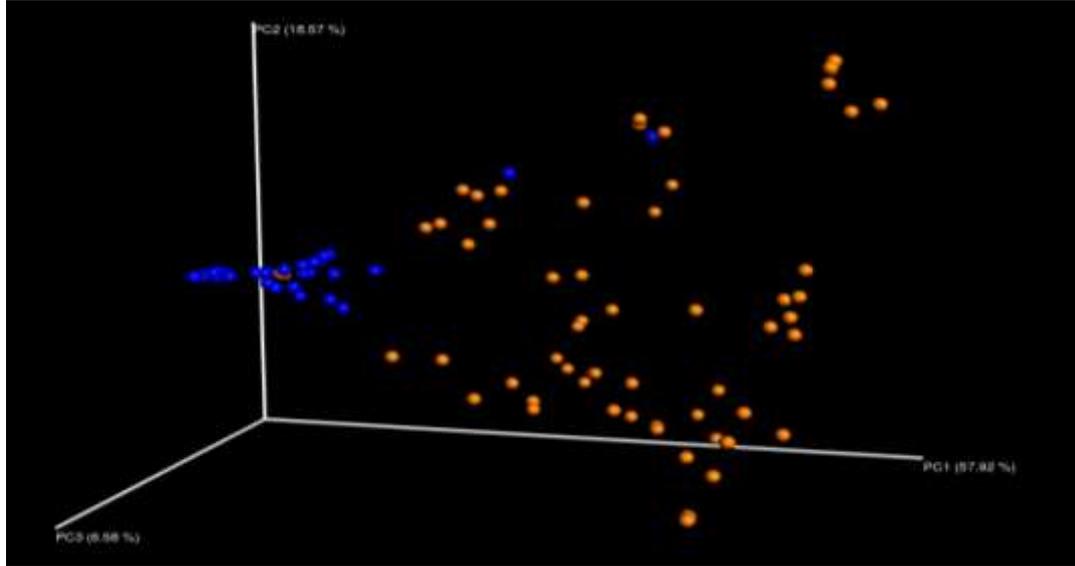
## • Richesse en surface des fromages :

- Richesse: pas de lien entre Prok et Euk
- Eukaryotes : Forte dominance d'une ou deux espèces
- Prokaryotes : Forte dominance de qq espèces en cœur
- Forte diversité en surface

# Quelle est la diversité bactérienne détectée dans les fromages français?

Béta diversité – Prokaryotes :

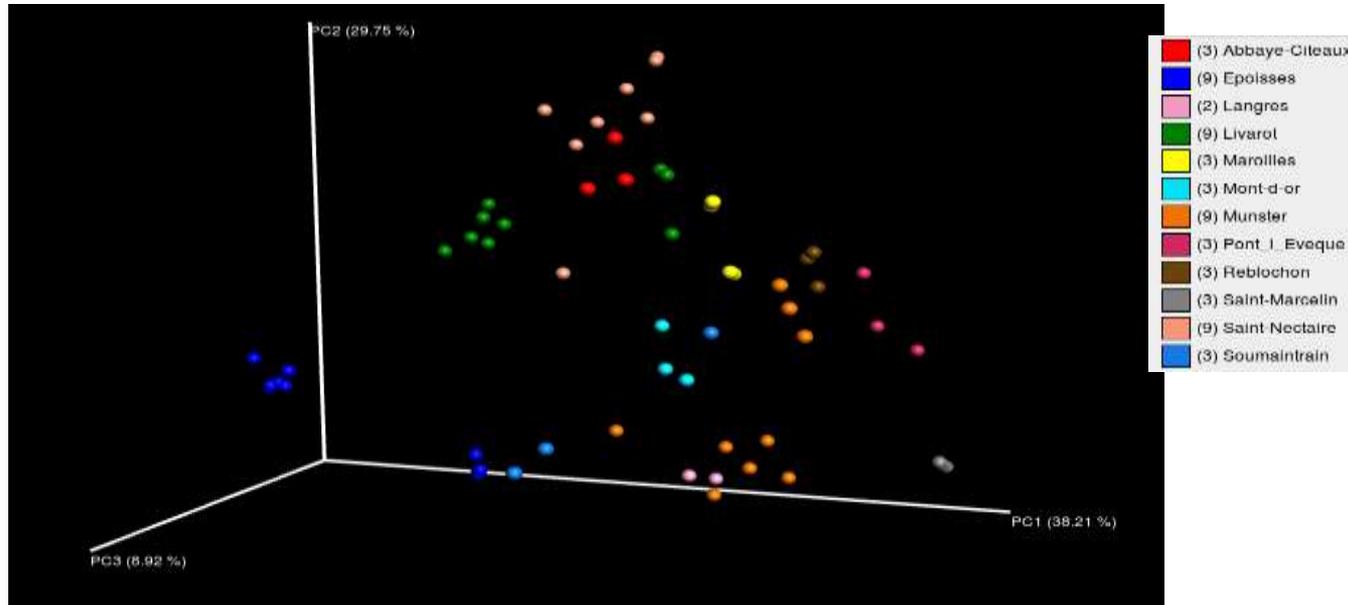
Weighted UniFrac distances



Coeur

surface

# Quelle est la diversité bactérienne détectée dans les fromages français?



Variété de fromages (Surface)

# Suivi d'activité biologique : quantification de bio-indicateurs d'affinage



Avancées dans la détection de l'expression de gènes d'intérêt dans un fromage grâce au développement des **méthodes métatranscriptomiques** type « shotgun » et PCR-Q mais aussi aux protocoles de préparation des échantillons

# Identification et quantification de bio-indicateurs d'affinage :

## Démarche

Fromages à différents stades d'affinage



Extraction d'ARN



### RNAseq

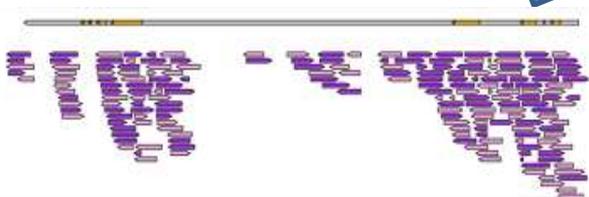
Séquençage de l'ensemble des transcrits



Mapping sur génomes de référence



Transcriptome des espèces dominantes



**Proposition de gènes indicateurs en fonction de :**

- connaissances bibliographiques
- profils obtenus RNAseq (induction/répression)

### PCR-Q

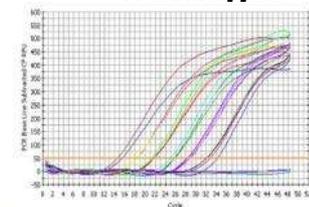
Sélection de gènes indicateurs d'activité



Design d'amorces PCR pour la quantification du gène ciblé



Profils quantitatifs dans les fromages



# Suivi d'activité biologique : quantification de bio-indicateurs d'affinage

## Exemple d'application : le Reblochon

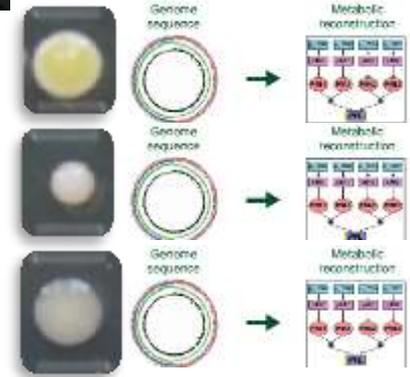


### Principales espèces :

- **Bactéries** : *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* et *Brevibacterium aurantiacum*
- **Levures** : *Debaryomyces hansenii* / *Geotrichum candidum*

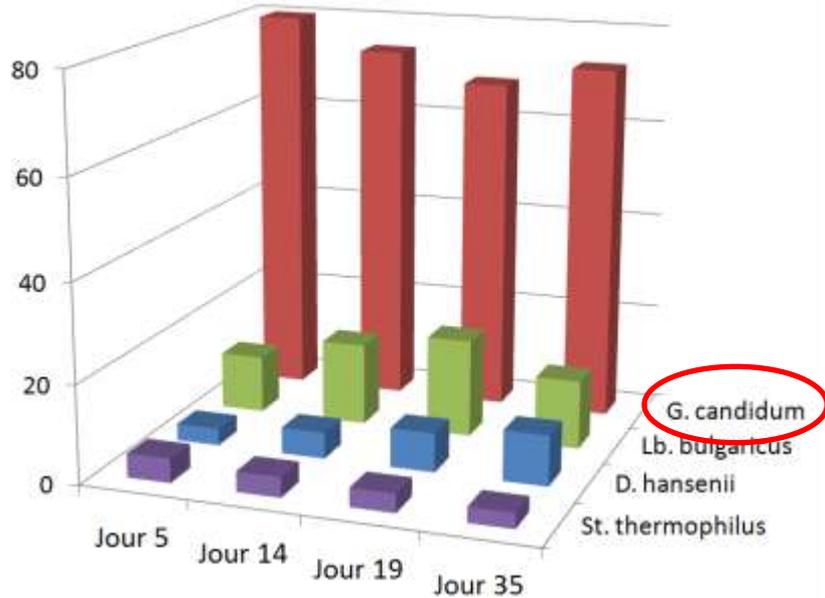
**Objectif** : **Rechercher des indicateurs d'activité biologique ou technologiques** au cours de l'affinage

**Méthodologie** : Fabrication de reblochons et prélèvements de croûte à 5, 14, 19 et 35 jours d'affinage, 3 répétitions biologiques

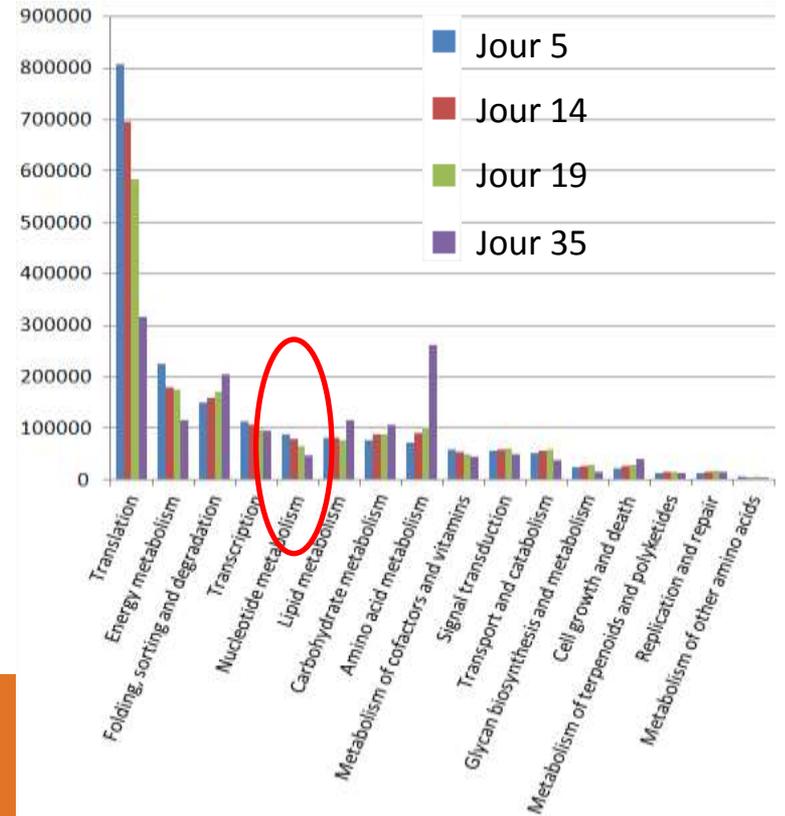


# Exemple d'application : Recherche de bio-indicateurs d'affinage

Niveaux relatifs d'expression **des 4 espèces dominantes** au cours de l'affinage (RNAseq)



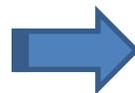
Nombre de transcrits de *Geotrichum candidum* selon leur fonction (RNAseq)



# Exemple d'application : Recherche de bio-indicateurs d'affinage

Analyse détaillée RNAseq montre une induction de nombreux gènes de catabolisme d'acides aminés de **G. candidum** en fin d'affinage :

- Transporteurs d'acides aminés
- Glutamate déshydrogénases
- Transaminases
- Exporteurs d'ammoniaque
- etc.



Induction de voies liées à la production d'arômes

Gène	Fonction
GECA15s03233g	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YCL064C CHA1 Catabolic L-serine (L-threonine) deaminase, catalyzes the degradation of both L-serine and L-threonine
GECA10s02628g	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YDR380W ARO10 Phenylpyruvate decarboxylase
GECA07s02331g	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YNR002C ATO2 Putative transmembrane protein involved in export of ammonia
GECA06s00802g	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YDL215C GDH2 NAD(+)-dependent glutamate dehydrogenase
GECA04s04949g	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR027C AAT2 Cytosolic aspartate aminotransferase, involved in nitrogen metabolism
GECA01s10427g	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YKR039W GAP1 General amino acid permease
GECA03s05400g	similar to <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGL202W ARO8, Aromatic aminotransferase I
etc.	

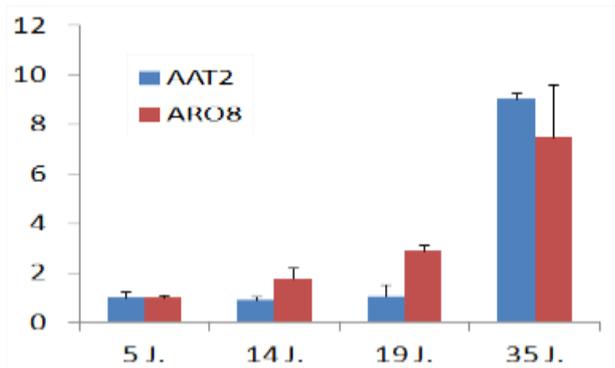
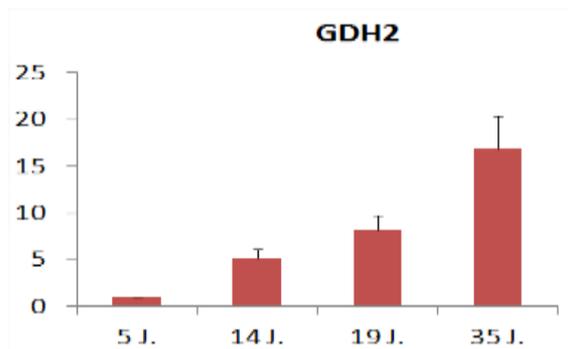


amorces

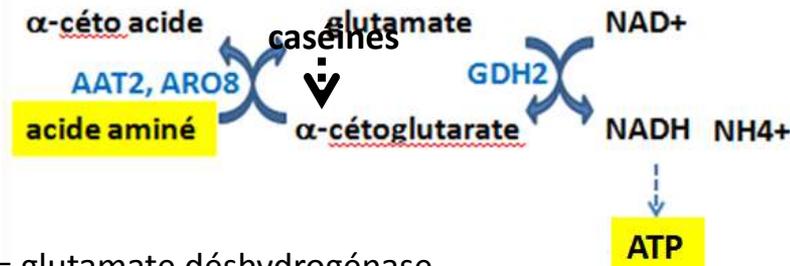
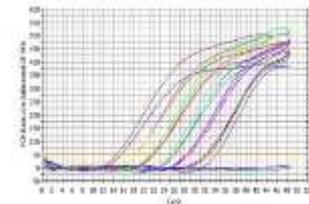


# Exemple d'application : Recherche de bio-indicateurs d'affinage

PCR quantitative : Suivi d'une sélection de gènes marqueurs



Arômes ++

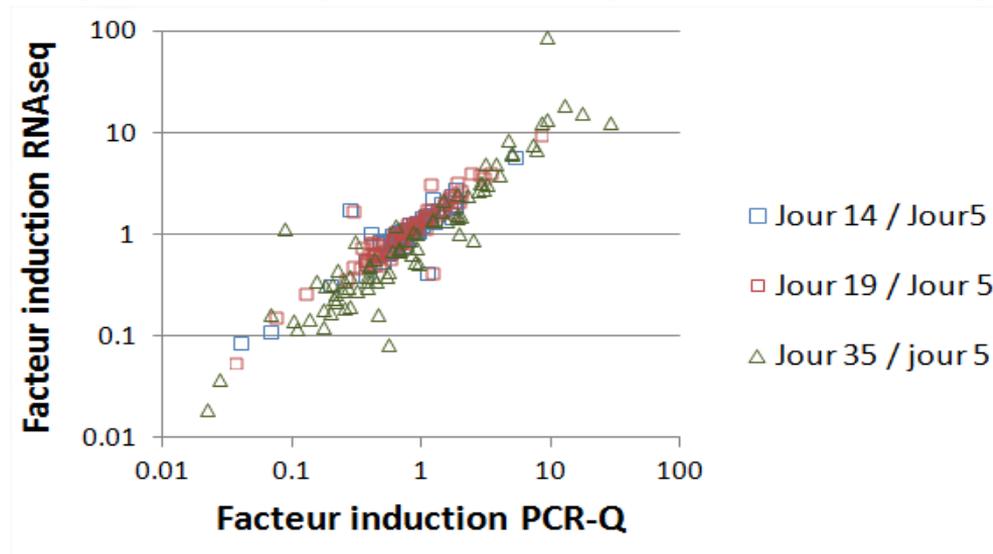


GDH2 = glutamate déshydrogénase

AAT2 et ARO8 = amino acid transaminases

# Exemple d'application : Recherche de bio-indicateurs d'affinage

Bilan des mesures d'ARNm de *G. candidum* dans le Reblochon par RNAseq vs PCR-Q :  
Comparaison de l'expression de 80 gènes induits ou réprimés pendant l'affinage d'un Reblochon



***Même approche applicable pour les autres microorganismes des fromages***

***→ caractérisation de l'ensemble de la communauté microbienne***

# Quelles applications industrielles ? (fromage ou autre aliment)

- Mieux connaître le procédé
- Suivre plus spécifiquement des activités technologiques **ou indésirables** :

- coloration
- arômes
- protéolyse, lipolyse
- consommation de substrats
- acidification/désacidification
- amines biogènes
- mycotoxines
- défauts d'arôme, de couleur, de texture, gaz ...

## Dans quel contexte ?

- sélection de souches, formulation de ferments
- effet de changements de paramètres technologiques
- compréhension de fabrications défectueuses (possibilité d'analyse a posteriori)

Etienne Rifa,  
Isabelle Verdier-Metz,  
Marie Fréтин,  
Marie-Christine Montel

*INRA, UR545, Recherches Fromagères, Aurillac*

Anne Ferlay,  
Bruno Martin,

*INRA, Unité Mixte de Recherches sur les  
Herbivores, Saint Genès- Champanelle*

Caroline Chatelard-Chauvin

*Pôle fromager AOP Massif central, Aurillac*

Françoise Monsallier,

*Chambre d'Agriculture du Cantal*

Eric Dugat-Bony,  
Sandra Hélinck,  
Séverine Layec,  
Pascal Bonnarme,  
Sophie Landaud,  
Dominique Swennen,  
JM Beckerich,  
Anne Sophie Sarthou,  
Jessie Castellote,

*INRA, UMR 782 GMPA, Ecomic, Grignon*

Sébastien Fraud,

*Actalia, La Roche-Sur-Foron*

Valentin Loux,

*INRA, MaIAGE, Jouy-en-Josas*

MERCI POUR VOTRE ATTENTION

## ► Plateforme technologique fromagère (fabrication et affinage aux normes L2)



- **Outil de recherche**
  - Challenge test en fromages avec des **bactéries pathogènes** (*Listeria*, STEC, *Salmonella*)
  - Fabrications pour étude sensorielles
- **Prestations de service**



Pour la recherche et au service des organismes de développement et des centres techniques Actalia

### Contacts:

Marie-Christine MONTEL, [cmontel@clermont.inra.fr](mailto:cmontel@clermont.inra.fr)

Christophe CHASSARD, [christophe.chassard@clermont.inra.fr](mailto:christophe.chassard@clermont.inra.fr)

# Projet "1350 PDO French cheeses "

## Cartographie phylogénétique et génomique de l'ensemble des 45 fromages AOP français : vers une empreinte fonctionnelle de notre patrimoine microbien fromager



### Contacts:

Françoise IRLINGER, [irlinger@grignon.inra.fr](mailto:irlinger@grignon.inra.fr)

Céline DELBES, [celine.delbes@clermont.inra.fr](mailto:celine.delbes@clermont.inra.fr)

### Projet Fédérateur

- Professionnels fromagers (CNIEL, CNAOL)
- Centres techniques (Actalia,....
- Laboratoires académiques (INRA, Universités...) multi-disciplinaires