



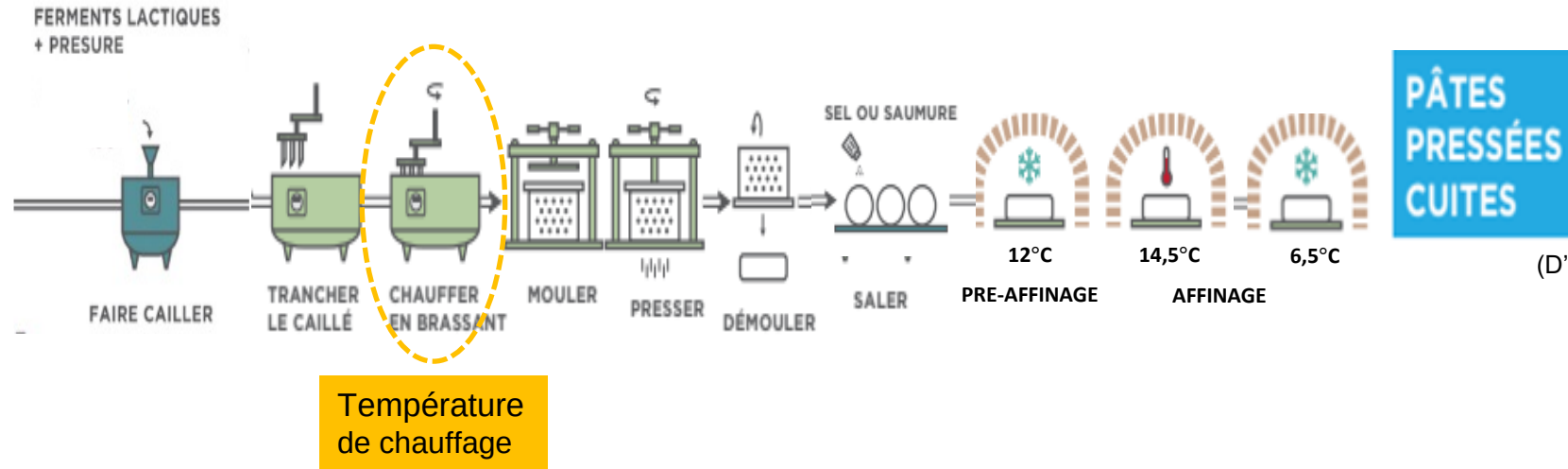
*Un nouveau regard sur les écosystèmes laitiers et fromagers :
Adaptation, développement et appropriations des méthodes
omiques à des fins d'écologie microbienne*

Cas terrain Franche-Comté

Yvette Bouton - CIGC

Séminaire final • 26/04/2023 • Paris

Modèle PPC (Comté)



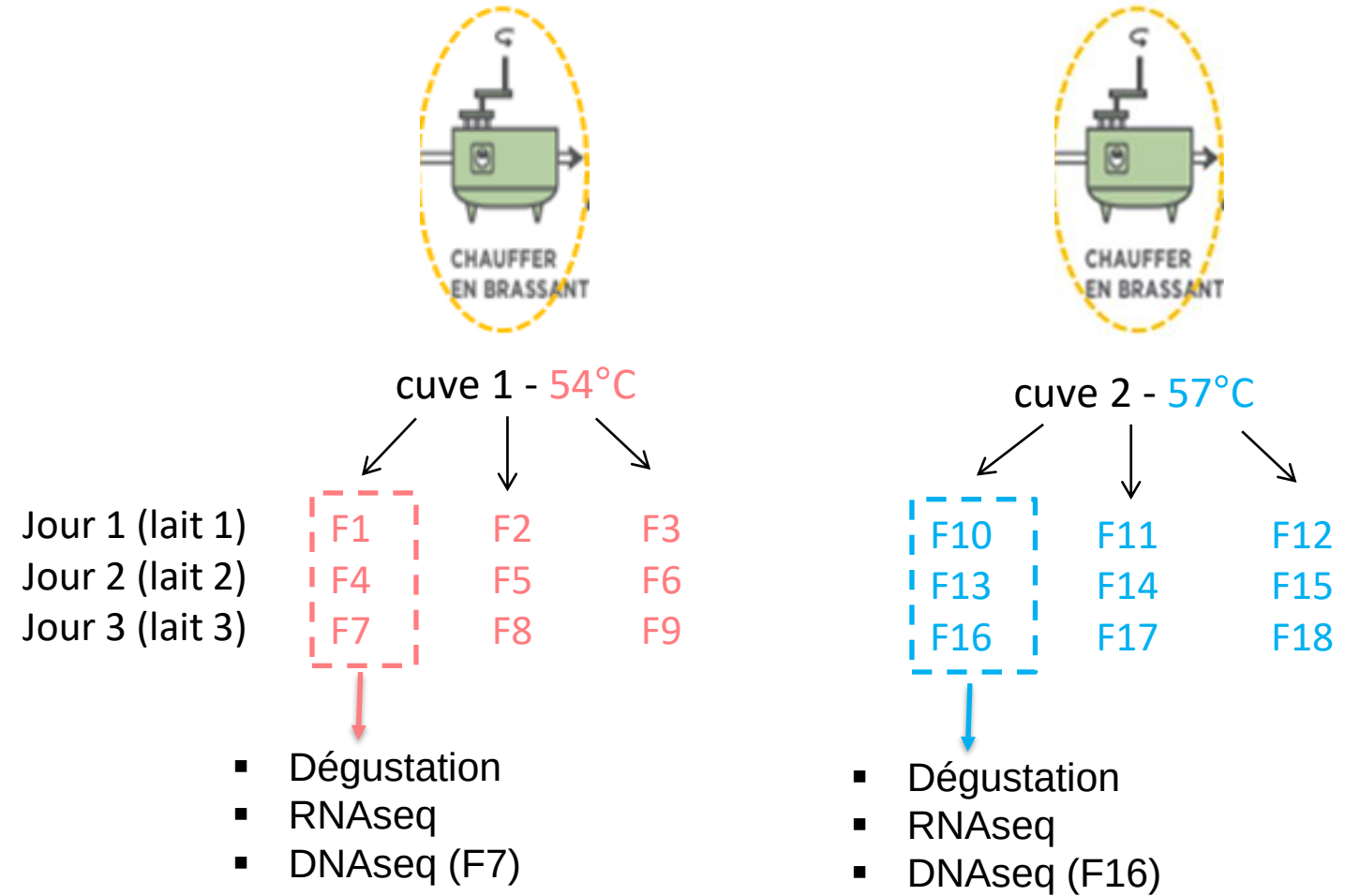
(D'après doc. CNIEL
modifié)

Objectifs

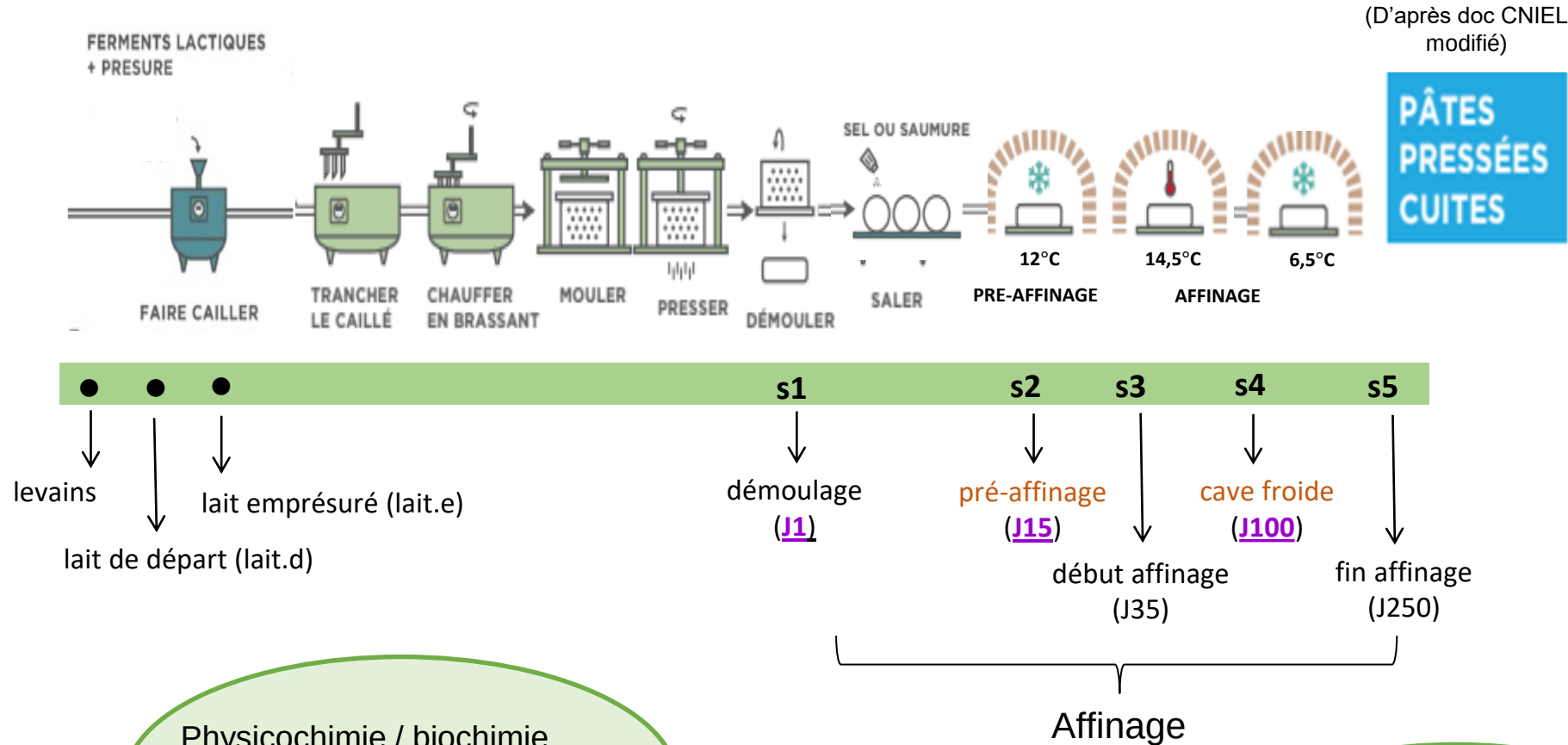
Mieux comprendre l'incidence de la température de chauffage du caillé sur la dynamique des espèces microbiennes pendant l'affinage et les caractéristiques sensorielles du fromage pour *in fine*, mieux maîtriser la qualité du produit fini.

Dispositif expérimental - Plan d'expérience

- Un atelier de fabrication
- Levains identiques
- 3 jours consécutifs
- Un cycle d'affinage



Dispositif expérimental - Analyse en cinétique de la pâte



• Métabarcoding (ADN)

lait, levain, fromage :
5 stades (bactéries) et
2 stades (champignons)

• DNA seq fromage (5 stades)

Physicochimie / biochimie
Microbiologie (dénombrements)
Dégustations

Métatranscriptomique (RNA seq)

fromage (3 stades)

Résultats - Analyses physico-chimiques et sensorielles (dégustations)

Fin affinage 8,5 mois

Physico-chimie 20 h

	54°C	57°C
pH	5,3	5,3
ES	63,3	63,2
G/S	53,1	53,4
HFD	55,3	55,6

54°C

AGV totaux $\approx$ 185 mg (correct)
 C2 : 104 mg/100g
C3 : 62 mg/100g

Protéolyse : 1141 μ M $-\text{NH}_2/\text{g}$ ESD

57°C

AGV totaux $\approx$ 110 mg (faible)
 C2 : 79 mg/100g
C3 : 9 mg/100g

Protéolyse : IM = 1090 μ M $-\text{NH}_2/\text{g}$ ESD

HFD $\approx$ 52%
 NaCl $\approx$ 0,97 %

Note pâte : 6,9 - Note goût : 6,8

Arômes :

- Lactique chauffé
- Fruité (abricot confiture miel)
- Torréfié (Noisette/graines),
- Bouillon de légumes
- Note soufrée.

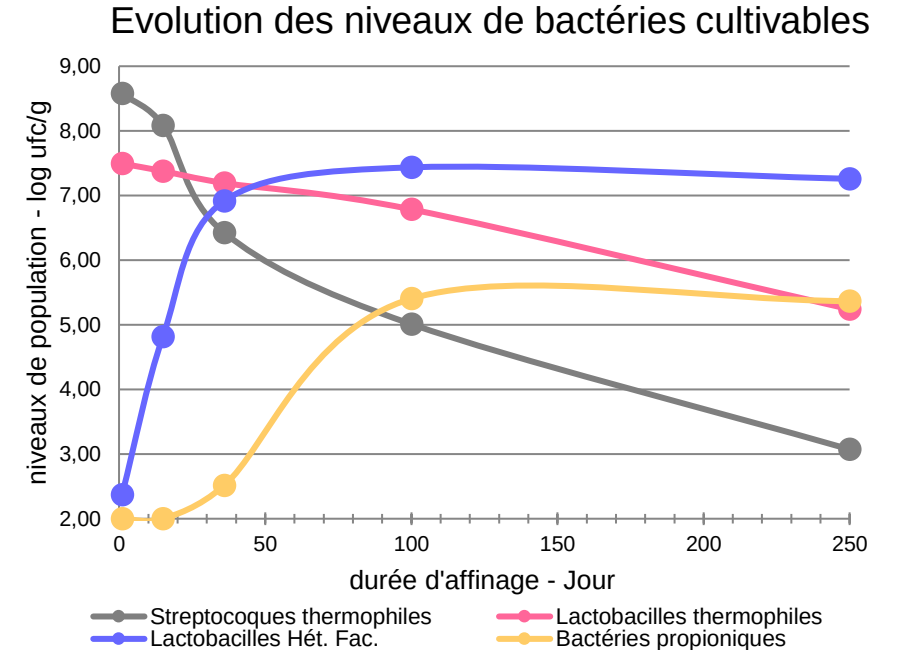
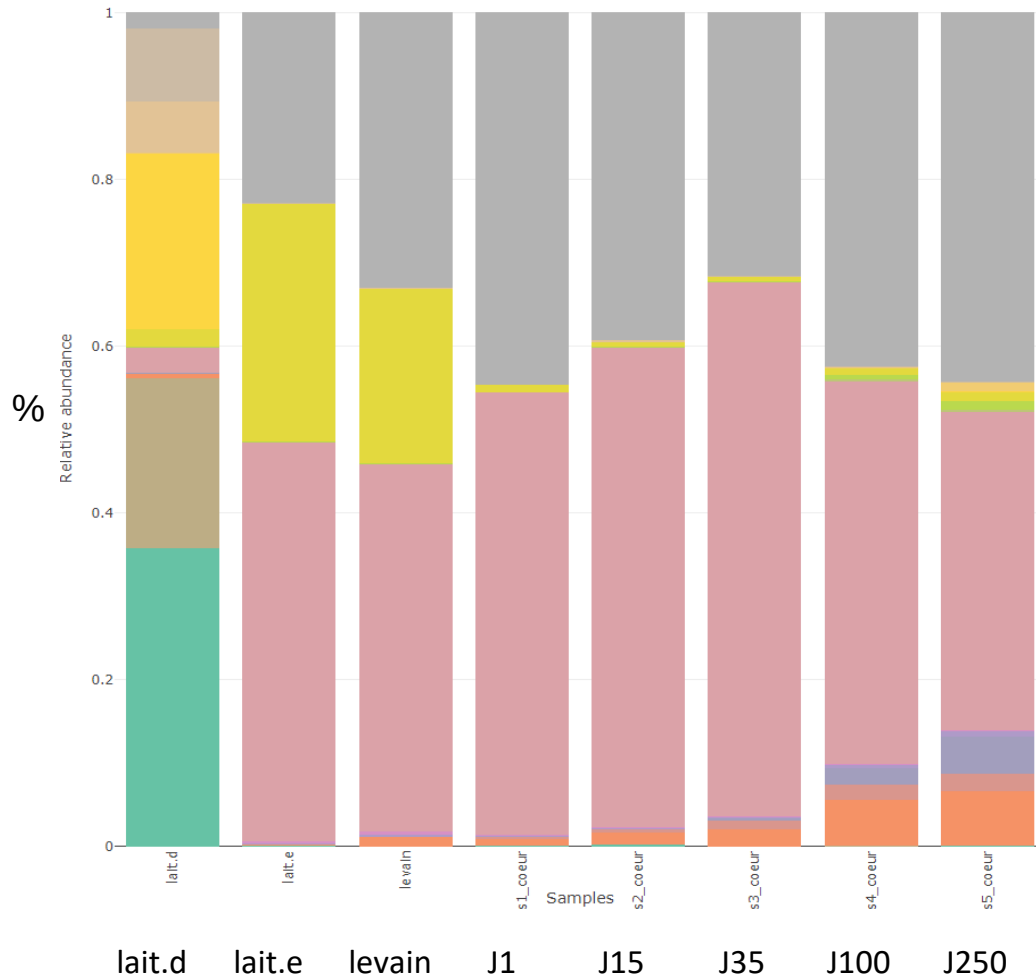
Note pâte : 7,0 - Note goût : 6,8

Arômes :

- Lactique acidifié, Lactique évolué
- Végétale (dont note verte).
- Gamme du Torréfié présente mais moins développée.
- Pointe d'oxydé-vert

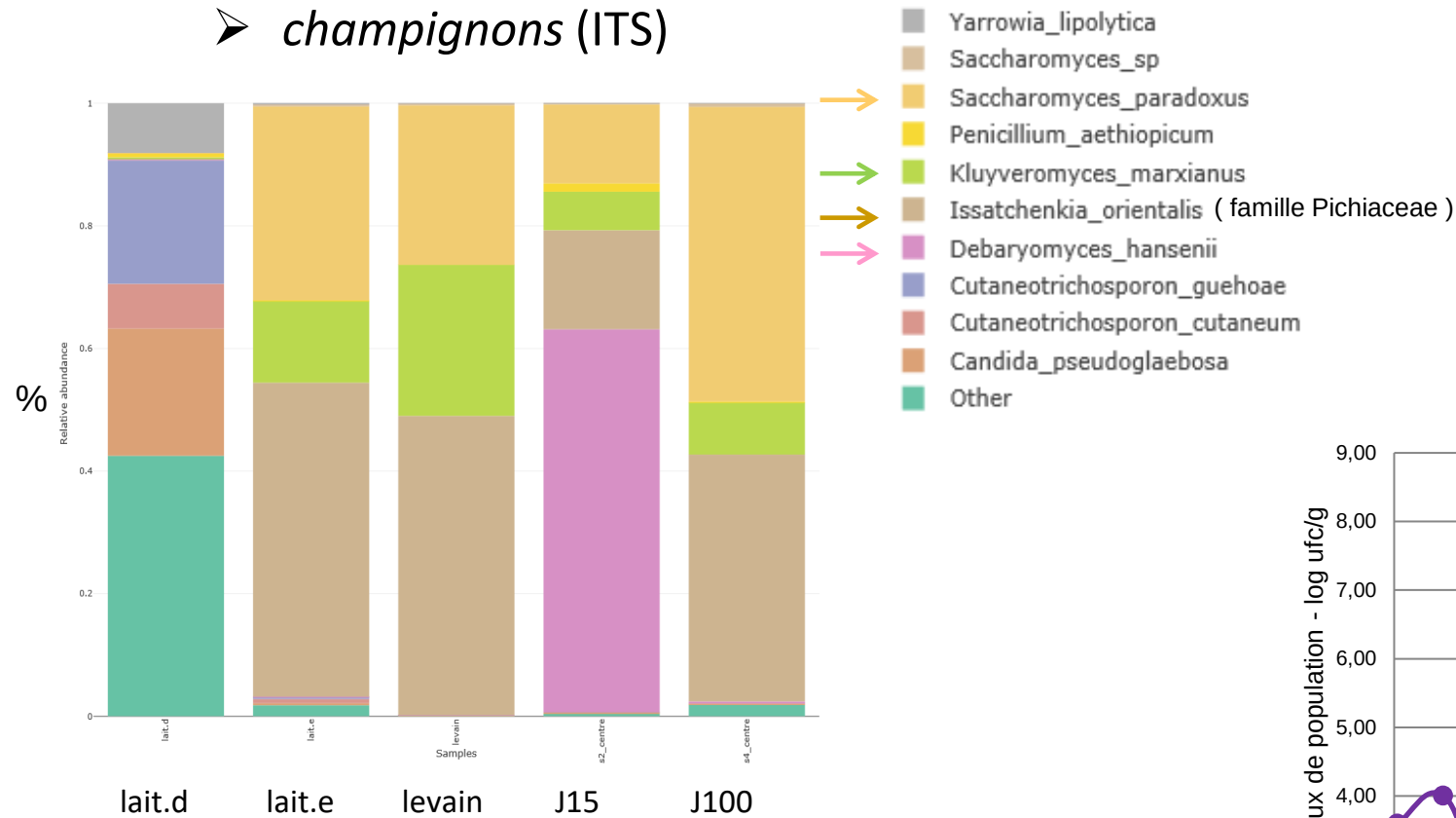
Résultats - Abondance des espèces bactériennes majoritaires

➤ *bactéries* (16S)

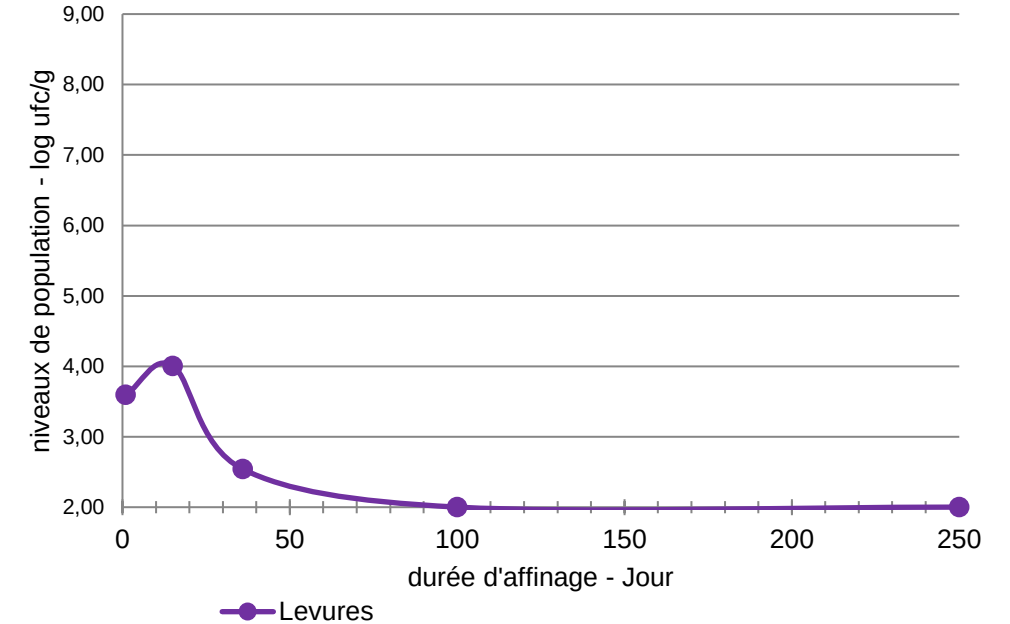


Abondance des espèces fongiques majoritaires

➤ champignons (ITS)

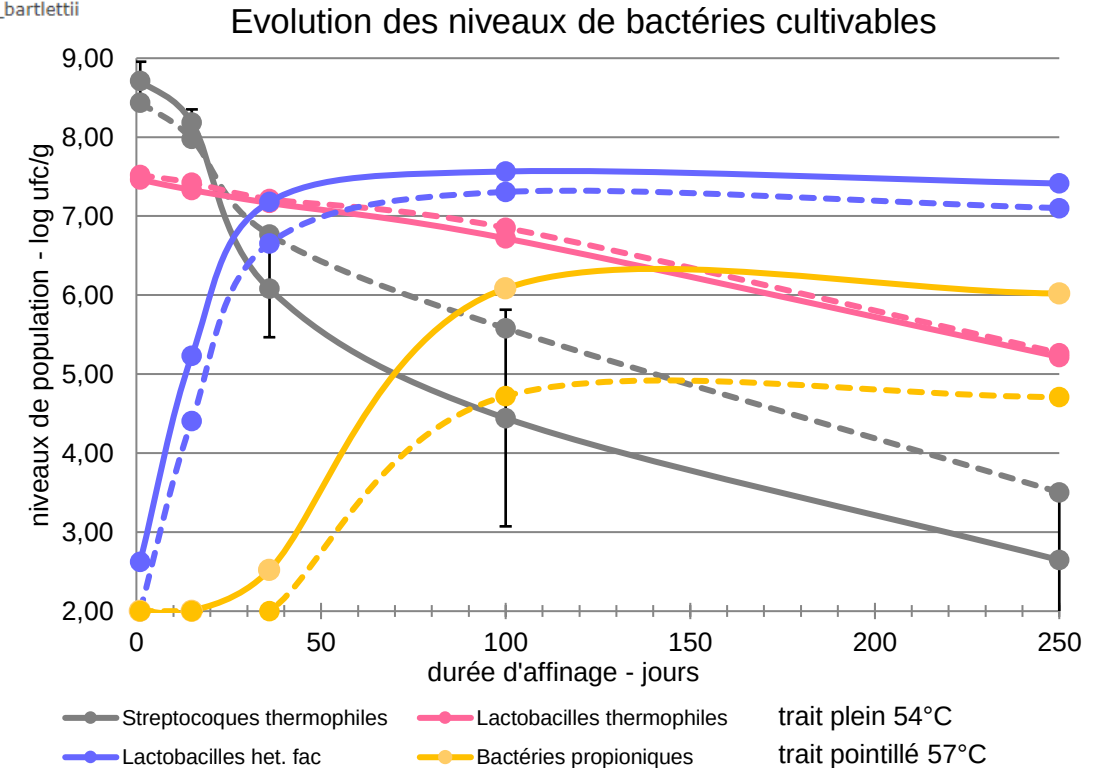
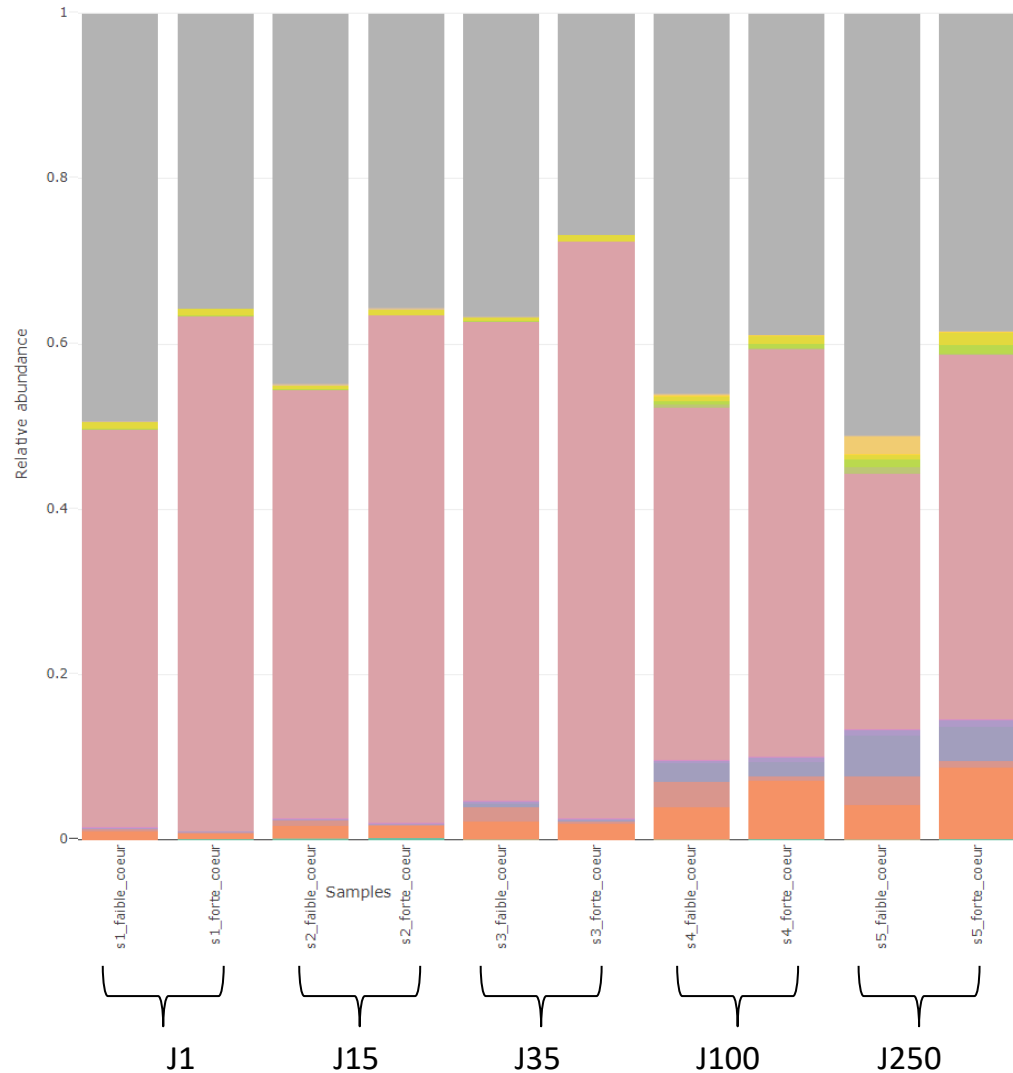


Evolution des niveaux de levures cultivables



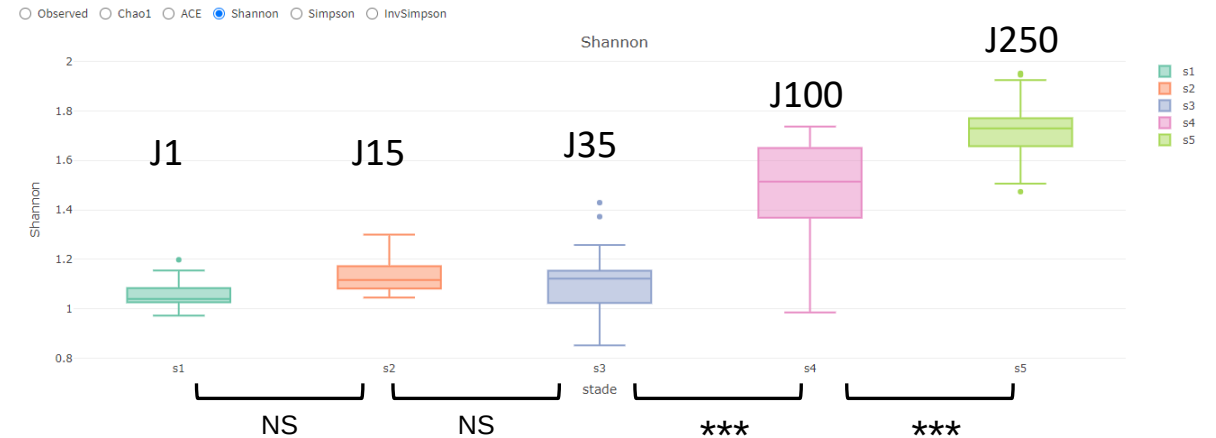
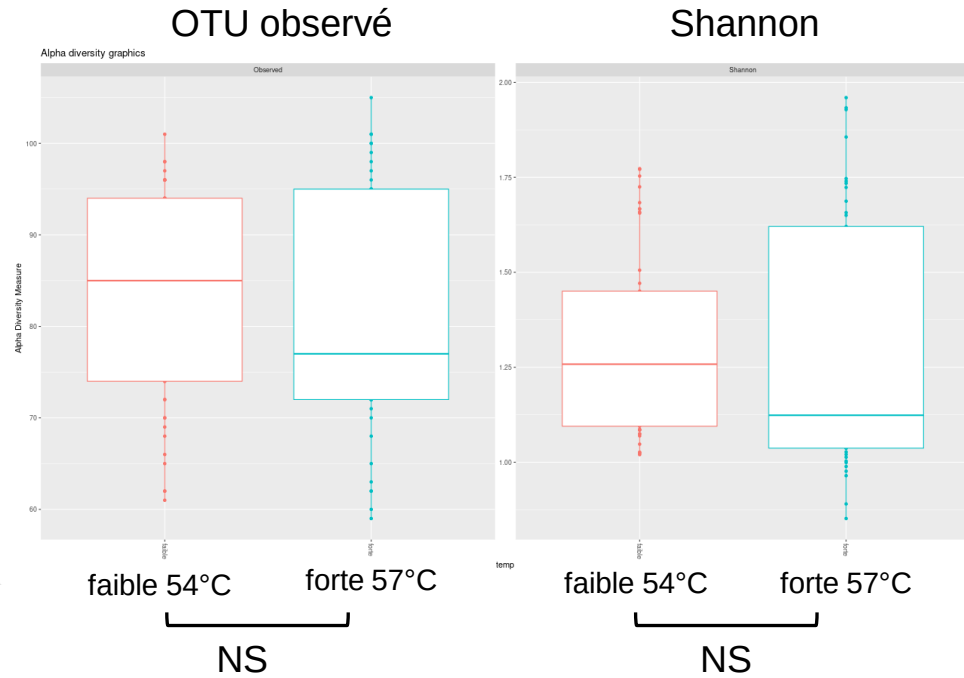


Incidence de la température de chauffage du caillé





Comparaison des niveaux de diversité α -diversité (richesse et équitabilité)



- Pas d'effet de la température de chauffage du caillé sur les indices de richesse et d'équitabilité (pâte -16S)

- Effet du stade d'affinage sur les indices de richesse et d'équitabilité (pâte -16S)

Remarque : pas d'effet de la température sur les indices de richesse et d'équitabilité (ITS, pâte J15 et J100).

Comparaison des profils des communautés bactériennes β -diversité

```
Call:
vegan::adonis(formula = betaDist() ~ stade + temp + stade:temp, data = sample_data, permutations = 9999)

Permutation: free
Number of permutations: 9999

Terms added sequentially (first to last)
```

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
stade	4	0.92607	0.23152	20.059	0.40559	0.0001 ***
temp	1	0.37982	0.37982	32.908	0.16635	0.0001 ***
stade:temp	4	0.05403	0.01351	1.170	0.02367	0.3158
Residuals	80	0.92334	0.01154		0.40439	
Total	89	2.28325			1.00000	

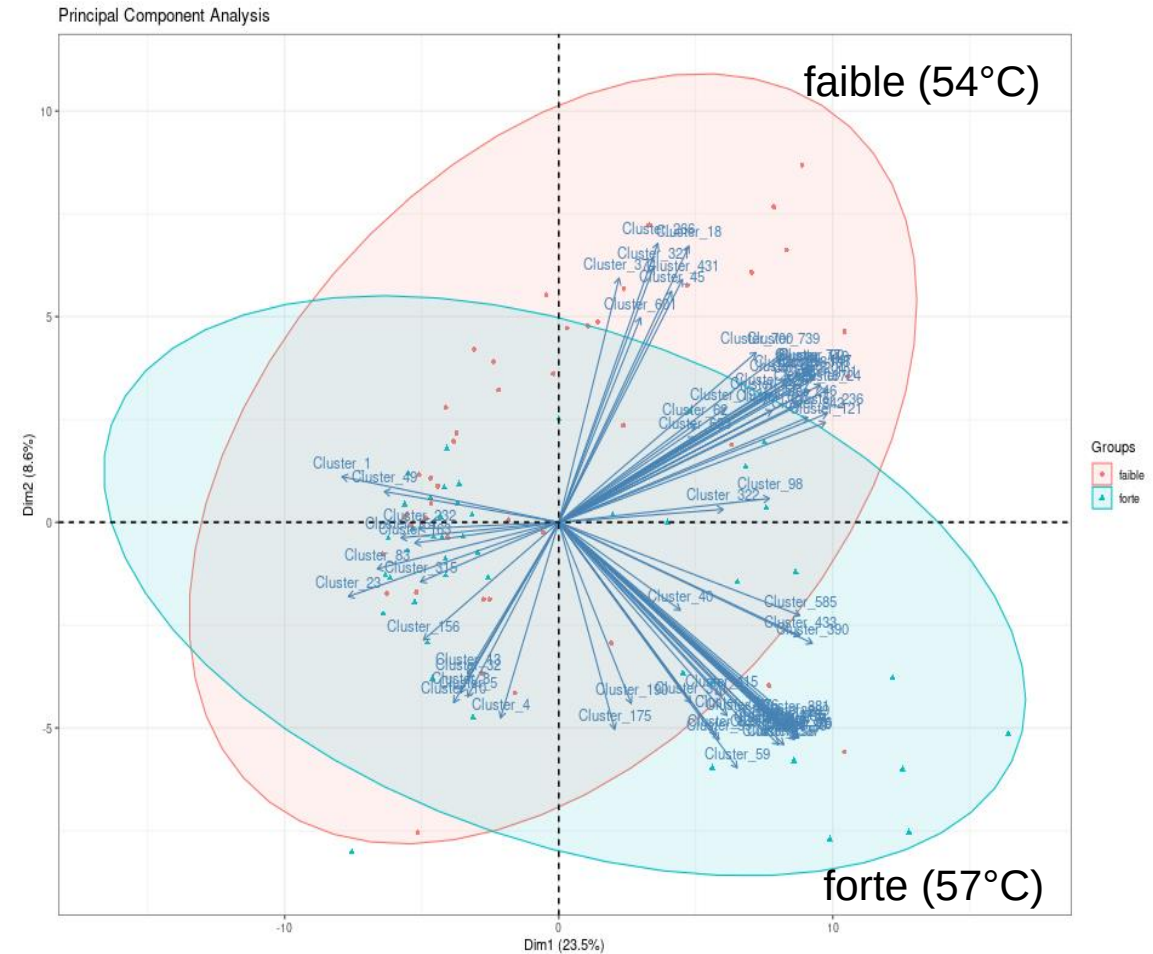
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

17%

Mesures de distance de Bray-Curtis,
Multivariate ANOVA (PERMANOVA + Pairwise ADONIS)

- **Effet température** (17% de la variabilité expliquée) sur les profils des communautés bactériennes de la **pâte**

Remarque : effet de la température (1,6 % de la variabilité expliquée) sur les profils des communautés fongiques (pâte J15 et J100).



Comparaison des profils des communautés bactériennes β -diversité

```
Call:
vegan::adonis(formula = betaDist() ~ stade + temp + stade:temp, data = sample_data, permutations = 9999)

Permutation: free
Number of permutations: 9999

Terms added sequentially (first to last)
```

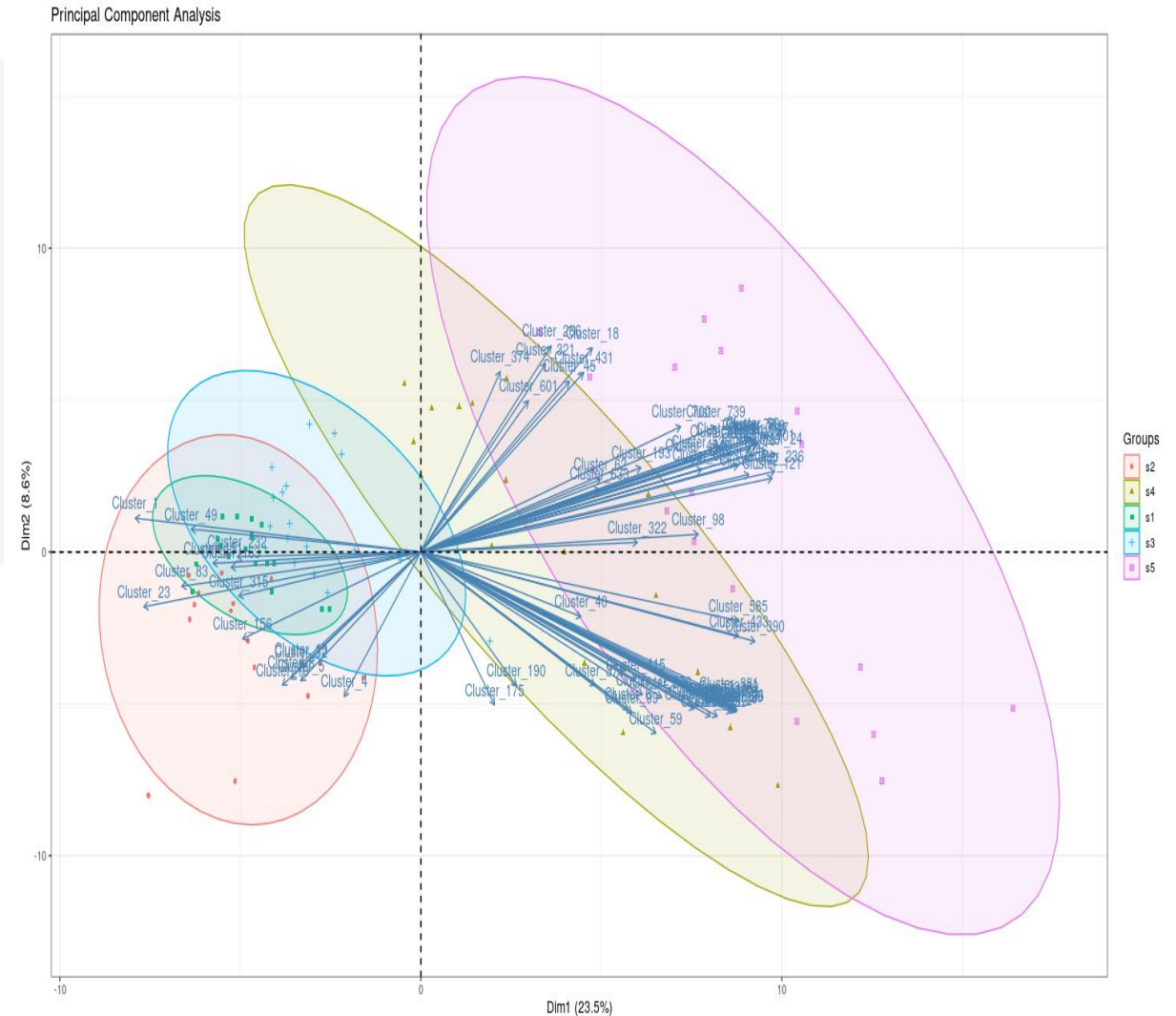
	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
stade	4	0.92607	0.23152	20.059	0.40559	0.0001 ***
temp	1	0.37982	0.37982	32.908	0.16635	0.0001 ***
stade:temp	4	0.05403	0.01351	1.170	0.02367	0.3158
Residuals	80	0.92334	0.01154		0.40439	
Total	89	2.28325			1.00000	

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

41%

Mesures de distance de Bray-Curtis,
Multivariate ANOVA (PERMANOVA + Pairwise ADONIS)

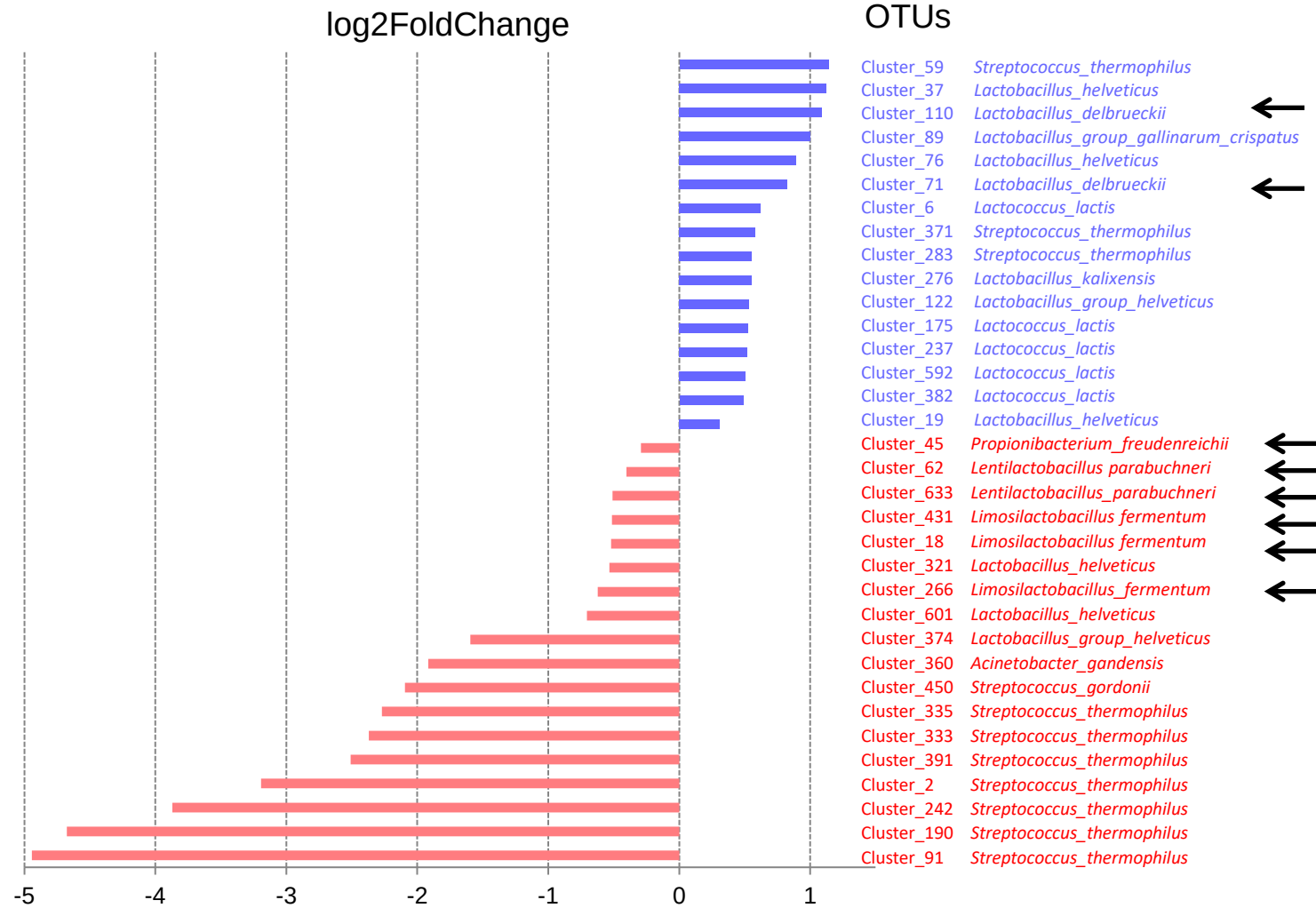
- **Effet stade d'affinage (41% de la variabilité expliquée) sur les profils des communautés bactériennes de la pâte**





Analyse différentielle

(faible vs forte avec DeSeq2)



Abondance plus élevée à 57°C

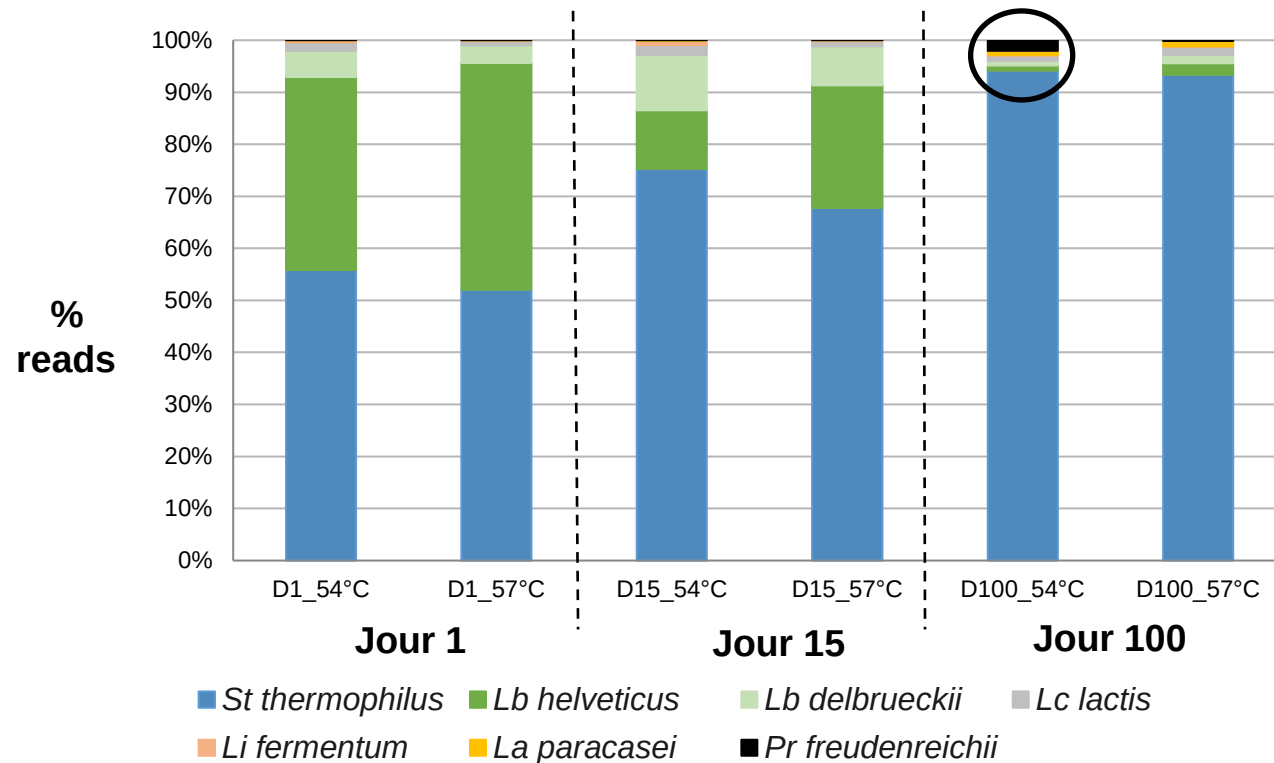
- *Lactobacillus delbrueckii*

Abondance plus élevée à 54°C

- *Propionibacterium freudenreichii*
- *Lentilactobacillus parabuchneri*
- *Limosilactobacillus fermentum*

Etude métatranscriptomique

Les données DNA seq → sélectionner des génomes de référence afin de réaliser l'étape de mapping des reads RNAseq (alignement des séquences RNAseq) - 7 espèces ciblées.



- transcriptome « complet » des espèces *St. thermophilus* (J1 à J100) et *L. helveticus* (J1 à J15)
- Autres espèces : seuls les gènes les plus exprimés sont quantifiables - *P. freudenreichii* plus actif à 54°C vs 57°C

Premières conclusions

- Impact de la température de chauffage du caillé en cuve sur les profils des communautés microbiennes (pâte) et les profils aromatiques des fromages,
- Méthodologie d'extraction ARN et les analyses bio-informatiques ont permis d'avoir des transcrits aux stades d'affinage J1, J15 et J100 d'un fromage à PPC
- Impact de la température de chauffage du caillé en cuve sur l'activité de *Propionibacterium freudenreichii*
- Nécessité de poursuivre l'interprétation biologique des données métatranscriptomiques (comptages gènes sur- ou sous-exprimés à 57°C vs 54°C pour une même espèce)

Merci de votre attention