

MetaPDOcheese:

Cartographie de la diversité microbienne des laits et des fromages AOP français et exploration des déterminants technologiques

Françoise Irlinger, Céline Delbès



SayFood
Food & Bioproduct Engineering

UMR F
romage



INRAE

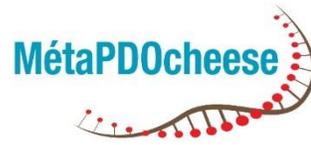


cnaol
CONSEIL NATIONAL
DES APPELLATIONS
D'ORIGINE LAITIÈRES



• Des questions socio-économiques et scientifiques convergentes

Projet construit au sein du RMT Fromages de Terroirs



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

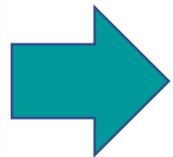


• Objectifs

→ *Acquérir des connaissances sur :*

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

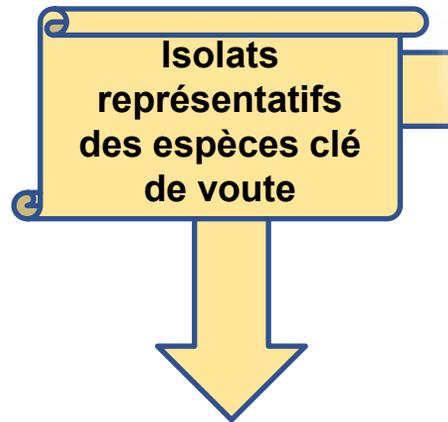
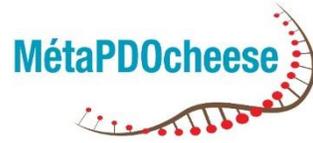
→ *Initier l'utilisation des méthodes métagénomiques par les acteurs des filières AOP*



Dépôt du projet MétaPDOcheese – septembre 2016
AO des grands projets de séquençage - France Génomique



MetaPDOcheese



Phase I : Métagénétique « des communautés microbiennes »

Cartographier la diversité des communautés microbiennes fromagères à l'échelle du territoire français :
Catalogue d'espèces bactériennes et fongiques et étude de leur abondance dans les 44 fromages AOP français en lien avec leurs pratiques et la région

Phase II : Métagénomique de 146 fromages et laits et Génomique de 650 isolats fromagers

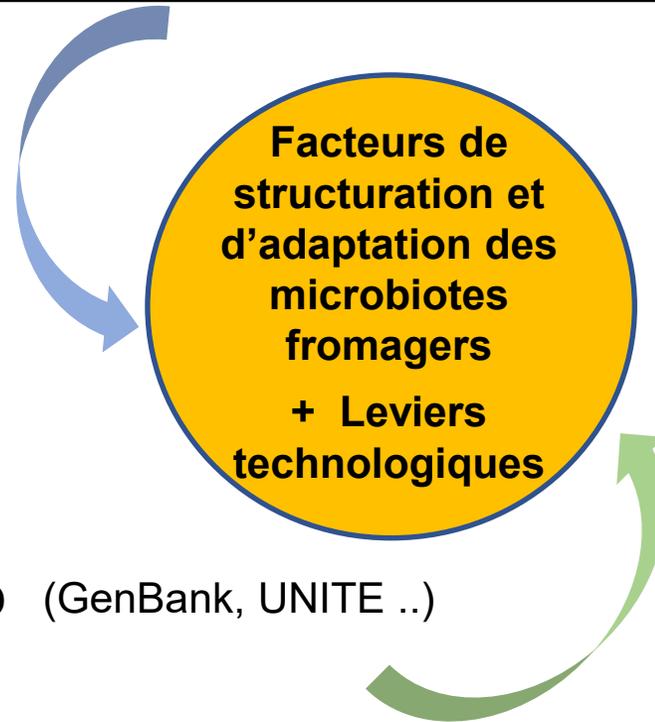
Etudier l'adaptation de quelques espèces microbiennes au contexte fromager :
Construction d'un catalogue de génomes et de protéines avec fonctions annotées

Analyses de génomique comparative

Enrichissement des BDD (GenBank, UNITE ..)

Facteurs de structuration et d'adaptation des microbiotes fromagers
+ Leviers technologiques

Métadonnées (pratiques de production, paramètres technologiques...)



• 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 des communautés microbiennes:

Phase 1

- Bactéries, champignons (moisissures et levures)
- Métagénétique sur 2800 laits et fromages (V3-V4 et ITS2) (> 190 000 séquences /échantillon)

Phase 2

- Métagénomique sur 146 fromages et laits
- Culturomique et Génomique de 650 isolats d'espèces microbiennes



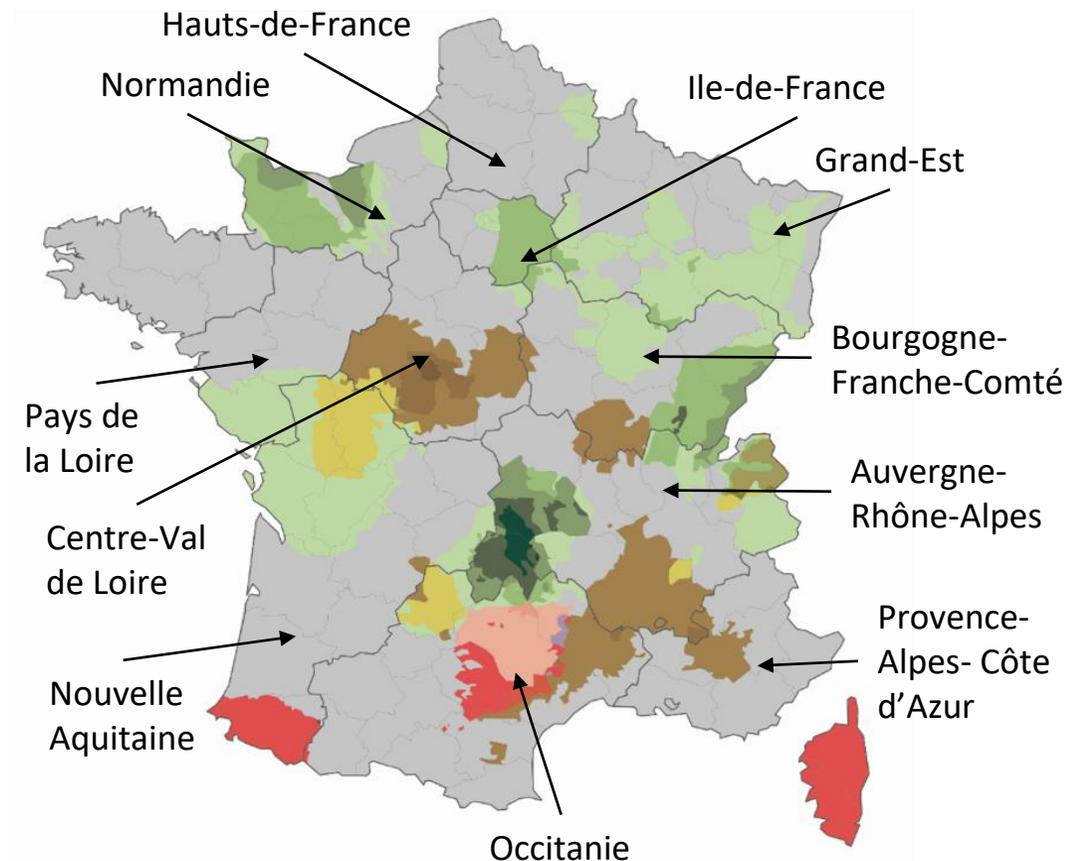
Vach



Chèvre



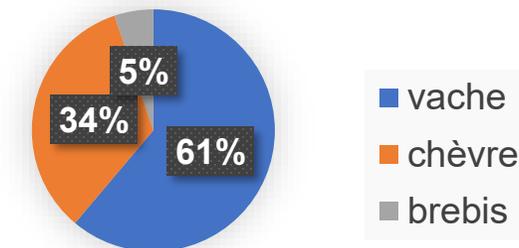
Brebis



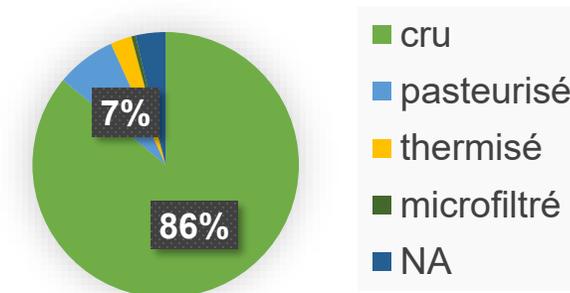
• 44 AOPs répartis en 7 familles technologiques:

Caractéristiques générales des échantillons étudiés :

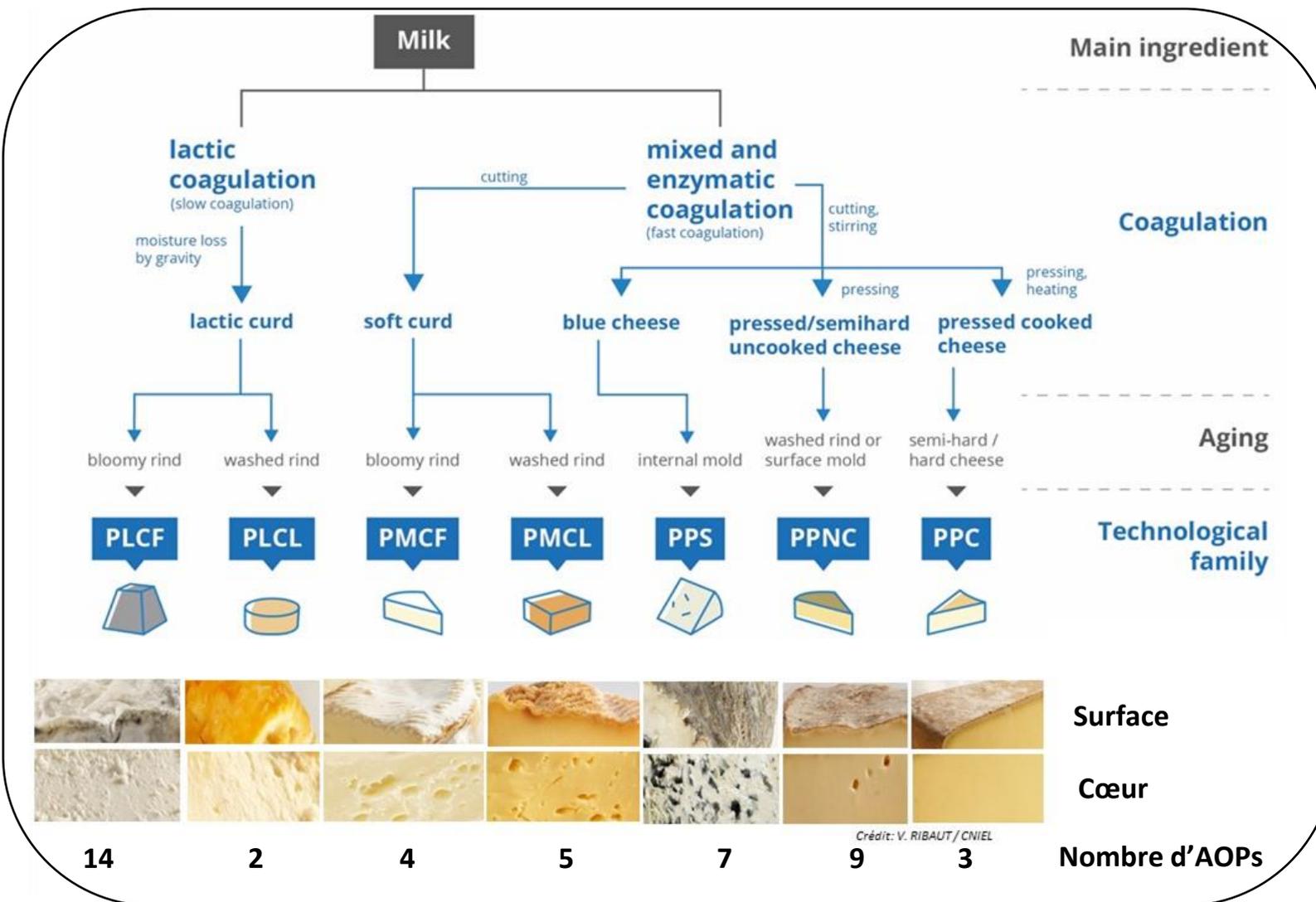
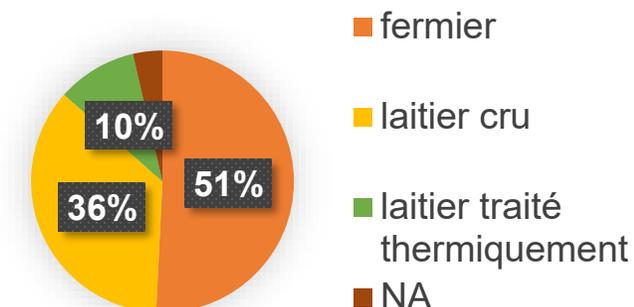
Espèce laitière



Traitement du lait

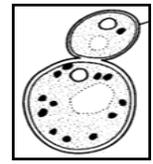
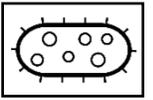


Type de production



Adapted from Monserrat & Mietton, 2014

Richesse microbienne des laits (n=370)



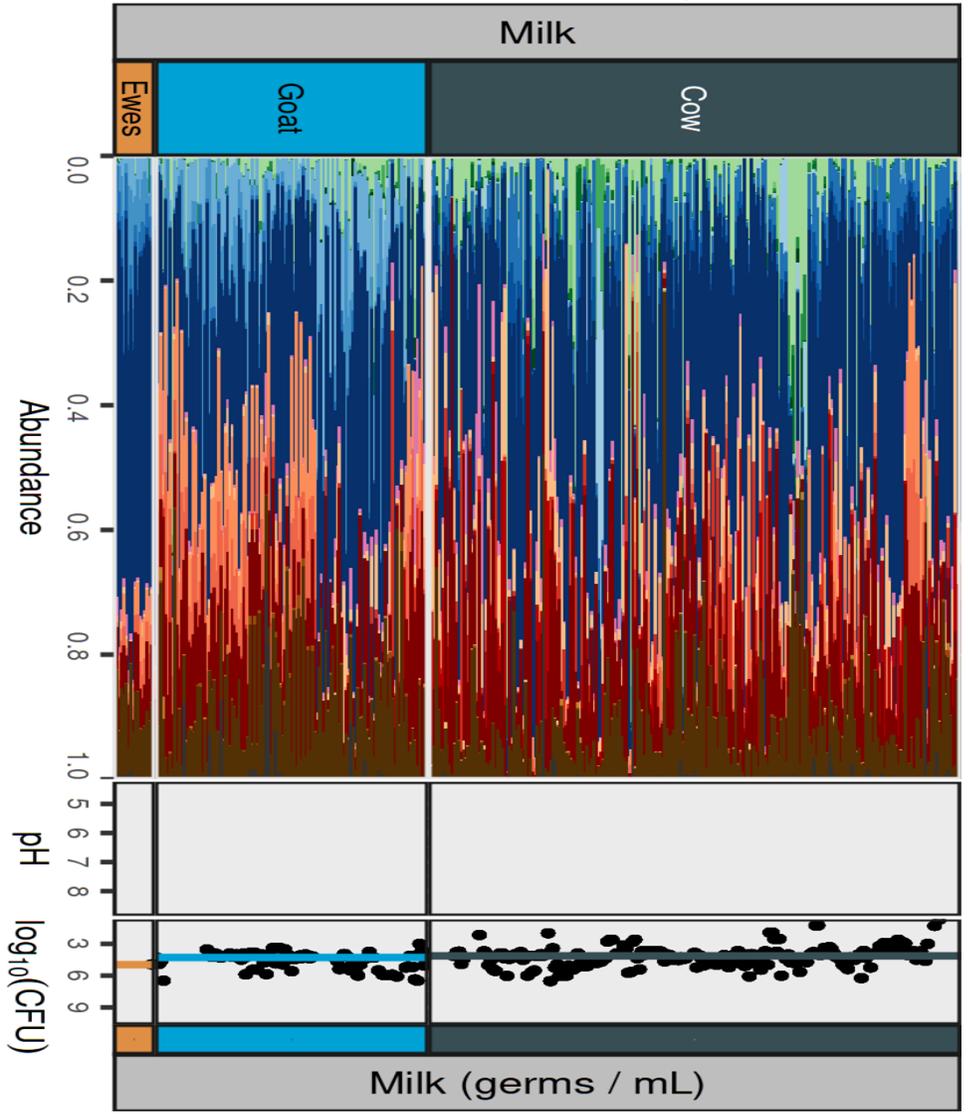
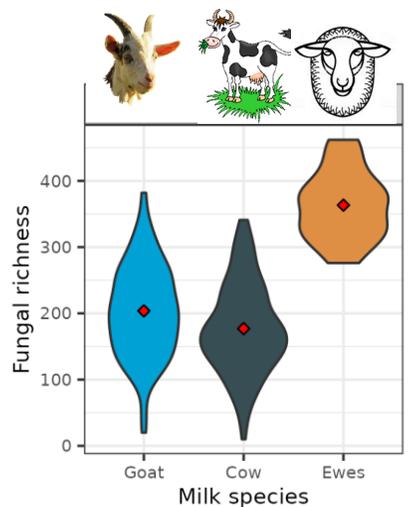
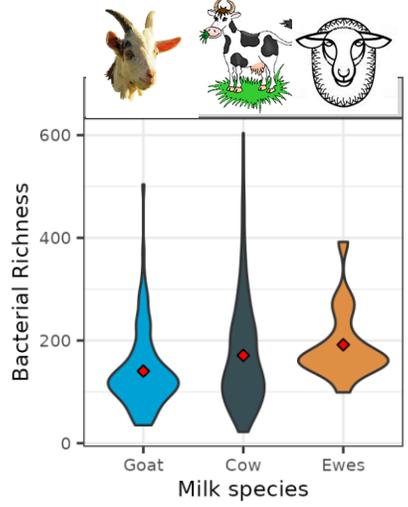
1230 espèces
bactériennes

1367 espèces
fongiques



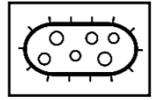
Richesse bactérienne

Richesse fongique



Species

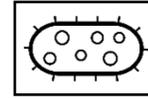
- Firmicutes**
- Lactococcus lactis* ▲●
- Lactococcus mult. species* ▲
- Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ▲
- Lactiseibacillus mult. species* ▲
- Leuconostoc mult. species* ▲
- Leuconostoc pseudomesenteroides* ▲
- Streptococcus thermophilus* ▲
- Staphylococcus epidermidis* ●
- Staphylococcus 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



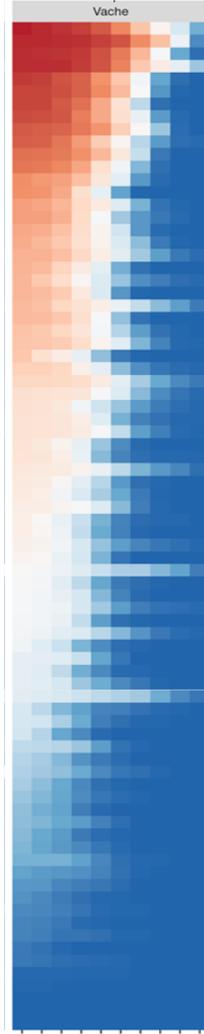
Le « core microbiote » des laits



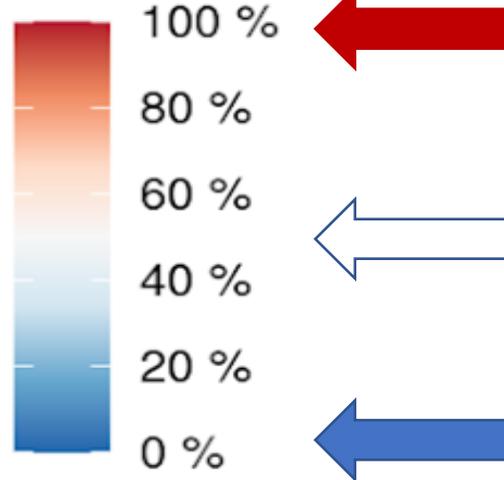
Bactéries
(espèces > 0.1%)



- Species
- Moraxella osloensis
 - Romboutsia timonensis
 - Eubacterium tenue
 - Lactococcus lactis
 - Turicibacter sp1
 - Intestinibacter bartlettii
 - Romboutsia sedimentorum
 - Clostridium Group disparicum celatum saudiensis
 - Ruminococcaceae sp.
 - Aerococcus viridans
 - Catonella sp1
 - Christensenellaceae sp.
 - Mogibacterium sp1
 - Jeotgalicoccus Group halotolerans psychrophilus
 - Staphylococcus chromogenes
 - Ruminococcus sp.
 - Facklamia tabacinasalis
 - Acinetobacter guillouiae
 - Blautia sp4
 - Enterococcus faecalis
 - Turicibacter sanguinis
 - Streptococcus Group porcinius uberis
 - Blautia sp1
 - Corynebacterium xerosis
 - Olsenella sp1
 - Cellulosilyticum sp.
 - Kocuria Group salisica varians
 - Staphylococcus Group argenteus simiae aureus
 - Staphylococcus xylosum
 - Leuconostoc Group mesenteroides suionicum
 - Enterococcus Group durans laecum thirae vilvorum
 - Staphylococcus Group ratti rivorum
 - Staphylococcus pelliculatus
 - Rhodococcus Group erythropolis griffithii
 - Acinetobacter albensis
 - Facklamia sp3
 - Bifidobacterium pseudolongum
 - Corynebacterium crudilactis
 - Aerococcus suis
 - Christensenellaceae R-7 group sp.
 - Pseudomonas Group azotoformans lactis parafactis
 - Corynebacterium maria
 - Serratia quinivorans
 - Staphylococcus equorum
 - Carnobacteriaceae sp.
 - Chryseobacterium haifaense
 - Corynebacterium casei
 - Hafnia alvei
 - Obesumbacterium proteus
 - Sphingomonas Group aerolata aurantiaca laeni
 - gipenosidivorax olei panaciterae
 - Corynebacterium humireducens
 - Alloicoccus sp.
 - Corynebacterium marinum
 - Serratia Group grimmes liquefaciens
 - Streptococcus Group equinus luteliensis
 - WCHB1-41 sp.
 - Corynebacterium stationis
 - Salinicoccus salitudinis
 - Staphylococcus epidermidis
 - Group bullatum marchantiae
 - Salinicoccus kunningensis
 - Brevibacterium senegalense
 - Staphylococcus warneri
 - Staphylococcus auricularis
 - Oligella sp.
 - Hafnia paralvei
 - Yersinia massiliensis
 - Jeotgalicoccus psychrophilus
 - Caryophanon tenue
 - Streptococcus pluranimallium
 - Staphylococcus simulans
 - Oceanobacillus sp.
 - Staphylococcus cohnii
 - Marinilactibacillus sp.
 - Jeotgalicoccus coquinae
 - Staphylococcus lentus
 - Corynebacterium mastitidis
 - Corynebacterium Group casei stationis
 - Corynebacterium sp1
 - Mannheimia glucosida



Prévalence



Espèces bactériennes détectées dans tous les échantillons de laits

Espèces bactériennes détectées dans 50% des échantillons de laits

Espèces bactériennes détectées dans < 1% des échantillons de laits

Quelques espèces microbiennes communes aux laits des trois espèces laitières :

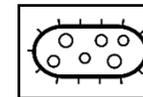
Lactococcus lactis, *Romboutsia timonensis*, *Moraxella osloensis*, *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii*

Seuil d'abondance

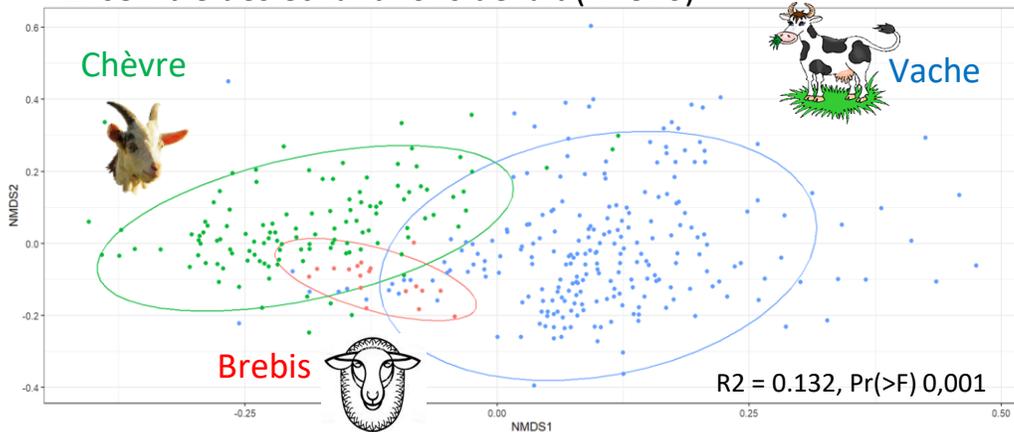


• Déterminants de la composition des microbiotes du lait

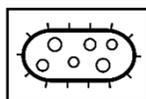
Beta-diversité de la communauté bactérienne des laits (BC index)



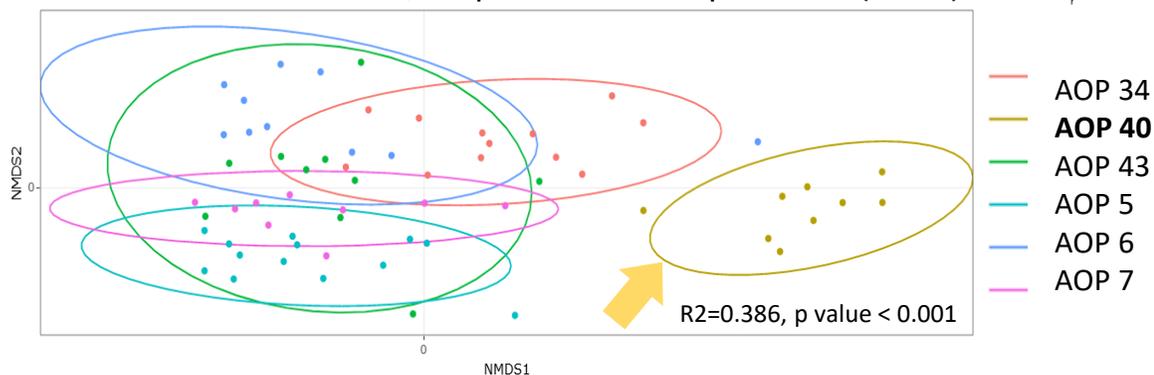
Ensemble des échantillons de lait (N=370)



- **L'espèce de ruminant laitier** est un facteur déterminant de la composition du microbiote bactérien du lait.



Laits de vache de 6 AOP, les plus influencés par l'AOP (N=63)

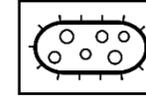


- **L'AOP** est le second facteur le plus déterminant de la composition du microbiote bactérien du lait.

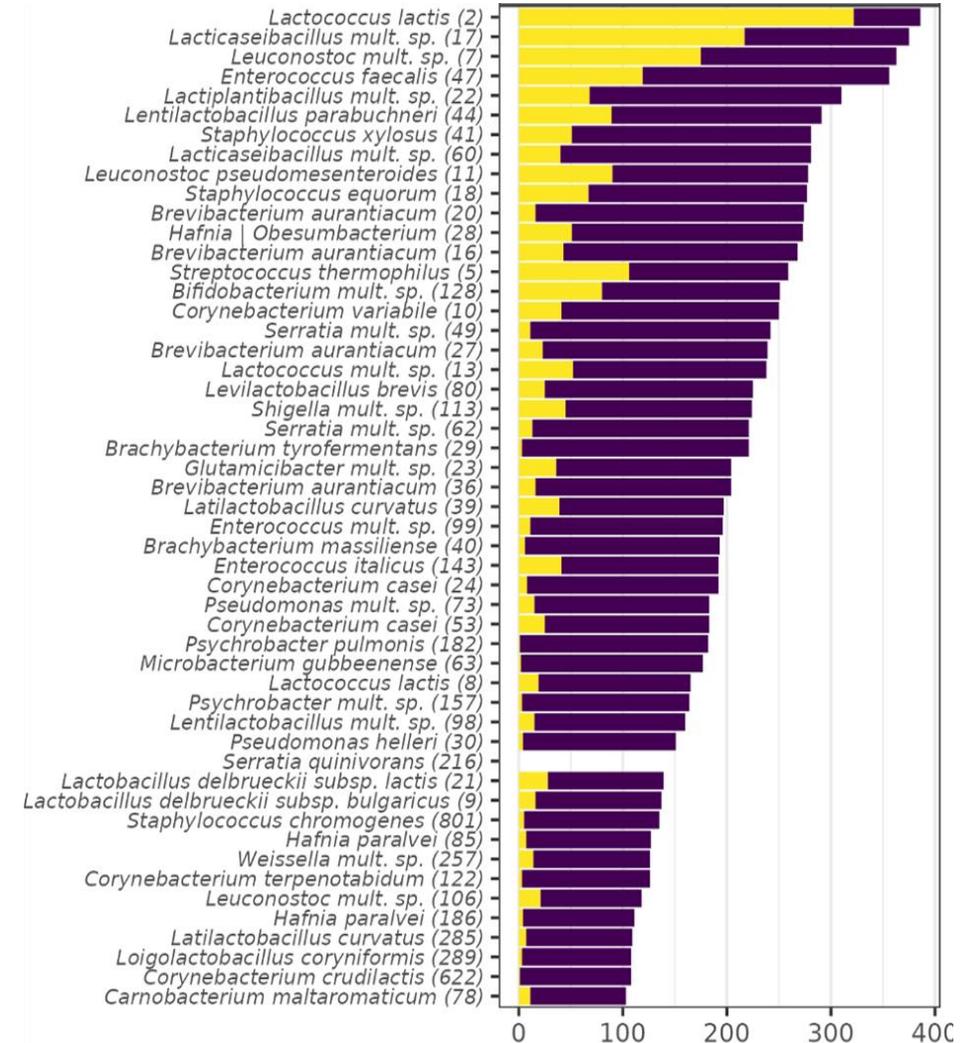
Contribution des microbiotes des laits aux microbiotes des fromages

➤ Chaque lait est comparé avec le fromage qui en est issu

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



Espèces partagées avec le lait et les plus répandues dans les fromages.

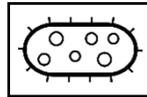


Nombre de productions dans lesquelles l'espèce est :
■ partagée entre le lait et le fromage
■ détectée seulement dans le fromage

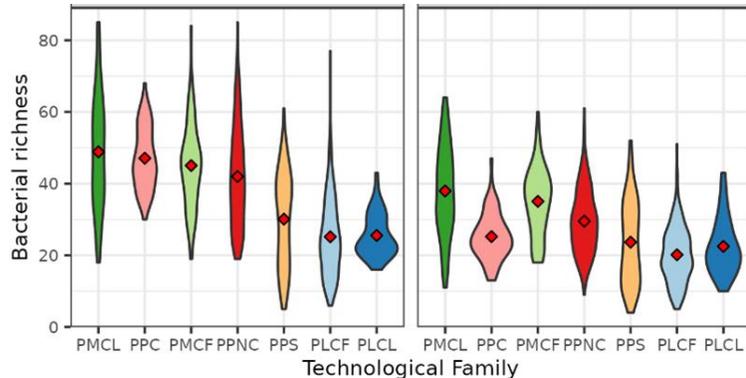
Richesse bactérienne des 2291 fromages AOP (cœur et surface)



820 espèces bactériennes



Richesse bactérienne

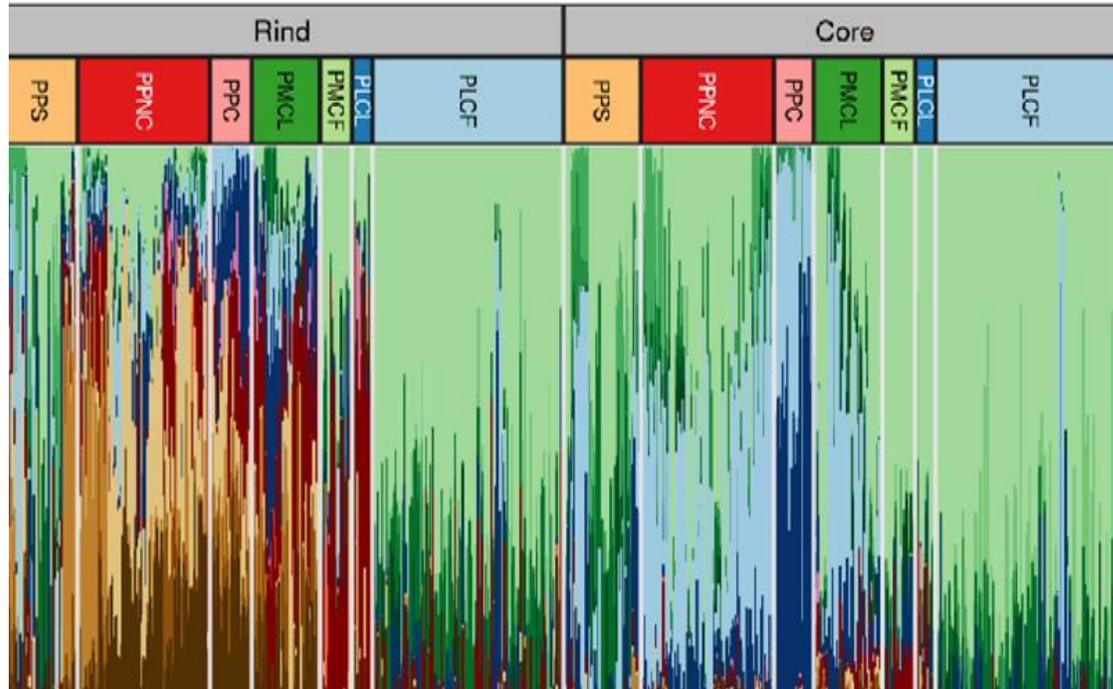
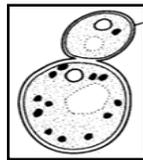


Surface

Cœur



333 espèces fongiques



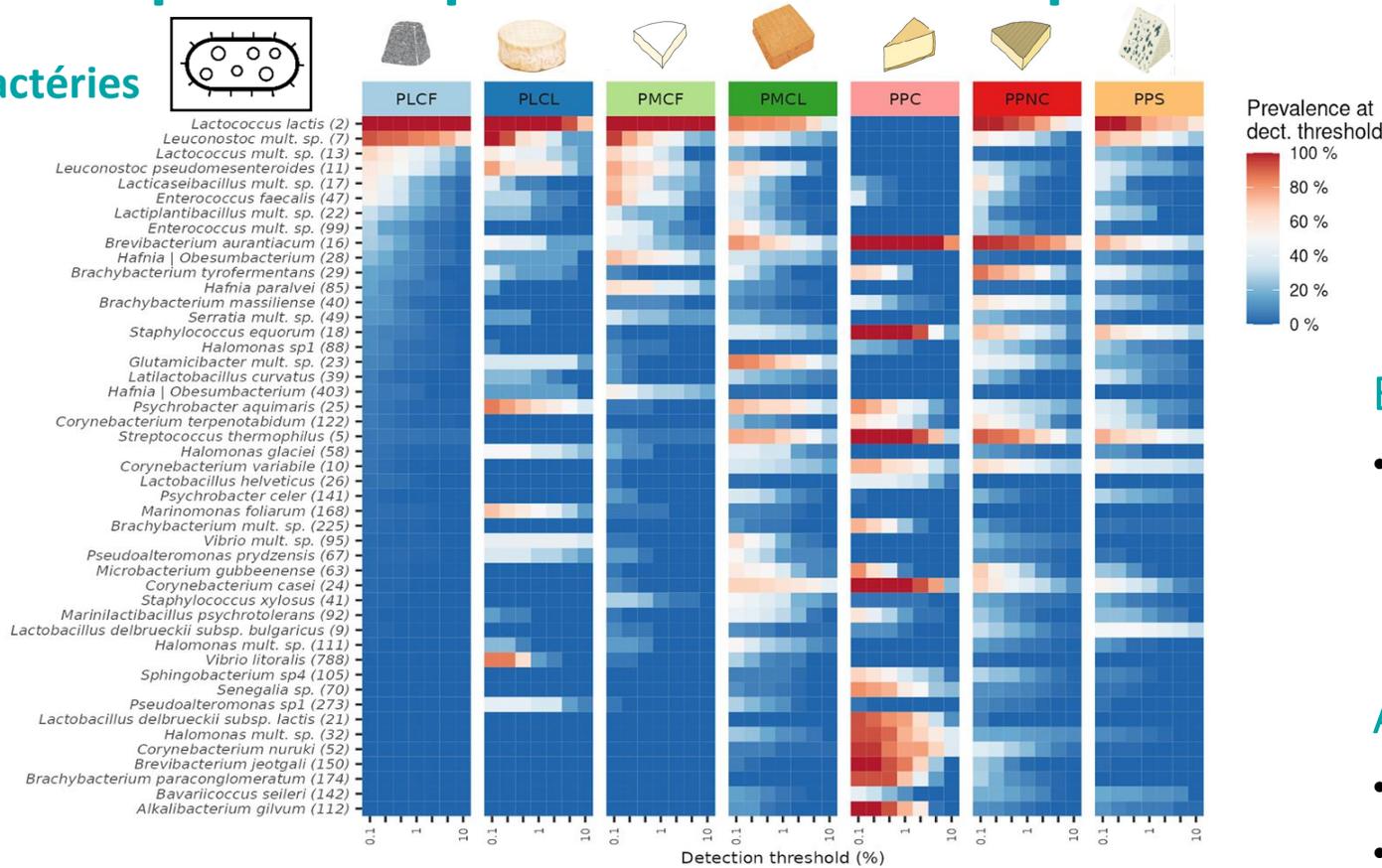
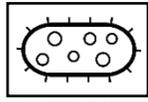
Firmicutes

- 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 les plus abondantes et prévalentes à la surface des fromages

Bactéries



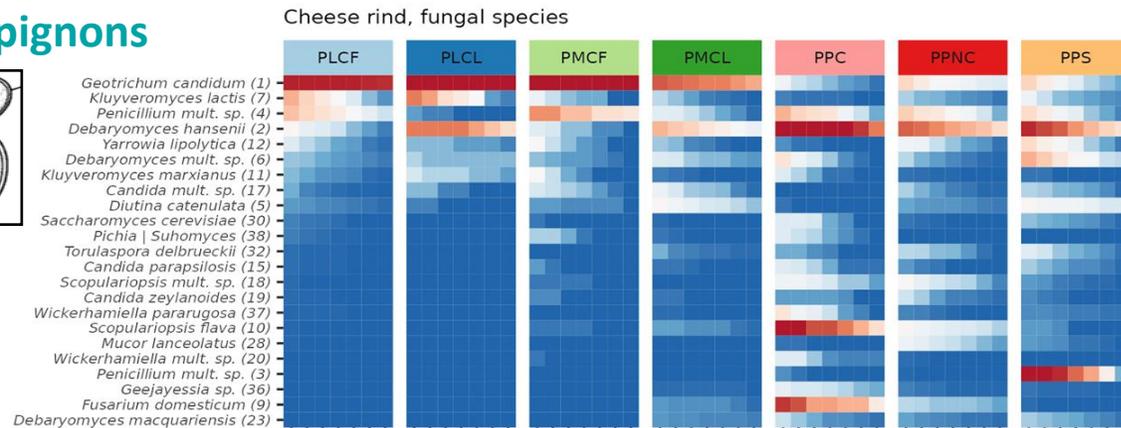
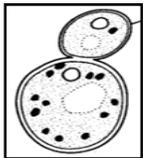
Exploration du core microbiome :

- Aucune espèce microbienne partagée par tous les fromages étudiés

A l'échelle de la famille technologique :

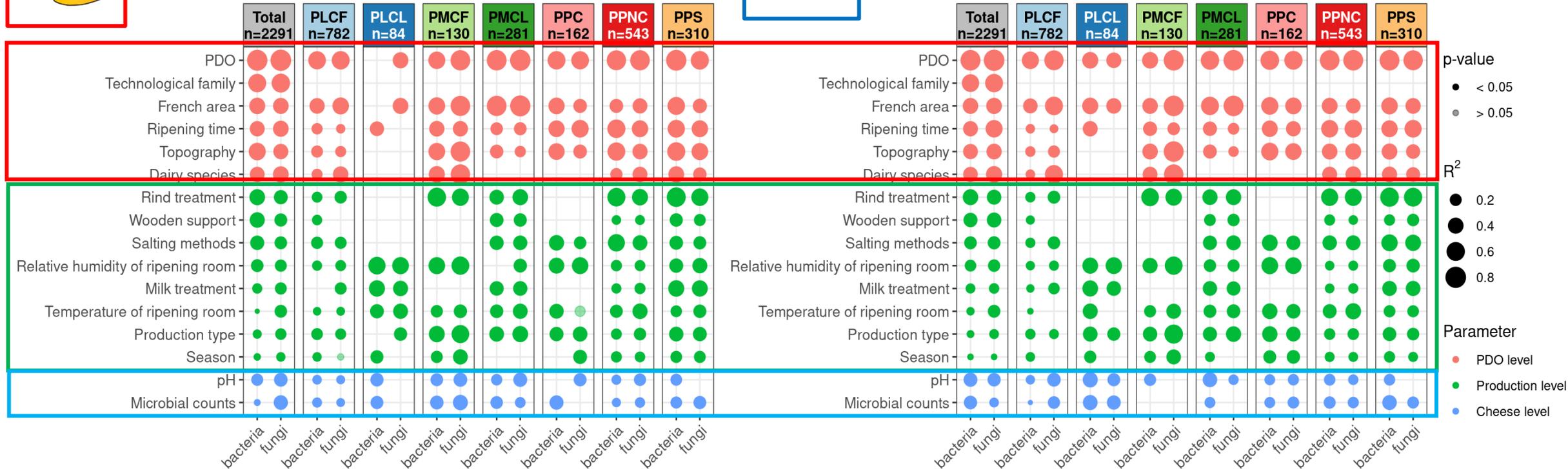
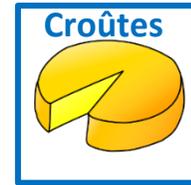
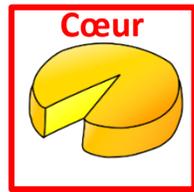
- Un core microbiome distinct pour chaque famille
- Comprenant principalement des espèces connues pour être inoculées pendant la fabrication du fromage (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus*, *Lactococcus laudensis*, *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii*)

Champignons



Correlations entre la diversité microbienne des fromages et les paramètres technologiques

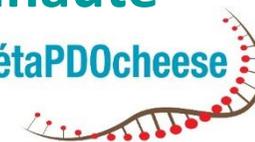
MétaPDOcheese



Les facteurs les plus significatifs de la diversité 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.

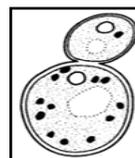
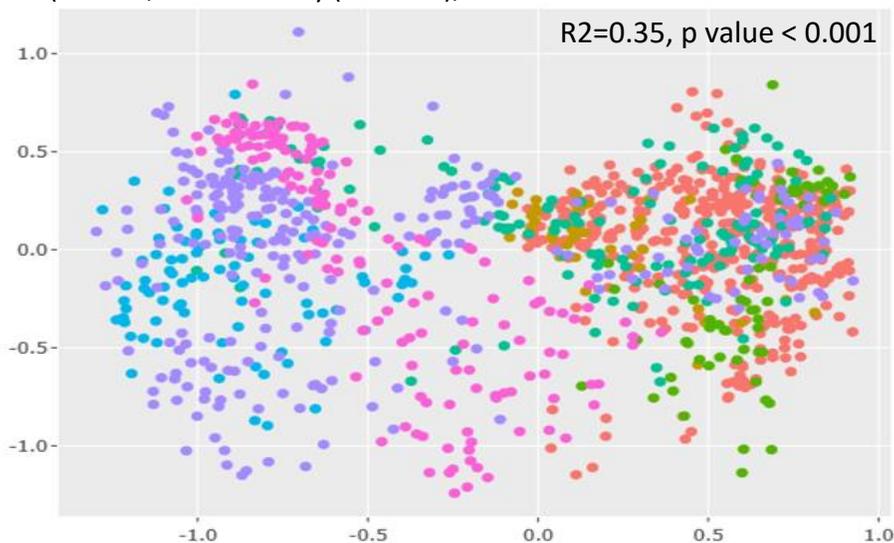
Les pratiques contribuant à la structuration du microbiote des fromages : Communauté fongique à la surface des fromages à pâte pressée non cuite (PPNC)



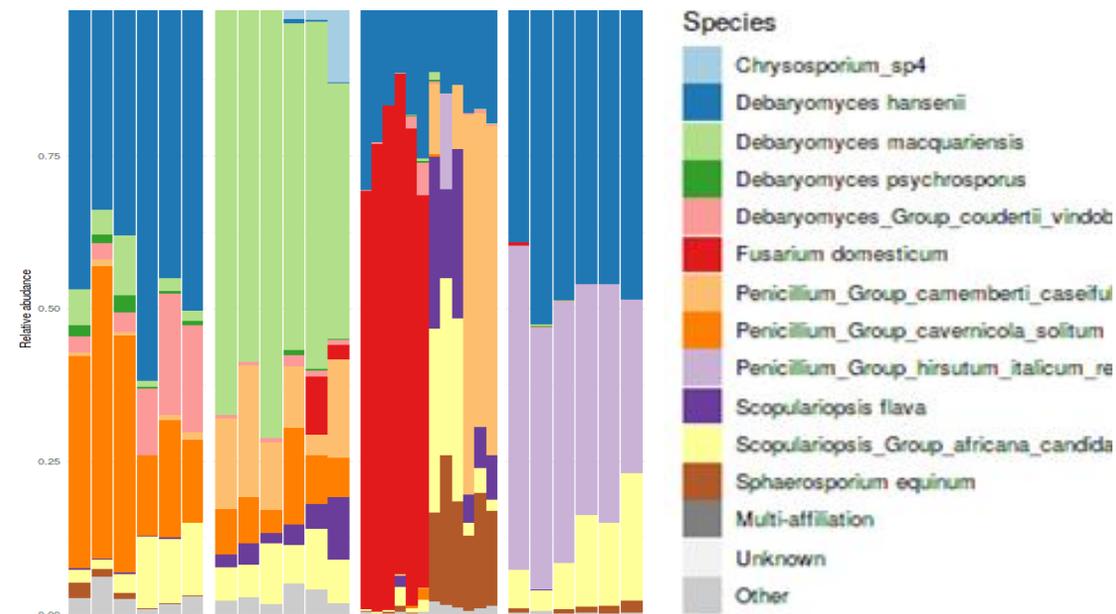
Tous les fromages selon la famille technologique

(n=2291; Beta-diversity (BC index);

R²=0.35, p value < 0.001

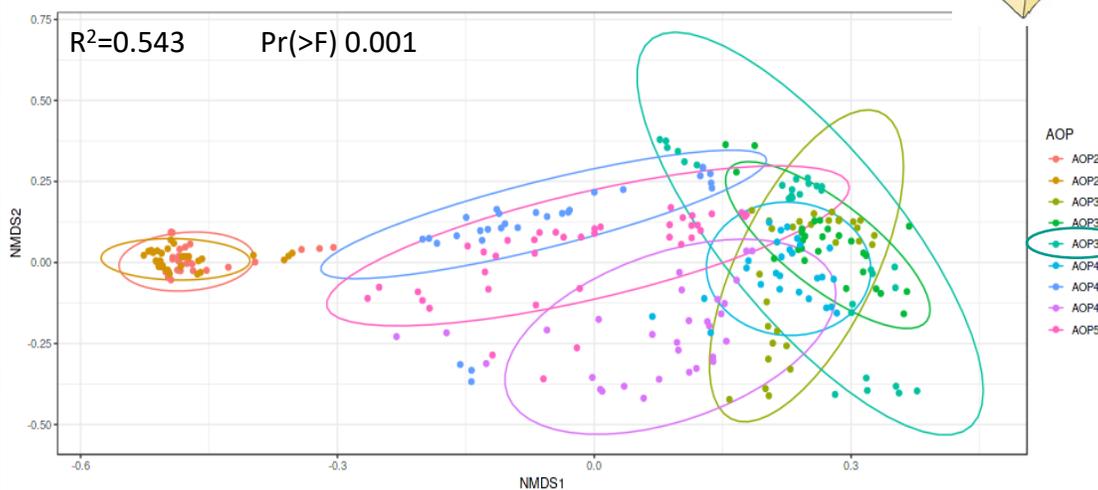


Profils fongiques à la surface des fromages de l'AOP38 en fonction des soins de croûte



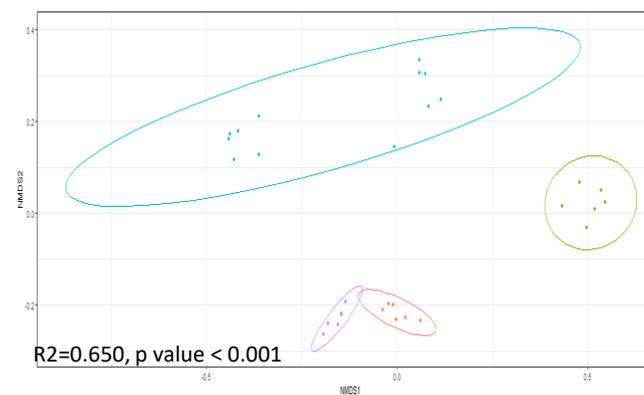
Structuration des profils fongiques selon l'AOP des PPNC

R²=0.543 Pr(>F) 0.001



- AOP
- AOP28
- AOP29
- AOP32
- AOP33
- AOP38
- AOP40
- AOP42
- AOP44
- AOP5

À sec Aucun Lavage Mixte



R²=0.650, p value < 0.001

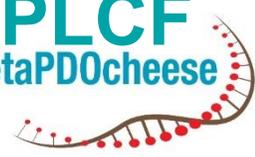
Soin de croûte:

- À sec
- Aucun
- Lavage
- Mixte
- Non renseigné

Facteurs de structuration du microbiote des fromages AOP - PLCF

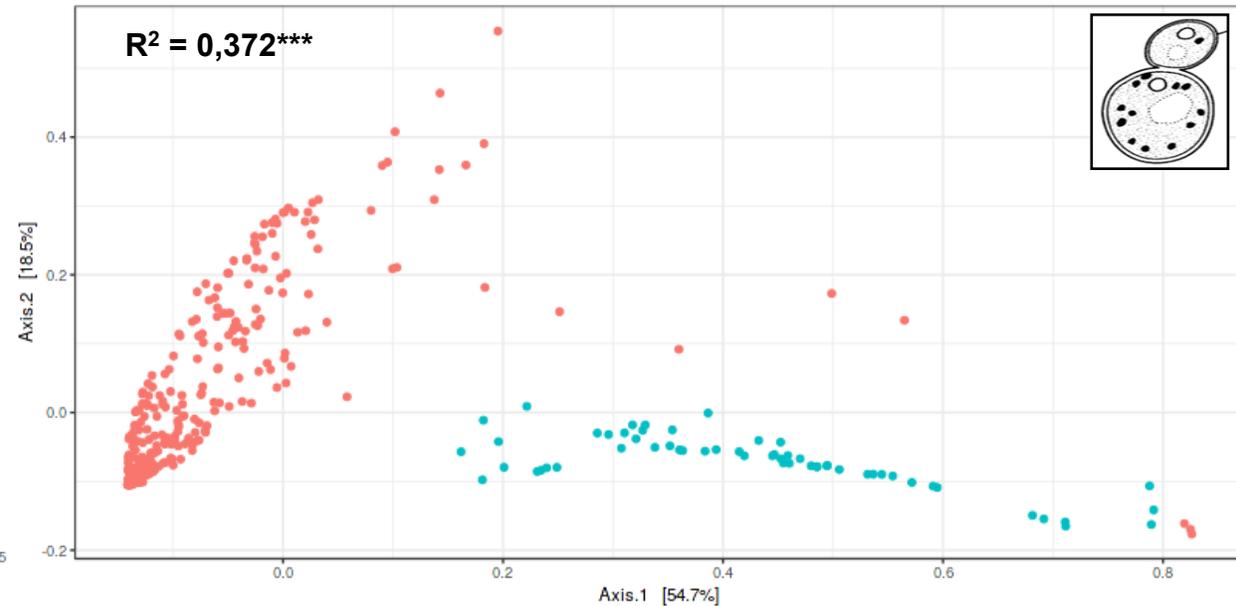
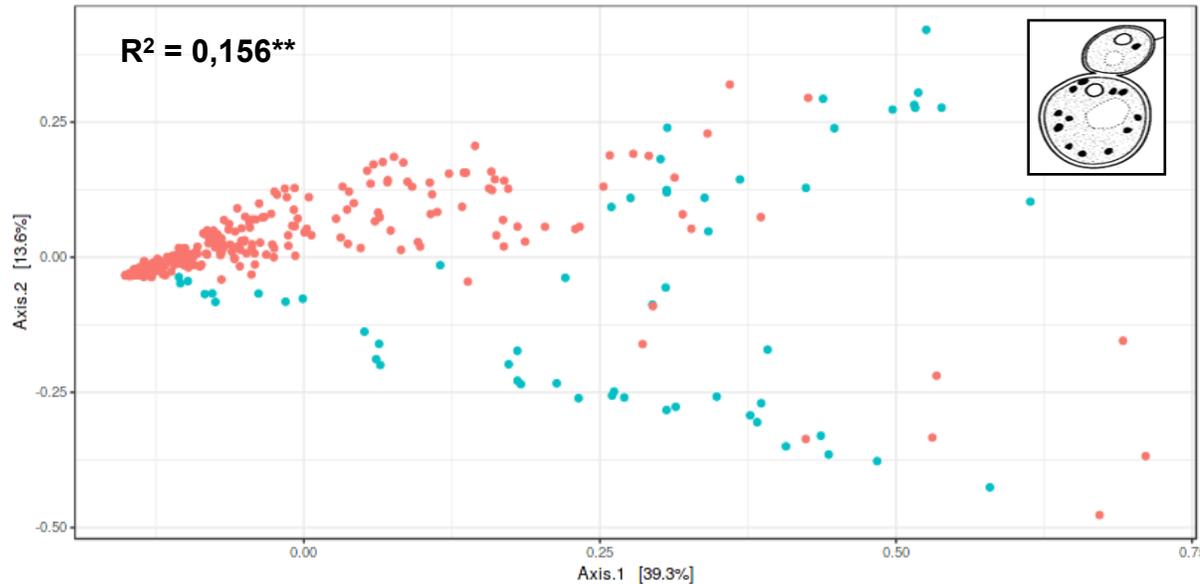
MétaPDOcheese

Beta-diversité de la communauté **fongique** des fromages PLCF (Bray-Curtis index) selon l'espèce laitière



Coeur

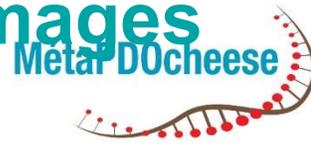
Surface



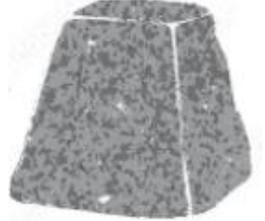
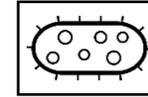
Dans la famille des fromages PLCF, l'**espèce laitière** est un facteur majeur de la structuration du microbiote fongique du fromage.

Facteurs de structuration du microbiote des laits et des fromages

AOP – PLCF au lait de chèvre



Beta-diversité de la communauté bactérienne (Jaccard index) selon l'AOP

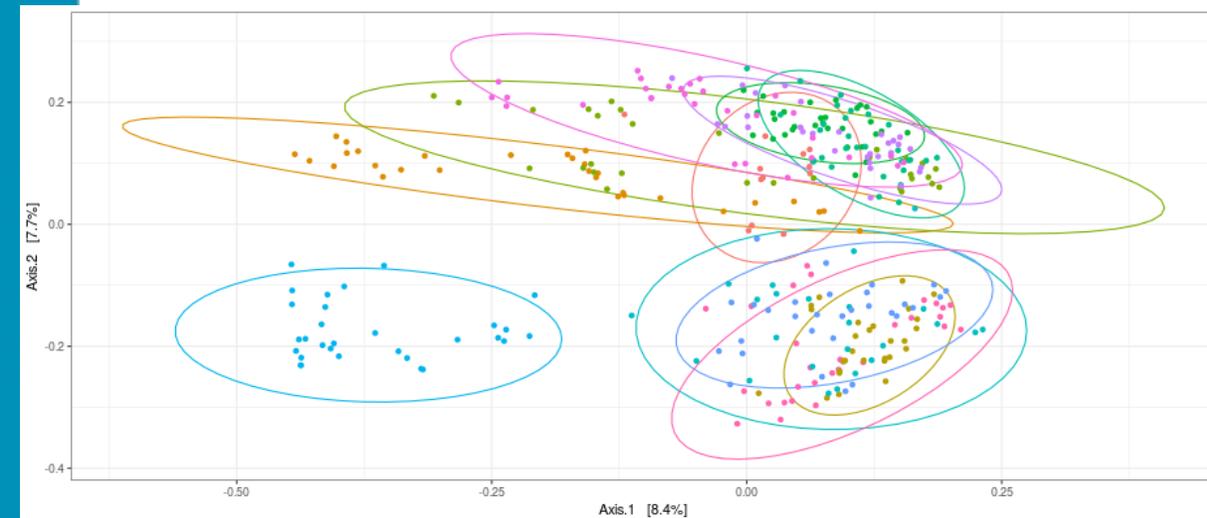


$R^2 = 0,297^{***}$

coeur

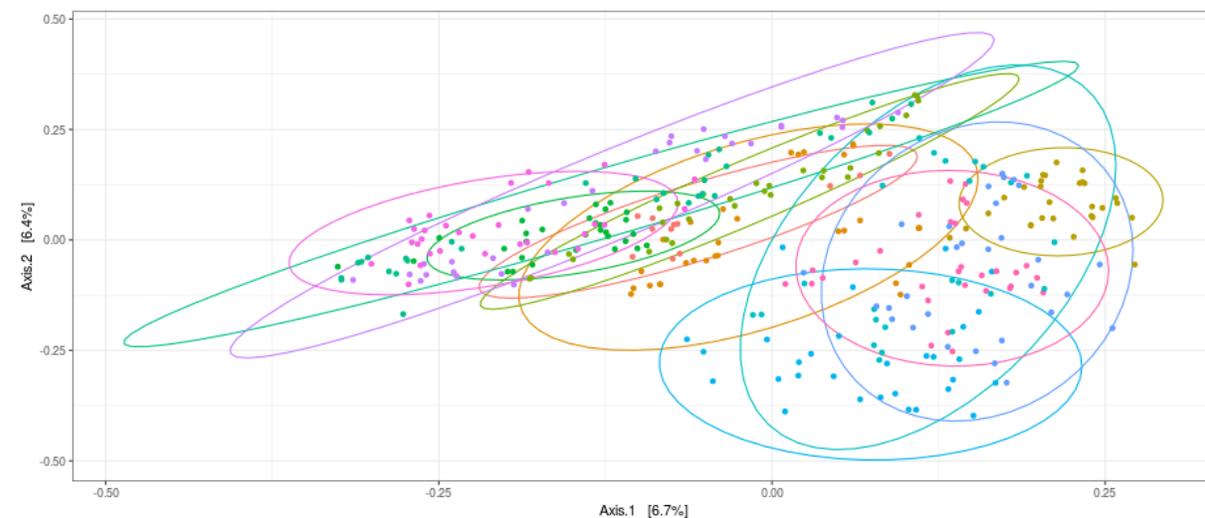
$R^2 = 0,246^{***}$

surface



AOP

- AOP10
- AOP12
- AOP13
- AOP14
- AOP15
- AOP16
- AOP17
- AOP2
- AOP21
- AOP26
- AOP27
- AOP9

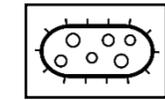
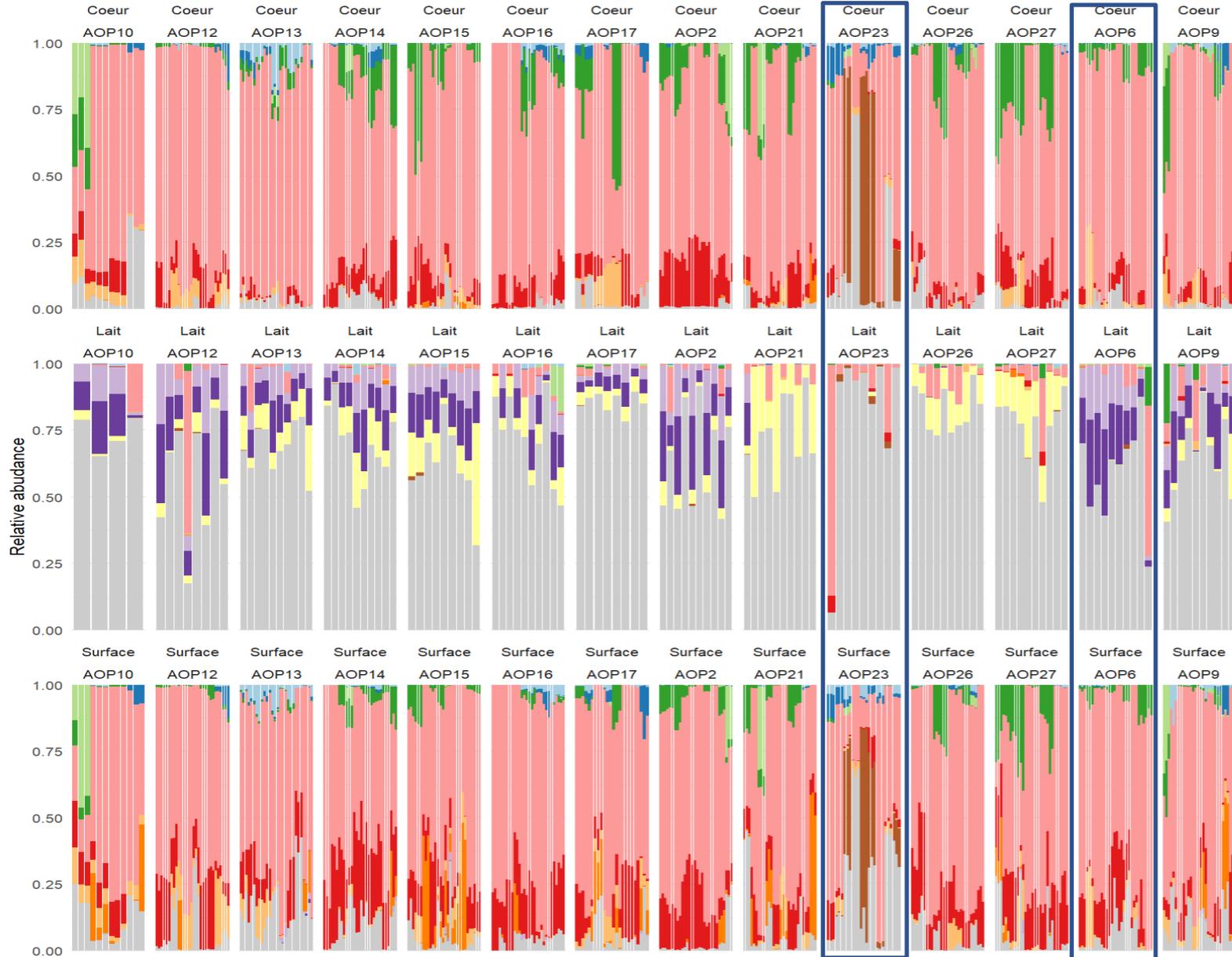
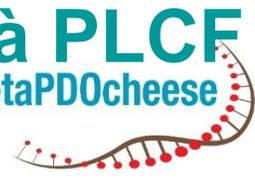
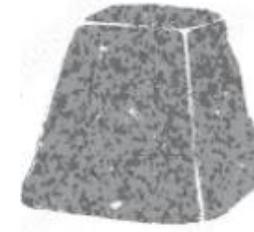


Pour les fromages PLCF au lait de chèvre, l'AOP est un facteur structurant du microbiote bactérien mais aussi fongique

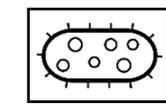
Composition en espèces bactériennes des laits et fromages à PLCF

MétaPDOcheese

Profil d'abondances relatives = proportion des différentes espèces pour chacun des échantillons.
Les espèces non-majoritaires sont regroupées dans la partie grise « other ».



- Species
- Lacticaeibacillus Group casei paracasei zeae chiayiensis
 - Lactiplantibacillus Group plantarum pentosus paraplantarum fabifermentans
 - Lactobacillus Group helveticus crispatus gallinarum
 - Lactococcus Group chungangensis laudensis
 - Lactococcus lactis
 - Leuconostoc Group mesenteroides suionicum
 - Leuconostoc pseudomesenteroides
 - Pseudomonas helleri
 - Serratia Group grimesii liquefaciens proteamaculans
 - Serratia quinivorans
 - Staphylococcus epidermidis
 - Streptococcus thermophilus
 - Unknown
 - Other

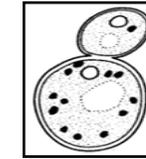
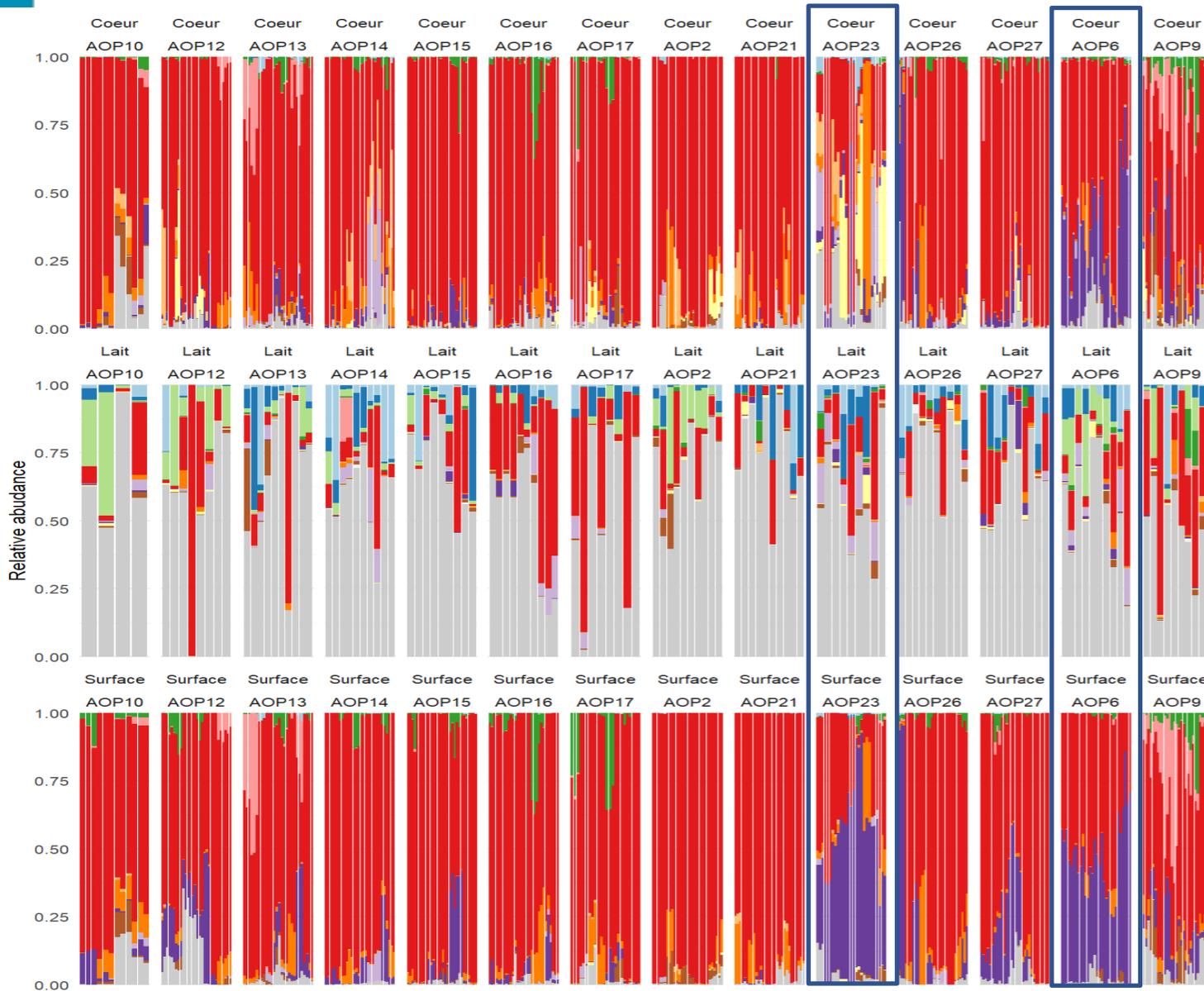
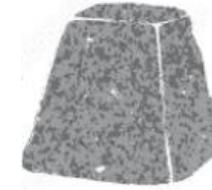


AOP6 et AOP23: fromages PLCF au lait de vache

Composition en espèces fongiques des laits et fromages à PLCF :

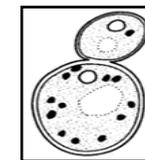
Profil d'abondances relatives = proportion des différentes espèces pour chacun des échantillons.
Les espèces non-majoritaires sont regroupées dans la partie grise « other ».

MétaPDOcheese



Species

- Candida inconspicua
- Candida parapsilosis
- Candida sake
- Debaryomyces hansenii
- Debaryomyces_Group_coudertii_vindobensis_subglobosus_prosopidis_fabryi_psychrosporus_rena
- Geotrichum candidum
- Kazachstania unispora
- Kluyveromyces lactis
- Kluyveromyces marxianus
- Penicillium_Group_camemberti_caseifulvum_fuscoglaucum_commune
- Saccharomyces cerevisiae
- Yarrowia lipolytica
- Unknown
- Other



AOP6 et AOP23: fromages PLCF au lait de vache

• Conclusions – Phase 1

MétaPDOcheese



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

- **Un core microbiome 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



ISME Communications, 2024, 4(1), ycae095

<https://doi.org/10.1093/ismeco/ycae095>

Advance access publication: 11 July 2024

Original Article

Irlinger et al., 2024

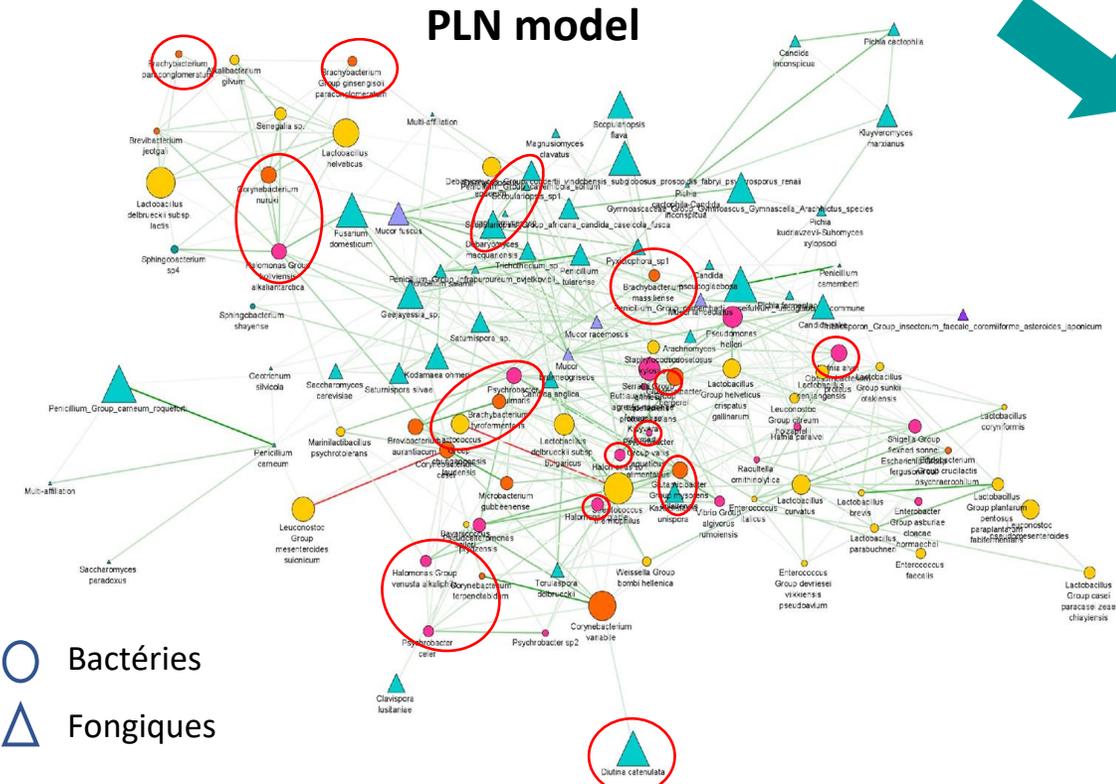
A comprehensive, large-scale analysis of “terroir” cheese and milk microbiota reveals profiles strongly shaped by both geographical and human factors

Françoise Irlinger¹, Mahendra Mariadassou², Eric Dugat-Bony¹, Olivier Rué², Cécile Neuvéglise³, Pierre Renault⁴, Etienne Rifa⁵, Sébastien Theil⁵, Valentin Loux², Corinne Cruaud⁶, Frederick Gavory⁶, Valérie Barbe⁶, Ronan Lasbleiz⁷, Frédéric Gaucheron⁸, Céline Spelle⁷, Céline Delbès^{5,*}

• Perspectives – Phase 2 du projet : Métagénomique de fromages et de laits et Génomique d'isolats d'espèces ciblées



Réseau d'associations microbiennes dans les fromages à partir des données métagénomiques



Taille des nœuds : abondance relative maximum dans 1 échantillon
 Couleur des nœuds : phylum
 Couleur des liens : valeur de la corrélation (rouge pour les associations négatives, vert pour les associations positives)

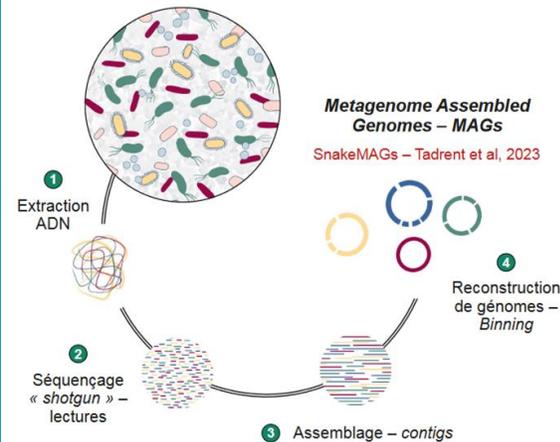
○ Espèces hyperconnectées et centrales, sélectionnées



Métagénomique : 146 métagénomes

* 137 Fromages
115 surfaces et 22 cœurs

* 9 laits



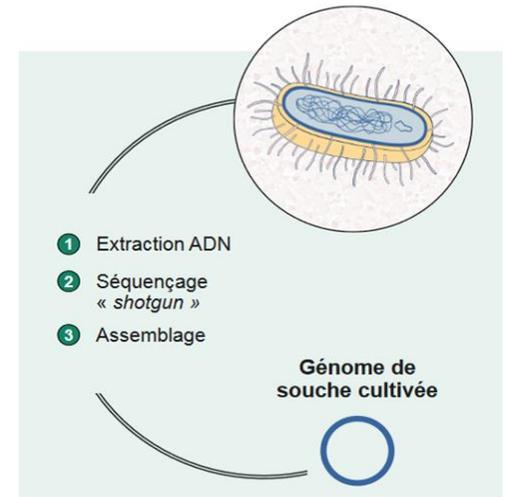
Culturomique et Génomique

* 373 génomes bactériens:

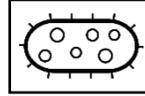
Halomonas, Psychrobacter, Glutamicibacter, Pseudoalteromonas, Corynebacterium, Brachybacterium

* 275 génomes fongiques :

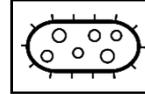
Candida anglica, Kazachstania unisporea, Debaryomyces sp., Diutina catenulata, candida sake



- Complémentarité de la culturomique et de la métagénomique, permettant de **reconstruire des génomes** de bactéries endogènes et d'identifier au moins **16 nouvelles espèces à décrire** (*Vreelandella*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, ...)

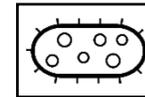
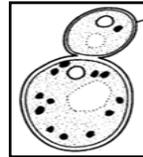


- **Exploration du Potentiel fonctionnel** de ces microbiomes avec la mise à disposition d'un **catalogue de protéines** propre à l'écosystème fromager français et couvrant l'ensemble de la diversité taxonomique.



Projet HaloGene; Gardon et al., papier 1 en cours d'écriture

Ex : acquisition du fer à partir des données métagénomiques et génomiques pour comprendre le rôle de ce processus dans la structuration des communautés microbiennes fromagères



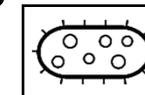
Thèse ABIES_MiCA – Sibylle Tabuteau (2022 -2025)

- **Collection de souches microbiennes avec génomes séquencés** pour comprendre leur capacité à s'adapter et à coloniser l'environnement fromager

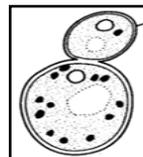
Ex : Halomonas (Vreelandella)

Candida anglica

Kazachstania unispora



Projet HaloGene; Gardon et al., papier 2 en cours d'écriture

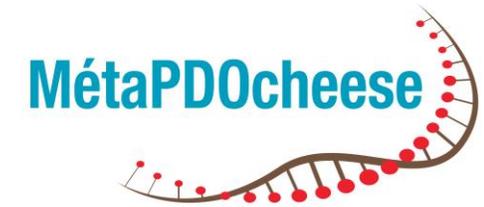


Neuvéglise et al., 2024, Food Microbiology

Neuvéglise et al., papier en cours d'écriture



Remerciements



C. Spelle, R. Lasbleiz et les 44 ODG impliquées



F. Gaucheron



SAYFOOD V. Hervé, H. Gardon, E. Dugat-Bony, J. Gendre, S. Tabuteau, C. Monnet, A.S. Sarthou, L. Arnoult, M. Michottey
UMRF S. Theil, C. Callon, E. Rifa
MICALIS P. Renault
SPO C. Neuvéglise
MAIAGE V. Loux, **M. Mariadassou**, O. Rué



V. Barbe, C. Cruaud, F. Gavory

