

SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	9
1 INTRODUCTION.....	13
2 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	19
2.1 Etude des communautés microbiennes.....	19
2.1.1 Des communautés naturelles aux consortia synthétiques	21
2.1.1.1 Organisation et dynamique des communautés naturelles	21
2.1.1.2 Construction de consortia synthétiques et étude de leur évolution.....	23
2.1.2 Enjeu des interactions métaboliques au sein des écosystèmes microbiens	26
2.1.2.1 Notion de biens publics et stratégies métaboliques	27
2.1.2.2 Rôle des interactions	31
2.1.2.2.1 Dans la construction de consortia synthétiques.....	31
2.1.2.2.2 Dans la structure et la dynamique des communautés complexes.....	31
2.1.3 Modélisation mathématique des dynamiques de population	34
2.1.3.1 Approches de modélisation pour l'étude des interactions métaboliques au sein des communautés naturelles	34
2.1.3.2 Modèles métaboliques en microbiologie alimentaire : la microbiologie prévisionnelle.....	36
2.2 Les écosystèmes laitiers : des modèles d'étude de communautés microbiennes	37
2.2.1 Les communautés naturelles des laits crus et des fromages	38
2.2.2 Des consortia simples et raisonnés : les starters industriels.....	41
2.2.3 L'espèce <i>Lactococcus lactis</i> au sein des écosystèmes laitiers	42
2.3 Identifier, caractériser et quantifier les microorganismes d'intérêt laitiers	45
2.3.1 Les méthodes culture-dépendantes	46
2.3.1.1 Analyse d'isolats par biologie moléculaire.....	48
2.3.2 Les méthodes culture-indépendantes	49
2.3.2.1 Approches moléculaires globales pour l'analyse de communautés complexes.....	50

2.3.2.2	Approches moléculaires ciblées.....	53
2.3.2.2.1	Hybridation de sondes fluorescentes <i>in situ</i>	53
2.3.2.2.2	Amplification PCR de gènes spécifiques d'espèces ou de lignées	53
3	PROBLEMATIQUE.....	56
4	RESULTATS.....	61
4.1	La PCR digitale comme outil de traçage de populations spécifiques au sein des écosystèmes laitiers	61
4.1.1	Résumé de l'article 1	61
4.1.2	Article 1: <i>Precise Populations' Description in Dairy Ecosystems Using Digital Droplet PCR: The Case of L. lactis Group in Starters</i>	62
4.2	Interactions intra-espèces au cours de l'évolution expérimentale d'un consortium de souches de <i>Lactococcus lactis</i>.....	75
4.2.1	Résumé de l'article 2	75
4.2.2	Stratégie de détection souche-spécifique par PCR digitale	76
4.2.3	Article 2: <i>Evolution of a Consortium of Lactococcus lactis Strains in Milk: Intra-species Crosstalk Decoding by a Modelling Approach</i>	77
4.3	Interactions inter-espèces au cours d'une évolution expérimentale	107
4.3.1	Résumé de l'article 3	107
4.3.2	Article 3: <i>Coevolution of an Undefined Starter Made From Raw Milk and a Consortium of Selected Strains of Lactococcus lactis</i>	109
5	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	141
6	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	157
	Liste des figures et tables	175
	Communications orales.....	177
	Communications écrites et posters	177

Liste des abréviations

BL : Bactéries Lactiques

LAB : Lactic Acid Bacteria

BS : Backslopping

AA: Acides aminés/Amino Acids

FAA: Free Amino Acids

COV: Composés Organiques Volatils

VOC : Volatile Organic Compounds

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ddPCR: PCR digitale en gouttelettes

qPCR : PCR quantitative

MLST : MultiLocus Sequence Typing

WGS : Whole Genome Sequencing

WPS : Whole Population Sequencing

OTU : Operational Taxonomic Unit

FROGS : Find Rapidly OTU with Galaxy Solution

1. INTRODUCTION

1 INTRODUCTION

Les microorganismes sont les piliers de la vie sur Terre, organisés en écosystèmes, ils cohabitent entre eux et en présence d'autres organismes des règnes animal et végétal. En effet, ils sont impliqués dans les phénomènes biologiques environnementaux et dans la survie des plantes et des animaux. Mais également, ils sont à l'origine de nombreuses denrées fermentées via le savoir-faire empirique des Hommes. Ils évoluent ainsi depuis des billions d'années, interagissant au sein d'une multitude de matrices diverses et variées. Cette colonisation ubiquitaire est possible grâce au réservoir de diversité que constitue le monde microbien, où variétés génétiques et physiologiques sont à l'origine d'un potentiel métabolique immense (Gibbons & Gilbert, 2015). En tant qu'acteurs au sein d'un écosystème, ils assurent des fonctions essentielles qui doivent être maintenues dans le temps, comme par exemple, participer aux réactions redox essentielles dans les cycles biogéochimiques (Falkowski *et al*, 2008), ou contribuer à la physiologie humaine (Turnbaugh *et al*, 2007). Cependant, les communautés microbiennes sont soumises aux facteurs biotiques et abiotiques environnants qui impactent leur dynamique. Pourtant, les fonctions spécifiques à chaque écosystème sont souvent maintenues, grâce aux phénomènes d'interactions entre les populations et à la division des tâches métaboliques permises par la richesse génétique et phénotypique des espèces cohabitant (Allison & Martiny, 2008; Hillesland & Stahl, 2010). Comprendre l'organisation des réseaux métaboliques au sein des communautés naturelles, ainsi que le comportement nutritionnel de chaque espèce membre, reste un vrai défi avec de nombreuses « boîtes noires ». L'étude de consortia synthétiques constitue ainsi un moyen de contourner certaines limitations dues à la complexité des communautés naturelles, par la culture d'espèces d'intérêt dans des conditions définies et contrôlées en laboratoire (Großkopf & Soyer, 2014). Il s'agit de comprendre les facteurs clés à l'origine des interactions gouvernant la dynamique des populations au cours du temps, et jouant un rôle dans la stabilité et la robustesse du système face aux variations de conditions environnementales. De même, la mise en place d'évolutions expérimentales adaptatives, permettant d'étudier les déterminants physiologiques, métaboliques et génétiques sur des centaines de générations de bactéries, peut s'avérer intéressante pour comprendre l'organisation d'un système microbien constitué de plusieurs espèces, ou souches, au cours du temps (Morris *et al*, 2014; Celiker & Gore, 2014; Barrick & Lenski, 2013).

Les communautés microbiennes des aliments fermentés constituent des écosystèmes d'intérêt accessibles pour étudier les interactions inter- ou intra-spécifiques (Smid & Lacroix, 2013; Wolfe & Dutton, 2015; Canon *et al*, 2020). En effet, la maîtrise des conditions de cultures au

sein des matrices alimentaires permet de mesurer des paramètres clés étant liés aux fonctionnalités de l'écosystème, comme par exemple la production d'acide lactique ou d'arômes, ou encore le relargage d'acides aminés par les bactéries lactiques d'intérêt laitier. Ces fonctionnalités étant liées à la dynamique des populations au cours du temps, le développement d'outils d'analyse pour la détection, l'identification ou la quantification des microorganismes cohabitant au sein de l'écosystème s'avère utile. Il peut s'agir de décrire la composition d'une communauté en identifiant les espèces majoritaires, grâce à des approches moléculaires ciblant des gènes ubiquitaires et hautement conservés, comme la méthode de metabarcoding de l'ADNr 16S. Ou encore, de discriminer plus finement des populations génétiquement proches, comme des souches appartenant à une même espèce, grâce à des techniques sensibles et résolutes. Ainsi, le suivi d'espèces ou de populations d'intérêt au sein d'une matrice au cours du temps, associé à l'analyse des produits issus de leur métabolisme, donne des informations sur les interactions trophiques au sein de l'écosystème. Dans le but de mieux comprendre ces interactions métaboliques au sein d'écosystèmes d'intérêt technologique, et en vue de mieux maîtriser les procédés de fermentation, la construction de modèles mathématiques peut constituer un outil judicieux (Teusink & Smid, 2006). Basés sur la croissance microbienne (taux de croissance, rendement en biomasse et affinité au substrat), elle-même dépendante de la disponibilité des ressources extracellulaires et de l'allocation de ces ressources, ils permettent d'établir des hypothèses biologiques sur les stratégies métaboliques adoptées au sein d'un écosystème (Bachmann *et al*, 2016).

Cette thèse s'inscrit dans la compréhension des mécanismes modelant la mise en place et l'évolution des écosystèmes laitiers. Elle est le fruit d'une collaboration entre l'équipe « Bacterial Adaptation, Diversity and Engineering » de Toulouse Biotechnology Institute et l'équipe de recherche « Agromolécules et Agroalimentaire » de l'Ecole d'Ingénieur de Purpan. Plus précisément, cette thèse vise à étudier les interactions inter- et intra-espèces au cours de l'évolution expérimentale d'un consortium de souches de *Lactococcus lactis* en lait, additionné ou non d'une communauté naturelle issue d'un lait cru fermenté. S'il existe de nombreux travaux sur les relations inter-espèces, très peu d'études permettent de décrypter le dialogue pouvant se mettre en place entre souches d'une même espèce. Une des principales limitations étant le manque de résolution des techniques moléculaires, permettant difficilement de distinguer des souches proches génétiquement au sein d'un écosystème.

Les résultats de ces travaux de thèse sont présentés sous la forme de trois articles. Le premier présente la mise au point d'un outil de traçage population-spécifique en PCR digitale, et son

utilisation pour décrire la dynamique des espèces *lactis* et *cremoris* de *Lactococcus* ainsi que le biovar diacetylactis au sein d'un starter commercial. Cette méthodologie a été utilisée pour suivre spécifiquement des souches de *Lactococcus lactis* associées en consortium au cours d'une évolution expérimentale. Le second article, présente la modélisation des interactions métaboliques entre souches de *L. lactis* au sein de ce consortium, lors de son évolution en lait stérile. Enfin, le dernier article, met en lumière les interactions s'établissant entre les souches du consortium et la communauté microbienne naturelle issue d'un lait cru. Elle rend compte d'une coévolution des deux communautés, mise en évidence par le suivi de caractéristiques technologiques d'intérêt telles que les capacités d'acidification, et d'un dialogue inter-espèces s'exprimant par la production d'une palette aromatique différente de celle produite par chaque communauté individuellement.

2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Etude des communautés microbiennes

Dans la nature, chaque microorganisme se trouve au sein d'un écosystème dans lequel il est en interaction avec des facteurs biotiques (c-à-d. d'autres cellules procaryotes ou eucaryotes) et abiotiques (c-à-d. les conditions environnementales) propres à cet écosystème. Grâce aux considérables avancées techniques des dernières décennies, notamment en biologie moléculaire, l'écologie microbienne devient de plus en plus explorée (Gibbons & Gilbert, 2015). En effet, il s'agit d'étudier les microorganismes en tant qu'entités au sein de leur écosystème, c'est-à-dire en considérant l'effet des facteurs environnants sur leur dynamique ainsi que sur les fonctions exercées (van Gestel & Kolter, 2019). Différentes approches ont été développées pour étudier les écosystèmes microbiens. La première, appelée approche « top-down », consiste à déconstruire une communauté complexe naturelle, afin d'explorer la composition et la structure des populations dans le temps et l'espace. Cette démarche permet d'émettre des hypothèses sur les scénarii écologiques, ou encore sur les capacités fonctionnelles des microorganismes membres, à partir de données d'ensemble (par ex. données « omiques ») (Fierer *et al*, 2014). La deuxième, désignée d'approche « bottom-up », consiste à simplifier les communautés d'intérêt grâce à la construction de consortia synthétiques permettant d'étudier de façon indépendante les différents facteurs influençant l'organisation et les fonctionnalités de l'écosystème (Figure 1). Par l'association d'un nombre restreint d'espèces, ou souches, identifiées, la dynamique de chaque membre au sein du consortium peut être suivie et l'identification des interactions métaboliques est rendue facilitée (De Roy *et al*, 2014). Ces deux approches, donnant accès à différents types et niveaux d'informations, constituent des stratégies complémentaires pour l'étude des écosystèmes microbiens.

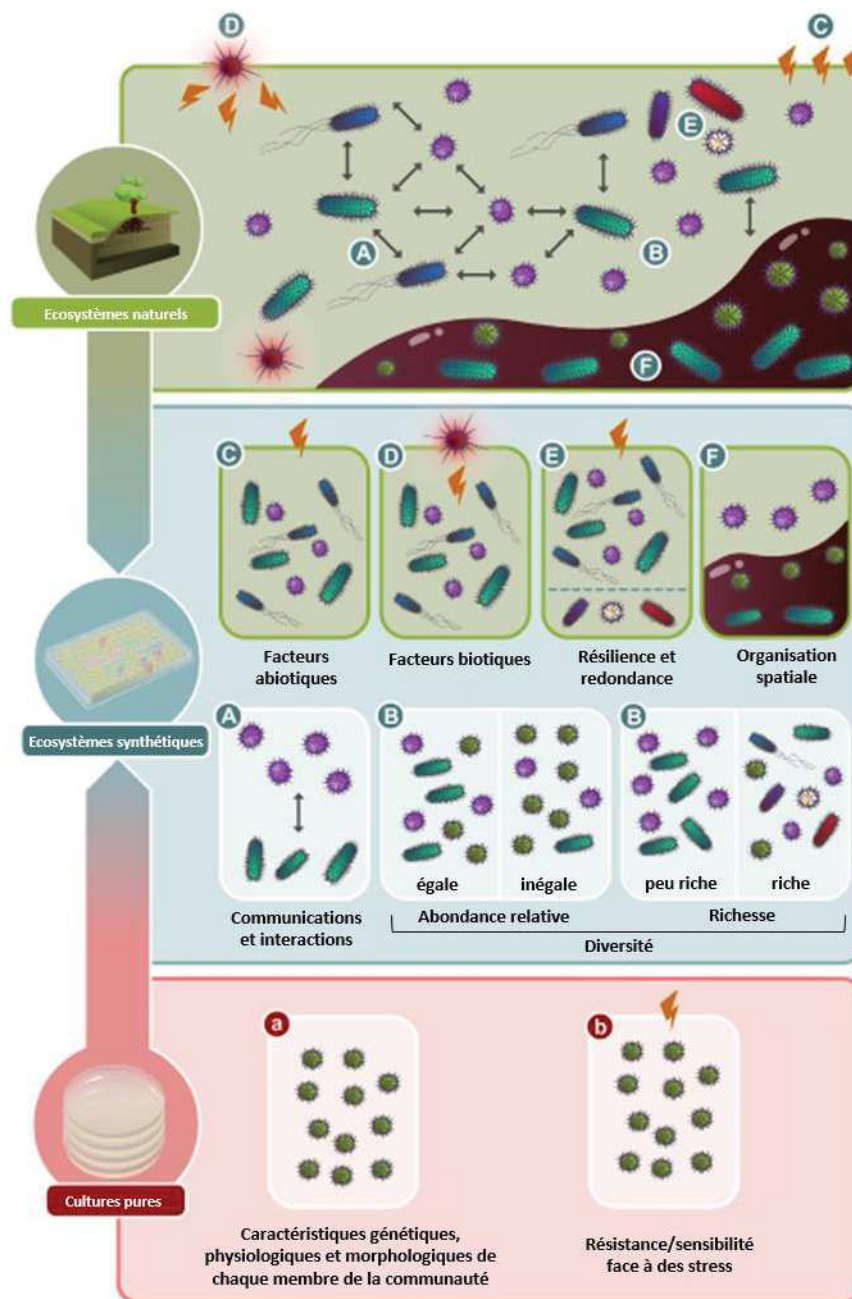


Figure 1. Les écosystèmes synthétiques, des modèles simplifiés pour l'étude des communautés microbiennes complexes naturelles. De nombreux facteurs influencent l'organisation et les fonctionnalités des communautés naturelles : (A) les interactions métaboliques et mécanismes de communication, (B) la diversité (abondance et richesse), (C) les facteurs abiotiques environnementaux, (D) les facteurs biotiques (par ex. invasion et prédation), (E) les mécanismes de résilience et redondance, (F) l'organisation spatiale. L'étude des isolats après une étape de culture permet (a) de caractériser les microorganismes viables et cultivables et (b) d'étudier leur sensibilité/résistance face à des stress. D'après (De Roy *et al*, 2014).

2.1.1 Des communautés naturelles aux consortia synthétiques

2.1.1.1 Organisation et dynamique des communautés naturelles

Les communautés microbiennes s'assemblent dans le temps et l'espace selon quatre grands processus écologiques qui sont : 1) la diversification (variations génétiques conduisant à de nouvelles espèces), 2) la dispersion (mouvements de microorganismes dans l'espace), 3) la sélection (changements de structure dans les populations, étant fonction de leur fitness dans les conditions de l'écosystème) et 4) la dérive (modifications aléatoires de l'abondance relative des espèces au cours du temps) (Nemergut *et al*, 2013). Ces phénomènes conduisent à des communautés dynamiques, dont la biodiversité varie qualitativement et quantitativement. Deux principaux descripteurs représentent la biodiversité locale d'un écosystème (c-à-d. biodiversité alpha). La richesse spécifique, donnant la composition en nombre d'espèces présentes au sein de l'écosystème, et l'abondance relative de ces espèces, donnant la structure de la communauté. La diversité entre communautés (c-à-d. comparaison entre deux écosystèmes) est représentée par la biodiversité bêta. A l'échelle d'une communauté, en cas de perturbations biotiques ou abiotiques, l'évolution de la biodiversité peut être suivie dans le temps par l'étude de la dynamique des populations.

En effet, face à des changements environnants, la biodiversité d'une communauté peut 1) ne pas être affectée (résistance), 2) être altérée mais revenir à son état d'origine (résilience), ou 3) être altérée et rester en l'état. Dans ce dernier cas, la communauté peut assurer les mêmes fonctions que la communauté originelle (redondance fonctionnelle) ou bien montrer des fonctionnalités différentes (Allison & Martiny, 2008). De tels phénomènes ont déjà été décrits au sein d'écosystèmes alimentaires comme les levains traditionnels (Minervini *et al*, 2014; Vogelmann & Hertel, 2011). Caractérisés par des communautés relativement complexes, les levains montrent une certaine stabilité microbienne en terme de composition (majoritairement constitués d'espèces de bactéries lactiques et de levures), et de fonctionnalités. Cependant, des modifications de composition et de structure au niveau des souches ou des espèces peuvent survenir au cours des repiquages successifs caractérisant le processus de propagation usuellement appliqué, appelé backslopping. En effet, la variabilité de la composition nutritionnelle de la matrice (farine) et l'apport de nouveaux microorganismes (dû à une matrice non stérile et à l'ambiance de la boulangerie) durant la propagation, impactent la biodiversité de l'écosystème, pouvant induire des phénomènes de succession écologique, laissant parfois des espèces sous-dominantes devenir majoritaires. A l'échelle des souches, la robustesse propre joue un rôle important dans l'adaptation face à des perturbations environnantes (Siragusa *et al*,

2009; Minervini *et al*, 2010). En effet, la diversité inter-souche existe au niveau métabolique, ainsi, les capacités d'utilisation des sources d'énergie (c-à-d. type et quantité de substrat), de résistance à des stress et de synthèse de métabolites fonctionnels (par ex. composés à activité antimicrobienne, tels que les bactériocines), permettront à certaines souches d'émerger, au détriment des autres souches moins favorisées par les conditions environnementales.

Bien que de telles dynamiques de populations puissent ne pas affecter le maintien de l'écosystème en lui-même, les phénomènes de succession de souches ou d'espèces durant la propagation des levains peut induire des variations de performances technologiques, impactant de ce fait les caractéristiques organoleptiques du produit fermenté. Cependant, le degré de redondance fonctionnelle peut impliquer un découplage entre la structure d'une communauté et ses fonctionnalités (Nemergut *et al*, 2013). Ainsi, décrire la composition microbienne ne permettra pas toujours de prédire les fonctions assurées, dans la mesure où de nombreuses combinaisons taxonomiques peuvent montrer une convergence fonctionnelle (Burke *et al*, 2011). Il apparaît ainsi important de considérer une communauté dans son ensemble plutôt qu'à l'échelle des espèces individuellement, la résultante fonctionnelle étant souvent régie par les interactions métaboliques pouvant se mettre en place. La prédiction des capacités fonctionnelles peut être abordée par des approches de métagénomique « shotgun » visant à s'intéresser aux traits caractérisant la communauté indépendamment de l'identité des espèces membres (Fierer *et al*, 2014). Il s'agit de déterminer l'abondance relative ou la présence/absence de gènes, à l'échelle de la communauté et non des espèces individuellement, afin d'en déduire certains traits prédictifs de capacités fonctionnelles. La présence de gènes d'enzymes telles que la catalase ou la peroxydase peut par exemple servir à prédire une tolérance de la communauté face au stress osmotique (Zhang *et al*, 2013; Fierer *et al*, 2014). Cependant, ce type d'approche reste limitée par certains paramètres liés aux méthodes moléculaires reposant sur l'annotation de gènes et la détection de la population totale (c-à-d. cellules vivantes et mortes), ou encore, liés à l'expression de certains traits pouvant varier considérablement en fonction des conditions environnementales. L'intérêt majeur de la stratégie réside alors dans l'émission d'hypothèses sur les potentiels réseaux et interactions métaboliques pouvant se mettre en place, en considérant le pool de diversité génétique de la communauté entière. L'étude des métabolites produits par la communauté servirait ainsi à vérifier ou écarter certaines hypothèses sur les réseaux métaboliques inférés.

2.1.1.2 Construction de consortia synthétiques et étude de leur évolution

Etudier les communautés dans leur ensemble peut également mener à la construction de consortia synthétiques simplifiés pour mieux décrypter leur fonctionnement. Lorsqu'on s'intéresse aux écosystèmes alimentaires, comprendre la structuration des communautés ainsi que leurs fonctionnalités est particulièrement important lors du processus de fermentation, pour garantir son bon déroulement ainsi que les qualités sanitaires et organoleptiques des produits fermentés. Wolfe et Dutton décrivent les produits fermentés comme de bons modèles pour l'étude des mécanismes impliqués dans l'organisation et la dynamique des communautés microbiennes (Wolfe & Dutton, 2015). Par exemple, une approche globale d'établissement d'un catalogue de la diversité microbienne a été utilisée pour mettre en évidence les membres majoritaires retrouvés au sein des croûtes de fromage (Wolfe *et al*, 2014). Le séquençage d'une multitude de communautés microbiennes issues de ce type d'écosystème, provenant de croûtes de fromage de dix pays différents a permis d'étudier la diversité structurelle et fonctionnelle de ces communautés naturelles. Ces informations ont notamment été utilisées pour reconstruire des consortia synthétiques alimentaires en laboratoire. Un représentant de chacun des 24 genres dominants identifiés a pu être cultivé, leur assemblage a servi à reconstituer des communautés *in vitro*, afin de préciser ou confirmer les facteurs impactant la dynamique microbienne au sein de la communauté naturelle (c-à-d. environnement abiotique, interactions champignons-bactéries) (Wolfe *et al*, 2014). Le phénomène dynamique de succession microbienne au cours de l'affinage a également été reproduit *in vitro* (Wolfe *et al*, 2014). Cette approche de simplification des communautés, où l'écosystème est reconstruit de façon raisonné (c-à-d. assemblage de quelques espèces définies) au sein d'un environnement bien caractérisé et contrôlé, décrite précédemment comme approche « bottom-up » (De Roy *et al*, 2014), peut donc être judicieusement mise en œuvre en aval d'une approche d'ensemble (approche « top-down »).

Ainsi, outre l'intérêt fondamental d'étudier les phénomènes régissant l'organisation, les fonctions et l'évolution des écosystèmes microbiens, les approches d'écologie microbienne aident à comprendre le fonctionnement des communautés d'intérêt technologique telles que celles des denrées alimentaires fermentées. D'autre part, ces écosystèmes permettent souvent d'étudier les phénomènes de diversification et domestication, notamment par la mise en évidence de transferts horizontaux de gènes entre les microorganismes en coévolution sur de longues échelles de temps (Wolfe & Dutton, 2015). D'autres modifications génétiques impactent l'évolution des populations en adaptation à une niche écologique (c-à-d.

spécialisation), principalement la pseudogénisation et la perte de gènes devenus inutiles après domestication, ou à l'inverse, la duplication de gènes favorisant la croissance au sein de l'écosystème (Gibbons & Rinker, 2015). Ces modifications sont liées au passage des microorganismes issus de communautés naturelles et complexes vers des matrices alimentaires moins variables. Ces phénomènes adaptatifs peuvent être étudiés en laboratoire grâce à la mise en place d'évolutions expérimentales (Bachmann *et al*, 2012). Les expériences dites d'accumulation de mutations constituent un premier type d'évolution expérimentale permettant la propagation de microorganismes (Figure 2A). Le repiquage de colonies isolées, sélectionnées de façon aléatoire, sur milieu solide impose une réduction de la taille de la population, induisant une baisse de la diversité génétique et la fixation de mutations arbitraires indépendamment de leur effet sur la fitness. Cette pratique est notamment utile pour estimer un taux de mutations spontanées sur un nombre de générations donné. Les évolutions expérimentales adaptatives diffèrent de cette approche par leur dynamique évolutive différente au niveau génétique (Barrick & Lenski, 2013). Réalisées par propagation des populations microbiennes en culture continue (Figure 2B) ou par transfert en série (Figure 2C), elles conduisent au maintien de la diversité génétique à travers les générations (Barrick & Lenski, 2013). Les populations évoluées diffèrent des populations ancestrales par l'accumulation de modifications génétiques avantageuses (c-à-d. ayant un impact positif sur leur fitness), et dirigent ainsi la dynamique au cours du temps (Barrick & Lenski, 2013). La pratique du transfert en série, où des populations de microorganismes sont propagées par repiquages successifs au cours du temps, avec une fraction de la population étant périodiquement transférée dans un milieu neuf (Figure 2C), est retrouvée dans le processus de backslopping utilisé comme procédé technologique dans certaines fermentations alimentaires.

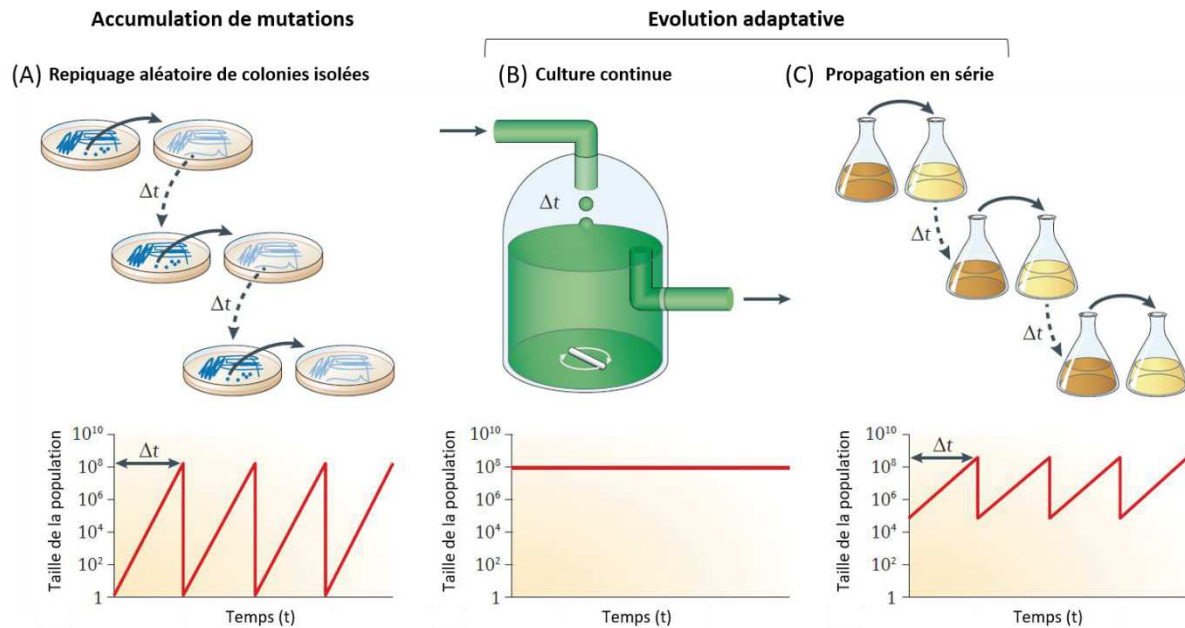


Figure 2. Les trois principales méthodes de propagation utilisées lors d'évolutions expérimentales. Les changements de taille de la population propagée au cours du temps sont représentés en dessous de chaque méthode de propagation correspondante. D'après (Barrick & Lenski, 2013).

En biotechnologies, il s'agit principalement d'étudier des évolutions génétiques conduisant à l'émergence et au maintien de populations améliorées exerçant des fonctions d'intérêt. C'est-à-dire, à la sélection de populations évoluées adaptées aux conditions de propagation grâce à la conservation de mutations impactant positivement leur fitness, et induisant un phénotype amélioré pour les fonctionnalités technologiques étudiées. L'évolution adaptative en laboratoire peut ainsi constituer une stratégie pour l'amélioration de consortia synthétiques (Sgobba & Wendisch, 2019; Liu *et al*, 2019). Liu et collaborateurs ont récemment montré une amélioration des capacités de biolixiviation d'un consortium de trois espèces, ayant permis d'extraire de 26 à 55% de fer en plus comparativement au consortium non évolué (Liu *et al*, 2019). L'évolution adaptative est souvent mise en place pour étudier l'évolution d'écosystèmes simples à une ou deux espèces. Cependant, Celiker et Gore ont montré son intérêt pour l'étude de communautés plus complexes. Afin de mieux comprendre l'évolution de la structure d'une communauté à six espèces (c-à-d. l'abondance relative de chaque espèce), 96 réplicats ont évolués sur environ 400 générations (Celiker & Gore, 2014). Il s'avère que la structure finale des réplicats a permis de distinguer quatre clusters, tous différents de la structure de la communauté ancestrale, avec, pour chaque cluster, une espèce avantagée retrouvée en abondance. Ce résultat montre une adaptation évolutive non déterministe mais pas aléatoire pour autant puisque dirigée, pour

chaque cluster, par une espèce majoritaire et commune entre réplicats. Cependant, l'évolution de la structure des communautés complexes reste moins prédictible comparée à l'étude d'espèces uniques. En effet, les écosystèmes multi-espèces montrent une plus grande biodiversité, impliquant de multiples interactions inter-espèces pouvant conduire à différents scénarii évolutifs (Turcotte *et al*, 2012).

2.1.2 Enjeu des interactions métaboliques au sein des écosystèmes microbiens

Au sein des écosystèmes microbiens, différents types d'interactions métaboliques peuvent s'établir entre les membres de la communauté. Ces interactions participent à moduler la dynamique des populations. Pour un écosystème microbien à deux membres, six types d'interactions métaboliques sont décrits dans la littérature (Figure 3) (Großkopf & Soyer, 2014). Chaque type d'interaction écologique (0/+, -/-, -/+, 0/0, +/+, 0/-) peut être expliqué par un schéma métabolique décrivant la structure du réseau au sein duquel les deux membres microbiens s'organisent. Il s'agit de représenter chaque microorganisme par rapport à l'utilisation d'un substrat et à la production de métabolites, et de prendre en compte le rôle de certains métabolites (par ex. rôle de substrat ou effet inhibiteur).

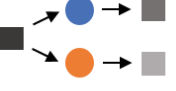
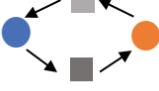
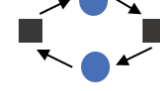
Effet	Type d'interaction	
	Écologique	Métabolique
0/+	Commensalisme 	Chaîne alimentaire 
-/-	Compétition 	Substrat commun 
-/+	Prédation 	Chaîne alimentaire avec inhibition par le produit 
0/0	Pas d'interaction 	Pas de métabolites en commun 
+/+	Interactions double positives 	Syntrophie 
		Mutualisme  Coopération 
0/-	Amensalisme 	Inhibition par le produit 

Figure 3. Les six types d'interaction en fonction de leur effet sur la croissance microbienne. Chaque type d'interaction écologique entre un microorganisme de phénotype A (rond bleu) et un microorganisme de phénotype B (rond orange) est représenté par un schéma illustrant les effets respectifs (stimulation ou inhibition, ou pas d'effet) de chacun des deux membres de l'écosystème sur l'autre. Chaque schéma écologique est traduit en interaction métabolique, illustrant le comportement nutritionnel des deux microorganismes vis-à-vis de leur substrat ainsi que l'effet des métabolites produits. Les substrats et produits sont représentés par des carrés. D'après (Großkopf & Soyer, 2014) et (Canon *et al*, 2020).

2.1.2.1 Notion de biens publics et stratégies métaboliques

Au sein d'un écosystème, les ressources présentes dans le milieu sont considérées comme biens publics à disposition des microorganismes environnants. Selon leurs capacités métaboliques, ils sont capables d'utiliser certains substrats pour leur croissance, ceci conditionnant l'installation de différentes interactions. Par exemple, au sein d'un écosystème à deux membres, l'utilisation d'un même substrat comme ressource unique implique une compétition pour ce

substrat (Figure 3). Il s'avère que les stratégies métaboliques individuelles correspondent à des traits transmissibles de génération en génération tels que la capacité d'utilisation de certaines voies métaboliques ou d'expression de certaines enzymes (Cavaliere *et al*, 2017). Selon la théorie évolutive du jeu, désignée d'« evolutionary game theory » dans la littérature, le succès des stratégies métaboliques individuelles dépend des stratégies adoptées par les autres cellules présentes dans l'écosystème (Cavaliere *et al*, 2017; Frey, 2010). Ainsi, cette théorie prédit la sélection des stratégies individuelles les plus avantageuses au fil des générations et ainsi, l'augmentation de la fréquence de ces populations au sein de l'écosystème.

En cas de limitation des ressources, des compromis métaboliques à l'échelle de la cellule se mettent en place afin de résoudre les problèmes d'allocation de ces ressources en intracellulaire (Bachmann *et al*, 2016). En dépend la synthèse de nouveaux composés cellulaires comme les protéines. Il existe ainsi un dilemme entre privilégier le taux de croissance, avantageux à l'échelle de la cellule individuelle en compétition, ou bien le rendement en biomasse, lorsque les ressources deviennent limitantes à l'échelle d'une population et que la croissance est ralentie. Ainsi, la propagation en série d'une culture microbienne en suspension a conduit à la sélection de variants à croissance rapide (c-à-d. stratégie du taux de croissance) (Figure 4A) (Bachmann *et al*, 2013). A l'inverse, une privatisation des ressources (c-à-d. élimination de la compétition entre cellules individuelles), par création d'un environnement spatial structuré (c-à-d. emprisonnement des cellules individuellement dans des gouttelettes d'eau en émulsion dans de l'huile, Figure 4B), a permis un enrichissement en variants lents mais efficaces pour la production de biomasse (Bachmann *et al*, 2013).

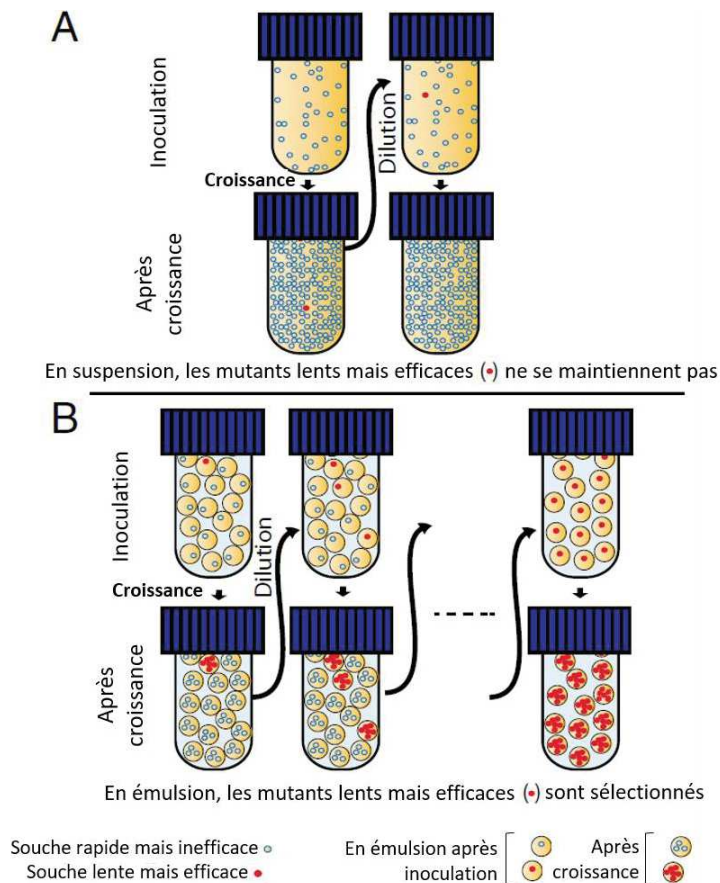


Figure 4. Propagation en série (A) de cellules microbiennes en suspension ou (B) de cellules uniques emprisonnées en émulsion. En suspension, les variants à croissance rapide sont sélectionnés. En émulsion, les mutants lents mais efficaces pour la production de biomasse atteignent de plus grandes densités cellulaires par rapport aux cellules sauvages et sont sélectionnés au cours des repiquages successifs (rupture de l'émulsion après croissance, dilution des cellules puis formation d'une nouvelle émulsion). D'après (Bachmann *et al*, 2013).

La notion de biens publics peut également donner lieu à des interactions de type coopération comme le cross-feeding (Fritts *et al*, 2021), où des métabolites excrétés par une population peuvent être utilisés par d'autres populations de microorganismes. Il s'avère que ces interactions sont souvent rencontrées dans les écosystèmes microbiens d'intérêt technologique (par ex. fermentations alimentaires, applications environnementales), et améliorent leur robustesse face aux stress environnementaux souvent rencontrés au cours des procédés technologiques (Cavaliere *et al*, 2017; Canon *et al*, 2020). Cependant, l'exploitation « gratuite » de la ressource, initialement produite pour les propres besoins de croissance de la population coopérative, par les populations avoisinantes peut progressivement impacter négativement la fitness des cellules productrices. En effet, ces dernières investissent dans le coût métabolique associé à la production de la ressource, contrairement aux cellules l'exploitant gratuitement

appelées cellules tricheuses (Cavaliere *et al*, 2017). Les traits coopératifs sont souvent liés à l'expression d'enzymes de dégradation extracellulaires, dont les gènes sont communément portés par des éléments génétiques mobiles (par ex. transposons, plasmides). Les phénomènes de transferts horizontaux favorisent ainsi la transmission de traits coopératifs, et donc les interactions de coopération au sein d'une communauté (Cavaliere *et al*, 2017). Chez *Lactococcus lactis*, espèce multi-auxotrophe, la capacité à croître en lait dépend notamment de l'expression d'une protéase de paroi (PrtP) dégradant les protéines (majoritairement les caséines) en peptides internalisables et hydrolysables (c-à-d. source d'acides aminés). Le gène *prtP*, la plupart du temps plasmidique, peut se perdre facilement au cours des générations puisqu'une partie des cellules prtP⁺ accomplit la fonction de protéolyse, mettant à disposition des acides aminés dans le milieu (Bachmann *et al*, 2011). Le maintien de ce plasmide représente de ce fait un fardeau métabolique pour les cellules prtP⁺ (Ainsworth *et al*, 2014) et une co-culture prolongée des deux types de variants conduit progressivement à une invasion par les cellules prtP⁻ favorisées par les conditions (Smid & Lacroix, 2013). Cependant, des approches de modélisation mathématique de la dynamique des populations ont montré la non extinction des cellules prtP⁺ au fil des générations. La persistance du trait protéolytique est observée à faible densité cellulaire, condition privilégiant la capture des acides aminés par les cellules productrices prtP⁺, celles-ci disposant des acides aminés en quantité plus abondante autour d'elles (Bachmann *et al*, 2011). Les acides aminés agissent notamment comme des molécules signal sur les mécanismes de régulation intracellulaires, en particulier via le répresseur pléiotropique CodY, senseur du pool intracellulaire d'acides aminés à chaînes ramifiées tels que l'isoleucine, la leucine et la valine (Guédon *et al*, 2001b). Ces mécanismes régulateurs doivent ainsi intervenir dans les stratégies métaboliques individuelles adoptées en fonction des conditions environnantes.

En écologie microbienne, l'hypothèse de la « reine noire » (« black queen hypothesis » dans la littérature) (Estrela *et al*, 2016; Morris *et al*, 2014) prédit l'invasion des microorganismes dépendant d'autres membres de la communauté pour une fonction vitale, mais pas l'extinction des populations à l'origine du bien public mutualisé, malgré le coût métabolique associé. La fonction de protéolyse, indispensable au maintien des populations prtP⁺ productrices de biens publics vitaux et des populations tricheuses et bénéficiaires prtP⁻, est ainsi considérée comme une fonction « reine noire ». Celle-ci devant toujours rester dans le jeu afin que les « tricheurs » ne meurent pas. On distingue la dépendance obligatoire, lorsqu'un microorganisme dépend totalement du microorganisme exerçant la (les) fonction(s) vitale(s), et l'interdépendance mutuelle, lorsque les deux membres dépendent l'un de l'autre, chacun exerçant une fonction

vitale (Estrela *et al*, 2016). Ces interactions et dépendances métaboliques semblent ainsi intervenir au niveau intra-espèce, via le partage de biens publics issus de fonctions « reine noire » permettant souvent la coexistence, au cours des générations, de souches proches, malgré leur compétition pour un même substrat (Morris *et al*, 2014).

2.1.2.2 Rôle des interactions

2.1.2.2.1 Dans la construction de consortia synthétiques

En biotechnologie, la création de consortia synthétiques d'intérêt peut judicieusement reposer sur la mise en place d'interactions nutritionnelles (Zelezniak *et al*, 2015; Canon *et al*, 2020). La diversité métabolique des espèces ou souches sélectionnées, ainsi que la maîtrise des conditions environnementales et spatiales, peuvent permettre d'orienter les interactions vers une amélioration du rendement métabolique de la fonctionnalité visée (Ben Said & Or, 2017). L'utilisation de consortia synthétiques pour la production de molécules d'intérêt, se base souvent sur le rôle clé des interactions de type coopération ou commensalisme (Sgobba & Wendisch, 2019). La partition de voies métaboliques complexes, en étapes successivement réalisées par plusieurs souches ou espèces microbiennes, est une stratégie judicieusement adoptée car elle permet de diminuer le coût métabolique endossé par un seul microorganisme lorsque la tâche est assurée individuellement.

Ces approches d'ingénierie métabolique, et de simplification des écosystèmes, s'avèrent aussi utiles pour explorer et prédire les interactions modelant la structure et la dynamique au sein des communautés microbiennes naturelles (Freilich *et al*, 2011; Ghoul & Mitri, 2016; Kong *et al*, 2018). Cependant, ces écosystèmes simplifiés ne prennent pas en compte la réalité des interactions s'installant au sein des communautés naturelles, où de nombreuses espèces peuvent être en présence et impacter le scénario des interactions (Wolfe *et al*, 2014). De plus, la fluctuation des conditions environnementales biotiques et abiotiques rencontrée dans la nature peut conduire à une variabilité des interactions imprévisible et difficilement reproductible en conditions contrôlées (Liu *et al*, 2020).

2.1.2.2.2 Dans la structure et la dynamique des communautés complexes

Les écosystèmes alimentaires constituent souvent de bons modèles d'étude des interactions au sein de communautés plus ou moins complexes telles que les croûtes de fromage et les fromages (Smid & Lacroix, 2013; Sieuwerts *et al*, 2008; Gobbetti *et al*, 2018). En particulier, lors de la

fabrication d'un yaourt, la protocoopération entre les deux acteurs *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* est un bon exemple de coexistence mutualiste (Courtin & Rul, 2004). Les deux espèces impactent positivement leurs croissances réciproques, *Lb. bulgaricus* par ses capacités protéolytiques, et *S. thermophilus* par la production de métabolites stimulateurs (c-à-d. acides pyruvique et formique, CO₂). La meilleure capacité de dégradation du lactose de *S. thermophilus* lui permet de démarrer sa croissance avant *Lb. bulgaricus* grâce à la consommation du glucose issu de cette dégradation. Le galactose n'étant pas utilisé par *S. thermophilus*, son relargage permettra à *Lb. bulgaricus* de métaboliser celui-ci. Leur association est notamment d'intérêt pour la production d'arômes, en effet, la synthèse de diméthyltrisulfide est améliorée en co-culture comparativement aux monocultures (Smid & Lacroix, 2013). De même, les travaux de Wolfe et collaborateurs, portant sur les communautés issues des croûtes de fromage, ont également permis d'étudier les interactions au sein de cet écosystème. L'approche de reconstruction de communautés *in vitro* a mis en évidence des interactions champignons-bactéries, où la désacidification du milieu par des levures et champignons filamenteux bénéficie à certains genres de bactéries. Des interactions négatives (c-à-d. inhibant la croissance), réciproques entre certains genres de bactéries et de champignons, participent aussi à la structure de cet écosystème complexe (Wolfe *et al*, 2014). Les différents types d'interactions s'installant au sein d'une communauté conditionnent la dynamique des populations. Dans le cas des communautés complexes, les possibilités d'interactions sont démultipliées et plusieurs types d'interactions peuvent se mettre en place selon la composition et la structure des populations. Une approche théorique de modélisation a permis de montrer l'importance des interactions multiples au sein de communautés complexes (Mougi & Kondoh, 2012). Il s'avère que la présence des deux types d'interaction antagoniste et mutualiste, interactions respectivement négative et positive, contribue à stabiliser la dynamique des populations au sein d'un écosystème. La communauté du kéfir, par exemple, abrite entre 30 et 50 espèces de bactéries lactiques et acétiques et de levures. Le kéfir constitue en ce sens un excellent modèle d'étude des interactions inter-espèces. Ces multiples interactions sont notamment le siège d'interdépendances métaboliques jouant un rôle clé dans la stabilité des associations microbiennes naturelles (Zelezniak *et al*, 2015). La survie d'une espèce dans l'écosystème peut ainsi dépendre des interactions avec les autres espèces. C'est par exemple le cas de *Lactobacillus kefiranofaciens*, espèce ayant montré son incapacité à croître seule dans le lait, mais dominant au sein de la communauté du kéfir grâce à des interactions avec huit autres espèces (Blasche *et al*, 2021). L'environnement matriciel joue également un rôle important dans l'établissement des interactions. Là encore, le kéfir permet d'étudier les interactions de la

communauté microbienne à la fois en milieu solide (dans le grain, matrice de polysaccharides synthétisée durant la fermentation du lait) et en milieu liquide (dans le lait). Il existe majoritairement des interactions positives dans sa partie liquide, alors que des interactions de compétition prédominent au sein du grain. Ces interactions orchestrent ainsi la colonisation spatiale et temporelle des espèces cohabitant au sein du kéfir, et conduisent au maintien d'une communauté stable et résiliente (Blasche *et al*, 2021).

La stabilité d'un écosystème résulte généralement des interactions de compétition ayant conduit 1) à l'extinction des populations désavantagées, 2) à la spécialisation des populations en cohabitation, occupant ainsi des niches métaboliques différentes, ou bien 3) à la séparation spatiale des populations (Ghoul & Mitri, 2016). Cependant, de nombreux mécanismes coopératifs contribuent à maintenir un écosystème à l'équilibre. La grande diversité métabolique rencontrée au sein des communautés microbiennes permet l'accomplissement de fonctions par division des tâches métaboliques entre plusieurs microorganismes, ou encore par l'échange de métabolites ou de signaux permettant la communication au sein d'une population (Thommes *et al*, 2019). Le quorum sensing notamment, joue un rôle important dans le contrôle de la densité cellulaire d'une population (Smid & Lacroix, 2013; Xavier, 2011; Sieuwerts *et al*, 2008). La communication de cellule à cellule est permise par la sécrétion et la détection de molécules inductrices, qui, en concentration suffisante, déclenchent une cascade de signalisation permettant l'expression de gènes de façon synchronisée. Ce phénomène peut participer à la coexistence d'espèces différentes (Hosni *et al*, 2011).

L'étude des interactions microbiennes, de la cellule à la communauté, nécessite ainsi des approches à la fois moléculaires (à l'échelle des mécanismes cellulaires) et basées sur des principes d'écologie (au niveau de la structure de l'écosystème) (Cosetta & Wolfe, 2019). Joindre les frontières de ces disciplines devient une stratégie de plus en plus adoptée pour comprendre la mise en place des interactions, et les multiples applications qui émergent de ces dialogues microbiens. Cette compréhension passe par le développement de modèles mathématiques qui s'appuieront sur des hypothèses formulées à partir des observations recueillies sur un certain nombre de descripteurs biologiques.

2.1.3 Modélisation mathématique des dynamiques de population

Les modèles mathématiques étudiant les interactions métaboliques reposent sur la croissance microbienne au sein d'une matrice et en présence des microorganismes cohabitant. Ils visent à expliquer la succession des différentes populations et peuvent parfois prédire leur dynamique au sein de l'écosystème.

2.1.3.1 Approches de modélisation pour l'étude des interactions métaboliques au sein des communautés naturelles

Lorsqu'il s'agit de s'intéresser à des écosystèmes complexes, composés de plusieurs espèces de microorganismes, des modèles mathématiques comme le modèle de Lotka-Volterra généralisé peuvent être utiles pour étudier les interactions deux-à-deux au sein de la communauté. Il est généralement utilisé pour décrire la dynamique des interactions entre un prédateur et sa proie. Ce type de modèle dynamique se structure en équations exprimant une relation linéaire entre le taux de croissance et l'abondance, pour chacune des espèces. Il s'agit de mesurer la somme des interactions pondérant la croissance de chaque espèce, l'une étant proie (c-à-d. productrice d'une ressource) et l'autre prédatrice (c-à-d. consommatrice), dont les dynamiques varient de manière antagoniste. Les interactions levures-levures et levures-bactéries ont ainsi été étudiées au sein d'une communauté présente à la surface de fromages en cours d'affinage (Mounier *et al*, 2008). Le modèle, exprimant la dynamique de chaque espèce et prenant en compte l'influence des autres espèces sur la croissance microbienne, a permis de mettre en évidence des interactions positives, avec un rôle clé de certaines levures sur le développement bactérien. Des interactions négatives entre levures ont également été suggérées par le modèle et ont été vérifiées par la technique d'omission (c-à-d. étude de l'écosystème en retirant une des espèces). Cependant, il s'avère que certaines interactions trouvées dans le modèle n'étaient pas expliquées par l'étude par omission, et à l'inverse, que certaines interactions ayant été observées expérimentalement n'étaient pas significatives dans le modèle. Ce type de modèle peut ainsi donner un scénario préliminaire des interactions au sein d'un écosystème complexe, dans le but d'orienter l'étude des interactions. Cette démarche permet de ce fait d'émettre des hypothèses biologiques expliquant les dynamiques observées et pouvant être testées expérimentalement. Le couplage de modèles de type Lotka-Volterra avec des modèles métaboliques peut permettre de mettre en évidence les mécanismes interactifs impliqués dans les variations de population.

De plus, l'établissement de scénarii des interactions métaboliques et des phénomènes physiologiques supposé(e)s par modélisation mathématique peut constituer une étape vers la

prédiction des comportements microbiens au sein d'écosystèmes complexes. Cependant, il est important de souligner que la valeur prédictive d'un modèle n'est applicable que dans les conditions et les fonctionnalités pour lesquelles il a été établi (Teusink & Smid, 2006). Dans le but de mieux prédire la dynamique des communautés microbiennes, Liu et collaborateurs ont modélisé les interactions régissant l'organisation d'écosystèmes simples (c-à-d. construits de quelques souches définies et aux fonctionnalités connues). Plus précisément, ils ont étudié l'organisation temporelle des populations au sein de consortia synthétiques constitués de souches modifiées de *Lactococcus lactis* (Liu *et al*, 2020). D'abord en créant, par ingénierie métabolique, une interaction positive (coopération) entre deux souches capables de synthétiser et sécréter chacune une sous-unité de la bactériocine lactococcine G (lcnG) inhibant les souches non immunisées (c-à-d. dépourvues du gène *lagC*) de *L. lactis*. Puis en créant de la compétition entre ces deux souches coopératives et une autre souche de *L. lactis* sensible à lcnG mais produisant la lactococcine A (lcnA) active contre les souches productrices de lcnG (Figure 5). Dans le but d'évaluer l'impact de variations des interactions, et ainsi se rapprocher des fluctuations observées dans la nature, différents ratio des souches coopératrices (c-à-d. partition de la tâche métabolique) et taux d'ensemencement (c-à-d. échantillonnage stochastique) ont été étudiés. Des modèles basés sur la cinétique de trois variables clés, 1) la disponibilité en nutriments, 2) la quantification des populations et 3) les interactions médiées par la production de bactériocines, ont permis de montrer que les variations des interactions de coopération et de compétition régissaient l'organisation des populations et conduisaient à divers scénarii de leur dynamique. Il s'avère que rajouter un élément de modulation des interactions, de manière pH dépendante (c-à-d. en mettant chacun des gènes *lagC* et *lncA* sous contrôle d'un promoteur inducible à pH < 6.5, Figure 5), a mis en évidence de multiples dynamiques des populations et ainsi des scénarii d'interactions encore plus diversifiés. En effet, selon les conditions environnementales, le schéma des interactions diffère, avec parfois une inversion des rôles entre les différentes souches du consortium, selon qu'elles exercent ou non certaines de leurs fonctionnalités (résistance à la lcnG, ou production de lcnG ou lcnA). Les données expérimentales ayant montré une bonne concordance avec les modèles établis, il est vraisemblable que la variabilité des interactions constitue un élément régulateur déterminant régissant la dynamique des populations. Ces approches d'étude et de modélisation de consortia synthétiques donnent ainsi de solides bases pour l'établissement de modèles prédictifs de la structure et de la dynamique microbienne au sein d'un écosystème.

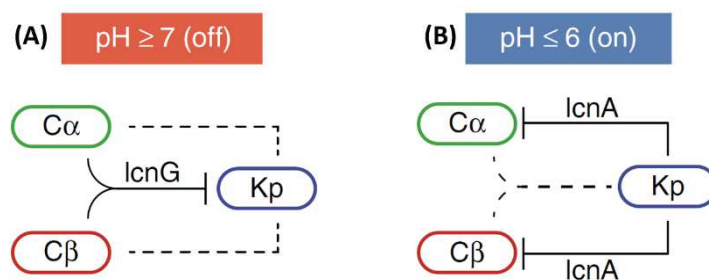


Figure 5. Représentation des relations de coopération et compétition au sein du consortium synthétique à trois membres. (A) à $\text{pH} \geq 7$, la souche Kp, inactive (off) pour la production de lcnA, est inhibée par les souches coopératrices Cα et Cβ productrices de lcnG. (B) à $\text{pH} \leq 6$, la souche compétitrice Kp inhibe les souches Cα et Cβ par la production induite de lcnA. D'après (Liu *et al*, 2020).

La modélisation des interactions métaboliques permet ainsi de répondre à des questions d'ordre fondamental, concernant l'organisation d'une communauté au sein d'un écosystème et les comportements trophiques des différents membres microbiens. Mais également, la modélisation peut permettre d'apporter des solutions à des problématiques d'ordre technologique ou sanitaire, notamment dans l'industrie des produits alimentaires fermentés. C'est notamment le cas de la microbiologie prévisionnelle.

2.1.3.2 Modèles métaboliques en microbiologie alimentaire : la microbiologie prévisionnelle

En microbiologie alimentaire, des modèles simples basés sur la croissance microbienne, incluant les équations de Monod ou Pirt (Monod, 1949; Pirt & Hinshelwood, 1965), sont particulièrement adaptés et utiles pour prévoir l'impact des conditions de fermentation sur la croissance des microorganismes lors d'un procédé technologique (Teusink & Smid, 2006), on parle de microbiologie prévisionnelle (McMeekin *et al*, 2002). Ces modèles prennent en compte le phénomène de limitation de la croissance selon la concentration en substrat mais aussi selon l'accumulation en produit(s) inhibiteur(s) tels que les acides organiques (Levenspiel, 1980). Le taux de croissance, le rendement en biomasse et l'affinité au substrat constituent les descripteurs élémentaires permettant l'établissement de ce type de modèle (Bachmann *et al*, 2016). Des modèles ont notamment été développés pour expliquer et prédire le comportement de microorganismes impliqués dans la lutte contre l'installation de microorganismes pathogènes ou responsables d'altérations dans les denrées fermentées (Martens *et al*, 1999; McMeekin *et al*, 2002; Leroy & De Vuyst, 2003). Parmi ces microorganismes, les bactéries lactiques (BL), et notamment les BL laitières, constituent des microorganismes d'intérêt technologique, organoleptique et sanitaire largement étudiés. Elles montrent en effet des propriétés

antimicrobiennes intéressantes de par une importante production d'acide lactique, et la production de métabolites inhibiteurs tels que les bactériocines. En participant ainsi à la conservation des produits fermentés, les BL constituent des microorganismes de choix pour la modélisation d'écosystèmes alimentaires, permettant d'intégrer à la fois des descripteurs technologiques et de sécurité alimentaire. Leroy et collaborateurs ont notamment établi plusieurs modèles du comportement bactérien de souches utilisées comme starter alimentaire dans le but de prédire les fonctionnalités de ces souches dans l'environnement de leur matrice alimentaire spécifique. L'approche consistait à bâtir un modèle primaire explicatif des données biologiques expérimentales de croissance, de métabolisme (c-à-d. consommation des sucres) et de production de métabolites fonctionnels dans des conditions de laboratoire définies. Cette première modélisation, permettant de lier la production des molécules fonctionnelles d'intérêt à la croissance bactérienne, a servi à la construction d'un modèle secondaire à valeur prédictive, simulant les paramètres du modèle primaire en fonction de différents facteurs abiotiques (température, pH, concentration en NaCl). De cette façon, la croissance en milieu laitier de la souche LY03 de *Streptococcus thermophilus* (utilisée dans les procédés de fabrication de yaourt) ainsi que sa production d'exopolysaccharides ont été simulées (Leroy *et al*, 2002). La même stratégie a permis de simuler la production de sakacine K, bactériocine produite par la souche CTC 494 de *Lactobacillus sakei* (souche impliquée dans les procédés de fabrication de saucisses fermentées) (Leroy *et al*, 2002; Leroy & De Vuyst, 2003).

2.2 Les écosystèmes laitiers : des modèles d'étude de communautés microbiennes

Parmi les aliments fermentés, les produits laitiers constituent des écosystèmes de choix pour l'étude des communautés microbiennes. Ils peuvent être facilement reproduits en laboratoire, grâce à la maîtrise des conditions de culture (par ex. température, salinité, hygrométrie) conditionnant la croissance microbienne (Wolfe & Dutton, 2015). Le lait, matrice liquide constituée de sucres, protéines, lipides, vitamines et minéraux, et à haute activité de l'eau, constitue un environnement favorable pour la croissance de nombreux microorganismes. Cependant, l'accessibilité de certains nutriments et leur internalisation nécessitent des étapes de dégradation enzymatique (c-à-d. hydrolyse, protéolyse, lipolyse) et de transport, spécifiques à certaines populations de microorganismes (Quigley *et al*, 2013). Ainsi, les multiples combinaisons d'espèces de bactéries lactiques, les différents laits utilisés et la particularité de chaque procédé de fabrication donnent lieu à une immense variété de produits laitiers regroupant en particulier une multitude de fromages et laits fermentés (Macori & Cotter, 2018;

Ravyts *et al*, 2012; Liu *et al*, 2014). Les BL jouent un rôle prépondérant dans les fermentations laitières, principalement grâce à une production efficace d'acide lactique permettant l'acidification rapide du lait, mais aussi par la production d'autres acides organiques, composés d'arômes, bactériocines, exopolysaccharides ou enzymes d'intérêt (Leroy & De Vuyst, 2004; Wouters *et al*, 2002). Les BL occupent de nombreuses niches liées à l'environnement des productions laitières. De la prairie au produit fini, en passant par l'animal, le matériel de traite et l'ambiance de la fromagerie, elles se retrouvent ainsi dans le lait cru (Montel *et al*, 2014; Quigley *et al*, 2013; Fallico *et al*, 2011), en présence d'autres types de bactéries, levures et moisissures. C'est cette communauté complexe et indéfinie que l'on retrouve dans les productions traditionnelles, artisanales et fermières. A l'inverse, lors de productions industrielles, les BL sont ajoutées dans le lait sous la forme de starters aux capacités technologiques connues (Leroy & De Vuyst, 2004; Wouters *et al*, 2002; Macori & Cotter, 2018). Ces starters sont des associations raisonnées et judicieuses de quelques souches de BL, sélectionnées parmi une ou plusieurs espèces d'intérêt selon les caractéristiques organoleptiques souhaitées pour le produit fermenté et le procédé technologique appliqué.

2.2.1 Les communautés naturelles des laits crus et des fromages

Les laits crus constituent des communautés complexes au sein desquelles ont été identifiés plus de 100 genres et 400 espèces de bactéries, levures et moisissures pouvant cohabiter (Montel *et al*, 2014), et dont la dynamique est fonction des conditions environnementales et des interactions métaboliques liées à l'exploitation des ressources nutritionnelles (Smid & Lacroix, 2013; Bachmann *et al*, 2016). La fermentation spontanée des laits crus permet souvent le développement majoritaire des BL, donnant ainsi des starters naturels, aussi appelés starters indigènes, sauvages ou autochtones, utilisés pour la fabrication de produits tels que les fromages (Demarigny & Gerber, 2014). Un autre type de starter naturel, appelé starter naturel de lactosérum, obtenu par égouttage du caillé lors d'une fabrication fromagère, est particulièrement utilisé par les fermiers français pour la production de fromage de chèvre (par ex. fromages AOP Picodon, Rocamadour, Pélardon, Charolais, Mâconnais et Rigotte de Condrieu) (Demarigny & Gerber, 2014). Cette méthode d'ensemencement du lait à partir du lactosérum d'une production précédente correspond à une pratique de backslopping (BS). Une autre pratique de BS consiste à utiliser le produit fini comme inoculum pour la production suivante, c'est le cas lors de la fabrication d'un lait fermenté de tradition bretonne appelé Gwell (von Gastrow *et al*, 2020). Les BL présentes au sein des starters naturels sont scindées en deux catégories, les BL starter et les BL non-starter, selon leur rôle au cours du processus de

fabrication du produit fermenté (Gobbetti *et al*, 2018). Les BL starter regroupent des espèces mésophiles et thermophiles dont le rôle principal est l'acidification rapide, nécessaire à la formation du caillé, par production d'acide lactique à partir du lactose consommé. Les BL non-starter présentent une diversité microbienne plus importante que les BL starter, dont principalement des lactobacilli mésophiles mais aussi des lactococci, pediococci, enterococci et des espèces de *Leuconostoc* (Gobbetti *et al*, 2018; Terzić-Vidojević *et al*, 2020). Elles ont surtout montré leur importance durant l'étape d'affinage. Leur dynamique de croissance diffère de celle des BL starter dont le niveau de biomasse passe de 10^6 cfc/ml à l'ensemencement à 10^8 - 10^9 cfc/g dans le caillé. En effet, les BL non-starter atteignent seulement 10^2 - 10^3 cfc/g après formation du caillé, puis se développent au cours de l'affinage, pouvant atteindre 10^7 à 10^9 cfc/g après plusieurs mois (Gobbetti *et al*, 2015; Fitzsimons *et al*, 2001). Durant cette étape, les stress acide et salin, ainsi que la faible humidité, les basses températures, et le manque de lactose rendent l'environnement particulièrement hostile (Gobbetti *et al*, 2015). Pourtant, les BL non-starter montrent des mécanismes d'adaptation à ces conditions, résultant notamment dans l'augmentation du niveau d'enzymes impliquées dans le métabolisme azoté, et particulièrement le catabolisme des acides aminés libres à chaînes ramifiées (Gobbetti *et al*, 2015; De Angelis & Gobbetti, 2011; Hansen *et al*, 2001). Les lactobacilli mésophiles, en particulier, sont impliqués dans le relargage et l'utilisation de ces acides aminés libres précurseurs d'arômes (par ex. alcools, cétones, esters et tous les furanes) et jouent ainsi un rôle dans le développement du profil aromatique des fromages (Sgarbi *et al*, 2013). C'est notamment le cas de souches de *Lactobacillus rhamnosus* cultivées dans des conditions semblables à celles rencontrées dans les fromages (Bove *et al*, 2012). Bove et collaborateurs ont également montré l'importance du métabolisme du pyruvate, notamment pour la synthèse d'ATP, et l'utilisation du citrate permettant la production de composés d'arômes d'intérêt tels que le diacétyl et l'acétoïne. Aussi, bien que considérées comme peu lipolytiques, les BL non-starter montrent tout de même des activités lipases et estérases pouvant jouer un rôle dans la production d'arômes liés au métabolisme des lipides lors de longs affinages (Gobbetti *et al*, 2015). Enfin, la lyse cellulaire, notamment rencontrée durant l'affinage, participe considérablement à la formation de composés d'arômes. D'une part grâce au relargage d'enzymes cytosoliques (peptidases, lipases, enzymes impliquées dans le catabolisme des AA), et d'autre part, en fournissant aux cellules actives (c-à-d. majoritairement des BL non-starter) des substrats précurseurs d'arômes tels que des AA et acides gras libres, ainsi que des sucres provenant des parois cellulaires (Sgarbi *et al*, 2013; Smid & Kleerebezem, 2014).

Ainsi, les starters naturels, notamment par la présence des BL starter et BL non-starter, confèrent aux produits fermentés toute la typicité associée à leur terroir, avec notamment des profils aromatiques complexes, variés et spécifiques, liés à la grande diversité des communautés naturelles microbiennes. L'environnement abiotique local, spécifique à chaque pratique (c-à-d. correspondant au savoir-faire de chaque producteur fromager), modèle notamment les communautés microbiennes de façon indéniable. C'est le cas des communautés de croûtes de fromage, dans lesquelles un pool de microorganismes commun à cet écosystème, et entre différentes régions, diverge vers des communautés spécifiques selon les traitements appliqués par le producteur (Wolfe *et al*, 2014). D'autre part, la biodiversité des starters naturels est souvent illustrée par des profils de composés volatiles plus complexes que ceux des starters industriels (Montel *et al*, 2014; Picon *et al*, 2019). La présence de plusieurs souches de BL autochtones, éventuellement en association avec des souches commerciales, conduit souvent à la production d'une grande variété de composés d'arômes, notamment par combinaison de leurs voies métaboliques (Ayad *et al*, 2001; Centeno *et al*, 2002). Il se trouve que la diversité aromatique s'explique en grande partie par la variété enzymatique au niveau du métabolisme des acides aminés (Picon *et al*, 2019). En effet, la conversion enzymatique de chaque type d'acide aminé (c-à-d. AA à chaînes ramifiées, AA aromatiques, AA soufrés, acide aspartique), donne des saveurs caractéristiques, résultant en une multitude de panels aromatiques (Table 1). La première étape intracellulaire conditionnant la production des composés d'arômes à partir des AA repose sur les aminotransférases (Figure 6). Ces enzymes spécifiques de chaque groupe d'AA, réalisent la conversion des AA en leur α -céto-acide correspondant (Ardö, 2006; Smid & Kleerebezem, 2014). Les α -céto-acides peuvent directement conférer des notes aromatiques au produit ou être convertis en d'autres composés participant à la saveur (c-à-d. aldéhydes, alcools, acides carboxyliques).

Table 1. Principaux acides aminés précurseurs de composés d'arôme et leur profil de saveurs associé. D'après (Ardö, 2006).

Type d'acides aminés	Acides aminés	Profil de saveurs
AA à chaînes ramifiées	Leu, Ile, Val	Malté, fruité,
AA aromatiques	Phe, Tyr, Trp	Floral, chimique, putride
AA soufrés	Met, Cys	Type chou bouilli, viande, ail, œufs
Acide aspartique	Asp	Beurré

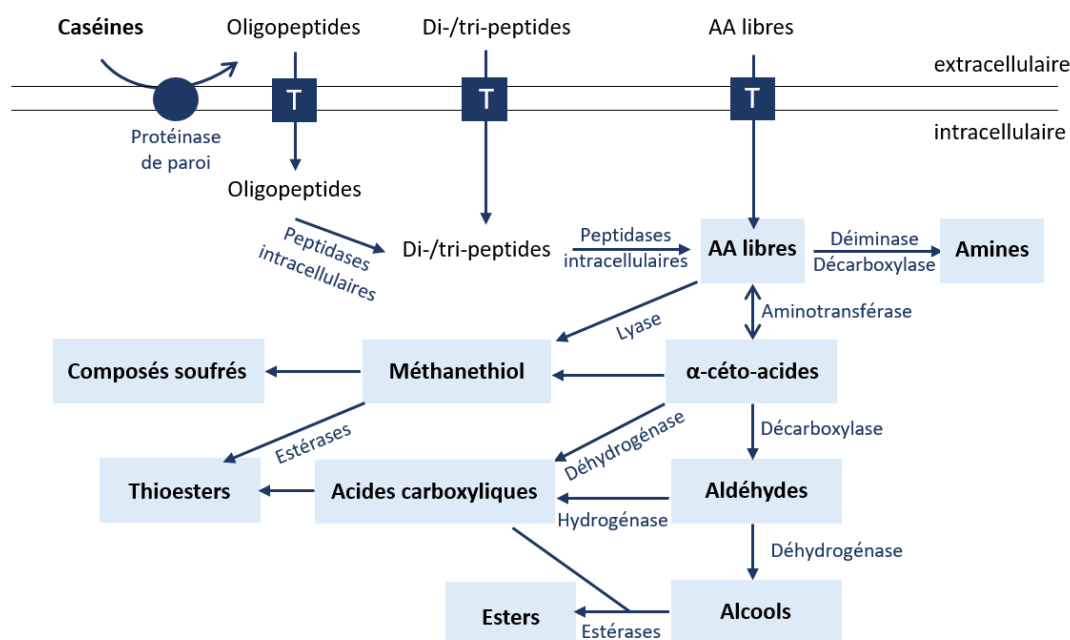


Figure 6. Vue d'ensemble des voies métaboliques impliquées dans la production des principaux composés d'arômes issus de la protéolyse du lait. Les oligopeptides, di-/tri-peptides et acides aminés libres du milieu extracellulaire sont internalisés par des transporteurs spécifiques. D'après (Smit *et al*, 2005; et Smid & Kleerebezem, 2014).

2.2.2 Des consortia simples et raisonnés : les starters industriels

Les starters laitiers industriels, aussi appelés classiquement ferments lactiques, sont des associations de bactéries lactiques sélectionnées de façon raisonnée, en vue de l'élaboration de produits laitiers tels que les fromages, yaourts ou divers laits fermentés. Les espèces mésophiles *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc lactis*, ainsi que les espèces thermophiles *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* et *Lactobacillus helveticus* rentrent usuellement dans la composition des starters industriels. La sélection de souches parmi une ou plusieurs de ces espèces vise à assembler une ou plusieurs de leurs fonctionnalités d'intérêt (Leroy & De Vuyst, 2004). De plus, durant un procédé technologique et au fil des fabrications, l'étape de fermentation est conditionnée par la stabilité et la robustesse du ferment, dont la composition et les fonctionnalités doivent être assurées. Les attaques phagiques constituent des incidents technologiques rencontrés lors des procédés de fabrication et peuvent conduire à l'échec des fermentations. Notamment en entraînant la perte d'une espèce si celle-ci n'est représentée que par une souche unique sensible au phage responsable de l'invasion. Le choix 1) de différentes souches d'une même espèce et ayant des fonctionnalités redondantes, 2) de souches résistantes, ou encore 3) d'une stratégie de rotation entre deux ou trois starters au cours des fabrications, peut ainsi s'avérer utile pour faire face à de telles perturbations biotiques

(Frantzen *et al*, 2018; Leroy & De Vuyst, 2004; Moineau, 1999; Erkus *et al*, 2013). Les capacités technologiques restent essentielles et déterminantes durant le processus de fabrication. L'acidification rapide du lait en début de fermentation, responsable de la formation du caillé et prévenant le développement de germes indésirables, constitue un des critères importants conditionnant le succès d'une production. Cette caractéristique donne ainsi tout son sens au terme starter signifiant « qui donne le départ ». Cependant, une post-acidification considérée indésirable peut survenir, par exemple durant une période de stockage, comme dans le cas du yaourt où un pH initial de 4.5-4.2 peut descendre en dessous de 4.0. La sélection de mutants de *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* lac⁻, permettant de lutter contre le phénomène de post-acidification, est possible étant donné la protocoopération qui s'établit avec *S. thermophilus*, et permet la production de yaourts « doux » (Mollet, 1999; Leroy & De Vuyst, 2004). Le choix d'un starter dépend aussi des propriétés organoleptiques souhaitées pour le produit fermenté tels que les arômes, le goût ou encore la texture. La sélection s'oriente ainsi vers des BL capables d'améliorer le profil aromatique, grâce à des capacités enzymatiques intéressantes (en particulier protéolytiques et lipolytiques), et le profil textural, grâce à la production d'exopolysaccharides (Leroy & De Vuyst, 2004; Smid & Kleerebezem, 2014; Ayad *et al*, 2001; De Vuyst *et al*, 2001). D'autre part, il s'avère que certains composés issus des fermentations peuvent également apporter des bénéfices sur la santé du consommateur (par ex. vitamines, polyols hypocaloriques) ou encore participer à la biopréservation des produits fermentés (par ex. bactériocines telle que la nisine, acide lactique) (Bukvicki *et al*, 2020). Ainsi, la construction judicieuse et raisonnée de consortia tels que les starters lactiques permet à l'industrie laitière de garantir les qualités organoleptiques et sanitaires, ainsi que la reproductibilité des produits fermentés.

2.2.3 L'espèce *Lactococcus lactis* au sein des écosystèmes laitiers

Lactococcus lactis, espèce anaérobie aérotolérante et appartenant au phylum des Firmicutes à bas G+C%, est reconnue comme espèce GRAS (Generally Recognized As Safe). Elle fait partie des espèces mésophiles d'intérêt technologique dans le domaine laitier et rentre souvent dans la composition des starters. Au sein de l'espèce *lactis*, les sous-espèces *lactis*, incluant le biovar diacetylactis, et *cremoris*, sont les plus rencontrées. Elles ont récemment été réaffectées comme deux espèces distinctes sur la base de leur identité nucléotidique moyenne (Average Nucleotidic Identity ANI) (Torres Manno *et al*, 2018; Cavanagh *et al*, 2015a, 2015b). En effet, initialement différenciées par des tests phénotypiques (c-à-d. croissance en présence de NaCl 4%, à 40°C et à pH 9.2, et capacité à dégrader l'arginine) (Schleifer *et al*, 1985), leur faible différence

nucléotidique pour le gène de l'ARNr 16S ne permet pas leur discrimination. Pourtant, il existe une importante disparité entre génotype et phénotype, avec des souches du génotype *cremoris* possédant un phénotype Lactis. Les dernières méthodes moléculaires basées sur une analyse à l'échelle du génome entier ont permis d'apporter une meilleure cohérence entre les approches phénotypiques, phylogéniques et génomiques, et ainsi de réviser la classification taxonomique (Cavanagh *et al*, 2015a; Wels *et al*, 2019).

L'espèce *lactis* montre une plus grande diversité que l'espèce *cremoris* regroupant des souches au génome « érodé » du à leur spécialisation à l'environnement laitier (Wels *et al*, 2019). En effet, une analyse MLST (MultiLocus Sequence Typing) du génome de 36 souches de *L. lactis* d'origines variées a révélé une grande variabilité génétique au sein de l'espèce et appuie une nouvelle classification distinguant les souches « environnementales » des souches « domestiquées » (Passerini *et al*, 2010). Ces dernières correspondant à un groupe de souches très proches génétiquement et ayant certainement acquis par transfert horizontal des gènes plasmidiques impliqués dans le métabolisme du lactose et des caséines. Ces plasmides clés confèrent les fonctionnalités nécessaires à la croissance en lait. L'utilisation du lactose dépend de l'opéron *lac*, constitué des gènes *lacABCDEFGX*, et étant régulé par le répresseur codé par le gène *lacR* (Kelleher *et al*, 2019; Ainsworth *et al*, 2014; Kelleher *et al*, 2017). La faculté de protéolyse, utile à la croissance et conduisant également à la formation de composés d'arômes (Figure 6) (Ardö, 2006; García-Cayuela *et al*, 2012; Smid & Kleerebezem, 2014), est due à la présence d'une protéase de paroi, codée par le gène plasmidique *prtP*, assurant l'hydrolyse de la caséine en une multitude d'oligopeptides. Une maturase associée à PrtP, codée par le gène plasmidique *prtM*, est requise pour rendre fonctionnelle PrtP et ainsi, que la fonction de protéolyse soit assurée (Ainsworth *et al*, 2014). Les oligonucléotides sont ensuite internalisés grâce au transporteur Opp, puis clivés en dipeptides par des oligopeptidases intracellulaires (par ex. PepO1). D'autres transporteurs permettent d'internaliser des di- ou tri-peptides extracellulaires (DtpT, DtpP). Les dipeptides intracellulaires sont clivés en acides aminés par de nombreuses peptidases (PepN, PepC, PepV, PepA, PepX, PepDA et PepQ) (Guédon *et al*, 2001b). Il s'avère que l'opéron *opp* et le gène *prtP* sont souvent localisés sur des plasmides différents, le maintien des deux plasmides conditionne ainsi le phénotype protéolytique (Ainsworth *et al*, 2014). Il existe une diversité protéolytique, due à la présence/absence de ces plasmides, à l'échelle des souches, mais le système protéolytique chez l'espèce *lactis* reste relativement bien conservé. En revanche, une plus grande diversité est observée entre les espèces *lactis* et *cremoris* (Kelleher *et al*, 2017; Liu *et al*, 2010). De plus, les souches de *L. lactis* appartenant au biovar diacetylactis sont caractérisées par la capacité à utiliser le citrate

présent dans le lait et par la production de diacétyl et d'acétoïne (Figure 7), deux composés d'arômes issus de ce métabolisme et conférant des notes beurrées aux produits fermentés (Curioni & Bosset, 2002; Smid & Kleerebezem, 2014). La capacité à utiliser le citrate dépend de la présence des gènes chromosomiques *citDEF* et *citM*, codant pour des enzymes impliquées dans la métabolisation du citrate, et du gène plasmidique *citP*, codant une perméase permettant son internalisation (Figure 7).

Ces fonctionnalités d'intérêt, propres à la fermentation en matrice laitière, sont vraisemblablement le résultat d'une adaptation de souches ancestrales d'origine environnementale à cette niche écologique (Kelly *et al*, 2010; Passerini *et al*, 2010; Bachmann *et al*, 2012; Cavanagh *et al*, 2015b). Cette adaptation à l'environnement laitier a également entraîné la perte de fonctions associées à l'utilisation de composés plus complexes tels que des sucres végétaux, ayant ainsi souvent conduit à la réduction de la taille du chromosome (Kelly *et al*, 2010; Kelleher *et al*, 2017; Bachmann *et al*, 2012). En effet, les souches dites environnementales, proviennent d'origines variées comme les plantes, les animaux ou les laits crus et montrent une plus grande diversité comparativement aux souches domestiquées (Cavanagh *et al*, 2015a). Jusqu'à 43 génotypes de *L. lactis* ont été décrits dans des laits crus de fermes françaises (Montel *et al*, 2014). Nomura et collaborateurs ont également montré une meilleure résistance des souches issues de plantes face aux stress acide et salin, ainsi qu'une capacité à dégrader plus de sucres, comparativement aux souches issues du lait (Nomura *et al*, 2006). Ce réservoir de diversité peut alors s'avérer intéressant pour la production de denrées alimentaires fermentées, et notamment dans la participation au profil aromatique de produits tels que les fromages artisanaux ou fermiers, où complexité et typicité sont souvent recherchées (Cavanagh *et al*, 2015b; van Hylckama Vlieg *et al*, 2006). En effet, Ayad et collaborateurs ont montré la capacité des souches environnementales à produire des saveurs spécifiques et originales, différentes de celles produites par les souches industrielles (Ayad *et al*, 1999; Alemayehu *et al*, 2014). De même, les souches environnementales de *L. lactis* montrent une capacité à produire plus de composés volatiles à partir des acides aminés à chaînes ramifiées (Centeno *et al*, 2002), ces derniers conférant des caractéristiques de saveurs recherchées dans les fromages affinés (Curioni & Bosset, 2002). L'analyse des volatils par GC-MS a mis en évidence des composés majoritairement issus de la dégradation des acides aminés tels que les alcools primaires ou les aldéhydes branchés. Ne provenant pas de milieux riches comme le lait, où l'hydrolyse des caséines permet un accès facile aux acides aminés, ces souches sont alors d'avantage dépendantes de leur propre capacité de synthèse en acides aminés contrairement aux souches laitières industrielles (Ayad *et al*, 1999; Smit *et al*, 2005). Ces dernières montrent de

nombreuses auxotrophies liées à la perte partielle, ou totale, de voies de biosynthèse due à leur adaptation en lait (Cavanagh *et al*, 2015b). La technique d'omission d'acides aminés un à un, permettant de déterminer les exigences nutritionnelles minimales pour une souche (Cocaign-Bousquet *et al*, 1995), a montré la présence nécessaire de 9 à 10 acides aminés pour les besoins de croissance des souches laitières industrielles, parmi lesquels glutamate, valine, méthionine, histidine, sérine, leucine et isoleucine ont été reconnus essentiels pour la plupart des souches. Moins exigeantes, les souches environnementales nécessitent seulement 1 à 4 acides aminés pour leurs besoins de croissance (Ayad *et al*, 1999). D'autre part, il s'avère que certaines de ces souches environnementales ont montré des capacités de production de diacétyl et d'acétoïne non liées au métabolisme du citrate (Passerini *et al*, 2013), ceci témoignant de capacités métaboliques différentes des souches domestiquées, avec une réorientation du pool de pyruvate vers des produits de fermentations autres que l'acide lactique, en particulier vers des composés d'arômes.

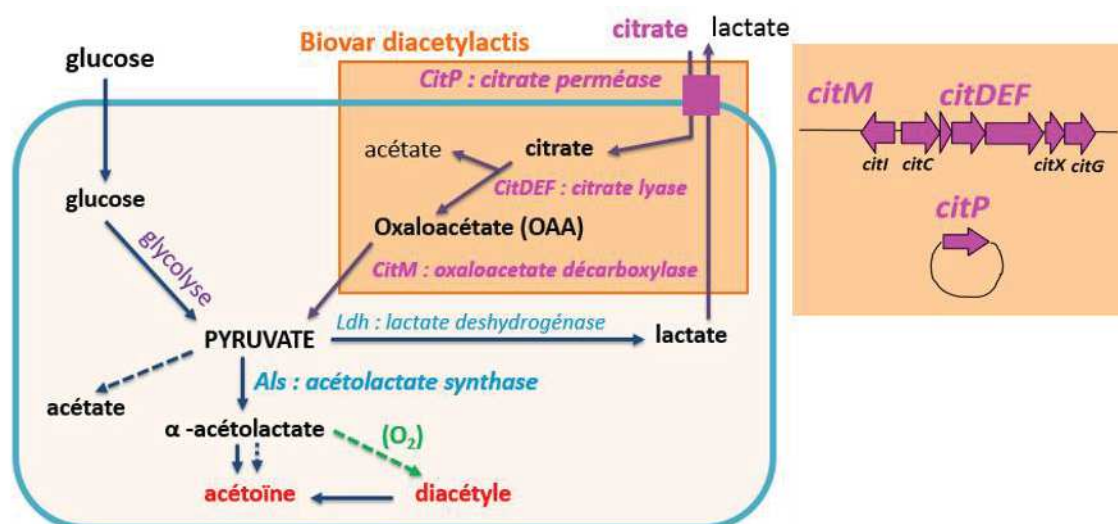


Figure 7. Schéma simplifié du métabolisme carboné chez l'espèce *L. lactis* bv diacetylactis. Sont représentées les localisations chromosomique des gènes *citM* et *citDEF* et plasmidique du gène *citP*.

2.3 Identifier, caractériser et quantifier les microorganismes d'intérêt laitiers

Détecter, identifier et quantifier les microorganismes au sein des matrices laitières s'avère utile à plusieurs niveaux : 1) pour contrôler les qualités sanitaires et organoleptiques des produits fermentés (c-à-d. présence de microorganismes pathogènes ou d'altération), 2) pour mieux maîtriser les procédés technologiques, grâce au suivi de populations d'intérêt telles que les starters, ou les microorganismes à bénéfices santé, mais aussi, 3) dans un intérêt plus fondamental, pour étudier l'occurrence, l'abondance et la dynamique des populations au sein

de communautés complexes ou de consortia synthétiques, par exemple dans le but d'étudier les interactions régissant l'organisation de ces populations au cours du temps. Une multitude de méthodes, basées sur différents principes de microscopie, biochimie enzymatique et analytique, spectrométrie et biologie moléculaire, permettent de décrire de manière qualitative et quantitative la composition microbienne des écosystèmes laitiers, mais à des niveaux de résolution différents. On les regroupe en deux grandes classes selon la nécessité ou non d'une étape culturale (Figure 8). En pratique, certaines méthodes moléculaires s'avèrent utiles en aval d'une étape de culture pour l'identification et le typage d'isolats. En effet, l'étude moléculaire d'échantillons environnementaux, sans étape culturale, peut manquer de résolution. Par exemple, arriver à différencier des souches appartenant à une même espèce dans un écosystème et sans étape d'isolement reste un challenge. De plus en plus, l'utilisation en parallèle des méthodes culturales et non-culturelles montre la complémentarité de ces deux stratégies pour l'évaluation de la diversité microbienne au sein d'un échantillon (Quigley *et al*, 2011).

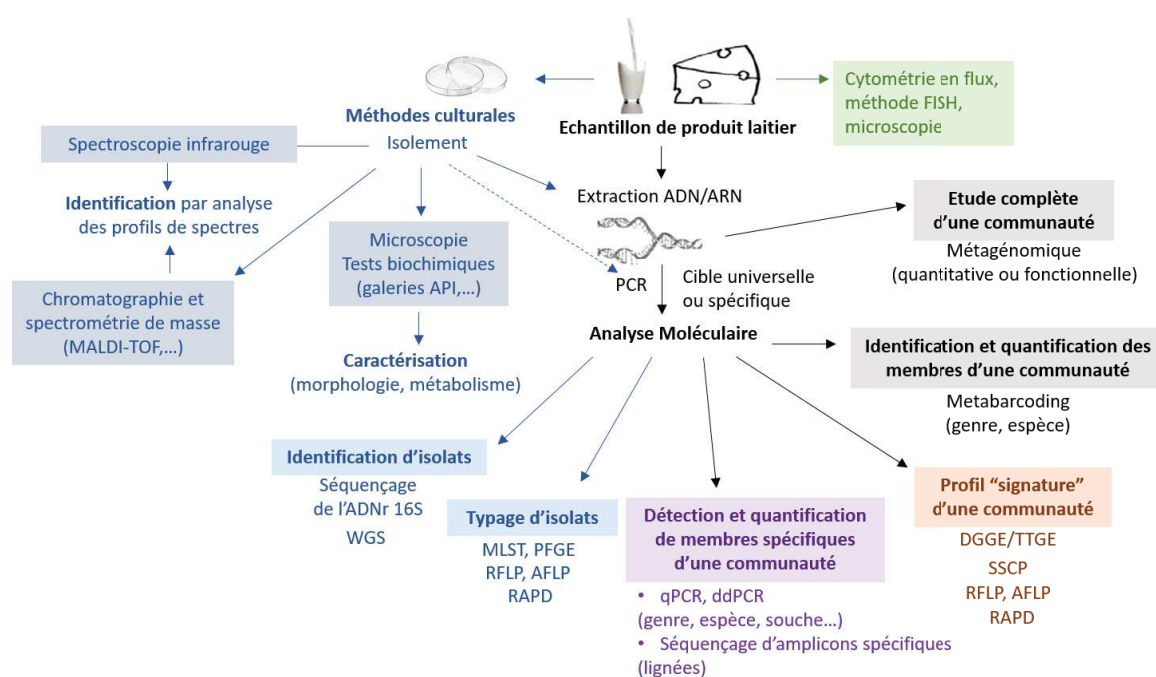


Figure 8. Schéma représentant les principales méthodes culturales et non culturales pour la détection, l'identification et la quantification des microorganismes au sein d'un échantillon de produit laitier. D'après (Quigley *et al*, 2011).

2.3.1 Les méthodes culture-dépendantes

Depuis l'avènement de la microbiologie, les méthodes culturales permettent d'isoler, dénombrer, caractériser et identifier une grande diversité de microorganismes cultivables en

conditions de laboratoire. La croissance de colonies sur milieu gélosé sélectif ou différentiel permet la quantification des microorganismes viables, et une identification basée sur les descriptions morphologiques macroscopiques (c-à-d. des colonies) et microscopiques (c-à-d. des cellules), et sur les caractéristiques biochimiques liées à la présence d'enzymes spécifiques. Dépendantes d'une étape de culture, elles sont considérées comme chronophages et fastidieuses et présentent certaines limites et des biais non négligeables, comme l'incapacité de récupérer les cellules viables non cultivables (Sudhakaran V & Anand, 2020; Sohier *et al*, 2014) ou encore, dans le cas d'écosystèmes complexes, de discriminer des populations d'intérêt parmi une communauté autochtone aux exigences nutritionnelles similaires (Ashraf & Shah, 2011). Cependant, par rapport aux méthodes non culturelles, elles ont l'avantage d'être peu coûteuses, et permettent de cultiver des microorganismes viables présents en faible quantité et dont le matériel génétique ne serait pas détecté par metabarcoding, à cause d'une quantité trop importante d'ADN d'autres microorganismes majoritaires ou de la présence d'inhibiteurs de la réaction PCR souvent rencontrés en grande quantité dans la matrice laitière (Sudhakaran V & Anand, 2020).

L'analyse biochimique de microorganismes après leur isolement est usuellement utilisée pour leur identification au rang du genre ou de l'espèce, mais aussi pour la caractérisation de propriétés technologiques (Domingos-Lopes *et al*, 2017). Ces tests sont basés sur le résultat positif ou négatif d'une réaction enzymatique et permettent de définir les capacités métaboliques et nutritionnelles d'un microorganisme (par ex. réactions avec de nombreux substrats : sucres, acides carboxyliques, acides aminés ou peptides). De même, la sensibilité/résistance dans des conditions particulières (par ex. pH, salinité, présence de certains composés chimiques) peut-être mise en évidence. Les résultats de ces réactions « oui/non » sont comparés à une base de données permettant d'obtenir la meilleure identification probable. Ils prennent la forme de systèmes miniaturisés, tels que les galeries API (Analytical Profile Index), ou leur version automatisée (par ex. système Biolog) (Franco-Duarte *et al*, 2019).

Enfin, les méthodes basées sur la spectrométrie de masse permettent l'analyse de diverses biomolécules (par ex. protéines, lipides, sucres, acides aminés). De nombreuses techniques de séparation ou ionisation peuvent être couplées à la spectrométrie de masse (par ex. chromatographies liquide et gazeuse, MALDI-TOF) et s'avèrent utiles pour l'identification de microorganismes via la confrontation d'une empreinte moléculaire (c-à-d. un profil de spectres) à une base de données (Sudhakaran V & Anand, 2020; Franco-Duarte *et al*, 2019). Complémentaire des méthodes moléculaires, la spectroscopie peut également aider à

l'identification de microorganismes, avec l'avantage de ne pas dénaturer l'échantillon analysé. Treguier et collaborateurs ont montré les performances de la spectroscopie proche-infrarouge pour l'identification de bactéries lactiques avec la discrimination des espèces *L. lactis*, *E. durans*, *E. faecalis* et *E. faecium* communément retrouvées dans le lait cru (Treguier *et al*, 2019). Cette technique repose principalement sur les différences inter-genres ou inter-espèces de composition de la paroi cellulaire, notamment en polysaccharides, et permet par exemple de discriminer les genres *Lactococcus* et *Enterococcus* difficilement différenciés sur milieu sélectif.

2.3.1.1 Analyse d'isolats par biologie moléculaire

Les microorganismes isolés sur boîte de Pétri peuvent être identifiés par analyse moléculaire du matériel génétique (Figure 8). Le séquençage d'amplicons de l'ADNr 16S par la méthode Sanger est une approche standard pour l'identification au rang de l'espèce (Franco-Duarte *et al*, 2019). En effet, les régions hautement conservées de l'ADNr 16S permettent l'hybridation d'amorces universelles et conduisent à la détection de la quasi-totalité des microorganismes procaryotes. Ce sont les régions hypervariables qui permettent l'identification des différent(e)s genres et espèces bactérien(ne)s (Baker *et al*, 2003).

Au-delà de l'identification, le typage permet d'analyser la diversité intra-espèce. La technique de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), basée sur l'amplification aléatoire de séquences dans le génome, a notamment servi à classer des souches environnementales de *L. lactis* proches génétiquement. Deux clusters correspondant aux sous-espèces *lactis* et *cremoris* de *L. lactis* ont pu être mis en évidence (Corroler *et al*, 1999). Plus récemment, la RAPD s'est montrée utile pour identifier des souches de BL intentionnellement ensemencées dans le yaourt (Sharma *et al*, 2020). Cependant, la méthode peut être jugée comme peu reproductible et peu répétable du fait des températures d'amplification trop peu stringentes (Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance.).

D'autres techniques plus robustes ont montré leur efficacité pour l'étude d'isolats, notamment des méthodes basées sur la digestion enzymatique des fragments d'ADN (par ex. RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism, AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism). Par exemple, la comparaison de profils AFLP de souches environnementales, isolées de fromages frais, à des profils de référence de BL a permis une identification au niveau de l'espèce et une analyse par agrégation évaluant le pourcentage de similarité entre les isolats

(Leboš Pavunc *et al*, 2012). De plus, deux autres techniques complémentaires peuvent être utilisées pour l'analyse de la diversité inter-souches d'une espèce. La technique PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), basée sur la migration de longs fragments de restriction issus de la coupure enzymatique du génome microbien, permet de mettre en évidence le degré de variabilité génétique entre souches, comme le montre l'étude d'isolats de BL issus d'un fromage portugais pour le genre *Lactobacillus* (Domingos-Lopes *et al*, 2017). La méthode MLST (Multi Locus Sequence Typing) peut compléter les analyses de diversité microbienne en permettant l'étude des liens phylogénétiques entre souches d'une même espèce (Passerini *et al*, 2010). Basée sur le séquençage de 5 à 7 gènes de ménage, elle donne pour chaque souche une séquence type (ST) à partir des différents profils alléliques permettant l'analyse phylogénétique. La MLST a ainsi permis d'établir une nouvelle classification des souches de la sous-espèce *lactis* de *L. lactis*, distinguant les souches « environnementales » des souches « domestiquées » (c-à-d. adaptées au milieu laitier) (Passerini *et al*, 2010).

Enfin, le séquençage de génomes entiers, connu sous le nom de Whole Genome Sequencing (WGS) dans la littérature, permet sans ambiguïté de différencier des isolats (Saltaji *et al*, 2020; Moura *et al*, 2017). Bien que coûteuse, les avancées techniques pourraient permettre son utilisation routinière dans un futur proche.

2.3.2 Les méthodes culture-indépendantes

Ces méthodes sont basées sur l'identification du matériel génétique provenant de la communauté microbienne sans en isoler chacun des membres (Figure 8). L'étape d'extraction des acides nucléiques, et ainsi la qualité et la quantité d'ADN purifié, constitue une étape déterminante conditionnant les résultats d'identification et de quantification par ces techniques moléculaires. Les matrices laitières, comme la plupart des matrices alimentaires, contiennent de nombreux composés connus pour leurs effets inhibiteurs sur l'amplification d'ADN par PCR (Quigley *et al*, 2012; Pirondini *et al*, 2010). En effet, les lipides et protéines du lait, ainsi que le calcium, présents en grandes quantités, rendent l'étape d'extraction délicate, influant sur le rendement et la pureté de l'ADN extrait. Ces constituants peuvent agir négativement par inhibition de la polymérase durant l'étape d'amplification, ou encore par capture de l'ADN dans des complexes protéiques à hauts poids moléculaires (Wilson, 1997). Cependant, ces techniques ont l'avantage de permettre la détection rapide et spécifique des microorganismes viables et non viables au sein de matrices complexes telles que les fromages, laits crus, ou autres produits laitiers.

D'autre part, l'utilisation d'agents intercalants tels que l'ethidium monoazide (EMA) ou le propidium monoazide (PMA) permet de différencier les cellules vivantes des cellules mortes. En effet, ces composés peuvent pénétrer dans les cellules mortes dont la membrane est endommagée et s'intercaler dans l'ADN, empêchant ainsi l'étape d'amplification PCR (Sudhakaran V & Anand, 2020). L'EMA ayant déjà montré son intégration dans l'ADN de cellules vivantes chez certaines espèces bactériennes (par ex. *Listeria monocytogenes*), mais aussi sa cytotoxicité (Pan & Breidt, 2007), l'utilisation du PMA reste ainsi préférable pour l'élimination du signal des cellules mortes (Nocker *et al*, 2006; Lopes & Maciel, 2019).

2.3.2.1 Approches moléculaires globales pour l'analyse de communautés complexes

Ces approches reposent sur l'obtention de profils « signature » propres à une communauté. La technique de RAPD, précédemment évoquée pour l'étude d'isolats, a également servi à évaluer la diversité microbienne au-delà de l'espèce dans des starters naturels (Ercolini *et al*, 2008). D'autres méthodes restent plus reproductibles, comme la T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) ou l'AFLP (Figure 8) qui reposent sur la séparation de fragments de restriction dont la taille varie selon les polymorphismes nucléotidiques. Les techniques de DGGE et TGGE (Denaturing/Temperature Gradient Gel Electrophoresis), utilisant un gradient dénaturant, respectivement un solvant ou la température, donnent un profil de bandes qui varie selon la composition en GC de l'ADN 16S préalablement amplifié. Ainsi, des échantillons de fromage frais produit avec un starter commercial en association avec des espèces de BL identifiées ont été analysés par DGGE, avec des profils correspondant à la combinaison des profils du starter et des BLensemencées (Leboš Pavunc *et al*, 2012). Enfin, la méthode SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), basée sur les différences de conformation des fragments amplifiés simple brin, permet de confronter le profil spectral d'une communauté aux profils d'espèces de référence issus de bases de données. Cette technique s'est montrée utile pour évaluer la diversité et la dynamique de populations de staphylocoques durant un procédé de fabrication de fromage au lait cru (Delbès & Montel, 2005). Cependant ces techniques proposant des signatures de communautés ne permettent en général pas d'identifier et de quantifier finement chaque membre de la communauté.

Pour atteindre ce but, le séquençage de cibles moléculaires judicieusement choisies s'avère être une stratégie plus informative. La spécificité réside dans le choix de la cible moléculaire, il est possible de viser l'ensemble des bactéries de la communauté, ou bien des genres, espèces ou

lignées spécifiques d'intérêt. Lorsqu'il s'agit de déterminer la composition globale de communautés complexes et indéfinies telles que dans les fromages ou les laits crus, les techniques moléculaires ciblant l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S (par ex. les régions V1-V3 ou V3-V4) ou le gène entier sont usuellement utilisées pour la détection des microorganismes procaryotes (Franco-Duarte *et al*, 2019; Quigley *et al*, 2011; Li *et al*, 2018). Les populations eucaryotes de levures et moisissures sont identifiées grâce au ciblage de l'ADNr 18S, 26S ou 28S et des régions ITS1 et ITS2 (Banjara *et al*, 2015; Delavenne *et al*, 2011; Lopandic *et al*, 2006). Cette méthode appelée métagénomique ciblée (ou metabarcoding) permettant d'identifier des OTUs (Operational Taxonomic Units, soit Unités Taxonomiques Opérationnelles), définies comme des clusters de séquences hautement similaires et utilisées comme proxy des espèces microbiennes (Ercolini, 2013; Cocolin & Ercolini, 2015). La confrontation des séquences de ces OTUs à des bases de données (par ex. SILVA, RDP) permet leur affiliation jusqu'au rang du genre ou de l'espèce. La justesse et la précision de l'affiliation dépend ainsi de l'implémentation qualitative et quantitative des bases de données. Le développement de bases de données spécifiques d'écosystème s'avère utile et adapté pour l'identification précise et représentative des microorganismes usuellement rencontrés dans l'écosystème considéré (Almeida *et al*, 2014). C'est le cas de la base de données DAIRYdb, regroupant à ce jour 10439 séquences de l'ADNr 16S des espèces microbiennes rencontrées dans les produits laitiers (Meola *et al*, 2019). D'autre part, l'utilisation du pipeline FROGS (Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution) comme outil d'analyse améliore considérablement le traitement des vastes jeux de données générés par ces méthodes de metabarcoding. Rapide, robuste, hautement sensible et facile d'utilisation, FROGS a démontré ses avantages par rapport aux autres outils existants (c-à-d. mothur, UPARSE, QIIME) (Escudié *et al*, 2018). L'analyse par metabarcoding ciblant l'ADNr 16S a permis d'étudier les variations de communautés de différents laits crus au cours du temps et selon les conditions météorologiques (Li *et al*, 2018), ou encore, dans l'industrie laitière, de suivre la composition microbienne d'un lait de consommation durant la chaîne de production et le stockage (Porcellato *et al*, 2017). De plus, une méthode permettant de calculer la concentration absolue de chaque espèce de microorganismes par gramme d'échantillon, grâce à l'introduction en faibles quantités d'un standard interne (c-à-d. des séquences du gène de l'ARNr 16S) avant extraction de l'ADN, a récemment été décrite (Zemb *et al*, 2020). La quantification de l'ADNr 16S total (c-à-d. provenant du standard interne et de l'échantillon environnemental) par qPCR permet ainsi une normalisation par la charge microbienne initiale, prenant en compte le rendement d'extraction de l'ADN. Ces travaux s'avèrent prometteurs pour l'analyse quantitative d'échantillons

environnementaux par metabarcoding, méthode permettant usuellement une quantification relative de l'abondance des différents OTUs au sein de l'échantillon d'ADN extrait.

Bien que le gène codant l'ARNr 16S constitue ainsi un « gold standard » largement utilisé pour l'identification et la quantification d'espèces bactériennes dans les aliments fermentés (Ercolini, 2013), il est cependant présent en plusieurs copies, dont le nombre varie selon les espèces, ceci constituant une limite pour l'évaluation quantitative d'un échantillon. Le ciblage d'autres gènes conservés, présents en copie unique, s'est alors montré efficace pour l'identification et la quantification de BL d'intérêt (Randazzo *et al*, 2009). Par exemple le gène *rpoB*, codant la sous-unité bêta de l'ARN polymérase bactérienne, a été utilisé pour confirmer l'identification, au rang de l'espèce, d'isolats ayant servi à l'établissement d'un catalogue de génomes de microorganismes laitiers (Almeida *et al*, 2014). D'autres cibles ont été exploitées pour différencier les espèces de BL rencontrées dans les fromages artisanaux (par ex. *recA*, *rpoB*, *cpn60*) (Randazzo *et al*, 2009). Plus récemment, Saltaji et collaborateurs ont étudié la diversité microbienne d'un starter naturel indéfini issu d'un lait cru et utilisé dans la fabrication de fromages à pâte molle. Le séquençage d'amplicons spécifiques du gène de ménage *purR* a permis de différencier cinq variants de l'espèce *L. lactis* (Saltaji *et al*, 2020). Enfin, l'approche de métagénome shotgun, WMGS (Whole Metagenome Shotgun), a été utilisée pour reconstruire les génomes complets de souches dominantes au sein d'un starter naturel utilisé pour la production de fromage (Somerville *et al*, 2019). Le WMGS a également servi pour la construction du catalogue de génomes microbiens d'intérêt laitier dans les travaux d'Almeida et collaborateurs (Almeida *et al*, 2014). En effet, les analyses métagénomiques de communautés complexes dépendent des bases de données génomiques, dont l'implémentation est permise par le séquençage de souches, avec l'apport de nouvelles séquences permettant de gagner en résolution d'identification. Les méthodes de séquençage haut-débit rendues plus abordables et accessibles, l'étude des métagénomes complets en écologie microbienne alimentaire devient une stratégie de plus en plus utilisée. Elle permet d'analyser le maximum d'informations contenues dans les génomes en donnant des renseignements sur l'identité et l'abondance des microorganismes (métagénomique quantitative) mais également sur leurs fonctionnalités (métagénomique fonctionnelle).

2.3.2.2 Approches moléculaires ciblées

2.3.2.2.1 Hybridation de sondes fluorescentes *in situ*

D'autres méthodes de détection existent, comme les techniques basées sur la détection de fluorescence, notamment par microscopie ou cytométrie en flux (Figure 8), qui s'avèrent très intéressantes dans le monde de l'industrie agroalimentaire (Sohier *et al*, 2014). Parmi elles, la méthode FISH, utilisant des sondes nucléotidiques fluorescentes hybridant l'ARN ou l'ADN au sein des cellules cibles, a été très utilisée en laboratoire dans les années 90. Couplée à la microscopie à fluorescence, elle permet d'une part, de détecter *in situ* les microorganismes ciblés, donnant ainsi des informations sur leur distribution spatiale au sein de la matrice (Ercolini *et al*, 2003), ou d'autre part, de les énumérer (Babot *et al*, 2011). Elle peut être également couplée à la cytométrie en flux, permettant la quantification des cellules vivantes et mortes au sein d'un échantillon (Davis, 2014). Ces méthodes donnent ainsi accès à de nombreuses informations, comme l'énumération des microorganismes en globalité (Gunasekera *et al*, 2000; Babot *et al*, 2011), mais aussi la discrimination entre divers états physiologiques cellulaires (dont les cellules viables non cultivables) (Bunthof *et al*, 2001; Zotta *et al*, 2012; Arbi *et al*, 2011) grâce au ciblage de nombreux composants cellulaires ou marqueurs physiologiques (Díaz *et al*, 2010). Cela permet également d'étudier les effets de certains stress technologiques (par ex. stress acide, oxydatif, osmotique ou de température) durant un procédé de fabrication (Díaz *et al*, 2010), ou encore de réaliser une dynamique des populations par le suivi des microorganismes d'intérêt. Cependant, le pouvoir discriminatoire de ces méthodes au niveau taxonomique (c-à-d. genre ou espèce) reste encore limité et les limites de détection et quantification restent relativement élevées, de l'ordre de 10^3 à 10^4 cellules/ml en lait (Gunasekera *et al*, 2000).

2.3.2.2.2 Amplification PCR de gènes spécifiques d'espèces ou de lignées

L'augmentation du nombre de génomes de microorganismes d'intérêt laitier séquencés et implémentés dans les bases de données permet désormais de mettre en évidence des cibles spécifiques d'espèces ou de lignées, facilement amplifiables par les méthodes PCR telles que la PCR quantitative en temps réel (qPCR) (Boyer & Combrisson, 2013). Ces travaux concernent principalement les microorganismes pathogènes ou d'altération (Rantsiou *et al*, 2008; Cremonesi *et al*, 2016; Wang *et al*, 2018; D'Urso *et al*, 2009; Lopes & Maciel, 2019), et les espèces d'intérêt technologique. Les espèces *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus paracasei* ont notamment été détectées et quantifiées spécifiquement grâce à l'utilisation du gène *tuf*

(Achilleos & Berthier, 2013; Ruggirello *et al*, 2014). Le défi consiste souvent à détecter de très faibles quantités de microorganismes, ceci nécessitant l'utilisation de méthodes suffisamment sensibles (Auvolat & Besse, 2016; Zago *et al*, 2009). Dans le cas du ciblage de pathogènes alimentaires, il est requis de répondre aux critères microbiologiques sanitaires imposés par la législation, et une étape de pré-enrichissement est souvent nécessaire afin d'abaisser les limites de détection et de quantification en qPCR (Postollec *et al*, 2011; Agrimonti *et al*, 2019; Boyer & Combrisson, 2013). Le développement d'une méthode de filtration éliminant les cellules mortes ou très endommagées a notamment permis la détection fiable des cellules viables de *Salmonella enterica* et *Listeria monocytogenes* dans le yaourt (D'Urso *et al*, 2009). Plus récemment, la technique de PCR digitale (ddPCR) s'est montrée plus sensible que la qPCR, avec l'avantage de s'affranchir d'une courbe standard en permettant une quantification absolue donnée en nombre de copies par microlitre (Wang *et al*, 2018; Cremonesi *et al*, 2016; Morisset *et al*, 2013). La ddPCR s'est montrée particulièrement adaptée pour contrôler la qualité sanitaire de denrées pour des pathogènes de tolérance zéro (Wang *et al*, 2018). Elle mérite d'être étendue à l'analyse d'écosystèmes complexes pour tracer spécifiquement des populations minoritaires.

3. PROBLEMATIQUE

3 PROBLEMATIQUE

Lactococcus lactis constitue un microorganisme modèle chez les bactéries lactiques et est notamment très étudié pour son intérêt technologique en fermentations laitières. A l'origine présente chez les plantes et les animaux, l'espèce *lactis* aurait colonisé le lait cru par la suite. L'évolution génétique des souches environnementales de *lactis* ayant colonisé ce biotope témoigne d'une 'domestication' de ces souches, par pseudogénisation ou perte de gènes inutiles en lait, et par acquisition de gènes clés facilitant la croissance dans cette matrice (Bachmann *et al*, 2010; Kelly *et al*, 2010). Ainsi, il existe une grande diversité génotypique et phénotypique chez l'espèce *lactis*, particulièrement chez les souches environnementales (Passerini *et al*, 2010). Si l'évolution de souche en culture seule a déjà été étudiée (Bachmann *et al*, 2012), l'évolution de plusieurs souches de l'espèce *lactis* en consortium n'a jamais été décrite dans la littérature.

Dans cette thèse, nous avons ainsi cherché à étudier un consortium de souches sélectionnées de *lactis* pendant son évolution en lait sur plusieurs centaines de générations. En effet, cette approche de construction raisonnée de communautés microbiennes simplifiées est judicieusement utilisée pour décrypter finement l'organisation et les interactions métaboliques qui peuvent s'installer dans le temps (De Roy *et al*, 2014; Kong *et al*, 2018). Les évolutions adaptatives permettent de reproduire en laboratoire les phénomènes adaptatifs observés au sein des écosystèmes naturels, notamment par l'étude des populations évoluées, qui diffèrent des populations ancestrales par accumulation de modifications génétiques (Barrick & Lenski, 2013). La mise en place de cette stratégie expérimentale vise ainsi à ouvrir sur l'étude des génomes évolués de nos souches seules ou en consortium, notamment dans le but d'évaluer l'impact des interactions intra-espèces sur leur adaptation. Ces modifications dépendent des environnements biotique et abiotique de l'écosystème, eux-mêmes fonction de l'activité métabolique de chaque membre microbien (Cavaliere *et al*, 2017). La consommation des substrats, principalement le lactose et les caséines, entraîne notamment une acidification du milieu et la mise à disposition d'une source d'acides aminés internalisable par les cellules, respectivement. Cette ressource est considérée comme un bien public, accessible à toutes les cellules avoisinant la cellule responsable de la protéolyse des caséines. Durant ces travaux, nous nous sommes intéressés aux interactions métaboliques entre deux souches capables de protéolyse et une souche ne disposant pas du gène codant cette fonction. Des interactions de coopération comme le cross-feeding se mettent souvent en place (Fritts *et al*, 2021), elles sont

particulièrement rencontrées en fermentations alimentaires (Cavaliere *et al*, 2017; Canon *et al*, 2020). Cependant, la fitness des cellules exerçant la fonction mutualisée est souvent impactée du fait du coût métabolique lié à l'expression du gène codant cette fonction. Au cours d'une propagation (par ex. évolution expérimentale adaptative), il est alors décrit des phénomènes de perte du gène codant la fonction mutualisée, souvent porté par des éléments génétiques mobiles (Bachmann *et al*, 2011). Dans notre cas, nous avons cherché à expliquer la dynamique de chaque souche en émettant des hypothèses évolutives sur les phénomènes métaboliques observés. Il s'agit d'une part, d'étudier des descripteurs métaboliques et de croissance durant l'évolution de chaque souche seule ou en consortium. L'utilisation de tels descripteurs en modélisation mathématique peut permettre d'étudier les interactions métaboliques impactant la croissance de chaque membre d'un écosystème, et potentiellement de prédire la dynamique d'un consortium bien caractérisé (Mounier *et al*, 2008; Liu *et al*, 2020). Nous avons cherché à construire un modèle explicatif permettant de décrire la dynamique de chaque souche au sein du consortium, en émettant des hypothèses biologiques sur leur comportement nutritionnel. Le but était notamment de mettre en évidence les facteurs clés impactant cette dynamique, afin de rendre le modèle mathématique robuste pour l'étude de souches de *L. lactis* en consortium. De plus, cette approche de suivi précis nécessite l'utilisation d'outils moléculaires permettant la discrimination de souches phylogénétiquement proches. Une partie de cette thèse décrit la mise au point d'un outil de suivi population-spécifique en PCR digitale, technique ayant prouvé sa grande sensibilité, spécificité et précision dans le domaine du diagnostic clinique en particulier (Huggett *et al*, 2015; Ye *et al*, 2021).

D'autre part, ces travaux ouvrent également à l'étude de descripteurs génétiques, qui permettraient de mieux comprendre les phénomènes métaboliques observés. En particulier l'apparition de polymorphismes nucléotidiques au niveau de régions impliquées dans les fonctions métaboliques clés telles que la protéolyse.

Enfin, une partie des travaux de thèse consistait à étudier une communauté naturelle issue de lait cru. Lorsqu'on considère des communautés microbiennes plus complexes telles que celles des laits crus, les fonctionnalités de l'écosystème s'étudient par des approches globales de méta-analyses permettant de s'intéresser à la résultante de l'activité microbienne de chaque membre et du réseau interactif pouvant s'installer. Il est intéressant d'étudier la stabilité et la robustesse de tels écosystèmes face aux différents stress liés aux environnements abiotique et biotique. En effet, les communautés naturelles peuvent se montrer résistantes, résilientes, ou encore

redondantes pour les fonctionnalités exercées (Allison & Martiny, 2008). Nous nous sommes intéressés à l'évolution d'une communauté issue d'un lait cru en étudiant sa composition bactérienne au rang de l'espèce et ses fonctionnalités métaboliques en lait. Ces descripteurs ont également été étudiés lorsque cette communauté indigène était en évolution en présence d'un consortium de souches sélectionnées de *L. lactis*. Ce type d'association correspond à des pratiques de terrain en filière laitière, lorsque des ferments sont additionnés au lait cru pour démarrer les fermentations fromagères par exemple. La propagation en série des communautés, également pratiquée pour la fabrication de certains fromages et appelée « backslopping » (Demarigny & Gerber, 2014), permet dans notre cas d'étudier judicieusement la dynamique des populations et les phénomènes écologiques et métaboliques impactant cette dynamique.

4. RESULTATS

4 RESULTATS

4.1 La PCR digitale comme outil de traçage de populations spécifiques au sein des écosystèmes laitiers

4.1.1 Résumé de l'article 1

Détecter et quantifier de façon spécifique et précise des populations ou souches d'intérêt au sein d'écosystèmes laitiers peut s'avérer difficilement réalisable par les approches quantitatives usuellement utilisée comme la qPCR, en particulier lorsqu'il s'agit de discriminer des cibles génétiquement proches. La PCR digitale (ddPCR), ayant montré son efficacité dans le domaine du diagnostic clinique ou encore pour la détection de pathogènes alimentaires, allie sensibilité, spécificité, précision, justesse et rapidité. Basée sur la répartition aléatoire des fragments d'ADN au sein d'une multitude de gouttelettes pouvant être comparées à des nano-réacteurs, elle permet une quantification absolue en nombre de copies d'ADN cible par microlitre, grâce à l'application de la Loi de Poisson (Figure 9). Comparativement à la qPCR, elle a également l'avantage d'être beaucoup moins sensible aux inhibiteurs de PCR souvent rencontrés dans les matrices alimentaires. Dans le but d'étudier les variations de population au cours d'une évolution expérimentale en lait, ou sous différentes conditions de pH et de température lors d'un procédé technologique, nous avons mis au point une stratégie de suivi par l'utilisation de sondes fluorescentes souche- ou population-spécifiques dans des essais de ddPCR.

Une partie des travaux de cette thèse consistant à étudier les interactions intra-espèces entre souches de *Lactococcus lactis* au cours de leur évolution expérimentale en consortium, une dynamique précise de ces souches a été réalisée par ddPCR. Il s'agissait de quantifier spécifiquement chacune des souches par rapport à la population totale du consortium au cours des repiquages successifs. Des sondes fluorescentes ciblant une région de polymorphismes (SNP) discriminant les trois souches, au sein du gène de ménage *recN*, en association avec une sonde consensus ciblant une région commune du même gène, ont permis d'obtenir un ratio de chacune des souches au cours de l'évolution.

Cette méthodologie a été élargie à l'étude d'écosystèmes laitiers comme les starters industriels, pour détecter les espèces *L. lactis* et *L. cremoris* et le biovar diacetylactis au cours d'un procédé technologique. Il s'agissait de suivre de façon précise les fluctuations de chaque espèce et du biovar relativement à la population totale, selon des conditions de pH et de température différentes. Ces travaux ont fait l'objet d'une première publication ayant validé l'utilisation de

cette méthode pour décrire finement les dynamiques de ces populations d'intérêt durant la fabrication de laits fermentés.

La ddPCR, technologie ayant été transférée des applications de santé du domaine médical vers des problématiques d'écologie microbienne du domaine agroalimentaire, constitue ainsi un outil puissant alliant sensibilité accrue, précision et robustesse.

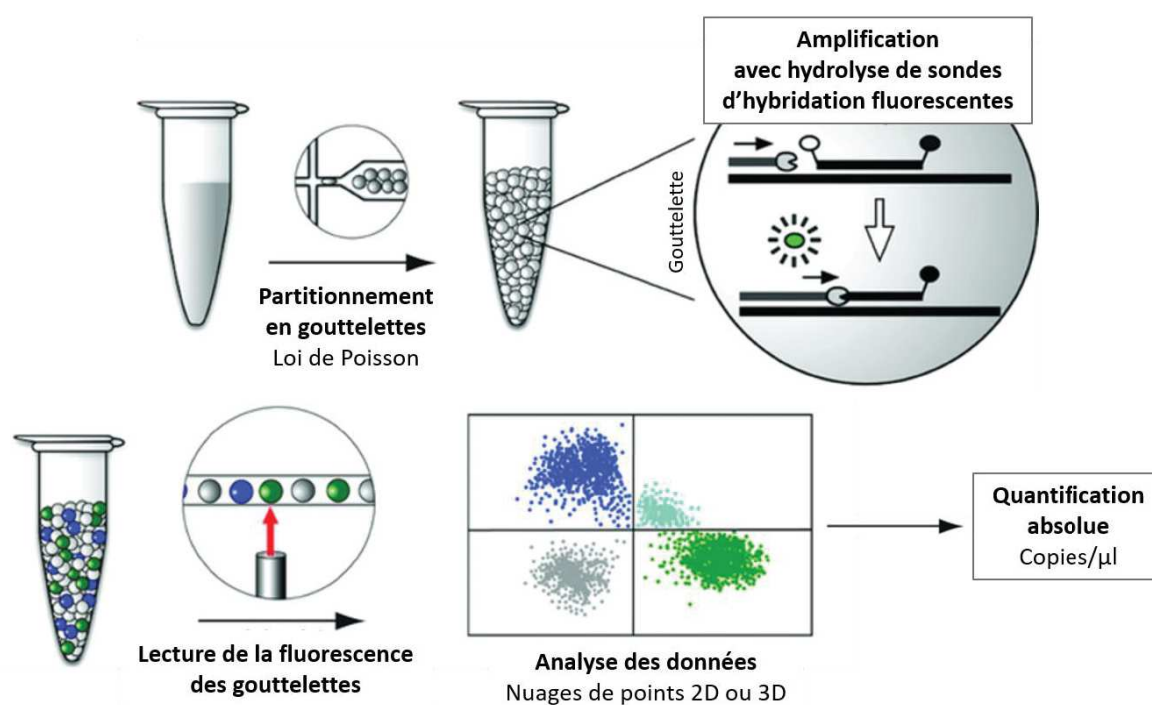


Figure 9. Principe de la PCR digitale avec utilisation de sondes d'hybridation fluorescentes. Le fluorophore de la sonde d'hybridation (rond blanc en 5' de la sonde) est libéré de son quencheur (rond noir en 3') via hydrolyse par la polymérase durant l'étape d'amplification PCR. D'après (Mazaika & Homsy, 2014).

4.1.2 Article 1: Precise Populations' Description in Dairy Ecosystems Using Digital Droplet PCR: The Case of *L. lactis* Group in Starters



Precise Populations' Description in Dairy Ecosystems Using Digital Droplet PCR: The Case of *L. lactis* Group in Starters

Marie-Aurore Caillaud^{1,2}, Martine Abeilhoul¹, Ignacio Gonzalez¹, Marjorie Audonnet¹, Frédéric Gaucheron³, Muriel Cocaïgn-Bousquet^{1*}, Hélène Tormo² and Marie-Line Daveran-Mingot¹

¹ TBI, Université de Toulouse, CNRS, INRAE, INSA, Toulouse, France, ² Université de Toulouse, Ecole d'Ingénieurs de Purpan, INPT, Toulouse, France, ³ Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL), Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Paloma López,
Margarita Salas Center for Biological
Research (CSIC), Spain

Reviewed by:

Christian Magni,
CONICET Instituto de Biología
Molecular y Celular de Rosario (IBR),
Argentina
Atte Von Wright,
University of Eastern Finland, Finland

*Correspondence:

Muriel Cocaïgn-Bousquet
cocaïgn@insa-toulouse.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Food Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 05 June 2020

Accepted: 21 July 2020

Published: 06 August 2020

Citation:

Caillaud M-A, Abeilhoul M,
Gonzalez I, Audonnet M,
Gaucheron F, Cocaïgn-Bousquet M,
Tormo H and Daveran-Mingot M-L
(2020) Precise Populations'
Description in Dairy Ecosystems
Using Digital Droplet PCR: The Case
of *L. lactis* Group in Starters.
Front. Microbiol. 11:1906.
doi: 10.3389/fmicb.2020.01906

Lactococcus lactis group (composed of the *lactis* and *cremoris* subspecies, recently reassigned as two distinct species) plays a major role in dairy fermentations. Usually present in starter cultures, the two species enable efficient acidification and improve the organoleptic qualities of the final product. Biovar diacetylactis strains produce diacetyl and acetoin, aromas from the citrate metabolism. As these populations have distinct genomic and phenotypic characteristics, the proportions of each other will affect the final product. Today, there is no quantitative test able to distinguish between the two species and the biovar in dairy ecosystems. In this study, we developed a specific, reliable, and accurate strategy to quantify these populations using, species-, and diacetylactis-specific fluorescent probes in digital droplet PCR assays (ddPCR). Species were distinguished based on three single nucleotide polymorphisms in the glutamate decarboxylase *gadB* gene, and the *citD* gene involved in citrate metabolism was used to target the biovar. Used in duplex or singleplex, these probes made it possible to measure the proportion of each population. At 59°C, the probes showed target specificity and responded negatively to the non-target species usually found in dairy environments. Depending on the probe, limit of detection values in milk matrix ranged from 3.6×10^3 to 1.8×10^4 copies/ml. The test was applied to quantify sub-populations in the *L. lactis* group during milk fermentation with a commercial starter. The effect of temperature and pH on the balance of the different populations was pointed out. At the initial state, *lactis* and *cremoris* species represent, respectively, 75% and 28% of the total *L. lactis* group and biovar diacetylactis strains represent 21% of the *lactis* species strains. These ratios varied as a function of temperature (22°C or 35°C) and acidity (pH 4.5 or 4.3) with *cremoris* species promoted at 22°C and pH4.5 compared to at 35°C. The biovar diacetylactis strains were less sensitive to acid stress at 35°C. This methodology proved to be useful for quantifying *lactis* and *cremoris* species and biovar diacetylactis, and could complete 16S metagenomics studies for the deeply description of *L. lactis* group in complex ecosystems.

Keywords: *L. lactis*, *L. cremoris*, biovar diacetylactis, starters, ddPCR

INTRODUCTION

In dairy industries, starters are simple ecosystems that transform milk into different final products depending on the biochemical and microbial composition and the technology applied. Qualitative and quantitative descriptions of these ecosystems are thus useful to monitor milk transformation. Among the microorganisms involved in food fermentations, *Lactococcus lactis* species, the primary component of starter cultures, plays a major role. During cheese making, *Lactococcus lactis* acidifies the milk, changing its physico-chemical characteristics and preventing the growth of pathogenic and spoilage bacteria. Moreover, *Lactococcus lactis* creates appropriate biochemical conditions for ripening and contributes to the final texture and flavor of cheeses (Parente and Cogan, 2004; Smit et al., 2005).

Lactococcus lactis species is divided into different subspecies, among which the two subspecies *lactis* and *cremoris* are of industrial interest. Before the advent of molecular methods for strain identification, these subspecies were identified using phenotypic tests (Schleifer et al., 1985). Later, several studies based on genome-wide (Kelleher et al., 2017; Torres Manno et al., 2018) and comparative analysis of ANI parameters (Cavanagh et al., 2015a) support the idea that these two subspecies can be considered as two distinct species *lactis* and *cremoris*. The use of this new denomination is now well admitted. In the *lactis* group, both species are associated with well described growth characteristics (Wels et al., 2019). However, *cremoris* species have different phenotypes (Cavanagh et al., 2015a), with strains identified as “true” *cremoris*, and strains showing a *Lactis* phenotype (growth at 40°C, in the presence of 4% NaCl and pH 9.2, and the ability to degrade arginine). Dairy starters are usually a mix of strains of the two genotypes. The proportion of each genotype is important because it affects the characteristics of the final product (Fernández et al., 2011). Several methods are available for the identification of *lactis* and *cremoris* genotypes (Cavanagh et al., 2015b), including glutamate decarboxylase activity in *L. lactis* species (Nomura et al., 1999). In *L. cremoris*, the non-functional activity is related to a frameshift mutation in the glutamate decarboxylase gene, *gadB*, thus encoding a non-functional protein (Nomura et al., 2000). The study that followed these works produced a successful method to distinguish the two reassigned species, based on PCR amplification and RFLP analysis of the *gadB* gene in pure cultures (Nomura et al., 2002).

Among *lactis* species, the biovar diacetylactis is usually of considerable interest for the dairy industry as it includes strains that produce diacetyl and acetoin, thus improving product flavor by adding a creamy or buttery aroma to the final products. This aroma is related to citrate metabolism. Citrate is uptaken by a citrate permease encoded by the plasmidic *citP* gene (García-Quintás et al., 1998). After internalization, citrate is converted into oxaloacetate and acetate by the citrate lyase, an enzyme encoded by the chromosomal *citDEF* genes. Finally, oxaloacetate is decarboxylated into pyruvate, leading to C4 compounds among which diacetyl and acetoin. The citrate-fermenting capacity of the biovar diacetylactis strains is usually identified by the growth of blue colonies on Kempfer and McKay medium (Kempfer and McKay, 1980) or by the presence of the PCR amplified *citP* gene,

systematically associated with the presence of the chromosomal cluster (Passerini et al., 2013).

To our knowledge, no quantitative test has yet been developed to quantify *cremoris* and *lactis* species or the biovar diacetylactis population in dairy ecosystems. Specific identification and quantification require a reliable and accurate strategy. PCR-based assays using TaqMan probes technology are suitable to detect specific targets of interest (Law et al., 2015). This strategy can be very useful to distinguish nucleotide variants with single nucleotide polymorphism (SNP) precision (Billard et al., 2012; Strayer et al., 2016). However, the choice of the target is a crucial step to ensure the reliability, and the accuracy of the detection and the quantification.

Quantitative PCR assays (qPCR or real-time PCR) are widely used to describe microbial communities in the environment (Smith and Osborn, 2009) or in food samples (Tessonnière et al., 2009; Zago et al., 2009; Postollec et al., 2011). However, qPCR has some limitations for the absolute quantification (Morisset et al., 2013; Ren et al., 2017; Gobert et al., 2018). The recent digital droplet PCR (ddPCR) technology has been particularly successful in clinical diagnosis or in detecting foodborne pathogens (Elizaquível et al., 2012; Day et al., 2013). In fact, ddPCR is more accurate, sensitive, precise and resistant to inhibitors (Wang et al., 2018) than qPCR. Moreover, the end point measurement and the partitioning technology allow the absolute quantification in copies per microliter, based on Poisson distribution, without a need for standard curves.

The aim of this study was to develop a reliable, fast, sensitive, precise and specific method to describe and quantify the proportions of the two species and the biovar diacetylactis of *L. lactis* group in dairy ecosystems like starters. The method was used to monitor variations in different subpopulations in a commercial starter during the production of a fermented milk under different pH (4.5 and 4.3) and temperature (22°C or 35°C) conditions.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Culture Conditions

All analyzed strains of *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis* biovar diacetylactis, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc faecium* and *Leuconostoc lactis* are listed in **Table 1**.

All the species were grown in GM17 medium at 30°C or 37°C for *Streptococcus thermophilus* strains, except for *Leuconostoc* species which were cultivated in MRS broth at 30°C.

Reconstituted Starters

Mixtures of the two strains were reconstituted by combining IL1403 and S72 strains (**Table 1**). Each strain was grown in GM17 medium overnight at 30°C. This preculture was used to inoculate a new GM17 medium at OD_{580nm} = 0.05. The OD_{580nm} was measured during cultivation and growth was stopped at the beginning of the stationary phase (3.85 < OD_{580nm} < 4.29). Five

mixtures were produced with theoretical ratios (v/v) of IL1403 to S72 of 5:95, 20:80, 50:50, 80:20 and 95:5. After centrifugation at 13,000 rpm for 5 min, the pellets were recovered and stored at -20°C until DNA extraction. The experiment was independently repeated three times.

Commercial Starter

MM100 commercial starter (DANISCO, CHOOZIT MM 100 LYO 25 DCU, PD 207167-10.0FR, N°50434) is composed of *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris* and *Lactococcus lactis*

TABLE 1 | List of genus, species and strains tested to develop the test.

Genus	Species	Biovar	Strain	References
<i>Lactococcus</i>	<i>cremoris</i>		189	From Sandine lab
	<i>cremoris</i>		188	From Sandine lab
	<i>cremoris</i>		HER 1203	From Ackermann lab
	<i>cremoris</i>		S 72	
	<i>cremoris</i>		S 78	
	<i>cremoris</i>		S 82	
	<i>cremoris</i>		S 102	
	<i>cremoris</i>		S 103	
	<i>cremoris</i>		S 105	
	<i>cremoris</i>		HER 1205	From Ackermann lab
	<i>cremoris</i>		EIP 58E	Unpublished
	<i>cremoris</i>		CNRZ 268	From Novel lab
	<i>cremoris</i>		EIP 36F	Unpublished
	<i>cremoris</i>		EIP 53A	Unpublished
	<i>cremoris</i>		EIP 53I	Unpublished
	<i>cremoris</i>		L 24	From Novel lab
	<i>lactis</i>	Diacetylactis	EIP 33F	Unpublished
	<i>lactis</i>	Diacetylactis	IL 1403	Bolotin et al. (2001)
	<i>lactis</i>	Diacetylactis	EIP 33H	Unpublished
	<i>lactis</i>	Diacetylactis	UCMA 5716	Passerini et al. (2010)
	<i>lactis</i>		NCDO 2727	Obis et al. (2001)
	<i>lactis</i>		S 188	Passerini et al. (2010)
	<i>lactis</i>		EIP 13D	Unpublished
	<i>lactis</i>		CIRM-BIA2008	Obis et al. (2001)
	<i>lactis</i>		EIP 55H	Unpublished
	<i>lactis</i>		EIP 19S	Unpublished
	<i>lactis</i>		EIP19F	Unpublished
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>		CIP 104055	
	<i>faecalis</i>		CIP 104056	
	<i>faecium</i>		CIRM-BIA499	
<i>Leuconostoc</i>	<i>citreum</i>		CIRM-BIA852	
	<i>citreum</i>		CIRM-BIA1453	
	<i>lactis</i>		CIRM-BIA1088	
	<i>lactis</i>		CIRM-BIA1450	
	<i>mesenteroides</i>		CIRM-BIA435	
	<i>mesenteroides</i>		CIRM-BIA1183	
	<i>faecium</i>		ST5A1	
<i>Lactococcus</i>	<i>garvieae</i>		DSM 20684	
	<i>garvieae</i>		DSM 29394	
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>		TIL868	
	<i>thermophilus</i>		TIL1359	
	<i>thermophilus</i>		TIL1421	

biovar diacetylactis. The proportion of each species, which affects the features of the fermented product, is not provided by the supplier, but the technological characteristics are specified for use at 35°C . The lyophilized starter was re-hydrated at the concentration of 25 DCU/l in peptone water and then diluted at 5 DCU/100l in 10% (w/v) sterile skimmed milk (Sigma-Aldrich) and left to grow at 22°C or 35°C until the pH reached 4.5 or 4.3. Temperature and pH ranges were closely linked to specific production processes of fermented milks and fresh soft cheeses. At each temperature, the acidification of two independent cultures was measured using the Cinac system (AMS Alliance France) (Spinnler and Corrieu, 1989) and showed highly reproducible curves that were consequently averaged. At both temperatures and at three time points during the process, before growth (T0) and after growth until pH reached 4.5 (T1) and then 4.3 (T2), the MM100 starter was characterized for *L. lactis* populations with ddPCR assays.

DNA Extraction

DNA of all strains and reconstituted starters were extracted using the GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. The DNA of the fermented milks was extracted with DNeasy PowerFood Microbial Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions with the following modifications: first, the cell pellet was resuspended in the MBL solution and incubated at 70°C for 10 min. The genomic DNA concentration ($C_{ng}/\mu\text{l}$) was obtained by measuring absorbance at 260 nm on a Nanodrop ND2000. For the sake of convenience, $C_{ng}/\mu\text{l}$ was converted into $C_{copies}/\mu\text{l}$ according to the following equation: $C_{copies}/\mu\text{l} = Na \times C_{ng}/\mu\text{l} \times 10^{-9}/(L \times 660)$, where Na is the Avogadro constant ($6.02 \times 10^{23}/\text{mol}$), and L is the average size of a lactococcal genome (2.5×10^6 bp). This calculation provides only an estimated value in copies/ μl since A260 measurement depends on various factors and does not distinguish between intact and fragmented targets.

DNA purity was evaluated by the ratio of absorbance 260 nm/280 nm. Extracted DNA was diluted and used for the ddPCR assays at appropriate dilutions.

Primers and Probes for ddPCR

Sequences of the *gadB* gene available on the National Centre for Biotechnology Information (NCBI)¹ were retrieved and aligned using ClustalW in MEGA7 (Kumar et al., 2016). SNPs specific to the *lactis* and *cremoris* species (positions 1332, 1335, and 1336 in IL1403 chromosome) and a conserved region in the *L. lactis* group (position 1283), were chosen to design specific hydrolysis probes. Two different fluorophores (HEX and FAM) were used to enable multiplex ddPCR. Locked nucleic acids (LNAs) were added to enhance oligonucleotide melting temperature and probe affinity and specificity (Letertre et al., 2003; Mouritzen et al., 2003). The conserved regions surrounding these probes were used to design specific primers allowing the amplification of a 149 bp fragment for the ddPCR experiments. Melting temperature predictions and the thermodynamic parameters of

¹<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

the primers and probes were calculated using the IDTs oligo-analyzer tools². The primers, probe sequences and amplicon size are listed in **Table 2**. Primers were synthesized by Eurofins (Ebersberg, Germany) and probes by Eurogentec (Angers, France). All primers and probes were diluted in ultra-pure water at a concentration of 100 μ M and solutions were stored at -20°C .

Droplet Digital PCR (ddPCR) Assays and Procedure

ddPCR was performed with the QX200 AutoDG Droplet Digital PCR system (Bio-Rad) according to the manufacturer's protocol. The ddPCR mastermix had a final volume of 22 μ l and contained 2.2 μ l of DNA, 11 μ l of 2x ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) (Bio-Rad, Ref catalog 186-3024), 1.1 μ l of 18 μ M forward plus reverse primers mixture, 1.1 μ l of 5 μ M HEX and FAM probes or 1.1 μ l of 5 μ M FAM probe for singleplex assay (**Table 2**), and 5.5 μ l or 6.6 μ l of nuclease free water, for the duplex or singleplex assay, respectively. Only 20 μ l of the mixture was used to generate droplets using the QX200 Droplet generator. Subsequently, the droplet suspension was transferred into 96-wells plate and PCR amplification was performed on a T100 Touch thermal cycler (Bio-Rad) with the following program: 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 30 s at 94°C and 60 s at 59°C , ending with 10 min at 98°C , at a ramp rate of $2^{\circ}\text{C}/\text{s}$. After PCR, each reaction was analyzed by the droplet reader (Bio-Rad) and acquired data were treated with QuantaSoft software V1.7 (Bio-Rad). Thresholds were set manually considering the double negative droplets cluster from the negative control and the FAM- and/or HEX-specific positive droplets cluster from the control strains.

The DNA concentration must be in the dynamic range of the ddPCR (0.25 copies/ μ l to 5,000 copies/ μ l) (Droplet Digital PCR Applications Guide, Bio-Rad). DNA is often diluted to obtain one theoretical copy per droplet. For limits of detection and quantification (LoD and LoQ) assays, five dilutions were tested, from the initial dilution by serial diluting to the tenth.

Statistical Analysis

Statistical data analysis was carried out using the R statistical programming environment (R Development Core Team, 2005).

²<https://eu.idtdna.com/pages>

The effect of pH on the *lactis* (P_{lac}/P_{tot}) and *cremoris* (P_{cre}/P_{tot}) species and the biovar diacetylactis (P_{cit}/P_{lac}) during milk fermentation at two different temperatures, 22°C and 35°C , was evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA). A further two-way ANOVA was carried out on P_{lac}/P_{tot} and P_{cre}/P_{tot} ratios to assess the effects of interactions between pH (4.5, 4.3) and temperature (22°C , 35°C). Normality of the samples was checked using the Shapiro-Wilk test, which showed no evidence of significant differences to a normal distribution, and homogeneity of the variances was checked with the Levene test. Conventional ANOVA with Tukey's *post hoc* test was used when variances were homogeneous, whereas Welch's ANOVA and the Games-Howell *post hoc* test were used when variances were heteroscedastic. Average P_{lac}/P_{tot} , P_{cre}/P_{tot} and P_{cit}/P_{lac} ratios were calculated from n independent sample measurements: $n = 6$ at the initial condition, $n = 8$ and $n = 9$ at 22°C and 35°C , respectively, and at pH 4.5, and $n = 6$ at each temperature and pH 4.3.

RESULTS

Judicious Selection of Target Genes to Identify and Quantify the *L. lactis*, *L. cremoris*, and Biovar Diacetylactis Populations

The glutamate decarboxylase gene (*gadB*) was used in previous studies to distinguish the two phylogenetic groups corresponding to *lactis* and *cremoris* genotypes among the *L. lactis* strains (Nomura et al., 2002). However, the PCR-restriction fragment length polymorphism targeting *gadB* does not enable quantification of the two genotypes in simple or complex ecosystems. In order to identify specific SNPs in this gene, nucleotide sequences from 57 strains, including 21 *lactis* genotype and 36 *cremoris* genotype strains (**Supplementary Table S1**), were aligned. Three SNPs (positions 1332, 1335, and 1336 in IL1403 gene) were genotype-specific and served to design two probes: P_{lac} (*lactis* species) and P_{cre} (*cremoris* species). A region with no polymorphism was used for the design of primers (F-*gadB* and R-*gadB*) and a consensus probe P_{tot} *L. lactis* group-specific (**Figure 1A**). Because the droplet reader

TABLE 2 | Primers/probe(s) sets targeting the *gadB* and *citD* genes of *L. lactis* and *L. cremoris* species.

Target gene	Target genotype	Primer or probe name	Sequence (5'–3')	Amplicon or probe length (bp)
<i>gadB</i>		Forward F- <i>gadB</i>	TGGAAAATGAAATCATTCAACG	149
		Reverse R- <i>gadB</i>	ATATGTTTTATTTCAGGTTTCCT	
	<i>lactis</i>	P_{lac}	FAM -TTATTTA+ A +AGC+ CTCA ATTGCTTCTTG-BHQ1	26
	<i>cremoris</i>	P_{cre}	FAM -TTATTTA+ G +TGC+ ATCA ATTGCTTCTTG-BHQ1	26
	<i>lactis</i> and <i>cremoris</i>	P_{tot}	HEX -ACATAGTTAAA+ T + G + CCAT ATTCATCC-BHQ1	25
<i>citD</i>		Forward F- <i>citD</i>	TGGTAAGCAAATCGAGGC	134
		Reverse R- <i>citD</i>	CACGTTCCACTACCGC	
	biovar diacetylactis	P_{cit}	FAM -AGCTTATGCCATTGAAAATGCGGAC-BHQ1	25

HEX, hexachlorofluorescein; FAM, 6-carboxyfluorescein; BHQ, black hole quencher; +N in bold, locked nucleic acid, also corresponding to SNPs positions in P_{lac} and P_{cre} FAM-probes.

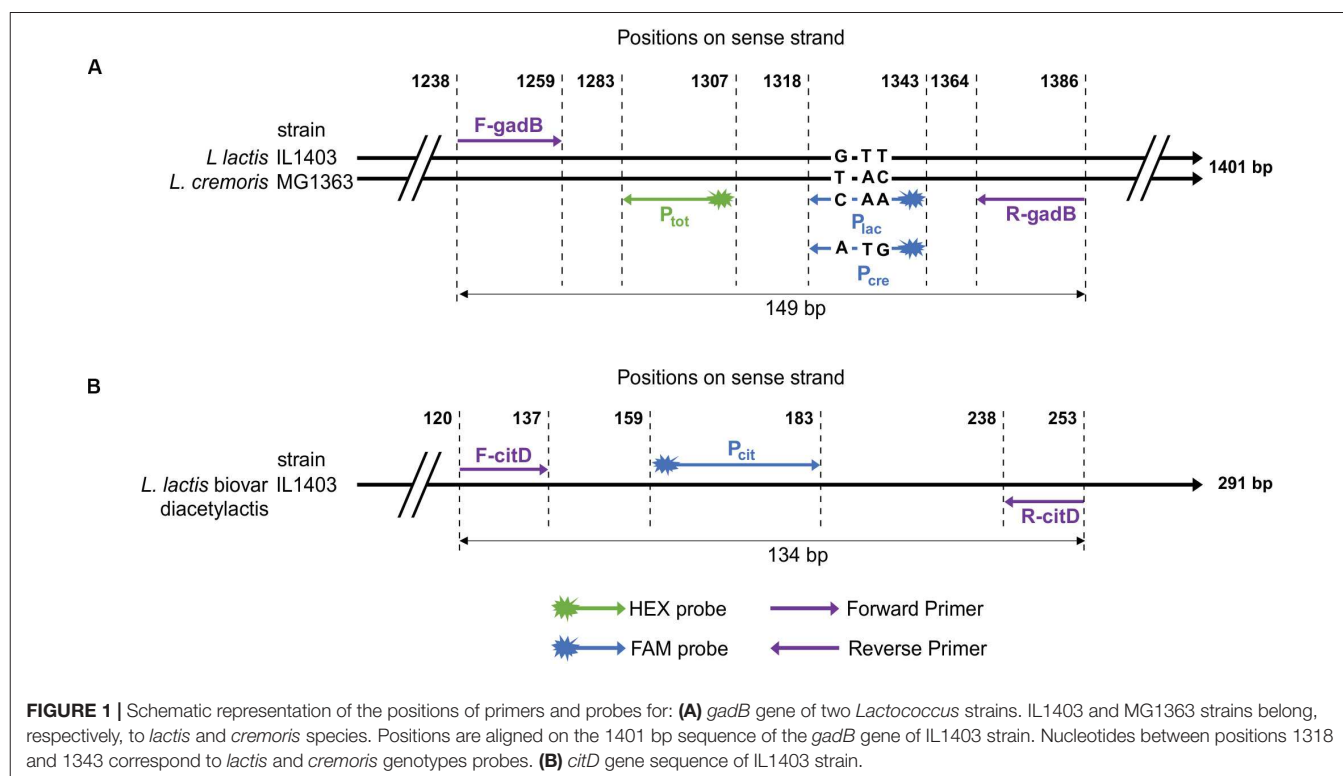


FIGURE 1 | Schematic representation of the positions of primers and probes for: **(A)** *gadB* gene of two *Lactococcus* strains. IL1403 and MG1363 strains belong, respectively, to *lactis* and *cremoris* species. Positions are aligned on the 1401 bp sequence of the *gadB* gene of IL1403 strain. Nucleotides between positions 1318 and 1343 correspond to *lactis* and *cremoris* genotypes probes. **(B)** *citD* gene sequence of IL1403 strain.

allows fluorescence reading at two wavelengths, duplex reactions were tested (FAM-P_{lac} and HEX-P_{tot} or FAM-P_{cre} and HEX-P_{tot} probes) to detect and determine the proportions of each species in the total *Lactococcus lactis* population present in a sample.

Most descriptions of the biovar diacetylactis include citrate-utilizing strains. This metabolism has been investigated in detail in the dairy strain CRL264 (Zuljan et al., 2016). The citrate is transported by the plasmid-encoded citrate permease CitP, after which its transformation into oxaloacetate and pyruvate is mediated by a chromosomal cluster encoding *citDEFXG* and *citM*, respectively (de Felipe et al., 1995). The *citD* gene encoding the citrate lyase acyl carrier protein was targeted to identify and quantify this biovar. This gene sequence is highly conserved among the biovar and regions with no polymorphism were chosen to design primers, R-*citD* and F-*citD*, and a FAM-probe, FAM-P_{cit}, from 11 sequences retrieved from the GenBank database (Figure 1B and Supplementary Table S2).

Test Development

A thermal-gradient from 65°C to 55°C was used to establish the optimal hybridization temperature. Each set of primers/probe(s) was tested on both target and non-target strains and gradient results were compared. A temperature of 59°C that specifically dissociated specific positive droplets from the negative ones was chosen for all primers/probe(s) sets.

Specificity of Probes

The specificity of primers and probes was tested first *in silico* using the Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool³.

³<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Specificity was then further tested experimentally using DNA from samples of target and non-target species (Table 1). The selected non-target species corresponded to phylogenetically closely related species or species commonly present in the dairy environment. Firstly, the test was conducted at 59°C on 15 non-target strains belonging to *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc faecium*, and *Leuconostoc lactis* species. No cross amplification was detected in any of the three primers/probe(s) sets. Next, 27 target strains (16 *L. cremoris* and 11 *L. lactis* among which 4 biovar diacetylactis) were tested for each primers/probe(s) set. P_{tot}, P_{lac}, P_{cre}, and P_{cit} only showed positive results with their target strains, thereby confirming the specificity of the probes.

Comparison Between Singleplex and Duplex Assays

As the test was designed to quantify the ratio of each species among the total *L. lactis* group, two probes were mixed in duplex in the reaction. The aim was to check whether the quantification of one specific target (P_{lac} or P_{cre}) is affected by the presence of the consensus target (P_{tot}) and *vice versa*. Five technical replicates were tested for *L. lactis* EIP33F strain and for *L. cremoris* HER1205 strain, with P_{lac}, P_{cre}, and P_{tot} in singleplex (a specific probe and a consensus probe in two different wells) or in duplex (a specific probe plus a consensus probe in the same well). For each probe or pair of probes, no significant variation of the measured target copy number was observed between the duplex and the singleplex assays (Table 3). The difference between the duplex and the singleplex average values was lower than the coefficient of

variation representing inter-well variation in the same condition (duplex or singleplex).

Limits of Detection (LoD) and Quantification (LoQ)

Limits of detection and quantification were determined by testing five DNA dilutions of a mixture containing the two species *lactis* (including the biovar *diacetylactis*) and *cremoris*. Each measurement was carried out in triplicate. For data analysis, the merge well function of QuantaSoft software was used to allow a more reliable, precise and accurate quantification based on “mega-wells” data, thus taking both intra- and inter-well variability into account.

As no significant differences were found between singleplex and duplex assays, P_{lac} and P_{cre} probes were used in duplex with P_{tot} probe. LoD corresponds to the lowest value of copies per microliter detected. It was defined as at least five positive droplets detected per well since the maximum number of positive droplets detected in negative controls was 4 (Table 4). For all probes, LoD was reached at dilution 3 with 11.6, 18.2, 9.5, 17.2 and 3.6 copies/ μ l, respectively, for P_{lac} , P_{tot} (duplex with P_{lac}), P_{cre} , P_{tot} (duplex with P_{cre}) and P_{cit} probes (Table 4). LoQ corresponds to the lowest target concentration quantified when specific positive droplets detected allow an accurate and reliable Poisson-estimated value with a deviation of the 95% confidence interval values from the estimated value <25% (Table 4). The 95% confidence interval is calculated from three technical replicates of merged wells. For P_{lac} , P_{cre} and P_{cit} probes, LoQ is reached at dilution 2, respectively, with 98, 74 and 26.1 copies/ μ l present in the tested dilution. Indeed, at next dilutions, numbers 3, 4 and 5, the deviation of the highest and lowest values of the 95% CI from the estimated value was >25% (Table 4). For P_{tot} , the deviation of the highest value of the 95% CI from the Poisson estimated concentration was > 25% (26% for P_{tot} in duplex with P_{lac} and with P_{cre}) but the deviation of the lowest value of the 95% CI from the estimated concentration was <25% (22% for P_{tot} in duplex with P_{lac} and with P_{cre}). As the strength of duplex assays is obtaining a reliable and accurate ratio value of *lactis* or *cremoris* targets for the entire *Lactococcus* population, LoQ

values of 176 and 166 copies/ μ l for P_{tot} in duplex with P_{lac} and P_{cre} , respectively, were retained, thus ensuring a quantification variability strictly below 25%.

Test Validation on Reconstituted Starters

The accuracy and reliability of the FAM/HEX ratios were validated on three independently repeated experiments using reconstituted starters with known proportions of each species and the biovar. IL1403 (species *lactis* biovar *diacetylactis*) and S72 (species *cremoris*) strains were mixed at ratios of IL1403 to S72 of 5:95, 20:80, 50:50, 80:20, and 95:5. For each mixture, the attempted proportions of IL1403 and S72 strains were confirmed with both duplex assays P_{lac}/P_{tot} and P_{cre}/P_{tot} (Figure 2). Moreover, IL1403 strain proportions were also confirmed with the P_{cit} probe. These results highlight the accurate and reliable detection and relative quantification of the two species and the biovar with this test.

Monitoring *Lactococcus* Populations During the Milk Fermentation Process: Effect of Temperature and pH on the Balance of the Two Species and the Biovar

During the milk fermentation process, MM100 starter was described for *Lactococcus* populations considering temperature and pH conditions. The proportions of the two species *lactis* and *cremoris* were measured among the total *Lactococcus* population, and the biovar *diacetylactis* was analyzed regarding *lactis* species population. Table 5 lists descriptive statistics for the populations quantified. Acidification kinetics were also measured, and the pH curves revealed different activity depending on the temperature (Figure 3), with maximum acidification rates of -0.282 and -0.48 UpH/h at 22°C and 35°C , respectively. T0 refers to the initial state before growth, and T1 and T2 correspond to fermentation times when pH reached 4.5 and 4.3, respectively. At 22°C , T1 was reached after 22 h of fermentation and T2 after 47 h, and at 35°C , T1 was reached after 9 h and T2 after 19 h

TABLE 3 | Comparison between singleplex and duplex assays.

Probe	Assay	Target species	Average concentration of five replicates (copies/ μ l)	Coefficient of variation representing inter-wells variation (%)	Deviation between duplex and singleplex average values as a % of the duplex value
P_{cre}	Duplex	<i>cremoris</i>	1748	5.1	0.46
	Singleplex	<i>cremoris</i>	1756	4.1	
P_{lac}	Duplex	<i>lactis</i>	1480	6.2	2.6
	Singleplex	<i>lactis</i>	1442	7.1	
P_{tot}	Duplex with P_{lac}	<i>lactis</i>	1494	6.1	4.6
	Singleplex	<i>lactis</i>	1426	11	
	Duplex with P_{cre}	<i>cremoris</i>	1748	5.1	1
	Singleplex	<i>cremoris</i>	1730	2.3	

For duplex tests, P_{cre} and P_{lac} probes were in the presence of P_{tot} probe. Concentrations correspond to values in the original DNA sample tested. The range of DNA concentrations was selected to ensure the theoretical number of copies per microliter included in the non-saturating range of target recommended for ddPCR experiments. The coefficient of variation, in%, was calculated from five technical replicates following this formula: (standard deviation/average) $\times$ 100. Deviation between singleplex and duplex values, expressed as the% of the duplex concentration, is the ratio of the difference between singleplex and duplex average concentrations on the duplex average value. The *cremoris* and *lactis* species targets tested were, respectively, HER1205 and EIP33F strains.

TABLE 4 | Determination of LoD and LoQ values for the four probes.

Probe	Dilution number	Poisson estimated concentration (copies/ μ l)	Highest value of the 95% CI (copies/ μ l)	Lowest value of the 95% CI (copies/ μ l)	Deviation of the 95% CI highest value from the Poisson estimated value	Deviation of the 95% CI lowest value from the Poisson estimated value	Number of positive droplets/well
P_{lac}	1	963	993	933	3%	3%	1343
	2	98	107	88	9%	10%	141
	3	11.6	15.4	8.5	33%	27%	17
	4	1.1	2.3	0.4	109%	64%	2
	5	0.7	1.7	0.2	143%	71%	1
	NC						1
P_{tot} (duplex with P_{lac})	1	1651	1692	1611	2%	2%	2237
	2	176	188	163	7%	7%	253
	3	18.2	22.9	14.2	26%	22%	26
	4	1.9	3.4	0.9	79%	53%	3
	5	0.9	2.1	0.3	133%	67%	1
	NC						4
P_{cre}	1	787	814	760	3%	3%	1106
	2	74	82	67	11%	9%	108
	3	9.5	12.9	6.8	36%	28%	14
	4	1.7	3.1	0.8	82%	53%	2
	5	0.9	2.2	0.3	144%	67%	1
	NC						0
P_{tot} (duplex with P_{cre})	1	1754	1794	1713	2%	2%	2366
	2	166	177	154	7%	7%	239
	3	17.2	21.7	13.4	26%	22%	25
	4	2.5	4.2	1.3	68%	48%	4
	5	0.9	2.2	0.3	144%	67%	1
	NC						1
P_{cit}	1	243	258	229	6%	6%	350
	2	26.1	30.7	21.5	18%	18%	38
	3	3.6	5.7	2.1	58%	42%	5
	4	1.3	2.6	0.5	100%	62%	2
	5	1.1	2.4	0.4	118%	64%	2
	NC						3

Dilution numbers correspond to the five dilutions tested with a factor of 10 between each. NC stands for Negative Control tested for each duplex (P_{lac}/P_{tot} and P_{cre}/P_{tot}) or singleplex (P_{cit}) assay. The number of positive droplets per well is given for each NC and was reduced, for each sample, to a single well value, based on the merged values of three wells: the number of positive droplets from each "mega-well" was divided by the ratio of the total number of accepted droplets of the "mega-well" to the total number of accepted droplets of the "more positive" NC. The positive threshold is above 4 positive droplets per well, with values < 4 in red. LoQ values are in bold, with their corresponding 95% confidence intervals. Percentage deviation of the highest and lowest values of the 95% CI from the Poisson estimated value > 25% are in red.

(Figure 3). We considered the cells remained under acid stress between T1 and T2. Figure 4 shows changes in the populations of *lactis* and *cremoris* species and biovar diacetylactis during the milk fermentation process under different temperature and pH conditions. The results of the ANOVA and of the *post hoc* test for the contrast of interest are listed in Supplementary Table S3. At T0, the mesophilic starter was dominated by the *lactis* species strains (75%). Among this population, 21% belonged to biovar diacetylactis. Strains of *cremoris* species represented 28% of the total *Lactococcus* population (Figures 4A–D and Table 5).

At 35°C, there was no statistically significant difference in the proportions of either *lactis* or *cremoris* species between T0 and T1 ($p = 1$ and $p = 0.083$, respectively). This confirms that the

P_{lac}/P_{tot} and P_{cre}/P_{tot} ratios are conserved under recommended conditions of use. At 22°C, the balance of the two species between T0 and T1 was significantly modified ($p < 0.001$) with P_{lac}/P_{tot} and P_{cre}/P_{tot} ratios of 56% and 44%, respectively (Figures 4A,B and Table 5). At this temperature, the growth of *cremoris* species seems to be promoted whereas there was a decrease in populations of *lactis* species, probably leading to modified organoleptic features in the fermented product.

At 35°C, after a period of acid stress (T2), the population balance was significantly modified compared to in T1, with respectively, 53% and 48% of *lactis* and *cremoris* species ($p < 0.001$). In this starter, *cremoris* species strains were seen to be more resistant to the acid stress than *lactis* species strains.

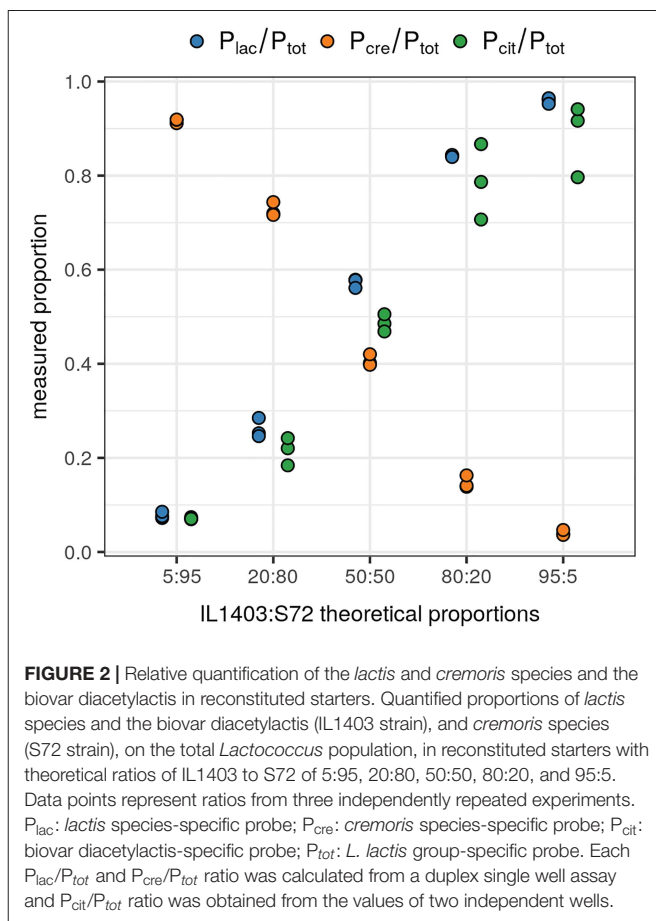


TABLE 5 | Descriptive statistics for the quantified populations of the *lactis* and *cremoris* species and the biovar diacetylactis during the milk fermentation at two temperatures.

Condition	Time	n	P_{lac}/P_{tot}			P_{cre}/P_{tot}			P_{cit}/P_{lac}		
			Mean	SD		Mean	SD		Mean	SD	
22°C	Initial										
	T0	6	0.75	0.047	6	0.28	0.042	6	0.21	0.039	
	T1	8	0.56	0.022	8	0.44	0.036	8	0.07	0.014	
35°C	T2	6	0.55	0.041	6	0.45	0.042	6	0.07	0.004	
	T1	9	0.77	0.007	9	0.22	0.01	9	0.06	0.011	
	T2	6	0.53	0.043	6	0.48	0.043	6	0.24	0.051	

P_{lac}/P_{tot} , P_{cre}/P_{tot} and P_{cit}/P_{lac} ratios were quantified at the start of the fermentation (T0) and when pH reached 4.5 (T1) and then 4.3 (T2) during growth at two different temperatures, 22°C and 35°C. Each P_{lac}/P_{tot} and P_{cre}/P_{tot} ratio was calculated from a single well of a duplex assay and the P_{cit}/P_{lac} ratio was obtained from values of two independent wells. The number of independently repeated experiments (n), the mean and standard deviation (SD) of the ratios are reported.

In contrast, at 22°C, no statistically significant effect of pH on the population balance was found, the proportions under acid stress conditions remained approximately the same with $P_{lac}/P_{tot} = 55\%$ and $P_{cre}/P_{tot} = 45\%$ ($p = 1$). A two-way ANOVA on P_{lac}/P_{tot} and P_{cre}/P_{tot} ratios revealed a significant interaction

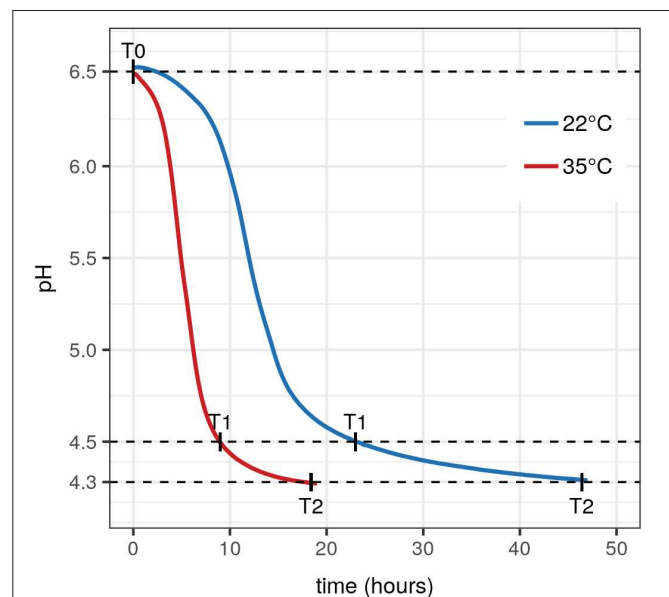


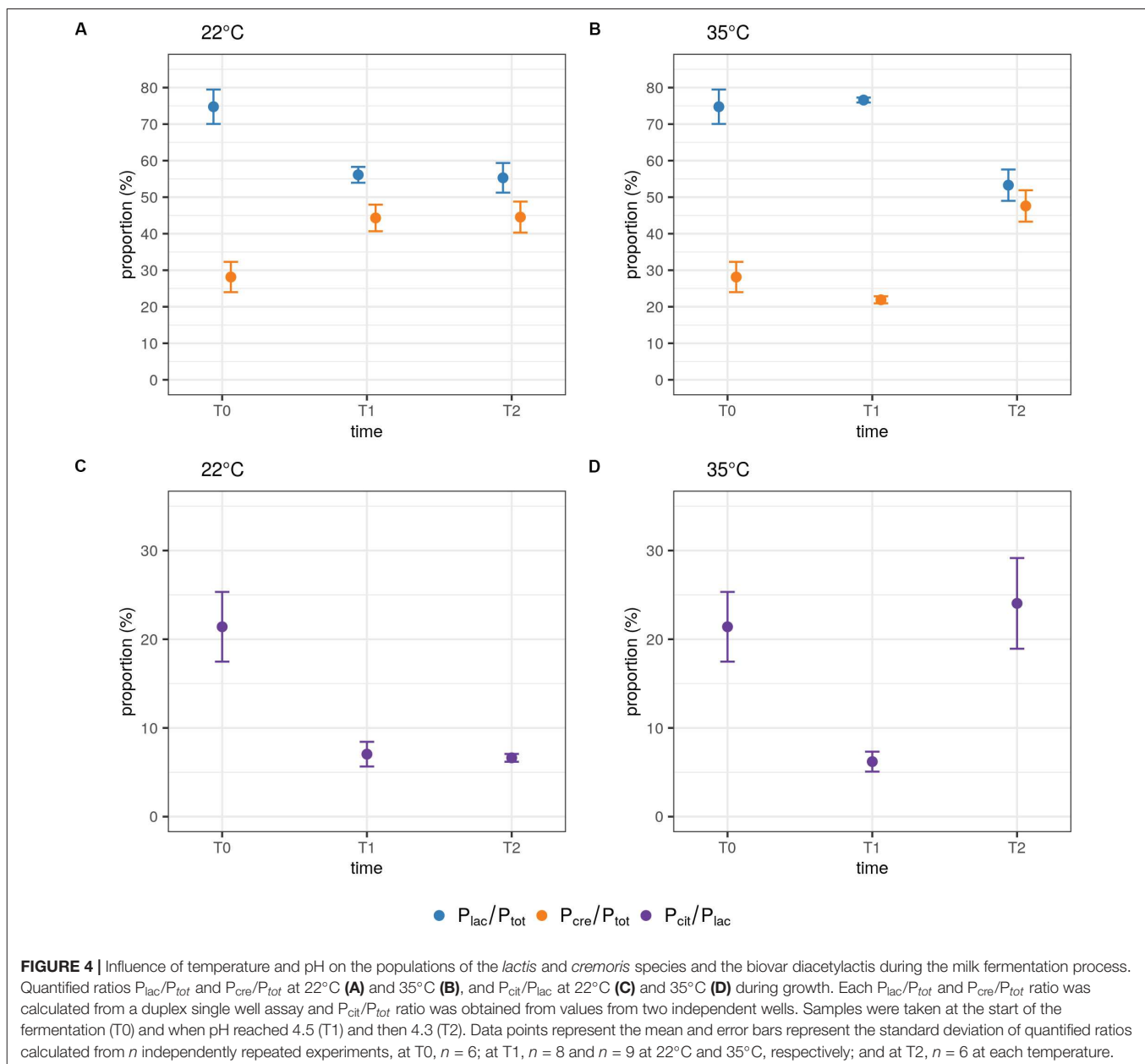
FIGURE 3 | Acidification kinetics of MM100 starter during milk fermentation. Acidification curves of MM100 during milk fermentation at 22°C (blue curve) and 35°C (red curve). Each curve is the average of two pH kinetics from two independent cultures. T0, start of the fermentation after inoculation, T1 and T2, times when pH reached 4.5 and then 4.3.

effect between pH and temperature [$F(1,25) = 105.14$, $p < 0.001$ and $F(1,25) = 100.54$, $p < 0.001$, respectively]. At T1, a significant difference between the ratios was found between 22°C and 35°C ($p < 0.001$, for both ratios); however, at T2, the temperature had no significant effect on P_{lac}/P_{tot} and P_{cre}/P_{tot} ratios ($p = 0.633$ and $p = 0.413$, respectively; **Figures 4A,B**).

The aromatic signature is due to the biovar diacetylactis strains, which represented 21% of the *lactis* species strains and hence 15% of the total population. At T1, the percentage of these strains dropped significantly to 7% and 6% of the *lactis* species population at 22°C and 35°C, respectively ($p = 0.006$, **Figures 4C,D**). In contrast, under acid stress conditions (T2), the percentage of biovar diacetylactis strains depended on temperature. At 35°C, this proportion increased to 24% ($p = 0.012$) suggesting a greater capacity for diacetyl production at this step of the process, while at 22°C, pH had no significant effect on P_{cit}/P_{lac} ratio ($p = 1$), and the percentage remained at 7% (**Figures 4C,D**).

DISCUSSION

L. lactis and *L. cremoris* are widely used in starters for fermented dairy foods. As the two species have distinct genomic and phenotypic features, their respective proportions must be finely tuned throughout the design of the starters. Interactions between the two species probably occur during dairy fermentation, and the technological process used could change the balance between populations, thereby affecting the properties of the final product (Mills et al., 2010; Kelleher et al., 2017). Moreover, among



lactis species, the biovar diacetylactis determines the specific aroma through the production of diacetyl. It is thus of primary importance to monitor each population's dynamics. Different species- and biovar-specific PCRs have been proposed (Beimfohr et al., 1997; Corroler et al., 1999). qPCR assays using the *tuf* gene as target have been developed to quantify *L. lactis* group in cheese samples (Achilleos and Berthier, 2013). However, this method cannot selectively distinguish between *lactis* and *cremoris* species and the biovar. PCR-RFLP of the glutamate decarboxylase gene (*gadB*) has been proposed to distinguish the two species (Nomura et al., 2002), but this does not allow quantification and requires the strains to be isolated. With this aim in view, we identified three specific SNPs in the *gadB* gene and used them to design two species-specific probes. A third probe, *lactis*

group-specific, in the same amplified fragment, enabled us to calculate the ratio of each species among the total population of *L. lactis* group in a duplex reaction. Both sets of primers and probes were tested on a panel of *L. lactis* and *L. cremoris* strains as well as on the species usually found in milk and dairy products. The target DNA was easily differentiated from the non-target DNA. As the populations were quantified, LoQ and LoD were defined for all the probes by testing several dilutions of a fermented milk sample. Depending on the probe, LoD values ranged from 3.6×10^3 to 1.8×10^4 copies/ml and LoQ values were 10 times higher. Considering the milk matrix, our results agree with the dynamic ranges of target determination encountered in dairy matrices like cheese using quantitative PCR (Zago et al., 2009).

Biovar diacetylactis is usually used by dairy manufacturers due to its capacity to produce diacetyl and acetoin, two aroma compounds associated with creamy and buttery flavors. The *citP* gene is highly valued as a molecular marker of this biovar. But the plasmid encoding CitP is sometimes missing while the chromosomal cluster *citDEFXG* is highly conserved among the strains that produce diacetyl (Passerini et al., 2013; Torres Manno et al., 2018). For that reason, the *citD* chromosomal gene encoding the citrate lyase was chosen as target to highlight the diacetylactis biovar. As few sequences are currently available in the databases, it will be necessary to update primers and probe with data accumulated in the coming years.

The specific objective of this study was to demonstrate that the *gadB* and *citD* targets described above can be used in digital droplet PCR assays to determine the proportions of the two species and the biovar in a starter or a dairy product. In contrast to qPCR, no standard curve with an external DNA calibrator is required and ddPCR shows little susceptibility to the inhibitors usually present in food matrices like dairy products (Morisset et al., 2013). With this approach, we analyzed species variations in a mesophilic starter called MM100 entirely composed of *Lactococcus* strains. First, we confirmed the microbial composition of the starter with 75% and 28% of *lactis* and *cremoris* species, respectively. Biovar diacetylactis was present at a ratio of 15% of the whole starter, a conventional ratio for such starters (Carr et al., 2002). Next, we analyzed variations in these ratios during the fermentation process as a function of the temperature and the pH. At the temperature specified by the supplier (35°C), pH 4.5 was reached after only 9 h and the proportions of the two species did not change substantially. Usually at this temperature, growth of strains of the *cremoris* species with a *Cremoris* phenotype (the “true *Cremoris*”) is not promoted (Cavanagh et al., 2015b). Since this species is maintained, we hypothesize that these strains have a *Lactis* phenotype. As reported in the literature, the large metabolic capabilities of the *lactis* species, particularly in carbohydrate metabolism, may promote faster growth rate than the *cremoris* species (Kelleher et al., 2017). However, as lactose is the main carbohydrate in milk, this dairy environment is very well adapted to the *cremoris* species strains which have the necessary ability to break down this sugar (Wels et al., 2019). Moreover, several studies have shown that strains of the *lactis* species initially produce acid slowly (Herreros et al., 2003; Fusieger et al., 2020) and that, conversely, strains of the *cremoris* species usually produce better acidification than *lactis* species, both at the beginning and at the end of the fermentation (Nomura et al., 2006; Fernández et al., 2011). Hence, we hypothesize that strains of the *cremoris* species significantly reduce the pH during fermentation.

At 22°C, the ratios were modified, with respectively, 56% and 44% of *lactis* and *cremoris* species. *cremoris* species growth seems promoted at this temperature, counter to *lactis* species whose proportion decreased. This change probably has an impact on the characteristics of the final product, resulting in different organoleptic characteristics from those obtained at 35°C. Indeed, starters with a majority of strains of the *cremoris* species can cause less bitterness in some dairy products like Cheddar cheese

(Lee et al., 1996) compared to dairy products containing more *lactis* strains. This could be explained by different proteolytic systems in the two species. Comparative genome analysis identified an additional copy of *oppACBFD* operon encoding an oligopeptide transporter in most strains of the *cremoris* species, whereas only one operon has been described in most strains of the *lactis* species, and its functionality is unclear due to the presence of pseudogenes (Wels et al., 2019). Multiple genes for oligopeptides uptake should ensure more efficient degradation of peptides derived from milk.

Moreover, several strains of the *cremoris* species usually used in dairy starters display higher aminotransferase activity than their *lactis* counterparts (Kelleher et al., 2017). This is of particular importance in the fermented food industry because aminotransferases help developing flavor.

During acid stress, the proportions of the two species changed compared to their original proportions. Nevertheless, whatever the temperature, a balance was reached, and both species were present at the end of the process. This result is in agreement with the results of previous studies describing the persistence of the two species during cheese aging (Ruggirello et al., 2016). Moreover, *L. lactis* species is known to adapt its tolerance to acid stress conditions, especially by inducing responses during the exponential growth phase, allowing its survival under very low pH challenges (Frees et al., 2003). It is also worth noting that the proportion of biovar diacetylactis strains increases during the acid stress at 35°C. If this population is metabolically active at low pH, the citrate transport and its sequential conversion into pyruvate is probably induced (Martín et al., 2004). Excess pyruvate is rerouted toward the production of diacetyl/acetoin that adds flavor to the final product (García-Quintás et al., 2008). This pathway confers a competitive advantage in condition of pyruvate accumulation (Zuljan et al., 2014). These aroma compounds are neutral metabolites and their synthesis contributes to pH homeostasis, which could explain the increase in the ratio of diacetylactis to *lactis* species at low pH. However, this increase does not occur at 22°C, suggesting that the lower temperature may adversely affect the activity of the enzymes involved in this pathway. Nevertheless, it should be borne in mind that differentiating between DNA of live and dead cells is a main issue when detecting by culture-independent based molecular methods. The majority of disrupted dead cells was discarded in the supernatant during the centrifugation preceding the DNA extraction. To ensure the detection of intact cells only, the use of ethidium monoazide (EMA) or propidium monoazide (PMA) based on membrane integrity could be a possible optimization of the test. Moreover, dairy process could induce VNC state as already described for *L. lactis* group (Ruggirello et al., 2018). A RNA-based analysis such as RT-ddPCR will discard metabolically inactive populations.

CONCLUSION

We developed a classical ddPCR assay with fluorescent probes illustrating a proof of concept for the discrimination of populations of interest in dairy ecosystems. The primary objective

of our work was to target the *lactis* and *cremoris* species and the biovar *diacetylactis* that would be of considerable industrial interest. We demonstrated the applicability of the ddPCR to quantify these populations in starters and to monitor their variations during the fermentation step of a technological process like cheese making. This technology showed high tolerance to inhibitors arising from food matrices and one duplex assay allowed us directly to provide the ratio of each population.

Finally, this methodology could easily be adapted to identify different cellular states and specific sub-populations in complex ecosystems like raw milks or cheeses, thereby completing 16S metagenomics studies.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets presented in this study are included in the article/Supplementary Material.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M-LD-M, HT, and MC-B conceived the study. M-AC conceived the ddPCR design. MAB, MAu, and M-AC performed the experiments. IG performed the statistical analysis. M-LD-M, M-AC, HT, and MC-B analyzed the data and wrote the

manuscript. All authors read, corrected, and approved the final manuscript.

FUNDING

The project was supported by the CNIEL (*Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière*). M-AC has a grant from *Région Occitanie* and EI-Purpan. The funder was not involved in the study design, collection, analysis, interpretation of data, the writing of this article or the decision to submit it for publication.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to acknowledge support from the Genome and Transcriptome platform of Genopole Toulouse Midi Pyrénées, on which ddPCR work was performed. Our special thanks to J.-J. Maoret, F. Martins, and E. Lhuillier, from GeT-Santé, for their active support in the experiments and their wise advice.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01906/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Achilleos, C., and Berthier, F. (2013). Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. *Food Microbiol.* 36, 286–295. doi: 10.1016/j.fm.2013.06.024
- Beimfohr, C., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H. (1997). Rapid genotypic differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies and Biovar. *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 216–221. doi: 10.1016/S0723-2020(97)80068-9
- Billard, A., Laval, V., Fillinger, S., Leroux, P., Lachaise, H., Beffa, R., et al. (2012). The allele-specific probe and primer amplification assay, a new real-time PCR method for fine quantification of single-nucleotide polymorphisms in pooled DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1063–1068. doi: 10.1128/AEM.06957-11
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauder, S., Jaillon, O., Malarre, K., Weissenbach, J., et al. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 11, 731–753. doi: 10.1101/gr-1697r
- Carr, F. J., Chill, D., and Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28, 281–370. doi: 10.1080/1040-840291046759
- Cavanagh, D., Casey, A., Altermann, E., Cotter, P. D., Fitzgerald, G. F., and McAuliffe, O. (2015a). Evaluation of *Lactococcus lactis* isolates from nondairy sources with potential dairy applications reveals extensive phenotype-genotype disparity and implications for a revised species. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 3961–3972. doi: 10.1128/AEM.04092-14
- Cavanagh, D., Fitzgerald, G. F., and McAuliffe, O. (2015b). From field to fermentation: the origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiol.* 47, 45–61. doi: 10.1016/j.fm.2014.11.001
- Corroler, D., Desmasures, N., and Gueguen, M. (1999). Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 91–99. doi: 10.1007/s002530051368
- Day, E., Dear, P. H., and McCaughan, F. (2013). Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine. *Methods* 59, 101–107. doi: 10.1016/j.jymeth.2012.08.001
- de Felipe, F. L., Magni, C., de Mendoza, D., and López, P. (1995). Citrate utilization gene cluster of the *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*: organization and regulation of expression. *Mol. Gen. Genet. MGG* 246, 590–599. doi: 10.1007/BF00298965
- Elizaquivel, P., Sánchez, G., and Aznar, R. (2012). Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. *Food Control* 25, 704–708. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.12.003
- Fernández, E., Alegría, A., Delgado, S., Martín, M. C., and Mayo, B. (2011). Comparative phenotypic and molecular genetic profiling of wild *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains of the *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* genotypes, isolated from starter-free cheeses made of raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5324–5335. doi: 10.1128/AEM.02991-10
- Frees, D., Vogensen, F. K., and Ingmer, H. (2003). Identification of proteins induced at low pH in *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 293–300. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00104-1
- Fusieger, A., Martins, M. C. F., de Freitas, R., Nero, L. A., and de Carvalho, A. F. (2020). Technological properties of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* bv. *diacetylactis* obtained from dairy and non-dairy niches. *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.* 51, 313–321. doi: 10.1007/s42770-019-00182-3
- García-Quintáns, N., Magni, C., Mendoza, D., and de López, P. (1998). The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar *diacetylactis* is induced by acid stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 850–857.
- García-Quintáns, N., Repizo, G., Martín, M., Magni, C., and López, P. (2008). Activation of the diacetyl/acetoin pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* bv. *diacetylactis* CRL264 by acidic growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1988–1996. doi: 10.1128/AEM.01851-07
- Gobert, G., Cotillard, A., Fourmestraux, C., Pruvost, L., Miguet, J., and Boyer, M. (2018). Droplet digital PCR improves absolute quantification of viable lactic acid bacteria in faecal samples. *J. Microbiol. Methods* 148, 64–73. doi: 10.1016/j.mimet.2018.03.004
- Herreros, M. A., Fresno, J. M., González Prieto, M. J., and Tornadijo, M. E. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Int. Dairy J.* 13, 469–479. doi: 10.1016/S0958-6946(03)00054-2

- Kelleher, P., Bottacini, F., Mahony, J., Kilcawley, K. N., and van Sinderen, D. (2017). Comparative and functional genomics of the *Lactococcus lactis* taxon; insights into evolution and niche adaptation. *BMC Genom.* 18:267. doi: 10.1186/s12864-017-3650-5
- Kempler, G. M., and McKay, L. L. (1980). Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. diacetylactis. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 926–927.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Law, J. W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G., and Lee, L.-H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front. Microbiol.* 5:770. doi: 10.3389/fmicb.2014.00770
- Lee, K. D., Lo, C. G., and Warthesen, J. J. (1996). Removal of bitterness from the bitter peptides extracted from cheddar cheese with peptidases from *Lactococcus lactis* ssp. cremoris SK111. *J. Dairy Sci.* 79, 1521–1528. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(96)76512-8
- Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., Arar, K., and Fach, P. (2003). Evaluation of the performance of LNA and MGB probes in 5'-nuclease PCR assays. *Mol. Cell. Prob.* 17, 307–311.
- Martín, M. G., Sender, P. D., Peirú, S., de Mendoza, D., and Magni, C. (2004). Acid-inducible transcription of the operon encoding the citrate lyase complex of *Lactococcus lactis* Biovar diacetylactis CRL264. *J. Bacteriol.* 186, 5649–5660. doi: 10.1128/JB.186.17.5649-5660.2004
- Mills, S., O'sullivan, O., Hill, C., Fitzgerald, G., and Ross, R. P. (2010). The changing face of dairy starter culture research: from genomics to economics. *Int. J. Dairy Technol.* 63, 149–170. doi: 10.1111/j.1471-0307.2010.00563.x
- Morisset, D., Štebih, D., Milavec, M., Gruden, K., and Žel, J. (2013). Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR. *PLoS One* 8:e62583. doi: 10.1371/journal.pone.0062583
- Mouritzen, P., Nielsen, A. T., Pfundheller, H. M., Choleva, Y., Kongsbak, L., and Møller, S. (2003). Single nucleotide polymorphism genotyping using locked nucleic acid (LNA). *Expert Rev. Mol. Diagn.* 3, 27–38. doi: 10.1586/14737159.3.1.27
- Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., and Suzuki, I. (1999). Novel characteristic for distinguishing *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* from subsp. cremoris. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 49, 163–166. doi: 10.1099/00207713-49-1-163
- Nomura, M., Kobayashi, M., Narita, T., Kimoto-Nira, H., and Okamoto, T. (2006). Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *J. Appl. Microbiol.* 101, 396–405. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02949.x
- Nomura, M., Kobayashi, M., Ohmomo, S., and Okamoto, T. (2000). Inactivation of the glutamate decarboxylase gene in *Lactococcus lactis* subsp. cremoris. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2235–2237. doi: 10.1128/AEM.66.5.2235-2237.2000
- Nomura, M., Kobayashi, M., and Okamoto, T. (2002). Rapid PCR-based method which can determine both phenotype and genotype of *Lactococcus lactis* subspecies. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2209–2213. doi: 10.1128/AEM.68.5.2209-2213.2002
- Obis, D., Guillot, A., and Mistou, M. Y. (2001). Tolerance to high osmolality of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris* is related to the activity of a betaine transport system. *FEMS Microbiol. Lett.* 202, 39–44. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10777.x
- Parente, E., and Cogan, T. M. (2004). "Starter cultures: general aspects," in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology General Aspects*, eds P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, and T. P. Guinee (Cambridge, MA: Academic Press), 123–147. doi: 10.1016/S1874-558X(04)80065-4
- Passerini, D., Beltramo, C., Coddeville, M., Quentin, Y., Ritzenthaler, P., Daveran-Mingot, M.-L., et al. (2010). Genes but not genomes reveal bacterial domestication of *Lactococcus lactis*. *PLoS One* 5:e15306. doi: 10.1371/journal.pone.0015306
- Passerini, D., Laroute, V., Coddeville, M., Le Bourgeois, P., Loubière, P., Ritzenthaler, P., et al. (2013). New insights into *Lactococcus lactis* diacetyl- and acetoin-producing strains isolated from diverse origins. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 329–336. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.023
- Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., and Sohier, D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiol.* 28, 848–861. doi: 10.1016/j.fm.2011.02.008
- R Development Core Team (2005). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R foundation for statistical computing. Available online at: <https://www.R-project.org/>
- Ren, J., Deng, T., Huang, W., Chen, Y., and Ge, Y. (2017). A digital PCR method for identifying and quantifying adulteration of meat species in raw and processed food. *PLoS One* 12:e0173567. doi: 10.1371/journal.pone.0173567
- Ruggirello, M., Coccolin, L., and Dolci, P. (2016). Fate of *Lactococcus lactis* starter cultures during late ripening in cheese models. *Food Microbiol.* 59, 112–118. doi: 10.1016/j.fm.2016.05.001
- Ruggirello, M., Giordano, M., Bertolino, M., Ferrocino, I., Coccolin, L., and Dolci, P. (2018). Study of *Lactococcus lactis* during advanced ripening stages of model cheeses characterized by GC-MS. *Food Microbiol.* 74, 132–142. doi: 10.1016/j.fm.2018.03.012
- Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M. D., and Fischer, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related *Streptococci* to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 6, 183–195. doi: 10.1016/S0723-2020(85)80052-7
- Smit, G., Smit, B. A., and Engels, W. J. M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 591–610. doi: 10.1016/j.femsre.2005.04.002
- Smith, C. J., and Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67, 6–20. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x
- Spinnler, H. E., and Corrieu, G. (1989). Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *J. Dairy Res.* 56, 755–764. doi: 10.1017/S0022029900029332
- Strayer, A. L., Jeyaprakash, A., Minsavage, G. V., Timilsina, S., Vallad, G. E., Jones, J. B., et al. (2016). A multiplex real-time PCR assay differentiates four *Xanthomonas* species associated with bacterial spot of tomato. *Plant Dis.* 100, 1660–1668. doi: 10.1094/PDIS-09-15-1085-RE
- Tessonnière, H., Vidal, S., Barnavon, L., Alexandre, H., and Remize, F. (2009). Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 129, 237–243. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.027
- Torres Manno, M., Zuljan, F., Alarcón, S., Esteban, L., Blancato, V., Espariz, M., et al. (2018). Genetic and phenotypic features defining industrial relevant *Lactococcus lactis*, *L. cremoris* and *L. lactis* biovar. diacetylactis strains. *J. Biotechnol.* 282, 25–31. doi: 10.1016/j.biotech.2018.06.345
- Wang, M., Yang, J., Gai, Z., Huo, S., Zhu, J., Li, J., et al. (2018). Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of *Salmonella typhimurium* in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 266, 251–256. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.011
- Wels, M., Siezen, R., van Hijum, S., Kelly, W. J., and Bachmann, H. (2019). Comparative genome analysis of *Lactococcus lactis* indicates niche adaptation and resolves genotype/phenotype disparity. *Front. Microbiol.* 10:4. doi: 10.3389/fmicb.2019.00004
- Zago, M., Bonvini, B., Carminati, D., and Giraffa, G. (2009). Detection and quantification of *Enterococcus gilvus* in cheese by real-time PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 514–521. doi: 10.1016/j.syapm.2009.07.001
- Zuljan, F., Espariz, M., Blancato, V. S., Esteban, L., Alarcón, S., and Magni, C. (2016). Draft genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* bv. diacetylactis CRL264, a citrate-fermenting strain. *Genome Announc.* 4:15. doi: 10.1128/genomeA.01575-15
- Zuljan, F. A., Repizo, G. D., Alarcon, S. H., and Magni, C. (2014). α -Acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* contributes to pH homeostasis in acid stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 188, 99–107. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.017

Conflict of Interest: FG was employed by CNIEL.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Caillaud, Abeilhou, Gonzalez, Audonnet, Gaucheron, Coccagn-Bousquet, Tormo and Daveran-Mingot. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

4.2 Interactions intra-espèces au cours de l'évolution expérimentale d'un consortium de souches de *Lactococcus lactis*

4.2.1 Résumé de l'article 2

L'espèce *Lactococcus lactis*, caractérisée par une grande diversité génétique et phénotypique, regroupe des souches rencontrées dans diverses niches écologiques telles que les plantes, les animaux ou le lait. Alors que leur évolution et leur adaptation au sein de leur environnement sont bien décrites, les interactions métaboliques entre souches proches restent peu étudiées. Dans cette étude, nous avons construit un consortium de trois souches de *L. lactis* (souches 20, 13 et 33), présentant de la diversité au niveau génomique et phénotypique, afin d'étudier les interactions métaboliques intra-espèces durant leur évolution adaptative en lait stérile sur plus de 800 générations. Des descripteurs clés, suivis durant la croissance des souches seules ou en consortium, ont été utilisés pour construire un modèle mathématique dans le but d'expliquer la dynamique des souches au cours du temps. Des essais de ddPCR utilisant des sondes fluorescentes ont permis de quantifier spécifiquement chacune des souches au sein du consortium. La dynamique a montré la perte rapide de la souche 20, et la cohabitation des souches 13 et 33 au cours de l'évolution. La modélisation a ainsi été réalisée sur les deux souches en coévolution. Des hypothèses biologiques basées sur les métabolismes carboné et azoté et les cinétiques d'acidification ont conduit à un scénario des potentielles et majeures interactions influençant la croissance des souches. Une première phase de fluctuations a été apparentée à une adaptation, en particulier pour la souche 33 ayant montré une augmentation de sa production de lactate et de son relargage d'acides aminés. Cette souche a ainsi été considérée potentiellement plus résistante au stress acide et plus efficace pour la protéolyse que la souche 13. Après un mois d'évolution, les deux souches ont montré une cohabitation stable, avec la souche 33 comme souche majoritaire. Des interactions à la fois d'inhibition et de coopération ont permis d'expliquer cette cohabitation dans le temps. Un modèle basé sur la seule interaction d'inhibition de croissance due à l'accumulation de lactate produit par les deux souches n'a pas suffi à expliquer les données biologiques. L'introduction d'un phénomène de cross-feeding dans le modèle, où le relargage efficace d'acides aminés libres par la souche 33 bénéficie à la souche 13, a permis la bonne concordance entre simulation et données observées. Une amélioration du modèle, par exemple par l'ajout d'autres descripteurs pertinents, ainsi que de plus amples expérimentations pourraient conduire à l'établissement de modèles prédictifs de l'évolution de consortia d'intérêt.

Mots clés : évolution expérimentale, interactions, modélisation, *Lactococcus lactis*, métabolisme, adaptation, cross-feeding, lait

4.2.2 Stratégie de détection souche-spécifique par PCR digitale

Afin de suivre spécifiquement trois souches de l'espèce *lactis* en consortium, durant leur évolution expérimentale, nous avons ciblé un gène de ménage présentant de la variabilité allélique inter-souche. De précédents travaux ont montré que le gène *recN* présentait une grande diversité nucléotidique au sein de l'espèce *lactis*, permettant de représenter au mieux la diversité inter-souche (Passerini *et al*, 2010).

Les SNP associés aux trois souches au niveau de ce gène *recN* ont permis de dessiner trois sondes nucléotidiques spécifiques, et une sonde consensus. Ces sondes, utilisées en PCR digitale en gouttelettes, ont permis la quantification spécifique de chacune des souches au cours de leur évolution en consortium.

La dynamique de chaque souche parmi la population totale a été suivie au cours des repiquages successifs durant les 89 jours d'évolution expérimentale en lait.

4.2.3 Article 2: Evolution of a Consortium of *Lactococcus lactis* Strains in Milk: Intra-species Crosstalk Decoding by a Modelling Approach

EVOLUTION OF A CONSORTIUM OF *LACTOCOCCUS LACTIS* STRAINS IN MILK: INTRA-SPECIES CROSSTALK DECODING BY A MODELLING APPROACH

Marie-Aurore Caillaud et al.

ABSTRACT

Lactococcus lactis species is characterized by a large genetic and phenotypic diversity, with strains present in various ecological niches like plants, animals or milk. While their evolution and adaptation to their environment is well described, the metabolic interactions occurring between closely related strains remain poorly studied. In this study, we built a consortium of three selected strains of *L. lactis* (i.e. strains 20, 13 and 33), showing genomic and phenotypic diversity, to study intra-species metabolic interactions during its adaptive evolution in sterile milk over more than 800 generations. Key descriptors followed during the strains' growth alone or within the consortium were used to build a mathematical model to explain the strains' dynamics over time. Each strain was specifically quantified within the consortium in ddPCR assays using fluorescent probes. The dynamics showed the early loss of the strain 20, and the cohabitation of strains 13 and 33 over evolution. Modelling was thus carried out focusing on the co-evolving strains. Biological hypothesis based on carbon and free amino acids (FAA) metabolisms and acidification kinetics' parameters led to a scenario of likely interactions mainly influencing strains' growth. A first phase of fluctuation was related to adaptation phenomena, especially for the strain 33, which showed increased lactate production and FAA release. This latter was thus thought to be more resistant to acid stress and more efficient for casein proteolysis than the strain 13. After one month of evolution, the two strains cohabited stably and the strain 33 was dominant. Both inhibitory and cooperative interactions explained strains' cohabitation over time. Growth inhibition was mainly due to lactate accumulation produced by both strains, but was not sufficient to make the model fit to biological data. A cross-feeding phenomenon, where the strain 33 efficient FAA release benefited to the strain 13, was inferred and led to a model simulation in agreement with the observed data. Improvement of the model, for example by adding other key descriptors, and further experimental studies could lead to the construction of predictive models of evolving consortia of interest.

Keywords: experimental evolution, interactions, modelling, *Lactococcus lactis*, metabolism, adaptation, cross-feeding, milk

1. Introduction

For millennia, our history has shown the use of natural microbial communities to ferment diverse matrices, ensuring several roles like participate to foodstuffs' preservation or to ecological phenomena like wastewater treatment. The success of empirical practices or natural biological processes can be explained by three phenomena ensuring the robustness and stability of the ecosystem facing environmental fluctuations: i) resistance (unchanged microbial composition), ii) resilience (altered composition but return to the original state) or iii) functional redundancy (modified microbial composition with taxonomic groups sharing similar roles in the ecosystem functionality) (Allison & Martiny, 2008). Studying natural microbial communities corresponds to an overall approach taking into account the network of co-habiting species evolving into their environment. This so called top-down approach aim to understand microbial interactions, focusing on the functionality accomplished by the community, using metagenomics, transcriptomics and metabolomics tools describing the resultant phenotype carried out by such complex communities (Ghoul & Mitri, 2016). The metabolic heterogeneity resulting from the added pools of genes of these mixed communities allows accomplishing complex tasks through labor division. Nevertheless, these ecosystems remain black boxes because the community composition and its dynamics over time are poorly understood. Yet, studying the microbial enzymatic conversions carried out by these complex communities of mixed-species is of interest in the biotechnological field. However, the cohabiting populations are often not well characterized for their respective functions and produced metabolites of industrial interest are often not produced at a maximal yield, compared to yields reached with monocultures during monitored biotechnological processes (Ben Said & Or, 2017).

In the aim to study microbial interactions and functionalities in a defined and controlled environment, reasoned associations of chosen species or strains are used as simple ecosystems to decode the metabolic network and the functions arisen from these synthetic microbial consortia. This bottom-up approach allows accessing the structure and the dynamics of a consortium under specific conditions. As such constructed consortia models are far from what takes place in Nature, spatial and temporal scales cannot allow answering same questions than when studying the community in evolution in its environment (Jessup *et al*, 2004). Nevertheless, it can allow identifying necessary conditions to favor co-habitation and maximize the rate of the functional process carried out and thus, be useful to produce metabolites of biotechnological interest (Sgobba & Wendisch, 2019). Identifying interdependencies between

microbial partners, like different auxotrophies associated with a cross-feeding phenomenon, can help understanding the structure of the network and the type of interactions leading to a stable and robust system (Sgobba & Wendisch, 2019). Moreover, such nutritional behaviors can be considered as common patterns valid for other systems with similar structure and can be at the origin of well-founded hypothesis aiming to understand which social traits or metabolic features govern the system in a complex community (Xavier, 2011).

Dairy lactic acid bacteria (LAB) co-cultures are good examples of mixed-species' or –strains' ecosystems ensuring functions of technological interest in the food field. Microbial reasoned associations like starters constitute simple consortia relatively easy to reproduce in lab conditions. They allow studying metabolic interactions following technological and metabolic descriptors relevant for LAB growth in milk (Canon *et al*, 2020), like pH, carbohydrates substrates and products, aroma compounds or free amino acids. *Lactococcus lactis* species is a model LAB widely used as a starter of acidification in dairy fermentations like cheesemaking, and also for its capacities to enhance the flavor profile of end-products (Torres Manno *et al*, 2018; Fusieger *et al*, 2020; Kelly *et al*, 2010; Passerini *et al*, 2013). Milk matrix utilization by LAB is based on the ability to use lactose and breakdown caseins. The optimal growth of *L. lactis* strains depends on amino acids (AA) availability, especially because dairy strains are auxotrophic for many AA, and thus cannot sustain their AA requirement by their own biosynthesis (Chopin, 1993; Juillard *et al*, 1998). Strains' diversity for proteolytic system is thus a key feature when studying the metabolic network between members of a consortium implicated in a dairy technological process. Proteins' utilization in *L. lactis* growing in milk implicates the expression of the *prtP* gene, coding for an extracellular protease PrtP able to hydrolyze caseins (Bachmann *et al*, 2011; Ainsworth *et al*, 2014). Being often plasmid encoded, its loss can arise under favorable conditions of AA availability, leading to *prtP*- mutants' appearance. Caseins' breakdown constitutes the first step to the peptides' release, making them available for transport into the cell, via oligopeptide transporters, to be hydrolyzed into utilizable free AA within the cytoplasm (Steele *et al*, 2013). This functionality may confer a selective advantage for the protease-positive strains (*prtP*+), which can provide an available AA source for their own requirement. However, this functionality requires a metabolic cost for the *prtP*+ cells, and cheating protease-negative *prtP*- cells can take advantage of *prtP*+ cells in co-cultures, using as a public good peptides released in milk without any energy cost from the extracellular protease expression (Bachmann *et al*, 2011). In fact, by modelling the population's dynamics of *prtP*+ and *prtP*- cells in mixed milk cultures, Bachmann *et al* demonstrated that the

overall advantage of prtP⁺ cells vanishes when they are propagated at high cell densities (Bachmann *et al*, 2011). Whereas at low cell densities, prtP⁺ cells are more able to capture AA available in higher concentrations surrounding them, this leading to the prtP⁺ strains' maintain when being co-cultured with prtP⁻ strains. Moreover, the proteolytic system, including *prtP*, is regulated at transcriptional level by the pleiotropic CodY protein. In case of high peptides' concentration in the extracellular medium (i.e. due to PrtP activity), intracellular pool is powered and the accumulation of dipeptides containing isoleucine, leucine or valine branched chain AA, reflecting peptides' abundance, constitutes the intracellular signal activating the repressor CodY (Guédon *et al*, 2001a, 2001b). The regulatory mechanism governing the proteolytic system could be a way for cooperative cells to resist against cheaters invasion adapting behavioral strategies to maintain the useful proteolytic functionality (Cavaliere *et al*, 2017). Thus, during an experimental coevolution, the decrease of the prtP⁺ population, but not its extinction, and the increase of the prtP⁻ population would be expected. These interactions between prtP⁺ and prtP⁻ strains are not completely understood and have not yet been studied over generations during an adaptive evolution experiment. Yet, understanding the interactions that govern an ecosystem of interest is a key step to monitor the process and avoid fermentations' failure. In this aim, mathematical models can be helpful tools to understand the determinant features affecting the populations' dynamics and the social behavior, or to predict which interactions could settle over time considering specific process conditions. Predictive models main limitation is the applicability to other systems than the one used for the model establishment, because key features based on metabolic pathways and network are strain- or species-dependent and conditions-dependent. Nevertheless, it has been developed for food safety applications to predict spoilage microorganisms' growth, and methods were included in the database within the French national program of predictive microbiology Sym'Previus (Martens *et al*, 1999; Pinon *et al*, 2004). Anyway, metabolic models can both i) generate new knowledge from experimental data, and ii) hypothesize or predict system's structure and behavior from biological knowledge (Teusink & Smid, 2006). When it deals about controlling a fermentation process, models usually use equations based on microbial growth (i.e. growth rate, biomass yield and substrate affinity) (Teusink & Smid, 2006; Nielsen & Villadsen, 1992; Bachmann *et al*, 2011, 2016). In fact, availability of extracellular resources and intracellular resource allocation respectively determine the selection and the establishment of metabolic strategies (Bachmann *et al*, 2016). These models are built from the Monod and Herbert-Pirt

relations, that use phenomenological macroscopic parameters arising from molecular properties (Monod, 1949; Pirt & Hinshelwood, 1965).

The aim of this study was to decode the interactions between three selected strains of *Lactococcus lactis* in consortium during its adaptive evolution in milk over 800 generations. We focused on the main functionalities encountered in the dairy environment, studying in particular the nutritional social behaviors of two proteolytic strains (i.e. prtP+), including a citrate-consumer/diacetyl-producer strain, and one prtP- strain. We built a model adapted to this dairy environment to explain the strains' dynamics, which is modulated by the adaptive strategies adopted by the strains in the consortium, and to understand what kind of intra-species crosstalk can settle over the evolution.

2. Materials and methods

2.1. Microbial material and culture conditions

The *Lactococcus lactis* EIP33, EIP20A and EIP13A strains were isolated from goat raw milk. The EIP33 strain belongs to the biovar diacetylactis. For the experimental evolution, pre-cultures of *L. lactis* strains were grown at 30°C in M17 broth (BD Difco) reconstituted following the supplier's recommendations and added with D-glucose (VWR) at a concentration of 10 g/L. The cultures were grown in a skimmed milk (Sigma-Aldrich) reconstituted at 10% (w/v) and sterilized at 105°C during 30 minutes.

2.2. Construction of the consortium

The consortium was constructed as followed: the optic density at 580 nm (OD_{580nm}) of an overnight pre-culture of each strain was measured and the concentration of each culture was estimated from the graph $CFU/ml = f(OD_{580nm})$ on the basis of previous experiments. Pre-culture were mixed in such a way that the final concentration was due to 50%, 25%, 25% of EIP20A, EIP13A and EIP33 strains respectively (Figure 1).

2.3. Experimental evolution

At day 0, starting point of the evolution, three tubes containing 40 mL of sterile skimmed milk were respectively inoculated with each strain alone (i.e. strains 33, 13 and 20) and one tube was inoculated with the consortium. For the four tubes, an adequate volume of the pre-culture (strains alone) or the mixture (consortium) was added to obtain a final concentration of 1×10^7 cells/ μ l. Two independent experiments (a and b) were launched for the four tubes (Figure 1). The experimental evolution was carried out over 89 days with daily backslappings at 0.1% (v/v)

in a new fresh sterile skimmed milk. Every 24 hours, all fermented milks were homogenized during 30 seconds with the vortex. For each sample, 1 ml was stored at -20°C for HPLC analysis and 1 ml was mix with 9 ml of a 2.22% (w/v) trisodium citrate (Sigma-Aldrich) solution. After a first centrifugation at 5 000 rpm during 10 minutes, the supernatant was discarded and a second centrifugation during 5 minutes at 13 000 rpm was monitored to recover supernatant-free cells' pellets which were stored at -20°C until DNA extraction.

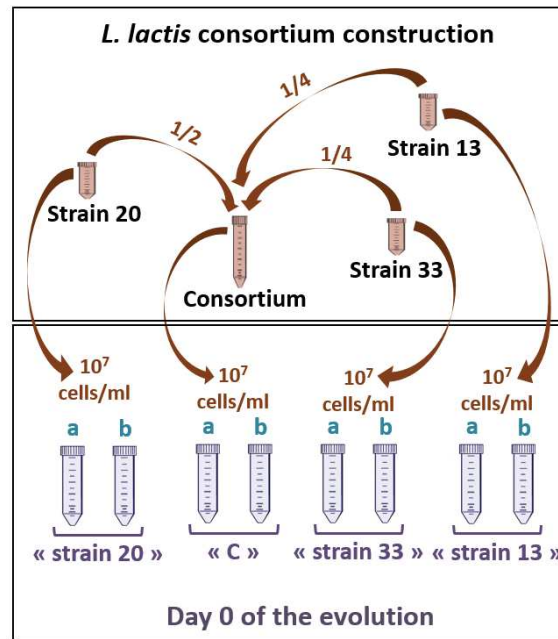


Figure 1. Consortium construction and starting day of the experimental evolution. Strain 20, strain 13 and strain 33 tubes correspond to pre-cultures in M17 broth added with glucose. The consortium corresponds to the mixture of these three pre-cultures, by adding the adequate volume of each strain to have 50%, 25% and 25% of strains 20, 13 and 33, respectively. At day 0 of the evolution, 10⁷ cells/ml of each culture were introduced in each 40ml skimmed milk tube.

2.4. DNA extraction

DNA extractions were carried out using the DNeasy PowerFood Microbial Kit (Qiagen) according to the supplier's instructions with the following modification: the cells' pellet was first resuspended in the MBL solution and incubated at 70°C during ten minutes. The genomic DNA concentration ($C_{ng/\mu l}$) was obtained by measuring the absorbance at 260 nm on a Nanodrop ND2000. For analysis convenience of the *L. lactis* consortium, $C_{ng/\mu l}$ was converted into $C_{copies/\mu l}$ according to the following equation: $C_{copies/\mu l} = N_a \times C_{ng/\mu l} \times 10^{-9} / (L \times 660)$, where N_a is the Avogadro constant ($6.02 \times 10^{23}/mol$), and L is the average size of a lactococcal genome (2.5×10^6 bp). This calculation provides only an estimated value in copies/ μl since A260

measurement depends on various factors and does not distinguish between intact and fragmented targets.

The DNA purity was evaluated by the ratio of the absorbance at 260 nm and 280 nm. Extracted DNA were diluted if needed and used at the appropriate concentration for ddPCR assays.

2.5. Digital droplet PCR assays

2.5.1. Primers and probes

The strains 20, 13 and 33 were quantified, within the consortium targeting, the *recN* gene in three different duplex ddPCR assays. The primers F-*recN* and R-*recN* allow the amplification of a 117 bp fragment with single nucleotide polymorphisms (SNP) specific to each strain.

Three fluorescent FAM-probes including the two SNP positions, P₂₀ P₁₃ and P₃₃ (respectively specific of strains 20, 13 and 33), were used, and an HEX-probe, P_{cons}, designed in a conserved region in the three strains' sequence (i.e. consensus probe), was added to each FAM-probe in duplex assays.

The copies' number per cell of *prtP* plasmidic gene was quantified for strains 13 and 33, alone and within the consortium. F-*prtP* and R-*prtP* allow the amplification of a 136 bp fragment with strain specific SNP. Two fluorescent HEX-probes including three SNP positions, P_{prtP13} and P_{prtP33} (respectively specific of strains 13 and 33), were used in duplex assays respectively with P₁₃ and P₃₃ FAM-probes targeting *recN*.

The primers' and probes' sequences and the amplicon size are listed in Table 1. Primers and probes were synthesized by Eurogentec (Angers, France) for *recN* gene, and by IDT (Belgium) for *prtP* gene. All oligonucleotides were diluted in ultra-pure water at the concentration of 100 µM and solutions were stocked at -20°C.

2.5.2. ddPCR procedure

ddPCR was performed with the QX200 AutoDG Droplet Digital PCR system (Bio-Rad) according to the protocol developed by (Caillaud *et al*, 2020), at the hybridization/elongation temperature of 60°C for all assays. Also replacing 1.1µl of nuclease free water by the same volume of 18µM *prtP* primers' set when quantifying *prtP* copies' number in fermented milks.

Table 1. Primers and probes targeting *recN* and *prtP* genes in *L. lactis* strains 20, 13 and 33.

Target gene	Target strain(s)	Primer or probe name	Sequence (5'-3')	Amplicon or probe length (bp)	Theoretical melting temperature (°C)
<i>recN</i>	Strains 20, 13 and 33	Forward F- <i>recN</i>	AGAACTGTCCGATGTGATG	117	60
		Reverse R- <i>recN</i>	TGAACTTGTGCAACTTTAACTG		60
	Strain 20	P ₂₀	FAM -CGGGTTC+AGAAAA+GGACTCA-BHQ1	20	68
	Strain 13	P ₁₃	FAM -TGACGGGTTC+AGAAAA+TGACTCAG-BHQ1	24	68
	Strain 33	P ₃₃	FAM -CGGGTTC+GGAAAA+TGACTCA- BHQ1	20	69
	Strains 20, 13 and 33	P _{cons}	HEX -CTGAGAGTT+CAAGTTGGA+CTTTCT- BHQ1	24	67
<i>prtP</i>	Strains 20, 13 and 33	Forward F- <i>prtP</i>	TTGGACCGGAAACCATTC	136	60
		Reverse R- <i>prtP</i>	CCTTTAGCGTCAGCAGTATAG		60
	Strain 13	P _{prtP13}	HEX -TCAGCAAAGGG+ G + CA +TTAGCC-IBFQ	20	65
	Strain 33	P _{prtP33}	HEX -TCAGCAAAGGG+ A + AA +GTAGCC-IBFQ	20	62

HEX: hexachlorofluorescein; FAM: 6-carboxyfluorescein; BHQ: black hole quencher; IBFQ: iowa black fluorescein quencher; +N in bold: locked nucleic acid, also corresponding to SNPs positions in P₂₀, P₁₃, P₃₃, P_{prtP13} and P_{prtP33} probes.

2.6. Acidification kinetics

For eight stages of the evolution (days 5, 12, 19, 32, 45, 59, 67 and 81), all fermented milks served to inoculate (0.1%, v/v) a 60 ml additional skimmed milk sample dedicated to pH kinetics' monitoring with the Cinac system (AMS Alliance) (Spinnler & Corrieu, 1989).

2.7. High Performance Liquid Chromatography

During the experimental evolution, fermented milks from 14 stages were analyzed for carbon and amino acids metabolisms. The concentrations of substrates (lactose and citrate) and fermentation end-products (lactate, formate, acetate, acetoin, diacetyl and ethanol) were determined by high performance liquid chromatography (HPLC, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) as previously described (Passerini *et al*, 2013). Free amino acids (FAA) concentrations in fermented milks' supernatants were also determined by HPLC. After addition of 40 µl of norvaline (15 mM) as an internal standard, proteins in the samples were precipitated by adding 4 volumes of methanol to 1 volume of the sample and incubating the mixture overnight at 4°C. The mixture was then centrifuged, and the supernatant was kept for amino acids' analysis as previously described (Laroute *et al*, 2016).

2.8. Modelling

Each 24 hours, fermentation process was characterized by a microbial growth including lag, exponential and stationary phases. In mathematical terms, this growth pattern can be translated into an ordinary differential equations' system, describing temporal evolution of the growth of a bacterial population converting a nutrient into biomass and by-products (Nielsen & Villadsen, 1992). *Lactococcus lactis* species is characterized by its ability to use the lactose and breakdown caseins to access amino acids for their growth requirement. Lactose metabolization leads to lactate production. The simplest microbial kinetics describing the reaction in a batch reactor is then given by:

$$\begin{aligned}\frac{dX}{dt} &= \mu X \\ \frac{dL}{dt} &= \alpha \mu X \\ \frac{dA}{dt} &= (\beta^+ - \beta^-) \mu X\end{aligned}\tag{1}$$

Where X denotes the biomass concentration of a given strain, L denotes the lactate concentration and A denotes the FAA concentration. Lactose was not explicitly described in

this model, as it was considered neither an inhibitor nor limiting in the milk during each batch experiment.

Growth rate μ and yields α , β^+ and β^- are central elements of the model. They were first used to exhibit the effect of the physiochemical parameters on the populations' dynamics and especially the inhibitory effect of the lactic acid production and the potential limitation by the FAA availability:

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{K_L^\gamma}{K_L^\gamma + L^\gamma} \right) \left(\frac{A}{K_A + A} \right) \quad (2)$$

More interestingly, they will be used to explain inhibitory and cooperative interactions between several strains in the consortium. Hill factor (i.e. γ value) represents this inhibition: high γ value corresponds to strong growth inhibition due to high lactate concentration. Parameter μ_{max} is the maximal growth rate, K_L is the lactate inhibition constant and K_A is a Monod constant relative to FAA.

Parameters' estimation reported in the model (1)-(2) was proceeded with a Nelder-Mead Simplex algorithm (Nelder & Mead, 1965) based on a least-squares optimization. Model for each strain was first estimated on 'pure-culture' before being adapted to the consortium condition. Matlab software was used to code the full estimation procedure.

2.9. Statistical analysis

(R Development Core Team, 2005). In order to make concentrations comparable between the three populations over time, values of all stages of the evolution were reduced centered for each variable (i.e. carbon metabolites and FAA).

Cinac data were analyzed using XLSTAT. A Student test was carried out to compare acidification parameters' mean values (from acquired data at eight stages of the evolution) between the strains 13 and 33 alone and the consortium.

3. Results

3.1. The experimental evolution

The aim of this study was to unravel the intra-species interactions that can arise from the coevolution of three selected *L. lactis* strains, especially metabolic interactions implicating AA metabolism between proteolytic and non-proteolytic strains. The adaptive laboratory evolution was chosen as experimental strategy to let the interactions take place over generations by serial propagation in sterile milk. In our culture conditions, *L. lactis* strains were able to give between 9 and 12 generations of cells every 24 hours, at each backslopping (i.e. a part of the fermented culture (0.1% v/v) was inoculated in a fresh sterile milk every day). This led to a total number of 800 to 900 generations during the 89 days' experimental evolution.

3.1.1. Strains' selection

In order to study metabolic interactions between coevolving *L. lactis* strains, i.e. interactions mediated by their nutritional behavior and the adaptive metabolic strategies adopted, we analyzed 26 *L. lactis* strains for genotypic and phenotypic criteria, relevant in dairy ecosystems. To avoid mutual growth inhibition by the production of inhibitory secondary metabolites like bacteriocins, the 26 strains were tested on solid medium for their growth compatibility. Focusing on proteolytic and non-proteolytic strains' interactions (i.e. prtP⁺/prtP⁺ and prtP⁺/prtP⁻) between phylogenetically related strains, also showing genomic and phenotypic diversity, implicated to select three strains, i.e. two prtP⁺ and one prtP⁻. Preliminary compatibility tests led to multiple three strains' combinations. Strains were thus screened for the presence of the *prtP* plasmidic gene encoding the extracellular protease PrtP allowing the caseins' breakdown. Lactose internalization capacity was also checked with the presence of the *lacE* gene, useful to grow in milk. Technological capacities, being of interest for the dairy fermentations' field and known to vary among strains, were considered to select strains with various acidification and aroma production phenotypes. Acidification features were investigated during kinetics, mainly the pH value reached after 24 hours of growth in milk, and the maximum speed of acidification, allowing distinguishing between efficient acidifying and low or non-acidifying strains. The other technological criterion screened was the capacity to metabolize the citrate. This metabolism, leading to the production of aroma compounds conferring buttery and nutty notes (i.e. diacetyl and acetoin), is of particular interest in dairy fermentations. We selected one strain owing the *citP* plasmidic gene and the *citDEF*

chromosomic gene, allowing internalization and metabolization of citrate respectively. Moreover, phylogenetically related strains were selected for their allelic diversity by referring to MLST analysis from previous works (Passerini *et al*, 2010). We chose strains with different sequence types, and from both environmental and domesticated clusters. All these criteria led to the selection of three strains, called 13, 20 and 33, showing an inter-strains' diversity at different levels (Table 2).

Table 2. Genetic, genotypic and phenotypic criteria for *L. lactis* strains' selection.

Strain	Genetic criteria (MLST analysis)		Genotypic criteria (Screening for key genes involved in milk metabolism)				Phenotypic criteria (acidification kinetics in milk)	
	Sequence Type	Cluster	Lactose	Caseins	Citrate		$\Delta\text{pH}_{24\text{h}}$ (UpH)	Maximum speed of acidification (UpH/h)
			<i>lacE</i>	<i>prtP</i>	<i>citDEF</i>	<i>citP</i>		
13	29	E	+	+	-	-	1.71	-0.219
20	26	E	+	-	-	-	0.11	-0.036
33	34	D	+	+	+	+	1.62	-0.201

E and D correspond to environmental and domesticated clusters respectively. + and – represent the presence or absence of the gene, respectively. Acidification kinetics were carried out on each strain during their individual growth in milk under the same conditions provided for the experimental evolution.

3.1.2. Strains' dynamics

Allelic diversity allowed us to specifically detect and quantify the three strains within the consortium. Indeed, the presence of single nucleotide polymorphisms (SNP) between the *recN* gene sequences (i.e. housekeeping gene included in the MLST analysis (Passerini *et al*, 2010)) of the three strains served as target region to design hybridization probes specific to each strain (i.e. P₂₀, P₁₃ and P₃₃ FAM-probes, targeting *recN* sequences of strains 20, 13 and 33 respectively). We used these probes in digital droplet PCR (ddPCR) assays. Regions without SNP were targeted to design primers and a consensus probe, P_{cons}, to calculate, in duplex assays, an accurate and precise ratio of each strain among the total population of the consortium. The strains' dynamics over the 89 days of experimental evolution (Figure 2) shows the rapid loss of the strain 20 (Phase 0, Figure 2). This result was checked adapting the ddPCR assay to low target's concentration and the absence of detection of the strain 20 was confirmed. Interestingly, the strain 20 evolving alone maintained its growth over the three months of evolution, showing active metabolism with lactate production all over the evolution (Supplementary Table S1). It seems that no positive interactions could take place early enough to maintain this strain in the

consortium, although the increase of this prtP⁻ strain, benefiting from the prtP⁺ strains present in high cells densities, could have been expected. Moreover, the decreasing proportion leading to its loss may illustrates a negative impact from strains 13 and 33 growth. Probably due to their high acidification rate and speed compared to strain 20 (Table 2). From day 3, only the two prtP⁺ strains 13 and 33 were detected, with dynamics revealing irregular variations, where strain 13 tends to decrease and strain 33 tends to increase (Phase 1, Figure 2). From day 27 to the end of the evolution (i.e. day 89), the two strains have coevolved stably (Phase 3, Figure 2), with strain 33 as the dominant member of the consortium, with observed proportions between 62 and 84% of the total consortium population (Figure 2). To note that 'a' and 'b' replicates show similar dynamics for the three phases, indicating the robustness of the evolution. In view of the present dynamics, we will study the interactions between strains 13 and 33 (i.e. Phases 1 and 2), with the aim to explain their cohabitation during the experimental evolution. Especially by decoding the interactions between two prtP⁺ populations, which, to our knowledge, have not yet been described in the literature.

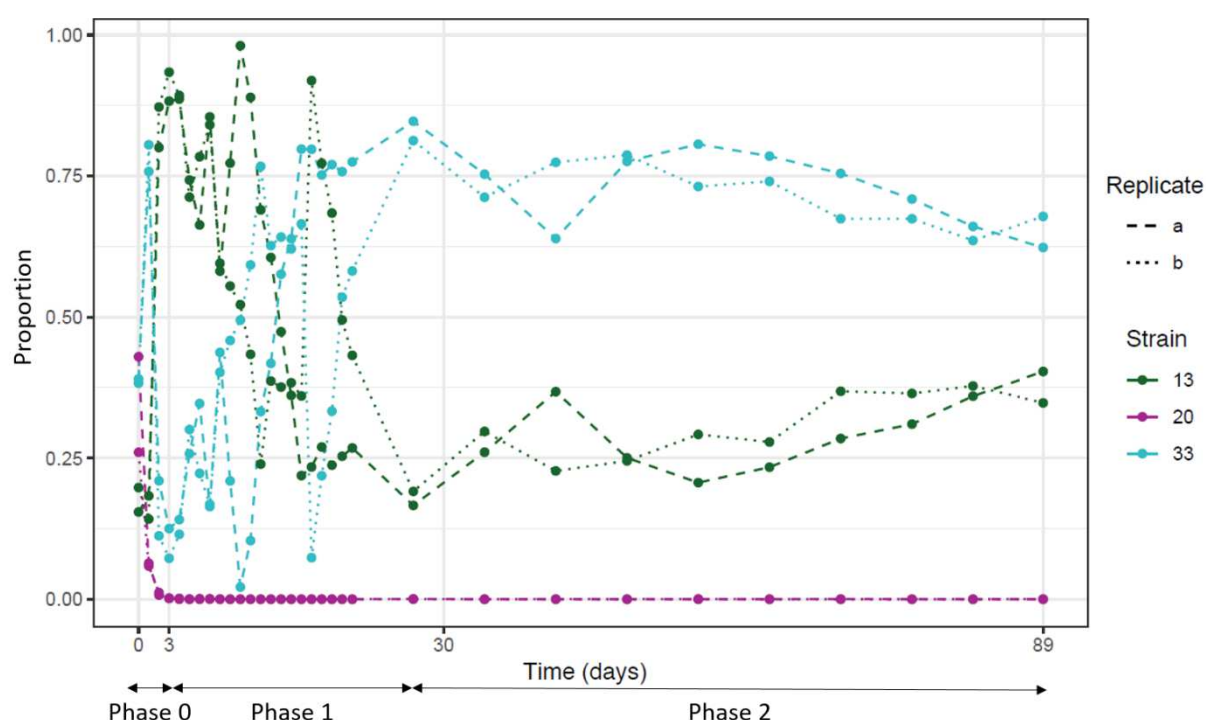


Figure 2. Strains' dynamics over the experimental evolution. The proportion of each strain among the total consortium's population was calculated by ddPCR analysis of the extracted DNA from 24 hours' fermented milks. Except for day 0, for which DNA came from unfermented milks at the initial state t₀. P_{20}/P_{cons} , P_{13}/P_{cons} and P_{33}/P_{cons} duplex assays respectively gave the proportion of strains 20, 13 and 33, calculated with the ratio of the absolute concentrations (i.e. in copies/ μ l) corresponding to 'specific targets/consensus targets'.

3.2. Construction of a mathematical model based on strains' growth

We choose to study strains 13 and 33 metabolic interactions by a modelling approach aiming to explain strains' dynamics over the evolution. Relevant biological descriptors were used to build the model, including i) regular colonies plate counting of 24 hours' fermented milks, ii) final pH (i.e. after the 24 hours' fermentation) measurement and 24 hours' acidification kinetics, and iii) metabolites' quantification of fermented milks (i.e. carbon substrates and products, and free amino acids (FAA)), for each individual strain and the consortium.

3.2.1. The analysis of experimental data from metabolism served to build biological hypotheses

We focused on central metabolism to highlight the main factors affecting the strains' growth. The profiles of each strain in pure culture gave information about their nutritional behavior in milk (Supplementary Table S1). Data from HPLC analysis were represented on a heatmap allowing to compare carbon metabolites and FAA dynamics over time between the three populations (i.e. each strain, 13 and 33, and the consortium) (Figure 3). The aim was to infer metabolic interactions, making biological hypothesis according to the strains' behavior when they evolved alone in comparison with the consortium profile, where they coexisted during the 89 days.

As the two strains have a mainly homolactic metabolism, producing almost exclusively lactate (i.e. lactic acid) from lactose fermentation (Supplementary Table S1), we considered that lactate production was relevant to compare lactose metabolism between the three populations. The strain 13 was identified to produce less lactate than the strain 33 and the consortium (Figure 3A, Supplementary Table S1). However, the strain 13 pH kinetics showed a higher capacity to acidify milk after a 24 hours' fermentation, with a significant higher $\Delta\text{pH}_{24\text{h}}$ value (Figure 4, Supplementary Figure S1A). This could illustrate, in strain 33, a better ability than strain 13 to regulate the pH in the medium, via acid stress resistance mechanisms' activation. This is notably the case with to the citrate metabolism present in the strain 33, allowing the decrease of the medium acidity due to the direct citric acid consumption. Indeed, the strain 33 pure culture showed citrate consumption, with an associated acetoin production (Figure 3A). This profile is also observed for the consortium. As the strain 33 is the only strain able to metabolize citrate, these results are in accordance with the dynamics observed in Figure 2, where the strain 33 coexists within the consortium all over evolution, and becomes predominant.

In the beginning of the evolution, an increase of the lactate production was observed for the strain 33, increasing from 70 to 82 mM during the phase 1 and then remaining quite constant around 79 mM in the phase 2 (Supplementary Figure S2). To note that the strain 13 showed a rapid increase of the lactate production between days 1 and 7 (from 48-58 up to 69 mM) to stay around the mean value of 67 mM after day 7 until day 89 (Supplementary Figure S2). It appears the changes settled more progressively for the strain 33 than for the strain 13.

Concerning amino acids metabolism (Figure 3B), the heatmap shows a global higher FAA release both by the strain 33 and by the consortium, compared to the strain 13. This observation is especially marked in the first month of the evolution in strain 33. The strain 13 released a low level of FAA, and notably leucine, valine, phenylalanine, isoleucine, tyrosine, alanine and citrulline, compared to the strain 33. The level of these amino acids is also lower in the consortium compared to the strain 33, except at day 28, revealing the likely consumption of the FAA released by the strain 33 by the strain 13. Such cooperative behavior, through public resources' providing, also called cross-feeding, could be a plausible interaction hypothesis between the two prtP⁺ strains.

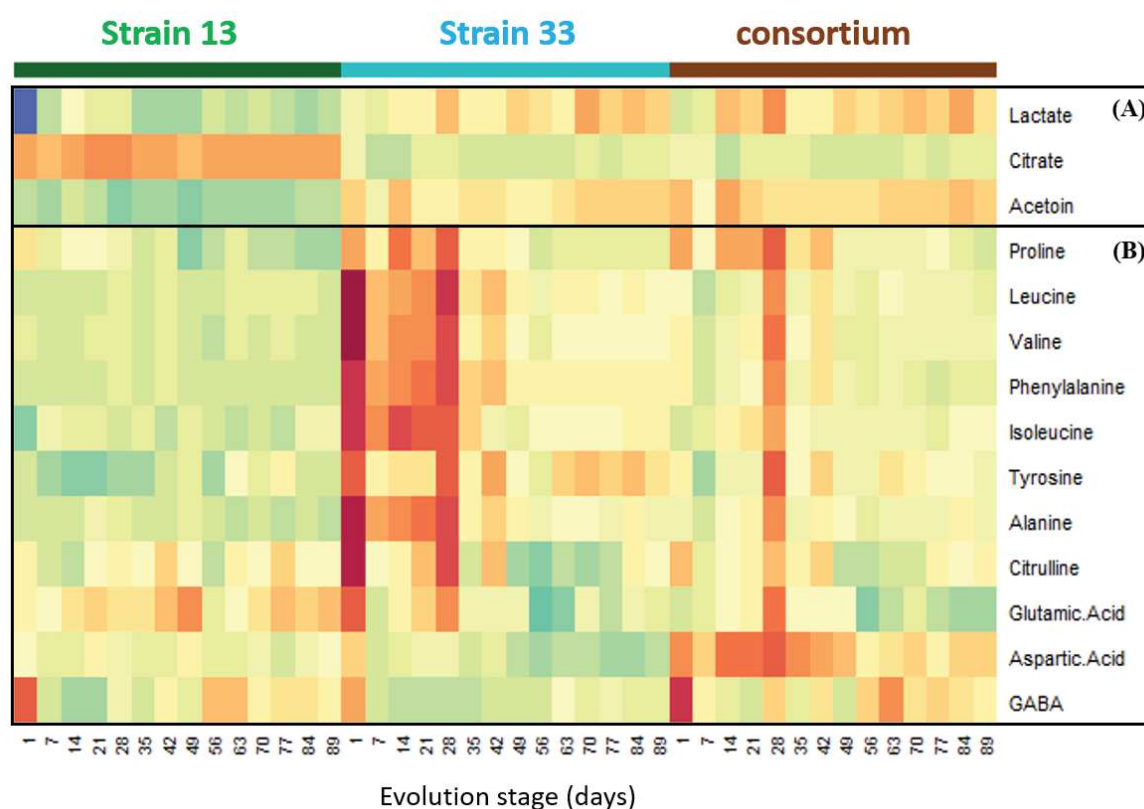


Figure 3. Heatmap representing (A) key carbon metabolites' consumption or production and (B) key free amino acids' release by the strains 13 and 33, and the consortium, in the fermented milks over the experimental evolution. The heatmap represents the

concentrations' variations around the mean value of each variable. To note that the initial concentrations' values correspond to the mean of a and b replicates. Colors vary from blue to red for high variations below or above the mean respectively. GABA: γ -aminobutyric acid.

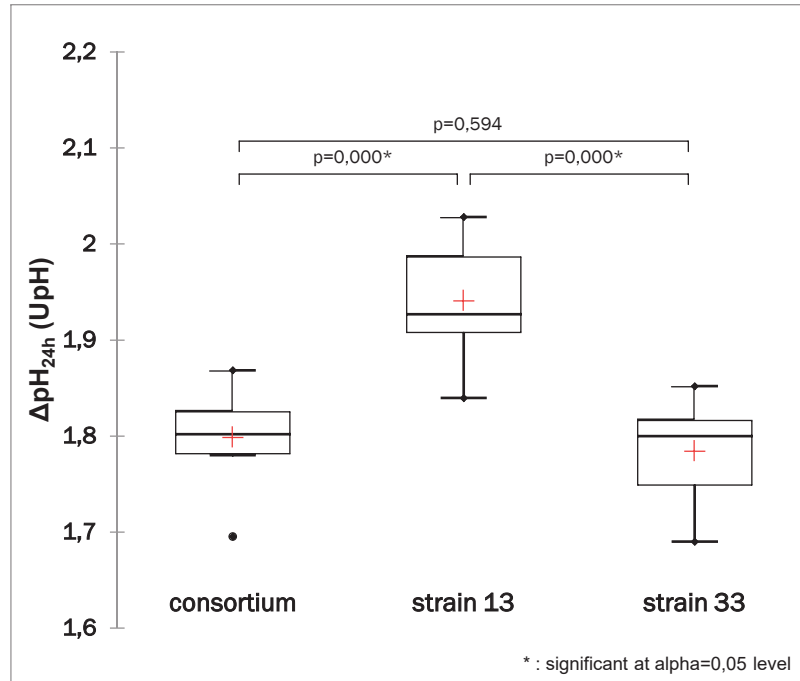


Figure 4. Boxplots representing the $\Delta\text{pH}_{24\text{h}}$ of strains 13 and 33 and the consortium evolving in milk. For each strain or the consortium, boxplots regroup values of a and b replicates for 8 stages of the evolution (i.e. days 5, 12, 19, 32, 45, 59, 67 and 81).

3.2.2. A model based on both inhibitory and cooperative interactions explained the strains' coevolution

As commented in section 2.8, considering the first results on lactose metabolism and the associated lactate production and medium acidification, strains' growth inhibition by lactate was first introduced into the model built for the consortium. Growth rate of each strain was thus expressed by the Hill model:

$$\mu_{13}(L) = \mu_{\max 13} \left(\frac{K_{L13}^\gamma}{K_{L13}^\gamma + L^\gamma} \right)$$

$$\mu_{33}(L) = \mu_{\max 33} \left(\frac{K_{L33}^\gamma}{K_{L33}^\gamma + L^\gamma} \right)$$

Where 13 and 33 refer to the strains 13 and 33 respectively.

Parameters' estimation was performed from pure cultures' strains data and Hill factor was fixed by basing on the Cinac acidification curves' look. Previous growth in milk's experimentations and Cinac data acquired during the evolution allowed us to choose the maximum speed of acidification as a proxy of the estimated μ_{max} .

This first model was thus constructed taking into account only the strains' inhibition by lactic acid in order to see if differences between the two strains 13 and 33 could explain the observed dynamics. Within the consortium, the lactate concentration depended on both strains' growth over the evolution:

$$\frac{dL}{dt} = \alpha_{13}\mu_{13}X_{13} + \alpha_{33}\mu_{33}X_{33}$$

The simulation of this model, calibrated independently for both strains, over batches' succession did not fit to the experimental data (Supplementary Figure S3). The single inhibitory interaction of strains' growth by their lactate production does not explain their coevolution in time, indicating the proposed model requires to be sophisticated.

The key role of FAA in the growth dynamics was then investigated, considering strains' interactions via amino acids cross-feeding. According to the FAA release profile of the heatmap, we can assume there is a likely positive interaction where proteolysis capacities of the strain 33 benefited to the strain 13. This phenomenon is observed for a pool of FAA (i.e. Leu, Val, Phe, Ile, Tyr, Ala and Cit) (Figure 3B). We considered that alanine was a good representative, easily numerically exploitable, among the FAA released in high amounts by the strain 33. According to our hypothesis, the strain 13 depended on the strain 33 for the supply of FAA of the 'alanine pool'. Thus, the alanine (i.e. alanine and the others FAA of the pool) was likely a limiting resource for the strain 13 growth, but not for the strain 33 growth:

$$\mu_{13} = \mu_{max13} \left(\frac{K_{L13}^Y}{K_{L13}^Y + L^Y} \right) \left(\frac{A}{K_A + A} \right)$$

$$\mu_{33} = \mu_{max33} \left(\frac{K_{L33}^Y}{K_{L33}^Y + L^Y} \right)$$

With A , the alanine concentration in the consortium (i.e. resulting from the release and consumption of the two strains); and K_A , the alanine half saturation constant.

Alanine concentration within the consortium, over evolution, depends on each strain's growth rate and biomass, and on the alanine yield β , corresponding to the difference between alanine release (β^+) and consumption (β^-) by each strain. Such combination of release minus consumption being not identifiable as such, only the net release β_{33} of the strain 33 and the net consumption β_{13} of the strain 13 are explicated in the model. In the consortium conditions, the release by the strain 33 is higher than the consumption by the strain 13:

$$\frac{dA}{dt} = -\beta_{13}\mu_{13}X_{13} + \beta_{33}\mu_{33}X_{33}$$

The alanine yield of the strain 33 within the consortium β_{33} was estimated with data from the pure culture. All these parameters were used to estimate β_{13} , K_A , and $\mu_{max_{13}}$ in the consortium. This second model, including the stimulatory effect of the 'alanine pool' of FAA on the strain 13 growth, led to a strains' dynamics where the two strains cohabited over evolution. It especially explained the phase 2 of the dynamics showing the strain 33 predominance (Figure 2).

3.2.3. An adaptation phase led to populations' fluctuations in the beginning of the evolution

Modeling the phase 1 of the dynamics needed the addition of others phenomena, than lactate inhibition and FAA cross-feeding, to explain the strain 33 increase and the strain 13 decrease in the first month of the evolution. According to i) the lactate dynamics of the strain 33 showing an increase of the lactate production in the beginning of the evolution (Figure S2), and to ii) the higher release of FAA of the 'alanine pool' in the phase 1 compared to phase 2 (Figure 3B), a likely adaptation phase led to populations' fluctuations in the beginning of the evolution (phase 1, Figure 2). Our first hypothesis was that this strain was able to adapt to acid stress. In mathematical terms, lactate concentration increase resulted in the increase of the lactate inhibition constant $K_{L_{33}}$, this corresponding to a reduced inhibition. As described above, the strain 33 heatmap profile also shows a higher release of FAA of the 'alanine pool' in the phase 1 compared to phase 2 (Figure 3B). It thus seems that the strain 33 adapted its nitrogen metabolism, with an increasing release of FAA during the first month of the evolution. In this third model, this was represented by the variation in the alanine yield β_{33} . According to these hypotheses, $K_{L_{33}}$ and β_{33} parameters varied across backslappings, their estimation was thus made, at each point of the dynamics, from model of the strain 33 evolving alone, with μ_{max} , Y ,

and α unchanged compared with the same parameters in the phase 2 model. Equations of the time dependent functions K_{L33} and β_{33} can be expressed as follows:

$$K_{L33}(t) = \min(m_{K_{L33}}t + b_{K_{L33}}, c_{L33})$$

$$\beta_{33}(t) = m_{\beta_{33}}t + b_{\beta_{33}}$$

Where c refers to the constant value corresponding to K_{L33} tray.

3.3. Model simulation on experimental data from the evolution

The final model simulations fitted well with the experimental data. Strains' dynamics during the evolution in the phases 1 and 2 is well predicted (Figure 5A) as well as lactate (Figure 5B) and alanine (Figure 5C) concentrations. However, a breaking point at day 28 is observed for the model simulation on the alanine concentrations' dynamics. Biological data having been checked for this day and surrounding days, the model needs to be optimized to simulate a continuous dynamics between phases 1 and 2.

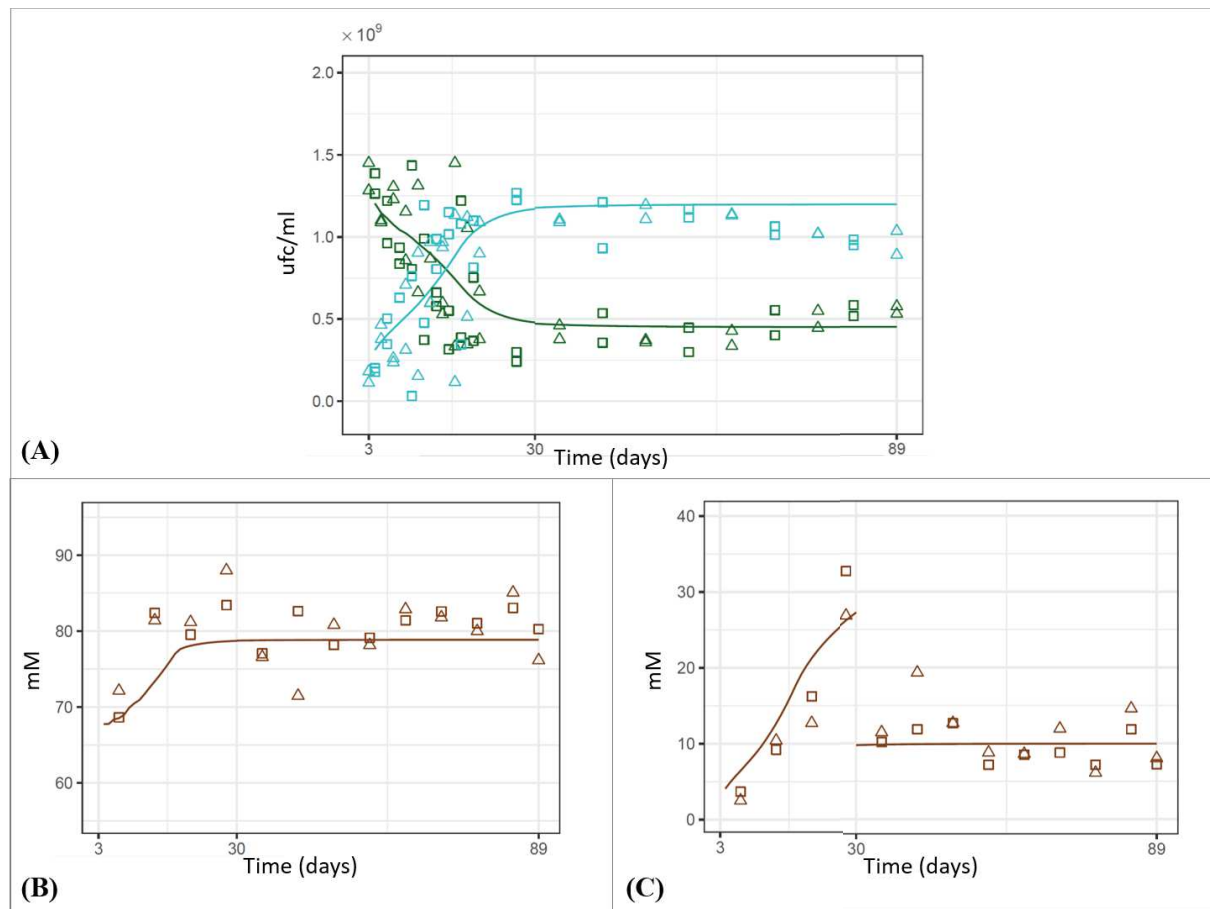


Figure 5. Strains' dynamics (A) and, lactate (B) and alanine (C) concentrations' dynamics within the consortium according to the complete model. Each strain's biomass within the consortium is represented over time in green and blue for the strains 13 and 33, respectively. Lactate and alanine concentrations in the consortium over time are represented in brown. Solid lines correspond to the model simulation and empty squares and triangles correspond to experimental data of each replicate for the two strains.

3.3.1. Scenario of interactions according to the model

Our results showed evidence of metabolic interactions between strains 13 and 33 during their coevolution in milk over 89 days. Both strains being efficient for acidification, mainly by lactate production, inhibited their growth at each batch of 24 hours' fermentation. In phase 1, it seems that strain 33 adapted its behavior in front of acid accumulation, becoming a more efficient lactate producer probably due to the increase of acid resistance (Figure 6). Moreover, this strain growing alone showed efficient release of a pool of FAA. The modelling of this behavior within the consortium, with the lactate inhibition phenomenon, explained the cohabitation of the two strains in the phase 2 of the dynamics. The cross-feeding interaction implicates a limitation of provided FAA for the strain 13, thus depending on the strain 33 release (Figure 6). During the phase 1, the strain 33 was likely able to adapt its nitrogen metabolism, increasing the release of

the alanine pool of FAA (Figure 6). The amino acid metabolism and acid adaptation phenomena for the strain 33 well explained its rise in the first month of the evolution.

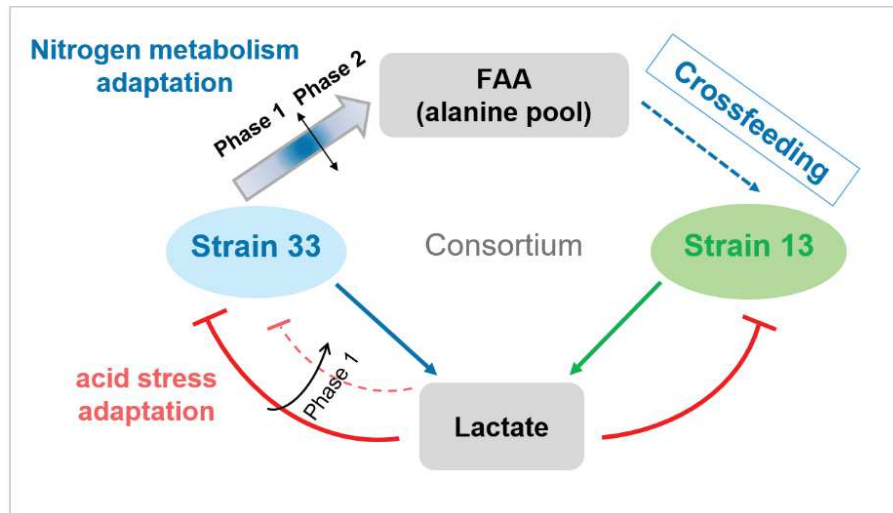


Figure 6. Scenario of metabolic interactions within the consortium according to the model.

3.4. Hypotheses validation

In the aim to verify our first hypothesis, we studied the acidification kinetics and parameters obtained by Cinac analysis. Cinac curves' look shows a shift to left over the evolution (i.e. from day 5 to day 81) (Figure 7). This observation correspond to a decrease of the lag time of acidification, parameter characterizing the beginning of each 24 hours' fermentation. In fact, for the two strains alone and the consortium, the lag time was reduced of between 1h05min and 1h35min at day 19 compared to day 5 and stayed relatively stable until the end, with a tendency to decrease (between 10 and 30min of saved time at day 81 compared to day 19, Supplementary Figure S1B). An improvement was also observed for acidification capacities at 24 hours of culture for the three populations, with the increase of the $\Delta\text{pH}_{24\text{h}}$ between days 5 and 19 (+0.11-0.15 UpH, Supplementary Figure S1A, Figure 7), this parameter stayed quite stable from day 19 to day 81 (Figure S1A). These results indicate an adaptation to fermentation conditions in milk, especially occurring in the beginning of the evolution. It therefore remains to determine and study acid stress resistance mechanisms of each strain specifically.

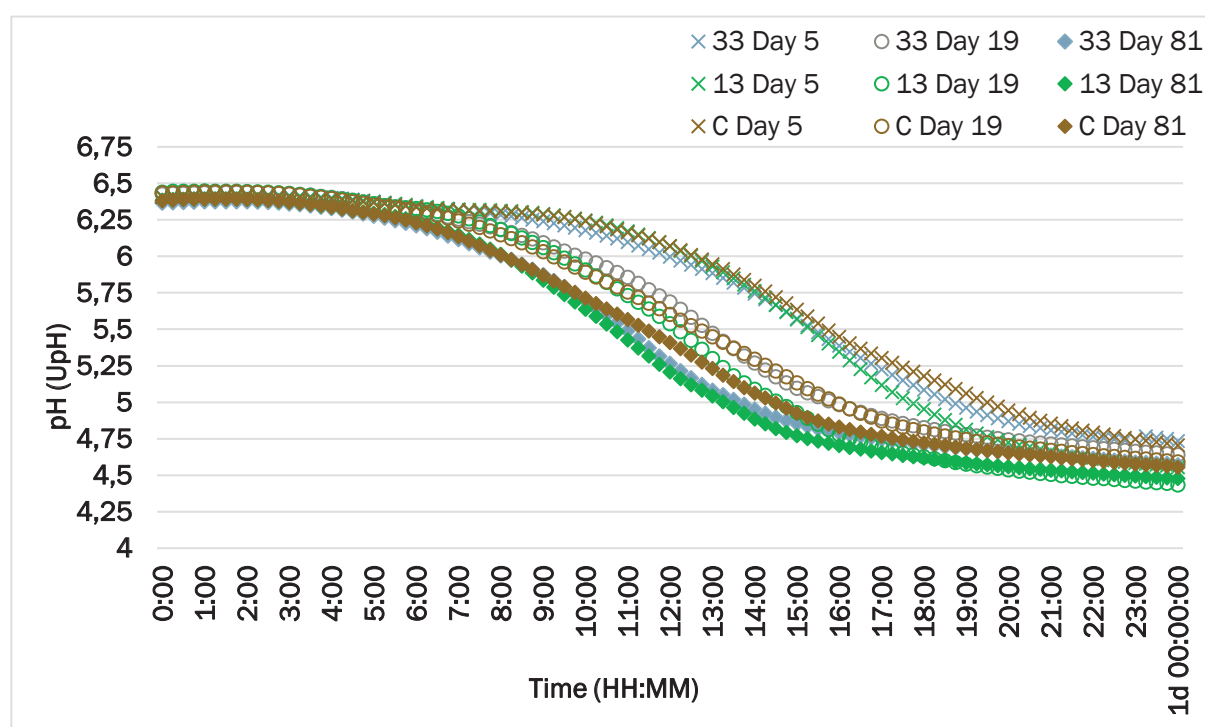


Figure 7. Cinac acidification curves during 24 hours' milk fermentations by the strains 13 and 33 alone and the consortium at three stages of the evolution. For the two strains and the consortium, shown data correspond to data from 'a' replicates. To note 'b' replicates showed similar profiles. Analyzed stages of the evolution correspond to days 5, 19 and 81. '13', '33' and 'C' correspond to the strains 13 and 33 and the consortium, respectively.

The other hypothesis concerns the nitrogen metabolism, where the strain 33 appeared to i) be more efficient for the proteolytic functionalities, and to ii) adapt its metabolism in the phase 1 of the evolution. Caseins' proteolysis by the cell wall proteinase PrtP is the first and crucial step to allow cellular access to nitrogen resources. As this gene is present on a plasmid, we looked at the dynamics of the average copies' number of *prtP* gene per cell, in milks fermented by the strains 13 and 33 alone and by the consortium. *prtP* gene of both strains was specifically detected and quantified in ddPCR assays, with two strain-specific fluorescent probes (i.e. P_{prtP13} and P_{prtP33} HEX-probes). Each probe was used in a duplex assay with each strain specific FAM-probe targeting the single copy chromosomal *recN* gene (i.e. P₁₃ or P₃₃). The strain 13-specific *prtP* copies' number in the strain 13 and in the consortium stayed quite stable over the evolution, showing respectively 1-1.5 and 1.5-2 average copies per cell (data not shown). The strain 33-specific *prtP* copies' number dynamics fluctuated over time, both in the strain 33 and in the consortium. At day 0, 2 copies of the strain 33 *prtP* gene were present, then, between days 4 and 34, an increase was observed (from 2 to 3-3.5 average copies per cell). From day 41 until the end of the evolution, the copies' number decreased to come back to the initial 2 average copies per cell (data not shown). These results support the idea of a regulation of the strain 33

proteolytic system over the evolution. The increased strain 33-specific *prtP* gene copies' number in the strain alone and in the consortium correlates with the higher release of FAA in the first month of the evolution. This highlighting a likely improvement of the proteolytic capacity via the proteolytic system's regulation of the strain 33 during the phase 1. The observed decrease after day 41 probably explains the shift between phase 1 and 2 and the lower FAA release in the phase 2. All these results illustrates that the average number of the proteolytic plasmidic gene well correlates with the AA metabolism, and thus, with nutritional interactions.

4. Discussion

In this study, we were able to follow specifically each strain of the consortium during a 89 days experimental evolution. The observed dynamics, showing a first populations' fluctuation phase and then a stable cohabitation of the strains 13 and 33, was modelled based on the strains' growth characteristics in sterile milk (i.e. growth rate, biomass yield and substrate affinity). Such models, inspired by Monod and Pirt equations, are usually adapted to study metabolic networks in microbial consortia, helping to investigate metabolic strategies and resources' allocation of each member (Bachmann *et al*, 2013, 2016).

First of all, the phase 0 (between days 0 and 3) showed the early loss of the strain 20. Its presumed extinction must be due to its less competitive phenotype, being *prtP*- (i.e. with impaired proteolysis function) and, thus, slow growing and slow acidifying. However, a cooperation for AA could have been expected with the presence of proteolytic *prtP*+ strains in the ecosystem. It seems that no metabolic specificity in strain 20 allow this strain to improve its fitness within the consortium (e.g. by producing metabolites leading to cooperative interactions improving strains 13 and 33 growth). Competition for public resources (i.e. FAA and lactose) and the inhibitory effect of lactate rapid accumulation from fast growing and acidifying strains 13 and 33 certainly explain the extinction of the strain 20 in the first three days of the evolution. This scenario has already been described in the literature, where the ecological study of biotic interactions, especially microbial competition, and evolution, suggests that ecosystem stability over time arise from previous competitive phenotypes (Ghoul & Mitri, 2016). This scenario will have to be tested simulating an implemented version of our model to confirm our assumptions. Moreover, the strain 20 growing alone maintained itself over the entire evolution. This result could be explained by its environmental origin, being more robust than domesticated strains facing environmental stresses, with a genetic background allowing adaptation to various ecological niches. We could thus assume this strain could show

reduced auxotrophies for AA, being able to synthesize sufficient levels to sustain its growth in milk, but not reaching a high growth rate compared to prtP⁺ strains. It would be interesting to build a model predicting strain 20 survival and adaptation in milk.

The actual model was therefore established to explain strains 13 and 33 dynamics and cohabitation over time, inferring metabolic interactions during the phase 1 (from day 3 to day 27) and the phase 2 (after day 27 until the end). The backslipping practice, resulting in a several number of generations, and encountered in adaptive laboratory experiments (ALE), leads to beneficial mutations' accumulation which drive the evolutionary dynamics toward better adapted evolved populations in their specific and uniform environment (Barrick & Lenski, 2013). This is in accordance with the strains' adaptation observed during the experimental evolution. Especially for the strain 33, which appeared to adapt its resistance to acid stress and its proteolytic activity over generations, mostly in the beginning of the evolution. Rapid adaptation over successive backslippings has already been reported in a cheese model, with a ten days' successive propagation of a natural whey starter (composed of *L. lactis* and *L. cremoris* strains) in a pasteurized raw milk re-seeded with four genera of LAB (Demarigny *et al*, 2011; Dalmaso *et al*, 2009). This led to a rapid adaptation, with fluctuations in the acidification aptitude (i.e. ΔpH) over time. Moreover, it has to be noted that the strain 33 acid stress resistance is partly due to its capacity to internalize and metabolize the citrate present in milk. Indeed, citrate metabolism contributes to pH homeostasis, which may allow the bacterium to recover from acid stress (Magni *et al*, 1999; García-Quintáns *et al*, 1998). This could most likely explain this strain produced more lactate than the strain 13 but less acidified the milk after 24 hours. These results constitute new insights about inter-strains coevolution, highlighting the metabolic diversity existing between phylogenetically related strains, both able to efficiently metabolize the milk matrix (i.e. being prtP⁺ and lacE⁺).

About nitrogen metabolism adaptation, proteolytic activity regulation is a well described mechanism, mostly dependent on the activity of the CodY protein known as a central regulator of the proteolytic system in *Lactococcus lactis* (Guédon *et al*, 2001b, 2005). This repressor is activated by dipeptides containing one of the branched-chain amino acids Ile, Val or Leu. Their internalization and intracellular breakdown initiate the transcription repression of major genes implicated in the proteolysis function (i.e. *prtP*, *pepC*, *pepN* and *opp-pepOI* genes) (Guédon *et al*, 2001a). We can thus believe that this mechanism plays a key role in the proteolytic phenotypic trait of the strain 33, alone and within the consortium. However, the efficiency of proteolysis can also be regulated by the copies' number of the key gene *prtP* usually present on

a plasmid. At the population scale, heterogeneity exists, and the plasmid loss is frequently observed (Bachmann *et al*, 2011). In fact, the cell wall PrtP proteinase is responsible for giving the access to free utilizable peptides to all cells present in the medium. This cooperative behavior is often damaged by the emergence of 'cheating' cells benefiting from the cooperative interactions but not contributing to them (Bachmann *et al*, 2011; Cavaliere *et al*, 2017). Anyway, the proteolytic trait remains maintained over generations, due to the local spatial structure allowing the proteolytic strain to benefit first from the surrounding substrates' availability (Bachmann *et al*, 2011; Canon *et al*, 2020). Thus, the strain 33 having shown proteolytic capacities' fluctuations likely related to an adaptation, it can be not surprising to encounter copies' number variation of the *prtP* gene in the strain 33 population. This phenomenon was observed both in the strain growing alone and within the consortium, highlighting the heterogeneity within and between populations. The domesticated strain 33, belonging to the biovar diacetylactis, seems more able to optimize its growth over an experimental evolution than the environmental strain 13, although the latter was also isolated from raw milk. In fact, domestication is associated with a greater adaptation to the milk niche, leading to specialized strains harboring several plasmids allowing efficient growth in milk and stresses resistance (Kleerebezem *et al*, 2020; Passerini *et al*, 2010; Kelleher *et al*, 2017, 2019). Acidification parameters' analysis revealed that both strains improved their lag time, having started to acidify earlier over days, and reached more acidic pH values after a 24 hours' fermentation in milk. However, the strain 33 showed a more progressive adaptation compared to the strain 13, which showed rapid changes before day 19 and then stabilized. This could highlight a finer adaptation of the strain 33 under conditions specific to this experimental evolution, as this strain belongs to the 'domesticated' strains' cluster and thus is already familiar to the milk niche. On the other hand, the environmental strain 13, presumed less accustomed to dairy environment, had to trigger a rapid adaptation to these conditions. Lactate accumulation and FAA availability are undoubtedly key factors influencing *L. lactis* strains' growth in milk. In the consortium, it appeared the genomic and phenotypic diversity of the two phylogenetically related strains allowed both positive and negative interactions to settle over time. Model simulation taking into account only the inhibitory effect of the lactate produced by both strains did not explain the observed dynamics. The strain 33 had probably improved its resistance to the acid stress with the increased lactate production. This could have led to its domination during the evolution and to the extinction of the strain 13 if no cooperative behavior had settled between them. Adding a cross-feeding phenomenon for FAA in the model explained the

cohabitation of the two strains over the evolution. Low privatization of resources, due to the coevolution of the two strains competing for the same nutrients in the milk matrix, has likely induced a one-way dependency of the strain 13 for the strain 33, the latter showing more efficient capacities for milk utilization and a greater ability to adapt to this niche. By benefiting of the FAA pool released in high amount by the strain 33, the strain 13 can maintain its growth within the consortium. This type of metabolic dependency is often described when metabolic conflicts are inevitable (i.e. sharing the same public resources) (Estrela *et al*, 2016). Moreover, cooperative interactions participate to improve the robustness of microbial communities against environmental stresses, and can be used to direct the evolution of social interactions toward functionalities of interest (Cavaliere *et al*, 2017). Cross-feeding can also lead to the specialization of microorganisms for distinct tasks and thus to division of labor. In multi-strains consortia, it appears cooperative pairs outcompete independent bacteria (Thommes *et al*, 2019). The choice of such metabolic strategies gives rise to tradeoffs between growth rate and biomass yield, each one being advantageous under different conditions, depending on biotic and abiotic environment of each cell (Bachmann *et al*, 2013). In our case, it seems the fluctuations' phase 1, related to an adaptation phase, led to a stable phase 2 where strains 13 and 33 adopted their own metabolic strategies depending on their mutual presence. It appears the two prtP⁺ strains harbor different mechanisms, with the assumption that the environmental strain 13 could be less auxotrophic than the strain 33. Moreover, previous results of the sequences' analysis of the strains before the evolution indicated both *prtP* and *lacE* genes would be present on a megaplasmid in the strain 13. This could explain the stability of the copies' number of the *prtP* gene over time in this strain, in which the plasmid loss would affect both caseins and lactose use capacities.

On the other hand, the model did not take into account the presence of prophages in the strains' genome, and possible one-off phenomenon like their excision. In fact, *L. lactis* prophages have been characterized and showed evidence of modulation on the host physiology, even in lysogenic conditions (Aucouturier *et al*, 2018). By modifying the growth and survival of the host strain and influencing its autolytic properties, prophages can therefore affect the populations' dynamics. It could be interesting to consider prophages as a relevant descriptor for the model improvement, as our strains' genome before evolution showed between 33 and 55% of genes from phages origin within strain-specific regions, with 2 to 4 putative complete prophages.

In these works, we built an explicative model of the strains' dynamics within the consortium. Further studies could help to improve and use the model to predict metabolic interactions and strains' dynamics over an adaptive evolution. Especially by developing the model with the integration of other descriptors of the nitrogen metabolism (e.g. other AA, *prtP* copies' number).

SUPPLEMENTARY DATA

TABLE

Table S1. Main produced carbon metabolites and consumed citrate, and their levels over the evolution, for the three strains growing alone and the consortium.

strain	replicate	Lactate (mM)		Acetate (mM)		Acetoin (mM)		Ethanol (mM)		Citrate (mM)	
		mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
20	a	9,9	3,3	-	-	0,2	0,6	-	-	0,0	0,5
	b	10,1	3,5	-	-	0,4	0,4	-	-	0,0	0,4
13	a	65,8	6,6	1,3	0,2	0,3	0,4	2,4	0,7	-0,8	0,7
	b	66,8	3,6	1,2	0,1	-0,2	0,4	*2,8	*0,7	-1,0	0,8
33	a	78,0	3,9	11,0	0,6	3,0	0,6	2,6	0,7	8,2	0,9
	b	77,4	4,7	11,0	0,7	3,2	0,6	2,1	0,6	8,3	0,9
C	a	78,6	5,1	10,7	1,2	3,4	0,6	1,9	0,5	7,8	0,9
	b	78,7	5,1	10,9	1,2	3,5	0,6	2,0	0,5	7,8	0,9

Mean and standard deviation values were calculated from HPLC measurements of 14 evolution stages, for each strain ('20', '13' and '33') or the consortium ('C'), *except for the ethanol values of '13 b', which were calculated from 13 HPLC measurements. To note that culture conditions not favored diacetyl production, which was not detected by HPLC analysis. Values correspond to absolute production or citrate consumption, compared to unfermented control milks. Negative values mean that the metabolite was found in slightly higher amount in the control milks.

FIGURES

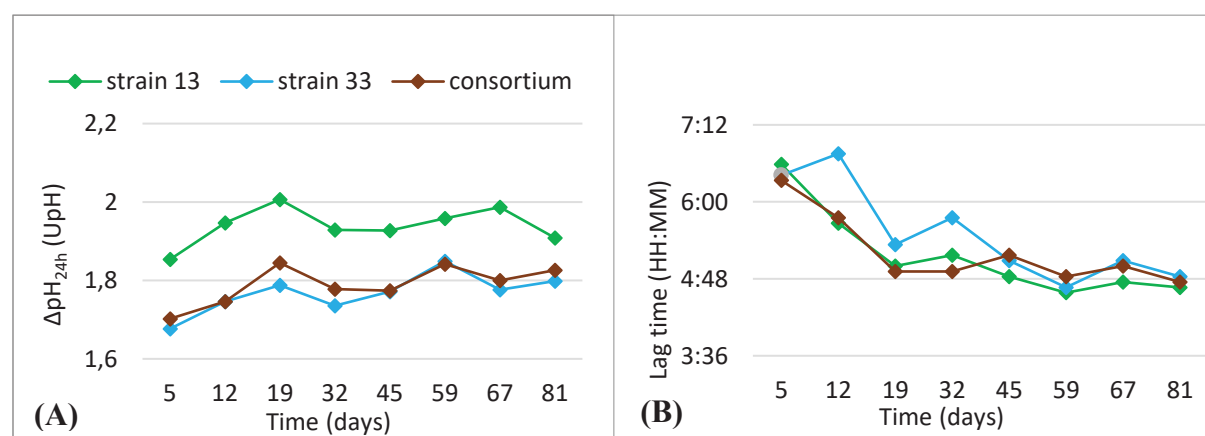


Figure S1. Cinac kinetics' parameters during the strains 13 and 33 and the consortium growth in milk over the evolution. (A) ΔpH_{24h} : Each value corresponds to the absolute difference between the start and the end of the 24 hours' fermentation (i.e. t_0-t_{24}). **(B) Lag time of acidification.** For (A) and (B), all values correspond to 'a' replicates data. To note 'b' replicates showed similar profiles.

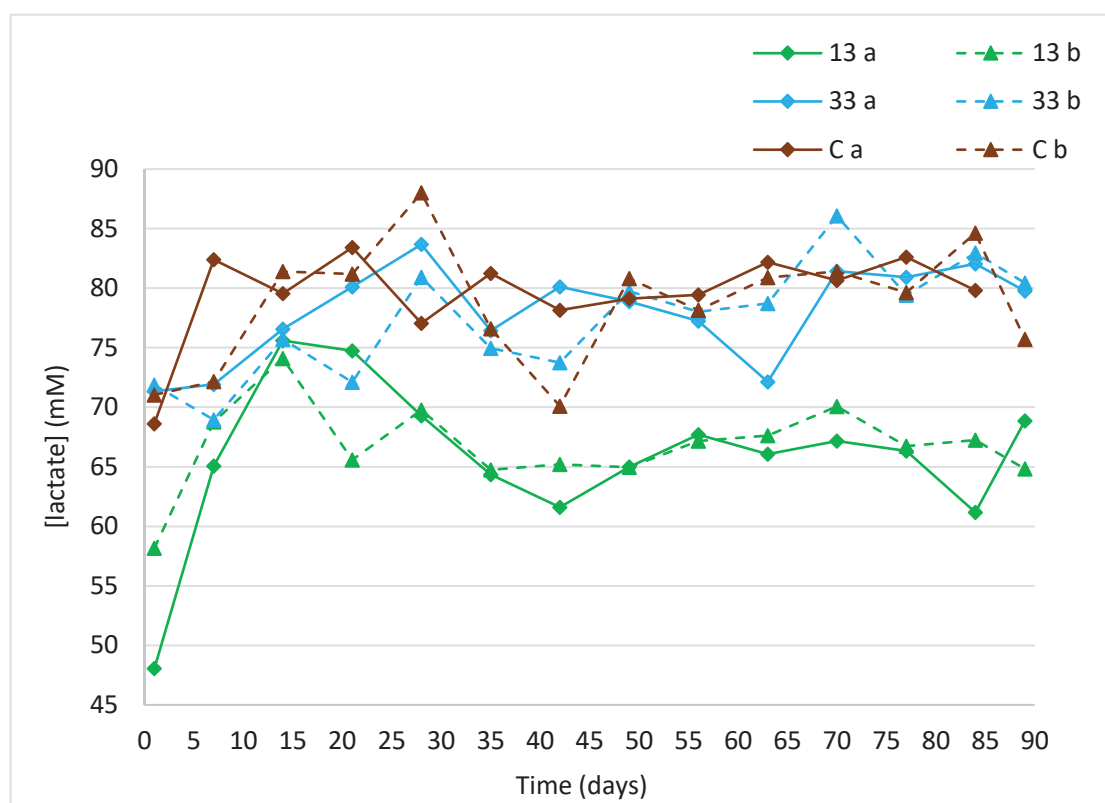


Figure S2. Lactate concentration's dynamics over the evolution for the strains 13 and 33 alone and the consortium. HPLC data acquired for 14 stages of the evolution are represented for each replicate. Values correspond to the absolute lactate production, calculated from fermented milks' and control milks' data. '13', '33' and 'C' correspond to the strain 13, the strain 33 and the consortium, respectively. 'a' and 'b' correspond to replicates.

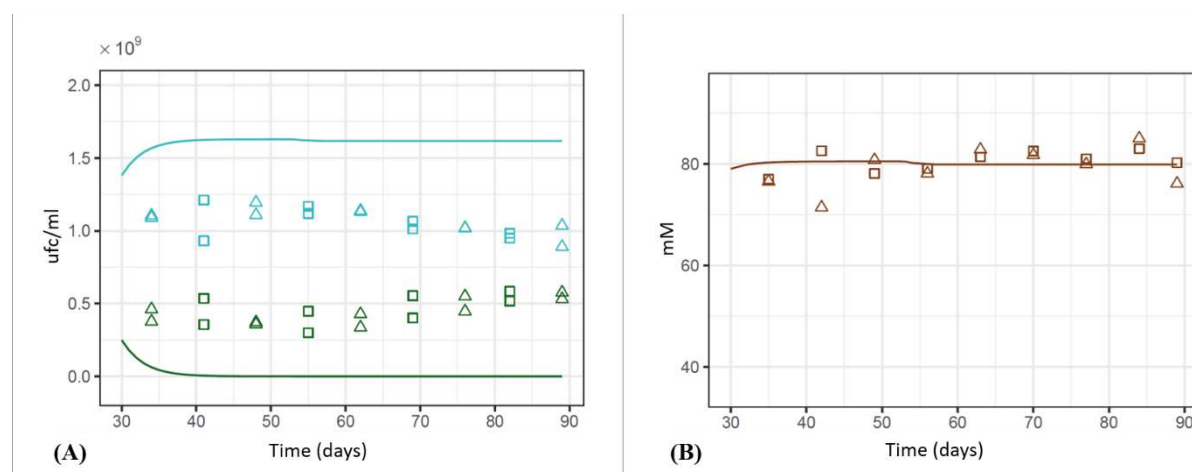


Figure S3. Strains' dynamics (A) and lactate concentration's dynamics (B) within the consortium according to the first model based on the inhibitory effect of the produced lactate. Each strain's biomass within the consortium is represented over time in green and blue for the strains 13 and 33, respectively. Lactate concentration in the consortium over time is represented in brown. Solid lines correspond to the model simulation and empty squares and triangles correspond to experimental data of each replicate for the two strains.

4.3 Interactions inter-espèces au cours d'une évolution expérimentale

4.3.1 Résumé de l'article 3

Les bactéries lactiques (BL) sont impliquées dans la fermentation des produits laitiers tels que les fromages ou les laits fermentés, dans lesquels elles contribuent principalement à l'acidification et au profil aromatique. Présentes parmi d'autres communautés indéfinies au sein des laits crus, elles peuvent spontanément fermenter le lait, agissant comme des starters naturels. Ces fermentations spontanées confèrent aux caractéristiques organoleptiques du produit une empreinte typique associée au terroir. A l'inverse, la construction raisonnée d'associations de BL est utilisée en industrie laitière pour assurer la reproductibilité et la sûreté des produits. Dans cette étude, un starter naturel indéfini a été construit à partir d'un lait cru de chèvre. Sa coévolution avec un consortium raisonné de BL, choisi notamment pour sa capacité de production de diacetyl/acétoïne, a été étudié au cours d'une évolution expérimentale en lait stérile. La composition des différentes communautés et certains paramètres technologiques (c-à-d. acidification et production de composés d'arômes) ont été analysés au cours de leur propagation par backsloppings journaliers. Au sein du starter naturel indéfini, l'analyse par metabarcoding du gène de l'ARNr 16S a montré la prédominance de l'espèce *Lactococcus lactis*, représentant de 59% de la communauté détectée en début d'évolution, à 86% en milieu et fin d'évolution. Les dynamiques de trois principaux paramètres d'acidification (temps de latence, vitesse maximale et acidification absolue) ont mis en évidence une potentielle adaptation du starter indéfini en début d'évolution ayant conduit à une stabilité des capacités d'acidification au cours du temps. L'association de starter indéfini avec le consortium de BL a montré un profil d'acidification proche de celui du starter indéfini seul. La coévolution des deux communautés a notamment été mise en évidence par la production d'acétoïne, liée au consortium raisonné, ayant été observée dans l'association tout au long de l'évolution. Une production plus importante de 2-méthylthiolan-3-one a été spécifiquement observée dans l'association, révélant une vraisemblable interaction entre la communauté naturelle issue de lait cru et les BL sélectionnées du consortium. Ces travaux ont montré que l'association d'un starter naturel et d'un consortium raisonné pouvait conduire à des laits fermentés au profil organoleptique spécifique et ouvrent la voie pour exploiter la diversité métabolique caractérisant les communautés microbiennes naturelles dans les fabrications laitières.

Mots clés : interactions microbiennes, acidification, production d'arômes, backslopping, starter, lait cru

4.3.2 Article 3: Coevolution of an Undefined Starter Made From Raw Milk and a Consortium of Selected Strains of *Lactococcus lactis*

COEVOLUTION OF AN UNDEFINED STARTER MADE FROM RAW MILK AND A CONSORTIUM OF SELECTED STRAINS OF *LACTOCOCCUS LACTIS*.

Marie-Aurore Caillaud et al.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are implicated in dairy products' fermentation like cheeses or fermented milks, in which they contribute to acidification and aromatic profile. Present in raw milks' microbiota with other groups of microorganisms, LAB can ferment milk spontaneously, acting as natural starters and contributing to the typical organoleptic footprint of the product associated with the terroir. On the other hand, reasoned constructions of LAB associations are used in dairy industries to ensure the reproducibility and safety of their products. In this study, we constructed an undefined natural starter from a goat raw milk and studied its coevolution with a reasoned LAB consortium, notably chosen for its capacity to produce the diacetyl/acetoin aromatic compounds. We analyzed the composition of the different communities and their technological features (i.e. acidification and aroma compounds' production) over time, during their evolution in sterile skimmed milk practicing daily backslappings. In the undefined natural starter, 16S rRNA gene metabarcoding showed a predominance of the *Lactococcus lactis* species, representing from 59% of the detected communities at the start of the evolution to around 86% at the middle or at the end. Considering acidification features' dynamics (lag time, maximum speed and absolute acidification), some adaptations of the undefined starter community in the beginning of the evolution led to acidification capacities' stability over time. The association of the undefined starter and the LAB consortium showed an acidification profile close to the undefined starter alone. The two communities coevolved over time, with an acetoin production linked to the LAB consortium encountered in the association all over the evolution. A higher production of 2-methylthiolan-3-one was specifically observed in the association, revealing potential interactions between selected LAB and the natural community from raw milk. This work showed that a natural starter and a constructed consortium used in association could give rise to a specific organoleptic profile of the fermented milk and paves the way for taking advantage of the metabolic diversity characterizing natural microbial communities in dairy manufacturing.

Keywords: microbial interactions, acidification, aroma production, backslopping, starter, raw milk

1 Introduction

In dairy fermented products, lactic acid bacteria (LAB) play different roles, contributing to acidification, texture, aroma compounds' production, food safety and human health (Settanni & Moschetti, 2010). Associations of selected key LAB can be added as starters for the milk transformation. Their regular use leads to standardized final products in terms of organoleptic properties: flavour, aroma, aspect (Demarigny and Gerber, 2014). These 'starter LAB' regroup strains belonging to *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc* species among mesophilic species, and to *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus helveticus* among thermophilic species (Fox *et al*, 2004). Other LAB species are encountered in the 'non-starter LAB' group, especially lactobacilli species (Coeuret *et al*, 2004; Gobbetti *et al*, 2018; Švec *et al*, 2005). These non-starter LAB derive from milk and can be used as adjunct communities in cheese manufacturing, since they play a key role in the organoleptic characteristics of the final cheese and can also confer health benefits (Beresford & Williams, 2004).

In artisanal raw milk cheeses or fermented milks, 'natural starters' are used, particularly in Mediterranean countries (Salameh *et al*, 2016). They are also called indigenous, autochthonous or wild starters and contain a large diversity of microorganisms, especially starter and non-starter LAB but also yeasts and moulds (Salameh *et al*, 2016; Garofalo *et al*, 2020). They can originate from various sources (e.g. environment, raw materials, and animals) and thus, inoculate the milk and the curd during the process. Natural starters result from the spontaneous fermentation of milk and can be propagated by backslopping (BS) practices (Demarigny & Gerber, 2014). BS practices, consisting in the use of a previous production (i.e. the whey or the final product) as inoculum for the next fermentation, are more reproducible and safer than the launch of spontaneous fermentations at each production. The BS enables the expression of the terroir associated with the raw materials, the know-how of producers and the artisanal transformation process (Demarigny & Gerber, 2014). In France, this method is used for the production of several traditional dairy products: lactic goat cheeses (including the 12 PDO cheeses), the Breton fermented milk called Gwell, and the AOP Beaufort cheese made from cow's milk.

For lactic goat cheeses, the coagulation of raw milk lasts 24 hours at low temperature (20°C). During this step, LAB grow and the pH decreases until 4.4-4.6 at the end of coagulation. Then, the whey is collected and the curd is moulded. This whey is used successfully as a natural starter for the next cheese making (i.e. BS). Even if this practice enhances the sensorial typicity of cheeses, some deviations of the fermentation (e.g. affected acidification, texture or aroma

production) can arise. Some are due notably to the variability of the raw milk composition (i.e. housing, seasons, feeding) (Tormo *et al*, 2015, 2011) but it is not clear if and how added starters interact with raw milk communities and impact the ecosystem robustness over BS, whereas yet, this conditions the success of fermentations over time. It appears fermentations' deviations are also pointed out for the Gwell (von Gastrow *et al*, 2020), which share a similar production process to that of lactic goat cheeses. For these two kinds of products, *L. lactis* is the major species constituting the natural starters and driving the acidification of the curd (von Gastrow *et al*, 2020). This suggests the crucial role of this species in the fermentation process, which thus, conditions the success of the following fermentations during successive BS.

In this study, a self-organized complex community from a goat raw milk (called Undefined Starter 'US') and a consortium of three selected *L. lactis* strains (called 'C'), regarded as a simple and reasoned assemblage acting as an acidification starter, were associated. The stability and robustness of these communities, and the presence of interactions between them, were studied during a three months experimental evolution with daily BS. We analyzed the microbial composition and technological features (i.e. acidification capacities and aroma compounds' production) of the US and the association 'US with C' over time, during their propagation in sterile skimmed milk.

2 Materials and Methods

2.1 Microbial material and culture conditions

The *Lactococcus lactis* EIP33, EIP20A and EIP13A strains were isolated from goat raw milk. The EIP33 strain belongs to the biovar diacetylactis. These strains come from the EIP collection (Toulouse). For the experimental evolution, pre-cultures of *L. lactis* strains were grown at 30°C in M17 broth (BD Difco) reconstituted following the supplier's recommendations and added with D-glucose (VWR) at the concentration of 10 g/L. Cultures were grown in a skimmed milk (Sigma-Aldrich) reconstituted at 10% (w/v) and sterilized at 105°C during 30 minutes. For VOCs analysis, pre-cultures were grown in a sterile skimmed milk reconstituted at 10% (w/v), and cultures were grown in a pasteurized goat raw milk from *Fromagerie Le Pic*. Drastic pasteurization was carried out with a core temperature of 94°C during 10 minutes.

2.2 Construction of the consortium and the undefined starter from raw milk

The consortium was constructed as followed: the optic density at 580 nm (OD_{580nm}) of an overnight pre-culture of each strain was measured and the concentration of each culture was estimated from the graph CFU/ml = f(OD_{580nm}) on the basis of previous experiments. Pre-

cultures were mixed in such a way that final concentration was due to 50%, 25%, 25% of EIP20A, EIP13A and EIP33 strains respectively (Figure 1A).

An undefined natural starter was made from a goat raw milk from *La Ferme de Cabriole* (Saint-Félix 31540, Occitanie) farm. The raw milk from a morning milking was kept in ice until the repartition in 40 ml samples for a storage at -20°C until use. One sample was left at 22°C and after 24h, 400 µl of vortex homogenized milk served to inoculate 40 ml of sterile skimmed milk. 2 x 1 ml were used for pH measurement and DNA extraction from collected cells. The same procedure was repeated twice (Figure 1B).

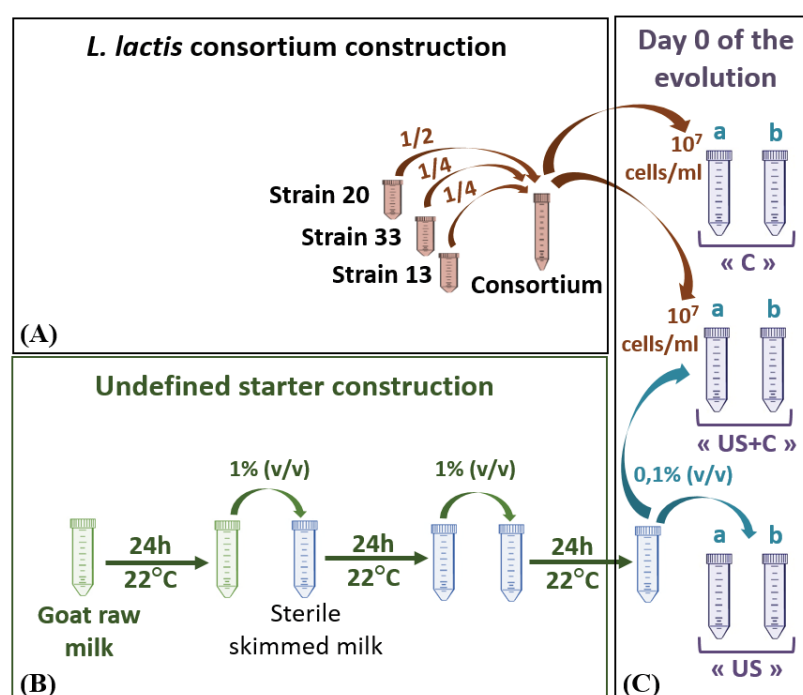


Figure 1. Design of experimental evolutions: (A) Construction of the *L. lactis* consortium designated as 'C' (B) Construction of the undefined starter from raw milk designated as 'US' (C) First inoculation at day 0 for the three types of experiment.

2.3 Experimental evolution

At day 0, starting point of the evolution, three tubes containing 40 mL of sterile skimmed milk were respectively inoculated with i) an adequate volume of the consortium to obtain a final concentration of 1×10^7 cells/µl, or with ii) the homogenized undefined starter at 0.1%, or with iii) the undefined starter and the consortium in the same proportions as mentioned in i) and ii). Two independent experiments (a and b) were launched (Figure 1C). The experimental evolution was carried out over 89 days with daily backslappings at 0.1% (v/v) in a new fresh sterile skimmed milk. Every 24 hours, all fermented milks were homogenized during 30 seconds with the vortex. For each sample, 1 ml was stored at -20°C for HPLC analysis and 1 ml was mix

with 9 ml of a 2.22% (w/v) trisodium citrate (Sigma-Aldrich) solution. After a first centrifugation at 5 000 rpm during 10 minutes, the supernatant was discarded and a second centrifugation during 5 minutes at 13 000 rpm was monitored to recover supernatant-free cells' pellets which were stored at -20°C until DNA extraction.

2.4 Fermented milk model for VOCs analysis

The protocol was inspired by (Dhaisne *et al*, 2013). Each 60 ml of pasteurized goat raw milk were inoculated with 60 µl of each 24 hours pre-culture from milks of the experimental evolution at days 5, 12, 41 and 82. During growth at 22°C, pH kinetics of each culture was monitored with the Cinac system and the fermentation was stopped when pH reached 4.6, pH value usually reached in fermented dairy products. Uninoculated pasteurized raw milk was acidified with L(+)-lactic acid (PanReac AppliChem ITW Reagents) until pH reached 4.6, and was then homogenized and divided into four samples to be used as control milks. After homogenization, fermented and control milks were kept at 4°C during 13 days. Then, 2.5 g of each homogenized fermented and control milks were conditioned in a 22 ml 20 mm vial (Perkin, B0104236) and crimped with the adapted cap (Perkin, B4000022) to be stocked at -20°C until volatile compounds analysis.

2.5 DNA extraction

DNA extractions were carried out using the DNeasy PowerFood Microbial Kit (Qiagen) according to the supplier's instructions with the following modification: the cells' pellet was first resuspended in the MBL solution and incubated at 70°C during ten minutes. The genomic DNA concentration ($C_{ng/\mu l}$) was obtained by measuring the absorbance at 260 nm on a Nanodrop ND2000. For analysis convenience of the *L. lactis* consortium, $C_{ng/\mu l}$ was converted into $C_{copies/\mu l}$ according to the following equation: $C_{copies/\mu l} = Na \times C_{ng/\mu l} \times 10^{-9} / (L \times 660)$, where Na is the Avogadro constant ($6.02 \times 10^{23}/mol$), and L is the average size of a lactococcal genome (2.5×10^6 bp). This calculation provides only an estimated value in copies/µl since A260 measurement depends on various factors and does not distinguish between intact and fragmented targets.

The DNA purity was evaluated by the ratio of the absorbance at 260 nm and 280 nm. Extracted DNA were diluted if needed and used at the appropriate concentration for 16S metabarcoding and ddPCR assays.

2.6 16S Metabarcoding assays

The V3-V4 region of the 16S rDNA gene was amplified for 30 cycles with an annealing temperature of 65°C using MTP Taq DNA polymerase (Sigma-Aldrich) and the primers PCR1F_460 (CTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTACGGRAGGCAGCAG) and PCR1R_460 (GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT). The amplicons' length was approximately of 450 bp depending on the species. Amplicons were then sent to the Genotoul platform of INRAE Toulouse (France) for sequencing.

The raw 16S rDNA sequences were analyzed using the bioinformatics pipeline FROGS (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) (Escudié *et al*, 2018). After quality control depletions, 475 889 total sequences (out of the initial 575 639 sequences), comprising from 21 857 to 60 544 sequences per sample were used for the analysis. Affiliations were investigated using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) by referencing to the DAIRYdb_v1.1.2 database. Data were filtered by retaining OTUs with at least 0.005% of all sequences and by keeping the 100 biggest OTUs (Operational Taxonomic Units). 18 OTUs corresponding to 437 989 sequences were kept for the affiliation. Multi-affiliation was manually checked to accept a single affiliation based on the latest taxonomic rank identified without ambiguity. Samples were normalized to the same depth (19 672 affiliated sequences) before analysis.

2.7 Digital droplet PCR assays

The primers and probes used in ddPCR are described in (Caillaud *et al*, 2020). The primers F-gadB and R-gadB and the HEX-P_{tot} fluorescent probe were used to amplify a 149 bp fragment '*L.lactis* group-specific'. F-citD and R-citD primers and the FAM-P_{cit} fluorescent probe were used to amplify a 134 bp fragment 'biovar diacetylactis-specific'. The ratio P_{cit}/P_{tot} determined the proportion of the biovar diacetylactis population in the *L. lactis* group. Primers were synthesized by Eurofins (Ebersberg, Germany) and probes by Eurogentec (Angers, France). All primers and probes were diluted in ultra-pure water at the concentration of 100 µM and solutions were stocked at -20°C.

ddPCR was performed with the QX200 AutoDG Droplet Digital PCR system (Bio-Rad) according to the protocol developed by (Caillaud *et al.*, 2020).

2.8 Acidification kinetics

For eight stages of the evolution (days 5, 12, 19, 32, 45, 59, 67 and 81), all fermented milks served to inoculate (0.1%, v/v) a 60 ml additional skimmed milk sample dedicated to pH kinetics' monitoring with the Cinac system (AMS Alliance) (Spinnler & Corrieu, 1989).

2.9 High Performance Liquid Chromatography

From the experimental evolution, the concentrations of substrates (lactose and citrate) and fermentation end-products (lactate, formate, acetate, acetoin, diacetyl and ethanol) were determined by high performance liquid chromatography (HPLC, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) as previously described (Passerini *et al*, 2013).

2.10 Headspace Trap Gas Chromatography-Mass Spectrometry

2.10.1 Extraction of volatile compound using headspace trap

A Perkin Elmer Turbomatrix HS-40 trap automatic headspace sampler with trap enrichment was used to extract volatiles. After 13 days at 4°C, aliquots (2.5 g) of fermented milks were placed in 22 mL Perkin Elmer vials with polytetrafluorethylene (PTFE)/silicone septa. The principle of the HS-trap method has been previously described in detail (Barani *et al*, 2006). It includes several steps: equilibration, pressurization, trap load, trap dry-purge, trap desorption and trap hold. Analyses were performed according to methods previously described by (Pogačić *et al*, 2015). The final conditions retained after optimization were the following: Samples were warmed for 15 min at 65°C (equilibration). The vials were then pressurized for 1 min at 207 kPa with the carrier gas (helium), by introducing a needle through the septum. A Tenax™ trap at 35°C was then loaded for 2.3 min by allowing the pressure to fall through the trap, permitting the adsorption and the concentration of the analytes of the headspace on the trap. The trap load was repeated twice for each vial trap. The adsorbed water was then removed by purging helium through the trap (dry purge: 3 min). The trap was heated at 250°C for 0.1 min and backflushed at 90 kPa, leading to desorption of the analytes, which were then transferred to the GC through a transfer line maintained at 150°C, with an injection time of 0.6 min. The trap was held at 250°C for 5 min.

2.10.2 Analysis of volatile compounds using GC-MS

Volatiles were analyzed using a Clarus 680 gas chromatograph coupled to a Clarus 600T quadrupole mass spectrometer (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). They were separated on an Elite WAX ETR capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 mm; Perkin-Elmer), with helium as the mobile phase. The initial temperature of the oven, 35°C, was maintained for 5 min. The increase of temperature was performed at a rate of 5°C/min up to 230°C. The mass spectrometer was operated in the scan mode (scan time 0.3 s, interscan delay 0.03 s) within a mass range of m/z 29 to 206. Ionization was done by electronic impact at 70 eV. All samples were analyzed in the same GC-MS run. Standards were regularly injected to verify the absence of instrumental

drift of the GC-MS system. Blank samples (boiled deionized water) were also injected to check the absence of carry-over. Volatile compounds were identified by comparison of mass spectra and retention times with those of authentic standards purchased from Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France), on the basis of their retention index and mass spectral data from the NIST 2008 Mass Spectral Library (Scientific Instrument Services, Ringoes, NJ, USA).

2.10.3 Data processing

Data pre-processing was performed using Perkin Elmer Turbomass software, version 5.4.2.1617. The GC-MS raw data files were converted to netCDF format with Data Bridge (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) for further analysis. GC-MS data were processed by converting the raw data to time- and mass-aligned chromatographic peaks areas using the open source XCMS package implemented with the R statistical language (Smith *et al.*, 2006). The full width at half maximum was set to 5, the group band-width to 3, and the other parameters were those by default.

2.11 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using XLSTAT software. The significance threshold was set at 0.05.

2.11.1 Acidification kinetics analysis

A variance analysis with a classical ANOVA model was performed on Cinac kinetics' data of fermented milks of the evolution. Lag time before the acidification's start, maximum speed of acidification and delta pH between times 0 and 24 hours of fermentation were analyzed for 48 individuals (3 types of community, 8 stages of evolution and 2 biological replicates per type of milk), testing the impact of the two factors 'nature of the microbial community' and 'stage of the evolution' and the interaction of both. Residuals' normality was checked for each measured pH feature. A Tukey test was performed for each feature, leading to contrasts' analysis combining the two factors studied and to Tukey's hierarchical classes for each factor and the interaction.

2.11.2 Carbon metabolism regarding diacetylactis population data's description

A PCA was performed on HPLC data of carbon metabolites and ddPCR data of the diacetylactis population from the experimental evolution. Data sets included 24 individuals (3 types of community, 4 stages of evolution and 2 biological replicates per type of milk) and active variables were 5 carbon metabolites and the ratio P_{cit}/P_{tot} .

2.11.3 VOCs analysis

For each compound, a variance analysis with a classical ANOVA model was performed on the entire data set excepted control milks. In total, the relative abundance of 24 identified compounds were analyzed for the 24 individuals, except for the 2-methylpropan-1-ol where 23 individuals were analyzed. The impact of the factors 'nature of the microbial community' and 'stage of the evolution' and the interaction of both were tested. Considering the large dynamic range of compounds, all data were log transformed. For each compound, residuals' normality was checked and a Tukey test was performed, leading to contrasts' analysis combining the two factors studied and to Tukey's hierarchical classes for each factor and the interaction. Ranking for the factor 'nature' is informed in the compounds' Table 1.

A principal component analysis (PCA) was performed on the entire data set, including control milks, to see the overall distribution of all individuals considering variables' correlations. A hierarchical agglomerative clustering (HAC), based on Euclidean distance and Ward's method, was done from the PCA observations' coordinates. Another PCA was performed on US and US+C fermented milks and after the removal of 9 compounds from the analysis, for which no significant differences were observed considering the factor 'nature of the community'.

3 Results

3.1 From raw milk to undefined natural starter

3.1.1 Spontaneous fermentation of a raw milk led to an acidifying undefined community

After a first fermentation of a goat raw milk at 22°C during 24 hours, pH only decreased of -0.26 UpH ($\text{pH}_{24\text{h}}=6.34$). Then, a significant drop was observed after the first backslopping and 24 hours at 22°C, with pH having reached 4.6. Acidification capacities of the community remained efficient after the second backslopping with $\text{pH}=4.4$ after one day at 22°C. This experimentation was independently repeated a second time from the same raw milk and similar results were observed. This acidifying community made of indigenous populations of raw milk constituted the undefined starter (US) and was the starting point for an experimental evolution in duplicates, in skimmed milk over 89 days.

3.1.2 Some adaptations of the undefined starter community in the beginning of the evolution led to acidification capacities' stability

As key technological features, three main acidification's parameters were described with the Cinac system during the evolution of the US (see section 2.8.). The lag time and maximum speed of acidification and the delta pH between times 0 and 24 hours were determined for eight different evolution stages. The averaged values from the two biological duplicates (a and b) are presented in Figure 2. Similar dynamics were obtained for each duplicate (Figure S1A, B and C).

The acidification lag time dynamics of the US is stable over the evolution (average value of 5h01min, Figure 2A), except at day 12, at which a significantly higher value of 6h10min was observed compared to values from day 45 to day 67 (p -values=0.045, 0.033 and 0.018 for days 45, 59 and 67, respectively). Such lag time extension could be due to an environmental disturbance having occurred at day 12.

The maximum speed of acidification of the US was significantly increased between days 12 and 19 (from 0.20 to 0.29 UpH/h, p -value=0.024) (Figure 2B). The dynamics then shows a stable profile from day 19 to day 81 (average value of 0.27 UpH/h). The US community was likely able to rapidly adapt its maximum speed of acidification toward more efficient capacities, the evolved US communities from day 19 until the end showing improved S_{max} compared to US communities at days 5 and 12.

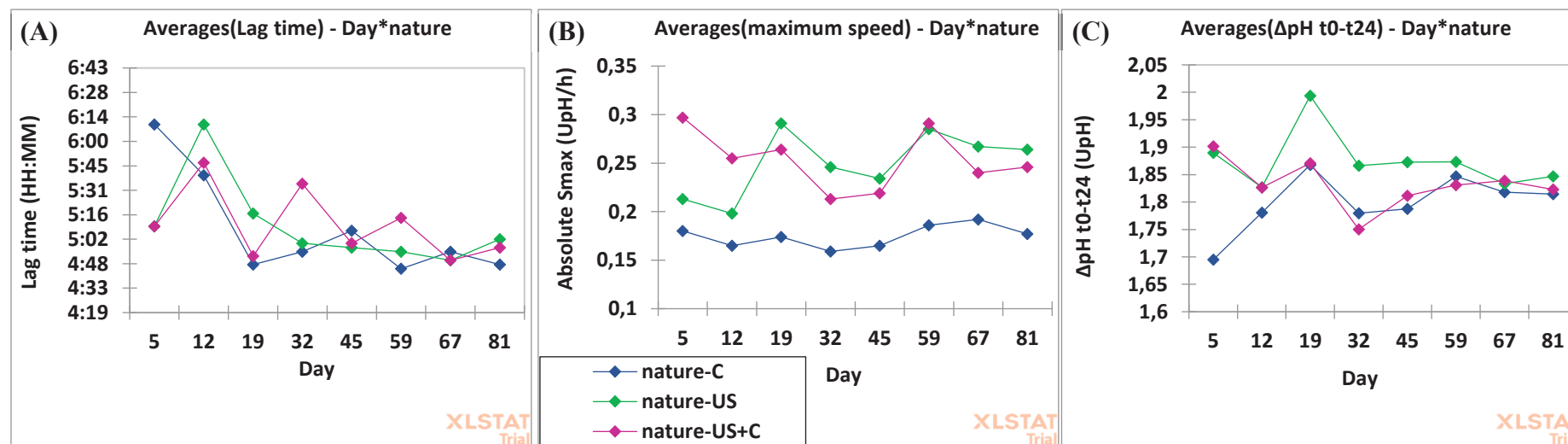


Figure 2. Acidification main features for the three communities during the evolution. Data from acidification kinetics acquired with Cinac system for eight stages during the evolution: days 5, 12, 19, 32, 45, 59, 67 and 81. **(A) Lag time** before the start of acidification, **(B) Maximum speed** of acidification, and **(C) Delta pH** between t0 and t24 corresponding to the absolute acidification in UpH on 24 hours of fermentation. For the three graphs, data of each day of the evolution is the average value of two biological replicates. 'C', 'US' and 'US+C' correspond to the consortium alone, the undefined starter alone and the association of both communities, respectively.

The dynamics of the absolute acidification after 24 hours of fermentation (i.e. delta pH between times 0h and 24h) is stable over the evolution (average value of 1.86 UpH, Figure 2C), except at day 19, at which a significantly higher value of 1.99 UpH was observed compared to values at days 12, 67 and 81 (p-values=0.004, 0.007 and 0.017 respectively) (Figure 2C).

For the three acidification's features, all significant changes occurred during the first month of the evolution. These results highlight a likely adaptation of the US community in the beginning of the evolution, having led to the stability of its acidification capacities. Particularly, the US community improved its maximum speed of acidification.

3.1.3 Species dynamics' within the undefined starter community showed the *Lactococcus lactis* predominance over the evolution

The overall community of the US was analyzed using 16S metabarcoding, and detected OTUs were affiliated at the species level. The obtained results were similar for the two independent replicates. At the beginning of the evolution (day 0), the *Lactococcus lactis* species represented almost 59% of the population detected (Figure 3A), the other half was composed of a majority of the *Enterobacter aerogenes* species (36%) and a few population of the *Acinetobacter johnsonii* and *berezinae* species (3.3 and 0.4%, respectively). Then, the composition of the undefined starter at days 41 and 89 showed a predominance of the *Lactococcus lactis* species (average value of 86%). The *Enterobacter aerogenes* species was no longer detected and the relative abundance of the *Acinetobacter johnsonii* species increased (from 3.3% at day 0 to 13.6% and 15% at days 41 and 89 respectively). From day 41 to day 89, the community stayed quite stable at the species level (Figure 3A). To better describe the aromatic features of this community, it was relevant to look for the presence of the *Lactococcus lactis* biovar diacetylactis population among the *Lactococcus lactis* species. A ddPCR assay using the 'biovar diacetylactis-specific' hydrolysis probe P_{Cit} was achieved. No strains belonging to this biovar was detected at any stage of the evolution tested (i.e. days 0, 5, 12, 41, 89).

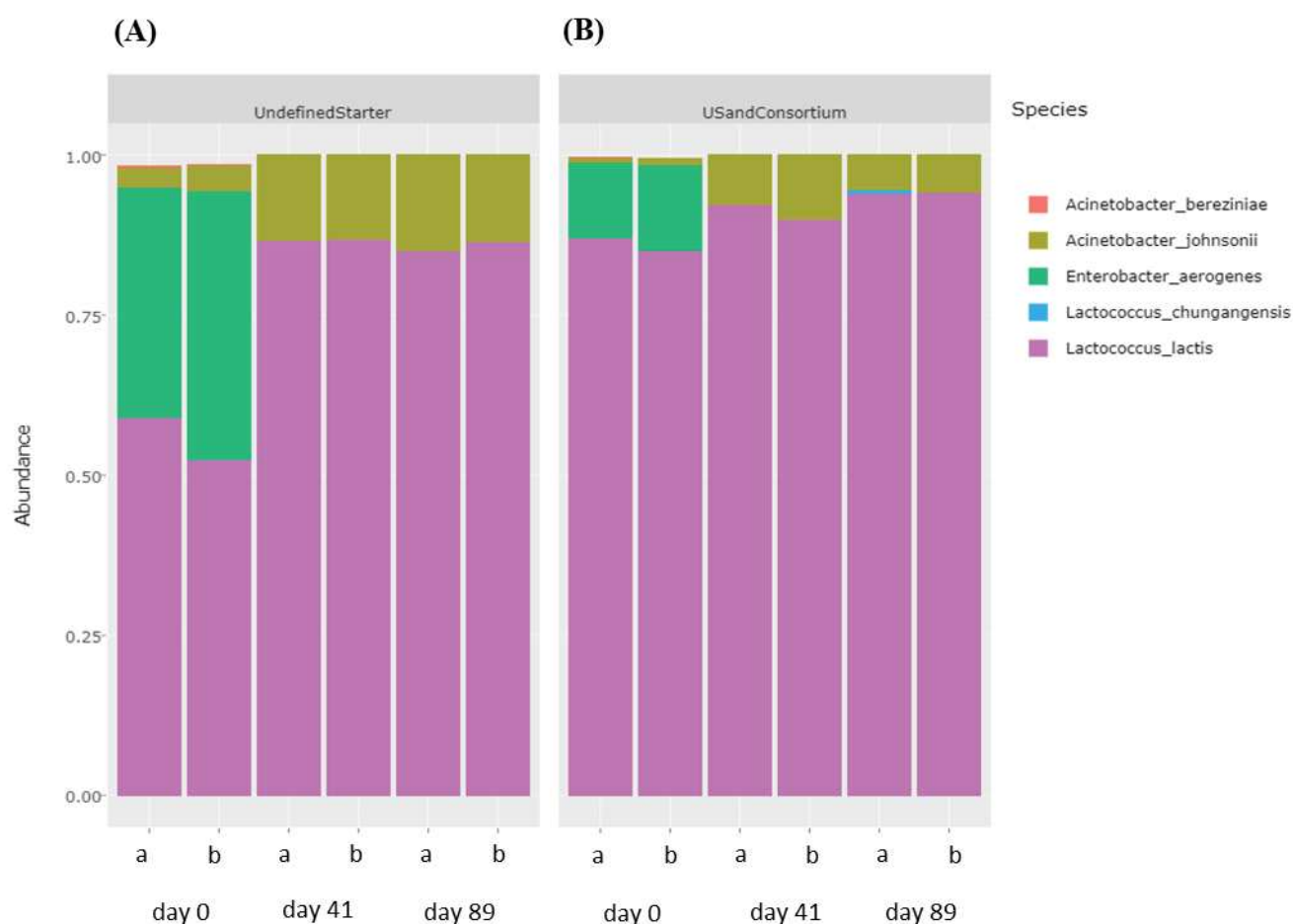


Figure 3. Bacterial composition at the species level with 16S metabarcoding analysis: compositions' overview during the evolution of (A) the undefined starter and (B) the association 'undefined starter + consortium'. Relative abundance of each population is represented with a bar and corresponds to the number of OTUs reliably identified for each population regarding the total number of OTUs. Day 0 corresponds to the unfermented milk at the beginning of the evolution, days 41 and 89 correspond to the fermented milk after 24 hours at 22°C, after backslipping at days 40 and 88 respectively. Biological replicates are named 'a' and 'b'. To note that *Lactococcus lactis* population in pink corresponds to the *L. lactis* group including the *L. lactis* and *L. cremoris* species (formerly assigned as two subspecies).

3.2 Co-habitation of the undefined starter and the *L. lactis* reasoned consortium

The evolution of the US was also studied in the presence of a constructed consortium of three selected strains of *Lactococcus lactis* (C), chosen for their acidification and aromatic capacities. The association US + C evolved during the 89 days in duplicates like the US alone. The evolution of the C was also performed in similar conditions as a control experiment. Technological properties and bacterial composition of the community US+C were studied over generations

3.2.1. The association “undefined starter + consortium” showed an overall acidification profile over evolution resembling to the undefined starter

To compare the acidification profile of the association US+C with the profiles of the US and C communities over the evolution, an ANOVA was performed to study the impact of ‘the nature of the community’, ‘the stage of evolution’ and the interaction of both factors on the three Cinac parameters described in Figure 2.

The acidification lag time dynamics of the association US+C shows fluctuations with a tendency to stabilization toward a reduced lag time (Figure 2A). As it was observed for the US alone, start and end values (i.e. days 5 and 81) were similar, around the average value of 5h03min. On the other hand, the consortium dynamics shows a significant higher lag time at day 5 compared to day 81 (from 6h10min to 4h47min, p-value=0.013). From day 12 until the end, the three communities showed close lag times which tended to stabilize over time. Starting the evolution with the US profile, it thus appears the lag time dynamics of the association US+C is closer to the US dynamics, which is characterized by similar lag times between starting and evolved communities.

The US+C maximum speed of acidification dynamics over evolution shows a profile closer to the US than to the C (Figure 2B), with significant differences of US+C and US mean values compared to C mean value (both p-values<0.0001), and no significant differences between US+C and US (p-value=0.894). To note that, when analyzing the profiles at the day level, the association US+C well differed from the consortium at day 5, with a significant higher $S_{\max}$ value (p-value=0.002), whereas the difference was not significant between the US and C communities at this day (p-value=0.992).

At day 5, the delta pH t_0-t_{24} was significantly higher for the US+C and the US compared to the C (p-values=0 and 0.001) (Figure 2C). This being likely related to the higher lag time of the C at this day when taking into account the maximum speed which remained stable all over the evolution. According to the lag time dynamics, the US+C delta pH_{24h} dynamics thus follows the US profile, and differs from the C profile in the beginning of the evolution (Figure 2A and C). This difference vanishes over time, with a dynamics showing no significant delta pH_{24h} differences between the three communities from day 12 until the end of the evolution, with a mean value of 1.83 Uph at day 81 (Figure 2C).

It appears the overall US+C profile for acidification features was closer to the US profile. The similarity is particularly highlighted with the maximum speed of acidification, which showed a clear difference between the two US communities (i.e. US+C and US) and the C all over the evolution. For the lag time of acidification and the delta pH_{24h}, the similarity was especially observed in the beginning of the evolution, as since day 12 of the evolution, US+C, US and C communities showed similar profiles.

3.2.2. Species dynamics' within the community 'US with C' showed the stable *L. lactis* predominance all over the evolution

As previously described, the overall community was analyzed in the association US+C over generations, and detected OTUs were affiliated at the species level. As both replicates showed similar profiles, the 'a' replicate will be described in this section. From day 0 to day 89, the predominance of the *Lactococcus lactis* species remained stable (87%, 92% and 94% at days 0, 41 and 89, respectively, Figure 3B). The *Enterobacter aerogenes* species was present at day 0 (12%) but this population did not settle during the evolution. The *Acinetobacter johnsonii* and *berezinae* species only represented 0.9% of the community at day 0, while the relative abundance of the *johnsonii* species increased between days 0 and 41 (from 0.8% to 8%) and this species was still present at the end of the evolution (5.7% at day 89). Data of the 'b' replicate only differed from 'a' for the detection of the *Lactococcus chungangensis* species, which was found in the 'a' replicate at very low level at days 41 and 89 (0.1% and 0.5%, respectively) but not in the 'b' replicate.

3.2.3. The consortium brought a diacetylactis population, associated with aroma compounds production, which settled during the evolution

The presence of the biovar diacetylactis in the US + C was investigated. Two fluorescent hybridization probes, FAM-P_{cit} and HEX-P_{tot}, were used in two different ddPCR assays to specifically quantify the diacetylactis and *L. lactis* populations respectively. The P_{cit}/P_{tot} ratio for the US+C community at five evolution stages (days 0, 5, 12, 41, 89) is described in Figure 4. As the US did not contain any diacetylactis population, we can assume the presence of this biovar in the US + C was only due to the *L. lactis* EIP33 strain provided by the consortium.

At the starting point of the evolution, for both 'a' and 'b' replicates of US+C, diacetylactis strains represented 33% to 34% of the total *L. lactis* group (Figure 4). This population dropped from 33-34% to 4-5% between days 0 and 5, and remained low at day 12 (11%). In the later

stages of the evolution, the diacetylactis population's dynamics showed a huge rise among the total *L. lactis* group, with P_{cit}/P_{tot} ratios of 83% and 66% at day 41 for 'a' and 'b' replicates respectively. At the end of the evolution, these proportions stayed quite stable, with P_{cit}/P_{tot} ratios of 80-81% at day 89, illustrating the establishment of the biovar diacetylactis EIP33 strain among the US+C community.

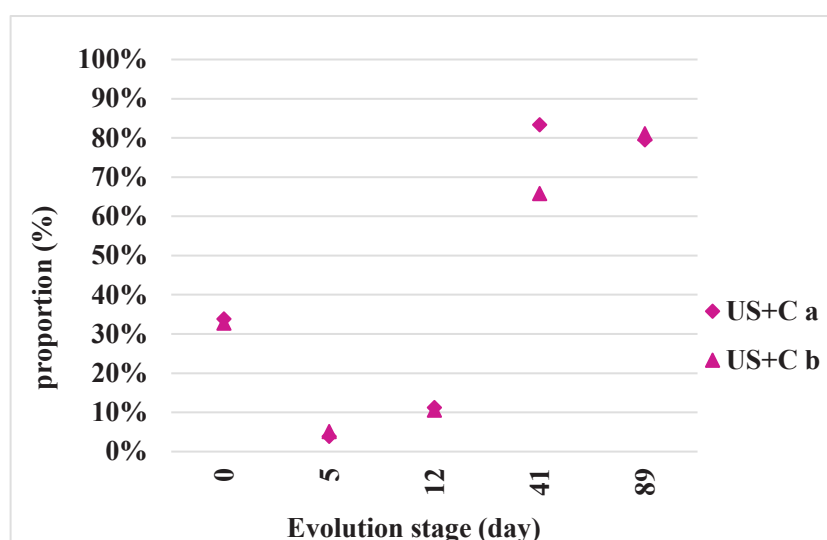


Figure 4. Diacetylactis population's dynamics among the total *L. lactis* group within the association 'undefined starter + consortium'. Ratios were calculated from two independent wells, with the values from the singleplex assays using the FAM- P_{cit} probe or the HEX- P_{tot} probe. 'US+C' corresponds to the 'undefined starter + consortium' community, and 'a' and 'b' are the biological duplicates corresponding to two independent samples.

A PCA was built from biochemical (citrate consumption, and lactate, acetoin, and acetate production) and microbial (diacetylactis population's dynamics) variables to compare the global behavior of US, C and US+C at four stages of the evolution (days 5, 12, 41 and 89) (Figure 5). As expected, citrate consumption was correlated with acetoin production and with lactate and acetate production, highlighting a mixed metabolism compared to a homolactic profile. The P_{cit}/P_{tot} ratio, representing the presence of the biovar diacetylactis population among the total *L. lactis* group, was correlated with the acetoin production. This result supports that this compound was produced by the diacetylactis population. On the PCA, individuals are divided in two groups, the 'citrate consumer-acetoin producer' group with a 'diacetylactis profile' (US+C and C) and the 'non-diacetylactis profile' group (US). This is in accordance with the diacetylactis population's dynamics from ddPCR data. However, it has to be noted that at early stages of the evolution (days 5 and 12 for US+C, and day 5 for C) these individuals co-localized with the 'non-diacetylactis profile' group. Indeed, at these stages, diacetylactis strains

were a minority (Figure 4). Thus, the ‘diacetylactis profile’ in the association US+C was surely due to the presence of the consortium.

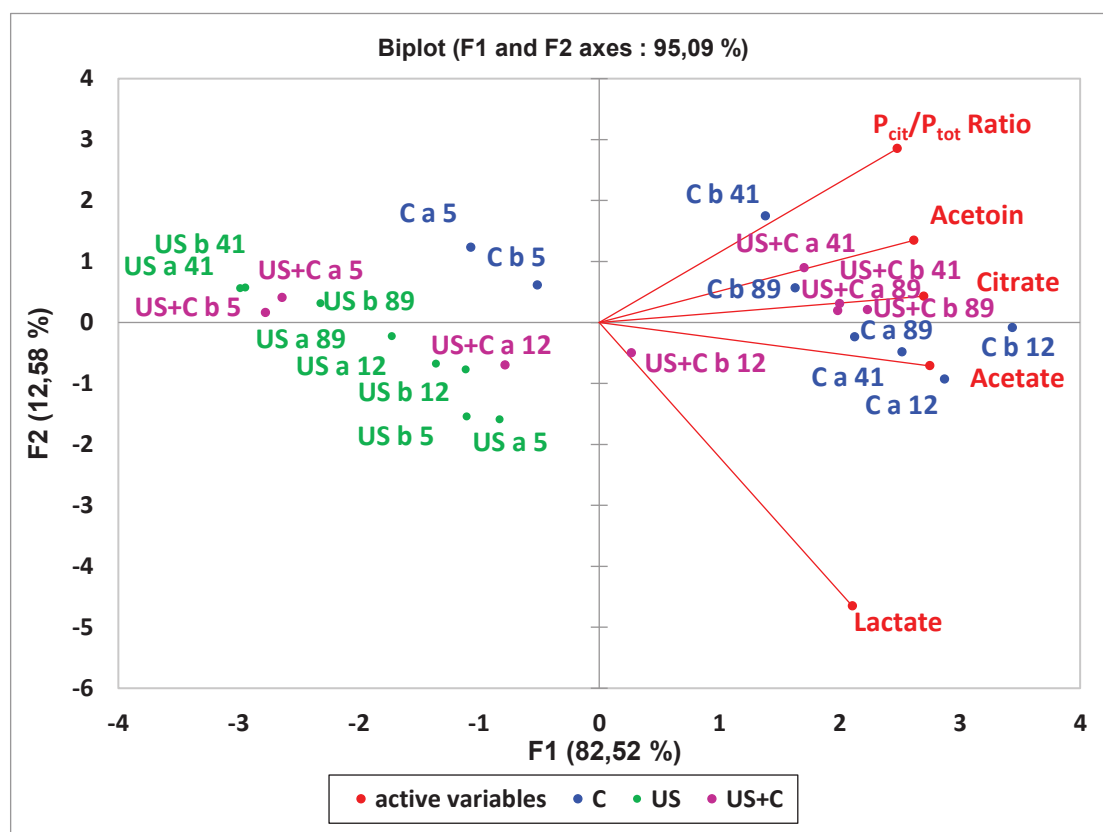


Figure 5. Principal component analysis representing the three communities regarding carbon metabolism and diacetylactis population's dynamics. Both variables and observations are represented on the distance biplot, by F1 and F2 axes representing 82.52% and 12.58% of the total variability of individuals, respectively. ‘US+C’ and ‘C’ correspond to ‘undefined starter + consortium’ and ‘consortium’ communities respectively, and ‘a’ and ‘b’ are the biological duplicates corresponding to two independent samples. To note that HPLC analyzed samples correspond to fermented milks from days 7, 14, 42 and 89, considered as similar evolution stages as days 5, 12, 41 and 89 respectively.

3.3 VOCs profiles illustrate the crosstalk between the undefined starter and the *L. lactis* consortium

A fermented milk model in pasteurized raw milk was used to study VOCs profiles of the three communities at four stages of the evolution (days 5, 12, 41 and 82). The pasteurized raw milk matrix, and the technological protocol applied for the fermented milks’ production, were suitable for the analysis of aroma profiles. A long storage period at 4°C (i.e. 13 days) was applied to favor the aroma formation after the release of cytosolic enzymes due to the cell lysis

(Smid & Kleerebezem, 2014). The 24 compounds identified by Headspace Trap GC-MS are listed in the Table 1. For 16 compounds, the p-value from the ANOVA testing the factor 'nature' of the community was significant and the Tukey test gave the significant differences between the three types of fermented milks, allowing their ranking by the concentrations produced for each compound. To note that the butan-2-one and 2,4-dimethylfuran compounds were found in larger amounts in the control milks, this meaning the presence of the bacterial community impacts the aroma profile of milk, lowering the concentration of these compounds.

3.3.1 VOCs profiles analysis led to groups' discrimination by the nature of the community

A hierarchical agglomerative clustering (HAC) was performed from the principal component analysis of the VOCs data of the fermented milks and the control milks. The dendrogram shows three distinct groups including the control milks' group (Figure 6). The two other groups correspond to a 'consortium' cluster, bringing together all milks fermented with the consortium alone C and one milk fermented with the consortium and the undefined starter ("US+C a 5", Figure 6). This 'consortium' group was characterized by a diacetylactis profile, mainly represented by alpha-diketones like butane-2,3-dione (diacetyl) and pentane-2,3-dione, and by the 3-hydroxybutan-2-one (acetoin) methyl-ketone (data not shown), all conferring buttery notes. The other group is composed of the milks fermented by the undefined starter alone US or by the association US+C, this meaning the US presumably gave its aroma footprint to the association US+C. Clearly, this classification based on the VOCs data highlights the impact of the factor 'nature of the community' on the aroma profile of the fermented milks.

3.3.2 VOCs profiles are the witnesses of a metabolic crosstalk between the undefined starter and the *L. lactis* consortium

After running the ANOVA testing the factors 'nature of the community', 'stage of evolution' and the interaction of the two, compounds showing no significant differences between the three types of milks were excluded for the following principal component analysis. Individuals' repartition was thus analyzed considering 16 compounds differentially produced in the three types of milks. A PCA focusing on the milks fermented by the undefined starter alone US and in the presence of the *L. lactis* consortium US+C was performed to better describe the aroma compounds' profile of these communities (Figure 7). The C alone mostly characterized by a 'diacetylactis footprint', was removed from the analysis not to mask the other compounds

present in lower quantities (Table 1). The representation on Figure 7 shows two distinct groups corresponding to the two different types of fermented milks US and US+C. This meaning the compounds discriminate the fermented milks by the nature of the two communities, with groups of compounds characteristic of each type of fermented milk. According to the correlation between variables and factors, the F1 axis well represents 9 compounds, from 5-hydroxy-2,7-dimethyloctan-4-one to hexanal, correlated with US+C individuals, on the right side of the F1 axis (Figure 7). The F2 axis well represents the other 7 compounds with a clear correlation of the 2-methylthiolan-3-one with US+C individuals (Figure 7). ANOVA results well confirmed the significant higher production of this compound in US+C compared to US and C (Table 1). This was the only compound showing a significant higher production by the association US+C than by the two communities alone. This specific higher production of 2-methylthiolan-3-one in US+C could likely result from an interaction between the undefined starter and the consortium. Conversely, 3-methylbutan-1-ol, 3-methylbutanal and 2-methylpropan-1-ol were significantly found in lower amounts in US+C compared to US (Table 1). On the PCA, these variables are anti-correlated with the 2-methylthiolan-3-one variable (Figure 7). Pentane-2,3-dione and 3-hydroxybutan-2-one (acetoin) were part of the aromatic profile of the milks fermented with the US+C. Acetoin was significantly produced in higher amount in C compared to US+C and US, and in US+C compared to US (Table 1). This is in accordance with previous results having shown an acetoin production in C and US+C during the evolution, which was linked to the presence of the diacetylactis population represented by the EIP33 strain. The butane-2,3-dione (diacetyl) was found in larger amounts in C (Table 1). This is in accordance with the 'diacetylactis profile' of the consortium harboring the genetic background to metabolize the citrate. Although surprisingly, US showed a significant higher diacetyl production than US+C (Table 1). As biovar diacetylactis strains are not present in US, the diacetyl production is not due to citrate metabolism.

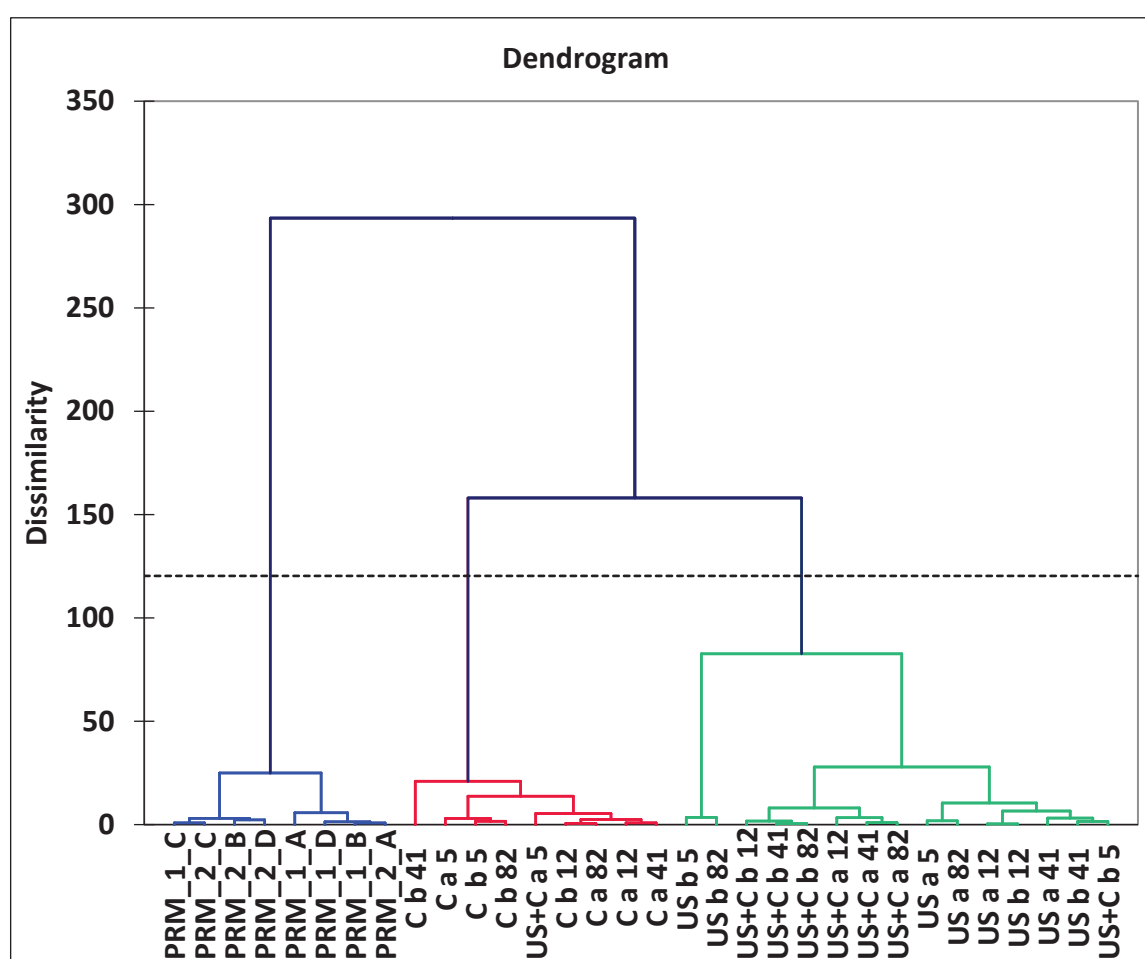


Figure 6. Hierarchical agglomerative clustering from the PCA of VOCs data for the three communities and the control milks. ‘PRM’ is for pasteurized raw milk (i.e. control milks): after chemical acidification, two milk samples (‘1’ and ‘2’) were divided into four replicates ‘A’, ‘B’, ‘C’ and ‘D’. ‘C’, ‘US’ and ‘US+C’ refer to the consortium alone, the undefined starter alone, and the association of both communities, respectively. ‘a’ and ‘b’ are the biological duplicates corresponding to two independent samples, and 5, 12, 41 and 82 refer to four stages of the evolution. The dotted line represents the threshold separating the three classes observed, that correspond to three distinct branches on the dendrogram.

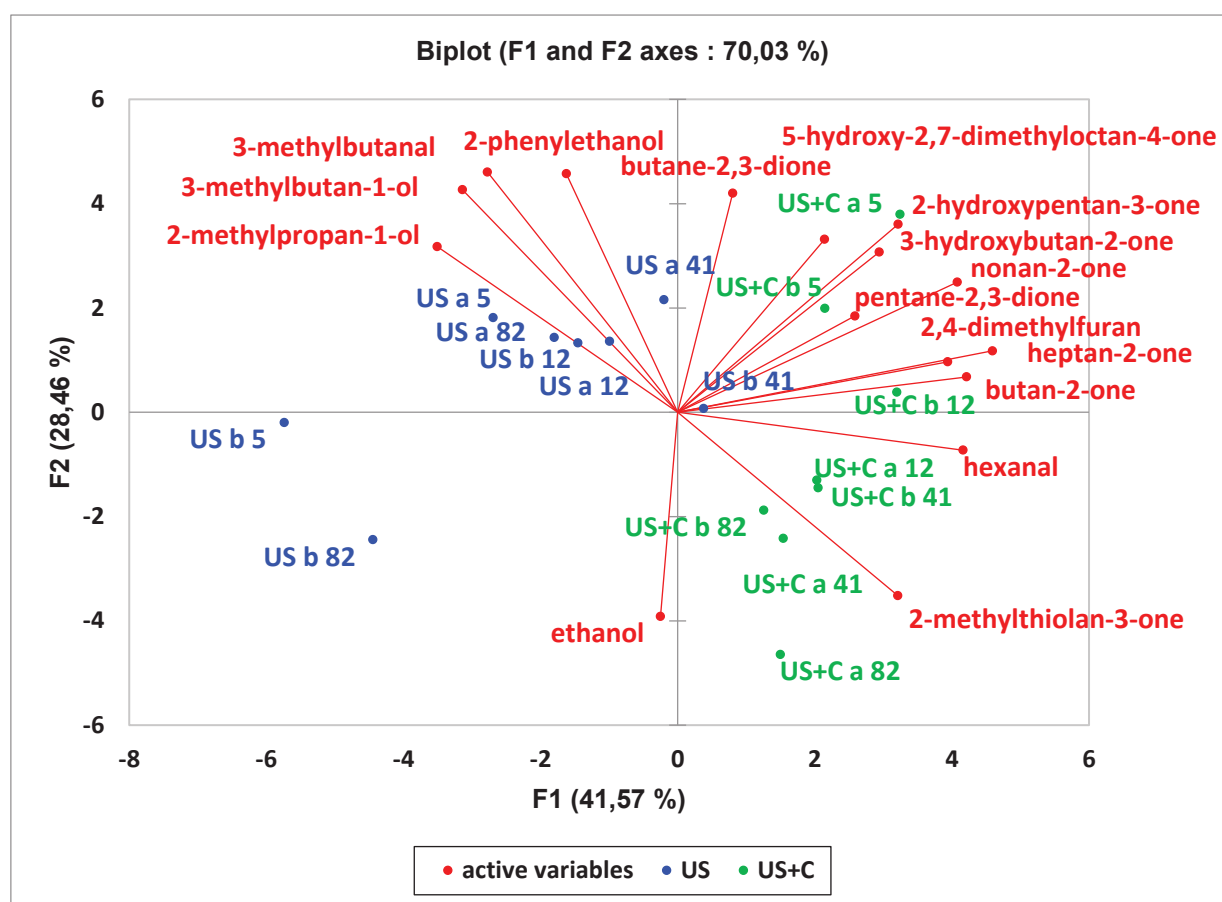


Figure 7. Principal component analysis representing the milks fermented by the undefined starter alone and in the presence of the consortium, after compounds' selection regarding ANOVA results. Both variables and observations are represented on the distance biplot, by F1 and F2 axes representing 41.57% and 28.46% of the total variability of individuals, respectively. 'US+C' and 'C' correspond to 'undefined starter + consortium' and 'consortium' communities respectively. 'a' and 'b' are the biological duplicates corresponding to two independent samples, and 5, 12, 41 and 82 refer to four stages of the evolution.

Table 1. Volatile compounds identified in milks fermented by the three communities, and in the control milks.

CAS Number	Volatile compounds (IUPAC Name)	Odour descriptors ^a	m/z	Identification ^b	Kovats Index, calculated	P-value nature ^c	Ranking from Tukey test for the factor 'nature of the community'
123-51-3	3-methylbutan-1-ol	fusel, alcoholic, pungent, ethereal, cognac, fruity, banana, molasses	70	DB, KI, S	1238	<0,0001	'C' = 'US' > 'US+C'
590-86-3	3-methylbutanal	aldehydic, ethereal, chocolate, peach, fatty	86	DB, KI, S	913	<0,0001	'C' > 'US' > 'US+C'
431-03-8	butane-2,3-dione	strong, butter, sweet, creamy, pungent, caramel	86	DB, KI, S	964	<0,0001	'C' > 'US' > 'US+C'
600-14-6	pentane-2,3-dione	buttery, nutty, toasted, caramellic, creamy	100	DB, KI, S	1045	<0,0001	'C' > 'US+C' = 'US'
5704-20-1	2-hydroxypentan-3-one	truffle, nutty, earthy	59	DB, KI	1375	<0,0001	'C' > 'US+C' = 'US'
6838-51-3	5-hydroxy-2,7-dimethyloctan-4-one	?	69	DB, KI	1477	<0,0001	'C' > 'US+C' = 'US'
66-25-1	hexanal	fresh, green, fatty, aldehyc, grass, leafy, fruity, sweaty	67	DB, KI	1061	<0,0001	'C' > 'US+C' > 'US'
513-86-0	3-hydroxybutan-2-one	sweet, buttery, creamy, dairy, milky, fatty	88	DB, KI, S	1303	<0,0001	'C' > 'US+C' > 'US'

60-12-8	2-phenylethanol	floral, rose dried, rose flower, rose water	91	DB, KI	1864	0,014	'C' $\geq$ 'US' $\geq$ 'US+C'
110-43-0	heptan-2-one	fruity, spicy, sweet, herbal, coconut, woody	58	DB, KI	1193	0,001	'C' $\geq$ 'US+C' > 'US'
821-55-6	nonan-2-one	fresh, sweet, green, weedy, earthy, herbal	71	DB, KI, S	1403	0,005	'C' $\geq$ 'US+C' $\geq$ 'US'
78-83-1	2-methylpropan-1-ol**	ethereal, winey	74	DB, KI, S	1093	<0,0001	'US' = 'C' > 'US+C'
64-17-5	ethanol	alcoholic, ethereal, medicinal	46	DB, KI	931	0,001	'US+C' = 'US' > 'C'
78-93-3	butan-2-one*	ethereal, fruity, camphoreous	72	DB, KI	905	<0,0001	'US+C' > 'C' = 'US'
13679-85-1	2-methylthiolan-3-one	sulfurous, fruity, berry	60	DB, KI	1520	0,001	'US+C' > 'US' = 'C'
3710-43-8	2,4-dimethylfuran*	?	96	DB, KI	949	0,015	'US+C' $\geq$ 'C' $\geq$ 'US'
67-64-1	propan-2-one	solvent, ethereal, apple, pear	58	DB, KI	826	0,772	NS
107-87-9	pentan-2-one	sweet, fruity, ethereal, wine, banana, woody	71	DB, KI	957	0,056	NS
624-92-0	(methyldisulfanyl)methane	sulfurous, vegetable, cabbage, onion	64	DB, KI, S	1047	0,07	NS
64-19-7	acetic acid	sharp, pungent, sour, vinegar	45	DB, KI, S	1457	0,242	NS
107-92-6	butanoic acid	sharp, acetic, cheese, butter, fruit	73	DB, KI, S	1616	0,304	NS

142-62-1	hexanoic acid	sour, fatty, sweat, cheese	60	DB, KI, S	1793	0,107	NS
67-71-0	Methylsulfonylmethane	sulfurous, burnt	48	DB, KI	1832	0,68	NS
124-07-2	octanoic acid	fatty, waxy, rancid, oily, vegetable, cheesy	101	DB, KI, S	1967	0,102	NS

^aOdor described from thegoodscentscompany.com

^bIdentification based on: Kovats index 'KI', mass spectral data Library NIST 2008 'DB', and standards 'S'

*Compounds significantly found in larger amount in the control compared to the fermented milks

**For the 2-methylpropan-1-ol, one outlier individual for day 41 was removed from the analysis

Summary table of identified compounds, their associated odor descriptors and the traceability for their identification. The p-values from the ANOVA testing the factor 'nature of the community' are given for each compound. The ranking of the three types of fermented milks from the Tukey test, when the ANOVA p-value was found significant, indicates which community, relatively to the others, produces significantly more of the compound (>), tends to produce more but it is not significant ($\geq$), or produces similar amounts (=). 'NS' corresponds to no significant differences between the three types of fermented milks (i.e. p-value>0.05).

4. Discussion

To evaluate the impact of the addition of a well-known starter to a naturally structured community over time, a goat raw milk was submitted to an experimental evolution, alone or in association with a consortium of selected strains. This process is comparable to backslopping practices used in different traditional fermented dairy products such as farm-house goat cheeses, Gwell or Grana Padano and Parmigiano Reggiano, where a portion of a successful fermentation is used as an inoculum to initiate a new fermentation into a fresh raw material (Demarigny and Gerber, 2014; Filippis *et al.*, 2014; von Gastrow *et al.*, 2020). In this case, the backslopped community must compete with the microbial community present in the raw milk. In this experimental evolution, the fermented milk is added to a sterile skimmed milk. Hence, the community will shape without adding new raw milk microbiota nor environmental modifications linked to the matrix. The structuration of this community will probably result in adaptive selection via abiotic factors such as pH, nutrients (lactose and casein) and biotic interactions (e.g. commensalism, mutualism, inhibition) between the microorganisms (Nemergut *et al.*, 2013). Species known for their acidification and proteolytic capacities usually take over. We have observed this phenomenon after only two BS with a majority of starter LAB (58.9% of *Lactococcus lactis* species) and an efficient community to drop rapidly the pH at 4.4 at 22°C. The large predominance of this species is also observed in Gwell, a traditional French mesophilic fermented milk which is used in a similar process including the BS practice (von Gastrow *et al.*, 2020). The same applies to different fermented milk such as Viili from Finland (Kahala *et al.*, 2008), Dadhi from Indonesia (Venema & Surono, 2019; Wirawati *et al.*, 2019), or Mabisi from Zambia (Moonga *et al.*, 2020). The absence of *S. thermophilus* or other thermophilic species in our raw milk evolved community is not surprising and could be explained by the incubation temperature at 22°C, disadvantaging the selection of thermophilic LAB.

BS is often recommended to stabilize and improve the sanitary quality of the microbiota after only few cycles (Özel *et al.*, 2020; Venema & Surono, 2019). Indeed, *Enterobacter*, a genus including potential pathogens and present after the two BS of the US construction and thus, at day 0 of the evolution, is not detected at day 41, nor to the day 89, with a community composition remaining quite stable. Nevertheless, *Acinetobacter*, selected during the natural starter construction, remains present throughout the evolution. Numerous comprehensive studies investigated the microbiome of raw milks according to season, lactation period and farms, and psychrotrophic genera associated with spoilage, such as *Pseudomonas* and

Acinetobacter, were present in numerous samples (Joishy *et al.*, 2019; Kable *et al.*, 2019, 2016; McHugh *et al.*, 2020). More specifically, the study of Li *et al.*, (2018) highlighted a tiny core microbiome of bacterial raw milk communities constituted by these two genera since *Acinetobacter* and *Pseudomonas* were detected in all 112 cow milk samples examined. The presence of these psychrotrophic bacteria is linked with the raw milk conservation at refrigeration temperatures before cheesemaking (Ercolini *et al.*, 2009).

The stability of the technological properties is of particular interest and contributes to the undefined starter robustness. Indeed, after a period of variation until day 19, this natural community has adapted over time since the acidification capacities have stabilized at their best values (minimum lag time and high speed of acidification). This adaptation is described during the domestication of an environmental *Lactococcus lactis* strain in milk (Bachmann *et al.*, 2012). These phases of adaptation of a natural community have been well described in sourdough fermentations in which BS is frequently used. Wahengbam *et al.*, (2015) links a sudden drop in pH with the bacterial population build-up at the first steps of BS, and then the population's dynamics and technological properties remain stable. The addition of the consortium increases the *Lactococcus* genus proportion in the community, but *Enterobacter* and *Acinetobacter* are still present but to a lesser extent. The dynamics of the three genera remains the same over time. In our case, the consortium's maximum speed of acidification is lower than that of the undefined starter. Two reasons could explain this result: i) although designed to grow rapidly in milk, this consortium is not an industrial starter optimized for fast acidification, ii) fast and efficient acidifying strains were selected during the raw milk evolution (e.g. *Lactococcus cremoris* strains).

The aromatic footprint of the consortium is due to the production of acetoin and its derived compounds by the *L. lactis* strain 33. Indeed, this strain belongs to the biovar diacetylactis, well-known for the acetoin/diacetyl production from citrate metabolism (Laroute *et al.*, 2017; Torres Manno *et al.*, 2018). As none diacetylactis strain was detected in the undefined starter, these aroma compounds, retrieved in milk fermented by the association US+C, are probably due to the conservation of the *L. lactis* strain 33 in the US+C community. Indeed, the acetoin production of the C and the US+C communities was correlated with the proportion of diacetylactis population detected. However, it has to be noted that the US has the capacity to produce diacetyl, this compound being detected by GC-MS chromatography in the fermented raw milk model for VOCs analysis. Indeed, it has already been demonstrated that *L. lactis* environmental strains, lacking citrate metabolism, could produce this aroma (Alemayehu *et al.*,

2014; Passerini *et al*, 2013). Nevertheless, 3-hydroxybutane-2-one (acetoin), a compound associated to diacetyl, is not a characteristic of the US but is a footprint of the C, and was also found in the association US+C. We can assume that the pathways leading to the production of acetoin from diacetyl or alpha-acetolactate are more efficient in the *L. lactis* EIP33 strain than in strains belonging to the US. The 3-methylbutanal and its corresponding alcohol, which are the degradation products of leucine, characterize the milks fermented by US. Alemayehu *et al*, (2014) described the capacity of non-dairy *Lactococcus* strains to produce high levels of this aroma. The non-dairy *Lactococcus* population was probably present in milk before the fermentation and has adapted to the dairy environment while preserving their aromatic capacities during the build-up of the US. The crosstalk between the US and the selected strains of the consortium was highlighted by the production of 2-methylthiolan-3-one, the only compound produced in higher concentration in the milks fermented by the association US+C compared to US and C milks. This compound gives sulfurous, fruity and berry notes, and has been found in many foodstuffs, such as coffee or yogurt and cheese (Fuchsmann *et al*, 2015; Ott *et al*, 1997). It can be formed by chemical reactions during food preparations, but it is also produced by microorganisms, especially by the proteobacteria of the genus *Chitinophaga* and by yeasts, in which the production derived from cysteine and methionine metabolism respectively (Howell *et al*, 2005; Nawrath *et al*, 2010). 2-methylthiolan-3-one could give a particular footprint to the milks fermented by the association US+C and might differentiate them from those fermented by the C or the US, since only a few amount can influence the odor profile.

In conclusion, this study may help to understand the impact of associating a reasoned starter with a natural starter from raw milk over a long period, and demonstrate that indigenous microorganisms' community and selected starters may positively interact with each other to drive the flavor of the final product.

SUPPLEMENTARY DATA

FIGURE

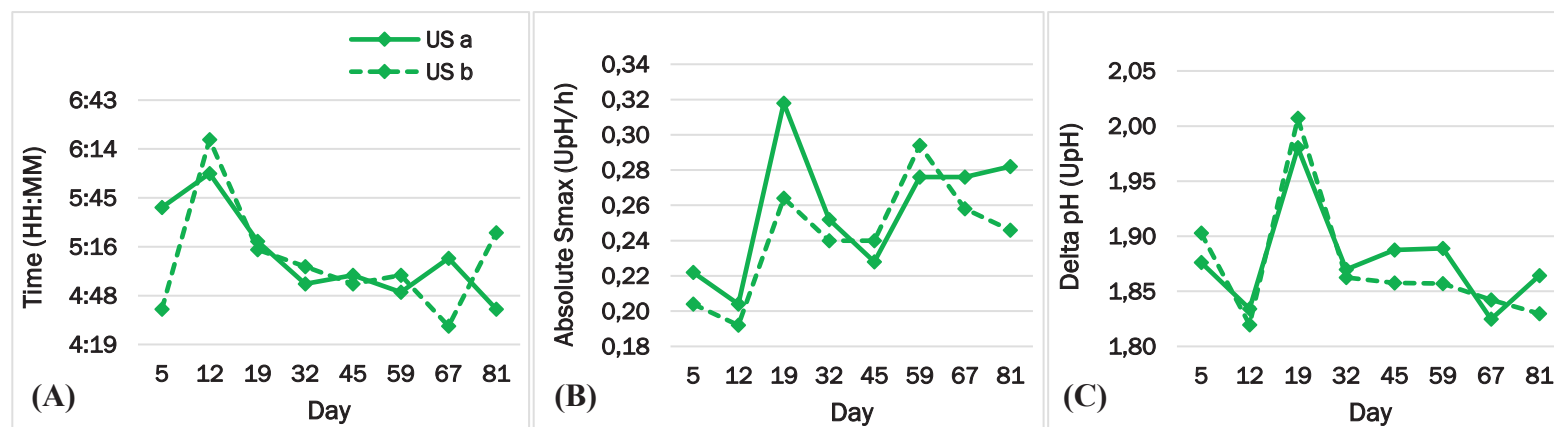


Figure S1. Acidification main features for the two replicates of the US community during the evolution. Data from acidification kinetics acquired with Cinac system for eight stages during the evolution: days 5, 12, 19, 32, 45, 59, 67 and 81. **(A) Lag time** before the start of acidification, **(B) Maximum speed** of acidification, and **(C) Delta pH** between t_0 and t_{24} corresponding to the absolute acidification in UpH on 24 hours of fermentation. ‘US’ corresponds the undefined starter community.

5. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

5 DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les travaux de cette thèse ont permis d'aborder des problématiques d'écologie microbienne à travers l'analyse des interactions métaboliques intra-espèces et inter-espèces au cours d'une évolution adaptative en lait. L'étude des interactions microbiennes présente un intérêt fondamental puisqu'elle permettra de comprendre les stratégies adaptatives adoptées, et les mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place de ces stratégies. De nombreux phénomènes régissent les dynamiques de populations au sein d'un écosystème et le métabolisme des différents acteurs joue un rôle prépondérant dans l'établissement de ces dynamiques. L'évolution expérimentale sur plus de 800 générations d'un consortium de souches de *Lactococcus lactis* sélectionnées de façon raisonnée a permis d'étudier les interactions métaboliques intra-espèces en lait, grâce au suivi de déterminants physiologiques impactant la croissance des souches et modulant ainsi leur dynamique. Un modèle mathématique prenant en compte deux types d'interactions métaboliques (c-à-d. inhibition et coopération) et des phénomènes adaptatifs a permis d'expliquer la dynamique observée. Bien que les métabolismes carboné et azoté jouent un rôle central dans l'établissement du réseau interactif, d'autres phénomènes sont connus pour impacter la croissance microbienne et réguler les variations de population chez *L. lactis*. Plusieurs perspectives à ce travail pourraient être proposées pour avoir une vision exhaustive des mécanismes mis en jeu dans la structuration de ce consortium

5.1 Elucider le rôle des prophages

Il serait intéressant d'évaluer l'impact des prophages et de leur excision sur la régulation des populations durant l'évolution expérimentale. En effet, les génomes de lactocoques sont connus pour héberger des prophages entiers ou défectifs, dont la présence contribue à la diversité génétique des lactocoques (Kelleher *et al*, 2018). Ces prophages peuvent négativement impacter les fermentations en cas d'induction puis excision, conduisant à la lyse cellulaire et à la perte de la souche. Cependant, au cours de certaines étapes d'un procédé, comme durant l'affinage des fromages, la lyse cellulaire engendrée peut impacter positivement le profil organoleptique des produits fermentés, grâce à la libération d'enzymes intracellulaires impliquées dans le développement des arômes (O'Sullivan *et al*, 2000). Il s'avère que l'étude de la stabilité de prophages chez trois souches industrielles de *L. lactis* au cours de procédés de fermentation impliquant différents stress technologiques (par ex. de température, acide, osmotique, oxydatif) a mis en évidence une induction modérée des prophages sous certaines de ces conditions comparativement à la forte induction engendrée par la mitomycine C (Ho *et al*, 2016). Plus

récemment, Kelleher et collaborateurs ont réalisé une étude plus exhaustive, sur le génome complet de 30 souches de lactocoques, en s'intéressant à la présence de prophages, à leur diversité génomique et à la balance bénéfique/risque, pour les souches hôtes, de porter ces prophages. Ces travaux ont montré que la présence stable de prophages pouvait être à l'avantage de la souche hôte, notamment via la présence de potentiels gènes impliqués dans des systèmes de résistance aux phages (Kelleher *et al*, 2018). Cependant, pour la bactérie, le risque majeur du à la présence de prophages est qu'ils constituent inévitablement un pool génétique pouvant participer à l'adaptation et à la diversification des phages virulents qui représentent un réel danger pour la cellule. A l'inverse, les prophages résidents peuvent aussi moduler les propriétés autolytiques cellulaires et la sensibilité à l'attaque par des bactériophages virulents. Une étude récente a montré que l'expression de gènes phagiques en conditions lysogéniques impliquait une modulation de la physiologie de la souche hôte de *L. lactis*, et pouvait impacter sa croissance et sa survie selon les conditions environnementales de culture (Aucouturier *et al*, 2018). Il apparaît ainsi que les prophages, faisant partie intégrante des génomes hôtes, participent vraisemblablement à la physiologie des cellules hôtes et à leur adaptation au sein d'un écosystème. Dans le cas des trois souches utilisées pour l'évolution expérimentale réalisée durant cette thèse, le séquençage de leurs génomes avant évolution et la recherche de prophages grâce au logiciel PHASTER ont montré des régions correspondant à des prophages putatifs entiers ou incomplets (Figure 10A). Ces régions représentent de 5% à 55% des régions spécifiques à chacune des souches. Pour certaines d'entre elles, les gènes de l'intégrase et de l'endolysine, respectivement impliqués dans l'intégration de l'ADN phagique et la lyse de la cellule, encadrent une région de 30-40 kb constituée par des gènes phagiques, témoignant de l'intégration des prophages au sein du chromosome bactérien. Pour les souches 13 et 33 l'analyse des séquences a permis de mettre en évidence des contigs de 13 et 25 kb ne pouvant être assemblés avec le chromosome. L'analyse de ces contigs a permis de dire qu'ils correspondaient vraisemblablement à des formes excisées de prophages. En effet, ils contiennent uniquement des gènes de phages, et les gènes de l'intégrase ainsi que le module endolysine/holine sont retrouvés côte à côte et en sens inverse. Cette configuration ne correspond pas à une localisation sur le chromosome (sur lequel ils sont diamétralement opposés) mais est typique d'une forme excisée. L'identification des sites AttL et AttR bornant les prophages intégrés par recombinaison spécifique de sites permettrait de connaître les séquences des sites AttP phagique et AttB bactérien (Figure 10B). Les formes excisées, n'entraînant pas systématiquement de cycle lytique complet, conduiraient à la régénération d'un site AttB. Un mélange de cellules ayant ou non le prophage serait alors observé. La détection

du couple AttL/AttB ou AttR/AttB par des techniques de PCR (qPCR ou ddPCR) pourrait donner un pourcentage d'excision des prophages de chaque souche (Figure 10B). Cette information constituerait un descripteur intéressant potentiellement intégrable dans le modèle mathématique expliquant la dynamique des souches au cours de l'évolution. En effet, il est possible que des excisions spontanées de prophages puissent réguler la croissance des populations. De plus, ce phénomène peut conduire au transfert horizontal de gènes phagiques et bactériens issus de la souche hôte (Nanda *et al*, 2015), mais peut également participer à la régulation génique bactérienne en jouant le rôle d'interrupteur lorsque le prophage est intégré au sein de gènes fonctionnels ou d'opérons (Feiner *et al*, 2015). De plus, la coévolution antagoniste hôte-parasite semble conduire à la sélection de mutations génétiques permettant leur adaptation au cours du temps (Buckling & Rainey, 2002). Ceci jouant vraisemblablement un rôle non négligeable dans l'orientation des processus écologiques et du scénario évolutif des populations évoluant seules ou en communauté au sein de l'écosystème.

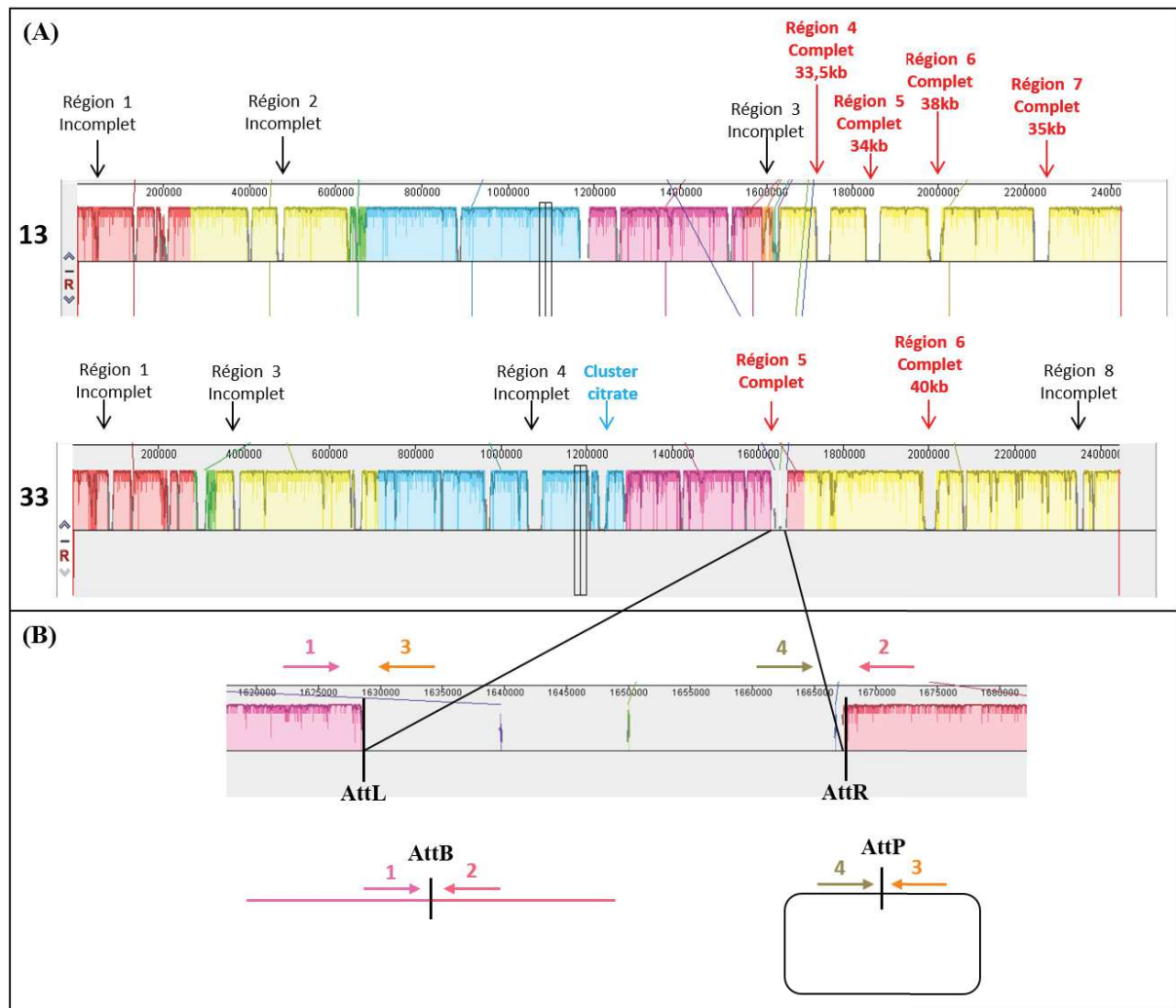


Figure 10. Représentation (A) des régions phagiques des génomes des souches 13 et 33 séquencés avant évolution et (B) de la stratégie de détection des formes intégrée et excisée d'un prophage putatif. Les alignements ont été réalisés sur MAUVE (Darling *et al*, 2004) et l'analyse des séquences phagiques sur PHASTER (Arndt *et al*, 2016). Les prophages complets ou régions phagiques (c-à-d. prophages incomplets) sont indiqués en rouge ou noir respectivement. Les flèches « 1 » et « 2 » correspondent à des amorces PCR complémentaires des régions chromosomiques bactériennes bordant la séquence phagique et permettant l'amplification du site *AttB* reconstitué en cas d'excision. Les flèches « 3 » et « 4 » correspondent à des amorces PCR complémentaires aux extrémités de l'ADN phagique intégré et permettant l'amplification respective des sites *AttL* et *AttR* (en présence des amorces « 1 » et « 2 » respectivement).

5.2 Mettre en évidence les modifications génétiques apparues lors de l'évolution expérimentale

La compréhension des mécanismes moléculaires à la base des interactions mises en évidence passe par l'étude des séquences des souches évoluées seules ou en mélange de façon à comparer 1) d'une part les génomes avant et après évolution et d'autre part 2) les génomes des souches ayant évoluées seules ou en mélange (Figure 11). Ceci nécessiterait d'isoler et identifier les souches après évolution puis de séquencer leur génome. Bien que classique, cette approche reste fastidieuse, notamment par le grand nombre de souches qu'il faudrait isoler et séquencer pour arriver à une vision exhaustive des modifications génétiques dues à l'évolution adaptative. Une approche plus globale pourrait alors être envisagée, par séquençage de la population totale de chacune des souches après évolution, qui permettrait d'étudier les différents variants ayant été sélectionnés au cours des générations. Cette approche, désignée de « Whole Population Sequencing » (WPS) viserait à suivre la fixation de certaines mutations au cours de l'adaptation de la souche. Ces mutations seraient comparées à celles obtenues par le consortium évolué (Figure 11B). En effet, la présence d'interactions inter-souches au sein du consortium, conditionnant les stratégies métaboliques adoptées et ainsi la physiologie cellulaire, implique certainement des modifications génétiques différentes des souches en culture pure. Cependant, le WPS montre certaines limites pour analyser les variants au sein d'un consortium constitué par des populations en coévolution. En effet, différencier les mutations apparues spécifiquement dans une souche ou dans une autre constitue un verrou étant donnée la proximité génétique de ces souches. Seules les mutations apparues dans les gènes spécifiques de souche pourraient être attribuées à une souche en particulier.

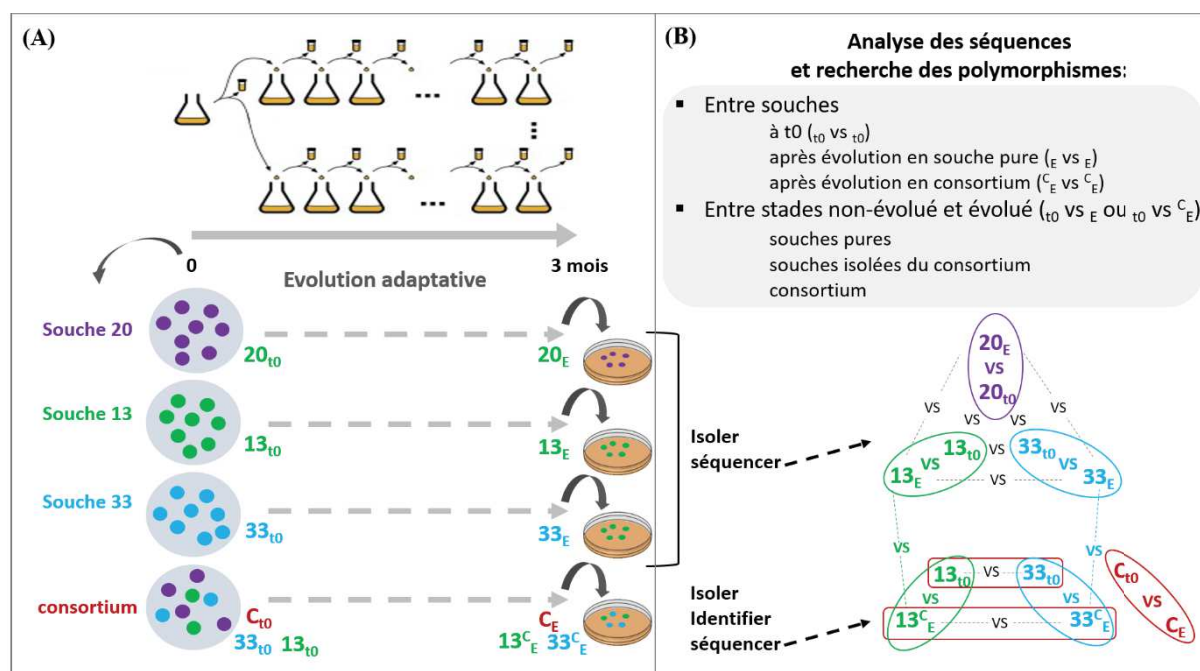


Figure 11. Stratégie expérimentale prévue pour mettre en évidence les modifications génétiques apparues lors de l'évolution expérimentale : (A) représentation schématique de l'évolution adaptative des souches 20, 13 et 33 en culture pure et en consortium entre t_0 et $t_{3\text{mois}}$ (B) stratégies et schéma des possibles comparaisons de séquences pour la recherche de polymorphismes après isolement.

Afin de relier les mutations aux phénotypes observés, il serait intéressant de repérer en particulier l'émergence de polymorphismes, et leur évolution au fil des générations, au niveau des séquences de gènes clés, codant pour des enzymes impliquées dans des fonctions technologiques. Les aminotransférases, par exemple, constituent des enzymes d'intérêt organoleptique, car elles sont impliquées dans les premières étapes des voies de biosynthèse de composés d'arômes à partir des acides aminés (Smid & Kleerebezem, 2014).

D'autre part, les souches de *L. lactis* isolées de l'environnement laitier abritent de nombreux plasmides arborant généralement des gènes impliqués dans des fonctions utiles à l'adaptation en lait et améliorant leur survie au sein de cette niche écologique (Kelleher *et al*, 2019; Ainsworth *et al*, 2014). Ces fonctions sont souvent d'intérêt technologique car elles participent à la transformation des constituants du lait en métabolites impactant le profil organoleptique des produits fermentés (par ex. acide lactique, acides aminés précurseurs d'arômes, composés d'arômes), mais aussi à des mécanismes importants tels que la résistance à des bactériophages, la conjugaison ou la production de bactériocines (Kelleher *et al*, 2019; Ainsworth *et al*, 2014). Il serait intéressant d'analyser les modifications des contenus plasmidiques de chaque souche ou les mutations fixées au niveau des différents plasmides lors de l'évolution. Les premières données de séquençage des souches non évoluées ont permis d'identifier dix éléments

correspondant à des plasmides chez les souches 13 et 33, dont un mégaplasme portant les gènes *lacE* et *prtP* chez la souche 13 et trois plasmides portant chacun un des gènes clés *lacE*, *prtP* ou *citP* chez la souche 33. Chez cette dernière souche, l'augmentation du nombre de copies du gène *prtP* dans la souche 33 avait été attribuée à une augmentation du nombre de copies du plasmide portant *prtP*. Il serait ainsi judicieux de s'intéresser à l'étude des mutations au niveau de l'origine de réplication de ce plasmide. Aussi, une analyse au niveau des différents acteurs du système protéolytique pourrait être pertinente puisqu'il semblerait que les souches modulent leur activité protéolytique lorsqu'elles sont en mélange. D'autre part, quatre plasmides, dont un portant *lacE*, ont été identifiés chez la souche 20 ayant disparue du consortium dans les premiers jours de l'évolution. Pourtant dépourvue du gène *prtP*, acteur clé du système protéolytique, cette souche s'est maintenue en monoculture durant toute l'évolution. L'étude de son matériel génétique chromosomique et plasmidique pourrait aider à identifier des gènes impliqués dans la fonction protéolytique ou encore dans la biosynthèse des acides aminés, permettant sa survie en lait.

Les mutations adaptatives peuvent conduire à des modifications d'expression, souvent dans le sens d'une spécialisation pour les conditions de culture caractérisant le milieu de propagation (Kleerebezem *et al*, 2020; Price *et al*, 2019). La modulation du régulateur pléiotropique CcpA, due à une unique mutation, a permis l'adaptation de *Lactococcus lactis* en condition de limitation en glucose au cours d'une évolution adaptative de laboratoire (Price *et al*, 2019). Cependant, cette spécialisation, ayant permis l'optimisation de l'import de glucose chez la souche évoluée, implique également une perte d'adaptabilité dans des conditions présentant d'autres source de carbone comme substrat. Compte tenu des phénomènes de variation observés au cours de l'évolution pour la fonction protéolytique, précisément au niveau du relargage d'acides aminés libres et du nombre de copies du gène plasmidique *prtP*, il pourrait être judicieux de s'intéresser à l'expression du régulateur CodY impliqué dans la régulation du système protéolytique chez *L. lactis*.

Outre la compréhension des mécanismes moléculaires associés aux phénotypes observés lors de l'évolution, l'analyse des mutations apparues dans des gènes ou des voies métaboliques n'étant pas en lien direct avec les phénotypes observés, devrait permettre de mettre en évidence de nouveaux acteurs clés dans les phénomènes adaptatifs. L'étude du génome accessoire de ces souches pourrait notamment permettre de mettre en évidence des mutations adaptatives dans

des régions spécifiques potentiellement impliquées dans des fonctions utiles ou favorables au maintien des souches 13 et 33 en co-culture et des trois souches 13, 33 et 20 en culture pure.

Enfin, les interactions intra-espèces entre les souches 13 et 33 témoignent de stratégies métaboliques différentes de chaque population comparativement à l'évolution de ces populations seules. Il serait ainsi intéressant de mesurer la fitness des souches ayant évoluées seules et en mélange afin d'étudier le potentiel avantage sélectif de variants impliqués dans des interactions inter-souches. Cette approche nécessitant d'isoler un nombre représentatif des deux souches du consortium évolué reste cependant fastidieuse à mettre en place. D'autre part, afin de répondre à la question de l'impact de l'évolution adaptative sur la fitness des souches seules et du consortium, cet indicateur pourrait être comparé entre les stades non évolué et évolué pour chacune des souches et pour le consortium.

5.3 Prendre en compte la structure de la matrice

Au cours de la croissance bactérienne, la composition de la matrice, pouvant varier, joue inévitablement un rôle dans l'établissement des interactions. C'est notamment le cas des fermentations laitières impliquant différentes modifications du lait selon le type de produit fermenté. Dans le cas des laits fermentés, l'acidification est l'un des principaux facteurs induisant la modification physico-chimique du lait. L'abaissement du pH conduit à la déstabilisation des micelles de caséines et ainsi à formation d'un gel lactique, c'est le phénomène de coagulation acide (Walstra, 1990). Les microorganismes peuvent ainsi se retrouver immobilisés au sein de matrices solides dans lesquelles ils poussent sous forme de colonies, interagissant avec leur microenvironnement (Jeanson *et al*, 2015). L'effet de séquestration dépend aussi de la taille des colonies. De la même façon qu'en culture planctonique, les hautes densités cellulaires, impliquant une croissance sous la forme de micro-colonies en milieu solide, favorisent les phénomènes interactifs grâce à de faibles distances inter-colonies. En l'absence de flux de liquide et en considérant un phénomène diffusion très limité, la distribution spatiale de ces colonies reste le paramètre déterminant conditionnant la possibilité d'établir des interactions entre colonies voisines. Les travaux de Van Tatenhove-Pel et collaborateurs soulignent l'importance des gradients de concentration en substrat autour des cellules, ceux-ci conditionnant l'établissement des interactions avec les cellules environnantes (van Tatenhove-Pel *et al*, 2020). En effet, les écosystèmes naturels sont des systèmes tridimensionnels, par opposition à des monocouches cellulaires à deux dimensions (par ex. culture sur boîte de Petri, dispositif microfluidique), au sein desquels la concentration en

métabolites varie. Cette variation est notamment fonction de la présence de cellules consommatrices et d'enzymes de dégradation, ou encore, des flux de liquide et du volume du système pouvant diluer les métabolites. La distance cellule-cellule et les caractéristiques de diffusion des métabolites apparaissent ainsi déterminants pour l'établissement des interactions. Les distances d'interaction de type cross-feeding au sein d'un consortium composé de cellules productrices, réceptrices et compétitrices, ont été prédites par modélisation puis vérifiées expérimentalement. Ces travaux ont montré que les interactions au sein de tels systèmes ne sont pas rendues possibles au-delà d'une distance de 15 μm de la cellule productrice, autour de laquelle les concentrations en métabolites varient selon un gradient dégressif. L'induction de phénomènes d'agrégation entre cellules productrices et réceptrices a permis une diminution de la distance cellule-cellule et du taux de diffusion, deux facteurs connus pour promouvoir les interactions. Dans notre cas, le changement de matrice est induit par le seul phénomène de fermentation par les souches de *L. lactis*. La diminution progressive du pH conduit en quelques heures à la formation d'un gel lactique, correspondant à un environnement à l'interface des milieux aqueux et solide. Notre modèle d'étude s'apparente ainsi à un lait fermenté au sein duquel la densité de biomasse, de l'ordre de 10^6 cellules/ml en début de chaque repiquage, et atteignant 10^9 cellules/ml après 24 heures de culture, devrait permettre la diffusion de métabolites entre cellules voisines.

5.4 Les associations entre starters indéfinis issus de lait cru et starters sélectionnés : un dialogue gagnant-gagnant ?

Comprendre les phénomènes régissant les interactions au sein des communautés microbiennes naturelles et leur évolution dans le temps reste un vrai défi. En effet, ces communautés à la structure complexe, comme par exemple celles issues de lait cru, sont souvent de composition indéfinie. Elles peuvent être étudiées comme des entités à part entière, tels des « méta-microorganismes » pouvant être caractérisés par des fonctionnalités propres à chaque écosystème. Ces fonctionnalités résultent du réseau métabolique établi et n'est pas la simple somme des individualités. L'évolution de ces communautés complexes au cours de fermentations pourra alors être abordée par des approches de méta-analyses (par ex. métagénomique, métabolome, volatilome) qui pourront servir comme descripteurs pour l'étude de la stabilité et de l'adaptation de l'écosystème au cours de son évolution dans le temps.

Il s'avère que les communautés complexes montrent une meilleure résilience face à des perturbations environnementales comparativement à des associations simples de quelques souches de microorganismes, moins stables en cas de stress (Erkus *et al*, 2013). La richesse et

la diversité des communautés complexes seraient à l'origine de cette stabilité et robustesse au cours du temps. En effet, cette diversité peut abriter une vaste hétérogénéité et notamment à l'échelle des souches. C'est particulièrement le cas de la résistance/sensibilité aux phages qui est souche-dépendant. Au sein d'une communauté complexe, les attaques phagiques impactent ainsi la dynamique au niveau des souches plus qu'au niveau des lignées. En effet, l'hétérogénéité inter-souche au sein d'une même lignée génétique permet généralement, malgré la perte d'une souche sensible, le maintien de cette lignée au cours d'un processus de propagation comme le backslipping, grâce à la présence de souches résistantes (Erkus *et al*, 2013). Dans ces communautés naturelles, les lignées sont maintenues et vivent en parfait équilibre avec les phages ayant structuré leur dynamique.

Cet équilibre est parfois rompu lors du BS, et des dérives fermentaires peuvent survenir (par ex. sûr- ou sous-acidification), et conduire à une détérioration de la qualité du produit fini (c-à-d. dérive sensorielle). Utilisée surtout pour sa contribution à la typicité des fromages (Demarigny & Gerber, 2014), cette pratique de BS de starters naturels nécessite parfois d'être remplacée ou associée à l'utilisation de starters industriels sélectionnés principalement pour leur potentiel acidifiant et leur reproductibilité fonctionnelle. Comprendre la coévolution de telles associations et évaluer leur impact sur les qualités organoleptiques du produit fermenté reste alors une boîte noire.

Dans cette étude, nous avons associé une communauté microbienne indéfinie issue de la fermentation d'un lait cru de chèvre (c-à-d. starter naturel), à trois souches de *L. lactis* en consortium. La stabilité et la robustesse de cet écosystème ainsi que la présence d'interactions métaboliques ont été étudiées lors d'une évolution expérimentale de trois mois réalisée par BS journaliers. Nous avons analysé la composition microbienne et les potentialités technologiques (acidification, production de composés d'arômes) du starter indéfini seul et en association avec le consortium de souches sélectionnées.

Cette étude met en avant le rôle déterminant de la composition des starters dans les profils d'acidification des laits fermentés et surtout, dans l'empreinte aromatique de ces mêmes laits. Elle démontre également l'aptitude des communautés microbiennes autochtones des laits, et notamment de l'espèce *L. lactis*, à constituer des starters naturels indéfinis technologiquement intéressants après quelques repiquages sur lait stérile. Les microorganismes indigènes fermentés associés à des starters sélectionnés peuvent donc interagir et orienter le profil

aromatique du produit fini de façon stable tout au long des repiquages successifs sur une période relativement longue (89 jours).

L'originalité de cette approche, et les résultats intéressants qui en découlent méritent d'être poursuivis. D'une part, la composition microbienne des starters naturels issus de la fermentation des laits crus dépend de la composition de ces communautés, qui dépendent elle-même des conditions de production propres à chacune des exploitations laitières (Montel *et al*, 2014; Mallet *et al*, 2012; Gobbetti *et al*, 2018). D'autre part, les aptitudes d'acidification et de production d'arômes sont conditionnées par la composition microbienne de ces starters naturels. Etablir des typologies de laits, basées sur le lien entre les pratiques utilisées en exploitation laitière (par ex. systèmes d'élevage extensif ou intensif, pratiques de traite, pratiques d'hygiène) et la composition microbienne, pourrait ainsi s'avérer utile pour la sélection des laits crus pouvant servir à la construction de starters naturels. L'utilisation de méthodes moléculaires pouvant cibler des espèces, lignées, populations ou souches d'intérêt, tel que l'outil de ddPCR mis en place pour la détection des espèces *lactis* et *cremoris* de *L. lactis* et des populations du biovar diacetylactis, aiderait à la caractérisation microbiologique des laits crus. Cet outil pourrait également être utilisé pour la détection de microorganismes pathogènes (par ex. *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella sp.*) nécessitant une détection à bas seuil de sensibilité.

L'étude de l'évolution par BS d'une variété de laits crus permettrait de valider ou non la démarche d'élaboration de starters naturels aux capacités technologiques intéressantes ayant été appliquée dans ces travaux de thèse. De même, il serait intéressant d'étudier les signatures aromatiques résultant de l'association entre divers starters naturels indéfinis et divers consortia sélectionnés, afin de pouvoir généraliser ou non l'utilisation avantageuse de telles associations, ayant conduit dans nos travaux à un profil aromatique présentant une spécificité n'étant pas la résultante des individualités des deux starters (naturel indéfini et synthétique sélectionné). D'autre part, les starters naturels permettent également des interactions entre bactéries, levures et moisissures et au sein de chaque communauté de champignons. Ces microorganismes eucaryotes aux capacités métaboliques variées participent à la production d'arômes d'intérêt dans de nombreuses denrées fermentées et notamment au sein des fromages (Dzialo *et al*, 2017; Banjara *et al*, 2015; Aroma Compound Production in Cheese Curd by Coculturing with Selected Yeast and Bacteria, 2001). Des approches de metabarcoding permettraient de détecter ces communautés et d'évaluer leur proportion au sein du starter naturel, en présence ou non du

consortium de souches de *L. lactis*, au cours de l'évolution expérimentale. Ces données seraient à mettre en regard des profils de COVs des laits ayant fermentés en présence de la communauté indéfinie issue de lait cru.

L'analyse des composés volatils par GC-MS, technique précise usuellement utilisée pour la description des profils aromatiques des denrées fermentées, reste relativement lourde et laborieuse à réaliser et ne permet pas une analyse en temps réel au cours d'une fermentation. La technique SIFT-MS (Selected-Ion Flow-Tube Mass Spectrometry) permet l'analyse en continu des composés aromatiques produits au sein des aliments (Langford *et al*, 2019). Cette technique, présentant de basses limites de détection (de l'ordre du ng/g) (Gibson *et al*, 2015) et une bonne répétabilité, ne nécessite aucune préparation de l'échantillon. Elle est ainsi plus rapide que la GC-MS et permet de s'affranchir des modifications et biais liés à la préparation des échantillons. L'analyse de l'espace de tête du produit permet d'obtenir une empreinte globale des composés aromatiques présents, ou d'identifier spécifiquement des composés aromatiques. Cette technique a été utilisée avec succès pour l'authentification du terroir de 130 échantillons d'huiles d'olive du bassin méditerranéen (Bajoub *et al*, 2018). Elle a permis également de différencier différentes variétés de fromages (Perez-Hurtado *et al*, 2017), mais aussi de différencier une même variété de fromages produits dans différentes entreprises et de corréler des composés aromatiques à des descripteurs sensoriels (Castada *et al*, 2019). La technique SIFT-MS a également servi à tracer et différencier en temps réel trois espèces d'entérobactéries en interaction, grâce au suivi des concentrations espèce-dépendantes de sept composés volatils produits (Sovová *et al*, 2013). Le plus grand intérêt de cet outil réside ainsi dans le suivi de la dynamique de production des composés volatils pendant le processus de fermentation et au cours des différents repiquages. Il pourrait également être utilisé pour sélectionner des laits crus après une première fermentation.

CONCLUSION GENERALE

Les travaux de cette thèse constituent un point de départ à l'étude des mécanismes fondamentaux structurant les communautés, qu'elles soient construites de façon raisonnée ou non, et permettent d'entrevoir diverses applications. L'utilisation de la ddPCR habituellement employée dans le domaine médical, a permis, d'étudier finement les populations au sein des écosystèmes laitiers. Elle a ainsi prouvé son utilité en écologie microbienne. Bien que de nombreuses études d'évolutions expérimentales adaptatives de souches pures existent dans la littérature, peu de travaux sur l'évolution et l'adaptation de communautés ou de consortia ont été décrits et finement analysés à ce jour. Pourtant, dans la nature ou dans des fermentations alimentaires, une souche ne se retrouve jamais seule mais toujours en mélange avec différentes populations, qu'elles soient phylogénétiquement proches ou non. Au sein de ces écosystèmes, les interactions microbiennes impactent considérablement la dynamique des populations. Dans cette étude, la modélisation mathématique a été un outil de choix pour décrypter le dialogue métabolique intra-espèce, et d'autres paramètres peuvent être rajoutés au modèle pour le rendre plus exhaustif et robuste, et éventuellement lui conférer une valeur prédictive. En mettant en évidence des phénomènes interactifs métaboliques intra- et inter-espèces au cours de cette évolution expérimentale en lait, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées à différents niveaux. De l'étude des modifications génétiques aux fonctionnalités technologiques, en passant par le rôle des prophages au cours de l'évolution d'un consortium ou d'une communauté naturelle, ces perspectives restent toutes associées à des problématiques d'écologie microbienne.

6. REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

6 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Achilleos C & Berthier F (2013) Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. *Food Microbiol* 36: 286–295
- Agrimonti C, Bottari B, Sardaro MLS & Marmioli N (2019) Application of real-time PCR (qPCR) for characterization of microbial populations and type of milk in dairy food products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 59: 423–442
- Ainsworth S, Stockdale S, Bottacini F, Mahony J & van Sinderen D (2014) The *Lactococcus lactis* plasmidome: much learnt, yet still lots to discover. *FEMS Microbiol Rev* 38: 1066–1088
- Alemayehu D, Hannon JA, McAuliffe O & Ross RP (2014) Characterization of plant-derived lactococci on the basis of their volatile compounds profile when grown in milk. *Int J Food Microbiol* 172: 57–61
- Allison SD & Martiny JBH (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci* 105: 11512–11519
- Almeida M, Hébert A, Abraham A-L, Rasmussen S, Monnet C, Pons N, Delbès C, Loux V, Batto J-M, Leonard P, *et al* (2014) Construction of a dairy microbial genome catalog opens new perspectives for the metagenomic analysis of dairy fermented products. *BMC Genomics* 15: 1101
- Arbi AE, Ghorbal S, Delacroix-Buchet A & Bouix M (2011) Assessment of the dynamics of the physiological states of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 during growth by flow cytometry. *J Appl Microbiol* 111: 1205–1211
- Ardö Y (2006) Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnol Adv* 24: 238–242
- Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y & Wishart DS (2016) PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* 44: W16–21
- Aroma Compound Production in Cheese Curd by Coculturing with Selected Yeast and Bacteria (2001) *J Dairy Sci* 84: 2125–2135
- Ashraf R & Shah NP (2011) Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt--a review. *Int J Food Microbiol* 149: 194–208
- Aucouturier A, Chain F, Langella P & Bidnenko E (2018) Characterization of a Prophage-Free Derivative Strain of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 Reveals the Importance of Prophages for Phenotypic Plasticity of the Host. *Front Microbiol* 9
- Auvolat A & Besse NG (2016) The challenge of enumerating *Listeria monocytogenes* in food. *Food Microbiol* 53: 135–149

Ayad EHE, Verheul A, Engels WJM, Wouters JTM & Smit G (2001) Enhanced flavour formation by combination of selected lactococci from industrial and artisanal origin with focus on completion of a metabolic pathway. *J Appl Microbiol* 90: 59–67

Ayad EHE, Verheul A, de Jong C, Wouters JTM & Smit G (1999) Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *Int Dairy J* 9: 725–735

B

Babot JD, Hidalgo M, Argañaraz-Martínez E, Apella MC & Perez Chaia A (2011) Fluorescence in situ hybridization for detection of classical propionibacteria with specific 16S rRNA-targeted probes and its application to enumeration in Gruyère cheese. *Int J Food Microbiol* 145: 221–228

Bachmann H, Bruggeman FJ, Molenaar D, Branco dos Santos F & Teusink B (2016) Public goods and metabolic strategies. *Curr Opin Microbiol* 31: 109–115

Bachmann H, Fischlechner M, Rabbers I, Barfa N, Branco dos Santos F, Molenaar D & Teusink B (2013) Availability of public goods shapes the evolution of competing metabolic strategies. *Proc Natl Acad Sci* 110: 14302–14307

Bachmann H, Molenaar D, Kleerebezem M & van Hylckama Vlieg JET (2011) High local substrate availability stabilizes a cooperative trait. *ISME J* 5: 929–932

Bachmann H, Starrenburg MJC, Molenaar D, Kleerebezem M & van Hylckama Vlieg JET (2012) Microbial domestication signatures of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution. *Genome Res* 22: 115–124

Bachmann H, de Wilt L, Kleerebezem M & van Hylckama Vlieg JET (2010) Time-resolved genetic responses of *Lactococcus lactis* to a dairy environment. *Environ Microbiol* 12: 1260–1270

Bajoub A, Medina-Rodríguez S, Ajal EA, Cuadros-Rodríguez L, Monasterio RP, Vercammen J, Fernández-Gutiérrez A & Carrasco-Pancorbo A (2018) A metabolic fingerprinting approach based on selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS) and chemometrics: A reliable tool for Mediterranean origin-labeled olive oils authentication. *Food Res Int* 106: 233–242

Baker GC, Smith JJ & Cowan DA (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods* 55: 541–555

Banjara N, Suhr MJ & Hallen-Adams HE (2015) Diversity of Yeast and Mold Species from a Variety of Cheese Types. *Curr Microbiol* 70: 792–800

Barani F, Dell'Amico N, Griffone L, Santoro M & Tarabella C (2006) Determination of Volatile Organic Compounds by Headspace Trap. *J Chromatogr Sci* 44: 625–630

Barrick JE & Lenski RE (2013) Genome dynamics during experimental evolution. *Nat Rev Genet* 14: 827–839

- Ben Said S & Or D (2017) Synthetic Microbial Ecology: Engineering Habitats for Modular Consortia. *Front Microbiol* 8
- Beresford T & Williams A (2004) The microbiology of cheese ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1: General Aspects* pp 287–318. Elsevier
- Blasche S, Kim Y, Mars RAT, Machado D, Maansson M, Kafkia E, Milanese A, Zeller G, Teusink B, Nielsen J, *et al* (2021) Metabolic cooperation and spatiotemporal niche partitioning in a kefir microbial community. *Nat Microbiol*: 1–13
- Bove CG, Angelis MD, Gatti M, Calasso M, Neviani E & Gobbetti M (2012) Metabolic and proteomic adaptation of *Lactobacillus rhamnosus* strains during growth under cheese-like environmental conditions compared to de Man, Rogosa, and Sharpe medium. *PROTEOMICS* 12: 3206–3218
- Boyer M & Combrisson J (2013) Analytical opportunities of quantitative polymerase chain reaction in dairy microbiology. *Int Dairy J* 30: 45–52
- Buckling A & Rainey PB (2002) Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*
- Bukvicki D, Siroli L, D'Alessandro M, Cosentino S, Fliss I, Said LB, Hassan H, Lanciotti R & Patrignani F (2020) Unravelling the Potential of *Lactococcus lactis* Strains to Be Used in Cheesemaking Production as Biocontrol Agents. *Foods Basel Switz* 9
- Bunthof CJ, Bloemen K, Breeuwer P, Rombouts FM & Abee T (2001) Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 67: 2326–2335
- Burke C, Steinberg P, Rusch D, Kjelleberg S & Thomas T (2011) Bacterial community assembly based on functional genes rather than species. *Proc Natl Acad Sci* 108: 14288–14293

C

- Caillaud M-A, Abeilhou M, Gonzalez I, Audonnet M, Gaucheron F, Coccagn-Bousquet M, Tormo H & Daveran-Mingot M-L (2020) Precise Populations' Description in Dairy Ecosystems Using Digital Droplet PCR: The Case of *L. lactis* Group in Starters. *Front Microbiol* 11
- Canon F, Nidelet T, Guédon E, Thierry A & Gagnaire V (2020) Understanding the Mechanisms of Positive Microbial Interactions That Benefit Lactic Acid Bacteria Co-cultures. *Front Microbiol* 11
- Castada HZ, Hanas K & Barringer SA (2019) Swiss Cheese Flavor Variability Based on Correlations of Volatile Flavor Compounds, Descriptive Sensory Attributes, and Consumer Preference. *Foods Basel Switz* 8
- Cavaliere M, Feng S, Soyer OS & Jiménez JI (2017) Cooperation in microbial communities and their biotechnological applications. *Environ Microbiol* 19: 2949–2963
- Cavanagh D, Casey A, Altermann E, Cotter PD, Fitzgerald GF & McAuliffe O (2015a) Evaluation of *Lactococcus lactis* Isolates from Nondairy Sources with Potential Dairy

- Applications Reveals Extensive Phenotype-Genotype Disparity and Implications for a Revised Species. *Appl Environ Microbiol* 81: 3961–3972
- Cavanagh D, Fitzgerald GF & McAuliffe O (2015b) From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiol* 47: 45–61
- Celiker H & Gore J (2014) Clustering in community structure across replicate ecosystems following a long-term bacterial evolution experiment. *Nat Commun* 5: 4643
- Centeno JA, Tomillo FJ, Fernández-García E, Gaya P & Nuñez M (2002) Effect of Wild Strains of *Lactococcus lactis* on the Volatile Profile and the Sensory Characteristics of Ewes' Raw Milk Cheese. *J Dairy Sci* 85: 3164–3172
- Chopin A (1993) Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12: 21–37
- Cocaign-Bousquet M, Garrigues C, Novak L, Lindley ND & Loublere P (1995) Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. *J Appl Bacteriol* 79: 108–116
- Cocolin L & Ercolini D (2015) Zooming into food-associated microbial consortia: a 'cultural' evolution. *Curr Opin Food Sci* 2: 43–50
- Coeuret V, Gueguen M & Vernoux JP (2004) In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. *J Dairy Res* 71: 451–460
- Corroler D, Desmasures N & Gueguen M (1999) Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 91–99
- Cosetta CM & Wolfe BE (2019) Causes and consequences of biotic interactions within microbiomes. *Curr Opin Microbiol* 50: 35–41
- Courtin P & Rul F (2004) Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Le Lait* 84: 125–134
- Cremonesi P, Cortimiglia C, Picozzi C, Minozzi G, Malvisi M, Luini M & Castiglioni B (2016) Development of a Droplet Digital Polymerase Chain Reaction for Rapid and Simultaneous Identification of Common Foodborne Pathogens in Soft Cheese. *Front Microbiol* 7: 1725
- Curioni PMG & Bosset JO (2002) Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *Int Dairy J* 12: 959–984

D

- Dalmasso M, Hennequin D, Duc C & Demarigny Y (2009) Influence of backslopping on the acidifications curves of "Tomme" type cheeses made during 10 successive days. *J Food Eng* 92: 50–55

- Darling ACE, Mau B, Blattner FR & Perna NT (2004) Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* 14: 1394–1403
- Davis C (2014) Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *J Microbiol Methods* 103: 9–17
- De Angelis M & Gobbetti M (2011) Stress Responses of Lactobacilli. In *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*, Tsakalidou E & Papadimitriou K (eds) pp 219–249. Boston, MA: Springer US
- De Roy K, Marzorati M, Van den Abbeele P, Van de Wiele T & Boon N (2014) Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities. *Environ Microbiol* 16: 1472–1481
- De Vuyst L, De Vin F, Vaningelgem F & Degeest B (2001) Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 11: 687–707
- Delavenne E, Mounier J, Asmani K, Jany J-L, Barbier G & Le Blay G (2011) Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *Int J Food Microbiol* 151: 247–251
- Delbès C & Montel M-C (2005) Design and application of a Staphylococcus-specific single strand conformation polymorphism-PCR analysis to monitor Staphylococcus populations diversity and dynamics during production of raw milk cheese. *Lett Appl Microbiol* 41: 169–174
- Demarigny Y, Dalmasso M, Tonleu A, Rigobello V, Beuvier E, Ly-Chatain MH & Bouton Y (2011) Influence of the Backslopping Practice on the Microbial Diversity of the Lactococcus Population in a Model Cheesemaking. *Food Nutr Sci* 02: 618
- Demarigny Y & Gerber P (2014) Usefulness of Natural Starters in Food Industry: The Example of Cheeses and Bread. *Food Nutr Sci* 05: 1679–1691
- Dhaisne A, Guellerin M, Laroute V, Laguerre S, Coccagn-Bousquet M, Le Bourgeois P & Loubiere P (2013) Genotypic and Phenotypic Analysis of Dairy Lactococcus lactis Biodiversity in Milk: Volatile Organic Compounds as Discriminating Markers. *Appl Environ Microbiol* 79: 4643–4652
- Díaz M, Herrero M, García LA & Quirós C (2010) Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochem Eng J* 48: 385–407
- Domingos-Lopes MFP, Stanton C, Ross PR, Dapkevicius MLE & Silva CCG (2017) Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiol* 63: 178–190
- D’Urso OF, Poltronieri P, Marsigliante S, Storelli C, Hernández M & Rodríguez-Lázaro D (2009) A filtration-based real-time PCR method for the quantitative detection of viable Salmonella enterica and Listeria monocytogenes in food samples. *Food Microbiol* 26: 311–316
- Dzialo MC, Park R, Steensels J, Lievens B & Verstrepen KJ (2017) Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiol Rev* 41: S95–S128

E

- Ercolini D (2013) High-Throughput Sequencing and Metagenomics: Moving Forward in the Culture-Independent Analysis of Food Microbial Ecology. *Appl Environ Microbiol* 79: 3148–3155
- Ercolini D, Frisso G, Mauriello G, Salvatore F & Coppola S (2008) Microbial diversity in Natural Whey Cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese. *Int J Food Microbiol* 124: 164–170
- Ercolini D, Hill PJ & Dodd CER (2003) Bacterial Community Structure and Location in Stilton Cheese. *Appl Environ Microbiol* 69: 3540–3548
- Ercolini D, Russo F, Ferrocino I & Villani F (2009) Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiol* 26: 228–231
- Erkus O, Jager VC de, Spus M, Alen-Boerrigter IJ van, Rijswijk IM van, Hazelwood L, Janssen PW, Hijum SA van, Kleerebezem M & Smid EJ (2013) Multifactorial diversity sustains microbial community stability. *ISME J* 7: 2126–2136
- Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S & Pascal G (2018) FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinforma Oxf Engl* 34: 1287–1294
- Estrela S, Morris JJ & Kerr B (2016) Private benefits and metabolic conflicts shape the emergence of microbial interdependencies. *Environ Microbiol* 18: 1415–1427

F

- Falkowski PG, Fenchel T & Delong EF (2008) The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles. *Science* 320: 1034–1039
- Fallico V, McAuliffe O, Fitzgerald GF & Ross RP (2011) Plasmids of Raw Milk Cheese Isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Biovar diacetylactis DPC3901 Suggest a Plant-Based Origin for the Strain ▽. *Appl Environ Microbiol* 77: 6451–6462
- Feiner R, Argov T, Rabinovich L, Sigal N, Borovok I & Herskovits AA (2015) A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nat Rev Microbiol* 13: 641–650
- Fierer N, Barberán A & Laughlin DC (2014) Seeing the forest for the genes: using metagenomics to infer the aggregated traits of microbial communities. *Front Microbiol* 5
- Filippis FD, Stora AL, Stellato G, Gatti M & Ercolini D (2014) A Selected Core Microbiome Drives the Early Stages of Three Popular Italian Cheese Manufactures. *PLOS ONE* 9: e89680
- Fitzsimons NA, Cogan TM, Condon S & Beresford T (2001) Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *J Appl Microbiol* 90: 600–608

- Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM & Guinee TP (2004) Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1: General Aspects Elsevier
- Franco-Duarte R, Černáková L, Kadam S, Kaushik KS, Salehi B, Bevilacqua A, Corbo MR, Antolak H, Dybka-Ściepiń K, Leszczewicz M, *et al* (2019) Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms-From Past to Present. *Microorganisms* 7
- Frantzen CA, Kleppen HP & Holo H (2018) Lactococcus lactis Diversity in Undefined Mixed Dairy Starter Cultures as Revealed by Comparative Genome Analyses and Targeted Amplicon Sequencing of *epsD*. *Appl Environ Microbiol* 84
- Freilich S, Zarecki R, Eilam O, Segal ES, Henry CS, Kupiec M, Gophna U, Sharan R & Ruppin E (2011) Competitive and cooperative metabolic interactions in bacterial communities. *Nat Commun* 2: 589
- Frey E (2010) Evolutionary game theory: Theoretical concepts and applications to microbial communities. *Phys Stat Mech Its Appl* 389: 4265–4298
- Fritts RK, McCully AL & McKinlay JB (2021) Extracellular Metabolism Sets the Table for Microbial Cross-Feeding. *Microbiol Mol Biol Rev MMR* 85
- Fuchsmann P, Stern MT & Bru Y-A (2015) Olfactometry Profiles and Quantitation of Volatile Sulfur Compounds of Swiss Tilsit Cheeses. *J Agric Food Chem*: 11
- Fusieger A, Martins MCF, de Freitas R, Nero LA & de Carvalho AF (2020) Technological properties of Lactococcus lactis subsp. lactis bv. diacetylactis obtained from dairy and non-dairy niches. *Braz J Microbiol Publ Braz Soc Microbiol* 51: 313–321

G

- García-Cayuela T, Gómez de Cadiñanos LP, Peláez C & Requena T (2012) Expression in Lactococcus lactis of functional genes related to amino acid catabolism and cheese aroma formation is influenced by branched chain amino acids. *Int J Food Microbiol* 159: 207–213
- García-Quintáns N, Magni C, Mendoza D de & López P (1998) The Citrate Transport System of Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis Is Induced by Acid Stress. *Appl Environ Microbiol* 64: 850–857
- Garofalo C, Ferrocino I, Reale A, Sabbatini R, Milanović V, Alkić-Subašić M, Boscaino F, Aquilanti L, Pasquini M, Trombetta MF, *et al* (2020) Study of kefir drinks produced by backslipping method using kefir grains from Bosnia and Herzegovina: Microbial dynamics and volatilome profile. *Food Res Int* 137
- von Gastrow L, Madec M-N, Chuat V, Lubac S, Morinière C, Lé S, Santoni S, Sicard D & Valence F (2020) Microbial Diversity Associated with Gwell, a Traditional French Mesophilic Fermented Milk Inoculated with a Natural Starter. *Microorganisms* 8: 982
- van Gestel J & Kolter R (2019) When We Stop Thinking about Microbes as Cells. *J Mol Biol* 431: 2487–2492

- Ghoul M & Mitri S (2016) The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends Microbiol* 24: 833–845
- Gibbons JG & Rinker DC (2015) The genomics of microbial domestication in the fermented food environment. *Curr Opin Genet Dev* 35: 1–8
- Gibbons SM & Gilbert JA (2015) Microbial diversity--exploration of natural ecosystems and microbiomes. *Curr Opin Genet Dev* 35: 66–72
- Gibson A, Malek L, Dekker RFH & Ross B (2015) Detecting volatile compounds from Kraft lignin degradation in the headspace of microbial cultures by selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). *J Microbiol Methods* 112: 40–45
- Gobbetti M, De Angelis M, Di Cagno R, Mancini L & Fox PF (2015) Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends Food Sci Technol* 45: 167–178
- Gobbetti M, Di Cagno R, Calasso M, Neviani E, Fox PF & De Angelis M (2018) Drivers that establish and assembly the lactic acid bacteria biota in cheeses. *Trends Food Sci Technol* 78: 244–254
- Großkopf T & Soyer OS (2014) Synthetic microbial communities. *Curr Opin Microbiol* 18: 72–77
- Guédon E, Martin C, Gobert F-X, Dusko Ehrlich S, Renault P & Delorme C (2001a) Réseau de régulation de la transcription des gènes du système protéolytique de *Lactococcus lactis*. *Le Lait* 81: 65–74
- Guédon E, Serror P, Ehrlich SD, Renault P & Delorme C (2001b) Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* 40: 1227–1239
- Guédon E, Sperandio B, Pons N, Ehrlich SD & Renault P (2005) Overall control of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis* by CodY, and possible models for CodY regulation in Firmicutes. *Microbiol Read Engl* 151: 3895–3909
- Gunasekera TS, Attfield PV & Veal DA (2000) A Flow Cytometry Method for Rapid Detection and Enumeration of Total Bacteria in Milk. *Appl Environ Microbiol* 66: 1228–1232

H

- Hansen BV, Houlberg U & Ardö Y (2001) Transamination of branched-chain amino acids by a cheese related *Lactobacillus paracasei* strain. *Int Dairy J* 11: 225–233
- Hillesland KL & Stahl DA (2010) Rapid evolution of stability and productivity at the origin of a microbial mutualism. *Proc Natl Acad Sci* 107: 2124–2129
- Ho C-H, Stanton-Cook M, Beatson SA, Bansal N & Turner MS (2016) Stability of active prophages in industrial *Lactococcus lactis* strains in the presence of heat, acid, osmotic, oxidative and antibiotic stressors. *Int J Food Microbiol* 220: 26–32

- Hosni T, Moretti C, Devescovi G, Suarez-Moreno ZR, Fatmi MB, Guarnaccia C, Pongor S, Onofri A, Buonauro R & Venturi V (2011) Sharing of quorum-sensing signals and role of interspecies communities in a bacterial plant disease. *ISME J* 5: 1857–1870
- Howell KS, Klein M, Swiegers JH, Hayasaka Y, Elsey GM, Fleet GH, Høj PB, Pretorius IS & de Barros Lopes MA (2005) Genetic determinants of volatile-thiol release by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl Environ Microbiol* 71: 5420–5426
- Huggett JF, Cowen S & Foy CA (2015) Considerations for Digital PCR as an Accurate Molecular Diagnostic Tool. *Clin Chem* 61: 79–88
- van Hylckama Vlieg JET, Rademaker JLW, Bachmann H, Molenaar D, Kelly WJ & Siezen RJ (2006) Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. *Curr Opin Biotechnol* 17: 183–190

J

- Jeanson S, Flourey J, Gagnaire V, Lortal S & Thierry A (2015) Bacterial Colonies in Solid Media and Foods: A Review on Their Growth and Interactions with the Micro-Environment. *Front Microbiol* 6: 1284
- Jessup CM, Kassen R, Forde SE, Kerr B, Buckling A, Rainey PB & Bohannan BJM (2004) Big questions, small worlds: microbial model systems in ecology. *Trends Ecol Evol* 19: 189–197
- Joishy TK, Dehingia M & Khan MR (2019) Bacterial diversity and metabolite profiles of curd prepared by natural fermentation of raw milk and back sloping of boiled milk. *World J Microbiol Biotechnol* 35: 102
- Juillard V, Guillot A, Le Bars D & Gripon J-C (1998) Specificity of Milk Peptide Utilization by *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 64: 1230–1236

K

- Kable ME, Srisengfa Y, Laird M, Zaragoza J, McLeod J, Heidenreich J & Marco ML (2016) The Core and Seasonal Microbiota of Raw Bovine Milk in Tanker Trucks and the Impact of Transfer to a Milk Processing Facility. *mBio* 7
- Kable ME, Srisengfa Y, Xue Z, Coates LC & Marco ML (2019) Viable and Total Bacterial Populations Undergo Equipment- and Time-Dependent Shifts during Milk Processing. *Appl Environ Microbiol* 85
- Kahala M, Mäki M, Lehtovaara A, Tapanainen J-M, Katiska R, Juuruskorpi M, Juhola J & Joutsjoki V (2008) Characterization of starter lactic acid bacteria from the Finnish fermented milk product viili. *J Appl Microbiol* 105: 1929–1938
- Kelleher P, Bottacini F, Mahony J, Kilcawley KN & van Sinderen D (2017) Comparative and functional genomics of the *Lactococcus lactis* taxon; insights into evolution and niche adaptation. *BMC Genomics* 18

- Kelleher P, Mahony J, Bottacini F, Lugli GA, Ventura M & van Sinderen D (2019) The *Lactococcus lactis* Pan-Plasmidome. *Front Microbiol* 10
- Kelleher P, Mahony J, Schweinlin K, Neve H, Franz CM & van Sinderen D (2018) Assessing the functionality and genetic diversity of lactococcal prophages. *Int J Food Microbiol* 272: 29–40
- Kelly WJ, Ward LJH & Leahy SC (2010) Chromosomal diversity in *Lactococcus lactis* and the origin of dairy starter cultures. *Genome Biol Evol* 2: 729–744
- Kleerebezem M, Bachmann H, van Pelt-KleinJan E, Douwenga S, Smid EJ, Teusink B & van Mastriht O (2020) Lifestyle, metabolism and environmental adaptation in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Rev* 44: 804–820
- Kong W, Meldgin DR, Collins JJ & Lu T (2018) Designing microbial consortia with defined social interactions. *Nat Chem Biol* 14: 821–829

L

- Langford VS, Padayachee D, McEwan MJ & Barringer SA (2019) Comprehensive odorant analysis for on-line applications using selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). *Flavour Fragr J* 34: 393–410
- Laroute V, Tormo H, Couderc C, Mercier-Bonin M, Le Bourgeois P, Cocaïgn-Bousquet M & Daveran-Mingot M-L (2017) From Genome to Phenotype: An Integrative Approach to Evaluate the Biodiversity of *Lactococcus lactis*. *Microorganisms* 5
- Laroute V, Yasaro C, Narin W, Mazzoli R, Pessione E, Cocaïgn-Bousquet M & Loubière P (2016) GABA Production in *Lactococcus lactis* Is Enhanced by Arginine and Co-addition of Malate. *Front Microbiol* 7
- Leboš Pavunc A, Beganović J, Kos B, Uroić K, Blažić M & Šušćović J (2012) Characterization and Application of Autochthonous Starter Cultures for Fresh Cheese Production. *Food Technol Biotechnol* 50: 141–151
- Leroy F & De Vuyst L (2003) A Combined Model To Predict the Functionality of the Bacteriocin-Producing *Lactobacillus sakei* Strain CTC 494. *Appl Environ Microbiol* 69: 1093–1099
- Leroy F & De Vuyst L (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol* 15: 67–78
- Leroy F, Degeest B & De Vuyst L (2002) A novel area of predictive modelling: describing the functionality of beneficial microorganisms in foods. *Int J Food Microbiol* 73: 251–259
- Levenspiel O (1980) The monod equation: A revisit and a generalization to product inhibition situations. *Biotechnol Bioeng* 22: 1671–1687
- Li N, Wang Y, You C, Ren J, Chen W, Zheng H & Liu Z (2018) Variation in Raw Milk Microbiota Throughout 12 Months and the Impact of Weather Conditions. *Sci Rep* 8: 2371

- Liu F, Mao J, Kong W, Hua Q, Feng Y, Bashir R & Lu T (2020) Interaction variability shapes succession of synthetic microbial ecosystems. *Nat Commun* 11: 309
- Liu M, Bayjanov JR, Renckens B, Nauta A & Siezen RJ (2010) The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics* 11: 36
- Liu R, Chen Y, Tian Z, Mao Z, Cheng H, Zhou H & Wang W (2019) Enhancing microbial community performance on acid resistance by modified adaptive laboratory evolution. *Bioresour Technol* 287: 121416
- Liu W, Pang H, Zhang H & Cai Y (2014) Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. In *Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice*, Zhang H & Cai Y (eds) pp 103–203. Dordrecht: Springer Netherlands
- Lopandic K, Zelger S, Bánszky LK, Eliskases-Lechner F & Prillinger H (2006) Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol* 23: 341–350
- Lopes ATS & Maciel BM (2019) Real-Time Quantitative PCR as a Tool for Monitoring Microbiological Quality of Food. *Synth Biol - New Interdiscip Sci*
- M**
- Macori G & Cotter PD (2018) Novel insights into the microbiology of fermented dairy foods. *Curr Opin Biotechnol* 49: 172–178
- Magni C, Mendoza D de, Konings WN & Lolkema JS (1999) Mechanism of Citrate Metabolism in *Lactococcus lactis*: Resistance against Lactate Toxicity at Low pH. *J Bacteriol* 181: 1451–1457
- Mallet A, Guéguen M, Kauffmann F, Chesneau C, Sesboüé A & Desmasures N (2012) Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *Int Dairy J* 27: 13–21
- Martens DE, Béal C, Malakar P, Zwietering MH & van 't Riet K (1999) Modelling the interactions between *Lactobacillus curvatus* and *Enterobacter cloacae*: I. Individual growth kinetics. *Int J Food Microbiol* 51: 53–65
- Mazaika E & Homsy J (2014) Digital Droplet PCR: CNV Analysis and Other Applications. *Curr Protoc Hum Genet* 82: 7.24.1-7.24.13
- McHugh AJ, Feehily C, Fenelon MA, Gleeson D, Hill C & Cotter PD (2020) Tracking the Dairy Microbiota from Farm Bulk Tank to Skimmed Milk Powder. *mSystems* 5
- McMeekin TA, Olley J, Ratkowsky DA & Ross T (2002) Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *Int J Food Microbiol* 73: 395–407
- Meola M, Rifa E, Shani N, Delbès C, Berthoud H & Chassard C (2019) DAIRYdb: a manually curated reference database for improved taxonomy annotation of 16S rRNA gene sequences from dairy products. *BMC Genomics* 20: 560

- Minervini F, De Angelis M, Di Cagno R & Gobbetti M (2014) Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. *Int J Food Microbiol* 171: 136–146
- Minervini F, De Angelis M, Di Cagno R, Pinto D, Siragusa S, Rizzello CG & Gobbetti M (2010) Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I. *Food Microbiol* 27: 897–908
- Moineau S (1999) Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76: 377–382
- Mollet B (1999) Genetically improved starter strains: opportunities for the dairy industry. *Int Dairy J* 9: 11–15
- Monod J (1949) The Growth of Bacterial Cultures. *Annu Rev Microbiol* 3: 371–394
- Montel M-C, Buchin S, Mallet A, Delbes-Paus C, Vuitton DA, Desmasures N & Berthier F (2014) Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int J Food Microbiol* 177: 136–154
- Moonga HB, Schoustra SE, van den Heuvel J, Linnemann AR, Samad MS, Shindano J & Smid EJ (2020) Composition and Diversity of Natural Bacterial Communities in Mabisi, a Traditionally Fermented Milk. *Front Microbiol* 11
- Morisset D, Štebih D, Milavec M, Gruden K & Žel J (2013) Quantitative Analysis of Food and Feed Samples with Droplet Digital PCR. *PLOS ONE* 8: e62583
- Morris JJ, Papoulis SE & Lenski RE (2014) Coexistence of Evolving Bacteria Stabilized by a Shared Black Queen Function. *Evolution* 68: 2960–2971
- Mougi A & Kondoh M (2012) Diversity of Interaction Types and Ecological Community Stability. *Science* 337: 349–351
- Mounier J, Monnet C, Vallaëys T, Arditi R, Sarthou A-S, Hélias A & Irlinger F (2008) Microbial Interactions within a Cheese Microbial Community. *Appl Environ Microbiol* 74: 172–181
- Moura A, Tourdjman M, Leclercq A, Hamelin E, Laurent E, Fredriksen N, Van Cauteren D, Bracq-Dieye H, Thouvenot P, Vales G, *et al* (2017) Real-Time Whole-Genome Sequencing for Surveillance of *Listeria monocytogenes*, France. *Emerg Infect Dis* 23: 1462–1470

N

- Nanda AM, Thormann K & Frunzke J (2015) Impact of Spontaneous Prophage Induction on the Fitness of Bacterial Populations and Host-Microbe Interactions. *J Bacteriol* 197: 410–419
- Nawrath T, Gerth K, Müller R & Schulz S (2010) The Biosynthesis of the Aroma Volatile 2-Methyltetrahydrothiophen-3-one in the Bacterium *Chitinophaga* Fx7914. *ChemBioChem* 11: 1914–1919

- Nelder JA & Mead R (1965) A Simplex Method for Function Minimization. *Comput J* 7: 308–313
- Nemergut DR, Schmidt SK, Fukami T, O'Neill SP, Bilinski TM, Stanish LF, Knelman JE, Darcy JL, Lynch RC, Wickey P, *et al* (2013) Patterns and processes of microbial community assembly. *Microbiol Mol Biol Rev* 77: 342–356
- Nielsen J & Villadsen J (1992) Modelling of microbial kinetics. *Chem Eng Sci* 47: 4225–4270
- Nocker A, Cheung C-Y & Camper AK (2006) Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods* 67: 310–320
- Nomura M, Kobayashi M, Narita T, Kimoto-Nira H & Okamoto T (2006) Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *J Appl Microbiol* 101: 396–405

O

- O'Sullivan D, Ross RP, Fitzgerald GF & Coffey A (2000) Investigation of the relationship between lysogeny and lysis of *Lactococcus lactis* in cheese using prophage-targeted PCR. *Appl Environ Microbiol* 66: 2192–2198
- Ott A, Fay LB & Chaintreau A (1997) Determination and Origin of the Aroma Impact Compounds of Yogurt Flavor. *J Agric Food Chem* 45: 850–858
- Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance.
- Özel B, Şimşek Ö, Settanni L & Erten H (2020) The influence of backslopping on lactic acid bacteria diversity in tarhana fermentation. *Int J Food Microbiol* 335: 108886

P

- Pan Y & Breidt F (2007) Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Appl Environ Microbiol* 73: 8028–8031
- Passerini D, Beltramo C, Coddeville M, Quentin Y, Ritzenthaler P, Daveran-Mingot M-L & Le Bourgeois P (2010) Genes but Not Genomes Reveal Bacterial Domestication of *Lactococcus Lactis*. *PLoS ONE* 5
- Passerini D, Laroute V, Coddeville M, Le Bourgeois P, Loubière P, Ritzenthaler P, Coccagn-Bousquet M & Daveran-Mingot M-L (2013) New insights into *Lactococcus lactis* diacetyl- and acetoin-producing strains isolated from diverse origins. *Int J Food Microbiol* 160: 329–336
- Perez-Hurtado P, Palmer E, Owen T, Aldcroft C, Allen MH, Jones J, Creaser CS, Lindley MR, Turner MA & Reynolds JC (2017) Direct analysis of volatile organic compounds in foods by headspace extraction atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM* 31: 1947–1956

- Picon A, López-Pérez O, Torres E, Garde S & Nuñez M (2019) Contribution of autochthonous lactic acid bacteria to the typical flavour of raw goat milk cheeses. *Int J Food Microbiol* 299: 8–22
- Pinon A, Zwietering M, Perrier L, Membré J-M, Leporq B, Mettler E, Thuault D, Coroller L, Stahl V & Vialette M (2004) Development and Validation of Experimental Protocols for Use of Cardinal Models for Prediction of Microorganism Growth in Food Products. *Appl Environ Microbiol* 70: 1081–1087
- Pirondini A, Bonas U, Maestri E, Visioli G, Marmiroli M & Marmiroli N (2010) Yield and amplificability of different DNA extraction procedures for traceability in the dairy food chain. *Food Control* 21: 663–668
- Pirt SJ & Hinshelwood CN (1965) The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 163: 224–231
- Pogačić T, Maillard M-B, Leclerc A, Hervé C, Chuat V, Yee AL, Valence F & Thierry A (2015) A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. *Food Microbiol* 46: 145–153
- Porcellato D, Aspholm M, Skeie SB, Monshaugen M, Brendehaug J & Mellegård H (2017) Microbial diversity of consumption milk during processing and storage. *Int J Food Microbiol* 266: 21–30
- Postollec F, Falentin H, Pavan S, Combrisson J & Sohier D (2011) Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiol* 28: 848–861
- Price CE, Branco Dos Santos F, Hesseling A, Uusitalo JJ, Bachmann H, Benavente V, Goel A, Berkhout J, Bruggeman FJ, Marrink S-J, *et al* (2019) Adaption to glucose limitation is modulated by the pleiotropic regulator CcpA, independent of selection pressure strength. *BMC Evol Biol* 19: 15

Q

- Quigley L, O’Sullivan O, Beresford TP, Paul Ross R, Fitzgerald GF & Cotter PD (2012) A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. *J Appl Microbiol* 113: 96–105
- Quigley L, O’Sullivan O, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF & Cotter PD (2011) Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *Int J Food Microbiol* 150: 81–94
- Quigley L, O’Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF & Cotter PD (2013) The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev* 37: 664–698

R

- R Development Core Team (2005) *R : A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R foundation for statistical computing. Available online at: <https://www.R-project.org/>

- Randazzo CL, Caggia C & Neviani E (2009) Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *J Microbiol Methods* 78: 1–9
- Rantsiou K, Alessandria V, Urso R, Dolci P & Cocolin L (2008) Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *Int J Food Microbiol* 121: 99–105
- Ravyts F, Vuyst LD & Leroy F (2012) Bacterial diversity and functionalities in food fermentations. *Eng Life Sci* 12: 356–367
- Ruggirello M, Dolci P & Cocolin L (2014) Detection and Viability of *Lactococcus lactis* throughout Cheese Ripening. *PLOS ONE* 9: e114280

S

- Salameh C, Banon S, Hosri C & Scher J (2016) An overview of recent studies on the main traditional fermented milks and white cheeses in the Mediterranean region. *Food Rev Int* 32: 256–279
- Saltaji S, Rué O, Sopena V, Sablé S, Tambadou F, Didelot S & Chevrot R (2020) *Lactococcus lactis* Diversity Revealed by Targeted Amplicon Sequencing of *purR* Gene, Metabolic Comparisons and Antimicrobial Properties in an Undefined Mixed Starter Culture Used for Soft-Cheese Manufacture. *Foods Basel Switz* 9
- Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, Kilpper-Bälz R, Collins MD & Fischer W (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and Related Streptococci to the Genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst Appl Microbiol* 6: 183–195
- Settanni L & Moschetti G (2010) Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol* 27: 691–697
- Sgarbi E, Lazzi C, Tabanelli G, Gatti M, Neviani E & Gardini F (2013) Nonstarter lactic acid bacteria volatiles produced using cheese components. *J Dairy Sci* 96: 4223–4234
- Sgobba E & Wendisch VF (2019) Synthetic microbial consortia for small molecule production. *Curr Opin Biotechnol* 62: 72–79
- Sharma A, Kaur J, Lee S & Park Y-S (2020) Tracking of Intentionally Inoculated Lactic Acid Bacteria Strains in Yogurt and Probiotic Powder. *Microorganisms* 8: 5
- Siewerts S, de Bok FAM, Hugenholtz J & van Hylckama Vlieg JET (2008) Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Appl Environ Microbiol* 74: 4997–5007
- Siragusa S, Cagno RD, Ercolini D, Minervini F, Gobbetti M & Angelis MD (2009) Taxonomic Structure and Monitoring of the Dominant Population of Lactic Acid Bacteria during Wheat Flour Sourdough Type I Propagation Using *Lactobacillus sanfranciscensis* Starters. *Appl Environ Microbiol* 75: 1099–1109
- Smid EJ & Kleerebezem M (2014) Production of aroma compounds in lactic fermentations. *Annu Rev Food Sci Technol* 5: 313–326

- Smid EJ & Lacroix C (2013) Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Curr Opin Biotechnol* 24: 148–154
- Smit G, Smit BA & Engels WJM (2005) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol Rev* 29: 591–610
- Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R & Siuzdak G (2006) XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem* 78: 779–787
- Sohier D, Pavan S, Riou A, Combrisson J & Postollec F (2014) Evolution of microbiological analytical methods for dairy industry needs. *Front Microbiol* 5
- Somerville V, Lutz S, Schmid M, Frei D, Moser A, Irmeler S, Frey JE & Ahrens CH (2019) Long-read based de novo assembly of low-complexity metagenome samples results in finished genomes and reveals insights into strain diversity and an active phage system. *BMC Microbiol* 19: 143
- Sovová K, Čepl J, Markoš A & Španěl P (2013) Real time monitoring of population dynamics in concurrent bacterial growth using SIFT-MS quantification of volatile metabolites. *Analyst* 138: 4795–4801
- Spinnler HE & Corrieu G (1989) Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *J Dairy Res* 56: 755–764
- Steele J, Broadbent J & Kok J (2013) Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. *Curr Opin Biotechnol* 24: 135–141
- Sudhakaran V A & Anand S (2020) Approaches for Detection of Dairy Microorganisms: An Update. In *Dairy Processing: Advanced Research to Applications*, Minj J Sudhakaran V A & Kumari A (eds) pp 217–241. Singapore: Springer
- Švec P, Dráb V & Sedláček I (2005) Ribotyping of *Lactobacillus casei* group strains isolated from dairy products. *Folia Microbiol (Praha)* 50: 223–228

T

- van Tatenhove-Pel RJ, Rijavec T, Lapanje A, van Swam I, Zwering E, Hernandez-Valdes JA, Kuipers OP, Picioreanu C, Teusink B & Bachmann H (2020) Microbial competition reduces metabolic interaction distances to the low μm -range. *ISME J*
- Terzić-Vidojević A, Veljović K, Tolinački M, Živković M, Lukić J, Lozo J, Fira Đ, Jovčić B, Strahinić I, Begović J, *et al* (2020) Diversity of non-starter lactic acid bacteria in autochthonous dairy products from Western Balkan Countries - Technological and probiotic properties. *Food Res Int* 136: 109494
- Teusink B & Smid EJ (2006) Modelling strategies for the industrial exploitation of lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol* 4: 46–56
- Thommes M, Wang T, Zhao Q, Paschalidis IC & Segrè D (2019) Designing Metabolic Division of Labor in Microbial Communities. *mSystems* 4: e00263-18

- Tormo H, Agabriel C, Lopez C, Ali Haimoud Lekhal D & Roques C (2011) Relationship between the Production Conditions of Goat's Milk and the Microbial Profiles of Milk. *Int J Dairy Sci* 6: 13–28
- Tormo H, Ali Haimoud Lekhal D & Roques C (2015) Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk and effect of farming practices on the dominant species of lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 210: 9–15
- Torres Manno M, Zuljan F, Alarcón S, Esteban L, Blancato V, Espariz M & Magni C (2018) Genetic and phenotypic features defining industrial relevant *Lactococcus lactis*, *L. cremoris* and *L. lactis* biovar. *diacetylactis* strains. *J Biotechnol* 282: 25–31
- Treguier S, Couderc C, Tormo H, Kleiber D & Levasseur-Garcia C (2019) Identification of lactic acid bacteria *Enterococcus* and *Lactococcus* by near-infrared spectroscopy and multivariate classification. *J Microbiol Methods*: 105693
- Turcotte MM, Corrin MSC & Johnson MTJ (2012) Adaptive Evolution in Ecological Communities. *PLOS Biol* 10: e1001332
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R & Gordon JI (2007) The Human Microbiome Project. *Nature* 449: 804–810

V

- Venema K & Surono IS (2019) Microbiota composition of dadih – a traditional fermented buffalo milk of West Sumatra. *Lett Appl Microbiol* 68: 234–240
- Vogelmann SA & Hertel C (2011) Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. *Food Microbiol* 28: 583–589

W

- Wahengbam R, Giasuddin A & Kumaraswamy J (2015) Three-phase succession of autochthonous lactic acid bacteria to reach a stable ecosystem within 7 days of natural bamboo shoot fermentation as revealed by different molecular approaches. *Mol Ecol* 24: 3372–3389
- Walstra P (1990) On the Stability of Casein Micelles1. *J Dairy Sci* 73: 1965–1979
- Wang M, Yang J, Gai Z, Huo S, Zhu J, Li J, Wang R, Xing S, Shi G, Shi F, *et al* (2018) Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of *Salmonella typhimurium* in milk. *Int J Food Microbiol* 266: 251–256
- Wels M, Siezen R, van Hijum S, Kelly WJ & Bachmann H (2019) Comparative Genome Analysis of *Lactococcus lactis* Indicates Niche Adaptation and Resolves Genotype/Phenotype Disparity. *Front Microbiol* 10
- Wilson IG (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 63: 3741–3751
- Wirawati CU, Sudarwanto MB, Lukman DW, Wientarsih I & Srihanto EA (2019) Diversity of lactic acid bacteria in dadih produced by either back-slopping or spontaneous

fermentation from two different regions of West Sumatra, Indonesia. *Vet World* 12: 823–829

Wolfe BE, Button JE, Santarelli M & Dutton RJ (2014) Cheese Rind Communities Provide Tractable Systems for In Situ and In Vitro Studies of Microbial Diversity. *Cell* 158: 422–433

Wolfe BE & Dutton RJ (2015) Fermented Foods as Experimentally Tractable Microbial Ecosystems. *Cell* 161: 49–55

Wouters JTM, Ayad EHE, Hugenholtz J & Smit G (2002) Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int Dairy J* 12: 91–109

X

Xavier JB (2011) Social interaction in synthetic and natural microbial communities. *Mol Syst Biol* 7: 483

Y

Ye P, Cai P, Xie J & Wei Y (2021) The diagnostic accuracy of digital PCR, ARMS and NGS for detecting KRAS mutation in cell-free DNA of patients with colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* 16: e0248775

Z

Zago M, Bonvini B, Carminati D & Giraffa G (2009) Detection and quantification of *Enterococcus gilvus* in cheese by real-time PCR. *Syst Appl Microbiol* 32: 514–521

Zelezniak A, Andrejev S, Ponomarova O, Mende DR, Bork P & Patil KR (2015) Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities. *Proc Natl Acad Sci* 112: 6449–6454

Zemb O, Achard CS, Hamelin J, Almeida M-LD, Gabinaud B, Cauquil L, Verschuren LMG & Godon J-J (2020) Absolute quantitation of microbes using 16S rRNA gene metabarcoding: A rapid normalization of relative abundances by quantitative PCR targeting a 16S rRNA gene spike-in standard. *MicrobiologyOpen* 9: e977

Zhang W, Wang Y, Lee OO, Tian R, Cao H, Gao Z, Li Y, Yu L, Xu Y & Qian P-Y (2013) Adaptation of intertidal biofilm communities is driven by metal ion and oxidative stresses. *Sci Rep* 3: 3180

Zotta T, Guidone A, Tremonte P, Parente E & Ricciardi A (2012) A comparison of fluorescent stains for the assessment of viability and metabolic activity of lactic acid bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 28: 919–927

Liste des figures et tables

FIGURES

- Figure 1. Les écosystèmes synthétiques, des modèles simplifiés pour l'étude des communautés microbiennes complexes naturelles. D'après (De Roy et al, 2014).....p. 20**
- Figure 2. Les trois principales méthodes de propagation utilisées lors d'évolutions expérimentales. D'après (Barrick & Lenski, 2013).....p. 25**
- Figure 3. Les six types d'interaction en fonction de leur effet sur la croissance microbienne. D'après (Grosskopf & Soyer, 2014; Canon et al, 2020).....p. 27**
- Figure 4. Propagation en série (A) de cellules microbiennes une suspension ou (B) de cellules uniques emprisonnées en émulsion. D'après (Bachmann et al, 2013).....p. 29**
- Figure 5. Représentation des relations de coopération et compétition au sein du consortium synthétique à trois membres. (A) à $\text{pH} \geq 7$ et (B) à $\text{pH} \leq 6$. D'après (Liu et al, 2020).....p. 36**
- Figure 6. Vue d'ensemble des voies métaboliques impliquées dans la production des principaux composés d'arômes issus de la protéolyse du lait. D'après D'après (Smit et al, 2005; et Smid & Kleerebezem, 2014).....p. 41**
- Figure 7. Schéma simplifié du métabolisme carboné chez l'espèce *L. lactis* bv diacetylactis.....p. 45**
- Figure 8. Schéma représentant les principales méthodes culturales et non culturales pour la détection, l'identification et la quantification des microorganismes au sein d'un échantillon de produit laitier. D'après (Quigley et al, 2011).....p. 46**
- Figure 9. Principe de la PCR digitale avec utilisation de sondes d'hybridation fluorescentes. D'après (Mazaika & Homsy, 2014).....p.62**
- Figure 10. Représentation (A) des régions phagiques des génomes des souches 13 et 33 séquencés avant évolution et (B) de la stratégie de détection des formes intégrée et excisée d'un prophage putatif.....p.144**
- Figure 11. Stratégie expérimentale prévue pour mettre en évidence les modifications génétiques apparues lors de l'évolution expérimentale.....p.146**

TABLES

- Table 1. Principaux acides aminés précurseurs de composés d'arôme et leur profil de saveurs associé. D'après (Ardö, 2006).....p. 40**

Communications orales

Caillaud M-A.

Webinaire INRAE « Comprendre et valoriser les communautés microbiennes », département MICA (Microbiologie et Chaîne Alimentaire), 25 septembre 2020.

Évolution de souches de Lactococcus lactis en consortium dans le lait: décryptage du dialogue intra-espèce par une approche de modélisation.

Caillaud M-A, Audonnet M, Laroute V, Couderc C, Abeilhou M, Cocaïgn-Bousquet M, Tormo H, Daveran-Mingot M-L.

CBL (Club des Bactéries Lactiques), 22^e colloque, CAEN, 12-14 juin 2019.

Evolution de souches environnementales de Lactococcus lactis ssp. lactis en consortium: décryptage du dialogue intra-espèce.

Caillaud M-A. Réseau Mixte Technologique – CNIEL PARIS, 23 octobre 2018.

Etude de la dynamique, de la stabilité et de la robustesse d'un ferment dans le lait.

Communications écrites et posters

Publication

Caillaud M-A, Abeilhou M, Gonzalez I, Audonnet M, Gaucheron F, Cocaïgn-Bousquet M, Tormo Daveran-Mingot M-L (2020) Precise Populations' Description in Dairy Ecosystems Using Digital Droplet PCR: The Case of *L. lactis* Group in Starters. *Front Microbiol* 11

Posters

Caillaud M-A, Couderc C, Audonnet M, Laroute V, Abeilhou M, Cocaïgn-Bousquet M, Daveran-Mingot M-L, Tormo H.

International Scientific Conference On Raw Milk, VALENCE, 23-25 octobre 2019.

Raw milk microflora crosstalk with a consortium of Lactococcus lactis subsp. lactis strains during experimental evolution in milk.

Couderc C, Caillaud M-A, Laroute V, Le Bourgeois P, Cocaïgn-Bousquet M, Hoffmann P-A, Daveran-Mingot M-L, Jard G, Tormo H.

International Scientific Conference On Raw Milk, VALENCE, 23-25 octobre 2019.

Development of an autochthonous starter for PDO "Rocamadour" cheese.