

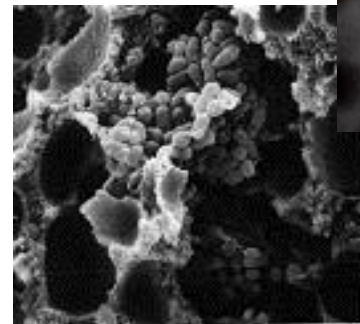
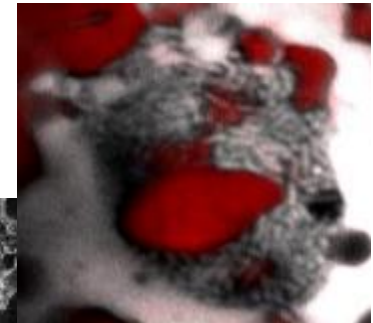
# Colonies bactériennes dans le fromage : distribution spatiale et micro-environnement

Anne Thierry, Valérie Gagnaire, Clémentine Le Boucher, Ilham El Mourdi, Juliana V.C. Silva, Sylvie Lortal, Juliane Floury et Sophie Jeanson

UMR1253 STLO, INRA Agrocampus Ouest, 35042 Rennes, France



# Pourquoi étudier les colonies bactériennes ?



# Colonie : une définition

## Colonie

“A bacterial colony is taken as a **clonal group of cells** developed either **on the surface of or embedded within a gel-type solid** (culture medium or food) from which it takes its growth substrates. Unlike biofilms, a colony is **limited by size** displaying a definite maximum radius ranging between a few  $\mu\text{m}$  to a few mm. As the production of extracellular polymeric substances has never been investigated in colonies, we considered not to be a mandatory property.”

*Jeanson et al. 2015, Frontiers in Microbiology*



## Biofilm

“A biofilm is well-defined as: “a microbiologically derived sessile community characterized by cells that are irreversibly attached to a substratum or interface or to each other, are embedded in a matrix of extracellular polymeric substances that they have produced, and exhibit an altered phenotype with respect to growth rate and gene expression”

*Donlan and Costerton, 2002, Clin. Microbiol. Rev. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193*

*Adapté de Jeanson et al. 2015 Frontiers in Microbiol.*

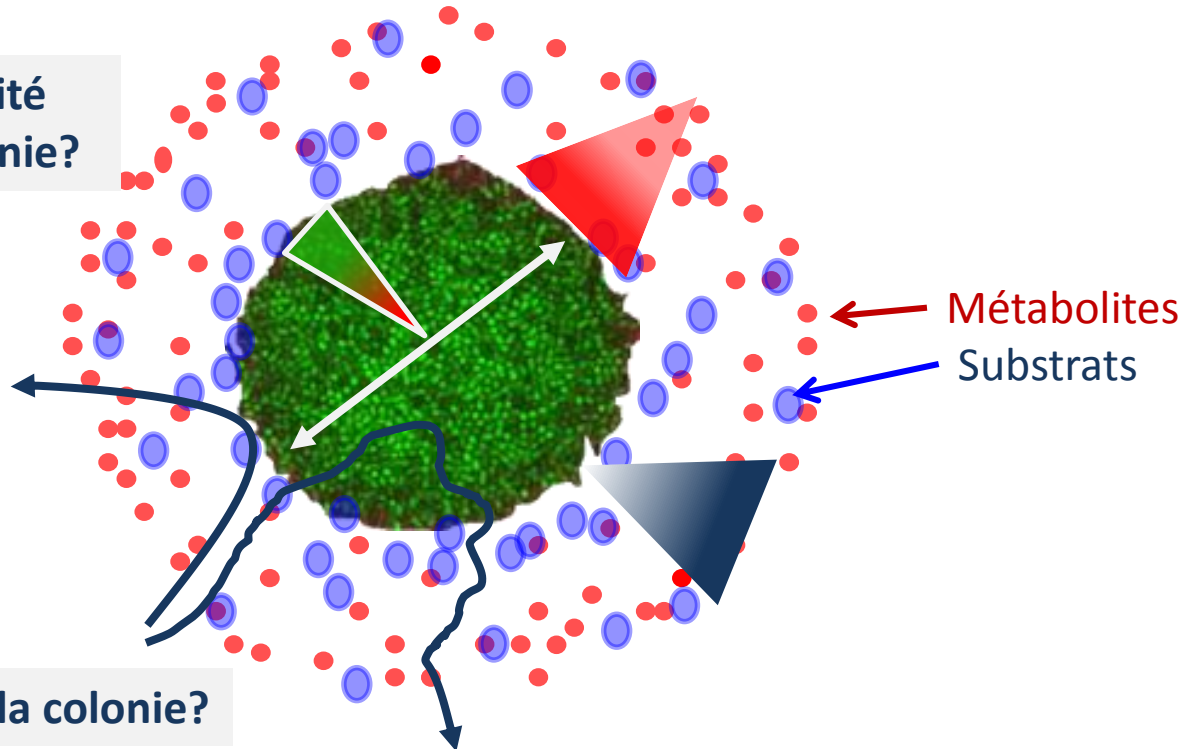
# Colonies dans le fromage : de nombreuses questions...

Taille des colonies ?

Micro-environnement hétérogène ?  
Micro-gradients ?

Hétérogénéité  
dans la colonie?

Diffusion dans la colonie?

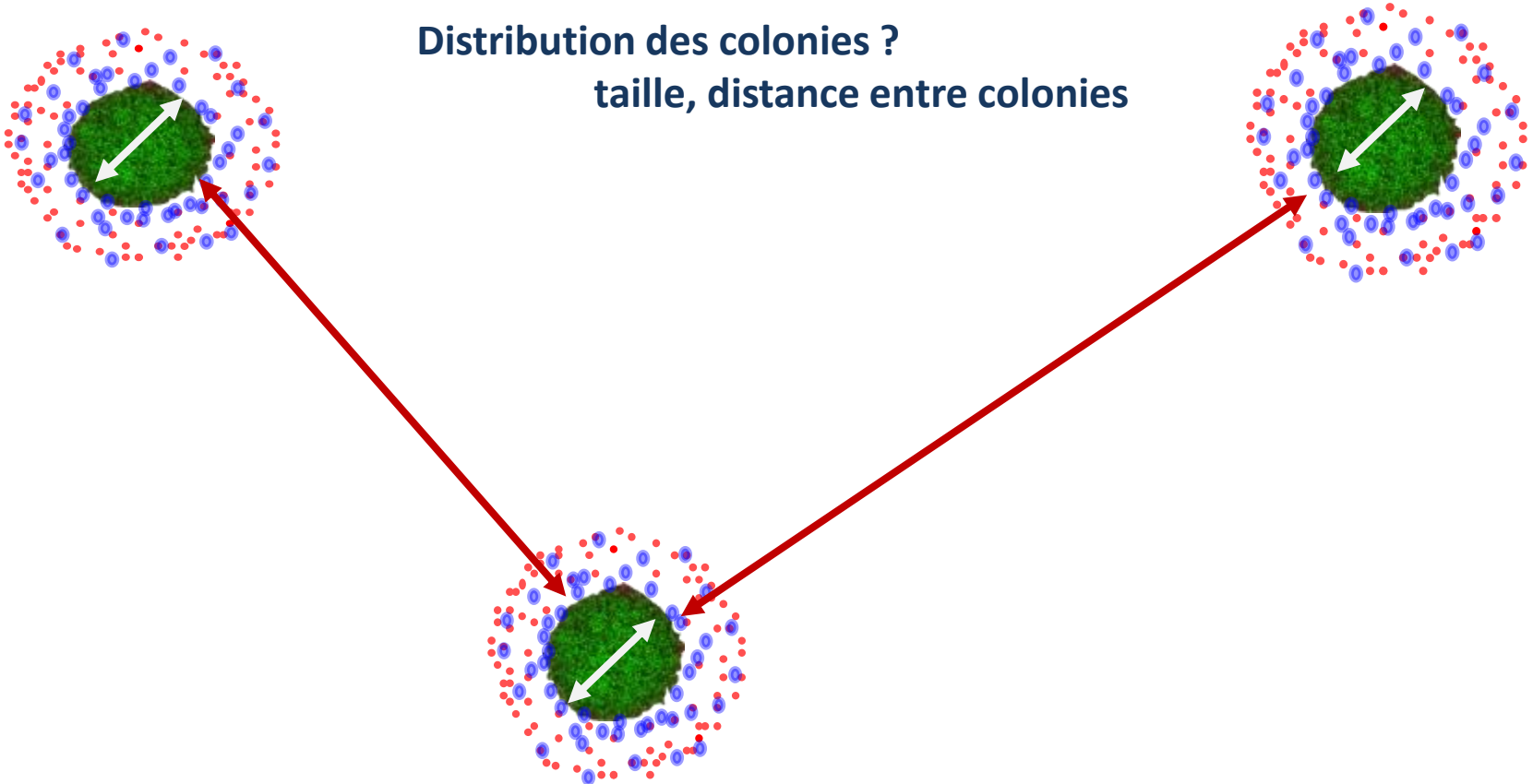


*Jeanson et al., Frontiers in Food Microbiology, 2015*

# Colonies dans le fromage : de nombreuses questions...

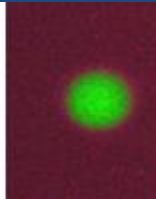
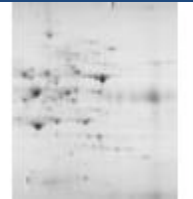
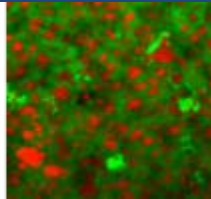
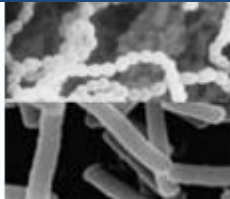
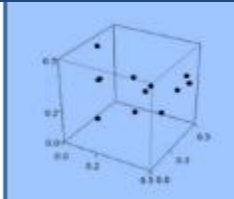


**Distribution des colonies ?**  
taille, distance entre colonies

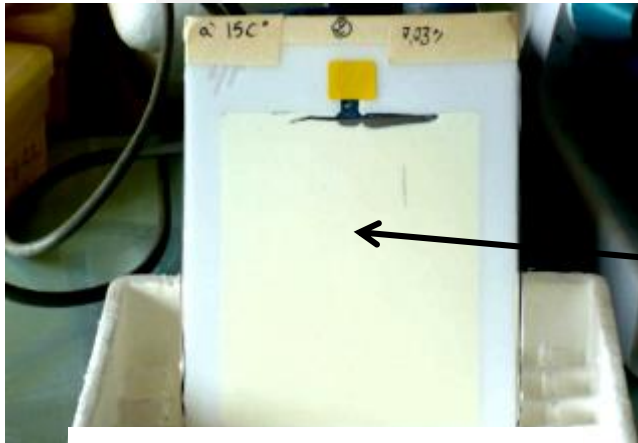




# Approches et système modèle développés pour étudier les interactions colonies – matrice



# Dispositif expérimental

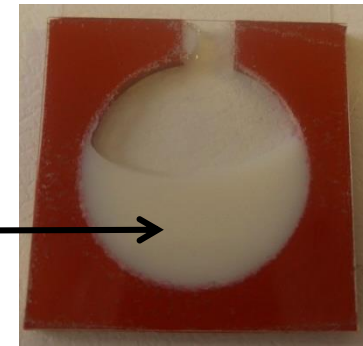


Gel cassette® = 40 mL

Gel cassette system®

(Brocklehurst et al., 1995 from the *Inst Food Res, UK*)

Fromage  
modèle



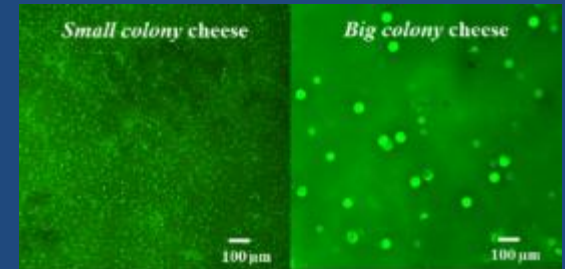
Imaging chamber = 1 mL

Permet **observation non-destructive en microscopie confocale**

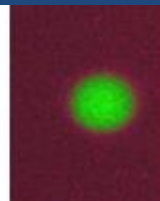
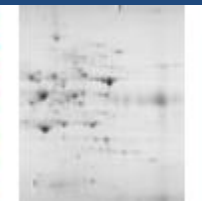
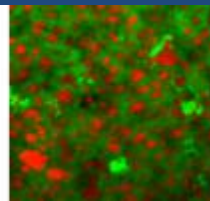
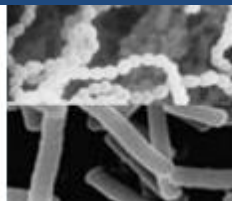
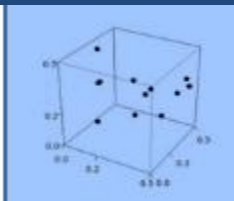
Fromage modèle : à partir de lait écrémé concentré 5X par ultrafiltration  
coagulé dans le dispositif

Ensemencé en une souche de *Lactococcus lactis*

Marqueurs fluorescents : SYTO9™ pour colorer bactéries, solutés marqués au RITC ou FITC



## Distribution spatiale des colonies

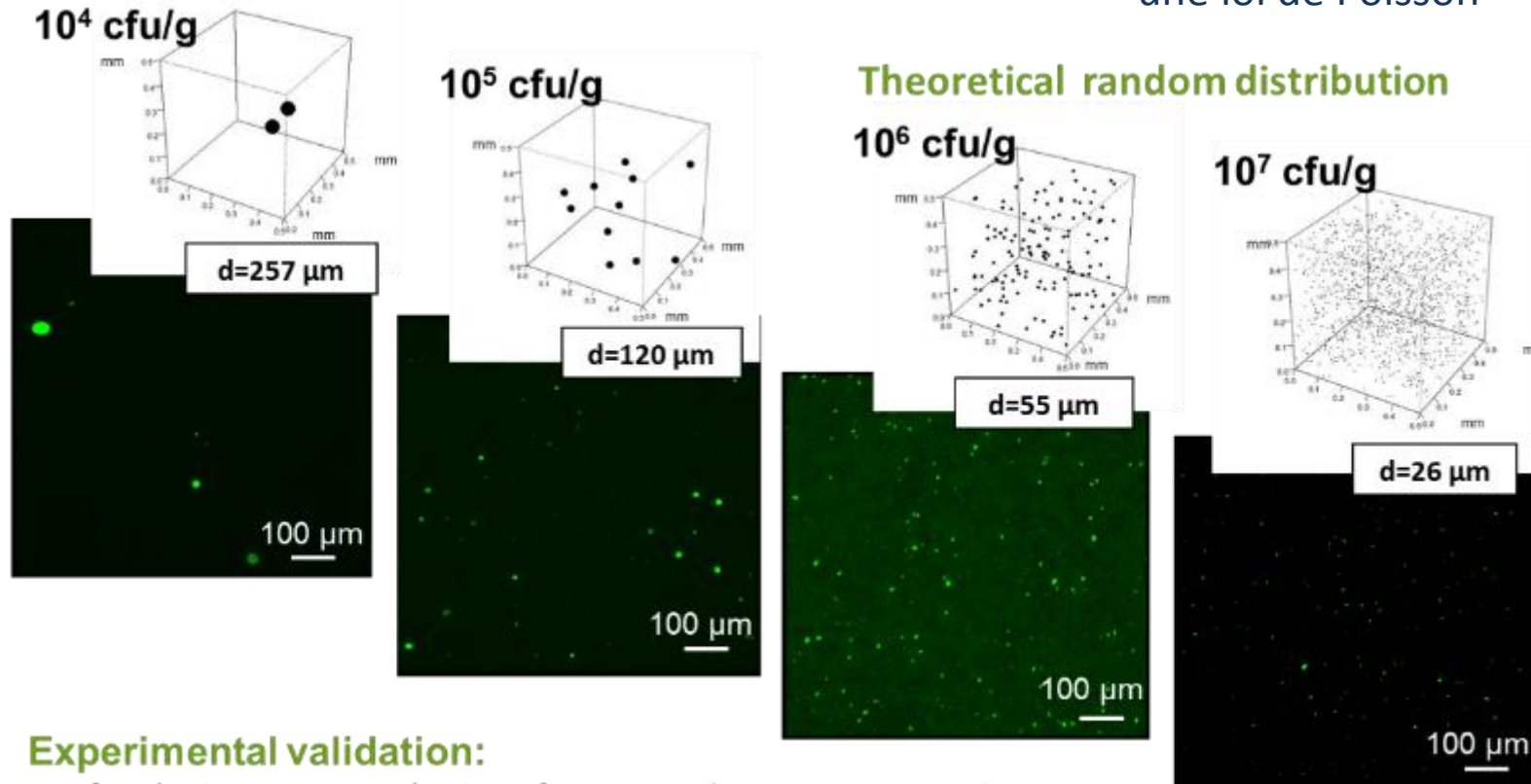


# Distribution spatiale des colonies du fromage

Jeanson et al., AEM, 2011

Distribution théorique calculée à partir d'hypothèses :

- une cellule → une colonie
- distribution aléatoire suivant une loi de Poisson

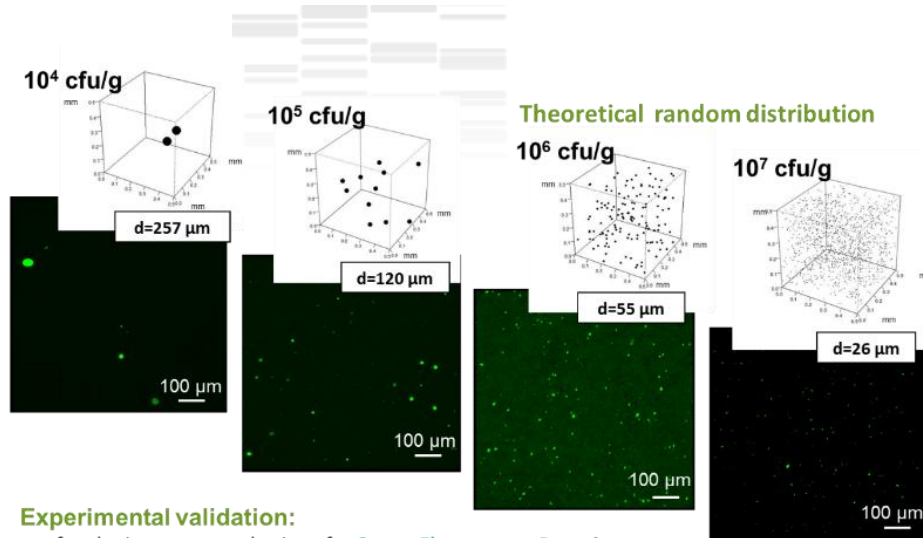


## Experimental validation:

confocal microscopy: colonies of a **Green Fluorescent Protein** - producing *Lactococcus* strain

# Distribution spatiale des colonies du fromage

Jeanson et al., AEM, 2011



## Experimental validation:

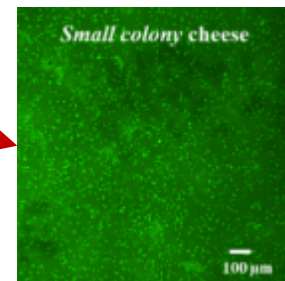
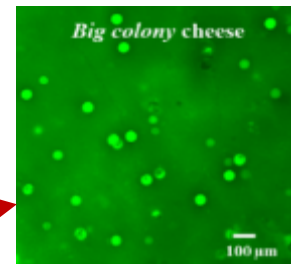
confocal microscopy: colonies of a **Green Fluorescent Protein** - producing *Lactococcus* strain

- Observations expérimentales confirment distribution théorique
- Même population finale quelle que soit la population initiale
- Distribution spatiale fonction de la population initiale

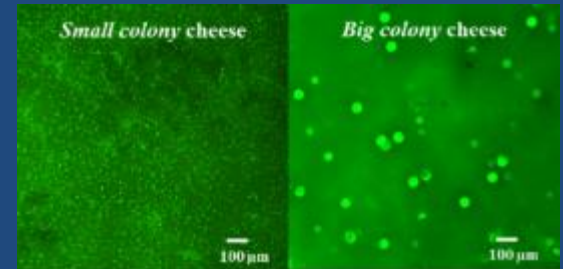
# Distribution des colonies

population initiale, UFC/g	diamètre colonie, $\mu\text{m}$	bactéries/ colonie	distance entre colonies, $\mu\text{m}$	Dans le fromage
$10^4$	60-100	$10^5$	$\sim 300$	Levains additionnels
$10^5$	40-50	$10^4$	$\sim 150$	Levains lactiques
$10^6$	$\sim 20$	$10^3$	$\sim 80$	
$10^7$	$\sim 4$	100	$\sim 30$	

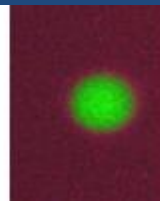
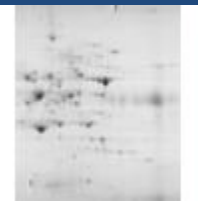
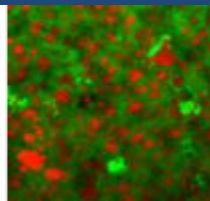
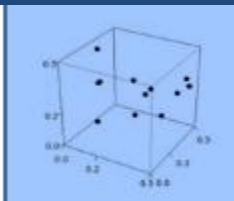
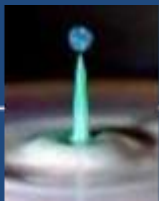
Mesurés expérimentalement



Adapté de Jeanson et al. 2015 *Frontiers in Microbiol.*

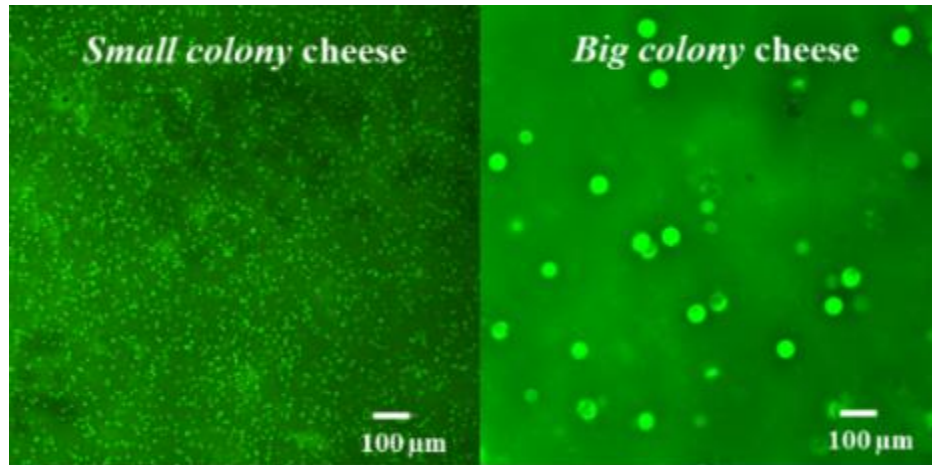
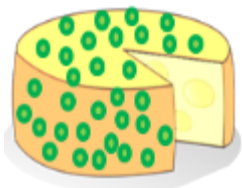


## Conséquences de la distribution spatiale des colonies sur le métabolisme bactérien et l'affinage du fromage



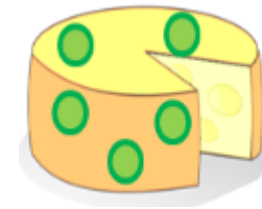
# Conséquences de la distribution spatiale

Même population de *L. lactis*



$3 \cdot 10^7$  petites colonies/g  
(7 µm diam)

$2 \cdot 10^5$  grosses colonies  
(46 µm diam)



Impact de ces différences de distribution ?

Survie, hétérogénéité

Métabolisme



C. Le Boucher

# Design expérimental

*Le Boucher et al., AEM, 2016*

Coagulation au moment à  $t_0$  ou différée

Inoculation  $2 \cdot 10^5$  cfu/mL

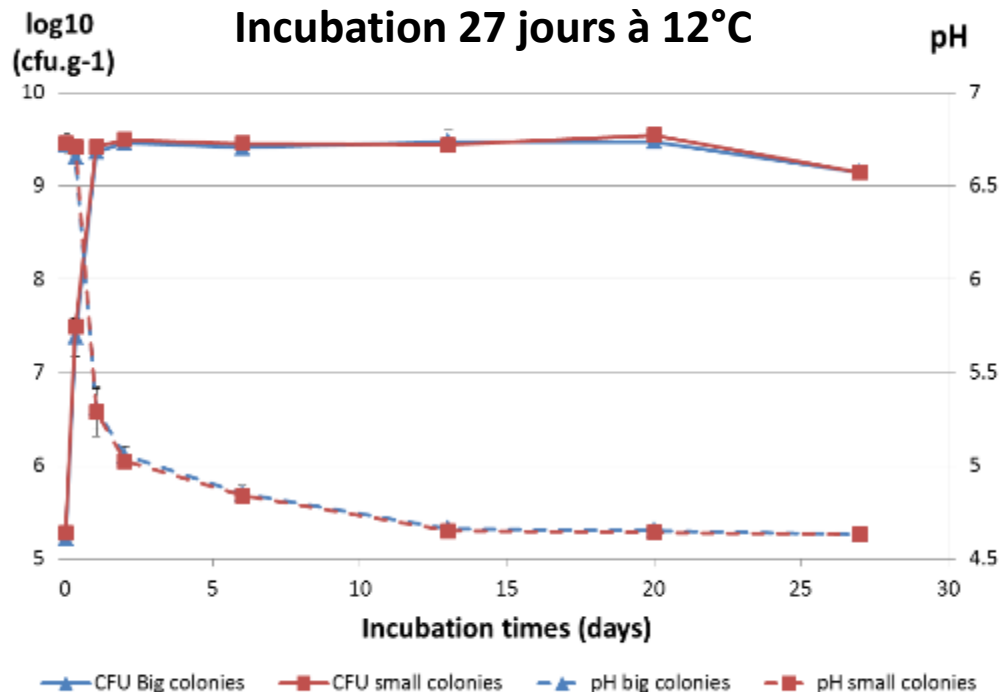
0h coagulation

19°C

8h

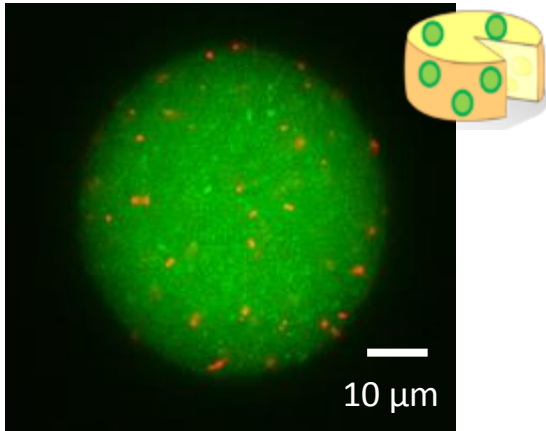
$3 \cdot 10^7$  cfu/mL  
coagulation

20h



**La distribution spatiale est le seul paramètre qui différencie les deux séries de fromages**

# Hétérogénéité au sein des colonies ?



- **Intégrité cellulaire** préservée pour les deux types de fromage quelle que soit la distribution durant toute la durée d'incubation
- **Pas d'hétérogénéité** de viabilité entre la périphérie et le centre des colonies

coloration Live/Dead :

cellules endommagées en rouge

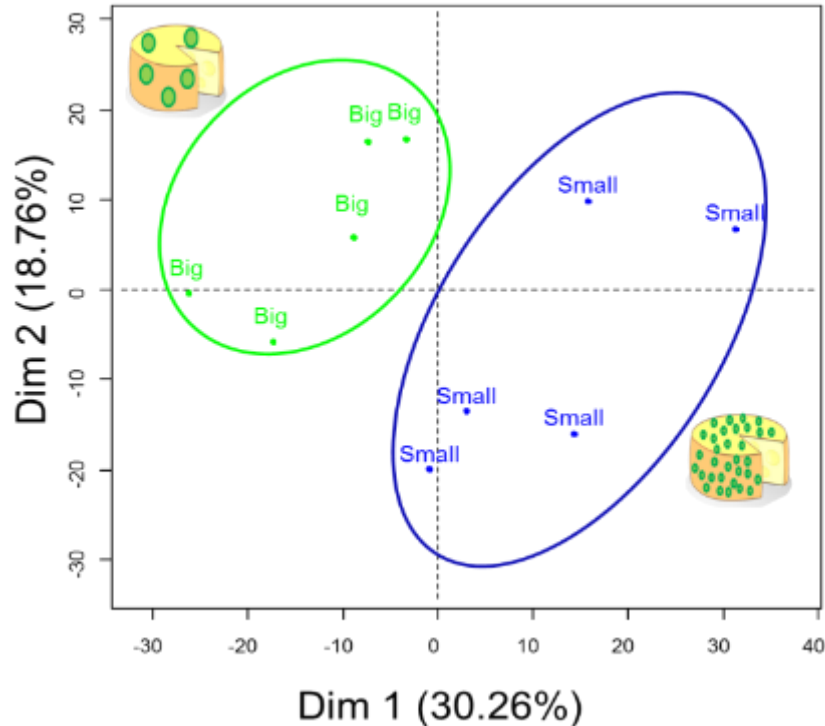
cellules intègres en vert

*Le Boucher et al., AEM, 2016*

# Deux empreintes distinctes en métabolomique

## Métabolomique non ciblée par LC-MS

Exemple : ACP à 2 jours  
extraits aqueux, ionisation mode +



- LC-MS
- extraits à l'eau et l'acétonitrile
- mode d'ionisation + et -

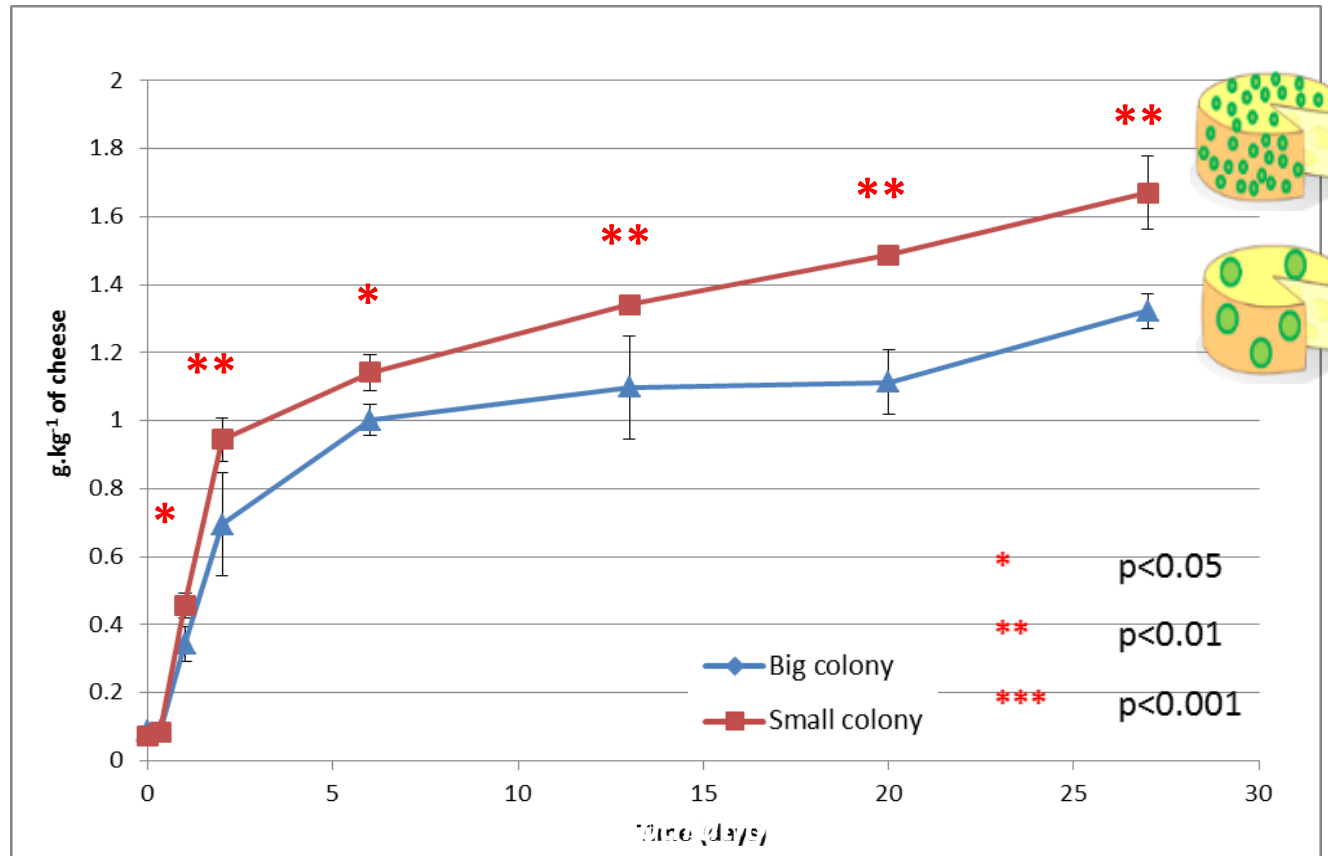
- résultats analogues à 2 et 13 j pour 2 types d'extraits et 2 modes d'ionisation

- **26 métabolites identifiés**
  - Acides aminés libres
  - Vitamines
  - Acides organiques
  - Nucléotides

*Le Boucher et al., Metabolomics, 2015*

# Acides aminés libres

Concentration en acides aminés libres totaux, g/kg



Le Boucher et al., AEM, 2016

# Bilan : influence de la distribution spatiale

- Métabolites plus abondants dans les fromages à petites colonies/ fromages à grosses colonies ex : acides aminés libres, diacetyl

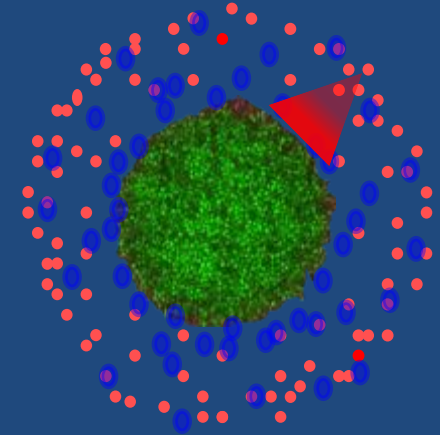
population initiale, UFC/g	diamètre colonie, $\mu\text{m}$	bactéries/ colonie	distance entre colonies, $\mu\text{m}$	Dans le fromage
$2 \cdot 10^6$	46	$10^4$	$\sim 150$	Levains lactiques
$10^6$	$\sim 20$	$10^3$	$\sim 80$	
$3 \cdot 10^7$	$\sim 7$	$10^2$	$\sim 30$	

Population initiale et nombre de colonies x 200

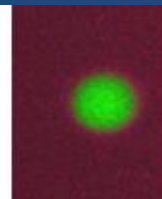
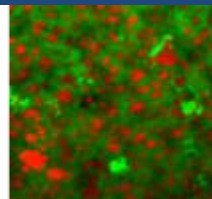
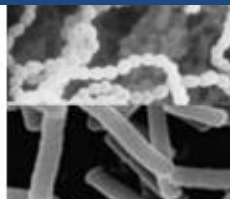
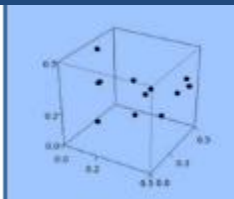
diamètre des colonies / 6  
aire interfaciale x 5

→ Des différences significatives mais modérées  
par rapport à l'ampleur des différences de distributions générées

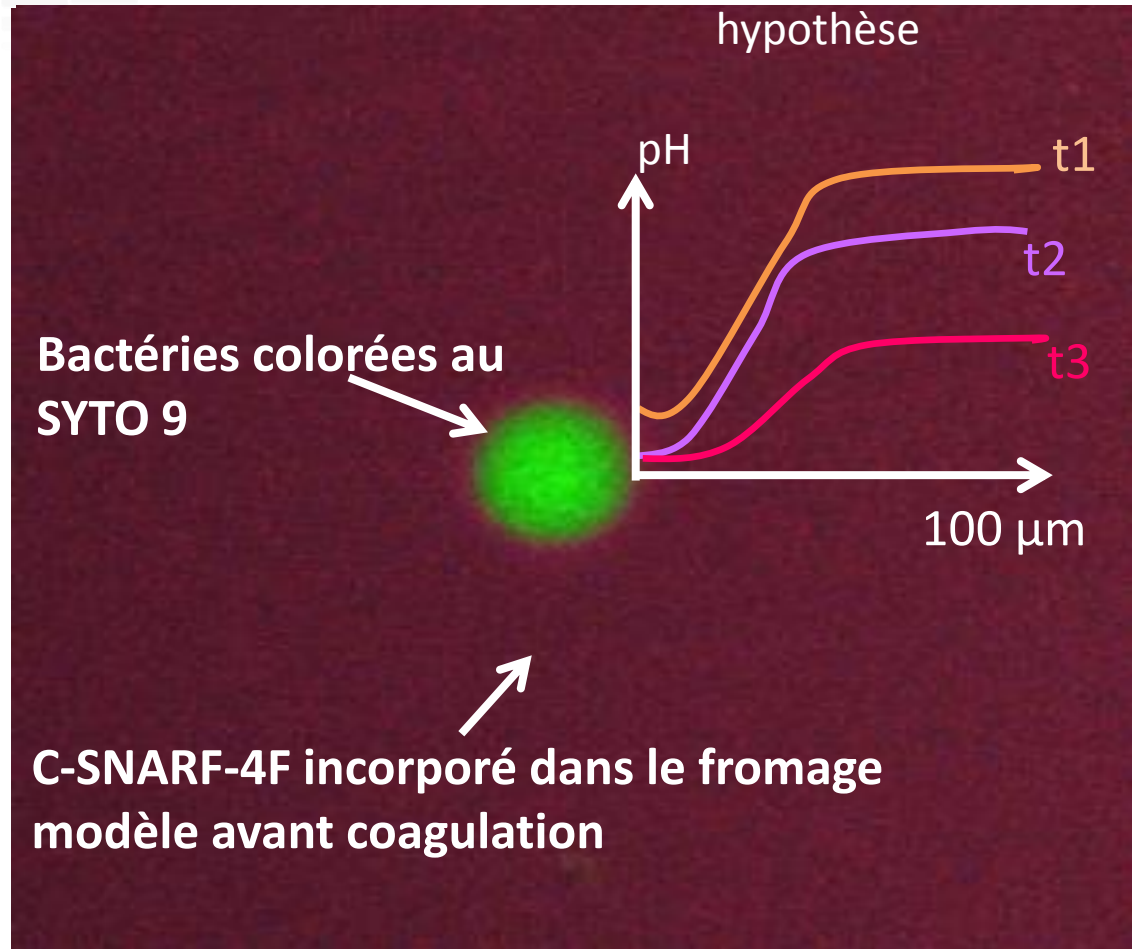
*Le Boucher et al., AEM, 2016*



## Micro-environnement des colonies : gradients de pH ?

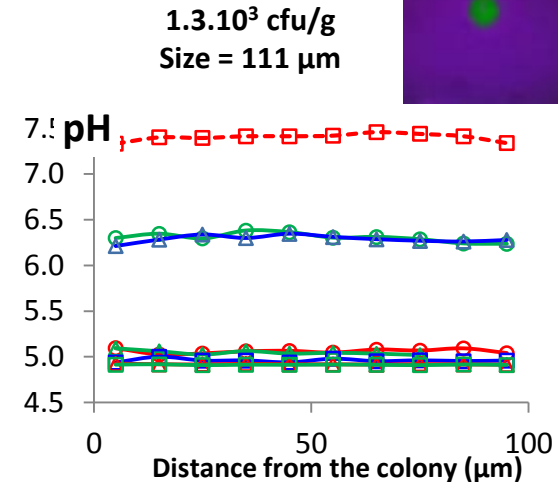
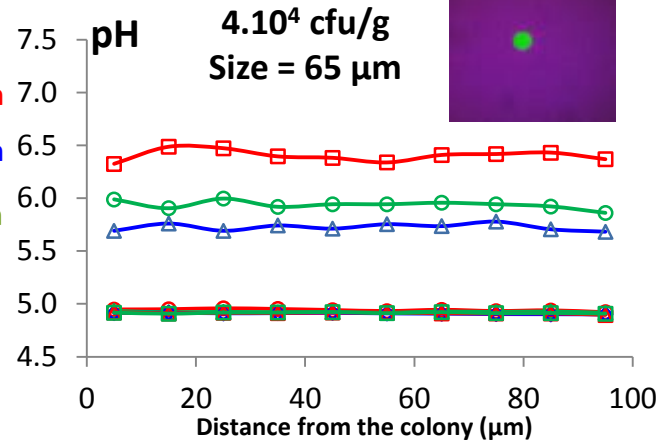
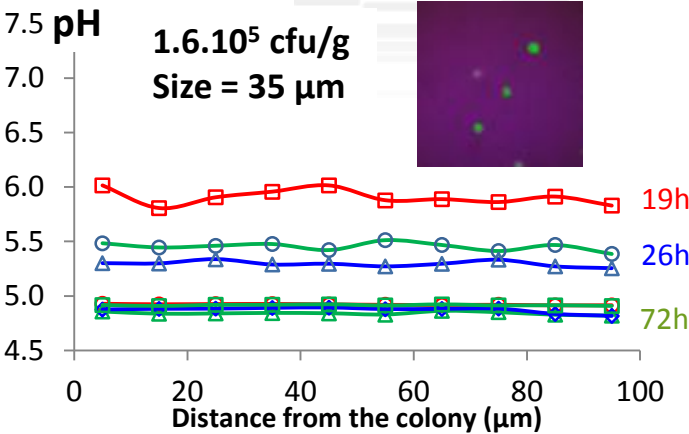


# Microgradients de pH ?

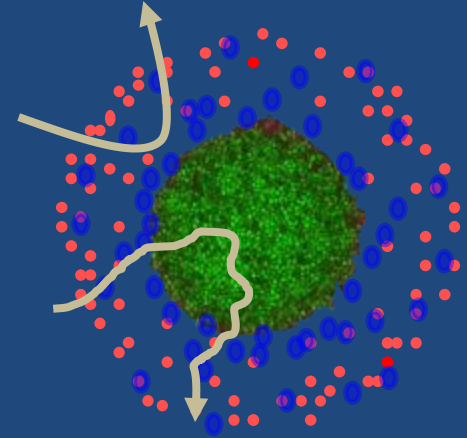


# Microgradients de pH ?

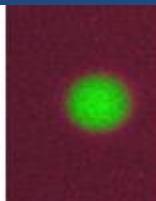
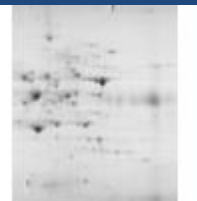
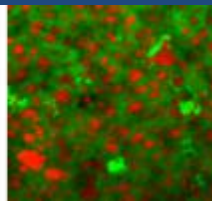
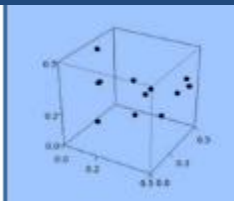
Jeanson et al., AEM, 2013



**Pas de microgradients de pH**  
observé pendant 72 h d'acidification,  
quelle que soit la taille des colonies



## Porosité des colonies et diffusion dans la matrice

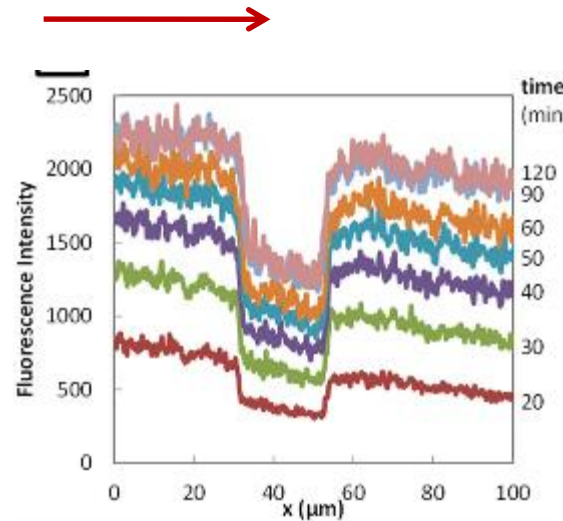
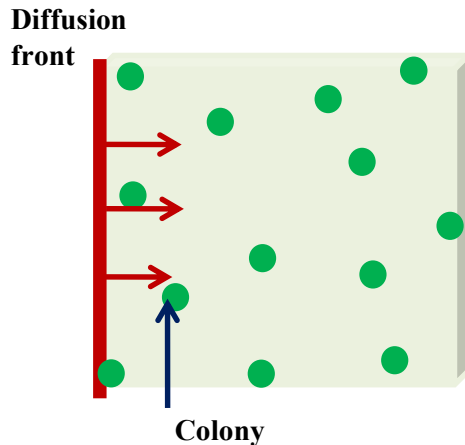


# Porosité des colonies ?

*Floury et al., IJFM, 2013*

*Floury et al., Frontiers in Microbiology, 2015*

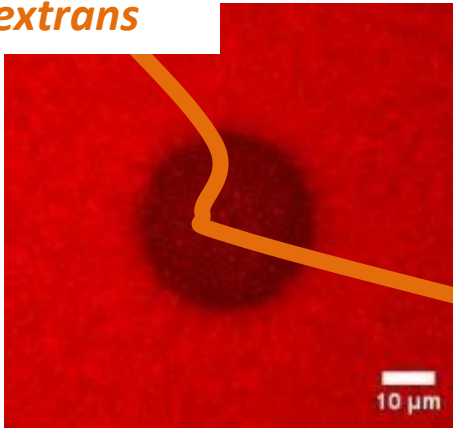
- **Diffusion des solutés dans les colonies** : suivi spatio-temporel de l'intensité de fluorescence
- RITC-Dextranes de 4 to 155 kDa : molécules flexibles, hydrophiles et neutres
- Protéines laitières marquées au RITC : caséine- $\alpha$ s1, sérum albumine bovine, lactoferrine



Augmentation du signal de fluorescence dans la matrice et la colonie au cours du temps

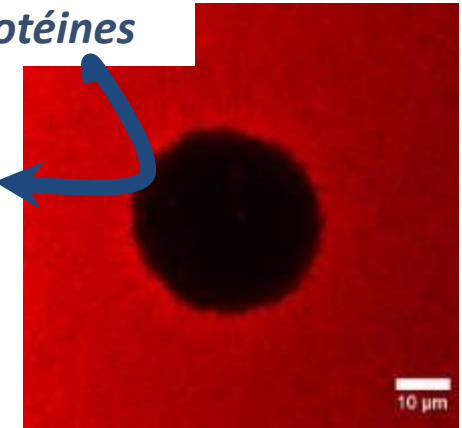
# Porosité des colonies ?

*dextrans*



*Diffusion d'un RITC-dextran de 155 kDa dans la matrice et au sein de la colonie*

*protéines*



*Diffusion de la RITC-lactoferrine dans la matrice mais pas dans la colonie*

- colonies de *L. lactis* immobilisées dans le fromage modèle
- Solutés marqués

- Tous les dextrans diffusent dans la colonie

- Aucune des 3 protéines testées ne diffuse

→ La diffusion dans les colonies dépend des solutés !

# Diffusion dans les matrices fromagères

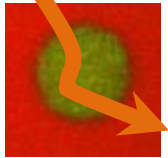
*Silva et al, J. Agric Food Chem 2015*  
*Silva et al, Food Res Int 2015*

*Silva et al, Food Hyd 2015*  
*Chapeau et al, Food Chem 2016*

## Dans des matrices fromagères modèles :

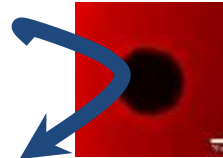
étude par FRAP (fluorescence recovery after photobleaching)  
avec solutés marqués au FITC (fluorescein isothiocyanate)

### dextrans



Dextrans de 4 à  
2000 kDa

### protéines



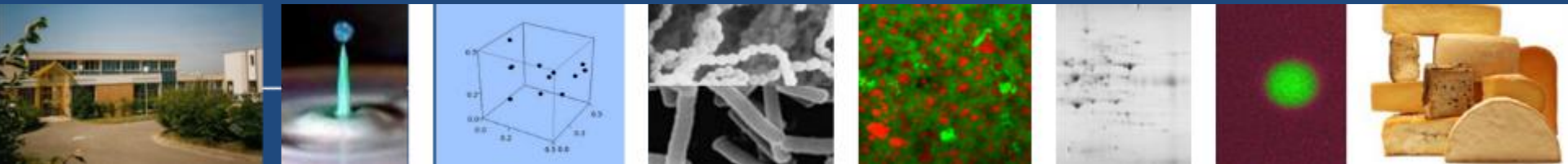
$\alpha$ -lactalbumine  
 $\beta$ -lactoglobuline  
sérum albumine bovine

- Taille moyenne des pores des matrices largement supérieure à la taille des plus grands dextrans (~50 nm)
- validé dans des fromages réels pour des dextrans jusqu'à 250 kDa (~20 nm)
- coefficients de diffusion nettement inférieurs à ceux de dextrans de rayons hydrodynamiques voisins

→ forte influence des propriétés physico-chimiques des solutés :  
flexibilité des dextrans, charge des protéines



# Conclusions



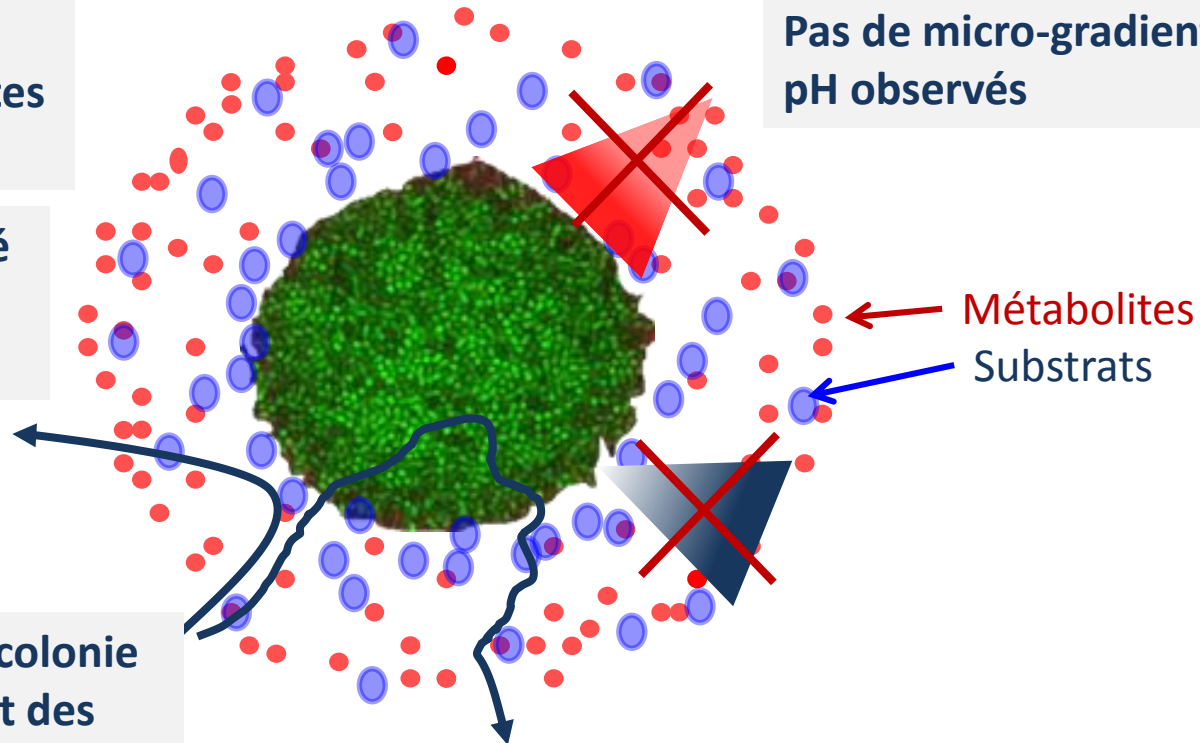
# Colonies du fromage : quelques réponses

Effet distribution :  
métabolisme plus  
rapide dans les petites  
colonies

Pas d'hétérogénéité  
observée  
dans la colonie

Diffusion dans la colonie  
dépend fortement des  
solutés

Pas de micro-gradients de  
pH observés



**Taille des colonies : vraisemblablement un élément clé**

*Jeanson et al., Frontiers in Food Microbiology, 2015*

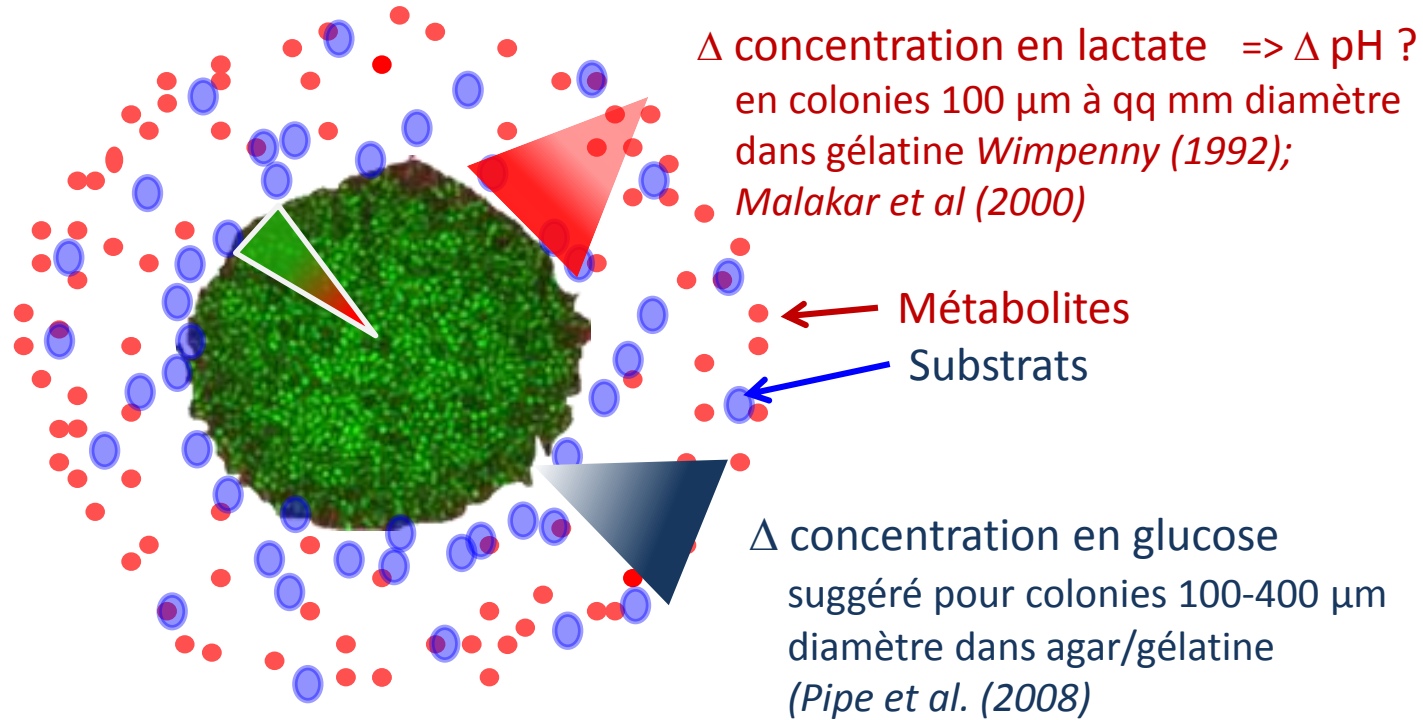
# Colonies : littérature

Colonies diamètre > 100  $\mu\text{m}$

Micro-gradients

## Hétérogénéité dans la colonie

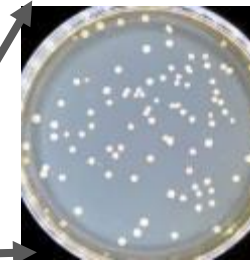
Colonies > 400  $\mu\text{m}$   
dans gélatine  
*McKay et al. (1997)*



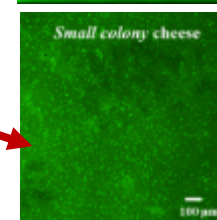
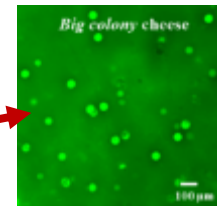
*Jeanson et al., Frontiers in Food Microbiology, 2015*

# Colonies

population initiale, UFC/g	diamètre colonie, $\mu\text{m}$	bactéries/ colonie	
1	> 1000	$10^9$	Macro-colonies
10	600-1000	$10^8$	
100	300-400	$10^7$	
1000	100-200	$10^6$	
Levains additionnels			
$10^4$	60-100	$10^5$	
$10^6$	40-50	$10^4$	Levains lactiques
$10^6$	~20	1000	
$10^7$	~4	100	



Gradients,  
hétérogénéité



Pas de gradients  
ni  
d'hétérogénéité  
observés

Adapté de Jeanson et al. (2015)



Microgradients of pH Do Not Occur around *Lactococcus* Colonies in a Model Cheese

## LC-HRMS fingerprinting as an efficient approach to highlight fine differences in cheese metabolome during ripening

Spatial Distribution of *Lactococcus lactis* Colonies Modulates the Production of Major Metabolites during the Ripening of a Model Cheese

## Bacterial Colonies in Solid Media and Foods: A Review on Their Growth and Interactions with the Micro-Environment

Vol. 77, No. 4

## Spatial Distribution of Bacterial Colonies in a Model Cheese<sup>∇</sup>

S. Jeanson,<sup>1,2\*</sup> J. Chadœuf,<sup>3</sup> M. N. Madec,<sup>1,2</sup> S. Aly,<sup>1,2</sup> J. Floury,<sup>1,2</sup> T. F. Brocklehurst,<sup>1</sup>  
INRA, UMR1253, F-35000 Rennes, France<sup>1</sup>; Agrocampus Ouest, UMR1253, F-35000 Rennes, France<sup>2</sup>;  
Analytical Methods

First assessment of diffusion coefficients in model cheese by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)

J. Floury<sup>a,b,c,\*</sup>, M.-N. Madec<sup>a,b</sup>, F. Waharte<sup>d</sup>, S. Jeanson<sup>a,b</sup>, S. Lortal<sup>a,b</sup>

Diffusion of solutes inside bacterial colonies immobilized in model cheese depends on their physicochemical properties: a time-lapse microscopy study

Flexibility and Charge of Solutes Affect Diffusion in Casein Suspensions

The influence of cheese composition and microstructure on the diffusion of macromolecules: A study using Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

# Etudes conduites de 2010 à 2015 au STLO



**Juliane Floury:**



**Ilham El Mourdi**

**Juliana Silva,**

**Sylvie Lortal**

**Sophie Jeanson, Valérie Gagnaire,**

**Anne Thierry**

**Clémentine**

**Le Boucher**

**Merci pour votre attention**