



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

SIReNa



LIBio
Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules ●●●

Ecole Doctorale : Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles

Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (EA 4367)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement le 18 juillet 2023 pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention : GENIE BIOTECHNOLOGIQUE ET ALIMENTAIRE

par **Alexis DIJAMENTIUK**

Sous la direction de **Frédéric BORGES** et **Cécile MANGAVEL**

Propagation de communautés bactériennes : modelage, stabilisation et sélection pour la biopréservation

Membres du Jury :

Directeur de thèse

Frédéric BORGES

Maître de conférences, Université de Lorraine

Co-directrice de thèse

Cécile MANGAVEL

Ingénieure de recherche, Université de Lorraine

Rapporteurs

Marie-Christine CHAMPOMIER-VERGÈS

Directrice de recherche, INRAE, Jouy-en-Josas

Christophe CHASSARD

Directeur de recherche, INRAE, Aurillac

Présidente du jury

Nathalie DESMASURES

Professeure, Université de Caen Normandie

“In order to design a future of positive change, we must first become experts at changing our minds.” – Jacque Fresco

Remerciements

Je remercie tout d'abord Christophe Chassard et Marie-Christine Champomier-Vergès, rapporteurs, ainsi que Nathalie Desmases, examinatrice, d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Merci à Anne-Marie Revol-Junelles, directrice du LIBio, de m'avoir accueilli dans ce laboratoire depuis mon stage de Master 2.

Je souhaite également adresser mes remerciements chaleureux à mes encadrants Frédéric Borges et Cécile Mangavel. Vous m'avez accordé votre confiance et accompagné avec bienveillance jusqu'au bout de ce travail. Ces quatre années passées avec vous m'ont permis de gagner en maturité, tant sur le plan scientifique qu'humain. Je vous en suis pleinement reconnaissant, et j'espère que nos chemins se recroiseront à l'avenir.

Je remercie Véronique Sadtler et Damien Blaudez d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi et d'avoir alimenté des discussions scientifiques constructives.

Merci à l'ensemble des contributeurs internes et externes au laboratoire de m'avoir accordé du temps et donné des points de vue complémentaires sur mes travaux. Je pense notamment à Jennifer Burgain, Florentin Michaux, Sandie Ferrigno, Claire Gaiani, Nicolas Louvet, Stéphane Delaunay et Emmanuel Rondags.

Mes amitiés sincères vont à l'ensemble du personnel du laboratoire avec qui j'ai pu interagir tout au long de cette thèse. Vous avez tous contribué à générer de bonnes conditions de travail et une ambiance agréable. Je remercie Annelore Elfassy, Sylvie Wolff et Myriam Schivi pour le soutien matériel que vous avez apporté ainsi que pour les bons moments partagés ensemble. Mention spéciale à Jérémy pour ses recommandations musicales déjantées, ainsi qu'à Amandine et Nazaré avec qui j'ai eu plaisir à refaire le monde autour du café quotidien.

Merci à Asfaw Zegeye et à Patrick Billard de m'avoir encouragé à poursuivre dans cette voie.

Je souhaite aussi témoigner mon inoxydable affection envers toutes celles et ceux qui m'ont soutenu moralement pendant ces années :

Mes parents, ma sœur, et ma belle-famille, pour votre patience remarquable et vos encouragements.

Mes amitiés à Charles, que je rencontre systématiquement en régions montagneuses, ainsi qu'à Timothée, dont les breuvages boréaux sont toujours appréciés.

Paul, Clément et Nicolas, je ne saurais me passer de nos fantastiques sessions musicales avec le groupe *Cosmocracy Inc.*, ainsi que de nos interminables conversations scientifiques et philosophiques.

Valerio, malgré l'océan qui nous sépare, tes ravitaillements de sagesse au cours de ce grand marathon ont été salvateurs.

Ludovic, nos parenthèses régulières consacrées à l'écriture d'*Eder Kahl* m'ont permis de m'extraire d'une vie monacale le temps de soirées papales. Celles-ci n'auraient toutefois pas la même saveur sans Claire. Je vous remercie tous les deux de m'avoir hébergé pendant le *Grand Confinement de l'an 2020*, que vous avez transformé en un moment inoubliable.

Une pensée pour mes camarades canins Flicka et Sibiu, experts-nés dans l'extorsion de victuailles. Nos excursions quotidiennes m'ont fait le plus grand bien et vous m'avez aidé à relativiser.

Enfin, je clos la rédaction de ce manuscrit en pensant à toi, Chloé. Je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi, notamment pendant cette étape de notre vie. Merci pour tout l'amour et la tendresse que tu manifestes chaque jour à mon égard. Je t'aime.

Table des matières

Remerciements	i
Table des matières.....	iii
Table des illustrations	vii
Liste des abréviations	xi
Introduction	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique	5
1. Le microbiote et sa caractérisation.....	6
1.1. Notions fondamentales.....	6
1.2. Explorer la composition des microbiotes.....	11
1.3. Caractériser et comparer les structures des microbiotes.....	20
2. Interactions biotiques dans les communautés microbiennes	28
2.1. Typologie des interactions.....	28
2.2. Les mécanismes de la compétition microbienne	31
3. Ingénierie de communautés microbiennes	36
3.1. Ingénierie ascendante : assemblage rationnel de communautés	36
3.2. Ingénierie descendante : manipulation et modelage de communautés naturelles	40
4. Exemple de valorisation de la compétition microbienne : la biopréservation..	57
Objectifs de la thèse	65
Chapitre II. Développement d'un système de co-culture atténuant la compétition microbienne	67
Introduction et contribution.....	68
Abstract.....	71
1. Introduction	73
2. Material and methods.....	75
3. Results	83
4. Discussion.....	98

5. Conclusions	102
Availability of data and materials	103
Acknowledgements.....	103
Funding.....	103
Author contributions.....	104
Ethics declarations.....	104
6. Supplementary Information	105
Rights and permissions	111
Chapitre III. Etude de la dynamique de communautés bactériennes propagées en régime séquentiel : apport de deux systèmes de culture	113
Introduction et contribution.....	114
Abstract.....	117
1. Introduction.....	118
2. Material and methods.....	121
3. Results	126
4. Discussion.....	136
5. Conclusions	140
Acknowledgements.....	141
Author contributions.....	141
Funding	141
Ethics declarations	141
6. Supplementary Information	142
Chapitre IV. Etude de la variabilité fonctionnelle de communautés propagées	143
Résumé.....	144
1. Introduction.....	145
2. Matériel et méthodes	147
3. Résultats	152
4. Discussion.....	157
Conclusion	160
Chapitre V. Discussion.....	161

Développer un système de co-culture afin de limiter les interactions microbiennes	162
Comprendre le fonctionnement du système de co-culture en émulsion inverse	165
Cultiver et modeler des microbiotes.....	171
Etudier l'impact fonctionnel de la propagation	177
Apport des travaux pour l'ingénierie de microbiote.....	180
Conclusion	183
Bibliographie	185
Communications	205
Abstract	207
Résumé	208

Table des illustrations

Figure 1. Schéma illustrant la notion de microbiome, comprenant le microbiote et son « théâtre d'activité ».	7
Figure 2. Puce d'isolement, ou iChip, pour la culture microbienne à haut débit in situ.	13
Figure 3. Schéma représentant deux communautés microbiennes hypothétiques.	20
Figure 4. Niche fondamentale et niche réalisée.	31
Figure 5. Réseau non-transitif de compétition.	35
Figure 6. Sélection de systèmes de co-culture classés par types de technologies disponibles.	42
Figure 7. Structures de trois types d'émulsions.	45
Figure 8. Abondance relative des OTU bactériennes trouvées dans les trois levains.	49
Figure 9. Abondance relative des taxons fongiques trouvés dans les trois levains.	50
Figure 10. Dynamique des phages et des communautés au cours d'une propagation par backslopping.	54
Figure 11. Confocal laser scanning microscopy image of emulsified and non-emulsified cultivation systems.	83
Figure 12. Particle size distribution obtained by granulomorphometric analysis.	84
Figure 13. Effect of the culture system on the growth kinetics of <i>C. maltaromaticum</i> F2 and <i>L. monocytogenes</i> EGDe.	86
Figure 14. Effect of varying initial densities on the growth dynamics of separately cultivated bacteria.	87
Figure 15. Effect of the culture system on competition between antagonistic strains in a mixed culture.	89
Figure 16. Growth kinetics of selected bacterial strains in classical setup or invert emulsion.	94
Figure 17. Communities propagated as mixed cultures or blends of separately grown bacteria in classical setup or invert emulsion.	95
Figure 18. Clustering and ordination based on Bray–Curtis distances between samples.	97
Figure 19. Normalized excitation and emission spectra of <i>E. coli</i> DH5- α pGLO and Nile Red determined by scanning.	105

Figure 20. Double layer agar assay.....	106
Figure 21. Particle size distribution obtained by granulomorphometric analysis of emulsions in bioreactor.	107
Figure 22. Halo inhibition assay.....	110
Figure 23. Growth dynamics of bacterial communities during serial propagation using a classical setup or an invert emulsion system.....	126
Figure 24. Compositional dynamics at the genus level of bacterial communities from raw milk during serial propagation using a classical setup or an invert emulsion system.	128
Figure 25. Alpha diversity analysis of raw milk communities upon serial passaging using a classical setup or invert emulsion.....	130
Figure 26. Beta diversity analysis of raw milk communities upon serial passaging using a classical setup or invert emulsion.....	132
Figure 27. Bacterial composition of plated raw milk community L5 inoculum, and after 10 passages using a classical setup or an invert emulsion system.....	134
Figure 28. Compositional dynamics at the phylum level of bacterial communities from raw milk during serial propagation using a classical setup or an invert emulsion system.	142
Figure 29. Protocole graphique de l'expérience de compétition de communautés de laits crus vis-à-vis de <i>L. monocytogenes</i> EGD _{delux}	148
Figure 30. Distribution et diagramme de densité des forces d'inhibition moyennes exercées par les communautés microbiennes issues de laits crus.	152
Figure 31. Corrélation entre la force d'inhibition et la reproductibilité de la réponse chez les 27 communautés retenues.....	154
Figure 32. Carte thermique représentant les forces d'inhibition et la reproductibilité des réponses et classification hiérarchique ascendante des 27 communautés retenues.	155
Figure 33. Boîtes à moustache représentant la force et la variabilité des propriétés d'inhibition de <i>L. monocytogenes</i> caractérisant les communautés des groupes gp1, gp2 et gp3.	156
Figure 34. Schémas illustrant l'effet du niveau d'ensemencement sur la capacité de croissance des bactéries et la compétition bactérienne dans une culture en émulsion inverse.....	166
Figure 35. Principe expérimental permettant de tester l'hypothèse d'une limitation de la croissance due à l'acidification des gouttelettes en émulsion inverse.	169

Figure 36. Protocole expérimental de culture de microbiote en émulsion inverse en une seule étape comprenant 3 cycles de température de 24 h....	172
Figure 37. Enrichissement progressif de mutants à croissance lente dans une culture en émulsion inverse.....	174
Figure 38. Principe expérimental de la sélection artificielle de communautés.	178

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
API	<i>Analytical Profile Index</i>
Asp	Aspartate
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
A _w	Activité de l'eau
BIGS	<i>Biology, Genetics and Statistics</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BLIS	<i>Bacteriocin-like inhibitory substance</i>
bp	<i>Base pair</i>
CFU	<i>Colony forming unit</i>
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscopy</i>
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
DO	Densité optique
EHEC	<i>Enterohaemorrhagic Escherichia coli</i>
EPEC	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>
FROGS	<i>Find, rapidly, OTUs with Galaxy solution</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HSD	<i>Honestly significant difference</i>
iChip	<i>Isolation chip</i>
IECL	<i>Institut Elie Cartan de Lorraine</i>
INRAE	Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
INRIA	Institut national de recherche en informatique et en automatique
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
LIBio	Laboratoire d'ingénierie des biomolécules
LRGP	Laboratoire réactions et génie des procédés
MCM	<i>Medium for Carnobacterium maltaromaticum</i>
MLST	<i>Multi-locus sequence typing</i>

NMDS	<i>Non-metric dimensional scaling</i>
OTU	<i>Operational taxonomic unit</i>
O/W	<i>Oil-in-water</i>
PALCAM	<i>Polymyxin-acriflavine-LiCl-ceftazidime-aesculin-mannitol agar</i>
PCoA	<i>Principal coordinates analysis</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PGPR	Polyricinoléate de polyglycérol
pH	Potentiel hydrogène
rcf	<i>Relative centrifugal force</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	<i>Round per minute</i>
sp.	<i>Species, espèce</i>
spp.	<i>Species pluralis, espèces</i>
subsp.	<i>Subspecies, sous-espèce</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TSAYE	<i>Tryptic soy agar with yeast extract</i>
TSBYE	<i>Tryptic soy broth with yeast extract</i>
UHT	Ultra haute température
VBNC	<i>Viable but not cultivable</i>
v/v	<i>Volume per volume</i>
W/O	<i>Water-in-oil</i>
W ₁ /O/W ₂	<i>Water-in-oil-in-water</i>
w/w	<i>Weight per weight</i>

Introduction

Cette thèse a été menée au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio, EA 4367 de l'Université de Lorraine). Les activités de recherche de ce laboratoire sont positionnées dans le domaine de la transformation alimentaire et non alimentaire d'agro-ressources d'origines diverses, essentiellement laitières, végétales et marines. L'objectif est de développer des approches d'ingénierie de matrices et de vecteurs biosourcés en se basant sur la compréhension et la maîtrise des phénomènes biotiques et abiotiques régissant la structuration de systèmes d'intérêt pour la bioéconomie. L'ambition du laboratoire est de contribuer à une meilleure prise en compte des problématiques liées à la gestion des ressources naturelles et à la santé des individus. L'amélioration de la sécurité alimentaire et la prolongation de la durée de vie des aliments constituent en effet des enjeux majeurs de notre époque. Dans ce contexte, les activités de recherche en microbiologie menées au LIBio portent sur la conception de nouvelles approches d'ingénierie d'écosystèmes alimentaires fermentés. L'application principalement visée est la biopréservation, une méthode valorisant la compétition microbienne vis-à-vis de flores d'altération ou de pathogènes. Les découvertes récentes sur les communautés microbiennes, ou microbiotes, des aliments fermentés suscitent une volonté de les manipuler dans une démarche d'ingénierie écologique pour de telles applications.

Les perspectives que présentent les microbiotes se heurtent toutefois aux limites des procédés historiquement utilisés pour cultiver des micro-organismes. Or, le contrôle des interactions microbiennes qui s'établissent pendant la culture de mélanges complexes de micro-organismes est essentiel pour l'ingénierie de communautés. Typiquement, la compétition peut conduire à l'exclusion de membres des communautés microbiennes au cours de la culture, aboutissant à des communautés qui ne présentent pas les fonctionnalités désirées. Ainsi, l'ingénierie de communautés nécessite de développer des outils pour leur culture et leur modelage,

et de caractériser leurs effets sur la structure et la fonctionnalité des communautés, problématiques que cette thèse propose d'aborder. Ce manuscrit s'articule autour de cinq chapitres :

Le **Chapitre I** consiste en une synthèse bibliographique permettant de situer le contexte scientifique et technique dans lequel s'inscrivent les travaux de thèse. La première partie de ce chapitre aborde les notions fondamentales concernant la nature des microbiotes et les approches permettant de les caractériser et de les comparer. La deuxième partie traite des interactions biotiques qui s'établissent dans les microbiotes en mettant l'accent sur la compétition microbienne, ses mécanismes et implications. La troisième partie présente l'ingénierie de communautés microbiennes, qu'elle scinde en deux approches complémentaires permettant d'obtenir des microbiotes présentant une fonctionnalité d'intérêt. Cette section relate les différentes technologies disponibles pour assembler, cultiver et modéliser des microbiotes et traite de leur dynamique dans les processus de culture. La quatrième partie est dédiée à la biopréservation, un exemple de valorisation de la compétition microbienne pouvant reposer sur des approches d'ingénierie de communautés. De cet état de l'art découlent les objectifs de la thèse qui sont ensuite détaillés.

Le **Chapitre II** présente la preuve de concept d'un système de co-culture qui permet de limiter la compétition microbienne. L'effet de ce système sur la culture de micro-organismes séparés et en mélange a été évalué en combinant dénombrements et approches indépendantes de la culture basées sur le séquençage à haut-débit d'amplicons. Ces travaux correspondent à un article publié dans le journal *Microbial Cell Factories*.

Par la suite, l'effet du système développé ainsi que d'une méthode classique sur la dynamique de communautés microbiennes issues de lait cru au cours d'une culture séquentielle a été étudié à l'aide des mêmes techniques de caractérisation. Ces travaux mettent en évidence la complémentarité des deux outils dans un contexte

d'ingénierie de communautés. Ces travaux présentés dans le **Chapitre III** correspondent à un manuscrit en préparation en vue d'une soumission.

Le **Chapitre IV** consiste en une étude de l'impact de la propagation sur la fonctionnalité de communautés issues de laits crus dans un contexte de biopréservation. En particulier, ce chapitre présente les résultats d'essais de compétition *in vitro* entre des communautés propagées et une souche indicatrice de *Listeria monocytogenes* et aborde la problématique de la reproductibilité des propriétés inhibitrices exercées par les communautés.

Ce manuscrit se clôture sur une discussion en **Chapitre V**, replaçant les travaux de cette thèse dans leur contexte et proposant des perspectives pour leur poursuite. Cette discussion s'achève par une conclusion générale.

Chapitre I. Synthèse bibliographique

1. Le microbiote et sa caractérisation

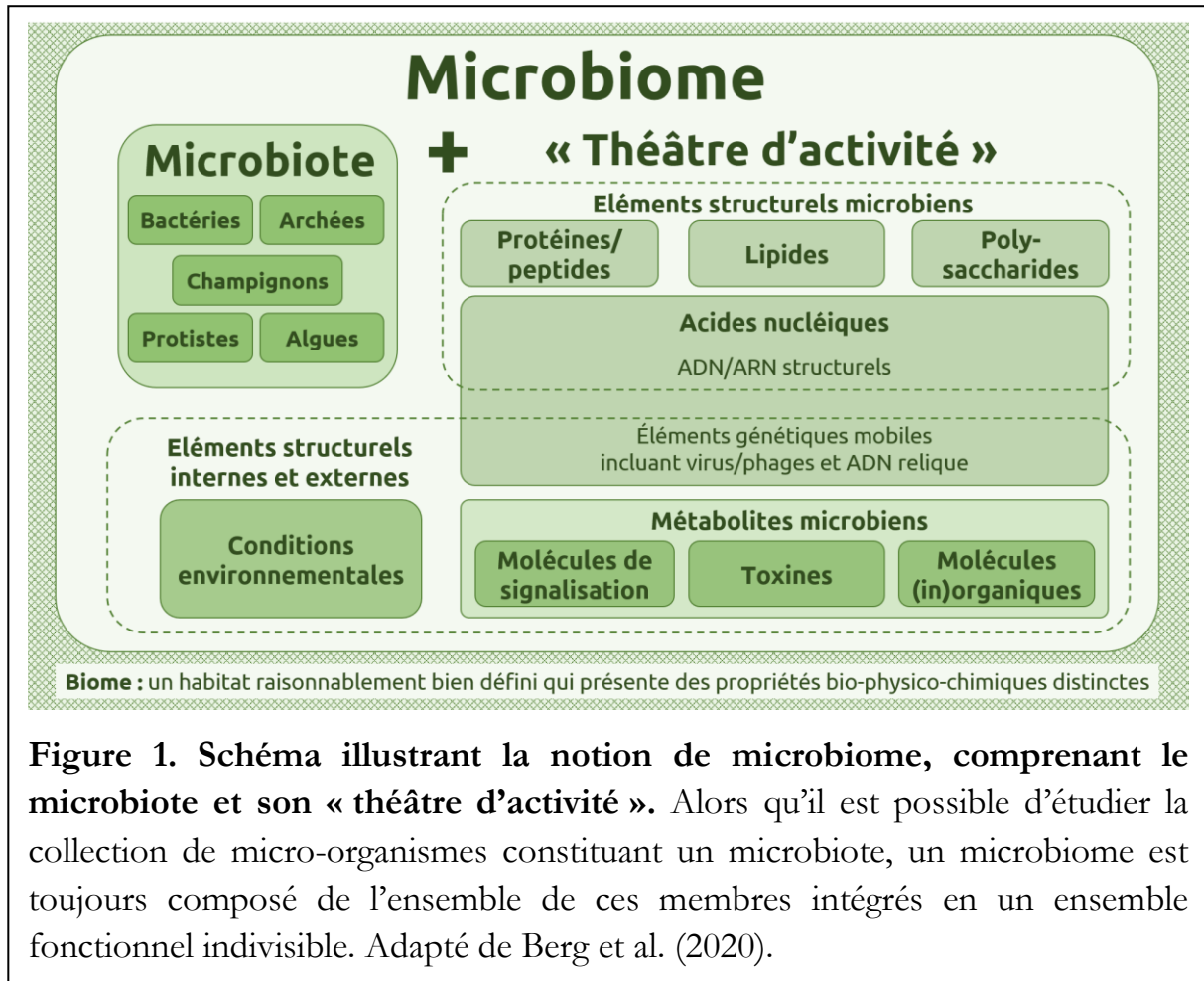
1.1. Notions fondamentales

Microbiote et microbiome

La surface terrestre est presque entièrement occupée par des espèces vivantes dont les plus abondantes et diversifiées sont des micro-organismes. Ils comprennent les bactéries, les archées et les eucaryotes unicellulaires (champignons et protistes). Leur immense diversité métabolique a permis aux micro-organismes d'occuper et de se maintenir dans l'ensemble des habitats de la planète. Les micro-organismes sont associés les uns aux autres et à des matrices biotiques (un hôte animal ou végétal) ou abiotiques (sol, surfaces, aliments, etc.), pour former une unité fonctionnelle appelée **écosystème microbien**. Les interrelations s'établissant entre les micro-organismes ainsi qu'avec leur environnement sont étudiées par l'écologie microbienne, discipline émergente au XX^{ème} siècle dont l'essor a abouti à la définition de deux notions fondamentales et distinctes.

La première est la notion de **microbiote**, laquelle désigne un assemblage de micro-organismes interagissant les uns avec les autres pour former une **communauté microbienne** colonisant un habitat particulier. La seconde notion, celle de **microbiome**, capture l'ensemble de l'habitat (biome) avec ses micro-organismes et leur « théâtre d'activité » (Berg et al., 2020), basée sur une définition initialement proposée à la fin des années 1980 (Whipps et al., 1988). Ce théâtre d'activités comprend le spectre complet de biomolécules produites par les micro-organismes, à savoir les éléments structuraux (acides nucléiques, protéines, lipides, polysaccharides), les métabolites (molécules de signalisation, toxines, molécules organiques et inorganiques), et les molécules produites par les hôtes associés aux microbiotes. En plus des acides nucléiques structuraux, ce spectre inclut également

les acides nucléiques extracellulaires, virus, phages et éléments génétiques mobiles (Figure 1) (Berg et al., 2020).



Niche écologique

Une autre notion fondamentale en écologie microbienne est celle de **niche écologique**. Différentes définitions de ce concept ont été proposées à travers l'histoire (Pocheville, 2015). Une définition couramment retenue est celle proposée par Hutchinson, qui définit conceptuellement la niche écologique d'un organisme comme un espace environnemental multidimensionnel dans lequel il se maintient de façon stable (Hutchinson, 1957). Plus concrètement, il s'agit de l'ensemble des paramètres physico-chimiques (température, humidité, pH, etc.) et ressources nutritionnelles favorables à l'organisme. Ces paramètres lui permettent de survivre dans son environnement et de se reproduire. Dans la nature, les micro-organismes font partie de communautés dans lesquelles les membres interagissent les uns avec les autres. Ces interactions biotiques exercent des contraintes sur l'espace environnemental que les organismes peuvent occuper. Ces contraintes permettent d'opérer une distinction entre deux types de niches : la niche fondamentale et la niche réalisée. La niche fondamentale correspond à la niche que l'organisme occupe théoriquement en l'absence de partenaires, tandis que la niche réalisée correspond à la niche effectivement occupée et résultant de ces interactions. Le concept de niche peut être étendu de l'organisme aux communautés de micro-organismes. La niche écologique se conceptualise facilement, toutefois elle regroupe un nombre de facteurs tel que la connaissance de son entièreté demeure généralement inaccessible. Pour la caractériser, on retient les facteurs les plus significatifs en lien avec la connaissance de l'écosystème étudié, et l'on fait abstraction des autres.

Omiques : techniques d'étude et de caractérisation des microbiomes

L'étude des microbiomes a pris de l'ampleur au cours des dernières décennies grâce à des développements technologiques, en particulier les techniques d'investigation à haut-débit basées sur la biologie moléculaire. Ces techniques, regroupées sous le vocable « omiques », comprennent notamment la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique (Borges et al., 2022; Prosser et al., 2007). Appliquées à l'échelle de l'ensemble d'un microbiome, et prenant en compte son contenu total, ces approches sont dites *méta*-omiques. Elles donnent lieu aux déclinaisons métagénomique, métatranscriptomique, métaprotéomique et métabolomique. Appliquées séparément ou en combinaisons multi-omiques, ces techniques ont pour objectif de comprendre les lois qui gouvernent le fonctionnement et l'évolution des microbiomes, par l'étude de la composition des microbiotes ainsi que des interactions microbiennes au sein des communautés et avec leur environnement. Les approches multi-omiques permettent concrètement de répondre à un ensemble de questions scientifiques relatives aux microbiomes. En particulier, les méthodes basées sur la génomique permettent d'identifier les micro-organismes en accédant à la composition taxonomique des microbiomes, mais aussi d'évaluer leur potentiel métabolique par l'étude du contenu génétique et des fonctions inférées. La métatranscriptomique, la métaprotéomique et la métabolomique permettent d'obtenir respectivement les profils d'expression génique, les protéines et métabolites effectivement produits par les microbiomes en fonctionnement.

Pertinence de l'étude des microbiomes

L'application des approches précédemment citées a permis de révéler à la fois l'ampleur de la diversité du contenu taxonomique et fonctionnel des communautés microbiennes ainsi que leur rôle crucial dans le fonctionnement des écosystèmes. En effet, les microbiomes façonnent par leur activité les environnements qu'ils colonisent. Par exemple, l'étude de microbiomes environnementaux (sol, air, océans, etc.) a mis en évidence leur place centrale dans le cycle des éléments à l'échelle globale (Sokol et al., 2022). On estime ainsi que leur activité a radicalement transformé la surface de la planète sur des échelles de temps géologiques. L'étude de microbiomes associés à des macro-organismes animaux et végétaux montre qu'ils exercent sur la santé de leur hôte des effets bénéfiques ou néfastes (Q.-L. Chen et al., 2021; Fan & Pedersen, 2021; Hall et al., 2018; Wei et al., 2015). Dans les aliments fermentés, les microbiomes opèrent les processus biochimiques qui transforment la matrice initiale en produit fini. Ces processus exercent un effet sur les profils sensoriels du produit (Arfi et al., 2004; Callon et al., 2005; Lacroix et al., 2010). De plus, ils peuvent exercer des effets protecteur vis-à-vis de pathogènes ou de flores d'altération (Borges et al., 2022). De nombreux exemples d'applications industrielles de cultures impliquant plusieurs micro-organismes ont été passés en revue par Bader et al., parmi lesquels la production de métabolites d'intérêt (enzymes, bactériocines, acides organiques, éthanol, caroténoïdes, arômes), de polymères, d'hydrogène, d'électricité, la dégradation de lignine ou encore la dépollution (bioremédiation) (Bader et al., 2010). La diversité des apports des microbiomes s'étend également au traitement des eaux (ElNaker et al., 2018), la méthanisation (digestion anaérobie) (Godon et al., 1997) ou la protection des environnements construits (Gadd & Dyer, 2017). Ces exemples illustrent la variété de domaines dans lesquels les innovations en matière de microbiome présentent un potentiel pour l'amélioration de la production de valeur, tout en soutenant les principes de l'économie circulaire (D'Hondt et al., 2021).

1.2. Explorer la composition des microbiotes

La composition d'un microbiote se réfère à son contenu taxonomique. Ces données taxonomiques permettent d'étudier la dynamique et la succession de populations microbiennes en lien avec leurs conditions environnementales ou des fonctionnalités d'intérêt exprimées par le microbiote. Deux approches complémentaires permettent d'accéder à la composition des microbiotes : les approches reposant sur la culture et les approches indépendantes d'une étape de culture. L'objet de cette section est de définir ces approches en soulignant d'abord ce qui les distingue, puis ce qui en fait des approches complémentaires pour l'étude de la composition des microbiotes.

Approches dépendantes de la culture

Les approches de caractérisation reposant sur la culture sont les plus anciennes, trouvant leur origine à l'aube de la microbiologie. Elles font classiquement appel à l'isolement de micro-organismes par étalement de suspensions issues d'échantillons environnementaux sur un milieu de culture solide (gélose nutritive) avec ou sans enrichissement préalable. L'incubation de ces milieux solides conduit au développement des micro-organismes viables sous formes de colonies, permettant notamment de dénombrer la flore microbienne des échantillons. En outre, les colonies qui se sont développées lors de l'incubation peuvent être caractéristiques par leur morphologie et leur coloration, qui constituent des premiers éléments d'identification. Les milieux gélosés utilisés peuvent présenter un niveau de sélectivité plus ou moins élevé vis-à-vis des micro-organismes, reposant sur leur composition nutritionnelle d'une part et sur la présence éventuelle d'inhibiteurs tels que des antibiotiques d'autre part. L'observation au microscope optique permet d'identifier les micro-organismes sur les bases de leur taille et morphologie cellulaires, ainsi que de leur paroi après coloration de Gram.

Les micro-organismes isolés peuvent aussi être caractérisés et différenciés sur la base de réactions biochimiques catalysées par des enzymes particulières. Ces caractérisations peuvent reposer sur l'utilisation de milieux chromogènes ou de techniques de culture particulières. Par exemple, l'hydrolyse de l'esculine en esculetine par certaines espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* conduit à la formation de complexes entre le produit de la réaction et les ions fer(III) dans les géloses bile-esculine, ce qui se manifeste par l'apparition d'un halo noir caractéristique autour des colonies (Lindell & Quinn, 1975). Autre exemple, l'ensemencement de micro-organismes le long d'un gradient de concentration en O₂ qui s'établit dans des tubes longs et fins (tubes de Veillon), permet en observant la zone de croissance microbienne d'en déduire leur type respiratoire (Joffin & Leyral, 2001). Il existe une très grande variété de milieux et de tests permettant de mettre en évidence certaines activités, ce qui a abouti à l'invention de tests standardisés. Ces derniers sont fréquemment utilisés afin de faciliter et de systématiser l'identification de micro-organismes avec des applications diagnostiques dans les milieux médicaux, environnementaux ou alimentaires. Parmi ces tests, les galeries API® (Analytical Profile Index) développées à la fin des années 1960 consistent en une série de cupules contenant des substrats particuliers (sucres, acides aminés, acides carboxyliques, etc.) et permettent d'accéder aux capacités métaboliques des micro-organismes (Lesquir & Joffin, 2017). Le résultat de ce test consiste en une série de variables binaires constituant un profil qui est confronté à une base de données. Dans une démarche d'automatisation, le système Biolog® (Bochner, 1989) permet d'étudier les profils nutritionnels de micro-organismes d'intérêt et de communautés microbiennes, en évaluant leurs cinétiques de croissance sur une grande variété de ressources carbonées. Se présentant sous forme de microplaques, il présente l'avantage d'être adapté à un haut-débit de caractérisation par spectrophotométrie.

Les divers niveaux de caractérisation mentionnés précédemment donnent de nombreuses informations sur les isolats d'intérêt, permettant à la fois de préciser leur identification taxonomique jusqu'aux rangs de genre et d'espèce, mais aussi de mettre en évidence des propriétés d'intérêt technologique. Mais les méthodes culturales souffrent d'une limitation majeure que leur nom laisse pressentir : les micro-organismes sont caractérisés par des besoins nutritionnels et des valeurs cardinales (température, pH, A_w , etc.) spécifiques, rendant parfois leur culture fastidieuse. Le développement récent d'approches de culture à haut-débit permet toutefois de s'émanciper de ces contraintes. En particulier, la culturomique consiste à cribler un grand nombre de conditions de culture qui ont permis d'isoler de nombreux micro-organismes jusqu'alors considérés non-cultivables (Bilen et al., 2018; Lagier et al., 2016). De plus, découlant de la spécificité élevée des niches écologiques de certains

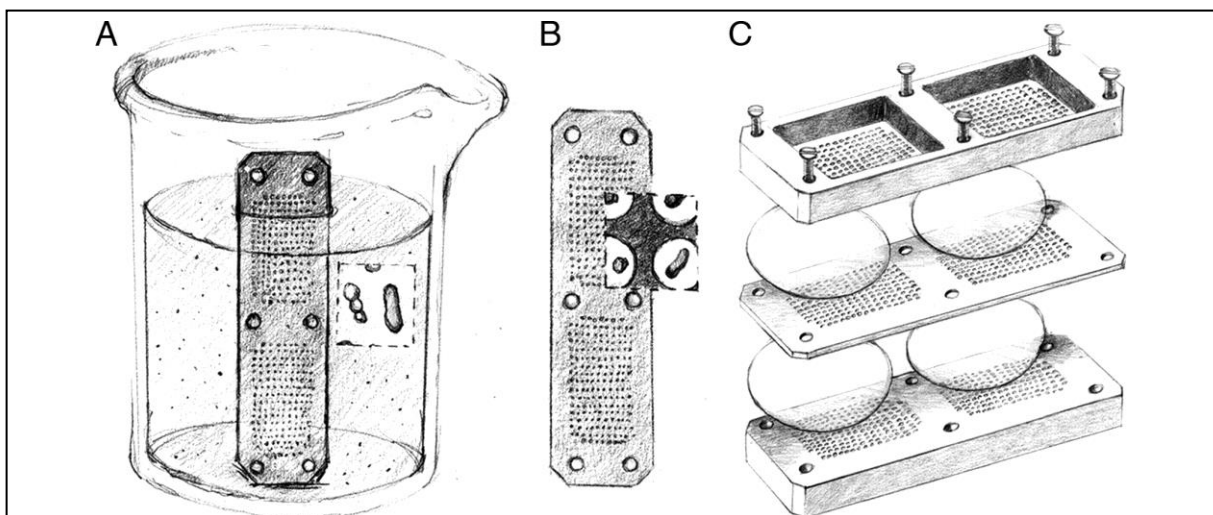


Figure 2. Puce d'isolement, ou iChip, pour la culture microbienne à haut débit *in situ*. (A) L'immersion d'une plaque percée de multiples orifices dans une suspension contenant un mélange de cellules environnementales permet de capturer en moyenne une seule cellule par orifice (B). (C) Assemblage de la puce : des membranes sont disposées de chaque côté des réseaux de trous de la plaque centrale chargée. Ces membranes sont pressées contre la plaque centrale à l'aide des plaques inférieure et supérieure, elles-mêmes percées de trous correspondants. Les vis fournissent une pression suffisante pour sceller la puce, chaque trou devenant une chambre de diffusion miniature qui contient (en moyenne) une seule cellule. Illustration de Stacie Bumgarner, Whitehead Institute for Biomedical Sciences, Cambridge, MA., adapté de Nichols et al., (2010).

micro-organismes, la présence d'interactions microbiennes est parfois requise pour leur développement. Des auteurs ont ainsi proposé un système appelé *iChip* (puce d'isolement, *anglais* : *isolation chip*) tirant profit de ces interactions biotiques et abiotiques complexes pour l'isolement *in situ* de micro-organismes fastidieux dans leur environnement d'origine (Nichols et al., 2010). Le dispositif permet d'isoler des micro-organismes individuels dans les orifices d'une plaque immergée dans un mélange de l'environnement d'origine (*e.g.* sédiment marin, sol, etc.) et de gélose en surfusion. Cette plaque est alors recouverte par des membranes semi-perméables maintenues en place au moyen d'autres plaques (Figure 2). La puce chargée est ensuite placée dans son environnement d'origine, où la diffusion de nutriments et de métabolites à travers les membranes permettent la croissance des isolats.

Enfin, certains stress ou conditions environnementales défavorables peuvent conduire les bactéries à entrer dans un état physiologique particulier dans lequel elles sont actives mais ne sont pas en mesure de se multiplier. Cet état est dit « viable mais non-cultivable » (*anglais* : *viable but not culturable*, VBNC) (Bodor et al., 2020). L'élimination ou la neutralisation de ces facteurs de stress peut aider à rétablir la cultivabilité des cellules. Cela peut être fait au moyen d'une température ou d'une composition nutritive favorable, en ajoutant des piègeurs de ROS ou des antioxydants, ou encore en exposant les bactéries au surnageant de cellules en croissance active (Bodor et al., 2020). Enfin, la co-culture avec d'autres espèces peut également contribuer à la réactivation de la croissance des cellules VBNC (Bodor et al., 2020). Pour ce faire, un dispositif tel que l'iChip peut se révéler utile.

Les isolats sélectionnés par une des méthodes mentionnées peuvent être analysés par des techniques de biologie moléculaire, en particulier la génomique. Le principe de ces techniques d'identification repose sur l'existence dans les génomes des micro-organismes de marqueurs génétiques, dits **marqueurs taxonomiques**, qui permettent d'identifier les micro-organismes et de construire leurs relations phylogénétiques entre eux. Ces marqueurs présentent deux propriétés importantes. Premièrement ils sont ubiquitaires, c'est-à-dire fortement conservés dans le monde

vivant. Deuxièmement, leur séquence nucléotidique est suffisamment variable pour offrir un pouvoir résolutif, c'est-à-dire pouvoir distinguer les différents isolats analysés sur le plan taxonomique. Un marqueur présentant ces propriétés et typiquement utilisé pour identifier les isolats bactériens est la séquence codant la sous-unité 16S de l'ARN ribosomique (ARNr 16S) (Woese & Fox, 1977). Les régions hautement conservées de ce gène permettent l'hybridation d'amorces universelles, tandis que les régions hypervariables qui le composent offrent un pouvoir résolutif. L'identification des eucaryotes fait appel à d'autres marqueurs taxonomiques, notamment les espaceurs internes transcrits (ITS, *anglais* : *Internal Transcribed Spacers*) séparant les sous-unités 18S et 5,8S (ITS1) et 5,8S et 28S (ITS2, 28S chez les opisthocontes, 25S chez les plantes) du gène codant l'ARNr, qui ne seront pas abordés dans ce manuscrit. L'amplification en chaîne par polymérase (PCR, *anglais* : *Polymerase Chain Reaction*) de ces marqueurs taxonomiques est classiquement suivie d'un séquençage par la méthode de Sanger et aboutit, par alignement avec les séquences d'une base de données, à l'affiliation taxonomique de l'isolat étudié. Ces techniques sont également à la base des approches indépendantes de la culture qui sont abordées ci-après.

Approches indépendantes de la culture basées sur la génomique

L'exploration de la composition des microbiotes peut faire appel à des approches indépendantes de la culture. Diverses méthodes existent, parmi lesquelles celles basées sur la génomique. Une des méthodes les plus utilisées repose sur le codage à barre de l'ADN microbien (*anglais* : *DNA barcoding*). Dans le cadre de l'étude de microbiotes, impliquant le contenu génomique total d'un échantillon environnemental, on parle de *metabarcoding*. Il s'agit d'une méthode d'identification permettant d'obtenir la composition d'un microbiote à partir d'un seul échantillon en s'affranchissant de l'isolement préalable de ses membres (Taberlet et al., 2012). Cette approche à haut-débit est devenue commune grâce aux développements

technologiques du dernier demi-siècle et la réduction de leur coût d'utilisation (Bartram et al., 2011). Le principe du metabarcoding est le suivant : dans un premier temps, la totalité des ADN de l'échantillon est extraite. Le marqueur taxonomique choisi, typiquement une région hypervariable du gène codant la sous-unité 16S de l'ARNr dans le cas d'un échantillon bactérien, est amplifié par PCR. D'autres marqueurs taxonomiques peuvent être utilisés pour améliorer la résolution taxonomique à des niveaux inférieurs à l'espèce. Ces amplicons sont alors séquencés par des méthodes de séquençage à haut-débit comme la méthode Illumina. Les séquences sont ensuite répertoriées dans des fichiers qui font ensuite l'objet d'un traitement bio-informatique. La qualité d'un séquençage diminuant avec la longueur des amplicons, un filtrage peut être effectué pour ne retenir que les séquences avec une qualité élevée (Bokulich et al., 2013). Il existe différentes approches de traitement, mais un exemple typique consiste à agréger les séquences sur la base de leur similarité au sein de groupes appelés OTUs (unités taxonomiques opérationnelles, *anglais : Operational Taxonomic Units*) (Mahé et al., 2015). Une séquence consensus est assignée à chaque OTU identifiée (Schloss & Westcott, 2011). Dès lors, une affiliation taxonomique peut être réalisée par alignement de ces séquences sur des bases de données de référence, présentant préférentiellement une couverture taxonomique importante (Bokulich & Mills, 2012). En aval de ce traitement, il est possible de conduire des analyses permettant de connaître les attributs structurels des microbiotes étudiés et de comparer les structures de communautés différentes, des aspects développés dans une section ultérieure.

Le metabarcoding est une approche puissante qui a permis de caractériser le contenu taxonomique de nombreux écosystèmes, révélant leur immense diversité et permettant d'identifier des micro-organismes inaccessibles par les méthodes culturales. Toutefois elle souffre de nombreux biais dont il est nécessaire de tenir compte pour l'interprétation des résultats (Fouhy et al., 2016). Ces biais s'expriment à toutes les étapes du metabarcoding. Notamment, l'extraction d'ADN peut varier selon les micro-organismes, selon la composition de leur paroi ou leur association à

des matrices particulières. Le choix du marqueur taxonomique peut influencer sur les abondances détectées, étant donné le fait que le nombre de copies de ces gènes peut varier d'une espèce à l'autre (Louca, Doebeli, et al., 2018). De même, il faut judicieusement choisir les amorces au regard de leur affinité pour la matrice génomique, mais aussi la polymérase et les conditions de PCR (température, nombre de cycles, etc.), au regard de l'introduction stochastique d'erreurs lors du processus d'amplification. Outre la production d'un nombre de lectures limité, la méthode de séquençage est également prompte à l'introduction d'artefacts. Certains biais peuvent être corrigés au cours de l'analyse, par l'utilisation de bases de données riches (Bokulich & Mills, 2012), tenant compte du nombre de copies du marqueur par espèce (Louca, Doebeli, et al., 2018), du taux d'erreurs introduites (Callahan et al., 2016). Les lectures de très faibles abondances peuvent parfois être considérées comme des artefacts, c'est pourquoi leur élimination peut reposer sur l'utilisation de seuils d'abondance établis selon différents critères (Bokulich et al., 2013; Drake et al., 2022). De manière importante, le metabarcoding ne permet pas d'accéder à l'abondance absolue des micro-organismes présents dans un échantillon, mais à leurs abondances relatives. Enfin, le metabarcoding se basant sur l'amplification d'ADN total ne permet pas à lui seul de distinguer les micro-organismes vivants, morts ou dans des états physiologiques particuliers (*e.g.* VBNC). Pour cela, il doit être couplé à d'autres approches (Emerson et al., 2017). Par exemple, la métatranscriptomique informera de l'activité effective des micro-organismes (Pochon et al., 2017).

Complémentarité de ces deux approches

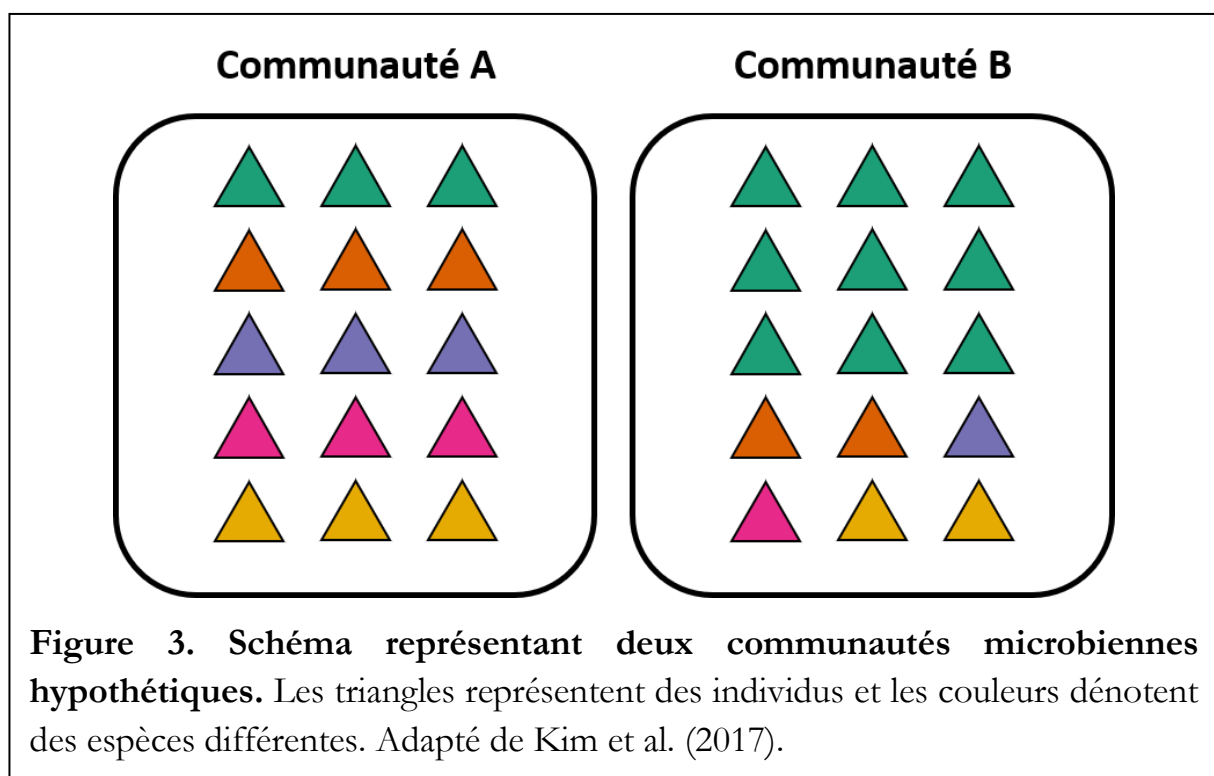
Les approches culturelles sont limitées par leur débit et leur caractère fastidieux, ce qui, en conjonction avec l'essor des approches indépendantes de la culture, a conduit à un certain désintérêt de la communauté scientifique pour leur exploitation. Cependant, les sections précédentes permettent d'identifier les forces et les faiblesses respectives des deux approches. Il en ressort qu'elles sont en fait complémentaires pour accéder à la composition des microbiotes. Par exemple, la caractérisation du contenu taxonomique d'un écosystème par metabarcoding permet de mieux cibler les conditions de culture à utiliser afin d'isoler le maximum de sa diversité. Conscients du besoin de manipuler des micro-organismes pour les applications envisagées ainsi que des limites inhérentes aux approches indépendantes de la culture, certains auteurs plaident pour la réintroduction des approches culturelles dans les routines de recherche sur les microbiotes (Bilen et al., 2018; Ha & Devkota, 2020). Ces auteurs mettent en avant les capacités limitées des approches basées sur le séquençage pour la détection de taxons particulièrement rares mais pourtant essentiels dans certains écosystèmes. Pour reprendre le raisonnement exposé dans un article particulièrement intéressant : dans l'hypothèse que chaque cellule parmi les 10^{14} micro-organismes peuplant l'intestin humain ne porte qu'une seule copie du gène codant la sous-unité 16S de l'ARNr, un séquençage générant 500 000 lectures ne permettrait au mieux que d'accéder à la séquence de cinq micro-organismes sur un milliard¹ (Ha & Devkota, 2020). Cela illustre bien les limites de détection propres à cette méthodologie. En revanche, les méthodes culturelles permettent de détecter des bactéries présentant une abondance inférieure à 10^3 cellules par gramme de matière. Eventuellement couplées à un enrichissement en conditions favorables, la culture de micro-organismes se révèle ainsi particulièrement sensible pour la détection et l'isolement de micro-organismes peu abondants. Il faut également garder à l'esprit que la performance des méthodes basées sur la génomique dépend de la

¹ Cela revient à observer $5 \cdot 10^5$ micro-organismes parmi une population totale de 10^{14} organismes, d'où la fréquence d'observation : $5 \cdot 10^5 / 10^{14} = 5 \cdot 10^{-9}$.

qualité et de la richesse des bases de données, des catalogues eux-mêmes alimentés par le séquençage d'isolats obtenus par des méthodes culturales. Ces exemples illustrent clairement la nécessité d'intégrer ces deux approches pour la caractérisation des microbiotes, une stratégie utilisée par exemple pour l'évaluation des dynamiques de communautés de ferments (Parente et al., 2016), de fromages (Delbès et al., 2007) ou encore pour le compostage de fumier (Liu et al., 2022).

1.3. Caractériser et comparer les structures des microbiotes

Les microbiotes sont des assemblages structurés de micro-organismes dans lesquels les membres portent chacun un potentiel métabolique et contribuent par leurs interactions mutuelles à l'ensemble des fonctions écologiques opérées par le microbiome. La composition des microbiotes est variable en termes de nombre d'espèces ou d'OTU présentes et de leurs abondances relatives. Ces différents aspects de la variabilité rencontrée dans les microbiotes sont capturés par la notion de **biodiversité**, qui peut être traduite par un ensemble de mesures, notamment des mesures quantitatives appelées **indices de diversité**. On distingue deux niveaux de diversité pour l'étude et la comparaison des microbiotes. La *diversité alpha* correspond au niveau de diversité caractérisant la structure d'un microbiote donné. La *diversité bêta* s'applique à la diversité de structures existantes au sein d'un groupe de microbiotes et s'intéresse à leur degré de similarité. Afin d'illustrer ces deux niveaux d'analyse, un ensemble de 2 communautés hypothétiques peut être considéré (Figure 3) (B.-R. Kim et al., 2017).



Diversité alpha : caractériser la structure d'une communauté

La diversité alpha désigne un niveau de diversité *locale*, elle regroupe les attributs structurels propres à une communauté donnée. Pour en comprendre la signification, considérons l'exemple introduit précédemment. Les deux communautés A et B présentent chacune 5 espèces différentes (Figure 3). Le nombre total d'espèces dénombré est un premier indice de diversité alpha, appelé **richesse spécifique (S)**. Dans cet exemple, les deux communautés présentent ainsi la même richesse spécifique. Cette mesure intuitive est toutefois délicate à évaluer dans des systèmes très diversifiés (Marcon, 2015). En effet, collecter un échantillon dans un environnement revient à prélever une partie de la communauté qui y habite réellement. Plus l'échantillon est grand, plus l'inventaire des espèces est complet. Cependant, même un inventaire de taille raisonnable peut ne pas répertorier la totalité des espèces réellement présentes dans l'environnement étudié, et cela d'autant plus que la communauté est diversifiée. Consciente de ce biais, la statisticienne Anne Chao a mis au point un indice permettant d'estimer le nombre d'espèces présentes dans l'environnement réel mais absentes de l'échantillon (Chao, 1984). Celui-ci se base sur les espèces peu représentées dans la distribution et est donné par la formule suivante (Marcon, 2015) :

$$\hat{S}_{Chao1} = s_{obs} + \frac{(n-1)(s_n^1)^2}{2ns_n^2}$$

Où s_{obs} correspond au nombre total d'espèces observées, et s_n^v le nombre d'espèces observées v fois dans l'échantillon de taille n . Cet estimateur amplement utilisé en écologie est associé à un intervalle de confiance.

Dans l'exemple de la Figure 3, les 5 espèces en présence ne présentent pas la même abondance relative dans les deux communautés. En l'occurrence, la communauté A présente une distribution d'espèces parfaitement uniforme tandis que la communauté B est dominée par une espèce. L'uniformité des abondances est une seconde caractéristique importante. L'ensemble de ces deux caractéristiques

constitue la diversité alpha. Différents indices de diversité tiennent compte à la fois de la richesse spécifique et de l'uniformité de la distribution, lesquels ne donnent pas le même poids à ces deux attributs. Bien qu'il n'existe pas de consensus quant au meilleur indice à utiliser pour une analyse de diversité alpha, l'**entropie de Shannon (H')** et l'**indice de Simpson (D)** se sont imposés de manière majoritaire (Marcon, 2015).

L'entropie de Shannon provient de la théorie de l'information de Claude Shannon (Shannon, 1948). Cette mesure a trouvé une analogie en écologie où elle permet de quantifier la biodiversité, où elle reflète « la surprise moyenne fournie par l'observation d'un échantillon » (Marcon, 2015). Sa formule est la suivante :

$$H' = - \sum_{s=1}^S p_s \ln p_s$$

Où S est la richesse spécifique de l'échantillon, et p_s la probabilité qu'un individu tiré au hasard appartienne à une espèce donnée s , en d'autres termes son abondance relative (Marcon, 2015). L'entropie de Shannon constitue une mesure d'incertitude : plus la richesse et l'uniformité d'une communauté augmentent, plus il est difficile de prédire à quelle espèce correspond un individu tiré au hasard. À l'inverse, s'il n'y a qu'une seule espèce dans une communauté, il n'y a aucune incertitude dans la prédiction de l'espèce à laquelle appartient l'individu tiré au hasard et H' vaut exactement zéro. Ainsi, dans le cas de nos communautés illustratives, H' est plus faible dans la communauté B qui est dominée par un type que dans la communauté A qui est parfaitement uniforme.

L'autre indice largement utilisé est l'indice de concentration de Simpson (D) (Simpson, 1949). Celui-ci représente la probabilité que deux individus tirés au hasard appartiennent à la même espèce. Sa formule est la suivante :

$$D = \sum_{s=1}^S p_s^2$$

Cet indice varie de 0 à 1. Il converge vers $1/S$ à mesure que l'uniformité de la communauté augmente. Comme cet indice présente des valeurs faibles dans des communautés plus diversifiées, l'utilisation de l'indice réciproque $1/D$ se présente comme une alternative plus intuitive, celle-ci variant entre 1 (le nombre d'espèce minimal) et S . Cet indice est peu sensible à l'introduction de taxons rares dans le jeu de données, il permet de rendre compte de changements de niveau de diversité portant sur les taxons les plus abondants.

Diversité bêta : comparer les structures de communautés entre elles

Les indices de diversité alpha présentés précédemment permettent de caractériser la structure de microbiotes pris individuellement. Un deuxième niveau de diversité appelé *diversité bêta* permet de caractériser des variations de composition entre communautés (Whittaker, 1960). Il existe une variété de mesures de diversité bêta, et comme dans le cas de la diversité alpha, il n'y a pas de consensus quant aux mesures les plus appropriées pour répondre à une question écologique particulière (Anderson et al., 2011). Différentes mesures donnent du poids à différentes caractéristiques des communautés comparées (Lozupone et al., 2007). L'usage de mesures qualitatives met bien en évidence les facteurs environnementaux conduisant à la présence ou l'absence de taxons, tandis que les mesures quantitatives mettent bien en évidence les facteurs conduisant à des changements d'abondances relatives des taxons. Ces dernières sont donc particulièrement adaptées au suivi de communautés dans le temps ou le long d'un gradient de conditions environnementales.

Parmi les indices les plus utilisés figurent la distance de Jaccard, l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis, les distances UniFrac et wUniFrac. La distance de Jaccard dérive de l'indice de Jaccard, lequel est une mesure qualitative de la similarité entre des communautés réduites à des ensembles binaires, dans lesquelles les espèces sont présentes (1) ou absentes (0) (Lozupone et al., 2007). Il est défini comme le rapport de la taille de l'intersection à la taille de l'union de deux communautés (Jaccard, 1901). En d'autres termes, il s'agit d'une mesure de la proportion d'espèces partagées entre A et B (Marcon, 2015):

$$J(A, B) = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|}$$

Cette mesure varie ainsi entre 0, où elle indique une totale dissimilarité et 1, où elle indique une totale similarité en termes de composition spécifique entre les

communautés comparées. La distance de Jaccard d_J , donnée par $d_J = 1 - J$, traduit la dissimilarité entre communautés.

Un autre indice largement utilisé est la dissimilarité de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957). Cette mesure quantitative tient compte des abondances spécifiques au sein des communautés comparées. Il s'agit ainsi d'une mesure de la proportion de communauté partagée. Ainsi, l'indice de Bray-Curtis pour comparer deux communautés A et B est donné par :

$$BC_{AB} = 1 - \frac{2C_{AB}}{S_A + S_B}$$

Où S_A et S_B sont les nombres totaux d'individus observés dans A et dans B, et C_{AB} la somme des plus petites abondances pour les espèces communes à A et B. L'exemple ci-dessous présente le calcul de l'indice de Bray-Curtis pour deux communautés hypothétiques :

	Abondances		Plus petites abondances pour les espèces communes
	Communauté A	Communauté B	
espèce 1	10	7	7
espèce 2	4	4	4
espèce 3	3	6	3
espèce 4	2	0	0
	$S_A = 19$	$S_B = 17$	$C_{AB} = 14$

$$BC_{AB} = 1 - \frac{2 \times 14}{19 + 17} = 0,22$$

D'autres auteurs ont proposé d'inclure les relations phylogénétiques à l'analyse de diversité bêta, une approche appropriée pour l'analyse de jeux de données produits par séquençage de marqueurs taxonomiques et reflétant l'adaptation de communautés à différents environnements (Lozupone & Knight, 2005). La distance UniFrac ne tient compte que de la présence-absence d'espèces entre des communautés, et compte la fraction de la longueur de branche de l'arbre

phylogénétique des séquences uniques à l'une ou l'autre communauté (Lozupone & Knight, 2005). Une extension de cette mesure, dite wUniFrac (UniFrac pondéré, *anglais : weighted UniFrac*) ajoute l'information de l'abondance relative au calcul de la distance (Lozupone et al., 2007).

D'une manière générale, ces indices de diversité bêta permettent de comparer des communautés en se focalisant sur des attributs différents et peuvent ainsi être utilisés de manière complémentaire. Par exemple, si deux communautés présentent une distance de Jaccard inférieure à leur dissimilarité de Bray-Curtis, on peut en déduire qu'elles ne partagent pas les taxons abondants. Autre exemple, si la distance de Jaccard est supérieure à la distance Unifrac, cela signifie que les taxons composant ces communautés sont distincts, mais phylogénétiquement proches.

Lors de l'analyse de plusieurs de communautés, les calculs de diversité bêta permettent de produire des matrices de distance (ou de dissimilarité). Ces matrices expriment les distances entre l'ensemble des paires de communautés considérées (Kindt & Coe, 2005). A partir de ces matrices, il est possible de réaliser un partitionnement des données, ou encore des ordinations qui sont des transformations géométriques aboutissant à des représentations graphiques généralement en deux dimensions (Kindt & Coe, 2005). Sur un graphique d'ordination, les échantillons sont représentés par des points arrangés de telle sorte que la distance qui les sépare reflète la distance écologique entre les échantillons. Ainsi, deux points proches sur le graphique signifient que les deux communautés qu'ils représentent sont similaires. Les approches d'ordination couramment utilisées sont l'analyse en coordonnées principales (*anglais : principal coordinates analysis, PCoA*) et le positionnement multidimensionnel non métrique (*anglais : non-metric multidimensional scaling, NMDS*), reposant sur des méthodes de projection différentes.

Enfin, les études sur les microbiotes reposent sur l'analyse d'un échantillon jugé représentatif de l'écosystème étudié. Idéalement, le nombre de lectures fourni par le séquençage est suffisant pour permettre une bonne estimation de la diversité

alpha, et très similaire entre les échantillons analysés afin de permettre leur bonne comparaison par analyse de diversité bêta. Or en pratique, celui-ci peut varier d'une communauté à l'autre. En conséquence, des méthodes sont nécessaires afin de limiter les biais introduits par les différences de tailles d'échantillons. Une de ces méthodes est la raréfaction itérative (Cameron et al., 2021). Le principe est de tirer au hasard et avec remise un certain nombre de séquences, typiquement correspondant au plus petit nombre de lectures observé dans le jeu de données, et de calculer les indices de diversité alpha ou bêta. La raréfaction est réitérée N fois, et ce processus s'achève par le calcul de valeurs moyennes pour chaque communauté ou paires de communautés.

2. Interactions biotiques dans les communautés microbiennes

Les flux de matière et d'énergie à travers les écosystèmes s'inscrivent dans la continuité des voies métaboliques à travers les organismes (Capra & Luisi, 2014). Ainsi au sein des écosystèmes microbiens, les interactions observées à l'échelle des micro-organismes sont le résultat net d'une réalité métabolique sous-jacente. A travers leurs interactions, les micro-organismes concourent à la génération de leur propre niche écologique. Selon Hutchinson, les espèces ne sont pas toujours capables d'occuper l'intégralité de leur niche potentielle, ou niche fondamentale, étant donné la présence d'autre espèces dans leur écosystème. Ainsi, il définit la niche réalisée comme le résultat des interactions sur la niche fondamentale des organismes (Hutchinson, 1957).

2.1. Typologie des interactions

La plupart des processus de fermentation alimentaires dépendent de mélanges de micro-organismes qui agissent de concert pour obtenir un produit présentant les caractéristiques désirées. Dans les aliments fermentés, les micro-organismes interagissent avec leur substrat mais aussi entre eux, et exercent un effet sur le résultat des processus de fermentation alimentaire et en particulier sur les dynamiques des populations (Smid & Lacroix, 2013). Au sein de réseaux binaires de micro-organismes, cinq types d'interactions microbiennes se distinguent selon leur effet sur la valeur adaptative² des micro-organismes impliqués, à savoir positif, négatif ou nul :

² Capacité relative des génotypes à se reproduire.

(1) le mutualisme (interaction +/+), (2) le commensalisme (interaction +/-), (3) l'amensalisme (interaction -/0), (4) le parasitisme (interaction +/-) et (5) la compétition (interaction -/-) (Smid & Lacroix, 2013).

Un exemple bien caractérisé d'interaction doublement positive (1), mutualiste, et de son impact sur la fonctionnalité du produit fini est la proto-coopération entre la bactérie non-protéolytique *Streptococcus thermophilus* et la bactérie protéolytique *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Bien que ces espèces soient individuellement capables de fermenter le lait, leur croissance est stimulée en co-culture, de même que leur production d'acide lactique, qui concourent à l'obtention des propriétés texturales du yaourt (Sieuwert et al., 2008).

Le commensalisme (2) constitue une interaction à effet positif sur un des micro-organismes impliqués et neutre pour l'autre. En co-culture, des variants de *Lactococcus lactis* exprimant une protéase de surface (prt+) stimulent la croissance de variants n'exprimant pas cette enzyme (prt-) (Hugenholtz et al., 1987). En fait, la protéolyse exercée par les variants prt+ conduit à l'accumulation de peptides et acides aminés en tant que biens publics disponibles pour les variants prt-. Dans une co-culture prolongée, cette disponibilité de biens publics conduit à la dominance des variants prt- car ces derniers présentent un taux de croissance plus élevé que les variants prt+. Cela illustre un phénomène de transition du commensalisme au parasitisme (4).

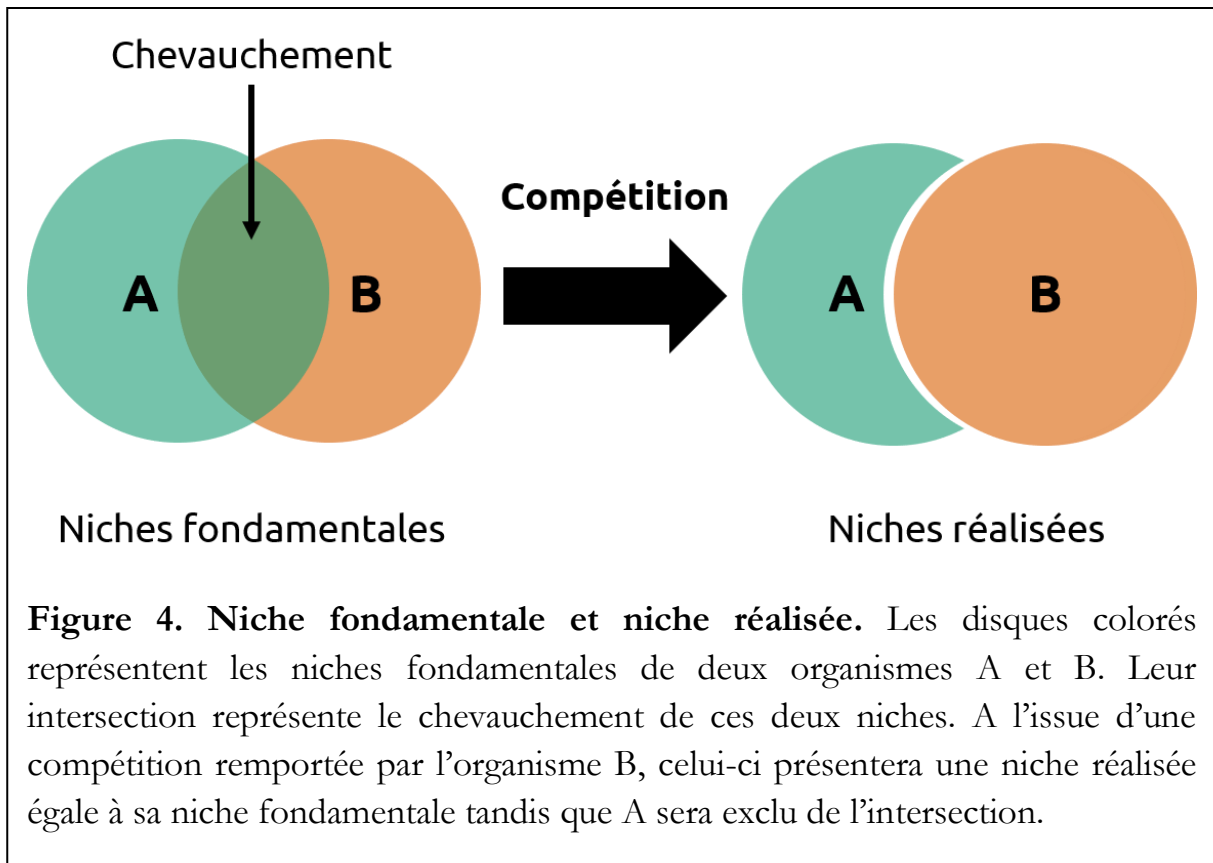
La production de composés inhibiteurs telle que les bactériocines conduit généralement à la dominance en mélange du producteur par rapport à des micro-organismes sensibles, constituant une relation amensale (3) (Smid & Lacroix, 2013), bien que d'autres auteurs la considèrent comme une forme de compétition (5) (Ghoul & Mitri, 2016; Hibbing et al., 2010).

En écologie, la compétition (5) est un phénomène de concurrence entre deux organismes vivants pour l'accès à des ressources nutritionnelles ou un espace de croissance. Au sens strict, la compétition se manifeste lorsqu'un certain nombre

d'organismes de la même espèce ou d'espèces différentes utilisent des ressources limitées, ou lorsque les organismes se nuisent mutuellement dans la quête d'une ressource indépendamment de sa rareté (Birch, 1957). Dans le contexte microbien, certains auteurs qualifient une souche de compétitive si son phénotype entraîne la diminution de la valeur adaptative d'une souche concurrente (Ghoul & Mitri, 2016). Les souches compétitrices peuvent varier d'une simple mutation ou appartenir à des espèces différentes (Bauer et al., 2018). La compétition se distingue de la prédation ou du parasitisme en cela que les interacteurs présentent également un chevauchement de niche écologique en termes de ressources (Ghoul & Mitri, 2016).

Implications des interactions pour la niche écologique

Comme mentionné précédemment, les interactions entre organismes conduisent à la réalisation de leur niche écologique. L'effet exercé par ces interactions peut être illustré de manière assez intuitive en considérant des interactions négatives comme la compétition, dans laquelle deux organismes présentent un chevauchement généralement partiel de leur niche fondamentale (Figure 4). La compétition entre deux organismes conduit à l'exclusion d'un organisme de l'intersection des niches fondamentales. Ainsi l'organisme remportant la compétition présente une niche réalisée complète tandis que le perdant présente une niche réalisée réduite (Glasser & Price, 1988). Certains auteurs suggèrent que les interactions positives, facilitatrices pour les espèces impliquées, permettraient d'étendre leurs niches réalisées de telle sorte qu'elles excèdent les limites de leurs niches fondamentales (Bruno et al., 2003). Cette théorie est toutefois contestée, d'autres auteurs énonçant que la facilitation peut contribuer à l'atténuation des interactions négatives, mais ne peut pas entraîner l'expansion de la niche réalisée au-delà de la niche fondamentale à moins que cette dernière évolue elle-même (Rodriguez-Cabal et al., 2012).



2.2. Les mécanismes de la compétition microbienne

L'étude des interactions et en particulier de la compétition représente un intérêt majeur pour des applications industrielles. Par exemple, dans la production de ferments impliquant des cultures mixtes et notamment multi-spécifiques, les industriels sont fréquemment confrontés à ce phénomène qui peut nuire au maintien de la biodiversité au sein du réacteur de culture (Corrieu & Luquet, 2008; Smid & Lacroix, 2013) et réduire la performance du procédé (Ghosh et al., 2016). La compréhension des facteurs favorisant ou limitant cette interaction ainsi que de ses mécanismes permet en conséquence d'envisager d'améliorer ces procédés de production. Il est généralement admis que la compétition peut être classée en deux grandes catégories : la compétition par exploitation et la compétition par interférence (Bauer et al., 2018; Birch, 1957; Ghoul & Mitri, 2016; Hibbing et al., 2010). Il faut

toutefois noter que ces deux mécanismes sont combinés dans la compétition effective entre deux micro-organismes ou au sein des microbiotes.

Compétition par exploitation

La compétition par exploitation résulte d'interactions indirectes entre les organismes exploitant une même ressource dans le milieu. Le phénotype présentant la meilleure capacité à exploiter cette ressource est favorisé. La compétition par exploitation peut faire appel à deux stratégies. En premier lieu, la simple absorption de nutriments au détriment d'autrui selon un mécanisme aspécifique (Ghoul & Mitri, 2016), correspondant à une stratégie passive (Hibbing et al., 2010). L'épuisement rapide des ressources par une espèce particulière avantagée du point de vue cinétique peut conduire à l'arrêt de la croissance de l'ensemble des espèces dans la population. Ce phénomène est appelé « effet Jameson » (Irlinger & Mounier, 2009; Jameson, 1962). Dans un exemple faisant appel à une co-culture intraspécifique chez *Lactococcus lactis*, les phénotypes de croissance lente et biomasse élevée sont progressivement conduits à l'extinction au profit des phénotypes de croissance rapide et biomasse faible (Bachmann et al., 2013). Cette extinction de micro-organismes à taux de croissance relativement faible a été également constatée dans des enrichissements de *Listeria monocytogenes* en bouillon à partir d'échantillons alimentaires au profit d'autres *Listeria* spp., avec des implications préjudiciables pour leur détection et leur isolement (Besse et al., 2010).

En deuxième lieu, une stratégie active basée sur la sécrétion de molécules permettant de récolter des nutriments dans l'environnement. Par exemple, la production d'enzymes digérant des nutriments complexes ou encore de sidérophores chélatant le fer (III) (e.g. entérochélines produites par *Escherichia coli*) (Ghoul & Mitri, 2016; Scholz & Greenberg, 2015). Les micro-organismes peuvent également produire des protéines leur permettant d'adhérer à une matrice, par exemple, les pili de *Lactobacillus rhamnosus* permettent à ce micro-organisme d'adhérer à la β -

lactoglobuline (Gomand et al., 2019; Guerin et al., 2016). Cela leur permet d'occuper cet habitat et de sécuriser l'accès aux ressources sises, empêchant les compétiteurs d'y accéder (Ghoul & Mitri, 2016).

Compétition par interférence

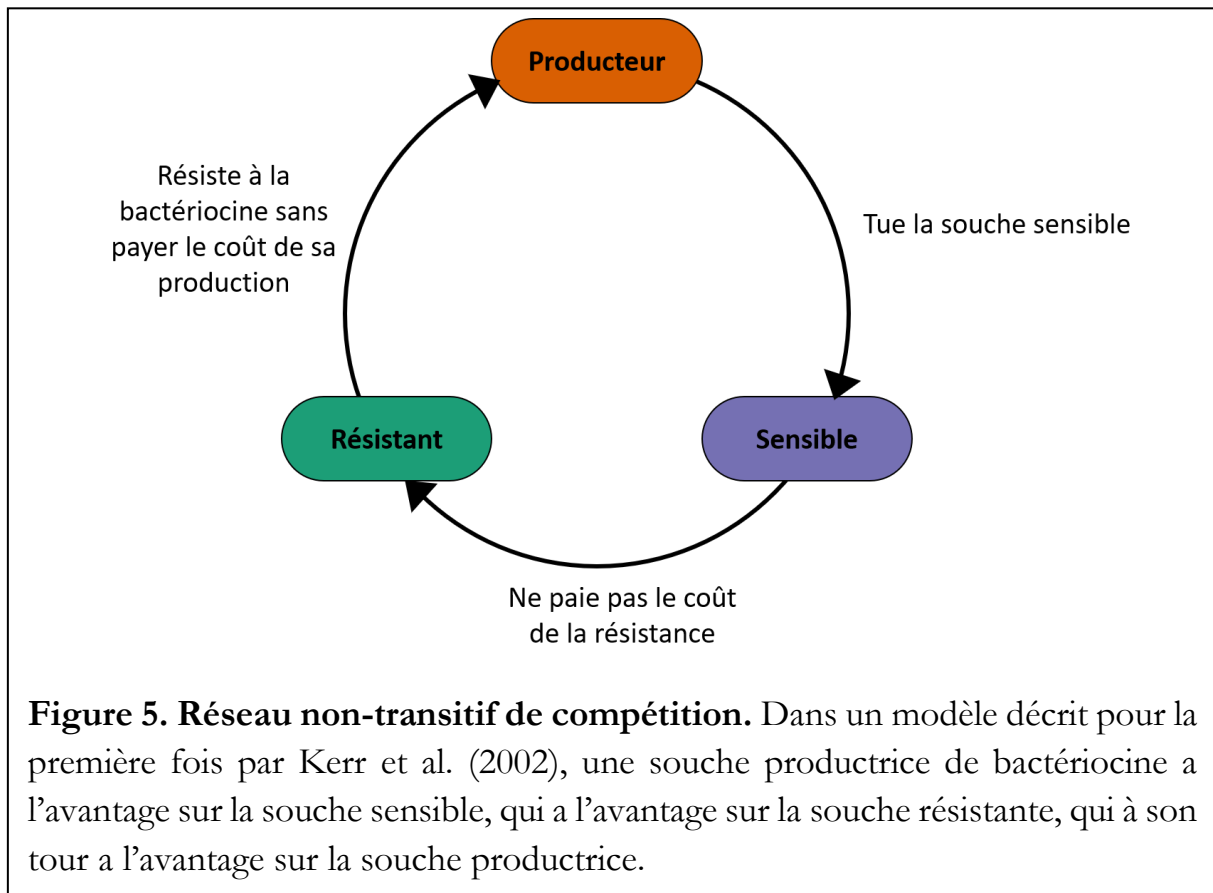
Outre les stratégies mentionnées précédemment, il existe des mécanismes permettant de renverser le résultat prédit par la seule compétition par exploitation. La compétition par interférence correspond à un antagonisme direct entre micro-organismes qui repose sur la production d'un composé antimicrobien destiné à détruire un adversaire ou à perturber voire empêcher sa croissance (Hibbing et al., 2010). Il peut s'agir d'un métabolite primaire, ou encore un métabolite spécialisé. Les métabolites primaires incluent par exemple les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène ou le diacétyle (Bourdichon et al., 2021) pouvant générer des conditions adverses pour les compétiteurs. Les métabolites secondaires incluent les antibiotiques et autres toxines. Un exemple typique d'interférence par un métabolite spécialisé peut être la production et la sécrétion d'un peptide antimicrobien (e.g. bactériocine) par une souche productrice (Ghoul & Mitri, 2016). Cette stratégie est amplement représentée chez les bactéries et les archées (Riley & Gordon, 1999). Leurs mécanismes d'action sont divers, et peuvent différer selon la nature de la paroi bactérienne de leurs cibles. Elles peuvent notamment provoquer la formation de pores dans les bactéries à Gram positif, par l'inhibition de la synthèse des peptidoglycanes ou par le blocage de la configuration de transporteurs transmembranaires en position ouverte (Cotter et al., 2013). Chez les bactéries à Gram négatif, les bactériocines peuvent s'introduire dans les cellules en empruntant divers transporteurs et provoquer des dommages par l'inhibition de protéines importantes, telles que l'ADN gyrase, l'ARN polymérase ou bien l'Asp-ARNt synthétase (Cotter et al., 2013).

Les rôles écologiques de ces substances antimicrobiennes sont divers et semblent dépendre du contexte. En concentrations sub-inhibitrices, ces substances peuvent agir comme molécules signal et exercer un rôle de communication intercellulaire en régulant l'expression génétique des membres de la communauté, pour favoriser par exemple la formation de biofilms (Hibbing et al., 2010).

Le cas des réseaux non transitifs de compétition

Dans un système binaire, c'est-à-dire impliquant deux micro-organismes, la compétition conduit à l'exclusion partielle ou totale d'un des interacteurs. Ce résultat n'est pas nécessairement constaté lorsque plusieurs interacteurs sont impliqués, et particulièrement lorsque ces interacteurs sont spatialement dispersés dans un environnement structuré, créant des niches individuelles. Cela peut être illustré par le cas des réseaux non transitifs impliquant trois micro-organismes (Figure 5). Dans un article de 2002, des auteurs co-cultivent sur gélose trois souches d'*Escherichia coli* : la première produit une bactériocine (colicine), la deuxième y est sensible, et la troisième y est résistante sans produire elle-même de composé antimicrobien (Kerr et al., 2002). Ils constatent que les trois populations sont capables de se maintenir en équilibre selon un mécanisme analogue au jeu « pierre-papier-ciseaux ». La souche sensible est désavantagée par rapport à la souche productrice, mais avantagée par rapport à la souche résistante car elle ne paie pas le coût métabolique de cette résistance. Dans le même temps, la souche résistante est avantagée par rapport à la souche productrice de bactériocine, car elle ne paie pas le coût métabolique de la production. Cette architecture compétitive concourt au maintien de la diversité dans des environnements structurés tels que des biofilms (Narisawa et al., 2008) mais n'opère pas dans des environnements homogènes tels qu'un réacteur de culture. En

effet, lorsque le milieu de culture est bien mélangé, la souche résistante exclut rapidement la souche sensible ainsi que la souche productrice (Kerr et al., 2002).



3. Ingénierie de communautés microbiennes

Les fonctions importantes portées par les communautés microbiennes suscitent un intérêt dans de nombreux domaines, qu'il s'agisse du développement de thérapies ou de biotechnologies basées sur les microbiomes. Plus précisément, l'ingénierie de microbiome constitue un outil prometteur pour améliorer et innover dans diverses applications cliniques et industrielles. En bref, l'ingénierie de microbiome repose essentiellement sur deux stratégies complémentaires : la construction de communautés synthétiques (ingénierie ascendante) ou la manipulation des communautés microbiennes naturelles (ingénierie descendante) pour produire une fonction spécifique (Eng & Borenstein, 2019).

3.1. Ingénierie ascendante : assemblage rationnel de communautés

Principe

L'ingénierie ascendante correspond à l'assemblage *de novo* et rationnel de communautés synthétiques à partir de micro-organismes sélectionnés et isolés. Les avancées récentes apportées par les études multi-omiques ont créé l'opportunité de prédire comment le contrôle des réseaux métaboliques et des interactions microbiennes permet de générer des communautés présentant les fonctions désirées (Lawson et al., 2019). Les caractéristiques générales de cette stratégie comprennent l'étude des génomes des membres de la communauté, la reconstruction de leur réseau métabolique, l'utilisation d'outils de modélisation ou d'analyse de réseau de manière à guider la conception du microbiome synthétique (Lawson et al., 2019). L'approche ascendante a déjà fait preuve de sa puissance comme outil d'ingénierie de

communauté. On peut distinguer les approches de réduction et les approches combinatoires (Eng & Borenstein, 2019). L'opération de réduction consiste à déconstruire une communauté naturelle par isolement de ses membres, de retenir les espèces désirées pour les réassembler sous forme d'un consortium synthétique portant les fonctions clés de la communauté d'origine. Elle nécessite des méthodes d'isolement et de criblage spécifiques et permet d'obtenir des microbiotes synthétiques dont la composition est connue et contrôlée. Cependant, cette approche peut être vouée à l'échec dans le cas où le nombre d'espèces impliqué est élevé, en particulier sans connaissance de leur compatibilité (Eng & Borenstein, 2019). L'approche combinatoire quant à elle consiste à générer l'intégralité des combinaisons d'un ensemble d'espèces sélectionnées et de sélectionner les microbiotes portant les fonctions désirées. En pratique, les deux approches sont complémentaires mais l'approche combinatoire présente l'avantage de combiner éventuellement des espèces issues de différentes sources. Son inconvénient réside dans la croissance exponentielle du nombre de combinaisons à tester, à mesure que l'on ajoute des espèces dans le mélange.

Exemples d'ingénierie ascendante de communautés

Par une approche combinatoire, Wei et collègues ont assemblé toutes les communautés possibles à partir d'une collection de 5 espèces bactériennes rhizosphériques à densité initiale égale (Wei et al., 2015). Il en résultait 31 combinaisons présentant des compositions et niveaux de diversité différents (de 1 à 5 membres). Leur objectif était d'élucider le rôle des communautés associées aux racines de plantes dans la résistance à l'invasion par un pathogène. Les auteurs ont ainsi caractérisé l'ensemble des profils de consommation d'une sélection de ressources carbonées des membres individuels des communautés et du pathogène. Ils ont constaté que les micro-organismes et consortia présentant un recouvrement au moins partiel de leurs profils ressource-consommateur avec celui du pathogène

étaient les plus efficaces pour empêcher la croissance de ce dernier. Cependant, cette efficacité était réduite pour les consortia au sein desquels la compétition métabolique était plus marquée. Cet exemple met en évidence le pouvoir prédictif offert par la connaissance du réseau d'interactions métaboliques pour obtenir des microbiotes exprimant une fonction désirée. Ainsi, l'approche combinatoire est d'un grand intérêt pour la construction de consortia fonctionnels mais représente un volume de travail important. L'essor de technologies telles que les systèmes microfluidiques couplés à des caractérisations phénotypiques permet d'augmenter considérablement le débit de manipulation. Les travaux de Kehe et collègues illustrent bien l'apport de ces technologies à haut-débit, avec la construction et la caractérisation automatiques de 10^5 communautés synthétiques comprenant jusqu'à 7 ou 19 membres en une seule journée (Kehe et al., 2019). Le principe est d'encapsuler les membres dans des microgouttelettes et de charger ces dernières sur des puces microfluidiques. Ces puces comprennent à leur surface des cupules dont la géométrie permet d'accueillir un nombre déterminé de gouttelettes. L'exposition des puces à un champ électrique en courant alternatif provoque la fusion des gouttelettes et en conséquence les assemblages de consortia synthétiques. L'utilisation de substrats de culture définis permet de déterminer les profils de consommation des ressources des micro-organismes et consortia étudiés. En relation avec ces profils, cette technologie a permis de découvrir et de valider des compositions microbiennes stimulant la croissance d'une bactérie modèle symbionte de plantes, *Herbaspirillum frisingense*.

Stabilité des assemblages et compatibilité des membres

Prédire la stabilité fonctionnelle des communautés assemblées est crucial pour envisager de les utiliser. Pour ce faire, l'approche combinatoire a été appliquée à la prédiction de la stabilité des interactions écologiques au sein de communautés synthétiques (Friedman et al., 2017). Ces auteurs proposent une règle simple permettant de déterminer le devenir d'assemblages bactériens allant jusqu'à 8 membres à partir du résultat de la compétition au sein de paires. L'hypothèse qu'ils se sont proposé d'évaluer stipule que l'ensemble des espèces capables de se maintenir en paire survivent au sein d'assemblages multi-spécifiques. En revanche, les espèces exclues par une autre espèce ne sont pas capables de survivre dans les communautés. Les auteurs ont constaté que dans près de 90% des cas, la coexistence de triplets spécifiques était effectivement prédite par cette règle simple. Cependant, la prédiction de la coexistence des membres dans les assemblages comprenant un plus grand nombre d'espèces (en particulier 7 ou 8) nécessite l'ajout des résultats de compétition de triplets spécifiques. D'autres auteurs ont effectué des co-cultures à haut-débit de paires de micro-organismes constituées à partir de 73 souches appartenant à l'espèce *Carnobacterium maltaromaticum*, dans le but d'étudier la compétition intra-spécifique chez cette bactérie lactique (Ramia et al., 2020). La majorité (56%) des souches émettrices présentait un antagonisme vis-à-vis d'au moins une souche réceptrice, indiquant la forte prévalence de la compétition au sein de cette espèce. Or, la conception d'assemblages stables tels que ceux recherchés pour les ferments lactiques nécessite de sélectionner des souches pour lesquelles le risque d'exclusion mutuelle est faible. Ainsi les auteurs se sont également intéressés à la réciprocité des interactions compétitives. La majorité (environ 79%) des interactions identifiées étaient réciproquement neutres, mettant en évidence des souches qui présentent un haut niveau de compatibilité, et pourraient ainsi être utilisées pour la construction de ferments par ingénierie ascendante.

Bien que l'ingénierie ascendante constitue en principe une stratégie prometteuse, sa mise en œuvre souffre encore de limitations majeures. En particulier,

il est à ce jour encore difficile de reconstruire avec précision et exactitude les réseaux métaboliques impliqués dans les écosystèmes. Ces difficultés trouvent leur source dans l'incomplétude des inférences métaboliques qu'il est possible d'obtenir à partir de l'analyse génomique, ainsi que la méconnaissance des fonctions de nombreux gènes, protéines et métabolites (Lawson et al., 2019).

3.2. Ingénierie descendante : manipulation et modelage de communautés naturelles

Principe et pertinence de la stratégie

De nombreuses fonctions peuvent être exécutées par des micro-organismes taxonomiquement distincts au sein d'un écosystème. Cette propriété appelée redondance fonctionnelle a été observée dans diverses études (H. Chen et al., 2022; Louca, Polz, et al., 2018; Somerville et al., 2022). De surcroît, certaines fonctions métaboliques sont fortement associées à certains facteurs environnementaux (Louca, Polz, et al., 2018), justifiant d'agir sur ces derniers afin de façonner structure et fonction des microbiotes.

Ainsi, l'ingénierie de communautés peut reposer sur des méthodes de modelage de communautés naturelles, que l'on peut regrouper sous le vocable d'ingénierie descendante. Le principe de cette stratégie est essentiellement d'exercer une pression de nature abiotique sur les communautés de manière à en modifier la structure, et *in fine* la fonction (Lawson et al., 2019). L'application des pressions abiotiques sur le microbiote permettant de promouvoir la croissance d'espèces exerçant la fonctionnalité désirée est autrement appelée enrichissement (Eng & Borenstein, 2019). Néanmoins, cela peut rendre la communauté inappropriée pour certaines applications (Eng & Borenstein, 2019). En particulier, la présence d'organismes pathogènes dans une communauté ainsi façonnée disqualifie de fait cette dernière pour des applications thérapeutiques ou alimentaires.

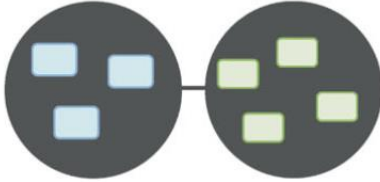
Les pressions abiotiques appliquées aux communautés peuvent être la composition et la structure du substrat, son taux de charge ou de renouvellement dans un réacteur de culture, la température, etc. L'ingénierie descendante requiert de conceptualiser le microbiome comme un système dont les intrants, extrants et conditions physico-chimiques clés sont identifiés et contrôlés à l'aide d'équipements spécialisés (sondes de pH ou redox, de température, etc.). L'ensemble des données récoltées permet d'alimenter des modélisations mathématiques donnant accès aux informations relatives à la productivité de l'écosystème ou à sa composition, dans une démarche de pilotage et d'optimisation des bioprocédés (Lawson et al., 2019).

Systèmes de co-culture pour moduler les interactions

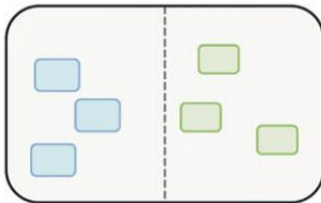
Une manière d'influer sur la structure et la fonction des communautés est de modifier la structure spatiale du milieu de culture, de manière à moduler les interactions microbiennes ou encore générer des interactions synthétiques dans l'écosystème. En effet, comme illustré précédemment dans le cas des réseaux non-transitifs ainsi que dans la section consacrée à la stabilité des assemblages, le contrôle des interactions microbiennes peut être crucial pour obtenir un écosystème stable. Pour ce faire, une multitude de systèmes de co-culture sont disponibles. Un système de co-culture est un dispositif de culture cellulaire dans lequel deux ou plusieurs populations différentes de cellules sont cultivées avec un certain degré de proximité ou contact entre elles (Goers et al., 2014). Ainsi, selon le dispositif de co-culture utilisé, les populations peuvent être de parfaitement mélangées à séparées. Les technologies disponibles pour générer ces conditions sont diverses et peuvent être classées selon le type de support utilisé (Figure 6).

Systèmes microfluidiques

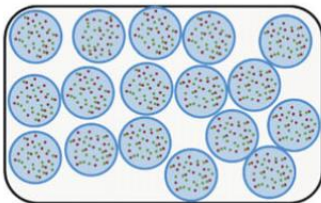
Connexion de compartiments par un canal fluide



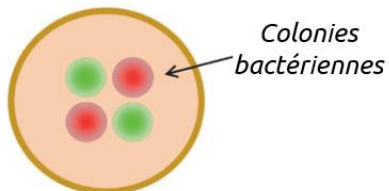
Compartiments séparés par des membranes



Cellules en gouttelettes



Boîtes de Petri

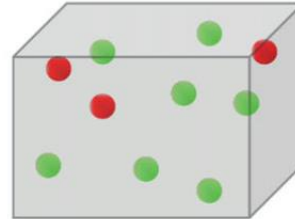


Systèmes à support solide

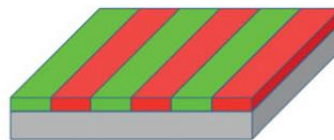
Cellules en gouttelettes avec échange de substances gazeuses



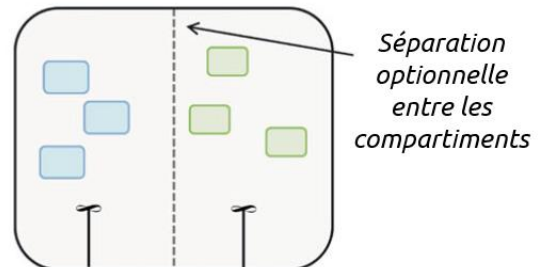
Cellules encapsulées dans un gel



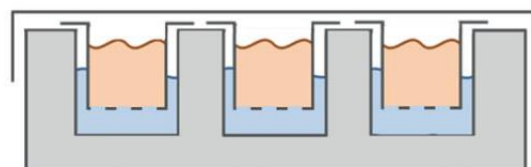
Couches de cellules sur des lames en verre



Bioréacteurs



Puits communicants



- type cellulaire A
- type cellulaire B
- plaque de culture
- membrane

Figure 6. Sélection de systèmes de co-culture classés par types de technologies disponibles. Adapté de Goers et al. (2014).

La co-culture sur gélose est un exemple classique de configuration dans laquelle le degré de séparation influe sur la viabilité d'un système bactérien à plusieurs membres. Le phénomène des réseaux non-transitifs évoqué précédemment illustre l'apport de cette technique (Kerr et al., 2002). Récemment, des auteurs ont montré la possibilité d'imprimer sur gélose, et ce à résolution micrométrique, des arrangements cellulaires d'*Escherichia coli* productrices de toxine et sensibles (Krishna Kumar et al., 2021). Ce niveau élevé de contrôle de la configuration spatiale des arrangements microbiens permet de faire varier avec précision le degré de ségrégation local. Leurs résultats montrent que la structure spatiale a un impact sur les résultats de la compétition par exploitation et par interférence et conduit ainsi à différents niveaux de coexistence des micro-organismes. D'autres auteurs ont fait appel à la microfluidique pour co-cultiver trois espèces sauvages de bactéries telluriques et mutualistes obligatoires (H. J. Kim et al., 2008). Ces micro-organismes exercent chacun une fonction unique requise pour la survie du consortium. Leur système de co-culture consiste en une puce contenant trois puits dont le fond est séparé par une membrane d'un compartiment commun qui permet le transfert de métabolites entre les puits. Chaque puits est alors inoculé avec une espèce individuelle. Alors que les micro-organismes ne peuvent coexister tous les trois dans un milieu de culture homogène, c'est-à-dire en l'absence de structuration spatiale définie, ils exhibent tous une croissance dans le système microfluidique. De plus, la variation des distances séparant les puits révèle que cette coexistence des trois espèces bactériennes n'est possible qu'à des distances intermédiaires (600 à 1200 μm). Les exemples précédents montrent l'intérêt des technologies microfluidiques pour contrôler finement la structure spatiale des consortia et agir en conséquence sur leur structure au sens écologique.

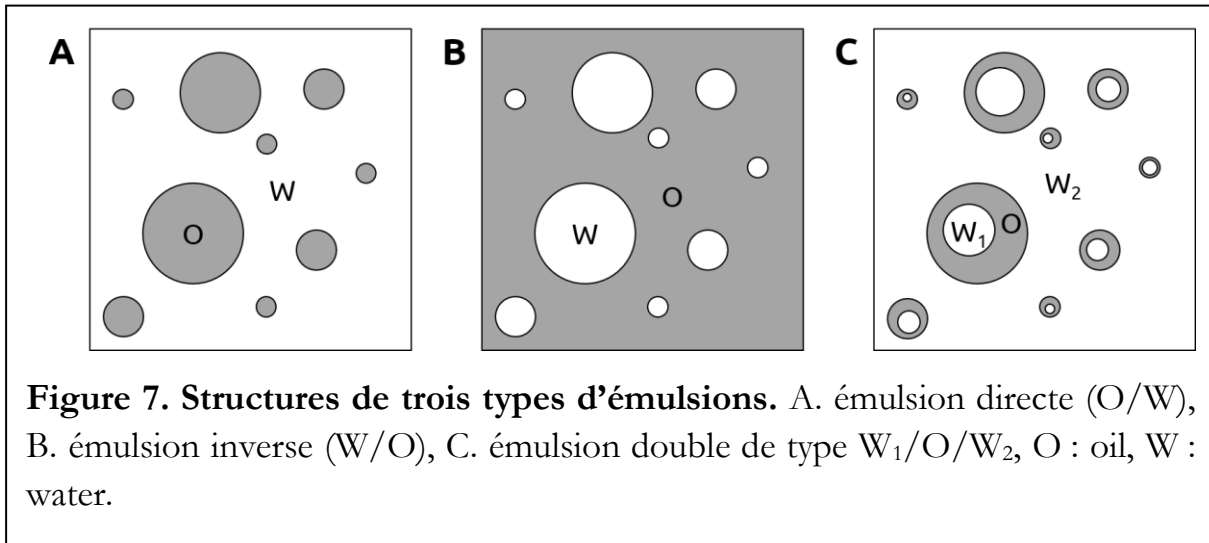
Les systèmes de co-culture précédents sont bien adaptés à l'ingénierie de microbiotes synthétiques à de petites échelles ainsi qu'à l'étude des interactions et des phénomènes liés à la structure spatiale dans les communautés microbiennes. Toutefois, ils ne peuvent être aisément transposés à l'échelle de productions

industrielles. Pour ce faire, des systèmes alternatifs compatibles avec les bioréacteurs classiquement utilisés dans l'industrie ont été proposés. Par exemple, des auteurs ont mis au point un système permettant d'immobiliser des cellules au sein de bioréacteurs pour des fermentations lactiques continues dans la production de fromages frais (Sodini et al., 1997a). Leur dispositif consistait à inoculer dans un bioréacteur contenant du lait UHT 4 souches de bactéries lactiques, séparément ou encapsulées ensemble au sein de billes de κ -carraghénane et gel de caroube. Les auteurs ont constaté que l'immobilisation cellulaire permettait d'améliorer les rendements en acide lactique et en cellules par rapport à une culture mixte bien mélangée (Sodini et al., 1997b). De plus, la stabilité des performances rapportées était maintenue pendant 8 semaines, avant que la rupture des billes ne libère les micro-organismes et provoque une contamination croisée au sein du système (Sodini et al., 1997b). D'autres conceptions de système de co-culture permettent un niveau de ségrégation spatiale plus important entre les micro-organismes, par exemple les systèmes émulsionnés.

Les émulsions : des systèmes prometteurs pour la co-culture de micro-organismes

Une émulsion correspond à une interdispersion de deux liquides immiscibles où l'un des liquides est dispersé sous forme de gouttelettes dans l'autre. Les émulsions peuvent être classées selon la distribution des phases dispersée, désignant la substance composant les gouttelettes, et continue, désignant la substance constituant le liquide environnant. Par convention, une dispersion d'huile dans une phase aqueuse est appelée **émulsion directe** (O/W, *anglais : oil-in-water*, Figure 7A). En revanche, une dispersion de gouttelettes d'eau dans une phase lipidique est appelée **émulsion inverse** (W/O, *anglais : water-in-oil*, Figure 7B). Il est également possible d'obtenir des systèmes d'émulsions multiples. Par exemple, une **émulsion double** du type « eau dans huile dans eau » ($W_1/O/W_2$, *anglais : water-in-oil-in-water*) consiste

en gouttelettes d'eau dispersées dans des gouttelettes lipidiques plus volumineuses, elles-mêmes dispersées dans une phase continue aqueuse (Figure 7C).



Le processus de production d'une émulsion, appelé émulsification ou homogénéisation, se fait par apport d'énergie mécanique au système conduisant à l'interdispersion des phases. L'accroissement de la surface de contact entre les deux liquides immiscibles correspond à un état thermodynamiquement défavorable. En effet, les interactions attractives entre molécules d'un même liquide sont responsables de la tendance de l'interface à se maintenir dans une géométrie minimisant sa surface. Cette tendance à la contraction est appelée tension superficielle. Ainsi, une émulsion évolue rapidement vers une séparation des deux phases. Il est possible de diminuer l'instabilité des émulsions par ajout au cours de l'émulsification de molécules amphiphiles appelées tensioactifs. Celles-ci s'adsorbent à la surface des gouttelettes formées et stabilisent le système en diminuant la tension superficielle. Les émulsions ainsi obtenues présentent une stabilité cinétique, c'est-à-dire une certaine capacité à résister au changement de leur structure au cours du temps.

L'évolution de la structure d'une émulsion et sa stabilité peuvent être évaluées en suivant la distribution de taille des gouttelettes au cours du temps (McClements, 1999). Lorsque les gouttelettes d'une émulsion sont de la même taille, l'émulsion est qualifiée de monodisperse, tandis que lorsque les gouttelettes sont de tailles variées,

l'émulsion est qualifiée de polydisperse. Le type d'émulsion et la taille des gouttelettes sont influencés par de multiples paramètres parmi lesquels figurent la composition des phases, leurs propriétés et proportions relatives, les quantités et propriétés du ou des tensioactifs ou encore la quantité d'énergie apportée au système pendant l'émulsification (Ushikubo & Cunha, 2014). La connaissance de ces facteurs est cruciale pour la prédiction de la stabilité des émulsions au cours du temps (Weiss & Muschiolik, 2007).

La structure compartimentée offerte par les systèmes émulsionnés (Figure 7) représente une opportunité pour les co-cultures microbiennes. En effet, elle est une manière de procéder à la ségrégation spatiale des micro-organismes dans le but de moduler leurs interactions. Ces systèmes ont d'ailleurs récemment fait l'objet d'applications. En particulier, des auteurs ont utilisé un système d'émulsion double de type eau-huile-eau ($W_1/O/W_2$) afin de ségréger spatialement la levure *Zygosaccharomyces rouxii* de la bactérie lactique *Tetragenococcus halophilus*, impliqués dans la fermentation de la sauce soja (Devanthi, El Kadri, et al., 2018a). L'objectif de leurs travaux était de limiter l'antagonisme entre les deux souches, réputé nuisible pour la production de composés aromatiques d'intérêt (Devanthi, Linforth, et al., 2018). Le procédé de co-culture décrit consiste à encapsuler la levure dans une goutte de milieu de culture aqueux (phase W_1), laquelle est incorporée dans une goutte d'huile (phase O), elle-même incorporée dans un milieu de culture aqueux (phase W_2) qui contient la bactérie lactique. Leurs travaux montrent que ce système de co-culture permet effectivement de lever l'antagonisme entre les deux micro-organismes. Par ailleurs, ce type de système de co-culture a également permis d'enrichir des yaourts avec la souche probiotique *Lactobacillus paracasei* sans interférer avec le processus de fermentation opéré par le consortium *Streptococcus thermophilus*-*Lactobacillus bulgaricus* (El Kadri et al., 2018). Ainsi, les systèmes basés sur les émulsions permettent de moduler les interactions microbiennes, limitant notamment les phénomènes compétitifs.

En conclusion, les systèmes de co-cultures se révèlent d'un grand intérêt pour l'ingénierie de communauté et l'optimisation de leur fonctionnalité. Ils permettent par leur configuration spatiale de moduler le degré de séparation, et ainsi d'interaction entre les micro-organismes. Celui-ci doit être adapté à l'application visée, étant donné que les populations peuvent dépendre l'une de l'autre pour leur croissance ou la production d'un métabolite, ou à l'opposé être antagonistes. Les différents exemples mentionnés dans cette section illustrent l'apport de ces systèmes de co-culture pour exercer un contrôle sur ces paramètres et obtenir la fonctionnalité désirée. Outre l'utilisation de ces dispositifs, le choix du mode de culture, en une étape ou en régime séquentiel, peut également permettre de modeler la structure des communautés cultivées.

Les cultures séquentielles comme outils d'ingénierie descendante de communautés dans les aliments fermentés : exemple du backslopping

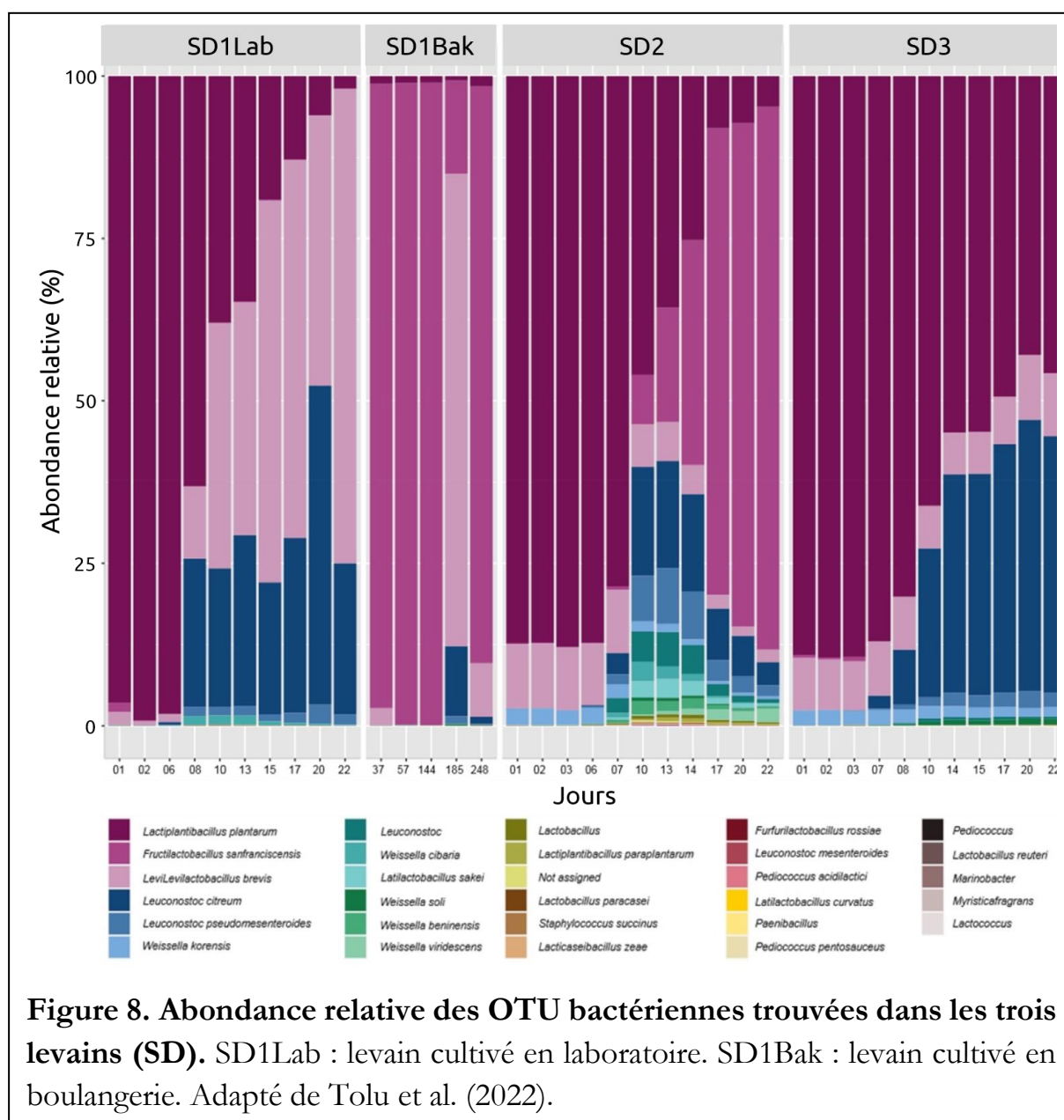
Historiquement, les premières productions d'aliments fermentés se basaient sur la fermentation spontanée de la matière première due au développement du microbiote résident (Leroy & De Vuyst, 2004). La fabrication de ces aliments implique généralement plusieurs espèces microbiennes assurant des tâches distinctes et organisées en communautés. Leur fonctionnement permet de transformer la matrice initiale en produit fini. Au cours de ces transformations, les communautés s'établissent et se succèdent sous l'influence de pressions biotiques et abiotiques. Les pressions abiotiques sont non seulement imposées par le procédé, mais proviennent également des micro-organismes eux-mêmes lorsqu'ils transforment leur habitat par fermentation. Ainsi, les microbiotes d'aliments fermentés constituent des écosystèmes caractérisés par des dynamiques taxonomique et fonctionnelle élevées. Dans ce contexte, de nombreux processus de fabrication traditionnels ont recours à la propagation de ces microbiotes par **backslopping**. Cette méthode de **propagation séquentielle** consiste à ensemencer la matière première à l'aide d'un

résidu issu d'une production précédente. A l'échelle des espèces, ce procédé a conduit à une domestication des espèces par évolution des génomes des micro-organismes selon des mécanismes de pseudogénisation, réduction, duplication et de transfert horizontal (Gibbons & Rinker, 2015). Outre l'impact sur les espèces, ce procédé de propagation agit également à l'échelle des communautés en constituant une pression de sélection conduisant à leur adaptation progressive à la matrice fermentescible. Cette adaptation se traduit par une amélioration du procédé de fermentation et une meilleure prédictibilité du résultat (Smid et al., 2014). En cela, le backslopping peut être considéré comme un outil d'ingénierie descendante de microbiotes qui est encore utilisé aujourd'hui dans les technologies de fermentation alimentaires faisant appel à des cultures primaires non définies.

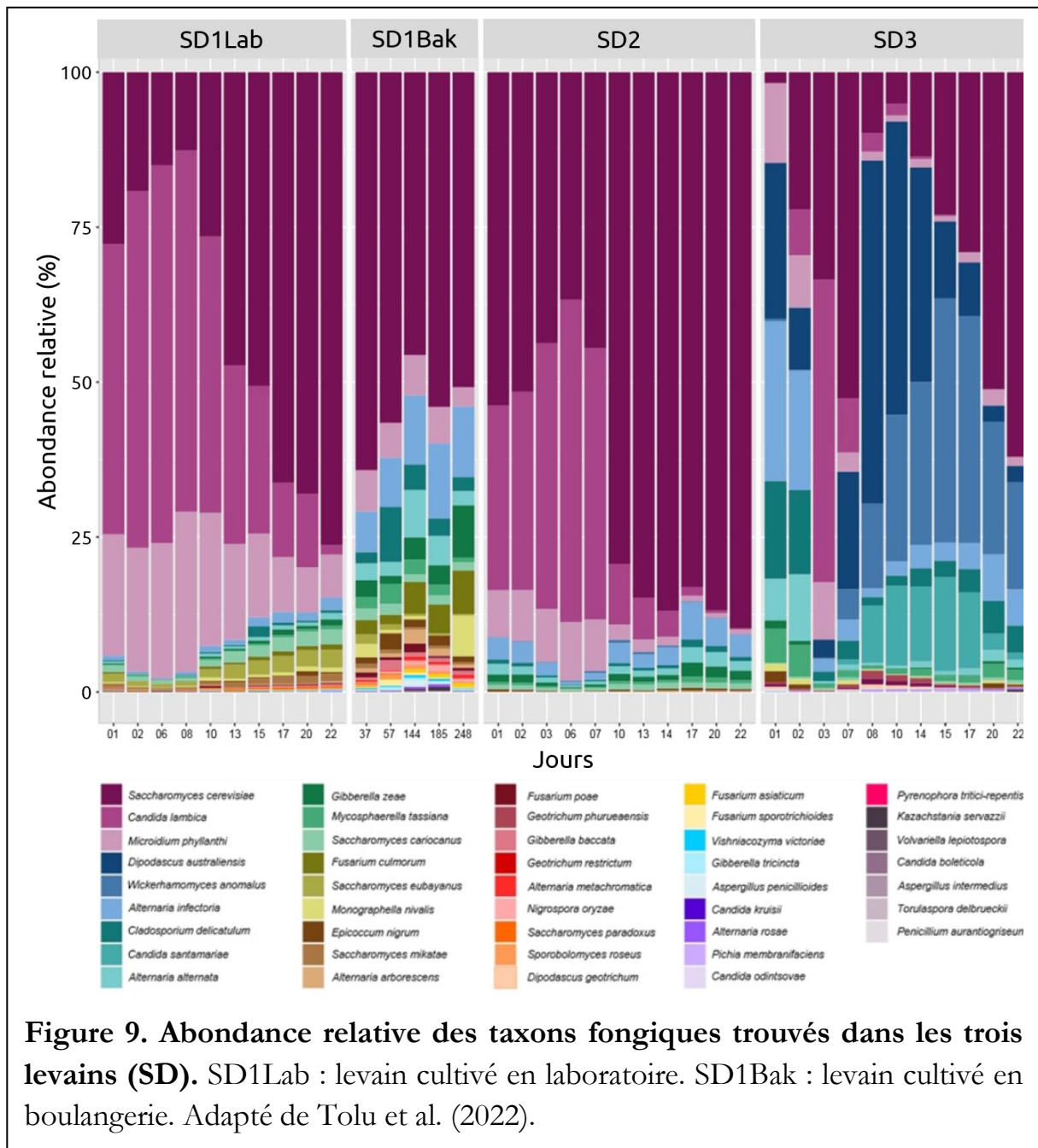
Dynamiques de structure et de fonctionnalité de microbiotes d'aliments fermentés propagées en régime séquentiel

Les levains de boulangerie constituent un exemple typique de cultures primaires propagées par backslopping et démontrant une dynamique de populations au cours du processus. Ce système complexe est obtenu par fermentation d'un mélange de farine céréalière et d'eau par des micro-organismes appartenant essentiellement aux bactéries lactiques et aux levures issues des ingrédients, de l'environnement de fabrication et des boulangers (Reese et al., 2020). La structure des levains de boulangerie est fortement influencée d'une part par les paramètres physico-chimiques du procédé et d'autre part par le transfert involontaire de micro-organismes issus de l'environnement vers le levain. En effet, Tolu et al. (2022) ont réalisé 3 séries de propagations par backslopping quotidien pendant 22 jours. Les matrices ont toutes étéensemencées avec une culture primaire définie constituée d'une souche bactérienne de *Lactiplantibacillus plantarum*, et de deux souches de levures des espèces *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida lambica* (Tolu et al., 2022). Les trois séries de propagation diffèrent par les conditions de pH et de température pour évaluer

l'influence des paramètres physico-chimiques sur la structure des communautés. L'analyse de la composition des communautés propagées a montré que durant les premiers jours de propagation la souche bactérienne de *L. plantarum*, dominante dans l'inoculum, le restait dans toutes les configurations testées. Toutefois, son abondance relative diminuait à mesure des repiquages et de la croissance de bactéries contaminantes apportées par les ingrédients (Figure 8).



Après cette propagation en laboratoire, la culture issue de la première configuration a été utilisée en boulangerie et analysée tous les 2 mois pendant 8 mois. Le microbiote bactérien de ce levain s'est rapidement enrichi en *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, une bactérie associée à l'environnement de production, jusqu'à devenir dominante malgré des fluctuations locales de son abondance relative. Globalement, le microbiote bactérien était peu hétérogène et marqué par la présence de bactéries lactiques. De façon similaire, les structures des microbiotes fongiques dans les premières étapes reflétaient celles des inocula, caractérisés par une faible diversité



alpha. Au fur et à mesure des propagations, ces structures divergeaient entre les configurations avec l'enrichissement progressif et différentiel de micro-organismes contaminants (Figure 9).

Outre l'influence de l'apport de micro-organismes externes dans le système, la température de fermentation plus élevée dans la première configuration semblait favoriser l'activité de *L. plantarum* et ainsi conduire à une acidification plus rapide et un pH plus bas comparé aux autres configurations. Le microbiote fongique montrait également une évolution différente dans les trois configurations, en particulier au regard des abondances relatives des souches primaires ajoutées : celle de *S. cerevisiae* augmentait tandis que celle de *C. lambica* diminuait jusqu'à son extinction en fin d'expérience. Ces résultats indiquent que les différences de conditions de pH initial et de température ont induit des communautés de structures différentes.

Cet exemple illustre l'importance des paramètres de procédé dans le façonnement des communautés microbiennes de levains mais aussi et surtout l'influence majeure des transferts microbiens depuis l'environnement de production, apportant des micro-organismes en mesure de supplanter la flore native. Ainsi, la composition d'une culture propagée par backslipping dans un environnement de production non-stérile résulte de processus continus de dynamiques de population, d'évolution de souches et d'apport de matériel biologique exogène (Smid et al., 2014).

Récemment, des travaux ont illustré la façon dont les écosystèmes microbiens peuvent être façonnés par des pressions sélectives à long terme (Groenenboom et al., 2022). Récemment, des travaux menés sur le Mabisi, un lait fermenté produit traditionnellement en Zambie, avaient pour but de modéliser l'évolution des communautés microbiennes afin d'identifier les paramètres agissant sur la structuration des communautés et d'évaluer leur contribution respective. Généralement, le Mabisi est produit par fermentation spontanée de lait cru de vache dans un contenant (calebasse, seau ou bidon à lait) pendant 24 à 48 h. Le Mabisi est ensuite mélangé et consommé, et la communauté en résultant est réutilisée pour la

production suivante par ajout de lait cru dans le contenant. Ces communautés bactériennes ont été co-cultivées pendant des dizaines d'années par ce procédé de backslopping. Les auteurs sont partis de six échantillons distincts de Mabisi pour suivre l'évolution de la composition et de la fonctionnalité de leurs microbiotes au cours de 16 étapes de propagation séquentielles en laboratoire, durant chacune 86 h avec ensemencement au 1/100 (v/v). Chaque échantillon initial de Mabisi a été utilisé pour réaliser 5 cycles en parallèle afin d'étudier la variabilité générée. Tout d'abord, les auteurs ont identifié au total 47 espèces différentes appartenant à deux genres principaux (*Acetobacter* et *Lactobacillus*). Malgré une richesse spécifique importante, seules 4 espèces (*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Acetobacter pasteurianus* et *Acetobacter orientalis*) dominent les communautés, les autres espèces détectées restant minoritaires. Au cours des propagations, les auteurs ont observé une augmentation moyenne des abondances relatives de *Lactobacillus* conjointement à une diminution des *Acetobacter*, et une survie des autres espèces en faible abondance. Cela illustre une sélection des bactéries adaptées au milieu et aux conditions de culture. Toutes les communautés provenant du même échantillon de Mabisi présentent des dynamiques parallèles. Cependant, bien qu'elles montrent de nombreuses similitudes, leurs compositions divergent au fur et à mesure des propagations. Dans l'ensemble, la composition des communautés propagées présente une plus grande variabilité comparée à celle des six communautés de départ. La comparaison globale des structures de communauté (diversité bêta) associée à une analyse en composante principale révèle deux grands groupes de communautés, qui reflètent deux destins écologiques selon une dynamique intra-genre : deux clusters se forment selon que *L. helveticus* ou *L. delbrueckii* domine dans le microbiote. Une modélisation a montré que l'évolution de la composition des communautés soumises à un régime de propagation séquentielle peut être expliquée majoritairement (77,1%) à la composition des communautés initiales et au nombre de cycle. Toutefois, le reste de la variation étant imputé à des processus stochastiques, la structure de l'échantillon final ne peut être prédite de manière triviale. Du point de vue de la fonctionnalité

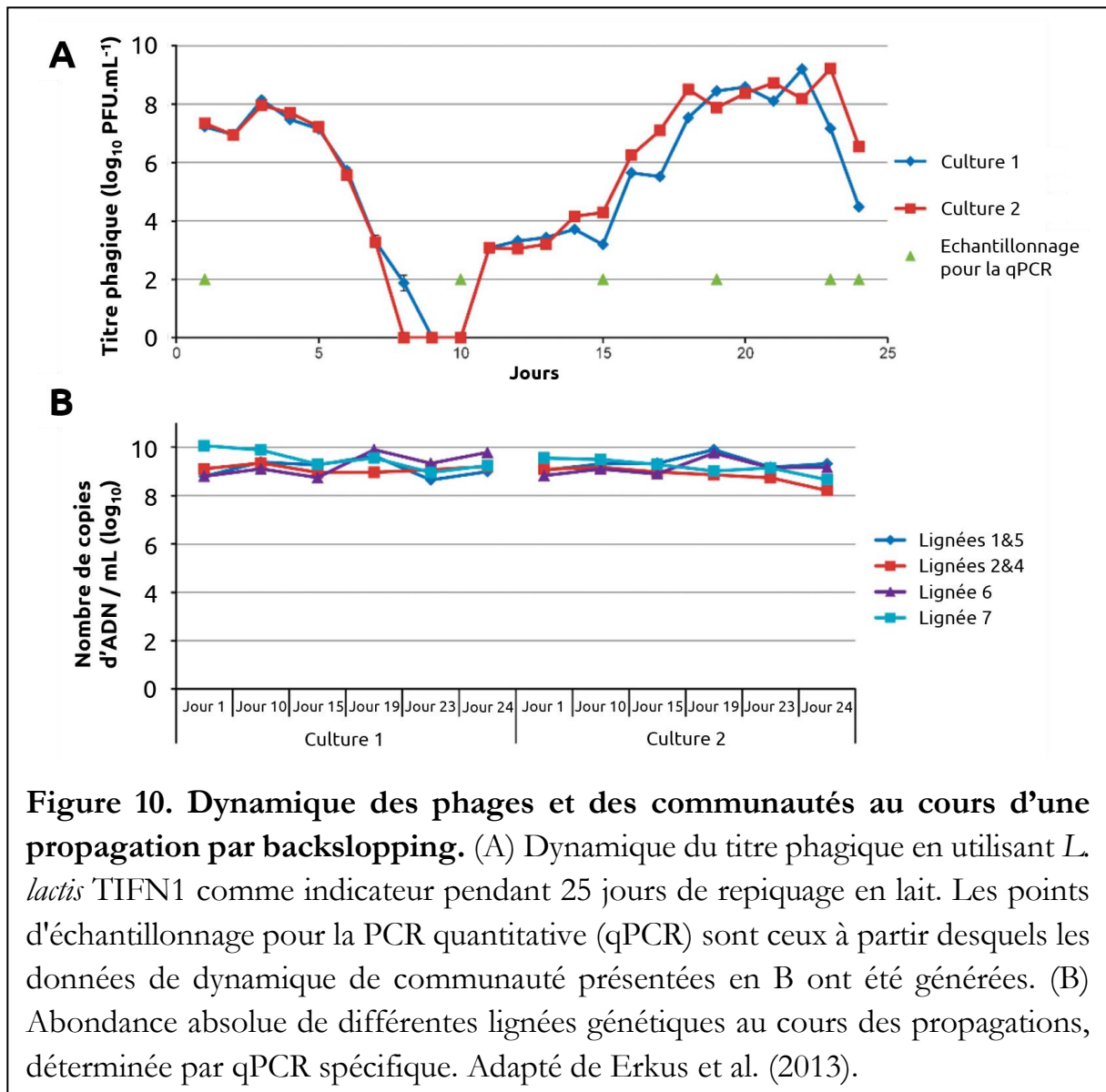
évaluée par les profils de production de composés volatils ainsi que d'autres facteurs (pH, consistance et séparation de phase), l'ensemble des communautés appartiennent au même groupe. Cela suggère que les différents groupes de micro-organismes en présence peuvent exercer les mêmes fonctions, il s'agit d'un phénomène de redondance fonctionnelle.

Rôle des bactériophages dans la dynamique taxonomique et fonctionnelle des cultures primaires pour la production fromagère

Outre les facteurs mentionnés précédemment, les bactériophages naturellement présents dans les communautés microbiennes sont également connus pour exercer un rôle majeur dans la dynamique et la stabilité de leur structure et fonction, mais aussi dans leur réponse aux variations environnementales. Deux mécanismes connus sont illustrés par les travaux d'Erkus et al. (2013) et de Somerville et al. (2021).

Au cours de propagations séquentielles, les communautés de cultures primaires sont assujetties à des pressions de sélection biotiques et abiotiques. Toutefois, il fait consensus que les cultures primaires non définies sont généralement plus résilientes face aux instabilités de l'environnement de culture que les cultures définies comprenant un nombre restreint de souches. Afin d'élucider les mécanismes impliqués dans cette résilience, des auteurs ont conduit des analyses approfondies des diversités génétique et fonctionnelle de cultures primaires non définies pour la production de Gouda (Erkus et al., 2013). Leurs travaux révèlent une faible richesse spécifique mais une grande diversité intraspécifique. En effet, les cultures sont minoritairement composées de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* comprenant une seule lignée (1,4 % d'abondance relative), tandis que le genre *Lactococcus* était majoritaire (98,6 %) et représenté par les deux espèces *lactis* et *cremoris* comprenant respectivement 2 et 5 lignées génétiques distinctes. L'analyse du contenu plasmidique révèle la présence de profils plasmidiques distincts entre les lignées identifiées.

L'annotation fonctionnelle à partir des données génomiques suggère l'existence d'une complémentarité fonctionnelle entre les souches de *Lactococcus* et de *Leuconostoc* au regard du catabolisme d'acides aminés spécifiques et de voies de synthèse de composés aromatiques. Ces informations suggèrent l'existence d'une répartition des tâches au sein d'une communauté diversifiée nécessaire à la transformation de la matière première en fromage. Afin de comprendre comment cette diversité peut se maintenir au cours des propagations séquentielles de la culture primaire, les auteurs ont étudié le contenu phagique de la communauté propagée quotidiennement pendant plusieurs semaines.



Dans l'ensemble du métagénome, 1,15 % d'ADN lié aux phages a été détecté. Plus précisément, 1,75 % du contenu génomique de *Lactococcus* spp. correspond à des séquences de prophages, tandis que cette proportion est de 0,65 % chez *Leuconostoc mesenteroides*. La présence de phages dans les surnageants de culture indique que certains d'entre eux sont actifs. De manière intéressante, des différences considérables de sensibilité phagique au sein des lignées et entre lignées génétiques ont été rapportées. Aussi le titre phagique fluctuait de manière importante, indiquant l'extinction de populations sensibles durant certaines phases de la propagation (Figure 10A). Malgré ces fluctuations, les abondances relatives des lignées auxquelles ces populations appartenaient demeuraient relativement stables (Figure 10B). Ces résultats suggèrent que la stabilité compositionnelle des cultures primaires propagées par backslipping est maintenue par la prédation phagique opérant au niveau des souches. Le mécanisme impliqué correspondrait au modèle *kill-the-winner* (littéralement : « tuer le vainqueur »), selon lequel la suppression de souches dominantes par des attaques phagiques permet le maintien de la diversité génétique et de la stabilité fonctionnelle globale de la communauté (Thingstad, 2000).

Un autre mécanisme impliquant les bactériophages est connu pour jouer un rôle dans le maintien de la diversité intra-spécifique et de la fonctionnalité au sein de cultures primaires. Dans des travaux récents faisant appel à une combinaison de métagénomique, métabolomique et de co-cultures, les auteurs ont caractérisé un ensemble de cultures primaires obtenues par backslipping destinées à la production d'un fromage traditionnel Suisse à pâte dure, cumulant un total de 82 années de propagation (Somerville et al., 2022). Les résultats montrent que ces cultures primaires sont dominées par deux taxons (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*) et que leur composition est stable. Cette simplicité compositionnelle au niveau spécifique est doublée d'une faible diversité de souches qui présentent une redondance fonctionnelle, mais une forte variabilité en termes de sensibilité aux phages. En effet, l'analyse génomique révèle que la majorité de la variabilité génétique entre les souches se situe au niveau des espaceurs des loci

CRISPR impliqués dans l'immunité adaptative aux phages. Au cours des propagations, de nouveaux espaceurs ont été acquis par les souches, suggérant que celles-ci sont continuellement exposées aux phages et acquièrent des résistances en intégrant de courtes séquences issues de leur génome. Par ailleurs et malgré la présence de nombreux espaceurs CRISPR correspondant dans les génomes, deux phages de *Streptococcus* persistent en abondances extrêmement élevées dans le microbiome. Ceux-ci excèdent souvent le nombre de cellules, sans effet sur la croissance bactérienne ni sur le processus de fabrication fromagère. Cela suggère que ces deux phages ont une histoire évolutive marquée par une association de longue durée avec leurs hôtes. La persistance de ces phages dans leurs hôtes selon un cycle lysogénique est cohérente avec un modèle appelé *piggy-back-the-winner* (littéralement : « monter sur les épaules du vainqueur ») (Silveira & Rohwer, 2016). Selon cette hypothèse, ces phages entrent en cycle lytique non dans le cadre de la régulation de populations dominantes mais lorsque l'environnement est défavorable pour les hôtes, par exemple en conditions de pH sous-optimales ou lorsque les nutriments sont rares. Les auteurs suggèrent que ces phages domestiqués pourraient exercer un rôle écologique bénéfique sur le microbiote, apportant par exemple une protection contre l'établissement d'envahisseurs. D'un point de vue technologique, ils pourraient directement contribuer au processus de fabrication fromagère lors de cycles lytiques : la lyse bactérienne conduirait à l'enrichissement du profil aromatique du produit par la libération de contenus intra-cellulaires dans le milieu.

Ainsi, les phages ne jouent pas impérativement un rôle négatif dans la production fromagère : leur activité régulatrice est fondamentale pour le maintien de la diversité taxonomique et de la stabilité fonctionnelle des cultures primaires.

4. Exemple de valorisation de la compétition microbienne : la biopréservation

Définition et pertinence de l'approche

Les fromages au lait cru sont façonnés par l'activité de leur microbiote au cours de leur fabrication. Ils constituent un écosystème dynamique, dans lequel les ressources disponibles de la matrice alimentaire et les paramètres du procédé de fabrication font évoluer la structure de la communauté microbienne. Hormis la présence de micro-organismes pouvant être considérés comme bénéfiques au regard des propriétés organoleptiques du produit fini ou de la santé des consommateurs (Lacroix et al., 2010; Montel et al., 2014), les microbiotes de ces produits fermentés peuvent également contenir des flores d'altération qui réduisent la durée de vie et la qualité du produit (Ledenbach & Marshall, 2009), voire des micro-organismes pathogènes pour l'être humain. En France, entre 2014 et 2018, les produits à base de lait cru ont fait l'objet de 510 alertes pour dangers microbiologiques impliquant des *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) ou entéropathogènes (EPEC), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. et *Listeria monocytogenes* (Anses, 2022). Cette dernière espèce concerne la majorité des alertes et se révèle particulièrement dangereuse pour les populations sensibles (jeunes enfants, femmes enceintes, personnes immunodéprimées, etc.) (Anses, 2022; Melo et al., 2015). Les contrôles de la qualité microbiologique des matières premières et des produits finis ou en cours de fabrication permettent généralement de limiter l'incidence de contaminations des consommateurs en retirant ou rappelant les produits finis présentant un danger microbiologique (Anses, 2022). Toutefois, cela entraîne un gaspillage des ressources avec des pertes économiques associées. L'application de mesures ciblant l'ensemble des chaînons de la production, à savoir la bonne gestion des effluents de fertilisation,

de l'ensilage, de l'abreuvement, alimentation, logement et soin des animaux, ainsi que de la traite et du stockage du lait, permettent de limiter le portage des pathogènes et la contamination de la matière première (Anses, 2022). Pendant la phase de transformation de cette matière première, le contrôle des populations microbiennes indésirables fait appel d'une part à l'application des mesures d'hygiène dans l'environnement de production, et d'autre part à la bonne maîtrise des paramètres du procédé de fabrication. Ces derniers recouvrent la température, l'acidification du lait, l'ajout de NaCl, la durée de l'affinage, qui permettent d'exclure la flore indésirable en favorisant l'implantation de flore bénéfique (Irlinger & Mounier, 2009; Ryser & Marth, 1987; Verraes et al., 2015). Toutefois, malgré les contrôles et l'amélioration continue de la maîtrise de l'hygiène et des procédés de fabrication, la présence de flores d'altération ou pathogène dans les produits au lait cru fermentés demeure une problématique majeure sur les plans de la santé publique et économique. En réponse à cela, et dans le but de promouvoir des produits plus sains, la communauté scientifique travaille à développer des approches de biopréservation. La biopréservation consiste en l'utilisation de la flore résidente de l'aliment et/ou de ses métabolites présentant des propriétés inhibitrices vis-à-vis de la flore indésirable (Stiles, 1996; Zagorec & Christeans, 2013).

Rôle et mécanismes d'action des cultures biopréservatrices

Utilisées empiriquement depuis des millénaires, les bactéries lactiques impliquées dans les processus de fabrication fromagère se sont naturellement révélées être d'un intérêt particulier pour la biopréservation (Stiles, 1996). En effet, la plupart des cultures protectrices commercialisées appartiennent essentiellement aux genres *Lactococcus*, *Lactobacillus lato sensu* et *Carnobacterium* (Borges et al., 2022). L'activité biopréservatrice de ces micro-organismes est supportée par divers mécanismes, recoupant les mécanismes de la compétition décrits précédemment. En premier lieu, le métabolisme primaire de ces micro-organismes conduit à la production d'acides organiques (acides lactique, succinique, acétique et formique), de gaz (CO_2 , H_2 et SO_2) ou d'autres métabolites (éthanol, diacétyl, aldéhydes, cétones, etc.) dont la plupart ont un effet antagoniste vis-à-vis d'autres micro-organismes (Ben Said et al., 2019; Bourdichon et al., 2021). Typiquement, la production et la sécrétion majoritaires d'acide lactique résultent en la diminution du pH de l'aliment, lequel restreint inévitablement la croissance de flores bactériennes et fongiques (Borges et al., 2022; Bourdichon et al., 2021; Ross et al., 2002). De plus, cet acide organique manifeste un effet directement antimicrobien par la rupture du gradient de protons transmembranaire ou encore la diminution du pH cytoplasmique (Warnecke & Gill, 2005).

En second lieu, l'activité biopréservatrice des micro-organismes ajoutés pour la fermentation du lait peut être médiée par des métabolites spécialisés tels que les bactériocines, décrits dans la section sur la compétition par interférence. De nombreuses bactériocines (lacticines, enterocines, plantaricines, lactococcines, etc.) présentent un potentiel intéressant (Silva et al., 2018). En fait, plus de 230 bactériocines produites par des bactéries lactiques ont été isolées et partiellement caractérisées à ce jour (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Cependant, bien que l'utilisation de bactériocines soit une approche étudiée depuis plusieurs décennies, seulement deux bactériocines sont actuellement disponibles sur le marché pour des applications en biopréservation (Twomey et al., 2021). La plus utilisée est la nisine, un

lantibiotique produit par *Lactococcus lactis* présentant une activité inhibitrice vis-à-vis de nombreuses bactéries Gram positives, notamment des bactéries lactiques. En particulier, cette molécule est efficace pour le contrôle des populations de *L. monocytogenes* et *S. aureus* ainsi que des bactéries formant des spores des genres *Clostridium* et *Bacillus* (Silva et al., 2018). Cependant, le large spectre d'inhibition de la nisine ainsi que sa sensibilité au pH et à la température sont susceptibles de limiter son intérêt dans les produits laitiers fermentés. L'autre bactériocine commercialisée pour la biopréservation est une pédiocine produite par *Pediococcus* spp., plus efficace que la nisine contre *L. monocytogenes*, *S. aureus* ainsi que d'autres bactéries Gram-négatives dont *Pseudomonas* et *Escherichia* spp. (Silva et al., 2018). De plus, cette molécule représente un fort potentiel d'application en biopréservation en raison du maintien de son activité anti-*Listeria* dans de vastes gammes de température et de pH (Silva et al., 2018).

La plupart des études ont évalué le potentiel inhibiteur des bactériocines utilisées de façon isolée. Toutefois, des travaux récents ont montré que différentes combinaisons de bactériocines (nisine Z, pédiocine PA-1, microcine J-25) avec de la reutérine (3-Hydroxypropanal) et des acides organiques (acide lactique, acide citrique) pouvaient agir en synergie et présenter de forts effets inhibiteurs sur une diversité de micro-organismes, notamment des pathogènes résistants aux antibiotiques (Soltani et al., 2022). Cette piste prometteuse misant sur la diversité des mécanismes d'actions et des synergies permettrait de réduire les quantités de bactériocines ajoutées au produit pour sa biopréservation. Mais l'utilisation de bactériocines reste inféodée à la capacité de les produire, extraire et purifier, des opérations coûteuses qui limitent leur usage dans un contexte de production de masse. De plus, dans la plupart des cas, les bactériocines sont adsorbées dans les matrices alimentaires et sont facilement dégradées, ce qui entraîne une perte d'activité antibactérienne. Ainsi, la stratégie la plus utilisée pour la biopréservation des produits laitiers fermentés demeure l'utilisation de bactéries lactiques productrices de

bactériocines, sous forme de ferments ou cultures adjointes aux ferments (Silva et al., 2018).

De l'utilisation de micro-organismes isolés aux communautés

Couramment ajoutées en tant que ferments lactiques, des bactéries de l'espèce *Lactococcus lactis* ont démontré une activité anti-*Listeria monocytogenes* notable dans divers contextes (Silva et al., 2018). L'activité désirée est parfois portée par des bactéries adjointes (ou flore secondaire, anglais : *non-starter lactic acid bacteria*, NSLAB) telles que des *Lactobacillus plantarum* et *Carnobacterium maltaromaticum* faisant par ailleurs l'objet d'une commercialisation comme cultures protectrices. Sont également mentionnées des bactéries du genre *Enterococcus*, cependant leur utilisation dans les aliments peut présenter un risque pour les consommateurs et nécessite une évaluation par les autorités alimentaires européennes (EFSA (European Food Safety Authority), 2007; Silva et al., 2018). Néanmoins, les micro-organismes de biopréservation ont souvent une action limitée dans le temps ainsi qu'un spectre parfois large nuisant à l'écosystème fromager. Ces limitations, combinées à la caractérisation de plus en plus précise des microbiotes des produits laitiers fermentés, ont conduit la communauté scientifique à développer des approches alternatives basées sur la valorisation de l'effet barrière exercé par des consortia microbiens entiers.

La pertinence d'approches de biopréservation basées sur l'exploitation de communautés microbiennes est validée par un ensemble de découvertes obtenues dans des domaines analogues comme la bioprotection de plantes d'intérêt agronomique. Pour reprendre un exemple mentionné dans la section traitant de l'ingénierie ascendante, l'utilisation de consortia microbiens associés à la rhizosphère de tomates et leur mise en compétition avec un pathogène de cette plante a mis en évidence l'intérêt des communautés pour cette application (Wei et al., 2015). Les auteurs ont montré que l'architecture des réseaux trophiques de ces microbiotes

synthétiques était un bon prédicteur du succès de l'invasion du pathogène. En particulier, ils ont identifié le recouvrement de niche écologique (entendue ici comme l'ensemble des ressources métabolisées) entre la communauté et le pathogène comme paramètre exerçant un effet barrière efficace contre ce dernier. Ces résultats ont été validés expérimentalement en microcosmes³ ainsi qu'*in situ*, où la diversité des microbiotes était positivement et significativement corrélée à la santé des plantes.

Par ailleurs, il a été démontré en microcosmes que plus les microbiotes de sol sont taxonomiquement riches et diversifiés, plus ils entraînent le déclin de *Listeria monocytogenes*, suggérant que la diversité est la clé de l'effet barrière contre l'invasion de ce pathogène dans son réservoir tellurique (Vivant et al., 2013). Dans une approche similaire, des auteurs ont suggéré l'importance de la diversité pour l'inhibition de ce pathogène sur les surfaces de fromages au lait cru (Retureau et al., 2010). Bien que les consortia microbiens aient montré une grande variété au regard de leur capacités inhibitrices, ces travaux ont permis d'identifier plusieurs consortia conduisant à la décroissance des populations de *L. monocytogenes*. Ainsi les microbiotes de fromages au lait cru peuvent se protéger contre des invasions par le pathogène. D'autres travaux font état de l'utilisation de consortia anti-*Listeria* et montrent que l'inhibition est plus marquée pour les associations de bactéries lactiques que lorsqu'elles sont introduites séparément (Callon et al., 2011). Enfin, d'autres travaux démontrent que des consortia bactériens peuvent inhiber des souches d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines (Callon et al., 2016; Frétin et al., 2020). De nombreux procédés de fabrication fromagère font appel à des consortia multi-spécifiques supposés occuper l'écosystème alimentaire d'un point de vue taxonomique et surtout fonctionnel (Mayo et al., 2021). Dans ce contexte, l'utilisation de consortia multi-spécifiques est ainsi d'un intérêt majeur pour la biopréservation, mais il semble que le contenu taxonomique prime sur la richesse spécifique pour l'expression de cette propriété (Callon et al., 2014). Qu'il s'agisse de souches isolées ou de consortia, les

³ Un microcosme est un dispositif miniaturisé mimant un écosystème naturel, adapté à la manipulation dans des conditions contrôlées en laboratoire.

agents de biopréservation doivent nécessairement être sélectionnés sur la base de leurs propriétés inhibitrices vis-à-vis de la flore indésirable.

Sélection des agents de biopréservation

Identifier et sélectionner des agents de biopréservation requiert en premier lieu une connaissance de l'environnement ciblé (Twomey et al., 2021). Par exemple l'espèce *Carnobacterium maltaromaticum*, présente dans les produits laitiers, est connue pour ses propriétés inhibitrices de *Listeria monocytogenes* reposant notamment sur sa production de bactériocines (Afzal et al., 2010). La sélection d'isolats de cette espèce peut être effectuée grâce à divers milieux de culture avec ou sans enrichissement préalable (Afzal et al., 2010). La connaissance de ce micro-organisme a permis de mettre au point un milieu sélectif (MCM) combinant trois antibiotiques pour son isolement et son dénombrement dans des matrices d'intérêt (Edima et al., 2007). Une fois ces isolats obtenus, ceux-ci peuvent faire classiquement l'objet d'un criblage rapide sur gélose afin de déterminer s'ils présentent une activité inhibitrice (Twomey et al., 2021). Ce type d'essai consiste simplement en un dépôt d'une colonie sur une gélose contenant la bactérie cibléeensemencée dans la masse, suivi d'une incubation. Après incubation, la gélose devient trouble, excepté autour de la colonie inoculée en surface dans le cas où celle-ci produit une substance inhibitrice diffusible. Cette méthode permet d'évaluer facilement le potentiel inhibiteur des isolats mais souffre d'un débit limité. L'émergence et la massification des approches multi-omiques permet de réduire considérablement le temps de travail alloué à ces criblages (Borges et al., 2022). En illustration, l'exploration de génomes de 29 souches de *Carnobacterium maltaromaticum* par des outils bio-informatiques a permis de mettre en évidence la présence de clusters génétiques impliqués dans la production de 12 bactériocines de classes différentes (Gontijo et al., 2022). Par ailleurs, ces approches peuvent être combinées aux approches phénomiques à haut-débit afin d'éclaircir le lien génotype-phénotype des souches étudiées (Acin-Albiac et al., 2020) et de détecter des activités

inhibitrices invisibles en suivant les méthodes classiques de diffusion sur gélose (El Kheir et al., 2018). Par exemple, ces derniers auteurs ont identifié des souches de *C. maltaromaticum* et de *Lactococcus piscium* présentant des activités inhibitrices de *Listeria monocytogenes* en utilisant un criblage à haut-débit (El Kheir et al., 2018). La méthode consistait à co-cultiver une collection de souches avec une souche rapportrice de *Listeria monocytogenes* dont la production de bioluminescence reflète l'activité métabolique (El Kheir et al., 2018; Riedel et al., 2007). Le criblage peut être affiné par la mise en compétition des candidats avec d'autres souches réceptrices étant donné leurs susceptibilités variables (Twomey et al., 2021). Enfin, les agents de biopréservation sélectionnés *in vitro* doivent prouver leur efficacité *in situ*, c'est-à-dire dans les produits alimentaires concernés par cette application (Leyva Salas et al., 2017; Twomey et al., 2021).

Objectifs de la thèse

L'ingénierie de communauté microbienne nécessite non seulement des outils permettant de les caractériser et de les modéliser, mais aussi des outils permettant de les cultiver ou de les modéliser à façon. Les systèmes de culture décrits dans la littérature ont en commun d'imposer une certaine configuration spatiale aux membres de la communauté de sorte à moduler la magnitude des interactions entre eux. Le contrôle des interactions est en effet essentiel pour l'ingénierie de communauté microbienne. Par exemple, la compétition peut conduire à l'exclusion indésirable de membres de la communauté microbienne au cours du processus de culture et ainsi conduire à des communautés ne présentant pas les propriétés souhaitées. Dans ce contexte, **l'objectif de cette thèse est d'étudier l'influence de la propagation de microbiotes en conditions contrôlées sur leur structure et leur fonction.**

Le projet scientifique est organisé ainsi en trois temps :

Dans un premier temps, abordé dans le **Chapitre II**, un système expérimental de culture permettant de limiter les interactions de compétition a été conçu. Le système élaboré permet un micro-confinement et une ségrégation spatiale des micro-organismes à travers l'utilisation d'un bouillon de culture structuré en émulsion inverse à l'aide d'une phase lipidique liquide. Ce système a été caractérisé puis son effet sur les interactions de compétition a été étudié à l'aide d'un couple modèle de bactéries antagonistes avant d'être évalué sur une communauté synthétique. De plus, l'effet de ce système de culture sur la physiologie des bactéries a également été étudié.

Dans un deuxième temps, ce système de culture en émulsion inverse a été comparé à un système de culture classique non émulsionné. Ces deux systèmes ont été utilisés pour propager et modéliser des communautés sauvages issues de lait cru. Plus précisément, un mode de cultures séquentielles a été choisi pour mimer des conditions d'ingénierie de communauté dans un contexte de valorisation de

microbiote. Ce régime de culture itératif consiste à inoculer un milieu de culture frais avec un échantillon de la culture précédente. Les communautés microbiennes cultivées à chaque étape ont été récoltées pour étudier la dynamique des communautés en fonction du mode de culture utilisé. L'apport respectif des deux méthodes de propagation au regard du modelage et de la stabilisation des communautés bactériennes a été évalué. Cette partie des travaux est développée dans le **Chapitre III**.

Dans un troisième temps, l'impact fonctionnel de la propagation a été étudié en prenant comme exemple la propriété d'inhibition de pathogène dans un contexte de sélection de communauté pour des applications de biopréservation. Une collection de communautés a fait l'objet de propagations séquentielles, puis les communautés résultantes ont été utilisées dans des tests de compétitions avec une souche marquée de *Listeria monocytogenes*. Les propriétés d'inhibition du pathogène ont été caractérisées en termes de magnitude et de reproductibilité, ce dernier critère constituant une problématique majeure dans un contexte de valorisation de communautés microbiennes. Ces travaux sont présentés dans le **Chapitre IV**.

Chapitre II. Développement d'un système de co-culture atténuant la compétition microbienne

Introduction et contribution

Le potentiel d'application des microbiomes a conduit la communauté scientifique à envisager de les manipuler de manière à domestiquer les fonctionnalités d'intérêt qu'ils peuvent exprimer. L'ingénierie de microbiome, cadre conceptuel et pratique dans lequel ces manipulations sont effectuées, nécessite de nouvelles méthodes de culture afin d'y parvenir. Ces méthodes consistent à exercer un contrôle sur les interactions microbiennes durant le processus de culture. En particulier, la compétition entre les espèces au sein du réacteur peut conduire à un déséquilibre des populations en faveur du plus adapté, compromettant le maintien de la biodiversité du microbiome. Le contrôle de cette interaction requiert des outils spécifiques tels que des systèmes de co-culture. De nombreuses technologies sont disponibles et permettent une variation du degré d'interaction microbien opérée *via* le degré de ségrégation spatiale des micro-organismes. Dans les travaux qui suivent, nous proposons un système de co-culture imposant une ségrégation théoriquement totale des micro-organismes. La stratégie envisagée est de (1) procéder au micro-confinement des micro-organismes au sein de gouttelettes nutritives et (2) de les ségréger au moyen d'une barrière physique imperméable empêchant les échanges de métabolites tels que les bactériocines impliquées dans la compétition par interférence. Une émulsion inverse, aussi appelée émulsion « eau-dans-huile » (*anglais : w/o, water-in-oil*) est un milieu hétérogène dans lequel des gouttelettes de phase aqueuse sont dispersées dans une phase lipidique. Ce système correspond ainsi aux attributs recherchés pour la conception du système de co-culture proposé. Ces travaux font ainsi l'hypothèse que le micro-confinement et la ségrégation de micro-organismes à travers un système de co-culture en émulsion inverse permettent de limiter les effets d'un antagonisme s'exprimant entre deux souches. Les résultats attendus sont que les micro-organismes cultivés en émulsion se comportent comme

s'ils étaient cultivés séparément, c'est-à-dire en l'absence d'interaction et en particulier de compétition par interférence.

Ces travaux décrivent la formulation d'un système de co-culture en émulsion inverse en dispersant un bouillon de culture aqueux riche (TSBYE) dans un mélange comprenant de l'huile de tournesol et un tensioactif. Le choix de la proportion de bouillon, 20 % (m/m), de la nature du tensioactif (PGPR) ainsi que sa concentration, 2,5 % (m/m) favorise la configuration inverse de l'émulsion. Les résultats montrent que l'émulsion inverse obtenue se structure en une dispersion de gouttelettes de bouillon dans la phase lipidique. Afin de pouvoir être utilisées pour l'accueil et la culture de micro-organismes, ces gouttelettes doivent présenter un diamètre suffisant (de l'ordre de quelques dizaines de micromètres) et l'émulsion doit être cinétiquement stable, c'est-à-dire conserver sa structure pour la durée de l'incubation. Cette stabilité cinétique a été vérifiée jusqu'à 96 h d'incubation. L'analyse par granulomorphométrie du système de culture a montré que la majorité du volume de bouillon est dispersée dans des gouttelettes d'un diamètre moyen de 30 μm pour la durée de l'incubation. Les micro-organismes introduits dans le milieu de culture avant son émulsification doivent être contenus dans ces gouttelettes nutritives. Pour le vérifier, un bouillon contenant des bactéries productrices de protéine fluorescente verte (GFP) a été produit, après quoi la phase lipidique a été marquée à l'aide d'un fluorophore lipophile (Rouge de Nil). Le milieu émulsionné a alors été observé en microscopie confocale à balayage laser. Les résultats confirment le micro-confinement des bactéries dans des gouttelettes de milieu nutritif, et leur ségrégation spatiale par la phase lipidique. De plus, l'introduction de bactéries n'altère pas la structure de l'émulsion inverse. Afin de déterminer si l'émulsion inverse permet de lever la compétition, un couple modèle de bactéries antagonistes a été cultivé. En culture classique, *Carnobacterium maltaromaticum* F2 inhibe la croissance de *Listeria monocytogenes* EGDe. En milieu émulsifié, les deux bactéries croissent conjointement, ce qui confirme notre hypothèse. Ces résultats ont pu être reproduits lors de la montée en échelle du volume de production à l'aide d'un bioréacteur. L'étude de

cinétiques de croissance a montré que la culture en émulsion inverse impacte la physiologie des micro-organismes, ce qui se manifeste par exemple par une modification de leurs taux de croissance spécifique. L'intensité de cet effet diffère toutefois selon les bactéries cultivées. De plus, le système de culture présente une capacité de charge réduite par rapport à une culture classique. Ce phénomène peut être imputé à deux causes possibles : (i) les gouttelettes offrent un espace limité pour la croissance et (ii) des gouttelettes sont inoccupées. Découlant de cette observation, le lien entre le niveau d'ensemencement et la capacité de charge, mais aussi la capacité à maintenir une ségrégation satisfaisante entre les micro-organismes ont été étudiés. Les résultats montrent qu'il existe un compromis entre la capacité de charge et la ségrégation des bactéries, nécessitant d'ajuster judicieusement le niveau d'ensemencement. En l'occurrence, le niveau d'ensemencement maximal recommandé se situe approximativement à 10^7 UFC.mL⁻¹. La culture en une seule étape d'un consortium synthétique suivi d'une analyse par metabarcoding révèle que la communauté propagée est moins diversifiée que la communauté initiale quel que soit le système utilisé. Cependant, la diversité est plus élevée dans le consortium propagé en émulsion inverse. De plus, la communauté obtenue ainsi est plus similaire à l'inoculum que celle obtenue par une culture classique.

En conclusion, ces travaux montrent que le système de co-culture en émulsion inverse constitue un nouvel outil permettant de propager et modéliser les communautés microbiennes. Son fonctionnement repose sur le micro-confinement et la ségrégation spatiale des micro-organismes qui conduisent à la levée des interactions microbiennes et la suppression des effets indésirables de la compétition dans le réacteur de culture. Ces résultats ont été obtenus à l'issue d'une seule étape de culture, c'est pourquoi il serait intéressant d'évaluer les apports de cette technique dans un contexte de culture séquentielle.

Les travaux de cette partie ont abouti à la publication d'un article dans le journal *Microbial Cell Factories*, retranscrit ci-après.

Invert emulsions alleviate biotic interactions in bacterial mixed culture

Alexis Dijamentiuk¹, Cécile Mangavel¹, Annelore Elfassy¹, Florentin Michaux¹, Jennifer Burgain¹, Emmanuel Rondags², Stéphane Delaunay², Sandie Ferrigno³, Anne-Marie Revol-Junelles¹ & Frédéric Borges^{1*}

¹LIBio, Université de Lorraine, Nancy, France

²LRGP, Université de Lorraine, Nancy, France

³IECL, Equipe BIGS, INRIA Nancy, Université de Lorraine, Nancy, France

*Correspondence:

Frédéric Borges

frederic.borges@univ-lorraine.fr

Microbial Cell Factories **volume 22**, Article number: 16 (2023)

<https://doi.org/10.1186/s12934-022-02014-w>

Abstract

The large application potential of microbiomes has led to a great need for mixed culture methods. However, microbial interactions can compromise the maintenance of biodiversity during cultivation in a reactor. In particular, competition among species can lead to a strong disequilibrium in favor of the fittest microorganism. In this study, an invert emulsion system was designed by dispersing culture medium in a mixture of sunflower oil and the surfactant PGPR. Confocal laser scanning microscopy revealed that this system allowed to segregate microorganisms in independent droplets. Granulomorphometric analysis showed that the invert emulsion remains stable during at least 24 h, and that the introduction of bacteria did not have a significant impact on the structure of the invert emulsion. A two-strain antagonistic model demonstrated that this invert emulsion system allows the propagation of two strains without the exclusion of the less-fit bacterium.

The monitoring of single-strain cultures of bacteria representative of a cheese microbiota revealed that all but *Brevibacterium linens* were able to grow. A consortium consisting of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Staphylococcus xylosus*, *Lactiplantibacillus plantarum* and *Carnobacterium maltaromaticum* was successfully cultivated without detectable biotic interactions. Metabarcoding analysis revealed that the system allowed a better maintenance of alpha diversity and produced a propagated bacterial consortium characterized by a structure closer to the initial state compared to non-emulsified medium. This culture system could be an important tool in the field of microbial community engineering.

1. Introduction

Food fermentation processes involve consortia of microorganisms interacting with each other and transforming the matrix into desired final products. Yet, complex starter cultures are composed of a diversity of microorganisms that are mostly cultivated separately before mixing (Smid & Lacroix, 2013). For obvious economic and logistical reasons, both scientists and industrials are willing to rely on alternatives such as mixed cultures. However, the maintenance of taxonomic or phenotypic diversity in a mixed culture is inherently difficult because of microbial interactions. In particular, competition between microorganisms reduces diversity in the local environment in which it takes place (Ghoul & Mitri, 2016). Several co-culture systems have been designed in order to modulate interactions between microorganisms. Most of these systems rely on the degree of spatial segregation and diffusion of molecules between microorganisms (Goers et al., 2014). Sodini et al. designed a method to operate continuous fermentation and inoculation of milk in a bioreactor by entrapping separately four different lactic acid bacteria in carrageenan gel beads (Sodini et al., 1997a). However, this approach leads to the release of bacteria and compounds which ultimately compromise the spatial segregation of microorganisms. Micro-droplets used as bioreactors is now a common approach for the study of bioenergetics, cell-to-cell interactions and co-cultivation of bacteria, and usually relies on the use of microfluidic or millifluidic devices (Boitard et al., 2015). In principle, such systems reduce the diffusion of inhibitory molecules and disrupt contact-dependent competitive phenomena. Invert emulsions of microbial growth medium prepared with microfluidic devices have also been used to encapsulate micro-organisms in order to enrich cultures with slower-growing strains that would otherwise be excluded by the cultivation process (Bachmann et al., 2013; van Tatenhove-Pel et al., 2021). While this technology enables to precisely control the volume of microreactors and work at high throughput, it is nonetheless inappropriate for large scale amplification of bacteria of interest, notably in the context of agroindustry and complex starter culture production. At these scales,

other designs adjusting the degree of interaction between microorganisms have been used. For example, Devanthi et al. have demonstrated the utility of double emulsions ($W_1/O/W_2$) in order to segregate a yeast in the internal W_1 phase, and a bacterium in the external W_2 phase. This cultivation system allowed to propagate these microorganisms while avoiding antagonisms and then to sequentially release them for soy sauce fermentations (Devanthi, El Kadri, et al., 2018b). Similarly, a double emulsion could also be used to enrich yoghurts with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* without interfering with starter cultures and the fermentation process (El Kadri et al., 2018). However, these studies focused on competition related to exploitation of resources and did not consider antagonisms resulting from interference competition which involves the production of antimicrobial compounds such as bacteriocins (Hibbing et al., 2010). Yet, antimicrobial compounds are widespread in microbial ecosystems (Drissi et al., 2015; Rezaei Javan et al., 2018; Walker et al., 2020; H. Wang et al., 2011) and their presence might interfere with a wide range of biotechnological applications involving microbiomes (D'Hondt et al., 2021). In particular, bacteriocins are ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties allowing their producer to exclude a competitor from a shared ecological niche. These compounds are frequently found in lactic acid bacteria (Alvarez-Sieiro et al., 2016; De Vuyst & Leroy, 2007) which are of high biotechnological interest for the food and medical industries (Nes et al., 2015). It is therefore essential to consider the presence of bacteriocins when designing mixed microbial culture systems.

The aim of the present study was to evaluate the potential of single invert emulsions to alleviate competition during the culture of antagonistic microorganisms and therefore to maintain diversity in a more complex mixed culture. Invert emulsions are typically inter-dispersions of two immiscible liquids wherein droplets of an aqueous phase are dispersed in a continuous oil phase. The investigated invert emulsion system was designed in order to confine microorganisms into droplets of aqueous culture medium; the continuous oil phase would provide a physical barrier to either contact or the transfer of diffusible inhibitors between them.

2. Material and methods

Bacterial cultures

Carnobacterium maltaromaticum F2 (Rahman et al., 2014) was isolated by using MCM agar (Trypticase Soy Agar (TSA) (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) with 6 g L⁻¹ of yeast extract (YE), supplemented with 3.5 mg L⁻¹ vancomycin, 5 mg L⁻¹ gentamicin and 20 mg L⁻¹ nalidixic acid) (Edima et al., 2007) with a sterile loop and incubating the plates at 25°C for 36 h. Isolates of *Listeria monocytogenes* EGDe were prepared by inoculation of PALCAM agar (Biokar Diagnostics, Paris, France) followed by incubation at 37°C for 24 h. Colonies were inoculated into fresh Trypticase Soy Broth (TSB) medium (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) supplemented with 6 g L⁻¹ of bacto-yeast extract (YE), bacteria were allowed to grow at 30°C for 24 h. Aliquots of the resulting culture were supplemented with glycerol to a final concentration of 10% (v/v) and kept at -80°C for later use as starter cultures. Other strains used in bacterial consortium cultivation experiments were obtained from various sources, as shown in Table 1. Twenty-four hours before the experiments, separate pre-cultures of each strain were prepared by cultivation in TSBYE for 24 h at their optimal growth temperature (Table 1).

Table 1. Bacterial strains used in this study

Strain	Growth temperature (°C)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar diacetylactis	25
<i>Streptococcus thermophilus</i>	42
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	25
<i>Staphylococcus xylosus</i>	30
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> F2	30
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> WHE92	30
<i>Brevibacterium linens</i>	25
<i>Listeria monocytogenes</i> EGDe	37
<i>Escherichia coli</i> DH5- α pGLO	37

Just prior to the experiments, cultures were prepared for each strain by diluting the pre-cultures into fresh medium until a final bacterial density of 10^6 CFU mL⁻¹, unless otherwise specified. Mixed cultures of *C. maltaromaticum* F2 and *L. monocytogenes* EGDe were prepared from individual pre-cultures to obtain a cell-to-cell ratio of 1:1. Non-emulsified pure and mixed cultures were incubated 24 h at 30°C to serve as control in emulsified cultivation experiments. For bacterial consortium cultivation experiments, mixed cultures of the aforementioned bacteria were prepared by mixing equal volumes of pre-cultures in fresh TSBYE medium, final volume 20 mL, so as to obtain a total density of 10^6 CFU mL⁻¹. Classical cultures were produced by using 15 mL from the new mixture while 3 mL were used for producing invert emulsion cultures. Mixed cultures were then incubated at 30°C for 72 h. In parallel, each strain was cultivated separately in both systems. After 72 h incubation, equal volumes of cultures in classical setup and invert emulsion were pooled and used as controls simulating the absence of interaction in classical setup or invert emulsion, respectively. Propagation of a bacterial consortium was performed in quadruplicate; pure culture experiments were performed in triplicate. *Escherichia coli* DH5- α was transformed with the pGLO plasmid according to Sambrook and Russell (Sambrook & Russell, 2001), allowing the bacterium to express Green Fluorescent Protein (GFP) when cultivated in the presence of arabinose. This strain was maintained on TSAYE containing 100 μ g mL⁻¹ ampicillin and 33 μ g mL⁻¹ D,L-arabinose.

Bacterial enumeration

Cultures were ten-fold serially diluted in tryptone-salt solution (Biokar Diagnostics, Paris, France) with 2% Tween[®] 80 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) with thorough vortexing. Serial dilutions were used to inoculate agar medium Petri dishes in order to count colonies for enumeration after cultivation. Non-specific enumeration was performed on TSAYE, while specific enumerations in competition experiments were performed on the selective agar media MCM and PALCAM for *C. maltaromaticum* F2 and *L. monocytogenes* EGDe, respectively. TSAYE and MCM plates were incubated at 25°C for 36–48 h for *C. maltaromaticum* F2, while

TSAYE and PALCAM plates were incubated at 37°C for *L. monocytogenes* EGDe. Given the proportion of aqueous medium in the invert emulsion, raw cell numbers in emulsified cultures were corrected by a factor of 5. Experiments were performed in triplicate.

Growth kinetics upon 24 h

Growth parameters were obtained by using R (R Core Team, 2021) and the R package *growthrates* (Petzoldt, 2020). The Baranyi growth model was fitted to enumeration data (Baranyi & Roberts, 1994, 1995). Box constraints in the Baranyi model, namely initial N value (y_0), maximum growth rate (μ_{max}), carrying capacity (K) i.e., maximal population density and initial physiological state $h_0 = \mu_{max} \times lag$ were extracted from prior observation of the dataset and applied in order to optimize the fitting before growth parameters were estimated. Generation time was obtained by the formula $\ln(2) \div \mu_{max}$. Lag time values were obtained by dividing the h_0 parameter of the model by μ_{max} . Experiments were done in triplicate.

Invert emulsions

Small-scale invert emulsions were prepared by dropwise addition of 3 mL sterile or inoculated TSBYE into a mix of 11.625 g refined sunflower oil (Système U, Rungis, France) and 375 mg polyglycerol polyricinoleate (PGPR) (Palsgaard A/S, Juelsminde, Denmark), i.e., PGPR 2.5% of the total weight, in a 40 mL, 30 mm diameter vial (CEB, Angers, France). Emulsification was ensured by a magnetic stirrer (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) using a polygonal stir bar with pivot ring (L: 20 mm; Ø 6 mm) at 400 rpm and 20°C, during 5 min counting from the moment the last drop of aqueous phase was added. After emulsification, the invert emulsions were transferred into a 15 mL CELLSTAR® centrifugation tube (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Austria) and placed on a Stuart SB-2 tube rotator (Cole-Parmer LLC, Vernon Hills, USA) at 20 rpm, the tube holder having a 45° tilt in order to avoid both sedimentation and excessive shear of

the samples. The samples were incubated at 30°C under continuous rotation to allow bacterial propagation.

Bioreactor-scale emulsification took place in aseptic conditions in a 1 L bioreactor (GPC, Périgny, France). It was carried out at 30°C by addition under stirring at 250 rpm with a 6-bladed Rushton propeller of 120 mL inoculated TSBYE in a mix of 465 mL sunflower oil and 15 g PGPR. The stirring speed was reduced to 175 rpm after 20 min in order to maintain droplets in suspension for the rest of the experiment.

The breaking of 1.5 mL of invert emulsion was carried in several steps according to a protocol adapted from Bachmann et al. (Bachmann et al., 2013). First, the oil phase was removed after centrifugation of the sample at 5000 rcf for 10 min. Then, 300 μ L 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluoro-1-octanol (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, MO, USA) were added and the sample was shaken gently over 15 min. Finally, the mix was let still until phase separation.

Particle size distribution

Particle size distribution was determined by dynamic image analysis using the QICPIC granulomorphometer with LIXELL dispersion system (Sympatec GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Germany) coupled with the QICPIC image analysis software. This technique is based on the acquisition of high-resolution pictures of particles (herein droplets) within a liquid solution (Yu & Hancock, 2008). Just before analysis, 0.5 mL of emulsion was gently diluted into 50 mL sunflower oil. The dilution was then injected into the 0.2 mm cuvette using a syringe. Measurement time was 30 s per run and each measurement was done in triplicate. Diameters were automatically sorted into 30 classes ranging from 3 to 750 μ m. Particle size distributions were expressed as the volumetric density distribution (q3lg) for each class of diameter. The span values, normalizing the width of the distribution relatively to the median value d_{50} , were calculated as:

$$\text{span} = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}}$$

where d_{10} and d_{90} are the first and ninth deciles and d_{50} is the median of the particle size distribution.

Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

The day before CLSM observations, fluorescent isolates of *Escherichia coli* DH5- α pGLO were transferred into 10 mL TSBYE supplemented with ampicillin $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ and D,L-arabinose $33 \mu\text{g mL}^{-1}$ for overnight preculture at 37°C under vigorous agitation. On the day of the experiment, this culture was emulsified. Fifty microliters of the freshly prepared emulsified culture were collected and added to $950 \mu\text{L}$ sunflower oil. Ten microliters of the lipophilic stain Nile Red (Sigma-Aldrich Corporation, Saint-Louis, MO, USA) were added to the mix thereafter homogenized by mild inversions. Twenty-five microliters of the mix were deposited on a microscope slide to which the coverslip was then sealed with lacquer. Imaging was performed on a TCS SP5-X-AOBS confocal microscope with white light laser (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Magnification was $100\times$ with a numeric zoom factor of 5. Excitation and emission wavelengths λ_{ex} and λ_{em} for the observation of the bacteria and continuous phase were determined by prior spectral scanning (Supplementary Information: Figure 19). Retained values were $\lambda_{\text{ex}}(\text{GFP}) = 481 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}(\text{GFP}) = 499\text{--}517 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{ex}}(\text{Nile Red}) = 539 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}(\text{Nile Red}) = 559\text{--}613 \text{ nm}$. Images were acquired in sequential mode to avoid fluorescence crosstalk, then enhanced and exported using LAS X software (Leica).

Inhibition assays on agar

Twenty-five microliters of supernatant obtained from non-emulsified cultures or broken emulsified cultures of *Carnobacterium maltaromaticum* F2 were heated to 80°C for 30 min in order to kill remaining bacteria. The treated supernatants were then added into wells dug in soft TSAYE plates pre-inoculated with a pre-culture of *L.*

monocytogenes EGDe so as to obtain a final OD₅₉₀ of 0.01. Plates were stored at 4°C during 24 h to allow diffusion of the deposits, then incubated 24 h at 30°C to allow growth of *L. monocytogenes* EGDe. This method was adapted from the agar well diffusion assay method described by Holder and Boyce (Holder & Boyce, 1994).

DNA extraction and amplification of the 16S rRNA V4 region and sequencing

The DNA extraction was performed in two steps using the NucleoSpin Food® kit (Macherey–Nagel, Düren, Germany). Briefly, 1.5 mL of bacterial suspension were centrifugated at 10,000 rcf during 10 min and the supernatant was discarded. The pellet was then suspended in 550 µL 65°C preheated lysis buffer, to which 10 µL of 10 mg mL⁻¹ proteinase K were added. The homogenized mixture was then incubated at 65°C for 3 h, before 10 µL of 20 mg mL⁻¹ RNase and between 200 and 300 mg of sterile, UV-treated glass beads (150–212 µm diameter) were added. The new mixture was then shaken at 3200 rpm on a Vortex Génie 2 horizontal agitator (Scientific Industries, New York, USA) for 1 h at room temperature before centrifugation at 10,000 rcf for 10 min. The supernatant was then used for DNA purification according to the manufacturer's instructions.

Polymerase chain reaction (PCR) targeted the v4 region of the 16S rRNA gene, using three variants of the forward 515F primer (10 µM) at equal volumes, and the reverse 806R primer (10 µM) (Table 2) (Caporaso et al., 2011).

Table 2. Primers with adapters used for amplification of bacterial 16S rRNA (V4) gene and sequencing. The primer sequence hybridizing to DNA appears in bold characters.

Forward	515F-1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNN GTGCC AGCMGCCGCGGTAA
	515F-2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNN GTGCCA GCMGCCGCGGTAA
	515F-3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNN GTGCCAG CMGCCGCGGTAA
Reverse	806R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNN GGAC TACHVGGGTWCTAAT

Five microliters of 20 ng μL^{-1} DNA extract were transferred into 45 μL PCR mix containing 37.8 μL DNA-grade water, 5 μL AccuPrime™ Buffer II (Invitrogen, Carlsbad, USA), 1 μL of each primer at 10 μM , 0.2 μL AccuPrime™ *Taq* DNA polymerase High Fidelity. After an initial denaturation step at 94°C for 3 min, 35 PCR cycles were performed as follows: 10 s denaturation at 94°C, 45 s hybridization at 50°C, 1 min 30 s elongation at 68°C. The duration of the final elongation step was 10 min. Miseq V2 Illumina sequencing was conducted by ADNid (Monferrieux-sur-Lez, France), providing 2×250 bp reads.

Sequence analysis

The processing of the sequencing reads was conducted using FROGS tools (Escudié et al., 2018) on the Galaxy Migale platform. Bacterial 16S rRNA (V4 region) paired-end reads were merged with a maximum mismatch rate of 10% in the overlap region. Denoising consisted of removing reads that did not match the expected length (i.e., between 240 and 300 bp) or containing ambiguous bases (N). After dereplication, clustering of sequences was conducted with the fastidious option in SWARM, a single-linkage clustering algorithm using a local clustering threshold (aggregation distance of 1 in the present work) (Mahé et al., 2015). Chimeras were removed and only the 6 most abundant OTUs were kept. Taxonomic affiliation was performed by Blast against the EZBioCloud 16S database (Yoon et al., 2017). The abundance table was then imported into R (R Core Team, 2021) for further analysis. Alpha and beta diversity analyses were conducted using tools from the ‘vegan’ R package (Oksanen et al., 2022). For beta diversity, Bray–Curtis distances were calculated with the ‘avgdist’ function, using rarefaction at the minimal sequencing depth (31,444 sequences) upon 100 iterations. Hierarchical clustering of samples was conducted by processing the rarefied distance matrix with the built-in ‘hclust’ function using Ward’s method for agglomeration (Murtagh & Legendre, 2014).

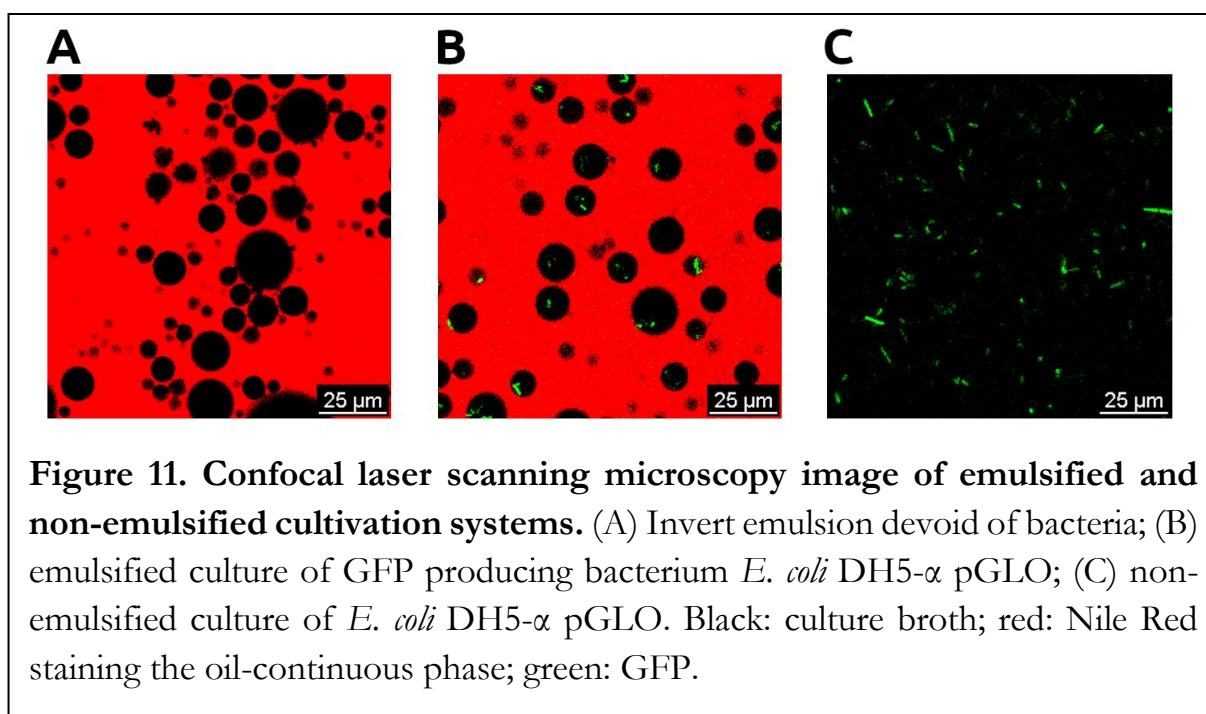
Statistical analysis

Tests for statistical significance were performed on at least three repetitions using R (R Core Team, 2021). Experimental data obtained in this study were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA) using a fixed effects model, followed by Tukey's HSD test. In the droplet size distributions of the invert emulsions, factors involved were the presence or absence of bacteria, and the incubation of invert emulsions (0 h or 24 h incubation). In bacterial enumerations, factors were the cultivation system used (classical system or invert emulsion) and the incubation (0 h or 24 h incubation). In community cultivation experiments, differences in Shannon diversity index between groups of samples were tested using one-way ANOVA, followed by a Tukey's HSD test. Results were expressed as means $\pm$ SEM (Standard Error of the Mean). Differences were considered to be statistically significant when P value was inferior to 0.05. In the figures, means $\pm$ SEM followed by a different superscript letter indicate a significant difference ($P < 0.05$).

3. Results

Structure of the invert emulsion

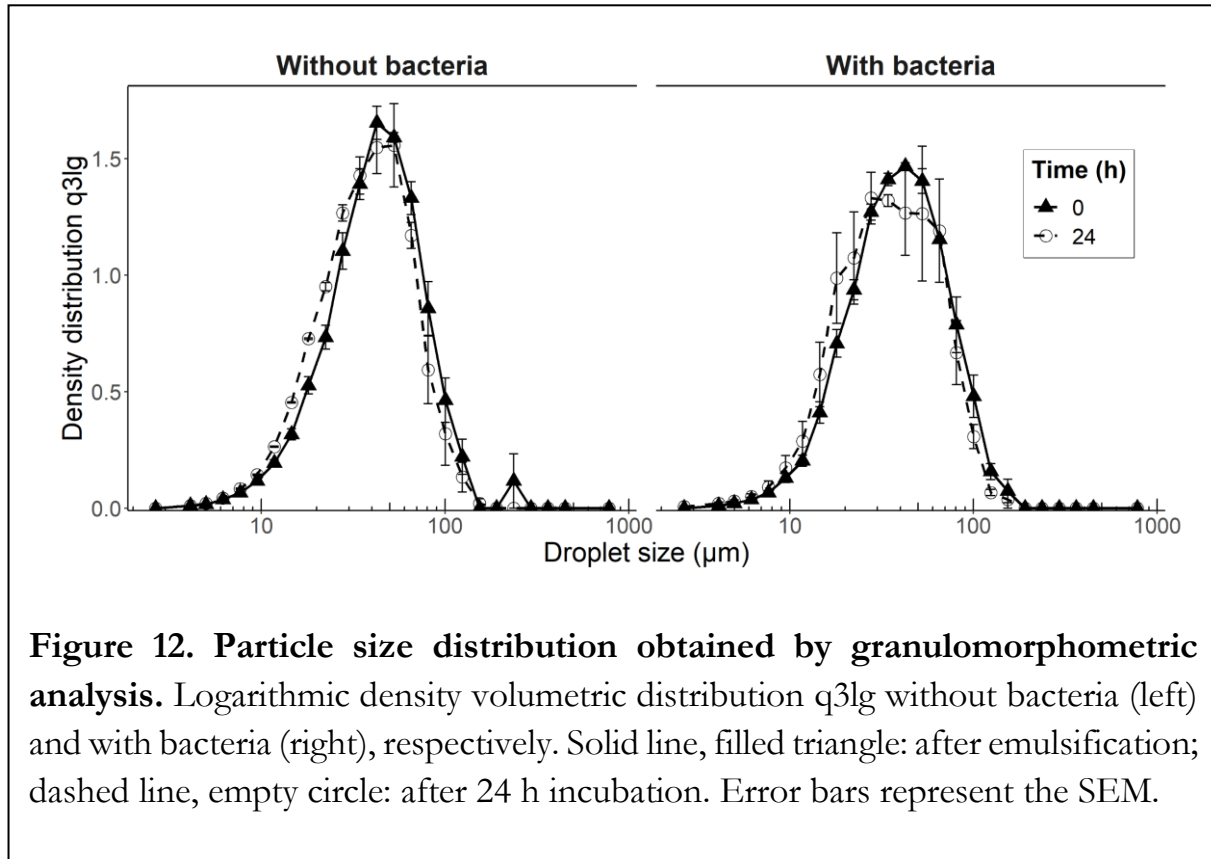
An invert emulsion free of bacteria was produced by dispersing TSBYE culture medium in a mixture of sunflower oil and the surfactant PGPR. The observation of the emulsion by CLSM confirmed that the system was an invert emulsion as the continuous phase was labelled by the Nile red dye (Figure 11A). The black circular droplets represented the emulsified phase containing the culture medium.



Granulomorphometry allowed to evaluate droplet size distribution in the sample before and after 24 h incubation at 30°C. Granulomorphometric analysis of freshly prepared emulsions revealed that 80% of the dispersed phase was contained in droplets of $d_{10} = 18.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$ to $d_{90} = 84.1 \pm 6.6 \mu\text{m}$ diameter, the median diameter in the volumetric distribution was $d_{50} = 43.1 \pm 1.7 \mu\text{m}$ (Figure 12, left).

After 24 h incubation, 80% of the volume was contained in droplets whose diameters were comprised between $d_{10} = 16.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ and $d_{90} = 74.7 \pm 5.6 \mu\text{m}$ ($d_{50} = 38.2 \pm 0.8 \mu\text{m}$) (Figure 12, left). The width of the distribution, described by

span, was 1.52 ± 0.08 after emulsification and did not change after 24 h incubation (1.52 ± 0.12). Droplet size changes in the invert emulsion which could have been occurred by Ostwald ripening or coalescence would have led to a displacement of the distribution towards greater diameters, yet such displacement was not observed.



These results show that the obtained invert emulsion was sufficiently stable during 24 h at 30°C. Considering that most of the volume of the dispersed phase was comprised in droplets whose sizes were deemed compatible with the hosting of bacteria, the bacterium *Carnobacterium maltaromaticum* F2 was then introduced in the culture broth before emulsification. After emulsification, most of the volume was contained in droplets whose diameter was comprised between $d_{10} = 17.3 \pm 0.7 \mu\text{m}$ and $d_{90} = 81.0 \pm 4.2 \mu\text{m}$ ($d_{50} = 39.3 \pm 1.5 \mu\text{m}$) (Figure 12, right). Similarly, the bulk of the volume was contained in droplets from $d_{10} = 15.9 \pm 1.8 \mu\text{m}$ to $d_{90} = 73.1 \pm 2.2 \mu\text{m}$ in diameter ($d_{50} = 35.1 \pm 4.5 \mu\text{m}$) after 24 h incubation (Figure 12, right). Span values for invert emulsions containing bacteria were approximately 1.62 ± 0.04 after emulsification and 1.68 ± 0.18 after 24 h incubation. Thus, neither

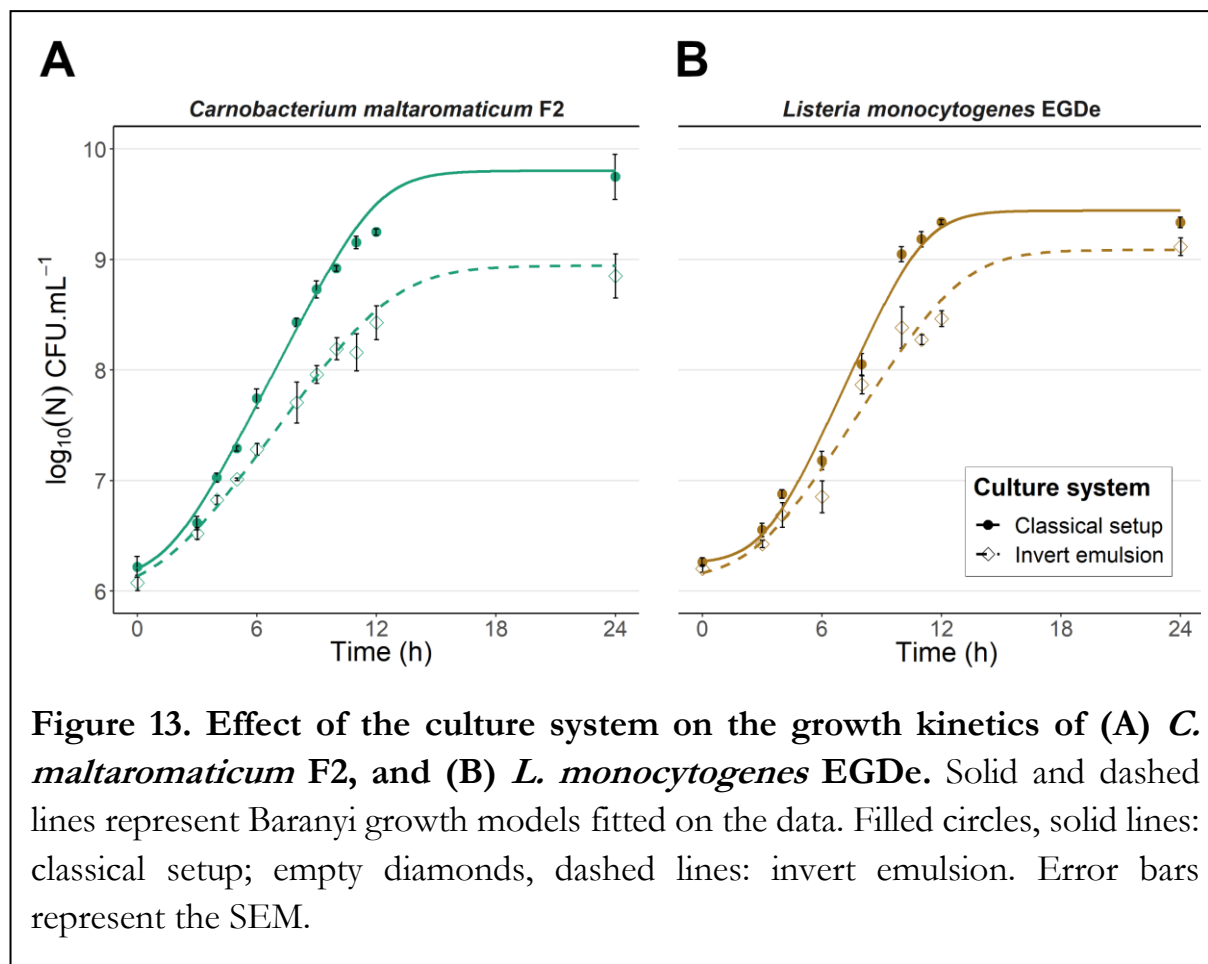
d_{50} nor span were significantly affected by introduction of bacteria or incubation (P value ≥ 0.05). In a similar manner, an invert emulsion was prepared with a culture of the aero-anaerobic bacterium *Escherichia coli* DH5- α expressing a green fluorescent protein (GFP) with the aim of localizing bacteria in the system using CLSM. It showed that the fluorescent bacteria were confined in these droplets, therefore spatially segregated by the continuous phase (Figure 11B) as opposed to a non-emulsified culture where all bacteria shared the same space (Figure 11C). As the introduction of bacteria had a negligible effect on both structure and stability of the system, the invert emulsion system was considered suitable for bacterial cultivation assays.

Bacterial culture in invert emulsion

In order to investigate the impact of invert emulsion on competition, a model couple of antagonistic bacteria was constituted. The model consists of *Carnobacterium maltaromaticum* F2 which produces a Bacteriocin-Like Substance (BLIS) able to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* EGDe, as illustrated by the presence of an inhibition halo on a double-layer agar assay (Supplementary Information: Figure 20). Each bacterium was first cultivated separately in invert emulsion and in non-emulsified medium (i.e., classical setup). The mean generation time of *C. maltaromaticum* F2 reached approximately 52 ± 4 min in non-emulsified culture while it reached approximately 70 ± 3 min in invert emulsion (P value < 0.05) (Figure 13A).

The lag time was similar in both culture systems: 108 ± 8 min in classical culture and 109 ± 3 min in invert emulsion. The mean carrying capacity in invert emulsion was $8.86 \pm 0.19 \log_{10}$ CFU mL⁻¹, significantly lower than in a classical system where it reached $9.69 \pm 0.21 \log_{10}$ CFU mL⁻¹ (P value < 0.05). Similar differences were observed between culture systems with *L. monocytogenes* EGDe (generation time of approximately 45 ± 1 min in non-emulsified culture and 63 ± 5 min in invert emulsion) but were not statistically significant (P value ≥ 0.05) (Figure 13B), as well as the differences in lag time (193 ± 2 min in classical culture

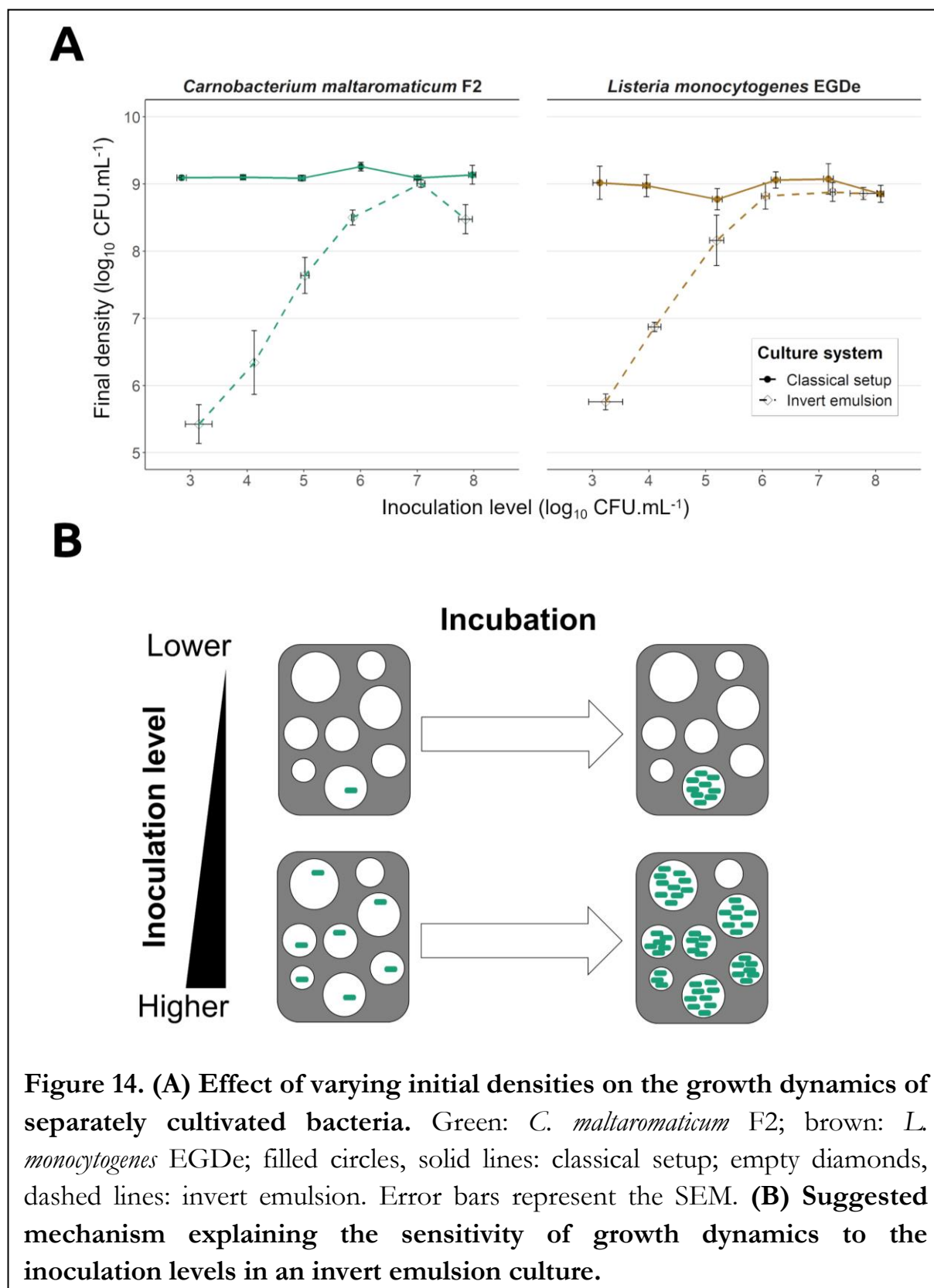
and 169 ± 31 min; P value ≥ 0.05). The carrying capacity was significantly lower in invert emulsion ($9.07 \pm 0.09 \log_{10}$ CFU mL⁻¹) than in a classical system ($9.44 \pm 0.03 \log_{10}$ CFU mL⁻¹) (P value < 0.05). These results show that bacteria can grow in an invert emulsion. In addition, invert emulsion led to a lower carrying capacity of the medium and a lower growth rate for *C. maltaromaticum* F2.



The impact of inoculation levels on growth capacity was subsequently investigated by cultivating *C. maltaromaticum* F2 and *L. monocytogenes* EGDe separately with different initial densities. In non-emulsified culture, the final level of bacterial densities was approximately the same and reached 10^9 CFU mL⁻¹ for both bacteria (Figure 14A, left and right, Supplementary Information: Table 3).

Consequently, and as expected, the inoculation level had a low impact on the final densities in a non-emulsified medium. By contrast, in invert emulsified medium the final density of *C. maltaromaticum* F2 increased when the inoculum increased from 10^3 to 10^6 CFU mL⁻¹ and reached the same amount as in a classical culture at the

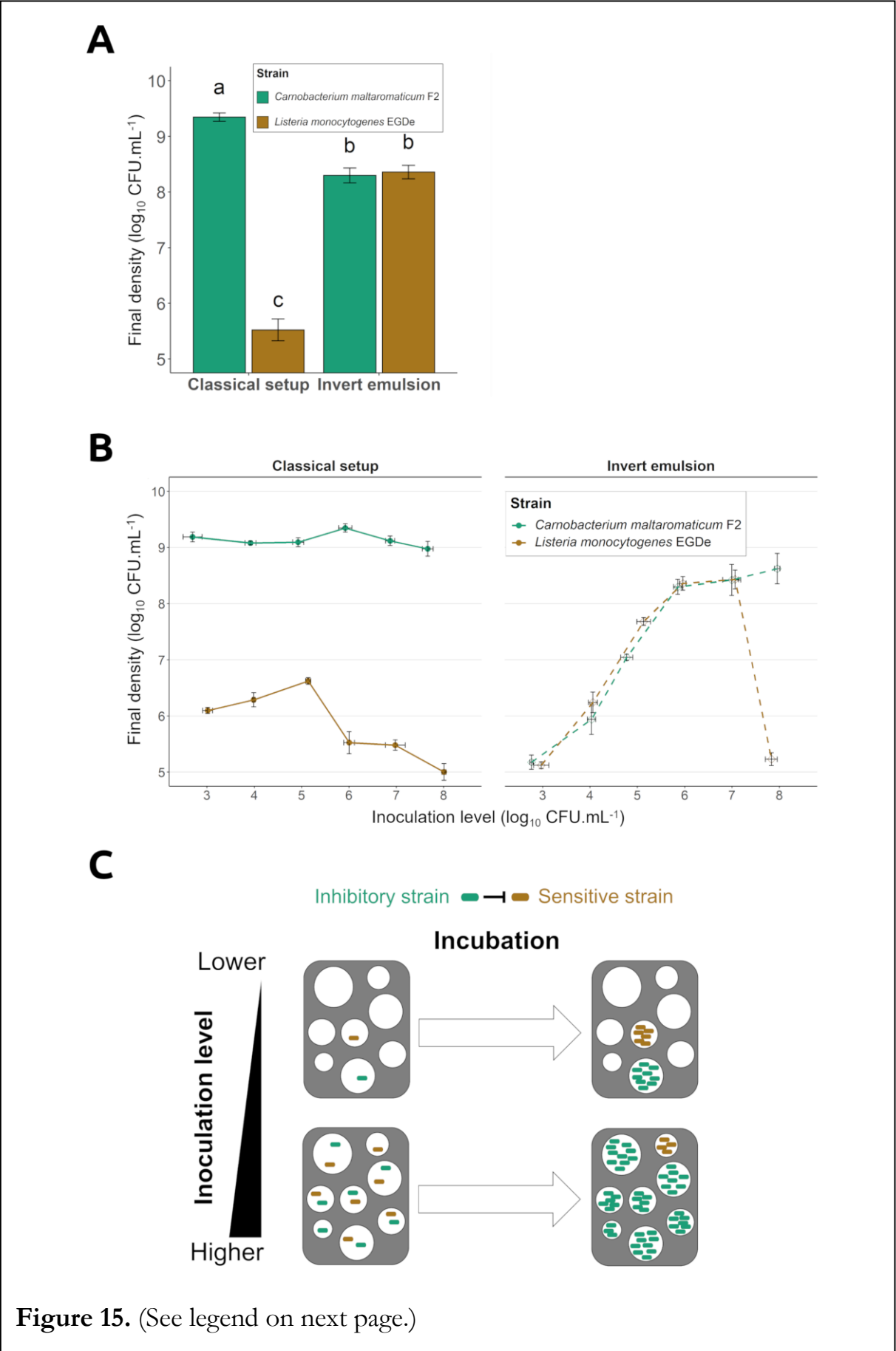
10^7 CFU mL⁻¹ inoculation level (Figure 14A, left, Supplementary Information: Table 3). At the highest inoculation level (10^8 CFU mL⁻¹), the bacterial density slightly decreased (Figure 14A, left, Supplementary Information: Table 3).



In terms of amount of growth, given by the final density divided by the initial density, the increase of *C. maltaromaticum* F2 populations in invert emulsion averaged $2.4 \log_{10}$ regardless of the inoculation level between 10^3 and 10^6 CFU mL⁻¹. The amount of growth then decreased to $1.9 \log_{10}$ when the invert emulsion was inoculated with 10^7 CFU mL⁻¹, and to $0.6 \log_{10}$ when the inoculum was of 10^8 CFU mL⁻¹. Similarly, the final density of *L. monocytogenes* EGDe increased with the initial density when comprised between 10^3 and 10^6 CFU mL⁻¹, then reached its maximum approximating 10^9 CFU mL⁻¹ from 10^6 CFU mL⁻¹ inoculation level (Figure 14A, right, Supplementary Information: Table 3). More precisely, the amount of growth of *L. monocytogenes* EGDe in invert emulsion averaged $2.8 \log_{10}$ from the 10^3 to 10^6 CFU mL⁻¹ inoculation levels. It then decreased to $1.6 \log_{10}$ at the 10^7 CFU mL⁻¹ inoculation level and finally to approximately $1.1 \log_{10}$ at the highest inoculation level. This experiment demonstrates that the growth dynamics of bacteria cultivated in invert emulsion remains constant as long as the initial density remains inferior to 10^6 to 10^7 CFU mL⁻¹. When this threshold is reached, growth dynamics diminish and the final densities do not exceed those retrieved in a classical system. Therefore, bacteria should be inoculated under this threshold in order to preserve maximal growth dynamics in invert emulsion. Overall, these results suggest that the invert emulsion culture system is sensitive to the inoculation level. Especially, higher inoculation levels lead to higher final densities as the occupancy rate of droplets increases until it reaches its limits. The suggested behavior is illustrated in Figure 14B.

Impact of invert-emulsion culture on interference competition

In order to study the effect of invert emulsions on competition between *C. maltaromaticum* F2 and *L. monocytogenes* EGDe, both strains were co-cultivated with an initial cell-to-cell ratio of 1:1. Bacterial densities were separately enumerated by using selective media. When bacteria were co-inoculated in a classical system at 10^6 CFU mL⁻¹, *C. maltaromaticum* F2 reached approximately 10^9 CFU mL⁻¹ (Figure 15A, left, Supplementary Information: Table 4).



(See figure on previous page.)

Figure 15. (A) Effect of the culture system on competition between antagonistic strains in a mixed culture, bacteria were co-inoculated with an initial density of 10^6 CFU mL⁻¹. **(B) Effect of varying initial densities on competition between antagonistic strains in a mixed culture.** **(C) Suggested bacterial segregation mechanism leading to the alleviation of competition and sensitivity of this property to inoculation levels.** Green: *C. maltaromaticum* F2; brown: *L. monocytogenes* EGDe; filled circles, solid lines: classical setup; empty diamonds, dashed lines: invert emulsion. Error bars represent the SEM; a different superscript letter indicate a statistically significant difference (P value < 0.05).

This is similar to the growth of the bacterium observed in a pure classical culture at this inoculation level (Figure 14A, left, Supplementary Information: Table 3). As expected, *L. monocytogenes* EGDe densities were markedly low ($5.5 \pm 0.2 \log_{10}$ CFU mL⁻¹) at the end of a classical mixed culture (Figure 15A, left, Supplementary Information: Table 4). However, when the antagonistic strains were co-cultivated in invert emulsion, both displayed growths up to approximate final densities of 10^8 CFU mL⁻¹ and growth dynamics approximating $2.3 \log_{10}$ (Figure 15B, right, Supplementary Information: Table 4). These outcomes are consistent with the final densities and growth dynamics observed in pure cultures of each strain in invert emulsion at this inoculation level (Figure 14A, left and right, Supplementary Information: Table 3). These results therefore depict the absence of competition in invert emulsion, invert emulsions thus alleviate the effects of competition between antagonistic strains. As the inoculation level impacted the growth dynamics in pure cultures, we further investigated the effect of initial bacterial densities on competition. In classical mixed culture and regardless of the inoculation levels, final densities of *C. maltaromaticum* F2 reached $9 \log_{10}$ CFU mL⁻¹ while those of *L. monocytogenes* EGDe never exceeded approximately $6.6 \log_{10}$ CFU mL⁻¹ (Figure 15B, left, Supplementary Information: Table 4). As expected, the inhibitor strain therefore dominated the sensitive strain in classical mixed culture. In invert emulsion, the final density of the inhibitor strain *C. maltaromaticum* increased with the inoculation level

and growth dynamics were relatively constant (approximately $2.3 \log_{10}$ on average), until a threshold was reached at 10^6 CFU mL⁻¹ inoculation level, above which the density only slightly increased (Figure 15B, right, Supplementary Information: Table 4). This shows that *C. maltaromaticum* F2 was not affected by the introduction of *L. monocytogenes* EGDe in invert emulsion. In invert emulsion, population densities of the sensitive strain *L. monocytogenes* EGDe presented an analogous trend of increasing densities and almost steady growth dynamics (approximately $2.3 \log_{10}$ on average) for inoculation levels from 10^3 to 10^6 CFU mL⁻¹. Final densities reached a maximum ($8.4 \log_{10} \pm$ CFU mL⁻¹) at 10^6 – 10^7 CFU mL⁻¹ inoculation levels (Figure 15B, right, Supplementary Information: Table 4). This shows that when bacteria were co-inoculated between 3 and 7 $\log_{10}$ CFU mL⁻¹, the invert emulsion prevented *L. monocytogenes* EGDe from inhibition by the competitor. However, at the highest inoculation level (10^8 CFU mL⁻¹), the density of the sensitive strain decreased to approximately 10^5 CFU mL⁻¹ which corresponded to a $2.6 \log_{10}$ fold decrease (Figure 15B, right, Supplementary Information: Table 4). This result contrasted with that of a pure culture of *L. monocytogenes* EGDe in invert emulsion, where the final density was approximately 10^9 CFU mL⁻¹ (Figure 14A, right, Supplementary Information: Table 3) and was similar to that of a mixed culture in a classical system (Figure 15B, left, Supplementary Information: Table 3). This result shows that competition occurred in the invert emulsion system as it occurred in a classical cultivation system when bacteria were co-inoculated at 10^8 CFU mL⁻¹. The observed competitive phenomenon was likely due to the co-localization of competitors within single droplets in invert emulsion that resulted from the high inoculation level involved, as represented in Figure 15C. These results demonstrate that the inoculation level for a binary co-culture should not exceed 10^7 CFU mL⁻¹ in order to benefit from the competition-alleviating properties of invert emulsions.

A control experiment was performed in order to check that the model strain *C. maltaromaticum* F2 was able to produce diffusible inhibitory compound under cultivation in emulsified medium. For this purpose, *L. monocytogenes* EGDe was

exposed to the aqueous phase from an emulsified culture of *C. maltaromaticum* F2 in an agar assay (Supplementary Information: Figure 22A). Antimicrobial activity was observed around wells containing aqueous phases of emulsified cultures of *C. maltaromaticum* F2 showing that cultivation in invert emulsion did not prevent the bacterium from producing diffusible antimicrobial substances against *L. monocytogenes* EGDe (Supplementary Information: Figure 22B) as it did in classical culture (Supplementary Information: Figure 22A). In addition, a third well contained an emulsion wherein *C. maltaromaticum* F2 had grown, without further treatment. The absence of inhibition zone around this deposit showed that the invert emulsion prevented the diffusion of inhibitory substances into the agar containing *L. monocytogenes* EGDe (Supplementary Information: Figure 22C).

Altogether, these results demonstrated that the invert emulsion culture system limited the effects of interference competition in a mixed culture.

Scaling-up the invert emulsion cultivation system

A scale-up (40-fold) the invert emulsion culture system was performed. To do so, we used a bioreactor of 1 L capacity to produce 600 mL of emulsified culture medium. The particle size distribution was similar to small-scale emulsions with an initial $d_{50} = 39.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$ and a span of 1.27 ± 0.01 in non-inoculated invert emulsions. After 24 h incubation, the distribution was significantly displaced towards smaller droplets ($d_{50} = 24.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$) and was less polydisperse (span = 1.12 ± 0.01) (P value < 0.001) (Supplementary Information: Figure 21, left). The introduction of bacteria significantly displaced the distribution towards smaller droplets ($d_{50} = 32.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$) and monodispersity (span = 1.22 ± 0.01) (P value < 0.001). Incubation significantly decreased the median diameter of droplets ($d_{50} = 22.9 \mu\text{m}$, P value < 0.001) and the polydispersity of the invert emulsion (span = 1.08 ± 0.01 , P value < 0.001) (Supplementary Information: Figure 21, right). After checking that *C. maltaromaticum* F2 and *L. monocytogenes* EGDe grew in bioreactor, these strains were then co-inoculated at 10^6 CFU mL⁻¹. As expected, the classical culture was highly

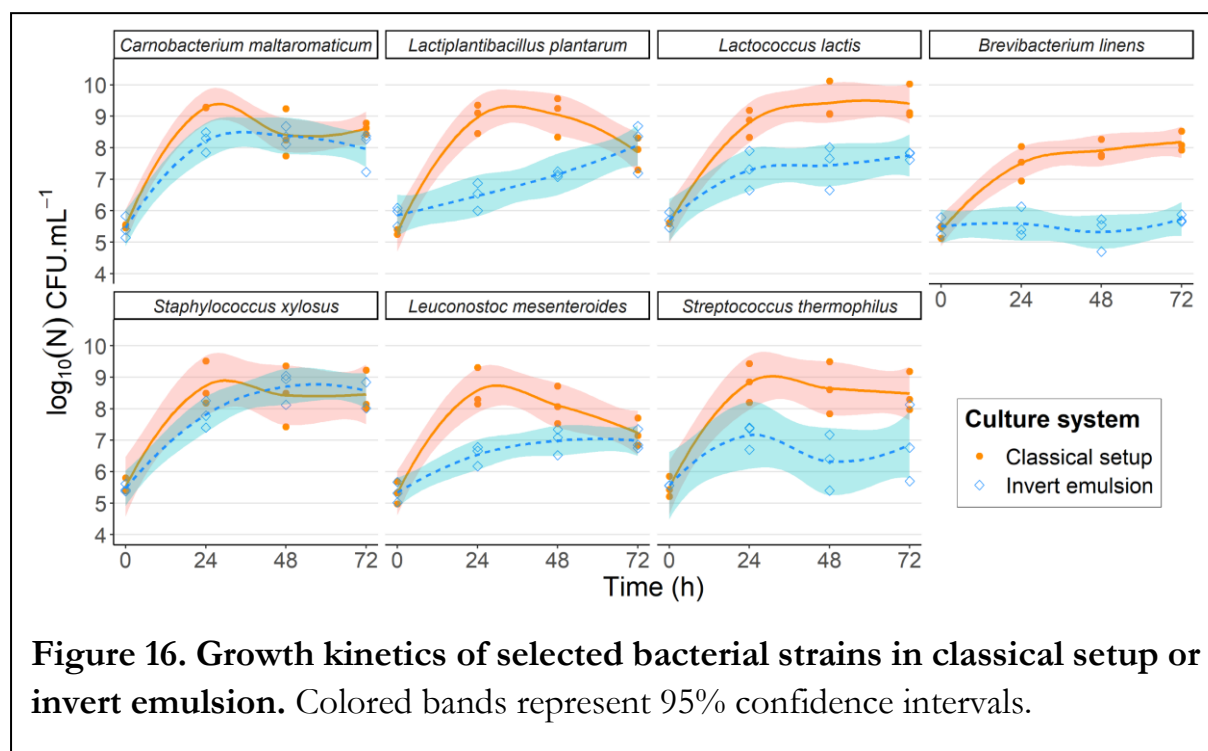
favorable for *C. maltaromaticum* F2 whose densities reached $8.5 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU mL⁻¹ after 24 h incubation. In contrast, *L. monocytogenes* EGDe reached $6.1 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU mL⁻¹. In invert emulsion, *C. maltaromaticum* F2 and *L. monocytogenes* EGDe reached 8.2 ± 0.1 and $8.1 \pm 0.3 \log_{10}$ CFU mL⁻¹ respectively. The antagonistic model thus displayed competition in non-emulsified culture but not in invert emulsion, in a similar way to the small-scale condition. This demonstrates that the invert emulsion system can be used at larger scales to reduce competition between a couple of antagonistic bacteria.

Effect of the invert emulsion system on the growth of different strains

Seven bacterial strains belonging to different species typically found in cheese microbiomes were selected to evaluate the effect of invert emulsion on the growth of different bacteria. Namely, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis, *Streptococcus thermophilus*, *Brevibacterium linens*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Staphylococcus xylosus*, *Lactiplantibacillus plantarum* WHE92 and *Carnobacterium maltaromaticum* F2 (as a control) were cultivated separately in a classical setup or in invert emulsion on the course of 72 h incubation and enumerated each 24 h. Results show that strains exhibited different behaviors upon cultivation in invert emulsion (Figure 16).

In the extremes, *C. maltaromaticum* and *S. xylosus* showed similar growth in invert emulsion compared to the classical setup, while *B. linens* did not grow. Interestingly, densities of *L. mesenteroides* and *L. plantarum* were similar after 72 h incubation in invert emulsion and in classical setup, but growth kinetics were slower and no decline phase was observed in invert emulsion. *L. lactis* and *S. thermophilus* were able to grow in invert emulsion, however the final densities in this system were between 1 and 2 log₁₀ lower after cultivation with this method compared to the classical setup.

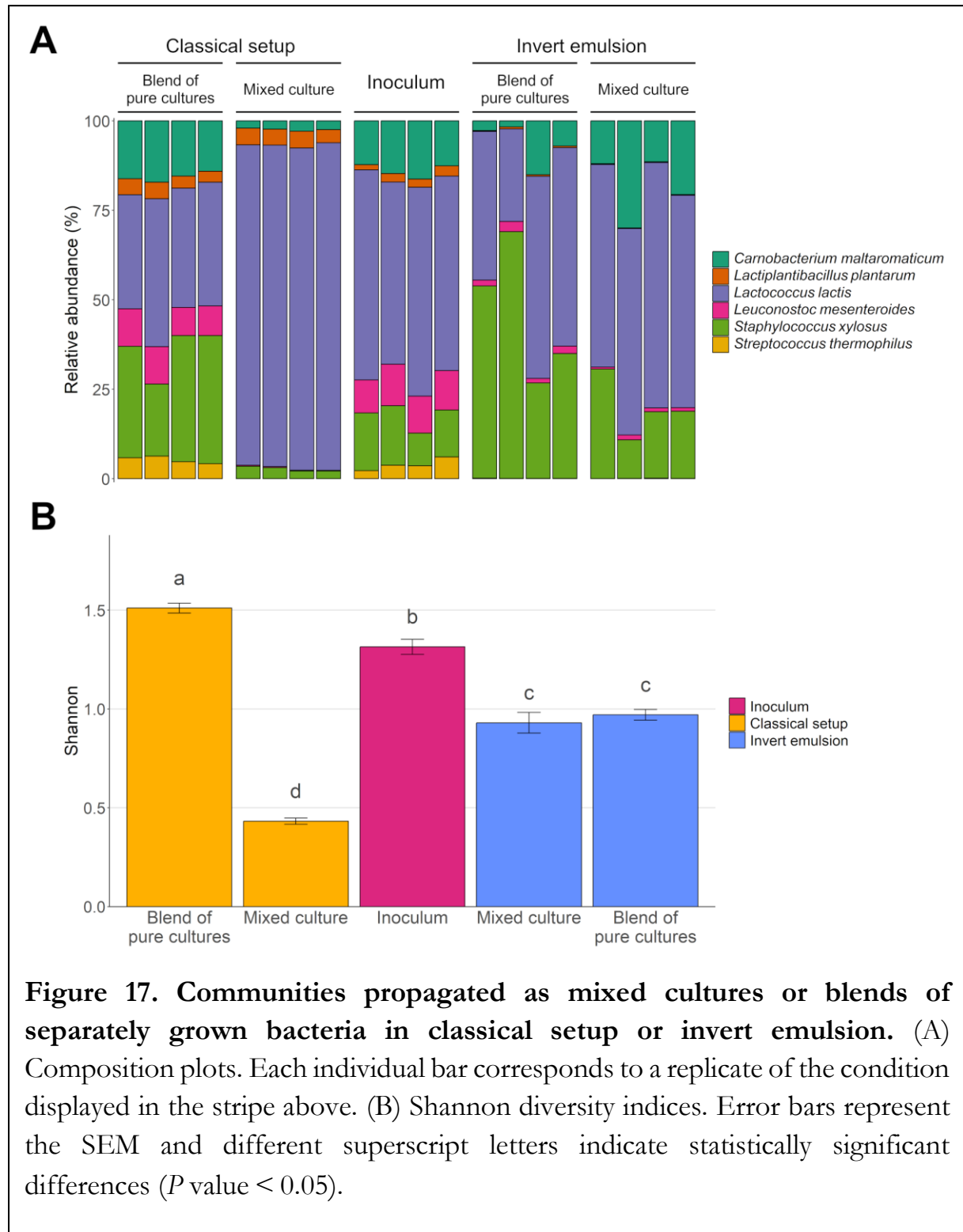
These results show that invert emulsion culture is not a neutral system for the growth of bacteria opening the possibility that this device can induce changes in structures of cultivated communities.



Propagation of a bacterial consortium

The six strains displaying growth in invert emulsion culture, i.e., *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Staphylococcus xylosus*, *Lactiplantibacillus plantarum* and *Carnobacterium maltaromaticum*, have been used to build a bacterial consortium in order to investigate the effect of the cultivation system on the community structure. The bacterial consortium was assembled by mixing equal volumes of overnight cultures of the strains at their optimal growth temperature (Table 1), and cultivated during 72 h at 30°C as a mixed culture in a classical setup or in invert emulsion. In parallel, all strains were cultivated separately in each system for 72 h and were assembled by mixing equal volumes of cultures just before analysis. These blends of pure cultures were used to simulate the absence of interactions and to investigate the effect of each system on bacterial growth. The communities have been inoculated at approximately 6 log₁₀ CFU mL⁻¹ in order to avoid the entrapment of multiple bacteria in a single droplet of medium.

Populations grew during incubation by a mean factor of $2.99 \pm 0.09 \log_{10}$ in classical setup and of $2.64 \pm 0.04 \log_{10}$ in invert emulsion. The structure of the communities was investigated by metabarcoding (Figure 17A).

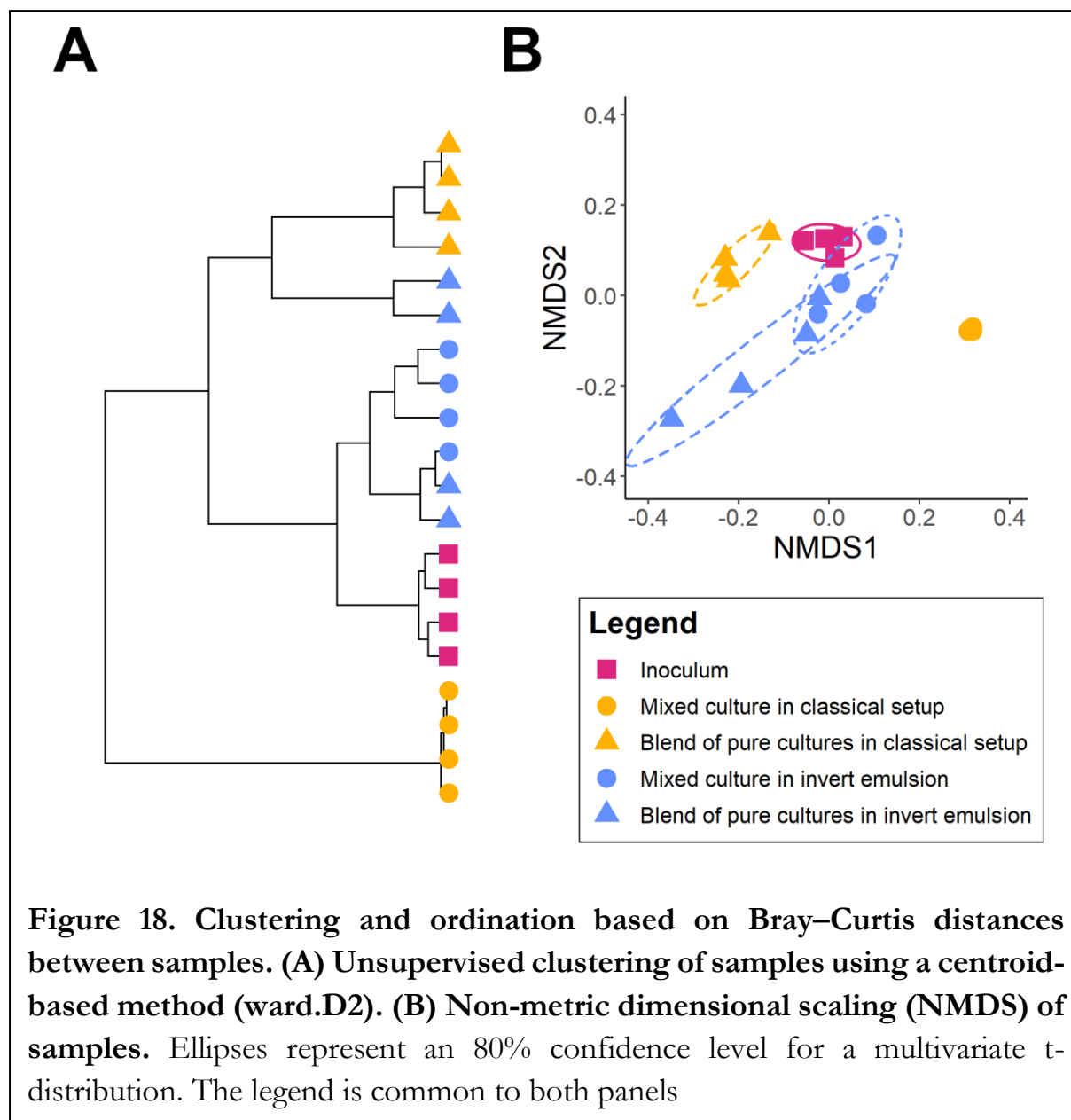


The Shannon alpha diversity index of the inoculum was 1.34 ± 0.04 , and decreased to 0.46 ± 0.02 , and 0.98 ± 0.03 after cultivation in a classical system and in invert emulsion, respectively (Figure 17B). Thus, the diversity of the bacterial consortium significantly dropped during cultivation with both methods (P value < 0.001), but remained significantly higher after cultivation in invert emulsion (P value < 0.001). The low diversity observed in the community propagated in the classical setup can be attributable to *L. lactis* which dominated the cultivated community since $90.2\% \pm 0.5\%$ of the sequencing reads were assigned to this species (Figure 17A). As expected, no significant difference (P value ≥ 0.05) was found in invert emulsion between the Shannon indices of communities grown in mixed culture or in separate culture (blend). Thus, in invert emulsion culture, bacteria behaved in mixed culture as if they were cultivated separately. These results confirmed the absence of microbial interactions between the droplets of the emulsion, resulting in a higher diversity than in classical mixed culture.

A clustering of the samples on the basis of Bray–Curtis distance matrix, and a centroid-based aggregation method, showed that mixed cultures performed in a classical setup were especially distinct from others, including the control blend of pure cultures in a classical setup (Figure 18A).

This observation agrees with the ordination plot where these samples form a cluster apart from the others (Figure 18B). As expected in the absence of microbial interactions, the clustering revealed that mixed and blends of emulsified cultures are intertwined (Figure 18A), and in the ordination plot, both conditions are overlapping (Figure 18B). Consistent with all preceding results, the structure of the communities cultivated in invert emulsion are closer to inocula and controls simulating the absence of interaction, than to the classical setup (Figure 18). However, the samples from the mixed invert emulsion culture form a distinct cluster from the inoculum cluster (Figure 18A). This result indicates that cultivation in invert emulsion result in a community characterized by a different structure. Indeed, the resulting communities

have low relative abundance of *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, and *S. thermophilus*, and reciprocally a high relative abundance of *S. xylosum* (Figure 17A).



Overall, these results show that invert emulsified culture medium can support growth of a bacterial consortium. Although microbial diversity decreases in all mixed culture conditions, the diversity remains higher in invert emulsion due to biotic confinement. In addition, the culture of communities in emulsified and non-emulsified medium leads to communities exhibiting distinct structures.

4. Discussion

This study demonstrates that reproducible invert emulsions using culture medium could be easily obtained. In order to be suitable for bacterial cultivation, the invert emulsion must meet two requirements. Firstly, it had to be sufficiently stable during the growth of a given bacterium. Secondly, it had to contain droplets large enough to host and allow growth of bacteria, which size is generally comprised between 0.5 and 5 μm . In the system described here, most of the medium is dispersed into droplets of approximately 40 μm diameter, which was deemed compatible with hosting and growth of bacteria. The introduction of bacteria has a negligible effect on the structure of the invert emulsion in small-scale systems. In addition, 24 h incubation does not significantly alter the structure of the emulsion. In bioreactor however, both introduction of bacteria and incubation time displace the distribution towards lower diameters, approximately 25 μm . Nonetheless, these diameters are still compatible with hosting and growth of bacteria as shown by bioreactor pure and mixed culture experiments.

The invert emulsions used in this study consist of a culture medium dispersed in a continuous oil phase. CLSM observations showed that bacteria were located in aqueous droplets. The facultative anaerobic strain *C. maltaromaticum* F2 and the microaerophilic *L. monocytogenes* EGDe were introduced separately in the medium before emulsification. Bacterial enumerations showed that both strains can grow significantly (up to approximately 3 $\log_{10}$) in invert emulsions up to 10^7 CFU mL^{-1} inoculation levels, showing that this system can sustain bacterial growth. Lower final densities were observed in invert emulsion compared to a non-emulsified culture despite having reached the carrying capacity as shown by the analysis of kinetics. Regarding growth capacity during a 24 h incubation period, similar patterns have been observed for the six strains selected, with lower final densities in invert emulsion system. Cultivation upon a longer period (72 h) revealed that the cultivation device affected the growth of these bacteria, by diminishing the growth rate or the

final density depending on the bacterium. The lower carrying capacity of the system might be inherent to the confinement of bacteria in droplets. Indeed, some droplets did not contain bacteria, therefore these droplets contained broth that was not available for bacterial growth. Another hypothesis is that this system could be highly sensitive to growth heterogeneity as it was observed for *L. lactis* (Bachmann et al., 2013). This assumption is consistent with the fact that microdroplet technologies have been increasingly used for single-cell studies and clone selection (Boitard et al., 2015; Lidstrom & Meldrum, 2003). Other authors have shown that the confinement of entomopathogenic fungi and microalgae in droplets of invert emulsions dramatically increased their viability, therefore suggesting some sort of physiological changes in the encapsulated microorganisms (Vandergheynst et al., 2013). Another hypothesis could be that growth into confined spaces could lead to inhibition due to the local density of bacteria within droplets, mediated by contact dependent or independent mechanisms (Ikryannikova et al., 2020). Also, the absence of growth in *B. linens* in invert emulsion could be due to limitation in the oxygen supply. Indeed, all strains that were able to grow are facultative anaerobic bacteria while *B. linens* is strictly aerobic, thus suggesting that the invert emulsion cultivation technique is not suitable for the culture of strictly aerobic bacteria.

This work also demonstrated that bulk invert emulsions could be used as a culture system to improve the co-cultivation of antagonistic bacteria. This system relies on the spatial segregation of bacteria. The antagonism of the investigated bacterial model couple relies on the production of diffusible inhibitory compound, therefore focusing on interference competition. Yet, it is likely that the structure of the invert emulsion might also limit the effects of competition resulting from the exploitation of resources. Indeed, droplets of culture broth can be considered as microreactors enabling each bacterium to grow separately from each other, a structure that was supported by CLSM observations. It is reasonable to assume that the more bacteria are inoculated before emulsification, the more droplets are occupied and eventually co-occupied by different strains. This problem has long been

recognized in the use of microfluidic devices and has been addressed by different authors on the basis of statistical modelling (Collins et al., 2015; Moon et al., 2011) and experimentation (Park et al., 2011). While such models are especially useful for controlling cell encapsulation in invert emulsions produced by microfluidics, they remain challenging in the case of bulk invert emulsions due to their polydispersity.

The results presented here showed that there is a range of inoculation levels that are suitable to alleviate competition in this binary model of antagonism. In binary emulsified co-culture with a cell-to-cell ratio of 1:1, the optimal inoculation level should also not exceed 10^7 CFU mL⁻¹, otherwise the degree of co-occupation of droplets by antagonistic bacteria likely increases and competitive interactions can take place. These inoculum conditions were used to cultivate a bacterial consortium. There was no significant difference of alpha diversity between mixed emulsified cultures and blends of emulsified cultures. In addition, clustering analysis based on beta diversity revealed that both conditions were intertwined, and furthermore both conditions were not distinguishable by NMDS. Yet, the bacteria of the consortium are able to interact since the culture in the classical setup led to a community which derived strongly from the initial community. Therefore, bacteria in emulsified medium behave as if they were free of microbial interactions, which is in agreement with the data obtained with the two-strain antagonistic model which showed that emulsion could mitigate interactions such as interference competition. Although this study focused on competition, it could be assumed that invert emulsions could also alleviate other type of interactions such as mutualistic interactions. Indeed, a similarly structured system produced by microfluidics has been used in order to infer complex microbial interactions networks, involving mutualistic interactions (Hsu et al., 2019). Moreover, the present study focused on interspecific competition. Yet, it is reasonable to assume that it could also alleviate competition on an intraspecific level. Such results were described in experimental evolution experiments conducted by Bachmann et al. (Bachmann et al., 2013). By lifting intraspecific competition, bulk emulsions could potentially allow the production of highly diversified communities

of the same species, a sought-after property for starter cultures in the dairy industry (Erkus et al., 2013).

Although the invert emulsion system allowed to alleviate microbial interactions, the community structure obtained after cultivation was different from the initial bacterial consortium. This is probably due to the effect of the system itself on the growth capacity of the microorganisms. Indeed, monitoring the growth of each microorganism in pure emulsified culture revealed its impact on the physiology of microorganisms. For instance, *B. linens* was not able to grow in this system, *L. plantarum* had a lower growth rate, *L. lactis* and *S. thermophilus* produced a lower biomass. Moreover, investigation of the effect of inoculation levels on the final bacterial densities in invert emulsion culture revealed that this system is sensitive to the initial bacterial densities. A low initial density leads to a low final density as access to the substrate for bacterial growth is likely to be limited by the compartmentation of the medium in invert emulsion. These different growth behaviors likely led to these divergent communities and opens the possibility of using invert emulsion not only to propagate communities but also as a tool to reshape them. This suggests that the present co-culture system could fit in the microbial community engineering toolbox (Goers et al., 2014; Lawson et al., 2019).

5. Conclusions

This work demonstrates that invert emulsions containing bacteria can be obtained in a single step using regular emulsification methods. The invert emulsion system provides a substantial number of droplets with a mean diameter of approximately 40 μm that can harbor single bacteria and allow their growth. More importantly, bacteria are spatially segregated within this cultivation device, a property that leads to the reduction of bacterial competition in a binary bacterial model demonstrating strong antagonism in a classical culture device. In order to benefit from the alleviation of competition, this system should be inoculated with less than 10^7 CFU mL^{-1} . More specifically, the authors recommend that the bacterial mixture is inoculated at approximately 10^6 CFU mL^{-1} so as to provide an optimal compromise between growth dynamics and alleviation of competition. Indeed, higher inoculation levels lead to lower growth dynamics and the loss of the latter property, likely resulting from the co-localization of antagonistic bacteria within the same droplets. In the propagation of a bacterial consortium, invert emulsions produced more diversified communities than non-emulsified medium, while being more conservative than a classical setup regarding structure. Bulk emulsions can also be prepared within standard bioreactors, fostering their use for industrial purposes. In a broader perspective, invert emulsion culture media represent an important potential for research on microbiota and for their valorization. Their use to limit exploitation and interference competition between microorganisms could be an important new tool for the production of innovations in the field of microbial community engineering.

Availability of data and materials

The datasets presented in this study can be found in the data repository DOREL (Données de Recherche Lorraines) at <https://doi.org/10.12763/7QIYMF>

Acknowledgements

We thank Dominique DUMAS from the Imaging Core Facility (PTIBC) of UMS2008 IBSLor (Université de Lorraine-CNRS-INSERM—<http://www.umsibslor.univ-lorraine.fr/>) for CLSM imaging of the invert emulsion cultivation system. We also thank Christian RIEDEL, Institut für Mikrobiologie und Biotechnology, Universität Ulm, Germany for providing *L. monocytogenes* EGDe. We are thankful to Catherine DENIS (ACTALIA, Sécurité des aliments, Saint Lô, France) and to Valérie STAHL (Aerial, Illkirch, France) for providing technological flora strains. The authors thank Véronique SADTLER and Damien BLAUDEZ for their participation in the AD thesis committee and constructive scientific discussions. We are grateful to the INRAe MIGALE bioinformatics facility (MIGALE, INRAe, 2018. Migale bioinformatics Facility, <https://doi.org/10.15454/1.5572390655343293E12>) for providing help and support. We also thank Sabine BOSSELAAR for having introduced metabarcoding in the lab. Finally, we thank Myriam SCHIVI and Sylvie WOLFF for providing excellent technical support.

Funding

We thank the Carnot Institute Icél for providing financial support.

Author contributions

AD, FB, CM, FM: conceptualization; AD, FB, CM, JB, ER, SD: methodology; AD, AE, JB: investigation; AD, FB, CM, JB, ER: validation; AD: data curation, visualization, original draft; AD, SF: formal analysis; AD, FB, CM, FM, JB, A-MR: review and editing; AE: resources; FB, CM, JB: supervision; FB, CM, A-MR: funding acquisition; FB, CM: project administration. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

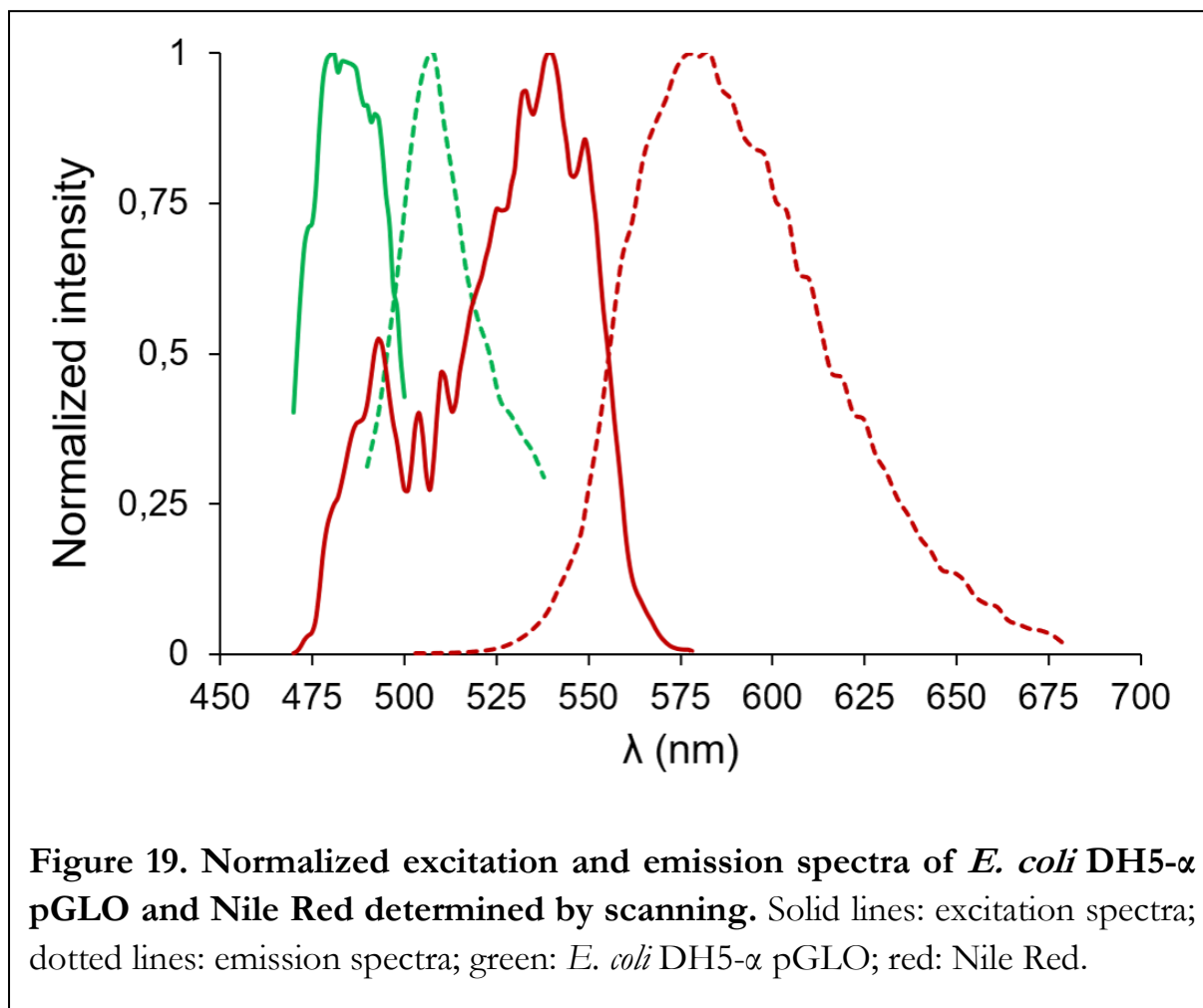
Not applicable.

Competing interests

The 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.

6. Supplementary Information

*Excitation and emission spectra of *E. coli* DH5- α pGLO and Nile Red*



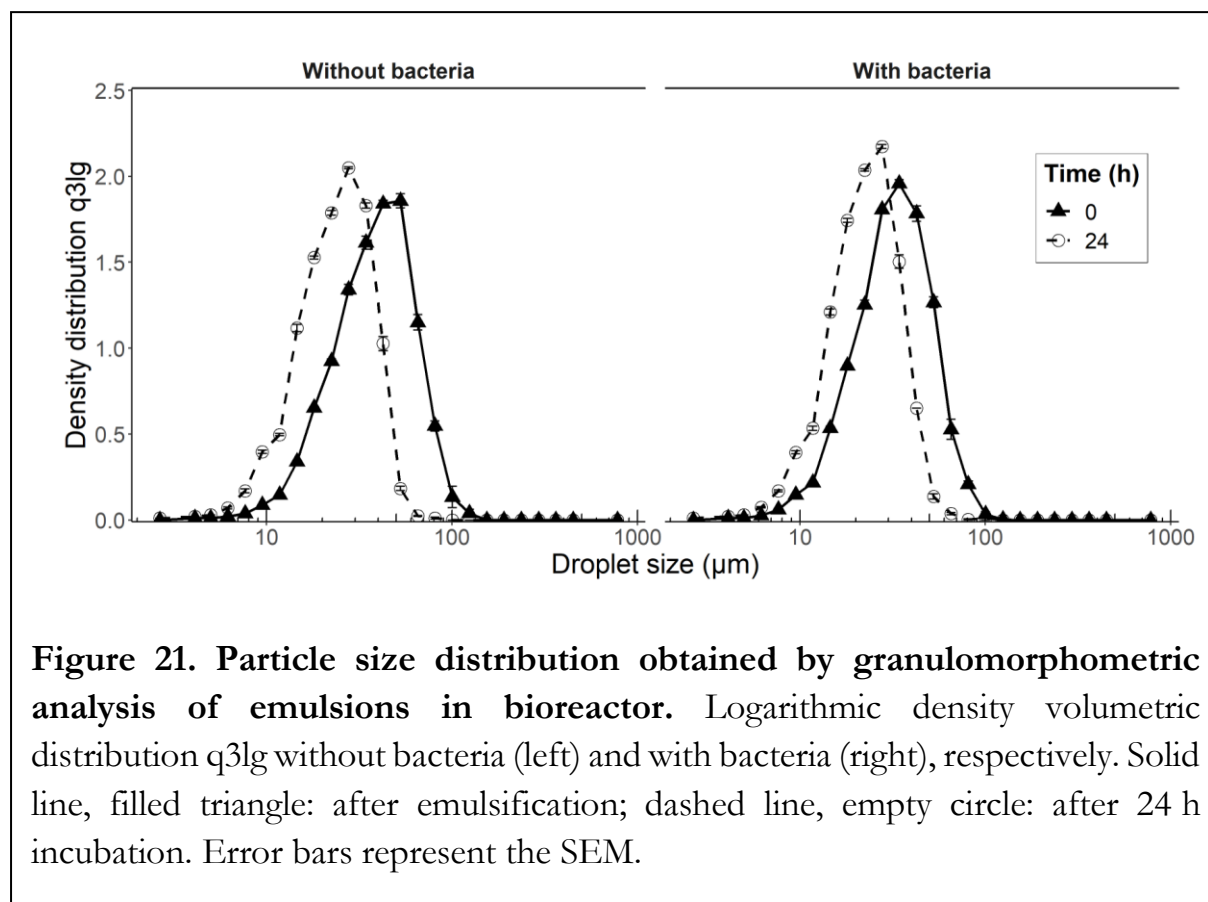
Excitation (ex) and emission (em) spectra of the GFP-producing bacterium and lipophilic stain Nile Red were determined separately by scanning a broad range of wavelengths (λ) using CLSM. Results show that the maximum λ_{ex} (GFP) was 481 nm, λ_{em} (GFP) was in the range of 499 nm to 517 nm. The maximum λ_{ex} (Nile Red) was 539 nm and λ_{em} (Nile Red) was comprised between 559 nm and 613 nm (Figure 19).

Double layer agar assay



Figure 20. Double layer agar assay. One colony of *C. maltaromaticum* F2 was deposited in the center of the agar. After a first incubation, a second layer of agar containing *L. monocytogenes* EGDe was poured onto the first layer and the plate was incubated once again.

After a second incubation, the agar became turbid except in an area surrounding the colony, indicating inhibition (Figure 20).

Bioreactor-scale invert emulsions

The invert emulsion culture system was scaled-up to 600 mL for demonstration. Particle size distributions were obtained by granulomorphometric analysis using the QICPIC device (Figure 21).

Effect of inoculum levels on bacterial growth

Table 3. Effect of inoculum levels on the growth of *C. maltaromaticum* F2 and *L. monocytogenes* EGDe in pure cultures using a classical setup or the invert emulsion system. Results are expressed as means $\pm$ SEM, fold change refers to the ratio of the final population to the initial population.

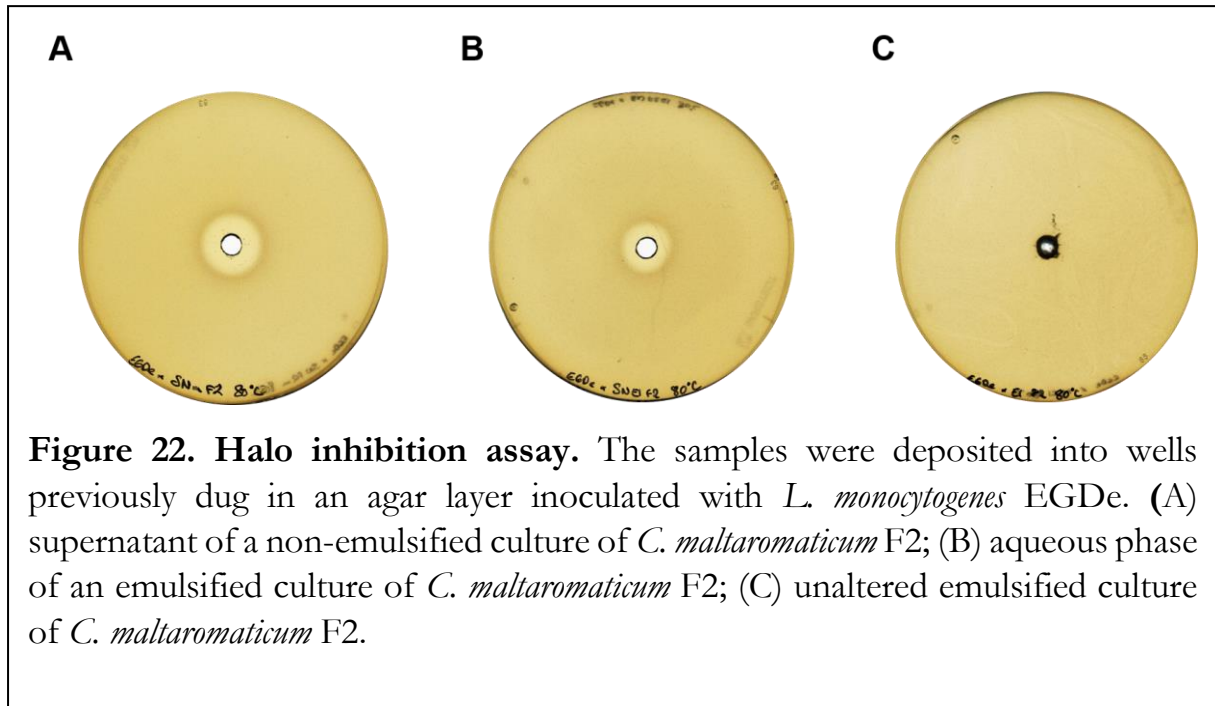
Scale	Strain	System	Initial population (log10 CFU.mL-1)	Final population (log10 CFU.mL-1)	Fold change (log10)
Small-scale	<i>C. maltaromaticum</i> F2	Classical setup	2.84 $\pm$ 0.08	9.09 $\pm$ 0.03	6.25 $\pm$ 0.06
			3.93 $\pm$ 0.05	9.10 $\pm$ 0.03	5.17 $\pm$ 0.07
			4.97 $\pm$ 0.06	9.09 $\pm$ 0.04	4.12 $\pm$ 0.07
			6.01 $\pm$ 0.02	9.26 $\pm$ 0.06	3.25 $\pm$ 0.07
			7.01 $\pm$ 0.06	9.09 $\pm$ 0.02	2.08 $\pm$ 0.05
			7.97 $\pm$ 0.06	9.14 $\pm$ 0.14	1.16 $\pm$ 0.08
		Invert emulsion	3.15 $\pm$ 0.24	5.42 $\pm$ 0.29	2.28 $\pm$ 0.48
			4.12 $\pm$ 0.01	6.34 $\pm$ 0.47	2.22 $\pm$ 0.48
			5.02 $\pm$ 0.07	7.64 $\pm$ 0.27	2.62 $\pm$ 0.21
			5.86 $\pm$ 0.02	8.50 $\pm$ 0.11	2.64 $\pm$ 0.12
			7.07 $\pm$ 0.07	9.01 $\pm$ 0.06	1.94 $\pm$ 0.11
			7.85 $\pm$ 0.12	8.47 $\pm$ 0.22	0.62 $\pm$ 0.11
	<i>L. monocytogenes</i> EGDe	Classical setup	3.13 $\pm$ 0.12	9.02 $\pm$ 0.25	5.89 $\pm$ 0.37
			3.96 $\pm$ 0.06	8.97 $\pm$ 0.16	5.02 $\pm$ 0.11
			5.21 $\pm$ 0.09	8.77 $\pm$ 0.16	3.57 $\pm$ 0.24
			6.24 $\pm$ 0.08	9.06 $\pm$ 0.12	2.82 $\pm$ 0.19
			7.17 $\pm$ 0.09	9.07 $\pm$ 0.23	1.91 $\pm$ 0.25
			8.09 $\pm$ 0.05	8.85 $\pm$ 0.13	0.76 $\pm$ 0.18
		Invert emulsion	3.24 $\pm$ 0.30	5.76 $\pm$ 0.12	2.52 $\pm$ 0.18
			4.10 $\pm$ 0.11	6.87 $\pm$ 0.07	2.77 $\pm$ 0.08
			5.19 $\pm$ 0.13	8.16 $\pm$ 0.38	2.97 $\pm$ 0.29
			6.06 $\pm$ 0.07	8.82 $\pm$ 0.19	2.76 $\pm$ 0.18
			7.24 $\pm$ 0.04	8.88 $\pm$ 0.14	1.64 $\pm$ 0.10
			7.79 $\pm$ 0.23	8.86 $\pm$ 0.09	1.07 $\pm$ 0.31
Bio-reactor	<i>C. maltaromaticum</i> F2	Classical setup	5.75	8.54	2.78
		Invert emulsion	5.90	8.63	2.73
	<i>L. monocytogenes</i> EGDe	Classical setup	6.22	8.24	2.02
		Invert emulsion	6.17	8.41	2.24

Effect of inoculum levels on bacterial competition

Table 4. Effect of inoculum levels on the competition between *C. maltaromaticum* F2 and *L. monocytogenes* EGDe in mixed cultures using a classical setup or the invert emulsion system. Results are expressed as means $\pm$ SEM, fold change refers to the ratio of the final population to the initial population.

Scale	System	Strain	Initial population (log ₁₀ CFU.mL ⁻¹)	Final population (log ₁₀ CFU.mL ⁻¹)	Fold change (log ₁₀)
Small-scale	Classical setup	<i>C. maltaromaticum</i> F2	2.70 $\pm$ 0.20	9.19 $\pm$ 0.09	6.49 $\pm$ 0.13
		<i>L. monocytogenes</i> EGDe	3.01 $\pm$ 0.11	6.10 $\pm$ 0.05	3.08 $\pm$ 0.16
		<i>C. maltaromaticum</i> F2	3.92 $\pm$ 0.11	9.08 $\pm$ 0.03	5.16 $\pm$ 0.15
		<i>L. monocytogenes</i> EGDe	3.99 $\pm$ 0.03	6.29 $\pm$ 0.13	2.30 $\pm$ 0.14
		<i>C. maltaromaticum</i> F2	4.93 $\pm$ 0.12	9.09 $\pm$ 0.08	4.17 $\pm$ 0.13
		<i>L. monocytogenes</i> EGDe	5.14 $\pm$ 0.05	6.62 $\pm$ 0.06	1.48 $\pm$ 0.11
		<i>C. maltaromaticum</i> F2	5.92 $\pm$ 0.14	9.35 $\pm$ 0.07	3.42 $\pm$ 0.19
		<i>L. monocytogenes</i> EGDe	6.00 $\pm$ 0.11	5.52 $\pm$ 0.20	-0.48 $\pm$ 0.11
		<i>C. maltaromaticum</i> F2	6.87 $\pm$ 0.09	9.12 $\pm$ 0.09	2.25 $\pm$ 0.04
		<i>L. monocytogenes</i> EGDe	6.98 $\pm$ 0.21	5.48 $\pm$ 0.09	-1.50 $\pm$ 0.21
		<i>C. maltaromaticum</i> F2	7.66 $\pm$ 0.11	8.98 $\pm$ 0.13	1.31 $\pm$ 0.13
		<i>L. monocytogenes</i> EGDe	8.01 $\pm$ 0.04	5.00 $\pm$ 0.15	-3.00 $\pm$ 0.13
	Invert emulsion	<i>C. maltaromaticum</i> F2	2.76 $\pm$ 0.03	5.18 $\pm$ 0.12	2.41 $\pm$ 0.10
		<i>L. monocytogenes</i> EGDe	2.97 $\pm$ 0.16	5.12 $\pm$ 0.06	2.15 $\pm$ 0.10
		<i>C. maltaromaticum</i> F2	4.03 $\pm$ 0.08	5.94 $\pm$ 0.27	1.91 $\pm$ 0.27
		<i>L. monocytogenes</i> EGDe	4.06 $\pm$ 0.09	6.24 $\pm$ 0.18	2.18 $\pm$ 0.09
		<i>C. maltaromaticum</i> F2	4.77 $\pm$ 0.13	7.04 $\pm$ 0.06	2.27 $\pm$ 0.18
		<i>L. monocytogenes</i> EGDe	5.13 $\pm$ 0.15	7.68 $\pm$ 0.07	2.55 $\pm$ 0.22
		<i>C. maltaromaticum</i> F2	5.85 $\pm$ 0.09	8.30 $\pm$ 0.13	2.45 $\pm$ 0.17
		<i>L. monocytogenes</i> EGDe	5.96 $\pm$ 0.07	8.36 $\pm$ 0.12	2.40 $\pm$ 0.08
		<i>C. maltaromaticum</i> F2	6.99 $\pm$ 0.19	8.42 $\pm$ 0.28	1.43 $\pm$ 0.42
		<i>L. monocytogenes</i> EGDe	7.06 $\pm$ 0.07	8.43 $\pm$ 0.17	1.37 $\pm$ 0.21
Bio-reactor	Classical setup	<i>C. maltaromaticum</i> F2	5.77 $\pm$ 0.18	8.47 $\pm$ 0.08	2.70 $\pm$ 0.25
		<i>L. monocytogenes</i> EGDe	6.31 $\pm$ 0.05	6.06 $\pm$ 0.06	-0.25 $\pm$ 0.01
	Invert emulsion	<i>C. maltaromaticum</i> F2	5.97 $\pm$ 0.09	8.22 $\pm$ 0.09	2.25 $\pm$ 0.17
		<i>L. monocytogenes</i> EGDe	5.83 $\pm$ 0.05	8.11 $\pm$ 0.29	2.28 $\pm$ 0.24

Halo inhibition assay



Rights and permissions

Open Access

This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder.

To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Chapitre III. Etude de la dynamique de communautés bactériennes propagées en régime séquentiel : apport de deux systèmes de culture

Introduction et contribution

La production des aliments fermentés d'origine laitière repose sur l'activité du microbiote résident ou ajouté sous forme de ferments lors de la fabrication. Dans de nombreux processus de production, l'ensemencement de la matière fermentescible est conduit par transfert d'un échantillon issu de la production précédente. Ce régime de culture itératif appelé *backslopping* ou propagation séquentielle permet de procéder à la sélection de microbiotes adaptés à la fonctionnalité désirée, et constitue en cela un outil d'ingénierie descendante de communautés. Les communautés propagées en régime séquentiel manifestent une dynamique taxonomique qui est fonction des paramètres abiotiques et biotiques qui leur sont appliqués. Les travaux conduits dans cette partie proposent d'étudier la dynamique de communautés bactériennes issues de laits crus au cours de propagations séquentielles selon deux méthodes de culture, la culture classique et la culture en bouillon émulsionné. Plus particulièrement, l'objectif est de déterminer l'apport de chacun des deux systèmes de culture pour le modelage des microbiotes et leur stabilisation. Pour ce faire, 3 communautés bactériennes ont été extraites de lait crus afin d'inoculer un milieu de culture riche (TSBYE). Cet inoculum a ensuite été propagé selon une culture classique ou une culture en émulsion inverse produite suivant le protocole de la preuve de concept présentée précédemment. Après incubation, les communautés cultivées ont été transférées dans un bouillon frais afin de réitérer ce processus, aboutissant à 10 étapes de culture. A l'issue de chaque cycle, les communautés ont été dénombrées et analysées par metabarcoding afin de déterminer leur dynamique en termes d'enrichissement et de composition au cours de la propagation séquentielle en fonction du système de culture utilisé.

Les résultats montrent que les conditions de culture de laboratoire exercent une pression de sélection sur les communautés, ce qui se manifeste par une diminution importante de la richesse et de la diversité des microbiotes lors du premier

cycle de culture. Au cours des propagations suivantes, les dynamiques des microbiotes présentent des comportements différents selon qu'ils sont cultivés en système classique ou en émulsion inverse, bien que les niveaux de richesse spécifique soient sensiblement similaires entre les deux modes de culture. En culture classique, la composition atteint un état d'équilibre après un nombre réduit de cycles de croissance, ce qui est confirmé par une faible variabilité de la diversité selon l'indice de Shannon au cours des propagations séquentielles. En revanche, la composition des communautés propagées en émulsion inverse montre un motif de succession en termes de dominance tout au long du processus, ce qui se traduit par des oscillations de la diversité donnée par cet indice. Ces tendances sont également capturées par l'analyse de la diversité bêta. En particulier, la quantité de changement structurel au cours des propagations, obtenue par sommation des dissimilarités de Bray-Curtis entre communautés au sein d'un même mode de culture, est significativement plus petite pour les communautés cultivées en système classique comparé à celles cultivées en émulsion inverse. L'ordination des matrices de dissimilarité révèle deux typologies de trajectoires écologiques pour les microbiotes propagés en cultures séquentielles. Premièrement, les communautés cultivées en système classique convergent vers un point, ce qui signifie que leurs structures se stabilisent au cours du processus de propagation. Deuxièmement, les communautés cultivées en émulsion inverse ne convergent pas, ce qui indique que leurs structures sont continuellement remodelées au cours du même processus. De plus, ces trajectoires divergent de l'inoculum dans les deux cas et ce selon une direction différente en fonction du système de culture utilisé, ce qui montre que les deux systèmes conduisent à des communautés de structures différentes à partir du même inoculum. Enfin, et en complément des résultats précédents, l'analyse des communautés d'un lait cru après 10 passages en système classique ou émulsionné a révélé une composition radicalement différente de celle de l'inoculum. Spécifiquement, ces communautés étaient dominées par des taxons très faiblement abondants dans l'inoculum. Pour tester l'opportunité d'isoler ces taxons à partir des communautés propagées, une cinquantaine de colonies issues

de chacun de ces échantillons ont été prélevées et analysées par séquençage Sanger afin de les identifier. Les résultats montrent que la majorité des colonies provenant de communautés issues de propagations en système classique correspondaient à *Enterococcus faecalis*, tandis que la majorité des colonies isolées à partir de communautés propagées en émulsion inverse correspondaient à *Rahnella inusitata*. Pourtant, aucun de ces deux taxons n'a pu être isolé à partir de l'inoculum. Cette expérience démontre l'intérêt de la culture en émulsion inverse pour l'enrichissement et l'isolement de taxons rares dans l'écosystème étudié.

En conclusion, ces travaux montrent que les dynamiques structurelles de communautés bactériennes au cours de propagations séquentielles diffèrent selon le système de culture utilisé. La culture classique conduit à la stabilisation des communautés tandis que la culture en émulsion inverse conduit à un remodelage des structures tout au long du processus. Ces comportements différents font de ces méthodes deux outils complémentaires pour l'ingénierie de communautés microbiennes. De plus, la propagation séquentielle en émulsion inverse permet d'enrichir et d'isoler des taxons très minoritaires dans l'écosystème initial. Ainsi, la culture en émulsion inverse constitue une méthode culturale intéressante pour leur collection et leur étude. Il serait intéressant d'évaluer la dynamique évolutive de ces communautés au cours d'un nombre plus élevé de propagations séquentielles. Enfin, ces travaux concernent la dynamique taxonomique des communautés. Par conséquent, il serait judicieux d'aborder les aspects fonctionnels des communautés propagées afin d'étudier leur variabilité en termes de robustesse et de reproductibilité.

Dynamics of bacterial communities upon serial propagation using two different co-culture systems highlight their complementarity for microbial community engineering

Alexis Dijamentiuk¹, Cécile Mangavel¹, Chloé Gapp¹, Annelore Elfassy¹, Anne-Marie Revol-Junelles¹, and Frédéric Borges¹

¹LIBio, Université de Lorraine, Nancy, France

Abstract

Microbial communities harbor important biotechnological potential in diverse domains, however the engineering and propagation of such communities still face both knowledge and know-how gaps. More specifically, culturing tools are needed in order to propagate and shape microbial communities, so as to obtain desired properties and valorize their microbial potential. Previous work suggested that micro-confinement and segregation of microorganisms using invert (water-in-oil, w/o) emulsion broth can shape community during propagation, by alleviating biotic interactions and inducing physiological changes in cultured bacteria. The aim of the present work was to evaluate invert emulsion and simple broth cultures for the propagation and shaping of bacterial communities derived from raw milk in a serial propagation design. The classical setup (simple broth culture) resulted in stable community structures during serial propagation, whereas the invert emulsion system resulted in only transiently stable structures. In addition, different communities with different taxonomic compositions could be obtained from a single inoculum. Furthermore, the invert emulsion system allowed to enrich rare taxa from a microbiome and thus facilitated their subsequent isolation on culture agar plates. In a broader perspective, this work stresses the interest of using complementary culture tools for the study and the valorization of microbial communities.

1. Introduction

Microbiomes, defined as microbial communities characterizing a specific habitat as well as their “theatre of activity”, harbor critical roles in the biogeochemical cycling of natural resources (Anantharaman et al., 2018; Berg et al., 2020; Kuypers et al., 2018; Sokol et al., 2022). They also represent a large reservoir of biological and functional diversity, the understanding of which is increasingly recognized as crucial to the development of a global, sustainable bioeconomy (D’Hondt et al., 2021). Culture-independent multi-omics approaches have revealed the immense diversity of the bacterial repertoire of microbiomes and shed light on their functioning. This new knowledge leads the scientific community to want to enhance the biotechnological potential of microbial communities through microbiome engineering. For instance, some authors have highlighted the benefits of using ecological properties, hereby referring to diversity and specific network architecture properties of microbial communities for the preservation of plant cultures (Wei et al., 2015). It is nowadays well known that microbial communities represent an opportunity for applications covering numerous domains such as bioprotection of crop cultures (Q.-L. Chen et al., 2021), anaerobic digestion (Nguyen et al., 2019) or biopreservation of food matrices (Borges et al., 2022). Engineering microbiomes requires rational approaches in order to obtain the desired properties. A conceptual framework has been proposed to achieve this goal by defining an integrative process combining *top-down* (decomposition of communities and study of individual microbial properties) and *bottom-up* (rational assembly of microbial communities) approaches (Lawson et al., 2019).

These new perspectives put back on the table the importance of microbial culture and underline the need for innovative tools and culture processes to build and manipulate microbial communities. Top-down engineering, which seeks selection of communities exhibiting desirable traits, can rely on *ex-situ* cultivation of naturally occurring microbiomes (Chang et al., 2021; Estrela et al., 2021; Hug & Co,

2018). This approach can call upon the manipulation of environmental pressures in order to modulate the structure and functionality of microbial communities. To this end, it is possible to tune the culture process parameters such as temperature, nutrient composition of the substrate as well as incubation regime (Lewis et al., 2021). Undefined microbial communities such as starter cultures for the production of many fermented food are usually proliferated by “backslopping”, a serial propagation technique consisting in using remnants from previous fermentation processes to inoculate fresh raw material in order to initiate a new fermentation (Azcarate-Peril et al., 2019). In a synthetic biology perspective, top-down engineering can also involve the use of co-culture systems in which microbial populations are allowed to grow with some degree of proximity of contact between them, modulating the intensity of biotic interactions (Goers et al., 2014). As an example, Isabelle Sodini and colleagues were able to immobilize cells in bioreactors for continuous lactic acid fermentation in fresh cheese manufacturing (Sodini et al., 1997a). Their system consisted of inoculating a bioreactor containing UHT milk with four strains of lactic acid bacteria, separately or encapsulated together in κ -carrageenan beads and locust bean gum gel so as to decrease bacterial interactions. The authors found that cell immobilization improved lactic acid and cell yields over a well-mixed mixed culture for several weeks (Sodini et al., 1997b). Alternatively, water-in-oil (w/o) emulsion co-culture systems have been used for stochastic segregation of bacteria in nurturing droplets, alleviating interaction between microorganisms (Bachmann et al., 2013; Goers et al., 2014; Park et al., 2011). A more recent work has applied a similar tool for the propagation of a synthetic consortium representative of a cheese microbiome, composed of 6 different bacterial species (Dijamentiuk et al., 2023). This work has shown that the microbial community was shaped differently depending on whether it was propagated in simple broth or in w/o emulsion. These differences were related to the absence of biotic interaction and physiological effects exerted by the w/o emulsion system. Bachmann *et al.* have shown that this technique relying on the privatization of public resources conducted to stepwise enrichment of more yielding

but otherwise lost slow-growing mutants of *Lactococcus lactis* in serial propagation (Bachmann et al., 2013).

The present work investigated the effects of classical and w/o emulsion co-culture systems on the composition of raw milk communities in a serial propagation design. The working hypothesis is that compositional changes accumulated upon serial propagation lead to diverging communities, therefore highlighting the interest in complementary tools for the domestication and valorization of microbial communities. Moreover, it was investigated whether an invert emulsion system could lead to enrichment of subdominant taxa and subsequent isolation with culture dependent methods.

2. Material and methods

Production, incubation, and breaking of invert emulsions

Cultures in invert emulsions were prepared under sterile conditions following the protocol of Dijamentiuk et al., 2023 by dropwise addition of 3 mL inoculated medium to a mix of 11.625 g (77.5 % w/w) refined sunflower oil (Système U, Rungis, France) and 375 mg (2.5 % w/w) polyglycerol polyricinoleate (PGPR) (Paalsgaard A/S; Julsminde, Denmark) in a 40 mL, 30 mm diameter vial (CEB, Angers, France). The emulsification was carried out with stirring using a magnetic stirrer (IKA-Werke, GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) and a polygonal stir bar with pivot ring (L: 20 mm, Ø 6 mm) at 400 rpm and 20°C during 5 min. The invert emulsions were then transferred into 15 mL centrifugation tubes (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Austria) and incubated at 30°C during 72 h. To avoid either sedimentation or excessive shearing of the samples, cultures were held on a tube rotator (Cole-Parmer LLC, Vernon Hills, USA) with a 45° tilt continuously rotating at 20 rpm. The breaking of invert emulsions was carried as described in the protocol of Dijamentiuk et al., 2023, adapted from Bachmann et al., 2013. One and a half milliliters of emulsion were centrifugated at 5,000 rcf for 10 min. After the oil phase was removed, 300 µL 1H, 1H, 2H, 2H-perfluoro-1-octanol (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA) were added. Phase separation occurred after gentle shaking over 15 min and then allowed to decant.

Bacterial culture and enumeration

The three raw milks used in this work have previously been used in a screening procedure for the identification of bacterial strains with biopreservative properties (El Kheir et al., 2018). Aliquots of raw milk were thawed, homogenized and enumerated before use for cultivation experiments. Inoculations were performed by diluting frozen aliquots of milk 1:100 so that the initial density would not exceed 10^7 CFU.mL⁻¹ in invert emulsion systems, as previously described (Dijamentiuk et al.,

2023). The diluted suspensions were used to inoculate fresh Trypticase Soy Broth (TSB) (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) supplemented with 6 g.L⁻¹ of bacto-yeast extract (YE). Enumeration consisted in serially diluting bacterial suspensions in tryptone-salt buffer (Biokar Diagnostics, Paris, France) amended with 2 % Tween® 80 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and plating onto TSYE containing 15 g.L⁻¹ agar (TSAYE). Plates were then incubated at 30°C for 72 h before reading. Given the proportion of aqueous medium in the invert emulsion (1:5), raw cell numbers in emulsified cultures were corrected by a factor of 5.

Serial propagation of microbial communities

Serial propagation consisted in 10 growth cycles, starting with the suspension of 300 µL of raw milk in 30 mL of TSBYE. Each growth cycle consisted in four steps. (1) The inoculated broth was homogenized and divided in two: 15 mL was used for classical culture, and 3 mL was used for the production of 15 mL invert emulsion culture. (2) Both cultures were transferred into 15 mL centrifugation tubes, then placed onto the tube rotator and incubated during 24 h at 30°C. (3) After incubation, 300 µL of grown and homogenized classical culture or extracted aqueous phase of emulsified culture were suspended in 30 mL fresh broth. After initial inoculation and each culture step, cultures were enumerated and used for DNA extraction and subsequent metabarcoding analysis.

DNA extraction

DNA extraction was performed using the NucleoSpin Food® kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) with modifications, as described in Dijamentiuk et al., 2023. It consisted of centrifuging 1.5 mL of bacterial suspension for 10 min at 10,000 rcf, then removing the supernatant. Then, the pellet was suspended in 550 µL of 65°C pre-warmed lysis buffer from the kit and 10 µL proteinase K (10 mg.mL⁻¹) was added, as well as 10 µL of 20 mg.mL⁻¹ RNase and approximately 200 to 300 mg of sterile, UV-treated, 150 to 212 µm diameter glass. After incubation at 65°C for 3 h, the reaction mix was shaken at 3,200 rpm on a Vortex Génie 2 horizontal agitator

(Scientific Industries, New York, USA) for 1 h at room temperature, and centrifuged at 10,000 rcf for 10 min. DNA purification from the supernatant was then conducted following the instructions of the NucleoSpin Food® kit.

Sequencing and downstream analysis

PCR, amplicon normalization, paired-end sequencing, sequence merging as well as quality control were outsourced to Eurofins Genomics Europe GmbH (Konstanz, Germany) following the InView-Microbiome Profiling 3.0 procedure. Briefly, the V3-V4 hypervariable region of the bacterial 16S rRNA was targeted by the forward 357F (5'-TACGGGAGGCAGCAG-3', Turner et al., 1999) and reverse 800R (5'-CCAGGGTATCTAATCC-3', Kisand et al., 2002) primers and amplified using myTaq™ HS DNA Polymerase (Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, Ohio, USA). Details of the amplification cycle were not disclosed by the service provider. Illumina (MiSeq) sequencing was conducted according to Kozich et al. (2013) and produced 2 x 300 bp reads with a minimal depth of 60,000 reads. Paired-end reads were merged using the software FLASH (version 2.2.00, Magoč & Salzberg, 2011) with a minimum overlap size of 10 bp. Merged sequences were approximately 425 bp in length. Further processing of sequences was done with the FROGS tools (Escudié et al., 2018) on the Galaxy platform (Galaxy version 3.2.3). The denoising step consisted in removing reads that did not match the expected length (i.e. between 350 and 450 bp) and the ones containing ambiguous bases (N). After dereplication, the clustering step was performed with the fastidious option in SWARM, a single-linkage clustering algorithm using a local clustering threshold (aggregation distance of 1 in this work) (Mahé et al., 2015). After the removal of chimeras, OTUs with an abundance as proportion inferior to $5 \cdot 10^{-5}$ were removed as recommended by Bokulich et al., (2013). Taxonomic affiliation was then performed by BLAST against the 16_EZBioCloud_52018 database (Yoon et al., 2017). A post-processing step aggregated OTUs sharing the same taxonomy with at least 99 % identity and 99 % alignment coverage. The abundance table was then imported into R version 4.1.2 (R Core Team, 2021) for further analysis. Alpha and beta diversity

analyses were conducted using tools from the vegan R package (version 2.6-4, Oksanen et al., 2022). Alpha diversity analysis consisted in calculating Richness and Shannon index. In the beta diversity analysis, rarefied Bray-Curtis dissimilarities were obtained using the `avgdist` function. Briefly, the OTU matrix was randomly subsampled using the minimum sequencing depth of the dataset as sample size (*i.e.* 56,651 sequences) and the dissimilarity matrix was calculated at each of the 100 iterations of this process. All these iterations were then averaged (mean) to obtain an average dissimilarity matrix. Dissimilarity matrices allowed for the ordinations by non-metric dimensional scaling using the `metaMDS` function and the calculation of total dissimilarities indicating the magnitude of change upon serial passaging for each community and culture system.

Identification of bacterial isolates and analysis

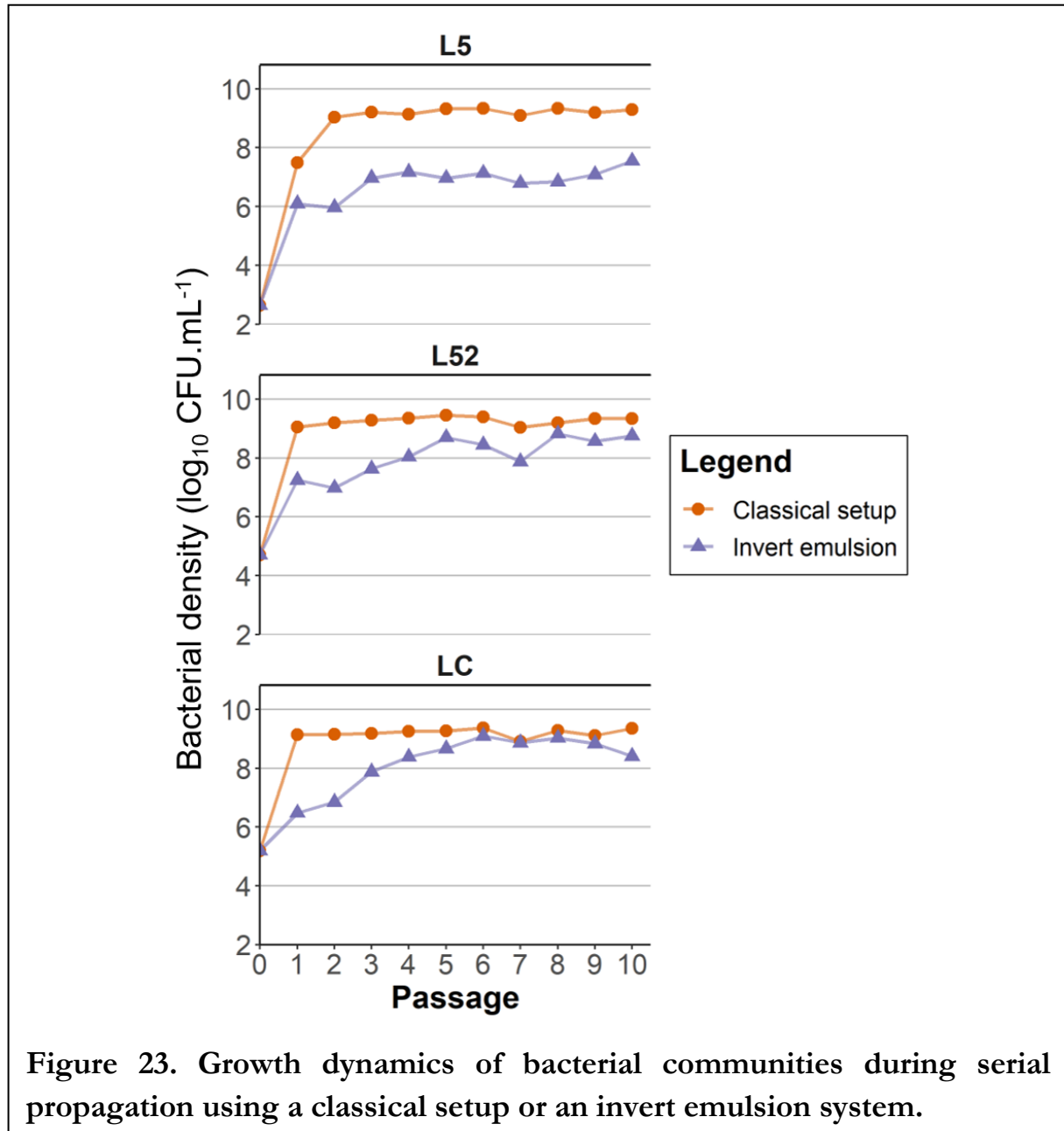
Identification of multiple isolates (approximately 50 per condition) consisted of colony picking using sterile pipette cones, which were then deposited into the wells of a PCR microplate containing 50 μ L of PCR mix. The PCR mix consisted of 25 μ L of TaKaRa mix (EmeraldAmp GT PCR Master Mix containing buffer, polymerase, dNTPs and loading buffer), 22 μ L of sterile nuclease-free water, 1.5 μ L of 10 μ M forward primer (W02: 5'-GNTACCTTGTTACGACTT-3') and 1.5 μ L of 10 μ M reverse primer (W18: 5'- GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') according to Godon et al., 1997. The microplate was then placed in a thermal cycler for amplification according to the following program: initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 30 cycles of denaturation (94°C, 30 s), hybridization (50 °C, 30 s) and elongation (72°C, 90 s). Final elongation was done at 72°C for 10 min. Sanger sequencing of the amplicons and quality check were performed by LGC Genomics GmbH (Berlin, Germany) following the Premium Run procedure. Sequences were then imported into R, and a custom script allowed offline taxonomic affiliation by BLAST against the NCBI database (O'Leary et al., 2016). Two sequences presented multiple taxonomic affiliations and were discarded from the analysis.

Statistical analysis

Statistical tests were performed using R version 4.1.2. (R Core Team, 2021). Cell count data were subjected to a Shapiro-Wilk test to determine whether the distribution followed a normal distribution. As this condition was not met, the assessment of growth on different sections of the curves was done using Spearman's rank correlation tests. The comparison of the carrying capacities of the two culture systems was performed by comparing the mean cell densities calculated on the stable sections after testing for normality of the residuals, and homoscedasticity using a Bartlett's test. When both conditions were met, comparison of the means was done using a standard two-sided two samples *t*-test. Wilcoxon rank sum test with continuity correction was used for non-normal data while Welch's two-sided two-sample *t*-test was used for heteroscedastic data. Differences between culture systems regarding relative standard deviations of alpha diversity indices upon serial propagation as well as total dissimilarities were assessed using a two-sided Welch's *t*-test, as data presented unequal variances. In the composition of plated microbial communities, statistical significance of differences in the proportions of isolates between modalities was assessed by using a χ^2 (chi-squared) test on a contingency table wherein *Rabnella inusitata* was considered a taxon of interest whereas other taxa were grouped in another category.

3. Results

Dynamics of microbial communities during serial propagation using classical and invert emulsion systems

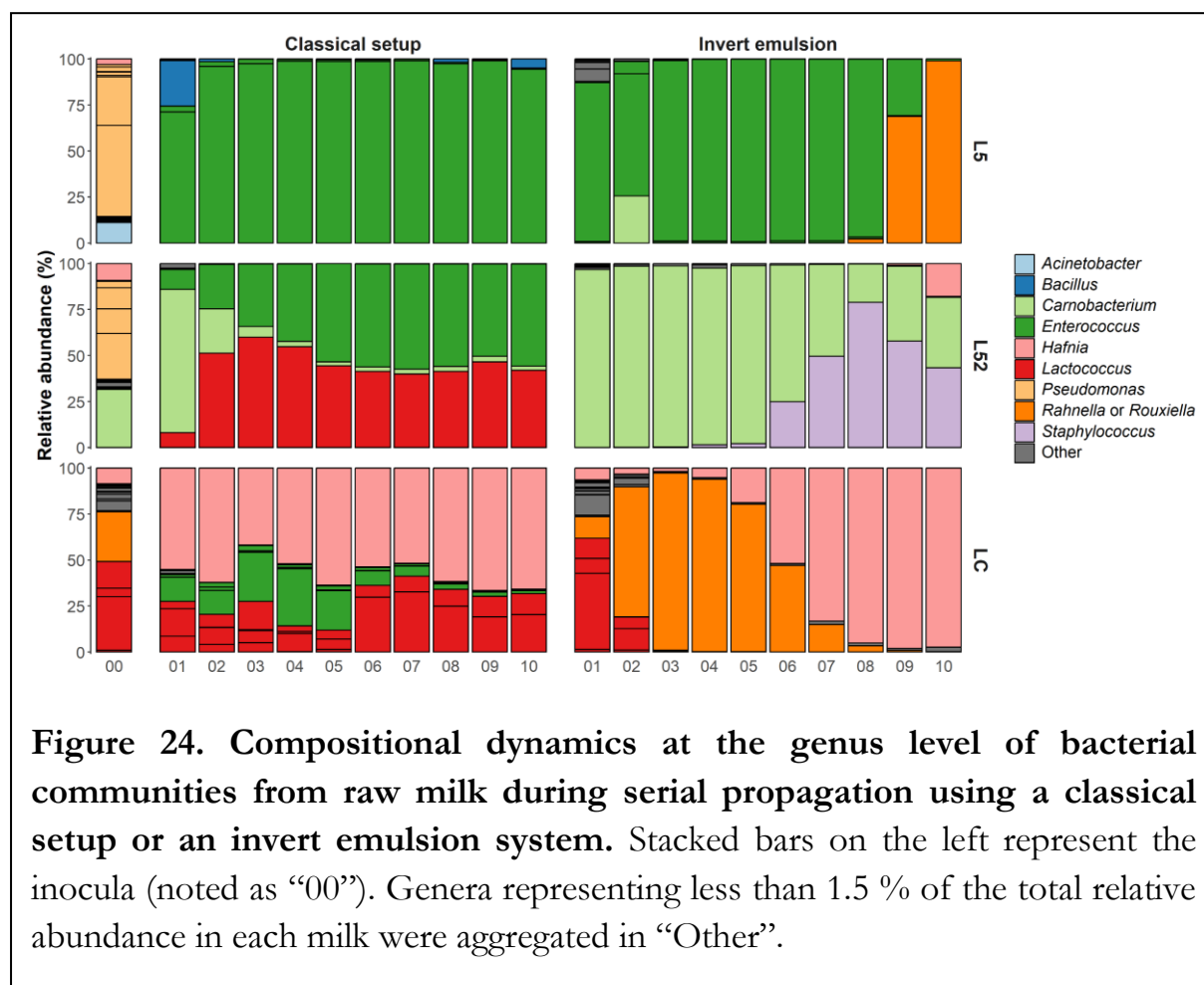


In order to assess the effect of the culture system on the structure of bacterial communities, 3 raw milk communities (named L5, L52 and LC) were serially passaged, i.e. subcultured iteratively, in a rich laboratory medium (TSBYE) using a

classical setup or an invert emulsion system. Each growth cycle consisted in 1:100 inoculation of fresh broth with the previous step followed by incubation. Inocula and propagated communities were enumerated after each passage (Figure 23).

In the classical setup, the density of the L5 community increased during the first growth cycle and then did not change significantly during the following cycles ($P \geq 0.05$, Spearman's rank correlation from passage 2 to 10), indicating stabilization of community size. Bacterial counts on this stable sequence allow to calculate a mean maximum density as well as the standard error of the mean. In this case, the mean density between passages 2 to 10 was $9.22 \pm 0.04 \log_{10} \text{ CFU.mL}^{-1}$. When propagated in invert emulsion, the density reached a plateau at $7.07 \pm 0.08 \log_{10} \text{ CFU.mL}^{-1}$ after the third propagation cycle ($P \geq 0.05$, Spearman's rank correlation from passage 3 to 10). The carrying capacity was markedly lower using the invert emulsion system compared with the classical setup ($P = 6.31.10^{-4}$, Wilcoxon rank sum test with continuity correction). The density of L52 community grown using the classical setup increased during the first growth cycle then stabilized ($P \geq 0.05$, Spearman's rank correlation from passage 1 to 10) at $9.27 \pm 0.04 \log_{10} \text{ CFU.mL}^{-1}$. Using the invert emulsion system, density progressively increased until passage 5 (correlation coefficient $r_s = 0.86$ and $P < 0.01$, Spearman's rank correlation from passage 2 to 5) and remained constant thereafter ($P \geq 0.05$, Spearman's rank correlation from passage 6 to 10) at $8.53 \pm 0.14 \log_{10} \text{ CFU.mL}^{-1}$, which is significantly lower than in the classical setup ($P = 5.53.10^{-6}$, Welch's two-sided two-sample t -test). In classical setup the LC community increased in population density during the first growth cycle and then stabilized ($P \geq 0.05$, Spearman's rank correlation, passages 1 to 10) at the carrying capacity of $9.20 \pm 0.04 \log_{10} \text{ CFU.mL}^{-1}$. In invert emulsion, population densities grew progressively until the sixth passage ($r_s = 1$ and $P < 0.001$, Spearman's rank correlation, passages 0 to 6) then stabilized ($P \geq 0.05$) at $8.84 \pm 0.12 \log_{10} \text{ CFU.mL}^{-1}$. Difference in carrying capacity between the two systems was statistically significant ($P = 3.21.10^{-3}$, standard two-sided two-sample t -test), but small ($< 0.5 \log_{10} \text{ CFU.mL}^{-1}$). These results show that the communities can reach the carrying capacity

after few (1 to 2) growth cycles when propagation is performed using the classical setup. On the contrary, the increase of the density was slower using the invert emulsion system where the carrying capacity was reached only after 3 to 6 growth cycles.

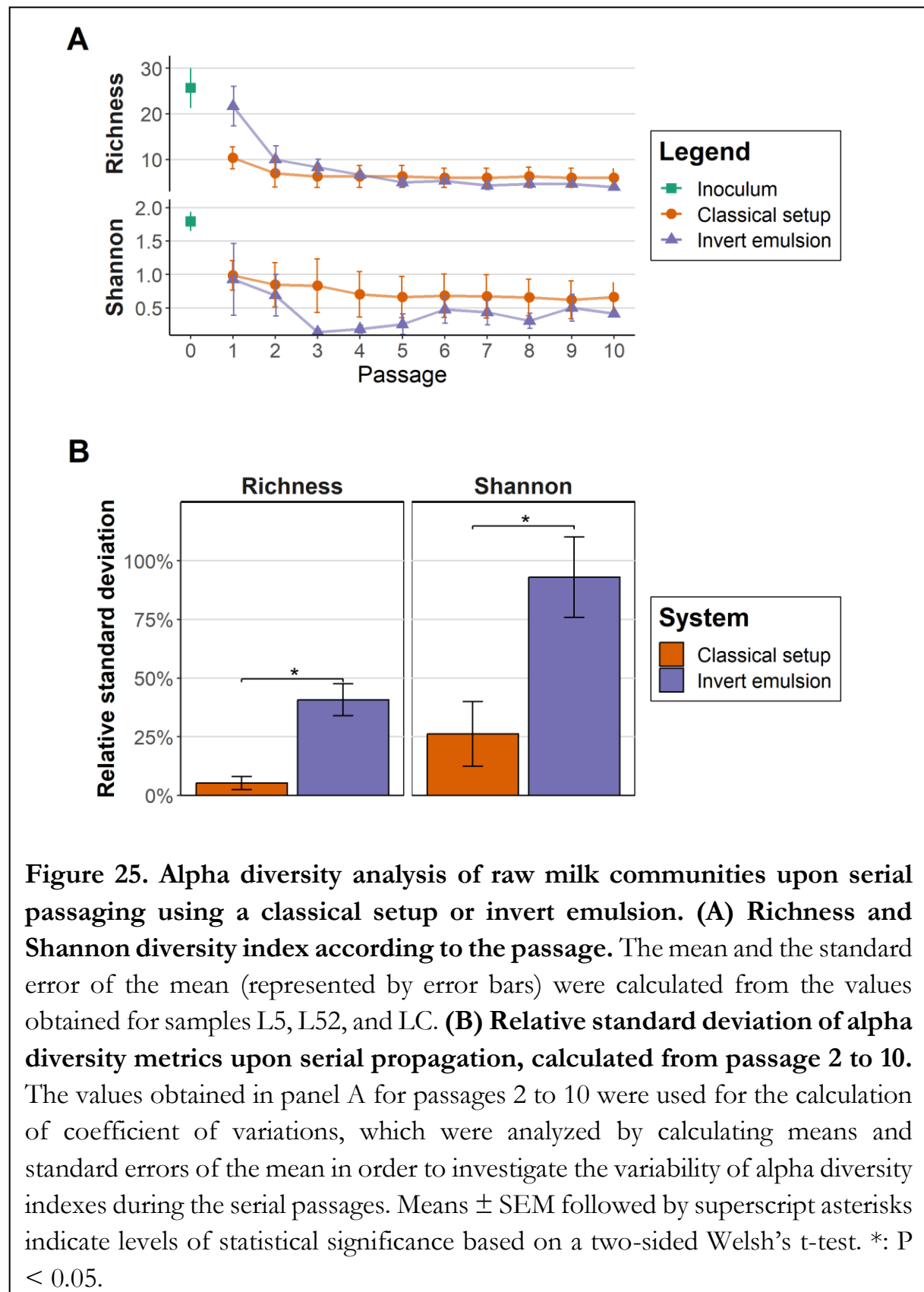


In addition to characterizing the growth of the communities, their composition was monitored by metabarcoding analysis at each propagation step. Community profiles strongly diverged from their respective inoculum upon serial propagation using both techniques (Figure 24). Compared to the initial community, the most drastic changes in OTU relative abundances occurred during the first growth cycle (passage 1). Indeed, in the inoculum L5 taxa belonging to the phylum *Proteobacteria* were largely dominant (97.6 %), whereas after the first propagation *Firmicutes* dominated the communities regardless of the cultivation method (classical

setup: 99.1 %; invert emulsion: 87.4 %). Similarly, the inoculum L52 was dominated by *Proteobacteria* (67.5 %, step 00 Figure 24 and Supplementary Information: Figure 28), whereas *Firmicutes* were dominant after the first growth cycle with both culture systems (100 % with the classical setup and 97.9 % with the invert emulsion system, step 01 in Figure 24 and Supplementary Information: Figure 28). On the contrary, the LC community did not display such drastic change at the phylum level, with 50 % *Firmicutes* in the inoculum, and after the first passage 43.3 % *Firmicutes* with the classical method and 76.4 % using invert emulsion (Figure 24 and Supplementary Information: Figure 28). Beyond the first growth cycle, community compositions tended to reach an equilibrium upon serial passaging using a classical setup (Figure 24, step 02 to 10). In contrast, serial propagation using the invert emulsion technique depicted strong dynamics that appeared as a wave-shaped pattern on relative abundances profiles at the genus level (Figure 24, step 01 to 10).

The data obtained with the three milk samples L5, L52, and LC were considered altogether to investigate the impact of propagation on alpha diversity (Figure 25). OTU richness and Shannon diversity were mostly higher in the inocula (passage 0) than in propagated communities, regardless of the cultivation technique (Figure 25A). Moreover, the most drastic changes in Shannon alpha diversity were observed during the first passage regardless of the propagation technique, concordant with compositional data (Figure 24). The Shannon index markedly decreased during the first growth cycle from 1.79 ± 0.14 in the inoculum to 0.99 ± 0.22 in classical setup and 0.93 ± 0.54 in invert emulsion (Figure 25A). These results indicate the rapid loss of species unadapted to culture conditions along with a gain of uniformity in the structures of propagated communities. Beyond the first passage, communities serially propagated using a classical setup displayed a clear trend towards stabilization of alpha diversity metrics (Figure 25A). On the contrary, serial propagation in emulsified medium resulted in variations of both alpha diversity indices (Figure 25A). In particular, the Shannon index shows oscillations between very low levels (0.14 ± 0.04), indicating a strong dominance of a taxon in terms of

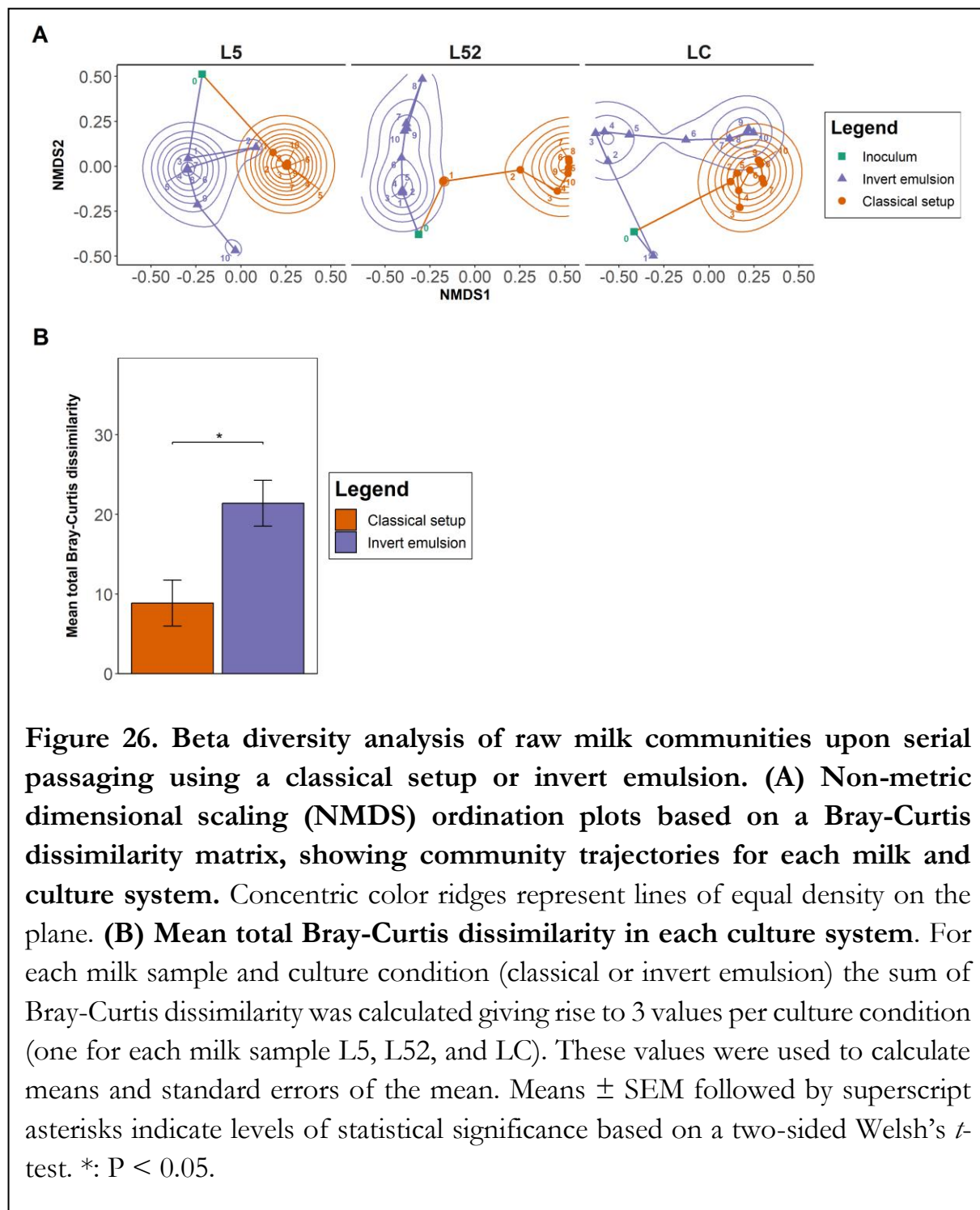
relative abundance, and higher levels (0.69 ± 0.31), indicating a relatively greater uniformity of the distribution of OTUs (Figure 25A, purple triangles). These results



are consistent with the compositional profiles obtained (Figure 24). In order to analyse the variability of alpha diversity indices during sequential propagations, the coefficient of variation (or relative standard deviation) of the diversity indices from the second growth cycle to the last (passages 2 to 10) were calculated for each milk and propagation modality. The resulting data were used to calculate means and error standard of the means (Figure 25B). These results show that the variations in species richness were significantly lower in the communities propagated in the classical system compared to the emulsified system ($P = 2.27 \times 10^{-2}$). Similarly, the coefficient of variation of the Shannon index was significantly lower in the classical system than in the emulsified system ($P = 4.09 \times 10^{-2}$). These observations confirmed a stabilization of communities during sequential propagation in the classical system.

Further assessment of the evolving character of cultivated community structures was performed by comparing samples to each other through beta diversity analysis. A non-metric dimensional scaling (NMDS) ordination based on Bray-Curtis dissimilarity matrices for each cultivated milk sample allowed to represent the trajectories of serially propagated communities (Figure 26A). This ordination shows that community structures diverged from that of the inocula (represented by green squares) during cultivation, regardless of the cultivation system considered. This observation was consistent with both compositional profiles and alpha diversity measurements collected after the first growth cycle (Figure 24 and Figure 25A, respectively). Moreover, the direction of trajectories differed among culture systems (Figure 26A), suggesting that the two culture systems lead to different communities. Furthermore, the closer the points are on the NMDS ordination plot, the more structurally similar communities are. In classical cultivation system, when the number of propagations increases, the communities get closer and converged to a locus of higher density indicating that the similarity of the microbial structure increases (Figure 26A, orange dots). This suggests that the structures of communities grown in the classical system stabilize upon serial passaging, in accordance with alpha diversity indices (Figure 25A). In contrast, the trajectories of communities grown in

emulsified media covered a greater distance and move from one region of higher density to another (Figure 26A, purple dots). This suggests that the structures of



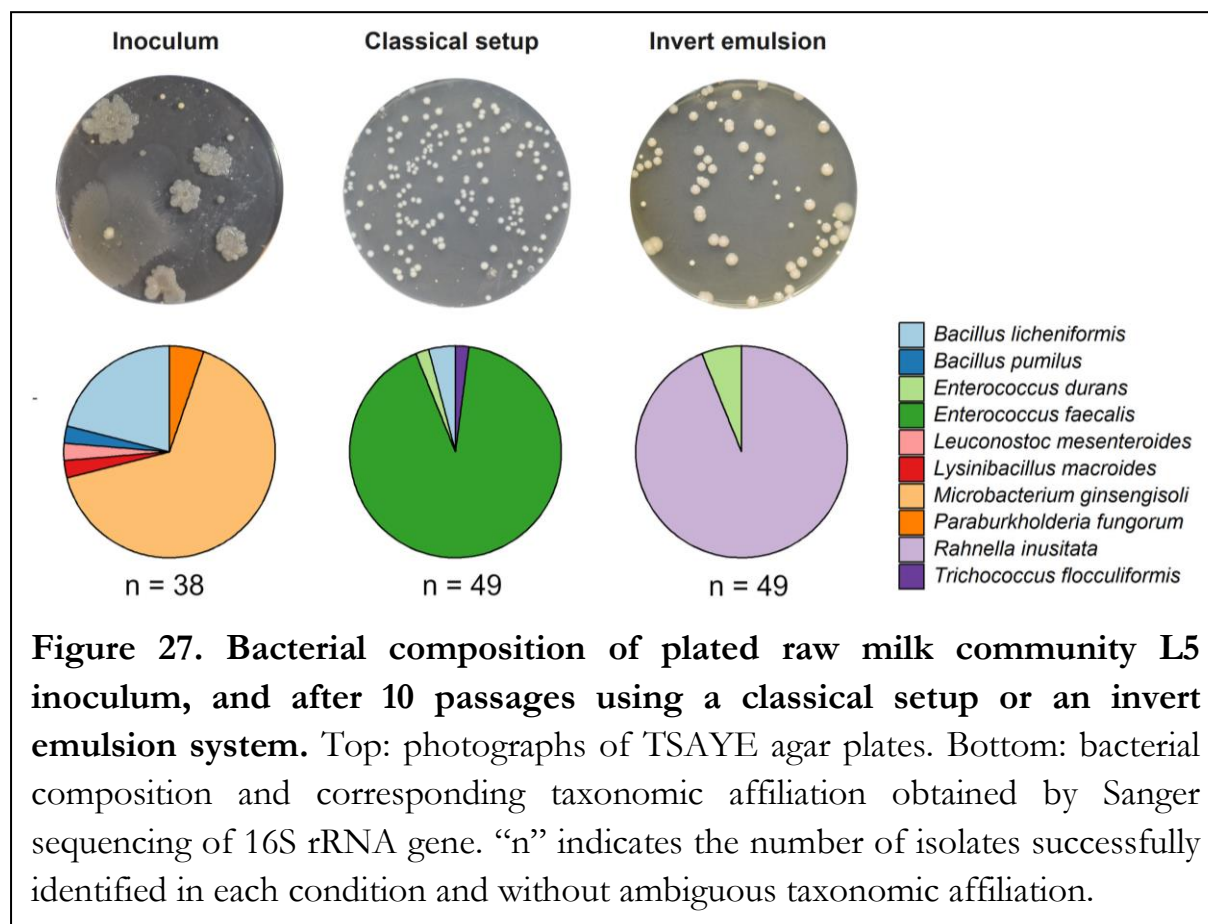
these communities stabilize transiently before evolving into a new structure during sequential propagations, in agreement with the wave-shaped patterns of compositional profiles mentioned earlier (Figure 24). To account for these

converging or diverging trends in community structures, the sums of Bray-Curtis dissimilarities were calculated for each community and culture modality (Figure 26B). It can be expected that the sum of Bray-Curtis dissimilarities between communities would be lower for convergent communities compared to more divergent communities. The results show that the mean total Bray-Curtis dissimilarity was significantly lower in serial propagation using the classical setup ($P = 3.69 \times 10^{-2}$, Figure 26B). This result shows that the amount of community structure change is greater during the serial propagation in emulsified medium compared to the classical system. Overall, ordinations, alpha diversity indices as well as compositional profiles revealed that serial passaging using a classical setup stabilizes the structure of cultivated communities. On the contrary, the cultivation in invert emulsified medium results in evolving communities showing a pattern of successive dominance by a given taxon.

Enrichment of rare taxa during serial propagation in invert emulsion

Metabarcoding analysis of the bacterial communities propagated from the L5 raw milk revealed that the communities grown using the classical setup and the invert emulsion system have a radically different composition from each other after 10 passages (Figure 24), which was confirmed by further analysis (Figures 25 and 26). Interestingly, the dominant taxa in these cultivated communities, *Enterococcus* sp. and *Rahnella* or *Rouxsiella* sp., were rare in the inoculum, in which they represented approximately 0.46 % and 0.12 % of the community respectively. These results opened up the possibility to isolate bacteria at high frequency in the cultured communities that could only be isolated at low frequency in the starting community. To test this hypothesis, samples corresponding to the inoculum and the 10th passages of conventional and invert emulsion cultures were plated on TSAYE agar and incubated at 30°C for 72 h to allow the development of colonies. Approximately 50 randomly selected colonies per modality were then identified by Sanger sequencing

of amplicons of the 16S rRNA gene. Several genera (*Microbacterium*, *Paraburkholderia* and *Lysinibacillus*) were absent from the metabarcoding analysis of the L5 inoculum as well as *Trichococcus* after 10 passages in classical setup (Figure 24), but were successfully isolated on agar plates as shown by Sanger sequencing of 16S rRNA



amplicons (Figure 27), highlighting the complementarity of culture dependent and independent methods in the characterization of microbial communities. In the community resulting from serial passaging in classical setup and in invert emulsion, the majority of the colonies analyzed corresponded to *Enterococcus faecalis* and *Rahnella inusitata*, respectively, whereas these taxa could not be isolated from the plated inoculum (Figure 27). Moreover, no bacteria belonging to the species *E. faecalis* were isolated from the serial propagations performed with the invert emulsion system (Figure 27, right). Similarly, no bacteria from the species *R. inusitata* were isolated from the community obtained by serial propagation using a classical setup (Figure 27, center). Considering *R. inusitata* as a taxon of interest while grouping all others together, a χ^2 test indicated a $P = 2.2 \cdot 10^{-16}$, thereby statistically confirming the

Results

compositional differences observed between the three modalities. This result demonstrates the interest of using serial passaging in invert emulsion for the enrichment and isolation of rare bacteria from an ecosystem of interest.

4. Discussion

The present work aimed at evaluating the contribution of classical and invert emulsion technique applied to the serial propagation of microbiota from raw milk for their shaping in a top-down engineering approach. To do so, 3 different raw milk communities were serially propagated and their composition were characterized by metabarcoding analysis after each growth cycle. Serial passaging in a classical setup led to the stabilisation of communities. Firstly, enumeration showed that serial propagation led to the increase and stabilisation of total bacterial density. Communities grew proficiently to reach approximately 10^9 CFU.mL⁻¹ during the first growth cycle. The stochastic sampling effect exerted by a 100-fold dilution was likely to be weak, limiting bottlenecking which is function of population size (Chang et al., 2021; Sánchez et al., 2021). Secondly, in the classical setup, a stabilisation of the taxonomical structures of the communities was observed with variable levels of richness and diversity according to the starting community. The L5 community was largely dominated by the *Enterococcus* genus after the first growth cycle while others were more diverse. Despite different compositions of the inocula, each raw milk community structure converged towards a structure attractor as shown in ordinations of Bray-Curtis dissimilarity matrices. These equilibria were characterized by lower levels of richness and diversity compared to the inocula. The exclusion of taxa mainly occurred during the first and second growth cycles and can be explained by two hypotheses. Firstly, a significant proportion of the original community was probably unable to grow under the laboratory culture conditions used. Secondly, bacterial interactions in the mixed culture could have led to the selection of a compatible subset of taxa and the exclusion of taxa from that subset (Friedman et al., 2017). The observed decrease of diversity, as measured by the Shannon index, indicated a lower uniformity in the distribution of OTUs, or dominance of a few taxa. During serial propagation, this index showed a stable trend, indicating a stabilization of the taxonomic distribution and the community structure. Our results are consistent with previous reports, where serial passaging in classical setup is commonly associated

with the stabilization of the structures of microbial communities. Taxonomical stabilisation upon serial passaging was described in diverse microbiomes including the intestine (Aranda-Díaz et al., 2022), plants (Jacquiod et al., 2022; Morella et al., 2020), activated sludge (ElNaker et al., 2018) and milk fermentation reactors (Dumarché & Leclercq, 2010). In serial passaging setups, communities undergo ecological succession during each growth cycle, but eventually reach a state of “generational equilibrium” as structures converge over successive incubations (Chang et al., 2021; Goldford et al., 2018; Sánchez et al., 2021). This compositional robustness is thought to be due to bacterial interactions in the mixed culture (Erkus et al., 2013; Hug & Co, 2018; Smid et al., 2014; Smid & Lacroix, 2013). Our results showed that classical serial propagation can be used to propagate communities in a stable manner, and that it could therefore be used in the selection process of communities with phenotypes of interest (Chang et al., 2021).

In order to evaluate the contribution of the invert emulsion method to community propagation and shaping, we used a recently published protocol to prepare emulsified cultures and applied it to a serial propagation regime (Dijamentiuk et al., 2023). As recommended in the latter study, the inoculum of an invert emulsion culture prepared as such did not exceed approximately 10^7 CFU.mL⁻¹ in order to ensure that most of the inoculated microorganisms occupy separate nurturing droplets and therefore did not interact with each other. This was ensured by 100-fold dilution of grown communities before each propagation step. The same study has also demonstrated that the bacterial density reached during a single propagation step is sensitive to the inoculation level. In line with this, the present results have shown that densities of communities cultivated in invert emulsion increased stepwise but reached a lower carrying capacity compared with the classical setup. Also, physiological changes induced by the confinement of bacteria in droplets (Dijamentiuk et al., 2023) and selection of slow growing mutants during serial propagation in invert emulsion (Bachmann et al., 2013) might have contributed to the differences between the two culture systems regarding growth dynamics.

As opposed to their counterparts in a classical setup, structures of communities propagated in invert emulsion evolved following a different behavior. The presence of multiple attractors along community trajectories in ordinations of Bray-Curtis dissimilarity matrices suggest that local stabilizations of community structures are transient. Contrariwise, ecological trajectories of communities propagated with a classical setup presented only a single attractor, indicating structural convergence and stabilization. The transient stability of the structures was also observable through the OTU relative abundance figures which gave rise to wave-shaped patterns. This was further confirmed by the oscillations in the Shannon diversity index over the 10 passages. It has been reported that bacteria are segregated in invert emulsion systems and are not able to establish biotic interactions (Bachmann et al., 2013; Dijamentiuk et al., 2023). In such system, fast growing bacteria are expected to quickly dominate the distribution while slower growing taxa are expected to appear in later passages. Therefore, the appearance of these emerging patterns is likely to be driven by the growth dynamics of individual bacteria entrapped into separated nurturing droplets. Consequently, the variation of community structures serially passaged in invert emulsion is expected to reflect these dynamics. These expectations are consistent with a previous report describing that the privatization of public resources through the use of invert emulsions can lead to enrichment of slow-growing but more yielding mutants in a co-culture during serial propagation (Bachmann et al., 2013). The particular dynamics of communities grown in reverse emulsion show that this technique allows to shape their structure in a different way compared to the classical method, which could be advantageous in a community engineering context. Indeed, for each raw milk community, the two culture systems yielded significantly different microbiota, despite being inoculated with the same community. This highlights their complementarity for shaping communities in a top-down engineering approach, and raises the question of the functional implications of such differences.

The succession of community structures observed in invert emulsion system suggested that it could be used for the enrichment of taxa poorly represented in the inoculum. To test this hypothesis, approximately 50 colonies were isolated from the L5 community inoculum and after 10 growth cycles in classical setup and invert emulsion. Agar plating allowed the successful isolation of several genera which were not found in the metabarcoding analysis. This result emphasize the interest of coupling culture-dependent and culture-independent approaches for the characterization of microbiotas as they both bring partial but complementary information about their composition (Ha & Devkota, 2020). Despite these differences, the composition of cultivated communities assessed by isolation and 16S rRNA sequencing were similar to those obtained by metabarcoding. Cultivation in inverted emulsified medium allowed to successfully isolate bacteria from the species *Rahnella inusitata*, which was poorly abundant in the inoculum and became dominant after 10 passages. This species was found to cause alterations of milk during storage (Trmčić et al., 2015) and present interesting technological application as biocatalyst (L. Wang et al., 2022). Therefore, the ability to isolate this species is of crucial importance for applications such as biopreservation or pharmaceutical engineering. The difficulty to isolate and propagate a wide variety of microorganisms from complex mixtures has long been described in the literature (Lagier et al., 2015). “*Recovering a single organism within the mixed community is akin to finding a needle in a haystack*”, especially if these microorganisms grow slowly and are a subdominant in the population (Ha & Devkota, 2020). Different strategies have been proposed for the recovery of such microorganisms, such as the use of bacteriophages to eliminate targeted abundant populations (Cieplak et al., 2018), microfluidics for high-throughput streaking of microcultures on agar plates (Jiang et al., 2016) or the high-throughput diversification of culture conditions named culturomics (Lagier et al., 2018). Our results highlight the interest of adding the invert emulsion technique to the palette of tools available for the characterization of microbiota, and isolation of rare taxa.

5. Conclusions

Intense research activities on microbiomes have led to a strong need for microbial community propagation techniques. In this work, two co-culture systems were used for the serial propagation of bacterial communities from 3 raw milks and the evolution of their structures was studied. An invert emulsion system, relying on the privatization of public goods was compared to a classical setup wherein bacteria share their resources and establish interactions. The results have shown that serial culture using a classical setup led to compositionally stable communities, while the invert emulsion led to progressive changes and transient compositional stability. Furthermore, the communities propagated differed according to the system, although they originated from a single inoculum, highlighting the complementarity of the tools for shaping microbiota. Finally, successful isolation of a rare taxon using serial propagation in invert emulsion demonstrated its usefulness to enrich the available bacterial repertoire.

Acknowledgements

The authors thank Véronique Sadtler and Damien Blaudez for their participation in the AD thesis committee and providing constructive insights. We are grateful to the INRAe MIGALE Bioinformatics facility (MIGALE, INRAe, 2018. Migale bioinformatics facility, <https://doi.org/10.15454/1.5572390655343293E12>) for providing help and support. We thank Annelore Elfassy, Myriam Schivi and Sylvie Wolff for providing excellent technical support.

Author contributions

AD, CM, FB: conceptualization; AD, CM, FB, CG: methodology; AD: investigation, visualization and original draft; AD, CG: data curation; AD, FB: formal analysis; AD, FB, CM, A-MR: review and editing; AE: resources; FB, CM: supervision; FB, CM, A-MR: funding acquisition; FB, CM: project administration. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

We thank the Carnot Institute Ic  el for providing financial support.

Ethics declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

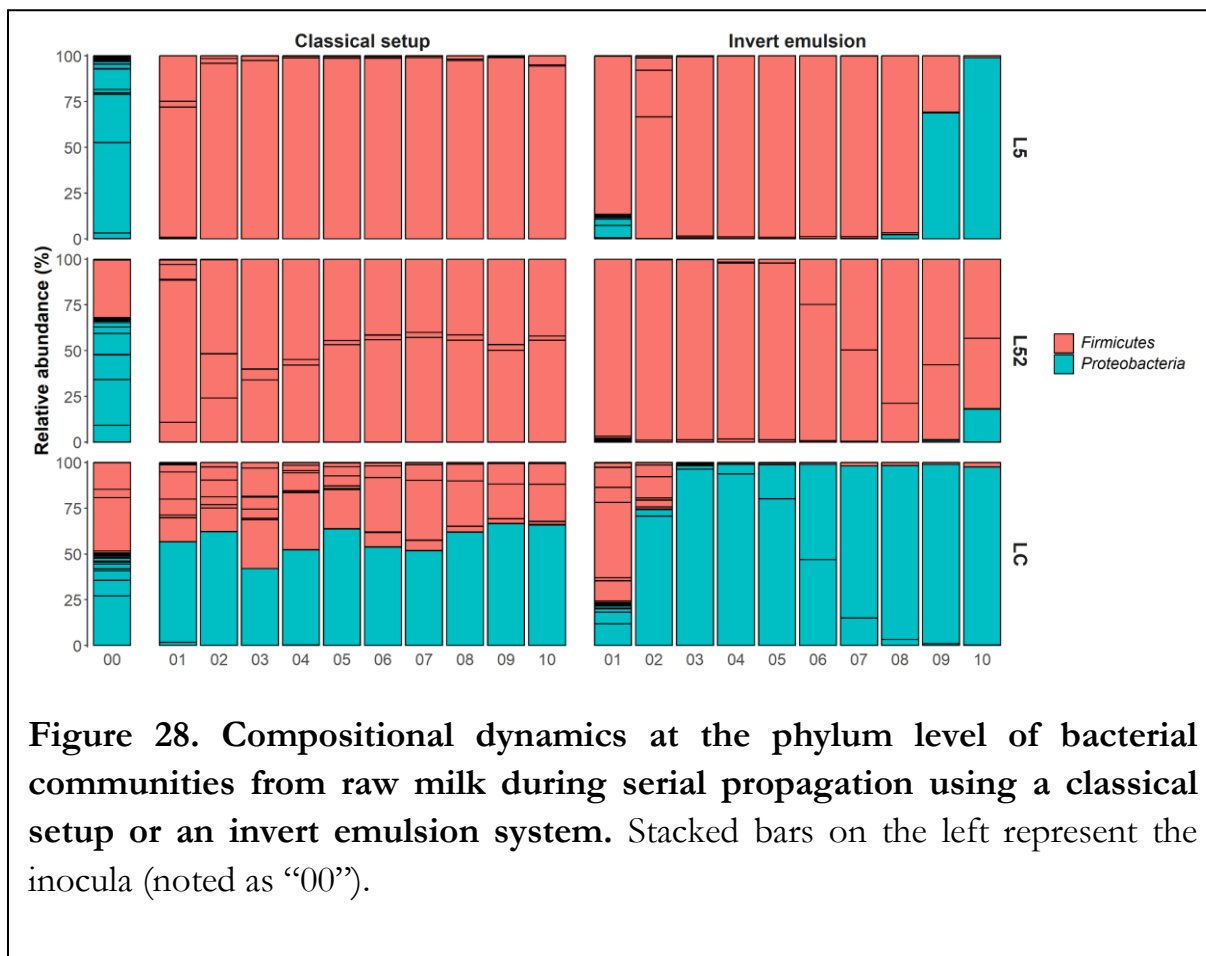
Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The 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.

6. Supplementary Information



Chapitre IV. Etude de la variabilité fonctionnelle de communautés propagées

Identification à haut-débit de microbiotes dérivés de lait cru pour la biopréservation grâce à l'utilisation d'une souche de *Listeria monocytogenes* bioluminescente

Résumé

Malgré les mesures d'hygiène dans l'environnement de production, et celui des méthodes de détection conduisant au retrait ou au rappel de produits contaminés, le contrôle des populations du pathogène *Listeria monocytogenes* dans les fromages reste un défi. Dans ce contexte, la biopréservation, procédé consistant à ajouter des micro-organismes sélectionnés pour leurs propriétés inhibitrices vis-à-vis du pathogène, apparaît comme une solution attractive. Les découvertes sur les microbiotes et les possibilités d'exploitation de leurs propriétés écologiques qui en découlent ouvrent la possibilité d'améliorer la performance des systèmes de biopréservation. Ce travail propose d'identifier des communautés dérivées de laits crus présentant des propriétés antagonistes au pathogène et d'évaluer l'apport de l'utilisation de communautés par rapport à une souche antagoniste pure. Les résultats de co-culture de microbiotes avec la souche rapportrice bioluminescente *L. monocytogenes* EGD_{lux} révèlent que les microbiotes criblés se distinguent par l'intensité et la robustesse de leur caractère inhibiteur. Cela montre que ces différents critères doivent être pris en compte pour identifier des candidats à la biopréservation. Parmi les 88 microbiotes évalués, 6 conduisent à des profils de réponse remarquables. Parmi ces communautés, une présente une intensité et une robustesse d'inhibition supérieure à la souche inhibitrice témoin *C. maltaromaticum* F2. Ces résultats montrent l'intérêt de cette méthode à l'échelle des communautés pour l'identification de communautés candidates pour des applications de biopréservation.

1. Introduction

Les aliments fermentés sont particulièrement exposés aux risques liés aux dangers microbiologiques. Les produits peuvent être contaminés par différents micro-organismes pathogènes, parmi lesquels *Listeria monocytogenes*, particulièrement dangereux pour les populations à risque (Anses, 2022; Melo et al., 2015). Entre 2014 et 2018, la bactérie est impliquée dans 62,3 % des alertes pour danger microbiologique (Anses, 2022). Les procédures de contrôle conduisent généralement au retrait ou au rappel des produits contaminés, ce qui permet d'éviter ce danger, mais engendre toutefois un important gaspillage de ressources. Ces données soulignent la nécessité de mieux maîtriser l'hygiène des environnements de production laitière et fromagère, mais aussi de développer des méthodes permettant de contrôler les populations de micro-organismes indésirables au sein même du produit. L'ajustement des paramètres physico-chimiques (pH, activité de l'eau, température), ainsi que la compétition avec le microbiote concourent au maintien ou à l'exclusion de la flore indésirable (Irlinger & Mounier, 2009; Ryser & Marth, 1987; Verraes et al., 2015). La biopréservation repose sur l'utilisation de la microflore de l'aliment et de ses métabolites antibactériens afin de promouvoir un effet barrière contre les flores pathogènes ou d'altération (Stiles, 1996; Zagorec & Christieans, 2013). En particulier, la recherche et la valorisation de bactériocines, peptides bactériens antimicrobiens, est une piste explorée depuis plusieurs décennies pour la biopréservation (Twomey et al., 2021).

Le développement de solutions de biopréservation fait ainsi généralement appel à la sélection de souches candidates présentant un pouvoir inhibiteur vis-à-vis du pathogène visé, en se basant sur un criblage fonctionnel ou encore des données génomiques (Borges et al., 2022; Souza et al., 2022). Par exemple, l'exploration du génome de l'espèce *Carnobacterium maltaromaticum* a révélé un potentiel génétique pour la production de bactériocines et d'autres substances antimicrobiennes (Begrem et al., 2020; Gontijo et al., 2022). Des travaux récents ont montré que la combinaison

de bactériocines produites par différents micro-organismes pouvait être efficace pour l'inhibition d'une diversité de micro-organismes (Soltani et al., 2022). D'autres travaux suggèrent que l'exploitation de synergies entre micro-organismes producteurs de bactériocines pourrait être une approche bénéfique non seulement pour l'inhibition de la croissance mais aussi pour la réduction des populations de *Listeria innocua* pendant la production de fromages modèles (Mills et al., 2017). Cela soulève la question de la valorisation de microbiotes dérivés de laits crus pour des applications en biopréservation au lieu de souches uniques. Dans un contexte agronomique, il a été montré qu'il est possible de tirer profit des propriétés écologiques inhérentes aux communautés microbiennes résidentes d'un végétal pour y réduire l'incidence de contaminations par une flore pathogène (Wei et al., 2015). D'autres travaux ont par ailleurs montré que des consortia microbiens pouvaient être particulièrement efficaces pour la réduction de la croissance de *L. monocytogenes* au niveau des surfaces de fromages au lait cru (Retureau et al., 2010). Enfin, des approches similaires basées sur l'utilisation de consortia bactériens ont été proposées pour l'inhibition de souches d'*Escherichia coli* productrices de shigatoxines (Callon et al., 2011, 2016; Frétin et al., 2020).

D'une manière générale, les découvertes sur les microbiotes de divers habitats ont permis de révéler leur potentiel et ont conduit la communauté scientifique à tenter de les valoriser. Cette démarche impose de pouvoir sélectionner les communautés par mesure de traits d'intérêt exprimés par les microbiotes (Arias-Sánchez et al., 2019; Swenson et al., 2000; Wright et al., 2019). En transposant à l'échelle des communautés une méthode de criblage utilisée pour la sélection de souches inhibitrices du même pathogène (El Kheir et al., 2018), ces travaux ont pour objectif de proposer une méthode de criblage pour la sélection de microbiotes dérivés de laits crus capables d'inhiber *L. monocytogenes*, et de comparer l'apport de l'utilisation de ces microbiotes par rapport à une souche inhibitrice de référence.

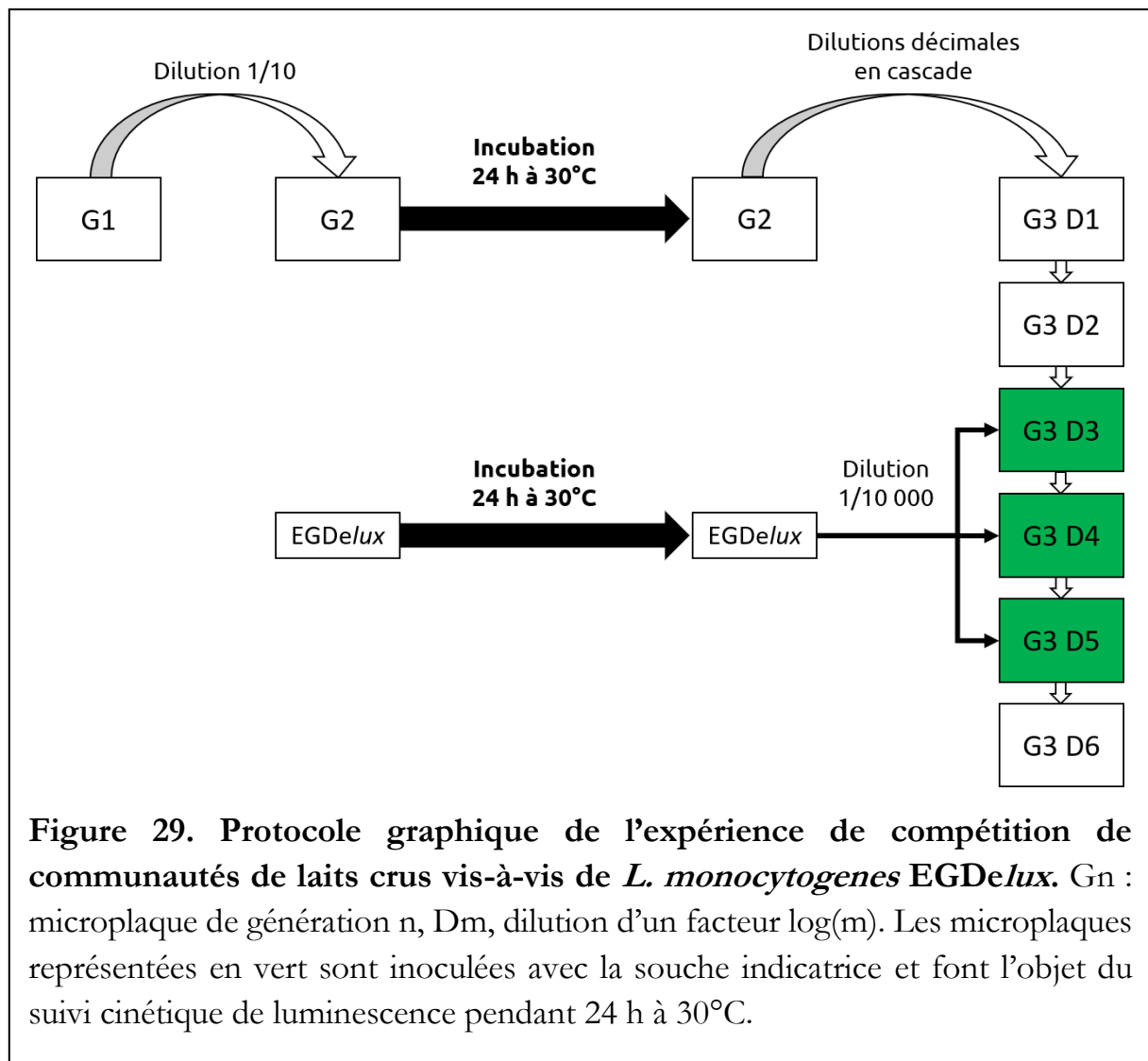
2. Matériel et méthodes

En raison du caractère pathogène de *Listeria monocytogenes*, l'ensemble des cultures microbiennes a été effectué dans un laboratoire de sécurité biologique de niveau 2. Les manipulations de microplaques pour le transfert de cultures ainsi que l'incubation et la lecture de luminescence font appel à l'utilisation d'un automate de manipulation de liquides et d'incubation (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suisse).

Construction de la collection de travail et conditions de culture

La collection de quatre-vingts six laits crus utilisés dans cette étude a préalablement fait l'objet d'une campagne de sélection de micro-organismes isolés présentant des propriétés de biopréservation (El Kheir et al., 2018). A ces échantillons de laits crus s'ajoutent un lait issu d'une exploitation agricole locale et un lait composite composé d'un mélange de laits crus. L'ensemble de ces échantillons ont été conservés à -30°C jusqu'à constitution de la collection de travail. La collection de travail désigne l'ensemble composé des communautés de laits crus, d'une souche rapportrice bioluminescente et de témoins de calibration et d'inhibition. Après décongélation et homogénéisation des 88 laits crus sélectionnés, 24 µL ont été transférés dans une microplaque de 96 puits contenant chacun 96 µL de bouillon Trypticase Soja (TSB) (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) supplémenté de 6 g.L⁻¹ d'extrait de levure (YE). Les puits vides restants sont remplis avec le même volume de *Listeria monocytogenes* EGDe ou d'une souche témoin présentant une forte activité anti-*Listeria* constituant un témoin d'inhibition *Carnobacterium maltaromaticum* F2 (*Cm* F2) (Dijamentiuk et al., 2023; Gontijo et al., 2022; Ramia et al., 2020), préalablement cultivés en TSBYE pendant 24 h à 30°C. La collection initiale a été produite en 12 exemplaires. L'ensemble des microplaques produites est incubé pendant 24 h à 30°C, puis 30 µL d'une solution aqueuse de glycérol 50% (v/v) stérile sont ajoutés dans chaque puits. Cette collection de génération 1 est conservée à -80°C jusqu'aux expériences de compétition. En parallèle, la souche bioluminescente *Listeria monocytogenes* EGDe_{lux} (Riedel et al., 2007) est striée sur gélose avec supplément

sélectif PALCAM (Biokar Diagnostics, Allonne, France) incubée à 30°C pendant 24 h. Un isolat est ensuite transféré dans 10 mL de TSBYE à 30°C pendant 24 h. A la culture starter obtenue est ajouté du glycérol pour atteindre une concentration finale de 10 % (v/v). Le mélange homogène est distribué en aliquots de 1,5 mL congelés à -80°C jusqu'à utilisation.



*Identification de communautés inhibant la luminescence de *L. monocytogenes* EGD_{Delux}*

L'identification de communautés inhibitrices repose sur la co-culture de communautés de la collection de travail avec la souche bioluminescente *L. monocytogenes* EGD_{Delux}. En effet, des travaux ont montré que la luminescence produite par cette souche reflète son activité métabolique, ce qui justifie son choix comme souche rapportrice (El Kheir et al., 2018; Riedel et al., 2007). Vingt-quatre heures avant la co-culture, une microplaque de la collection de travail (génération 1) est décongelée puis homogénéisée. Quinze microlitres de suspension microbienne sont transférés aux puits d'une microplaque contenant 135 μ L de TSBYE frais. En parallèle, une pré-culture de *L. monocytogenes* EGD_{Delux} est préparée par transfert de 10 μ L d'un starter décongelé dans 10 mL de TSBYE frais. Cette culture ainsi que la microplaque de génération 2 sont incubées à 30°C pendant 24 h. Le jour de l'expérience, la pré-culture de souche indicatrice présente typiquement une DO_{595nm} de 1,2 qui équivaut à une densité de population d'environ 10⁹ UFC.mL⁻¹. La microplaque de génération 2 subit une cascade de dilutions décimales par ajout de 15 μ L de culture mère dans 120 μ L de TSBYE par puits, jusqu'à un facteur de dilution de 10⁶. Les microplaques correspondant aux dilutions de facteurs 10³ (D3), 10⁴ (D4) et 10⁵ (D5) sont des microplaques blanches opaques (Corning 3917, Corning Inc., NY, USA) adaptées à la lecture de la luminescence en limitant la diffusion de lumière inter-puits. A ces microplaques sont ajoutés 15 μ L /puits de la pré-culture de souche indicatrice préalablement diluée au 1/1000 (v/v) dans du TSBYE frais. Les co-cultures sont incubées sous agitation axiale à 30°C pendant 24 h et leur luminescence est mesurée toutes les 20 min. La Figure 29 résume les étapes de cette expérience. L'expérience a été répétée 6 fois.

Indicateur de perturbation de la luminescence

L'indicateur de perturbation de la luminescence (LDI , anglais : *Luminescence Disturbance Indicator*) est calculé suivant El Kheir et al., 2018 :

$$LDI = \frac{1}{n} \sum \frac{l}{t}$$

Où n désigne le nombre de mesures, l la luminescence exprimée dans une unité arbitraire et t le temps en secondes.

Une mesure relative dérivée, l'indicateur d'inhibition de luminescence $LDIr$, est calculée ainsi :

$$LDIr = 100 \times \frac{LDI}{LDIc}$$

Où LDI désigne une valeur obtenue dans n'importe quelle condition et $LDIc$ la valeur obtenue en l'absence d'inhibition, c'est-à-dire le LDI de la souche témoin de bioluminescence EGDe *lux* seule. Pour ces travaux et de manière à présenter une mesure intuitive de la force d'inhibition, l'indice utilisé est $100 - LDIr$. Ainsi, cette valeur vaut 0 pour le témoin EGDe_{lux} et une valeur positive indique une inhibition de la luminescence.

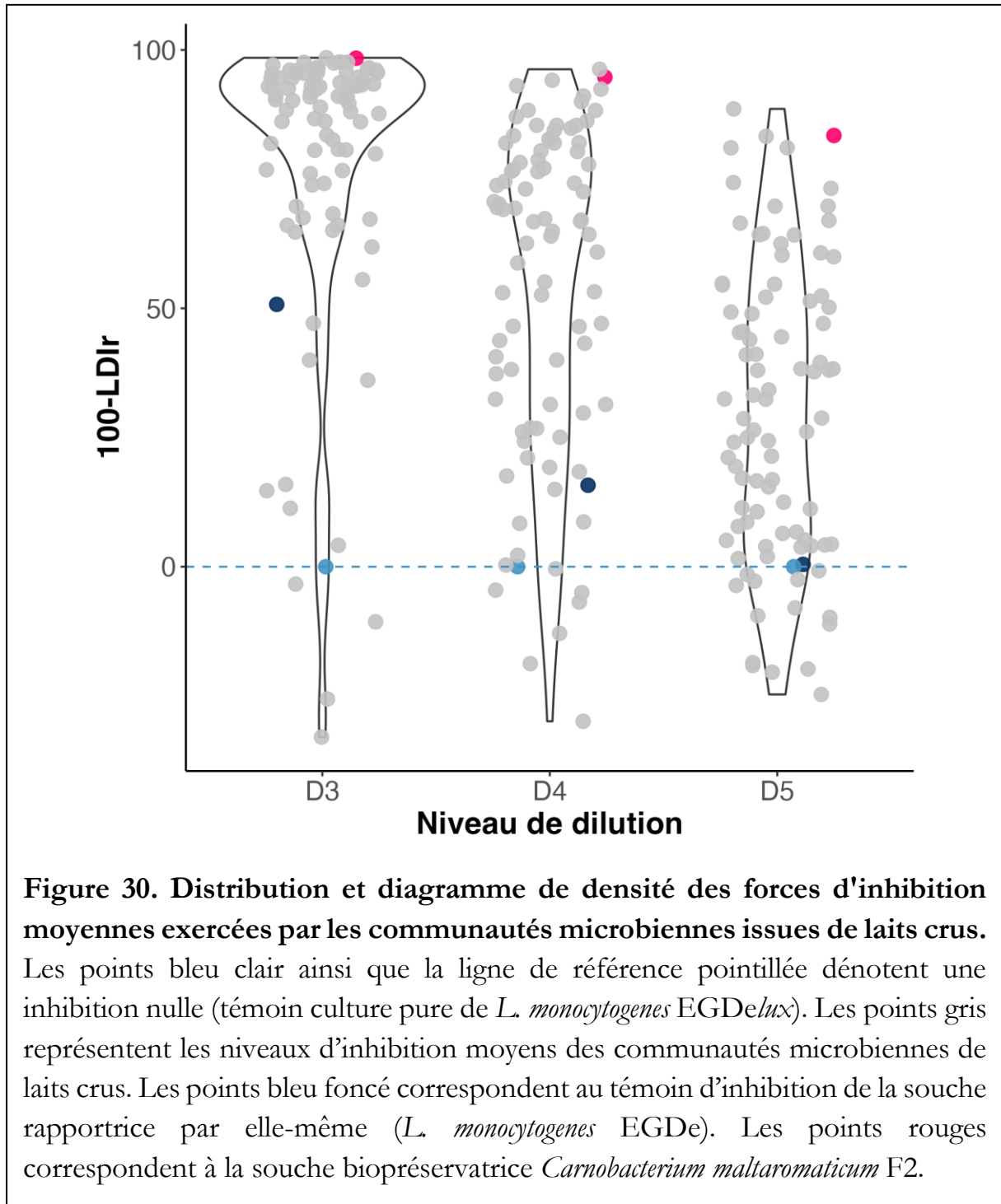
Sélection de communautés présentant un potentiel inhibiteur d'intérêt

L'ensemble du traitement des données a été effectué avec le logiciel R version 4.2.2 (R Core Team, 2022). Une approche statistique a été appliquée de manière à sélectionner les communautés les plus inhibitrices, présentant un $100 - LDIr$ moyen significativement supérieur à 0 pour chacune des trois dilutions considérées. Celle-ci consistait à réaliser un test t unilatéral, avec $H_0 : \mu = 0$ et $H_a : \mu > 0$ et un risque $\alpha = 10^{-3}$. Les communautés sélectionnées (P value ≤ 0.001) sont représentées sous forme d'une matrice comprenant les $100 - LDIr$ moyens aux trois dilutions et les coefficients de variation associés. Cette matrice permet de construire une carte

thermique avec le package *ComplexHeatmap* (Gu et al., 2016) et de regrouper les communautés par classification ascendante hiérarchique basée sur la distance euclidienne et avec la méthode des liens moyens. Les comparaisons de moyennes ont été réalisées par analyse de variances (ANOVA) suivies de tests Tukey de comparaisons multiples de moyennes deux à deux lorsque les conditions de normalité des résidus (testée à l'aide du test de Shapiro-Wilk) et d'homogénéité de variance (testée à l'aide d'un test de Bartlett) étaient respectées. En cas de non-respect des prérequis de l'ANOVA, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test des rangs signés de Wilcoxon ont été réalisés. Dans tous les cas, les valeurs P obtenues ont été comparées à un risque alpha fixé à 0.05.

3. Résultats

Criblage et sélection de communautés inhibitrices

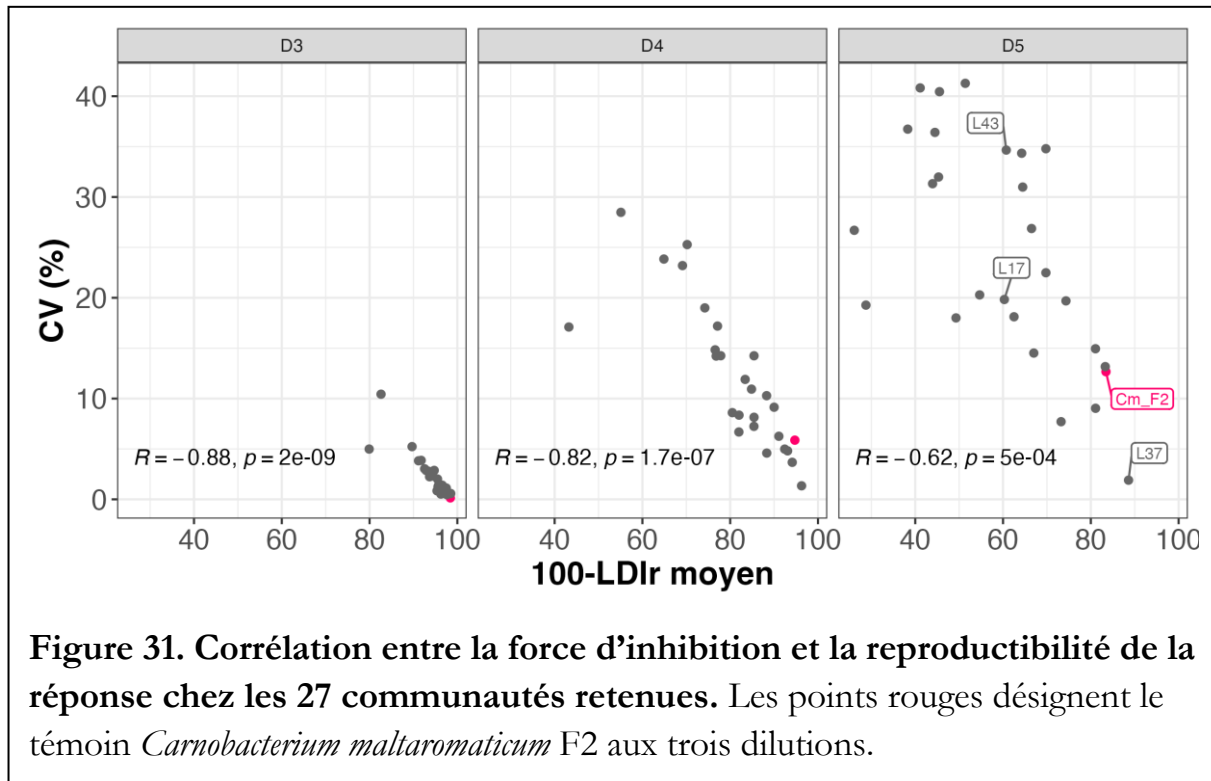


Le criblage à haut-débit de communautés a été réalisé sur la base de la mesure et la comparaison de leurs forces d'inhibition lors de co-cultures avec *L. monocytogenes* EGD_{lux}. Dans ce travail, l'intensité d'inhibition de la luminescence $100 - LDIr$,

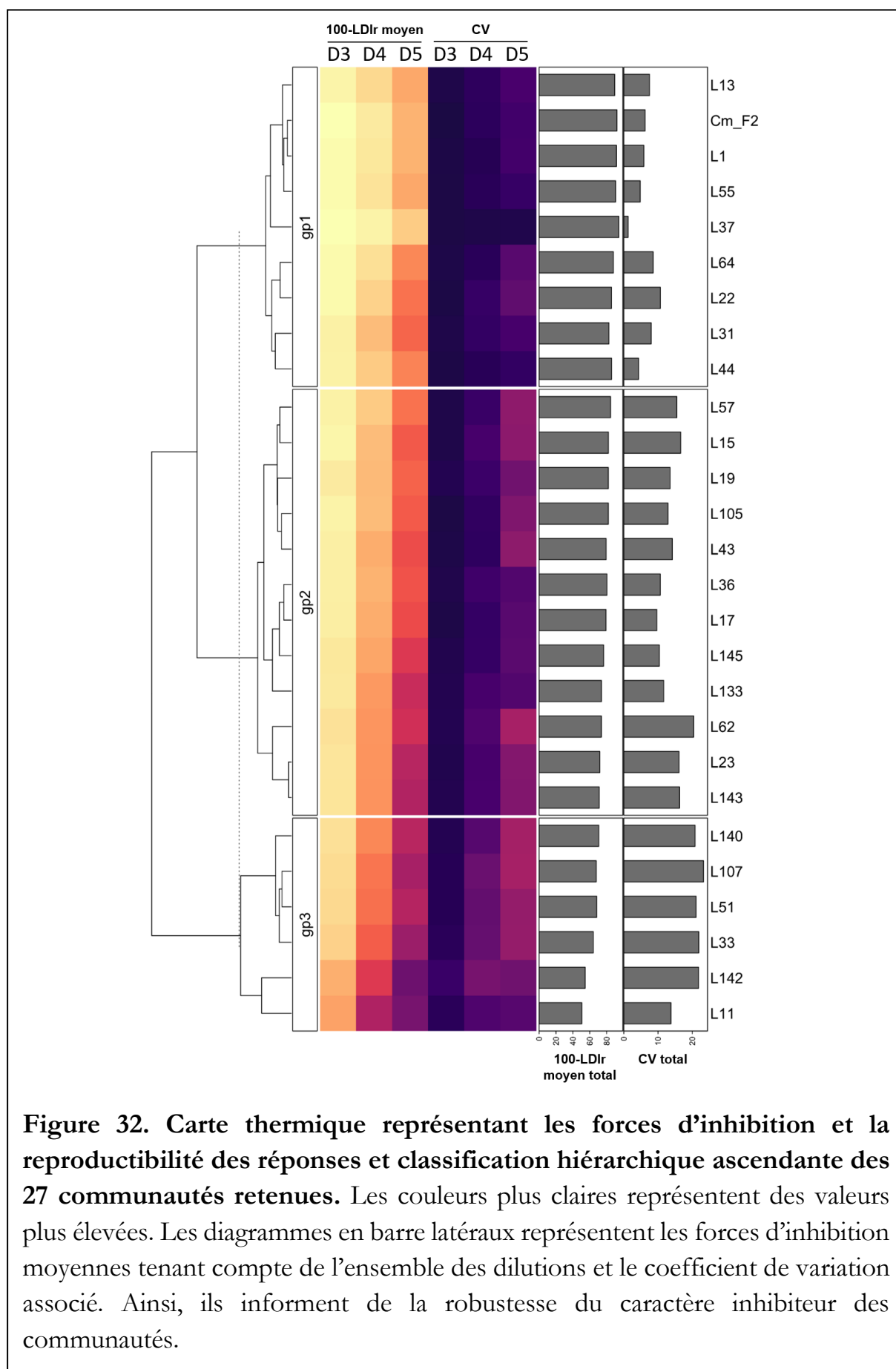
valant 0 en l'absence d'inhibition, a été mesurée au cours du temps sur des co-cultures de *L. monocytogenes* EGD_{lux} et de communautés cultivées. Différents niveaux d'inoculum des communautés ont été testés afin d'évaluer l'impact de l'inoculum sur les propriétés inhibitrices. Certaines communautés présentent des valeurs de forces d'inhibition négatives et n'ont pas été considérées dans la suite de l'étude. La distribution montre que la majorité des points présente une valeur $100 - LDIr$ moyenne significativement positive aux trois dilutions testées ($P < 0.001$, test de Student pour échantillon unique). Toutefois, cette proportion diminue lorsque la dilution augmente (94,5% à D3, 91,2% à D4 et 83,5% à D5) (Figure 30). Seulement 27 communautés sur les 88 testées inhibent significativement la luminescence de *L. monocytogenes* EGD_{lux} pour les trois dilutions testées et sont retenues pour la suite de l'analyse. La dilution D3 est peu discriminante, en effet 47 communautés sur 88 inhibent plus de 90 % de la luminescence ($1-LDIr > 90 \%$). En revanche, les dilutions D4 et D5 permettent de mieux différencier les communautés par leurs propriétés inhibitrices puisque les valeurs de $100-LDIr$ sont graduellement distribuées entre 0 et 100 pour ces deux dilutions (Figure 31). Ces résultats montrent que les communautés se distinguent fortement par leur capacité à inhiber la luminescence de *L. monocytogenes* EGD_{lux}.

Les 6 répétitions d'expériences réalisées pour chaque communauté ont permis de calculer le coefficient de variation afin d'évaluer le niveau de variabilité, ou la robustesse, des propriétés anti-*L. monocytogenes* des communautés. L'analyse du coefficient de variation en fonction de l'inhibition $100-LDIr$ montre une relation négative forte entre la robustesse et la force d'inhibition. Ainsi, et particulièrement pour les dilutions D3 et D4, plus l'inhibition est élevée, plus le coefficient de variation est faible avec un niveau de dispersion faible des données (coefficients de corrélation R respectivement de -0.88 et de -0.82) (Figure 31). Toutefois, pour la dilution D5, bien que la corrélation soit significative ($P = 5.10^{-5}$), la corrélation est moins forte car les données sont plus dispersées. Cela indique que des communautés présentant le même niveau d'inhibition de la luminescence peuvent ainsi présenter des coefficients

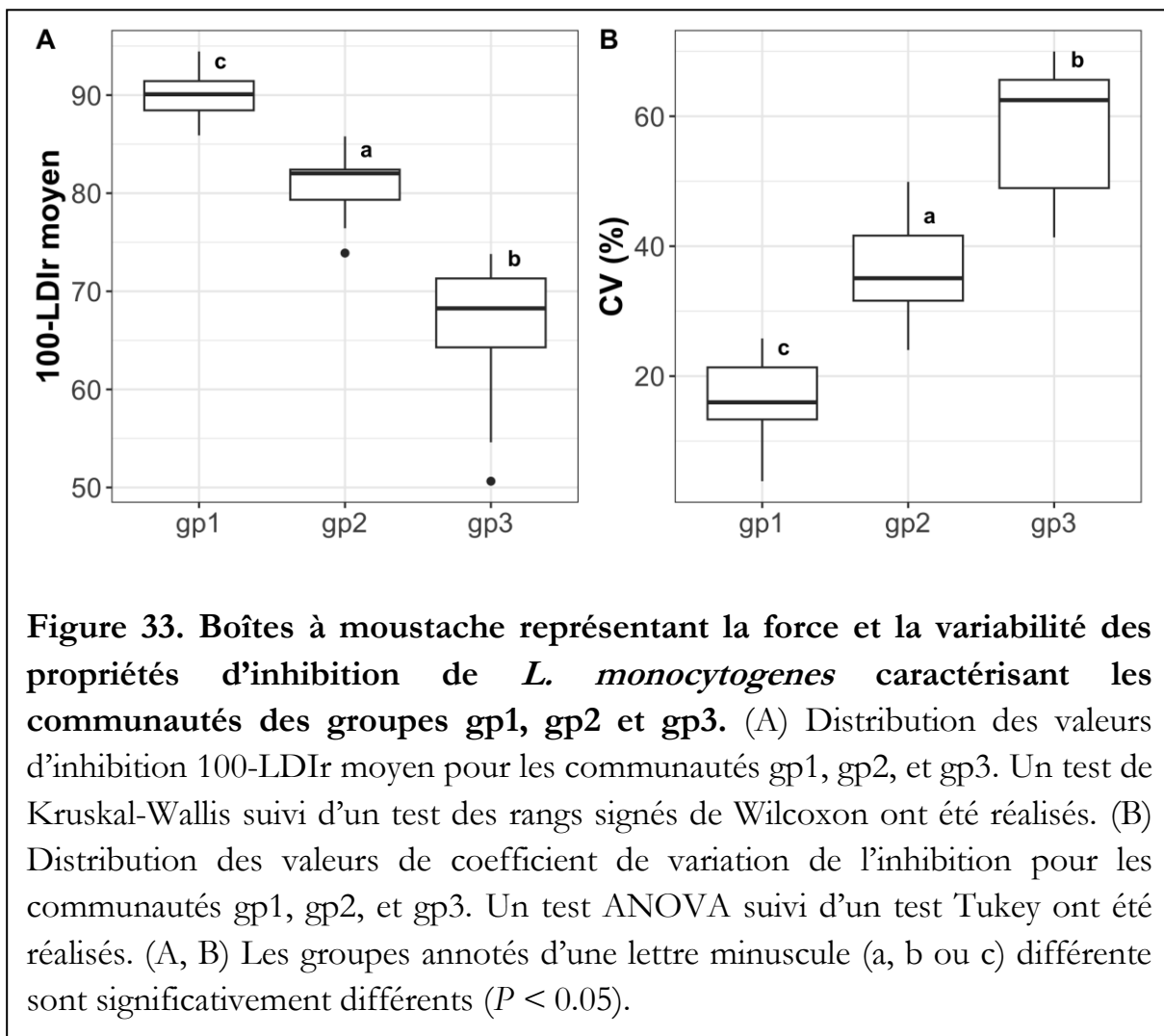
de variation très différents. Par exemple, à la dilution D5, les communautés L17 et L43 inhibent la luminescence 100-LDIr avec la même intensité de 60 %, mais avec des coefficients de variation très différents (de 20 % et 35 %, respectivement). En maximisant l'intensité d'inhibition 100-LDIr et en minimisant le coefficient de variation, la communauté présentant les propriétés anti-*L. monocytogenes* les plus intéressantes est la communauté L37 (Figure 31).



Les communautés retenues ont été regroupées en intégrant les données, pour chaque dilution, de force d'inhibition moyenne (100-LDIr) et de robustesse (coefficient de variation). Cette classification hiérarchique ascendante a permis d'identifier 3 groupes de communautés : gp1, gp2 et gp3 (Figure 32). Le groupe gp3 rassemble les communautés pour lesquelles les niveaux d'inhibition 100-LDIr sont les plus faibles et les coefficients de variation les plus élevés (Figure 33). Le groupe gp1 à l'inverse regroupe les communautés pour lesquelles les niveaux d'inhibition 100-LDIr sont les plus élevés et les coefficients de variation les plus faibles (Figure 33). Le groupe gp1 contient 6 communautés, dont la communauté L37, appartenant au même groupe de force d'inhibition et de robustesse que la souche témoin *Carnobacterium maltaromaticum* F2 (Figure 32).



Le groupe gp2 présente des caractéristiques intermédiaires entre gp1 et gp3 (figure 33). Ces résultats montrent que les communautés présentant les propriétés les plus intéressantes d'inhibition de *L. monocytogenes* sont celles du groupe gp1 et qu'au sein de ce groupe la communauté la plus performante en termes d'intensité et de robustesse d'inhibition est la communauté L37. De façon plus globale, ces résultats montrent que l'approche de criblage proposée permet de sélectionner des communautés issues de laits crus présentant un pouvoir inhibiteur fort et robuste de *Listeria monocytogenes* EGD_{Delux}. De plus, ils montrent que la robustesse du pouvoir inhibiteur des communautés est corrélée à son intensité.



4. Discussion

Les microbiotes représentent une opportunité intéressante pour la biopréservation des aliments fermentés (Frétin et al., 2020; Mills et al., 2017; Retureau et al., 2010). Cette application soulève la question des méthodes de criblage permettant de sélectionner des communautés présentant des propriétés d'intérêt. La méthode de criblage proposée repose sur l'inhibition de la luminescence de la souche *Listeria monocytogenes* EGD_{lux} dont la luminescence reflète l'état de croissance et qui peut être utilisée pour le criblage de souches biopréservatrices comme cela a été décrit précédemment (El Kheir et al., 2018). Ce travail propose de sélectionner des communautés issues de laits crus sur la base de résultats d'expériences de co-culture avec cette souche indicatrice.

Les résultats montrent que les communautés se distinguent du point de vue de leur force d'inhibition de la luminescence et que cette méthode est ainsi adaptée à la recherche de communautés inhibitrices. Certaines communautés, présentant des valeurs de force d'inhibition négatives ont été exclues de la sélection. La signification de cette stimulation de l'activité lumineuse n'est pas connue mais pourrait vraisemblablement correspondre à une promotion de la croissance de la souche rapportrice *L. monocytogenes* EGD_{lux}. Pour les communautés inhibitrices retenues, les résultats montrent également que la reproductibilité des réponses est variable. Ainsi nous avons intégré cette dimension pour affiner le criblage. Les communautés inhibitrices du groupe gp1 présentent à la fois un pouvoir inhibiteur élevé et robuste, comparable à celui de la souche inhibitrice de référence *Carnobacterium maltaromaticum* F2 (Dijamentiuk et al., 2023; Gontijo et al., 2022; Ramia et al., 2020). Le mécanisme impliqué pour *C. maltaromaticum* F2 est celui de la compétition par interférence. En revanche, le mécanisme par lequel les communautés exercent une inhibition vis-à-vis du pathogène ne sont pas connus. De manière analogue à *C. maltaromaticum* F2, les propriétés d'inhibition des communautés pourraient reposer sur la production de substance inhibitrice par un ou plusieurs micro-organismes présents dans ces

communautés. Une autre hypothèse serait que l'inhibition serait le résultat de la compétition par exploitation, et ferait intervenir des phénomènes de recouvrement de niche entre des micro-organismes de la communauté et le pathogène (Wei et al., 2015). Il est aussi possible que ces deux mécanismes agissent de concert et contribuent tous les deux à inhiber *L. monocytogenes*.

Ce criblage a été réalisé sans connaissance de la composition des microbiotes. Or, des auteurs argumentent qu'atteindre un état de stabilité générationnelle, c'est-à-dire de stabilité compositionnelle d'une génération à la suivante, est crucial avant la sélection artificielle de communautés sur la base de leur fonctionnalité (Chang et al., 2021). En effet, leurs simulations montrent que la sélection de microbiotes dans les premières générations favorise ceux présentant une fonctionnalité élevée, celle-ci se révélant médiocre lorsque les communautés atteignent la stabilité générationnelle (Chang et al., 2021). Des données de composition permettraient de préciser comment la fonctionnalité évolue avec la composition de la communauté lors de la propagation séquentielle. Jacquiod et collègues, en étudiant l'évolution de la composition de communautés associées à une plante modèle en agronomie, ont identifié un point de cassure moyen à la 5^{ème} génération, indiquant une stabilisation de leur structure. En revanche, Aranda-Díaz et collègues montrent pour des communautés *in vitro* dérivées d'échantillons fécaux et propagées en milieu riche (BHI), que la stabilité au rang taxonomique de la famille est atteinte après le deuxième passage (Aranda-Díaz et al., 2022). Dans les travaux du Chapitre III, nous avons constaté que la stabilisation de la structure des communautés de laits crus propagées en bouillon TSBYE intervenait dès le 3^{ème} cycle de culture. La connaissance de la taxonomie permettrait de tester des hypothèses complémentaires quant aux relations entre paramètres structuraux de l'écosystème et force d'inhibition. De même, ces données pourraient potentiellement permettre de mettre en évidence les sources de la variabilité fonctionnelle des microbiotes étudiés. Aussi, ce criblage a été effectué sans a priori sur l'innocuité des microbiotes utilisés, laquelle pourrait être

partiellement inférée par la connaissance du contenu taxonomique ou génomique au sens large.

En nous basant sur les travaux d'El Kheir et collègues (El Kheir et al., 2018), nous considérons que l'extinction de la luminescence de *L. monocytogenes* EGD_{Delux} reflète son inhibition. Ainsi la méthode utilisée permet de réaliser un criblage à haut débit avec un gain de temps considérable par rapport à des méthodes reposant sur le dénombrement. Cependant, ces travaux n'explorent pas la possibilité que la perturbation du cycle luciférine-luciférase soit découplée de l'inhibition de la souche. Globalement, l'intérêt du criblage à haut débit présenté dans ces travaux est de réduire rapidement le nombre de candidats sur lesquels d'autres tests doivent être pratiqués en vue d'une application en biopréservation. Des travaux complémentaires impliquant l'utilisation du dénombrement sur milieu sélectif (*e.g.* PALCAM) permettraient de confirmer l'inhibition de la souche par les communautés sélectionnées. De même, appliquer cette méthode à la co-culture vis-à-vis d'autres souches de *L. monocytogenes* permettrait d'évaluer le spectre d'inhibition des microbiotes. En outre, le pouvoir inhibiteur de communautés est ici évalué avec un milieu de culture de laboratoire. Des données de compétition dans du lait, ainsi qu'en présence de conditions physico-chimiques défavorables telles que celles retrouvées dans les produits laitiers fermentés (acidité et salinité élevée), permettraient d'affiner ce criblage comme démontré pour la recherche de souches inhibitrices (El Kheir et al., 2018). Enfin, en plus de la recherche de propriétés biopréservatrices, il serait pertinent de compléter ce criblage en incluant d'autres propriétés technologiques attendues pour des ferments, telles que l'acidification du lait ou encore la production d'arômes pour la production fromagère.

Conclusion

La sélection de communautés microbiennes dérivées de lait cru pour des applications en biopréservation doit faire appel à une étape de criblage ciblant l'activité inhibitrice ou suppressive de pathogène. Ce travail a transposé à l'échelle de microbiotes une méthode développée pour la recherche de souches présentant un potentiel anti-*Listeria monocytogenes*. Les résultats montrent que les communautés criblées se distinguent par leur force d'inhibition et la variabilité de leur réponse, justifiant d'intégrer ces deux dimensions dans le criblage. De plus, il a permis de sélectionner 6 communautés microbiennes présentant des niveaux d'inhibition et de robustesse similaires à celles de la souche témoin *Carnobacterium maltaromaticum* F2. Dans la globalité, ce travail montre qu'il est possible d'employer une souche rapportrice bioluminescente pour le criblage de communautés inhibitrices.

Chapitre V. Discussion

L'intérêt croissant pour les communautés microbiennes parmi les scientifiques et les industriels suscite une demande de nouveaux outils et techniques pour les cultiver et les façonner. Les travaux de cette thèse ont permis d'aborder la thématique de l'ingénierie de communautés en évaluant les apports respectifs de l'utilisation de systèmes de co-cultures différents au regard du modelage et de la stabilisation de communautés bactériennes, et ont permis d'étudier l'effet de la propagation sur la fonctionnalité de microbiotes dans un contexte de biopréservation.

Développer un système de co-culture afin de limiter les interactions microbiennes

La première étape de ces travaux de thèse consistait à mettre au point le système expérimental. La fonction visée de ce système était de limiter les interactions microbiennes, en particulier la compétition susceptible de conduire à l'exclusion indésirable de certaines espèces au sein du réacteur de culture. La littérature fait état de nombreux concepts de systèmes de co-culture permettant de moduler la magnitude des interactions microbiennes en imposant un certain niveau de ségrégation spatiale aux micro-organismes impliqués (Goers et al., 2014). Les travaux mentionnent des exemples de micro-confinement de micro-organismes, notamment à l'aide de systèmes microfluidiques (Bachmann et al., 2013; Hsu et al., 2019; Jiang et al., 2016; Kaminski et al., 2016) ou millifluidiques (Boitard et al., 2015). Ces systèmes présentent l'avantage d'offrir un haut niveau de contrôle sur la taille des compartiments produits ainsi que sur leur manipulation, en faisant des outils idéaux pour des études à l'échelle cellulaire (Kaminski et al., 2016). A l'heure actuelle, ces systèmes de micro-confinement de micro-organismes basés sur la microfluidique ont pu être utilisés à diverses fins parmi lesquelles l'étude d'interactions microbiennes (Hsu et al., 2019; Jackman et al., 2019), l'isolement à haut débit de souches (Jiang et al., 2016), l'assemblage combinatoire à haut-débit de communautés synthétiques (Kehe et al., 2019), la manipulation à l'échelle micrométrique de communautés (Krishna Kumar et al., 2021), le phénotypage cellulaire au regard de la sensibilité aux

antibiotiques (Baraban et al., 2011), ou encore l'étude de stratégies métaboliques compétitives dans des consortia microbiens (Bachmann et al., 2013).

Ces systèmes décrits dans la littérature sont souvent techniquement complexes contrairement au système très simple développé dans cette thèse. Celui-ci repose sur un processus d'émulsification simple faisant appel à des composants abondamment disponibles et un matériel courant. Pour les travaux de cette thèse, le concept choisi consistait à produire une émulsion inverse (W/O) à partir de bouillon de culture conventionnel. En d'autres termes, il s'agissait d'émulsionner le milieu de culture contenant les bactéries de sorte à confiner ces dernières dans des micro-gouttelettes nutritives spatialement séparées les unes des autres par une phase lipidique. Le système a été analysé par granulomorphométrie et microscopie confocale afin de caractériser sa structure. Les résultats montrent que la majorité du volume du milieu de culture dispersé est contenue dans des gouttelettes d'environ 30 µm de diamètre permettant d'accueillir et de ségréger des bactéries. Ainsi, le système obtenu présente des caractéristiques structurales compatibles avec l'hébergement de micro-organismes d'une taille moyenne de l'ordre du micron. Pour tester l'hypothèse de levée de la compétition, un couple de bactéries antagonistes dans lequel *Carnobacterium maltaromaticum* F2 inhibe la croissance de *Listeria monocytogenes* EGDe en produisant une substance inhibitrice a été utilisé. Les bactéries ont été inoculées ensemble à population initiale identique et cultivées en émulsion inverse. Comme attendu dans un système classique, la population de la souche inhibitrice a augmenté tandis que la population de la souche sensible a diminué, indiquant un phénomène compétitif. Au contraire en émulsion inverse, les populations des deux souches ont augmenté : cela montre que le système de co-culture proposé limite la compétition dans une culture mixte. En complément, une expérience de contrôle a permis de démontrer que *C. maltaromaticum* F2 produit bel et bien un composé inhibiteur diffusible lorsqu'elle est cultivée en émulsion inverse mais que ce système de culture en empêche la diffusion.

La stabilité du système durant la culture des micro-organismes est une propriété cruciale pour maintenir leur ségrégation spatiale. En effet, plusieurs

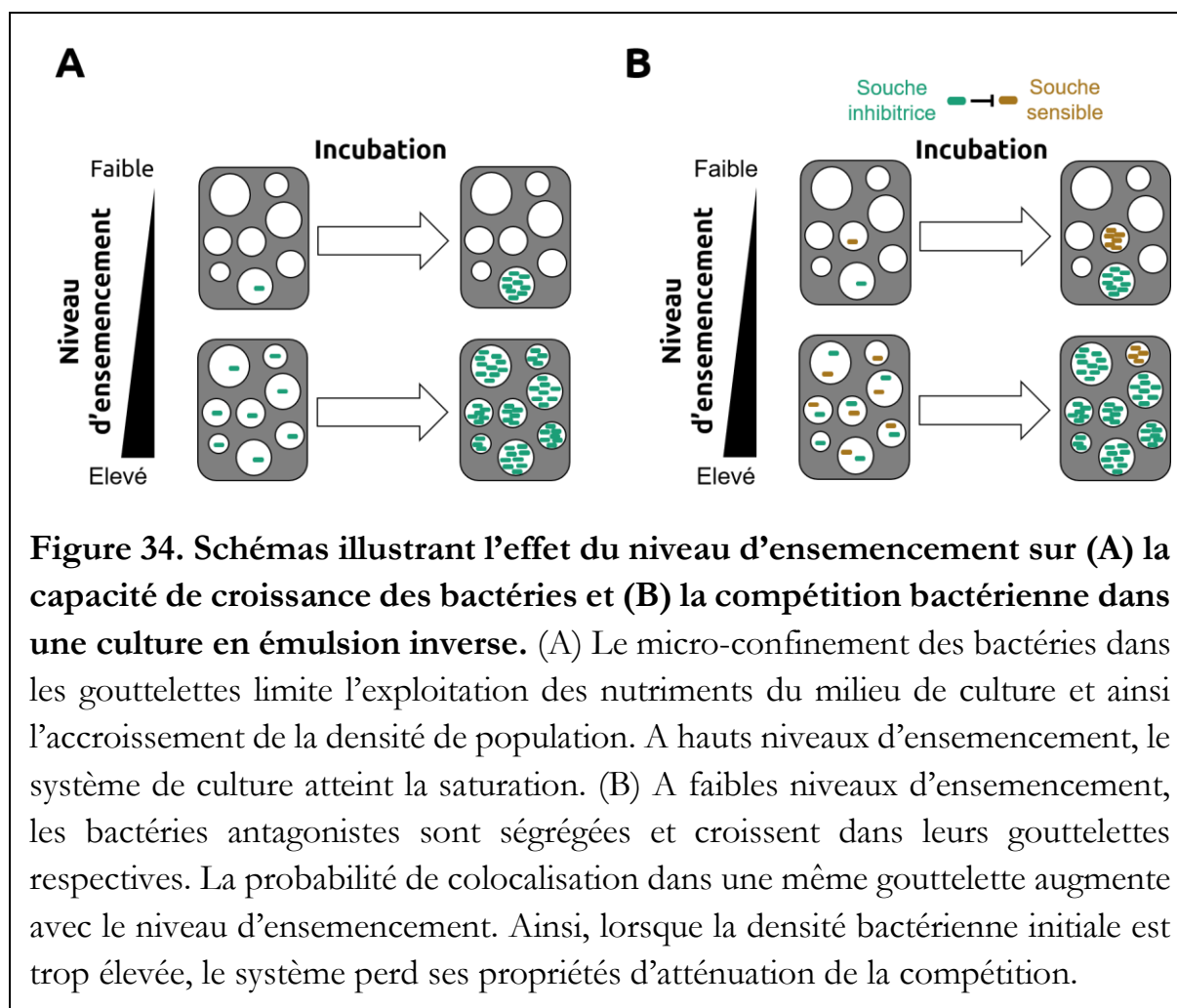
mécanismes pouvant conduire à la déstabilisation de l'émulsion inverse sont susceptibles d'intervenir (McClements, 1999). Par exemple, la floculation (agrégation des gouttelettes) ou la sédimentation (séparation gravitationnelle basée sur la différence de densité des phases) peuvent conduire à la coalescence des gouttelettes et ainsi rompre la ségrégation de micro-organismes. Pour maintenir les gouttelettes de milieu en suspension et éviter la sédimentation susceptible d'accélérer sa déstabilisation, le système de culture en émulsion inverse était placé sur un agitateur rotatif. L'analyse granulomorphométrique réalisée sur les émulsions après 24 h d'incubation a permis de vérifier que la distribution de taille des gouttelettes était peu affectée au cours de la culture.

En utilisant un bioréacteur d'une capacité d'un litre, le volume du système de culture a pu être porté à 600 mL, multipliant ainsi par 40 le volume des émulsions produites à petite échelle. Malgré un déplacement significatif de la distribution de taille des gouttelettes vers des volumes plus petits au cours d'une incubation de 24 h, la propriété d'atténuation de la compétition observée à petite échelle a pu être reproduite à l'échelle d'un bioréacteur de paillasse. La montée en échelle peut être intéressante dans une perspective de manipulation de volumes de culture plus importants. La maîtrise du procédé à ces échelles requiert toutefois de prêter une attention particulière aux paramètres de production et de pilotage du système de culture, parmi lesquels le choix du ou des tensioactifs, la composition des phases et leurs proportions relatives, la maîtrise de l'énergie apportée pour l'émulsification ainsi que la température d'incubation (Weiss & Muschiolik, 2007). La méthodologie des plans d'expérience serait adaptée à une telle démarche de montée en échelle.

Comprendre le fonctionnement du système de co-culture en émulsion inverse

Relation entre le niveau d'ensemencement et la densité de population bactérienne finale

Les dénombrements des microbiotes et micro-organismes purs cultivés ont révélé que la densité de population maximale, ou capacité de charge, du système de culture émulsionné était généralement inférieure à celle d'une culture classique. En effet, les bactéries cultivées en émulsion inverse étant contenues dans des gouttelettes n'ont accès qu'à un espace restreint pour leur croissance. L'augmentation du niveau d'ensemencement conduit à l'augmentation du nombre de gouttelettes occupées par des bactéries, et ainsi à l'augmentation de la densité de population finale. La gamme dynamique de croissance est constante jusqu'à un niveau d'ensemencement élevé, à partir duquel les gouttelettes sont saturées dès le début de la culture (Figure 34A). De même, la culture en émulsion inverse du couple modèle de bactéries antagonistes a montré que les effets de la compétition sont levés jusqu'à des niveaux d'ensemencement de l'ordre de 10^7 UFC.mL⁻¹. Toutefois, l'exclusion de la souche sensible a été observée pour un niveau d'ensemencement supérieur. Ce résultat découle vraisemblablement de la colocalisation des bactéries antagonistes dans les mêmes gouttelettes, à l'intérieur desquelles la compétition peut avoir lieu (Figure 34B).



Ces observations amènent à se poser la question du contrôle de la répartition des micro-organismes dans le système de culture. Dans les systèmes monodisperses, c'est-à-dire caractérisés par une faible variabilité de diamètre de gouttelettes, cette répartition suit généralement la loi de Poisson (Collins et al., 2015; Moon et al., 2011). En prenant en compte la taille de la population de micro-organismes et de gouttelettes ainsi que le diamètre de ces dernières, cette loi décrit la proportion de gouttelettes occupées par un nombre entier positif de micro-organismes. Ce modèle permettrait donc de calibrer soigneusement les paramètres d'ensemencement de sorte à maximiser la proportion de gouttelettes occupées par un seul micro-organisme, et minimiser la proportion de gouttelettes vides ou cooccupées. Toutefois, les analyses granulomorphométriques du système de culture développé montrent que la distribution de taille des gouttelettes est polydisperse. En effet, cette

distribution s'étend du micromètre à la centaine de micromètres de diamètre. La polydispersité des émulsions inverse produites implique qu'une fraction du volume du milieu nutritif est contenu dans des gouttelettes trop petites pour accueillir des bactéries, ce qui contribue probablement à limiter leur croissance. Une démarche d'optimisation du système consisterait à agir sur les paramètres de formulation et d'émulsification de manière à obtenir un système monodisperse. Dès lors, il serait possible de se baser sur ce modèle de répartition afin d'optimiser la ségrégation bactérienne. Enfin, la fraction volumique de la phase dispersée des émulsions inverses formulées dans ces travaux est de 20 %, ce qui constitue la limite théorique du volume utile à la croissance des micro-organismes. Une piste d'amélioration pourrait ainsi consister à essayer d'augmenter la fraction volumique de milieu de culture dispersé dans la phase lipidique. Pour aller plus loin, la recherche dans les domaines pharmaceutique, cosmétique, alimentaire ou pétrolier a recours à la production d'émulsions inverses dites « très concentrées », pour lesquelles la fraction volumique de phase dispersée dépasse 74 % et peut atteindre 99 % (Solans et al., 2004). La structure de ce type d'émulsions consiste en un assemblage de gouttelettes polyédriques, séparées par de fines pellicules de phase continue. Une telle configuration pourrait s'avérer avantageuse afin de maximiser le volume de milieu disponible pour la croissance des micro-organismes.

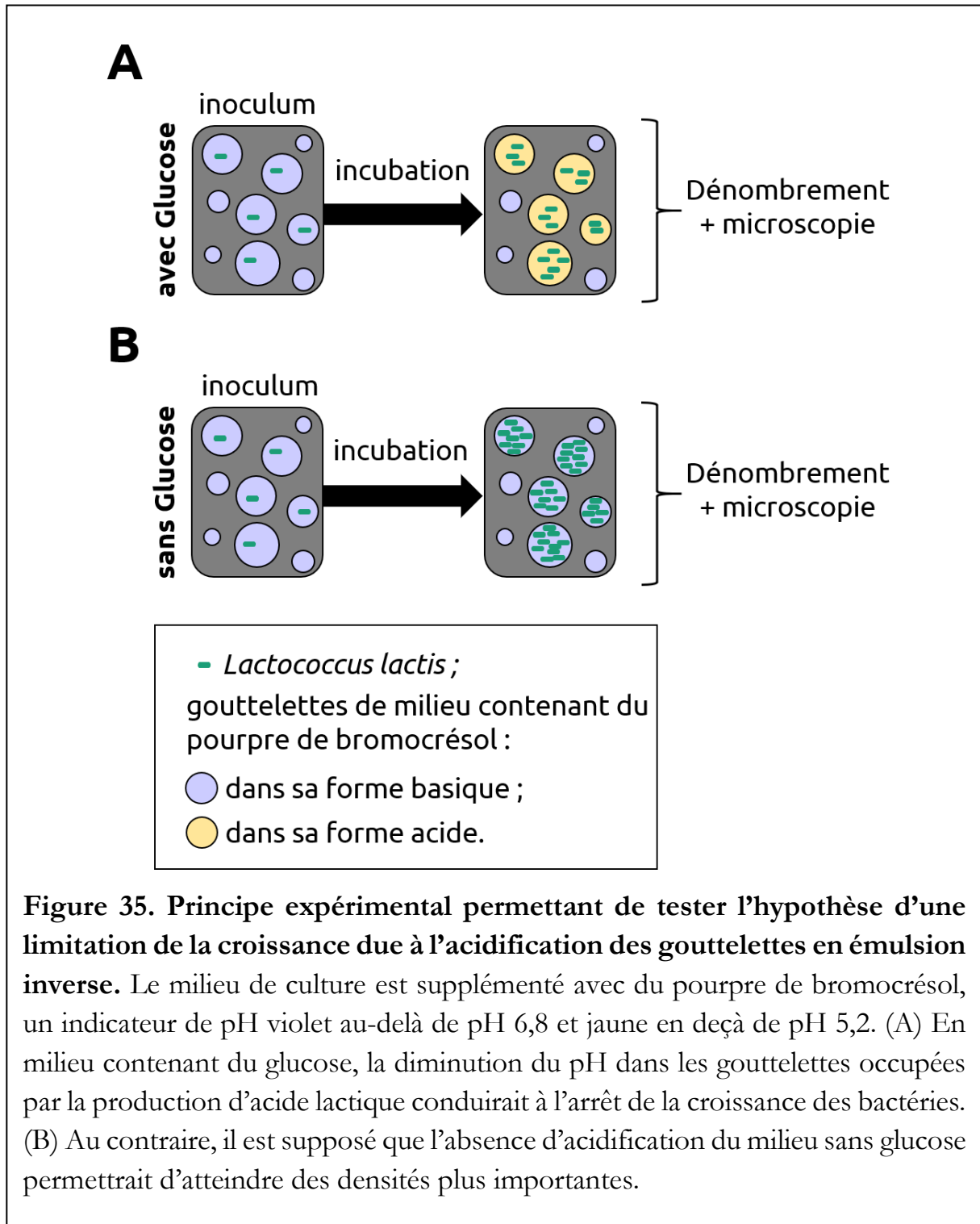
Effet du système sur la physiologie des micro-organismes cultivés

Les cinétiques de croissance obtenues par dénombrements pendant 24 h des deux bactéries modèles en culture pure ont révélé que le système émulsionné exerçait un effet sur leur temps de génération. Celui de *C. maltaromaticum* F2 était significativement supérieur lors d'une culture en émulsion par rapport à une culture classique. Un effet similaire (mais non significatif) a été observé avec *L. monocytogenes* EGDe. Ces résultats montrent que les deux bactéries sont affectées de la même manière par la culture en émulsion inverse, ce qui valide le choix du couple modèle

de bactéries antagonistes pour la preuve de concept. Toutefois, la culture en émulsion inverse peut exercer un effet tout à fait différent sur des bactéries appartenant à des espèces diverses. Le suivi cinétique sur 72 h d'une sélection de bactéries en cultures pures a montré que les espèces répondaient différemment à la culture en émulsion, avec dans les extrêmes des bactéries montrant des profils de croissance similaires à des conditions de culture classique tandis que d'autres ne croissaient pas. Bien que les mécanismes sous-jacents n'aient pas été étudiés, il est possible de formuler une hypothèse les concernant. Concernant les micro-organismes caractérisés par un métabolisme fermentaire comme *Lactococcus lactis*, une hypothèse permettant d'expliquer ce résultat serait que la densité cellulaire finale significativement plus faible à l'issue d'une culture émulsionnée pourrait être due à une acidification localisée des gouttelettes contenant les bactéries par production d'acide organique, entraînant un arrêt de la croissance bactérienne (Hsiao & Siebert, 1999; Kazou, 2022). Afin de tester cette hypothèse, cette bactérie pourrait être inoculée dans un bouillon dépourvu de glucose avant émulsification afin d'éviter l'acidification des gouttelettes au cours de la culture. Une densité de population plus importante comparée à un milieu contenant du glucose supporterait cette hypothèse. En sus, il est possible d'ajouter aux bouillons un indicateur de pH coloré tel que le pourpre de bromocrésol. Cet indicateur violet sous forme basique vire au jaune si le milieu devient plus acide. L'observation en microscopie optique de la couleur des gouttelettes produites pourrait ainsi informer de leur acidification au cours de la culture, en l'absence de sondes adaptées à leur taille (Figure 35). Alternativement, il serait possible d'utiliser des fluorophores tel que la fluorescéine, dont l'intensité de la fluorescence dépend du pH du milieu (Sjöback et al., 1995).

Bien qu'elles ne donnent accès qu'aux abondances relatives des différents membres d'une communauté, les données de metabarcoding ont permis de fournir des renseignements relatifs à la survie de micro-organismes lors du processus de culture. La culture de communautés issues de laits crus a montré que le système de culture en émulsion inverse permet de propager des bactéries appartenant aux phyla

des *Firmicutes* (ou *Bacillota*) et des *Proteobacteria* (ou *Pseudomonadota*). La perte de richesse enregistrée à l'issue du premier cycle de croissance en émulsion inverse suggère que certaines bactéries ne peuvent être cultivées avec ce système. Il serait intéressant d'obtenir des informations sur la diversité des micro-organismes qu'il est possible de cultiver en émulsion inverse. Des réponses pourraient être obtenues



rapidement par la mise en culture d'un éventail de micro-organismes représentant des phyla différents (e.g. *Actinomycetota*, *Bacteroidota*, etc.) voire des règnes différents (notamment *Fungi*). Dans une démarche similaire, la culture de microbiotes issus de divers environnements (sol, fèces, plantes, etc.) complétée par une analyse par metabarcoding et par des dénombrements permettrait d'illustrer la diversité de micro-organismes compatibles avec ce mode de culture.

Outre les considérations purement taxonomiques concernant les micro-organismes cultivables en émulsion, une attention plus particulière pourrait être portée à la diversité des types métaboliques représentés. Dans la preuve de concept, les bactéries ayant présenté une croissance sont essentiellement de type respiratoire anaérobie facultatif (*Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Staphylococcus xylosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Carnobacterium maltaromaticum* et *Lactiplantibacillus plantarum*) ou micro-aérophile (*Listeria monocytogenes*). *Brevibacterium linens*, un *Actinomycota* aérobic strict, ne présentait ni croissance ni diminution de sa population au cours de la culture en émulsion inverse. Il serait intéressant de mettre en culture d'autres micro-organismes représentatifs de ce type respiratoire afin de déterminer si ce mode de culture leur est approprié. Cela pourrait être pertinent dans le contexte de la propagation de microbiotes à dominante aérobic tels que les flores d'affinages de fromages. Ces considérations soulèvent la question de la disponibilité du dioxygène pour les micro-organismes cultivés en émulsion inverse, qui n'a pas été abordée dans ces travaux. Des travaux complémentaires visant à améliorer le procédé pourraient consister à aérer le milieu de culture émulsionné et étudier la solubilité de ce gaz dans la phase lipidique.

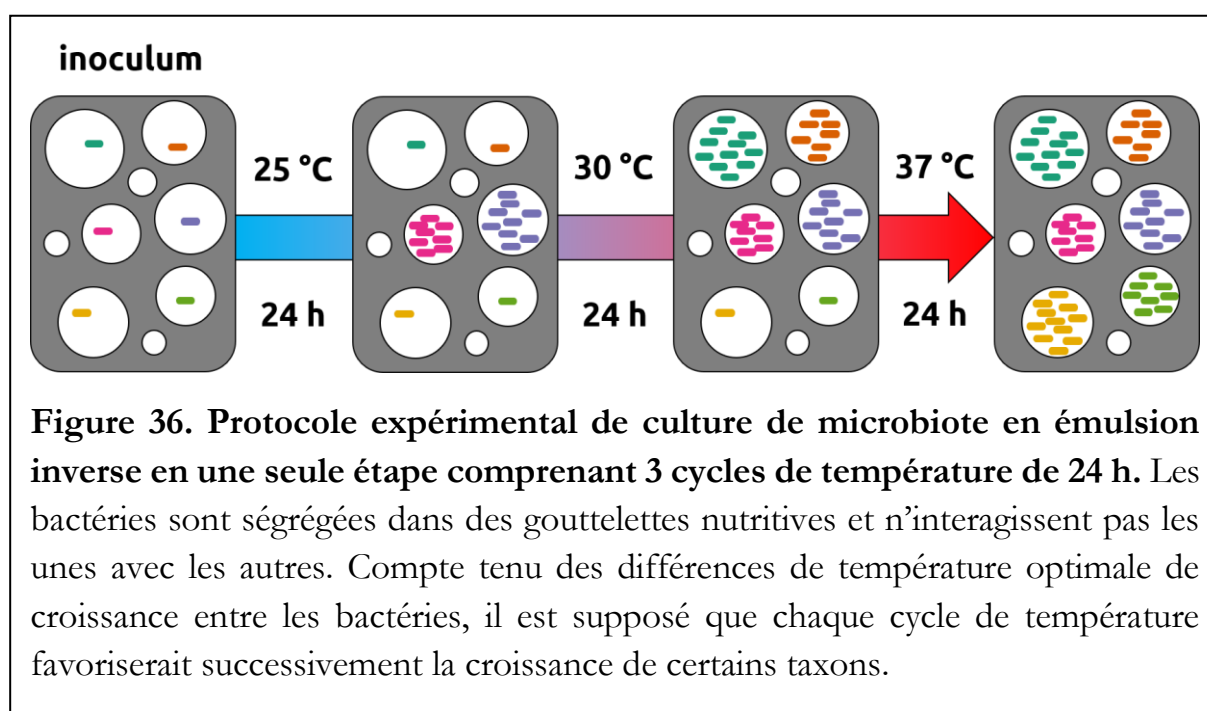
Cultiver et modeler des microbiotes

Le système de co-culture développé a pour objectif de servir d'outil de culture et d'ingénierie de microbiotes. A cet effet, son apport en comparaison avec une méthode de culture classique a été évalué.

Propagation en une seule étape de culture

La preuve de concept du système de culture a fait appel à la propagation en une seule étape de culture d'un consortium bactérien synthétique. L'analyse par metabarcoding montre que les structures de consortia cultivés diffèrent systématiquement de celle de l'inoculum, quel que soit le système de culture utilisé. En l'occurrence, le consortium propagé en système classique est largement dominé par *Lactococcus lactis* tandis que le consortium propagé en émulsion inverse présente une structure plus uniforme. Ce comportement est mis en évidence par une valeur de diversité alpha selon l'indice de Shannon plus élevée à l'issue d'une culture émulsionnée par rapport à une culture classique, et renforce l'idée selon laquelle ce système permet de limiter la perte de taxons due à l'exclusion compétitive. Toutefois, la mise en évidence des effets de la culture émulsionnée sur les membres individuels de ce consortium montre que la limitation des interactions microbiennes n'est pas le seul facteur qui détermine la structure des microbiotes cultivés. Supportant cette observation, l'analyse par metabarcoding a montré que les consortia cultivés en émulsion inverse présentaient la même structure qu'un mélange témoin des bactéries cultivées séparément à l'aide de ce système de culture. Il faut cependant noter que l'ensemble des cultures a été réalisé à température fixe de 30°C. Or les micro-organismes diffèrent par leurs valeurs cardinales, notamment leur température de croissance optimale. Par exemple, le consortium synthétique utilisé comme preuve de concept impliquait à lui-seul des micro-organismes dont les températures optimales de croissance variaient de 25 à 42°C. En faisant l'hypothèse que l'émulsion conserve ses propriétés structurelles sur la gamme de températures correspondante, on pourrait soumettre ce consortium à différentes températures d'incubation au

cours d'une même culture afin de favoriser successivement différents types microbiens, puis analyser sa structure par metabarcoding (Figure 36).



Dynamique des microbiotes en propagation séquentielle

Dans un deuxième temps, trois microbiotes issus de laits crus ont été propagés selon un régime de culture séquentiel, ou backslopping, un procédé itératif d'ingénierie de communauté consistant à inoculer un milieu frais avec un résidu de la culture précédente. En cohérence avec les résultats précédents, la mise en culture des microbiotes a conduit à la modification de leur structure, quel que soit le système utilisé. En effet dans tous les cas, une diminution de la richesse spécifique ainsi que de la diversité selon l'indice de Shannon dans les microbiotes cultivés comparés à l'inoculum dont ils proviennent a été constatée. Les structures des microbiotes cultivés diffèrent toutefois selon le système de culture. De plus, l'analyse par metabarcoding des microbiotes après chaque cycle a permis de mettre en lumière des différences supplémentaires entre les systèmes de culture utilisés au regard de la dynamique taxonomique. En particulier, alors que la culture séquentielle en système

émulsionné conduit au remaniement des structures de microbiote à chaque étape, les changements de structures sont essentiellement observés au cours des premières étapes de propagation en système classique. Plus spécifiquement, les variations de l'indice de Shannon reflètent des situations de dominance des microbiotes cultivés par différents taxons au cours des propagations en système émulsionné. Au contraire, cet indice de Shannon semble converger vers une valeur en système classique. Conformément à ce résultat, le niveau de variation moyen de cet indice au cours des propagations séquentielles est significativement inférieur en système classique comparé au système émulsionné. L'analyse de diversité bêta a permis de confirmer cette tendance en établissant une typologie de trajectoires écologiques propres à chaque système de culture. Les ordinations construites à partir de matrices de dissimilarité montrent que les structures des microbiotes cultivés en émulsion inverse traversent plusieurs îlots de stabilité tandis que ceux cultivés en système classique convergent au cours des propagations séquentielles. La quantité de changement au cours du processus, capturée par la sommation des valeurs de dissimilarités, est significativement inférieure pour les microbiotes cultivés en système classique par rapport au système émulsionné, ce qui confirme ces résultats. La stabilisation de communautés au cours de propagation séquentielles est un phénomène mis en évidence dans plusieurs études récentes adressant différents contextes. Par exemple, la propagation durant 12 cycles de culture en milieu lait standardisé (BM) d'une culture primaire pour la fabrication fromagère composée de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* propagée a révélé que deux espèces présentaient des abondances relatives équivalentes tout au long du processus (Somerville et al., 2022). De même, Aranda-Díaz et collègues ont montré que la stabilisation de microbiotes fécaux cultivés en anaérobiose en bouillon BHI intervient dès le deuxième passage (Aranda-Díaz et al., 2022). La propagation séquentielle de levains de boulangerie montre que malgré la fluctuation de leur structure et un enrichissement progressif en certaines espèces, celle-ci demeure relativement stable au regard des espèces dominantes (Tolu et al., 2022). Les travaux de cette thèse ont montré que dans le cas

de microbiotes dérivés de laits crus et propagés en milieu TSBYE, la stabilité compositionnelle était atteinte à l'issue du troisième cycle de croissance. Il serait toutefois intéressant d'étudier la dynamique des microbiotes au-delà de 10 passages afin de déterminer si les structures sont susceptibles de dériver. La propagation en émulsion ne permet pas d'obtenir une composition stable après 10 cycles de culture, aussi serait-il intéressant de poursuivre le processus de manière à atteindre, éventuellement, une stabilité compositionnelle des communautés.

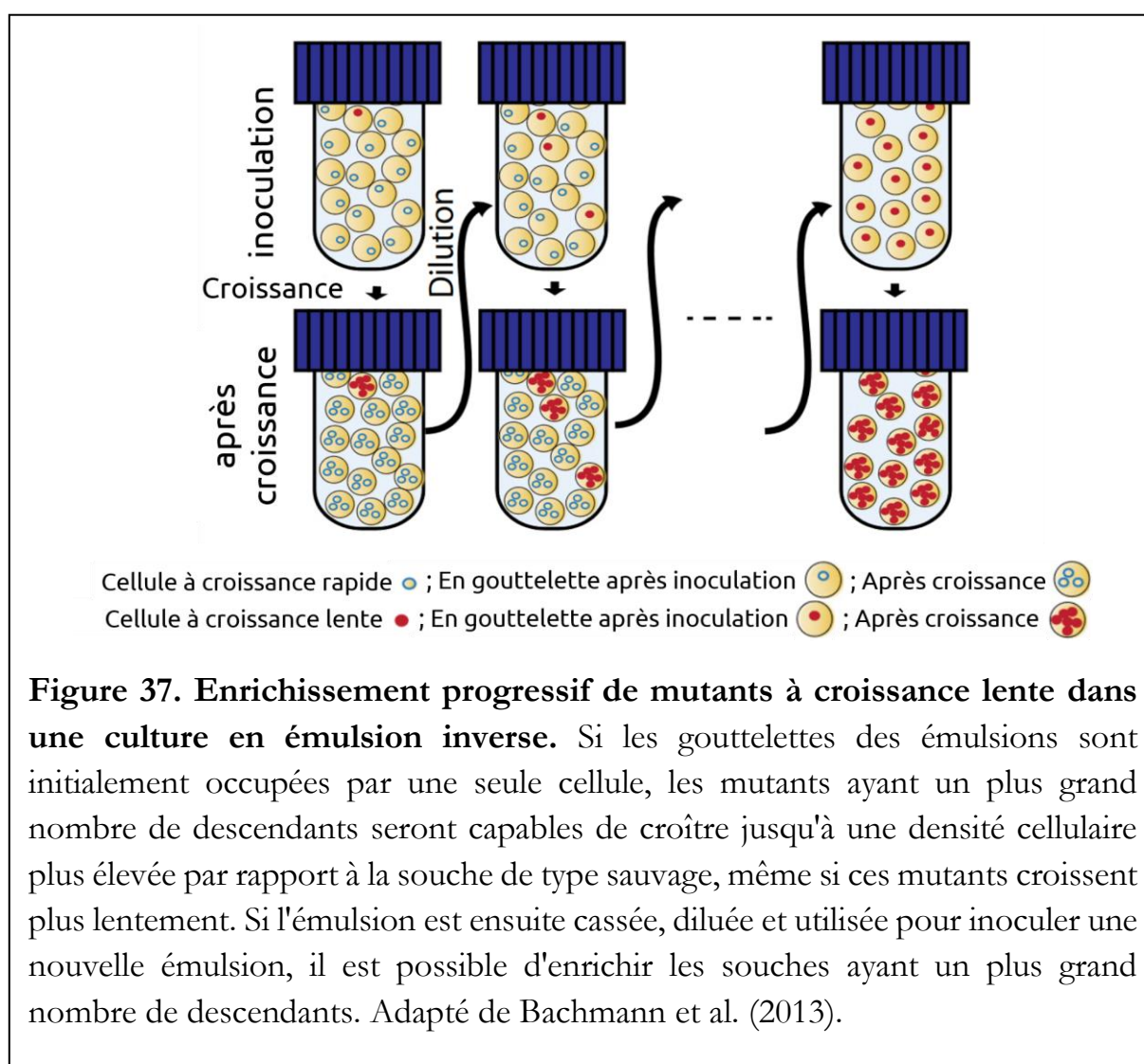


Figure 37. Enrichissement progressif de mutants à croissance lente dans une culture en émulsion inverse. Si les gouttelettes des émulsions sont initialement occupées par une seule cellule, les mutants ayant un plus grand nombre de descendants seront capables de croître jusqu'à une densité cellulaire plus élevée par rapport à la souche de type sauvage, même si ces mutants croissent plus lentement. Si l'émulsion est ensuite cassée, diluée et utilisée pour inoculer une nouvelle émulsion, il est possible d'enrichir les souches ayant un plus grand nombre de descendants. Adapté de Bachmann et al. (2013).

En outre, après 10 cycles de culture en émulsion inverse, un microbiote est dominé par un taxon qui était sous-représenté dans l'inoculum, *Rahnella inusitata*. Ce taxon a pu être isolé par étalement sur gélose de l'échantillon correspondant, alors que cela n'avait pas été possible à partir de l'inoculum ni dans l'échantillon issu d'une

culture classique. En effet, un bouillon de culture classique constitue un espace partagé par l'ensemble des micro-organismes susceptibles d'entrer en compétition pour des ressources en tant que biens publics. Dans cette situation, les micro-organismes présentant un taux de croissance élevé consomment l'ensemble des ressources publiques avant ceux présentant un taux de croissance plus faible (Bachmann et al., 2013, 2016). En revanche, la ségrégation de micro-organismes en gouttelettes de milieu peut être assimilée à la privatisation de ces ressources nutritionnelles par les micro-organismes, ce qui leur permet de croître. En 2013, Bachmann et collègues ont mis en évidence ce phénomène en montrant que la propagation séquentielle en émulsion inverse conduit à l'enrichissement progressif de variants de *Lactococcus lactis* à croissance lente alors que ces derniers sont exclus par les variants à croissance rapide (Figure 37) (Bachmann et al., 2013). Alternativement, il est possible que *Rahnella inusitata* soit plus adaptée aux conditions de culture que d'autres taxons. Dans tous les cas, ces résultats montrent que la propagation séquentielle en émulsion inverse peut constituer un outil prometteur pour l'enrichissement de taxons sous-représentés dans des échantillons environnementaux, d'autant plus lorsqu'ils présentent un désavantage compétitif vis-à-vis d'autres taxons. Il peut ainsi s'ajouter à la palette d'outils disponibles et répertoriés par Ha & Devkota pour la culture de micro-organismes et l'enrichissement du répertoire microbien (Ha & Devkota, 2020).

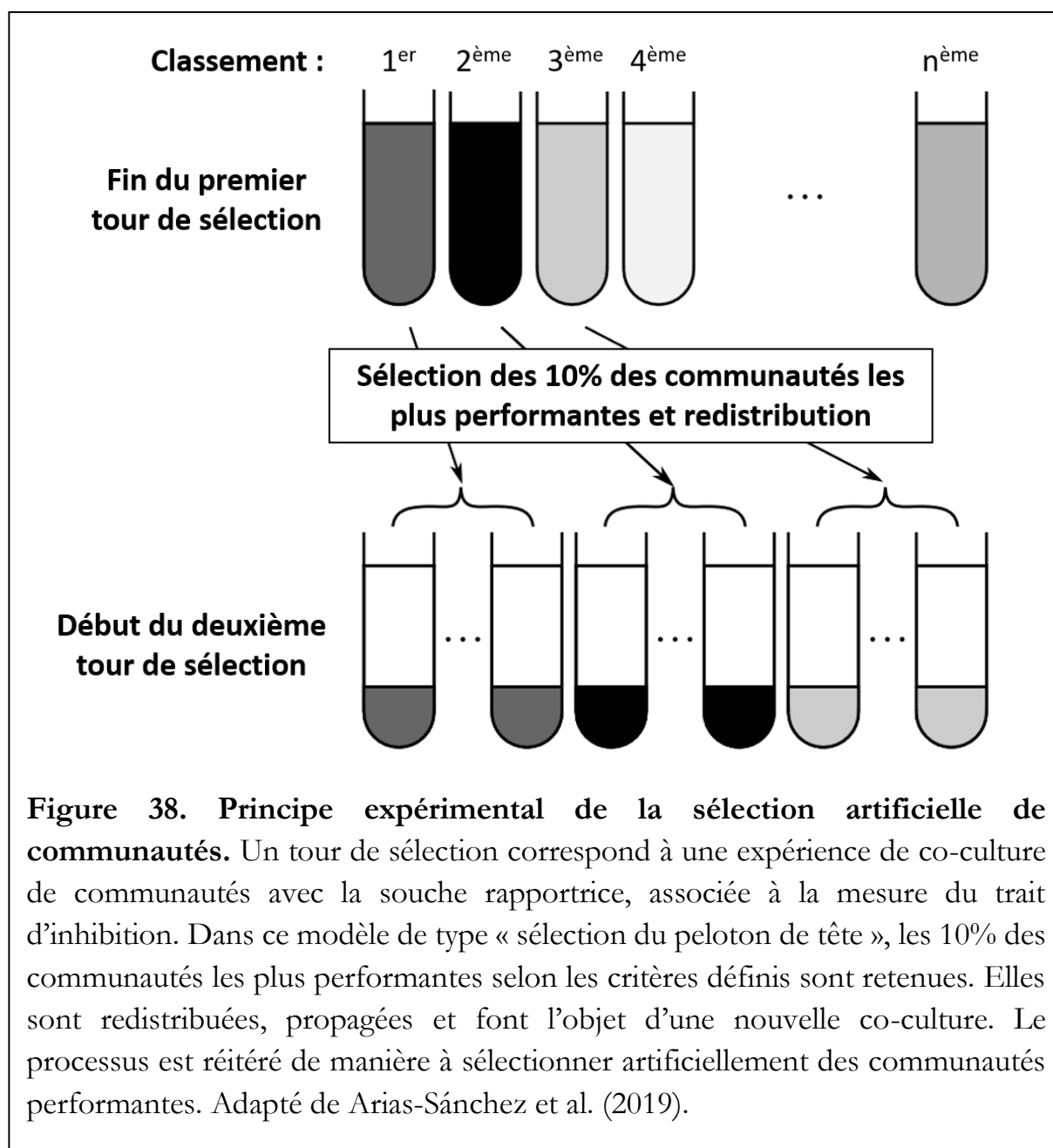
Ces travaux se sont focalisés sur la dynamique taxonomique sans considération pour la dynamique fonctionnelle. En effet, l'une des limites des méthodes basées sur le séquençage de marqueurs taxonomiques de communautés microbiennes est qu'elles ne fournissent pas d'informations sur la composition fonctionnelle des communautés échantillonnées. Or, il serait intéressant de déterminer si les communautés produites diffèrent en termes de contenu fonctionnel selon le système de culture utilisé, et comment celui-ci évolue au cours des cultures séquentielles. Actuellement, il existe plusieurs outils bio-informatiques permettant d'inférer le potentiel fonctionnel de communautés microbiennes sur la base de

données de séquençage d'amplicons du gène codant l'ARNr 16S. (Aßhauer et al., 2015; Douglas et al., 2020; Iwai et al., 2016; Jun et al., 2015; Langille et al., 2013; Wemheuer et al., 2020). Par exemple, l'outil PICRUSt2 (Douglas et al., 2020) fonctionne par placement des séquences dans un arbre phylogénétique de référence, correction du nombre de copies du gène de l'ARNr 16S et prédiction du métagénome à partir d'une base de données de gènes avec annotations fonctionnelles. En sortie, l'utilisateur obtient une table d'abondance de voies métaboliques et peut ainsi accéder au potentiel fonctionnel prédit de la communauté analysée. L'approche d'inférence fonctionnelle proposée présente l'avantage de pouvoir être mise en œuvre à moindre frais car exploitant jeux de données produits par analyse metabarcoding. Cependant, la résolution taxonomique de ces dernières est souvent limitée au rang du genre ou au mieux à celui de l'espèce. L'utilisation d'une approche de métagénomique shotgun pourrait contribuer à améliorer la précision de ces prédictions fonctionnelles en recueillant des informations plus complètes au niveau de l'espèce ou même de la souche (Borges et al., 2022).

Etudier l'impact fonctionnel de la propagation

La dernière partie de ces travaux a été consacrée à l'étude de l'effet de la propagation sur la variabilité fonctionnelle de communautés dérivées de laits crus dans un contexte de criblage de microbiotes pour des applications en biopréservation. La fonctionnalité considérée était l'inhibition du pathogène *Listeria monocytogenes*. Les travaux précédents ont montré que la culture classique permettait de stabiliser les structures de communautés après 3 cycles de propagation. Ainsi, 88 communautés provenant d'une collection de laits crus ont été propagées 3 fois puis co-cultivées avec une souche de *L. monocytogenes* luminescente. La luminescence produite par cette souche reflète son état de croissance (Riedel et al., 2007), aussi sa perturbation lors d'une co-culture reflète l'inhibition de la souche par le compétiteur (El Kheir et al., 2018). Un indicateur de perturbation de la luminescence, développé durant des travaux antérieurs portant sur le criblage à haut-débit de souches inhibitrices, indique la force d'inhibition des communautés (El Kheir et al., 2018). Trois niveaux de dilution ont été testés afin de déterminer la robustesse du pouvoir inhibiteur et six répétitions ont permis de déterminer le niveau de reproductibilité du comportement. Les travaux ont montré que les communautés se distinguent sur la base de la valeur de leur force d'inhibition, de leur robustesse (variabilité en fonction du niveau d'ensemencement) et de la reproductibilité du caractère inhibiteur. Les résultats montrent également que la force d'inhibition et la reproductibilité de la réponse sont corrélés négativement. L'usage de tests statistiques a permis de sélectionner 27 communautés parmi la collection de départ qui présentaient un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de *L. monocytogenes*. Ces communautés s'agrègent en 3 groupes caractérisés par des forces d'inhibition et de reproductibilité significativement différents. Un premier groupe contient des communautés caractérisées par un niveau d'inhibition faible ainsi qu'un niveau de variation élevé et un deuxième contient des communautés caractérisées par des valeurs intermédiaires. Le groupe le plus intéressant contient 6 communautés présentant un pouvoir inhibiteur élevé, robuste et reproductible, comparable à celui de *Carnobacterium*

maltaromaticum F2, une souche biopréservatrice performante qui a été utilisée comme témoin. Dans ce groupe, une communauté est plus performante que cette souche témoin selon les critères mentionnés. Dans leur ensemble, ces travaux ont montré qu'il est possible de cribler des communautés microbiennes inhibitrices de pathogène par co-culture avec une souche rapportrice lumineuse, et souligné la pertinence de l'invariabilité de la réponse comme critère de sélection.



Toutefois, la variabilité de communautés propagées peut constituer un atout dans un contexte de sélection artificielle⁴. La démarche pourrait consister à utiliser les communautés les plus inhibitrices pour ensemer du milieu frais en multiples réplicats et de répéter le processus, jusqu'à obtention d'une, ou d'un ensemble de communautés ayant hérité d'une haute valeur pour ce trait (Arias-Sánchez et al., 2019) (Figure 38). Ce type de démarche a déjà été implémenté dans divers contextes, par exemple pour la sélection de communautés microbiennes dégradant un polluant (Swenson et al., 2000) ou plus récemment pour la sélection de communautés rhizosphériques favorisant une faible ou forte verdure de la plante associée (Jacquiod et al., 2022). Cette perspective renvoie à la question de la dynamique fonctionnelle des communautés propagées en culture séquentielle : comment le trait mesuré évolue-t-il au cours des propagations ?

Dans une perspective d'ingénierie ascendante, il serait également intéressant de décomposer les communautés les plus performantes de manière à évaluer la contribution des différents membres isolément ou en groupes, dans une démarche similaire à celle de travaux antérieurs sur des consortia anti-*Listeria* (Callon et al., 2011). Les connaissances acquises permettraient alors de recomposer des communautés synthétiques à haute fonctionnalité à partir d'isolats sélectionnés.

⁴ La sélection artificielle est un processus évolutif dans lequel l'homme choisit consciemment de favoriser ou de défavoriser certaines caractéristiques des organismes ou communautés d'organismes.

Apport des travaux pour l'ingénierie de microbiote

L'ingénierie de microbiotes regroupe un ensemble d'approches visant à manipuler la composition de communautés microbiennes pour leur permettre d'exprimer une fonctionnalité désirée (Eng & Borenstein, 2019).

L'ingénierie ascendante consiste à construire rationnellement des communautés synthétiques. Cela peut être réalisé par l'isolement de micro-organismes à partir d'une communauté naturelle, la sélection d'organismes désirables et l'exclusion des indésirables, puis la reconstitution d'un microbiote simplifié récapitulant la fonctionnalité de la communauté source. Alternativement, les communautés peuvent être construites de manière combinatoire. Ces approches présentent les avantages de contrôler finement la composition des microbiotes, excluant notamment les espèces indésirables telles que des pathogènes. La conception de microbiotes peut également être assistée par des méthodes computationnelles de manière à évaluer *in silico* des compositions présentant des fonctionnalités optimales avant validation expérimentale. Ces outils permettent un gain de temps considérable mais nécessitent de mobiliser des modèles décrivant les dynamiques écologiques en présence. Dans sa globalité, l'ingénierie ascendante nécessite une connaissance mécanistique accrue des micro-organismes en tant qu'individus et en tant que communautés. Or à l'heure actuelle, ces informations manquent pour de nombreuses espèces.

L'approche descendante quant à elle consiste à manipuler la composition de communautés sources en influant sur les paramètres de culture. Fondamentalement, il s'agit de favoriser les taxons responsables de la fonctionnalité recherchée. Cette approche présente l'avantage de permettre l'optimisation de la fonctionnalité des microbiotes, et elle permet de s'affranchir de l'identification des micro-organismes qui les composent. Toutefois, le manque de maîtrise de la composition implique la probabilité qu'un micro-organisme indésirable soit membre de ces communautés, ce qui limiterait son usage dans des contextes alimentaire ou thérapeutique par exemple.

Les avantages et inconvénients respectifs des ingénieries de communauté ascendante et descendante en font deux approches complémentaires pour la conception et la valorisation de microbiomes dans divers contextes. Dans leur globalité, les travaux de cette thèse ont permis d'évaluer l'apport de deux outils pour la culture et l'ingénierie de microbiotes. En particulier ils ont montré que l'intérêt de la culture séquentielle en milieu émulsionné réside dans sa disposition à générer des structures nouvelles au cours des propagations. Toutefois, ce système de culture n'est pas adapté à la génération de microbiotes stables dès les premières étapes de propagation, pour laquelle le système classique doit y être préféré. Ainsi, les deux systèmes de cultures constituent des outils complémentaires pour l'ingénierie descendante de communautés. Additionnellement, la propagation séquentielle en émulsion inverse permet d'enrichir des micro-organismes rares dans l'inoculum, ce qui peut être opportun pour les isoler et les caractériser, préalable incontournable à une démarche d'ingénierie ascendante. Enfin, que l'approche choisie soit ascendante ou descendante, des méthodes de criblage sont nécessaires afin de sélectionner les communautés sources et construites présentant la fonction désirée. A ce propos, les travaux de cette thèse apportent une méthode de criblage à haut-débit pour la recherche de communautés inhibitrices de pathogènes candidates pour des applications en biopréservation. Cette méthode est basée sur l'utilisation d'une souche rapportrice luminescente et tient compte de la magnitude et de la variabilité du trait. Elle pourrait également être utilisée pour le criblage de communautés sources ou construites dans un contexte d'ingénierie de microbiome.

Conclusion

L'essor de l'ingénierie de communautés microbiennes suscite un besoin de techniques innovantes permettant de les cultiver, de les modeler et de les sélectionner. Les travaux de cette thèse ont permis de développer et d'évaluer des outils afin de répondre à ces problématiques. Ils ont montré qu'il était possible de produire un système de culture permettant de moduler les interactions microbiennes en utilisant des méthodes d'émulsification courantes. Ce système repose sur le confinement de bactéries dans des gouttelettes de bouillon nutritif, ségrégées les unes des autres par une phase lipidique. Après avoir démontré que ce système de culture atténuait la compétition entre deux bactéries antagonistes, l'effet des conditions d'ensemencement sur la densité finale et la ségrégation bactérienne ont été étudiés. Ce volet révèle l'existence d'un compromis entre dynamique de croissance et atténuation de la compétition, dont l'utilisateur de ce système de culture doit tenir compte. Les résultats ont également montré que la structure d'une communauté cultivée en émulsion inverse découle de la levée des interactions biotiques et de l'effet exercé par le système de culture sur la physiologie des bactéries. Par la suite, les dynamiques de communautés bactériennes issues de laits crus au cours de propagations séquentielles ont été étudiées, comparant l'effet de ce système de culture à celui d'un système classique non-émulsionné. Ces travaux ont permis de mettre en évidence des différences substantielles entre les deux systèmes de culture, qui aboutissent à des communautés différentes à partir d'un même inoculum. La culture séquentielle en émulsion inverse permet un remodelage progressif des communautés au cours du processus et d'enrichir des taxons sous-représentés dans l'échantillon de départ. La culture séquentielle classique permet quant à elle de stabiliser les communautés en quelques cycles de propagation. Cette méthode a été employée pour propager des communautés issues de laits crus dans le but d'étudier la variabilité fonctionnelle de communautés cultivées. Ces travaux se sont basés sur la mesure de la luminescence d'une souche rapportrice de *Listeria monocytogenes* au

cours d'expériences de co-cultures avec les microbiotes propagés. Ils ont montré que ces communautés se distinguent selon leur force d'inhibition et la variabilité de celle-ci, soulignant l'importance de ces critères dans le criblage de microbiotes sur la base de leur fonctionnalité pour des applications en biopréservation. De plus, ils ont permis d'identifier des communautés candidates pour des applications en biopréservation. Plus globalement, ces travaux apportent des informations pertinentes pour l'utilisation rationnelle de systèmes de co-culture ainsi que le criblage de communautés dans un contexte d'ingénierie de communautés microbiennes.

Bibliographie

- Acin-Albiac, M., Filannino, P., Gobetti, M., & Di Cagno, R. (2020). Microbial high throughput phenomics : The potential of an irreplaceable omics. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 2290-2299. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.010>
- Afzal, M. I., Jacquet, T., Delaunay, S., Borges, F., Millière, J.-B., Revol-Junelles, A.-M., & Cailliez-Grimal, C. (2010). Carnobacterium maltaromaticum : Identification, isolation tools, ecology and technological aspects in dairy products. *Food Microbiology*, 27(5), 573-579. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.019>
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria : Extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2939-2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- Anantharaman, K., Hausmann, B., Jungbluth, S. P., Kantor, R. S., Lavy, A., Warren, L. A., Rappé, M. S., Pester, M., Loy, A., Thomas, B. C., & Banfield, J. F. (2018). Expanded diversity of microbial groups that shape the dissimilatory sulfur cycle. *The ISME Journal*, 12(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0078-0>
- Anderson, M. J., Crist, T. O., Chase, J. M., Vellend, M., Inouye, B. D., Freestone, A. L., Sanders, N. J., Cornell, H. V., Comita, L. S., Davies, K. F., Harrison, S. P., Kraft, N. J. B., Stegen, J. C., & Swenson, N. G. (2011). Navigating the multiple meanings of β diversity : A roadmap for the practicing ecologist. *Ecology Letters*, 14(1), 19-28. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01552.x>
- Anses. (2022). *Avis relatif aux modalités de maîtrise du risque lié à la présence de dangers microbiologiques dans les fromages et autres produits laitiers fabriqués à partir de lait cru (saisine 2019-SA-0033). Partie 1 : Priorisation des couples « danger microbiologique/fromage et autre produit laitier au lait cru », bilan des mesures de maîtrise disponibles.* (p. 126). Anses.
- Aranda-Díaz, A., Ng, K. M., Thomsen, T., Real-Ramírez, I., Dahan, D., Dittmar, S., Gonzalez, C. G., Chavez, T., Vasquez, K. S., Nguyen, T. H., Yu, F. B., Higginbottom, S. K., Neff, N. F., Elias, J. E., Sonnenburg, J. L., & Huang, K. C. (2022). Establishment and characterization of stable, diverse, fecal-derived in vitro microbial communities that model the intestinal microbiota. *Cell host & microbe*, 30(2), 260-272.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.12.008>
- Arfi, K., Leclercq-Perlat, M.-N., Baucher, A., Tâche, R., Delettre, J., & Bonnarne, P. (2004). Contribution of several cheese-ripening microbial associations to aroma compound production. *Le Lait*, 84(5), 435-447. <https://doi.org/10.1051/lait:2004016>
- Arias-Sánchez, F. I., Vessman, B., & Mitri, S. (2019). Artificially selecting microbial communities : If we can breed dogs, why not microbiomes? *PLOS Biology*, 17(8), e3000356. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000356>

- Aßhauer, K. P., Wemheuer, B., Daniel, R., & Meinicke, P. (2015). Tax4Fun : Predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics*, 31(17), 2882-2884. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv287>
- Azcarate-Peril, M. A., Arnold, R. R., & Bruno-Bárcena, J. M. (Éds.). (2019). *How Fermented Foods Feed a Healthy Gut Microbiota : A Nutrition Continuum*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-28737-5>
- Bachmann, H., Bruggeman, F. J., Molenaar, D., Branco dos Santos, F., & Teusink, B. (2016). Public goods and metabolic strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 31, 109-115. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.03.007>
- Bachmann, H., Fischlechner, M., Rabbers, I., Barfa, N., Santos, F. B. dos, Molenaar, D., & Teusink, B. (2013). Availability of public goods shapes the evolution of competing metabolic strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(35), 14302-14307. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308523110>
- Bader, J., Mast-Gerlach, E., Popović, M. k., Bajpai, R., & Stahl, U. (2010). Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 109(2), 371-387. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04659.x>
- Baraban, L., Bertholle, F., Salverda, M. L. M., Bremond, N., Panizza, P., Baudry, J., Visser, J. A. G. M. de, & Bibette, J. (2011). Millifluidic droplet analyser for microbiology. *Lab on a Chip*, 11(23), 4057-4062. <https://doi.org/10.1039/C1LC20545E>
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3), 277-294. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1995). Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 26(2), 199-218. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00121-L](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00121-L)
- Bartram, A. K., Lynch, M. D. J., Stearns, J. C., Moreno-Hagelsieb, G., & Neufeld, J. D. (2011). Generation of Multimillion-Sequence 16S rRNA Gene Libraries from Complex Microbial Communities by Assembling Paired-End Illumina Reads. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11), 3846-3852. <https://doi.org/10.1128/AEM.02772-10>
- Bauer, M. A., Kainz, K., Carmona-Gutierrez, D., & Madeo, F. (2018). Microbial wars : Competition in ecological niches and within the microbiome. *OPEN ACCESS*, 5(5), 5.
- Begrem, S., Ivaniuk, F., Gigout-Chevalier, F., Kolypczuk, L., Bonnetot, S., Leroi, F., Grovel, O., Delbarre-Ladrat, C., & Passerini, D. (2020). New Insight into Antimicrobial Compounds from Food and Marine-sourced Carnobacterium Species through Phenotype and Genome Analyses. *Microorganisms*, 8(7), 1093. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071093>
- Ben Said, L., Gaudreau, H., Dallaire, L., Tessier, M., & Fliss, I. (2019). Bioprotective Culture : A New Generation of Food Additives for the Preservation of Food Quality and Safety. *Industrial Biotechnology*, 15(3), 138-147. <https://doi.org/10.1089/ind.2019.29175.lbs>
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin,

- J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schlöter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Besse, N. G., Barre, L., Buhariwalla, C., Vignaud, M. L., Khamissi, E., Decourseulles, E., Nirsimloo, M., Chelly, M., & Kalmokoff, M. (2010). The overgrowth of *Listeria monocytogenes* by other *Listeria* spp. In food samples undergoing enrichment cultivation has a nutritional basis. *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 345-351. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.025>
- Bilen, M., Dufour, J.-C., Lagier, J.-C., Cadoret, F., Daoud, Z., Dubourg, G., & Raoult, D. (2018). The contribution of culturomics to the repertoire of isolated human bacterial and archaeal species. *Microbiome*, 6(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0485-5>
- Birch, L. C. (1957). The Meanings of Competition. *The American Naturalist*, 91(856), 5-18.
- Bochner, B. R. (1989). Sleuthing out bacterial identities. *Nature*, 339(6220), Article 6220. <https://doi.org/10.1038/339157a0>
- Bodor, A., Bounedjoum, N., Vincze, G. E., Erdéni Kis, Á., Laczi, K., Bende, G., Szilágyi, Á., Kovács, T., Perei, K., & Rákhely, G. (2020). Challenges of unculturable bacteria: Environmental perspectives. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19(1), 1-22. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09522-4>
- Boitard, L., Cottinet, D., Bremond, N., Baudry, J., & Bibette, J. (2015). Growing microbes in millifluidic droplets. *Engineering in Life Sciences*, 15(3), 318-326. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400089>
- Bokulich, N. A., & Mills, D. A. (2012). Next-generation approaches to the microbial ecology of food fermentations. *BMB Reports*, 45(7), 377-389. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2012.45.7.148>
- Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., Mills, D. A., & Caporaso, J. G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>
- Borges, F., Briandet, R., Callon, C., Champomier-Vergès, M.-C., Christeians, S., Chuzeville, S., Denis, C., Desmaures, N., Desmonts, M.-H., Feurer, C., Leroi, F., Leroy, S., Mounier, J., Passerini, D., Pilet, M.-F., Schlusshuber, M., Stahl, V., Strub, C., Talon, R., & Zagorec, M. (2022). Contribution of omics to biopreservation: Toward food microbiome engineering. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.951182>
- Bourdichon, F., Arias, E., Babuchowski, A., Bückle, A., Bello, F. D., Dubois, A., Fontana, A., Fritz, D., Kemperman, R., Laulund, S., McAuliffe, O., Miks, M. H., Papademas, P., Patrone, V., Sharma, D. K., Sliwinski, E., Stanton, C., Von Ah, U., Yao, S., & Morelli, L. (2021). The forgotten role of food cultures. *FEMS Microbiology Letters*, 368(14), fnab085. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab085>

- Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27(4), 325-349. <https://doi.org/10.2307/1942268>
- Bruno, J. F., Stachowicz, J. J., & Bertness, M. D. (2003). Inclusion of facilitation into ecological theory. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(3), 119-125. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)00045-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)00045-9)
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2 : High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Callon, C., Arliguie, C., & Montel, M.-C. (2016). Control of Shigatoxin-producing Escherichia coli in cheese by dairy bacterial strains. *Food Microbiology*, 53(Pt B), 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.08.009>
- Callon, C., Berdagué, J. L., Dufour, E., & Montel, M. C. (2005). The Effect of Raw Milk Microbial Flora on the Sensory Characteristics of Salers-Type Cheeses. *Journal of Dairy Science*, 88(11), 3840-3850. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73069-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73069-1)
- Callon, C., Retureau, E., Didienne, R., & Montel, M.-C. (2014). Microbial biodiversity in cheese consortia and comparative Listeria growth on surfaces of uncooked pressed cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 98-109. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.003>
- Callon, C., Saubusse, M., Didienne, R., Buchin, S., & Montel, M.-C. (2011). Simplification of a complex microbial antilisterial consortium to evaluate the contribution of its flora in uncooked pressed cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2-3), 379-389. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.019>
- Cameron, E. S., Schmidt, P. J., Tremblay, B. J.-M., Emelko, M. B., & Müller, K. M. (2021). Enhancing diversity analysis by repeatedly rarefying next generation sequencing data describing microbial communities. *Scientific Reports*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01636-1>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(supplement_1), 4516-4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Capra, F., & Luisi, P. L. (2014). *The Systems View of Life : A Unifying Vision*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511895555>
- Chang, C.-Y., Vila, J. C. C., Bender, M., Li, R., Mankowski, M. C., Bassette, M., Borden, J., Golfier, S., Sanchez, P. G. L., Waymack, R., Zhu, X., Diaz-Colunga, J., Estrela, S., Rebolleda-Gomez, M., & Sanchez, A. (2021). Engineering complex communities by directed evolution. *Nature ecology & evolution*, 5(7), 1011-1023. <https://doi.org/10.1038/s41559-021-01457-5>
- Chao, A. (1984). Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11(4), 265-270.

- Chen, H., Ma, K., Lu, C., Fu, Q., Qiu, Y., Zhao, J., Huang, Y., Yang, Y., Schadt, C. W., & Chen, H. (2022). Functional Redundancy in Soil Microbial Community Based on Metagenomics Across the Globe. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.878978>
- Chen, Q.-L., Hu, H.-W., He, Z.-Y., Cui, L., Zhu, Y.-G., & He, J.-Z. (2021). Potential of indigenous crop microbiomes for sustainable agriculture. *Nature Food*, 2(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00253-5>
- Cieplak, T., Soffer, N., Sulakvelidze, A., & Nielsen, D. S. (2018). A bacteriophage cocktail targeting *Escherichia coli* reduces *E. coli* in simulated gut conditions, while preserving a non-targeted representative commensal normal microbiota. *Gut Microbes*, 9(5), 391-399. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1447291>
- Collins, D. J., Neild, A., deMello, A., Liu, A.-Q., & Ai, Y. (2015). The Poisson distribution and beyond : Methods for microfluidic droplet production and single cell encapsulation. *Lab on a Chip*, 15(17), 3439-3459. <https://doi.org/10.1039/C5LC00614G>
- Corrieu, G., & Luquet, F.-M. (2008). *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments*. Lavoisier.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins—A viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria : Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 194-199. <https://doi.org/10.1159/000104752>
- Delbès, C., Ali-Mandjee, L., & Montel, M.-C. (2007). Monitoring Bacterial Communities in Raw Milk and Cheese by Culture-Dependent and -Independent 16S rRNA Gene-Based Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1882-1891. <https://doi.org/10.1128/AEM.01716-06>
- Devanthi, P. V. P., El Kadri, H., Bowden, A., Spyropoulos, F., & Gkatzionis, K. (2018a). Segregation of *Tetragenococcus halophilus* and *Zygosaccharomyces rouxii* using W1/O/W2 double emulsion for use in mixed culture fermentation. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 105, 333-343. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.044>
- Devanthi, P. V. P., El Kadri, H., Bowden, A., Spyropoulos, F., & Gkatzionis, K. (2018b). Segregation of *Tetragenococcus halophilus* and *Zygosaccharomyces rouxii* using W1/O/W2 double emulsion for use in mixed culture fermentation. *Food Research International*, 105, 333-343. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.044>
- Devanthi, P. V. P., Linforth, R., Onyeaka, H., & Gkatzionis, K. (2018). Effects of co-inoculation and sequential inoculation of *Tetragenococcus halophilus* and *Zygosaccharomyces rouxii* on soy sauce fermentation. *Food Chemistry*, 240, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.094>
- D'Hondt, K., Kostic, T., McDowell, R., Eudes, F., Singh, B. K., Sarkar, S., Markakis, M., Schelkle, B., Maguin, E., & Sessitsch, A. (2021). Microbiome innovations for a sustainable future. *Nature Microbiology*, 6(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00857-w>

- Dijamentiuk, A., Mangavel, C., Elfassy, A., Michaux, F., Burgain, J., Rondags, E., Delaunay, S., Ferrigno, S., Revol-Junelles, A.-M., & Borges, F. (2023). Invert emulsions alleviate biotic interactions in bacterial mixed culture. *Microbial Cell Factories*, 22(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-02014-w>
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, 38(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Drake, L. E., Cuff, J. P., Young, R. E., Marchbank, A., Chadwick, E. A., & Symondson, W. O. C. (2022). An assessment of minimum sequence copy thresholds for identifying and reducing the prevalence of artefacts in dietary metabarcoding data. *Methods in Ecology and Evolution*, 13(3), 694-710. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13780>
- Drissi, F., Buffet, S., Raoult, D., & Merhej, V. (2015). Common occurrence of antibacterial agents in human intestinal microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00441>
- Dumarché, C., & Leclercq, S. (2010). *Method for preparing a leaven from unpasteurized milk* (Patent N° WO/2010/001073).
- Edima, H., Cailliez-Grimal, C., Revol-Junelles, A.-M., Tonti, L., Linder, M., & Millière, J.-B. (2007). A selective enumeration medium for *Carnobacterium maltaromaticum*. *Journal of microbiological methods*, 68, 516-521. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.10.006>
- EFSA (European Food Safety Authority). (2007). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA - Opinion of the Scientific Committee. *EFSA Journal*, 5(12), 587. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.587>
- El Kadri, H., Lalou, S., Mantzouridou, F., & Gkatzionis, K. (2018). Utilisation of water-in-oil-water (W1/O/W2) double emulsion in a set-type yogurt model for the delivery of probiotic *Lactobacillus paracasei*. *Food Research International*, 107, 325-336. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.049>
- El Kheir, S. M., Cherrat, L., Awussi, A. A., Ramia, N. E., Taha, S., Rahman, A., Passerini, D., Leroi, F., Petit, J., Mangavel, C., Revol-Junelles, A.-M., & Borges, F. (2018). High-Throughput Identification of Candidate Strains for Biopreservation by Using Bioluminescent *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01883>
- ElNaker, N. A., Elektorowicz, M., Naddeo, V., Hasan, S. W., & Yousef, A. F. (2018). Assessment of Microbial Community Structure and Function in Serially Passaged Wastewater Electro-Bioreactor Sludge : An Approach to Enhance Sludge Settleability. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25509-2>
- Emerson, J. B., Adams, R. I., Román, C. M. B., Brooks, B., Coil, D. A., Dahlhausen, K., Ganz, H. H., Hartmann, E. M., Hsu, T., Justice, N. B., Paulino-Lima, I. G., Luongo, J. C., Lymperopoulou, D. S., Gomez-Silvan, C., Rothschild-Mancinelli, B., Balk, M., Huttenhower, C., Nocker, A., Vaishampayan, P., & Rothschild, L. J. (2017). Schrödinger's

- microbes : Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems. *Microbiome*, 5(1), 86. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0285-3>
- Eng, A., & Borenstein, E. (2019). Microbial community design : Methods, applications, and opportunities. *Current Opinion in Biotechnology*, 58, 117-128. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.03.002>
- Erkus, O., de Jager, V. C., Spus, M., van Alen-Boerrigter, I. J., van Rijswijck, I. M., Hazelwood, L., Janssen, P. W., van Hijum, S. A., Kleerebezem, M., & Smid, E. J. (2013). Multifactorial diversity sustains microbial community stability. *The ISME Journal*, 7(11), 2126-2136. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.108>
- 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. *Bioinformatics*, 34(8), 1287-1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Estrela, S., Sánchez, Á., & Rebolleda-Gómez, M. (2021). Multi-Replicated Enrichment Communities as a Model System in Microbial Ecology. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.657467>
- Fan, Y., & Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>
- Fouhy, F., Clooney, A. G., Stanton, C., Claesson, M. J., & Cotter, P. D. (2016). 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC Microbiology*, 16(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0738-z>
- Frétin, M., Chassard, C., Delbès, C., Lavigne, R., Rifa, E., Theil, S., Fernandez, B., Laforce, P., & Callon, C. (2020). Robustness and efficacy of an inhibitory consortium against E. coli O26:H11 in raw milk cheeses. *Food Control*, 115, 107282. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107282>
- Friedman, J., Higgins, L. M., & Gore, J. (2017). Community structure follows simple assembly rules in microbial microcosms. *Nature Ecology & Evolution*, 1(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0109>
- Gadd, G. M., & Dyer, T. D. (2017). Bioprotection of the built environment and cultural heritage. *Microbial Biotechnology*, 10(5), 1152-1156. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12750>
- Ghosh, S., Chowdhury, R., & Bhattacharya, P. (2016). Mixed consortia in bioprocesses : Role of microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(10), 4283-4295. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7448-1>
- Ghoul, M., & Mitri, S. (2016). The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends in Microbiology*, 24(10), 833-845. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.011>
- Gibbons, J. G., & Rinker, D. C. (2015). The genomics of microbial domestication in the fermented food environment. *Current Opinion in Genetics & Development*, 35, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.07.003>

- Glasser, J. W., & Price, H. J. (1988). Evaluating Expectations Deduced from Explicit Hypotheses about Mechanisms of Competition. *Oikos*, 51(1), 57-70. <https://doi.org/10.2307/3565807>
- Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., & Moletta, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2802-2813. <https://doi.org/10.1128/aem.63.7.2802-2813.1997>
- Goers, L., Freemont, P., & Polizzi, K. M. (2014). Co-culture systems and technologies : Taking synthetic biology to the next level. *Journal of The Royal Society Interface*, 11(96), 20140065. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0065>
- Goldford, J. E., Lu, N., Bajić, D., Estrela, S., Tikhonov, M., Sanchez-Gorostiaga, A., Segrè, D., Mehta, P., & Sanchez, A. (2018). Emergent simplicity in microbial community assembly. *Science*, 361(6401), 469-474. <https://doi.org/10.1126/science.aat1168>
- Gomand, F., Borges, F., Guerin, J., El-Kirat-Chatel, S., Francius, G., Dumas, D., Burgain, J., & Gaiani, C. (2019). Adhesive Interactions Between Lactic Acid Bacteria and β -Lactoglobulin : Specificity and Impact on Bacterial Location in Whey Protein Isolate. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01512>
- Gontijo, M. T. P., Ramia, N. E., Dijamentiuk, A., Elfassy, A., Taha, S., Mangavel, C., Revol-Junelles, A.-M., & Borges, F. (2022). Mining Biosynthetic Gene Clusters in *Carnobacterium maltaromaticum* by Interference Competition Network and Genome Analysis. *Microorganisms*, 10(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091794>
- Groenenboom, A. E., van den Heuvel, J., Zwaan, B. J., Smid, E. J., & Schoustra, S. E. (2022). Species dynamics in natural bacterial communities over multiple rounds of propagation. *Evolutionary Applications*, 15(11), 1766-1775. <https://doi.org/10.1111/eva.13470>
- Gu, Z., Eils, R., & Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*, 32(18), 2847-2849. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>
- Guerin, J., Bacharouche, J., Burgain, J., Lebeer, S., Francius, G., Borges, F., Scher, J., & Gaiani, C. (2016). Pili of *Lactobacillus rhamnosus* GG mediate interaction with β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 58, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.016>
- Ha, C. W. Y., & Devkota, S. (2020). The new microbiology : Cultivating the future of microbiome-directed medicine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 319(6), G639-G645. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00093.2020>
- Hall, E. K., Bernhardt, E. S., Bier, R. L., Bradford, M. A., Boot, C. M., Cotner, J. B., del Giorgio, P. A., Evans, S. E., Graham, E. B., Jones, S. E., Lennon, J. T., Locey, K. J., Nemergut, D., Osborne, B. B., Rocca, J. D., Schimel, J. P., Waldrop, M. P., & Wallenstein, M. D. (2018). Understanding how microbiomes influence the systems they inhabit. *Nature Microbiology*, 3(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0201-z>

- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition : Surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 15-25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>
- Holder, I. A., & Boyce, S. T. (1994). Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture. *Burns*, 20(5), 426-429. [https://doi.org/10.1016/0305-4179\(94\)90035-3](https://doi.org/10.1016/0305-4179(94)90035-3)
- Hsiao, C.-P., & Siebert, K. J. (1999). Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 47(3), 189-201. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00012-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00012-4)
- Hsu, R. H., Clark, R. L., Tan, J. W., Ahn, J. C., Gupta, S., Romero, P. A., & Venturelli, O. S. (2019). Microbial Interaction Network Inference in Microfluidic Droplets. *Cell Systems*, 9(3), 229-242.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.06.008>
- Hug, L. A., & Co, R. (2018). It Takes a Village : Microbial Communities Thrive through Interactions and Metabolic Handoffs. *mSystems*, 3(2), e00152-17. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00152-17>
- Hugenholtz, J., Splint, R., Konings, W. N., & Veldkamp, H. (1987). Selection of Protease-Positive and Protease-Negative Variants of *Streptococcus cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), 309-314. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.309-314.1987>
- Hutchinson, G. E. (1957). Concluding Remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 22, 415-427. <https://doi.org/10.1101/SQB.1957.022.01.039>
- Ikryannikova, L. N., Kurbatov, L. K., Gorokhovets, N. V., & Zamyatnin, A. A. (2020). Contact-Dependent Growth Inhibition in Bacteria : Do Not Get Too Close! *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 7990. <https://doi.org/10.3390/ijms21217990>
- Irlinger, F., & Mounier, J. (2009). Microbial interactions in cheese : Implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(2), 142-148. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.02.016>
- Iwai, S., Weinmaier, T., Schmidt, B. L., Albertson, D. G., Poloso, N. J., Dabbagh, K., & DeSantis, T. Z. (2016). Piphillin : Improved Prediction of Metagenomic Content by Direct Inference from Human Microbiomes. *PLOS ONE*, 11(11), e0166104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166104>
- Jaccard, P. (1901). Distribution de la Flore Alpine dans le Bassin des Dranses et dans quelques régions voisines. *Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles*, 37, 241-272. <https://doi.org/10.5169/seals-266440>
- Jackman, C. M., Deans, K. W., Forney, L. J., & Lin, X. N. (2019). Microdroplet co-cultivation and interaction characterization of human vaginal bacteria. *Integrative Biology*, 11(3), 69-78. <https://doi.org/10.1093/intbio/zyz006>
- Jacquioud, S., Spor, A., Wei, S., Munkager, V., Bru, D., Sørensen, S. J., Salon, C., Philippot, L., & Blouin, M. (2022). Artificial selection of stable rhizosphere microbiota leads to heritable plant phenotype changes. 25, 189-201. <https://doi.org/10.1111/ele.13916>

- Jameson, J. E. (1962). A discussion of the dynamics of salmonella enrichment. *Epidemiology & Infection*, 60(2), 193-207. <https://doi.org/10.1017/S0022172400039462>
- Jiang, C.-Y., Dong, L., Zhao, J.-K., Hu, X., Shen, C., Qiao, Y., Zhang, X., Wang, Y., Ismagilov, R. F., Liu, S.-J., & Du, W. (2016). High-Throughput Single-Cell Cultivation on Microfluidic Streak Plates. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(7), 2210-2218. <https://doi.org/10.1128/AEM.03588-15>
- Joffin, J.-N., & Leyral, G. (2001). *Microbiologie technique, tome 1 : Dictionnaire des techniques* (3e édition). Canopé - CRDP de Bordeaux.
- Jun, S.-R., Robeson, M. S., Hauser, L. J., Schadt, C. W., & Gorin, A. A. (2015). PanFP : Pangenome-based functional profiles for microbial communities. *BMC Research Notes*, 8(1), 479. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1462-8>
- Kaminski, T. S., Scheler, O., & Garstecki, P. (2016). Droplet microfluidics for microbiology : Techniques, applications and challenges. *Lab on a Chip*, 16(12), 2168-2187. <https://doi.org/10.1039/C6LC00367B>
- Kazou, M. (2022). Lactic Acid Bacteria : Lactococcus lactis. In P. L. H. McSweeney & J. P. McNamara (Éds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition)* (p. 218-225). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00325-1>
- Kehe, J., Kulesa, A., Ortiz, A., Ackerman, C. M., Thakku, S. G., Sellers, D., Kuehn, S., Gore, J., Friedman, J., & Blainey, P. C. (2019). Massively parallel screening of synthetic microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(26), 12804-12809. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900102116>
- Kerr, B., Riley, M. A., Feldman, M. W., & Bohannan, B. J. M. (2002). Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock–paper–scissors. *Nature*, 418(6894), 171. <https://doi.org/10.1038/nature00823>
- Kim, B.-R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K.-H., Lee, J.-H., Kim, H. B., & Isaacson, R. E. (2017). *Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities*. 27(12), 2089-2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Kim, H. J., Boedicker, J. Q., Choi, J. W., & Ismagilov, R. F. (2008). Defined spatial structure stabilizes a synthetic multispecies bacterial community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(47), 18188-18193. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807935105>
- Kindt, R., & Coe, R. (2005). *Tree Diversity Analysis. A Manual and Software for Common Statistical Methods and Biodiversity Studies*.
- Kisand, V., Cuadros, R., & Wikner, J. (2002). Phylogeny of Culturable Estuarine Bacteria Catabolizing Riverine Organic Matter in the Northern Baltic Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 379-388. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.379-388.2002>
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5112-5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>

- Krishna Kumar, R., Meiller-LeGrand, T. A., Alcinesio, A., Gonzalez, D., Mavridou, D. A. I., Meacock, O. J., Smith, W. P. J., Zhou, L., Kim, W., Pulcu, G. S., Bayley, H., & Foster, K. R. (2021). Droplet printing reveals the importance of micron-scale structure for bacterial ecology. *Nature Communications*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20996-w>
- Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>
- Lacroix, N., St-Gelais, D., Champagne, C. P., Fortin, J., & Vuillemand, J.-C. (2010). Characterization of aromatic properties of old-style cheese starters. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3427-3441. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2795>
- Lagier, J.-C., Dubourg, G., Million, M., Cadoret, F., Bilen, M., Fenollar, F., Levasseur, A., Rolain, J.-M., Fournier, P.-E., & Raoult, D. (2018). Culturing the human microbiota and culturomics. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9), 540-550. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0041-0>
- Lagier, J.-C., Hugon, P., Khelaifia, S., Fournier, P.-E., La Scola, B., & Raoult, D. (2015). The Rebirth of Culture in Microbiology through the Example of Culturomics To Study Human Gut Microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 237-264. <https://doi.org/10.1128/CMR.00014-14>
- Lagier, J.-C., Khelaifia, S., Alou, M. T., Ndongo, S., Dione, N., Hugon, P., Caputo, A., Cadoret, F., Traore, S. I., Seck, E. H., Dubourg, G., Durand, G., Mourembou, G., Guillhot, E., Togo, A., Bellali, S., Bachar, D., Cassir, N., Bittar, F., ... Raoult, D. (2016). Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nature Microbiology*, 1(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.203>
- Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Clemente, J. C., Burkepile, D. E., Vega Thurber, R. L., Knight, R., Beiko, R. G., & Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>
- Lawson, C. E., Harcombe, W. R., Hatzenpichler, R., Lindemann, S. R., Löffler, F. E., O'Malley, M. A., García Martín, H., Pfleger, B. F., Raskin, L., Venturelli, O. S., Weissbrodt, D. G., Noguera, D. R., & McMahon, K. D. (2019). Common principles and best practices for engineering microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 17(12), 725-741. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0255-9>
- Ledenbach, L. H., & Marshall, R. T. (2009). Microbiological Spoilage of Dairy Products. In W. H. Sperber & M. P. Doyle (Éds.), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages* (p. 41-67). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1_2
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- Lesquir, N., & Joffin, J.-N. (2017). Api, une nouvelle aventure industrielle en biotechnologies. *Opéron*, 82.

- Lewis, W. H., Tahon, G., Geesink, P., Sousa, D. Z., & Ettema, T. J. G. (2021). Innovations to culturing the uncultured microbial majority. *Nature Reviews Microbiology*, 19(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00458-8>
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., & Coton, E. (2017). Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review. *Microorganisms*, 5(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030037>
- Lidstrom, M. E., & Meldrum, D. R. (2003). Life-on-a-chip. *Nature Reviews. Microbiology*, 1(2), 158-164. <https://doi.org/10.1038/nrmicro755>
- Lindell, S. S., & Quinn, P. (1975). Use of bile-esculin agar for rapid differentiation of Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 1(5), 440-443.
- Liu, Z., Wei, Y., Li, J., & Ding, G.-C. (2022). Integrating 16S rRNA amplicon metagenomics and selective culture for developing thermophilic bacterial inoculants to enhance manure composting. *Waste Management*, 144, 357-365. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2022.04.013>
- Louca, S., Doebeli, M., & Parfrey, L. W. (2018). Correcting for 16S rRNA gene copy numbers in microbiome surveys remains an unsolved problem. *Microbiome*, 6(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0420-9>
- Louca, S., Polz, M. F., Mazel, F., Albright, M. B. N., Huber, J. A., O'Connor, M. I., Ackermann, M., Hahn, A. S., Srivastava, D. S., Crowe, S. A., Doebeli, M., & Parfrey, L. W. (2018). Function and functional redundancy in microbial systems. *Nature Ecology & Evolution*, 2(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0519-1>
- Lozupone, C., Hamady, M., Kelley, S. T., & Knight, R. (2007). Quantitative and Qualitative β Diversity Measures Lead to Different Insights into Factors That Structure Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1576-1585. <https://doi.org/10.1128/AEM.01996-06>
- Lozupone, C., & Knight, R. (2005). UniFrac: A New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8228. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>
- Magoč, T., & Salzberg, S. L. (2011). FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), 2957-2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., & Dunthorn, M. (2015). Swarm v2: Highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ*, 3, e1420. <https://doi.org/10.7717/peerj.1420>
- Marcon, E. (2015). *Mesures de la Biodiversité* [Lecture, AgroParisTech]. <https://hal-agroparistech.archives-ouvertes.fr/cel-01205813>
- Mayo, B., Rodríguez, J., Vázquez, L., & Flórez, A. B. (2021). Microbial Interactions within the Cheese Ecosystem and Their Application to Improve Quality and Safety. *Foods*, 10(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/foods10030602>

- McClements, D. J. (1999). *Food Emulsions : Principles, Practices, and Techniques*. CRC Press.
- Melo, J., Andrew, P. W., & Faleiro, M. L. (2015). *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge : The role of stress responses. *Food Research International*, 67, 75-90. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.031>
- Mills, S., Griffin, C., O'Connor, P. M., Serrano, L. M., Meijer, W. C., Hill, C., & Ross, R. P. (2017). A Multibacteriocin Cheese Starter System, Comprising Nisin and Lacticin 3147 in *Lactococcus lactis*, in Combination with Plantaricin from *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(14), e00799-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00799-17>
- Montel, M.-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N., & Berthier, F. (2014). Traditional cheeses : Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 136-154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>
- Moon, S., Ceyhan, E., Gurkan, U. A., & Demirci, U. (2011). Statistical Modeling of Single Target Cell Encapsulation. *PLoS One*, 6(7), e21580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021580>
- Morella, N. M., Weng, F. C.-H., Joubert, P. M., Metcalf, C. J. E., Lindow, S., & Koskella, B. (2020). Successive passing of a plant-associated microbiome reveals robust habitat and host genotype-dependent selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(2), 1148-1159. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908600116>
- Murtagh, F., & Legendre, P. (2014). Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method : Which Algorithms Implement Ward's Criterion? *Journal of Classification*, 31(3), 274-295. <https://doi.org/10.1007/s00357-014-9161-z>
- Narisawa, N., Haruta, S., Arai, H., Ishii, M., & Igarashi, Y. (2008). Coexistence of Antibiotic-Producing and Antibiotic-Sensitive Bacteria in Biofilms Is Mediated by Resistant Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3887-3894. <https://doi.org/10.1128/AEM.02497-07>
- Nes, I. F., Gabrielsen, C., Brede, D. A., & Diep, D. B. (2015). Novel Developments in Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. In *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria* (p. 80-99). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118868386.ch5>
- Nguyen, L. N., Nguyen, A. Q., & Nghiem, L. D. (2019). Microbial Community in Anaerobic Digestion System : Progression in Microbial Ecology. In X.-T. Bui, C. Chiemchaisri, T. Fujioka, & S. Varjani (Éds.), *Water and Wastewater Treatment Technologies* (p. 331-355). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3259-3_15
- Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E. M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., Kanigan, T., Lewis, K., & Epstein, S. S. (2010). Use of Ichip for High-Throughput In Situ Cultivation of “Uncultivable” Microbial Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8), 2445-2450. <https://doi.org/10.1128/AEM.01754-09>
- Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, H., Henry, M., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., Cáceres, M. D., ... Weedon, J. (2022).

- vegan: Community Ecology Package* (R package version 2.6-2). <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- O'Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufo, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., ... Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D733-745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
- Parente, E., Guidone, A., Matera, A., De Filippis, F., Mauriello, G., & Ricciardi, A. (2016). Microbial community dynamics in thermophilic undefined milk starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.014>
- Park, J., Kerner, A., Burns, M. A., & Lin, X. N. (2011). Microdroplet-Enabled Highly Parallel Co-Cultivation of Microbial Communities. *PLoS One*, 6(2), e17019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017019>
- Petzoldt, T. (2020). *growthrates: Estimate Growth Rates from Experimental Data* (0.8.2). <https://CRAN.R-project.org/package=growthrates>
- Pocheville, A. (2015). The Ecological Niche : History and Recent Controversies. In T. Heams, P. Huneman, G. Lecointre, & M. Silberstein (Éds.), *Handbook of Evolutionary Thinking in the Sciences* (p. 547-586). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9014-7_26
- Pochon, X., Zaiko, A., Fletcher, L. M., Laroche, O., & Wood, S. A. (2017). Wanted dead or alive? Using metabarcoding of environmental DNA and RNA to distinguish living assemblages for biosecurity applications. *PLOS ONE*, 12(11), e0187636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187636>
- Prosser, J. I., Bohannan, B. J. M., Curtis, T. P., Ellis, R. J., Firestone, M. K., Freckleton, R. P., Green, J. L., Green, L. E., Killham, K., Lennon, J. J., Osborn, A. M., Solan, M., van der Gast, C. J., & Young, J. P. W. (2007). The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1643>
- R Core Team. (2021). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (4.1.2 « Bird Hippie »). R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- R Core Team. (2022). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (4.2.2 « Innocent and Trusting »). R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rahman, A., Cailliez-Grimal, C., Bontemps, C., Payot, S., Chaillou, S., Revol-Junelles, A.-M., & Borges, F. (2014). High genetic diversity among strains of the unindustrialized lactic acid bacterium *Carnobacterium maltaromaticum* in dairy products as revealed by multilocus sequence typing. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(13), 3920-3929. <https://doi.org/10.1128/AEM.00681-14>
- Ramia, N. E., Mangavel, C., Gaiani, C., Muller-Gueudin, A., Taha, S., Revol-Junelles, A.-M., & Borges, F. (2020). Nested structure of intraspecific competition network in

- Carnobacterium maltaromaticum*. *Scientific Reports*, 10(1), 7335. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63844-5>
- Reese, A. T., Madden, A. A., Joossens, M., Lacaze, G., & Dunn, R. R. (2020). Influences of Ingredients and Bakers on the Bacteria and Fungi in Sourdough Starters and Bread. *mSphere*, 5(1), e00950-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00950-19>
- Retureau, É., Callon, C., Didienne, R., & Montel, M.-C. (2010). Is microbial diversity an asset for inhibiting *Listeria monocytogenes* in raw milk cheeses? *Dairy Science & Technology*, 90(4), 375-398. <https://doi.org/10.1051/dst/2010010>
- Rezaei Javan, R., van Tonder, A. J., King, J. P., Harrold, C. L., & Brueggemann, A. B. (2018). Genome Sequencing Reveals a Large and Diverse Repertoire of Antimicrobial Peptides. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02012>
- Riedel, C. U., Monk, I. R., Casey, P. G., Morrissey, D., O'Sullivan, G. C., Tangney, M., Hill, C., & Gahan, C. G. M. (2007). Improved Luciferase Tagging System for *Listeria monocytogenes* Allows Real-Time Monitoring In Vivo and In Vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(9), 3091-3094. <https://doi.org/10.1128/AEM.02940-06>
- Riley, M. A., & Gordon, D. M. (1999). The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology*, 7(3), 129-133. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01459-6](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01459-6)
- Rodriguez-Cabal, M. A., Barrios-Garcia, M. N., & Nuñez, M. A. (2012). Positive interactions in ecology: Filling the fundamental niche. *Ideas in Ecology and Evolution*, 5. <https://ojs.library.queensu.ca/index.php/IEE/article/view/4335>
- Ross, R. P., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: Past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1-2), 3-16. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00174-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00174-5)
- Ryser, E. T., & Marth, E. H. (1987). Fate of *Listeria monocytogenes* During the Manufacture and Ripening of Camembert Cheese. *Journal of Food Protection*, 50(5), 372-378. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-50.5.372>
- Sambrook, J. F., & Russell, D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In *Cold Springs Harbour Press* (Vol. 1).
- Sánchez, Á., Vila, J. C. C., Chang, C.-Y., Diaz-Colunga, J., Estrela, S., & Rebolleda-Gomez, M. (2021). Directed Evolution of Microbial Communities. *Annual Review of Biophysics*, 50(1), 323-341. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-101220-072829>
- Schloss, P. D., & Westcott, S. L. (2011). Assessing and Improving Methods Used in Operational Taxonomic Unit-Based Approaches for 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3219-3226. <https://doi.org/10.1128/AEM.02810-10>
- Scholz, R. L., & Greenberg, E. P. (2015). Sociality in *Escherichia coli*: Enterochelin Is a Private Good at Low Cell Density and Can Be Shared at High Cell Density. *Journal of Bacteriology*, 197(13), 2122-2128. <https://doi.org/10.1128/JB.02596-14>
- Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, 27(3), 379-423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>

- Sieuwerts, S., de Bok, F. A. M., Hugenholtz, J., & van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008). Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations : From Classical to Genomics Approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 4997-5007. <https://doi.org/10.1128/AEM.00113-08>
- Silva, C. C. G., Silva, S. P. M., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00594>
- Silveira, C. B., & Rohwer, F. L. (2016). Piggyback-the-Winner in host-associated microbial communities. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 2(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.10>
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature*, 163(4148), Article 4148. <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Sjöback, R., Nygren, J., & Kubista, M. (1995). Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 51(6), L7-L21. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(95\)01421-P](https://doi.org/10.1016/0584-8539(95)01421-P)
- Smid, E. J., Erkus, O., Spus, M., Wolkers-Rooijackers, J. C., Alexeeva, S., & Kleerebezem, M. (2014). Functional implications of the microbial community structure of undefined mesophilic starter cultures. *Microbial Cell Factories*, 13(1), S2. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S2>
- Smid, E. J., & Lacroix, C. (2013). Microbe–microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.11.007>
- Sodini, I., Boquien, C. Y., Corrieu, G., & Lacroix, C. (1997a). Use of an immobilized cell bioreactor for the continuous inoculation of milk in fresh cheese manufacturing. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 18(1), 56-61. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900362>
- Sodini, I., Boquien, C.-Y., Corrieu, G., & Lacroix, C. (1997b). Microbial dynamics of co- and separately entrapped mixed cultures of mesophilic lactic acid bacteria during the continuous prefermentation of milk. *Enzyme and Microbial Technology*, 20(5), 381-388. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00165-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00165-2)
- Sokol, N. W., Slessarev, E., Marschmann, G. L., Nicolas, A., Blazewicz, S. J., Brodie, E. L., Firestone, M. K., Foley, M. M., Hestrin, R., Hungate, B. A., Koch, B. J., Stone, B. W., Sullivan, M. B., Zablocki, O., & Pett-Ridge, J. (2022). Life and death in the soil microbiome : How ecological processes influence biogeochemistry. *Nature Reviews Microbiology*, 20(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00695-z>
- Solans, C., Esquena, J., Azemar, N., Rodriguez, C., & Kunieda, H. (2004). Chapter 13 - Highly concentrated (gel) emulsions : Formation and properties. In D. N. Petsev (Éd.), *Interface Science and Technology* (Vol. 4, p. 511-555). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1573-4285\(04\)80015-2](https://doi.org/10.1016/S1573-4285(04)80015-2)

- Soltani, S., Biron, E., Said, L. B., Subirade, M., & Fliss, I. (2022). Bacteriocin-Based Synergetic Consortia: A Promising Strategy to Enhance Antimicrobial Activity and Broaden the Spectrum of Inhibition. *Microbiology Spectrum*. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00406-21>
- Somerville, V., Berthoud, H., Schmidt, R. S., Bachmann, H.-P., Meng, Y. H., Fuchsmann, P., von Ah, U., & Engel, P. (2022). Functional strain redundancy and persistent phage infection in Swiss hard cheese starter cultures. *The ISME Journal*, 16(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01071-0>
- Souza, L. V., Martins, E., Moreira, I. M. F. B., & de Carvalho, A. F. (2022). Strategies for the Development of Bioprotective Cultures in Food Preservation. *International Journal of Microbiology*, 2022, e6264170. <https://doi.org/10.1155/2022/6264170>
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70(2-4), 331-345. <https://doi.org/10.1007/BF00395940>
- Swenson, W., Arendt, J., & Wilson, D. S. (2000). Artificial selection of microbial ecosystems for 3-chloroaniline biodegradation. *Environmental Microbiology*, 2(5), 564-571. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00140.x>
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21(8), 2045-2050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>
- Thingstad, T. F. (2000). Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnology and Oceanography*, 45(6), 1320-1328. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.6.1320>
- Tolu, V., Fraumene, C., Carboni, A., Loddò, A., Sanna, M., Fois, S., Roggio, T., & Catzeddu, P. (2022). Dynamics of Microbiota in Three Backslopped Liquid Sourdoughs That Were Triggered with the Same Starter Strains. *Fermentation*, 8(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/fermentation8100571>
- Trmčić, A., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2015). A standard bacterial isolate set for research on contemporary dairy spoilage. *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5806-5817. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9490>
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. W., & Palmer, J. D. (1999). Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327-338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>
- Twomey, E., Hill, C., Field, D., & Begley, M. (2021). Recipe for Success: Suggestions and Recommendations for the Isolation and Characterisation of Bacteriocins. *International Journal of Microbiology*, 2021, e9990635. <https://doi.org/10.1155/2021/9990635>
- Ushikubo, F. Y., & Cunha, R. L. (2014). Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions. *Food Hydrocolloids*, 34, 145-153. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.016>
- Vandergheynst, J. S., Guo, H. Y., Cheng, Y. S., & Scher, H. (2013). Microorganism viability influences internal phase droplet size changes during storage in water-in-oil emulsions.

- Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(10), 1427-1434. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0886-6>
- van Tatenhove-Pel, R. J., Zwering, E., Boreel, D. F., Falk, M., van Heerden, J. H., Kes, M. B. M. J., Kranenburg, C. I., Botman, D., Teusink, B., & Bachmann, H. (2021). Serial propagation in water-in-oil emulsions selects for *Saccharomyces cerevisiae* strains with a reduced cell size or an increased biomass yield on glucose. *Metabolic Engineering*, 64, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.12.005>
- Verraes, C., Vlaemynck, G., Van Weyenberg, S., De Zutter, L., Daube, G., Sindic, M., Uyttendaele, M., & Herman, L. (2015). A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal*, 50, 32-44. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.05.011>
- Vivant, A.-L., Garmyn, D., Maron, P.-A., Nowak, V., & Piveteau, P. (2013). Microbial Diversity and Structure Are Drivers of the Biological Barrier Effect against *Listeria monocytogenes* in Soil. *PLOS ONE*, 8(10), e76991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076991>
- Walker, M. C., Eslami, S. M., Hetrick, K. J., Ackenhusen, S. E., Mitchell, D. A., & van der Donk, W. A. (2020). Precursor peptide-targeted mining of more than one hundred thousand genomes expands the lanthipeptide natural product family. *BMC Genomics*, 21(1), 387. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06785-7>
- Wang, H., Fewer, D. P., & Sivonen, K. (2011). Genome Mining Demonstrates the Widespread Occurrence of Gene Clusters Encoding Bacteriocins in Cyanobacteria. *PLoS One*, 6(7), e22384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022384>
- Wang, L., Jiang, H., Qiu, Y., Dong, Y., Hamouda, H. I., Balah, M. A., & Mao, X. (2022). Biochemical Characterization of a Novel Myrosinase Rmyr from *Rahnella inusitata* for High-Level Preparation of Sulforaphane and Sulforaphane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(7), 2303-2311. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07646>
- Warnecke, T., & Gill, R. T. (2005). Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. *Microbial Cell Factories*, 4(1), 25. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-25>
- Wei, Z., Yang, T., Friman, V.-P., Xu, Y., Shen, Q., & Jousset, A. (2015). Trophic network architecture of root-associated bacterial communities determines pathogen invasion and plant health. *Nature Communications*, 6, 8413. <https://doi.org/10.1038/ncomms9413>
- Weiss, J., & Muscholik, G. (2007). Factors Affecting the Droplet Size of Water-in-Oil Emulsions (W/O) and the Oil Globule Size in Water-in-Oil-in-Water Emulsions (W/O/W). *Journal of Dispersion Science and Technology*, 28(5), 703-716. <https://doi.org/10.1080/01932690701341819>
- Wemheuer, F., Taylor, J. A., Daniel, R., Johnston, E., Meinicke, P., Thomas, T., & Wemheuer, B. (2020). Tax4Fun2: Prediction of habitat-specific functional profiles and functional redundancy based on 16S rRNA gene sequences. *Environmental Microbiome*, 15(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s40793-020-00358-7>

- Whipps, J. M., Lewis, K., & Cooke, R. C. (1988). Mycoparasitism and plant disease control. In *Fungi in Biological Control Systems* (Burge, N.M., p. 161-188). Manchester University Press.
- Whittaker, R. H. (1960). Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs*, 30(3), 279-338. <https://doi.org/10.2307/1943563>
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain : The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088-5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>
- Wright, R. J., Gibson, M. I., & Christie-Oleza, J. A. (2019). Understanding microbial community dynamics to improve optimal microbiome selection. *Microbiome*, 7(1), 85. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0702-x>
- Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud : A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613-1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- Yu, W., & Hancock, B. C. (2008). Evaluation of dynamic image analysis for characterizing pharmaceutical excipient particles. *International Journal of Pharmaceutics*, 361(1-2), 150-157. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.05.025>
- Zagorec, M., & Christicans, S. (2013). *Flores protectrices pour la conservation des aliments*. Éditions Quae.

Communications

Communications écrites

Dijamentiuk, A., Mangavel, C., Elfassy, A., Michaux, F., Burgain, J., Rondags, E., Delaunay, S., Ferrigno, S., Revol-Junelles, A.-M., & Borges, F. (2023) Invert emulsions alleviate biotic interactions in bacterial mixed culture. *Microbial Cell Factories* 22(16). <https://doi.org/10.1186/s12934-022-02014-w>

Dijamentiuk, A., Mangavel, C., Gapp, C., Elfassy, A., Revol-Junelles, A.-M., & Borges, F. (2023) Dynamics of bacterial communities upon serial propagation using two different co-culture systems highlight their complementarity for microbial community engineering. *Manuscript in preparation*.

Communications orales

Dijamentiuk, A., Mangavel, C., Revol-Junelles, A.-M., Michaux F., Burgain, J., Gaiani, C., Rondags, E., Delaunay, S., Ferrigno, S., & Borges, F. (2022). Propagating microbial communities in invert emulsions, *Séminaire de l'Ecole Doctorale SIRENa*, Nancy, France, march 8, 2022. Oral presentation.

Dijamentiuk, A., Mangavel, C., Revol-Junelles, A.-M., Michaux F., Burgain, J., Gaiani, C., Rondags, E., Delaunay, S., Ferrigno, S., & Borges, F. (2022). Propagation de communautés bactériennes en émulsion inverse, *23^{ème} Colloque du Club des Bactéries Lactiques*, Rennes, France, june 10, 2022. Oral presentation.

Dijamentiuk, A., Mangavel, C., Revol-Junelles, A.-M., Michaux F., Burgain, J., Rondags, E., Delaunay, S., Ferrigno, S., Revol-Junelles, A.-M., & Borges, F. (2022). Invert emulsions for the propagation of microbial communities, *18th International Symposium on Microbial Ecology*, Lausanne, Switzerland, august 16, 2022. Poster pitch and poster.

Dijamentiuk, A., Mangavel, C., Revol-Junelles, A.-M., & Borges, F. (2022). Propagating microbial communities: better have more than one trick up one's sleeve, *2^{ème} Weblactic de la Société Française de Microbiologie - groupe Bactéries Lactiques*, online, november 24, 2022. Flash presentation.

Abstract

Propagation of bacterial communities: shaping, stabilization and selection for biopreservation

Recent discoveries about microbial communities, or microbiota, have revealed considerable biotechnological potential in a variety of fields. They are considered essential to accelerate innovation in food production systems. However, existing processes are not adapted to the cultivation of microbiota. One major barrier to community propagation is competition between microorganisms, which can lead to an undesirable reduction in biodiversity within the culture reactor. This phenomenon can lead to communities that lack the desired functionality. The objective of this thesis was to study the influence of microbiota propagation, under controlled conditions, on their structure and function. During this work, a process of microbial culture excluding microbial competition for the propagation of bacterial communities was developed. The chosen strategy is based on the micro-confinement and spatial segregation of bacteria within a broth structured as an invert emulsion. The effect of the invert emulsion culture on the growth of individual bacteria was studied, then the effect of this system on the dynamics of communities propagated according to a sequential regime, or backslopping, as well as that exerted by a conventional non-emulsified system was investigated. The results showed that the use of an inverse emulsion leads to the generation of new community structures during propagation, and that the use of the classical culture leads to their stabilization. The different behaviors of these two culture systems make them complementary tools for the modeling and the propagation of microbial communities. Finally, the effect of propagation on the functional variability of communities was studied in a biopreservation context. The screening of propagated raw milk microbiota showed that they differed in terms of robustness and reproducibility of anti-*Listeria* activity, emphasizing the need to take into account the functional variability of communities when selecting communities of interest for microbiota engineering.

Keywords: Microbiome engineering, Co-culture systems, Sequential propagation, Competition, Biopreservation

Résumé

Propagation de communautés bactériennes : modelage, stabilisation et sélection pour la biopréservation

Les découvertes récentes sur les communautés microbiennes, ou microbiotes, ont révélé un potentiel biotechnologique considérable dans divers domaines. Ils sont considérés comme essentiels pour accélérer l'innovation dans les systèmes de production alimentaire. Toutefois, les procédés existants ne sont pas adaptés à la culture des microbiotes. La difficulté que représente la culture de microbiotes a notamment pour origine la capacité des microorganismes à interagir par compétition, qui peut conduire à la réduction indésirable de la biodiversité au sein du réacteur de culture. Ce phénomène peut aboutir à l'obtention de communautés qui ne présentent pas les fonctionnalités souhaitées. L'objectif de cette thèse est d'étudier l'influence de la propagation de microbiotes en condition contrôlée sur leur structure et leur fonction. Les travaux de cette thèse ont permis de développer et de déterminer la performance d'un procédé excluant la compétition microbienne pour la culture de communautés bactériennes. La stratégie choisie repose sur le micro-confinement et la ségrégation spatiale des bactéries au sein d'un bouillon de culture structuré en émulsion inverse. Après avoir étudié l'effet de la culture en émulsion inverse sur la croissance de bactéries individuelles, les travaux ont comparé son effet sur la dynamique de communautés propagées selon un régime séquentiel, ou backslopping, avec celui exercé par un système classique non-émulsionné. Les résultats ont montré que l'utilisation d'une émulsion inverse conduit à la génération de nouvelles structures de communautés au cours de la propagation, et que l'utilisation de la culture classique conduit à leur stabilisation. Les comportements différents issus de ces deux systèmes de culture en font des outils complémentaires pour le modelage et la propagation de communautés microbiennes. Enfin, l'effet de la propagation sur la variabilité fonctionnelle de communautés a été étudiée dans un contexte de biopréservation. Le criblage de microbiotes de laits crus propagés a montré qu'ils se différenciaient en termes de robustesse et de reproductibilité de leur activité anti-*Listeria*, justifiant de tenir compte de la variabilité fonctionnelle des communautés pour leur sélection dans un contexte d'ingénierie de microbiotes.

Mots-clés : Ingénierie de microbiome, Systèmes de co-culture, Propagation séquentielle, Compétition, Biopréservation