

Évaluation des transferts microbiens du sol au lait en filière AOP Comté

CHEMIDLIN PREVOST-BOURE N. (1), SADET-BOURGETEAU S. (1), BRIE M. (2), DUMONT J. (2), CAMPEDELLI M. (2), KARIMI B. (1), NOWAK V. (1), GUYOT P. (3), LETOURNEUR C. (3), MANNEVILLE V. (4), GILLET F. (5), BOUTON Y. (3)

(1) UMR 1347 Agroécologie - AgroSup Dijon – INRAE - Université Bourgogne – Université Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon

(2) AgroSup Dijon, 21000 Dijon

(3) Comité Interprofessionnel de Gestion du Comté – Unité R&D, Bâtiment INRAE URTAL, 39800 Poligny

(4) Institut de l'Élevage, 63170 Aubière

(5) UMR 6249 Chrono-Environnement, Université Bourgogne Franche-Comté, 25030 Besançon

RESUME

Comprendre le lien d'un produit à son terroir est un véritable enjeu pour des productions laitières et fromagères performantes et durables préservant les équilibres agro-écologiques des prairies. En filière AOP Comté, les bactéries indigènes du lait cru ont été identifiées comme déterminantes dans la typicité du fromage affiné mais leur origine reste à identifier. Ici, l'hypothèse est que les communautés microbiennes indigènes du lait cru seraient issues des prairies permanentes suivant un *continuum* sol–phyllosphère–trayon–lait. Pour la tester, les communautés microbiennes des 4 compartiments ont été caractérisées par séquençage haut débit dans 45 fermes en AOP Comté. Une analyse de réseau a permis de mettre en évidence des liens forts et très significatifs entre compartiments ($0,26 < r < 0,49$). Ces liens se sont révélés sensibles aux pratiques agricoles (niveau de fertilisation organique, pression au pâturage, traitement des trayons post-traite) et aux conditions de milieu (pH du sol, diversité végétale, altitude). Cette chaîne de causalité suggère que le lien d'un produit à son terroir est dépendant de la diversité microbologique des agroécosystèmes et des pratiques agricoles mises en œuvre. Renforçant le caractère local du terroir, elle constitue un élément à prendre en compte pour la durabilité environnementale et économique des filières.

Microbial transfers evaluation from soil to milk in Comte PDO Cheese

CHEMIDLIN PREVOST-BOURE N. (1), BOURGETEAU-SADÉ S. (1), BRIE M. (2), DUMONT J. (2), CAMPEDELLI M. (2), KARIMI B. (1), NOWAK V. (1), GUYOT P. (3), LETOURNEUR C. (3), MANNEVILLE V. (4), GILLET F. (5), BOUTON Y. (3)

(1) UMR 1347 Agroécologie - AgroSup Dijon – INRAE - Université Bourgogne – Université Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon

SUMMARY

Understanding how a product is related to its “terroir” of production is crucial for efficient and sustainable dairy productions preserving the agroecological equilibrium of grasslands. The specificity of PDO Comté cheese has been related to the diversity of bacteria naturally occurring in raw milk but their sources remain undetermined. In this study, it is hypothesized that indigeneous microbial communities occurring in raw milk may arise from permanent grasslands grazed by dairy cows according to the *continuum* soil–phylosphere–teat–milk. To test this hypothesis, the microbial communities of these compartments have been characterized in 45 dairy farms in PDO Comté cheese area by high-throughput sequencing. A network analysis highlighted strong and significant links between the 4 compartments considered ($0.26 < r < 0.49$). These links were modified by farming practices (organic fertilization levels, cattle intensity, cow-teat care) and according to environmental conditions (soil pH, plant diversity, altitude). Altogether, this causal relationship through the *continuum* suggests that a product is related to its “terroir” by means of the microbial diversity of agroecosystems, this relationship being modulated by farming practices. Making “terroir” even more local, this causal relationship will have to be considered for sustainable dairy production.

INTRODUCTION

La gestion durable des prairies pour la production laitière et fromagère doit associer la performance du système de production tout en préservant les équilibres agro-écologiques des prairies et le lien du produit à son terroir. Aujourd'hui, il est établi que la diversité floristique des prairies et les communautés microbiennes indigènes du lait cru ont un rôle prépondérant dans la typicité des fromages au lait cru comme le Comté (Monnet *et al.*, 2000 ; Bouton *et al.*, 2009).

Néanmoins, même si la peau des trayons a été identifiée comme la principale source des microorganismes indigènes du lait, la chaîne de causalité reste encore à établir. D'après la littérature, des phyla et des genres microbiens peuvent être communs au lait cru, au trayon, à la phyllosphère (surface de l'herbe) et au sol de l'écosystème prairial (Vorholt 2012 ; Karimi *et al.*, 2018). Ceci suggère que la chaîne de causalité reliant le Comté à son terroir remonterait jusqu'à la prairie en s'appuyant sur sa biodiversité microbienne. Néanmoins, la fertilisation des prairies pour augmenter la production d'herbe

et améliorer la performance du système de production modifie leurs biodiversités végétales et microbiennes (Vorholt 2012 ; Coolon *et al.*, 2013 ; Mauchamp *et al.*, 2016 ; Toyota *et al.*, 2006), ce qui pourrait affecter la chaîne de causalité reliant le Comté à son terroir. Cette étude a donc pour objectifs d'évaluer si : 1) les microorganismes du lait cru peuvent provenir de la prairie permanente suivant un *continuum* sol–phyllosphère–trayon–lait ; 2) ce *continuum* est influencé par les pratiques de fertilisation mises en œuvre pour augmenter la performance du système de production.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. RESEAU DE FERMES

Un réseau de ferme basé sur le volontariat a été constitué au sein de la zone AOP Comté. Comptant 44 fermes, il couvre l'ensemble de l'arc jurassien et le gradient altitudinal allant du premier plateau au Haut-Jura.

1.2. STRATEGIE D'ÉCHANTILLONNAGE

La période de prélèvements s'est étendue d'Avril à fin Juin 2017. Au sein de chaque ferme, une parcelle de prairie permanente a été sélectionnée. Dans cette parcelle, une zone d'échantillonnage de 60 x 2 m a été délimitée et 5 quadrats (0,25 m²) positionnés tous les 10 m suivant la longueur de 60 m. Les prélèvements ont été réalisés pendant la période de présence des vaches laitières sur la parcelle considérée. Les prélèvements des compartiments trayon et lait ont été réalisés dans la salle de traite entre 0 et 8 jours après les prélèvements à la parcelle.

1.3. ÉCHANTILLONNAGE DES COMPARTIMENTS

A la parcelle, les communautés microbiennes de la phyllosphère ont été prélevées à l'aide de kits Sterisox Tryptone (Sanifarm, Bolzano, Italie) placés sur des supports stériles à raison d'une paire de Sterisox pour les 5 quadrats. Dix carottes de sol (2 par quadrat) ont été prélevées à l'aide d'une tarière (profondeur : 0 à 20 cm) et mélangées en un échantillon composite. Dans la salle de traite, la surface des trayons d'au moins 10 vaches laitières a été prélevée à l'aide de lingettes stériles et un échantillon de lait de tank a été prélevé à l'aide d'une louche stérile. Tous les échantillons ont été conservés à 4°C jusqu'à leur traitement au laboratoire.

1.4. CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES ET PRATIQUES AGRICOLES

Par parcelle, un sous-échantillon de chaque sol a été analysé pour ses caractéristiques physico-chimiques (Laboratoire d'analyse des sols d'Arras, www6.hautsdefrance.inrae.fr/las) : granulométrie (Sables (%), Limons (%), Argiles (%), NF ISO 11277), pH (NF ISO 10390); teneurs en Carbone organique, Azote (C_{org}, N_{tot}, g.kg⁻¹, NF ISO 10694 et NF ISO 13878), Calcaire total (CaCO₃, g.kg⁻¹, NF ISO 10693), et Phosphore assimilable (P₂O₅, g.kg⁻¹, NF ISO 11263, méthode Olsen). La communauté végétale a été caractérisée par sa richesse spécifique (SpRichness), son équitabilité (Evenness, indice de Pielou), son niveau de diversité (H', indice de Shannon) et les proportions de graminées (grass), de légumineuses (leg) et de dicotylédones (forbs). La gestion des parcelles de prairie permanente a été appréhendée par des enquêtes. Les variables retenues pour l'analyse étaient : 1) la pression au pâturage, *i.e.* le nombre de jours de présence au pâturage cumulé par vache par ha à une échelle annuelle ou saisonnière (JPP printemps, JPP été et JPP automne); 2) les pratiques de fertilisation : fertilisation industrielle (N_{ind}, kg N.ha⁻¹.an⁻¹) et fertilisation organique de ferme : quantités d'effluents épandues au total (N_{man}) et par effluent (N_{ma} pour les effluents liquides et N_{sma} pour les effluents solides; kg N.ha⁻¹.an⁻¹; équivalences : fumiers : 5 kg N t⁻¹, lisiers : 5 kg N m⁻³, lisiers dilués : 3 kg N m⁻³); ratio azote organique sur azote total (N_{man}/(N_{man}+N_{ind})). Le troupeau a été caractérisé par le nombre de vaches laitières (VL), la préparation du trayon pour la traite (Prepa_Traite, 3 catégories : pas de préparation, voie sèche, voie humide), et le traitement du trayon post-traite (Post_trempage, 2 catégories : Oui, Non).

1.5. CARACTERISATION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES

La caractérisation des communautés microbiennes (procaryotes : bactéries et archées ; et champignons) a été réalisée par des approches de biologie moléculaire. Des protocoles spécifiques à chaque compartiment ont été utilisés pour en extraire et en purifier l'ADN. Pour le sol, l'ADN a été extrait suivant le protocole décrit dans Terrat *et al.* (2017) consistant en une extraction de l'ADN par lyse mécanique et chimique puis sa précipitation dans de l'isopropanol glacial. L'ADN brut obtenu a été purifié avec le kit GeneClean Turbo (MP Biomedicals, Ilkirch, France). Les échantillons de surface d'herbe et de trayon ont été extraits des lingettes et des Sterisox dans une solution d'eau physiologique additionnée de 0,1% de Tween20 et 0,5% de lait G (Vacheyrou *et al.*,

2011) dans un stomacher. L'ADN des suspensions obtenues a été extrait comme celui du lait à l'aide du kit DNeasy PowerFood Microbial (Qiagen, Courtaboeuf, France) suivant les instructions du constructeur. Les ADN purifiés ont été utilisés pour caractériser les communautés de procaryotes et de champignons par séquençage haut-débit. Pour les procaryotes, un fragment de l'ADNr 16S (440 pb) a été amplifié *via* le couple d'amorces F479/R888 (5'-CAG CMG CYG CNG TAA NAC-3' / 5'-CCG YCA ATT CMT TTR AGT-3'). Pour les champignons, un fragment de l'ADNr 18S (350 pb) a été amplifié *via* le couple d'amorces FF390/FR1 (5'-CGA TAA CGA ACG AGA CCT-3' / 5'-ANC CAT TCA ATC GGT ANT-3'). Dans les deux cas, l'amplification PCR a été réalisée suivant les conditions décrites dans Tardy *et al.* (2014). Les produits PCR ont été purifiés à l'aide du kit AMPure® XP (Beckman Coulter, Italy, Milano) et des identifiants moléculaires ont été ajoutés à une seconde étape de PCR (Tardy *et al.*, 2014). Les amplicons ont été séquencés à l'aide d'un séquenceur MiSeq Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA) en chimie V3, produisant 15 881 872 et 15 723 864 séquences brutes pour les communautés de procaryotes et de champignons, respectivement.

1.6. ANALYSES BIOINFORMATIQUES

L'analyse bioinformatique des données issues du séquençage des communautés de procaryotes et de champignons a été réalisée avec le pipeline bioinformatique GnS-PIPE (Terrat *et al.*, 2017). Les étapes de traitement sont les suivantes : 1) élimination des séquences de mauvaise qualité (trop courtes : <350 pb en 16S et < 300 pb en 18S, ou présentant trop d'ambiguïté), 2) Déréplication stricte, *i.e.* regroupement des séquences strictement identiques, 3) Alignement des séquences dérépliquées avec l'outil Infernal, 4) normalisation du nombre de séquence par échantillon (10 000 séquences) par tirage aléatoire. A l'issue de cette procédure, deux échantillons comptaient seulement 3746 et 9379 séquences de qualité. Ils ont été conservés ainsi et toutes les séquences ont été considérées pour les analyses ultérieures. Ensuite, les séquences ont été affiliées au niveau du genre à l'aide de la base de données SILVA (Version R114). Les tables de contingence obtenues ont été converties en tables d'abondances relatives en divisant le nombre de séquence de chaque genre par le nombre de séquences total de l'échantillon.

1.7. ANALYSES STATISTIQUES

1.7.1. Richesse taxonomique et occurrence des genres bactériens, archées et fongiques

La richesse taxonomique des communautés de procaryotes ou de champignons a été déterminée pour chaque échantillon à partir des tables d'abondances relatives issues de l'analyse bioinformatique. Les compartiments (sol, phyllosphère, trayon, lait) ont été comparés pour leur richesse taxonomique par une analyse de rangs de Spearman. L'analyse de l'occurrence des différents genres entre les compartiments a permis d'évaluer la part de genres spécifiques à un compartiment ou partagés entre 2, 3 ou 4 compartiments par le biais d'un diagramme de Venn. Lorsque des aires de plusieurs compartiments se chevauchent, le nombre indiqué correspond au nombre de genres partagés.

1.7.2. Transferts microbiens et sensibilité aux conditions environnementales et aux pratiques

En écologie microbienne, les réseaux de co-occurrence permettent en général d'étudier les relations entre taxons microbiens. Ici, les réseaux de co-occurrence ont été utilisés pour évaluer si des transferts microbiens significatifs pouvaient être identifiés entre les quatre compartiments considérés : sol, phyllosphère, trayon et lait. Dans cette approche, les compartiments constituent les nœuds du réseau et les variations d'abondances relatives de chaque genre entre compartiments d'une même ferme constituent

des mesures répétées d'un transfert microbien. Ainsi, les transferts microbiens entre compartiments ont été évalués par ferme, à l'aide d'un coefficient de corrélation de Spearman ($P < 0,001$) calculé à partir de l'abondance relative des genres occurants dans les deux compartiments considérés et corrigé pour les faux positifs (méthode False Detection Rate) ; les genres n'occurant dans aucun des deux compartiments considérés étant écartés. Ceci a permis d'aboutir à une matrice de corrélations entre compartiments par ferme. Chaque ferme constituant un réplicat indépendant des transferts microbiens, les matrices de corrélation produites à l'échelle de chaque ferme ont été utilisées pour construire un réseau consensus entre compartiments suivant la méthode décrite dans Gysi *et al.* (2018 ; package WTO). Cette méthode combine plusieurs réseaux de co-occurrence en un réseau consensus ne conservant que les liens représentés dans chacun des réseaux de base, estime un coefficient de corrélation pondéré entre chaque nœud et évalue son niveau de significativité ($P < 0,001$). Pour chaque lien significatif entre compartiments constituant un transfert microbien, sa sensibilité aux conditions environnementales et aux pratiques agricoles a été évaluée par une analyse de variance basée sur des modèles linéaires généraux. En premier, les variables explicatives présentant une forte autocorrélation ont été écartées ($r < -0,6$ ou $r > 0,6$). Ainsi, les effets fixes suivants ont été testés : Altitude, JPP printemps, JPP été, JPP Automne, N_{man} , $N_{man}/(N_{man}+N_{ind})$, C_{org} , pH, P_2O_5 , Sables, Argiles, grass, SpRichness, Evenness, VL, Prepa_Traite, Post_Trempage ; les variables quantitatives ont été transformées suivant une relation polynomiale de second degré pour détecter de potentiels effet d'optimum. Le modèle le plus parcimonieux a été sélectionné pour chaque transfert microbien en deux étapes : 1) Réduction du nombre de variables explicatives (Z-score, package Boruta), 2) Sélection pas à pas basée sur le Critère d'Information d'Akaike (AIC). Le R^2 , le R^2 ajusté (R^2_{adj}) et les effets marginaux des variables explicatives ont été déterminés pour chaque modèle sélectionné.

2. RESULTATS

2.1. COMPARAISON DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES ENTRE COMPARTIMENTS

2.1.1. Richesse taxonomique

Le nombre moyen de genres observés par ferme est du même ordre de grandeur entre compartiments pour les procaryotes (sol : 353 ± 14 , phyllosphère : 378 ± 48 , trayon : 317 ± 40 , lait : 296 ± 61) ou les champignons (sol : 233 ± 26 , phyllosphère : 157 ± 22 , trayon : 192 ± 22 , lait : 117 ± 45). Les gammes de variations sont également très similaires entre compartiments pour les procaryotes (sol : 328 à 387, phyllosphère : 261 à 470, trayon : 238 à 389, lait : 135 à 481) ou les champignons (sol : 173 à 282, phyllosphère : 111 à 208, trayon : 154 à 242, lait : 77 à 367). Aucune différence significative n'a été mise en évidence pour les procaryotes ou les champignons ($P > 0,05$).

2.1.2. Occurrence des genres microbiens

Les diagrammes de Venn (Figure 1) représentent la distribution des genres procaryotes (Figure 1A) et de champignons (Figure 1B) entre les compartiments. Les proportions de genres partagés entre les 4 compartiments étaient similaires pour les procaryotes (48,3%, 592 genres) et les champignons (47,1%, 346 genres) et supérieures à celles observées pour uniquement 2 à 3 compartiments, celles-ci variant de 12,0% à 15,8%. Ces valeurs étaient du même ordre de grandeur que les proportions de genres spécifiques à un compartiment : 16,8% pour les procaryotes et 25,1% pour les champignons. Plus précisément, les 4 compartiments considérés partageaient un total de 1226 genres de procaryotes répartis à 90% au sein de 4 phyla : *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* et *Bacteroidetes*. Les 23 autres phyla de procaryotes observés

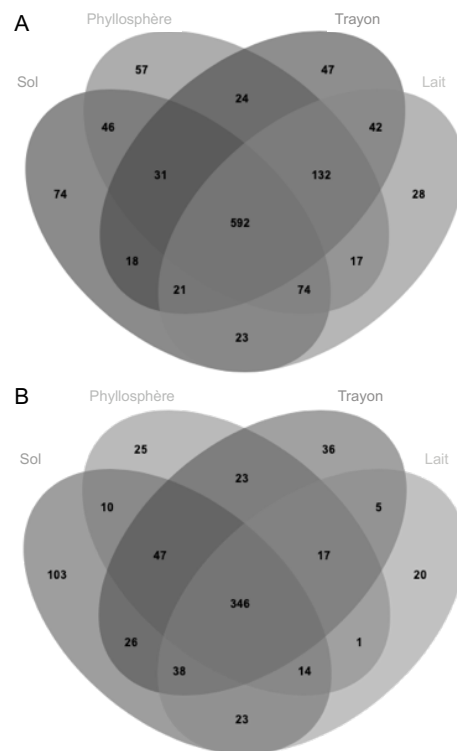


Figure 1. Diagramme de Venn de répartition des genres de procaryotes (A) et de champignons (B) entre compartiments.

n'en représentaient que 10%. Concernant les champignons, 735 genres étaient partagés entre les 4 compartiments considérés et appartenaient pour 86,9% d'entre eux aux phyla *Ascomycota* et *Basidiomycota*. L'ensemble des phyla partagés entre les 4 compartiments correspondait à des phyla dominants en termes d'abondances relatives mais certains d'entre eux correspondaient à des phyla minoritaires : *e.g.* *Plactomycetes*, *Crenarchaeota*, *Glomeromycota*, *Blastocladiomycota*, *Dictyoglomi*, *Elusimicrobia*, *Fibrobacteres*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*.

2.2. TRANSFERTS MICROBIENS ENTRE COMPARTIMENTS ET SENSIBILITÉ AUX CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES ET AUX PRATIQUES

Le réseau consensus issu de l'analyse (Figure 2) a mis en évidence des transferts microbiens significatifs entre les compartiments du *continuum*. Les valeurs des coefficients de corrélation pondérés sont présentées au-dessus des liens dans la Figure 2. Le sol et la phyllosphère étaient plus faiblement corrélés que la phyllosphère et le trayon, le trayon et le lait ou la phyllosphère et le lait. A l'échelle de chaque ferme, les coefficients de corrélation entre l'herbe et le trayon et entre le trayon et le lait étaient plus variables (0,20 à 0,83 et 0,24 à 0,66, respectivement) que ceux estimés entre le sol et la phyllosphère (0,14 à 0,41) ou entre la phyllosphère et le lait (0,14 à 0,53). L'analyse de variance des coefficients de corrélation, *i.e.* des transferts, entre compartiments estimés à l'échelle de chaque ferme a permis d'aboutir à des modèles expliquant une part significative de leurs variations (Tableau 1). En effet, les R^2_{adj} des modèles variaient entre 0,05 et 0,43. Les variables expliquant ces variations ont été hiérarchisées par rapport à leur part de variance expliquée, la variance pour les polynômes étant la somme des variances des différents facteurs. Ainsi, dans le cas du transfert sol-phyllosphère, la hiérarchie suivante était observée : fertilisation organique de la prairie (18,1%) > richesse spécifique de la communauté végétale (13,2%) > proportion de graminées (10,3%) > pH du sol (9,3%). La richesse spécifique végétale et la proportion de graminées avaient des effets positifs sur le transfert sol-phyllosphère. Les effets du niveau de fertilisation organique et du pH du sol étaient positifs jusqu'à des optima

Transferts	Variance (%)
Sol – Phyllosphère $R^2= 0,51$; $R^2_{adj}= 0,43$; $P<0,001$	
Fertilisation organique **	12,6
(Fertilisation organique) ² *	5,5
SpRichness**	13,2
Grass ² **	10,3
(pH) ² *	5,6
pH*	3,7
Phyllosphère -Trayon $R^2= 0,24$; $R^2_{adj}= 0,18$; $P<0,05$	
Fertilisation organique **	15,2
(JPP printemps) ² *	4,4
Altitude*	4,4
Trayon - Lait $R^2= 0,34$; $R^2_{adj}= 0,27$; $P<0,01$	
(JPP printemps) ² *	9,1
JPP printemps *	6,3
Post-trempege *	10,4
(Fertilisation organique) ² *	7,7
Phyllosphère - Lait $R^2= 0,1$; $R^2_{adj}= 0,05$; $P<0,13$	
(JPP été) ² *	9,6
JPP été *	0,1

Tableau 1. Résultats de l'analyse de variance des liens entre compartiments et effets marginaux des conditions environnementales et des pratiques agricoles sélectionnées. (variable X)² : effet polynomial de la variable X ; $P<0.05$: * ; $P<0.01$: ** ;

(respectivement de 30,8 kgN.ha⁻¹.an⁻¹ et de 7,1, toutes choses étant égales par ailleurs) au-delà duquel les transferts microbiens étaient réduits. De même, les variables expliquant les variations du transfert phyllosphère-trayon suivaient la hiérarchie : fertilisation organique totale (15,2%) > altitude (4,4%) ≈ pression de pâturage au printemps (4,4%). L'altitude et le niveau de fertilisation organique totale avaient un effet négatif alors que l'augmentation de la pression au pâturage tendait à favoriser le transfert. Les variables expliquant les variations du transfert trayon-lait suivaient la hiérarchie : pression de pâturage au printemps (15,4%) > traitement des trayons post-traite (10,4%) > niveau de fertilisation organique (7,7%). L'augmentation du niveau de fertilisation organique totale et le traitement des trayons post-traite tendaient à diminuer les transferts entre le trayon et le lait. *A contrario*, l'augmentation de la pression au pâturage au printemps tendait à augmenter les transferts jusqu'à un optimum de 126 jours de présence au pâturage, optimum au-delà duquel ils diminuaient. Les variations du transfert entre la phyllosphère et le lait étaient peu expliquées par des variables environnementales ou des pratiques agricoles. Seule la pression au pâturage d'été est ressortie comme importante avec un effet positif jusqu'à un optimum estimé à 177 Jours de Présence au Pâturage et un effet négatif au-delà de ce dernier, mais le modèle n'était pas significatif au seuil $P<0.05$.

3. DISCUSSION

La richesse taxonomique des procaryotes et des champignons (nombre de genres) était du même ordre de grandeur que celle observée dans la littérature pour chacun des compartiments de la prairie (sol : Karimi *et al.*, 2018 ; Fierer *et al.*, 2017, Lauber *et al.*, 2009 ; phyllosphère : Vorholt 2012). Dans le cas des trayons et du lait cru, la richesse taxonomique observée était aussi en accord avec les conclusions d'études récentes soulignant la forte diversité du microbiote du trayon et du lait cru (Falentin *et al.*, 2016 ; Fréтин *et al.*, 2019 ; Montel *et al.*, 2014) mais la gamme de variation était systématiquement plus large que celle observée dans ces études. Ceci peut s'expliquer par la diversité des modes et des matériels de préparation du trayon utilisés, deux facteurs modulant la diversité du microbiote du trayon et du lait cru (Falentin *et al.*, 2016 ; Fréтин *et al.*, 2019). Cette diversité se retrouve au niveau de la composition des communautés microbiennes, 24 à 25

phyla de bactéries et d'archées et 9 phyla de champignons ayant été observés dans chaque compartiment du *continuum* sol–phyllosphère–trayon–lait. Les phyla dominants en termes d'abondances relatives étaient similaires d'un compartiment à l'autre et en accord avec les études d'écologie microbienne des sols (Karimi *et al.*, 2018, Fierer *et al.*, 2017, Lauber *et al.*, 2009), de la phyllosphère (Vorholt 2012, Rastogi *et al.*, 2013), du trayon et du lait cru (Falentin *et al.*, 2016 ; Fréтин *et al.*, 2019 ; Montel *et al.*, 2014). L'analyse de co-occurrence a mis en évidence qu'environ 50% des genres identifiés étaient observés dans les 4 compartiments, proportions qui montaient à 60% à 70% lorsque l'on considérait les compartiments par paires. Les genres partagés appartenaient à 16 phyla de procaryotes et 9 phyla de champignons tant majoritaires que minoritaires en termes d'abondances relatives (e.g. *Plactomycetes*, *Crenarchaeota*, *Glomeromycota*, *Blastocladiomycota*). Ce fort niveau de co-occurrence a été observé dans l'étude de Fréтин *et al.* (2019) entre le trayon et le lait cru (33%) mais n'avait encore été mis en évidence ni entre le sol et la phyllosphère ni entre la phyllosphère et le trayon. Ces forts niveaux de co-occurrence entre compartiments suggèrent que des transferts de microorganismes existent au sein du *continuum* sol–phyllosphère–trayon–lait et s'appuient sur l'ensemble du microbiote. Une analyse de réseau a permis d'évaluer ces transferts. Le réseau consensus obtenu a mis en évidence des transferts forts et significatifs entre compartiments suivant le *continuum* sol–phyllosphère–trayon–lait et, de manière plus surprenante, entre la phyllosphère et le lait. Les transferts sol–phyllosphère, phyllosphère–trayon et trayon–lait sont supportés par les contacts successifs entre ces compartiments *via* les animaux ou la traite. Même si la littérature sur l'existence de ces transferts est extrêmement restreinte, différentes études ont démontré un transfert microbien entre la surface du trayon et le lait (Fréтин *et al.*, 2019, Vacheyrou *et al.*, 2011, Verdier-Metz *et al.*, 2012). L'existence d'un transfert phyllosphère–lait est moins triviale, ces compartiments n'étant pas en contact direct. On peut supposer qu'il s'agisse d'un artefact, le nombre de genres co-occurants uniquement entre la phyllosphère et le lait étant très faible (procaryotes : 17 genres, champignons : 1 genre) par rapport au nombre de genres partagés par la phyllosphère, le trayon et le lait (procaryotes : 724 genres, champignons : 364 genres). Le transfert phyllosphère–lait ne refléterait donc que la succession de transferts entre la phyllosphère, le trayon et le lait. Les réseaux construits à l'échelle de chaque ferme ont permis d'étudier les filtres environnementaux et les pratiques agricoles faisant varier les transferts microbiens entre compartiments. Les transferts sol–phyllosphère étaient sensibles à la composition de la communauté végétale (richesse spécifique et proportion de graminées), au pH du sol et au niveau de fertilisation organique, un ensemble de filtres entrant dans la définition des niches écologiques des communautés microbiennes des sols et/ou de la phyllosphère (Terrat *et al.*, 2017 ; Karimi *et al.*, 2018 ; Vorholt 2012). L'augmentation de la diversité végétale augmente la diversité des niches écologiques pour les microorganismes au niveau de la phyllosphère (Vorholt 2012). Ainsi, elle peut favoriser les transferts microbiens en permettant l'établissement et le maintien de genres microbiens notamment issus du sol au niveau des feuilles. Le pH du sol est une composante incontournable des niches écologiques pour les microorganismes du sol (Fierer *et al.*, 2006 ; Terrat *et al.*, 2017), son augmentation induisant une augmentation de la biodiversité microbienne du sol jusqu'à un optimum de 7,5 à 8. Cette augmentation de biodiversité microbienne associée à une diversité végétale accrue permettrait de favoriser l'implantation au niveau de la phyllosphère d'un nombre plus important de genres microbiens du sol, favorisant ainsi les transferts de microorganismes du sol vers la phyllosphère. La fertilisation organique des prairies module directement la composition des communautés microbiennes des sols et de la

phyllosphère (Nacke *et al.*, 2011 ; Vorholt 2012) et la diversité floristique des prairies (Mauchamp *et al.*, 2016 ; Chytrý *et al.*, 2009). Pour des niveaux de fertilisation modérés, elle augmente la diversité floristique et peut rendre accessibles des ressources pour une plus grande diversité de microorganismes du sol. Par ce biais, elle augmente le nombre de niches écologiques pour les microorganismes dans le sol et dans la phyllosphère et donc les transferts microbiens. A des niveaux de fertilisation élevés, elle peut favoriser certaines espèces végétales nitrophiles ou certains groupes microbiens et ainsi réduire la biodiversité microbienne et les transferts microbiens entre le sol et la phyllosphère. Cette hypothèse permettrait également d'expliquer l'effet négatif de la fertilisation organique sur les transferts microbiens phyllosphère-trayon. En réduisant la biodiversité microbienne de la phyllosphère, l'empreinte de cette dernière au niveau du microbiote du trayon serait diminuée. A cet effet de la fertilisation organique s'ajoute ceux de la pression au pâturage au printemps et de l'altitude. L'augmentation de la pression au pâturage au printemps tend à favoriser les contacts entre la phyllosphère et le trayon et donc l'ensemencement du trayon par la surface de l'herbe. Elle augmenterait ainsi l'empreinte du microbiote de la phyllosphère sur celui du trayon, une hypothèse supportée par d'autres études montrant des modifications du microbiote du trayon lorsque les animaux passent plus de temps à la pâture (Fretin et al 2019). *A contrario*, l'augmentation de l'altitude tend à repousser la date de mise à l'herbe et donc à réduire la pression au pâturage au printemps et le contact entre l'herbe et le trayon. L'intensité des transferts microbiens trayon-lait était affectée négativement par le traitement des trayons post-traité. Les matières actives utilisées (bactéricide ou bactériostatique ; Falentin *et al.*, 2016) et leur rémanence peuvent limiter le réensemencement du trayon lors du retour des animaux à la parcelle et donc le transfert de microorganismes depuis le trayon vers le lait cru. Les autres variables identifiées dans le transfert Trayon-lait étaient le niveau de fertilisation organique et la pression au pâturage au printemps. L'augmentation de la fertilisation organique peut réduire la biodiversité microbienne de la phyllosphère et par conséquent l'ensemencement du trayon. Suite à cela, la diversité microbienne potentiellement transférée vers le lait cru serait réduite. L'effet de la pression au pâturage au printemps présente un optimum au-delà duquel les transferts microbiens diminuent. Ceci paraît contradictoire puisqu'elle favorise les transferts phyllosphère-trayon mais pourrait refléter l'effet du temps de présence des animaux sur la parcelle. En effet, à pression au pâturage égale, les grands troupeaux passeront moins de temps sur la parcelle que les petits, réduisant ainsi l'ensemencement du trayon par contact et les transferts trayon-lait.

CONCLUSION

En mettant en évidence des liens forts au sein du *continuum* sol – phyllosphère – trayon – lait, cette étude vient poser les bases d'une chaîne de causalité sous tendant le lien entre un

produit, ici le Comté AOP, et son terroir de production. Elle s'appuie sur des transferts microbiens depuis la prairie vers le lait cru sensibles aux pratiques agricoles. Elle pourrait servir de base pour identifier un compromis entre typicité du produit et performance du système de production

Les auteurs remercient les éleveurs de l'AOP Comté pour leur implication tout au long du projet. Ils remercient également les financeurs de cette étude : le Comité Interprofessionnel de Gestion du Comté et l'ANR au travers de l'appel à projet I-SITE Bourgogne-Franche-Comté

- Bouton Y., Buchin S., Duboz G., Pochet S., Beuvier E., 2009. Food Microbiol. 129: 183-191
 Chytrý M., Hejčman M., Hennekens S.M., Schellberg J., 2009. App. Veg. Sci. 12: 167–176.
 Coolon J.D., Jones K.L., Todd T.C., Blair J.M., Herman M.A., 2013. PLoS ONE 8: e67884
 Falentin H., Rault L., Nicolas A., Bouchard D. S., Lassalas J., Lambertson P., Aubry J.-M., Marnet P.-G., LeLoir Y., Even S., 2016. Frontiers in microbiology, 10.3389/fmicb.2016.00480
 Fierer N., Jackson R.B., 2006. Proc. Nat. Acad. Sci. of the United States of America. 103: 626-631.
 Fierer N., 2017. Nat. Rev. Microbiol. : 10.1038/nrmicro.2017.87
 Frétin, M., Martin, B., Rifa, E., Verdier-Metz I., Pomiès D., Ferlay A., Montel M.C., Delbès C., 2019 *Sci Rep.* 8 : 200
 Gysi, D., Voigt, A., Fragoso, T., Eivind Almaas E. Nowick K., 2018. BMC Bioinformatics 19, 392
 Karimi B., Terrat S., Dequiedt S., Saby N. P. A., Horrigue W., Lelièvre M., Nowak V., Jolivet C., Arrouays D., Wincker P., Cruaud C., Bispo A., Maron P.-A., Chemidlin Prévost-Bouré N., Ranjard L., 2018 Sci. Adv. 4 : 7
 Lauber C.L., Strickland M.S., Bradford M.A., Fierer N., 2008. Soil Biol. Biochem. 40: 2407-2415.
 Mauchamp L., Mouly A., Badot P.M., Gillet F., 2016. App. Veg. Sci., 19, 2: 206-217.
 Monnet J.C., Berodier F., Badot P.M., 2000. J Dairy Sci. 83, 1632-1704.
 Montel, M.-C., Buchin S., Mallet A., Delbes C., Vuitton D. A., Desmasures N., Berthier F., 2014. International Journal of Food Microbiology 177, 136–54.
 Nacke H., Thürmer A., Wollherr A., Will C., Hodac L., Herold N., Schöning I., Schrupf M., Daniel R., 2011. PLoS ONE 6: e17000.
 Rastogi G., Coaker G.L., Leveau J.H.J., 2013. FEMS Microbiol. Lett. 348: 1- 10.
 Tardy V., Mathieu O., Leveque J., Terrat S., Chabbi A., Lemanceau P., Ranjard L., Maron P.A., 2014. Environ. Microbiol. Rep. 6: 173-183.
 Terrat S., Horrigue W., Dequiedt S., Saby N. P. A., Lelièvre M., Nowak V., Tripied J., Reignier T., Jolivet C., Arrouays D., Wincker P., Cruaud C., Karimi B., Bispo A., Maron P.-A., Chemidlin Prévost-Bouré N., Ranjard L., 2017, Plos One, 10.1371/journal.pone.0186766
 Toyota K., Kuninaga S., 2006. Appl. Soil Ecol. 33: 39-48.
 Vacheyrou M., Normand A.C., Guyot P., Cassagne C., Piarroux R., Bouton Y., 2011. Int. J. Food Microbiol. 146, 253-262.
 Verdier-Metz I., Gagne G., Bornes S., Monsallier F., Veisseire P., Delbès-Paus C., Montel M.C., 2012. Appl. Environ. Microbiol. 78, 326-333.
 Vorholt J.A., 2012. Nat. Rev. Microbiol. 10: 828-840.

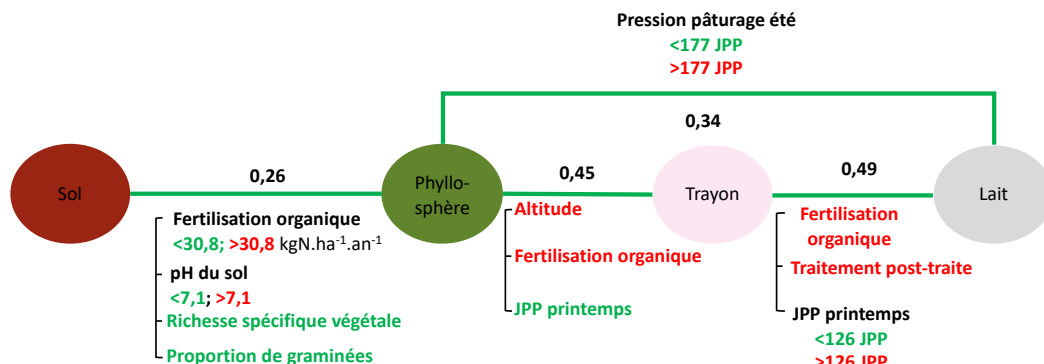


Figure 2. Réseau consensus des transferts microbiens dans le *continuum* sol -phyllosphère -trayon – lait. Les valeurs en gras correspondent aux coefficients de corrélation pondérés. Les variables influençant les transferts sont identifiées sous chacun d'eux : effet positif : vert, effet négatif : rouge, effet d'optimum : noir. JPP : Journées de Présence au Pâturage.