



**HAL**  
open science

# Écosystèmes microbiens des laits crus : Un trésor et un challenge pour le fromager

Sylvie Lortal

► **To cite this version:**

Sylvie Lortal. Écosystèmes microbiens des laits crus : Un trésor et un challenge pour le fromager. Séance de l'Académie d'agriculture de France "Fromage au lait cru - L'alliance subtile du patrimoine, de la microbiologie et de la santé publique", Mar 2014, Paris, France. hal-01209581

**HAL Id: hal-01209581**

**<https://hal.science/hal-01209581v1>**

Submitted on 5 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Ecosystèmes microbiens des laits crus : un trésor et un challenge pour le fromager

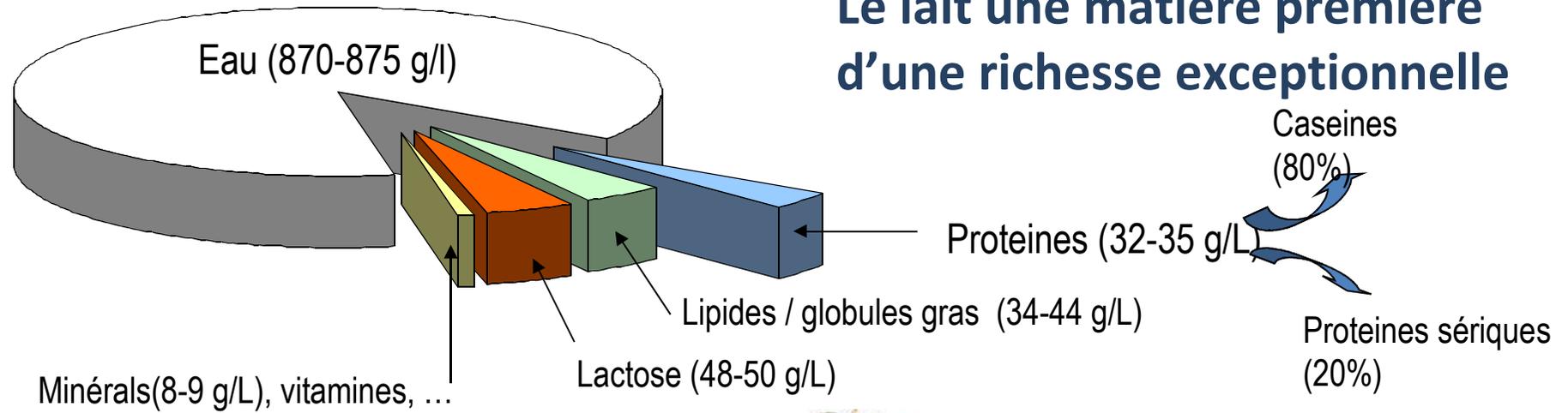
Sylvie Lortal

5 mars 2014



MILK : AN INFINITE SOURCE FOR INNOVATION

## Le lait une matière première d'une richesse exceptionnelle



**pH neutre**  
**aW élevée**

**qui n'est pas faite pour se retrouver à l'air libre....**



**« stérile » mais se contamine donc rapidement par les microorganismes environnants**



**MILK : AN INFINITE SOURCE FOR INNOVATION**

Salque M.  
et al., Nature,  
2012

-6000 ans

Croisades & Moines  
Femmes &  
diversification  
100 % de fromages  
à partir de lait cru



Héritage gastronomique et  
culturel précieux

1ère AOC



1925

Monde

0-100% (PVD)

France

15% des  
fromages  
au lait « cru »

JC

1673



1861

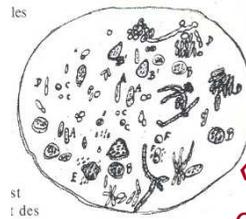
Pasteurisation

µbio pasteurienne

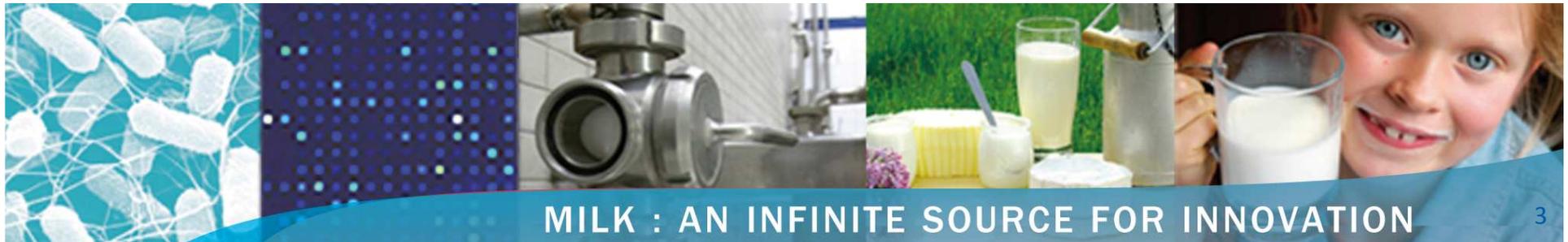


1990 - 2014

Révolution :  
écologie  
moléculaire



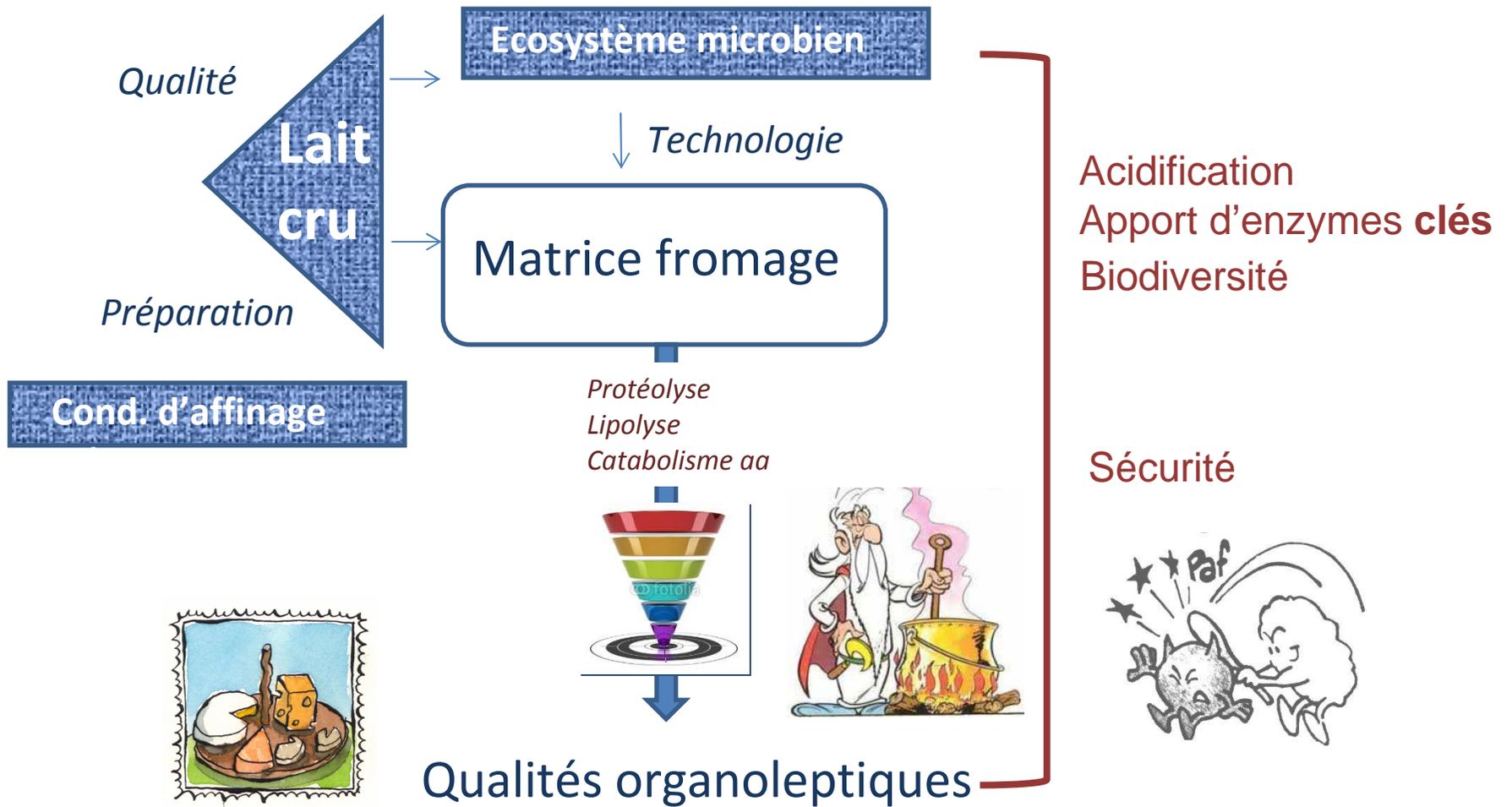
« les responsables de la fermentation semblent être de petits  
corps en forme de filaments »



MILK : AN INFINITE SOURCE FOR INNOVATION

# Pourquoi un trésor ?!

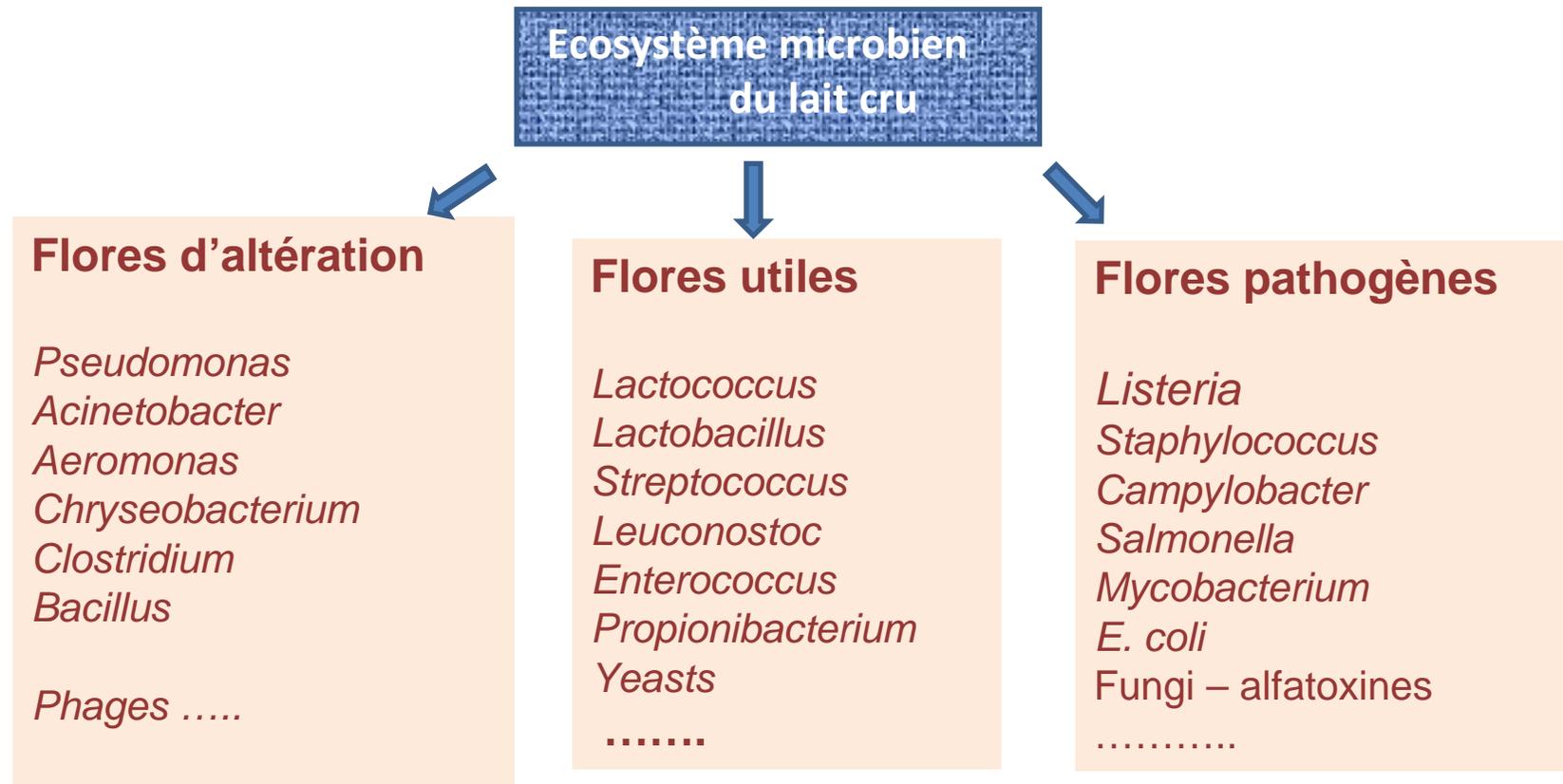
## Zéro levain !



MILK : AN INFINITE SOURCE FOR INNOVATION

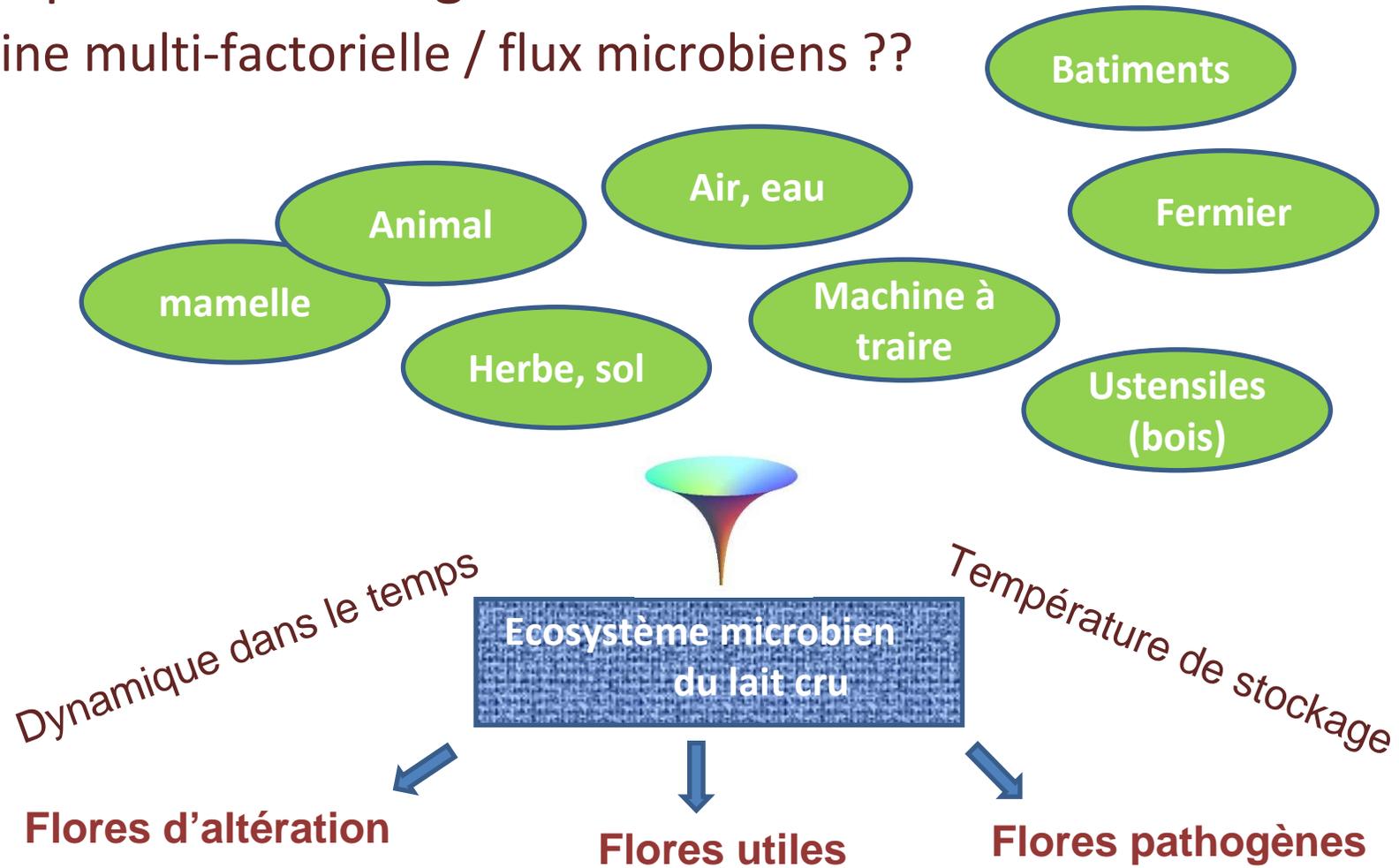
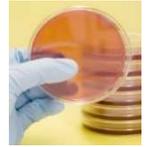
# Pourquoi un challenge ?

## Pas que des flores utiles + biodiversité espèces / souches



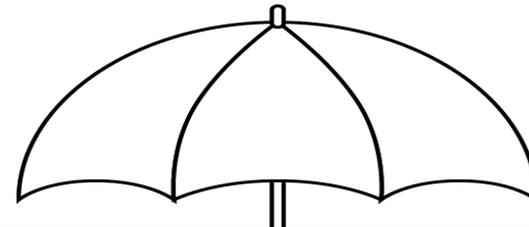
# Pourquoi un challenge ?!

Origine multi-factorielle / flux microbiens ??



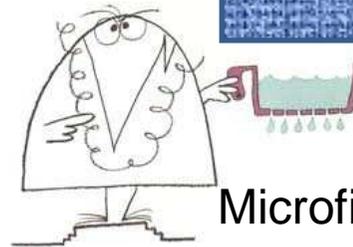
Devant tant d'incertitudes, d'absence de contrôle.....  
devant une pression médiatique croissante / sécurité....  
devant les changements d'échelle qu'impose l'industrialisation...

Accroissement  
drastique de l'hygiène

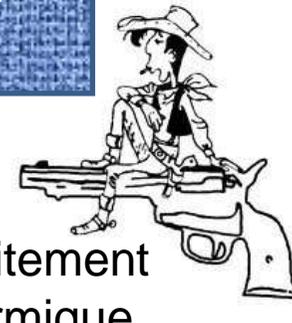


Ecosystème microbien  
du lait cru

Lait cru < 50 000/ml  
Perte d'un log en 15ans\*



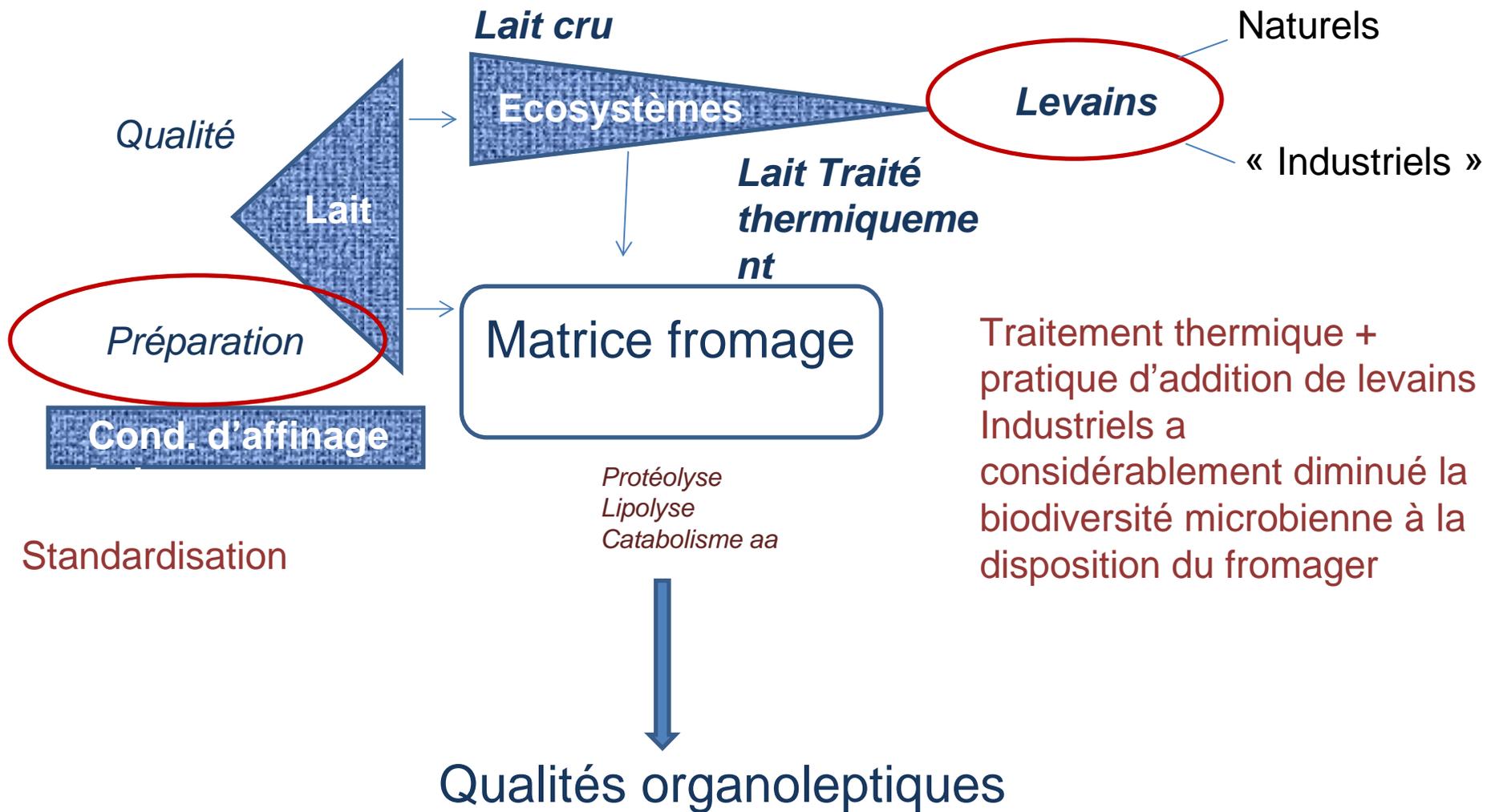
Microfiltration



Traitement  
thermique



MILK : AN INFINITE SOURCE FOR INNOVATION



Jusque dans les années 1990-2000 .....

Toutes les connaissances concernant les microorganismes du lait cru et les fromages qui en sont issus étaient obtenues par méthodes dite “culture dépendante”

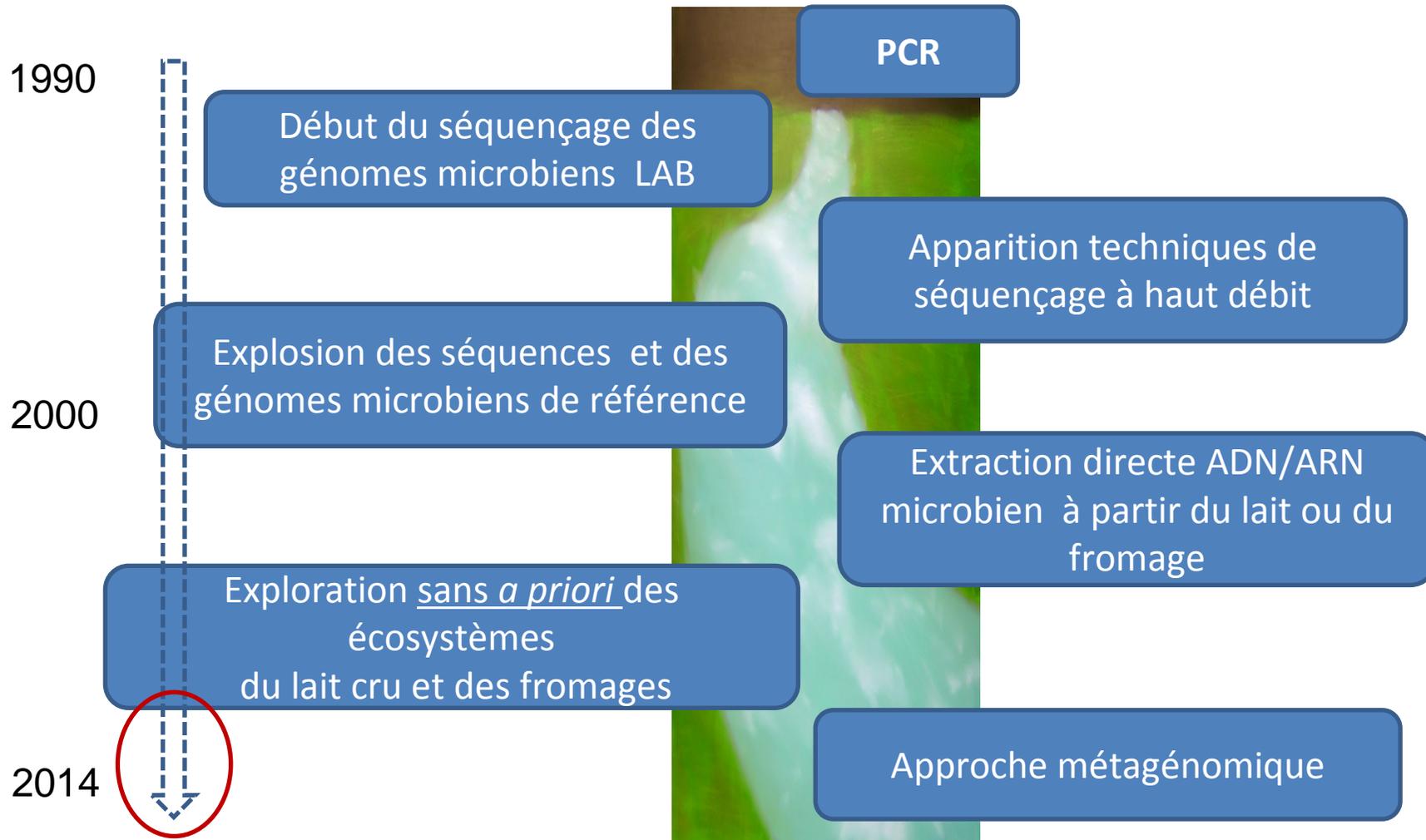
Soit 125 ans de microbiologie pour l’essentiel Pasteurienne

- **Bonne connaissance des flores utiles du lait cru, bactériennes surtout**
- **Bonne connaissance des flores pathogènes du lait cru**
- **Quelques connaissances sur flores d’altération**

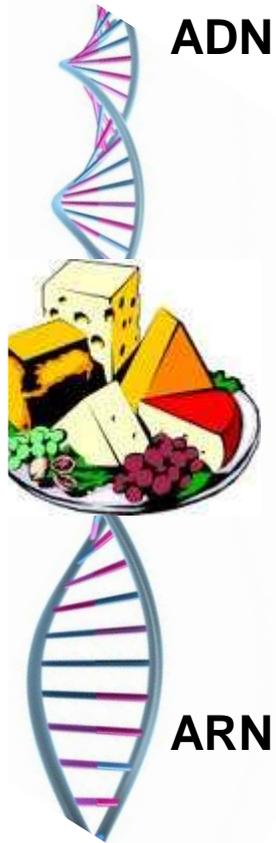
**Bien peu au final sur “l’écosystème”  
microbien du lait cru**



# Approches moléculaires directes - une révolution



# Quels outils aujourd'hui ?



## Amplicons ADNr 16S-23S

séparation par TTGE, DDGE, SSCP  
pré-identification par bandes de référence  
identification par séquençage de bandes

intéressant – comparaison échantillons  
mais sensibilité et précision imparfaite

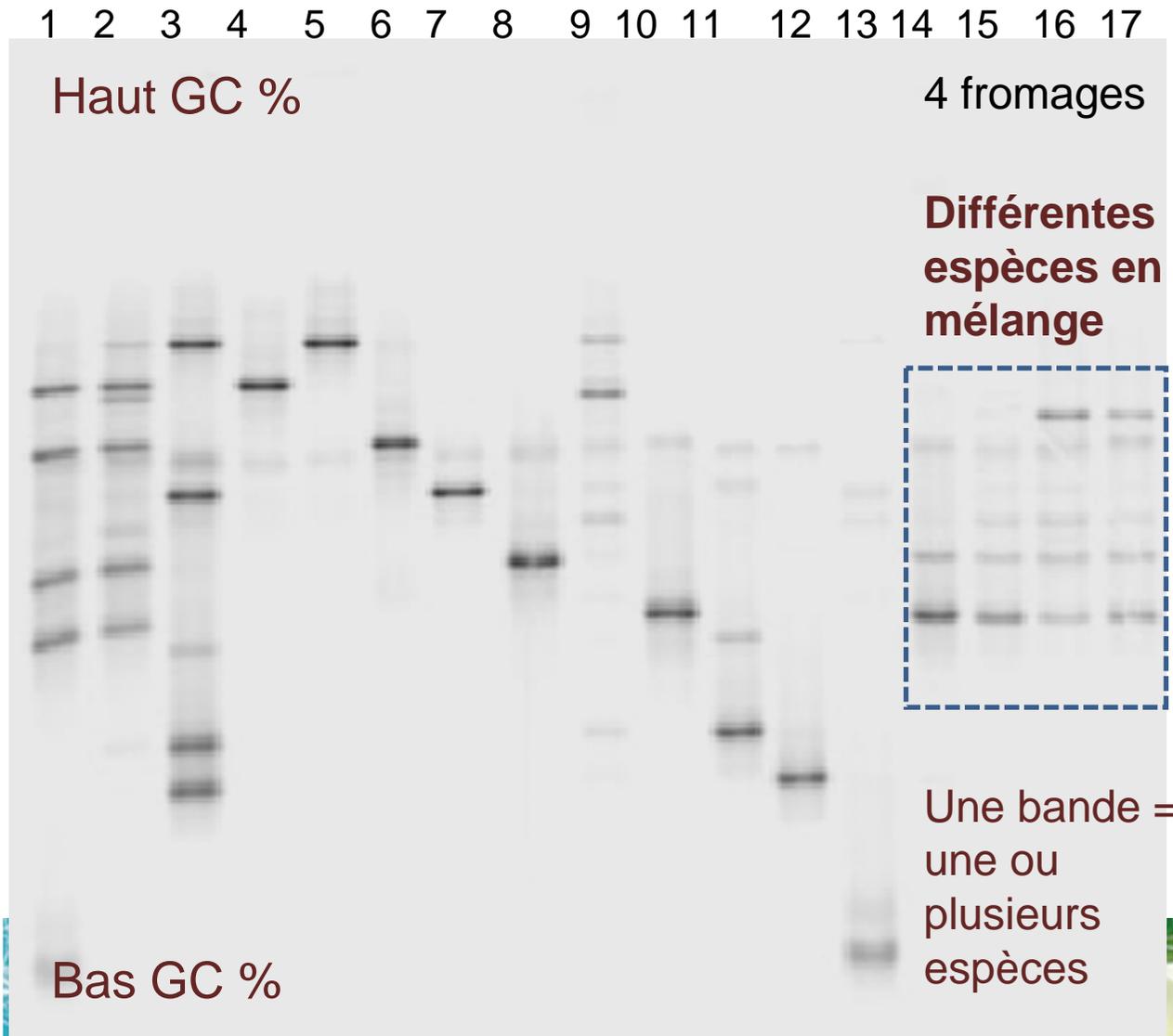
**Métagénomique** Séquençage à haut débit et identification via séquences de référence (database) – grand nombre d'échantillons possibles (code barre) – Pyroséquençage - « Targeted » métagénomique.

**Métatranscriptomique** quelles espèces sont les plus actives métaboliquement ? Quels gènes exprimés ?



# Migration de fragments d'ADN amplifiés en TTGE

Parayre et al., 2007



1- *Lb. helveticus*, *Strep. thermophilus*, *Lac. lactis*, *L. fermentum*, *P.freuderechii*

2- *Lb. helveticus*, *Strep. thermophilus*, *Lac. lactis*, *L. fermentum*, *Leuconostoc*

3-*Lb.paracasei*, *Lb. reuteri*, *Lb. plantarum*, *Ent. faecalis*

4- *Lb. fermentum*

5- *Lb. plantarum*

6- *Lb. helveticus*

7- *Ent. faecalis*

8-*Lc. lactis*

9- *Leuconostoc*

10- *Strep. thermophilus*

11- *Lb. reuteri*

12- *Lb.paracasei*

13-PF

14- Fromage Prato A

15-Fromage Prato B

16- Fromage Prato C

17- Fromage Prato D



Détection des espèces dominantes – profondeur 1 /100<sup>e</sup>

Identification présumée MAIS +++ pour comparer échantillons

# Illustrations récentes



- Ecosystèmes lait cru d'une exploitation sur un an
- Importance des pratiques de traite
- Importance des ustensiles en bois
- Lait cru et fromages – ANR Food microbiome



## Exemple 1 : Biodiversité bactérienne de laits crus observée par clonage et séquençage des ADNr 16S



Analyse intra exploitation (expérimentale caprine) sur un an  
118 échantillons de lait cru

### Grande diversité de populations microbiennes

- 7 espèces de bactéries lactiques
- 27 espèces de bactéries non lactiques Gram positives
- 13 espèces de bactéries Gram négatives
- 11 espèces de levures

Surprises ? Coryne, gram-négatives, halophiles !

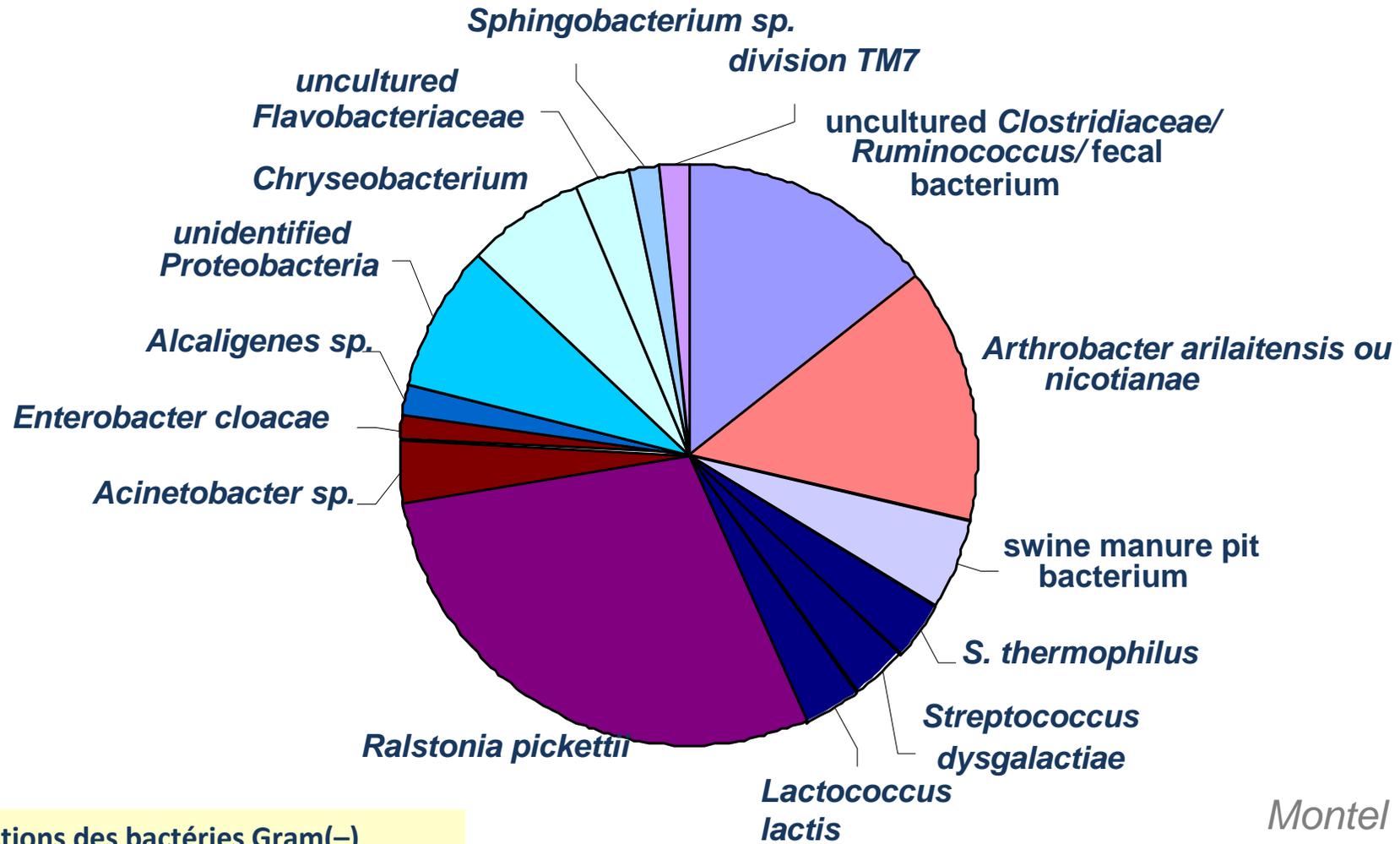
**Changement des profils microbiens** ( bactéries – levures) en fonction des saisons associés à **des changements d'alimentation**, de volume de production de lait ...

### Changement ponctuel à l'intérieur d'une saison

Montel MC – INRA Aurillac

Danish raw milks / Masoud et al., **2012** –Food Microbiol., 25.

Lait de vache – séquençage haut débit : 256 espèces microbiennes



Montel M-C /  
Callon - 2007

Questions des bactéries Gram(-)  
3 articles en 2012



MILK : AN INFINITE SOURCE FOR INNOVATION

# Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk ?

Verdier –Metz et al. **2009** –Food Microbiol., 25.

## OUI !!!

67 laits crus / savoie et Haute savoie

Analyse SSCP

**Facteurs : pratiques hygiéniques / trayon et / machine à traire**

3 groupes de Laits crus par SSCP, seulmt 2 dominés par bactéries lactiques

*Écho à Michel et al. 2001 via méthodes cultures dépendantes ... « la flore microbienne des laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production ».*



MILK : AN INFINITE SOURCE FOR INNOVATION

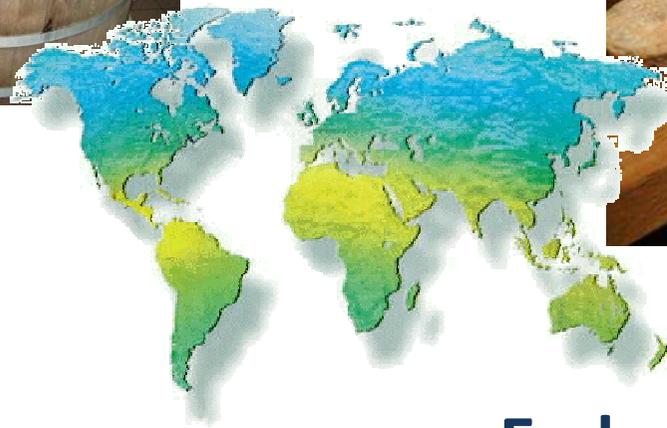
# Exemple 2 : Biodiversité microbienne apportée par les systèmes traditionnels tels que outils en bois en contact avec le lait cru



**Cuves**



**Planches**



**Emballage**

**Vacherin Mont d'or**

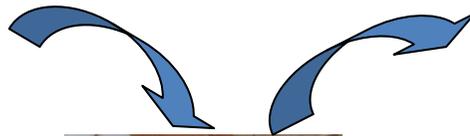




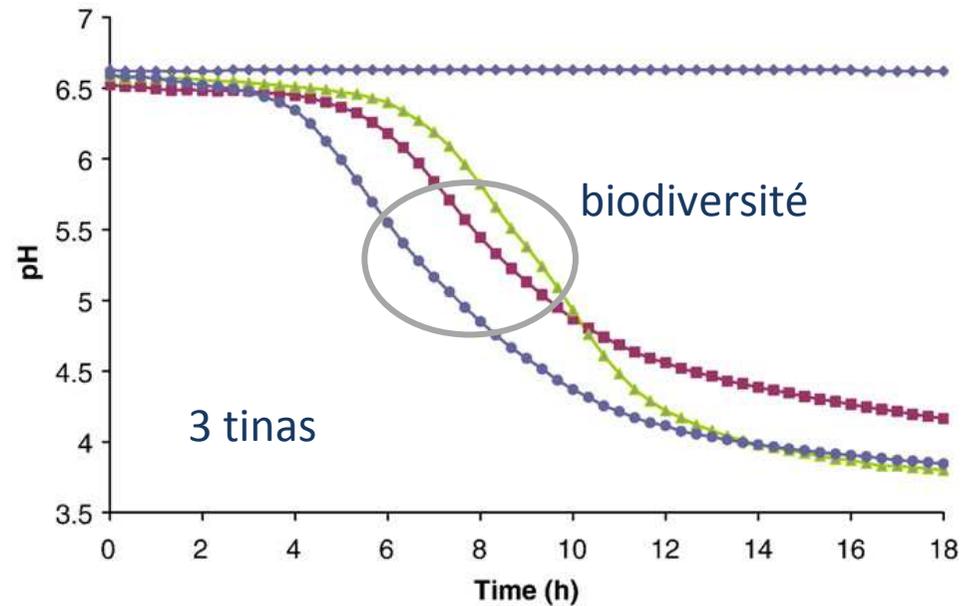
# Rôle technologique majeur de ce biofilm lactique

Acidification spontanée 37°C (CINAC)

Lait stérile

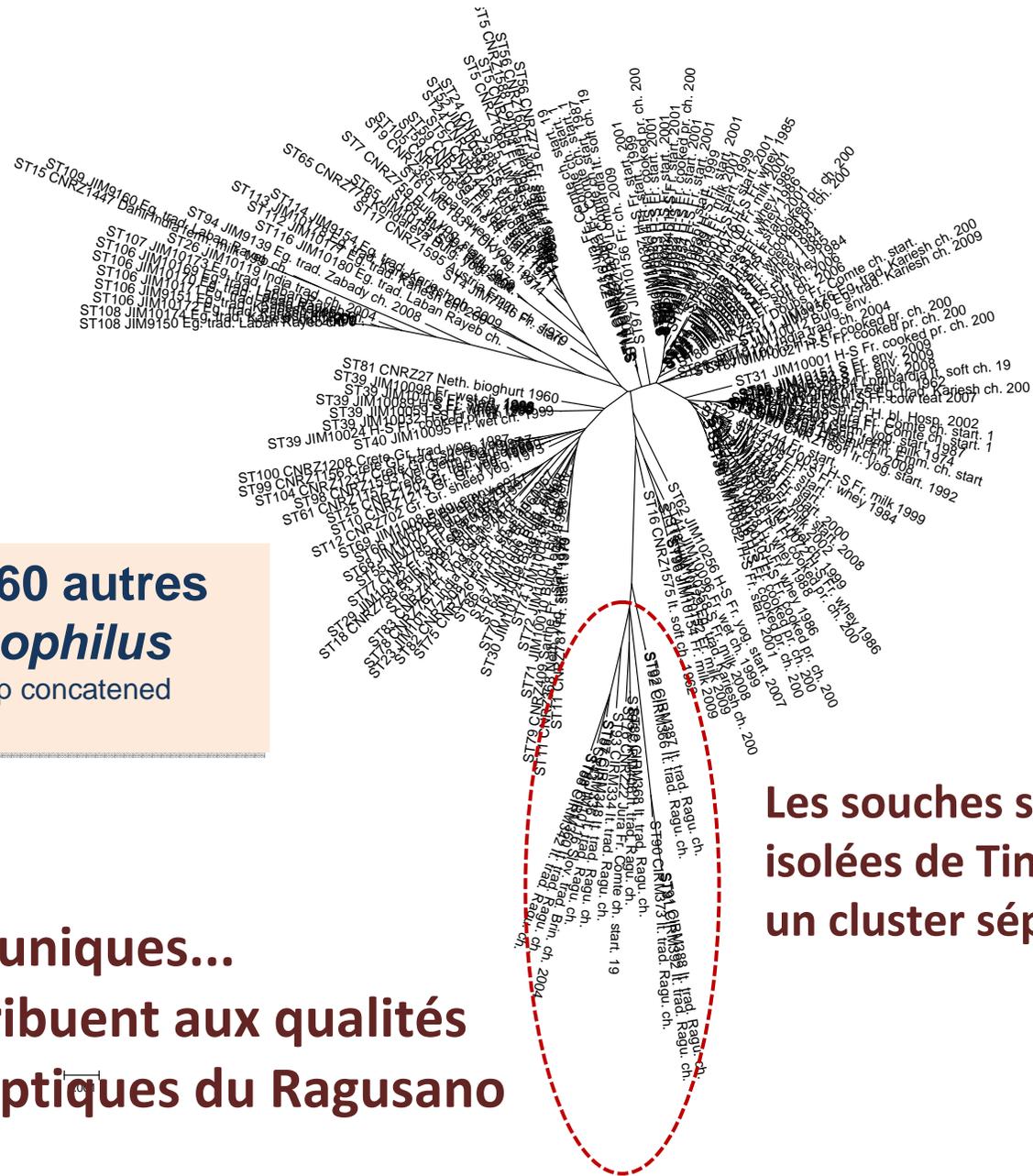


Lait après 10 min de contact /  
ensemencement LAB par biofilm surface



*Salers en 2011 idem*  
*Caciocavallo en 2012 idem*

# Unpublished data

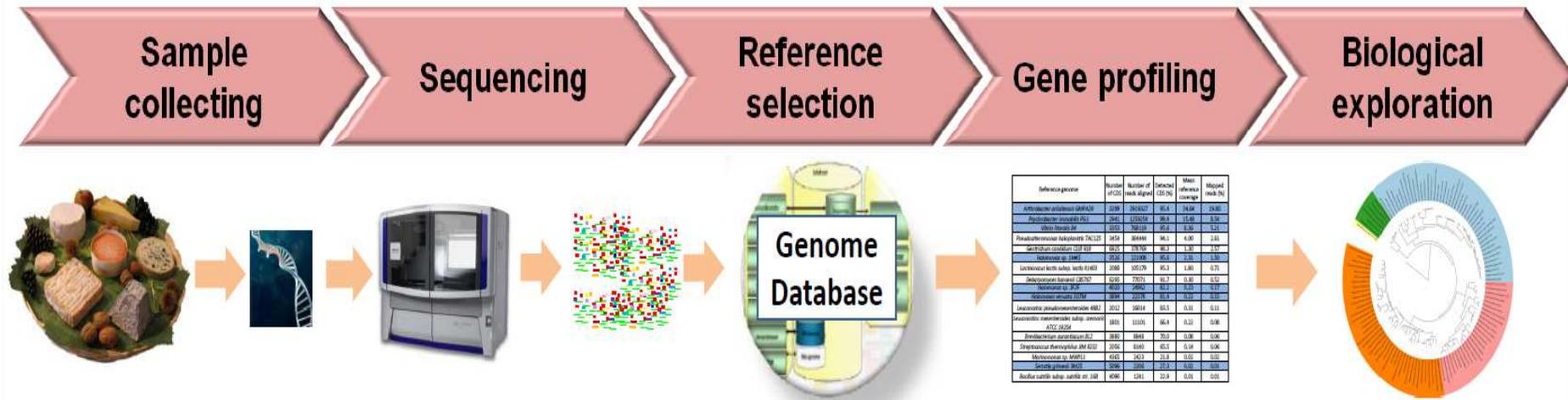


**Comparaison avec 160 autres souches de *S. thermophilus***  
Neighbour-joining tree from 2.943-bp concatenated sequences (bootstrap values 98%)

**Souches uniques... qui contribuent aux qualités organoleptiques du Ragusano**

**Les souches siciliennes isolées de Tina forment un cluster séparé...**

# Exemple 3 : Short-read whole shotgun séquençage des fromages Food Microbiome (ANR 2009-2013)



- 120 génomes d'espèces fromagères séquencées (souches référence)
- **40 fromages français analysés**
- Spécificité : short-reads (haut débit / cout)



## Exemple: un fromage à croûte lavé (à partir de lait pasteurisé)

Reference genome	Number of CDS	Number of reads aligned
<i>Arthrobacter arilaitensis</i> GMPA29	3299	2919327
<i>Psychrobacter immobilis</i> PG1	2941	1259254
<i>Vibrio litoralis</i> B4	3353	768119
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> TAC125	3454	384444
<i>Geotrichum candidum</i> CLIB 918	6925	378769
<i>Halomonas</i> sp. 1M45	3526	221008
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Il1403	2088	105179
<i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767	6295	77071
<i>Halomonas</i> sp. 3F2F	4020	24962
<i>Halomonas venusta</i> 3D7M	3894	22378
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> 4882	2012	16014
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC 19254	1801	11101
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> BL2	3880	8848
<i>Streptococcus thermophilus</i> JIM 8232	2056	8140
<i>Marinomonas</i> sp. MWYL1	4365	2423
<i>Serratia grimesii</i> 3M25	5096	2206
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	4090	1241

35x coverage of this genome, with 99.5% perfect matches!

- Biodiversité large due à des souches non inoculées (house-microflora)
- Présence de groupes microbiens et faiblement caractérisés
- quantification de population subdominante 1/ 100000
- Présence de lectures non assignées (e.g. ~30%) → groupes microbiens encore inconnus ??

Quigley, L. et al., Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 2011, 150 (2-3), 81-94.

Quigley, L. et al. High-Throughput Sequencing for Detection of Subpopulations of Bacteria Not Previously Associated with [62]Artisanal Cheeses. *Applied and Environmental Microbiology* **2012**, 78 (16), 5717-5723

**Quigley et al., 2013. The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiol. Rev., 37. 664**



**MILK : AN INFINITE SOURCE FOR INNOVATION**

*Chambers et al.* / Effect of milk pasteurisation on flavor properties of seven commercially available french cheese types . *Journal of Sensory Studies* **2010**, 25 (4), 494-511

*Franciosi, et al.*, Microbial analysis of raw cows' milk used for cheese-making: influence of storage treatments on microbial composition and other technological traits. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **2011**, 27 (1), 171-180.

[8-12-18C et écrémage - DDGE ]

*Arcuri et al.* / Determination of cheese origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacteria communities by PCR-DGGE: Preliminary application to traditional Minas cheese. *Food Control* **2013**, 30 (1), 1-6.

[résultats prometteurs ]



*Lavoie, et al.*, Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Science & Technology* **2012**, 92 (5), 455-468.

*Masoud, W. et al.*, The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *International Journal of Food Microbiology* **2012**, 153 (1-2), 192-202.

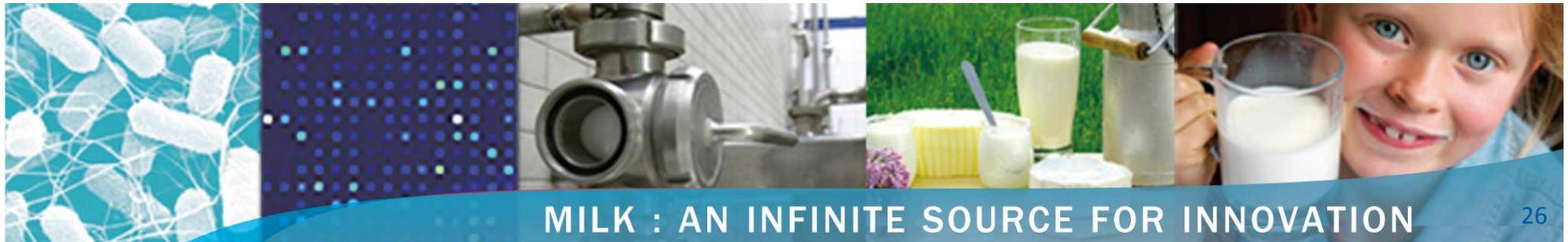
*Monsallier, F. et al.* Variability of microbial teat skin flora in relation to farming practices and individual dairy cow characteristics. *Dairy Science & Technology* **2012**, 92 (3), 265-278.

**A suivre !!!!! 😊.....**



# Ecosystèmes des laits crus – conclusions

- Une biodiversité insoupçonnée / à préserver / potentiel innovation[CRB]
  - Lien +++ avec qualités organoleptiques
  - Robustesse et gratuité
- Un « coaching » possible via pratiques d'élevage ???.... Grâce aux nouveaux outils moléculaires ? Vers une hygiène mieux raisonnée ?
- Quid effet santé d'une consommation régulière de flores diversifiées ?
- Réduction des allergies
  - Apport de vitamines et de micronutriments
  - Digestibilité
  - Impact sur équilibre de la flore intestinale
- .....Dans un contexte d'appauvrissement général de la biodiversité microbienne des aliments fermentés ?



# Conclusion générale



Vive la biodiversité microbienne !

**Merci de votre attention !**



**MILK : AN INFINITE SOURCE FOR INNOVATION**