



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

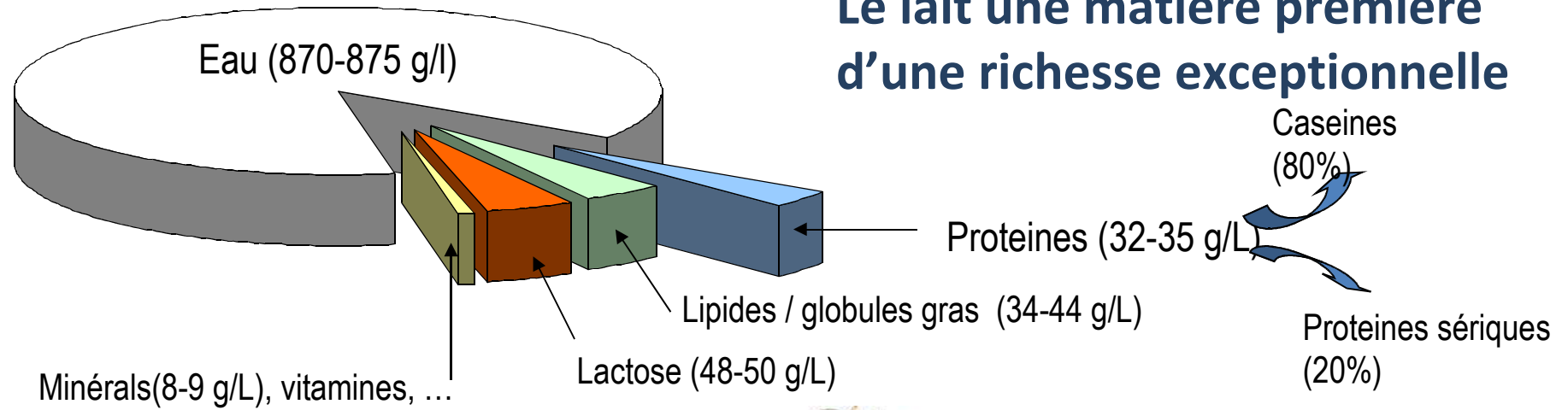
Sylvie Lortal

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

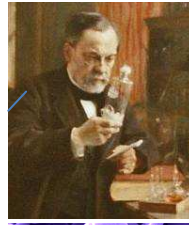
0-100% (PVD)

France

15% des
fromages
au lait « cru »

JC

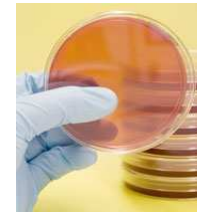
1673



1861

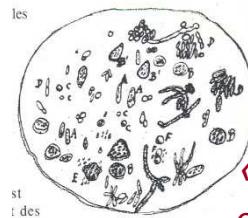
Pasteurisation

µbio pasteurienne



1990 - 2014

Révolution :
écologie
moléculaire



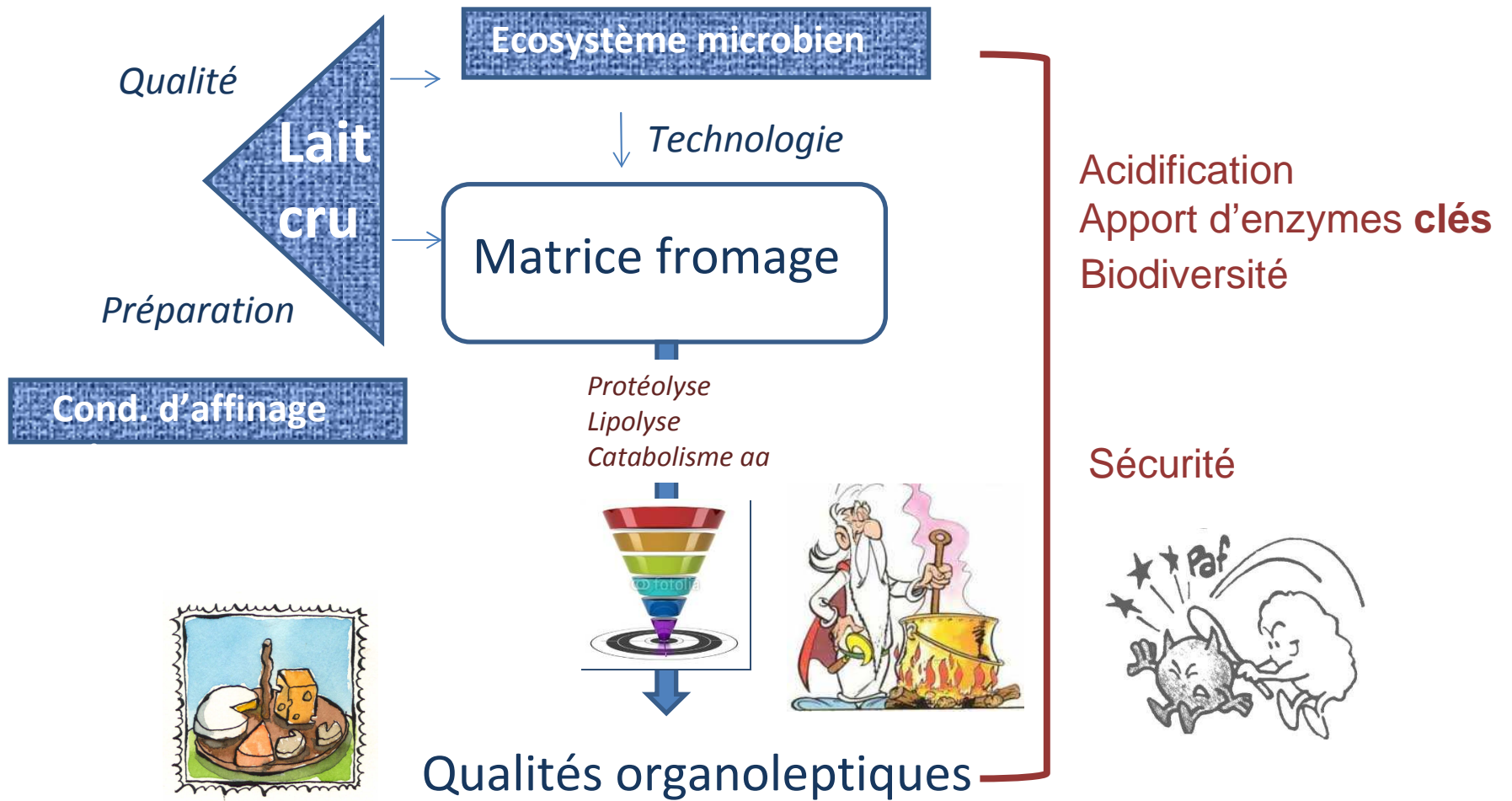
*« les responsables de la fermentation semblent être de petits
corps en forme de filaments »*



MILK : AN INFINITE SOURCE FOR INNOVATION

Pourquoi un trésor ?!

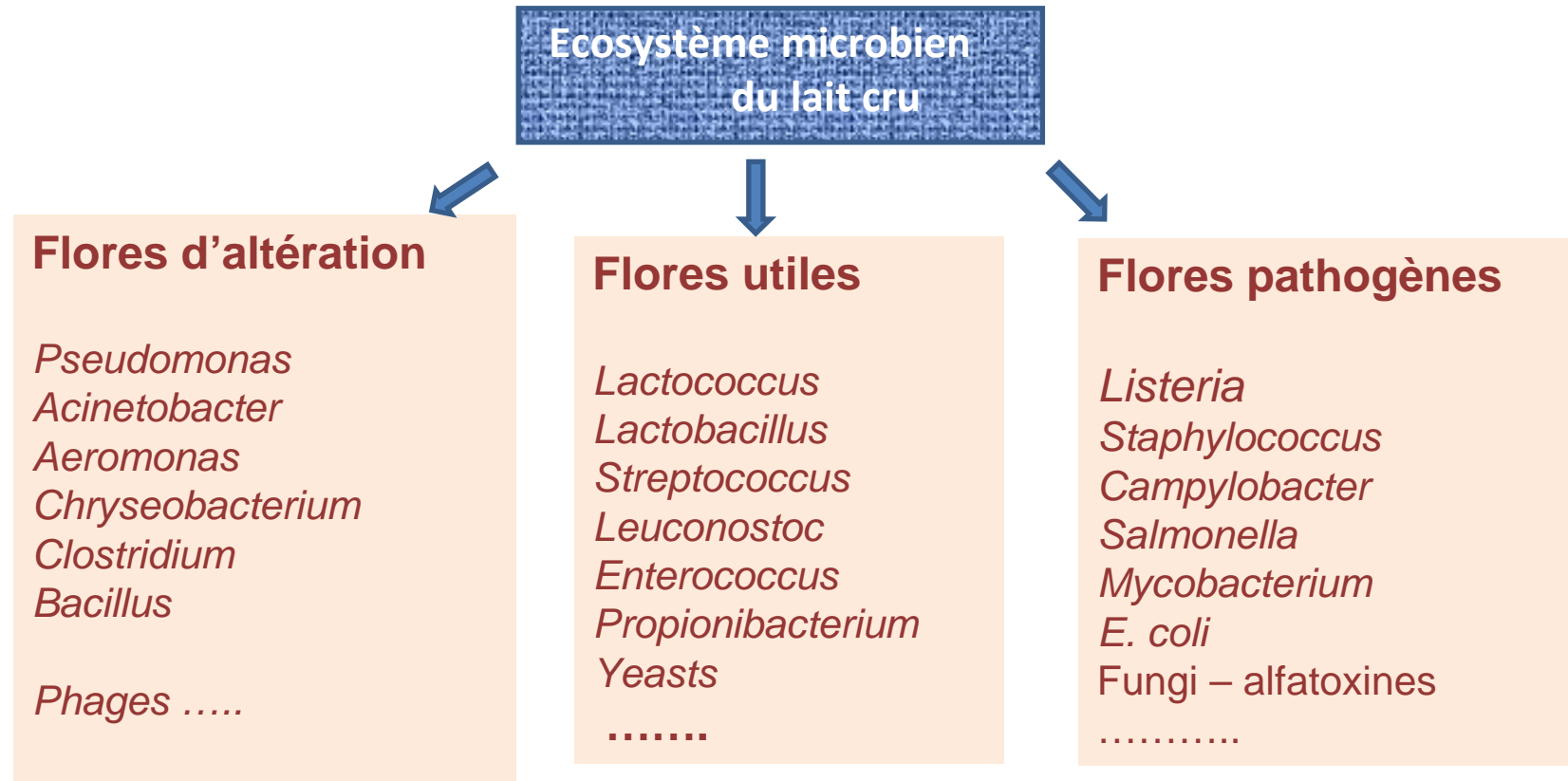
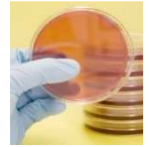
Zéro levain !



MILK : AN INFINITE SOURCE FOR INNOVATION

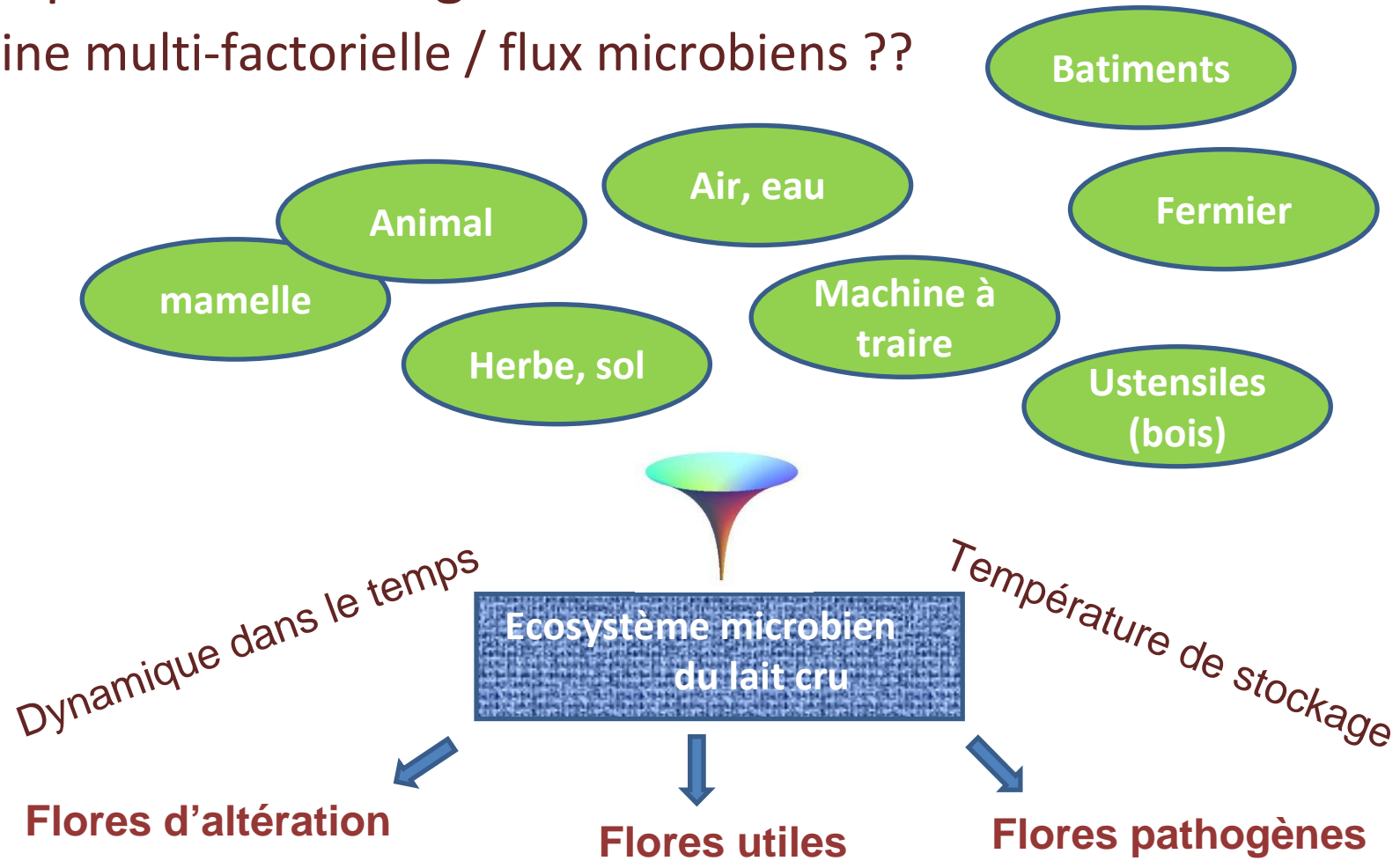
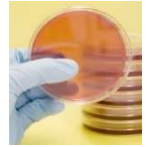
Pourquoi un challenge ?

Pas que des flores utiles + biodiversité espèces / souches



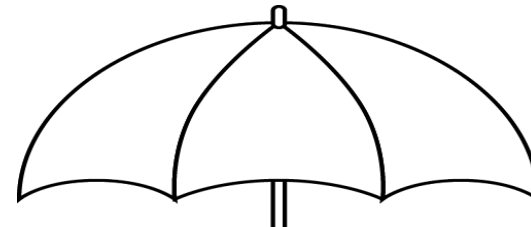
Pourquoi un challenge ?!

Origine multi-factorielle / flux microbiens ??



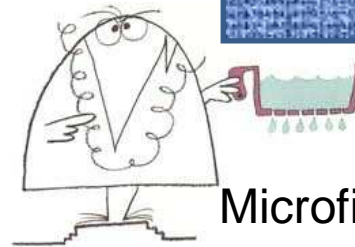
Devant tant d'incertitudes, d'absence de contrôle.....
devant une pression médiatique croissante / sécurité....
devant les changements d'échelle qu'impose l'industrialisation...

Accroissement
drastique de l'hygiène



Ecosystème microbien
du lait cru

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



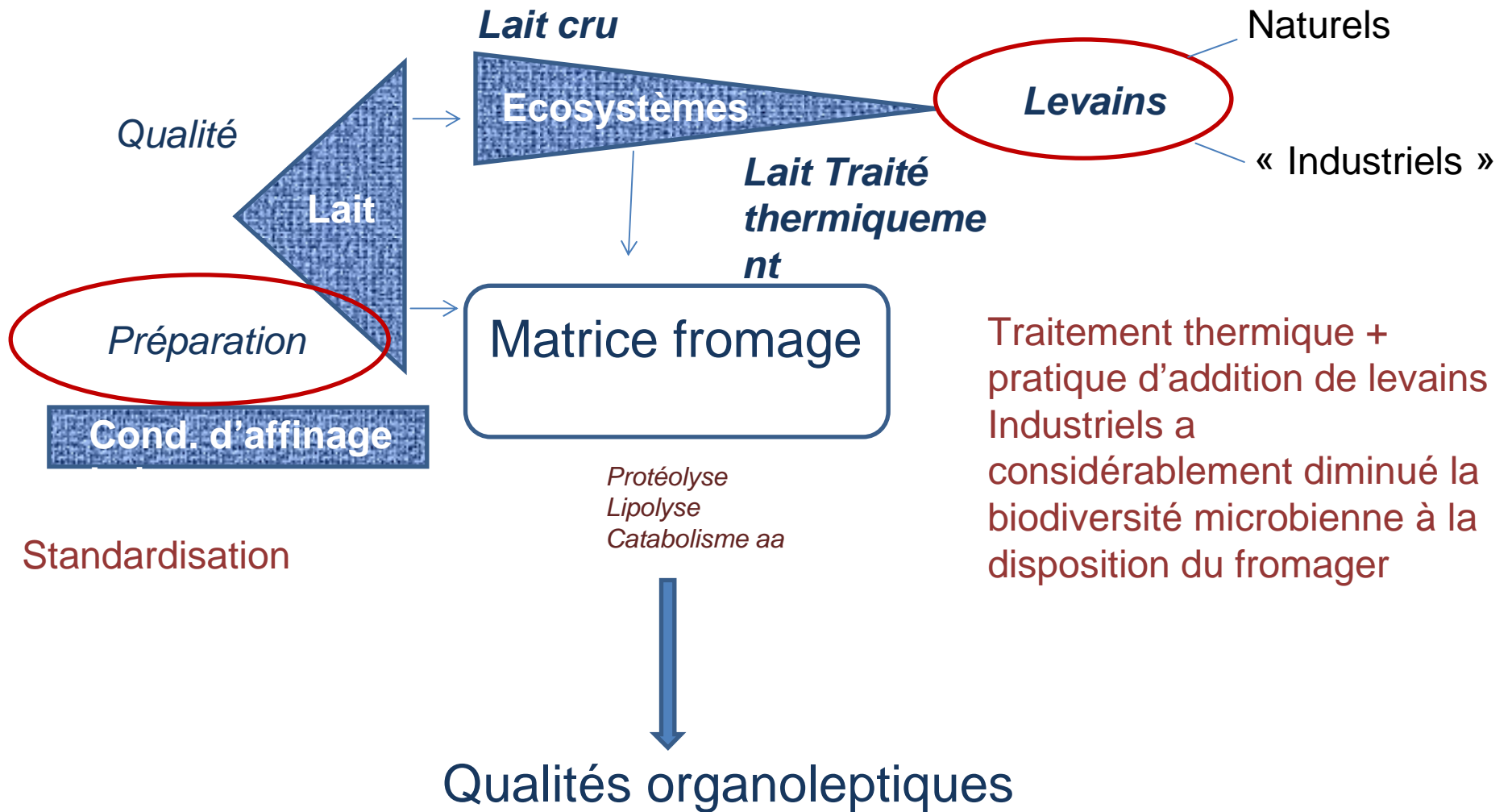
Microfiltration



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

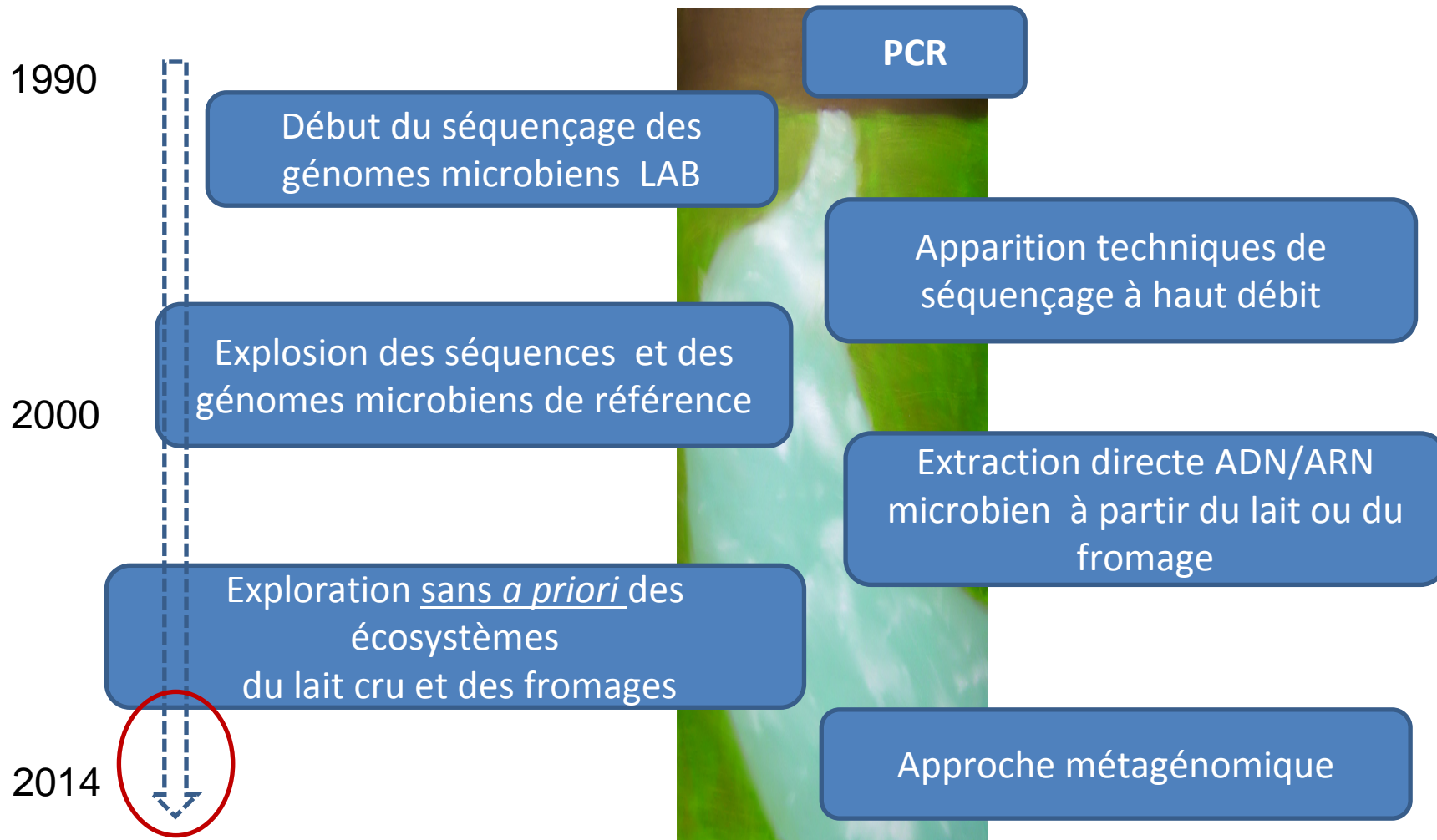
Soit 125 ans de microbiologie pour l’essentiel Pasteurienne

- **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**

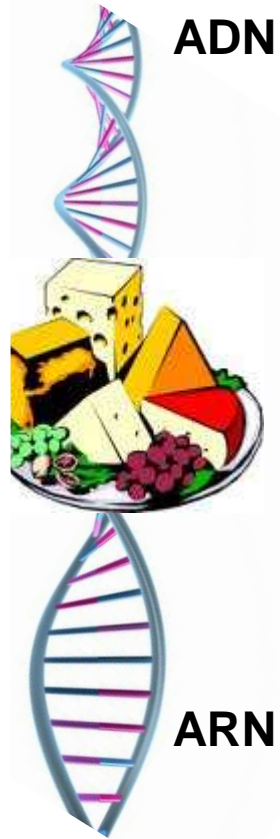


Approches moléculaires directes - une révolution



MILK : AN INFINITE SOURCE FOR INNOVATION

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

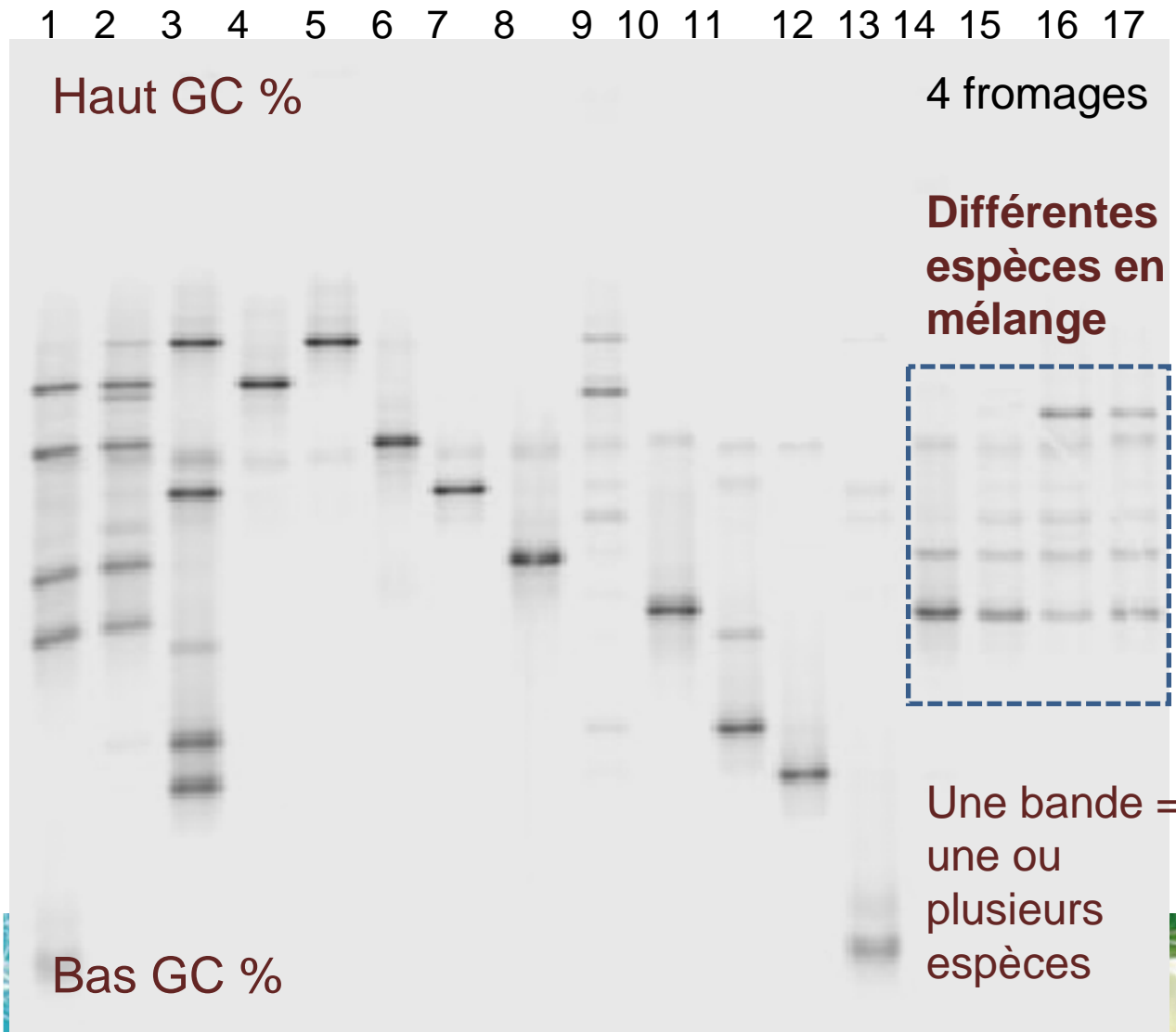
Métagénomique Séquençage à haut débit et identification via séquences de référence (database) – grand nombre d'échantillons possibles (code barre) – Pyroséquençage - « Targeted » métagénomique.

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^e

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 crus 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 !

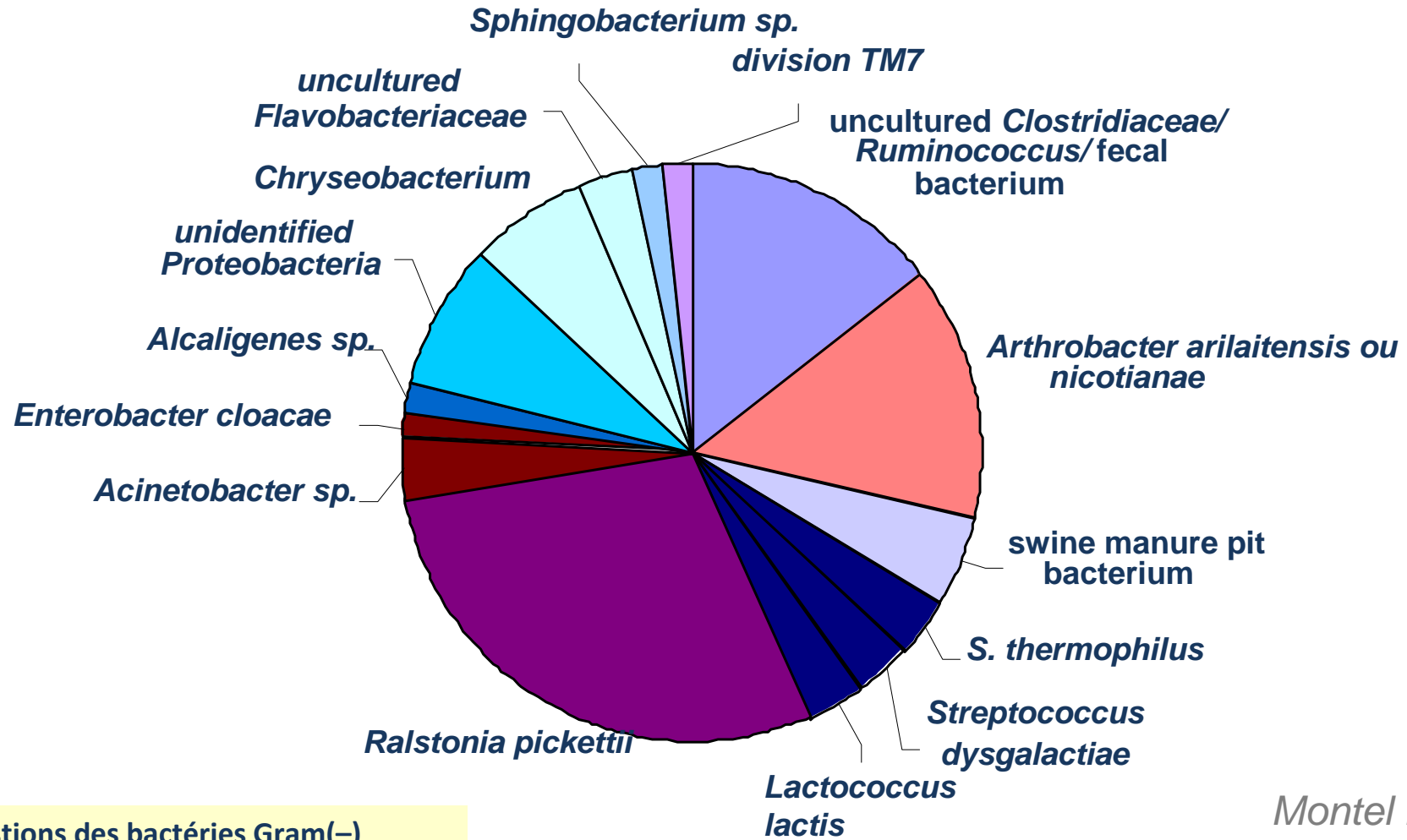
Changement des profils microbiens (bactéries – levures) en fonction des saisons associés à **des changements d'alimentation**, de volume de production de lait ...

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

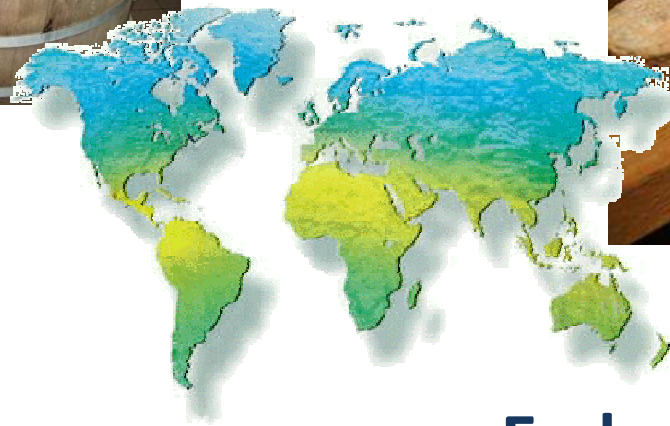
Exemple 2 : Biodiversité microbienne apportée par les systèmes traditionnels tels que outils en bois en contact avec le lait cru



Cuves



Planches



Emballage

Vacherin Mont d'or



Variability of Bacterial Biofilms of the “Tina” Wood Vats Used in the Ragusano Cheese-Making Process[∇]

G. Licitra,¹ J. C. Ogier,⁴ S. Parayre,³ C. Pediliggieri,¹ T. M. Carnemolla,¹
 H. Falentin,³ M. N. Madec,³ S. Carpino,² and S. Lortal^{3*}

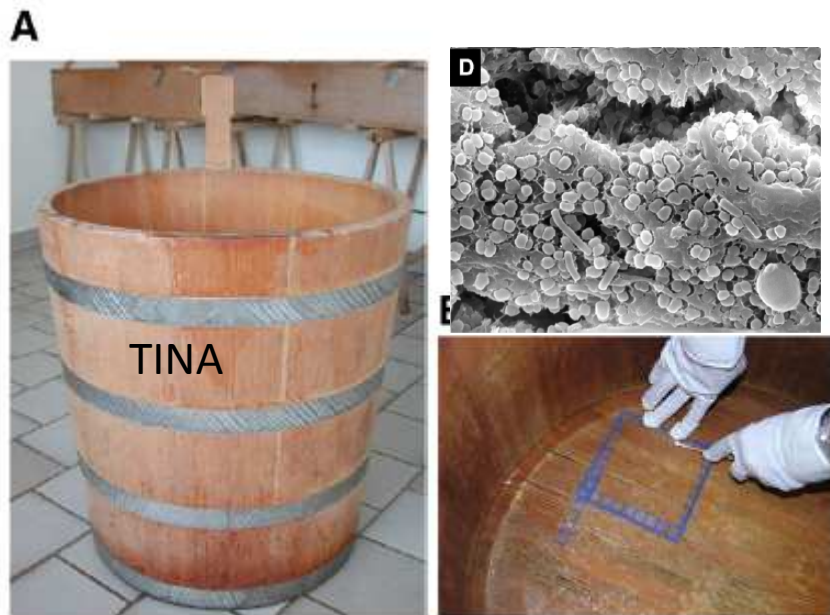
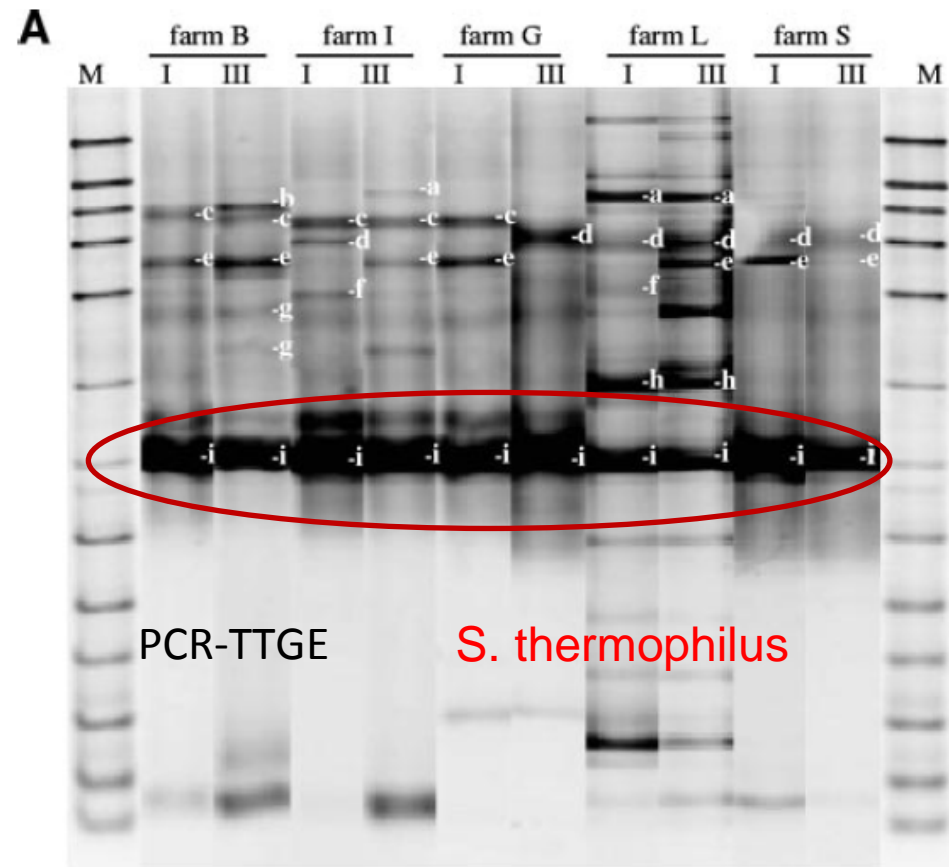


Fig. 1. Tina wood vat characteristics (A) and biofilm sampling (B) (surface of the blue square, 10 cm × 10 cm, five times per Tina).



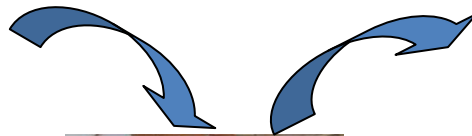
Absence complète de pathogènes
 Lortal *et al.*, 2009. IJFM.



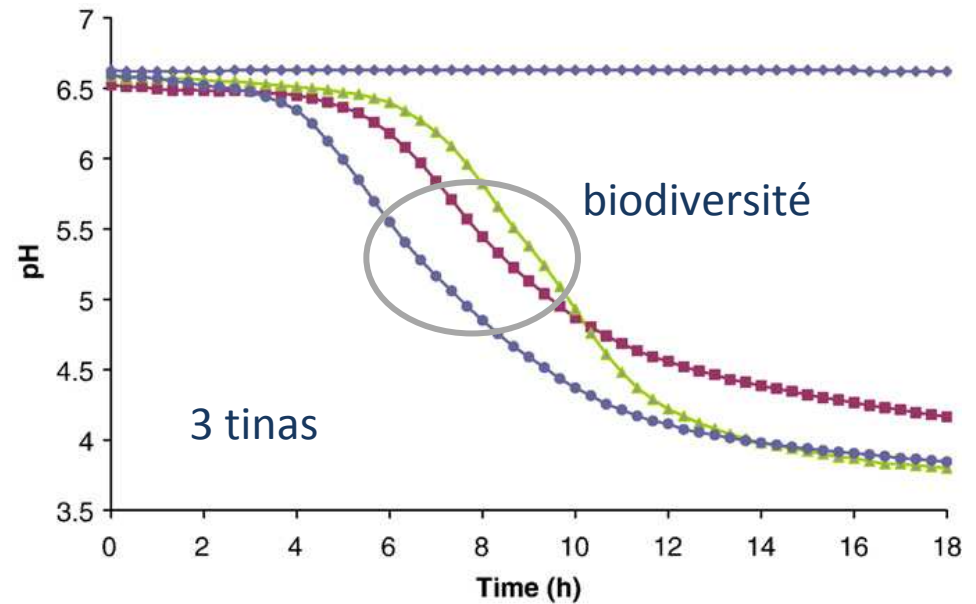
Rôle technologique majeur de ce biofilm lactique

Acidification spontanée 37°C (CINAC)

Lait stérile

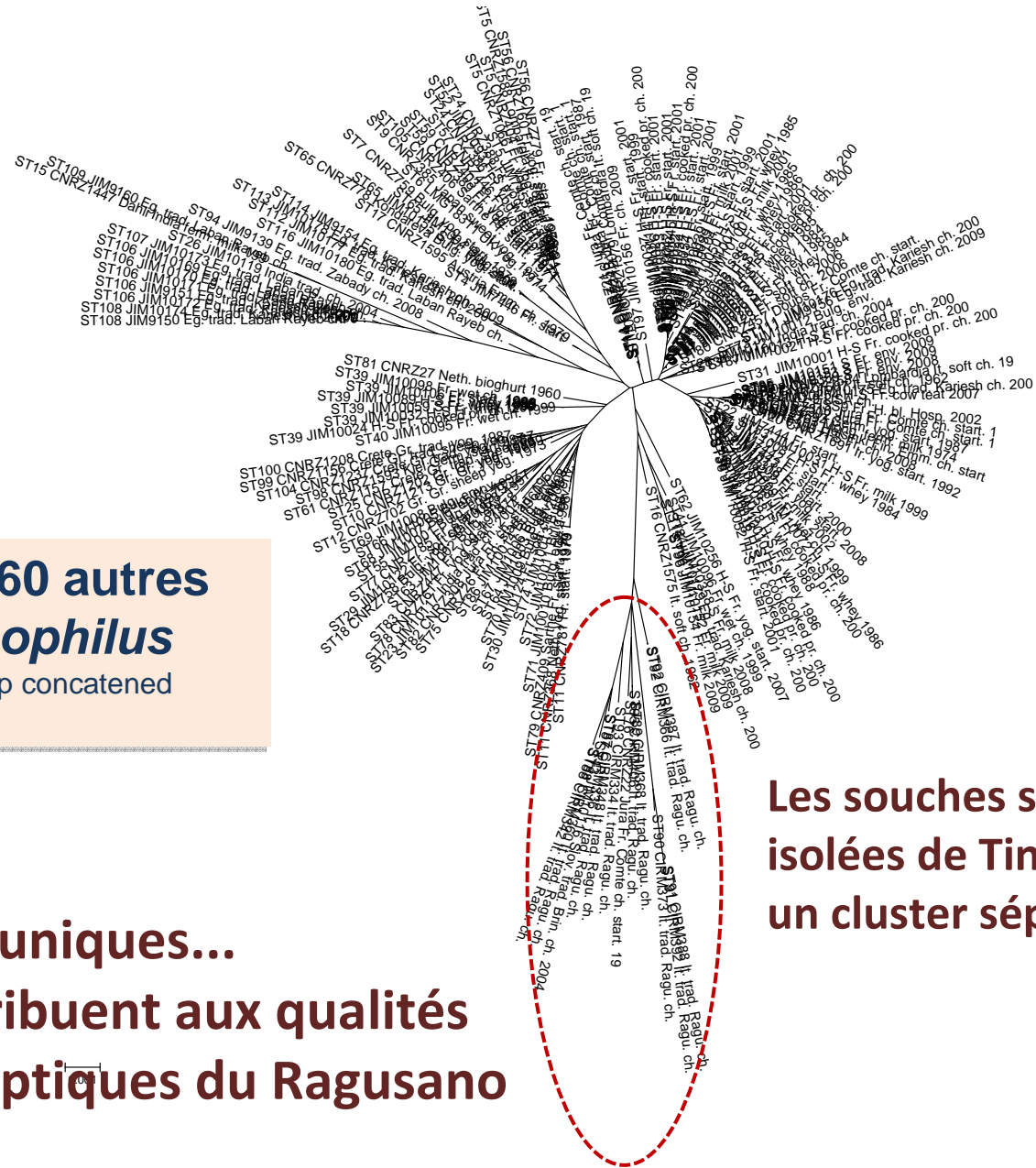


Lait après 10 min de contact /
ensemencement LAB par biofilm surface



Salers en 2011 idem
Caciocavallo en 2012 idem

Unpublished data

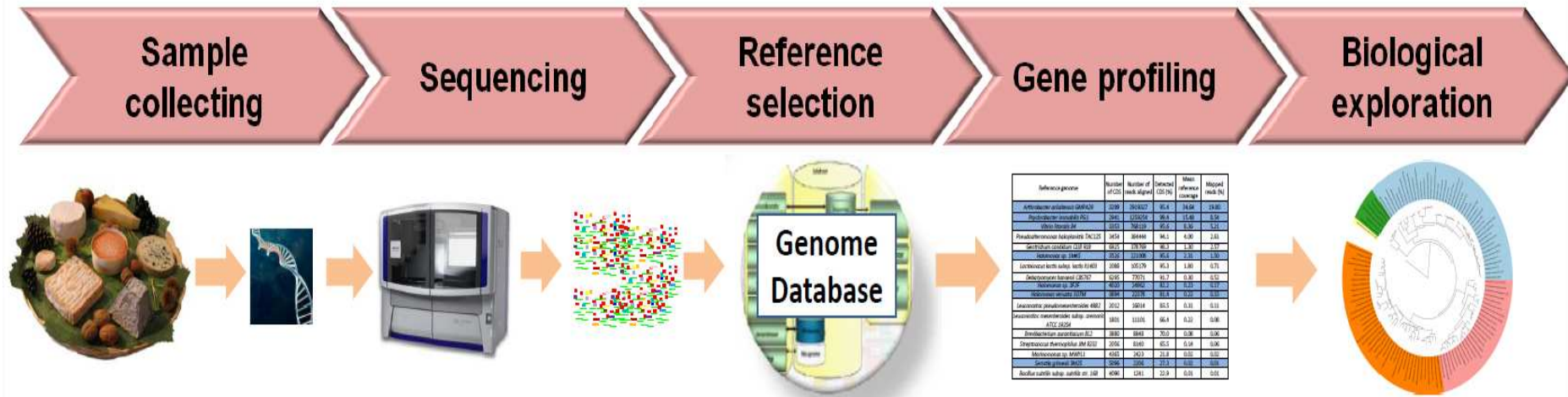


Comparaison avec 160 autres souches de *S. thermophilus*
 Neighbour-joining tree from 2.943-bp concatenated sequences (bootstrap values 98%)

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