Erasmo :

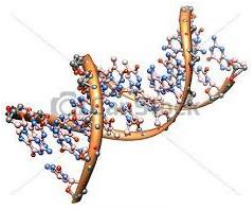
Synergie des flores microbiennes et valorisation des potentialités du lait cru : exploration par métagénomique.

PROJET REALISE DANS LE CADRE DE LA SOUS-MESURES 16.1
DU PROGRAMME DE DEVELOPPEMENT RURAL DE RHONE-ALPES

Les filières fromagères des Savoie bénéficient toutes d'un signe d'identification de la qualité et de l'origine (SIQO : AOP ou IGP), qui leur permet de se différencier sur le marché très concurrentiel des produits laitiers (plus de 300 lancements de produits innovants par an en moyenne en France pour un peu moins d'une vingtaine perdurant plus de 2 ans). Dans les Savoie, cette différenciation est basée sur 3 fondamentaux, que sont la valorisation des ressources herbagères et animales locales, les savoir-faire techniques et la transformation au lait cru.

Jusqu'à ce jour, l'ensemble des travaux sur les écosystèmes microbiens des laits et des fromages a été réalisé grâce à des analyses bactériologiques, dites pasteuriennes, c'est-à-dire basées sur des cultures sur milieux nutritifs, avec détermination visuelle des bactéries présentes en fonction de la morphologie des colonies et une identification grâce à des tests phénotypiques complémentaires. La lourdeur des analyses et leur coût ont fortement limité la prise en compte de la diversité microbienne présente, amenant chercheur, technicien et fromager à se focaliser sur les principales espèces dominantes, avec un risque de minimiser le rôle des espèces sous dominantes du lait cru par manque d'informations.

Le développement des méthodes basées sur l'analyse des génomes (pour rechercher des séquences d'ADN spécifiques de genres ou d'espèces microbiennes) a permis d'être plus spécifique et plus rapide dans l'identification des micro-organismes. En permettant la description simultanée de l'ensemble des espèces microbiennes présentes, qu'elles soient issues du lait, de l'environnement ou des levains, les méthodes « omiques » (issues des techniques de séquençage dit à « haut-débit ») ouvrent de nouvelles perspectives, pour une analyse globale et systémique des relations et interactions entre les populations microbiennes et / ou entre les populations microbiennes et la matrice fromagère en cours de fabrication.



Dans ce cadre, l'objectif du projet Erasmo est d'étudier les dynamiques microbiennes des populations endogènes (du lait) et exogènes (des levains) en cours de fabrication sur 3 technologies fromagères savoyardes, afin de mettre en évidence les synergies potentielles dans le développement des différentes flores présentes.

Eléments de protocole :

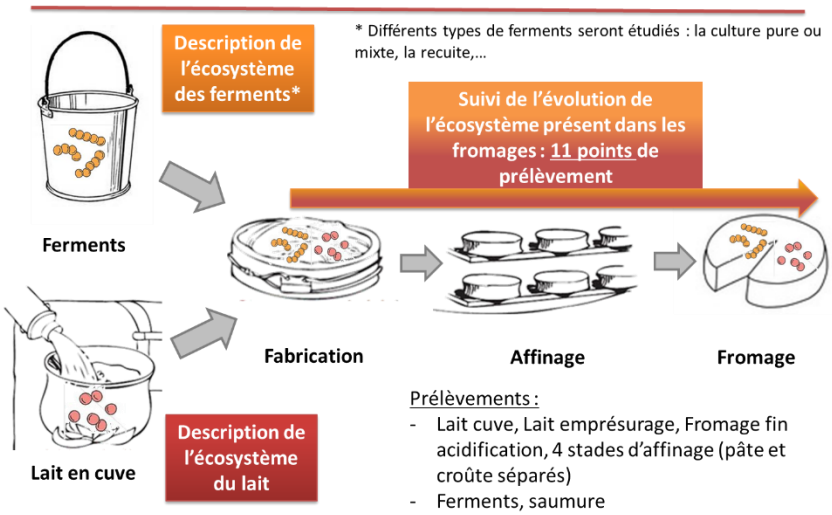
Le projet a comporté 2 phases expérimentales, sous forme de suivi de fabrication en atelier. Ces phases ont été réalisées, une fois en période estivale (été 2016) et une fois en période hivernale (hiver 2016/2017).

Elles se sont déroulées chacune dans 4 ateliers de chacune des 3 filières fromagères participant au projet, à savoir les filières Abondance, Tomme de Savoie et Reblochon. Les ateliers ont été choisis pour représenter au sein de chaque technologie une diversité de mode de préparation des levains, c'est-à-dire d'incorporation des ferments dans un milieu de culture avant de les utiliser pour ensemencer le lait de cuve.

Au cours de chacun des suivis, 13 prélèvements, du lait de cuve au fromage affiné ont été réalisés.

Au total, plus de 900 échantillons ont été analysés par métabarcoding, à la fois sur les bactéries et les levures moisissures, ainsi que de nombreuses analyses bactériologiques classiques et physico-chimiques.

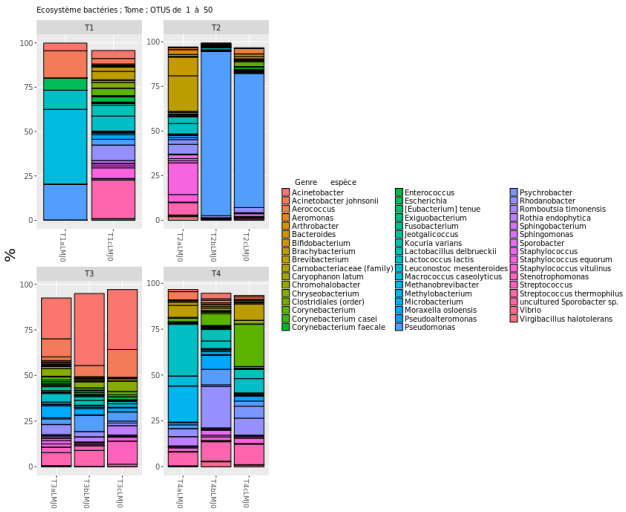
Les résultats sont nombreux et très riches



Diversité microbienne : les laits crus, une source inépuisable ?

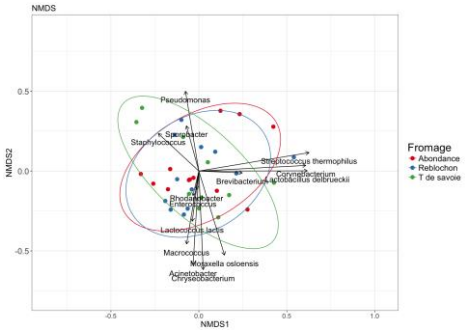
Les laits crus en cuve sont les échantillons qui contiennent la plus grande diversité microbienne. Ainsi, il est possible de distinguer jusqu'à 120 espèces/genres différents de bactéries et jusqu'à 50 espèces/genres de levure moisissures, pour des laits à 10 000 UFC/ml.

Dans ces échantillons, les espèces très majoritaires représentent souvent moins de 50 % de la totalité : même minoritaires, les autres espèces ne sont largement pas négligeables.

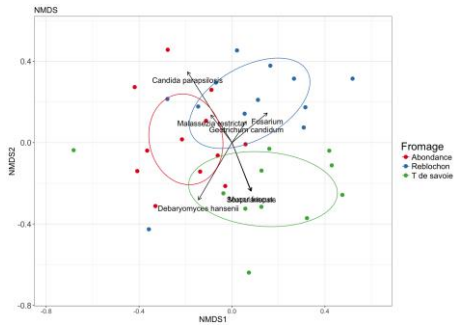


La variabilité de richesse entre les laits est elle aussi importante, tant en nombre qu'en nature des espèces présentes. Sauf accident de laits très chargés en une espèce donnée (pseudomonas par exemple), les différents laits analysés contiennent entre 80 à 120 espèces genres bactériens et de 40 à 60 pour les levures moisissures.

Pour les bactéries, cette variabilité ne semble pas dépendre de la filière mais des différents ateliers : elle reflète ainsi les pratiques mises en œuvre par les producteurs, qui ne sont pas annulées par le mélange des laits.



Pour les levures moisissures, la variabilité entre les laits de cuve est très liée aux filières : les laits semblent reflétés l'ambiance de la technologie, dès leur mise en cuve.



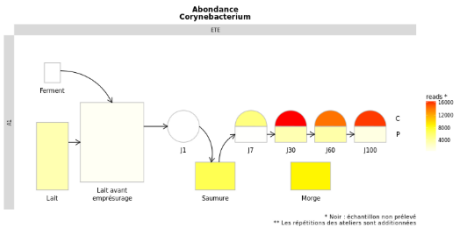
Dynamique en cours de fabrication :

Si les premiers stades de fabrication, de l'emprésurage au fromage à J+1 ou J+7, sont très marqués par l'ajout des ferments, les espèces non apportées par les ferments tendent à se développer dans les stades ultérieures, et ceci dans les 3 technologies.

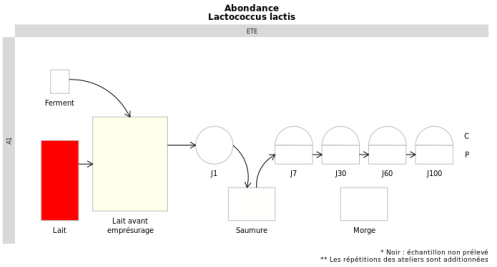
Ceci est observable pour le développement des bactéries en la pâte, par exemple en Tomme de Savoie et particulièrement net sur la croûte, par exemple en Reblochon.

La comparaison des compositions des différents échantillons permet de déterminer l'origine des espèces genres présents en fin d'affinage, en sachant s'ils étaient présents dans le lait ou la saumure, apportés par les ferments ou la morge ou s'ils proviennent d'un ensemencement par l'ambiance ou le matériel de la fromagerie.

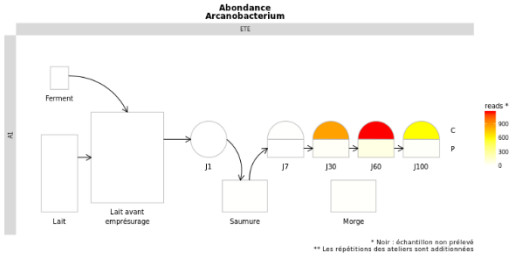
Des bactéries présentes dans le lait qui disparaissent … puis réapparaissent
Un exemple :
les Corynebactéries



Des bactéries présentes dans le lait … qui disparaissent
Un exemple :
Les Lactoccoques lactis



Des bactéries qui ne viennent ni du lait, ni des ferments … et donc de l'environnement : les planches, l'ambiance de la cave.
Un exemple : les Arcanobactéries

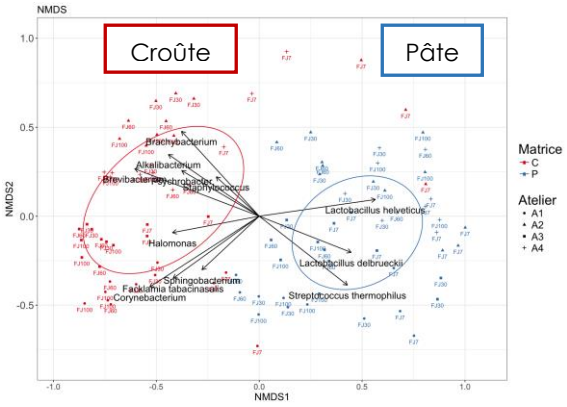


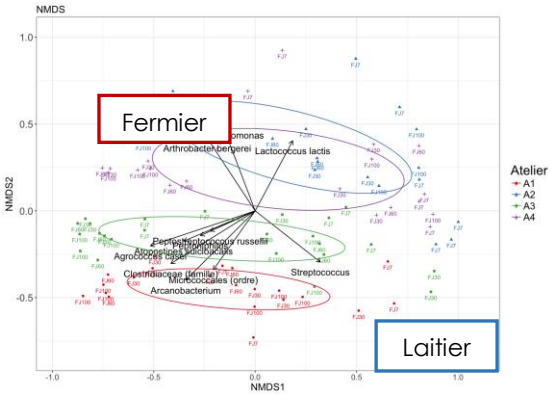
A l'échelle d'une technologie :

Pour les 3 technologies, l'abondance relative des espèces genres majoritaires :

- Evolue au cours de l'affinage
- Et permet de distinguer la composition de la pâte et de la croûte,

que ce soit pour les bactéries ou les levures moisissures.

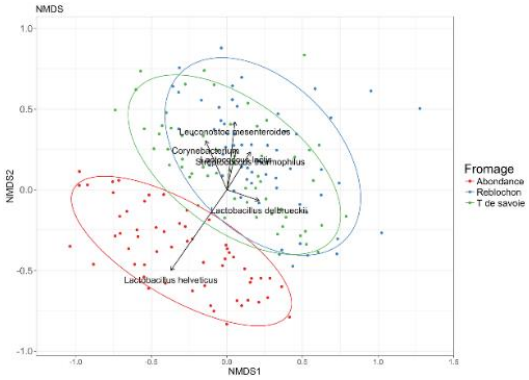


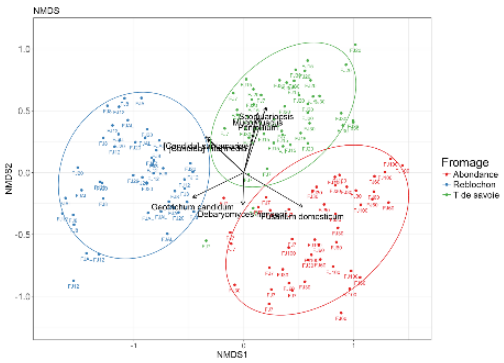


Les espèces moins abondantes, dites minoritaires, permettent, elles de distinguer les ateliers et en particulier, les ateliers fermiers des ateliers laitiers.

A l'échelle des trois technologies :

Dans la pâte et pour les bactéries, seuls les types de technologies (Pâte Pressée Non Cuite / Pâte Pressée Cuite) sont distinguables.





Pour les levures moisissures en croûte ou pâte et pour les bactéries en croûte, les trois technologies se distinguent parfaitement.

L'abondance des informations fournies par ces données représente une richesse pour mieux comprendre le rôle des différentes populations microbiennes au cours de la fabrication. A partir de la base de données actuelle, nous allons ainsi pouvoir explorer l'impact des paramètres technologiques sur l'évolution de telle ou telle flore.

En rendant visible une biodiversité, jusqu'alors décrite sur un nombre très restreint d'échantillons, la méthode omique utilisée dans ce projet, à savoir le métabarcoding, nous permet d'élargir notre vision de cette richesse peu visible. Dans les années à venir, le développement d'autres méthodes omiques nous permettra non seulement de décrire les populations présentes mais aussi d'identifier le rôle de chacune … puis l'activité de chacune à un temps donné.

En apportant des connaissances sur le fonctionnement des écosystèmes microbiens des fromages, ces travaux vont permettre une meilleure compréhension de l'impact des pratiques et ainsi sécuriser les processus biologiques complexes qui interviennent dans les fabrications fromagères au lait cru.

Avril 2018