

Microflore du lait cru

Vers une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens du lait et de leurs facteurs de variation

OUVRAGE COLLECTIF RÉALISÉ DANS LE CADRE DU RMT « FILIÈRES FROMAGÈRES VALORISANT LEUR TERROIR » ANIMÉ PAR LE CNAOL ET LE GIS ALPES JURA.

COORDINATION DE LA RÉDACTION DE L'OUVRAGE : Cécile Laithier (Institut de l'Elevage).

TOUS NOS REMERCIEMENTS AUX PERSONNES AYANT CONTRIBUÉ À LA RÉDACTION DE L'OUVRAGE :

RÉDACTEURS

Cécile Callon, Céline Delbès, Françoise Monsallier et Marie Christine Montel (INRA Aurillac), Julie Barral et Fanny Pélissier (Actilait), Cécile Laithier, Pierre Parguel, Sabrina Raynaud et Philippe Roussel (Institut de l'Elevage), Nathalie Desmasures (Université de Caen), Yvette Bouton (CIGC), Antoine Bérodiér (Centre technique des Fromages Comtois), Valérie Michel (Suaci Alpes du Nord - GIS Alpes Jura), Eric Beuvier (INRA de Poligny), Yann Demarigny (ISARA-Lyon), Henry-Eric Spinnler (AgroParisTech, Grignon), Hélène Tormo (EI-Purpan).

RELECTEURS AUTRES QUE LES RÉDACTEURS

Eric Notz (Actilait), Jean Marc Gautier et Renée de Crémoux (Institut de l'Elevage), Agnès Delacroix-Buchet (INRA Jouy en Josas), Françoise Berthier (INRA de Poligny), Caroline Chatelard (Pôle fromager AOP Massif central), Fabienne Feutry (CDFAA 64), Tiphaine Convert (Suaci Alpes du Nord - GIS Alpes Jura), Nadine Ballot (CNIEL/CNAOL).

■ Préface

Les Français sont les premiers consommateurs au monde de fromages affinés. C'est dire leur attachement aux productions fromagères qui font partie intégrante de leur géographie, de leur histoire, de leur culture et de la gastronomie française.

Gastronomie française qui a été élue au Patrimoine Mondial de l'UNESCO en novembre 2010. Dans sa décision, le comité note que cette gastronomie relève d'une « pratique sociale coutumière destinée à célébrer les moments les plus importants de la vie des individus et des groupes ».

Nous sommes « la France aux 1 000 fromages » avec ses 43 Appellations d'Origine Protégée, ses fabrications fermières, artisanales et industrielles, ses fabrications au lait cru (15 % des volumes totaux fabriqués en France)...

Ces fromages diffèrent de par leur forme, leur couleur, leur texture, leur goût... et sont élaborés selon des savoir-faire qui se sont constamment enrichis au cours des siècles.

Empiriquement, les micro-organismes présents dans le lait ont été utilisés pour la conservation du lait que ce soit en lait fermenté ou en fromages. Au cours des siècles, les progrès de la recherche ont mis en lumière le rôle des micro-organismes dans les processus fromagers. Dans un premier temps, il était question de mieux maîtriser la qualité organoleptique des fromages en utilisant des flores aux fonctions technologiques et aromatiques précises. Par la suite, les études se sont intéressées au volet sanitaire. Ainsi ces recherches ont abouti à une formidable évolution technique vers des fromages sûrs et réguliers. Depuis quelques années, la recherche s'intéresse à la compréhension des phénomènes biologiques complexes permettant cette production fromagère variée. Cette diversité doit être considérée comme une valeur patrimoniale. De nouveaux moyens d'investigation en microbiologie ont permis des avancées importantes dans ce domaine.

C'est par des échanges permanents entre chercheurs, techniciens, producteurs de lait, fromagers que se maintiendra ce patrimoine fromager original. C'est la conviction des auteurs de cet ouvrage. Les organisations de gestion, de promotion et de défense des appellations d'origine françaises ne peuvent qu'encourager et soutenir cette orientation.

Nous considérons cette synthèse des travaux de recherche sur la microbiologie du lait et des fromages comme un élément fondamental et fondateur de ce débat essentiel pour nos appellations d'origine et plus généralement pour tous nos fromages fermiers et traditionnels.

**Le Président du Conseil National
des Appellations d'Origine Laitières,
Dominique CHAMBON**

**Le Président du Comité de Pilotage
du Réseau Fromages de Terroirs,
Michel LACOSTE**

■ Organisation de l'ouvrage

L'ouvrage est organisé en différents niveaux de précision pour faciliter la lecture selon vos besoins. Ainsi, par partie, l'information résumée se trouve au niveau de l'introduction, des encadrés de couleur et de la conclusion. De plus, des tableaux ou figures de synthèse sont disponibles selon les parties. Le corps de texte détaille bien sûr ce premier niveau de lecture. Pour aller plus loin, des « encadrés » ont été rédigés.

Au niveau de chaque partie, les principales références bibliographiques « incontournables » sont listées. Les autres références citées sont mentionnées en annexe. Des fiches « méthode » précisant les manières de prélever, de réaliser des tests... et des fiches de synthèse sur les différents sujets abordés dans l'ouvrage sont également référencées et répertoriées en fin de document.

Les termes techniques (mots ou groupes de mots) identifiés par un astérisque sont définis en annexes. Un renvoi vers les principales pages les utilisant est indiqué.

■ Table des matières

Introduction	9
Chapitre 1 : Ce qu'il faut savoir avant d'intervenir sur les microflores des laits	13
Partie 1 : Nature et quantité de microflores des laits	15
A. Qu'est-ce que la microbiologie ?	15
B. Quelles sont les grandes catégories de micro-organismes rencontrées dans les laits ? Quelles sont leurs caractéristiques ?	15
C. Quels sont les principaux facteurs qui affectent le développement des germes dans le lait ?	17
D. Quelles sont les principales flores microbiennes associées aux produits laitiers et quels sont leurs rôles ?	18
E. Quels sont les niveaux des principales flores microbiennes dans les laits crus ?	21
F. Quelle est la diversité des micro-organismes associés aux laits ?	21
G. Que peut-on retenir aujourd'hui des données sur la flore microbienne des laits ?	23
Partie 2 : Quel est le rôle de la microflore du lait ?	25
A. Microflore du lait et biodiversité	25
B. Microflore du lait et caractéristiques sensorielles des fromages	29
C. Microflore du lait et effet barrière par rapport aux pathogènes	40
D. Microflore du lait et bénéfices potentiels pour la santé	46
Partie 3 : Comment apprécier les écosystèmes microbiens du lait ?	51
A. Indicateurs globaux	51
B. Les analyses de types microbiologiques	57
Partie 4 : Quelle est la variabilité rencontrée au sein de l'écosystème « lait », à quoi est-elle due ?	69
A. La variabilité des écosystèmes des laits crus de vache	69
B. La variabilité des écosystèmes des laits crus de chèvre et de brebis	71
C. Synthèse et perspectives	73
Chapitre 2 : Quels sont les origines et les réservoirs de cette microflore? Quels effets ont les pratiques d'élevage sur leur composition ?	75
Partie 1 : Les flux microbiens à la ferme	77

Partie 2 : Le réservoir trayon : sa composition et les pratiques influentes	79
A. Quelle population microbienne trouve-t-on en surface des trayons avant la traite ?	79
B. Quelle variabilité des flores microbiennes en surface des trayons ?	81
C. Synthèse et perspectives	83
Partie 3 : Le réservoir machine à traire : sa composition et les pratiques influentes	85
A. Quelles microflore sont mobilisables au niveau de la machine à traire ?	85
B. La machine à traire : source d'ensemencement du lait ?	89
C. Par quels leviers peut-on jouer sur le réservoir de flores machine à traire et le lait associé ?	89
D. Synthèse et perspectives	97
Partie 4 : L'environnement des animaux	99
A. Quelles sont les populations microbiennes rencontrées dans l'environnement des animaux ?	99
B. Quelles sont les pratiques qui influencent les populations microbiennes de l'environnement des animaux ?	103
C. L'environnement des animaux est-il une source d'ensemencement du lait ?	103
D. Synthèse et perspectives	105
Partie 5 : Combinaison de pratiques et composition microbienne des laits	107
A. Quelles sont les relations entre les caractéristiques microbiennes des laits et les pratiques d'élevage en production laitière caprine ?	107
B. Quelles sont les relations entre les caractéristiques microbiennes des laits et les pratiques d'élevage en production laitière bovine ?	110
C. Synthèse et perspectives	112
Conclusion	115
Annexes	117
Annexe 1 : Autres références bibliographiques citées	117
Annexe 2 : Liste des abréviations utilisées	124
Annexe 3 : Lexique	124
Annexe 4 : Fiches rédigées dans le cadre du groupe « écosystèmes microbiens » du RMT Fromages de terroirs	128
Annexe 5 : Coordonnées des rédacteurs	129

■ Introduction

Pierre PARGUEL

Institut de l'Élevage
Chambre Régionale d'Agriculture de Franche-Comté
Valparc-Espace Valentin Est, 25048 Besançon Cedex

Les micro-organismes présents dans le lait ont été historiquement utilisés pour la transformation et la conservation du lait. Les laits fermentés sont consommés depuis la plus haute antiquité. Associée à l'action de la présure, la flore microbienne des laits permettra la production d'une gamme très diversifiée de fromages. Ainsi, la flore naturelle du lait, au départ principal facteur de sa dégradation, a été sollicitée pour ses propriétés acidifiante, protéolytique, lipolytique et aromatique par des savoir-faire localisés et transmis de génération en génération. En France, c'est au moment de la première guerre mondiale, que, profitant de l'amélioration des réseaux de communication, on assiste à la production de masse pour certaines variétés de fromages. Cette évolution va induire une standardisation des fabrications. Les industriels laitiers vont s'appuyer sur les travaux initiés par Pasteur et utiliser le traitement thermique pour réduire les populations microbiennes du lait puis les remplacer par des cultures aux caractéristiques connues. La production de ferments dits « du commerce » va se généraliser.

Cette évolution vers la standardisation des fabrications va se trouver amplifiée par la promotion des mesures d'hygiène. Dans les années 50, la mention « pasteurisé » est perçue comme un gage de qualité.

Dans les années 1970, la promulgation de la loi Godefroy sur le paiement du lait à la qualité va instituer la faible charge microbiologique du lait comme un élément de sa qualité.

Cette approche de la qualité a induit des préconisations techniques et des pratiques d'élevage tendant, sous la forme de consignes relevant de l'hygiène générale (au sens des pré-requis hygiéniques), à réduire quantitativement les flores. Pour limiter les risques sanitaires identifiés, des actions plus ciblées ont complété ces préconisations. Au fil de la vulgarisation de ces approches, le germe est devenu un ennemi et le terme de « contamination » est rentré dans le langage courant, avec, comme objectif sous-

jacent une réduction de cette contamination comme solution raisonnable (ou au moins comme préalable) à l'approche des risques technologiques et sanitaires.

En 1975, Roger Veissere écrivait dans son ouvrage *Technologie du lait* : « Cette tendance à la simplification (des processus) risque de détruire une partie du capital gastronomique incomparable de la France. C'est pourquoi, il convient de s'efforcer, non seulement de parfaire la qualité des grands fromages industriels, mais également de maintenir, là où elles se justifient, les fabrications artisanales en les améliorant et en assurant leur mise en valeur... ».

Cette position s'est renforcée au cours du temps et l'idée que l'appauvrissement des flores du lait participe, dans certains cas, à une perte des particularités et de l'identité des produits est de plus en plus partagée.

Ainsi, les opérateurs économiques, les chercheurs et les techniciens admettent aujourd'hui un lien fort entre les écosystèmes* microbiens des laits et certaines caractéristiques des produits quand les processus technologiques ont respecté les communautés présentes naturellement. Cette conviction est renforcée par un constat de perte de ces caractéristiques au fil de la mise en place de programmes sanitaires. Par ailleurs, les actions techniques en place semblent arriver à une limite d'efficacité : les résultats se sont nettement améliorés mais, pour les accidents encore présents, il est de plus en plus difficile de poser un diagnostic et de préconiser des mesures pertinentes. En effet, dans certains cas, l'absence d'écosystème* microbien durablement établi favoriserait l'installation des germes indésirables sur le plan technologique, germes par ailleurs bien souvent plus compétitifs dans ces environnements.

La question se pose d'approcher les écosystèmes* microbiens autrement. L'objet n'est pas de prôner un « retour en arrière » et de favoriser un laxisme hygiénique ou sanitaire. Mais tout un chacun ressent bien que l'écosystème* microbien des laits est un

système complexe et non pas seulement un catalogue de germes aux fonctions uniques et juxtaposables. Ainsi, au delà de la présence plus ou moins importante de telle ou telle flore, l'équilibre entre les flores a aussi des effets sur la technologie, les caractéristiques organoleptiques et même sur les risques sanitaires.

Intuitivement, on admet que l'équilibre d'un lait (ou d'un levain obtenu avec un lactosérum) est le fait d'éléments impondérables comme le lieu, la végétation ayant servi à la nourriture des animaux, le climat, la saison, l'ambiance qui s'est installée dans un bâtiment. Mais cet équilibre originel peut être modifié par des équipements et des pratiques décidés et mis en œuvre par les éleveurs et les fromagers.

Dans les filières fromagères souhaitant utiliser les écosystèmes* naturels, le technicien est avant tout concerné par une sécurisation sanitaire des laits au départ, puisque le fromager va s'interdire ou raisonner les traitements d'assainissement comme la pasteurisation. Mais il doit aussi encourager la préservation des équilibres utiles pour le fromager et pour le produit. Plutôt qu'une approche « classique » germe par germe, il est alors question de s'intéresser à des « équilibres de germes » pour lesquels les outils d'évaluation et de maîtrise sont encore très incomplètement connus. La norme n'est plus alors le niveau de germes (désirables ou non) mais le rapport de « force » existant entre ceux-ci.

Cette attitude revient à accepter une « prise de risque ». Pour que cette prise de risque se fasse dans des conditions raisonnables, il est apparu fondamental que les résultats de la recherche dans ce domaine des écosystèmes* microbiens des laits soient accessibles aux acteurs concernés et en particulier aux techniciens d'élevage et aux fromagers. C'est l'objet de cet ouvrage. Ainsi l'écologie d'une flore particulière, et en particulier des flores pathogènes, ne sera abordée ici que dans sa participation à l'équilibre microbien du lait.

Les chercheurs en charge de ces programmes ont l'habitude d'échanger leurs protocoles et leurs résultats. La formalisation et la reconnaissance de ces échanges dans le cadre d'un Réseau Mixte de Technologie (RMT) - voir encadré ci-contre - a été une opportunité pour cette réalisation.

Dans un premier temps, il sera question de la nature des flores, de leur rôle et des moyens pour les mesurer. Une deuxième partie aborde les « réservoirs* à la

ferme », c'est à dire les lieux où l'on retrouve ces flores ainsi que les effets des équipements et des pratiques sur ces réservoirs*.

Les informations présentées dans cet ouvrage sont le fruit des recherches réalisées par les auteurs complétées des éléments repérés dans les bibliographies utilisées pour ces travaux de recherche depuis une dizaine d'années.

L'ouvrage ainsi réalisé ne peut pas être exhaustif. De plus, il est une synthèse des connaissances à un moment donné. Nous ne pouvons nous engager sur une procédure de mise à jour. Mais, au delà de son utilisation dans les relations entre techniciens, éleveurs et fromagers, il sera utile et pérenne

- s'il sert à conforter la place et le rôle des techniciens dans les programmes de recherche,
- s'il favorise l'implication des acteurs économiques dans les instances de débat et de mise en œuvre des actions dans les régions (Pôle fromager AOP Massif central, GIS ID 64, URFAC, GIS- Alpes Jura, AOC de Bourgogne...),
- s'il facilite l'enseignement de ces notions auprès des futurs éleveurs, fromagers, techniciens et chercheurs,
- s'il perpétue le besoin de rencontres entre chercheurs et techniciens.

Historique du groupe chargé de la rédaction de l'ouvrage

Le réseau inter-flores a été mis en place suite aux rencontres sur l'AOC à Pontarlier en 2000. Lors de ces journées, Rémy Grapin (INRA Poligny) et Gustave Pernodet (ENIL Poligny) ont apporté leur soutien à une réflexion sur les laits crus, depuis l'étude de l'incidence des pratiques d'élevage sur la microflore des laits, jusqu'à la mise en place d'actions de conseil en élevage. Par la suite, c'est sous l'égide du CIGC qu'ont été convoquées les premières réunions auxquelles participaient le GIS Alpes du Nord, l'INRA de Poligny, le CTC et l'Institut de l'Elevage. Au fil du temps, ont rejoint ce groupe informel des personnes venant des organismes suivants : INRA d'Aurillac et de Corte, Centre Fromager de Carmejane, Université de Caen, Pôle fromager AOP Massif central, EI de Purpan, ISARA-Lyon, GIS ID 64, CDFAA 64...

En 2008, la réflexion est intégrée dans le Réseau Mixte de Technologie (RMT) « filières fromagères valorisant leurs terroirs » animé par le CNAOL et le GIS Alpes Jura. Ce fut l'occasion d'intégrer d'autres chercheurs (Actilait, INRA, AgroParis Tech).

Le groupe a été chargé de rédiger un ouvrage de synthèse à usage des conseillers techniques travaillant dans des filières laitières s'intéressant à la gestion et à la valorisation des flores naturelles des laits.

Tous les deux ans, des rencontres entre chercheurs et techniciens permettent d'établir des échanges sur ce vaste sujet qu'est la maîtrise des flores microbiennes du lait à la ferme.

■ Chapitre 1

Ce qu'il faut savoir avant d'intervenir sur les microflore des laits

■ Partie 1 : Nature et quantité de microflores des laits

Nathalie DESMASURES

Unité des Micro-organismes d'Intérêt Alimentaire, E.A. 3213
Université de Caen Basse-Normandie - 14032 Caen cedex

Eric BEUVIER

UR 342 « Technologie et Analyses Laitières » - INRA
Rue de Versailles, BP 20089 - 39801 Poligny cedex 1

A. Qu'est-ce que la microbiologie ?

La microbiologie est une discipline très vaste qui a pour objet l'étude d'organismes souvent invisibles à l'œil nu (diamètre inférieur à un dixième de millimètre), qui doivent être observés au microscope, et sont donc appelés « micro-organismes ». Les mots « germes », « microbes », « microflores » ou encore « flores microbiennes » sont souvent employés pour désigner ces organismes (ou groupes* de micro-organismes), qui sont de nature très diverse : virus, bactéries, de nombreuses algues, champignons microscopiques, protozoaires.

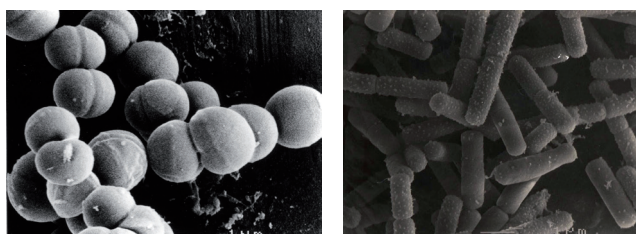
Les micro-organismes jouent un rôle fondamental dans le monde vivant. Ils ont été les premières formes de vie sur terre et sont capables de s'installer dans toutes les zones où la vie est possible, depuis les grands fonds marins jusqu'à des nuages (Bowers *et al.*, 2009). Ils peuvent être responsables de maladies mais sont aussi utilisés pour produire des médicaments ; ils peuvent être responsables d'intoxications alimentaires mais permettent également de fabriquer le pain, diverses boissons et toute une variété d'aliments fermentés. Ils sont enfin impliqués dans tous les grands cycles biogéochimiques (cycles du carbone, de l'azote, du soufre, du fer...) et il est estimé qu'ils sont responsables de la moitié de la photosynthèse sur terre (Prescott *et al.*, 2003).

B. Quelles sont les grandes catégories de micro-organismes rencontrées dans les laits ? Quelles sont leurs caractéristiques ?

Divers micro-organismes peuvent être retrouvés dans les laits crus. Les plus rencontrés sont les bactéries, mais des levures, des moisissures, des virus et divers protozoaires peuvent également être présents. Ils diffèrent notamment par leur taille et leur niveau de complexité.

1. Les bactéries

Elles prédominent parmi les micro-organismes rencontrés dans le lait. Les cellules bactériennes sont de très petite taille (généralement au plus quelques millièmes de millimètre, soit quelques micromètres ou μm). Les formes les plus courantes sont des cellules sphériques (coques) ou des bâtonnets (bacilles), plus ou moins réguliers ou incurvés.



Photographie 1. Cellules bactériennes en forme de coques (à gauche) ou de bâtonnets (à droite).

Placées dans des conditions d'environnement défavorables, certaines bactéries sont capables de donner naissance à des structures très résistantes, les spores, qui vont leur permettre de survivre pendant des durées qui peuvent être extrêmement longues. C'est le cas par exemple des « butyriques » (*Clostridium tyrobutyricum*).

Les bactéries ont une structure très simple (figure 1). Elles sont constituées d'un liquide, le cytoplasme, entouré par diverses enveloppes plus ou moins perméables. Elles peuvent posséder un ou plusieurs flagelles pour se déplacer. Dans le cytoplasme baignent plusieurs organites indispensables. Le nucléoïde et, éventuellement, un ou plusieurs

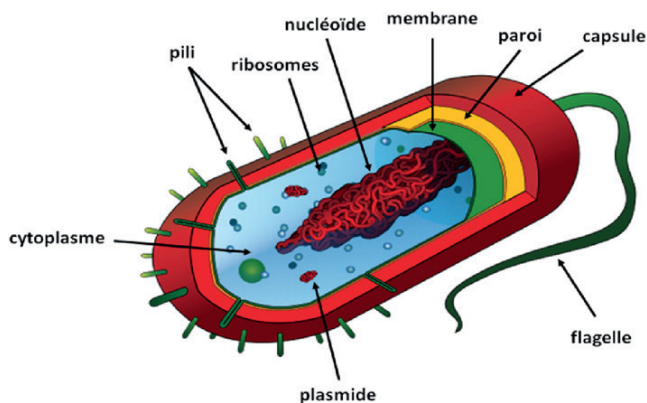


Figure 1. Représentation schématique d'une cellule bactérienne (source : wikipedia.org).

plasmides renferment le dépositaire de l'information génétique, l'ADN*. A partir des molécules d'ADN*, la cellule va produire d'autres molécules, transitoires, les ARN*. Enfin, c'est au niveau des ribosomes que sont synthétisées, à l'aide des divers ARN*, les protéines qui seront utilisées notamment pour la structure et pour le métabolisme* des cellules.

Un des premiers moyens d'étude et de classification des bactéries est l'examen en microscopie optique. La coloration de Gram - de loin la plus courante - permet d'apprécier la forme des cellules et de différencier, selon la structure de la paroi, les bactéries à Gram positif des bactéries à Gram négatif.

Complétée par la recherche de quelques grandes propriétés (catalase, oxydase), cette différenciation est très utile pour diagnostiquer l'appartenance de bactéries à une famille (*Streptococcaceae*, *Enterobacteriaceae*...).

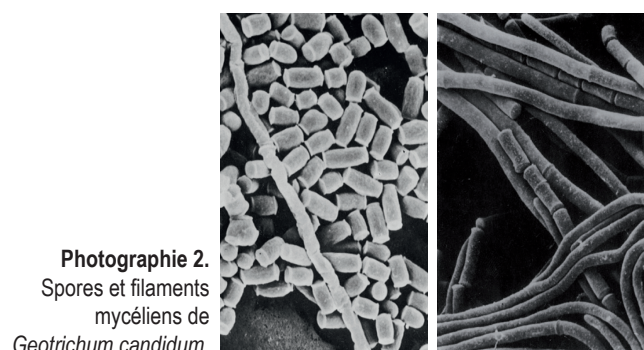
2. Les champignons microscopiques

Ce sont des organismes unicellulaires ou pluricellulaires, porteurs de spores qui assurent leur multiplication et/ou leur dissémination. Ils sont habituellement divisés en deux types de micro-organismes.

a. Les levures

Ce sont des champignons pour lesquels l'état unicellulaire prédomine. La forme la plus fréquente est ovale ou sphérique, avec des tailles allant de 2 à 3 µm jusqu'à 20 à 50 µm de long pour 1 à 10 µm de large. Leur classification (genres*, espèces* et regroupement en familles) reposait initialement sur leur morphologie, leur mode de reproduction et leurs caractéristiques physiologiques et biochimiques mais la biologie moléculaire est de plus en plus utilisée.

Parmi elles figurent notamment *Geotrichum candidum* ou *Debaryomyces hansenii*.



Photographie 2.
Spores et filaments
mycéliens de
Geotrichum candidum.

b. Les moisissures

Les moisissures sont des champignons filamenteux pluricellulaires. Leur identification repose encore beaucoup sur leurs caractéristiques macro- et microscopiques, mais les techniques de biologie moléculaire montrent les limites de ces critères. Les moisissures sont disséminées par l'émission de spores qui peuvent être véhiculées par l'environnement (air, eau) et se retrouver dans le lait et dans le fromage. La taille des spores varie de 4 à 10 µm de large et jusqu'à 500 µm de long (si pluricellulaires). Les filaments, de 2 à 5 µm de large, sont de longueur très variable.



Photographie 3. Tête
conidienne de *Aspergillus
flavus*.

3. Classification des bactéries et des champignons

Au sein d'une même catégorie, chaque bactérie ou chaque champignon peut être classé dans des groupes* de plus en plus fins (figure 2) allant du domaine à l'espèce*, parfois à la sous-espèce (indiquée par ssp ou subsp), voire au delà. La notion la plus fine (renforcée par les techniques de biologie moléculaire) est celle de « souche »* qui pourrait être apparentée à la notion d'individu chez les organismes les plus complexes.

4. Les autres micro-organismes

Si les laits peuvent renfermer divers virus (ex : entérovirus) ou protozoaires (ex : *Toxoplasma gondii*, agent de la toxoplasmose) potentiellement pathogènes pour l'homme, les pathologies associées sont exceptionnelles en Europe (The Community Summary report, 2010). Parmi les virus, certains appelés bactériophages (phages) sont des parasites obligatoires des bactéries. Ils peuvent être ainsi présents sur le matériel et de façon quasi systématique dans les lactosérums. Il s'agit de structures de très petite taille (quelques dixièmes de micromètres) et nécessitant des techniques particulières pour leur mise en évidence. Ils ne sont donc pas comptabilisés lors du dénombrement de germes totaux réalisés au cours des

Domaine → Phylum → Classe → Sous-classe → Ordre → Sous-ordre → Famille → Genre* → Espèce*

Figure 2. Principaux rangs (du plus large au plus fin) utilisés pour la classification des micro-organismes

analyses de lait. Lorsqu'ils sont virulents, ils peuvent détruire les bactéries responsables de l'acidification en transformation fromagère. Certains, dits tempérés, peuvent cohabiter avec la bactérie hôte sans perturber son cycle de développement.

C. Quels sont les principaux facteurs qui affectent le développement des germes dans le lait ?

La croissance des micro-organismes peut être influencée par divers facteurs du milieu ou de l'environnement, comme le pH, la température, la quantité d'eau libre, la concentration en nutriments, la présence de substances antimicrobiennes. Les interactions entre micro-organismes vont également intervenir.

Une fois dans le lait, un micro-organisme doit composer avec l'écosystème* dans lequel il se trouve, c'est-à-dire avec le **milieu** et les facteurs qui lui sont propres (pH, composition en nutriments, potentiel redox, disponibilité de l'eau...) ainsi qu'avec les **autres micro-organismes** présents simultanément avec qui il va interagir de façon positive ou négative. Or, les micro-organismes ont des exigences nutritionnelles et physiologiques ainsi que des niches écologiques qui leurs sont propres. Au sein de chaque groupe*, il existe des spécificités liées au genre*, à l'espèce*, à la sous-espèce, ou encore à la souche* concernée. Un équilibre va alors s'établir entre micro-organismes et avec le milieu, équilibre que les facteurs environnants (température en particulier) vont pouvoir également venir modifier.

Parmi les différents facteurs susceptibles d'intervenir, celui dont l'action est la plus évidente et la plus facile à mesurer est la température de conservation du lait. Si une basse température de conservation permettra de stabiliser le niveau des micro-organismes pris dans leur ensemble, elle pourra cependant être à l'origine de modifications dans l'équilibre des différentes flores microbiennes. En effet, tous les micro-organismes ne réagissent pas de la même façon à la température. Certains voient leur

croissance stoppée très vite par un faible abaissement de la température, alors que pour d'autres la croissance ne sera que ralentie, même par une diminution importante de la température. Cinq groupes* peuvent être distingués selon les exigences vis-à-vis de la température : les psychrophiles, les psychrotrophes, les mésophiles, les thermophiles et les hyperthermophiles (tableau 1). Les groupes* les plus rencontrés dans le lait sont les mésophiles (bactéries lactiques comme les lactocoques), les germes psychrotrophes comme beaucoup de *Pseudomonas* (proches des mésophiles pour la température optimale, mais peuvent se développer à basse température) et, dans une moindre mesure, les thermophiles (ex : *Bacillus stearothermophilus*).

Groupes*	Minimum	Optimum	Maximum
Psychrophiles	-5 - +5	12 - 15	15 - 20
Psychrotrophes	-5 - +5	25 - 30	30 - 35
Mésophiles	5 - 15	30 - 40	40 - 47
Thermophiles	40 - 45	55 - 65	60 - 90
Hyperthermophiles	60 - 70	≥ 80	100 - 110

Tableau 1. Niveaux de température (°C) pour le développement des micro-organismes.

D'autres facteurs sont susceptibles d'intervenir mais leur action au cours de la conservation du lait est difficilement perceptible tant que les micro-organismes ne se multiplient pas. Leur rôle sera davantage exprimé au cours de la transformation fromagère.

1. Le pH

La grande majorité des bactéries et champignons ont la capacité de se développer à un pH proche de la neutralité, correspondant à celui du lait ou à celui trouvé à la surface de fromages à croûte lavée par exemple (pH 6,5 à 7). Cependant, les champignons et diverses bactéries lactiques se développent mieux à pH plus bas, ce qui leur confère un avantage au cours des premières étapes de la transformation fromagère lors de l'acidification (pH 4,3-5,5) ou dans les fromages à pâte fraîche (pH 4,3-4,5), alors que la croissance et l'activité d'autres micro-organismes sont stoppées ou ralenties.

2. L'activité de l'eau (a_w)

Elle correspond à la quantité d'eau libre dans un milieu, et donc disponible pour le développement des micro-organismes. La valeur théorique de l' a_w peut varier de 0 (milieu totalement sec) à 1 (eau pure). Tous les micro-organismes n'ont pas les mêmes exigences vis-à-vis de l' a_w (rôle par exemple en début d'affinage des fromages). Lorsque les valeurs sont supérieures à 0,95 (cas des pâtes fraîches, des pâtes molles et de certaines pâtes pressées), l' a_w a peu d'effet sur les micro-organismes. En dessous de 0,91 (cas des fromages à pâte dure), la plupart des bactéries voient leur croissance inhibée.

3. Le potentiel d'oxydoréduction (potentiel redox)

Il résulte d'un équilibre déterminé par la présence dans le lait de réducteurs et d'oxydants et peut influencer le développement des micro-organismes selon leur besoin en oxygène : **aérobies stricts** (oxygène indispensable, ex : *Pseudomonas*, moisissures), **microaérophiles** (faible taux d'oxygène requis, ex : *Lactobacillus*, *Streptococcus*), **aéro-anaérobies facultatifs** ou **aérotolérants** (oxygène facultatif, ex : coliformes, staphylocoques), **anaérobies stricts** (oxygène toxique, ex : *Clostridium*). Ainsi certains micro-organismes se développeront mieux (voire uniquement) à la surface des fromages (en contact avec l'oxygène, comme beaucoup de bactéries corynéformes) qu'au cœur, alors que d'autres auront un comportement inverse (exemple : bactéries propioniques*).

4. La composition en nutriments

Le lait est composé de lactose, d'une grande variété de vitamines, minéraux, acides aminés, protéines, matières grasses... disponibles pour le développement des micro-organismes mais dont la nature et les concentrations peuvent varier dans le temps et en fonction des pratiques d'élevage. Les micro-organismes qui possèdent les systèmes adéquats pour utiliser ces composés seront avantagés par rapport aux autres.

5. Les systèmes antimicrobiens

Dans le lait, des systèmes inhibiteurs, naturels ou non, peuvent agir sur les micro-organismes. Certains sont liés à la composition physicochimique du lait (lactoferrine, acides gras libres, système lactoperoxydase-thiocyanate-péroxyde d'hydrogène)

ou à l'état immunitaire de l'animal (anticorps, cellules). D'autres sont des bactériocines*, substances produites par certains germes qui vont inhiber, spécifiquement ou pas, d'autres germes. Des inhibiteurs, liés à des pratiques à proscrire peuvent aussi être présents (antibiotiques, résidus de produits de nettoyage/désinfection).

D. Quelles sont les principales flores microbiennes associées aux produits laitiers et quels sont leurs rôles ?

En parallèle de la classification scientifique, les micro-organismes sont souvent regroupés en fonction de leurs rôles en technologie (utile, altération) ou en santé humaine ou animale (pathogène). Ces catégories (flores) ne sont pas absolues mais elles donnent une indication de l'intérêt ou du risque associé aux micro-organismes.

La flore microbienne «totale» quantifiée lors des analyses de lait sous le terme «germes totaux» représente une image (non exhaustive) de l'ensemble des micro-organismes vivants présents dans l'échantillon de lait. Par commodité, il est fréquent de classer les micro-organismes en fonction de leur intérêt/risque vis-à-vis de l'élaboration, l'altération et l'hygiène des produits et de parler alors de micro-organismes «utiles», «indésirables» ou «potentiellement pathogènes» (Bergère et Lenoir, 1992). Cette classification présente plusieurs inconvénients. Le premier est de ne pas prendre en compte le contexte. En effet, cette classification n'est pas absolue et un même micro-organisme pourra être utile dans telle technologie alors qu'il sera indésirable dans telle autre. Le second inconvénient est de donner tant d'importance au rôle principal mis en avant que des effets secondaires opposés risquent d'être négligés. Par exemple, les *Pseudomonas* sont habituellement classés comme indésirables alors que certaines souches* peuvent produire des arômes recherchés en fromagerie (Jay *et al.*, 2005). Le troisième est de raisonner à l'échelle des groupes* microbiens (famille, genre*, espèce*) alors que dans bien des cas, c'est la souche* qui sera déterminante. Enfin, comment classer tous les nouveaux groupes* microbiens mis en évidence récemment et pour lesquels aucune information n'est disponible à ce jour ? Le tableau 2 rassemble quelques grands groupes* microbiens classés comme «utiles» ou «indésirables» décrits

Micro-organismes	Rôles principaux	Autres rôles possibles	Exemples
Bactéries lactiques	Acidification du lait et du caillé, participation à la formation du goût (protéolyse*, production d'arômes), de la texture et de l'ouverture des pâtes (De Roissart et Luquet, 1994).	Production d'amines biogènes*. Activité antipathogène (bactériocines*, acide lactique) (Bonetta <i>et al.</i> , 2008).	Lactocoques, leuconostocs, pédiocoques, streptocoques thermophiles, lactobacilles, entérocoques.
Bactéries propioniques*	Participation à la formation du goût et à l'ouverture des fromages à pâte pressée cuite (Emmental, Comté, Gruyère ...) par fermentation propionique* = fermentation des lactates pour donner les acides acétique et propionique*, ainsi que du gaz carbonique.	Activité antipathogène (bactériocines*) (Ekinci et Barefoot, 2006).	<i>Propionibacterium acidipropionici</i> <i>Propionibacterium freudenreichii</i> <i>Propionibacterium jensenii</i> <i>Propionibacterium thoenii</i> .
Bactéries de surface	Constituants de la flore de surface des fromages affinés, ce sont des flores d'affinage. Rôle essentiel dans la texture et la formation de la couleur et du goût (composés soufrés) des fromages, notamment des fromages à croûte lavée, fleurie ou croûte mixte (Munster, Camembert, Pont l'Évêque....).	Activité antipathogène (bactériocines*).	Staphylocoques non pathogènes (<i>Staphylococcus equorum</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. lentus</i>), bactéries corynéformes (<i>Micrococcus</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> ...).
Levures	Désacidification de la pâte en début d'affinage, permettant ainsi l'implantation ultérieure d'une flore acido-sensible comme les bactéries corynéformes, et intervention également dans la formation du goût et de la texture des fromages.	<i>Geotrichum candidum</i> peut être responsable d'accidents (« graisse » ou « peau de crapaud ») en technologie pâte molle.	<i>Kluyveromyces lactis</i> et <i>marxianus</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> .
Moisissures	Agents d'affinage présents à la surface (<i>P. camemberti</i> , fromages à croûte fleurie ; <i>Rhizomucor</i> , Tomme de Savoie et Saint-Nectaire fermier) ou à l'intérieur (<i>P. roqueforti</i> , fromages bleus) de certains fromages. Rôle déterminant dans la formation des caractéristiques sensorielles des fromages. Responsables d'accidents (<i>Rhizomucor</i> , « poil de chat » en fromage à pâte molle), se caractérisant par un défaut d'aspect des fromages, et par l'apparition de mauvais goûts.	Production de mycotoxines.	<i>Chrysosporium sulfureum</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Penicillium camemberti</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Rhizomucor fuscus</i> , <i>Rhizomucor plumbeus</i> , <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> , <i>Trichothecium domesticum</i> (ex <i>Cylindrocarpum</i>).

Tableau 2. Rôles en transformation fromagère des grands groupes* microbiens du lait.

Micro-organismes	Rôles principaux	Autres rôles possibles	Exemples
Butyriques	Fermentation butyrique = production d'acide butyrique et d'hydrogène. défauts de goût et d'ouverture (« gonflement tardif ») qui peuvent se développer dans les fromages (à pâte pressée cuite et non cuite).		<i>Clostridium tyrobutyricum</i> , <i>Clostridium butyricum</i> , <i>Clostridium beijerinckii</i> , <i>Clostridium sporogenes</i> .
Coliformes	Peuvent être présents dans le tube digestif et les matières fécales. L'ensemble de ces bactéries est regroupé sous les termes « coliformes totaux ». Certaines (coliformes thermotolérants ou fécaux) sont utilisées, comme indicateurs des conditions d'hygiène en production.	Gonflements précoces (fromages à pâte molle d'aspect spongieux), Production de composés aromatiques d'intérêt fromager (Morales <i>et al.</i> , 2004).	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Klebsiella</i> .
Bactéries psychrotrophes	Peuvent se multiplier au froid et produire des lipases et protéases, généralement thermostables, à l'origine de défauts de goût (rance, amertume) dans les fromages. Certaines peuvent être à l'origine de défauts de pigmentation ou d'aspect poisseux à la surface de fromages.	Production de composés aromatiques d'intérêt fromager (Morales <i>et al.</i> , 2005).	Certains <i>Acinetobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas</i> .
Bactéries thermorésistantes	Peuvent survivre à la pasteurisation et entraîner une altération après traitement. Certaines peuvent produire des lipases et protéases, parfois thermostables. Elles englobent toutes les bactéries sporulantes mais aussi quelques bactéries résistant particulièrement à la chaleur parmi les non sporulantes.		<i>Enterococcus</i> , certains lactobacilles et certaines bactéries corynéformes, <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> .

Tableau 2 (suite). Rôles en transformation fromagère des grands groupes* microbiens du lait.

dans le lait. Les rôles majeurs utilisés pour classer ces micro-organismes sont indiqués, ainsi que les rôles secondaires qui peuvent parfois être en opposition avec la classification faite.

Des micro-organismes dangereux pour la santé du consommateur, issus de l'animal ou de son environnement, peuvent contaminer le lait et certains produits laitiers. Parmi les espèces* ou genres* les plus cités figurent *Campylobacter jejuni*, certains *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*. D'autres espèces*, moins fréquemment citées ou émergentes, sont à prendre en compte comme, par exemple, *Yersinia enterocolitica*, *Coxiella burnetti* (Rodolakis, 2009), ou encore *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* (Waddell et al., 2008). Le risque pour le consommateur dépend souvent de la souche* en présence. Ainsi au sein de l'espèce* *Staphylococcus aureus*, hôte de la peau et des muqueuses des mammifères, certaines souches* peuvent produire des entérotoxines dont l'ingestion provoque des diarrhées, souvent accompagnées de vomissements. De même, seules certaines souches* d'*Escherichia coli* ou de *Listeria monocytogenes* pourront occasionner des maladies d'origine alimentaire telles que le syndrome hémolytique et urémique (SHU) ou la listériose (avortement, septicémies, méningites), respectivement.

E. Quels sont les niveaux des principales flores microbiennes dans les laits crus ?

Parmi les grands types de flores microbiennes habituellement dénombrés dans les laits crus, sont systématiquement mis en évidence des staphylocoques et bactéries corynéformes et des bactéries lactiques. Dans la plupart des cas, des *Pseudomonas* sont également détectés, ainsi que des bactéries propioniques*, des levures et des entérobactéries.

Parmi les grands types de flores microbiennes habituellement dénombrés dans les laits crus, les staphylocoques et bactéries corynéformes sont systématiquement mis en évidence, à des niveaux moyens similaires quelles que soient les espèces animales laitières. Les bactéries lactiques sont également toujours représentées, mais sont plus

Groupes* microbiens dénombrés	Lait de vache ⁽¹⁾	Lait de chèvre ⁽²⁾	Lait de brebis ⁽³⁾
Staphylocoques et bactéries corynéformes	100-1000	1000	100-1000
Lactocoques	10-100	100-1000	10000
Lactobacilles	10-100	100	1000-10000
Leuconostocs	10-100	100-1000	10000-100000
Entérocoques	10-100	100-1000	10
Bactéries propioniques*	10		
Bactéries à Gram négatif	100-1000		
dont Entérobactéries	10		
dont <i>Pseudomonas</i> sp	100-1000 ^ε	10-100	
Levures	10-100	10-100	
Moisissures	<10	<10	
Spoires aérobies	<10		
Bactéries coliformes	<10	100	

(1) Desmasures et al., 1997a ; Michel et al., 2001 ; Mallet et al., 2010

(2) Barral et al., 2008 ; Casalta et al., 2009 ; Tormo et al., 2007b, 2010 ; Larrahat, 2009

(3) Casalta et al., 2009 ; Feutry et al., 2011a

^ε selon que les laits sont réfrigérés ou non et selon le nombre de traites

Tableau 3. Ordres de grandeur moyens (UFC*/ml) de quelques groupes* microbiens couramment dénombrés dans les laits crus de vache, de chèvre et de brebis.

nombreuses dans les laits de chèvres et brebis. Dans la plupart des cas pour les laits de vaches, des *Pseudomonas* sont également détectés, ainsi que des bactéries propioniques*, des levures et des entérobactéries.

F. Quelle est la diversité des micro-organismes associés aux laits ?

La diversité des micro-organismes peut être évaluée à différents niveaux, allant des grands groupes* microbiens en passant par les familles, genres*, espèces*, jusqu'aux souches*. Les récents inventaires mettent en évidence des centaines d'espèces* différentes dans les laits crus, chaque espèce* étant elle-même représentée par un nombre allant de quelques unités à quelques dizaines de souches*.

1. En terme de genres

Peu de travaux récents ont été consacrés à un inventaire de la diversité microbienne* des laits crus. Pour les laits de brebis, aucune étude globale n'a été publiée à ce jour. Des données sont disponibles pour des laits de vache. Douze exploitations situées en Basse-Normandie ont été étudiées par Mallet

Groupes* microbiens	Lait de vache ⁽¹⁾	Lait de chèvre ⁽²⁾
Bactéries lactiques	<i>Aerococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus</i>
Staphylocoques et bactéries corynéformes	<i>Arthrobacter</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Macrococcus</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Leucobacter</i> , <i>Leifsonia</i> , <i>Rothia</i> , <i>Renibacterium</i> , <i>Staphylococcus</i>	<i>Arthrobacter</i> , <i>Brachybacterium</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Dietzia</i> , <i>Jeotgalicoccus</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Macrococcus</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Ornithinococcus</i> , <i>Rothia</i> , <i>Salinicoccus</i> , <i>Staphylococcus</i>
Levures	<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Issatchenkia</i> , <i>Kazachstania</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Pichia</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Trichosporon</i>	<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Trichosporon</i>
Bactéries sporulantes (dont butyriques)	<i>Bacillus</i> , <i>Brevibacillus</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i>
Entérobactéries (dont coliformes)	<i>Enterobacter</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Yersinia</i>	<i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pantoea</i>
Autres bactéries à Gram négatif (dont psychrotrophes)	<i>Acinetobacter</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Shingobacterium</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Xanthomonas</i>	<i>Acinetobacter</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Delftia</i> , <i>Exigobacterium</i> , <i>Hahella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Stenotrophomonas</i>

(1) Mallet *et al.*, 2010 ; Saubusse *et al.*, 2007(2) Callon *et al.*, 2007

Les noms indiqués en gras correspondent à des genres* au sein desquels quelques espèces* au moins ont un rôle positif et/ou négatif identifié en technologie fromagère. Pour les autres genres*, les fonctionnalités restent à préciser.

Tableau 4. Inventaire de la diversité (à l'échelle des genres*) des bactéries et levures dans des laits crus de vache et de chèvre.

Lait de vache ⁽¹⁾	Lait de brebis ⁽²⁾
<i>Enterococcus durans</i> , <i>Ec. faecium</i> , <i>Ec. faecalis</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paraplantarum</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> <i>ssp lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides</i> , <i>Lactococcus</i> <i>lactis ssp lactis</i> , <i>Lc. lactis ssp cremoris</i>	<i>Ec. durans</i> , <i>Ec. faecalis</i> , <i>Ec. hirae</i> , <i>Ec. faecium</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. paraplantarum</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Ln. pseudomesenteroides</i> , <i>Lc. lactis ssp lactis</i> , <i>Lc. lactis ssp cremoris</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>

(1) Bouton *et al.*, 2006 ; Dalmasso *et al.*, 2008(2) Feutry *et al.*, 2011a**Tableau 5.** Biodiversité* (à l'échelle des espèces*) de bactéries lactiques dans des laits crus de vache et de brebis.

et al., 2010, révélant la présence d'au moins une quarantaine de genres* microbiens différents (près de 150 espèces* différentes). Pour ce qui est des laits de chèvre, les travaux de Callon *et al.*, 2007 ont porté sur une exploitation située en région Rhône Alpes (six prélèvements) et ont mis en avant près d'une quarantaine de genres* microbiens différents.

Ces éléments sont détaillés dans le tableau 4.

2. En terme d'espèces et de souches

Dans des laits de vache de la zone AOC Comté, parmi les flores lactique et propionique* recherchées, six espèces* de lactobacilles, trois espèces* d'entérocoques et trois espèces* de *Propionibacterium* ont été identifiées par Bouton *et al.*, 2006 (voir tableau 5 pour en savoir plus). Plus généralement, les travaux de Normand *et al.*, 2007 et de Bouton *et al.*, 2007 ont permis de mettre en évidence quarante-neuf espèces* bactériennes environnementales différentes dans les laits analysés. Dalmasso *et al.*, 2008 se sont intéressés à l'évolution de populations de bactéries lactiques (lactocoques, lactobacilles, leuconostocs et entérocoques) dans le lait cru d'une exploitation, prélevé pendant 12 jours successifs. Si globalement un nombre plus limité d'espèces* a été mis en évidence au cours de ce travail (7 espèces*), l'étude de la diversité intra-spécifique de *Lc. lactis* a révélé onze groupes* de souches* distincts, dont deux représentés de façon permanente.

Dans des laits de brebis de la zone de production de l'Ossau-Iraty, Feutry *et al.*, 2011a ont mis en évidence que chaque lait renfermait de 6 à 14 souches* de bactéries lactiques, correspondant à 5 à 10 espèces*. Au sein de la flore lactococque de laits crus réfrigérés collectés dans 32 fermes (Feutry *et al.*, 2011b), 43 souches* ont été mises en évidence.

Ces travaux, comme d'autres non détaillés ici (ex : Corrolier *et al.*, 1998 ; Kagkli *et al.*, 2007a) montrent l'existence dans le lait de quelques souches* à quelques dizaines de souches* par espèce*.

G. Que peut-on retenir aujourd'hui des données sur la flore microbienne des laits ?

Une grande diversité allant des genres* aux souches* a déjà été révélée, dans des laits pourtant peu chargés, mais l'image est loin d'être complète. Peu

d'échantillons ont été soumis à inventaire avec des techniques pointues d'identification en lait de vache et de chèvre, aucun inventaire n'est disponible pour des laits d'autres espèces* laitières.

Les diverses facettes des micro-organismes pris individuellement sont loin d'être parfaitement connues, elles sont susceptibles d'être modifiées à l'échelle des communautés microbiennes au sein des écosystèmes*, étant données toutes les interactions possibles.

Les rôles, notamment indésirables, attribués à certains groupes* microbiens ne reposent parfois que sur les propriétés de quelques espèces* voire de quelques souches*. Les bactéries à Gram négatif par exemple, qui comprennent en particulier des bactéries psychrotrophes, ou indicatrices de défaut d'hygiène ou encore potentiellement pathogènes, ont une image très négative alors qu'elles ne seraient pas nécessairement toutes indésirables (Coton *et al.*, 2009 ; Deetae *et al.*, 2009 ; Larpin-Laborde, 2006a).

Le recensement dans les laits de plus d'une centaine d'espèces* laisse entrevoir le formidable potentiel du lait cru en tant que réservoir* de diversité microbienne*, avec plusieurs centaines voire quelques milliers de souches* différentes.

Références principales

Barral J, Doutart E, Guezennec C, Karsenti C, Laithier C. 2008. Influence de la pratique de la prématuration sur la qualité du lait, l'acidification et la qualité des fromages de chèvre de type lactique. Rapport technique, Actilait, 60 pages.

Bergère JL, Lenoir J. 1992. La microbiologie laitière, sa place, ses impacts et son originalité. In Les groupes microbiens d'intérêt laitier. Coord : Hermier J, Lenoir J et Weber F, CEPIL, Paris, 568 pages.

Bouton Y, Guyot P, Beuvier E. 2006. Diversité génomique et temporelle des flores lactobacilles, bactéries propioniques et entérocoques isolées de laits crus. Colloque SFM, 7 novembre, Paris.

Callon C, Duthoit F, Delbes C, Ferrand M, Lefrileux Y, De Cremoux R, Montel MC. 2007. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year : Molecular approaches. Syst. Appl. Microbiol. 30, 547-560.

Casalta E, Sorba JM, Aigle M, Ogier JC. 2009. Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 133, 243-51.

Dalmasso M, Prestoz S, Rigobello V, Demarigny Y. 2008. Evolution of raw cow milk microflora, especially lactococci, enterococci, leuconostocs and lactobacilli over a successive 12 day milking regime. *Int. J. Dairy Sci.* 3, 117-130.

De Roissart H et Luquet FM. 1994. Bactéries lactiques. Coord : Lorica, Uriage. 1, 605 pages.

Feutry F, Oneca M, Berthier F, Torre P. 2011a. Biodiversity and dynamics of lactic acid bacteria strains in PDO Ossau-Iraty cheese made from raw ewe's milk with different starters. En préparation.

Mallet A, Guéguen M, Desmasures N. 2010. Etat des lieux de la diversité microbienne quantitative et qualitative de laits crus normands destinés à la transformation fromagère. 8^{ème} Congrès National de la SFM, 2-4 juin, Marseille.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA. 2003. Microbiologie - 2^{ème} édition française. De Boeck Université, Bruxelles.

Tormo H, Agabriel C, Lopez C, Ali Haimoud Lekhal C, Roques C. 2010. Relationship Between The Production Conditions of Goat's Milk And The Microbial Profiles Of Milk. *Int. J. Dairy Science*, 6, 13-28.

Les autres références citées dans cette partie sont listées en annexe.

■ Partie 2 : Quel est le rôle de la microflore du lait ?

A. Microflore du lait et biodiversité

Marie-Christine MONTEL

Unité de Recherches Fromagères - INRA
20, côte de Reyne - 15000 Aurillac

Céline DELBES

Unité de Recherches Fromagères - INRA
20, côte de Reyne - 15000 Aurillac

1. Définition de la biodiversité

Le terme biodiversité* ou encore diversité biologique (Chevassus-au-Louis, 2007) est défini dans le Journal officiel du 12 avril 2009 comme désignant « *la diversité des organismes vivants, qui s'apprécie en considérant la diversité des espèces* (diversité espèce*), celle des gènes* au sein de chaque espèce* (diversité génétique), ainsi que l'organisation et la répartition des écosystèmes* (diversité écologique)* ».

Ces différents niveaux d'organisation doivent être situés dans le contexte de la biodiversité microbienne* relative aux écosystèmes* laitiers. Les écosystèmes* laitiers dans leur niveau d'organisation le plus large, regroupent divers écosystèmes*. Les écosystèmes* fromages en sont souvent le point de mire car leurs qualités sont l'ultime but recherché par l'ensemble d'une filière fromagère. Ils se composent de deux systèmes interconnectés, la croûte du fromage, système ouvert, et la pâte, système fermé dès les premières étapes de fabrication.

Leur composition microbienne dépend essentiellement de celle du lait, elle-même dépendante de méta-écosystèmes microbiens que sont les exploitations laitières dans lesquelles plusieurs systèmes s'imbriquent allant de biofilms* de machine à traire à la peau des trayons, en passant par les litières et autres ambiances autour de l'animal. La composition microbienne de l'écosystème* croûte peut être aussi associée à celle des saumures employées pour des soins de croûte et à celle des ambiances de cave. Cette mosaïque de systèmes très divers constitue des réservoirs* de biodiversité* encore très mal connus et le flux de micro-organismes entre eux, le lait et la croûte des fromages n'est pas encore établi. La diversité et l'évolution de la composition microbienne des fromages au cours de leur affinage naissent aussi

de la diversité des conditions environnementales de fabrication (différents types de technologie fromagère) et d'affinage.

2. Les indicateurs de biodiversité

La mesure de la biodiversité* dans le cas des écosystèmes* microbiens du lait est complexe. La solution la plus usuelle consiste à mesurer la proportion des différentes flores en fonction de leur rôle. Mais il faut garder à l'esprit qu'un micro-organisme peu présent peut avoir un effet déterminant sur l'écosystème* étudié.

L'estimation de la biodiversité* dans ses différentes dimensions est indispensable pour comprendre comment ces systèmes interconnectés fonctionnent ensemble et individuellement. Elle revêt un intérêt particulier pour les écosystèmes* microbiens des fromages dont le fonctionnement conduit à l'élaboration des caractéristiques sensorielles des fromages. Nous avons donc besoin d'indicateurs pour évaluer la dynamique des populations en cours de process, pour apprécier la variation spatio-temporelle des écosystèmes* naturels en amont de ceux du lait et du fromage et les impacts des actions techniques sur leur structure et leurs fonctionnalités.

Il serait illusoire de penser que nous pouvons mesurer objectivement la biodiversité* par divers indicateurs parce que l'image que nous en avons, à quelque niveau que ce soit, est étroitement dépendante des méthodes mises en œuvre pour les apprécier.

Comme le résume la figure 3, quel que soit l'écosystème*, les variations de la composition en espèces* sont un indicateur sensible pour identifier des perturbations naturelles ou liées à l'activité humaine. Le nombre d'espèces* est l'indicateur le plus fréquent pour estimer la diversité des bactéries, levures, moisissures lorsque celles-ci sont cultivables. Même s'il n'existe aucune définition officielle de l'espèce* pour ces micro-organismes, un consensus se dégage pour la définir. Il est admis que deux bactéries dont les séquences des gènes* de l'ARN* ribosomal 16S présentent une similitude inférieure

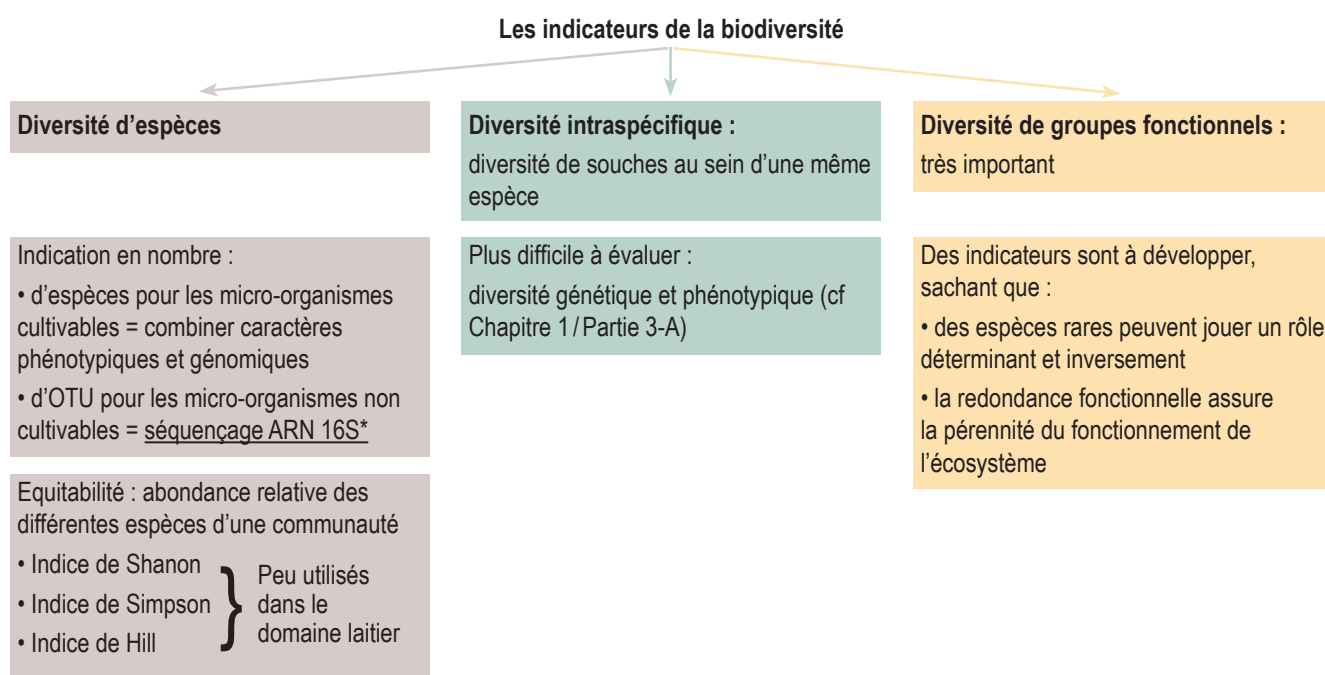


Figure 3. Schématisation des différents niveaux d'étude de la biodiversité* et les indicateurs correspondants.

à 97 % n'appartiennent pas à la même espèce*, mais des espèces* différentes peuvent avoir la même séquence d'ADN r16S. Aussi est-il indispensable de combiner ces caractères génomiques à des caractères phénotypiques indépendants les uns des autres. Par contre, seul le séquençage de l'ARN* ribosomal 16S* fait référence pour les micro-organismes non cultivables et la notion d'espèce* est remplacée par celle d' « operational taxonomic units » OTU (Amann *et al.*, 1995 ; Whitman WB, 1998). Alors que près de 400 000 OTU ont été recensés dans les banques de données internationales (Ribosomal Database Project), le nombre d'espèces* bactériennes identifiées serait seulement de 8000 (site internet bacterio.cict.fr). En effet, dans la majorité des écosystèmes* microbiens, seule une faible part des micro-organismes est cultivable, par exemple, dans le sol uniquement 1 %. En revanche, la description des communautés microbiennes de lait et de fromages révèle que plus de 90 % peuvent être cultivés sur des milieux de laboratoire (données INRA Aurillac). Face à l'immensité de la diversité microbienne*, avec environ 220 espèces* de bactéries, 35 espèces* de levures identifiées, la diversité microbienne* des laits et fromages en terme d'espèces* peut paraître bien faible. Cependant, la diversité dans les réservoirs* de flores des laits ou dans les ambiances d'affinage n'a encore été que très peu explorée. Par exemple, il semblerait que celle des trayons soit importante avec une proportion importante de flore non cultivable.

Le nombre d'espèces* ne renseigne qu'en partie sur la richesse d'une communauté. La **diversité intraspécifique** (diversité des souches* d'une même espèce*) doit être prise en compte même si elle est plus difficile à évaluer, référant tout à la fois à la diversité génétique et à la diversité phénotypique (cf Chapitre 1 / Partie 3-B). Elle va s'exprimer en fonction des caractéristiques génomiques des individus (souches*) et des environnements physiques et microbiens très divers dans lesquels ils peuvent vivre. Les caractéristiques physiologiques d'un individu peuvent parfois être totalement différentes si celui-ci est cultivé seul dans un milieu de culture ou dans son environnement naturel, en présence d'autres individus de la même espèce* ou non. Leur variabilité détermine la capacité d'un individu à s'adapter et à survivre à des pressions de sélection et va conditionner son rôle dans l'écosystème*.

L'indice de Shannon $H' = - \sum ((N_i / N) * \log_2(N_i / N))$ est un indice permettant de mesurer la biodiversité*.

L'indice de diversité de Simpson $D = 1 / \sum (N_i(N_i - 1) / (N(N - 1)))$ mesure la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard appartiennent à la même espèce* :

N_i : nombre d'individus d'une espèce* donnée, i allant de 1 à S (nombre total d'espèces*). N : nombre total d'individus.

L'indice de diversité de Hill mesure de l'abondance proportionnelle, permettant d'associer les indices de Shannon-Weaver et de Simpson : $Hill = (1/\lambda)/eH'$

$1/\lambda$: c'est l'inverse de l'indice de Simpson. eH' : c'est l'exponentiel de l'indice de Shannon.

L'**équité**, c'est-à-dire l'abondance relative des différentes espèces* d'une communauté est une composante essentielle pour approcher la structure de la biodiversité* des communautés microbiennes. Plusieurs indices de diversité (indice de Shanon, indice de Simpson, indice de Hill) peuvent être calculés pour analyser la structure d'une communauté et ses changements temporels : par exemple suivi de la vie d'un fromage durant la fabrication et l'affinage, variation de la composition d'un lait sur une période de lactation. Malgré leur pertinence en écologie microbienne pour évaluer la dominance et la rareté des espèces* dans une communauté, ces indices sont peu utilisés dans le domaine laitier, excepté dans l'analyse de profils microbiens générés par des méthodes moléculaires directes type SSCP, en raison de la difficulté de quantification des espèces* (cf Chapitre 1 / Partie 3-B). Comme cela sera développé dans la partie 3-B, nous disposons essentiellement de moyens pour quantifier les espèces* pathogènes ou dominantes dans un écosystème*. En première approche, la diversité structurelle des communautés microbiennes des laits et fromages est souvent uniquement estimée par le calcul des proportions relatives de grands groupes* microbiens (bactéries lactiques, bactéries à Gram négatif, bactéries Gram positive et catalase positive, levures) quantifiés sur des milieux de culture dont la sélectivité est connue.

L'approche de la biodiversité* ne serait pas complète sans approcher la **diversité des groupes* fonctionnels** qui déterminent la qualité des fromages. Un fromage est un tout et ses propriétés ne peuvent être déduites par la seule prise en compte des indicateurs évoqués ci-dessus, tels que la composition en espèces* ou en souches* et l'équité. En effet, une espèce* rare dans un écosystème* peut jouer un rôle déterminant dans le fonctionnement de l'écosystème* lorsqu'elle est présente. La colonisation de la surface des fromages par *Proteus vulgaris* en est un exemple car cette espèce*, de par son fort potentiel aromatique, peut avoir une forte incidence sur la flaveur des fromages (Deetae *et al.*, 2009). Cependant, son absence n'empêchera pas le système de fonctionner. A l'inverse, des espèces* souvent abondantes assurent des fonctions essentielles telles que, par exemple, les bactéries lactiques dans l'acidification. Mais elles ne sont pas à elles seules la clef de voûte du système, aussi soutenu par un ensemble d'interactions

avec d'autres micro-organismes. Au sein d'une communauté, des souches* d'une même espèce* ou d'espèces* différentes peuvent remplir la même fonction à des étapes successives dans les différentes voies métaboliques identifiées dans le processus : acidification, production de diverses molécules sapides ou aromatiques à partir d'acides aminés ou d'acides gras, production de métabolites* régissant les interactions microbiennes. La redondance fonctionnelle est un des garants du fonctionnement d'un écosystème* face à des perturbations extérieures. Il peut donc s'avérer intéressant de regrouper les espèces* par groupe* fonctionnel. Mais si les espèces* capables d'assurer l'acidification sont assez bien cernées, celles responsables des autres fonctions seules ou en interaction n'ont pas encore été toutes identifiées. Il pourrait alors être développé des indicateurs pour ces groupes* fonctionnels à côté des tests de lactofermentation (cf Chapitre 1 / Partie 3 -A).

3. Quelle biodiversité faut-il préserver ?

Les avis sont divergents sur la biodiversité* à préserver. Ne connaissant pas toutes les conséquences de sa réduction, il peut être défendu de maintenir une diversité maximale. Actuellement, l'élimination des pathogènes conduit ainsi souvent à une réduction conséquente de la diversité en général, sans avoir évalué le risque d'émergence de pathogènes plus redoutables. Il peut être défendu de ne maintenir qu'un certain niveau de diversité mais ce serait réduire une communauté à un assemblage d'espèces*.

Cette question est souvent au cœur des débats sur la biodiversité microbienne* et les avis divergent. Il peut être argué que nous devons maintenir une diversité maximale dans les environnements naturels des écosystèmes laitiers car nous ne connaissons pas toutes les conséquences de la réduction de leur biodiversité*. Dans un souci d'éliminer les espèces* jugées nuisibles et tout d'abord celles qui sont dangereuses pour la santé, les espèces* pathogènes sont traquées en essayant de minimiser le risque. Des mesures d'hygiène doivent indéniablement être prises mais sans oublier leur sens premier, « ensemble des principes et pratiques tendant à préserver et améliorer la santé ». Or au niveau des systèmes

réservoirs* de flores microbiennes pour la technologie fromagère, faute de connaître les leviers d'action pour éliminer spécifiquement les pathogènes pour l'homme et l'animal, des mesures drastiques réduisant sans discernement la biodiversité* sont souvent prises. Leurs conséquences sur le fonctionnement d'autres écosystèmes* imbriqués autour du lait et du fromage sont rarement anticipées. C'est ainsi que nous subissons la perte de fromageabilité des laits (cf Introduction), la résistance des souches* aux antibiotiques, aux molécules chimiques. Lors de toute action visant à réduire la biodiversité* dont nous ne percevons pas l'utilité à l'instant t, nous devrions donc nous interroger si nous n'éliminons pas des ressources génétiques qui pourraient être exploitées dans le futur à d'autres fins (synthèse de nouvelles molécules par exemple). Le risque d'émergence de pathogènes encore plus redoutables que ceux que l'on voulait éliminer mériterait d'être évalué.

Sans considérer les arguments ci-dessus, il peut aussi être défendu de ne maintenir dans un écosystème* naturel donné qu'un certain niveau de diversité. Cela suppose de connaître le seuil minimum de diversité au-delà duquel la performance du système n'est pas augmentée, d'avoir identifié les diversités inter et intraspécifiques indispensables, les espèces* facultatives. Cette démarche de sélection de flore dans un écosystème* naturel est pratiquée. Mais le fromage n'est pas un assemblage d'espèces* qu'il suffit d'identifier pour reconstituer ensuite une communauté capable d'assurer **de façon optimale toutes les fonctions**.

4. Quelles stratégies de préservation de la diversité microbienne ?

Deux stratégies de préservation de la biodiversité* se complètent plus qu'elles ne s'opposent. La préservation *in situ* vise à protéger les écosystèmes* naturels qui peuvent alors constituer des observatoires de biodiversité*. La conservation du patrimoine microbien repose aussi sur la préservation *ex situ*, qui ne peut perdurer qu'au travers du maintien de celle *in situ*.

Deux stratégies de préservation de la biodiversité*, la préservation *in situ* ou *ex situ*, se complètent plus qu'elles ne s'opposent.

La préservation *in situ* par protection des écosystèmes* naturels peut s'avérer être un des meilleurs garants du maintien de la biodiversité* et constituer un terrain d'observation de son évolution. Elle protège la valeur patrimoniale des ressources génétiques et fonctionnelles à la base de la préservation des savoir-faire, même dans un système « boîte noire ». Dans les filières fromagères, elle doit s'appuyer sur la conservation des pratiques traditionnelles qui ont fait leurs preuves : levains naturels, utilisation de la gerle*, savoir-faire ancestral. Elle prend tout son sens dans les filières sous signes de reconnaissance où le maintien de la biodiversité* est attendu par l'union internationale pour la conservation de la nature comme « les fers de lance d'une évolution de ce secteur » (Daniel, 2010). Elle doit être raisonnée en se fondant sur une démarche scientifique et en exerçant moins de pression de sélection sur les communautés microbiennes. Ces écosystèmes* ainsi préservés constituent des observatoires de biodiversité* dont l'évolution structurelle et fonctionnelle pourra être suivie par les indicateurs évoqués et mise en relation avec les bénéfices attendus sur les qualités des produits laitiers.

La conservation du patrimoine microbien passe aussi par leur préservation *ex situ*, tâche difficile lorsqu'on veut préserver toute la diversité. Elle ne peut exister et continuellement s'enrichir qu'au travers du maintien *in situ* de la biodiversité*. Les centres de ressources biologiques (CRB) s'inscrivent dans cette logique en s'efforçant de préserver en collection les ressources biologiques, de caractériser leurs potentialités pour une exploitation future, de constituer des banques d'acides nucléiques*. Plus spécifiquement, une stratégie a été mise en place au niveau français pour la préservation *ex situ* du patrimoine microbien des produits laitiers.

La sauvegarde des écosystèmes* naturels, en attendant de mieux les connaître et/ou dans l'idée d'avoir une réserve biologique pour faire face à des accidents (phages) ou pour répondre à de nouveaux besoins, a été adoptée par certaines AOC qui ont constitué des banques de flores.

5. Synthèse et perspectives

La biodiversité*, désignant la diversité des organismes vivants, notamment dans le cas des

écosystèmes* microbiens du lait, est difficile à mesurer. S'il est entendu que la biodiversité* doit être préservée, les avis divergent sur le niveau de sa sauvegarde mais convergent pour combiner des stratégies de préservation *in situ* et *ex situ*.

Par ailleurs, préserver la biodiversité* ne doit pas nous faire oublier que celle-ci évolue sans cesse. Nous devons observer et analyser si cette évolution spatiale et temporelle à tous les niveaux (diversité génétique, diversité d'espèces*, diversité des fonctions et des interactions structurelles et fonctionnelles entre les espèces* et diversité des conditions physicochimiques l'environnant) affecte le fonctionnement de nos écosystèmes* laitiers et *in fine* les qualités des fromages.

Références principales

Amann R, Ludwig W, Schleifer KH. 1995. Phylogenetic Identification and in Situ Detection of Individual Microbial Cells Without Cultivation. Microbiol. Rev. 59, 1, 143-69.

Anonymous, <http://www.bacterio.cict.fr>, 3 mai 2010.

Chevassus-au-Louis B. 2007. Biodiversité : un nouveau regard sur la diversité du vivant I. Immensité et complexité. Cahiers Agricultures 16, 3, 219-27.

Daniel Gilles. 2010. Biodiversité : l'UICN mise sur les labels de bonnes pratiques agricoles, <http://www.developpementdurablejournal.fr/spip.php?Article5887>, 3 mai 2010.

Whitman WB. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 6578-6583.

B. Microflore du lait et caractéristiques sensorielles des fromages

Antoine BERODIER

Centre Technique des Fromages Comtois (CTFC)
9, avenue Wladimir Gagneur, 39800 Poligny

Henry-Eric SPINLER

AgroParisTech - Centre de Grignon
Avenue Lucien Brétignières - 78850 Grignon

1. Évolution de la microflore du lait dans les fromages

a. Prédominance de la microflore du lait dans la pâte du fromage au cours de l'affinage

Une partie importante de la microflore du lait se retrouve en quantité suffisante dans la pâte du fromage pour intervenir dans les processus biochimiques de l'affinage. Les dynamiques de ces populations microbiennes peuvent varier suivant les espèces* et les technologies, mais elles sont constatées dans tous les produits étudiés.

Au cours de la fabrication du fromage au lait cru, la microflore naturelle du lait subit des stress plus ou moins nombreux et éprouvants (acidification, égouttage, chauffage...) selon la technologie de fabrication mise en œuvre. De plus, dans le but d'obtenir une acidification correcte et un égouttage suffisant, le fromager procède généralement en début de fabrication à un ensemencement lactique que l'on peut considérer comme massif (plus de 10^6 UFC*/ml de lait de fabrication) en regard de la microflore naturelle du lait (moins de 10^5 voire moins de 10^4 UFC*/ml). Ce déséquilibre des populations s'accroît encore au cours de la fabrication, toujours au profit des bactéries lactiques qui se développent et assurent l'acidification du caillé. Ainsi, au moment du démoulage des fromages, on obtient des niveaux de bactéries lactiques acidifiantes proches de 10^8 à 10^9 UFC*/g de caillé contre moins de 10^4 UFC*/g de caillé pour la microflore naturelle du lait.

Ainsi, on pourrait penser que la microflore naturelle du lait subit une telle compétition microbienne qu'elle se trouve très minoritaire pour prétendre jouer un rôle pendant l'affinage. Pourtant, on la retrouve dans les fromages en cours d'affinage (Agabriel *et al.*, 1999) et elle joue un rôle très important sur les caractéristiques finales du fromage. Par exemple, la flore lactobacille

mésophile hétérofermentaire, pourtant minoritaire au moment du démoulage, est capable de se développer dans les fromages au cours de l'affinage et d'atteindre des niveaux de population suffisants pour prétendre jouer un rôle dans l'évolution biochimique des fromages.

En Comté, fromage à pâte cuite pressée fabriqué au lait cru de vache, Grappin *et al.*, 1999 ont montré que les microflores lactiques acidifiantes -streptocoques et lactobacilles thermophiles- largement dominantes au démoulage (10^8 UFC*/g) ont une population qui décroît pendant les premières semaines d'affinage. A l'inverse, deux microflores naturelles du lait - lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et bactéries propioniques* - se développent rapidement pour devenir majoritaires dès 4 à 8 semaines d'affinage (figure 4). Ces dynamiques ont été observées sur un ensemble de 20 fromages issus de 5 fruitières* et ont pu être confirmées ensuite par d'autres travaux (Bouton *et al.*, 2009).

Cependant, les auteurs notent qu'une partie de la microflore naturelle du lait se développe peu ou pas dans la pâte du Comté en cours d'affinage ; c'est le cas par exemple des entérocoques, lactocoques, coliformes...

D'autres dynamiques de populations microbiennes ont aussi été observées en Salers, fromage à pâte pressée au lait cru de vache (Callon *et al.*, 2005). Les microflores naturelles du lait ou issues de la gerle* en bois servant à la fabrication, telles que leuconostocs, lactobacilles mésophiles hétérofermentaires mais aussi levures, croissent au cours de l'affinage ; cependant seules les deux premières populations atteignent 10^6 UFC*/g et prennent donc une place importante dans l'écosystème* microbien du fromage.

En Ossau-Iraty, fromage à pâte pressée au lait de brebis, les lactobacilles mésophiles hétérofermentaires deviennent dominants au cours de l'affinage (Feutry *et al.*, 2011a) quelle que soit l'origine des 6 fromages et les levains utilisés en fabrication. Les leuconostocs ont, quant à eux, une place plus variable dans l'écosystème* du fromage et d'autres flores, comme précédemment, restent présentes sans être dominantes (entérocoques, lactocoques).

Dans les fromages à pâte molle et affinage court, des constats similaires ont aussi été faits. Ainsi, dans des Camemberts issus de 3 fromageries, Dubernet *et*

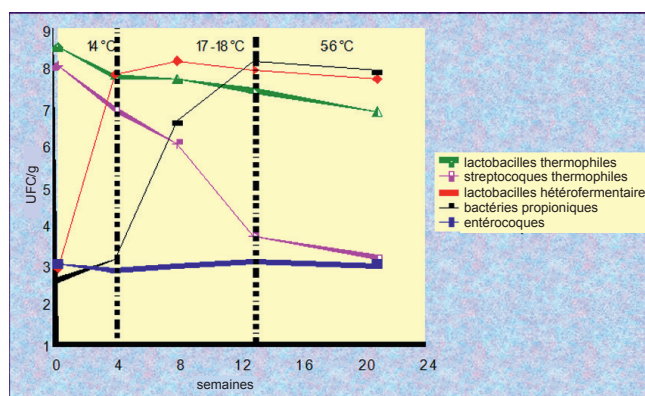


Figure 4. Évolution de la population (en UFC*/g) de différentes flores bactériennes au cours de l'affinage du Comté.

al., 2008 ont mis en évidence, dès 14 jours d'affinage, la présence importante (10^6 à 10^9 UFC*/g) de lactobacilles hétérofermentaires (*Lactobacillus paracasei*, *plantarum*...), en été comme en hiver. Néanmoins, les dynamiques de ces populations pendant l'affinage varient selon les fromageries étudiées. Il faut relativiser l'impact relatif de ces flores dans ces fromages. En effet, le rapport surface /volume de ces produits est élevé, donnant un rôle très important à la flore de surface. La biomasse correspondant à ces micro-organismes et l'activité de ces flores anaérobies est probablement faible comparée à celle des flores aérobies qui se développent à la surface (comme *P. camemberti* par exemple). Cependant, cette microflore anaérobie, qui a été peu étudiée et dont les métabolites* aromatiques restent dans la pâte, mériterait sans doute plus d'intérêt.

Enfin, dans des fromages Venaco, pâte molle au lait cru de chèvre ou de brebis, la microflore naturelle du lait, en absence de tout ensemencement lactique, se développe rapidement (Casalta, 2003). Ainsi, après 2 jours d'affinage, les lactocoques atteignent 10^9 UFC*/g et, après 15 jours d'affinage, les lactobacilles hétérofermentaires se situent à 10^6 - 10^7 UFC*/g. D'autres microflores (*leuconostocs sp.*, entérocoques) restent à des niveaux plus modestes d'environ 10^3 à 10^4 UFC*/g.

Enfin, des flores plus spécifiques vont, dans certains fromages, se développer pour atteindre des populations conséquentes (leuconostocs en Salers, bactéries propioniques* en Comté...).

b. Diversité de la microflore de surface pendant l'affinage

A la surface, les microflores se développent en aérobiose. De ce fait, elles ont un métabolisme* très actif. Il s'agit de levures, de champignons filamenteux et de bactéries. Malgré leur nombre et du fait de leur petite taille, les bactéries de surface représentent une biomasse plus faible que celle des champignons dans leur ensemble. Aussi l'importance et le rôle des microflores du lait dans la flore de surface des fromages sont moins systématiques que pour la microflore de la pâte.

Sur des livarots, il a été observé une importante évolution de la biodiversité* des bactéries (et dans une moindre mesure des levures) au cours de l'affinage mais le lien avec le lait cru n'a pas été spécifiquement étudié. Larpin-Laborde, 2006a a étudié de façon détaillée la biodiversité* des microflores de surface de 3 laits (2 pasteurisés et 1 cru) à 3 stades d'affinage. Malgré l'utilisation de lait pasteurisé dans 2 laits sur 3, la diversité des flores de surface est très élevée (entre 58 et 61 taxons différents dans chacun des fromages). Au total, 82 taxons microbiens ont été mis en évidence (27 levures, 29 bactéries à Gram négatif, 26 bactéries à Gram positif). L'importance des bactéries à Gram négatif est souvent négligée. Il est clair aujourd'hui qu'elles peuvent contribuer significativement à l'arôme des fromages à pâte molle et croûte lavée (Deetae *et al.*, 2009).

Des munsters, les uns au lait cru, les autres au lait pasteurisé ont été comparés par Feurer *et al.*, 2004a. Cette étude montre que les fromages issus de laits crus présentent une biodiversité* supérieure mais il a aussi été montré que les flores nonensemencées viennent aussi de contamination lors de la fabrication. Un traçage des flores du lait dans le fromage n'a pas été réalisé. Or, c'est la seule méthode (qui est possible aujourd'hui) qui permettrait de démontrer que les flores du lait sont bien celles que l'on retrouve dans l'écosystème* microbien du fromage. Il se peut très bien que la plus grande diversité de la flore rencontrée dans ces fromages soit liée au mode de fabrication fermier par rapport au fromage industriel. Les flores présentes dans l'environnement des ateliers malgré les procédures de nettoyage sont parfois surprenantes comme ces *Marinolactobacillus psychrotolerans* identifiés auparavant dans les mers arctiques.

Cette contamination dans les ateliers qui est une importante source de diversité doit impérativement être considérée dans les fromages à pâte molle comme un facteur contribuant à l'élaboration de la qualité au même titre que les apports microbiens des laits crus (Feurer *et al.*, 2004b).

Dans des fromages de type Banon, la dynamique des staphylocoques à coagulase négative (SCN) et des entérocoques a été suivie du lait au fromage affiné. Les SCN augmentent progressivement jusqu'à atteindre des niveaux compris entre 10^7 et 10^8 UFC*/g sur fromages affinés (environ 25 jours après emprésurage) (Goncalves, 2008). En 2009, toujours en Banon AOC, les flores d'affinage (microcoques, SCN, levures et moisissures) sont comprises entre 10^2 et 10^3 UFC*/ml de lait cru. Lorsque les fromages sont au stade du pliage (J +5 à +7 jours), les SCN sont à des niveaux de 10^5 UFC*/g alors que les microcoques, levures et moisissures sont entre 10^7 et 10^8 UFC*/g. Les moisissures dominantes retrouvées sur les fromages affinés appartiennent à l'espèce* *Geotrichum candidum*. Les mêmes souches* (résultats basés sur l'amplification et le séquençage du gène codant pour la tubuline) peuvent se retrouver sur des fromages issus d'exploitations différentes (Barral et Fatet, 2010).

2. Microflore naturelle du lait et caractéristiques organoleptiques des fromages

Au cours de l'affinage des fromages, diverses transformations biochimiques des caséines (protéolyse primaire* et secondaire*), de la matière grasse (lipolyse), des acides aminés, des acides gras, des citrates et des lactates (fermentations) se produisent. Le fromage va ainsi « mûrir » et acquérir ses caractéristiques organoleptiques.

Ces transformations biochimiques mettent en jeu de nombreux phénomènes qui dépendent de la composition physico-chimique et biochimique initiale du lait, des paramètres technologiques (dont l'ensemencement lactique), de la composition physico-chimique du caillé, de sa structure et des conditions d'affinage. L'équilibre entre ces différents paramètres pourra être différent et plus ou moins stable suivant les fromageries, sans que l'on sache très bien comment l'expliquer.

Les transformations subies par les constituants du caillé vont permettre au fromage d'acquérir d'une part

une texture caractéristique (sous l'effet de la protéolyse essentiellement) et d'autre part un goût développé et caractéristique sous l'effet de la protéolyse, des fermentations, de la lipolyse et de transformations biochimiques diverses telles la décarboxylation et la désamination des acides aminés.

a. Effet de la suppression de la microflore par microfiltration ou pasteurisation du lait

La suppression de la microflore du lait cru mis en fabrication entraîne une perte de goût et une diminution de la richesse du goût du fromage.

En technologie de pâte cuite pressée, lorsque l'on supprime la flore du lait cru par microfiltration*, tout en faisant varier l'ensemencement lactique, on constate, par comparaison avec les mêmes fromages fabriqués au lait cru et après 4 mois d'affinage (Bouton et Grappin, 1995a), une baisse de l'intensité du goût (5,1 au lieu de 5,9/10) et de la typicité (3,6 au lieu de 4,9/10). Ces observations ont été confirmées par Beuvier *et al.*, 1997 qui constatent que les fromages au lait cru sont plus aromatiques que ceux fabriqués à partir de lait microfiltré ou pasteurisé (respectivement 3,9, 3,0 et 3,6/10). En complément de cette perte de goût, les fromages au lait microfiltré sont jugés plus amers et moins piquants dans les deux études considérées.

A noter, par contre, que les caractéristiques de pâte (fermeté, onctuosité, élasticité) ne sont pas ou sont peu influencées par la présence ou non de microflore naturelle du lait.

Cette atténuation des caractéristiques de goût lorsque l'on supprime la microflore du lait avant mise en fabrication, a pu être rapprochée d'un affaiblissement des phénomènes biochimiques au sein du caillé : la dégradation des acides aminés issus de la protéolyse est plus faible, générant par voie de conséquence moins de molécules aromatiques, et la fermentation propionique* devient très réduite. Cet affaiblissement dépend aussi de la nature du cocktail de ferment utilisé. Le rôle essentiel des *Lactobacillus delbrueckii* apportés par les levains dans l'augmentation de la protéolyse secondaire* en pâte pressée cuite a été mis en évidence (Champonnois *et al.*, 2009).

En technologie de pâte pressée, des observations identiques ont été faites en comparant des fromages

au lait cru et au lait pasteurisé. Ainsi, Buchin *et al.*, 1998 ont pu mettre en évidence, en pasteurisant le lait, une perte d'intensité d'arôme des fromages qui passent d'une note de 5,1 pour le lait cru à 4,7/10 pour le lait pasteurisé ainsi qu'un profil aromatique différent ; les fromages au lait pasteurisé présentent en particulier moins d'arômes de type végétal et animal et plus d'arômes lactés. Les saveurs acide et piquante sont également moins intenses.

Verdier-Metz *et al.*, 2002, ont fait aussi ce même constat en Cantal : les fromages fabriqués au lait pasteurisé présentent, après 4 mois d'affinage, une intensité et une diversité d'arômes plus réduites que ceux fabriqués au lait cru. Ces écarts sur les profils aromatiques ont pu être corrélés à des différences de niveaux des composés aromatiques mesurés dans la pâte. Les fromages au lait cru présentent par exemple des taux d'alcools, d'acides gras et de composés soufrés plus élevés et des taux de méthyl-cétones* plus faibles.

A noter que pour ces deux études en pâte pressée, l'effet de la microflore du lait sur les caractéristiques organoleptiques est supérieur à celui de la composition en matière grasse du lait que les auteurs ont fait varier en jouant sur l'alimentation du troupeau laitier.

Si le rôle de la microflore du lait cru dans les phénomènes de protéolyse et de fermentation est bien démontré, son effet vis-à-vis de la lipolyse du fromage est plus discutée (Beuvier *et al.*, 1997) : l'action des lipases naturelles du lait et le faible niveau de lipolyse habituel de la plupart des fromages à pâte pressée, rend délicate la mise en évidence du rôle de la microflore du lait cru sur la transformation de la matière grasse.

L'ensemble de ces résultats démontre que la microflore du lait cru a un rôle prépondérant pour établir les caractéristiques de goût du fromage. L'intensité du goût et ses caractéristiques (typicité, richesse aromatique) sont largement déterminées par l'action de la microflore du lait qui se produit dans le fromage au cours de son affinage.

b. Effet du niveau et de la nature de la microflore du lait

Le niveau de microflore dans le lait ne semble pas, dans certaines limites, influencer les caractéristiques organoleptiques des fromages. Par contre, la nature de la flore est déterminante pour l'évolution du fromage à l'affinage et donc pour ses caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques.

La microflore du lait, en se développant dans le fromage au cours de l'affinage, est responsable en grande partie de la dégradation des constituants du caillé qui vont orienter les caractéristiques organoleptiques du fromage affiné.

Cependant, on peut se demander quel va être l'impact de la nature des différentes microflores et du niveau de ces microflores du lait vis-à-vis de ces transformations biochimiques.

Bouton, 2000, en technologie pâte pressée cuite, s'est attachée à comparer plusieurs niveaux de microflores de laits de mélange (composés de plusieurs laits de troupeaux) provenant de deux fromageries différentes ce qui lui a permis d'obtenir des équilibres de microflores différentes.

L'auteur observe que (figure 5) :

- d'une part, les fromages se répartissent le long de l'axe de protéolyse en fonction de l'origine de la microflore ; cela signifie que la nature de la microflore du lait, qui varie selon l'origine, a un impact plus important sur la protéolyse que la quantité de cette microflore ;

- d'autre part, la répartition des fromages le long de l'axe « fermentation propionique* » se fait au contraire en fonction du niveau de microflore ; cela tendrait à montrer que le niveau de microflore a un impact sur cette fermentation. Or, des taux différents d'acide propionique* (165 à 353 mg/100g) ont été obtenus avec un même niveau de microflore (env. 2×10^4 UFC*/ml) et *a contrario* des taux d'acide propionique* similaires (env. 330 mg/100g) ont été obtenus avec des niveaux de microflore très différents (2×10^4 à $2,6 \times 10^5$ UFC*/ml). Ceci souligne par conséquent l'importance primordiale de la nature de la microflore du lait.

Une approche similaire a été conduite en Camembert (Desmasures, 1995) où 3 exploitations ont été sélectionnées selon la charge microbienne et la proportion de microflore utile dans leur lait.

Sur la série de fabrications d'automne, le lait faiblement chargé en microflore (10^4 UFC*/ml) a donné les fromages les moins appréciés et le lait fortement chargé a donné les fromages les meilleurs. En revanche, sur la série d'hiver, les résultats sont inversés.

L'auteur conclut que le niveau de microflore n'intervient pas directement sur les caractéristiques sensorielles du Camembert mais que la nature de la flore est vraisemblablement plus importante sur ce plan. Un élément essentiel est l'équilibre entre les flores. Par exemple, des excès de *Geotrichum* dans les laits ont conduit dans le passé à des défauts caractérisés (peau de crapaud, fromages cassant, arômes putrides...). Dans des fromages à pâte molle, des niveaux initiaux de 10^3 spores/ml de ce micro-organisme sont déjà extrêmement élevés.

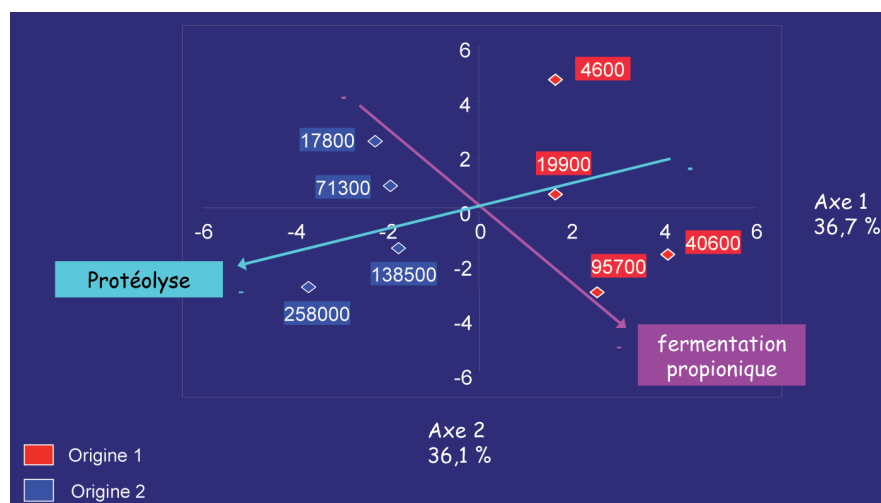


Figure 5. Représentation en ACP* des caractéristiques des fromages obtenus avec 2 microflores d'origines différentes (1 et 2) et des niveaux croissants dans le lait mis en fabrication.

Au regard de ces 2 études, **le niveau de microflore bactérienne du lait, dans une fourchette de population de 10^3 à 10^5 UFC*/ml, ne semble pas déterminer les caractéristiques organoleptiques des fromages ; par contre le type de microflore en fonction de l'origine (fermes différentes, fromageries différentes) paraît jouer un rôle majeur vis-à-vis des caractéristiques organoleptiques.**

Ce dernier point est confirmé par Demarigny *et al.*, 1997 : en récupérant par microfiltration* les 3 microflores de laits de fromageries géographiquement distantes puis en les ajoutant en quantités similaires sur 3 aliquots d'un même lait microfiltré, l'auteur a observé des différences de niveau de protéolyse et de profil fermentaire de fromage à pâte cuite en fonction de l'origine de la microflore.

Ainsi en partant de l'hypothèse que l'origine du lait (fermes différentes, fromageries différentes) conditionne la nature (composition, équilibres des espèces*, des souches*) de sa microflore, celle-ci joue un rôle majeur vis-à-vis des caractéristiques physico-chimiques.

Cette variation de la nature de la microflore en fonction de son origine a été vérifiée par Gueguen *et al.*, 1997 en Camembert. Des différences de répartition des sous-espèces de lactocoques (*Lactis* et *cremoris*) ont été mises en évidence entre des laits d'exploitations situées dans deux « terroirs » normands.

c. Microflore du lait et signature organoleptique des fromages

La nature de la microflore du lait assure la diversité organoleptique des fromages au lait cru.

La nature de la microflore du lait, abordée sous l'angle de l'origine du lait, a un rôle sur les phénomènes biochimiques se déroulant dans le fromage au cours de l'affinage. Il s'avère opportun de confirmer si les variations de la nature de la microflore du lait ont un impact sur les caractéristiques organoleptiques du fromage affiné.

En fabrication de Salers (Callon *et al.*, 2005), un même lait pasteurisé a été réensemencé avec 3 microflores de lait de fermes différentes (rétentats de microfiltration* de 3 laits) à un niveau de 10^5 UFC*/ml. Chaque lait « cru » ainsi reconstitué est

fabriqué séparément puis les fromages sont affinés dans les mêmes conditions.

24 descripteurs sensoriels ont permis de discriminer les fromages en fonction de la microflore d'origine ; mais seulement quelques composés volatils d'arômes mesurés en chromatographie* haute résolution se révèlent être présents en quantités différentes.

Les différences de profils aromatiques entre les fromages ont pu être reliées à des différences de profil microbiologique des fromages affinés. Ces relations entre variables sensorielles et variables microbiologiques se révèlent multifactorielles : un ou des arômes ne peuvent pas être attribués à la présence d'une seule espèce* ou souche* microbienne. Elles démontrent par conséquent que la complexité de l'écosystème* microbien du lait est à l'origine de la richesse aromatique du fromage.

En technologie pâte pressée cuite, une étude similaire a été menée (Demarigny *et al.*, 1997) : 3 microflores extraites par microfiltration* de 3 laits de fromageries à Comté différentes ont été réintroduites dans un même lait microfiltré constituant ainsi 3 laits « crus » avec des niveaux d'ensemencement similaires (A : 66 000 UFC*/ml ; B : 71 000 UFC*/ml ; C : 36 000 UFC*/ml) ; le lait microfiltré pauvre en microflore (MF : 1 600 UFC*/ml) servant de témoin.

Après 6 mois d'affinage, un jury de dégustation a pu, non seulement discriminer les fromages issus des laits avec microflore d'une part et le fromage témoin sans microflore d'autre part, mais aussi différencier les fromages selon la microflore d'origine (figure 6). En effet, 7 variables discriminent les 4 groupes de fromages et parmi celles-ci figurent 4 variables relevant de la partie aromatique : intensité de l'odeur, intensité du goût, arôme de beurre, arôme propionique*.

Dans ces deux études, en faisant varier l'origine de la microflore et tout en perturbant le moins possible sa composition, les auteurs ont voulu mettre en évidence le rôle primordial de la nature de cette microflore vis-à-vis des caractéristiques organoleptiques.

La microflore du lait en terme de composition et d'équilibres microbiens revêt donc une importance majeure vis-à-vis de la richesse aromatique du goût intra et inter fromage (cette dernière étant aussi appelée diversité aromatique en Comté).

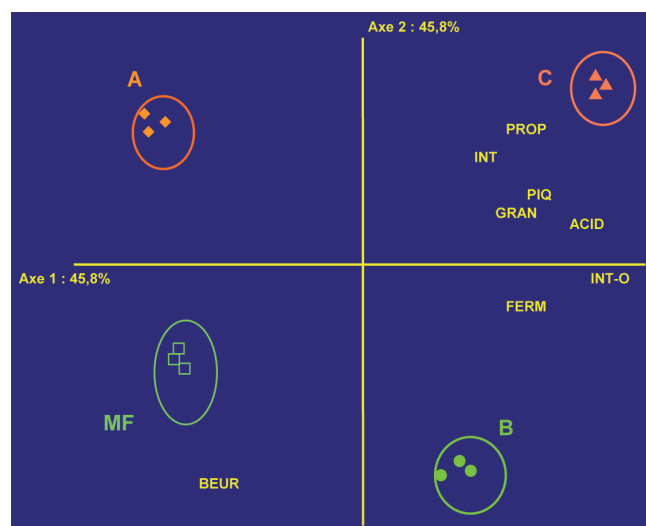


Figure 6. Analyse factorielle discriminante des données sensorielles obtenues sur les fromages d'hiver après 6 mois d'affinage (MF : microfiltrés; A,B,C microflore de 3 laits crus différents).

3. Interactions avec la flore des levains et rôle des levains « sauvages »

La microflore du lait et son impact sur le fromage sont conditionnés en partie par la flore lactique acidifiante apportée au cours du procédé de fabrication. L'utilisation d'un levain sauvage* renforcerait l'action de la microflore naturelle du lait.

La microflore du lait joue un rôle important vis-à-vis des caractéristiques organoleptiques du fromage. Ce rôle s'explique par le développement de cette microflore dans la pâte du fromage au cours de l'affinage.

Cependant, la fabrication d'un fromage nécessite généralement l'apport de levains lactiques qui vont assurer très largement l'acidification et l'égouttage du caillé. Cet apport souvent très majoritaire (10^6 UFC*/ml) en comparaison du niveau de la microflore du lait va interagir avec la microflore initiale du lait. Cet apport va se développer rapidement (10^8 à 10^9 UFC*/ml); on dit qu'il a pour mission « d'occuper le terrain ». Mais ces levains et la microflore naturelle du lait vont devoir coexister et interagir dans le lait.

Une approche pour estimer ces interactions entre microflore naturelle du lait et levains lactiques a été conduite par Bouton *et al.*, 2009 : dans du lait microfiltré, des associations maîtrisées de lactobacilles mésophiles hétérofermentaires (*L. paracasei*, *L.*

rhamnosus), d'entérocoques (*E. faecium*) et de bactéries propioniques* (*Propionibacterium freudenreichii*) ont été testées en ajout dans des fabrications de pâte cuite pressée (10^3 UFC*/ml) subissant par ailleurs un ensemencement lactique classique (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* et *L. helveticus*) nécessaire à l'acidification et l'égouttage du caillé.

Vis-à-vis des caractéristiques biochimiques et sensorielles des fromages, les entérocoques ont joué un rôle très limité. C'est d'ailleurs une flore bactérienne qui se développe peu dans le fromage (10^4 à plus de 10^5 UFC*/ml).

En revanche, la flore lactobacille mésophile hétérofermentaire a influencé la croissance des flores lactique et propionique*.

Des interactions entre bactéries lactiques et bactéries propioniques* ont aussi été observées en laboratoires (Grappin *et al.*, 1999). Certaines espèces* de bactéries lactiques stimulent la croissance des bactéries propioniques*, d'autres la ralentissent. Ces interactions peuvent s'expliquer par des interactions métaboliques entre ces bactéries : certaines bactéries lactiques peuvent par exemple produire des nutriments nécessaires aux bactéries propioniques*, alors que d'autres vont au contraire les consommer et donc entrer en compétition.

Plusieurs expérimentations en Comté ont porté sur les interactions lait cru - levains en croisant l'origine (fruitière*) du lait et celle du levain :

- des interactions entre microflore naturelle du lait, composition physicochimique et levains ont été mises en évidence vis-à-vis de l'ouverture des fromages en relation avec le niveau de protéolyse de la pâte (Bouton *et al.*, 1995b),
- des fromages fabriqués au lait cru dans 5 fromageries (Grappin *et al.*, 1999) soit avec les levains « sauvages* » de la fromagerie, soit avec des levains lactiques similaires sélectionnés, ont pu être discriminés selon le lieu de fabrication à partir de leur composition biochimique, microbiologique et de leurs caractéristiques sensorielles. Dans ce cas, l'incidence du type de levain (sauvage, sélectionné), même si elle existe, apparaît donc mineure puisqu'elle ne remet pas en cause les caractéristiques des fromages propres à chaque fromagerie,

• dans une même fromagerie, trois laits de mélange provenant de 3 fruitières* différentes ont été mis en fabrication soit avec les levains lactiques «sauvages» (ou indigènes*) de la fromagerie d'origine du lait, soit avec un ensemencement lactique sélectionné de composition et de niveau similaire. Après affinage, le jury de dégustation a pu (figure 7) d'une part discriminer les fromages selon l'origine du lait et cela quel que soit l'ensemencement lactique et d'autre part mettre en évidence une réduction des caractéristiques sensorielles -intensité aromatique, richesse aromatique et persistance du goût- des fromages fabriqués avec les ferments sélectionnés comparativement à ceux fabriqués avec les levains «sauvages*» (Bérodier, 1996).

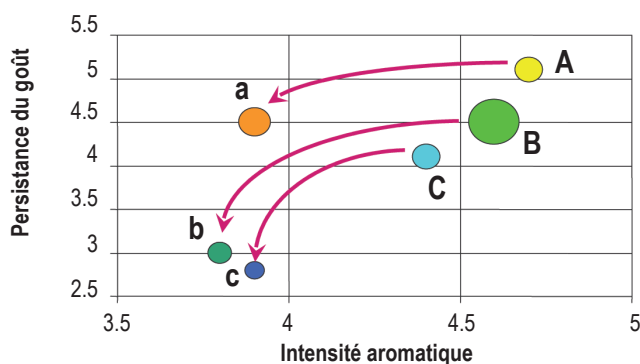


Figure 7. Effet du changement d'ensemencement lactique sur les caractéristiques de goût de Comté : A B, C fromages fabriqués avec les levains «sauvages*»; a, b, c fromages fabriqués avec les levains sélectionnés. La taille du cercle illustre la richesse aromatique (c'est-à-dire le nombre de descripteurs d'arôme), d'après Bérodier, 1996.

Les ferments sélectionnés ont ici, en quelque sorte, atténué l'impact de la microflore du lait puisque les fromages a, b, c ont respectivement des arômes moins intenses et moins persistants que ceux de A, B, C ainsi qu'une richesse aromatique souvent plus faible.

Au regard de ce résultat, les levains «sauvages*» pourraient être considérés comme des «amplificateurs» des effets de la microflore du lait. Il est aussi possible que les levains sauvages* soient mieux adaptés à la technologie utilisée dans l'essai ou plus compatibles avec les flores présentes dans le lait cru.

C'est ce même résultat que tend à montrer Dalmasso, 2009 : pour 2 modèles fromagers, elle constate que l'utilisation d'un levain «naturel*» permet, au fil du temps, d'obtenir un levain avec une certaine spécificité des souches*. Cette spécificité

s'acquerrait plus rapidement en technologie lactique qu'en pâte pressée non cuite.

Par ailleurs, cet ensemencement en levain «naturel*» agit sur les caractéristiques sensorielles des fromages qui évoluent au fil de son utilisation à partir de l'initialisation de l'ensemencement.

Dans le fromage, et comme certainement au cours de la fabrication, les levains lactiques entrent donc bien en interaction avec la microflore du lait.

Ces interactions sont complexes et peuvent vraisemblablement être différentes selon la composition du ferment lactique utilisé et de son utilisation (dose par exemple).

L'utilisation d'un levain «sauvage*» semble ainsi être un atout supplémentaire pour renforcer l'action de la microflore du lait, même s'il ne faut pas oublier qu'il peut être à l'origine de contaminations phagiques.

D'autres résultats d'études en lait de chèvre et de brebis vont également dans ce sens. En Venaco (Casalta, 2003), 3 levains composés de souches* «sauvages» de bactéries lactiques ont été testés tant en lait cru de chèvre qu'en lait cru de brebis. Les souches* inoculées dans le lait par les levains, tout comme les bactéries lactiques de la microflore indigène sont retrouvées dans le fromage durant l'affinage; il s'avère ainsi qu'un certain équilibre s'établit entre cette microflore et les souches* du levain. Des écarts de composition physico-chimique des fromages affinés ont été observés conduisant à des différences significatives des propriétés sensorielles des fromages.

En fromage Ibores au lait de chèvre cru (Gonzalez *et al.*, 2003), les fromages fabriqués avec deux levains autochtones (4 souches* de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*) obtiennent de meilleures notes que ceux fabriqués avec un levain du commerce mais ne présentent pas de différence significative avec ceux faits sans addition de levain.

Partidario, 1999, sur le fromage Serra da Estrela au lait cru de brebis, a noté que l'apport de levain «sauvage*» modifie l'activité lipolytique et la production de certains composés volatils pendant toute la durée d'affinage et améliore alors les caractéristiques organoleptiques des fromages.

4. Zoom sur le rôle de certaines flores

a. Flore hétérofermentaire et flore entérocoque

Les rôles respectifs des lactobacilles mésophiles hétérofermentaires (LHF) et des entérocoques, espèces* caractéristiques de la microflore indigène du lait, ainsi que l'interaction de ces espèces* avec les autres flores ont été étudiés en modèle pâte pressée cuite (Bouton *et al.*, 2009).

L'ajout de lactobacilles mésophiles hétérofermentaires a pour effet une production supérieure en composés volatils (alcools, esters...). Les auteurs estiment que la flore lactobacille mésophile hétérofermentaire du lait pourrait jouer un rôle important dans la diversité sensorielle des fromages au lait cru à pâte pressée cuite.

Cette hypothèse est largement répandue ; elle est étayée par le fait que, dans les fromages, la flore lactobacille mésophile hétérofermentaire devient rapidement majoritaire. Elle atteint des niveaux de population conséquents qui lui permettent d'avoir une action notable sur les constituants du fromage.

En ce qui concerne la flore entérocoque, la plupart des travaux montrent qu'elle reste à un niveau de population faible dans le fromage au cours de l'affinage. Ce faible niveau ne permet pas aux entérocoques une action notable sur l'évolution physico-chimique des fromages. Ainsi, Bouton *et al.*, 2009 démontre que l'ajout d'entérocoques ne modifie pas les profils en composés volatils des fromages. Mais d'autres études illustrent à contrario leur rôle dans l'aromatisation des fromages.

b. Flore levurienne

Dans la microflore naturelle du lait, peu d'importance a été accordé aux flores fongiques sinon à l'occasion de défauts. Néanmoins, il apparaît que dans les fromages à pâte molle, les levures et les moisissures ont un rôle essentiel. Dans les fromages à croûte lavée, les levures, en particulier, jouent un rôle très important (Irlinger et Mounier, 2009 ; Larpin-Deborde, 2006a ; Larpin *et al.*, 2006b).

La flore levurienne a un rôle majeur dans l'arôme des fromages à pâte molle, d'une part parce qu'elle participe à la désacidification et ainsi au développement des bactéries d'affinage à la surface des fromages, d'autre part par sa production propre

d'arômes (largement montré chez *Geotrichum* et *Kluyveromyces lactis*) (Martin *et al.*, 2002). En dehors des souches*ensemencées, une part de cette microflore vient sans doute du lait dans les fromages au lait cru (*Geotrichum* par exemple) ou de contaminations ultérieures pendant la fabrication (Feurer *et al.*, 2004b).

Les levures vont se développer dans les caillés lactiques très rapidement après l'égouttage. C'est le cas en particulier de *K. lactis* mais cette espèce* ne persiste pas dans les fromages et l'étude qui a été réalisée sur un ensemble de fromages européens (programme Européen SCM) à croûte lavée montre que cette espèce* n'est quasiment plus présente en milieu d'affinage et a disparu en fin d'affinage. Peu après, une autre espèce*, *Debaryomyces hansenii*, va se développer (Leclercq-Perlat *et al.*, 2009). Cette levure développe des arômes maltés. Ces deux levures vont épuiser le lactose résiduel, commencer un travail très significatif de désacidification du caillé et dégrader les acides aminés libres pour produire des alcools, des aldéhydes et des esters donnant des arômes fruités très caractéristiques des fromages en début d'affinage. *Geotrichum* leur succède, il continue à consommer le lactate et ainsi va permettre des conditions favorables au développement des bactéries d'affinage. Sur certains fromages, comme le livarot, une large diversité d'espèces* de *Geotrichum candidum* est présente. Il a été montré que cette espèce* est capable de changer la typicité aromatique du Camembert (Molimard *et al.*, 1997), montrant que malgré son implantation précoce, il avait un rôle organoleptique décisif. Des travaux plus récents montrent que c'est un micro-organisme qui reste très actif jusqu'à la fin de l'affinage alors que beaucoup d'autres ont disparu (Bonaiti, 2004). Par des méthodes de simplification d'un écosystème* où chaque souche* de levure a été omise à l'inoculation, il a été montré que les levures ont un impact très important et beaucoup plus important que les bactéries dans l'équilibre de l'écosystème* (Bonaiti, 2004).

c. Staphylocoques à coagulase négative

Les staphylocoques à coagulase négative comme leurs homologues suspects à coagulase positive sont des micro-organismes qui sont compétitifs avec les bactéries lactiques, c'est-à-dire qu'ils arrivent à croître significativement avant que la chute de pH

provoquée par les bactéries lactiques soit suffisante pour empêcher leur croissance.

Ces souches* en culture pure donnent des arômes chocolatés voire phénoliques (odeurs d'encres ou de crottin de cheval). Elles sont fréquentes dans de nombreux produits fermentés où elles peuvent jouer des rôles importants (Morot-Bizot, 2006). Néanmoins, leurs rôles aromatiques dans les fromages à croûte lavée ne semblent pas très significatifs.

Les souches* les plus communes sont *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus xylosus* (Irlinger, 2000).

d. Corynébactéries

Les bactéries corynéformes qui sont présentes sur ou dans les fromages offrent une large diversité. Cette famille a un rôle majeur sur l'élaboration de la couleur et de l'arôme. Les principaux genres* rencontrés sont *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium Mycetocola* (Bora et al., 2008) et *Brachybacterium*. Certaines espèces* comme *Arthrobacter arilaitensis* sont ubiquistes, c'est-à-dire qu'il est possible de les trouver dans une grande diversité de fromages. Des travaux sont en cours pour essayer de comprendre pourquoi cette bactérie est si bien adaptée au fromage. Les *Arthrobacter* ont des activités protéolytiques et lipolytiques importantes et, paradoxalement, ne jouent pas de rôle direct dans la formation de composés volatils contrairement aux espèces* *Brevibacterium linens* et *B. aurantiacum* qui sont beaucoup moins communes et qui sont productrices de grandes quantités d'arômes (en particulier d'arômes soufrés). Les voies de synthèse de ces composés et leur expression sont aujourd'hui bien connues chez *B. linens*. Les interactions entre micro-organismes impactent les arômes produits par cette espèce* (Mansour et al., 2009).

De même, il a été montré que la couleur donnée à la surface du fromage par une souche* peut être influencée par les levures qui désacidifient le milieu (Leclercq-Perlat et al., 2004). La technologie mise en œuvre pour faire un fromage à croûte lavée aura aussi un impact sur la couleur des bactéries du genre* *Brevibacterium* et *Arthrobacter* (Leclercq-Perlat et al., 2010).

e. Bactéries à coloration de Gram négative

Pendant très longtemps, les bactéries à Gram négatif ont été considérées comme des contaminants indésirables des fromages. Récemment, les travaux d'inventaires réalisés sur des fromages à croûte lavée ont montré que certaines espèces* non seulement étaient présentes de façon récurrente sur les fromages mais étaient aussi capables de produire des composés d'arôme d'intérêt (Deetae et al., 2009). Ces micro-organismes sont présents à la fois sur des fromages issus de lait cru et issus de laits pasteurisés. On ne peut donc pas dire que le lait en soit la source majeure mais qu'il s'agit plutôt d'implantation au cours de l'affinage à partir de l'environnement de fabrication du fromage. Parmi les espèces* rencontrées, on peut signaler *Proteus vulgaris*, *Psychrobacter sp.*, *Vibrio sp.* et *Halomonas sp.* (Mounier et al., 2009 ; Feurer et al., 2004b). Les propriétés de ces différentes souches* doivent maintenant être analysées pour savoir si elles ont un intérêt et si elles sont sans danger pour la santé.

5. Synthèse et perspectives

La microflore du lait cru intervient indiscutablement, au cours de l'affinage, dans l'élaboration des caractéristiques sensorielles des fromages et plus particulièrement du goût. Elle va intervenir directement lorsque certaines espèces* ou souches* pourront se développer suffisamment pour engendrer des modifications conséquentes des composants du fromage, ou bien son action sera indirecte lorsqu'elle agira en interaction avec la flore lactique des levains et/ou avec la microflore de surface.

Soulignons que l'incidence de la microflore du lait n'a pu être révélée qu'à travers une approche organoleptique suffisamment précise s'intéressant aux arômes des fromages.

Si le rôle de la microflore du lait sur les caractéristiques organoleptiques a pu être mis en évidence, il est toujours difficile d'expliquer les phénomènes réellement mis en jeu. En effet, les actions des différents micro-organismes du lait présents dans le fromage sont complexes et nombreuses ; elles sont aussi évolutives car dépendantes d'une dynamique de croissance et d'activités (en nombre mais aussi en nature) des

micro-organismes au cours de l'affinage.

La microflore native du lait est le vecteur principal (mais non unique) qui permet d'accrocher le fromage à son terroir.

Cependant, il est indispensable que la suite du procédé d'élaboration du fromage respecte ce potentiel du lait. Ainsi, la technologie mise en œuvre, en particulier les pratiques stressantes pour la microflore du lait telles qu'acidification, chauffage du caillé, températures d'affinage..., devront être maîtrisées et il faudra éviter toute dérive des pratiques pour ne pas altérer le potentiel de cette microflore. Les études concernant les interactions avec les levains lactiques illustrent l'effet des pratiques de fabrication. Il en est de même du procédé d'affinage, qui lui a pour rôle de révéler le potentiel de la microflore du lait pour élaborer les caractéristiques du fromage.

Sur ce plan, des études sont en cours dans certaines filières fromagères et envisagées dans d'autres. Elles offriront des connaissances complémentaires et indispensables pour orienter les pratiques vers une meilleure maîtrise de la richesse et diversité organoleptique des fromages de terroir.

En complément des pratiques, il ne faut pas oublier le rôle probable de l'ambiance de la fromagerie et de la cave d'affinage ; le lait est transformé dans une salle de fabrication, le caillé affiné dans une cave qui elles aussi détiennent leur propre écosystème* microbien.

S'interroger sur les effets éventuels de cette microflore de la fromagerie ou de la cave est aussi un élément qui contribuera certainement à préserver la biodiversité microbienne* utile à l'identité des fromages de terroir.

Références principales

Bérodier F, Bouton Y. 1996. Lien entre la flore bactérienne des laits et le goût du Comté à affinage constant. Rapport interne, CTC, 25 pages.

Beuvier E, Buchin S. 2004. Raw milk cheeses. *Cheese* 1, 319-345.

Beuvier E, Berthaud K, Cegarra S, Dasen A, Pochet S, Buchin S, Duboz G. 1997. Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. *Int. Dairy J.* 11, 311-323.

Bonaiti C. 2004. Approches dynamiques des fonctions et des interactions microbiennes dans un écosystème reconstituée par une méthode d'omission : exemple de l'affinage du fromage de Livarot. Thèse de Doctorat, Institut National agronomique Paris-Grignon, 200 pages.

Bouton Y. 2000. Incidences du niveau de flore d'un lait de fabrication sur la qualité d'un fromage à pâte pressée cuite. *Les Nouvelles du Comté* 30, 1-4.

Bouton Y, Grappin R. 1995a. Comparaison de la qualité de fromages à pâte pressée cuite fabriqués à partir de lait cru ou microfiltré. *Lait* 75, 31-44.

Buchin S, Delague V, Duboz G, Berdague JL, Beuvier E, Pochet S, Grappin R. 1998. Influence of pasteurization and fat composition of milk on the volatile compounds and flavor characteristics of semi-hard cheese. *J. Dairy Sci.* 81, 3097-3108.

Callon C, Berdagué JL, Dufour E, Montel MC. 2005. The effect of raw milk microbial flora on the sensory characteristics of Salers-type cheeses. *J. Dairy Sci.* 88, 3840-3850.

Casalta E. 2003. Bases scientifiques de la qualité du Venaco, fromage traditionnel au lait cru. Mise au point de ferments sélectionnés spécifiques. Thèse de Doctorat, Université de Bourgogne, 136 pages.

Demarigny Y, Beuvier E, Buchin S, Pochet S, Grappin R. 1997. Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. II. Biochemical and sensory characteristics. *Lait* 77, 151-167.

Desmasures N. 1995. Etude de laits de haute qualité: caractéristiques microbiologiques et aptitude à la transformation en camembert au lait cru. Thèse de Doctorat, Université de Caen, 285 pages.

Feurer C, Vallaëys T, Corrieu G, Irlinger F. 2004b. Does smearing inoculum reflect the bacterial composition of the smear at the end of the ripening of a French soft, red-smear cheese ? *J. Dairy Sci.* 87, 10, 3189-3197.

Les autres références citées dans cette partie sont listées en annexe.

C. Microflore du lait et effet barrière par rapport aux pathogènes

Julie BARRAL

Actilait - Centre de Carmeijane
Le château, 04510 Le Chaffaut-Saint-Jurson

La mise à profit de métabolites* produits par certains micro-organismes d'intérêt technologique pour lutter contre le développement des flores potentiellement pathogènes et d'altération a tenté de se développer dans les années 80-90 mais peu d'applications ont concrètement émergé. Actuellement, c'est donc la mise en œuvre de l'action combinée de divers micro-organismes, de différents produits de leur métabolisme* et des paramètres technologiques (technologie à barrières multiples), qui semble être une approche intéressante à exploiter.

Il est maintenant clairement reconnu que la diversité des écosystèmes* microbiens peut être mise à profit pour lutter contre l'implantation ou le développement de micro-organismes néfastes à la qualité du lait et des produits laitiers (Maoz *et al.*, 2003 ; Eppert *et al.*, 1997 ; Saubusse *et al.*, 2007). Les notions de protection et d'inhibition s'appliquent tant aux germes potentiellement pathogènes (aspect sanitaire) qu'aux micro-organismes pouvant altérer la qualité organoleptique des produits.

L'effet protecteur peut être défini comme l'effet protégeant le produit (ou sa surface, par exemple pour les planches d'affinage) de la contamination.

L'effet inhibiteur, quant à lui, entraîne un ralentissement de la croissance du micro-organisme, voire une diminution de sa population (au cours de la transformation fromagère par exemple).

Les premiers travaux portant sur ce sujet étaient plutôt ciblés sur les effets isolés de certains acides organiques ou certaines bactériocines* (la nisine* étant l'exemple le plus documenté) produits par les bactéries lactiques (Hurst, 1978 ; Dubois *et al.*, 1979). Le recours à un unique facteur d'inhibition, telles que les bactériocines*, ayant montré ses limites (Arque's *et al.*, 2004 ; Maisnier-Patin et Richard, 1994), les études réalisées ont progressivement mis en œuvre l'association de différents métabolites* afin de mettre en synergie leurs effets.

Bien qu'étant une notion ancienne (Leistner, 1985), le concept de « technologie à barrières multiples » s'avère être un moyen plus efficace de prévention du développement de micro-organismes pathogènes (Ghandi et Chikindas, 2007). L'action naturelle combinée de divers micro-organismes et métabolites* microbiens qui peut être rencontrée dans des écosystèmes* alimentaires tels que les fromages au lait cru, relève de ce type d'approche (Millet *et al.*, 2006).

1. Comment étudie-t-on les effets protecteur/inhibiteur des écosystèmes ?

Les études des effets protecteur/inhibiteur des écosystèmes* sont généralement d'une grande complexité et nécessitent de travailler à différents niveaux pour espérer obtenir des résultats quant au déroulement et à la nature de l'inhibition.

L'étude de ces effets peut être réalisée à 3 niveaux différents :

- **l'observation, sur le terrain**, de phénomènes d'inhibition d'un germe pathogène lors de la transformation fromagère. Par exemple, des résultats d'autocontrôles faisant apparaître des laits chargés en *S. aureus* et des fromages qui ne le sont pas ou très peu laisseraient penser que la technologie mise en œuvre et/ou l'action de l'écosystème* microbien du lait ont eu un effet inhibiteur (De Crémoux *et al.*, 2008),

- **l'étude en fromagerie expérimentale** qui vise à repérer des consortia microbiens inhibiteurs naturellement présents dans les laits ou fromages, à identifier les espèces* microbiennes les constituant, puis à les reconstituer en combinant différents groupes* microbiens ou espèces* pour évaluer leurs capacités inhibitrices en fabrications fromagères expérimentales (Saubusse *et al.*, 2007 ; Callon *et al.*, 2009),

- **la reproduction des phénomènes en laboratoire** en conditions expérimentales (microcosme fromager) (Imran *et al.*, 2010a, 2010b).

Il est donc indispensable de prendre en compte l'ensemble de ces niveaux si l'on souhaite identifier la nature de l'inhibition. L'observation terrain seule peut permettre de quantifier l'effet inhibiteur (non croissance ou décroissance d'un pathogène par exemple), mais ne permet pas d'en comprendre la nature.

Le travail en laboratoire seul (notamment de l'inhibition sur milieux de culture), sans une phase de fabrication en fromagerie expérimentale, ne permet pas d'extrapoler les résultats.

Et c'est bien là que réside toute la difficulté et la complexité de ce sujet. Les études mises en œuvre sont généralement longues, laborieuses et coûteuses. Le travail avec des souches* pathogènes rend difficile la validation sur le terrain et cela ne permet pas toujours d'aller aussi loin que souhaité dans la compréhension de la nature de l'inhibition. A l'issue de ces études, des hypothèses plus ou moins fortes sont donc émises.

2. Que sait-on de la nature de l'inhibition ?

L'inhibition peut être de nature très simple, mais aussi multifactorielle. Un certain nombre d'études ont montré l'intérêt mais aussi les limites de certains métabolites* (effet souche*, phénomènes de résistance, impact sur la flore d'intérêt technologique ?) et c'est pour cette raison qu'aujourd'hui la voie de la technologie à effet barrière est explorée.

Une autre difficulté dans la compréhension de la nature de l'inhibition réside dans la variabilité du potentiel inhibiteur des écosystèmes* dans le temps.

L'inhibition peut être due uniquement à une molécule qui agit sur un pathogène, ou à des phénomènes plus complexes, par association de plusieurs métabolites* avec des paramètres physico-chimiques du milieu (notion de technologie de barrière).

Elle est ainsi attribuée à la production de métabolites* protecteurs/inhibiteurs (acides organiques, bactériocines*, H₂O₂...), à la compétition pour un substrat, à des modifications physico-chimiques de l'environnement (pH par exemple), à la colonisation du milieu par forte densité cellulaire.

Malgré l'abondante littérature qui leur est consacrée, les bactéries lactiques ne sont pas les seules actrices de l'inhibition. En effet,

les flores d'affinage, telles que les microcoques et bactéries corynéformes, en association ou non avec les bactéries lactiques, ne semblent pas neutres (Maoz *et al.*, 2003 ; Callon *et al.*, 2010 ; Retureau *et al.*, 2010).

L'action d'un seul métabolite* est parfois insuffisante pour inhiber totalement la croissance de micro-organismes pathogènes, et le métabolite* est soit produit par une souche* très spécifique, soit l'inhibition ne concerne qu'une souche* particulière. De plus, des phénomènes de résistance de certaines souches* à certains métabolites* ont été décrits.

En outre, certaines études ne précisent pas quelles peuvent être les conséquences, pour les microflores d'intérêt technologique, des moyens utilisés pour inhiber les germes potentiellement pathogènes, notamment dans le cas d'ajout de bactériocines* (Richard, 1996) ou comme par exemple avec des champs électriques pulsés associés à de la nisine* pour inactiver *Listeria innocua* dans du lait cru (Calderon-Miranda *et al.*, 1999).

Enfin, le potentiel protecteur/inhibiteur d'un écosystème* semble être très variable dans le temps comme souligné par Irlinger et Mounier dans une synthèse réalisée en 2009, ainsi que par De Crémoux *et al.* en 2008, sur des laits de chèvre dont le potentiel inhibiteur vis-à-vis de *S. aureus* a varié d'une lactation à l'autre, voire au sein d'une même campagne.

Les résultats présentés dans le tableau 6 ne sont pas exhaustifs, mais illustrent différents modes d'inhibition connus, résumés par ailleurs dans la figure 8. Il faut toutefois garder à l'esprit que les effets

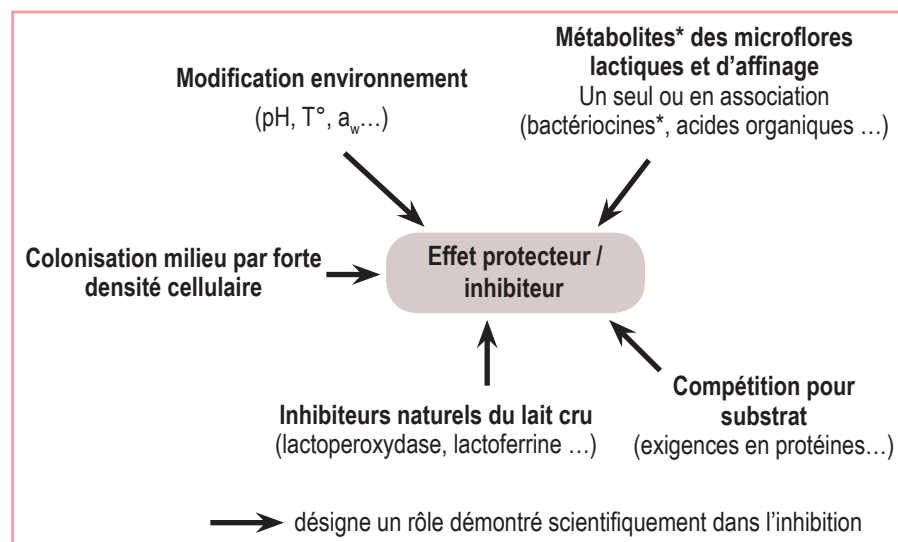


Figure 8. Schéma récapitulatif des facteurs de la protection/inhibition.

Nature de l'inhibition	Résultats/ Limites	Références
<u>Bactériocines*</u> : Nisine* (<i>Lactococcus lactis</i>)	En fabrication de camemberts, diminution de la population de <i>L. monocytogenes</i> , mais reprise de croissance à partir d'une semaine (remontée de pH). Acquisition de résistance de certaines souches* à la nisine*.	Maisnier-Patin <i>et al.</i> , 1992 Arque's <i>et al.</i> , 2004
Linocine M18 (<i>Brevibacterium linens</i>)	En fabrication de fromages à pâte molle à croûte lavée, la production de linoscine par une souche* de <i>B. linens</i> a été démontrée. Celle-ci réduit la population en <i>Listeria</i> (dont <i>monocytogenes</i>) en fabrication expérimentale.	Eppert <i>et al.</i> , 1997
<u>Association de bactériocines*</u> : Nisine* + entérocoque EFS2 (<i>E. faecalis</i>) + linoscine	Des souches* de <i>L. monocytogenes</i> très résistantes à la nisine* se sont aussi avérées résistantes à deux autres bactériocines* isolées de surface de fromages au lait cru : l'entérocoque EFS2 et la linoscine OC2.	Maisnier-Patin et Richard, 1994
<u>Acides organiques issus des métabolismes* des levures</u>	Une souche* de <i>G. candidum</i> isolée du fromage Pont l'Evêque, inhibait la croissance de <i>L. monocytogenes</i> grâce à la production d'acide D3-phenyllactique (PLA) et d'acide indolactique (ILA). Mais des essais <i>in situ</i> sur des caillés de St Paulin avec le PLA purifié n'ont toutefois montré qu'une inhibition modérée de <i>L. monocytogenes</i> . Les activités inhibitrices dépendent fortement du milieu, des conditions de culture et des souches* productrices.	Dieuleveux <i>et al.</i> , 1998 ; Dieuleveux et Guéguen, 1998
<u>Acides organiques issus des métabolismes* microbiens de la flore lactique et de la flore de surface</u>	La production d'acide lactique et l'abaissement du pH initial du lait contribuent à l'inhibition (1). Cet effet bactériostatique* sur les bactéries appartenant aux genres* <i>Listeria</i> , <i>Staphylococcus</i> ou <i>Clostridium</i> (2) peut être lié aux formes L (3) ou du lactate en association avec l'acétate et des alcools (4). En abaissant le pH du milieu, l'acide lactique permet aussi d'augmenter la toxicité de l'acide acétique (produit par voie hétérofermentaire) envers <i>L. monocytogenes</i> (5). De même, bien que son mode d'action ne soit pas réellement connu, il semblerait que l'accumulation du dioxyde de carbone (CO ₂) dans la bicouche lipidique membranaire puisse entraîner un dysfonctionnement de la perméabilité (6) et, par conséquent, inhiber le développement de certains micro-organismes (7).	El-Gazzar et Marth, 1992 (1) ; Oh et Marshall, 1993 (2) ; Holzapfel <i>et al.</i> , 1995 (3) ; Benthin et Villadsen, 1995 ; Callon <i>et al.</i> , 2010 (4) ; Adams et Hall, 1988 ; Ahamad et Marth, 1989 ; Holzapfel <i>et al.</i> , 1995 (5) ; Eklund, 1984 (6) ; Dacosta, 2000 (7)
<u>Inhibiteurs naturels associés à l'écosystème* du lait cru</u>	Six souches* de <i>L. monocytogenes</i> isolées de lait crus destinés à la fabrication de camembert voient leur niveau augmenter plus fortement dans du lait pasteurisé que dans du lait cru. L'ajout de thyocyanate et de peroxyde d'hydrogène au lait cru accroît son effet inhibiteur. L'effet inhibiteur du lait cru sur <i>L. monocytogenes</i> est partiellement lié à la présence du système lactoperoxydase mais plus probablement à la composition microbiologique du lait cru.	Gay et Amgar, 2005
<u>Inhibition par production de peroxyde d'hydrogène</u>	L'inhibition de <i>S. aureus</i> par une souche* de <i>Lactococcus garviae</i> serait due au peroxyde d'hydrogène.	Delbès-Paus <i>et al.</i> , 2010

Tableau 6. Exemples de résultats d'inhibition obtenus.

protecteurs/inhibiteurs ne sont généralement pas le fait d'un seul facteur, mais d'une interaction entre différents facteurs.

3. Focus sur les résultats d'études obtenus dans le domaine fromager

Les résultats récemment obtenus sur ce sujet dans différentes filières laissent entrevoir que les phénomènes d'inhibition/protection vis-à-vis des germes potentiellement pathogènes se produisent naturellement dans différents contextes (fabrication, affinage), qu'ils sont de nature complexe, et que la notion de « technologie à barrières multiples » prend tout son sens.

Ces résultats donnent une idée globale des travaux réalisés dans différentes filières fromagères, qui ont toutes à cœur de concilier maintien des écosystèmes* qui font la spécificité de leurs fabrications, et protection/inhibition vis-à-vis de germes pathogènes.

a. Ecosystèmes protecteurs vis-à-vis des pathogènes (planches d'affinage en bois, morge, croûte)

Une des spécificités de la transformation de type pâte pressée est le recours à des matériaux traditionnels tel que le bois. Dans un contexte réglementaire délicat, des études ont donc été réalisées afin de caractériser les biofilms* de planches d'affinage et d'évaluer leur potentiel bio-protecteur. Les travaux de Mariani *et al.* en 2008a ont permis de montrer que les biofilms* présents à la surface des planches d'affinage étaient stables au cours du temps, au sein d'une même cave d'affinage, qu'ils étaient exempts de flores pathogènes détectables et que les flores d'affinage (microcoques, corynébactéries et levures) des deux types de fromages



Photographie 4. Affinage des reblochon sur planches en bois.

suivis (Reblochon et Munster) étaient largement dominantes.

Pour tester l'effet inhibiteur des biofilms* natifs, deux souches* de *Listeria monocytogenes* issues du milieu laitier et opposées du point de vue de leur capacité d'implantation sur les planches d'affinage, ont été inoculées sur 152 échantillons de planches à Reblochon avec biofilms* natifs (Mariani, 2007; Mariani *et al.*, 2008b). Les facteurs de variation étudiés ont été l'origine des fromages posés sur les planches durant les 12 jours d'affinage, l'état du biofilm* avant et après nettoyage-séchage et l'application ou non d'un autoclavage à 125°C durant 15 minutes. Dans ces conditions expérimentales, les résultats (figure 9) démontrent que le biofilm* natif inhibe la croissance des 2 souches* de *Listeria monocytogenes* implantées volontairement et incubées en affinage modèle. L'effet inhibiteur apparaît résister aussi aux conditions de nettoyage et de séchage pratiquées par l'affineur. La comparaison de la croissance des 2 souches* de *Listeria monocytogenes* sur les planches autoclavées (forte croissance) et natives (inhibition et décroissance)

suggère que c'est la composante microbienne vivante du biofilm* qui conditionne l'effet observé. L'origine des fromages n'influence pas l'effet inhibiteur alors que le stade après nettoyage et séchage semble le modifier légèrement selon la souche* de *Listeria*. L'effet apparaît plus précoce pour la souche* 162 (dès J1), mais tardif et plus intense pour la souche* 481 au stade après nettoyage.

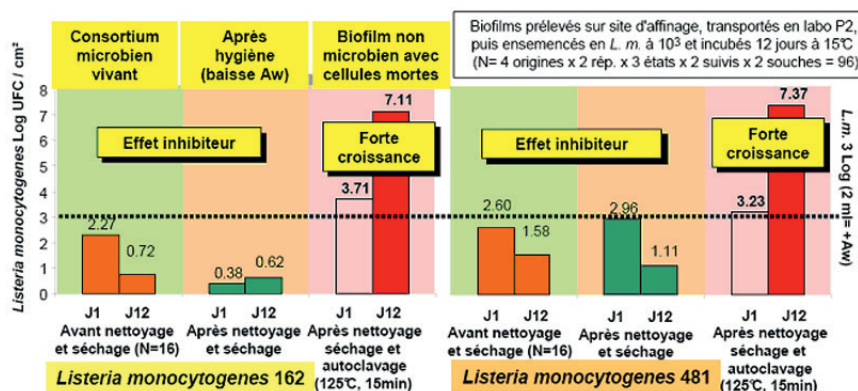


Figure 9. Croissance durant l'affinage du Reblochon des deux souches* de *L. monocytogenes* volontairement ensemencées sur différents états des biofilms* (Notz, 2007).

Les paramètres physico-chimiques et les populations microbiennes suivies sur les biofilms* natifs incubés correspondent à ceux rencontrés en conditions réelles d'affinage. Les conditions physico-chimiques n'expliquent pas cette absence de croissance de *L. monocytogenes* car la température, le pH et l'activité de l'eau des biofilms* testés apparaissent favorable à la croissance de ce pathogène. Les mêmes résultats ont été obtenus dans les mêmes conditions sur le Munster (Stahl *et al.*, 2008). Ces résultats confirment le rôle majeur du biofilm* naturel présent à la surface des planches dans l'inhibition. Le mécanisme d'inhibition n'a pas pu être élucidé mais il semblerait que les travaux réalisés sur des modèles expérimentaux (Guillier *et al.*, 2008) suggèrent plutôt l'existence d'un phénomène de compétition nutritionnelle.

Concernant toujours les effets inhibiteurs observés lors de l'affinage des fromages, des travaux ont été consacrés à l'étude d'une morge de Livarot naturellement inhibitrice vis-à-vis de plusieurs souches* de *Listeria monocytogenes* (Imran *et al.*, 2010a, 2010b). Dans un premier temps, des communautés microbiennes ont été assemblées à partir d'isolats provenant de cette morge. Les communautés ont été utilisées comme modèles pour étudier l'inhibition de *Listeria monocytogenes* Scott A en microcosme fromager (en laboratoire). Les communautés étaient constituées de levures, bactéries à Gram négatif et positif. Une activité anti-*Listeria*, d'amplitude similaire à celle de la morge initiale, a pu être obtenue à l'aide de diverses communautés constituées de 5 à 11 membres. Ces modèles ont permis de mettre en évidence un rôle prépondérant des interactions microbiennes, indépendamment du pH, dans l'expression de l'activité inhibitrice ainsi qu'une contribution importante de bactéries à Gram négatif. Les auteurs ont obtenu des niveaux d'inhibition de *L. monocytogenes* allant jusqu'à plus de 10^4 en présence des communautés, par comparaison avec la croissance du pathogène en présence seulement d'une souche* de levure (*Debaryomyces hansenii* ou *Geotrichum candidum*), utilisée pour reproduire la remontée de pH enregistrée en surface au cours de l'affinage.

De même, des consortia inhibiteurs issus de croûte de Saint-Nectaire ont été repérés par Retureau *et al.*, 2010. La biodiversité* du consortium de croûte le plus complexe a été décrit. Par simplification successive de

cette communauté, il a été émis l'hypothèse que des bactéries d'affinage peu communes dans les produits laitiers, en lien avec la production d'acides seraient impliquées dans l'inhibition.

b. Laits crus de chèvre inhibiteurs de *S. aureus*

En filière fromagère caprine, des études ont été consacrées à l'inhibition de *S. aureus* par différents moyens et notamment par les bactériocines* mais sans que les résultats puissent être extrapolables. Une démarche plus globale mais également plus empirique a donc été récemment adoptée (De Crémoux *et al.*, 2008) en partant des observations enregistrées sur le terrain qui mettent en évidence les situations recherchées (inhibition de bactéries pathogènes).

Une première phase a permis de mettre en évidence l'existence de laits, issus d'exploitations laitières et fermières, capables de limiter la croissance de *S. aureus*, l'inhibition portant soit sur une souche* de *S. aureus* apportée dans le lait (inoculation à 100 UFC*/ml), soit sur les souches* natives du lait, soit les deux.

Dans une seconde phase, la robustesse de ces écosystèmes* laitiers inhibiteurs a été évaluée dans des conditions variées, selon deux technologies fromagères (lactique ou présure) et selon les conditions de contamination et/ou d'inoculation des laits par *S. aureus* (type de souches*, niveaux de contamination ou d'inoculation).

Les travaux se sont avérés prometteurs tant par le nombre de laits identifiés comme ayant une capacité à limiter la croissance de *S. aureus* que par l'amplitude de l'inhibition constatée en fabrication, notamment de type présure, considérée comme la plus sensible. Le recours à des laits inhibiteurs permet de limiter la croissance de *S. aureus* d'environ 10^2 à 10^3 par rapport à celle qui pourrait être observée dans des laits non inhibiteurs.

Il faut toutefois souligner que dans le cadre de cette étude, le potentiel inhibiteur des laits a varié soit au cours d'une même campagne, soit d'une lactation à l'autre.

La comparaison des caractéristiques des laits inhibiteurs et non inhibiteurs a permis de formuler plusieurs hypothèses quant au rôle conjoint des lactocoques (*Lactococcus lactis* et *garviae*) et des molécules à activité antimicrobienne (lactoferrine) dans l'activité inhibitrice.

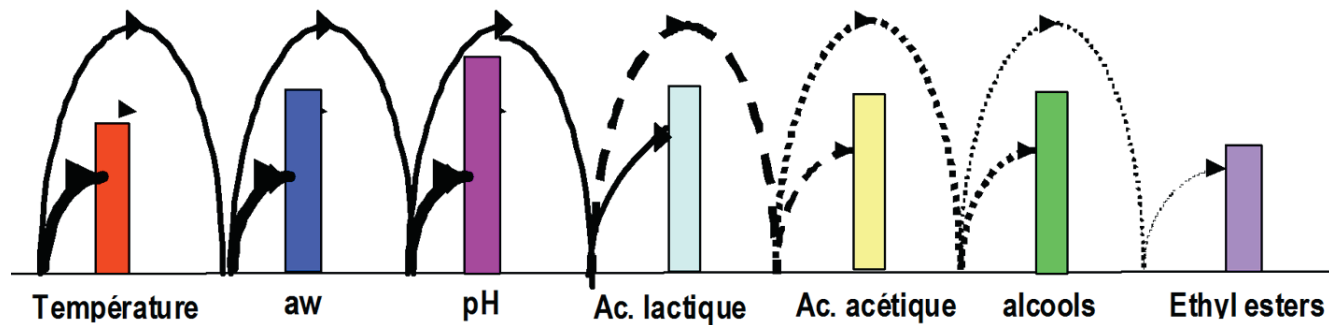


Figure 10. Schématisation des effets barrière (Source : Montel MC., communication personnelle).

c. Laits crus de chèvre inhibiteurs de *L. monocytogenes*

Millet *et al.*, 2006 ont identifié des laits crus de la zone Saint-Nectaire, inhibiteurs de *L. monocytogenes*. La communauté microbienne du lait le plus inhibiteur est très diverse (Saubusse *et al.*, 2007). Les résultats montrent que les bactéries lactiques sont impliquées dans l'inhibition de *L. monocytogenes*, et ceci d'autant plus lorsqu'elles sont associées aux microcoques et aux bactéries corynéformes (phénomène de symbiose). Des teneurs plus élevées en D-lactate, acétate et alcools - produits par les bactéries lactiques - caractérisent les fromages « inhibiteurs ».

La simultanéité ou succession des facteurs d'inhibition peut être schématisée comme indiqué dans la figure 10.

4. Synthèse et perspectives

Les travaux réalisés sur cette thématique ont évolué dans le temps, prenant progressivement en compte l'écosystème* microbien fromager dans son ensemble. Des résultats récents mettent en évidence la complexité des mécanismes associant les microflore, leurs métabolites* et les conditions du milieu dans lequel elles évoluent. Bien que certaines hypothèses restent à valider, le développement de méthodes d'analyse basées sur la biologie moléculaire (cf Chapitre 1 / Partie 3-B) apporte un grand secours à la caractérisation des écosystèmes* microbiens, et à la compréhension de l'inhibition.

Malgré tout, il est difficile de reproduire à plus grande échelle ce qui est observé dans un contexte bien précis ou en conditions de laboratoire. Les travaux menés sont souvent consacrés à l'étude d'un écosystème* spécifique, correspondant à une espèce laitière et à une technologie fromagère précise et

portant sur l'inhibition d'un seul pathogène (souvent d'un très faible nombre de souches*). De plus, la variabilité du potentiel inhibiteur au cours du temps constitue un frein à la recherche de laits ou autres systèmes inhibiteurs et à leur étude (De Crémoux *et al.*, 2008 ; Irlinger et Mounier, 2009).

L'inhibition prend aussi parfois un caractère tardif. Un temps d'action minimum est nécessaire aux bactériocines* pour permettre une décroissance de la population de *S. aureus* dans le produit laitier sans écarter pour autant les risques au pic maximum de croissance (Arque's *et al.*, 2004).

Les travaux sur cette thématique se poursuivent et devraient progressivement apporter de nouveaux éléments de compréhension. Différentes pistes de travail sont suivies :

- Recours à des bio protecteurs (bactériocine ou autres), ayant un effet sur les microflore pathogènes (et/ou d'altération) mais n'affectant pas les microflore utiles pour la transformation fromagère,
- Utilisation de « cocktails » de souches* sélectionnées, capables de reproduire ces effets inhibiteurs : un programme d'étude européen (Safecheese) portant sur l'étude de bactéries lactiques inhibitrices vient d'ailleurs de se terminer. Une culture de bactéries lactiques issues de fromages au lait cru a ainsi démontré un effet inhibiteur sur *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *E. coli*, sans affecter les caractéristiques organoleptiques des fromages. Les travaux devraient aboutir au développement et à la commercialisation de ce ferment,
- Orientation des pratiques (élevage, traite, fromagerie) pour favoriser un écosystème* repéré comme inhibiteur.

Références principales

Callon C, Didienné R, Buchin S, Montel MC. 2009. How microbial populations can inhibit *Listeria monocytogenes* in the core of cheeses. 4th IDF Dairy Science and Technology, 20-24 april, Rennes.

Dacosta Y. 2000. La bio-protection des aliments. Technique & Documentation, Lavoisier, Paris, 230 pages.

De Crémoux R, Barral J, Beuvier E, Callon C, Gilbert F, Montel MC, Raynal-Ljutovac K. 2008. Caractérisation et entérotoxigénicité des souches* de *S. aureus* en filière caprine, identification des risques de contamination et étude d'outils de contrôle en vue de leur maîtrise, de la production à la transformation. Collection Résultats. Compte rendu Institut de l'Elevage 150838016, 236 pages.

Dieuleveux V, Van Der Pyl D, Chataud J, Gueguen M. 1998. Purification and characterization of anti *Listeria* compounds produced by *Geotrichum candidum*. Appl. Environ. Microb. 64, 2, 800-803.

Gay M, Amgar A. 2005. Factors moderating *Listeria monocytogenes* growth in raw milk and in soft cheese made from a raw milk. Lait 85, 153-170.

Ghandi M, Chikindas ML. 2007. *Listeria* : a foodborne pathogen that knows how to survive. Int. J. Food. Microbiol. 113, 1-15

Imran M, Desmasures N, Vernoux JP. 2010a. From undefined red smear cheese consortia to minimal model communities both exhibiting similar antilisterial activity on a cheese-like matrix. Food Microbiol. 27, 1095-1103.

Irlinger F et Mounier J. 2009. Microbial interactions in cheese : implications for cheese quality and safety. Curr. Opin. Biotech. 20, 1-7.

Maisnier-Patin S, Richard J. 1994. Potentiel inhibiteur de la nisine et de deux autres substances antibactériennes vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* et problèmes soulevés par leur utilisation en technologie fromagère. Thèse de Doctorat, Université Lyon I, 283 pages.

Mariani C. 2007. Ecologie microbienne des biofilms présents à la surface d'affinage en bois de l'AOC « Reblochon de Savoie » et effet inhibiteur vis à vis de *Listeria monocytogenes*. Thèse de doctorat,

Institut National Agronomique Paris-Grignon, 242 pages.

Notz E. 2007. Ecologie microbienne des planches d'affinage de fromages à croûte lavée: Biofilm microbien durant l'affinage et interactions vis à vis de *Listeria monocytogenes*. Compte-rendu de fin de recherche du programme, ACTIA-ITFF 2003-2006, RA 03.27, 48 pages.

Richard J. 1996. Utilisation de bactériocines pour la production d'aliments plus sûrs : mythe ou réalité ? Lait 76, 179-189.

Les autres références citées dans cette partie sont listées en annexe.

D. Microflore du lait et bénéfices potentiels pour la santé

Eric BEUVIER

UR 342 « Technologie et Analyses Laitières » - INRA
Rue de Versailles, BP 20089, 39801 Poligny cedex 1

Les communautés microbiennes jouent un rôle essentiel dans la formation des caractéristiques sensorielles des fromages. Elles sont plus diverses et complexes dans les fromages au lait cru pour lesquels le lait ne subit aucun traitement pour réduire sa microflore. Elles contribuent au développement du goût typique des fromages au lait cru. Ainsi, la préservation de la diversité microbienne* du lait est primordiale pour obtenir des fromages au lait cru avec une grande diversité sensorielle (Beuvier et Buchin, 2004).

Depuis ces dernières années, se pose la question si cette microflore du lait, importante pour le développement des caractéristiques de goût du fromage, pourrait également jouer un rôle sur la santé humaine.

1. Lait/microflore du lait et allergies

L'exposition aux micro-organismes dans la prime enfance (à travers l'environnement de la ferme) et même par la suite préviendrait des risques d'allergie. En plus du contact avec les animaux, la consommation de lait de ferme et/ou de produits laitiers fermiers assure tout ou moins partiellement une protection contre certains phénomènes d'allergie.

Des études ont montré que les enfants qui vivaient dans les pays ou régions les plus « développées » avaient plus de risques de développer des maladies allergiques ; à l'inverse, les enfants qui avaient vécu leurs premières années de vie dans un environnement « traditionnel » rural étaient en quelque sorte « protégés » contre l'allergie et l'asthme (Vuitton et Dalphin, 2006 ; Bieli *et al.*, 2007). Tout en confirmant les résultats généraux sur la protection de l'environnement de la ferme contre la survenue de manifestations atopiques*, Riedler *et al.* 2001 ont montré que l'exposition à l'ambiance des étables et la consommation de lait cru étaient indépendamment et de façon synergique associées à des prévalences d'asthme (0,8 *vs* 11,8 %), de rhume des foins (0,8 *vs* 16 %) et de sensibilisation atopique (8,2 *vs* 32,9 %) significativement plus basses que celles observées chez les enfants non exposés.

Ainsi l'exposition aux micro-organismes dans la prime enfance (première année de la vie) préviendrait des désordres atopiques* (allergies). Cependant, plusieurs études semblent indiquer que l'exposition plus tardive pourrait aussi jouer un rôle, et que la protection serait d'autant plus importante que cette exposition se prolonge tout au long de la vie. La période fœtale elle-même pourrait être également déterminante, car le fait que la mère ait vécu dans une ferme pendant sa grossesse, mais aussi qu'elle ait bu du lait cru pendant cette période, est significativement associé à la protection de son enfant vis-à-vis des maladies allergiques (Vuitton et Dalphin, 2006).



Photographie 5.

En plus du contact avec les animaux de la ferme et avec des composés microbiens comme les lipopolysaccharides (LPS = endotoxines, composants

des bactéries à Gram négatif), la consommation du lait a été identifiée comme un autre facteur caractéristique de la vie « à la ferme » pouvant conférer une protection contre les allergies (Riedler *et al.*, 2001, Wickens *et al.*, 2002 ; Perkin et Strachan, 2006 ; Waser *et al.*, 2007). Les composants responsables de l'effet protecteur du lait de ferme et les mécanismes biologiques impliqués ne sont pas encore clairement identifiés bien que quelques suggestions aient été formulées. Ainsi, les lactobacilles (viables) et les LPS (non viables) du lait de ferme interagissant directement ou indirectement (par exemple via la modification de la microflore intestinale) avec le système immunitaire ont été proposés comme facteurs possibles de causalité. De même, Debarry *et al.* 2007 ont montré que des bactéries abondantes dans l'étable comme *Lactococcus lactis*, bactérie lactique présente également dans le lait cru, avaient un effet protecteur chez la souris contre le développement d'une maladie allergique telle que l'asthme. Ainsi comme discuté par Perkin (2007), l'effet protecteur du lait cru ou non pasteurisé est-il dû à une quantité plus importante et/ou à une diversité de micro-organismes présents dans ce lait ?

Par ailleurs, des composants du lait de ferme autres que les micro-organismes, tels que des quantités élevées d'acides gras polyinsaturés (omega-3), pourraient également jouer un rôle (Perkin et Strachan, 2006 ; Bieli *et al.*, 2007). Des études épidémiologiques menées par Waser *et al.* 2007, dans lesquelles entre autres, la consommation de beurre comparée à celle de la margarine a été associée à un risque plus faible d'apparition de l'asthme, confirmeraient un rôle potentiel de l'ingestion d'acides gras associée à la consommation de lait de ferme dans la diminution de l'allergie.

Des études toutes récentes semblent confirmer ou infirmer les résultats précédemment obtenus. Ainsi, selon Gehring *et al.* 2008, l'effet « vie à la ferme » et l'effet protecteur de la consommation de lait de ferme ne peuvent pas être expliqués par des niveaux plus élevés d'endotoxines (composants présents chez les bactéries à Gram négatif) dans le lait des familles vivant à la ferme comparées à celles n'y vivant pas et dans le lait de ferme comparé à du lait acheté dans le commerce, respectivement. Par ailleurs, Pfeifferle *et al.*, 2010 (Etude européenne PASTURE), tout en confirmant les effets protecteurs contre l'allergie de la « vie à la ferme » et de la consommation de produits

laitiers issus de la ferme, suggèrent un rôle de la matière grasse du lait. En effet, ils ont observé dans le sang du cordon ombilical des futures mamans vivant à la ferme et consommant du beurre fermier une plus grande quantité de composés médiateurs d'une réponse immunitaire favorisant ultérieurement chez le jeune enfant une protection contre l'allergie atopique*. De manière intéressante, ces auteurs soulignent l'importance des procédés de transformation du lait de ferme dans le rôle protecteur des produits laitiers issus de la ferme.

2. Microflore du lait/fromage et microflore intestinale

Des études démontrent les effets bénéfiques sur la santé de souches* de micro-organismes (qu'on appelle alors probiotiques*), notamment de bactéries lactiques. Des premiers travaux ont ainsi montré l'effet bénéfique de la consommation de certains fromages (pâtes pressées cuites, camembert) sur la microflore intestinale.

D'après Stanton *et al.*, 1998, les fromages, par leur niveau élevé en matière grasse et leur texture, pourraient offrir une protection aux micro-organismes vivants contenus dans le fromage, lors de leur passage dans le tractus gastro-intestinal. De plus en plus de travaux démontrent les effets bénéfiques sur la santé de souches* de micro-organismes, notamment

de bactéries lactiques, et laissent espérer d'autres découvertes dans ce domaine, en particulier pour les produits fermentés comme les fromages (au lait cru) riches en micro-organismes (Bouton, 2001 ; Moreau et Vuitton, 2002).

Ainsi, Bertrand *et al.*, 2007 ont observé que la consommation de fromage (fromage à pâte pressée cuite) chez l'Homme sain, stressé aux antibiotiques, limitait la colonisation des voies intestinales par certains micro-organismes (entérocoques) résistants aux antibiotiques. Un des principaux enjeux de cette étude était de démontrer que l'apport de micro-organismes par un aliment fermenté tel que le fromage pouvait jouer un rôle « protecteur » vis-à-vis d'une microflore néfaste susceptible d'apparaître lors de la prise d'un antibiotique et notamment, interagir avec les entérocoques antibiorésistants. Ainsi le fromage pourrait être considéré comme un produit « véhiculant » de micro-organismes dit probiotiques*. Dans cette étude, il a été montré que plusieurs souches* bactériennes du fromage (fromage au lait cru) telles que des souches* de lactobacilles mésophiles et de pédiocoques (bactéries lactiques) et des souches* de bactéries propioniques* survivaient au passage à travers le tractus gastro-intestinal (figures 11 et 12).

De même, Lay *et al.*, 2004 suggéraient que la consommation de Camembert pouvait avoir un effet probiotique : chez les rats à microflore humaine

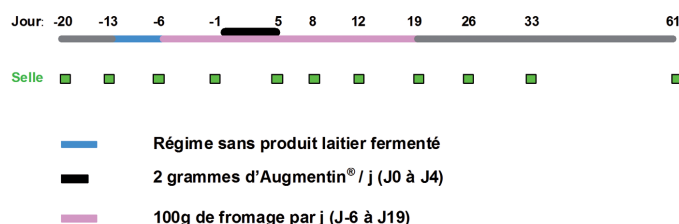


Figure 11. Etapes de dénombrement des microflores d'origine fromagère dans les selles des volontaires ingérant successivement un régime sans produit laitier fermenté puis une dose quotidienne de fromage, avec ou sans prise d'antibiotique - Augmentin® - (Beuvier *et al.*, 2008).

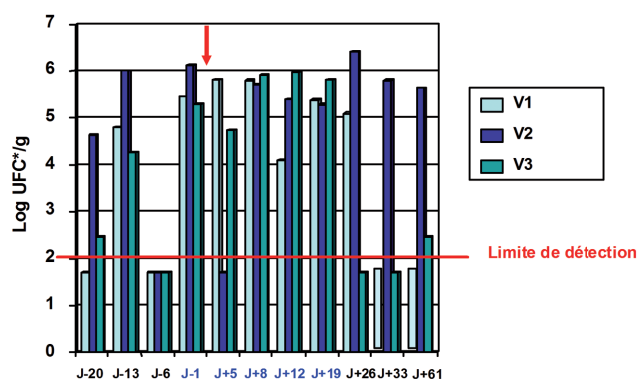


Figure 12. Evolution des bactéries propioniques* dans les selles de 3 volontaires (V1, V2 et V3) ayant consommé du fromage au lait cru à pâte pressée cuite (Beuvier *et al.*, 2008).

consommant ce fromage, des changements étaient observés au niveau du métabolisme* de la microflore intestinale, en particulier sur les activités enzymatiques réduisant la production de composés toxiques. Cependant, une étude menée sur l'Homme sain par la même équipe n'a pas abouti globalement aux mêmes effets excepté pour une seule activité enzymatique (Firmesse *et al.*, 2008).

3. Synthèse et perspectives

La consommation de lait de ferme et/ou de produits laitiers fermiers assure, tout du moins partiellement, une protection contre certains phénomènes d'allergie. Cependant, la connaissance des composants à l'origine de cette protection, ainsi que les mécanismes biologiques associés, nécessite encore des études d'approfondissement.

Des premiers travaux ont ainsi montré l'effet bénéfique de la consommation de certains fromages (pâtes pressées cuites, camembert) sur la microflore intestinale. Notamment, la consommation de fromages de type pâte pressée cuite aurait un rôle protecteur vis à vis d'une microflore néfaste (entérocoques antibiorésistants) susceptibles d'apparaître lors de la prise d'un antibiotique. D'une manière générale, d'autres études sont à mener pour pouvoir évaluer les effets de la consommation de produits laitiers riches en micro-organismes tels que les fromages sur la santé de l'Homme; cela passera, entre autres, par une meilleure connaissance du « microbiote » intestinal (= communautés microbiennes de l'intestin). Ces communautés, dynamiques et complexes, influencent profondément notre physiologie, notre nutrition, ainsi que notre immunité et son développement. Par ailleurs, les produits laitiers pouvant renfermer des probiotiques*, contiennent également des composés issus du métabolisme* microbien, ainsi que des composés provenant directement du lait, qui pourraient induire des effets biologiques (Reid, 2008).

Références principales

Bertrand X, Dufour V, Millon L, Beuvier E, Gbaguidi-Haore H, Piarroux R, Vuitton DA, Talon D. 2007. Effect of cheese consumption on emergence of antimicrobial resistance in the intestinal microflora induced by a short course of amoxicillin-clavulanic acid. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1052-1059.

Beuvier E, Buchin S. 2004. Raw milk cheeses. In *Cheese: chemistry, physics & microbiology*. Vol. 1, 3rd Edn P. Fox, P. McSweeney, T. Cogan & T. Guinee. Elsevier, 319-345.

Bouton Y. 2001. Raw milk cheese characteristics and their positive effects on health. *Cas. Intern.* 1, 54-62.

Moreau MC, Vuitton DA. 2002. Le fromage et les bénéfices du vivant en matière de santé : améliorations des défenses immunitaires, in, *Congrilaït 26th IDF World Dairy Congress*, 24-28 September, Paris.

Reid G. 2008. Probiotics and prebiotics. - Progress and challenges. *Int. Dairy J.* 18, 969-975.

Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maish S, Carr D, Schieri R, Nowak D, von Mutius E. 2001. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358, 1129-1133.

Vuitton DA, Dalphin JC. 2006. Hygiène et allergie : les micro-organismes des fermes sont-ils protecteurs ? *J. Mycol. Méd.* 16, 220-238.

Les autres références citées dans cette partie sont listées en annexe.

■ Partie 3 : Comment apprécier les écosystèmes microbiens du lait ?

A. Indicateurs globaux

Sabrina RAYNAUD

Institut de l'Élevage
Agrapole - 23, rue Jean Baldassini - 69364 Lyon cedex 07

Fanny PELISSIER

Actilait
20, côte de Reyne - 15000 Aurillac

Antoine BERODIER

Centre Technique des Fromages Comtois (CTFC)
9, avenue Wladimir Gagneur - 39800 Poligny

Certains tests de terrain, plus simples à utiliser que des méthodes de dénombrements microbiens, permettent de caractériser la qualité microbienne fromagère de laits crus. Ces tests ont des limites et des conditions de mise en œuvre précises, qu'il importe de connaître avant de les utiliser.

En complément des méthodes d'analyse microbiologique présentées dans la sous-partie suivante (cf Chapitre 1 / Partie 3-B), il existe des tests de terrain conçus pour évaluer de façon globale l'écosystème* d'un lait de ferme (ou d'un réservoir* tel que machine à traire, trayon) et son aptitude fromagère. Ces tests, faciles et rapides à mettre en œuvre ne nécessitent ni locaux spécifiques, ni équipements coûteux, ni personnel qualifié. Ils peuvent permettre un suivi régulier et simple de la qualité microbiologique des laits utilisés en fabrication. Faits régulièrement, ils permettent de détecter d'éventuelles dérives de la qualité microbiologique du lait de troupeau.

Historiquement, ces tests avaient pour but d'écarter de la collecte des laits très chargés qui risquaient de ne pas arriver sous forme liquide à la fromagerie (test à l'alcool et au pourpre de bromocrésol, test à la chaleur) ; puis ils ont été utilisés dans les prémices du paiement du lait à la qualité (tests colorimétriques) avant la généralisation des méthodes de dénombrements microbiens. Le test à la résazurine (test colorimétrique) a aussi servi à étudier l'activité des ferments en complément de la mesure d'acidité. On peut cependant se demander si dans le contexte de

laits très peu chargés observés actuellement, ces tests sont toujours pertinents.

Ces tests de terrain ont l'avantage de s'affranchir de multiples dénombrements microbiens classiques coûteux et toujours difficiles à interpréter en termes d'équilibres relatifs et de comportement. En effet, ils mettent en jeu des développements microbiens concomitants au sein desquels les synergies et compétitions peuvent s'exprimer. Cependant, ces tests doivent être éprouvés et adaptés (dans leurs conditions de réalisation) afin d'être pertinents pour évaluer la qualité fromagère d'un lait destiné à un fromage donné.

Les différents types d'indicateurs globaux et leur utilisation sont présentés ici.

1. Les tests de lactofermentation et aptitudes acidifiantes

Les tests de lactofermentation consistent à incuber du lait à une température fixée, afin d'étudier le moment où il coagule, l'aspect du coagulum obtenu, voire son pH et/ou son acidité. Tout d'abord indicateur de la qualité fromagère (notamment composition microbiologique et aptitude à l'acidification) des laits et de son évolution dans le temps, ce test peut aussi être utilisé pour étudier les réservoirs* de flores à la ferme, voire comme indicateur de la qualité sensorielle des fromages. Des conditions de mise en œuvre de ce test doivent être respectées pour pouvoir conclure et il doit être adapté aux différentes technologies, le plus souvent en adaptant la température d'incubation.

a. Méthode générale et variantes

De façon générale cette méthode consiste à incuber un échantillon de lait nonensemencé à une température maîtrisée (bain-marie) adaptée à la technologie fromagère concernée et à en suivre l'aspect, le pH et/ou l'acidité, voire l'odeur et le goût ou l'aspect microscopique pendant 24 à 48 h (fiche Annexe 4). Les conditions de réalisation du test sont

déterminantes et influent sur son résultat, notamment en ce qui concerne l'aspect des gels (Bérodier *et al.*, 2001).

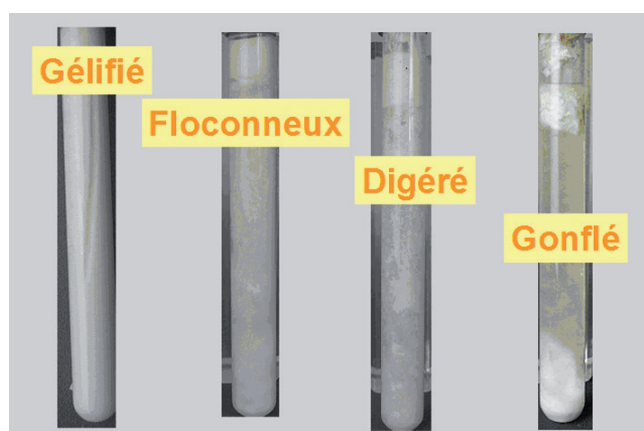


Figure 13. Exemple de grille de lecture de l'aspect des gels obtenus après lactofermentation (d'après le CTFC).

b. Intérêts

Test empirique, le test de lactofermentation a le mérite d'évaluer globalement la qualité microbienne fromagère du lait (figure 13). Il est basé sur la coagulation acide du lait par floculation des protéines. Ce test permet en effet de juger le comportement de l'écosystème* microbien du lait dans des conditions données et d'observer l'effet de la croissance conjointe des différentes flores du lait (compétition, synergie) isolément des autres éléments présents dans le fromage (ferment, présure...) et dans une matrice différente de celle du fromage.

Il permet tout d'abord de suivre la qualité microbienne des laits : composition microbiologique et aptitude à l'acidification, et évolution de ces paramètres durant le stockage et la collecte du lait. Il a pu être aussi utilisé pour caractériser des réservoirs* de flores, tel que la machine à traire, en faisant circuler dans celle-ci du lait UHT ensuite mis en fermentation, ainsi que pour évaluer l'influence des pratiques de traite, dont l'hygiène de traite, sur cette qualité fromagère. Enfin, certaines filières ont pu montrer que ce test permettait dans une certaine mesure de prédire la qualité organoleptique des fromages fabriqués avec le lait étudié (cf encadré ci-contre sur l'utilisation du test de lactofermentation).

c. Précautions et limites

D'un point de vue pratique, si l'on souhaite observer l'aspect du gel formé par le lait fermenté, il convient d'utiliser des tubes à essais en verre soigneusement nettoyés et désinfectés et de toujours remplir les tubes avec le même taux de remplissage (Bérodier *et al.*, 2001).

Dans le cadre d'une lactofermentation mésophile ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) pour des fabrications lactiques par exemple, on s'intéresse moins à l'aspect du gel et des adaptations sont donc possibles pour la mise en œuvre de la méthode sur le terrain par les techniciens voire les producteurs : utilisation de tubes en plastique jetables, incubation dans un bain-marie artisanal formé d'un aquarium et d'un thermoplongeur d'aquariophilie avec bulleur, travail autour d'un bec de gaz de camping, conservation du lait au froid 12h à 24h (Raynaud *et al.*, 2008).

La lecture doit être objectivée lorsque plusieurs utilisateurs lisent ce test car les aspects des coagulums peuvent être perçus différemment d'une personne à l'autre. Un référentiel photographique est indispensable. Ceci rend difficile les comparaisons entre études. La répétabilité de ces tests étant moyenne (Bérodier *et al.*, 2001), il est important de l'utiliser intra-ferme régulièrement pour avoir des éléments de comparaison. De même, en recherche, il est important d'avoir un grand nombre d'échantillons pour avoir une interprétation valide. Les résultats concernant les relations entre les caractéristiques sensorielles des fromages et celles des lactofermentations ne sont pas transférables d'une technologie à l'autre étant donné que le couple de temps et température varie entraînant une variation significative des résultats. Des écarts importants de composition physico-chimique du lait peuvent aussi agir sur son aptitude à la coagulation. Ainsi, un taux protéique élevé favoriserait le type gélifié et un taux protéique bas le type liquide.

Enfin, ces tests ne permettent pas de connaître de façon précise la composition des laits en différentes espèces* bactériennes et ne permettent pas de savoir si les laits sont exempts de germes pathogènes.

Le test de lactofermentation est utilisé selon différents axes :

1. Etude des réservoirs* de flores et des pratiques d'élevage jouant sur la qualité des laits

Le test de lactofermentation a pu être appliqué à du lait UHT ayant circulé dans la machine à traire, afin d'évaluer la composition microbiologique et l'aptitude acidifiante des biofilms* présents à l'intérieur de cette dernière (Laithier *et al.*, 2005a). L'incidence des réservoirs* de flore (trayons et matériel de traite et de stockage) a été illustrée par un suivi du résultat du test de lactofermentation sur le lait pendant la traite (CIGC, 2007 ; CTFC, 2007a). Des laits UHT récupérés après circulation dans la machine à traire de 5 exploitations fermières à différentes périodes au cours d'une année ont été incubés pendant 48 h avec mesure du pH à 24, 36 et 48 h. (cf Chapitre 2 / Partie 3) : en moyenne, une bonne activité fermentaire a été constatée, la plus faible ayant été observée dans une exploitation pratiquant l'alternance systématique des produits de nettoyage et désinfection acide/base chlorée (Laithier *et al.*, 2005a). Le test peut aussi être utilisé pour évaluer des pratiques de traite et de nettoyage de la machine à traire. Dans une étude portant sur 54 exploitations (CTFC, 2007b), il a été montré que les lactofermentations de type liquide (47 % des cas) étaient souvent rencontrées lorsque le post-trempage (ou pulvérisation des trayons en fin de traite) était pratiqué, que la machine à traire était rincée avant traite et que le tank était lavé immédiatement après traite avec une alternance acide/base chlorée. Le type gélifié (24 %) était plutôt rencontré lorsque la traite était effectuée en étable et que les pratiques de nettoyage étaient moins drastiques. Enfin, les pratiques associées au type digéré (29 %) étaient plus nuancées. Ce type de lactofermentation était souvent obtenu lorsqu'il n'y avait pas ou peu rinçage de la machine à traire avant traite et que l'hygiène des trayons était modérée.

2. Un indicateur sur la qualité technologique des laits

a. Intérêt pédagogique

Pour tous les types de technologies fromagères, ce test a un intérêt pédagogique. Sa présentation et son interprétation très visuelles en font un véritable outil de dialogue entre éleveurs, techniciens et fromagers. Il peut aider au suivi dans le temps des qualités microbiennes fromagères des laits ou encore à des comparaisons entre fermes.

b. Aptitude à l'acidification en fabrication lactique / recherche des causes d'un problème de fabrication

La mesure de l'abaissement de pH ou de l'augmentation de l'acidité provoqué par la production d'acide lactique par des bactéries lactiques permet de s'assurer de l'aptitude acidifiante du lait d'une exploitation (lactofermentation à 22°C pour une fabrication lactique), celle-ci pouvant être plus ou moins variable au sein d'une même ferme. Les conditions de fabrication pourront être adaptées en fonction du pouvoir acidifiant du lait. De même, des mesures régulières de cette aptitude acidifiante pourraient permettre d'en détecter d'éventuelles dérives.

c. Mise en relation avec la composition microbienne des laits

Plusieurs études ont essayé de relier la composition microbiologique du lait mis en lactofermentation avec le résultat final en termes d'aspect des gels ou d'acidification (acidité et/ou pH). Il semble que ce lien ne soit que partiel, mais les gels liquides correspondent à des laits aux niveaux microbiens les plus faibles (Pélissier *et al.*, 2009 ; Michel *et al.*, 2001) et les gels « gélatineux » sont plus fréquents quand les laits sont assez chargés avec une dominante de flores d'intérêt (Bérodier *et al.*, 2001). En élevages caprins, une meilleure acidification correspond à une augmentation de la teneur en flore acidifiante dans des laits de chèvre et l'absence de *Pseudomonas fluorescens* à un temps plus long pour atteindre le point d'inflexion de la courbe d'acidification du lait seul (Laithier *et al.*, 2005a).

Ce test a été et reste utilisé sur le terrain pour détecter les laits ayant une trop forte présence de flore indésirable, par exemple coliforme, qui va donner des gels troués à odeur animale (Alais, 1984).

d. Incidence de certaines pratiques de laiterie / fromagerie

Ce test permet aussi d'évaluer l'impact de certaines pratiques de laiterie sur les aptitudes acidifiantes des laits ou leur aptitude fromagère évaluée à travers l'aspect du gel. La conservation des laits de producteurs à 12°C au lieu de 4°C a ainsi été évaluée en filière Laguiole : les capacités acidifiantes des laits conservés 36 h à 12°C sont meilleures qu'à 4°C ; les coagulums sont plus gélifiés et moins liquides et les coagulums gélifiés ont des niveaux de lactocoques présumés significativement supérieurs. Les coagulums de type altéré (dont digéré) proviennent de laits aux niveaux de flores supérieurs après report expérimental à 12°C qu'à 4°C. Mais globalement, à 12°C, les niveaux de flores des laits

dont ils proviennent ne sont pas significativement différents de ceux conduisant à un type gélifié (Pélissier *et al.*, 2009).

3. Indicateur de la qualité des fromages

En pâte pressée cuite de vache, le type de gel obtenu après une lactofermentation de 24 h à 37°C (gélifié, liquide ou digéré) a pu être mis en lien avec les qualités organoleptiques et notamment le goût des fromages de Comté fabriqués avec ces laits (Bérodier *et al.*, 2001) : les fromages fabriqués à partir des laits de type gélifié au test de lactofermentation sont globalement de meilleure qualité, car bien typés en goût et riches en arômes. Les fromages fabriqués à partir des laits de type digéré présentent systématiquement des anomalies de qualité, en particulier en goût. Enfin, les fromages fabriqués à partir des laits de type liquide présentent peu d'anomalies mais sont très peu typés en goût.

De même, en filière Saint-Marcellin, un lien a pu être établi entre le profil d'acidification des laits lors de la lactofermentation et le goût de ces laits fermentés (Bonetti, 2000).

2. Les tests colorimétriques : résazurine et bleu de méthylène

Ces tests sont basés sur l'observation d'un changement de couleur d'un indicateur coloré ajouté au lait placé en incubation à une température fixée, sous l'influence de la réduction du milieu par la population microbienne. Avec les laits peu chargés observés de nos jours, des valeurs repères récentes manquent pour interpréter les résultats de ces tests.

a. Description de la méthode - significations

Ces tests permettent d'apprécier la charge microbienne d'un lait par observation d'une durée de décoloration. Il s'agit d'ajouter au lait un indicateur coloré (résazurine ou bleu de méthylène) qui se décolore lorsque les bactéries se développent en diminuant le potentiel d'oxydo-réduction du lait via la consommation de l'oxygène du milieu et en produisant des enzymes réductrices (figure 14). La durée de la décoloration donne une estimation du nombre de bactéries totales du lait (Institut de l'Élevage, 1993 et Institut de l'Élevage *et al.*, 2002).

En lait de vache, la recommandation était de l'utiliser sur des laits non réfrigérés ou réfrigérés moins de 10-12 heures mais le test à la résazurine après un report au froid de 12 heures environ en lait de chèvre a quand même bien fonctionné (Larruhât, 2009). Certains travaux anciens recommandaient une pré-incubation de 15 à 20 heures entre 12 et 15°C afin de permettre le développement des flores signes d'une mauvaise hygiène avant de faire un test colorimétrique (Alais, 1984).

b. Utilisation

Des tableaux d'interprétation des résultats existent pour du lait de vache mais ils sont basés sur des données anciennes et donc des niveaux de contamination du lait beaucoup plus élevés que ce qui est observé aujourd'hui (figure 15, tableau 7).

Quelques repères sont disponibles (références anciennes, lait de vache) pour l'interprétation du test au bleu de méthylène :

- lait très chargé décoloré en moins de 2 heures,
- lait chargé décoloré entre 2 et 4 heures,
- lait faiblement chargé décoloré en plus de 4 heures.

Il est probable qu'avec les laits actuels assez pauvres, la décoloration soit obtenue avec des durées supérieures à 4 h (Larruhât, 2009), sans doute supérieures à 6 h pour des laits ayant moins de 100 000 germes totaux (Alais, 1984).

c. Intérêt et limites

Ces tests ne permettent pas de connaître la composition des laits en différentes espèces* bactériennes et ne permettent pas non plus de savoir si les laits sont exempts de germes indésirables. Les ferments lactiques mésophiles sont beaucoup plus réducteurs que les ferments lactiques thermophiles. Ils sont surtout intéressants dans une utilisation régulière pour une interprétation par comparaison d'un jour à l'autre. Par ailleurs ces tests peuvent être réalisés à la fois sur le lait en fin de traite et sur le lait mis en fabrication afin d'apprécier les conditions de conservation et de maturation du lait.

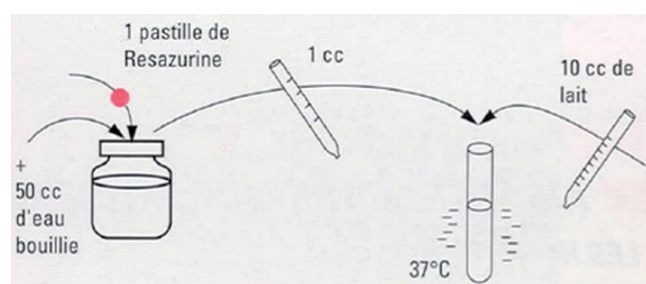


Figure 14. Réalisation du test à la résazurine (Institut de l'Elevage, 1993) et du test au bleu de méthylène (Institut de l'Elevage *et al.*, 2002).

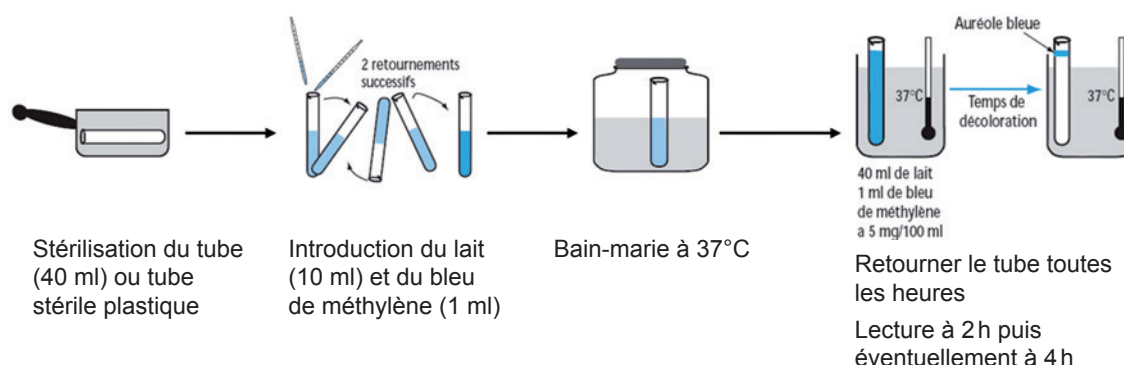


Figure 15. Evolution des décolorations au cours du temps pour le test à la résazurine.

Temps de décoloration, valeurs anciennes, lait de vache	Temps de décoloration, valeurs récentes, lait de chèvre	Quantités de germes
Entre 2 et 4 heures	Entre 6 et 7 h	Plus de 100 000 germes/ml
Entre 4 et 5 heures	Entre 7 et 8 h	50 000 germes/ml
Plus de 7 heures	Plus de 8 h	Moins de 20 000 germes/ml

Tableau 7. Interprétation des durées de décoloration du test à la résazurine en lait de vache et de chèvre (Institut de l'Elevage, 1993 et Larruhat, 2009).

Le test à la résazurine peut être influencé par la présence de leucocytes (cellules) dans le lait. Cependant pour ce test, la décoloration et donc l'obtention des résultats est plus rapide.

3. Autres tests

Il existe d'autres tests ou variantes de ces tests (test de Weinzirl, avec utilisation d'un bouchon de paraffine, fermentation avec des ferments et/ou de la présure...). Les variantes de ces tests peuvent aussi permettre d'apprécier l'activité d'un ensemencement lactique et ses évolutions dans le temps.

4. Synthèse et perspectives

Ces tests globaux, simples à mettre en œuvre, sont bien adaptés pour le suivi régulier de la qualité des laits d'une fabrication comme détecteur d'anomalie ou de dérive et déclencheur d'actions pour ajuster les pratiques (ensemencement, temps de maturation, mesure d'hygiène...). Ils sont intéressants pour comparer des laits, par exemple d'une même ferme à des jours différents et suivre l'écosystème* microbien des laits de troupeau. Ils peuvent alors déclencher des actions en ferme pour corriger les pratiques et peuvent servir ensuite pour juger de l'impact de ces corrections.

Des études restent à conduire sur une utilisation conjointe de ces différents tests : par exemple des travaux ont montré que la combinaison d'une lactofermentation à 22°C et d'un test à la résazurine donnait une bonne estimation de la flore acidifiante de laits de chèvre (Barral *et al.*, 2008 et Larruhart, 2009). Le lien entre ces tests et la qualité des produits reste à étudier plus en détail pour les autres fabrications que les pâtes pressées cuites, en adaptant les conditions de réalisation des tests (température, durée...).

Enfin, ces indicateurs globaux pourraient prendre des formes qui restent à imaginer par la recherche fondamentale et pourraient être adaptés aux équilibres microbiologiques recherchés pour une fabrication donnée.

Références principales

Alais C. 1984. Science du lait. Principes des techniques laitières. Sepaic, 814 pages.

Barral J, Doutart E, Guezenoc C, Karsenti C, Laithier C. 2008. Influence de la pratique de la prématuration sur la qualité du lait, l'acidification et la qualité des fromages de chèvre de type lactique. Rapport technique, Actilait, 60 pages.

Bérodier A, Parguel P, Dasen A, Duboz G, Renaud JP, Billot M, Bérodier F, Ducret JB, Marguet B. 2001. Validation du test de lactofermentation en filière Comté (1999 - 2000). Comité Technique du Comté, Poligny, 90 pages.

Institut de l'Elevage, GDS du Loir et Cher, Institut Technique Français des Fromages, Centre Fromager de Carmejane, 2002. Surveiller la fabrication des fromages fermiers, 143 pages.

Laithier C, Chatelin YM, David V, Talon R, Labadie J, Barral J, Tormo H, Lefrileux Y, Morge S. 2005a. Améliorer la maîtrise de la qualité des fromages fermiers par une meilleure caractérisation des biofilms et de leur rôle. Collection résultats. Compte rendu Institut de l'Elevage, 150531011, 64 pages.

Michel V, Hauwy A, Chamba JF. 2001. La flore microbienne des laits crus de vache. Diversité et influence des conditions de production. Lait 81, 575-592.

Pélissier F, Piednoir RL, Didienné R, Montel MC. 2009. Etude de l'incidence de la durée, de la

température et des équilibres microbiens initiaux sur les caractéristiques microbiologiques des laits crus après incubation expérimentale. Rapport d'étude, UMT TREFL Aurillac, 27 pages.

Raynaud S, Minard L, Lefrileux Y, Morge S, Laithier C, Barral J, Cuvillier D, Chatelin YM, Leroux V, Wyon I. 2008. Augmenter la maîtrise de fabrication du caillé en technologie lactique tout en utilisant des flores indigènes et du lait cru. Collection résultats. Compte rendu Institut de l'Elevage 150838002, 60 pages.

Les autres références citées dans cette partie sont listées en annexe.

B. Les analyses de types microbiologiques

Cécile CALLON

Unité de Recherches Fromagères - INRA
20, côte de Reyne - 15000 Aurillac

Marie-Christine MONTEL

Unité de Recherches Fromagères - INRA
20, côte de Reyne - 15000 Aurillac

1. Des méthodes différentes selon les objectifs visés

La description des communautés microbiennes d'un écosystème* en termes de diversité* (différents niveaux de complexité décrits ci-dessus) et de dynamique peut être abordée par deux types d'approche :

- une approche classique (culture dépendante) basée sur la culture des micro-organismes présents,
- une approche directe (culture indépendante) sans passage par une culture préalable des micro-organismes mais par l'étude des acides nucléiques (ADN*) issus de ces micro-organismes.

Une grande diversité d'individus peuple les communautés microbiennes. Les individus ou souches* se classent dans des genres*, puis des espèces*. Ils peuvent aussi appartenir à des groupes* fonctionnels (exemples des bactéries lactiques). Les équilibres et la diversité des individus présents sont en perpétuelle évolution du lait au fromage.

De nombreuses méthodes sont disponibles et le choix se fera en fonction des objectifs visés et du niveau d'analyse souhaité :

- étude quantitative : dénombrements à différents niveaux : groupes* microbiens, genres*, espèces* ;
- étude qualitative : inventaire au niveau groupe*, espèce* ou « typage » de souches* ;
- suivi de la dynamique des populations microbiennes en cours de process technologique ou comparaison de communautés à un instant t.

La figure 16 résume le type de méthode pouvant être mise en œuvre selon le niveau d'analyse souhaité.

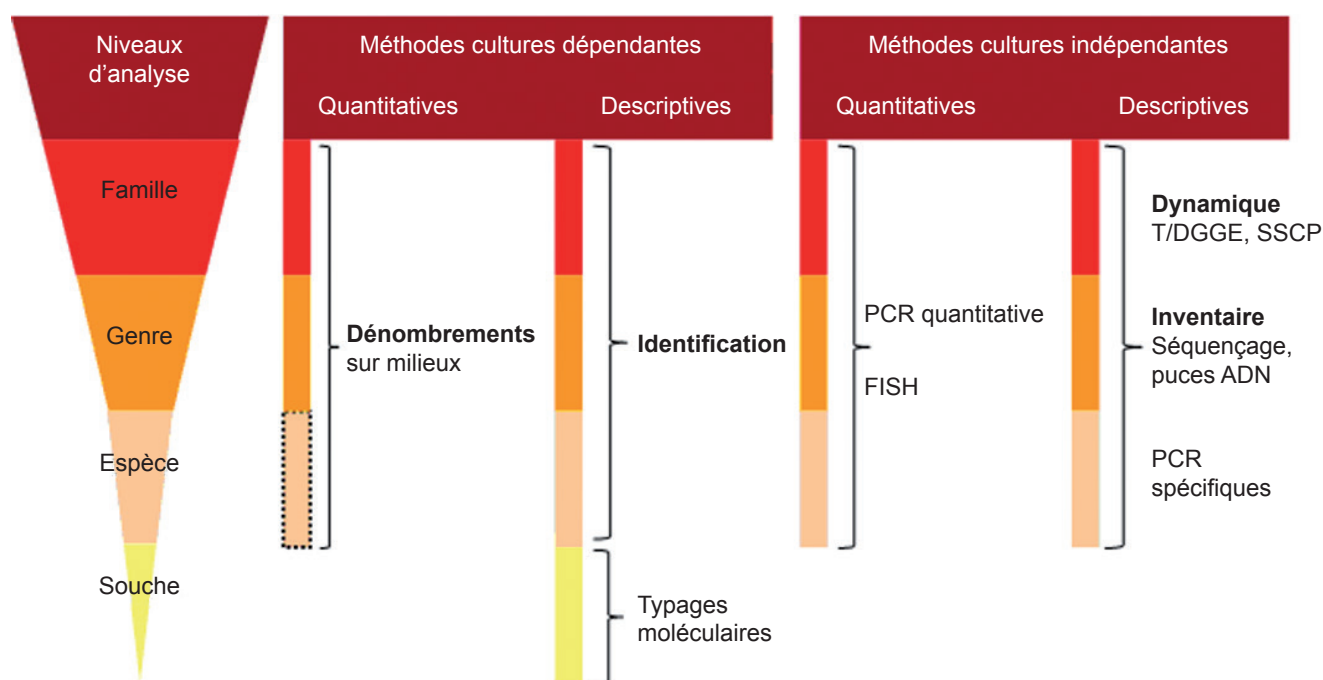


Figure 16. Quelle méthode pour quel niveau d'analyse ?

2. Etude des écosystèmes microbiens laitiers par méthodes classiques (culture dépendantes)

Les méthodes d'appréciation d'un écosystème* par approche classique culture dépendante sont résumées dans la figure 17.

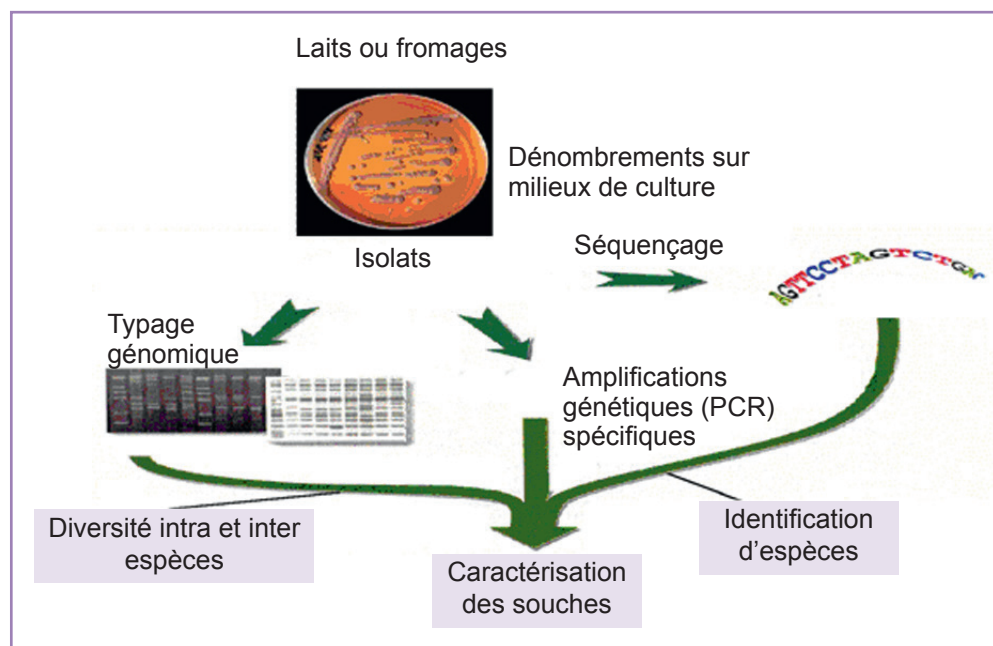


Figure 17. Récapitulatif des méthodes d'appréciation d'un écosystème* par approche culture dépendante.

a. Méthodes quantitatives = dénombrements des flores sur milieux de cultures

L'information obtenue par cultures et dénombrements sur milieux plus ou moins spécifiques se limite à la quantification tout au mieux d'un groupe* de micro-organisme, ou d'un genre* donné et parfois d'une espèce* (cas des pathogènes). Elle dépend de la composition de la communauté.

Jusqu'à ces dernières décennies, la description des communautés microbiennes passait essentiellement par la culture des micro-organismes et leur dénombrement sur milieux plus ou moins spécifiques suivis de l'identification (assignation à une espèce*) des isolats. Les flores peuvent être dénombrées sur milieu peu sélectif. C'est le cas par exemple pour la mesure de la Flore Mésophile Aérobie Revivable (FMAR), analyse effectuée pour le paiement du lait. Les groupes* de germes qui ont une fonction particulière (exemple : hétérofermentaires ou encore producteurs d'acide lactique) sont aussi recherchés. La sélectivité de certains milieux sélectionne un genre* et

parfois une espèce* comme c'est le cas surtout pour les bactéries potentiellement pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) pour lesquelles des milieux sélectifs ont été développés.

Des milieux de culture sont plus ou moins sélectifs

comme le milieu FH (Isolini *et al.*, 1990) pour le dénombrement des *Lactobacillus* ou bien le milieu SB (Slanetz et Bartley, 1957) pour le dénombrement des entérocoques. Cependant, la majorité des milieux de culture ne sont pas sélectifs comme le montrent les descriptions des communautés microbiennes de laits et fromages de diverses origines : fromages Salers (Callon *et al.*, 2004), laits de chèvre (Callon *et al.*, 2007), fromage

de Comté (Bouton *et al.*, 2009). La sélectivité des milieux de culture les plus usuels font l'objet d'une fiche de synthèse à paraître dans le cadre du Réseau Fromages de Terroirs.

Les dénombrements sur milieux de culture sont faciles à réaliser et peu coûteux et peuvent être réalisés en Laboratoires Interprofessionnels d'Analyses pour les dénombrements de flore totale et de bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*). Les autres flores peuvent être dénombrées dans des laboratoires spécialisés (R&D).

b. Méthodes qualitatives = identification et caractérisation d'isolats

Pour approfondir la description des communautés microbiennes, les dénombrements microbiens peuvent être suivis d'une identification des isolats (colonies prélevées sur milieux) ou d'une caractérisation de ces isolats par typage moléculaire*. Par contre, le suivi de dynamique des flores reste difficile.

Types de méthodes	Objectifs	Types de méthodes	Exemples	Lieux d'application	Principaux avantages/inconvénients
Méthodes quantitatives	Quantification de différents groupes, genres ou espèces microbiens	Dénombrements milieux non sélectifs pour quantifier la microflore totale	- Milieu PCA lait - Milieu BHI...	Laboratoires interprofessionnels d'analyses et laboratoires spécialisés (R&D)	(+) Méthodes faciles à réaliser et peu coûteuses. (-) Durées de culture parfois longues, variables selon les groupes microbiens (de 24h à 10 jours).
		Dénombrements milieux peu sélectifs pour quantifier un groupe microbien	- Milieu PCA + inhibiteurs pour les bactéries à Gram - - Milieu OGA pour les levures-moisissures...	Laboratoires spécialisés (R&D)	(-) Nécessité de réaliser de nombreux autres tests sur les colonies pour caractériser ces grands groupes.
		Dénombrements milieux sélectifs pour quantifier une espèce (pathogènes)	- Milieu AloA pour <i>L. monocytogenes</i> ...	Laboratoires interprofessionnels d'analyses	(-) Milieux uniquement développés pour les bactéries pathogènes.
Méthodes qualitatives	Identification au niveau espèce (à partir de colonies sur milieux de culture)	Méthodes phénotypiques	- Morphologie - Physiologie - Enzymologie - Biochimie...	Laboratoires spécialisés (R&D)	(+) Apport d'informations sur les caractères et les fonctions des microorganismes. (+) Méthodes très longues et fastidieuses. (+) Souvent insuffisamment discriminantes au niveau de l'espèce.
		Méthodes moléculaires	Séquençage de l'ADNr 16S (bactéries) et 26S (levures)	Laboratoires spécialisés (R&D)	(+) Méthode la plus pertinente pour l'identification au niveau espèce. (+) Amélioration des délais et coûts du séquençage pas sous-traitance (~ 4 jours). (+) Permet un inventaire exhaustif d'une communauté microbienne.
			PCR spécifiques de groupes microbiens, de genres ou d'espèces	Laboratoires spécialisés (R&D) et laboratoires interprofessionnels d'analyses (uniquement pathogènes)	(+) Nombreux protocoles existant dans la littérature pour identifier de nombreuses espèces. (-) Ne permet pas un inventaire exhaustif d'une communauté microbienne (=recherche ciblée d'une espèce ou d'un genre). (-) Nombreuses PCR souvent nécessaires.

PCA : Plate Count Agar, BHI : Broth Heart Infusion, OGA : Oxytetracyclin Glucose Agar, AloA : Agar *Listeria* selon Ottaviani et Agosti, PCR : Polymerase Chain Reaction, Rep-PCR : Repetitive extra Palindromic - Polymerase Chain Reaction, RAPD : Random Amplified Polymorphism DNA, MLVA : Multi Locus Variable Analysis, VNTR : Variable Number of Tandem Repeat, RFLP : Restricted Fragment Length Polymorphism, PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis.

Cependant, toutes ces techniques d'inventaire dépendent d'une culture microbienne qui isole le micro-organisme de son environnement, et elles sont longues et laborieuses. Les cultures sur milieux sélectifs induisent un a priori sur les micro-organismes recherchés.

Tableau 8. Récapitulatif des méthodes culture dépendantes : avantages et limites.

Types de méthodes	Objectifs	Types de méthodes	Exemples	Lieux d'application	Principaux avantages/inconvénients
Méthodes qualitatives	Typage moléculaire pour la différenciation au niveau souche (à partir de colonies sur milieux de culture)	Amplification de régions variables ou répétées de l'ADN (PCR)	- Rep-PCR - RAPD - MLVA - VNTR...	Laboratoires spécialisés (R&D)	(+) Permettent d'évacuer la diversité au niveau souche et e suivre des souches dans un écosystème. (-) Des banques de profils moléculaires de référence sont parfois nécessaires.
		Coupure de l'ADN par des enzymes de restriction	- RFLP - PFGE		

PCA : Plate Count Agar, BHI : Broth Heart Infusion, OGA : Oxytetracyclin Glucose Agar, AloA : Agar Listeria selon Ottaviani et Agosti, PCR : Polymerase Chain Reaction, Rep-PCR : Repetitive extra Palyndromic - Polymerase Chain Reaction, RAPD : Random Amplified Polymorphism DNA, MLVA : Multi Locus Variable Analysis, VNTR : Variable Number of Tandem Repeat, RFLP : Restrictred Fragment Lengh Polymorphism, PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis.

Cependant, toutes ces techniques d'inventaire dépendent d'une culture microbienne qui isole le micro-organisme de son environnement, et elles sont longues et laborieuses. Les cultures sur milieux sélectifs induisent un a priori sur les micro-organismes recherchés.

Tableau 8 (suite). Récapitulatif des méthodes culture dépendantes : avantages et limites.

Identification des isolats : différenciation possible jusqu'à l'espèce

Les colonies isolées sur les milieux de dénombrement peuvent être identifiées au moyen de méthodes phénotypiques ou moléculaires.

Les tests phénotypiques reposent sur l'étude de la morphologie des isolats et les tests de Gram et catalase qui permettent déjà de les classer dans des grands groupes*, l'étude de leur physiologie (résistance aux températures, pH, NaCl...), enzymologie et biochimie. Ils apportent des éléments essentiels sur les caractéristiques des micro-organismes qui peuvent être très importants et utiles dans un contexte donné. Cependant, malgré leur simplicité, ils n'en restent pas moins très longs et laborieux. De plus, ils sont souvent insuffisamment discriminants au niveau de l'espèce*. Ces tests sont uniquement réalisés en laboratoire spécialisé (R&D).

Les tests moléculaires s'avèrent plus pertinents et beaucoup plus rapides pour l'identification au niveau espèce*. Les outils de biologie moléculaire sont devenus des moyens performants de plus en plus utilisés dans le diagnostic spécifique et même intra-spécifique des organismes. Ils reposent sur la connaissance du génome des organismes recherchés. Chaque organisme possède dans son génome des enchaînements de nucléotides dans un ordre bien spécifique.

Parmi ces tests, le séquençage de l'ADN* ribosomal* (ADNr 16S) demeure à ce jour la méthode la plus pertinente et la plus rapide, d'autant plus que la sous-traitance de cette technique est aujourd'hui devenue aisée et bon marché. Cette méthode implique l'amplification par PCR* (Polymerase Chain Reaction) de l'ADN ribosomal 16S qui est une partie de l'ADN* présentant une grande variabilité inter espèces*. Cette amplification peut se faire après extraction de l'ADN* de chaque isolat, ou bien directement sur colonie ce qui amplifie encore sa rapidité. Il faut cependant être prudent car le pouvoir résolutif du séquençage des ADN ribosomaux* présente des limites pour certaines espèces* très proches (cas des espèces* de staphylocoques qui ne sont pas discriminées par leurs ADNr 16S). L'identification doit être confirmée par d'autres tests.

Des amplifications spécifiques de groupe*, de genre* ou d'espèce* (PCR spécifiques avec des amorces ciblant soit l'ADNr 16S, soit des gènes* de fonction) permettent également d'identifier les isolats. De nombreuses amorces sont disponibles dans la littérature pour l'identification d'un grand nombre d'espèces*. Cette méthode implique cependant un *a priori* sur les espèces* présentes dans l'écosystème* étudié mais ne permet pas un inventaire exhaustif de la communauté microbienne.

Les tests d'identification réalisés à partir des dénombrements sur milieux sont difficilement quantitatifs à moins de les effectuer sur l'ensemble des colonies d'une boîte de dénombrement, ce qui représente une charge de travail importante. Des estimations sont possibles en identifiant un nombre de colonies représentatives (par exemple la racine carrée du nombre total de colonies sur la boîte).

Caractérisation des isolats par typage : différenciation au niveau souche*

Les colonies isolées de milieux de cultures peuvent être caractérisées par des techniques d'empreinte génomique ou typage* (méthodes d'étude de la variabilité de l'ADN*) qui permettent de différencier les micro-organismes au niveau de la souche* (figure 18).

Plusieurs techniques d'empreinte sont disponibles permettant d'obtenir des profils moléculaires des isolats et de réaliser un typage inter ou intra-espèces* des isolats. Ces techniques sont basées sur la variabilité de l'ADN* qui est mise en évidence par le nombre et la taille des fragments ADN* obtenus (électrophorèse*) soit :

- après amplification* (PCR) par des amorces ciblant des régions particulières de l'ADN* comme la technique Repetitive Extra Palindromic-PCR (REP-PCR) (Callon *et al.*, 2004 ; Berthier *et al.*, 2001 ; Bouton *et al.*, 2002), Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD), Multi Locus Variable Analysis (MLVA), Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) (Callon *et al.*, 2008).
- après coupure de l'ADN* par des enzymes de restriction* comme la technique Restricted Fragment Length Polymorphism (RFLP), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) (Bouton *et al.*, 2002).

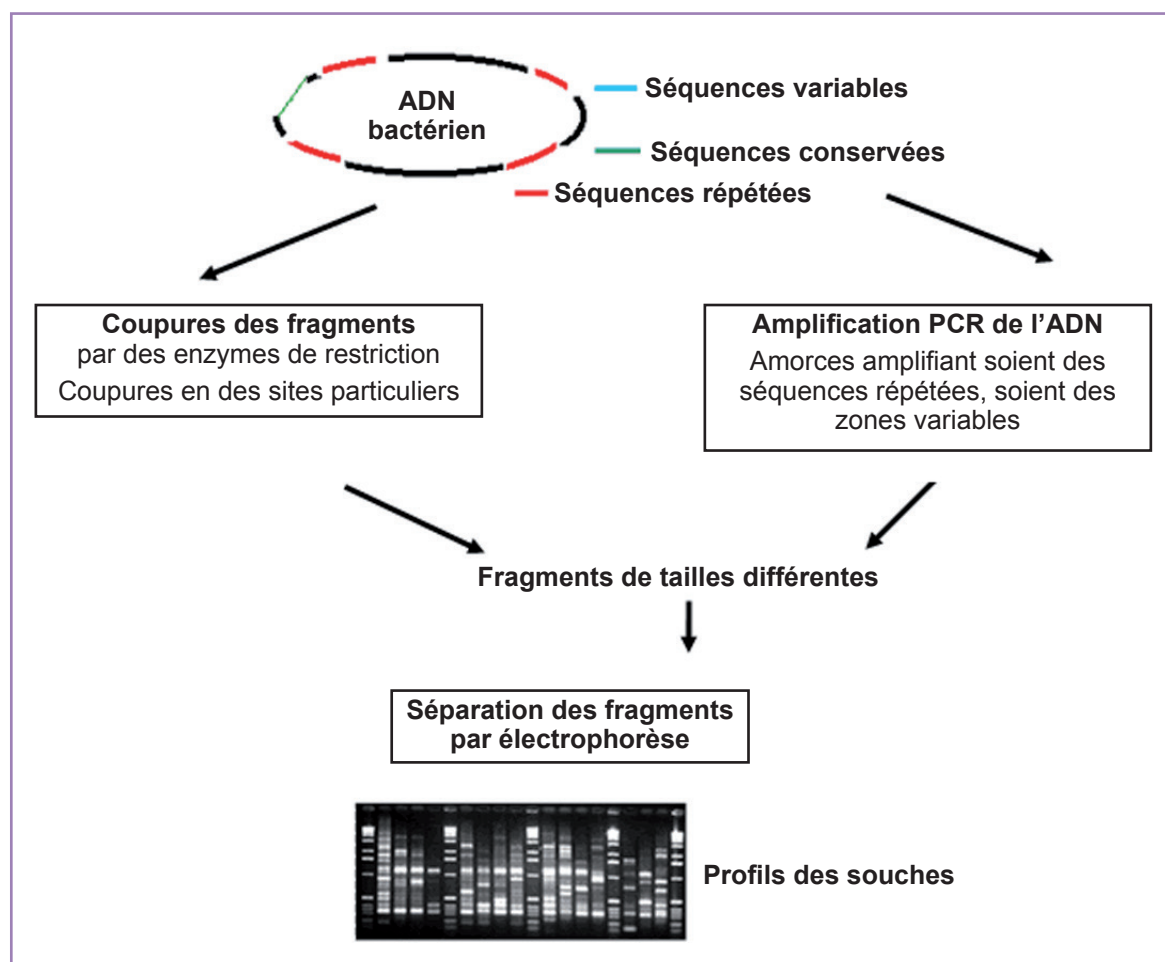


Figure 18. Principe du typage moléculaire*.

Ces techniques de typage sont intéressantes d'une part pour l'évaluation de la diversité au niveau des souches* (dernier niveau de complexité de la diversité microbienne*) mais aussi pour retracer l'origine de contamination par des pathogènes d'un produit ou bien encore de suivre un ferment dans une fabrication.

La pertinence de ces techniques a été démontrée dans de nombreuses études. Celles-ci sont facilement applicables en routine, peu coûteuses et assez rapides d'exécution, surtout pour l'évaluation de la diversité de la communauté microbienne étudiée ou le suivi d'une souche*.

Le tableau 8 récapitule les avantages et limites des méthodes culture dépendantes.

Cependant, toutes ces techniques d'inventaire dépendent d'une culture microbienne qui isole le micro-organisme de son environnement, et elles sont longues et laborieuses. Les cultures sur milieux sélectifs induisent un a priori sur les micro-organismes recherchés.

3. Etude des écosystèmes microbiens laitiers par méthodes directes (cultures indépendantes)

Les méthodes moléculaires directes ou cultures indépendantes ne nécessitent pas de sélection préalable par les milieux de culture et permettent ainsi la détection des micro-organismes non cultivables. Elles permettent d'inventorier, de suivre ou quantifier les micro-organismes au sein d'une communauté complexe mais cependant sont souvent limitées aux micro-organismes dominants. Ces techniques nécessitent des appareillages spécialisés et des mises au point importantes et sont réservées aux laboratoires spécialisés R&D.

Les méthodes moléculaires directes ou cultures indépendantes s'affranchissent des cultures microbiennes. Les acides nucléiques (ADN*) sont extraits directement de la matrice (lait, fromage) et les communautés microbiennes sont alors représentées par un pool d'acides nucléiques qui peut être analysé.

Types de méthodes	Objectifs	Types de méthodes	Exemples	Lieux d'application	Principaux avantages/inconvénients	
Méthodes quantitatives	Quantifier certaines espèces, genres ou groupes microbiens	Amplifications d'ADN spécifiques	PCR quantitative en temps réel	Laboratoires spécialisés (R&D)	(-) Seuils de détection parfois élevés. (-) Coût assez élevé. (-) Longues mises au point pour le développement d'une nouvelle amorce.	
		Hybridations <i>in situ</i> avec des sondes spécifiques	FISH	Laboratoires spécialisés (R&D)	(+) Permet aussi d'étudier l'organisation spatiale des groupes microbiens et leur localisation. (+) Pas d'extraction d'ADN au préalable (méthode rapide). (-) Difficulté de perméabiliser toutes les microorganismes. (-) Pas de quantification possible lorsque les cellules sont agrégées ou adsorbées sur un support.	
			Amplifications d'ADN	PCR non spécifiques (ADNr) + clonage-séquençage	Laboratoires spécialisés (R&D)	(-) Un très grand nombre de clones est nécessaire pour réaliser un inventaire exhaustif d'une communauté microbienne. (-) Méthode longue et coûteuse.
				PCR spécifiques	Laboratoires spécialisés (R&D) et laboratoires d'analyses interprofessionnels (pathogènes)	(-) Ne permet pas un inventaire exhaustif d'une communauté microbienne (=recherche ciblée d'une espèce ou d'un genre). (+) Méthode rapide et peu coûteuse.
		Méthodes qualitatives	Inventaire des espèces	Hybridations de séquences d'ADN avec des sondes spécifiques	Puces à ADN	Laboratoires spécialisés (R&D)

PCR : Polymerase Chain Reaction, FISH : Fluorescent In Situ Hybridation DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism

Tableau 9. Récapitulatif des méthodes culture indépendantes : avantages et limites.

Types de méthodes	Objectifs	Types de méthodes	Exemples	Lieux d'application	Principaux avantages/inconvénients
Méthodes qualitatives	Suivi de l'évolution des populations (=dynamiques)	Méthodes basées sur des empreintes moléculaires après amplifications non spécifiques	- SSCP - DGGE ou TGGE	Laboratoires spécialisés (R&D)	(+) vision globale des communautés complexes (+) analyse simultanée de nombreux échantillons (+) étude de la diversité et de la dynamique (-) sous-estimation de la diversité (co-élution, populations dominantes amplifiées)
					(+) pas de sélection préalable par les milieux de culture : tous les microorganismes dominants, même non cultivables, peuvent être inventoriés, suivis ou quantifiés

PCR : Polymerase Chain Reaction, FISH : Fluorescent In Situ Hybridation DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, TGGE : Temperature Gradient Gel Electrophoresis, SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism

Tableau 9 (suite). Récapitulatif des méthodes culture indépendantes : avantages et limites.

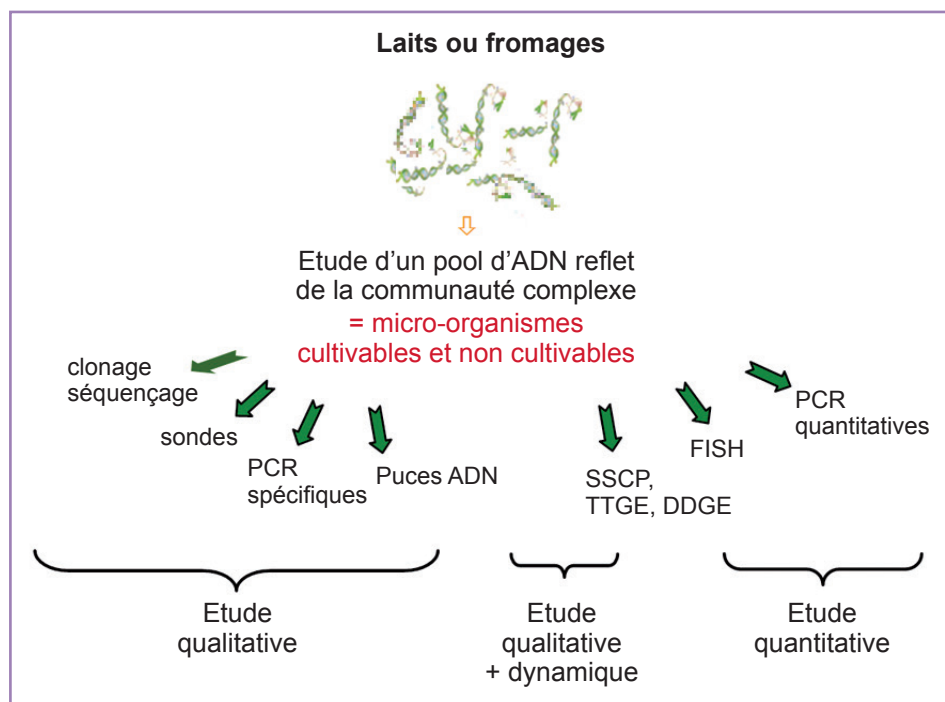


Figure 19. Schéma général des méthodes culture indépendantes.

Tous les micro-organismes dominants, même non cultivables, peuvent être inventoriés, suivis ou quantifiés, sous condition que les cellules puissent être lysées et leur ADN* extrait.

Les techniques culture indépendantes disponibles sont résumées dans la figure 19.

a. Méthodes quantitatives

Directement à partir de lait ou de fromage, il est possible de quantifier les micro-organismes au niveau espèces*, genres* ou familles (selon la spécificité des amorces utilisées) par des techniques de biologie moléculaire.

Deux techniques sont disponibles :

- la technique de PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) : cette méthode permet l'amplification d'un ADN* spécifique (groupes* microbiens, genres* ou espèces*) à partir de l'ADN* total extrait du lait ou du fromage. Les amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN* sont couplées à de la fluorescence qui permet de le quantifier. Cette méthode est pertinente pour quantifier un ou plusieurs micro-organismes dans une communauté complexe malgré des seuils de détection parfois élevés (10^1 à 10^4 UFC/g), un coût assez élevé, la nécessité de posséder l'appareillage adéquat et de longues mises au point pour chaque nouvelle espèce* testée.

- la technique FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) consiste en l'hybridation des ADN* *in situ* avec des sondes* spécifiques fluorescentes suivi d'une analyse au microscope à épi-fluorescence. C'est une autre technique moléculaire directe qui permet de quantifier et localiser les espèces* sans les cultiver et sans extraire l'ADN*. C'est une méthode de choix pour l'identification spécifique de cellules microbiennes individuelles dans leur environnement naturel. Il est alors possible d'obtenir rapidement des informations sur la morphologie, l'organisation spatiale et la localisation, informations qui permettent d'étudier l'écologie des groupes* bactériens ciblés.

Ces deux types de techniques requièrent un appareillage coûteux, de longues mises au point et une certaine expertise. Pour ces raisons, elles sont à ce jour seulement réalisées par des laboratoires spécialisés en recherche et développement. Cependant, certains laboratoires d'analyses interprofessionnels utilisent la méthode de PCR quantitative pour la quantification de pathogènes (comme *Listeria monocytogenes*) avec emploi de kits PCR commercialisés.

b. Méthodes qualitatives

A partir du pool d'ADN* extraits d'un échantillon, il est possible d'inventorier les espèces* présentes, d'étudier la biodiversité* ou de suivre la dynamique des populations.

Inventorier des espèces

Les espèces* présentes peuvent être inventoriées par :

- la réalisation d'une banque de clones* d'ADNr 16S, suivie de leur séquençage*. Cette technique favorise la mise en évidence des espèces* dominantes et nécessite d'avoir un très grand nombre de clones (300-500) pour un inventaire exhaustif et évaluer au maximum la diversité microbienne* dans l'échantillon. Cette technique est longue et fastidieuse et n'est réalisable que par des laboratoires de recherche.

- la réalisation de PCR spécifiques de genres* ou espèces* recherchés. Cela ne permet pas un inventaire exhaustif de la communauté microbienne mais renseigne uniquement sur la présence ou non d'un micro-organisme recherché. Dans le cas des pathogènes comme *Listeria monocytogenes*, cette technique peut-être réalisée dans des laboratoires interprofessionnels d'analyse.

- des hybridations d'ADN* avec des sondes* spécifiques d'une famille, d'un genre* ou d'une espèce*. Ces sondes* peuvent être immobilisées sur des puces à ADN ou biopuces*. Elles présentent l'avantage de pouvoir contenir un très grand nombre de sondes* qui sont donc utilisées simultanément en une seule analyse. Cependant, malgré ses atouts intéressants pour l'étude d'environnements complexes, la description des communautés microbiennes complexes par cette technique reste très limitée. La principale limite concerne le dessin des sondes* qui doivent être suffisamment spécifiques, des difficultés d'interprétation nécessitant une expérience certaine et le problème des sous dominants difficiles à amplifier. L'utilisation de cette technique reste réservée aux laboratoires de recherche.

Etude de la diversité et de l'évolution d'une communauté microbienne

Il est aussi possible d'étudier la diversité ou de suivre l'évolution d'une communauté microbienne

tout au long d'un process technologique pour des fromages ou bien à des périodes différentes.

Là encore, de nombreuses méthodes existent comme les méthodes d'empreintes moléculaires : les techniques Temperature/Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (T/DGGE) (Lafarge *et al.*, 2004; Ogier *et al.*, 2004) ou encore la méthode Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) (Callon *et al.*, 2006; Duthoit *et al.*, 2003). Contrairement à la RAPD et la RFLP, les méthodes T/DGGE et SSCP (figure 20) permettent, après amplification* (PCR) de l'ADN* global d'un échantillon, de séparer les fragments d'ADN* obtenus, non plus par leur taille, mais selon leur séquence.

Ces méthodes ont permis de suivre et de comparer des communautés dans les laits et fromages (saison, période de lactation, régime alimentaire différent...).

Les avantages de ces techniques sont de donner une vision globale de communautés complexes, de permettre l'analyse simultanée de nombreux échantillons et d'étudier à la fois la diversité et la dynamique des populations.

Cependant, ces méthodes comportent aussi quelques limites. Du fait que plusieurs espèces* peuvent co-éluer dans un profil, c'est-à-dire donner un pic au même endroit, ceci peut amener à sous-estimer la diversité. De plus, ces méthodes étant basées sur l'extraction et l'amplification de l'ADN* au départ, elles favorisent la détection des populations dominantes qui s'amplifient et se lysent préférentiellement.

Le tableau 9 récapitule les avantages et limites des méthodes culture indépendantes.

4. Synthèse et perspectives

L'étude de la biodiversité* dans les écosystèmes* des produits laitiers bénéficie d'outils performants mais ceux-ci sont souvent lourds d'utilisation, parfois chers et pas toujours transférables de la recherche vers les laboratoires de routine (tableaux 8 et 9 récapitulatifs des différentes méthodes en fonction des objectifs).

Il n'y a pas d'outil idéal et il est nécessaire de bien connaître les biais et limites de chaque méthode pour une interprétation au plus juste et souvent de les adapter à ses objectifs. Il est souvent souhaitable de combiner plusieurs méthodes pour avoir une image

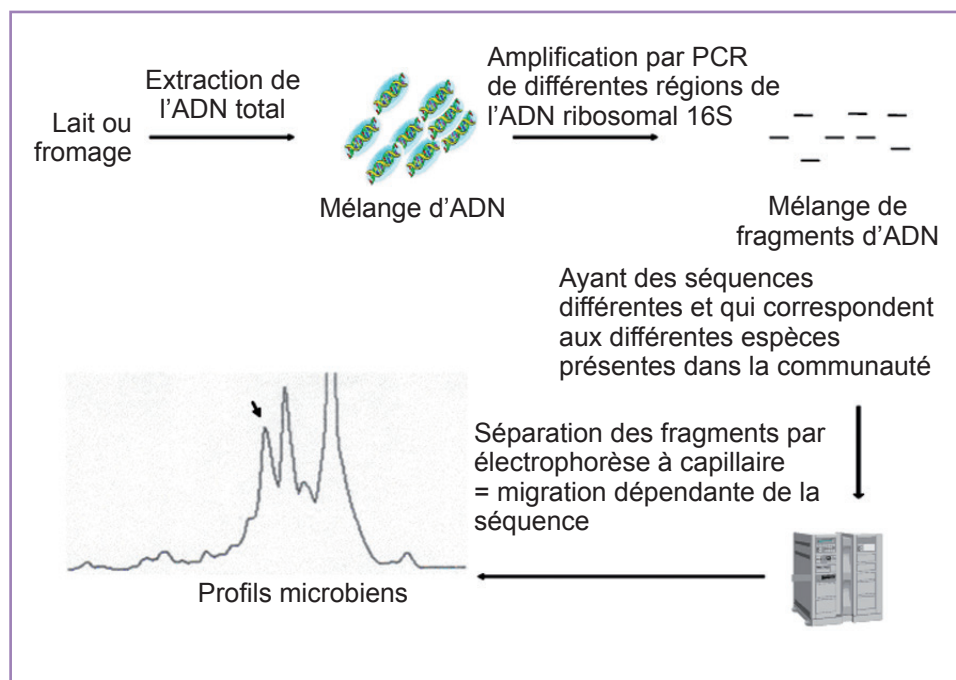


Figure 20. Principe de l'analyse globale des communautés microbiennes par la technique Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP).

finale de la communauté la plus complète et la plus proche de la réalité.

Toutes les techniques précédemment décrites permettent la description de la structure des communautés microbiennes mais ne donnent aucun renseignement sur leur viabilité ou leur activité métabolique. Aujourd'hui, la nécessité de développer d'autres outils plus centrés sur l'étude de la diversité fonctionnelle des communautés semble plus pertinente afin de mieux comprendre les interactions microbiennes encore insuffisamment comprises même si elles sont au cœur du fonctionnement des écosystèmes*.

Au-delà de l'activité métabolique globale, il peut être intéressant de cerner les activités spécifiques de certaines populations. Il est possible de suivre des gènes* de fonctions métaboliques précises par des techniques d'empreintes type T/DGGE précédemment décrites. De même, des biopuces métaboliques* (ou biopuces fonctionnelles*) peuvent être construites à partir de séquences de gènes* codant pour des enzymes et servent à identifier des voies métaboliques d'intérêt.

Cependant, l'attention doit être portée sur le fait que la recherche de gènes* n'est pas suffisante et qu'il est nécessaire de suivre l'expression de ceux-ci dans

le système étudié. L'approche transcriptomique* qui étudie l'expression des gènes* fonctionnels dans les écosystèmes* se développe, mais elle n'est pas encore transférable à une activité de routine.

Références principales

Berthier F, Beuvier E, Dasen A, Grappin R. 2001. Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species specific primers. *Int. Dairy J.* 11, 293-305.

Bouton Y, Guyot P, Beuvier E, Tailliez P, Grappin R. 2002. Use of PCR-based methods and PFGE for typing and monitoring homofermentative lactobacilli during Comté cheese ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 76, 27-38.

Callon C, Millet L, Montel MC. 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC salers cheese. *J. Dairy Res.* 71, 231-244.

Callon C, Gilbert FB, De Crémoux R, Montel MC. 2008. Application of variable number of tandem repeat analysis to determine the origin of *S. aureus* contamination from milk to cheese in goat cheese farms. *Food Control* 19, 143-150.

Callon C, Duthoit F, Delbes C, Ferrand M, Lefrileux Y, De Crémoux R, Montel MC. 2007.

Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year : Molecular approaches. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 547-560.

Callon C, Delbes C, Duthoit F, Montel MC. 2006. Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 172-180.

Duthoit F, Godon JJ, Montel MC. 2003. Bacterial Community Dynamics during Production of Registered Designation of Origin Salers Cheese as Evaluated by 16S rRNA Gene Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Appl. Environ. Microb.* 69, 3840-3848.

Isolini D, Grand M, Glättli H. 1990. Selektivmedien zum nachweis von obligat und fakultativ heterofermentativen Laktobazillen. *Schweiz. Milchw. Forsh.* 19, 57-59.

Lafarge V, Ogier JC, Girard V, Maladen V, Leveau JY, Delacroix-Buchet A. 2004. Le potentiel de la TTGE pour l'étude bactérienne de quelques laits crus. *Lait* 84, 169-178.

Ogier JC, Lafarge V, Girard V, Maladen V, Gruss A, Leveau JY, Delacroix-Buchet A. 2004. Molecular fingerprinting of dairy Microbial Ecosystems by use of temporal Temperature and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microb.* 70, 5628-5643.

Slanetz LCW, Bartley CH. 1957. Numbers of enterococci in water, sewage and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *J. Bacteriol.* 74, 591-596.

Les autres références citées dans cette partie sont listées en annexe.

■ Partie 4 : Quelle est la variabilité rencontrée au sein de l'écosystème « lait », à quoi est-elle due ?

Yann DEMARIGNY

Département Productions Agro-Alimentaires et Qualité (PAAQ)
ISARA-Lyon
Agrapole - 23, rue Jean Baldassini - 69364 Lyon Cedex 07

Ce chapitre se propose d'aborder la variabilité microbiologique des laits crus selon ses deux composantes, temporelle (d'un jour à l'autre, au cours de l'année ou sur plusieurs années) et spatiale (même aire géographique entre exploitations différentes et entre aires géographiques différentes). La diversité des approches méthodologiques de cette variabilité microbiologique dépend de nombreux facteurs parmi lesquels, le niveau d'échelle retenu (par exemple le jour, la saison ou l'année pour la variable temporelle) et l'environnement laitier (la race ou l'espèce laitière, les facteurs d'élevage, etc). Ce sont ces différents facteurs qui expliquent la complexité des systèmes. De plus, à ces facteurs se surajoutent les problématiques de l'approche microbiologique. Pour apprécier ces variabilités, les questions à se poser sont : comment apprécier cette variabilité ?, comment les micro-organismes cohabitent, vivent, meurent et se lysent ?, comment répondent-ils aux changements environnementaux ? (Montel *et al.*, 2003). Ces questions et ces difficultés ont pour conséquence que l'étude du même écosystème* lait cru par deux approches différentes conduit nécessairement à des résultats différents. Cela rend difficile voire quelquefois impossible la comparaison des résultats entre eux.

A. La variabilité des écosystèmes des laits crus de vache

L'ensemble des travaux les plus significatifs obtenus sur les laits crus de vache issus de régions différentes conduisent à des conclusions similaires. Au-delà des variations temporelles inévitables quelle que soit l'échelle considérée, qualitativement et quantitativement, il existe une constance et une spécificité de l'écosystème* microbien du lait cru à la ferme. Cette stabilité s'explique par le poids élevé des pratiques, lesquelles conditionnent l'évolution de la microflore vers tel ou tel type de communauté.

L'analyse de la variabilité des laits crus de vache est différemment appréhendée suivant les études. Celles-ci s'intéressent soit aux grands groupes* microbiens et à leurs rapports, soit à la composition en termes de souches* d'une population donnée, par exemple les lactocoques ou les lactobacilles. L'évolution des grands groupes* microbiens recouvre en général, la flore totale, les flores d'intérêt (flores lactiques mésophiles, flores « d'affinage », levures, microcoques...), les flores d'altération (*Pseudomonas*, coliformes) et dans certains cas, les pathogènes. En général, ces travaux sont menés de manière à tenir compte des effets croisés des variations spatiales et temporelles. En voici les principales conclusions.

1. Une certaine stabilité dans les fermes a priori liée aux pratiques des producteurs

Au-delà des variations temporelles inévitables quelle que soit l'échelle considérée, qualitativement et quantitativement, il existe une constance et une spécificité de l'écosystème* microbien du lait cru à la ferme. Cette stabilité s'explique par le poids élevé des pratiques, lesquelles conditionnent l'évolution de la microflore vers tel ou tel type de communauté.

Cette conclusion ressort de trois séries d'études particulièrement représentatives de l'étude des écosystèmes* laitiers de vache : celles menées par

N. Desmasures sur la zone AOC Camembert, celles d'Y. Bouton en AOC Comté et celles de V. Michel en zone alpine. Ces travaux sont appuyés par d'autres plus spécifiques.

Ainsi, l'effet dominant des pratiques sur la flore des laits ressort des travaux de Michel *et al.*, 2001 qui ont porté sur l'étude de 158 échantillons de laits de vaches prélevés en Savoie et en Haute-Savoie dans 27 fermes, en été et en hiver. Seize groupes* microbiens ont été suivis. En dépit de niveaux de contamination faibles (flore totale moyenne d'environ 10^4 UFC*/mL), les auteurs ont pu identifier cinq classes de laits crus correspondant à cinq types de communautés microbiennes, deux dominées par des flores d'intérêt technologiques, deux par des flores d'altération et la dernière inclassable sur ces critères. Il est remarquable de noter que sur la période d'étude, 54 % des laits n'ont pas changé de classe, surtout en hiver. Cela signifie que la flore microbienne du lait cru est fortement spécifique de la ferme dont elle provient. Cette observation a d'ailleurs été confirmée. Michel *et al.*, 2001 ont regroupé les laits par « types de pratiques », en trois groupes distincts. Or à chaque groupe de pratique correspondait plus spécifiquement certaines classes de laits. D'ailleurs, les auteurs ont pu justifier la présence et les niveaux de plusieurs flores par les pratiques. Les *Pseudomonas* semblent par exemple fortement liés au nettoyage de la machine à traire (types de produits, alternance, température).

La persistance de certains génotypes issus de la même ferme tout au long de l'année renforce l'idée d'un lien entre la composition de la flore du lait cru et les pratiques appliquées. En effet, dans le cadre d'une autre étude, Dalmasso *et al.*, 2008 ont suivi différentes flores dans des laits crus collectés quotidiennement sur la même exploitation durant 12 jours consécutifs. Les observations faites sur l'année sont confirmées sur cette échelle de temps plus réduite : fluctuation des flores qualitativement et quantitativement. En outre, la population de lactocoques se partage entre deux sous-populations, l'une dominante durant les 6 premiers jours, l'autre par la suite. La présence de biofilms* -en lien donc avec les pratiques de nettoyage- est postulée pour justifier cette remarquable homogénéité de cette population au cours du temps.

2. Avec des variations saisonnières

Il existe des variations saisonnières suivant les laits crus. Par exemple, en Normandie, il a été trouvé que les taux de lactobacilles et de lactocoques variaient suivant la période de l'année, avec toutefois des différences suivant les études et les techniques utilisées (tableau 10). La flore totale fluctue pouvant passer de 10^4 à 10^6 UFC*/mL. Il est remarquable d'observer qu'en dépit de variations, celles-ci se reproduisent d'une année sur l'autre et peuvent s'expliquer. Ainsi, les *Pseudomonas* sont corrélés à l'entretien de la machine à traire et les flores lactiques à l'animal ou à la ration. Ces conclusions ressortent en particulier de l'étude de Desmasures et Gueguen, 1997 qui ont suivi la composition du lait cru dans 4 exploitations durant 1 à 2 ans. Ces expérimentations ont été complétées par une analyse de la flore de 27 exploitations de janvier à juin sur la même zone (Desmasures *et al.*, 1997a).

En zone à Comté, les travaux de Bouton *et al.*, 2000 ont porté sur l'étude de laits crus provenant de deux zones du Jura. Les flores de lactobacilles, d'entérocoques et de bactéries propioniques* ont notamment fait l'objet d'une étude plus approfondie. Ce travail a été complété par la caractérisation de laits crus à Comté issus de 54 fermes sélectionnées sur le mode de stabulation -libre ou entravé. L'étude comportait des prélèvements en hiver et en été. Seize populations microbiennes ont été suivies (Bouton *et al.*, 2005 et 2006). Enfin, seize fermes à Comté ont été analysées pour les flores d'ambiance, de l'alimentation, des trayons et du lait (Normand *et al.*, 2007). Des premiers travaux, il ressort que la flore varie qualitativement et quantitativement d'une saison à l'autre. Par exemple, les flores psychrotrophes, entérocoques, propioniques* et les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs sont à un niveau deux fois plus élevé en hiver qu'en été. Les auteurs expliquent ces variations par les pratiques d'élevages et notamment, l'utilisation du foin, (distribution, refus...), la promiscuité (stabulation libre ou entravée par exemple) et l'hygiène (propreté des sols, nature des revêtements). Ces conclusions sont confirmées par l'étude de Normand *et al.*, 2007. Ces auteurs ont observé un lien entre la majorité des flores du lait cru et celles présentes dans l'air de la salle de traite et dans l'alimentation.

Flore	Milieu	Conditions	Hiver	Printemps	Été	Automne	Références
Lactocoques	PCA-Lait	30°C aérobiose	810 ± 1 200		690 ± 3 600		Desmasures <i>et al.</i> , 1997a
	PCA-Lait + BCP + ac. Nalidixique + Natamycine	30°C aérobiose	1 480	2 000	370	1 860	Desmasures et Gueguen, 1997 (1)
	PCA-Lait + BCP + ac. Nalidixique + Natamycine	30°C aérobiose	333 ± 203		2 320 ± 330		Corrolier <i>et al.</i> , 1998 (2)
Lactobacilles	Rogosa	30°C anaérobiose	180 ± 690		180 ± 3 000		Desmasures <i>et al.</i> , 1997a
	Rogosa	30°C anaérobiose	1 580	850	230	850	Desmasures et Gueguen, 1997 (1)

(1) données moyennes sur 3 mois

(2) données moyennes obtenues à partir des résultats issus de deux bassins de prélèvements

Tableau 10. Dénombrements des flores lactocoques et lactobacilles à différentes périodes de l'année dans des laits crus issus de Normandie - Données exprimées en unités formant colonies par millilitre de lait (UFC*/ml).

3. Et des effets liés au lieu

L'influence de l'origine des prélèvements était aussi marquée.

En Normandie, Corrolier *et al.*, 1998 ont étudié spécifiquement la flore lactocoque de six exploitations réparties sur deux bassins de production : le Bessin et le Bocage Falaisien. Ainsi, si 80 % de la population de lactocoques des laits crus issus du Bocage Falaisien était représentée par la sous-espèce *Lc lactis* subsp. *lactis*, ce pourcentage n'excédait pas 30,5 % dans le Bessin. Or cette sous-espèce présentait une plus grande hétérogénéité que la sous-espèce *cremoris*. Ainsi, la distribution des populations de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *Lc lactis* subsp. *cremoris* change suivant l'origine du prélèvement, c'est-à-dire, suivant l'exploitation et peut-être selon la région.

Bouton *et al.*, 2000 ont aussi montré que la flore variait quantitativement et qualitativement d'une ferme à l'autre. Plus spécifiquement, la diversité génétique des lactobacilles, et parmi eux, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb rhamnosus*, et *Lb paracasei*, et des entérocoques (*Enterococcus faecalis*, *Ec fecium*), présente des différences significatives entre fermes.

4. Des flores dont les variations sont difficiles à expliquer

Pour certaines flores, les variations sont difficilement interprétables. C'est le cas notamment pour les levures. Leur niveau peut être aussi bien lié au climat qu'au sol ou aux pratiques.

B. La variabilité des écosystèmes des laits crus de chèvre et de brebis

Les études sur les laits de chèvre et de brebis restent encore limitées. Elles révèlent toutes des variations en termes quantitatif et qualitatif des flores présentes. Ces variations sont dues aux facteurs d'élevage, saisonniers et environnementaux. A noter que les laits crus de chèvre présentent une flore microbienne différente de celle des laits de vache.

A la différence des laits de vache, les laits de chèvre ou de brebis sont fréquemment transformés directement sur l'exploitation. Ceci confère à leurs écosystèmes* des caractéristiques essentielles à la qualité des fromages (Scintu et Piredda, 2007). Le nombre d'études consacrées au lait cru de chèvre ou de brebis est encore extrêmement limité. Cependant, toutes font état de variations quantitatives et qualitatives des niveaux de flores dues aux facteurs

d'élevage, saisonniers et environnementaux (Gaya *et al.*, 1999).

Les laits crus de chèvre en particulier présentent une flore microbienne différente de celle des laits de vache, comme ceci a pu être montré dans la première partie de ce même chapitre.

1. Les laits de chèvre

La flore des laits de chèvre semble pouvoir être regroupée en grandes catégories indépendantes de l'origine des prélèvements. Tormo *et al.*, 2007b distinguent ainsi quatre catégories sur la base de l'étude de 48 laits issus des zones de production du Rocamadour, du Pélardon et en Franche-Comté. Barral *et al.*, 2008 recensent trois classes de laits en région PACA, mais de composition différente des précédentes. Il semble que la représentation de ces catégories soit plus ou moins stable d'une saison ou d'une année à l'autre suivant les études.

La présence de résultats proches d'une région ou d'une saison à l'autre conduit ces auteurs à privilégier l'influence des pratiques de production sur les caractéristiques microbiologiques des laits de chèvre. Pourtant Tormo *et al.*, 2007b montrent que les classes de laits ne recoupent pas les catégories de pratiques d'élevages effectuées sur le même lot d'exploitations. Parmi les facteurs suspectés, le paillage, les pratiques de nettoyage de la machine à traire ainsi que l'ambiance autour de la traite sont fréquemment avancées pour expliquer ces différences. Si le froid peut moduler localement l'incidence de certaines flores du lait cru -par exemple, les levures ou les *Pseudomonas*-, les mêmes pratiques semblent pouvoir systématiquement être associées aux laits peu chargés. Il en est de même des laits fortement chargés (Tormo *et al.*, 2010).

Callon *et al.*, 2007 ont suivi le lait cru de chèvre de la même exploitation durant toute une année. Plus de 42 espèces* microbiennes ont ainsi été caractérisées. Leur représentation pouvait fortement varier au cours de l'année. Tel était le cas par exemple des flores à Gram positif. Parmi elles, les bactéries lactiques présentaient une diversité plus faible centrée sur les espèces* *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* et *Leuconostoc mesenteroides*. De tels résultats ont également été relevés par Tormo *et al.* dans 20 élevages différents (communication personnelle). Callon *et al.*, 2007 ont mis en évidence

quatre périodes correspondant à quatre grands types de communautés microbiennes. La composition microbienne s'expliquait par un effet saisonnier marqué dû principalement aux changements de conditions d'élevage, et au type d'alimentation du troupeau. Par exemple, la présence de flores halophiles pouvait être liée à une alimentation salée ou à l'utilisation d'agent de nettoyage de la machine à traire. *Pseudomonas*, fréquemment identifié, était suspecté provenir de l'animal ou de l'environnement, puis être favorisé par le stockage du lait à 4°C.

Dalmasso, 2009 a suivi la flore du lait de chèvre de la même exploitation durant 10 jours consécutifs à raison d'un prélèvement tous les deux jours. Si les flores fluctuaient entre chaque prélèvement, les rapports entre populations restaient à peu près les mêmes : la flore totale variait entre 10^4 et 10^5 UFC*/mL; les *Pseudomonas* dominaient conjointement avec les staphylocoques (entre 10^3 et 10^4 UFC*/mL); les *Enterobacteriaceae* et les entérocoques pouvaient fortement varier. Ces changements étaient attribués aux conditions d'hygiène au cours de la traite. Ces résultats semblent toutefois différents de ceux rapportés par Tormo *et al.*, 2010. Les variations sur une échelle de temps courte à un instant donné ne sont peut-être pas soumises aux mêmes contraintes que sur de plus longues périodes et donc moins représentatifs ?

La connaissance des caractéristiques microbiologiques des laits de chèvres associée aux facteurs d'élevage, saisonniers et environnementaux est donc fondamentale. En effet, cela peut conditionner ultérieurement les paramètres de la transformation fromagère (Larruhart, 2009). Par exemple, pour le choix de la température de prématuration « optimale » ou le choix du type de levain de prématuration. En modifiant les rapports de flores dans les laits crus, cela peut conduire à des courbes d'acidification plus ou moins rapides.

2. Les laits de brebis

Deux études se sont intéressées à la flore lactococque des laits crus de brebis, prélevés sur 32 exploitations de la zone de production de l'Ossau-Iraty (Feutry *et al.*, 2011b), et au cours de l'année sur une exploitation produisant du Manchego (Gaya *et al.*, 1999).

Il ressort de la première étude que les lactocoques ne sont détectés que dans 62 % des exploitations. Il s'agit principalement de la sous-espèce *Lc lactis* subsp. *lactis*. Cette flore lactocoque des laits crus présente des caractéristiques rustiques -lysogénie, pouvoir acidifiant- d'intérêt technologique que les auteurs attribuent à l'influence croisée de l'environnement et des pratiques d'élevage.

Gaya *et al.*, 1999 ont observé, du printemps à l'hiver, une réduction de la population de lactocoques fortement acidifiante de 14,5 à 3 %. Ils attribuent ces changements aux conditions de production du lait cru au cours de l'année.

C. Synthèse et perspectives

Il ressort de ces différents travaux que l'écosystème* lait cru présente différents niveaux de variabilité. Les micro-organismes que l'on trouve en lait de vache et en lait de chèvre ou de brebis peuvent varier qualitativement et quantitativement. Les portées de cette conclusion sont à nuancer, les différentes études n'ayant pas suivi nécessairement les mêmes flores dans le cadre de leur suivi, ou en ayant privilégié certaines.

Des variations saisonnières et spatiales sont observées quel que soit le niveau d'étude : d'un jour à l'autre de production, d'une saison à l'autre ou sur plusieurs années, entre exploitations ou entre régions de production. Si les effets pédo-climatiques, le froid ou la pluie par exemple, sont avancés pour expliquer ponctuellement des fluctuations de certaines flores - ainsi les levures en lait de chèvre -, tous les auteurs cités s'accordent pour privilégier l'influence majoritaire des pratiques d'élevage et de production du lait. Parmi elles, le fait de pâturer ou non, le type de paillage, l'alimentation, le nettoyage de la machine à traire et des abords, l'hygiène de traite ou l'état sanitaire du troupeau sont le plus souvent proposés. Si les effets de ces pratiques ne semblent pas toujours se recouper pour conduire aux mêmes conclusions, cela tient à l'échelle de travail ou aux différentes méthodologies mises en œuvre par les auteurs cités. Toutes études confondues, il est intéressant de noter que les résultats sont congruents quelle que soit l'origine ou le moment du prélèvement. Cela traduit bien le fait que la qualité technologique et sanitaire du lait cru dépend avant tout des pratiques de production.

Les flores étudiées dans les différents travaux sont, le plus souvent, celles ayant un effet bénéfique ou néfaste sur le processus technologique. Cette constatation amène à confirmer que, suivant le type d'approche de l'écosystème* microbien, le résultat ne sera pas forcément le même. C'est en partie dû à des pratiques spécifiques liées au contexte pédo-climatique. Il conviendra d'approfondir cet aspect des écosystèmes* microbiens dans le cadre d'études futures, notamment son incidence sur la qualité des produits.

Références principales

Callon C, Duthoit F, Delbès C, Ferrand M, Lefrileux Y, De Crémoux R, Montel MC. 2007. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year : molecular approaches. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 547-560.

Corroler D, Mangin I, Desmasures N, Gueguen M. 1998. An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese registered designation of origin area. *Appl. Environ. Microb.* 64, 4729-4735.

Dalmasso M, Prestoz S, Rigobello V, Demarigny Y. 2008. Evolution of the raw cow milk microflora, especially lactococci, enterococci, leuconostocs and lactobacilli over a successive 12 day milking regime. *Int. J. Dairy Sci.* 3, 3, 117-130.

Desmasures N, Gueguen M. 1997. Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years. *J. Dairy Res.* 64, 2, 271-280.

Desmasures N, Bazin F, Gueguen M. 1997a. Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *J. Appl. Microbiol.* 83, 53-58.

Gaya P, Babin M, Medina M, Nuñez M. 1999. Diversity among lactococci isolated from exes' raw milk and cheese. *J. Appl. Microbiol.* 87, 849-855.

Michel V, Hauwuy A, Chamba JF. 2001. La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. *Lait* 81, 575-592.

Montel MC, Beuvier E, Hauwuy A. 2003. Pratiques d'élevage, microflore du lait et qualités des

produits laitiers. INRA Productions animales 16, 4, 279-282.

Scintu MF, Piredda G. 2007. Typicity and biodiversity of goat and sheep milk products. Small Ruminant Research 68: 221-231.

Tormo H, Agabriel C, Lopez C, Ali Haimoud Lekhal C, Roques C. 2010. Relationship Between The Production Conditions of Goat's Milk And The Microbial Profiles Of Milk. Int. J. Dairy Science, 6, 13-28.

■ Chapitre 2

Quels sont les origines et les réservoirs de cette microflore ? Quels effets ont les pratiques d'élevage sur leur composition ?

■ Partie 1 : Les flux microbiens à la ferme

Yvette BOUTON

Comité Interprofessionnel du Gruyère de Comté (CIGC)
Avenue de la Résistance, BP 20 026 - 39801 Poligny cedex

Malgré une réduction des niveaux de flore observée, des différences quantitatives et qualitatives entre les flores d'intérêt technologique et les flores d'altération demeurent dans les laits crus. Ces différences de profils ont pu être reliées aux pratiques de traite (Michel *et al.*, 2001). Ainsi, l'existence de liens entre la composition de la flore des laits et certaines pratiques suggère que la quantité et la nature de la flore ne seraient pas le fruit du hasard mais dépendraient des facteurs amont de production du lait. Ces facteurs pourraient être en partie expliqués par la flore microbienne retrouvée sur la peau et la muqueuse des trayons ainsi qu'à la surface du matériel de traite et par la composition des bioaérosols* des étables. Plus en amont encore, l'ambiance des étables s'avère influencée par les pratiques agricoles telles que les modes de récolte, de conditionnement ou de distribution des fourrages (Reboux *et al.*, 2006 ; Sudre *et al.*, 2009).

Un choix judicieux des pratiques d'élevage et des conditions de production du lait ne permettrait-il pas alors de préserver les flores d'intérêt technologique naturellement présentes dans le lait ? Dans cette perspective, la connaissance des réservoirs* de flores et des flux de micro-organismes existants dans les étables et les salles de traite semble un préalable indispensable pour mieux appréhender l'influence des pratiques de production dans l'enrichissement des laits en flore d'intérêt technologique. Les micro-organismes retrouvés dans le lait à la ferme peuvent

avoir de multiples sources. Ils peuvent provenir de l'environnement des animaux (bâtiment, eau d'alimentation du bétail, fourrages...), des animaux eux-mêmes et de leurs déjections, du matériel de traite, du trayeur... Une étude réalisée dans 16 fermes bovines de Franche-Comté, sur le cheminement des micro-organismes depuis l'étable jusqu'au lait a montré que la majorité des espèces* bactériennes recensées dans le lait avait pour origine l'environnement de la salle de traite (air, nourriture utilisée pendant la traite, trayons) (Normand *et al.*, 2007). De plus, la mise en évidence de souches* de la même famille, entre des bactéries isolées du lait et celles isolées de l'environnement (aliments, poussières, trayons, manchons) tendait à montrer l'existence de flux microbiens depuis l'environnement de la ferme jusqu'au lait (Bouton *et al.*, 2007). Sur la figure 21 sont représentées les sources potentielles de micro-organismes et leurs trajectoires possibles jusqu'au tank à lait. Si la littérature est assez bien fournie sur les contaminations du lait par les bactéries pathogènes ou d'altération (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium tyrobutyricum*...), peu d'études sont disponibles sur les réservoirs* et les voies d'ensemencement du lait en flore d'intérêt

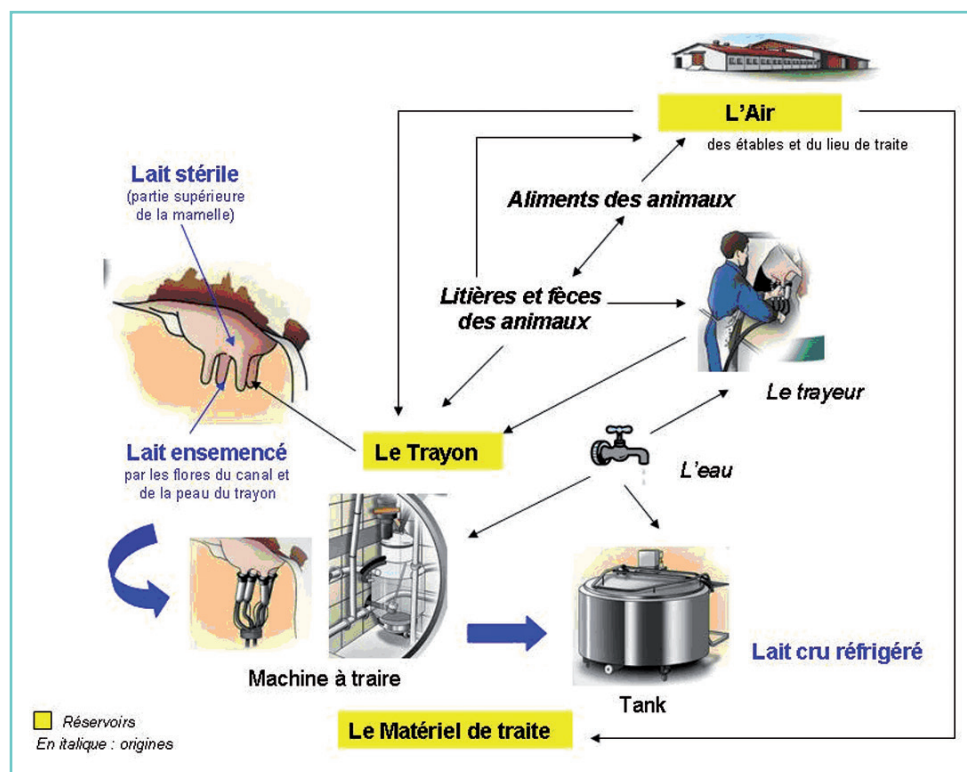


Figure 21. Flux microbiens dans les étables de production laitière.

technologique. Ce chapitre fait le point sur les connaissances acquises récemment sur la composition microbienne, les réservoirs* potentiels de flore (trayon, matériel de traite, air) et les pratiques influentes, ainsi que sur les origines possibles de ces micro-organismes en particulier d'intérêt laitier (litière, aliments du bétail).

Références principales

Bouton Y, Guyot P, Vacheyrou M, Normand AC, Piarroux R, Beuvier E. 2007. Etude des flux bactériens dans les étables de production laitière de Franche-Comté. Exemple des LHF. 15^{ème} colloque du Club des Bactéries Lactiques, 13-15 novembre, Rennes.

Michel V, Hauwuy A, Chamba JF. 2001. La flore microbienne de laits de vache : diversité et influence des conditions de production. Lait 81, 575-592.

Normand AC, Vacheyrou M, Guyot P, Bouton Y, Dubief T, Billot M, Sudre B, Cussenot R, Piarroux R. 2007. Etude des flux bactériens dans les étables de production laitière de Franche-Comté. Intérêts dans les domaines de la production fromagère. 13^e Forum des Jeunes Chercheurs, Université de Franche-Comté et Université de Bourgogne, 14-15 juin, Dijon.

Reboux G, Reiman M, Roussel S, Taattola K, Millon L, Dalphin JC, Piarroux R. 2006. Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour on Finnish and French farms. Ann. Agric. Environ. Med. 13, 267-273.

Sudre B, Vacheyrou M, Braun-Fahrlander C, Normand AC, Waser M, Reboux G, Ruffaldi P, von Mutius E, Piarroux R and the PASTURE study group. 2009. High levels of grass pollen inside European dairy farms : a role for the allergy-protective effects of environment ? Allergy 64, 1068-73.

■ Partie 2 : Le réservoir trayon : sa composition et les pratiques influentes

Valérie MICHEL

SUACI Alpes du Nord - GIS Alpes Jura
40, rue du Terraillet - 73190 Saint-Baldoph

Dans le schéma global d'ensemencement du lait présenté plus haut, le trayon apparaît comme l'un des réservoirs* potentiels de microflore pour ensemen- cer le lait. Mais que sait-on de sa charge microbienne ? Celle-ci a-t-elle toujours le même niveau, la même composition ? Existe-t-il des facteurs qui peuvent moduler la charge microbienne présente en surface de trayons ?

Autant de questions qui interrogent sur la place de ce réservoir* lié à l'animal mais aussi sur le rôle du trayeur à travers les pratiques qu'il met en place dans le schéma global d'ensemencement du lait.

A. Quelle population microbienne trouve-t-on en surface des trayons avant la traite ?

Les flores présentes en surface des trayons sains sont majoritairement des flores d'intérêt fromager : flores acidifiantes, entérocoques, flores intervenant lors de l'affinage. Les flores indésirables d'altération y sont détectées également mais en quantité cent fois moindre.

Les prélèvements réalisés en surface des trayons sont effectués le plus souvent par frottis au moyen de lingettes stériles pré-humidifiées. Les surfaces prélevées correspondent aux extrémités des trayons qui se trouvent plus tard en contact avec le manchon, sans oublier les sphincters. Les prélèvements ont lieu le plus souvent au moment de la traite, juste avant que les animaux soient nettoyés.

Les données les plus nombreuses sur la charge microbienne présente en surface de trayons avant préparation concernent la vache laitière (Desmasure *et al.*, 1997b ; Joandel, 2007 ; Michel *et al.*, 2006) mais quelques études ont également été menées en caprins et ovins (Barral *et al.*, 2003 ; Détomi, 2009 ; Goncalves, 2008 ; Bonnes, 2010).

Les résultats obtenus montrent que :

- il existe une large variété de groupes* microbiens présents en surface des trayons,
- les flores d'intérêt fromager sont largement dominantes dans la population globale, et ce, quelles que soient les espèces* étudiées.

Comme l'illustre le tableau 11, le niveau de flore totale détectée en surface des trayons des vaches laitières avoisine les 10^7 germes totaux par surface de trayons en contact avec l'intérieur du manchon trayeur. Les flores qui la composent sont majoritairement des flores qui peuvent être qualifiées de flore d'intérêt fromager, telles les flores acidifiantes mésophiles (de l'ordre de 10^6 à 10^7), les flores de surface (microcoques et corynébactéries, de l'ordre de 10^6 à 10^7), les entérocoques (de l'ordre de 10^5), les flores intervenant en affinage (lactobacilles hétérofermentaires facultatifs ou bactéries propioniques*, de l'ordre de 10^3 à 10^4). Les germes indésirables en transformation sont également présents à l'image des *Pseudomonas* (10^4), des coliformes totaux (de 10^3 à 10^4) ou des spores de *Clostridia* (de l'ordre de 10^2). Enfin, les germes potentiellement pathogènes que sont les staphylocoques à coagulase positive (SCP) font partie des flores minoritaires en surface des trayons prélevés : leur présence n'est détectée que dans deux tiers des prélèvements et ils font partie des flores sous-dominantes (niveaux inférieurs à 10^4 UFC*/surface de trayons) (Joandel, 2007 ; GIS Alpes du Nord, 2009). Ce faible niveau de SCP est à moduler : il a été constaté sur des trayons sains, exempts de blessures ou de boutons.



Photographie 6. Un exemple de trayon sain.

	FMAR	Flore acidifiante mésophile	EntC	Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs	Bactéries propioniques*	Coliformes fécaux	Pseudomonas	Clostridia	Levures	Moississures	SC +
Vaches laitières (30 troupeaux différents, 1 prélèvement hiver + 1 prélèvement été (GIS Alpes du Nord, 2009))											
Nb. ech	60										
Nb<Seuil détection	0	1	3	18	46	3	5	26	6	0	28
Moyenne	7,05	6,39	5,65	3,11	2,85	3,69	4,42	2,57	4,24	3,9	3,83
Coef. de variation	0,12	0,13	0,19	0,31	0,19	0,25	0,22	0,5	0,19	0,23	0,33
Vaches laitières (15 troupeaux différents, 3 prélèvements été (Joandel, 2007))											
Nb. ech	58	58	57	58	58	58	47	57	56	58	57
Nb<Seuil détection	0	0	0	1	9	0	1	0	0	0	24
Moyenne	7,46	6,81	5,27	3,23	3,16	4,52	4,72	5,77	4,75	4,43	2,72
Coef. de variation	0,07	0,10	0,20	0,36	0,47	0,14	0,16	0,07	0,20	0,15	0,65
Chèvres laitières (20 troupeaux différents, 2 prélèvements au printemps (Bonnes, 2010))											
Nb. ech	nr	40	40	nr	nr	40	40	nr	nr	nr	40
Nb<Seuil détection	0	0	6			22	34				21
Moyenne		5,37	3,59			2,56	3,83				3,32
Coef. de variation		0,21	0,19			0,10	0,17				0,12

FMAR : GT : Germes Totaux ou Flore Mésophile Aérobie Revivifiable, EntC : Entérocoques, SC+ : Staphylocoques à Coagulase positive, nr : flore non dénombrée dans l'étude.
Les moyennes et coefficients de variation (coef. de variation) indiqués sont calculés avec les valeurs supérieures au seuil de détection.

Tableau 11. Niveaux de divers groupes* microbiens présents en surface des trayons de vaches et de chèvres (bovins : en $\log_{10}$ UFC*/surface de rayon ; caprins : en $\log_{10}$ UFC*/surface de 2 trayons).

En cas d'infection, des niveaux de SCP de l'ordre de 10^6 UFC*/surface de trayons peuvent être atteints. Des travaux plus récents (Monsallier *et al.*, 2009) confirment cette faible prépondérance des SCP en surface des trayons sains. Les flores d'intérêt y sont également majoritaires mais les flores dominantes sont les flores d'affinage dont le niveau approche celui de la flore totale ; les flores lactiques ne seraient que sous-dominantes et constituées principalement par les entérocoques.



Photographie 7. Un exemple de trayon avec plaies.

En caprins, les prélèvements effectués en surface de trayons ont été dénombrés pour un nombre plus restreint de flores ; les niveaux retrouvés sont du même ordre de grandeur pour les flores acidifiantes mésophiles et les entérocoques (de l'ordre de 10^5 d'UFC*/surface de trayons) (Détomi, 2009), bien que ceux-ci puissent être présents en quantité plus faibles (niveau de 10^2 à 10^3 UFC*/surface de trayons) dans certaines études (Bonnes, 2010). Les coliformes sont également détectés dans les flores sous-dominantes (10^4 UFC*/surface de trayons) en surface des trayons caprins (Bonnes, 2010 ; Détomi, 2009). Les Staphylocoques à coagulase négative (SCN) peuvent être présents en forte quantité, leurs niveaux pouvant atteindre de 10^3 à 10^4 UFC*/surface de trayons (Goncalves, 2008) ; les niveaux de SCP étant quant à eux plus faibles (de l'ordre de $10^{3,3}$ UFC*/surface de trayons et détectés que dans la moitié des prélèvements effectués). Dans une autre étude, la flore présente sur les trayons a été appréciée en incubant les frottis dans du lait UHT : les flores dominantes représentent donc l'image de la population présente en surface des trayons après une phase d'enrichissement et de sélection par la matrice laitière. Les flores développées dans ces conditions sont également des flores d'intérêt : flores acidifiantes ou lactiques, les coliformes n'étant que sous dominants (Barral *et al.*, 2003).

Des suivis plus spécifiques de groupes* microbiens (Bonnes, 2010) corroborent la présence mineure des flores d'altération (*Pseudomonas*) et celle des flores acidifiantes comme *Lactococcus lactis* (Desmaures *et al.*, 1997b) ou les *Leuconostoc* (Bonnes, 2010).

B. Quelle variabilité des flores microbiennes en surface des trayons ?

La charge microbienne présente en surface des trayons est associée à la saison : elle est globalement plus faible en été. Elle dépend également des conditions de logement des animaux : la propreté et la nature des litières (paille ou sciure) influent son niveau et sa composition.

1. Les facteurs liés à l'environnement des animaux

Les niveaux et la qualité de la flore microbienne présente en surface de trayons sont principalement associés aux conditions dans lesquelles évoluent les animaux : les litières par leur composition et leur degré d'entretien semblent l'un des points majeurs associés à la variabilité de cette charge microbienne.

Il existe une variabilité importante entre les troupeaux des différentes exploitations, comme le montrent les coefficients de variation des tableaux précédents.

L'un des premiers facteurs de variabilité est le facteur saison, les surfaces des trayons étant globalement moins chargées en saison estivale qu'hivernale. Ainsi, les niveaux des flores d'intérêt fromager tels que ceux de la flore acidifiante mésophile, des entérocoques, de la flore halophile (composée majoritairement de microcoques et corynébactéries) ou encore des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs sont présents en quantité 4 fois supérieure en hiver pour les mêmes troupeaux prélevés en été et en hiver (30 troupeaux), alors que les flores d'altération (coliformes, *Clostridium* spp.) recherchées dans ces exploitations n'ont pas montré de différences de niveaux significatives.

Au sein d'une même saison, il est possible de distinguer des troupeaux en fonction du niveau et de la composition de la charge microbienne présente en surface de trayons. Aussi bien en été qu'en hiver, les niveaux de charge microbienne sont liés à la propreté des vaches laitières ; en effet, les troupeaux

dans lesquels les animaux ont les notes de propreté des jarrets et des mamelles (selon la grille de notation de l'Institut de l'Élevage, 1985) les plus faibles ont les charges microbiennes les plus basses en surface de trayons (Joandel, 2007 ; GIS Alpes du Nord, 2009).

Un des autres facteurs associés à la charge microbienne présente en surface des trayons est la qualité de la litière. En effet, son degré de souillure est inversement lié à la charge microbienne des trayons pour des troupeaux passant la nuit sur une litière en période hivernale (GIS Alpes du Nord, 2009). Des corrélations existent par ailleurs entre les niveaux de certains groupes* microbiens présents dans les litières et leurs niveaux en surface des trayons : c'est le cas des niveaux de FMAR, de flores acidifiantes mésophiles, d'entérocoques et de levures.

La présence ou l'absence d'une litière, ainsi que sa nature peut influencer l'importance relative de certains groupes* microbiens présents en surface des trayons. Ainsi, le lien entre niveaux d'entérocoques en surface des trayons et niveaux dans la litière est beaucoup plus fort pour des vaches laitières logées sur les litières à base de sciure que pour des vaches sur des litières à base de paille (figure 22). Les études menées en Franche-Comté et portant sur les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (bactéries participant fortement à l'élaboration des arômes) ont montré de même que certaines espèces* de lactobacilles présentes en surface des trayons des vaches laitières pouvaient également être isolées de la paille utilisée sous les animaux, mais également de leur alimentation (foin, herbe, farine) (Bouton *et al.*, 2007). En élevages caprins, une litière jugée sale sous les animaux est corrélée à des niveaux plus élevés d'entérocoques en surface des trayons (Détomi, 2009).



Photographie 8. Bergerie.

La comparaison entre la charge microbienne des trayons de vaches laitières prélevée à la traite du matin ou du soir semble montrer une présence plus importante de germes en surface des trayons le matin que le soir mais cette différence reste faible en bovins (de l'ordre d'un facteur 5) (F. Monsallier, communication personnelle, 192 échantillons). La variabilité de cette charge microbienne entre les animaux d'une même exploitation est également étudiée en prenant en compte la morphologie de la mamelle et des trayons. Par contre, en caprins, une étude portant sur 36 frottis de trayons prélevés pour moitié le matin et pour moitié le soir ne montrait pas de différence significative selon le moment du prélèvement.

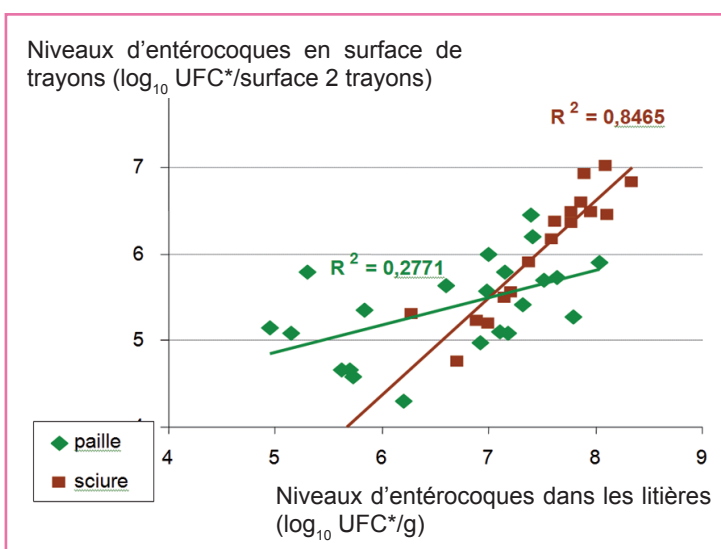


Figure 22. Corrélation entre les niveaux d'entérocoques en surface des trayons et dans les litières ($n=45$ prélèvements simultanés, 15 exploitations en vaches laitières, été).

2. Quelles associations avec les pratiques de traite ?

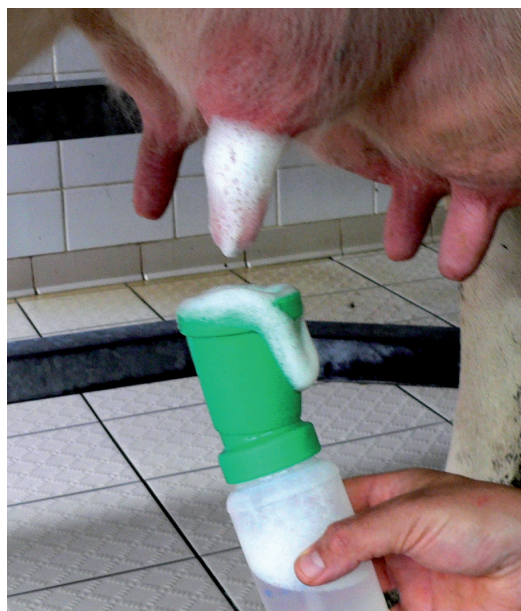
La préparation des trayons à la traite diminue les niveaux de tous les germes présents en surface des trayons, les techniques désinfectantes aboutissant aux réductions les plus fortes. La pratique du post-trempage ne semble pas gêner la recolonisation ultérieure de la surface des trayons.

Les pratiques d'hygiène mises en place lors de la préparation des animaux à la traite ont pour objectif de diminuer la charge microbienne présente en surface des trayons afin de réduire la contamination du lait par les germes indésirables. Si l'importance de cette préparation a largement été démontrée dans l'épuration microbienne des laits (Chatelin et

Richard, 1981), les pratiques mises en place montrent-elles toutes la même efficacité ? Ont-elles le même effet sur les flores microbiennes présentes en surface des trayons ?

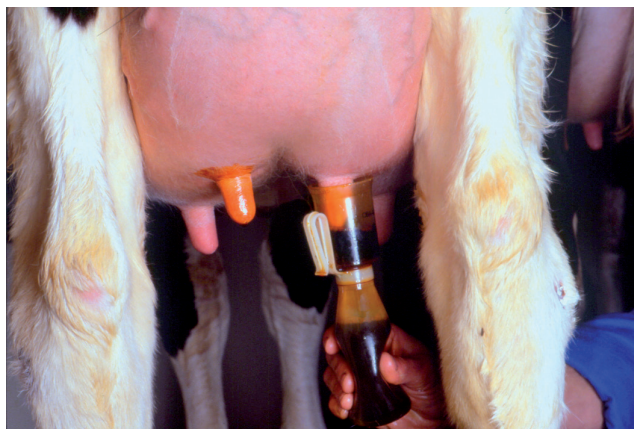
A noter que ces pratiques de nettoyage des trayons sont courantes en vaches laitières mais beaucoup moins fréquentes pour les chèvres, ces dernières et leurs mamelles étant jugées propres par les producteurs. En absence d'hygiène à la traite, la population des flores microbiennes présente en surface des trayons est donc susceptible d'ensemencer directement le lait.

En vache laitière, la préparation des trayons réduit les niveaux de germes d'un facteur 30 en moyenne, et ce pour tous les germes. Il est difficile de classer les différentes techniques utilisées entre elles, leur efficacité étant en partie liée à l'action mécanique appliquée par le trayeur, elle-même difficilement comparable entre trayeurs et troupeaux. L'emploi de produits désinfectants en préparation des trayons montre des efficacités supérieures de réduction des germes en surface des trayons sous l'effet conjugué de l'action mécanique et désinfectante : les réductions observées dépassent alors le facteur 100.



Photographie 9. Nettoyage des trayons par pré-moussage.

En fin de traite, le sphincter reste ouvert quelques minutes et peut constituer une voie d'entrée des germes pathogènes vers la mamelle. Pour diminuer ce risque (Serieys, 1996), les producteurs réalisent très souvent au moment de la dépose des faisceaux trayeurs une désinfection post-traite par trempage de l'extrémité des trayons dans une solution désinfectante.



Photographie 10. Désinfection des trayons après la traite.

On peut s'interroger sur l'effet de rémanence d'une telle technique connue sous le nom générique de post-trempage. Il semblerait que cette technique ne soit pas associée à des niveaux de flore totale en surface de trayons plus bas à la traite suivante (GIS Alpes du Nord, 2009) et ce aussi bien en hiver qu'en été. A noter que ces résultats ont été observés avec des produits iodés gras. Cette pratique ne serait donc pas une pratique limitante pour le maintien de la charge microbienne des trayons. Par leur pouvoir graissant, certaines spécialités contribueraient à une bonne intégrité physique des trayons, facteur limitant la colonisation par des germes pathogènes de type staphylocoques à coagulase positive.

Les leviers ayant un impact sur les flores des trayons sont synthétisés dans le tableau 12.

C. Synthèse et perspectives

La surface des trayons constitue un réservoir* de flores d'intérêt technologique, aussi bien en bovins qu'en caprins. Les flores indésirables étant présentes en quantité sous-dominantes (coliformes, staphylocoques à coagulase positive) sur des trayons sains, il paraît donc intéressant de chercher à faciliter l'ensemencement du lait par cette flore. Les techniques de préparation des trayons, basées sur une action mécanique sans action désinfectante, pourraient être l'un des moyens. Celui-ci nécessite d'être étudié plus en détails de manière à :

- préciser comment les conditions d'amont influent sur la charge microbienne présente en surface des trayons : il s'agit alors de déterminer les conditions de logement des animaux conduisant à des trayons suffisamment chargés en flore d'intérêt tout en limitant la présence de flore potentiellement pathogène pour la mamelle,

Sources	Leviers	Références
Temps	• Plus de flores d'intérêt fromager sur les trayons en hiver qu'en été • Niveaux légèrement plus élevés en surface des trayons le matin que le soir en bovins, non constaté en caprins	Joandel, 2007 Monsallier <i>et al.</i> , 2009
Logement	Conditions de logement : • Niveaux plus élevés de germes pour les animaux jugés moins propres • Coliformes plus élevés en surface des trayons caprins lorsque la densité animale dépasse 1,5 /m²	Joandel, 2007 Détomi, 2009
Litière	Nature de la litière : • Entérocoques seraient favorisés par une litière de type « sciure » plutôt que par une litière paille (bovin) • Certains lactobacilles hétérofermentaires présents en surface des trayons sont présents également dans la paille des litières (bovin) Entretien de la litière : • Litière sale entraîne des niveaux plus élevés d'entérocoques en surface des trayons caprins • Coliformes plus élevés en surface des trayons caprins lorsque les curages sont effectués tous les 3 mois ou moins	Joandel, 2007 Bouton <i>et al.</i> , 2007 Détomi, 2009 Détomi, 2009

Tableau 12. Synthèse des leviers jouant sur les flores des trayons.

- évaluer de quelle manière et en quelle proportion cette flore microbienne est transférée vers le lait.

Références principales

Barral J, Tormo H, Fabre E, Le Mens P. 2003. Les facteurs de production et qualité microbiologique des laits destinés à la fabrication du Banon. Centre Fromager de Carmejane, 41 pages.

Bonnes A. 2010. Caractérisation des réservoirs de flores microbiennes pouvant ensemer le lait cru de chèvre. Rapport de stage, E.I. Purpan, 44 pages.

Bouton Y, Guyot P, Vacheyrou M, Normand AC, Piarroux R, Beuvier E. 2007. Etude des flux bactériens dans les étables de production laitière de Franche-Comté. Exemple des LHF. 15^{ème} colloque du Club des Bactéries Lactiques, 13-15 novembre, Rennes.

Desmaures N, Opportune W, Gueguen M, 1997b. *Lactococcus* spp., Yeast and *Pseudomonas* spp. On teats and udders of milking cows as potential sources of milk contamination. Int. Dairy Journal 7, 643-646.

Détomi C. 2009. Connaissances des flores environnementales pouvant potentiellement ensemer le lait cru de chèvre. Rapport de stage, E.I. Purpan, 56 pages.

GIS Alpes du Nord, 2009. Gestion de la Flore Microbienne des laits crus par les pratiques des producteurs. Document technique, 55 pages.

Goncalves A. 2008. Etudier les staphylocoques à coagulase négative et les entérocoques, flores dominantes des laits crus de chèvre et de brebis en région PACA. Rapport de stage, IUT Digne les Bains, 52 pages.

Joandel E. 2007. Facteurs de variabilité des flores microbiennes en surface des trayons des vaches laitières. Rapport de stage, ENITAC, 58 pages.

Michel V, Hauwuy A, Chamba JF. 2006. Gestion de la flore microbienne des laits crus par les pratiques des producteurs. In 13^{èmes} Rencontres Recherches Ruminants, Institut de l'Elevage, INRA, Paris, 309-312.

Monsallier F, Verdier-Metz I, Chanal J, Delbès C, Gagne G, Montel MC. 2009. Le trayon est-il une source de diversité microbienne du lait ? Journée de Restitution de l'UMT Trefl, 3 juin 2009, Aurillac.

Serieys F. 1996. Efficacité des spécialités de pré-et post-trempe des trayons : les essais de terrain. Bulletin des GTV 520, 7-18.

Les autres références citées dans cette partie sont listées en annexe.

■ Partie 3 : Le réservoir machine à traire : sa composition et les pratiques influentes

Cécile LAITHIER

Institut de l'Elevage
Agrapole - 23, rue Jean Baldassini - 69364 Lyon cedex 07

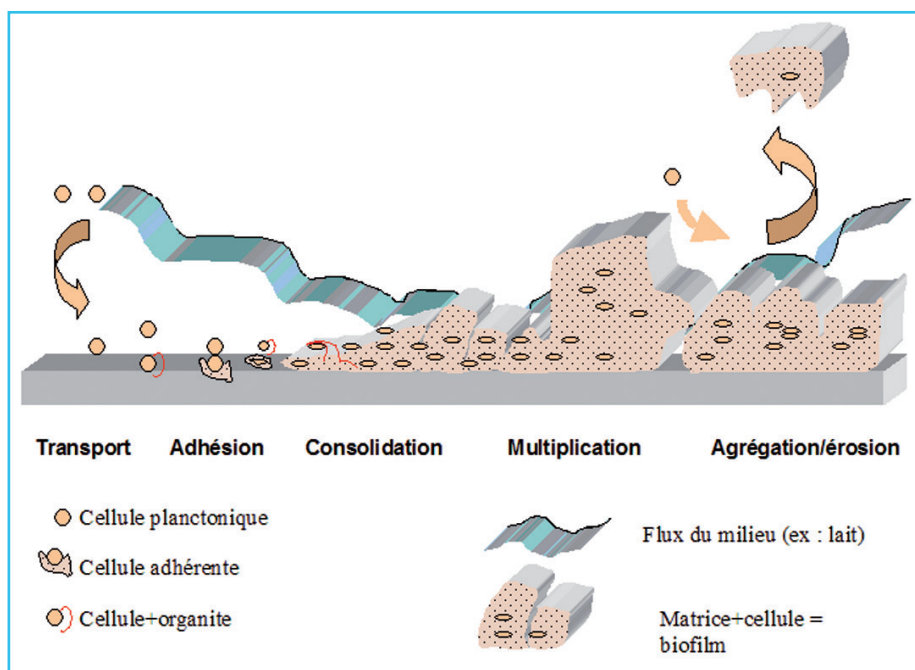
A. Quelles microflore sont mobilisables au niveau de la machine à traire ?

La machine à traire présente toujours des biofilms* à sa surface, qui peuvent en se détachant ensemençer ou contaminer le lait lors de la traite. En exploitations bovines, les flores mobilisables de la machine à traire ne semblent pas très diversifiées et les flores utiles seraient au même niveau que les flores d'altération. En exploitations caprines, les flores utiles seraient majoritaires dans les biofilms* de la machine à traire. Cependant, les flores d'altération voire même pathogènes peuvent être présentes et ce d'autant plus que le niveau de flore totale est élevé.

1. Des biofilms présents à la surface de la machine : définition et formation

De nombreux micro-organismes ont la faculté d'adhérer aux surfaces. Ce phénomène, suivi d'une multiplication des cellules adhérentes dans un environnement riche en minéraux et en matières organiques, conduit à la formation d'un biofilm* (figure 23). Il s'agit de communautés microbiennes immobilisées sur une surface et souvent enfouies dans une matrice fibreuse de polymères extracellulaires (Carpentier et Cerf, 1993). La formation de biofilms* par les micro-organismes est un phénomène très commun.

Figure 23. Les différentes étapes de formation d'un biofilm* microbien (Briand et Bellon-Fontaine, 2000).



La majorité des matériaux en contact avec un fluide naturel peut rapidement être recouvert de bactéries (Prigent-Combaret *et al.*, 1999). C'est le cas des surfaces humides des équipements laitiers tels que la machine à traire (Devoyod *et al.*, 1987 ; Wong et Cerf, 1995 ; Carpentier et Cerf, 1993 ; David et Huet, 2001).

Les biofilms* se forment en 4 étapes : les bactéries se rapprochent de la surface (transport), y adhèrent par des forces d'interaction entre le support et elles-mêmes. En conditions favorables, grâce à la synthèse de substances appelées exopolysaccharides (sucres complexes) par les bactéries, l'adhésion est alors consolidée. A cette étape, les différentes bactéries présentes dans le biofilm* changent de forme et « communiquent » entre elles pour former une véritable communauté. Ensuite, en phase de colonisation du support, un équilibre se crée entre deux types de phénomènes : l'accroissement de l'épaisseur du biofilm* par la multiplication des bactéries déjà fixées et/ou la fixation d'autres bactéries et la réduction de l'épaisseur par érosion du biofilm* sous l'effet, par exemple, du lait qui circule dans la machine à traire. Le passage du lait dans la machine à traire contribue à son enrichissement en flores par relargage partiel des

biofilms* développés. Il convient de noter que ce type d'organisation en biofilms* confère aux bactéries y participant des propriétés particulières et notamment une résistance plus grande aux traitements détergents et désinfectants (Prigent-Combaret *et al.*, 1999).

2. Les microflores mobilisables au niveau de la machine à traire

Les méthodes existantes pour échantillonner et détecter les bactéries composant les biofilms*, en particulier au niveau de la machine à traire ne permettent de récupérer qu'une partie du biofilm*. Ces méthodes (fiche Annexe 4; Wong et Cerf, 1995, Laithier *et al.*, 2005a) visent soit à récupérer les flores pouvant potentiellement ensemer le lait de la traite (par mise en circulation d'un fluide qui peut être du lait UHT, l'eau de l'exploitation ou de l'eau stérile) soit à récupérer directement les flores à la surface par action mécanique (écouvillonnage ou ultrasons le plus souvent).

Selon la technologie et les objectifs de l'étude, les flores recherchées n'ont pas forcément été les mêmes.

a. Dans les exploitations bovines

Les groupes* microbiens mobilisés par rinçage de la machine à traire dans des exploitations de Savoie ne sont pas très diversifiés (Michel *et al.*, 2005a et 2006). Sur les douze groupes* microbiens recherchés, seuls quatre ont été isolés et dans 80% des cas, avec des niveaux relativement faibles (<100 UFC*/ml d'eau). De plus, les flores d'altération (coliformes et *Pseudomonas*) ont été retrouvées la plupart du temps à des niveaux identiques à ceux des flores d'intérêt

technologique (tableau 13). Dans certains cas, une mobilisation importante de germes (élévation d'un facteur 1 000 de la population microbienne de l'eau utilisée pour le rinçage) a été observée. Comme on le verra par la suite, ceci peut s'expliquer par des défauts d'entretien et/ou un lavage inefficace du matériel de traite.

Compte tenu de ces résultats, dans l'objectif de favoriser l'ensemencement en flores utiles au niveau des laits, les études ultérieures en élevages bovins n'ont pas porté de manière prioritaire sur la machine à traire. Néanmoins, une étude réalisée en Franche-Comté sur 16 fermes lors de deux passages (Bouton *et al.*, 2007) a montré que le matériel de traite, via des prélèvements par écouvillonnage sur des manchons, était un réservoir* potentiel en lactobacilles hétérofermentaires facultatifs.

b. Dans les exploitations caprines

En élevage caprin, les résultats suggèrent que la machine à traire peut être un réservoir* potentiel en flores d'intérêt technologique.

Une étude préliminaire réalisée en PACA sur 6 exploitations suivies à 6 reprises a montré que le lait s'enrichit lors du passage dans la machine à traire en flores utiles (flore acidifiante, levures et moisissures, leuconostocs, entérocoques) mais également en flores d'altération (coliformes) (Barral *et al.*, 2003). Cependant, contrairement aux autres études, les dénombrements effectués ont été réalisés sur les flores développées après incubation dans du lait.



Photographie 11. Traite des vaches en salle de traite.



Photographie 12. Traite des chèvres en salle de traite.

	N ²	D ³	Flore acidifiante mésophile	Flore halophile ⁵	Bactéries propioniques*	<i>Pseudomonas</i>	Coliformes totaux
N> 10 UFC*/ml ⁴			50	54	43	52	21
Moyenne	58	6	1,71	1,81	1,95	1,48	0,85
Ecart type			1,29	1,56	1,25	1,44	1,48

¹ : l'information traitée correspond à la différence entre les résultats de dénombrement sur l'eau de l'exploitation évacuée après rinçage et l'eau du bac de lavage,

² : nombre total de prélèvements réalisés,

³ : nombre de groupes* microbiens détectés simultanément dans 75% des prélèvements,

⁴ : nombre de résultats supérieurs à 10 UFC*/ml,

⁵ : microcoques, corynébactéries, entérocoques.

Tableau 13. Niveaux¹ de divers groupes* microbiens dans l'eau de rinçage ayant circulé dans la machine à traire, en log₁₀ UFC*/ml d'eau sur deux saisons (Michel *et al.*, 2006).

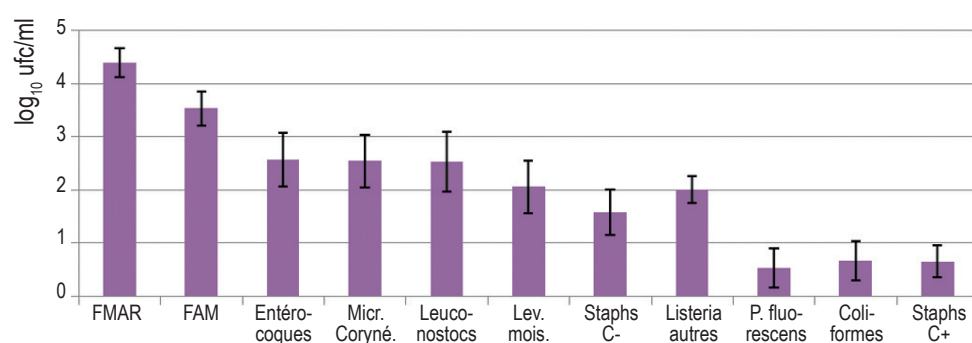


Figure 24. Laithier *et al.*, 2005a (n=31 : 5 exploitations, plusieurs passages sur 1 année).

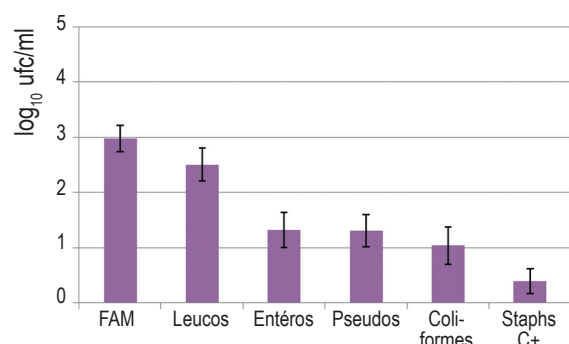


Figure 25. Bonnes, 2010 (n=40 : 20 exploitations, 2 passages).

FMAR : Flore Mésophile Aérobie Revivable
FAM : Flore Acidifiante Mésophile

Figures 24 et 25. Moyennes et intervalles de confiance des dénombrements effectués sur les laits UHT mis en circulation dans la machine à traire d'élevages caprins en log₁₀ UFC*/ml.

Les résultats obtenus par Laithier *et al.* (2004a, b ; 2005a, b) témoignent de la diversité des groupes* microbiens apportés par la machine à traire. Les flores utiles sont majoritaires (flore acidifiante, microcoques et corynébactéries) avec néanmoins une dominance en entérocoques au niveau de la flore acidifiante (par caractérisation phénotypique). Les flores d'altération et même *Staphylococcus aureus* peuvent être présentes et ce, d'autant plus que le niveau de flore totale est important (figure 24). Les laits ayant circulé dans la machine à traire présentent en moyenne une bonne aptitude à l'acidification et au repiquage.

Des travaux en cours, menés sur un plus grand nombre d'exploitations caprines et se focalisant davantage sur la flore acidifiante en ce qui concerne la flore utile, confirment la dominance des flores acidifiantes (figure 25). Les flores d'altération restant minoritaires sont en quantité un peu plus élevée que dans l'étude précédente.

3. Variabilité des microflores mobilisées de la machine à traire



Photographie 13. Bocal de réception du lait.

Très peu d'études se sont intéressées à la diversité selon le site de prélèvement et à l'évolution dans le temps des biofilms* de la machine à traire. Lors de l'étude sur les biofilms* réalisée en élevages caprins (Laithier *et al.*, 2004a et 2005a), des frottis à l'aide de chiffonnettes ont notamment été mis en œuvre pour connaître la composition des biofilms* en fonction de leur localisation, du type de support notamment en divers endroits de la machine à traire, mais également au niveau du tank, des bacs de caillage. Les biofilms* sont présents sur tous les supports. Les types de biofilms* obtenus diffèrent par le niveau de flores mais aussi par la variété de flores présentes. Le niveau

et la variété de flores semblent par ailleurs liés. La flore utile constitue toujours la flore majoritaire : les flores d'affinage (microcoques et corynébactéries) sont les seules présentes dans les classes de biofilms* présentant un niveau de flore totale faible (premières classes T de la figure 26). Celles-ci sont ensuite en association avec la flore acidifiante qui devient prédominante. Avec une augmentation importante du niveau de germes des biofilms*, les flores d'altération sont davantage présentes et *S. aureus* peut être détecté. *Listeria monocytogenes* n'a jamais été retrouvée dans les biofilms* analysés.

Certains types de biofilms* peuvent être associés à des sites de prélèvements (manchons, bocal de réception du lait, transfert du lactoduc, vanne du tank) et à des matériaux : caoutchouc, verre, plastique des bacs de caillage (figure 26). Globalement, les biofilms* les plus chargés se situent au niveau de la machine à traire. Les prélèvements au niveau de l'intérieur du tank sont moins chargés et encore moins ceux au niveau du bac de caillage. Ceci est à nuancer selon le type de matériau et le site précis de prélèvement. Ainsi, les zones peu accessibles au nettoyage (exemple : vanne du tank) ont des biofilms* aux niveaux de flore très élevés (utiles comme d'altération). En revanche, les bocal de réception du lait en verre abritent un type de biofilms* peu chargés en flores. Dans 30 % des cas, ces flores sont constituées uniquement de flores d'intérêt. Dans les autres cas, ils peuvent abriter des coliformes en petite quantité mais *Pseudomonas fluorescens* n'a pas été détecté. Le transfert du lactoduc peut présenter des profils de biofilms* avec des niveaux élevés de flores, contrairement au tank à lait. Ceci peut s'expliquer par des conditions différentes entre les 2 sites de prélèvements (turbulence du flux de lait, temps de contact, température...). Au niveau des manchons, le type de support a une incidence. Ainsi, ceux en silicone (une exploitation) présentent de très bas niveaux de flores avec uniquement des levures et moisissures, microcoques et corynébactéries (flores d'affinage), staphylocoques à coagulase négative.

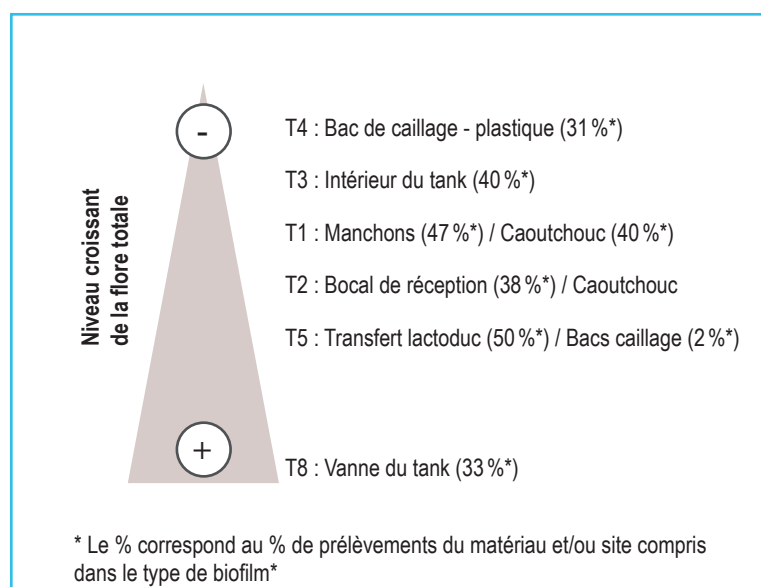


Figure 26. Représentation des types (T) de biofilms* prélevés par chiffonnette en fonction de la FMAR et des principaux sites de prélèvement et des matériaux associés (Laithier *et al.*, 2005a).

L'incidence de l'élevage a été mise en évidence sur le type de biofilms* indépendamment du site de prélèvement. Cependant, il apparaît clairement que le type



Photographie 14. Traite en pot trayeur.

de support et sa localisation ont plus d'incidence que le facteur élevage. Les profils de biofilms* obtenus peuvent varier selon la période de l'année mais cet effet ne semble pas se répéter d'une année à l'autre. Cet effet période est difficile à analyser car il est la résultante de plusieurs facteurs : climat, alimentation, stade de lactation... Par ailleurs, lors d'un même jour de prélèvement, la comparaison des flores entre manchons « neufs » introduits 14 jours avant le prélèvement et manchons « vieux » présents depuis le début du suivi de l'exploitation (mais ayant toujours moins d'un an) montre une différence significative uniquement sur la flore totale. Les autres flores ne diffèrent pas en nombre, que le manchon soit neuf ou âgé, ce qui suggère une implantation très rapide des biofilms*.

B. La machine à traire : source d'ensemencement du lait ?

La machine à traire est une source d'ensemencement du lait mais ce n'est bien sûr pas la seule.

1. Liens entre flores des laits de mélange et laits UHT ayant circulé dans la machine en élevages caprins

Lors de l'étude réalisée sur les biofilms*, sur 9 exploitations suivies à 6 reprises, les corrélations entre les niveaux des flores homologues des laits UHT et des laits de mélange (laits de troupeaux d'une traite) ont été calculées. Cinq des dix flores sont significativement corrélées (entérocoques, levures et moisissures,

Pseudomonas fluorescens, flore totale, staphylocoques à coagulase négative), montrant le lien entre les deux types de lait. Cependant, les corrélations restent faibles (inférieures à 0,5), révélant qu'il y a d'autres sources d'ensemencement.

Lors de l'étude plus récente en élevages caprins (Bonnes, 2010), d'importants liens ont été mis en évidence entre les profils microbiens de laits de mélange et les dénombrements de flores des laits UHT ayant circulé dans la machine à traire.

2. Mise en évidence de souches identiques de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs

Une étude réalisée en Franche-Comté sur 16 fermes bovines a permis de mettre en évidence des souches* identiques dans le lait et la machine à traire au niveau des manchons (Bouton *et al.*, 2007). Cela démontre ainsi le flux bactérien existant entre le réservoir* machine à traire et le lait de traite sachant que ces lactobacilles trouvent leurs origines en amont (alimentation, litières...).

C. Par quels leviers peut-on jouer sur le réservoir de flores machine à traire et le lait associé ?

1. Quel impact des pratiques en place dans les exploitations ?

L'apport en flores d'intérêt technologique par la machine à traire est à moduler et dépend entre autres de sa conception, du type de matériau utilisé, de la technique de lavage et de l'efficacité du rinçage. Particulièrement en cas de défauts d'entretien et /ou de lavage, les biofilms* de la machine à traire peuvent être des sources de flores d'altération voire pathogènes.

a. Influence de la conception et des matériaux de la machine à traire (MAT)

Une installation de traite comprenant de grandes longueurs de canalisations a plus de risques d'apporter un grand nombre de germes dans le lait car la surface de contact et donc de contamination ou d'ensemencement augmente (Michel *et al.*, 2001). De plus, les zones complexes peuvent être plus nombreuses, constituant autant de niches pour le développement des micro-organismes, surtout si le matériel est lavé moins intensément. La nature du

matériau a, par ailleurs, une influence sur la formation des biofilms* (Laithier *et al.*, 2005a). Les surfaces non poreuses comme l'inox et le verre sont moins favorables au développement des biofilms*. Le caoutchouc caractérise également un type de biofilms*. Par ailleurs, une faible fréquence de changement des tuyaux à lait (en caoutchouc) contribue à l'augmentation des teneurs en micro-organismes des laits (Tormo *et al.*, 2007b). Les manchons en silicone semblent présenter des niveaux de flores très bas avec uniquement des flores d'affinage (résultats néanmoins à confirmer car obtenus sur une seule ferme).

b. Défauts d'entretien et/ou de lavage : charges microbiennes élevées, y compris en flores indésirables

Les premiers travaux réalisés en France sur la qualité bactériologique des laits visaient surtout à identifier les causes importantes de contamination des laits et les moyens de maîtrise associés. Lors de l'étude de 12 fermes présentant des niveaux de flores élevés au niveau des laits, il a ainsi été montré qu'une machine à traire mal nettoyée apportait surtout des micro-organismes thermorésistants (Chatelin et Richard, 1981). Des installations mal conçues seraient par ailleurs source de coliformes.

Des défauts de nettoyage et d'entretien de la machine à traire sont encore rencontrés actuellement. Dans plus d'un quart de l'ensemble des suivis réalisés sur 30 exploitations, le rinçage du matériel de traite s'est traduit par une mobilisation importante de germes (élévation de la population microbienne de l'eau utilisée pour le rinçage d'un facteur 1 000) : des défauts d'entretien du matériel et/ou un lavage inefficace du matériel avaient alors été notés (Michel *et al.*, 2005a et 2006). A ce propos, le diagnostic de nettoyage est un outil concret pour évaluer les pratiques de nettoyage et en particulier vérifier que le nettoyage de la machine à traire suit bien les recommandations du COFIT. Il est maintenant réalisé lors du contrôle Certitraite. Il comprend l'examen des volumes d'eau nécessaires notamment pour le rinçage, les besoins en air pour le nettoyage, les doses de produit, les températures de nettoyage mises en œuvre, les temps de contact, etc. Par ailleurs, la qualité de l'eau est importante à considérer, notamment en cas de problème de contamination par *Pseudomonas* ou des coliformes (cf encadré ci-contre).



Photographie 15. Manchon âgé sujet à des dépôts.

Philippe ROUSSEL

Institut de l'Élevage
9, rue André Brouard
BP 70 510
49105 Angers Cedex 02

La qualité de l'eau et les flores microbiennes du lait

L'eau en élevage est vitale pour les animaux : l'apport d'eau de mauvaise qualité à des animaux ne peut que diminuer leurs performances, voire dans certains cas favoriser l'émergence de maladies infectieuses cliniques (salmonellose, listériose.....) et donc des contaminations des produits finis. De même, l'eau est utilisée quotidiennement dans les ateliers laitiers pour les opérations de nettoyage des trayons, des circuits de lait ou de la vaisselle laitière.

En matière de réglementation sur la qualité de l'eau utilisée en élevage, les exigences sont celles du paquet hygiène fixées dans les règlements (CE) 852/2004 et 853/2004, dont les modalités d'application sont transcrites dans un guide des bonnes pratiques d'hygiène en cours de validation par la DGAL. Dans le cas précis de l'eau utilisée pour le nettoyage, la désinfection et le rinçage du matériel en contact avec le lait, l'eau ne doit pas contenir de micro-organismes, de substances nocives en quantités susceptibles d'avoir une incidence directe ou indirecte sur la qualité sanitaire du lait, c'est à dire être une eau propre (aucune réglementation ne précise les critères analytiques permettant de définir précisément ce qu'on entend par « eau propre ») ou une eau potable. L'eau de boisson des animaux doit être quant à elle de « qualité adéquate ».

1. Risques liés à la qualité de l'eau

L'impact de la qualité de l'eau peut porter à la fois sur la santé des animaux et sur la qualité sanitaire de leurs produits. L'eau d'abreuvement peut être un vecteur de maladies ou parasitoses transmissibles aux animaux. S'agissant des risques biologiques, ils sont essentiellement à court ou moyen terme, il peut s'agir de bactéries, de virus ou de parasites. Les bactéries pouvant être transmises par l'eau sont très nombreuses et donc entraîner des maladies (brucellose, salmonellose, listériose.....). Elles peuvent provenir de la flore intestinale des animaux (*E. Coli*, entérocoques...) mais également de l'activité microbienne du sol ou de l'encrassement des canalisations d'eau (bactéries anaérobies sulfito-réductrices ou certains coliformes).

Il en est de même en ce qui concerne l'eau utilisée pour le nettoyage et la désinfection du matériel en contact avec le lait. La présence de bactéries (comme *Pseudomonas*, *Listeria*, *Salmonella*...) dans cette eau pourra entraîner une contamination dans un premier temps du lait puis ensuite du produit fini.

Dans le cas d'un captage privé, une analyse d'eau pratiquée régulièrement selon la réglementation en vigueur pour l'eau potable est préconisée (même s'il n'y a pas d'obligation réglementaire) pour en vérifier la qualité : elle comportera un volet bactériologique et un volet chimique. Pour la partie bactériologique, ces contrôles ont pour but de rechercher non pas des germes pathogènes mais des germes « témoins » d'une pollution. Présents en nombre important dans l'eau, ils indiquent que des bactéries potentiellement pathogènes sont susceptibles d'être également présentes.

Les laboratoires agréés proposent différents types d'analyses qui incluent plus ou moins de paramètres. En fonction des besoins ou de la problématique rencontrée, le choix portera sur des analyses simples (*Escherichia Coli*, entérocoques fécaux), qui pourront être complétées par les germes totaux, streptocoques fécaux, coliformes totaux et thermotolérants, et/ou d'autres analyses particulières tant au niveau bactériologique que chimique, non présentes dans les critères de potabilité (*Salmonella*, *Listeria*, *Pseudomonas*, métaux lourds, pesticides) moyennant une tarification supplémentaire. Dans ce cas, il faut bien se renseigner auprès du laboratoire sur la quantité d'eau nécessaire à l'analyse.

2. Les traitements possibles

Il existe aujourd'hui beaucoup de solutions de traitement d'eau aussi bien pour des contaminations d'origine bactériologique (chloration, utilisation d'UV...) que pour des problèmes d'origine chimique (dénitrificateur, adoucisseur, défériser...). Le choix de la mise en place d'un tel appareil sera fonction de la nature et de l'importance de la pollution, du besoin en eau, de la présence ou non d'un réseau de distribution et bien sûr du coût.

c. Quelles pratiques favorisent ou défavorisent la flore utile ?

Différents travaux menés en conditions de terrain ont permis d'identifier des pratiques de nettoyage qui tendraient à défavoriser l'ensemencement en flores d'intérêt technologique et/ou à modifier les équilibres microbiens au niveau des laits.



Photographie 16. Bac de nettoyage en exploitations caprines.

Les études décrites dans l'encadré ci-contre ont pu mettre en évidence les éléments suivants :

- des températures élevées de nettoyage de la machine à traire, bien au-delà des recommandations, sont associées à des laits moins « chargés », particulièrement en flores d'intérêt technologique (Arnal, 1999 ; Tormo *et al.*, 2010),
- un mauvais rinçage des installations de traite tendrait à appauvrir les laits en flores utiles (Arnal, 1999) avec une moindre aptitude des laits à la coagulation (Michel *et al.*, 2005b d'après une étude de FDCL 73),
- l'alternance systématique de l'utilisation d'acide et de base favorise l'irrégularité du pouvoir contaminant de la machine à traire et des laits plus riches en flores d'altération (coliformes et

Pseudomonas) (Chatelin et Richard, 1983 ; Michel *et al.*, 2001).

Cependant, les données disponibles concernent souvent la composition microbiologique des laits et non les flores mobilisables de la machine à traire. Il est alors souvent difficile d'individualiser l'effet des paramètres de nettoyage car ils sont liés entre eux sur le terrain. De plus, ils sont aussi souvent liés à d'autres pratiques d'élevage concernant l'hygiène. L'étude de l'effet de ces combinaisons de pratiques* sur les flores des laits sera particulièrement abordée dans la dernière partie de l'ouvrage.

2. Quels sont les résultats obtenus lors d'essais de changement de pratiques de nettoyage ?

L'orientation des biofilms* de la machine à traire est une question complexe. Elle doit forcément se raisonner en fonction du contexte de maîtrise de l'exploitation, en lien avec les autres pratiques déjà en place et en amont de la machine à traire. D'autres pistes restent par ailleurs à explorer au niveau de la décontamination sélective.

Les biofilms* sont toujours présents au niveau de la machine à traire et il est illusoire de chercher à les détruire complètement. Plusieurs travaux ont porté sur les changements de produits de nettoyage, s'inscrivant dans des contextes différents, avec divers objectifs :

- neutraliser l'effet de la machine à traire dans la constitution des équilibres microbiens des laits en exploitations bovines,
- orienter les biofilms* en élevages caprins avec des essais de procédures de décontamination sélectives (favorisant les flores d'intérêt technologique),
- réduire les coûts du nettoyage ou la présence de résidus tout en veillant à l'efficacité du nettoyage, dans les filières non traditionnelles.

La suppression du chlore dans les lessives alcalines a notamment été étudiée. Globalement, les différences obtenues au niveau des flores des laits sont faibles en élevages bovins (Ballot et Michel, 2002), sachant que le produit alcalin sans chlore testé contenait 3 fois plus d'agents tensio-actifs que le produit alcalin chloré. Par ailleurs, toujours en élevages bovins, l'utilisation de lessives sans chlore et sans prélavage n'affecte pas significativement le pouvoir d'ensemencement de la

Effet des paramètres de nettoyage

1. Effet de la température de nettoyage

Une étude réalisée au niveau de 12 producteurs de lait de vache destiné à la fabrication de Laguiole ayant des laits de bonne qualité bactériologique (niveaux bas en coliformes et en staphylocoques) a permis de mettre en évidence que les laits pauvres en flores utiles (bactéries lactiques, flores d'affinage) semblaient favorisés par le lavage de la machine à traire avec une eau à plus de 75°C (Arnal, 1999).

De même, une étude réalisée en élevages de chèvre dans 38 fermes en été 2006 et hiver 2007 (Tormo *et al.*, 2010) révèle que des températures élevées de début et de fin de nettoyage sont associées à des laits moins chargés, particulièrement en flores d'intérêt technologique.

2. Efficacité du rinçage

L'appauvrissement en flores utiles noté dans l'étude Laguiole (Arnal, 1999) semble par ailleurs accentué par un mauvais rinçage de l'installation (mais également par une méthode de préparation des trayons (pré-trempe avec essuyage papier).

Une étude menée en Savoie en 2000 (Michel *et al.*, 2005b d'après une étude de FDCL 73) dans une trentaine d'exploitations équipées de programmeurs automatiques de lavage a mis en évidence la présence de résidus de produits lessiviels à la fin du procédé de nettoyage de la machine à traire (révélée par un écart important de pH entre cette eau et l'eau du robinet) et en proportion importante (13 des 32 exploitations). Cette présence de résidus n'a été observée que pour des lessives alcalines. Elle n'entraîne pas de modification du niveau de flore totale mais une modification de sa composition (diminution des entérocoques). L'aptitude à la lactofermentation est diminuée : 21 % des laits coagulent lorsque les volumes de rinçage sont insuffisants alors que 60 % des laits des mêmes exploitations coagulent lorsque les volumes de rinçage sont suffisants.

3. Fréquence de nettoyage de la MAT et d'alternance acide/alcalin

Des travaux anciens (Chatelin et Richard, 1983) ont montré que l'alternance systématique de l'utilisation de l'acide et de la base favorise l'irrégularité du pouvoir contaminant de la machine à traire et des laits plus riches en flores d'altération (coliformes et *Pseudomonas*). Une étude réalisée sur des exploitations bovines confirme ces observations (Michel *et al.*, 2001). Par ailleurs, les producteurs lavant moins intensément leur machine à traire (1 fois par jour, utilisation d'acide peu fréquente, c'est à dire moins d'une fois tous les deux jours) ne produisent jamais de lait au niveau de flore totale le plus faible. Pour ces producteurs, le fait qu'ils soient surtout équipés de systèmes avec de grandes longueurs de canalisation (> 15 m) peut être un élément explicatif supplémentaire. Cela peut expliquer que les résultats obtenus en 2005 soient moins tranchés sur l'effet seul de l'alternance acide/base. Comme le montre cette dernière étude, ce sont l'ensemble des pratiques de nettoyage de la MAT combinées à d'autres pratiques au niveau de l'hygiène générale et des trayons qui sont liées à certains types de laits (Michel *et al.*, 2005a).

machine à traire, évalué par passage d'eau stérile, en terme de niveau de flore totale et de flore d'altération (Billon *et al.*, 2004; Meffe et Billon, 2006). Des travaux récents se sont intéressés à la simplification du nettoyage, en condition de ferme expérimentale ayant des pratiques de nettoyage conformes aux recommandations du COFIT, selon la même méthodologie que précédemment. Le protocole visait à remplacer l'usage de l'alcalin chloré le soir par un rinçage à l'eau tiède ou à l'eau froide (Corbet, 2008). L'utilisation d'eau tiède ou froide engendre une légère augmentation significative en *Pseudomonas* au niveau

de l'eau stérile mise en circulation dans la machine à traire, mais pas de différence significative sur la flore totale et les autres flores d'altération dénombrées. Aucune différence significative n'est apparue sur le lait de traite concernant la flore totale et les flores d'altération.

En élevages caprins, les essais de décontamination sélective étaient prometteurs à l'échelle du laboratoire mais ils se sont révélés plus mitigés en exploitations (Laithier *et al.*, 2005b). Ainsi, avec l'emploi d'alcalin non chloré additionné de 0,05 % de Na₂SO₄, produit

formulé au laboratoire (non commercialisé à ce jour), les paramètres d'acidification des laits de traite semblent améliorés et les flores d'affinage favorisées en exploitations caprines. Néanmoins, un risque de développement de *Pseudomonas* dans les biofilms* est mis en évidence dans certains cas, ce qui peut engendrer des conséquences différentes suivant les technologies mises en œuvre. Les résultats obtenus dépendent aussi de l'élevage suivi. La suppression du chlore peut ainsi s'envisager avec précaution suivant la situation propre de chaque éleveur. L'addition de sel en plus grande quantité (10 %) ne semble pas éliminer le problème des flores d'altération dans les conditions de l'essai complémentaire, réalisé en ferme expérimentale.

La difficulté réside dans la mise en œuvre d'essais dans des conditions proches de la réalité, prenant en compte la diversité des exploitations. L'orientation des biofilms* de la machine à traire doit forcément se raisonner en fonction du contexte de maîtrise de l'exploitation, en lien avec les autres pratiques déjà en place et en amont de la machine à traire. D'autres pistes restent par ailleurs à explorer : utilisation de produits sélectifs comme les huiles essentielles, utilisation d'acide acétique associé à la monolaurine, meilleur séchage des installations pour lutter efficacement contre *Pseudomonas*. L'implantation de biofilms* « positifs » est une autre voie possible d'étude non explorée jusque là pour les machines à traire.

Les essais de changement de pratiques de nettoyage

Les biofilms* sont toujours présents au niveau de la machine à traire. Compte tenu des résultats décrits précédemment, l'objectif en exploitations bovines est de neutraliser l'effet de la machine à traire en ne modifiant pas les équilibres microbiens établis sur les réservoirs* en amont de la machine à traire. En exploitations caprines, les études ont visé quant à elles à orienter les biofilms* en favorisant les flores utiles. Des travaux sont également réalisés sur le nettoyage dans les filières non traditionnelles, souvent dans un objectif économique ou de réduction des résidus tout en veillant à l'efficacité du nettoyage. Les résultats de ces derniers travaux sont rappelés ici car ils donnent des éléments complémentaires même si leur finalité n'est pas d'étudier les flores des laits et des biofilms* dans leur ensemble. Les travaux conduits selon ces différents objectifs et contextes ont porté sur l'étude de l'effet de la nature du produit de nettoyage et en particulier l'évaluation de l'impact du changement de produit de nettoyage.

1. Les essais en exploitations bovines

Les premiers travaux menés sur la qualité bactériologique des laits ont montré que le type de produit avait un impact sur les flores mobilisables de la machine à traire (Chatelin et Richard, 1983). Notamment, l'utilisation d'eau chaude acidifiée deux fois par jour engendrait au niveau des flores mobilisables de la machine à traire une moindre présence de contaminants mais favorisait les germes thermorésistants.

Les travaux plus récents en exploitations bovines visaient à réduire le risque de présence de résidus de chlore car comme indiqué précédemment, ceux-ci pourraient avoir un impact notamment sur l'équilibre des flores présentes dans la machine à traire. Ainsi, en zone Laguiole, des essais comparatifs portant sur l'utilisation de lessives chlorées et non chlorées dans 12 exploitations laitières bovines ont été effectués (Ballot et Michel, 2002). Le travail réalisé a mis en évidence un effet du type de lessive sur certaines flores utiles mais les différences sont faibles. Globalement, quelque soit la lessive utilisée, le niveau de flore totale des laits était faible (trois quart des laits à moins de 10 000 germes/ml). Les laits contiennent des niveaux plus élevés d'entérocoques lors de l'emploi de lessives non chlorées et des niveaux plus élevés de lactobacilles hétérofermentaires et de levures lors de l'emploi de lessives chlorées, sans pour autant observer de modification au niveau de la flore totale, des flores d'altération et potentiellement pathogènes. En revanche, ces modifications ne semblent pas liées à la présence ou non de résidus car il n'y a pas eu de problème de rinçage observé avec l'utilisation de lessive chlorée. Il a été observé à contrario une moindre rinçabilité de la lessive non chlorée, dont la concentration en agents tensio-actifs était trois fois plus élevée.

D'autres travaux ont été conduits en ferme expérimentale puis en exploitations bovines pour valider le concept d'utilisation de lessive sans chlore et sans prélavage. Les flores utiles n'ont pas été dénombrées. Il est cependant intéressant de constater que le pouvoir d'ensemencement de la machine à traire, évalué par passage d'eau stérile, n'est pas significativement affecté en terme de niveau de flore totale et de flore d'altération (Billon *et al.*, 2004 ; Meffe

et Billon, 2006). Par ailleurs, des travaux récents se sont intéressés à la simplification du nettoyage, en condition de ferme expérimentale ayant des pratiques de nettoyage conformes aux recommandations du COFIT, selon la même méthodologie que précédemment. Le protocole visait à remplacer l'usage de l'alcalin chloré le soir par un rinçage à l'eau tiède ou à l'eau froide (Corbet, 2008). L'utilisation d'eau tiède ou froide engendre une légère augmentation significative en *Pseudomonas* au niveau de l'eau stérile mise en circulation dans la machine à traire mais pas de différence sur la flore totale et les autres flores d'altération dénombrées. Aucune différence significative n'est apparue sur le lait de traite concernant la flore totale et les flores d'altération.

2. Les essais en exploitations caprines

En élevage caprin, l'objectif de l'utilisation de lessives à décontamination sélective est de détruire au niveau des biofilms* les flores d'altération et les flores pathogènes, tout en préservant les flores utiles. Une étude a été conduite dans ce sens en laboratoire sur des biofilms* reconstitués puis en exploitations (Laithier *et al.*, 2004b et 2005b). Les résultats obtenus en laboratoire ont montré que la sensibilité des groupes* microbiens variait selon la nature des produits testés : ainsi, par exemple, toutes les souches* se sont révélées sensibles au produit alcalin chloré ou aux produits de nature acide. Le produit alcalin additionné de sel Na_2SO_4 (10%), produit formulé au laboratoire non commercialisé, se révélait sélectif en préservant un peu la flore lactique et en réduisant le niveau des flores d'altération (*Pseudomonas*) et pathogènes mais cette solution n'est pas directement applicable en exploitations. La solution alcaline additionnée de sel à 0,05 % préservait mieux les flores d'intérêt tout en éliminant les flores d'altération mais elle ne réduisait les flores pathogènes que très partiellement (1 log de réduction uniquement), ce qui implique son utilisation dans des fermes en situation de maîtrise sanitaire.

La solution alcaline additionnée de 0,05 % de sel a alors été testée dans 9 exploitations caprines, en comparant la composition microbiologique et l'aptitude acidifiante des laits d'une traite et des laits UHT ayant été mis en circulation dans la machine à traire avant (utilisation alcalin chloré « classique ») et après changement de produit (utilisation alcalin + 0,05 % de sel). L'utilisation de cette solution permet au niveau des laits de traite d'améliorer légèrement les paramètres d'acidification et surtout de favoriser les flores d'affinage. Cependant, contrairement à ce qui a été observé au laboratoire, le risque de présence de *Pseudomonas* dans le lait passant dans la MAT est accru même si aucune différence significative n'a été mise en évidence sur les laits de traite (tableau 14).

Paramètres	Lait UHT		Lait d'une traite	
	Différence des moyennes (solution testée - produit habituel)	Probabilité	Différence des moyennes (solution testée - produit habituel)	Probabilité
FMAR	+0,481	<0,001	-0,194	0,904
Flore acidifiante	-0,257	<0,001	-0,058	0,158
Leuconostocs	-0,186	0,032	-0,087	0,031
Entérocoques	-0,246	<0,001	-0,064	0,184
Microcoques et corynébactéries	+0,280	0,023	+0,801	<0,001
Staphylocoques coagulase négative	+0,723	<0,001	+0,711	<0,001
Levures et moisissures	+0,309	0,118	-0,121	0,280
Coliformes	Pas d'évolution		Pas d'évolution	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Probabilité de présence x 2	0,0026	Pas d'évolution	

Tableau 14. Effets de la solution alcaline additionnée de 0,05 % de sel sur les dénombrements microbiens des laits UHT en log₁₀ UFC*/ml passés dans les machines à traire et les laits d'une traite (Laithier *et al.*, 2005a et b).

Listeria monocytogenes n'a jamais été retrouvée et *Staphylococcus aureus* était très rarement présent dans les échantillons de laits UHT ayant circulé dans la machine. Les résultats mettent par ailleurs en évidence un effet important de l'élevage suivi. La suppression du chlore peut ainsi s'envisager avec précaution suivant la situation propre de chaque éleveur. L'addition de sel en plus grande quantité (10 %) ne semble pas éliminer le problème des flores d'altération dans les conditions de l'essai complémentaire, réalisé en ferme expérimentale.

Type de pratique	Leviers	Références
Conception et matériau de la MAT	• Apport d'un nombre élevé de germes dans le lait avec une installation de traite comprenant de grandes longueurs de canalisations. • Surfaces non poreuses comme l'inox et le verre moins favorables au développement des biofilms*. • Les manchons en silicone semblent présenter des niveaux de flores très bas avec uniquement des flores d'affinage (à confirmer avec davantage d'exploitations).	Michel <i>et al.</i> , 2001 Laithier <i>et al.</i> , 2005a Laithier <i>et al.</i> , 2005a
Défauts d'entretien et/ou de lavage	• Mobilisation importante de germes au niveau de la MAT avec des défauts d'entretien et/ou un lavage inefficace du matériel.	Michel <i>et al.</i> , 2005a et 2006 ; Chatelin et Richard, 1981
Paramètres de nettoyage	Température de nettoyage • Des températures élevées de nettoyage de la machine à traire, bien au-delà des recommandations sont associées à des laits moins « chargés », particulièrement en flores d'intérêt technologique. Rinçage des installations • Un mauvais rinçage des installations de traite tendrait à appauvrir les laits en flores utiles. • Un mauvais rinçage conduit aussi à une moindre aptitude des laits à la coagulation. Alternance acide/alcalin • L'alternance systématique de l'utilisation de l'acide et de la base favorise l'irrégularité du pouvoir contaminant de la machine à traire et des laits plus riches en flores d'altération (coliformes et <i>Pseudomonas</i>). Essais de changement de produit de nettoyage : suppression du chlore En exploitations bovines : • Différences faibles au niveau des flores des laits entre l'utilisation d'alcalin non chloré et l'utilisation d'alcalin chloré. • Pouvoir d'ensemencement de la MAT non affecté au niveau de la flore totale et des flores d'altération avec l'utilisation de lessives sans chlore et sans pré-lavage. • En ferme expérimentale, l'utilisation d'eau froide ou tiède en remplacement de l'alcalin chloré le soir engendre une légère augmentation en <i>Pseudomonas</i> au niveau du pouvoir contaminant de la MAT mais aucune différence n'est apparue sur le lait concernant la flore totale et les flores d'altération. En exploitations caprines : • Paramètres d'acidification des laits améliorés et flores d'affinage favorisées avec l'emploi d'alcalin non chloré additionné de 0,05 % de Na₂SO₄ (produit formulé au laboratoire) mais risque de développement des <i>Pseudomonas</i> au niveau de la MAT (y compris en augmentant le taux de sel).	Arnal, 1999 ; Tormo <i>et al.</i> , 2010 Arnal, 1999 Michel <i>et al.</i> , 2005b Chatelin et Richard, 1983 ; Michel <i>et al.</i> , 2001 Ballot et Michel, 2002 Billon <i>et al.</i> , 2004 ; Meffe et Billon, 2006 Corbet, 2008 Laithier <i>et al.</i> , 2005b

Tableau 15. Synthèse des leviers jouant sur les flores des biofilms* du matériel de traite.

D. Synthèse et perspectives

Les biofilms* toujours présents à la surface de la machine à traire constituent un réservoir* de flores du lait. En exploitations bovines, les flores mobilisables de la machine à traire ne semblent pas très diversifiées et les flores utiles seraient au même niveau que les flores d'altération. En exploitations caprines, les flores utiles seraient majoritaires dans les biofilms* de la machine à traire. Cependant, les flores d'altération voire même pathogènes peuvent être présentes et ce d'autant plus que le niveau de flore totale est élevé.

Le type de machine à traire, les pratiques en place dans les exploitations modulent l'apport en flores et notamment en flores d'intérêt technologique par la machine à traire : conception de la machine, type de matériau utilisé, technique de lavage et efficacité du rinçage. Particulièrement en cas de défauts d'entretien et/ou de lavage, les biofilms* de la machine à traire peuvent être sources de flores d'altération voire pathogènes.

Les principaux travaux conduits lors d'essais de changement de pratiques de nettoyage ont porté sur des changements de produit utilisé pour le nettoyage et/ou la désinfection. En exploitations bovines, compte tenu de la composition des biofilms* décrite précédemment, l'idée est de chercher à neutraliser l'effet de la machine à traire dans la constitution des équilibres microbiens des laits. En exploitations caprines, les études ont visé à orienter les biofilms* en favorisant les flores utiles. Des travaux sont également réalisés sur le nettoyage dans les filières non traditionnelles, souvent dans un objectif économique ou de réduction des résidus tout en veillant à l'efficacité du nettoyage. La suppression du chlore dans les lessives alcalines a alors notamment été étudiée.

Ces travaux révèlent que l'orientation des biofilms* de la machine à traire est une question complexe. Elle doit forcément se raisonner en fonction du contexte de maîtrise de l'exploitation, en lien avec les autres pratiques déjà en place et en amont de la machine à traire. D'autres pistes restent par ailleurs à explorer au niveau de la décontamination sélective : utilisation de produits sélectifs comme les huiles essentielles, utilisation d'acide acétique associé à la monolaurine, meilleur séchage des installations pour lutter efficacement contre *Pseudomonas*. L'implantation de biofilms* « positifs » est une autre voie possible

d'étude non explorée jusque là pour les machines à traire.

Références principales

Ballot N, Michel V. 2002. Conditions d'utilisation d'une lessive non désinfectante et influence sur la flore des laits. Rapport technique, Pôle Fromager AOC Massif central, Aurillac, 25 pages.

Billon P, Meffe N, Gaudin V. 2004. Etude comparée du pouvoir contaminant d'une installation de traite nettoyée avec trois concepts de produits différents. Collection Résultats. Compte rendu Institut de l'Elevage confidentiel 2043103, 17 pages.

Bonnes A. 2010. Caractérisation des réservoirs de flores microbiennes pouvant ensemer le lait cru de chèvre. Rapport de stage, E.I. Purpan, 44 pages.

Bouton Y, Guyot P, Vacheyrou M, Normand AC, Piarroux R, Beuvier E. 2007. Etude des flux bactériens dans les étables de production laitière de Franche-Comté. Exemple des LHF. 15^{ème} colloque du Club des Bactéries Lactiques, 13-15 novembre, Rennes.

Chatelin YM, Richard J. 1981. Etude de quelques cas de contaminations microbiennes importantes du lait à la ferme. Lait 61, 80-94.

Laithier C, Chatelin YM, David V, Talon R, Labadie J, Barral J, Tormo H, Lefrileux Y, Morge S. 2005a. Améliorer la maîtrise de la qualité des fromages fermiers par une meilleure caractérisation des biofilms et de leur rôle. Collection résultats. Compte rendu final 150531011, 64 pages.

Laithier C, Chatelin YM, Talon R, Barral J, Tormo H, Lefrileux Y. 2005b. Efficacité en laboratoire puis en exploitations de procédures de nettoyage / désinfection sur la sélection positive des biofilms. In 11^{èmes} Rencontres Recherches Ruminants, Institut de l'Elevage, INRA, Paris, 367-370.

Meffe N, Billon P. 2006. Etude du pouvoir contaminant des machines à traire nettoyées avec un nouveau concept de produits sans prélavage. Résultats d'un essai réalisé dans 14 élevages. Collection Résultats. Compte rendu Institut de l'Elevage 140631018, 46 pages.

Michel V, Hauwuy A, Montel MC, Coulon JB, Chamba JF. 2005a. Pratiques d'élevage et composition

microbienne des laits crus. Symposium International Territoires et Enjeux du développement régional, 9-11 mars, Lyon.

Michel V, Hauwuy A, Chamba JF. 2001. La flore microbienne des laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. Lait 81, 575-592.

Tormo H, Agabriel C, Lopez C, Ali Haimoud Lekhal C, Roques C. 2010. Relationship Between The Production Conditions of Goat's Milk And The Microbial Profiles Of Milk. Int. J. Dairy Science, 6, 13-28.

Wong ACL et Cerf O. 1995. Les biofilms : vers la maîtrise de l'hygiène des surfaces du matériel laitier. Bulletin of the IDF 302, 45-50.

Les autres références citées dans cette partie sont listées en annexe.

■ Partie 4 : L'environnement des animaux

Yvette BOUTON

Comité Interprofessionnel du Gruyère de Comté (CIGC)
Avenue de la Résistance, BP 20 026 - 39801 Poligny cedex

L'environnement microbiologique des étables est très complexe du fait des activités menées dans l'étable et de la diversité microbienne* des différents substrats manipulés pour, par exemple, nourrir les animaux ou changer la litière. Au regard de cette diversité de flores, nous ne pouvons écarter l'hypothèse que certains micro-organismes présents dans l'environnement des étables puissent se retrouver dans le lait cru produit par les animaux logés dans ces étables. Ce transfert, de l'environnement au lait pourrait se faire, soit directement par l'air et les poussières, soit par l'intermédiaire du trayon, lui-même au contact de divers supports (litière, herbe, eau...).

Après une description des différents groupes* de micro-organismes rencontrés dans l'environnement des étables (litières, foin, végétaux frais, air), l'effet des pratiques des producteurs sur la composition microbiologique de cet environnement et du lait est abordé. Les travaux les plus nombreux concernent les étables de vaches laitières mais quelques études ont également été menées en caprins (Pétrier, 2009 ; Albuquerque, 2007 ; Callon *et al.*, 2007 ; Tormo *et al.*, 2009) et en ovins (Albenzio *et al.*, 2005 ; Goncalves, 2008 ; Sévi *et al.*, 2003).

A. Quelles sont les populations microbiennes rencontrées dans l'environnement des animaux ?

Parmi les flores rencontrées dans les divers compartiments de la ferme (paille fraîche, bouses, litières, foin, végétaux frais et air), la flore d'affinage (staphylocoques, bactéries corynéformes...) semble être la flore majoritaire. Les bactéries lactiques y sont présentes mais avec des niveaux beaucoup plus variables selon les supports et les fermes (de quelques unités dans les végétaux à plusieurs centaines de milliers dans les bouses). Les bactéries coliformes, bien représentées dans les litières et les végétaux frais, semblent être en quantité plus faible dans l'air (quelques centaines d'unités). Les *Pseudomonas* seraient plus rarement détectés en élevages caprins.

1. Les litières

Différents matériaux tels que la paille, la sciure, les copeaux de bois, le sable ou le papier peuvent être utilisés comme litière. Des différences de niveaux de populations microbiennes ont été mises en évidence selon la nature de la litière utilisée. Ainsi, Rendos *et al.*, 1975 ont montré que la paille présentait des niveaux en streptocoques et staphylocoques de 10 à 100 fois supérieurs à ceux dénombrés sur la sciure ou les copeaux de bois. Les niveaux en coliformes totaux n'étaient en revanche pas significativement différents (tableau 16). La source des micro-organismes retrouvés sur les litières n'est pour l'instant pas clairement établie. Ces micro-organismes peuvent provenir des matériaux eux-mêmes utilisés en tant que litière ou bien d'autres sources comme les déjections ou la peau des animaux.

Nature de la litière	Coliformes totaux	Streptocoques	Staphylocoques
Sciure	7,72	7,04	8,49
Copeaux de bois	6,82	6,93	7,69
Paille	6,49	7,72	9,34

Tableau 16. Niveaux moyens des populations microbiennes (en log₁₀ UFC*/g) dénombrées sur trois types de litières (9 observations/type de litière) utilisées par des vaches laitières (Rendos *et al.*, 1975).

D'après Reboux *et al.*, 2001, la paille renferme entre 10^4 et 10^5 UFC*/g de moisissures et d'actinomycètes*. Parmi les vingt-sept espèces* de moisissures recensées par ces auteurs, *Absidia corymbifera*, *Eurotium amstelodami*, *Wallemia sebi*, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus nidulans* constituent les cinq espèces* les plus représentées.

Quatre espèces* de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (*Lactobacillus coryniformis* spp. *L. curvatus*, *L. paraplantarum* et *L. plantarum*) et une espèce* de bactéries propioniques* (*Propionibacterium freudenreichii* spp.) ont été mises en évidence après une étape d'enrichissement (Bouton *et al.*, 2007 ; Bouton, communication personnelle.). En effet, ces micro-organismes en particulier les lactobacilles sont présents en très faibles quantités à la surface des végétaux mais peuvent très rapidement coloniser les plantes lorsque celles-ci sont abîmées.

Il a été observé que la charge microbienne d'une litière utilisée par les vaches était supérieure à celle d'une litière fraîche. Les niveaux des populations en coliformes, streptocoques (dont entérocoques) et staphylocoques augmentaient avec des variations pouvant aller de 10 à 10^6 selon les micro-organismes et les matériaux utilisés (Ménard *et al.*, 2004, Rendos *et al.*, 1975, Zdanowicz *et al.*, 2004). Récemment, Joandel, 2007 a mis en évidence des différences de plus de 10^2 sur des litières composées de paille ou de sciure, pour



Photographie 17.

les entérocoques, les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, les bactéries propioniques* et les flores d'affinage. Toutes les flores dénombrées sur la litière utilisée atteignaient des niveaux moyens de population compris entre 10^4 et 10^9 UFC*/g, exception faite des staphylocoques à coagulase positive (tableau 17). En caprins, si les entérocoques et les coliformes atteignaient également des niveaux du même ordre de grandeur (respectivement 10^7 et entre 10^5 et 10^6 UFC*/g), les *Pseudomonas* étaient en revanche rarement détectés (Albuquerque, 2007). Plusieurs études ont montré que la charge microbienne des bouses était moins élevée que celle des litières, suggérant un développement microbien à la surface des litières utilisées (Ménard *et al.*, 2004 ;

Flores	Bouses N = 49 à 58	Litière fraîche N = 6	Litière utilisée N= 39 à 45
<i>Flore totale</i>			
Flore mésophile aérobie revivable (FMAR)	6,58	7,81	9,01
<i>Flore d'intérêt technologique</i>			
Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs	1,67	2,31	4,82
Entérocoques	3,67	3,55	6,97
Bactéries propioniques*	1,81	1,98	4,47
Flore d'affinage	5,82	6,98	8,79
Levures	3,02	5,48	5,95
Moisissures	3,90	6,20	5,63
<i>Flore d'altération</i>			
<i>Pseudomonas</i>	3,07	5,59	6,61
Coliformes totaux	4,85	5,10	6,02
<i>Flore potentiellement pathogène</i>			
Staphylocoques à coagulase positive	1,07	0,82	1,42

Tableau 17. Niveaux moyens des populations microbiennes (en $\log_{10}$ UFC*/g) dénombrées sur les bouses et les litières de vaches laitières issues de 20 fermes (Joandel, 2007).

Joandel, 2007). En effet, l'humidité, la température mais aussi la lumière ou l'oxygène sont autant de facteurs pouvant influencer le développement des micro-organismes. D'après Joandel, 2007, les micro-organismes rencontrés principalement dans les bouses (en période de pâturage) appartiennent à la flore acidifiante mésophile (tels que les streptocoques, leuconostocs, pédiocoques, entérocoques), à la flore d'affinage (bactéries corynéformes, staphylocoques, microcoques) et à la famille des coliformes (tableau 17). Toutefois, de grandes variations de niveaux (de l'ordre de 10^4) ont été observées au sein d'une même exploitation sur une période de trois semaines, pour les entérocoques, les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, les bactéries propioniques*, les *Pseudomonas*, les levures et les bactéries d'affinage. Dans une autre étude réalisée en période hivernale (Kagkli *et al.*, 2007a), la flore lactobacille isolée de fèces de bovins (nourris à base d'ensilage) était plus importante d'environ 10^3 à la flore entérocoque (plus de 10^5 contre 10^2 UFC*/g).

Plusieurs espèces* de bactéries lactiques ont été identifiées dans les bouses. Il s'agit des espèces* *Aerococcus viridans*, *Enterococcus casseliflavus* et de 3 espèces* de lactobacilles : *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum* (Kagkli *et al.*, 2007a). Cependant, l'alimentation des animaux peut influencer la composition des bouses. Ainsi, Krause *et al.*, 2003 ont observé des niveaux de population en *Escherichia coli*, lactobacilles (*L. fermentum*, *L. ruminus*) et autres bactéries (*Streptococcus bovis*...) plus importants dans les bouses de vaches ayant consommé une alimentation riche en concentrés que dans celles de vaches ayant consommé des fourrages.

2. Les substrats d'alimentation

Comme la paille, le foin contient des populations de moisissures et d'actinomycètes* comprises entre 10^4 et 10^5 UFC*/g (Reboux *et al.*, 2001). Les espèces* majoritaires de moisissures sont les mêmes que celles rencontrées dans la paille. Les bactéries atteignent une population moyenne de plus de 10^3 UFC*/g. On trouve essentiellement des bacilles à Gram positif appartenant aux genres* *Bacillus* spp. et *Corynebacterium* spp., ainsi que des coques à Gram positif. Les bactéries à Gram négatif représentent moins de 1% de la flore



Photographie 18.



Photographie 19.

bactérienne (Roussel *et al.*, 2005). Au sein de la flore à Gram positif, des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (*L. amylovorus*, *L. coryniformis* spp., *L. curvatus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. paraplantarum*, *L. plantarum*) et des bactéries propioniques* (*P. freudenreichii* spp.) ont également été mis en évidence (Bouton *et al.*, 2007; Bouton, communication personnelle).

L'analyse de végétaux frais issus des prairies normandes (Denis et Desmasures, 2005) a révélé la présence importante de *Pseudomonas* (10^6 à 10^8

UFC*/g) et d'entérobactéries (10^4 à 10^7 UFC*/g). Parmi les flores utiles, les bactéries corynéformes (10^3 à 10^7 UFC*/g) et les levures (10^3 à 10^6 UFC*/g) étaient bien représentées alors que les bactéries lactiques l'étaient beaucoup moins. Seul le génotype *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* était présent sur les végétaux. Aucun lactobacille n'a été détecté dans la microflore prairiale. Dans une autre étude, plusieurs espèces* de lactobacilles (*L. paracasei*, *L. plantarum* et *L. paraplantarum*) ont pu être mises en évidence dans des échantillons d'herbe et de betterave fourragère après une étape d'enrichissement (Bouton *et al.*, 2007).

3. L'air et la poussière

Dans les étables de vaches laitières, la flore fongique ainsi que les actinomycètes* atteignent des populations variant de 10^3 à presque 10^6 UFC*/m³ d'air (Reboux *et al.*, 2001 ; Sudre *et al.*, 2009). Les principaux genres* recensés sont *Eurotium*, *Wallemia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Absidia* et *Mucor*. Des levures rouges (*Rhodotorula*) et blanches (*Candida* spp., *Cryptococcus* spp. et *Debaryomyces* spp.) ainsi que des actinomycètes* ont également été mis en évidence (Reboux *et al.*, 2001 ; Normand *et al.*, 2009).

La flore bactérienne (flore aérobie se développant à 30°C) atteint une population moyenne de plus de 10^4 UFC*/m³ d'air. Elle est composée essentiellement de bactéries à Gram positif (75 à 90 %) et de bacilles à Gram négatif (10 à 25 %). Aucun coque à Gram négatif n'a été mis en évidence. Les genres* *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. et *Bacillus* spp. représentent à eux seuls plus de 70 % des espèces* recensées (Normand *et al.*, 2009 ; Sudre *et al.*, 2009). Ainsi, parmi la diversité des bactéries identifiées dans l'air ou la poussière sédimentée, de nombreux micro-organismes sont présents à la surface des fromages. Il s'agit principalement des staphylocoques (*Staphylococcus equorum*, *S. xylosus*), des microcoques et des bactéries corynéformes (*Brachybacterium* spp., *Corynebacterium* spp., *Curtobacterium* spp.) (Denis et Desmasures, 2005 ; Normand *et al.*, 2009 ; Sudre *et al.*, 2009).

D'autres travaux réalisés en caprins (Pétrier, 2009 ; Tormo *et al.*, 2009) et en bovins (Michel *et al.*, 2006) ont montré qu'au moment de la traite, l'air contenait des bactéries d'affinage (staphylocoques à coagulase négative, bactéries corynéformes) et des bactéries



Photographie 20. Prélèvement d'air par biocollecteur.

lactiques mésophiles (lactocoques, leuconostocs, pédiocoques, entérocoques...). Ces flores atteignaient des niveaux moyens de populations de l'ordre de 10^4 UFC*/m³ d'air. Le niveau en bactéries coliformes était inférieur à quelques 10^2 UFC*/m³ d'air.

En bovins, les *Pseudomonas* (bactéries rarement détectées en caprins) et les bactéries propioniques* atteignaient des niveaux moyens respectivement de plus de 10^3 et de plus de 10^2 UFC*/m³ d'air. Toutefois, dans d'autres études réalisées également en bovins, les lactocoques, les lactobacilles et les bactéries propioniques* semblaient être faiblement représentés dans l'air. Seuls quelques isolats appartenant aux genres* *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. et *Propionibacterium* spp. ont été mis en évidence (Denis et Desmasures, 2005 ; Bouton *et al.*, 2007 ; Bouton, communication personnelle). En ovins, des populations de staphylocoques à coagulase négative (comprises entre plusieurs 10^3 et 10^4 UFC*/m³ d'air) et d'entérocoques (entre 10^2 et 10^3 UFC*/m³ d'air) ont également été dénombrées (Goncalves, 2008).



Photographie 21.

B. Quelles sont les pratiques qui influencent les populations microbiennes de l'environnement des animaux ?

Des facteurs de variation des flores rencontrées dans l'environnement des animaux ont été mis en évidence. L'activité dans les étables, le taux de renouvellement de l'air, la température du bâtiment ont un impact sur les niveaux de flores dans l'air. La flore microbienne des litières dépend de leur nature et de leur entretien. Les conditions de récolte et de stockage du foin vont avoir une influence sur les flores présentes dans ce fourrage. Les informations disponibles restent néanmoins partielles, les travaux méritant d'être poursuivis.

L'entretien de la litière a une influence sur les niveaux de flores. D'après Ménard *et al.*, 2004, le niveau de contamination, par *E. coli* et les entérocoques en surface de la litière, avec un paillage biquotidien est inférieur à celui obtenu avec un paillage quotidien.

Par ailleurs, Albenzio *et al.*, 2005 ont montré dans des conditions expérimentales que le taux de renouvellement d'air, de l'aire de couchage, influence les niveaux des populations microbiennes de l'air. Ainsi un passage d'un débit de 35m³/h à 70m³/h permettait de diminuer de manière significative les taux en coliformes et levures de l'air de l'étable. L'utilisation d'un produit asséchant tel que la bentonite, associé à un renouvellement des litières toutes les 4 semaines a aussi permis de réduire les poussières et les micro-organismes (levures et moisissures) de l'air des étables (Sévi *et al.*, 2003).

La composition de l'air varie également en fonction des différents substrats manipulés. Ainsi, il a été observé une augmentation des moisissures et des actinomycètes* dans l'air au moment de la distribution de foin (Reboux *et al.*, 2006 ; Sudre *et al.*, 2009). Par contre, aucun lien entre la flore bactérienne de l'air (flore aérobie se développant à 30°C) et les pratiques d'affouragement n'a été constaté, ce qui laisserait supposer que le foin n'est pas la source majeure de ces bactéries (Sudre *et al.*, 2009). Par ailleurs, Normand *et al.*, 2009 ont montré que la composition microbienne de la poussière sédimentée des étables reflétait celle de l'air avant la distribution de fourrage. Des pratiques en lien avec l'ambiance du bâtiment (période de pâturage des chèvres, température < 12°C) ont été associées à

des niveaux de flores plus faibles dans l'air de la salle de traite (Pétrier, 2009). En effet, en période de pâturage, les chèvres étant moins présentes dans le bâtiment, il y a moins de poussières car moins de paillage, moins de fourrages distribués et moins de piétinement de la litière.



Photographie 22.

Le développement des micro-organismes dans le foin, en particulier de la flore fongique est influencé par les conditions de récolte (humidité, présence de terre), de conditionnement et de séchage. Une moisissure impliquée dans la maladie du poumon du fermier en France, *Absidia corymbifera* a par exemple été observée plus fréquemment dans le foin séché en balles rondes que dans le foin séché en vrac et dans les balles carrées de moyenne densité (Roussel *et al.*, 2006). Lors du stockage du foin, la fermentation induit un changement de la flore microbiologique qui dépend de l'hygrométrie pendant la récolte, du pH et de la température atteints lors de la fermentation. D'après Roussel *et al.*, 2005, le salage du foin ne permet pas de réduire significativement les quantités de moisissures et de bactéries du foin.

C. L'environnement des animaux est-il une source d'ensemencement du lait ?

Des liens ont été mis en évidence entre les pratiques influençant la flore microbienne de l'environnement des animaux et les flores des laits. De plus, la présence de souches* identiques dans l'environnement des animaux et le lait renforce l'hypothèse d'un flux de micro-organismes de l'environnement au lait.

Réservoir	Source	Leviers	Références
Air		L'activité dans les étables (paillage, distribution des fourrages, présence des animaux) augmente les niveaux de flores dans l'air : • Plus de moisissures et d'actinomycètes* lors de la distribution de foin.	Reboux <i>et al.</i> , 2006 ; Sudre <i>et al.</i> , 2009
		Le taux de renouvellement d'air : • Le passage d'un débit d'air de 35 à 70 m³/h diminue les taux de coliformes et de levures dans l'air de l'étable ainsi que les taux de coliformes et de bactéries psychrotrophes dans le lait.	Albenzio <i>et al.</i> , 2005
		La température : • Moins de flores dans l'air si la température de la chèvrerie est < 12°C.	Pétier, 2009
	Litière	Nature de la litière : • Plus de streptocoques et de staphylocoques sur la paille que sur la sciure ou les copeaux de bois. • Plus de lactobacilles et de bactéries propioniques* dans le lait si présence de foin dans la litière.	Rendos <i>et al.</i> , 1975 Bouton <i>et al.</i> , 2005
		Entretien de la litière : • L'utilisation de produit asséchant (bentonite) associé à un renouvellement des litières toutes les 4 semaines diminue les taux de levures et moisissures dans l'air ainsi que les taux de coliformes, levures, moisissures et bactéries psychrotrophes dans le lait. • Moins de <i>E. coli</i> et d'entérocoques si paillage biquotidien plutôt que paillage quotidien.	Sévi <i>et al.</i> , 2003 Ménard <i>et al.</i> , 2004
	Foin	Conditions de récolte (humidité, terre...) et de stockage : • Plus de moisissures (<i>A. corymbifera</i>) dans un foin séché en balles rondes par rapport à un foin séché en vrac ou en balles carrées de moyenne densité. • Pas d'effet significatif du salage du foin sur les quantités de bactéries et de moisissures.	Roussel <i>et al.</i> , 2006 Roussel <i>et al.</i> , 2005

Tableau 18. Synthèse des leviers jouant sur les flores de l'environnement des animaux.

La nature de la litière, son entretien, le renouvellement d'air de l'aire de couchage influencent les niveaux de flore des laits. Par exemple, il a été montré que la présence de foin dans la litière et le confinement des animaux étaient associés à des niveaux plus élevés en lactobacilles et bactéries propioniques* des laits (Bouton *et al.*, 2005). Par ailleurs, d'après Sévi *et al.*, 2003, l'utilisation de produit asséchant (bentonite) associé à un renouvellement des litières toutes les 4 semaines diminue la charge microbienne des laits (flore totale, coliformes, levures, moisissures, bactéries psychrotrophes). De même, le taux de renouvellement d'air de l'aire de couchage provoque une baisse de la charge microbienne en coliformes et bactéries psychrotrophes des laits (Albenzio *et al.*, 2005).

Des études ont d'autre part mis en évidence des souches* identiques dans l'environnement des animaux (substrats d'alimentation, poussières, bouses) et le lait (Bouton *et al.*, 2007 ; Denis et Desmasures, 2005 ; Kagkli *et al.*, 2007a) laissant à penser qu'il existe bien un flux microbien de l'environnement au lait de traite. Toutefois, la contamination du lait en coliformes, lactobacilles et entérocoques d'origine fécale serait faible (Kagkli *et al.*, 2007b).

Enfin, plusieurs travaux ont émis l'hypothèse d'une implication de l'environnement (litière, alimentation...) comme facteur explicatif des résultats obtenus sur les laits produits à différentes périodes de l'année (Callon *et al.*, 2007 ; Desmasures *et al.*, 1997b ; Michel *et al.*, 2006). Ces données associées à la mise en



Photographie 23.

évidence de souches* identiques dans l'environnement des animaux et le lait renforcent l'hypothèse d'un flux de micro-organismes de l'environnement au lait. Cependant, nous manquons encore d'éléments d'information sur ces réservoirs* et/ou sources de micro-organismes (nature des espèces* en présence à différentes périodes de l'année, hiérarchisation des réservoirs* en fonction de leur importance...) et sur l'enchaînement des pratiques influençant les transferts de ces micro-organismes.

D. Synthèse et perspectives

L'air des étables et de la salle de traite est un réservoir de micro-organismes. Sa composition microbiologique est en partie liée aux divers substrats manipulés pour lesquels la composition en flore elle-même est dépendante des pratiques mises en œuvre (nature et entretien de la litière, mode de récolte et de conditionnement du foin, etc). Ces divers substrats constituent eux aussi des sources de micro-organismes. Si quelques études nous permettent de penser qu'il existe bien un flux de micro-organismes de l'environnement au lait, nous manquons encore d'éléments d'information en particulier sur les pratiques influentes.

Références principales

Bouton Y, Guyot P, Vacheyrou M, Normand AC, Piarroux R, Beuvier E. 2007. Etude des flux bactériens dans les étables de production laitière de Franche-Comté. Exemple des LHF. 15^{ème} colloque du Club des Bactéries Lactiques, 13-15 novembre, Rennes.

Denis C, Desmasures N. 2005. Etude du lien entre la nature de la flore prairiale et les caractéristiques des laits normands. Journées nationales des techniciens laitiers fermiers, Pont l'Evêque, septembre 2005.

Joandel E. 2007. Facteurs de variabilité des flores microbiennes en surface des trayons des vaches laitières. Rapport de stage, ENITAC, 58 pages.

Ménard JL, Roussel P, Masselin-Silvin S, Puthod R, Hetreau T, Forêt A, Houssin B, Aracil C, Le Guenic M. 2004. Contamination bactérienne d'une litière de stabulation libre paillée : effet de la fréquence de paillage et proposition d'une méthode pour son évaluation. In 11^{èmes} Rencontres Recherches Ruminants, Institut de l'Elevage, INRA, Paris, 333-336.

Michel V, Hauwuy A, Chamba JF. 2006. Gestion de la flore microbienne des laits crus par les pratiques des producteurs. In 13^{èmes} Rencontres Recherches Ruminants, Institut de l'Elevage, INRA, Paris, 309-312.

Normand AC, Vacheyrou M, Sudre B, Heederick DJJ, Piarroux R. 2009. Assessment of dust sampling methods for the study of cultivable micro-organisms exposure in stables. Appl. Environ. Microb. 75, 7617-23.

Pétrier M. 2009. Réservoirs en microflores ensemençant les laits crus de chèvre. Rapport de stage, ISARA-Lyon-Institut de l'Elevage, 65 pages.

Les autres références citées dans cette partie sont listées en annexe.

■ Partie 5 : Combinaison de pratiques et composition microbienne des laits

Hélène TORMO

Ecole d'Ingénieurs de PURPAN
75, voie du TOEC - BP 57 611 - 31076 Toulouse Cedex 3

Françoise MONSALLIER

Unité de Recherches Fromagères - INRA
20, côte de Reyne - 15000 Aurillac

Dans les parties précédentes, plusieurs facteurs d'exploitation ont été identifiés comme étant susceptibles de modifier la composition des réservoirs* et donc la flore naturelle du lait, à la fois sur le plan quantitatif et sur le plan de la diversité. Dans ce chapitre, il ne s'agit pas de décrire l'effet des pratiques d'élevage prises une par une mais de se replacer dans une logique d'élevage et de s'intéresser aux « combinaisons de pratiques »* pouvant avoir une influence sur la composition microbienne des laits.

Dans la bibliographie, l'effet des pratiques d'élevage sur la composition du lait en micro-organismes potentiellement pathogènes a été largement décrit. C'est pourquoi, l'objectif de ce chapitre est de décrire plus particulièrement les pratiques d'élevage favorisant des laits riches en diversité microbienne* (groupes* microbiens d'intérêt fromager) tout en garantissant leur qualité sanitaire.

Parmi les pratiques d'élevage étudiées, ce sont les combinaisons de pratiques* liées à l'hygiène qui sont les plus décrites et qui semblent avoir le plus d'influence sur la qualité microbiologique du lait. Ces combinaisons de pratiques* concernent :

- l'hygiène des trayons,
- l'hygiène générale (salle de traite, chèvrerie, trayeur),
- l'hygiène du matériel de traite,
- la gestion des litières (nature, hygiène).

En effet, à notre connaissance, il n'existe que peu d'études publiées portant sur les combinaisons de pratiques autres que celles liées à l'hygiène.

A. Quelles sont les relations entre les caractéristiques microbiennes des laits et les pratiques d'élevage en production laitière caprine ?

En élevages caprins, une étude a été réalisée dans cet objectif. Seuls les laits les plus extrêmes en termes de caractéristiques microbiologiques ont pu être reliés à des pratiques. Ainsi, si les laits les plus chargés sont constitués majoritairement de flores d'intérêt et qu'ils peuvent être caractérisés dans certains cas par une faible présence de staphylocoques à coagulase positive, ils comprennent également une part non négligeable de flores d'altération notamment dans les laits analysés au printemps. Les laits les plus chargés et les plus diversifiés en flores microbiennes sont plutôt associés à l'utilisation de litières à base de refus de foin et à des températures de fin de lavage de la machine à traire inférieures à 40°C ainsi qu'une hygiène autour de la traite jugée « médiocre ».

Dans le cadre de travaux de Tormo *et al.*, 2007a et b, 38 élevages issus des zones AOC Rocamadour et Pélardon ont été suivis (prélèvements de laits, enquêtes sur les pratiques) afin de mesurer la diversité microbienne* des laits produits au cours de deux saisons (printemps 2006 et hiver 2007). Cette diversité microbienne* a été évaluée à différents niveaux de spécificité selon les méthodes utilisées (cf Chapitre 1 / Partie 3-B).



Photographie 24.

- Evaluation des grands groupes* microbiens répertoriés selon leur rôle en technologie fromagère (flores d'intérêts technologique, flores d'altération, flores potentiellement pathogènes) par dénombrement sur milieux semi-sélectifs,

- Evaluation des espèces* microbiennes majoritaires par TTGE et DGGE,

- Identification des bactéries lactiques (espèces* et sous-espèces) par PCR et séquençage.

1. Quels sont les grands groupes microbiens rencontrés ?

Trois à quatre groupes de laits (nombre variable selon la saison) ont été définis. Les figures 27 et 28 représentent certains de ces groupes obtenus pour les deux saisons étudiées. Les groupes se distinguent principalement par :

- le niveau des flores acidifiantes mésophiles (groupes* représentés majoritairement par les bactéries lactiques du genre* *Lactococcus* et *Enterococcus*),

- le niveau des flores potentiellement d'altération : les coliformes et les entérocoques.

Les Staphylocoques à Coagulase Négative (SCN) sont la flore majoritaire des laits de chèvre en termes de niveaux et de présence dans les laits, quelles que soient les classes de laits considérées.

Selon la saison, les niveaux et les équilibres microbiens sont différents (figures 27 et 28). Ainsi en hiver, période qui correspond au début de la lactation, les niveaux de l'ensemble des flores sont en moyenne 100 fois moins importants qu'au printemps. Les coliformes sont à des niveaux particulièrement bas (< 10 UFC*/ml).

2. Quelles sont les espèces microbiennes majoritaires ?

Les espèces* appartenant au groupe* des SCN sont les plus fréquemment rencontrées dans les laits, ce qui confirme les résultats obtenus sur les dénombrements microbiens. Une nouvelle classification des laits selon les espèces* bactériennes présentes montre que des laits dont le nombre et le type d'espèces* bactériennes détectées sont différents varient en fonction des élevages mais également de la saison. Au printemps, les laits de deux classes (A, B) se distinguent des deux autres (C, D) par une plus faible diversité d'espèces* bactériennes.

En hiver, les classes majoritaires (E et F) se distinguent principalement par la présence ou non de *Brevibacterium linens*.

3. Quelles relations entre les caractéristiques microbiennes des laits et les pratiques d'élevage ?

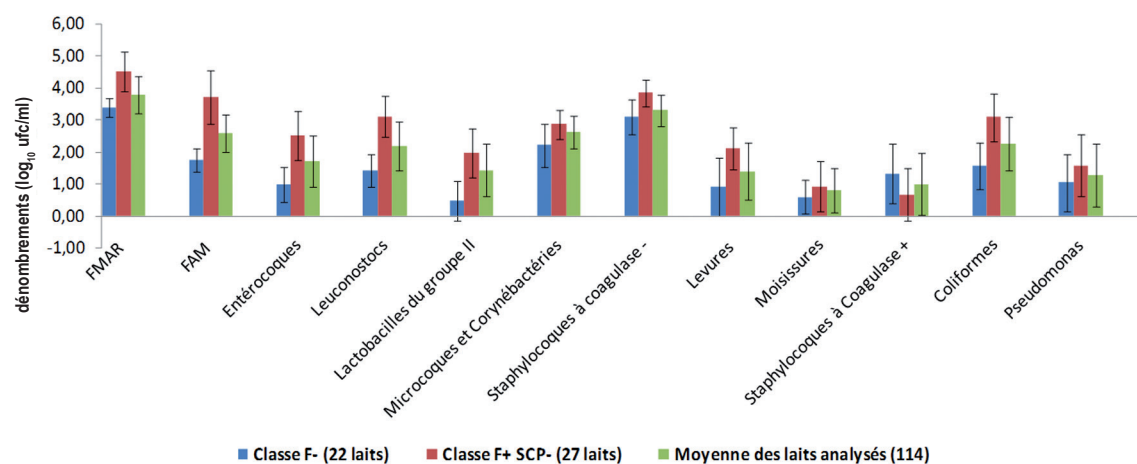
a. Groupes microbiens

Au printemps, des litières à base de refus de foin et renouvelées peu fréquemment d'une part, et des températures finales de nettoyage de la machine à traire (MAT) inférieures à 40°C d'autre part, sont des pratiques associées à des laits plus chargés en microflores et en particulier en FAM (Flore Acidifiante Mésophile), notamment en entérocoques, ainsi qu'en coliformes (tableau 19).

Combinaison de pratiques*	Nombre d'élevages par classe de groupes* microbiens des laits	
	F – (7)	F+SCP – (7)
Litière à base de paille, pas d'additif dans les litières ; température finale de nettoyage de la MAT > 40°C ; quai de traite sans paille ou autres souillures	3	0
Litière à base de paille et de refus de foin avec des fréquences importantes de renouvellement des litières ; balayage du quai de traite	4	0
Litière avec de la paille et du refus de foin avec des fréquences faibles de renouvellement des litières	0	7

Les chiffres représentent le nombre d'exploitations affectées à une classe de groupes* microbiens et une combinaison de pratiques*. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre total d'exploitations par classe de groupes* microbiens des laits.

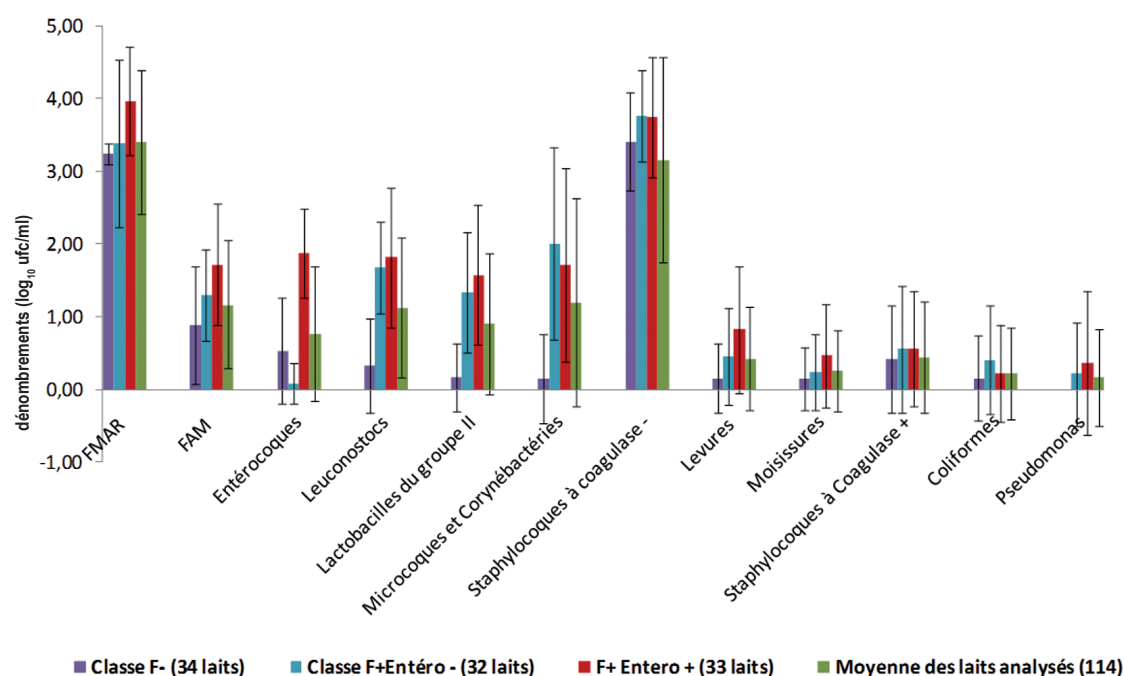
Tableau 19. Affectations des groupes* microbiens des laits aux combinaisons de pratiques pour le printemps.



F- : classe de laits aux niveaux faibles en microflores

F+ SCP- : classe de laits aux niveaux élevés en microflores hormis en staphylocoques à coagulase positive

Figure 27. Niveaux des groupes* microbiens dénombrés en fonction des classes de lait de chèvre et niveaux moyens pour l'ensemble des laits analysés (printemps 2006).



F+ Entéro- : classe de laits aux niveaux élevés en microflores et faibles niveaux d'entérocoques

F+ Entéro+ : classe de laits aux niveaux élevés en microflores et niveaux élevés d'entérocoques

F- : classe de laits aux niveaux faibles en microflores

Figure 28. Niveaux des groupes* microbiens dénombrés en fonction des classes de lait et niveaux moyens pour l'ensemble des laits analysés (hiver 2007).

Ce résultat concernant le lien litière-microflores des laits n'est pas surprenant. Sevi *et al.*, 2003 et Albenzio *et al.*, 2005 ont montré que du fait des aérosols, les micro-organismes des litières pouvaient inoculer le lait par le biais de contaminations aéroportées. D'autre part, Rendos *et al.*, 1975 et Michel *et al.*, 2005a ont montré que la nature des litières pouvait modifier la composition microbienne des litières et des trayons. Aucune étude à notre connaissance ne fait état de la composition microbienne des litières à base de refus

de foin. Cependant, on peut considérer que les litières à base de refus de foin pourraient contenir plus de micro-organismes que des litières à base de paille pour 2 raisons principales : (i) les refus de foin sont souvent plus humides que la paille, ainsi le développement microbien est facilité (ii) le refus de foin utilisé pour les litières peut rester (avant son utilisation dans les litières) plusieurs jours dans l'auge en contact direct avec les chèvres et l'ambiance de la chèvrerie. Il peut donc être plus facilement contaminé que la paille, le

plus souvent stockée dans un endroit séparé du lieu de couchage des animaux.

En hiver, la gestion des litières semble être un élément qui influe peu sur les microflore (tableau 20). Par contre, comme au printemps, les températures finales de nettoyage de la MAT sont en lien avec les classes de laits les plus chargés (température finale de nettoyage de la MAT < 40°C) ou de laits les moins chargés (température finale de nettoyage de la MAT > 40°C).

En complément des pratiques d'hygiène, le fait d'avoir une période d'arrêt de la production de lait combinée à des températures de nettoyage supérieures à 40°C sont deux facteurs qui sont associés à la classe de lait rencontrée en hiver (début de lactation) dont le niveau des groupes* microbiens et notamment des bactéries lactiques est le plus faible (tableau 20). Il est ainsi probable que les biofilms* de la machine à traire soient réduits par l'effet combiné d'un arrêt de production et des conditions de nettoyage de la MAT.

b. Espèces microbiennes

Au printemps, les pratiques d'hygiène autour de la traite semblent être déterminantes pour les profils d'espèces* des laits. Ainsi, les laits des classes A et B (faible diversité d'espèces*) sont associés à des combinaisons de pratiques plutôt hygiénistes (le trayeur se lave systématiquement les mains avant la traite, les MAT sont équipées d'un piège sanitaire lavable, la salle de traite est nettoyée à chaque fin de traite).

La classe D, classe la plus riche en espèces* microbiennes, se différencie par des pratiques d'hygiène médiocre (pas de lavage des mains du trayeur, nettoyage de la MAT insuffisant).

En hiver, en début de lactation, c'est le système



Photographie 25.

d'élevage qui est associé à des profils d'espèces* microbiennes différents. Les troupeaux qui sont en zéro pâturage et dont la majorité produisent du lait toute l'année sont associés à des laits où *B. linens* n'est quasiment pas détectée. A l'opposé, les troupeaux pâturant au printemps et en été et arrêtant la production en hiver sont associés à des laits où *B. linens* est systématiquement détectée.

B. Quelles sont les relations entre les caractéristiques microbiennes des laits et les pratiques d'élevage en production laitière bovine ?

En production laitière bovine, les pratiques d'hygiène jugées « moyennement » voire « peu » sécuritaires, préservant la flore de la mamelle, sont plutôt associées à des laits riches en diversité microbienne* et surtout en flore d'intérêt technologique.

En élevages bovins, une étude a été réalisée dans 67 élevages de Savoie et Haute - Savoie (Verdier-Metz *et al.*, 2009) afin d'étudier la relation entre la diversité microbienne* des laits et les pratiques d'élevage au cours de la saison estivale. La diversité microbienne* des laits a été mesurée par une méthode de biologie moléculaire (SSCP).

Combinaison de pratiques*	Nombre d'élevages par classe de groupes* microbiens des laits		
	F – (15)	F + Entero – (8)	F+ entéro+ (8)
Arrêt de production en hiver, température finale de nettoyage de la MAT > 40°C	8	1	0
Température finale de nettoyage de la MAT ≤ 40°C	4	1	8

Les chiffres représentent le nombre d'exploitations affectées à une classe de groupes* microbiens et une combinaison de pratiques*. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre total d'exploitations par classe de groupes* microbiens des laits.

Tableau 20. Affectations des groupes* microbiens des laits aux combinaisons de pratiques pour l'hiver.



Photographie 26.

1. Quels sont les grands groupes microbiens et les espèces rencontrés ?

Trois groupes de laits se distinguent en fonction de la diversité des espèces* présentes (cf tableau 21).

Les laits du groupe A sont caractérisés par un faible indice de diversité et une plus forte proportion de bactéries d'affinage (corynébactéries et microcoques).

Les indices de diversité des groupes B et C sont du même ordre de grandeur mais statistiquement différents ($P < 0,001$). La composition des laits des groupes B et C est plus diversifiée. Le groupe B présente une plus forte proportion de bactéries à Gram négatif (*Acinetobacter*) et de bactéries lactiques (*Lactococcus lactis*). Les laits du groupe B sont différents de ceux du groupe A de par leur diversité microbienne* et non pas, de par leur niveau de flore totale.

Le groupe C se distingue par un niveau de flore totale plus élevé ($P < 0,001$) et par la présence de staphylocoques et de bactéries lactiques (*Leuconostocs*). Globalement, il y a plus de bactéries d'affinage dans les laits du groupe A et plus de bactéries lactiques dans les laits des groupes B et C.

2. Quelles relations existe-t-il entre les caractéristiques microbiennes des laits et les pratiques d'élevage ?

Les combinaisons de pratiques* (figure 29) employées au sein des exploitations du groupe A se caractérisent par des hauts niveaux d'hygiène sur l'ensemble de l'exploitation (hygiène des trayons, propreté de la machine à traire et de la salle de traite, bâtiment bien aéré et propre) et sont reliées à des laits ayant une faible diversité microbienne*.



Photographie 27.

Pour le groupe B, les pratiques d'hygiène des mamelles sont moins strictes et sont jugées non satisfaisantes pour le lavage de la machine à traire et la propreté générale de la salle de traite.

Les exploitations du groupe C sont caractérisées par les pratiques les moins hygiénistes tant au niveau de l'hygiène des mamelles que de la propreté en général (salle de traite, lavage du matériel de traite). Les laits de ces exploitations se distinguent par un niveau de flore totale et une diversité microbienne* plus élevés que les groupes A et B.

Flores	A	B	C	P
Effectif	20	19	28	
Indice de diversité microbienne* moyen	0,88 ^e	1,09 ^f	1,18 ^g	**
Niveau flore totale (germes/ml)	6 310 ^e	5 012 ^e	15 849 ^f	**

Les nombres représentés par les lettres e, f, g sont différents et classés par ordre croissant ($e < f < g$). Dans la même ligne, les résultats avec des lettres différentes sont donc significativement différents par le test statistique de Newman-Keuls. P = niveau de signification ; ** : $P < 0,001$.

Tableau 21. Caractéristiques des laits produits (Verdier-Metz *et al.*, 2009).

Cette approche de la diversité microbienne* des laits montre que l'importance des soins apportés aux mamelles et du lavage du matériel de traite a une influence d'une part sur le niveau de flore totale et d'autre part sur la nature de la flore. Globalement, les pratiques d'hygiène de la mamelle jugées « moyennement » voire « peu » sécuritaires, préservant la flore de la mamelle (absence de lavage des mamelles ou le lavage collectif, les trayons lavés mais non essuyés, l'absence de post-trempe et d'élimination des premiers jets) sont plutôt associées à des laits riches en diversité microbienne* et surtout en flore d'intérêt technologique (Michel *et al.*, 2001 ; Verdier - Metz *et al.*, 2009). D'autres études menées dans différents troupeaux ont aussi montré que des pratiques d'hygiène de traite moins drastiques notamment l'hygiène des trayons (pas de lavage des trayons, ni de post-trempe) peuvent conduire à des laits avec des niveaux de flores microbiennes plus élevés (Cempirkova, 2006 ; Ruegg *et al.*, 2008 ; D'Amico et Donnelly, 2010).

Plus globalement, une étude menée dans la zone AOC Comté, a montré que la traite réalisée dans une salle de traite en bon état (sol propre, surface lisse facilitant le nettoyage) et dans une ambiance calme (sans manipulation de fourrage, ni raclage, ni curage, ni paillage) en préservant la flore de l'environnement (pas de nettoyage des crèches avant la traite) permet d'obtenir des laits plus riches en lactobacilles et en bactéries propioniques* (Bouton *et al.*, 2005).

C. Synthèse et perspectives

La mise en association des combinaisons de pratiques des producteurs avec la composition microbienne des laits a permis d'identifier un ensemble de pratiques qui semblent déterminantes pour l'obtention de laits non dépourvus de flores. En élevages caprins, ces pratiques concernent la gestion des litières et les températures de nettoyage de la MAT. Contrairement au lait de vache, l'hygiène des trayons n'est pas évoquée car le soin et le nettoyage ou la désinfection des trayons sont peu pratiqués. L'arrêt de production ainsi que la pratique du pâturage (les 2 pratiques étant souvent associées) sont 2 facteurs qui semblent être des éléments importants dans la composition microbiologique des laits. Il est fort probable que ces conduites soient associées à d'autres pratiques plus en lien avec l'hygiène générale.

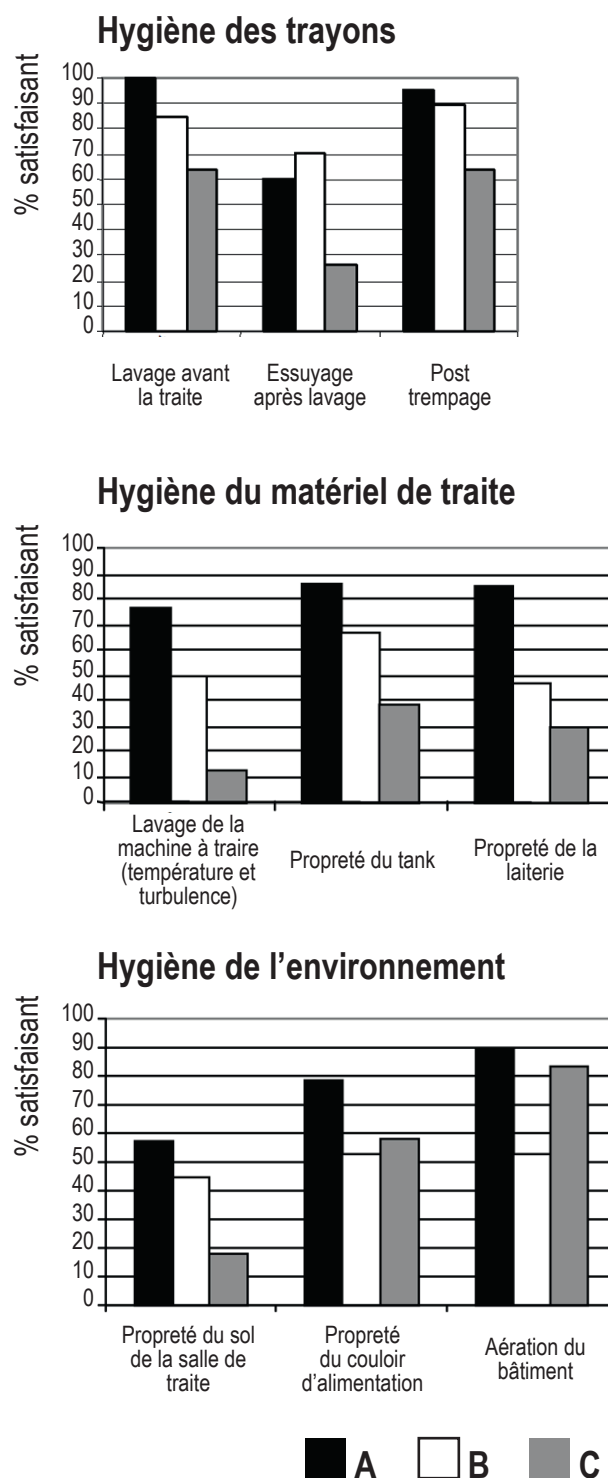


Figure 29. Combinaisons de pratiques* associées aux groupes de laits.

Cependant, ces liens n'ont pas pu être mis en évidence. En élevages bovins, l'hygiène des trayons, le lavage de la machine à traire et la gestion de l'environnement des vaches laitières sont des éléments associés à la composition microbiologique des laits.

Ces résultats, observés dans différents élevages, sont à utiliser avec précaution car ils dépendent de l'état de propreté des mamelles, de l'état sanitaire du

troupeau ainsi que de l'environnement autour de la traite (propreté des litières) et de l'alimentation (l'ensilage et l'enrubannage favorisent la présence de spores butyriques sur des mamelles non lavées).

La diversité des laits produits traduit la diversité des objectifs de production et la diversité des pratiques des éleveurs, ainsi que l'hétérogénéité existant au niveau de la maîtrise des producteurs. Par ailleurs, si on s'intéresse à la structure des exploitations, en production laitière bovine, celle-ci (type de bâtiment, matériel de traite) ne semble pas avoir d'impact sur les niveaux en flore totale et en *Staphylocoques à Coagulase Positive* (SCP) des laits. Il est possible de produire des laits riches en flore totale et à faible niveau de SCP dans tous les types de structure - stabulation avec salle de traite ou étable entravée avec lactoduc (Michel *et al.*, 2001). Il y a également peu de relations entre la taille du troupeau et la composition en micro-organismes du lait. Mais ceci est moins vrai en production laitière caprine où la taille des troupeaux peut varier considérablement conditionnant ainsi les conduites d'élevage et les conditions de production.

Il est difficile de mettre en évidence à grande échelle des pratiques caractéristiques de la production de laits de qualité sanitaire et technologique mais non dépourvus de flores. Il n'y a pas de recette unique pour produire un lait riche en flores d'intérêt technologique et pauvre en flores d'altération et pathogènes. Se pose alors la question de la prise en compte de cette complexité dans le conseil en matière de qualité du lait. Ce type de conseil doit se raisonner au cas par cas et demande à être adapté pour chaque exploitation voire au sein même de l'exploitation selon les événements (météo, problèmes sanitaires sur les animaux).

D'autres études sont en cours ou en projet pour apporter des connaissances complémentaires sur les leviers d'actions dans les élevages qui permettraient d'enrichir les laits en flore d'intérêt tout en garantissant leur qualité sanitaire et technologique.

Références principales

Bouton Y, Tessier L, Guyot P, Beuvier E. 2005. Relations entre les pratiques des producteurs et les niveaux de populations microbiennes des laits à Comté. In 12^{èmes} Rencontres Recherches Ruminants, Institut de l'Élevage, INRA, Paris, 403.

Michel V, Hauwuy A, Chamba JF. 2001. La flore microbienne des laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. Lait 81, 5, 575-592.

Verdier - Metz I, Michel V, Delbès C, Montel MC. 2009. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk ? Food Microbiol. 2, 305-31.

Tormo H, Ali Haimoud - Lekhal D, Lopez C, Ogier JC, Roques C. 2007a. Variabilité des flores microbiennes du lait cru selon les conditions d'élevage et de production du lait. INRA, Club des bactéries lactiques, 13-15 novembre, Rennes.

Tormo H, Ali Haimoud - Lekhal D, Lopez C. 2007b. Flore microbienne des laits crus de chèvre destinés à la transformation fromagère et pratiques des producteurs. In 14^{èmes} Rencontres Recherches Ruminants, Institut de l'Élevage, INRA, Paris, 87-90.

Les autres références citées dans cette partie sont listées en annexe.

■ Conclusion

Pierre PARGUEL

Institut de l'Elevage

Chambre Régionale d'Agriculture de Franche-Comté

Valparc-Espace Valentin Est, 25048 Besançon Cedex

Quels que soient le nombre et la qualité des travaux réalisés et synthétisés dans cet ouvrage, il reste beaucoup de choses à découvrir sur la thématique de la microflore native des laits crus. Pourtant, il convient d'agir dans les élevages, les fromageries et les filières pour entretenir le maintien d'une diversité des goûts permise par les flores du lait cru et limiter les comportements sécuritaires excessifs : c'est pourquoi la mise à disposition des résultats obtenus jusqu'à présent est importante.

Les travaux synthétisés ici montrent que la microbiologie du lait ne peut se réduire à une approche germe par germe (comme cela est souvent encore inscrit dans nos habitudes). L'approche systémique fait son chemin. De plus en plus, l'idée « d'équilibres microbiens » s'impose dans le vocabulaire et dans les raisonnements. La recherche nous confirme que ces équilibres sont en lien avec le milieu ; c'est la notion d'écosystème*. Mais les interactions en jeu ne sont pas toujours très stables et loin d'être complètement explorées.

Par ailleurs, si les connaissances fondamentales avancent rapidement, un travail important reste à faire pour les transformer en référentiel technique pour les éleveurs et les fromagers. Ainsi, les résultats de la recherche nous renseignent de façon de plus en plus précise sur la composition microbienne des écosystèmes* (une série de noms en latin), mais les informations permettant de mesurer et de maîtriser la « bonne » diversité dans une situation donnée restent à établir.

Nous retiendrons aussi que l'analyse des flores dominantes reste dans la plupart des cas insuffisante et, en particulier dans la transformation du lait cru, les flores « secondaires » ont un rôle déterminant sur les caractéristiques originales des produits.

Cet ouvrage rend compte des références scientifiques récentes (et nombreuses) sur la microbiologie du lait et permet d'argumenter et de débattre sur l'importance de valoriser les équilibres microbiens naturels du lait.

Il s'écrit à une époque où les présentations médiatiques de la biodiversité* posent cette notion comme une valeur en tant que telle. Ainsi des émissions de télévision (entre autres) alertent régulièrement sur la disparition d'espèces* végétales et animales sans justifier du rôle des organismes ainsi perdus et en affirmant ou laissant entendre que ces disparitions sont, au moins en partie, le fait de l'activité humaine. Il s'instaure ainsi une responsabilité individuelle et collective pour le maintien d'une diversité, considéré alors comme une valeur importante pour les générations futures.

L'époque actuelle est aussi marquée par un souci de sécurité sanitaire. Sur cet aspect, l'approche par le « germe à combattre » évolue vers une mesure du risque acceptable pour le consommateur. Dans cette maîtrise, la théorie des barrières fait son chemin. Il est ainsi de plus en plus couramment admis que la sécurité résulte de la maîtrise d'une suite d'éléments permettant la réduction d'un risque (salage, séchage, acidification...), ce qui diffère d'une approche consistant à imposer dans le processus une étape d'assainissement, le plus souvent par voie thermique.

Dans l'objectif d'aider les éleveurs et les fromagers à gérer des écosystèmes* microbiens sûrs, favorables à l'expression de qualités particulières dans le produit et portant une valeur patrimoniale, nos approches techniques classiques sont à adapter.

Aux confins d'une expression médiatique de l'éthique de la biodiversité*, d'une réglementation à vocation sécuritaire pour la santé, d'une évolution nécessaire entre le corps technique et les opérateurs de la filière laitière, cet ouvrage scientifique se veut un élément pour la réflexion et l'action.

Il est peut-être la première formulation collective d'une thématique nouvelle, et nous l'espérons enthousiasmante, pour les chercheurs, les techniciens, les éleveurs et les fromagers.

■ Annexes

Annexe 1

Autres références bibliographiques citées

- Adams MR, Hall CJ. 1988. Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int. J. Food Sci. Tech.* 23, 287-292.
- Agabriel C, Coulon JB, Journal C, Sibra C, Albouy H. 1999. Effect of milk composition and herd management conditions on the characteristics of farmhouse saint-nectaire cheese. *Lait* 79, 3, 291-302.
- Ahamad N, Marth EH. 1989. Behaviour of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21 and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric or lactic acid. *J. Food Protect.* 52, 688-695.
- Albenzio M, Santillo A, Caroprese M, Marino R, Centoducati P, Sevi A. 2005. Effect of different ventilation regimes on ewes' milk and Canestrato Pugliese cheese quality in summer. *J. Dairy Res.* 72, 447-455.
- Albuquerque CD. 2007. Connaissance des flores microbiennes environnementales pouvant potentiellement ensemer le lait cru de chèvre. Rapport de stage, EI-Purpan, 56 pages.
- Arnal A. 1999. Influence des pratiques d'élevage et des conditions de production sur la flore utile du lait. Rapport de stage, ENITAC, 80 pages.
- Arque's JL, Rodriguez E, Munez M, Medina M. 2004. Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 95, 2, 225-229.
- Barral J, Doutart E, Guezenoc C, Karsenti C, Laithier C. 2008. Influence de la pratique de la prématuration sur la qualité du lait, l'acidification et la qualité des fromages de chèvre de type lactique. Rapport technique interne, Actilait, 60 pages.
- Barral J, Fatet E. 2010. Maitrise des flores de surface en fabrication de type caillé doux : application au Banon AOC, Rapport technique, Actilait et MRE, 14 pages.
- Barral J, Tormo H, Fabre E, Le Mens P. 2003. Les facteurs de production et qualité microbiologique des laits destinés à la fabrication du Banon. Centre Fromager de Carmejane, 41 pages.
- Benthin S, Villadsen J. 1995. Different inhibition of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* by D- and L-lactic acid : effects on lag phase, growth rate and cell yield. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 647-654.
- Beuvier E, Dufrene F, Duboz G, Faurie F, Lefier D, Duployer MH, Bertrand X. 2008. Lactic and propionic acid bacteria survive gastrointestinal transit of healthy volunteers treated with amoxicillin-clavulanic acid consuming raw milk cheese. 5th Symposium on Cheese ripening, 9-13 march, Bern (affiche).
- Bieli C, Eder W, Frei R, Braun-Fahrlander C, Klimecki W, Waser M, Riedler J, von Mutius E, Scheynius A, Pershagen G, Doekes G, Lauener R, Martinez FD. 2007. A polymorphism in CD14 modifies the effect of farm milk consumption on allergic diseases and CD14 gene expression. *J. Allerg. Clin. Immunol.* 120, 1308-1315.
- Bonetta S, Bonetta S, Carraro E, Coisson JD, Travaglia F, Arlorio M. 2008. Detection of biogenic amine producer bacteria in a typical Italian goat cheese. *J. Food Prot.* 71, 205-209.
- Bonetti B. 2000. Caractérisation du potentiel fermentaire et du potentiel goût des laits du Saint-Marcellin ; relation avec les conditions de production. Synthèse d'étude, PEP bovins lait Rhône-Alpes, 5 pages.
- Bora N, Vancanneyt M, Gelsomino R, Swings J, Brennan M, Cogan TM, Larpin S, Desmasures N, Lechner FE, Kroppenstedt RM, Ward AC, Goodfellow M. 2008. *Mycetocola reblochoni* sp nov., isolated from the surface microbial flora of Reblochon cheese. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2687-2693.

- Bouton Y, Buchin S, Duboz G, Pochet S, Beuvier E. 2009. Effect of mesophilic lactobacilli and enterococci adjunct cultures on the final characteristics of a microfiltered milk Swiss-type cheese. *Food Microbiol.* 26, 183-191.
- Bouton Y, Guyot P, Vacheyrou M, Normand A-C, Piarroux R, Beuvier E. 2007. Etude des flux bactériens dans les étables de production laitière de Franche-Comté. Exemple des LHF. 15^{ème} colloque du Club des Bactéries Lactiques, 13-15 novembre, Rennes.
- Bouton Y, Guyot P, Beuvier E. 2006. Diversité génomique et temporelle des flores lactobacilles, bactéries propioniques et entérocoques de lait cru. Colloque SFM, 7 novembre, Paris.
- Bouton Y, Tessier L, Guyot P, Beuvier E. 2005. Relations entre les pratiques des producteurs et les niveaux de populations microbiennes des laits à Comté. In 12^{èmes} Rencontres Recherches Ruminants, Institut de l'Elevage, INRA, Paris, 403.
- Bouton Y, Guyot P, Berthier F, Beuvier E. 2000. Investigation of bacterial community development from raw milk and whey starter to curd and mature Comté cheese. FIL symposium, 12-16 March, Banff, Canada.
- Bouton Y, Guyot P, Dasen A. 1995b. Interaction of starter x milk on the characteristics of Comté cheese. 2nd plenary meeting of AIR programme, Vitoria (Spain), 30 november-2 december, 123-128.
- Bowers RM, Lauber CL, Wiedinmyer C, Hamady M, Hallar AG, Fall R, Knight R, Fierer N. 2009. Characterization of Airborne Microbial Communities at a High-Elevation Site and Their Potential To Act as Atmospheric Ice Nuclei. *Appl. Environ. Microb.* 75, 5121 - 5130.
- Briandet R, Bellon Fontaine MN. 2000. Le biofilm, une stratégie de survie pour les microbes. Salles Propres, 9.
- Calderon-Miranda ML, Barbosa-Canovas GV, Swanson BG. 1999. Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin. *Int. J. Food Microbiol.* 51, 1, 19-30.
- Callon C, Saubusse M, Didienne R, Buchin S, Montel MC. 2010. Simplification of a complex microbial anti-listerial consortium to evaluate the contribution of its flora in cheese. *Int. J. Food Microbiol.* (soumis).
- Callon C, Duthoit F, Delbes C, Ferrand M, Lefrileux Y, De Crémoux R, Montel MC. 2007. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: Molecular approaches. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 547-560.
- Carpentier B, Cerf O. 1993. Biofilms and industrial hygiene. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 459-511.
- Cempirkova R. 2006. Factors negatively influencing microbial contamination of milk. *Agricultura tropica et subtropica* 39, 4, 220-226.
- Champonnois L, Bretin M, Pochet S, Berthier F. 2009. Interactions between bacteria and cheese matrix regarding amino acid accumulation during manufacturing. 4th IDF Dairy Science and Technology, april 20-24, 2009.
- Chatelin YM, Richard J. 1983. Comparaison, dans des conditions courantes, de l'efficacité de quatre méthodes de nettoyage des machines à traire. *Lait*, 63, 87-101.
- Chatelin YM, Richard J. 1981. Etudes de quelques cas de contaminations microbiennes importantes du lait à la ferme. *Lait* 61, 80-94.
- CIGC, 2007. Etude PEDIFLO : Lactofermentation et pratiques de traite - Assemblée Générale du CTC-Censeau, mars, communication orale.
- Corbet V. 2008. Simplification du nettoyage de la machine à traire. Recueil de diapositives. 25-27 novembre, Derval.
- Corroler D, Mangin I, Desmasures N, Guéguen M. 1998. An ecological study of wild lactococci isolated from raw milk in the RDO Camembert cheese area. *Appl. Environ. Microb.* 64, 4729-4735.
- Coton M, Delbès C, Irlinger F, Desmasures N, Lefleche A, Montel MC, Coton E. 2009. Biodiversity and characterization of Gram negative isolates associated with French cheeses. FEMS 2009, 3rd congress of European microbiologists, 28 juin-2 juillet, Gothenburg, Suède.
- CTFC, 2007a. Évolution de la lactofermentation pendant la traite. Étude interne, communication orale.

CTFC, 2007b. Incidence des pratiques d'hygiène sur la lactofermentation. Étude interne, communication orale.

D'Amico DJ, Donnelly CW. 2010. Microbial quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont : effect of farm characteristics and practices. *J. Dairy Sci.* 93, 137-147.

Dalmasso M. 2009. Etude de l'influence du repiquage sur la complexité des lactosérums levains. Application aux modèles fromagers de type pâte pressée non cuite et de type mixte à dominante lactique. Thèse de Doctorat de Biologie Appliquée, Université de Savoie, 219 pages.

David V, Huet J. 2001. Les biofilms en milieu laitier : Comment se forment-ils ? Peut-on orienter leur population ? Synthèse bibliographique. Compte rendu Institut de l'Elevage 150231016, 67 pages.

Debarry J, Garn H, Hanuszkiewicz A, Dickgreber N, Blumer N, von Mutius E, Bufer A, Gattermann S, Renz H, Holst O, Heine H. 2007. *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J. Allerg. Clin. Immunol.* 119, 1514-1521.

Deetae P, Bonnarme P, Spinnler HE, Helinck S. 2009. Growth and aroma contribution of *Microbacterium foliorum*, *Proteus vulgaris* and *Psychrobacter sp* during ripening in a cheese model medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 169-177.

Delbès-Paus C, Dorchies G, Chaabna Z, Callon C, Montel MC. 2010. Contribution of hydrogen peroxide to the inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Lactococcus garvieae* in interaction with raw milk microbial community. *Food Microbiol.* 27, 924-932.

Desmaures N, Bazin F, Guéguen M. 1997a. Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *J. Appl. Microbiol.* 83, 53-58.

Desmaures N, Opportune W, Guéguen M. 1997b. *Lactococcus spp.*, yeasts and *Pseudomonas spp.* On teats and udders of milking cows as potential sources of milk contamination. *Int. Dairy J.* 7, 643-646.

Devoyod JJ, Millet L, Rousseau M. 1987. Rôle de la vaisselle laitière dans les fabrications fromagères traditionnelles- cas des fromages à pâtes pressées

demi dures. *In Histoire et géographie des fromages*, Université de Caen, 53-65.

Dieuleveux V, Guéguen M. 1998. Antimicrobial effects of D-3-phenyllactic acid on *Listeria monocytogenes* in TSB-YE medium, milk, and cheese. *J. Food Protect.* 61, 1281-1285.

Dubernet S, Desmaures N, Guéguen M. 2008. Diversity and dynamics of lactobacilli populations during ripening of RDO Camembert cheese. *Can. J. Microbiol.* 54, 218-228.

Dubois G, Beaumier H, Charbonneau R. 1979. Inhibition of bacteria isolated from ground meat by *Streptococcaceae* and *Lactobacillaceae*. *J. Food Sci.* 40, 903-907.

Ekinci FY, Barefoot SF. 2006. Fed-batch enhancement of jensenin G, a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii* (jensenii) P126. *Food Microbiol.* 23, 325-30.

Eklund T. 1984. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in bacterial membrane vesicles. *Int. J. Food Microbiol.* 1, 179-185.

El-Gazzar FE, Marth EH. 1992. Salmonellae, salmonellosis and dairy foods: a review. *J. Dairy Sci.* 75, 2327-2343.

Eppert I, Valdes-Stauber N, Gotz H, Busse M, Scherer S. 1997. Growth reduction of *Listeria spp.* caused by Undefined Industrial Red Smear Cheese Cultures and Bacteriocin-Producing *Brevibacterium linens* as Evaluated In Situ on Soft Cheese. *Appl. Environ. Microb.* 63, 12, 4812-4817.

Feurer C, Irlinger F, Spinnler HE, Glaser P, Vallaeys T. 2004a. Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *J. Appl. Microbiol.* 97, 3, 546-556.

Feutry F, Oneca M, Berthier F, Torre P. 2011a. Biodiversity and dynamics of lactic acid bacteria strains in PDO Ossau-Iraty cheese made from raw ewe's milk with different starters. En préparation.

Feutry F, Arana I, Garcia S, Casalta E, Desmaures N, Torre P. 2011b. *Lactococcus lactis* strains isolated from ewe's raw milks from the AOP Ossau-Iraty

cheese area. : ecological, genotypical and technological aspects. En préparation.

Firmesse O, Alvaro E, Mogenet A, Bresson JL, Lemée R, Le Ruyet P, Bonhomme C, Lambert C, Andrieux C, Doré J, Corthier G, Furet JP, Rigottier-Gois L. 2008. Fate and effects of Camembert cheese micro-organisms in the human colonic microbiota of healthy volunteers after regular Camembert consumption. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 176-181.

Gehring U, Spithoven J, Schmid S, Bitter S, Braun-Fahrlander C, Dalphin JC, Hyvarinen A, Pekkanen J, Riedler J, Weiland SK, Buchele G, von Mutius E, Vuitton DA, Brunekreef B. 2008. Endotoxin levels in cow's milk samples from farming and non-farming families - The PASTURE study. *Environ. Int.* 34, 1132-1136.

Goncalves A. 2008. Etudier les staphylocoques à coagulase négative et les entérocoques, flores dominantes des laits crus de chèvre et de brebis en région PACA. Rapport de stage, IUT Digne les Bains, 52 pages.

Gonzalez J, Mas M, Tabla R, Moriche J, Roa I, Rebollo JE, Cáceres P. 2003. Autochthonous starter effect on the microbiological, physicochemical and sensorial characteristics of Ibora goat's milk cheeses. *Lait* 83, 193-202.

Grappin R, Beuvier E, Bouton Y, Pochet S. 1999. Advances in the biochemistry and microbiology of Swiss-type cheeses. *Lait* 79, 3-22.

Gueguen M, Desmasures N, Corrolier D. 1997. Contribution à l'étude de l'impact des flores sauvages dans la fabrication des camemberts AOC. *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France* 83, 41-58.

Guillier L, Stahl V, Hezard B, Notz E, Briandet R. 2008. Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 51-57.

Holzappel WH, Geisen R, Schillinger U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 343-362.

Hurst A. 1978. Nisin in Streptococci. Skinner TA and Quesnel LB Academic Press Inc., London, 297-314.

Imran M, Vernoux JP, Desmasures N. 2010b. Role of microbial growth dynamics in antilisterial activity of model microbial communities originating from cheese. 110th General Meeting of the American Society for Microbiology, 23-27 mai, San Diego, USA.

Institut de l'Elevage, 1993. Guide national des bonnes pratiques en production fromagère fermière. 141 pages.

Irlinger F, Mounier J. 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Curr. Opin. Biotech.* 20, 142-148.

Irlinger F. 2000. Caractérisation phénotypique et moléculaire de la diversité des bactéries d'intérêt technologique, de la surface des fromages. Thèse de Doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon, 172 pages.

Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. 2005. Modern food microbiology, 7th edition, Springer, New York, USA.

Kagkli DM, Vancanneyt M, Hill C, Vandamme P, Cogan TM. 2007a. *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 243-251.

Kagkli DM, Vancanneyt M, Vandamme P, Hill C, Cogan TM. 2007b. Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces. *J. Applied Microbiol.* 103, 1393-1405.

Krause DO, Smith WJM, Conlan LL, Gough JM, Williamson MA, McSweeney CS. 2003. Diet influences the ecology of lactic acid bacteria and *Escherichia coli* along the digestive tract of cattle: neural networks and 16S^{*} rDNA. *Microbiology* 149, 57-65.

Laithier C, Chatelin YM, Tormo H, Lefrileux Y. 2004a. Les biofilms dans les exploitations fabriquant des fromages de chèvre à coagulation lactique : localisation, nature et rôle sur la qualité des produits. *In* 10^{èmes} Rencontres Recherches Ruminants, Institut de l'Elevage, INRA, Paris, 112.

Laithier C, Talon R. 2004b. « Biofilms present in farms producing goat cheese and development

of targeted disinfection procedures». Actes du deuxième colloque Food Factory, 7 octobre, Laval.

Larpin-Laborde S. 2006a. *Geotrichum candidum* et autres levures de surface du Livarot : inventaire, dynamique et potentialités allélopathiques. Thèse de Doctorat, Université de Caen Basse-Normandie, 215 pages.

Larpin S, Mondoloni C, Goerges S, Vernoux JP, Gueguen N, Desmasures N. 2006b. FEMS Yeast Res. 6, 8, 1243-1253.

Larruhat A. 2009. La pratique de prématuration entraîne-t-elle des effets différents sur l'acidification et la qualité des fromages de chèvre à pâte lactique, selon le profil microbiologique du lait ? Rapport de stage, INP-ENSAT, Actilait, 60 pages.

Lay C, Sutren M, Lepercq P, Juste C, Rigottier-Gois L, Lhoste E, Lemée R, Le Ruyet P, Doré J, Andrieux C. 2004. Influence of Camembert consumption on the composition and metabolism of intestinal microbiota : a study in human microbiota-associated rats. Brit. J. Nut. 92, 429-438.

Leclercq - Perlat MN, Corrieu G, Spinnler HE. 2010. The type of cheese curds determined the colouring capacity of *Brevibacterium* and *Arthrobacter* species. J. Dairy Res. 77, 287-294.

Leclercq - Perlat MN, Oumer A, Bergère JL, Spinnler HE, Corrieu G. 2009. Growth of *Debaryomyces hansenii* on a bacterial surface ripened cheese. J. Dairy Res. 66, 271-281.

Leclercq - Perlat MN, Corrieu G, Spinnler HE. 2004. The color of *Brevibacterium linens* depends on the yeast used for cheese deacidification. J. Dairy Res. 77, 1536-1544.

Leistner L. 1985. Hurdle technology applied to meat products of the shelf stable product and intermediatemoisture food types. In properties of water in foods. Coord : Simatos D, Multon JL, Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht, 209-329.

Maisnier-Patin S, Deschamps N, Tatini SR, Richard J. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. Lait 72, 249-263.

Mansour S, Bailly J, Landaud S, Monnet C, Sarthou AS, Cocaïgn-Bousquet M, Leroy S, Irlinger

F, Bonnarne P. 2009. Investigation of Associations of *Yarrowia lipolytica*, *Staphylococcus xylosus* and *Lactococcus lactis* in Culture as a First Step in Microbial Interaction Analysis. Appl. Env. Microbiol. 75, 20, 6422-6430.

Maoz A, Mayr R, Scherer S. 2003. Temporal stability and biodiversity of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia. Appl. Env. Microb. 69, 4012-4018.

Mariani C, Oulahal N, Briandet R, Chamba JF, Notz E. 2008a. Biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening: description and inhibition of *Listeria monocytogenes*. 5th IDF Symposium on Cheese Ripening, March 9-13, Bern, Switzerland.

Mariani C, Notz E, Engelman S, Oulahal N, Briandet R, Chamba JF. 2008b. Influence of the traditional cleaning on microbial ecology and anti-*Listeria* activity of different dairy wooden shelves. Presented at the 4th International Conference on the Food Factory of the Future, June 4th and 5th, Laval, France.

Martin N, Berger C, Spinnler HE. 2002. Sensory and instrumental flavor analyses of cheese curd cocultured with selected yeast and bacteria. J. Sens. Stud. 17, 1-17.

Michel V, Hauwuy A, Chamba JF, 2006. Gestion de la flore microbienne des laits crus par les pratiques des producteurs. In 13^{èmes} Rencontres Recherches Ruminants. Institut de l'Elevage, INRA, Paris, 309-312.

Michel V, Hauwuy A, Montel MC, Coulon JB, Chamba JF. 2005a. Pratiques d'élevage et composition microbienne des laits crus. Symposium International Territoires et Enjeux du développement régional, 9-11 mars, Lyon.

Michel V, Barral J, Laithier C, Parguel P. 2005b. Fiche « Peut-on agir sur la flore microbienne du lait cru ? » élaborée dans le cadre du groupe inter-flores.

Michel V, Hauwuy A, Chamba JF. 2001. La flore microbienne des laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. Lait 81, 575 - 592.

Millet L, Saubusse M, Didienne R, Tessier L, Montel MC. 2006. Control of *Listeria monocytogenes*

- in raw-milk cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 1, 105-114
- Molimard P, Lesschaeve I, Issanchou S, Brousse M, Spinnler HE. 1997. Effect of the association of surface flora on the sensory properties of mould-ripened cheese. *Lait* 77, 181-187.
- Morales P, Fernandez-Garcia E, Nunez M. 2005. Volatile compounds produced in cheese by pseudomonas strains of dairy origin belonging to six different species. *J. Agr. Food Chem.* 53, 6835-43.
- Morales P, Feliu I, Fernández-García E, Nunez M. 2004. Volatile compounds produced in cheese by *Enterobacteriaceae* strains of dairy origin. *J. Food Prot.* 67, 567-573.
- Morot-Bizot S. 2006. Les staphylocoques à coagulase négative dans l'écosystème des salaisons. Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand), 141 pages.
- Mounier J, Monnet C, Jacques N, Antoinette A, Irlinger F. 2009. Assessment of the microbial diversity at the surface of Livarot cheese using culture-dependent and independent approaches. *Int. J. Food Microbiol.* 133, 1, 31-37.
- Normand AC, Vacheyrou M, Guyot P, Bouton Y, Dubief T, Billot M, Sudre B, Cussenot R, Piarroux R. 2007. Etude des flux bactériens dans les étables de production laitière de Franche-Comté. Intérêts dans les domaines de la production fromagère. XIII^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, Université de Franche-Comté, Université de Bourgogne, 14-15 juin, Dijon.
- Oh DH, Marshall DL. 1993. Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 20, 239-246.
- Partidario A. 1999. Comparison of free fatty acids, volatile compounds and sensory characteristics of Serra da Estrela cheese at different ripening-stages. *Milchwissenschaft* 54, 381-385.
- Perkin MR. 2007. Unpasteurized milk: health or hazard? *Allergy* 37, 627-630.
- Perkin MR, Strachan DP. 2006. Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse association with childhood allergy? *J. Allerg. Clin. Immunol.* 117, 1374-1381.
- Pfefferle P, Buchele G, Blumer N, Roponen M, Ege MJ, Krauss-Etschmann S, Genuneit J, Hyvarinen A, Hirvonen MR, Lauener R, Pekkanen J, Riedler J, Dalphin JC, Brunekeef B, Braun-Fahrlander C, von Mutius E, Renz H. 2010. Cord blood cytokines are modulated by maternal farming activities and consumption of farm dairy products during pregnancy: The PASTURE Study. *J. Allerg. Clin. Immunol.* 125, 108-115.
- Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, Lejeune P. 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependant regulation of *ogon* gene expression in *Escherichia Coli*. *J. Bacteriol.* 181, 5993-6002.
- Reboux G, Reiman M, Roussel S, Taattola K, Millon L, Dalphin JC, Piarroux R. 2006. Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour on finnish and french farms. *Ann. Agr. Env. Med.* 13, 267-273.
- Reboux G, Piarroux R, Mauny F, Madroszyk A, Million L, Bardonnet K, Dalphin JC. 2001. Role of moulds in farmer's lung disease in Eastern France. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 163, 1534-1539.
- Rendos JJ, Eberhart RJ, Kesler EM. 1975. Microbial population of teat ends of dairy cows and bedding materials. *J. Dairy Sci.* 58, 1492-1500.
- Retureau E, Callon C, Didienne R, Montel MC. 2010. Is microbial diversity an asset for inhibiting *Listeria monocytogenes* in raw milk cheeses? *Dairy Sci. Technol.* 90, 375-398.
- Rodolakis A. 2009. Q Fever in dairy animals. *Ann. NY Acad. Sci.* 1166, 90-93.
- Roussel S, Reboux G, Millon L, Dalphin JC, Piarroux R. 2006. Pneumopathies d'hypersensibilité et exposition aux moisissures et actinomycètes de l'environnement. *J. Mycol. Med.* 16, 239-247.
- Roussel S, Reboux G, Dalphin JC, Laplante JJ, Piarroux R. 2005. Evaluation of salting as a hay preservative against farmer's lung disease agents. *Ann. Agr. Env. Med.* 12, 217-221.
- Ruegg PL, Reineman D, Hohmann K. 2008. The effect of milking management on microbial quality. XII Curso Novos Enfoques Na Producao e reproducao de Bovinos, March 6-8, Uberlandia Brazil.

Saubusse M, Millet L, Delbès C, Callon C, Montel MC. 2007. Application of Single Strand Conformation Polymorphism – PCR method to differentiate the cheese bacterial communities inhibiting *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 116, 126-135.

Sevi A, Albenzio M, Muscio A, Casamassima D, Centoducati P. 2003. Effects of litter management on airborne particulates in sheep houses and on the yield and quality of ewe milk. Livestock Production Science 81, 1-9.

Stahl V, Hezard B, Lintz A, Notz E, Briandet R, Guillier L. 2008. Analysis of wooden shelves surface microflora during the ripening of soft and smear cheeses with respect to their anti-*Listeria monocytogenes* potential. Presented at the 4th International Conference on the Food Factory of the Future, June 4th and 5th, Laval, France.

Stanton C, Gardiner G, Lynch PB, Collins JK, Fitzgerald G, Ross RP. 1998. Probiotic cheese. Int. Dairy J. 8, 491-496.

Sudre B, Vacheyrou M, Braun-Fahrlander C, Normand AC, Waser M, Reboux G, Ruffaldi P, Von Mutius E, Piarroux R and the PASTURE study group. 2009. High levels of grass pollen inside European dairy farms : a role for the allergy-protective effects of environment ? Allergy 64, 1068-73.

The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. 2010. The EFSA Journal, 1496, 1-288.

Tormo H, Bonnes A, Pétrier M, Morge S, Doutart E, Laithier C. 2009. Importance des flores microbiennes contenues dans l'air de la salle de traite pouvant avoir un impact sur la qualité des laits crus de chèvre. Colloque MicroAERO, 6-8 octobre, Narbonne.

Tormo H, Ali Haimoud - Lekhal D, Lopez C. 2007b. Flore microbienne des laits crus de chèvre destinés à la transformation fromagère et pratiques des producteurs. In 14^{èmes} Rencontres Recherches Ruminants, Institut de l'Elevage, INRA, Paris, 87-90.

Verdier-Metz I, Martin B, Hulin S, Ferlay A, Pradel P, Coulon JB. 2002. Combined influence of cow diet and pasteurisation of the milk on sensory properties of

French PDO Cantal cheese. In 26th IDF World Dairy Congress Congrilaite, CIDIL, CD, 24-28 September, Paris.

Waddell LA, Rajić A, Sargeant J, Harris J, Amezcua R, Downey L, Read S, McEwen SA. 2008. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*: a systematic review. Canadian Journal of Public Health 99, 145-55.

Waser M, Michels KB, Bieli C, Floistrup H, Pershagen G, von Mutius E, Ege M, Riedler J, Schram-Bijkerk D, Brunekreef B, van Hage M, Lauener R, Braun-Fahrlander C. 2007. Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. Clin. Exp. Allerg. 37, 661-670.

Wickens K, Lane JM, Fitzharris P, Siebers R, Riley G, Douwes J, Smith T, Crane J. 2002. Farm residence and exposures and the risk of allergic diseases in New Zealand children. Allergy 57, 1171-1179.

Zdanowicz M, Shelford JA, Tucker CB, Weary DM, von Keyserlingk MAG. 2004. Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either sand or sawdust. J. Dairy Sci. 87, 1694-1701.

Annexe 2

Liste des abréviations utilisées

ADN : Acide DésoxyriboNucléique,
AloA : Agar Listeria selon Ottaviani et Agosti,
AOC : Appellation d'Origine Contrôlée,
AOP : Appellation d'Origine Protégée,
ARN : Acide RiboNucléique,
BHI : Broth Heart Infusion,
CRB : Centre de Ressources Biologiques,
COFIT : Comité Français Interprofessionnel pour les techniques de production du lait,
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis,
EntC : Entérocoques,
FAM : Flore Acidifiante Mésophile,
FISH : Fluorescent In Situ Hybridization,
FMAR ou **GT** : Flore Mésophile Aérobie Revivifiable ou Germes Totaux,
ILA : Indol Lactic Acid,
LPS : Lipo Poly Saccharide,
MAT : Machine à Traire,
MLVA : Multi Locus Variable Analysis,
OGA : Oxytetracyclin Glucose Agar,
OTU : Operational Taxonomic Unit,
PCA : Plate Count Agar,
PCR : Polymerase Chain Reaction,
PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis,
PLA : D3- Phenyl Lactic Acid,
RAPD: Random Amplified Polymorphism DNA,
Rep-PCR: Repetitive extrapalindromic – Polymerase Chain Reaction,
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism,
RMT : Réseau Mixte Technologique,
SC+ : Staphylocoques à Coagulase positive,
SCN : Staphylocoques à Coagulase Négative,
SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique,
SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism,
TGGE : Temperature Gradient Gel Electrophoresis,
UFC : Unité Formant Colonie,
VNTR : Variable Number of Tandem Repeat.

Annexe 3

Lexique

Acides nucléiques : cf ADN ou électrophorèse d'acides nucléiques.

Actinomycètes : bactéries filamenteuses - *p 100*.

ADN : Acide Désoxyribonucléique, molécule constituant le patrimoine génétique et grâce à laquelle il est transmis à la descendance. Molécule composée d'enchaînement de bases nucléotidiques formant une séquence - *p 16, 57*.

ADN (ou ARN) ribosomal 16S : cf séquençage ADN (ou ARN) ribosomal 16S.

Amplification par PCR : technique permettant d'amplifier des séquences d'ADN en présence d'une ADN polymérase (enzyme qui recopie l'ADN) et d'amorces nucléotidiques spécifiques (oligonucléotides courts de 10 à 30 paires de base) qui se fixent sur une région choisie de l'ADN et permettent l'initialisation de la synthèse de la copie d'ADN - *p 61*.

Analyse en composantes principales (ACP) : méthode mathématique qui permet la projection d'un objet multidimensionnel dans un nombre plus restreint de dimensions en conservant un maximum de l'information. Exemple : un chameau qui est un objet tridimensionnel, si on en fait une ombre chinoise (donc en 2 dimensions) sera mieux reconnu si l'ombre est celle du profil que s'il s'agit d'une vue arrière. En effet, cette projection privilégie une dispersion maximum des points et conserve donc une quantité maximum de l'information de l'objet « chameau » - représentée en mathématique par la variance. Cette méthode est largement utilisée en analyse sensorielle car un profil sensoriel a autant de dimension que de descripteurs notés. L'ACP facilite la visualisation des différences entre produits - *p 33*.

Approche transcriptomique : c'est l'étude de l'expression des gènes d'un micro-organisme à un moment donné. Elle permet d'identifier les gènes actifs et de déterminer les mécanismes de régulation de l'expression des gènes - *p 67*.

ARN : Acide Ribonucléique, molécule généralement synthétisée à partir de l'ADN, et qui participe directement à la synthèse des protéines - p 16, 26.

ARN (ou ADN) ribosomal 16S : cf séquençage ADN (ou ARN) ribosomal 16S.

Atopie - Manifestation atopique : L'atopie se caractérise par une réponse allergique du système immunitaire à des allergènes communs de l'environnement, se traduisant par une production spontanée d'immunoglobulines de type E (IgE). Bien que d'origine totalement différente, l'atopie est souvent confondue avec le phénomène de polysensibilisation à cause de la similitude des symptômes. Elle est en constante augmentation dans le monde et touche environ 10 % des enfants en Occident (chiffre très variable, allant de 5 à 25 % selon les études). L'atopie est ainsi la première cause de l'asthme, puisqu'elle en est responsable dans environ 80 % des cas (Wikipédia ; 09 novembre 2009) - p 47.

Bactériocines : les bactériocines sont une famille de peptides ou protéines synthétisés naturellement par certaines bactéries, qui possèdent des propriétés antibiotiques. Elles peuvent être bactéricides, c'est-à-dire éliminer certains micro-organismes ou bactériostatiques, c'est-à-dire inhiber la croissance de certains micro-organismes. L'activité bactéricide ou bactériostatique est orientée contre certaines espèces proches de la souche productrice - p 18, 40.

Bactériostatique : action de certaines substances permettant de stopper la multiplication des bactéries - p 42.

Banque de clones : cf clonage de l'ADN.

Bioaérosol : ensemble des particules aériennes, des molécules et des composés volatiles qui proviennent des organismes vivants. Cette définition regroupe les bactéries, les virus, les champignons (moisissures et levures), les protozoaires et les molécules biologiquement actives (toxines et antigènes) - p 77.

Biodiversité : terme défini dans le Journal officiel du 12 avril 2009 comme désignant « la diversité des organismes vivants, qui s'apprécie en considérant la diversité des espèces (diversité espèce), celle des gènes au sein de chaque espèce (diversité génétique), ainsi que l'organisation et la répartition des écosystèmes

(diversité écologique) » - p 21, 25, 66, 115.

Biodiversité microbienne : la biodiversité microbienne désigne la diversité des individus peuplant une communauté microbienne - p 25, 39.

Biofilm : il s'agit de communautés microbiennes immobilisées sur une surface et souvent enfouies dans une matrice fibreuse de polymères extracellulaires (Carpentier et Cerf, 1993) - p 43, 53, 85.

Biopuces métaboliques ou biopuces fonctionnelles : les sondes fixées sur un micro support (lame de verre ou silicium ou plastique) permettent de rechercher simultanément plusieurs milliers de gènes de fonctions, c'est-à-dire codant des protéines de fonction dans un échantillon d'ADN - p 67.

Biopuces ou puces à ADN : une puce à ADN est un ensemble de sondes fixées sur un micro support (lame de verre ou silicium ou plastique) qui permet de rechercher simultanément plusieurs milliers de gènes ou de séquences spécifiques des micro-organismes recherchés dans un échantillon d'ADN. Les sondes sont marquées avec des fluorochromes et les hybridations avec les ADN cibles sont repérables par fluorescence - p 66.

Chromatographie : méthode de séparation de molécules mettant en œuvre le partage entre 2 phases de propriétés différentes (ex : Chromatographie en couche mince (CCM) : partage entre une phase solide (silice par ex) et une phase liquide (le solvant)). La chromatographie en phase gazeuse utilisée pour l'analyse des composés d'arôme utilise le partage entre une phase mobile gazeuse (le gaz vecteur) et une phase solide (souvent une silice greffée, disposée sur une colonne capillaire pouvant avoir jusqu'à 60m de long). Les composés ayant l'affinité la plus grande pour la phase solide mettront plus longtemps à migrer dans la colonne. Ils auront un temps de rétention plus élevé - p 34.

Clonage de l'ADN et banque de clones : le clonage repose sur l'insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur = plasmide. Réaliser une banque de clones consiste à sélectionner des clones contenant la séquence du gène recherché - p 66.

Combinaison de pratiques : ensemble de pratiques mises en œuvre par les producteurs à des étapes clés de la production du lait. Exemple : « pratique d'hygiène

des trayons » regroupe la désinfection des trayons avant la traite, les 1er jets, la désinfection des trayons après la traite - *p 107*.

Diversité microbienne : cf biodiversité microbienne.

Ecosystème : ensemble dynamique d'organismes vivants (plantes, animaux et micro-organismes) qui interagissent entre eux et avec l'environnement (sol, climat, eau, lumière) dans lequel ils vivent. Lorsque la partie vivante est une communauté microbienne, le terme d'écosystème microbien est employé - *p 9, 17, 25, 40, 51, 57, 69*.

Electrophorèse d'acides nucléiques : migration des fragments d'ADN dans un gel d'agarose soumis à un champ électrique. L'ADN chargé négativement migre du pôle négatif vers le pôle positif. Les fragments d'ADN les plus grands migrent moins vite que les fragments de petites tailles - *p 61*.

Enzymes de restriction : enzymes ayant la particularité de couper les molécules d'ADN à des sites spécifiques. Chaque enzyme reconnaît et coupe une séquence nucléotidique particulière de 4 à 8 paires de bases, générant des fragments d'ADN de tailles variables - *p 61*.

Espèce : en microbiologie, une espèce est constituée par sa souche type et par l'ensemble des souches considérées comme suffisamment proches de la souche type pour être incluses au sein de la même espèce. (<http://www.bacteriologie.net/generale/definitions.html>) - *p 16, 25, 57*.

Fermentation propionique : transformation, due aux bactéries propioniques, de l'acide lactique du caillé en acides propionique et acétique (flaveur des fromages à pâte cuite) et en gaz carbonique (ouverture des fromages) - *p 19, 32*.

Fruitière : fromagerie sous statut coopératif de l'Est de la France. Les ateliers dits chalets de fromagerie permettent de collecter un mélange de laits, traditionnellement à l'échelle d'un village afin de réaliser un fromage de gros format (pâte pressée cuite : Comté, Gruyère, Emmental...). Le terme « fruitière » vient certainement du mot « fruit » en allusion à la production et à la répartition du « fruit » du travail de chacun - *p 30*.

Gène : élément génétique correspondant à un segment d'ADN (séquence) et codant une molécule fonctionnelle = protéine - *p 25, 61*.

Genre : groupe qui devrait idéalement rassembler des espèces microbiennes génétiquement et phénotypiquement apparentées et qui devrait pouvoir être identifié sur la base de ses caractères phénotypiques. (<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/glossaire.html#definitiongenre>) - *p 16, 61*.

Gerle : récipient traditionnel en bois utilisé dans les montagnes d'Auvergne et d'Aubrac pour le transport du lait depuis le lieu de traite (le parc) jusqu'au lieu de fabrication (le buron) puis servant de cuve pour la fabrication. Ce récipient entretenu par lavage avec de l'eau et, historiquement, de la cendre, suivie d'un séchage constitue certainement un apport en microflores original pour le fromage de Salers, seul fromage pour lequel la gerle reste encore utilisée - *p 28, 30*.

Groupe : cf Souches, espèces, genres et groupes.

Levain sauvage, naturel ou indigène : levain obtenu par culture des microflores naturelles du lait (lactofermentation de laits individuels ou de laits de troupeau le plus souvent) ou par reproduction de l'écosystème issu d'une fabrication précédente, généralement par report à température contrôlée de lactosérum ou quelquefois de caillé - *p 35*.

Manifestation atopique : cf atopie.

Métabolisme : ensemble des réactions chimiques de synthèse ou de dégradation au sein d'une cellule - *p 16, 31, 40*.

Métabolites : composés issus du métabolisme des organismes vivants. Certains, dit métabolites terminaux, s'accumulent dans le milieu de culture (ex : acide lactique) ; d'autres apparaissent de façon transitoire puis disparaissent. C'est le cas de beaucoup de composés d'arômes - *p 27, 31, 40*.

Méthyl-cétones : composés carbonylés, dont certains sont volatils, résultant de la dégradation des acides gras (exemple : 2-heptanone, 2-hexanone, à note odorante florale et/ou fruitée voire de vomé à concentration élevée). Ces composés sont particulièrement concentrés dans les fromages à pâte persillée mais font partie des composés toujours rencontrés dans les arômes de fromage - *p 32*.

Microfiltration : technique permettant d'éliminer l'essentiel de la microflore du lait par passage sur un filtre spécifique de l'ordre du micron. Cette technique ne peut être mise en œuvre que pour du lait écrémé. La crème subit alors généralement un traitement thermique avant la reconstitution du lait pour la fabrication. La microfiltration est réglementairement assimilée à un traitement d'assainissement du lait et son usage interdit l'étiquetage « lait cru » - p 32, 34.

Nisine : bactériocine produite par *Lactococcus lactis* et présentant un spectre bactéricide assez large, notamment vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* et de *Staphylococcus aureus*. Son utilisation comme agent conservateur (E 234) est autorisée pour les fabrications de fromages fondus - p 40.

Origines des flores microbiennes : cf réservoirs et origines des flores microbiennes.

Pratiques : cf combinaison de pratiques.

Probiotiques : Les probiotiques sont des micro-organismes qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante (généralement 10^8 - 10^9 ufc/g lors de la consommation d'un aliment), exercent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (Reid, 2008) - p 48.

Propionique : cf fermentation propionique.

Protéolyse primaire : dégradation des protéines laitières (notamment caséines) en fragments de taille intermédiaire appelés peptides - p 31.

Protéolyse secondaire : dégradation des peptides intermédiaires en petits peptides et acides aminés - p 31.

Réservoirs et origines des flores microbiennes : les réservoirs sont les éléments en contact direct avec le lait lors de la traite : trayons, machine à traire, air du lieu de traite. Les origines sont en amont des réservoirs et influent sur leur charge microbienne (eau, litière, aliments...) - p 77, 79, 85, 99.

Séquençage ADN (ou ARN) ribosomal 16S : détermination de la succession (= séquence) des bases nucléotidiques composant l'ADN (ou ARN) ribosomal codant les ribosomes - p 26, 61.

Sonde : une sonde nucléotidique est un segment de nucléotides qui permet de rechercher de manière spécifique un fragment d'acide nucléique que l'on désire étudier (fragment d'ADN spécifique à une

espèce par exemple). Cette réaction sonde-fragment correspond à une réaction d'hybridation moléculaire - p 65.

Souche : succession de cultures dérivées d'une culture pure (le plus souvent une colonie parfaitement isolée). (<http://www.bacteriologie.net/generale/definitions.html>) - p 16, 26, 57, 69.

Souches, espèces, genres et groupes : la classification des bactéries (taxonomie ou systématique) utilise les mêmes échelons hiérarchiques que pour les végétaux et animaux : ordres, familles, groupes, genres et espèces, l'espèce constituant l'unité de base. Une espèce est constituée par un ensemble de souches différentes mais considérées comme suffisamment proches pour être incluses au sein de la même espèce.

Technique d'empreinte génomique ou typage moléculaire : technique permettant de mettre en évidence la variabilité de l'ADN. Le principe repose sur la comparaison de profils de coupure de l'ADN par des enzymes de restriction ou bien des profils d'amplification de fragments d'ADN au hasard ou de séquences répétées de l'ADN - p 61.

Transcriptomique : cf approche transcriptomique.

Typage moléculaire : cf technique d'empreinte génomique.

UFC : unités formant colonie. Micro-organismes qui peuvent former sur support solide des masses (colonies) visibles à l'œil nu, utilisées pour indiquer le nombre de germes dans un prélèvement - *un exemple* p 21.

Annexe 4

Fiches rédigées dans le cadre du groupe « écosystèmes microbiens » du RMT Fromages de terroirs

Ces fiches sont téléchargeables sur le site du Réseau Fromages de Terroirs : <http://www.rmtfromagesdeterroirs.com>

Fiches de procédures

→ Enquête en élevage (objectif de la méthode : rédiger un questionnaire et mettre en place les enquêtes dans le cadre d'un programme de recherche sur les équilibres microbiens du lait, impliquer les techniciens d'élevage) - Mars 2009

Contacts : pierre.parguel@inst-elevage.asso.fr ;
julie.barral@lr-elevage.com

→ Prélèvement des flores mobilisables dans la machine à traire (objectifs de la méthode : récupération des flores microbiennes développées entre 2 traites dans le système de traite (lactoduc + chambre de réception + griffes à lait)) - Décembre 2009

Contacts : cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr ;
v.michel@actilait.com

→ Prélèvements microbiologiques sur la surface du matériel, en particulier de fromagerie (des moules) : présentation et comparaison de 2 méthodes - Décembre 2009

Contacts : julie.barral@lr-elevage.com ;
cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

→ Prélèvement stérile de lait (objectifs de la méthode : réaliser des prélèvements de laits, de façon aseptique en vue d'analyses microbiologiques) - Décembre 2009

Contact : francoise.monsallier@cantal.chambagri.fr

→ Prélèvement d'ambiance (objectifs de la méthode : analyse de la flore microbienne de l'air ambiant et des poussières) - Mars 2009

Contacts : y.bouton@comte.com ;
cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr

→ Procédure de prélèvement microbiologique des parois de gerles en bois en AOP Salers (objectifs de la méthode : évaluer l'efficacité des méthodes d'entretien et de nettoyage des gerles en bois utilisées en AOP Salers en réalisant des prélèvements sur la surface des gerles en bois permettant de récupérer un maximum de flores ; cette méthode est non destructive et peut être utilisée en routine par les techniciens) - Septembre 2010.

Contacts : defargues@lial-mc.asso.fr ;
rddienne@clermont.inra.fr

→ Procédure de mise en oeuvre du test de lactofermentation (objectifs du test : obtenir une indication globale de la valeur fromagère des laits d'un point de vue microbien) - Février 2011

Contacts : f.pelissier@actilait.com ;
julie.barral@lr-elevage.com ;
a-berodier@ctfc.fr ;
cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr ;
sabrina.raynaud@inst-elevage.asso.fr

→ Prélèvement des flores de surfaces des trayons (objectifs de la méthode : estimer la charge microbienne présente sur la partie des trayons en contact avec le manchon trayeur, grâce à la réalisation de frottis en surface de trayons) - Janvier 2011

Contacts : julie.barral@lr-elevage.com ;
cecile.laithier@inst-elevage.asso.fr ;
sabrina.raynaud@inst-elevage.asso.fr ;
francoise.monsallier@cantal.chambagri.fr ;
v.michel@actilait.com

Fiches de synthèses

→ Quelques bases sur la microbiologie du lait et du fromage... - Mai 2009

Contacts : beuvier@poligny.inra.fr ;
fabienne.feutry@educagri.fr

→ Quelles sont les évolutions de la flore microbienne dans les laits et les fromages ? - Novembre 2009

Contact : ab-ctfc@orange.fr

→ Comment préserver une flore utile sans affecter la qualité sanitaire des laits - Mars 2009

Contact : pierre.parguel@inst-elevage.asso.fr

→ Faut-il privilégier la quantité ou la nature de la flore du lait ? - Août 2009

Contact : y.bouton@comte.com

Annexe 5

Coordonnées des rédacteurs

Julie Barral

Actilait
Centre de Carmejane
Le château
04510 Le Chaffaut-Saint-Jurson

Antoine Bérodiér

CTFC (Centre technique des
Fromages Comtois)
9, avenue Wladimir Gagneur
39800 Poligny

Eric Beuvier

UR 342 « Technologie et
Analyses Laitières »
INRA
Rue de Versailles
BP 20089
39801 Poligny cedex 1

Yvette Bouton

CIGC (Comité Interprofessionnel
du Gruyère de Comté)
Avenue de la Résistance
BP 20026
39801 Poligny cedex

Cécile Callon

Unité de Recherches Fromagères
INRA
20, côte de Reyne
15000 Aurillac

Céline Delbès

Unité de Recherches Fromagères
INRA
20, côte de Reyne
15000 Aurillac

Yann Demarigny

Département Productions Agro-
Alimentaires et Qualité (PAAQ)
ISARA-Lyon
Arapole
23, rue Jean Baldassini
69364 Lyon Cedex 07

Nathalie Desmasures

Unité des Micro-organismes
d'Intérêt Alimentaire, E.A. 3213
Université de Caen Basse-
Normandie
14032 Caen cedex

Cécile Laithier

Institut de l'Elevage
Arapole
23, rue Jean Baldassini
69364 Lyon cedex 07

Valérie Michel

Suaci Alpes du Nord - GIS Alpes
Jura
40, rue du Terraillet
73190 Saint Baldoph

Françoise Monsallier

Unité de Recherches Fromagères
INRA
20, côte de Reyne
15000 Aurillac

Marie Christine Montel

Unité de Recherches Fromagères
INRA
20, côte de Reyne
15000 Aurillac

Pierre Parguel

Institut de l'Elevage
Chambre Régionale d'Agriculture
de Franche-Comté
Valparc-Espace Valentin Est
25048 Besançon Cedex

Fanny Pélissier

Actilait
20, côte de Reyne
15000 Aurillac

Sabrina Raynaud

Institut de l'Elevage
Arapole
23, rue Jean Baldassini
69364 Lyon cedex 07

Philippe Roussel

Institut de l'Elevage
9, rue André Brouard
BP 70510
49105 Angers Cedex 02

Henry-Eric Spinnler

AgroParisTech - Centre de
Grignon
Avenue Lucien Brétignières
78850 Thiverval Grignon

Hélène Tormo

Ecole d'Ingénieurs de PURPAN
75, voie du TOEC
BP 57611
31076 Toulouse Cedex 3

OUVRAGE COLLECTIF RÉALISÉ DANS LE CADRE DU RMT « FILIÈRES FROMAGÈRES VALORISANT LEUR TERROIR » ANIMÉ PAR LE CNAOL ET LE GIS ALPES JURA.

PAO

Volcanographics (04 73 96 76 32 - www.volcanographics.com)

IMPRESSION

Diazo1 (04 73 19 69 00)

CRÉDITS PHOTOGRAPHIQUES

Photographies 1, 2 et 3 : © Unité MILA et CMABio, Université de Caen Basse-Normandie

Photographies 4 et 9 : © T. Hétreau, Centre d'Elevage de Poisy, Haute Savoie

Photographies 5, 17, 18, 20 et 23 : © C. Laithier, Institut de l'Elevage

Photographies 6, 7 et 10 : © T. Huneau, Ferme expérimentale de Derval

Photographie 8 : © J. Barral, Actilait

Photographies 11, 13, 14, 15, 16, 24, 25, 27 : © Institut de l'Elevage, DR

Photographie 12 : © D. Hardy, Institut de l'Élevage

Photographie 19 : © CIGC-Godin

Photographie 21 : © CIGC

Photographie 22 : © CIGC-Petite

Photographie 26 : ©INRA, G. Duboz
