

La biodiversité microbienne dans le fromage au lait cru

Cornelia Bär¹, Elisabeth Eugster¹, Stefan Irmeler¹, Aline Moser¹ et Cosima Pelludat²

¹Agroscope, Institut des sciences en denrées alimentaires IDA, Berne, Suisse

²Agroscope, Institut des sciences en production végétale IPV, Wädenswil, Suisse

Renseignements: Elisabeth Eugster, elisabeth.eugster@agroscope.admin.ch



Les microorganismes permettent de produire des fromages suisses au lait cru tout en garantissant leur sûreté et leur qualité. (Source: Swiss Cheese Marketing)

De tous les êtres vivants, les microorganismes sont ceux qui présentent la plus grande diversité. Ils jouent un rôle fondamental dans tous les écosystèmes et pourtant, ils ont encore été peu étudiés, notamment en raison de leur «invisibilité» à l'œil nu et de la difficulté à les cultiver en laboratoire. Or, les microorganismes sont omniprésents, ils existent depuis des milliards d'années et leur nombre est incroyablement élevé. Un gramme de sol contient environ 10 milliards de microorganismes pour un total d'espèces estimé à 10 000 (Torsvik *et al.* 1996); sur toutes les feuilles de tous les arbres du monde, cela représente même un nombre de 10^{26} (Vorholt 2012). Employer ces

organismes omniprésents dans un but précis au profit de l'agriculture et de l'agroalimentaire est un projet prometteur pour l'avenir.

Avant de pouvoir atteindre cet objectif, il faut d'abord résoudre le problème clé: comment trouver les candidats idéaux étant donné l'ampleur inimaginable de la population de microorganismes? Quel microorganisme ou quelle communauté de microorganismes possède la fonction, l'effet, la propriété susceptible de satisfaire à nos attentes? Ces dernières années, les chercheurs-euses se sont rapprochés de la solution du problème grâce à un développement exponentiel des nouvelles méthodes

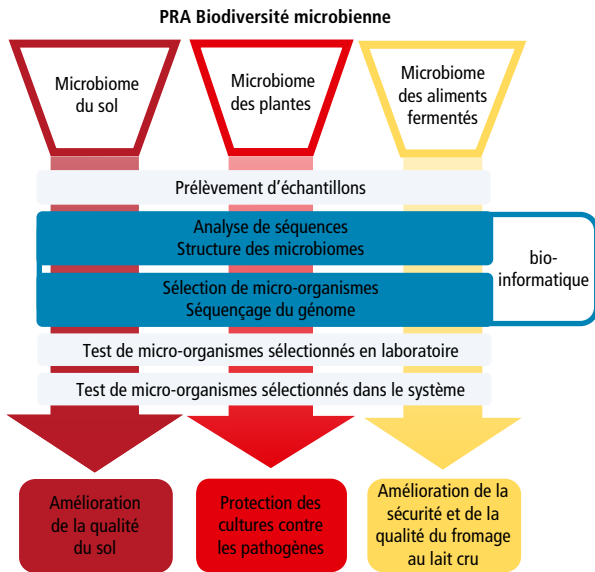


Figure 1 | Organisation du programme de recherche Agroscope «Biodiversité microbienne»

d'analyse génétique (*Next Generation Sequencing* NGS; Mayo *et al.* 2014). Le séquençage de l'ADN permet de saisir la totalité des microorganismes dans un système (le «microbiome») et de déterminer la séquence génomique des différentes souches microbiennes, ce qui fournit de premiers indices sur leur fonction. Cette fonction et la «performance» des microorganismes sélectionnés dans un système ainsi que l'effet obtenu sont ensuite mis en évidence en laboratoire grâce à des tests établis. Il existe déjà quelques exemples de l'utilité que peuvent avoir les microorganismes dans l'agriculture: certains microorganismes associés aux plantes peuvent servir à lutter contre des maladies (De Vrieze *et al.* 2015) et certains champignons du sol sont épandus pour lutter de manière ciblée contre les insectes nuisibles et les contrôler durablement dans la parcelle (Enkerli *et al.* 2004). La biodiversité microbienne des écosystèmes importants pour l'agriculture est cependant en grande partie inconnue et donc impossible à utiliser à notre profit.

Le programme de recherche Agroscope «Biodiversité microbienne»

Le programme de recherche Agroscope «Biodiversité microbienne» (PRA MikBioDiv) a pour but d'étudier les microbiomes et les fonctions des microorganismes dans trois écosystèmes essentiels pour l'agriculture et l'agroalimentaire, à savoir le sol, les plantes et les aliments fermentés. Les volets «Microbiome du sol» et «Microbiome des plantes» (fig. 1) analysent la biodiversité micro-

Résumé ■ Les microorganismes peuvent être utilisés autant dans l'agriculture que dans le secteur agroalimentaire: ils peuvent par exemple servir à lutter contre les maladies des plantes (De Vrieze *et al.* 2015) ou à maîtriser les insectes nuisibles (Enkerli *et al.* 2004). Toutefois, la biodiversité microbienne des principaux écosystèmes est en grande partie inconnue. Le programme de recherche Agroscope «Biodiversité microbienne» (PRA MikBioDiv) a donc pour but d'acquies des connaissances dans ce domaine, et ceci dans trois écosystèmes essentiels pour les secteurs agricole et agroalimentaire: le sol, les plantes et les aliments fermentés. L'étude de la biodiversité microbienne dans le fromage au lait cru a mis au jour une série d'espèces bactériennes «inattendues», mais connues dans la taxonomie. Par ailleurs, un grand nombre de séquences génétiques n'ont pu être attribuées à aucune espèce bactérienne connue, ce qui laisse à penser que même dans le fromage, il y a des bactéries inexplorées jusqu'à présent.

bienne dans des sols représentatifs de la Suisse, mais aussi à la surface des plantes comme le raygrass, les pommes de terre et les pommes. Les objectifs à long terme sont l'amélioration de la qualité du sol grâce à une meilleure connaissance des interactions entre l'utilisation du sol et son microbiome, mais aussi la protection des plantes contre les pathogènes grâce à des microorganismes individuels ou à des communautés de synthèse. Quant au volet «Microbiome des aliments fermentés» (fig. 1), il est destiné à l'étude de la biodiversité microbienne représentée dans la collection des souches d'Agroscope (Liebefeld) ainsi qu'à l'étude des écosystèmes du petit lait et du fromage au lait cru. Le but premier est d'identifier la diversité microbienne, de la préserver et de l'étudier à l'aide de données génomiques et d'activités métaboliques, pour s'en servir ensuite de manière ciblée pour la fabrication de produits laitiers fermentés, sûrs et de qualité. Le quatrième volet «Réseau Agroscope: génomique et bioinformatique (ANET-GB)» propose des expertises pour l'analyse et l'intégration de données destinées à la recherche en génomique et en bioinformatique.

Biodiversité microbienne dans le fromage au lait cru

La fabrication du fromage fait partie des procédés biotechnologiques les plus anciens. On y utilise des micro-

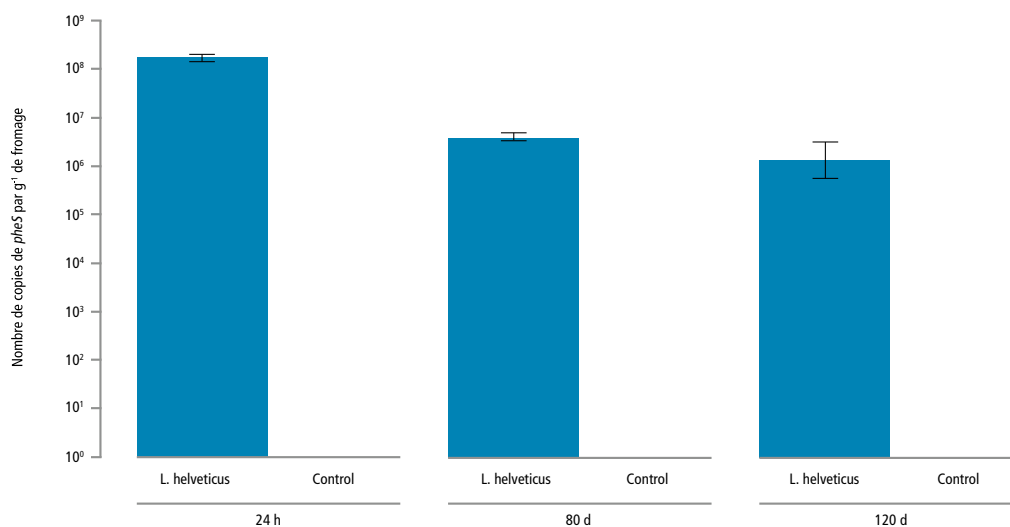


Figure 2 | Détermination quantitative de *L. helveticus* dans le fromage, fabriqué avec et sans (Control) *L. helveticus* comme culture complémentaire après 24 heures, 80 et 120 jours. Lorsque la concentration de *L. helveticus* dans le fromage était de 108 copies par g¹ de fromage (24) au départ, elle s'élevait encore à 10⁶–10⁷ copies par g¹ de fromage après 80–120 jours (Moser et al. 2016).

organismes pour transformer le lait en un produit de conservation et l'enrichir à l'aide de nombreux métabolites (les arômes par exemple), donnant à chaque fromage son caractère typique.

Dans le volet «Microbiome des aliments fermentés», une thèse de doctorat étudie la biodiversité microbienne de *Lactobacillus helveticus* au sein des espèces et des cultures de petit lait. Ces dernières sont le produit de la fermentation du petit-lait récupéré après la fabrication de fromage. Elles sont utilisées pour la fabrication de différentes sortes de fromages traditionnels et constituent un habitat privilégié de *L. helveticus*. Il s'agit d'une bactérie lactique, également employée comme probiotique ainsi que pour la fabrication de boissons fermentées. *L. helveticus* joue un rôle particulier dans la fabrication du fromage: elle contribue de manière déterminante à la décomposition bactérienne des protéines ainsi qu'au catabolisme des peptides et des acides aminés qui conduit à la formation de l'arôme typique (Hannon et al. 2007).

Afin d'étudier la diversité des souches de *L. helveticus* présentes dans la collection de souches d'Agroscope, les génomes de 80 souches ont été séquencés. Les données de séquençage serviront à répondre à différentes problématiques. Une méthode de détection quantitative spécifique a déjà été développée pour *L. helveticus*. Des études de corrélation sont en cours afin d'identifier les gènes responsables de la décomposition protéique et du catabolisme des peptides et des acides aminés, et par conséquent de la formation de l'arôme du fromage.

Le développement d'une méthode spécifique de détection quantitative est un premier succès. L'interprétation bioinformatique des données brutes du séquençage a montré que la séquence du gène *pheS* est suffisamment différenciée pour permettre de distinguer *L. helveticus* des espèces apparentées (Moser et al. 2016). La méthode développée est très sensible (il est possible de détecter 10 copies du gène *pheS* par ml ou g d'échantillon) et est déjà employée dans d'autres projets de recherche, afin d'identifier et de quantifier les espèces dans différents habitats comme le lait cru, le petit-lait entier, le fromage ou les légumes fermentés et de suivre leur évolution pendant la maturation (fig. 2).

Une thèse de recherche postdoctorale étudie la biodiversité microbienne dans le fromage au lait cru, biodiversité qui influe de manière déterminante sur les modifications biochimiques ayant lieu durant la maturation ainsi que sur la présence de défauts dans le fromage. Afin d'analyser le consortium complexe de microorganismes dans le fromage au lait cru, des technologies NGS sont employées qui appréhendent également les microorganismes non cultivables. Une synthèse de la littérature disponible montre que plus de 400 espèces de bactéries différentes ont été identifiées dans le lait cru (Montel et al. 2014). Les nouvelles techniques permettent non seulement de séquencer les génomes dans le fromage au lait cru, mais aussi d'identifier leurs gènes actifs (analyse du métagénome et métaanalyse du transcriptome). Le microbiome d'un fromage au lait cru peut

ainsi être étudié et caractérisé selon ses propriétés fonctionnelles. De cette manière, il est possible d'identifier les microorganismes qui proviennent du lait cru, de l'environnement dans la fromagerie et des cultures starter pour suivre leur évolution pendant la maturation du fromage. Par ailleurs, cela permet d'étudier l'influence de paramètres technologiques sur la biodiversité microbienne. Enfin, il est intéressant de comparer les microbiomes du fromage de bonne qualité à ceux du fromage de moindre qualité pour mieux comprendre l'influence des microorganismes sur la qualité du fromage.

Une première étape a été franchie avec l'établissement d'un mode opératoire (workflow) qui permet d'identifier les microorganismes dans le fromage. L'ADN d'un échantillon de fromage (fromage au lait cru, 90 jours) a été extrait et les gènes 16S rARN sur lesquels se basent les relations de parenté entre les bactéries ont été séquencés à l'aide d'un séquençage d'amplicon sur une plateforme Ion Torrent. L'interprétation bioinformatique et le classement taxonomique des séquences obtenues ont été effectués avec le logiciel MG-RAST (Meyer *et al.* 2008). La figure 3 présente les résultats de l'analyse du métagénome de cet échantillon de fromage au lait cru (Bär *et al.* 2016). Outre l'espèce connue comme *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Brevibacterium* qui proviennent du lait cru ou de l'environnement de la fromagerie ou qui ont été ajoutées comme culture starter ou complémentaire, les chercheurs-euses ont trouvé une série de souches bactériennes «inattendues», mais connues dans la taxonomie (par exemple *Weissella*, *Rhodococcus*). De plus, de nombreuses séquences génétiques n'ont pu être attribuées à aucune espèce bactérienne, ce qui laisse à penser que même dans le fromage, il existe des bactéries encore inexplorées jusqu'ici.

Bibliographie

- Bär C., Moser A., Wechsler D. & Irmeler S., 2016. Insights into the microbial biodiversity of cheese. 25th International ICFMH Conference 2016.
- De Vrieze M., Pandey P., Bucheli T. D., Varadarajan A. R., Ahrens C. H., Weisskopf L. & Bailly A., 2015. Volatile organic compounds from native potato-associated *Pseudomonas* as potential antimicrobial agents. *Frontiers Microbiology* **6**, 1295.
- Enkerli J., Widmer F. & Keller S., 2004. Longterm persistence of *Beauveria brogniartii* strains applied as biocontrol agents against European cockchafer larvae in Switzerland. *Biological Control* **29**, 115–123.
- Hannon J.A., Kilcawley K.N., Wilkinson M.G., Delahunty C.M. & Beresford T.P. 2007. Flavour precursor development in Cheddar cheese due to lactococcal starters and the presence and lysis of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal* **17**, 316–327.
- Mayo B., Rachid C.T.C.C., Alegria Á., Leite A.M.O., Peoxoto R.S., Delgado S., 2014. Impact of Next Generation Sequencing Techniques in Food Microbiology. *Current Genomics* **15**, 293–309.
- Meyer F., Paarmann D., D'Souza M., Olson R., Glass E. M., Kubal M., Paczian T., Rodriguez A., Stevens R., Wilke A., Wilkening J. & Edwards R. A., 2008. The Metagenomics RAST server – A public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* **9**, 386.
- Montel M.C. Bchin S. Mallet A. Delbes-Paus C. Vuitton D.A. Desmaures N. & Berthier F., 2014. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology* **177**, 136–154.
- Moser A., Berthoud H., Eugster E., Meile L. & Irmeler S., 2016. Realtime PCR based quantification of *Lactobacillus helveticus* (en préparation).
- Torsvik V., Sorheim R. & Goksoyr J., 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – A review. *Journal of Industrial Microbiology* **17**, 170–178.
- Vorholt J.A., 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nature reviews Microbiology* **12**, 828–840.

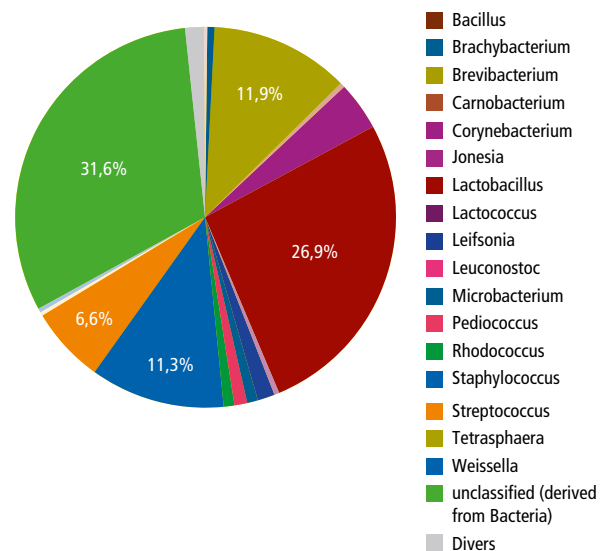


Figure 3 | Microbiome d'un fromage au lait cru à 90 jours de maturation, sur la base d'une analyse du métagénome 16S. Le classement phylogénétique a été effectué à l'aide du logiciel MG-RAST (Bär *et al.* 2016).

D'autres analyses suivront pour décrire le microbiome d'un fromage au lait cru et caractériser la composition, les propriétés et la dynamique des sous-populations en termes de qualité du fromage. Ces informations nous permettront de mieux comprendre l'influence des microorganismes sur la biochimie de la maturation du fromage et donc de mieux la contrôler et éventuellement même de l'accélérer. Les causes des défauts du fromage entraînant une perte de valeur seront mieux comprises et des mesures pourront être prises pour améliorer la qualité. ■