N°350
JUIN 2019

REVUE DES enil

MÉTAGÉNOMIQUE

REVUE DES ÉCOLES NATIONALES D'INDUSTRIE LAITIÈRE, DE LEURS AMICALES D'ANCIENS ÉLÈVES ET DES ORGANISMES ASSOCIÉS

Revue des ENIL.indd 1 19/06/2019 16:20

REVUE DES enil

Mi Mai s'est tenue l'AG de l'Anfopeil, moment de regroupement annuel des représentants des ENIL et leurs CFPPA, des Amicales d'anciens élèves, d'ACTALIA et des professionnels de la Transformation laitière. Les sujets d'échanges formels ou informels ne manquaient pas dans le contexte d'évolution de la Formation Professionnelle en cours. Ces différents échanges ont permis de consolider nos plans d'actions et de renforcer les liens Anfopeil-ENIL.

Ce fut aussi l'occasion pour l'AFDIL de présenter les résultats français de l'enquête européenne pilotée par l'AEDIL et financée par l'UE (programme Erasmus +) : «Cartographie des besoins en compétences dans les Industries Laitières et analyse des écarts avec l'offre de formation en Europe» .

14 pays y ont participé, 120 entreprises (19 en France), 53 organismes de Formation (8) et 65 anciens élèves (22) ont été interviewés. Les résultats européens seront présentés en Septembre 2019 lors de l'AG de l'AEDIL.

De l'enquête de l'échantillon français, et sans surprise, il ressort essentiellement que pour répondre à un marché de plus en plus exigeant en améliorant leur performance, les entreprises sont confrontées à un problème de recrutement de personnel qualifié pour renouveler les générations et donc à devoir former leurs employés pour les faire monter en compétences.
Les principales compétences attendues sont la technologie laitière, l'hygiène, la connaissance des Process, la conduite machine et la maintenance. Mais aussi des compétences de Savoir-Être (ouverture d'esprit, réactivité, autonomie, adaptabilité, évolutivite. ...)
Les entreprises françaises sont satisfaites (à 66%) de l'offre de formation et leurs suggestions d'amélioration portent sur le lien avec les entreprises, le développement du pragmatisme pour relever le défi du développement des compétences laitières (Sciences du Lait, Produit / Process, R&D).
Le Réseau des ENIL et l'Anfopeil sont donc confortés dans leurs démarches et nous sommes convaincus d'être sur la bonne voie pour aider les entreprises à renforcer la compétence des salariés de la transformation laitière.

Didier JOUBERT
Président ANFOPEIL

Directeur de la publication :
Didier JOUBERT, Président ANFOPEIL

Portage du dossier :
Cécile CHARLES, La roche sur Foron

Mise en page : Camille BARBIER

n° ISSN: 0395-6865

ANFOPEIL BP10025, 39800 POLIGNY

Imprimerie
Seigle-Ferrand
39800 POLIGNY
Dépot légal Juin 2019

accueil@anfopeil-enil.fr
03 84 37 27 24

Sommaire

Un peu de théorie
Principes et potentialités des méthodes de métagénomique au service de l'industrie laitière..... 3
Pierre RENAULT, INRA

Un autre regard sur l'écologie microbienne et la biodiversité
Nature et rôle des moteurs biotiques dans la construction des communautés microbiennes des fromages traditionnels..... 7
Françoise IRLINGER et Céline DELBÈS, INRA

Une application sur les filières fromagères AOP et IGP pour l'étude de la biodiversité et de l'écologie microbienne du lait de cuve à la fin de l'affinage.....10
Nicolas ORIEUX, ENIL Besançon-Mamirolle

Appropriation de ces méthodes par les filières sous signe de qualité
Intérêt du développement de ces méthodes pour les filières fromagères françaises, Interview de Sébastien Breton, Directeur Général du CNAOL 16
Delphine JEAN, ENIL Saint-Lô Thère

Une avancée pour la compréhension de la technologie fromagère
Construction des écosystèmes microbiens des fromages de type Cantal : l'influence des systèmes de production du lait au pâturage.....19
Marie FRETIN, INRA

Étude des conditions de production de lait
Impact de la fertilisation des prairies sur leur biodiversité et sur les transferts de micro-organismes et de contaminants chimiques du sol au lait 22
Yvette BOUTON, CIGC

Valorisation et exploitation des résultats de ces études dans les formations du Réseau des ENILs : Application « Shiny Pédago »
Interview Clément Carrera Moniteur au sein des Ateliers Technologiques de l'ENILV de La Roche-sur-Foron 24
Cécile CHARLES, ENILV de la Roche-sur-Foron

Les méthodes omiques pour répondre à des problématiques industrielles
Utilisation des méthodes – omiques dans le cadre de problématiques industrielles spécifiques : exemple du projet REDSEL 27
Sarah CHUZEVILLE, ACTALIA, La Roche Sur Foron
Interview..... 32
Frédéric GAUCHERON, CNIEL, par Sarah CHUZEVILLE

Stages ANFOPEIL
Thierry MICHELET, ANFOPEIL

Introduction

Plus que d'autres biotransformations, la transformation du lait en fromage est caractérisée par son environnement microbiologique. Elle est conduite au travers des observations (plus ou moins empiriques) de l'impact environnemental et des connaissances scientifiques toujours plus nombreuses et plus précises. A chaque stade, l'environnement microbiologique de proximité communément appelé «Ecosystème microbien » aura l'occasion de transmettre un patrimoine, qu'il conviendra d'utiliser ou de prendre en compte dans la conduite des diverses opérations de fromagerie. L'équilibre de ces « Ecosystèmes microbiens » est en constante évolution et sa caractérisation scientifique, n'a pu être abordée que de façon très partielle par les techniques pasteuriennes.

Les techniques de métagénomique, renforcées par l'accès aux bases de données mondiales « BIG DATA » ouvrent un spectre de caractérisation des écosystèmes microbiens jamais atteint jusqu'alors.

D'un point de vue technologique comme sanitaire, l'intérêt est d'une grande évidence pour les productions traditionnelles de Terroirs sous signe de qualité, mais également pour les transformations à caractère « industriel » dont on sait que l'unité de Transformation est en soit une somme d'Ecosystèmes microbiens qu'il convient de mieux connaitre.

Patrice DIEUDONNÉ, Directeur Adjoint en charge du Développement de l'ENILV de LA ROCHE sur FORON

Un peu de théorie

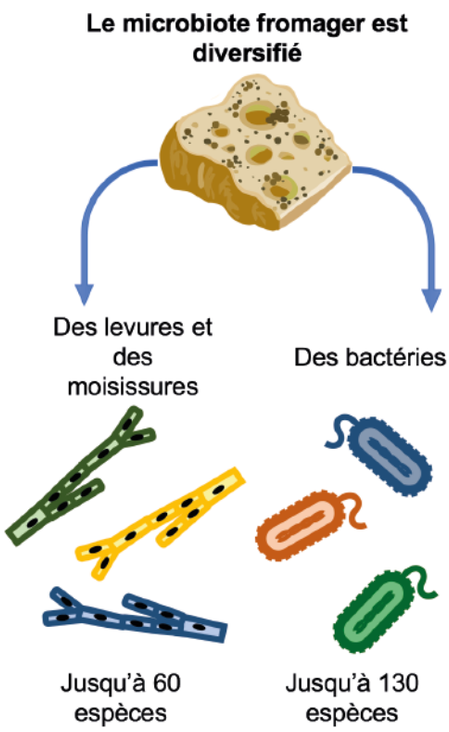
Principes et potentialités des méthodes de métagénomique au service de l'industrie laitière

Pierre RENAULT, Directeur de Recherche, «Food Microbial Ecology», Institut Micalis, INRA-CRJ

Les nourritures fermentées existent sans doute depuis que l'homme a inventé l'agriculture. En effet, les denrées conservées dans des récipients, ou de tout autre manière constituent des substrats riches en nutriments sur lesquels les micro-organismes peuvent se développer. Les aliments ainsi transformés peuvent acquérir de nouvelles propriétés que l'homme a appréciées, et qui ont parfois présenté des qualités nutritives plus intéressantes que la matière première de départ. Puis sans le savoir, en reproduisant toujours de la même manière ces aliments, il a créé des écosystèmes particuliers où des micro-organismes spécifiques se sont adaptés et ont conféré aux produits des propriétés qu'il a appréciées.

La connaissance de ces écosystèmes ne s'est développée que récemment à travers la découverte des micro-organismes grâce au microscope, puis leur isolement selon les méthodes de microbiologie pasteurienne. Les scientifiques ont ensuite caractérisé différents isolats, et ainsi l'existence de différentes espèces de micro-organismes dans les aliments. La caractérisation de ces micro-organismes s'est affinée petit à petit, depuis l'étude des propriétés morphologiques, physique (coloration Gram, ...), physiologiques (croissance à différentes températures, pH, en présence de sel, assimilation de sucres...), jusqu'à la détermination par des méthodes moléculaires telles que la séquence des ADN ribosomique 16S.

À grande échelle, ces analyses sont cependant très laborieuses et ne donnent qu'un aperçu partiel des micro-organismes présents dans les aliments. En conséquence, les analyses de routine sont souvent limitées à des comptages de flore sur différents milieux reflétant la flore totale, et la présence de différents groupes de micro-organismes tels que les bactéries lactiques mésophiles/thermophiles, les Lactobacilles, les Entérocoques, les halotolérantes... Ces données, bien que précieuses, manquent de précision et ne permettent pas tout le temps de comprendre le fonctionnement de l'écosystème pour aboutir à un produit particulier.
Depuis une dizaine d'années, un saut technologique a été accompli à l'aide des nanotechnologies qui ont permis le développement de séquenceurs avec des débits de plus en plus élevés, et avec eux, des méthodes bioinformatiques permettant de mieux caractériser les écosystèmes.



Revue des ENIL.indd 3 19/06/2019 16:20

Une peu de théorie sur le saut technologique

Nous allons ici aborder brièvement comment un saut technologique dans le séquençage de l'ADN a pu permettre de développer des études poussées sur les écosystèmes microbiens.
Tout d'abord, comment l'ADN peut-il être utilisé comme une carte d'identité des micro-organismes ? Chez ces derniers, l'ensemble des fonctions qui permettent leur développement est «écrit» dans un ou plusieurs chromosomes d'une taille très réduite par rapport à ceux de l'homme. L'écriture est codée avec 4 lettres (représentant les 4 bases, molécules constitutives de l'ADN) et le contenu des chromosomes peut être comparé à des livrets techniques, écrits selon un format unique décrivant un à un les différents éléments d'une machine. Lorsque l'on déchiffre ces livrets, il est possible de comparer chacun de leurs éléments pour les différencier. Et enfin, lorsque l'on possède une bibliothèque de « livrets de référence », il est possible d'identifier les microorganismes référencés.

Le problème parait donc simple, il suffit de se procurer ces « livrets » ! Cependant, il y a 2 points qui limitaient leur acquisition jusqu'à présent, leur taille et leur disponibilité. Les chromosomes des bactéries sont composés de 2 à 6 millions de « lettres », ceux des levures et champignons, de 6 à 40 millions. Avant les séquenceurs haut-débit, reconstituer ces séquences représentait en lui-même un travail très important, les séquenceurs « classiques » permettant de lire l'ADN par fragment de 6-800 lettres par centaines environ. Les séquenceurs de nouvelle génération ont des débits incomparablement supérieurs, et par exemple en une seule «ligne» d'un séquenceur «HiSeq» (parmi ceux qui ont le plus haut débit, 300 millions de séquences de 150 bases par ligne), il est possible d'obtenir les données nécessaires à la reconstitution de 100 à 200 génomes bactériens. Avec des programmes de bio-informatique, ce travail peut maintenant se faire de manière automatisée et produit des catalogues quasi-complets. Il existe aussi d'autres types de séquenceurs qui fournissent des séquences longues (> 10 000 bases) permettant de reconstituer l'organisation complète du génome, toujours avec un travail de bio-informatique automatisé. Actuellement, nous assistons donc à une explosion dans l'acquisition des séquences génomiques qui sont passées de quelques centaines en 2010 à plus de 100 000 aujourd'hui. En particulier, l'ensemble des génomes bactériens des espèces de référence a été déterminé. Il en résulte, que le travail limitant pour constituer les catalogues de référence est d'isoler les micro-organismes de référence et d'en extraire de l'ADN de bonne qualité. Paradoxalement, c'est donc un travail de microbiologie classique qui est devenu le processus limitant, dû notamment à la mauvaise cultivabilité de certains microorganismes.

Les «omics»

A partir des séquences des génomes, les analyses de bio-informatique permettent de déterminer différentes informations (les gènes en particulier qui font partie des éléments du livret pris en image précédemment). Les études basées sur ces informations, allant de la modélisation des fonctions de chaque microorganisme à leur comparaison à différentes échelles, sont regroupée sous le terme de «génomique». Si maintenant, de l'ADN est extrait d'un milieu naturel ou d'un produit donné, son étude par séquençage donnera un patchwork de génomes, le mélange de livrets décrit plus haut. Il pourra être étudié à l'aide des références établies précédemment. Il est devenu d'usage de nommer les études de ces ADN génomiques mélangés « Méta-génomique».

Il est intéressant de noter que l'ADN est une molécule qui se dégrade relativement lentement, et par exemple, il a été possible d'extraire d'os fossile de l'ADN de nos ancêtres Néanderthaliens ! L'étude de l'ADN extrait d'un milieu pourra donc être utilisé pour étudier les communautés qui s'y sont succédées.

Revue des ENIL.indd 4 19/06/2019 16:20

Lors du développement des microorganismes, les gènes codés par l'ADN sont d'abord recopiés, «transcrits», en ARN, une molécule reprenant directement le code à 4 lettres de l'ADN, mais en changeant de molécule de base. Il en résulte que les ARN sont des molécules qui se dégradent rapidement. La cellule les synthétise selon ses besoins, et leur dégradation rapide permet de ne contenir que celles dont la cellule a besoin sur le moment. La détection de ces ARN permettra donc de déterminer quels microorganismes sont actifs, et quelle est leur activité. Leur détection se fait avec les mêmes séquenceurs que l'ADN et cette analyse a été baptisée « Méta-transcriptomique », puisqu'elle révèle quels gènes sont transcrits par la communauté microbienne.

Les gènes transcrits permettent en général de produire des protéines, éléments majeurs du métabolisme cellulaire, dont les fonctions peuvent être prédites (en partie) par des programmes de bio-informatique reliés à des bases de données. Les études de Méta-transcriptomiques indiquent donc quelles fonctions métaboliques sont mises en œuvre.

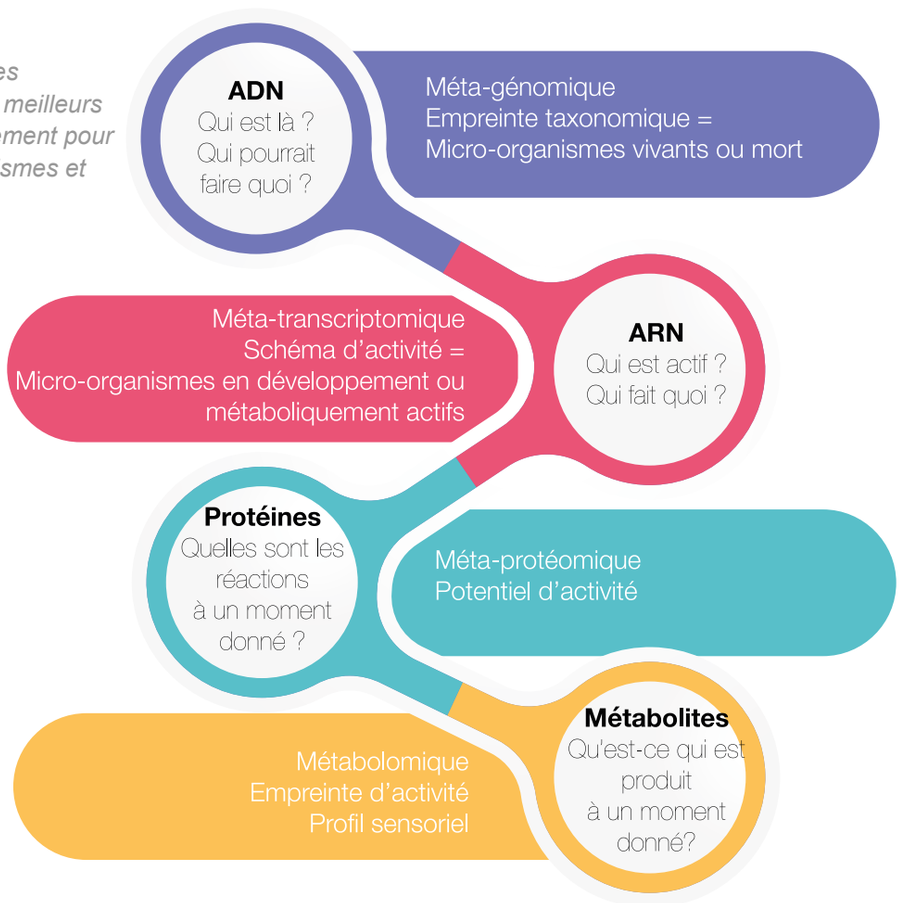
Des équipements haut-débit ont aussi été développés pour analyser les protéines à grande échelle, et donc développer des études « Méta-protéomiques ». Elles sont cependant rarement utilisées dans l'étude les écosystèmes fromagers du fait de la présence d'une très grande quantité de protéines dans le fromage qui interfère avec l'analyse des protéines des microorganismes.

En bout de chaîne, viennent les métabolites, molécules directement issues de l'activité de la cellule, ou bien de son interaction avec les composants du milieu extérieur. Des progrès considérables ont aussi eu lieu dans ce domaine, mais le spectre des molécules à analyser est très étendu, rendant impossible la réalisation d'études (quasi-)exhaustives. Elles peuvent cependant permettre de suivre la production/dégradation de produits d'intérêt comme des acides, des arômes, éventuellement toxines…

Les études utilisant les méthodes traçant les métabolites sont appelées «métabolomique», et à ma connaissance, personne n'a encore utilisé le terme «méta-métabolomique » !

Enfin, il est maintenant d'usage de parler des méthodes méta-omiques qui regroupent principalement les méthodes haut-débits présentées ci-dessus. Le challenge devient d'intégrer l'ensemble de ces résultats pour comprendre le fonctionnement d'un écosystème, voire d'en modifier son évolution.

Les Méta-omiques: des méthodes dignes des meilleurs services de renseignement pour tracer les microorganismes et leurs activités



Revue des ENIL.indd 5 19/06/2019 16:20

Quelques exemples d'applications aux écosystèmes alimentaires

Actuellement, l'immense majorité des études de composition des écosystèmes microbiens est basée sur l'étude d'un seul élément du livret ayant la propriété d'être très conservé pour être facile à détecter. Ces éléments, que l'on qualifie de « marqueurs », correspondent en général à des molécules impliquées dans la machinerie de production des protéines (comme par exemple les ARN ribosomaux 16S très utilisés pour les bactéries), de réplication des chromosomes… Ils permettent de sonder la diversité taxonomique des écosystèmes de manière exhaustive pour actuellement «un moindre coût».

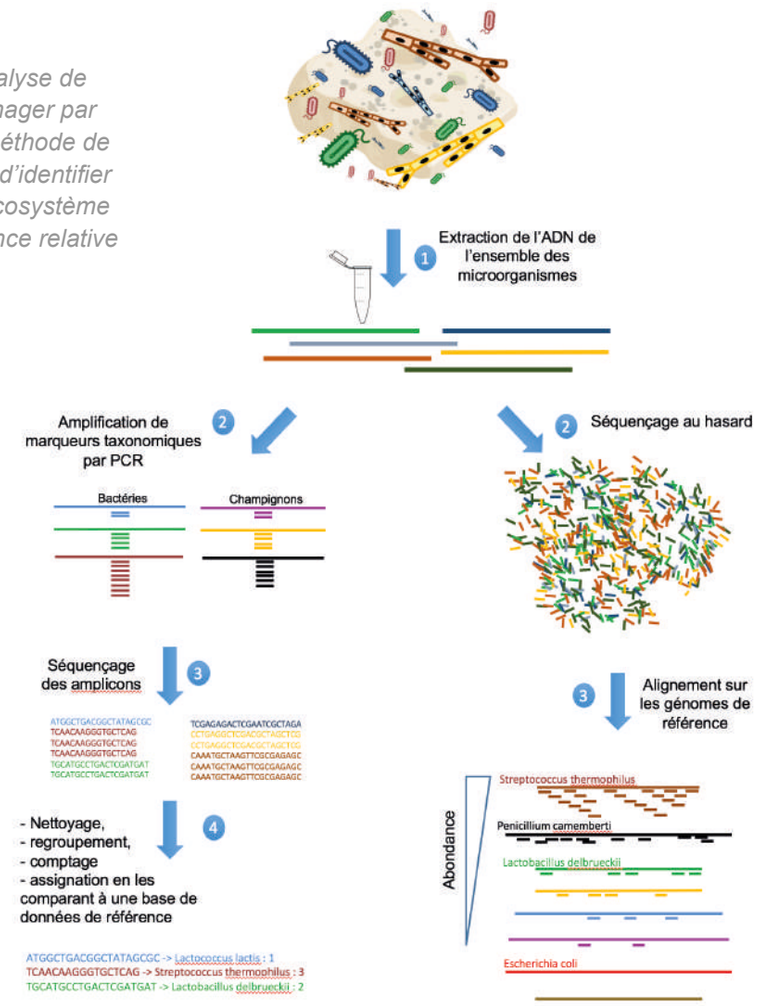
Cependant, ils ne permettent pas toujours d'établir le nom précis des espèces, du fait qu'ils sont trop semblables entre espèces proches. Leur utilisation a permis de mieux cerner la diversité des flores en fonction des procédés, et parfois de détecter des contaminants ou des espèces/groupes mal connus. La comparaison des flores entre produits devient possible à plus grande échelle.

L'utilisation de séquenceurs plus haut débit permet d'analyser non plus seulement des marqueurs, mais des extraits plus ou moins complets des génomes pris au hasard. Leur analyse demande des moyens bio-informatique beaucoup plus importants, puisqu'il faut lire des extraits de nombreux génomes mélangés et retrouver leur origine. Il faut donc comparer chaque extrait à l'ensemble des génomes connus. Exactement comme si des livres étaient découpés en morceau où seules des bribes de phrases restaient lisibles, puis le lecteur en possession d'une brouette de petits papiers cherche à regrouper chaque bride, et en déduire les livres dont elles proviennent, et tant qu'à faire, le nombre d'exemplaires de chaque…

A l'heure des « big data », ce travail est réalisable, et il est alors possible de reconstituer assez précisément le contenu en espèces/sous-espèces, en particulier là où le résultat de certains marqueurs est ambigu. Pour les populations microbiennes les plus abondantes, cette technique va jusqu'à montrer la présence de plusieurs souches de la même espèce, et/ou de caractériser la présence de gènes codants pour des caractères importants (positif comme pour la synthèse d'arômes, ou négatifs, comme des résistances aux antibiotiques…). Enfin, elle permet aussi de mieux quantifier la proportion entre les différentes populations.

Enfin, du fait du développement récent de la méta-transcriptomique, il n'y a encore que peu d'étude publiées montrant l'intérêt de cette méthode dans le cadre de production fromagères.

Exemple du principe de l'analyse de l'écosystème microbien fromager par métabarcoding. C'est une méthode de métagénomique qui permet d'identifier les micro-organismes de l'écosystème et de quantifier leur abondance relative dans l'échantillon analysé.



(4) Identification des microorganismes : Image de la biodiversité de l'échantillon

(3) Comptage du nombre de séquences spécifiques : Image de l'abondance relative d'un mircoorganisme donné dans l'échantillon

Revue des ENIL.indd 6 19/06/2019 16:20

REVUE DES enil

Écologie microbienne et biodiversité

Nature et rôle des moteurs biotiques dans la construction des communautés microbiennes des fromages traditionnels

Françoise IRLINGER Ingénieur de recherche / Scientist, PhD, INRA - AgroParisTech
et Céline DELBÈS, Chargée de recherche, HDR/ PhD, INRA Centre Auvergne-Rhône-Alpes
et Céline SPELLE, Chef de projet, CNAOL

Le projet MétaPDOcheese fait partie des lauréats des grands projets de séquençage 2017 de France génomique. Ce projet, porté par l'INRA (UMR GMPA à Grignon et UMRF à Aurillac) en partenariat avec le Génoscope, le CNAOL et le CNIEL est le fruit d'une réflexion collective des membres du groupe «écosystèmes microbiens» du RMT Fromages de terroir, l'objectif étant d'aider les acteurs des filières AOP à s'approprier les outils «omiques» et de répondre aux questions écologiques portant sur la structuration des communautés microbiennes dans le contexte fromager.

Contexte

Le fromage est produit et consommé depuis plusieurs milliers d'années. Son procédé de fabrication s'est adapté à l'évolution des technologies et des contextes socio-économiques. Indissociables de leur terroir, les 45 fromages d'Appellation d'Origine Protégée (AOP) sont ainsi fabriqués dans une zone géographique définie selon un savoir-faire traditionnel et reconnu comme des produits de hautes qualités, non standardisés, et surtout très diversifiés. Cette diversité peut s'expliquer par la diversification des conditions de production du lait et de transformation.

L'une des spécificités du fromage, qu'il soit produit à partir de lait cru ou de lait traité thermiquement, est de posséder une communauté microbienne particulièrement dense puisque la concentration microbienne peut atteindre des niveaux élevés, jusqu'à plus d'un milliard de cellules par gramme de fromage. Elle est cependant peu complexe par rapport à d'autres écosystèmes, composée de quelques espèces à plusieurs dizaines d'espèces, comportant à la fois des bactéries, des levures et de moisissures. Ces différents groupes microbiens se succèdent sur une échelle de temps réduite. Leur assemblage est influencé par des facteurs biotiques (souvent soumis par les pratiques fromagères, comme la température, l'humidité, le pH) mais aussi par des facteurs abiotiques (interactions microbiennes négatives ou positives). La communauté microbienne des fromages est subdivisée en deux catégories : les populations exogènes, introduites sous la forme de souches isolées, sont des levains commerciaux, composés de bactéries lactiques (ferments d'acidification) et de bactéries acido-sensibles et de levures et de champignons utilisés comme ferments d'affinage. La communauté microbienne locale n'est pas ensemencée et est d'origine diverse (présente dans le lait, ou issue des pratiques d'ensemencement traditionnelles). Plus de la moitié des genres microbiens (bactéries et fongiques) détectés ne provient pas de levains ensemencés mais de cette communauté locale issue du lait et/ou de l'environnement de la fromagerie. Le développement et l'activité de cette communauté microbienne sont garants de la production de produits diversifiés dont les qualités sensorielles, reconnues par le consommateur, nous sont enviées partout dans le monde.

Cependant, la diversité microbienne de fromages fabriqués au lait cru mais aussi pasteurisés est encore loin d'avoir dévoilé tous ses secrets. Les professionnels des filières fromagères peinent en effet soit i) à maintenir la diversité microbienne naturelle apportée par le lait cru, progressivement réduite par la modification des pratiques de traite et de transformation en réponse à la pression sanitaire soit ii) à maintenir les ferments d'affinage utilisés dans leur procédé, le plus souvent peu compétitifs face aux populations microbiennes locales issues de l'environnement fromager. Le constat est donc le même pour l'ensemble des filières fromagères : il existe un manque de connaissances sur l'étendue, l'origine et le devenir des communautés microbiennes, le fonctionnement de l'écosystème fromager en lien avec la composition de la matière première et les pratiques fromagères.

Le développement d'approches métagénomiques et la capacité de traiter en une seule fois un nombre massif d'échantillons, associées à l'utilisation de nouvelles technologies de séquençage à haut débit, offre aujourd'hui l'opportunité de caractériser finement l'extraordinaire richesse des communautés microbiennes colonisant ces fromages.

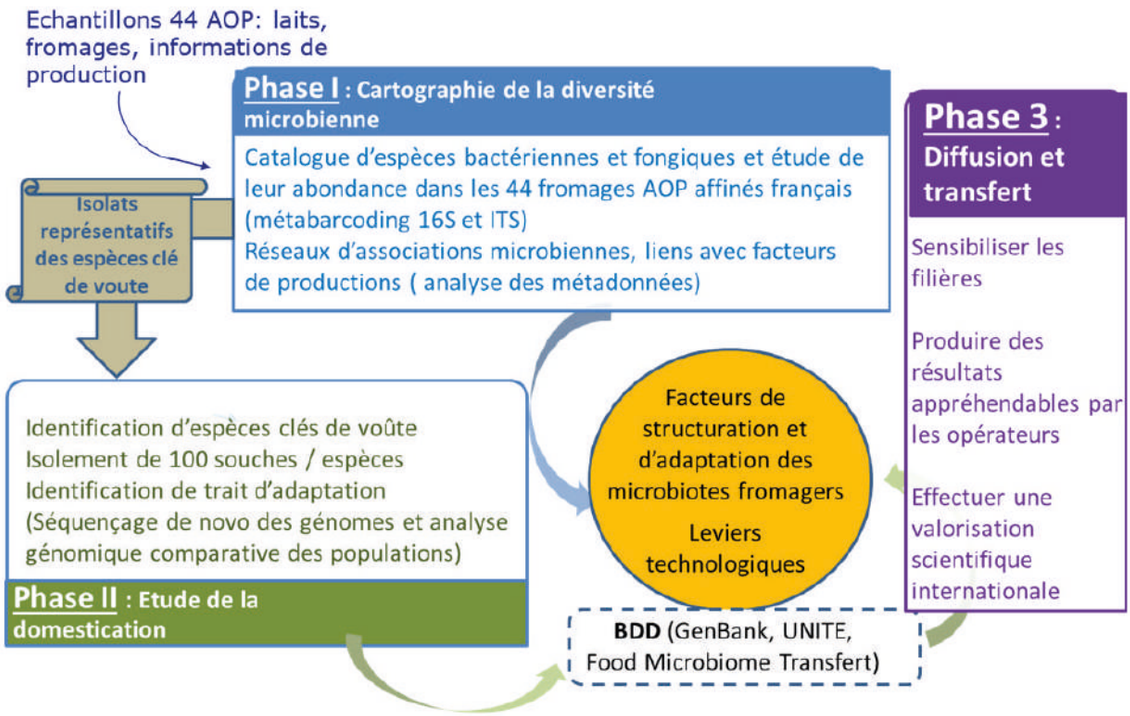
Revue des ENIL.indd 7 19/06/2019 16:20

Enjeux scientifiques et technologiques

La communauté microbienne des fromages, en grande majorité cultivable et moins diversifiée que celle du sol ou du microbiote humain, offre un modèle de choix pour étudier la structure, l'histoire évolutive et la fonction des communautés microbiennes en utilisant des outils tels que la métagénomique.
Elle peut aider les scientifiques mais aussi les professionnels à progresser dans la compréhension de certaines questions écologiques, portant sur les processus d'assemblage, de dispersion et d'extinction mais aussi les processus d'adaptation des espèces microbiennes présentes dans les fromages.
- Quels sont les facteurs qui façonnent la diversité microbienne spécifique à l'atelier, à la zone AOP, à la région, au territoire français ? Quelle est la relation entre la diversité des espèces et les spécificités des pratiques de production de lait et de fromage ? Ce type de connaissances va permettre d'optimiser les modes de gestion des écosystèmes microbiens du fromage en i) appréhendant l'assemblage des communautés microbiennes en relation avec la matrice fromagère et les pratiques technologiques, et ii) en identifiant des leviers (paramètres technologiques, pratiques d'inoculation) favorisant le maintien de communautés microbiennes autochtones adaptées à la production de fromages traditionnels de haute qualité.
- Existe-t-il des traits de domestication ou de diversification des espèces d'origine laitière ? Pour une espèce donnée, quelle est la diversité phénotypique et génétique parmi les souches sauvages (non inoculées) isolées des fromages AOP français traditionnels, comparées aux souches de référence disponibles dans les collections internationales de microorganismes, aux souches d'autres milieux ou isolées du fromage antérieurement ?

Objectifs

Les objectifs du projet sont de i) explorer la diversité microbienne de fromages affinés issus des 44 filières AOP et des laits associés, au niveau de l'espèce et leur abondance, ii) identifier les espèces clés de voûte autochtones et les interactions entre populations (autochtones et exogènes), iii) comprendre les facteurs qui permettent l'assemblage de ces communautés fromagères, iv) comprendre les processus d'adaptation des populations endogènes non ensemencées au contexte fromager.



Le séquençage de novo consiste à obtenir la séquence d'un organisme pour lequel il n'existe pas une séquence de référence dans les bases de données. Il s'agit donc de l'assemblage de données de séquences d'un génome inconnu. (Source : https://www.france-genomique.org)

Revue des ENIL.indd 8 19/06/2019 16:20

Le projet et les résultats attendus

La stratégie que nous proposons est dans un premier temps d'établir un inventaire exhaustif de la diversité microbienne phylogénétique de l'ensemble des 44 fromages affinés AOP et des laits associés à l'échelle du territoire national mais aussi à l'échelle de la filière et de l'atelier grâce au séquençage haut-débit, par métagénomique type amplicon (métabarcoding), d'un grand nombre d'échantillons (près de 6000). Cette approche permet, i) d'aborder l'écologie de ces communautés microbiennes au niveau de l'espèce à différentes échelles (atelier, technologie, filière, région) et ii) d'augmenter significativement la généricité des connaissances obtenues à propos de la structure des communautés microbiennes fromagères, la co-occurrence ou non entre espèces, en lien avec les paramètres technologiques et environnementaux, données qui font tant défaut encore actuellement, iii) de révéler la présence de nouvelles espèces microbiennes sous-dominantes et potentiellement d'intérêt technologique. Le traitement statistique de ce remarquable jeu de données associé avec les métadonnées fournies par les filières portant sur les pratiques de production permettra d'identifier les facteurs, les leviers favorisant l'assemblage de ces communautés et une diversité microbienne élevée.

- La deuxième étape consiste à isoler plusieurs centaines de souches représentatives de six espèces microbiennes (3 espèces fongiques et 3 bactériennes) identifiées dans la première phase comme espèces clés dans le processus de fabrication de fromage. Le séquençage de novo, l'annotation et la comparaison de leur génome seront réalisés afin d'étudier les mécanismes d'adaptation au contexte fromager et rechercher des éléments génétiques caractéristiques d'une «domestication» (acquisition ou perte de gènes, transfert horizontal, profil de variabilité).

Enfin, un des enjeux du projet est de permettre une sensibilisation des filières à la diversité microbienne de leurs produits et aux applications possibles des outils de métagénomique. L'objectif est d'aboutir à des résultats facilement appropriables par les filières et leurs opérateurs.

Le calendrier du projet

Le projet a été initié il y a deux ans en 2017 pour une durée de quatre ans.

	Phase 1 Cartographie de la diversité microbienne des fromages AOP	Phase 2 Retracer l'histoire récente des souches	Phase 3 Communication et diffusion
2017	• Collecte des laits et des fromages (1600) • Préparation et stockage des échantillons		
2018	• Extraction des ADNs des laits et des fromages (2800) • Amplifications des marqueurs bactériens des fromages • Séquençage des marqueurs bactériens des fromages		→ Journée de sensibilisation au Génoscope
2019	• Analyse bioinformatique et statistique des séquences bactériennes des fromages • Amplification et séquençage des marqueurs bactériens des laits • Amplification et séquençage des marqueurs fongiques des laits et des fromages		→ Fiche résultats par filière
2020	• Analyse bioinformatique et statistique de l'ensemble des séquences générées en lien avec les métadonnées décrivant les pratiques	→ Choix des espèces à étudier en phase 2 • Isolement de 600 souches (sur fromages et autres milieux)	→ Séminaire de restitution **phase 1**
2021		• Séquençage *de novo de* 600 génomes d'isolats	→ Publications scientifiques

Revue des ENIL.indd 9 19/06/2019 16:20

Une application sur les filières fromagères AOP et IGP pour l'étude de la biodiversité et de l'écologie microbienne du lait de cuve à la fin de l'affinage

Nicolas ORIEUX, Docteur en écotoxicologie, Directeur-Adjoint ENIL Besançon-Mamirolle

Durant les 3 dernières années, le pôle de R&D Rochois composé d'ACTALIA (La Roche-sur-Foron), du CERAQ et de l'ENILV (La Roche sur Foron) en partenariat avec les représentants des filières (AFTALP) a mené le projet ERASMO. Le but était d'étudier les dynamiques microbiennes des populations endogènes (du lait) et exogènes (des levains et de l'environnement) en cours de fabrications sur 3 technologies fromagères savoyardes (1 pâte pressée cuite et 2 pâtes pressées non cuites) grâce à la méthode de métabarcoding.
Pour chaque technologie, 11 points de prélèvements ont été réalisés (Fig 1) en 3 répétitions (3 jours successifs), dans 4 ateliers et au cours de 2 saisons (été et hiver). Cela totalise 792 échantillons. L'encodage des échantillons est précisé Fig 2.

Evolution de la biodiversité au cours du procédé de fabrication

La biodiversité est mesurée par le nombre de taxons détectés, aussi appelée richesse spécifique et peut également l'être par l'indice de Shannon (Fig 3). Ce dernier tient compte du nombre de taxons trouvés mais aussi de la proportion de chaque taxon. Dans un environnement riche, l'indice est élevé si les taxons sont tous équitablement représentés et l'indice est faible si quelques taxons sont dominants.

La plus forte biodiversité est dans le lait cru où l'on comptabilise entre 120 et 130 taxons bactériens pour un indice de Shannon de 3, très élevé. A l'inverse, la plus faible biodiversité est détectée dans les ferments. Dans la pâte et la croute fromagère, la richesse spécifique est stable au cours de l'affinage, entre 30 et 60 taxons mais l'indice de Shannon augmente ce qui signifie que les équilibres se reforment. Les flores majoritaires issues de l'ensemencement laissent progressivement leur place aux flores d'affinage. Dans un précédent article, nous avions appelé ce phénomène « la reconquête de la biodiversité ». Cette reconquête est plus importante dans la croute que dans la pâte.
Concernant les levures et les moisissures, la biodiversité est beaucoup plus variable selon les échantillons, et la dynamique est inversée par rapport aux bactéries, surtout dans la croute où l'on observe une chute de la biodiversité au cours de l'affinage. En général, une espèce domine l'écosystème fromager même si elle était très minoritaire dans le lait.
Il est à noter que les ferments ont été analysés sous forme de mélange, que la concentration de levures et moisissures était parfois très faible (quand non ensemencé) ou très élevée (si flores d'affinage ensemencée) et que l'atmosphère de fromagerie ensemence très vite les échantillons ce qui explique la grande variabilité de la biodiversité fongique des ferments. Nous ne la commenterons donc pas.

La saumure apparait quant à elle comme un véritable vivier de biodiversité, la richesse spécifique bactérienne et fongique y est surprenante et mériterait plus d'investigations.

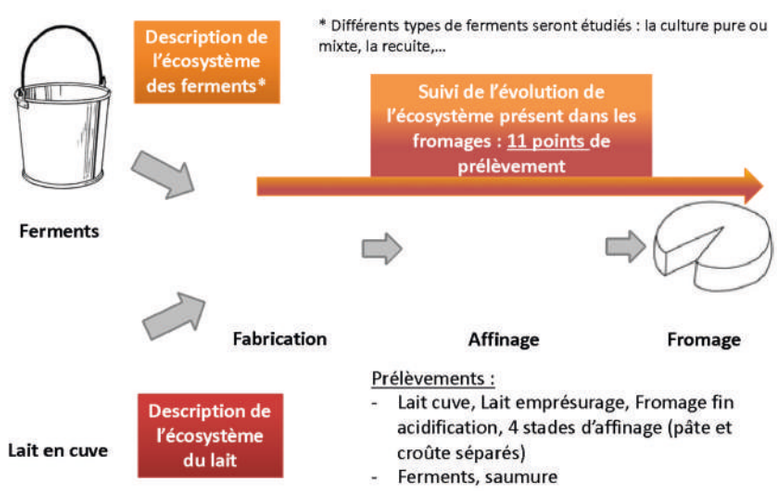


Fig 1 : Schéma d'échantillonnage

Revue des ENIL.indd 10 19/06/2019 16:20

Saison	Techno	Atelier	Répétition	Echantillon	Jour de prélèvement +
Été (E) Hiver (H)	PPC	A B C D	a b c	(L) Lait (FT) Ferment (LAE) Lait à l'emprésurage (P) Pâte (C) Croute (M) Mocasse * (MO) Morge * (S) Saumure	J0 J1 J7 JAL (avant lavage) J8 J12 J15 J20 J30 J60 J100
	PPNC 1	E F G H			
	PPNC 2	I J K L			

Fig 2 : Codification des échantillons

** Selon la technologie et l'atelier*

+ Selon la durée d'affinage de la technologie

Mocasse : Solution issue du frottage/lavage des fromages en sortie de séchoir pouvant servir à tremper les fromages après salage." (terme spécifique à une des filières PPNC du projet) (Source : projet DOCAMEX)

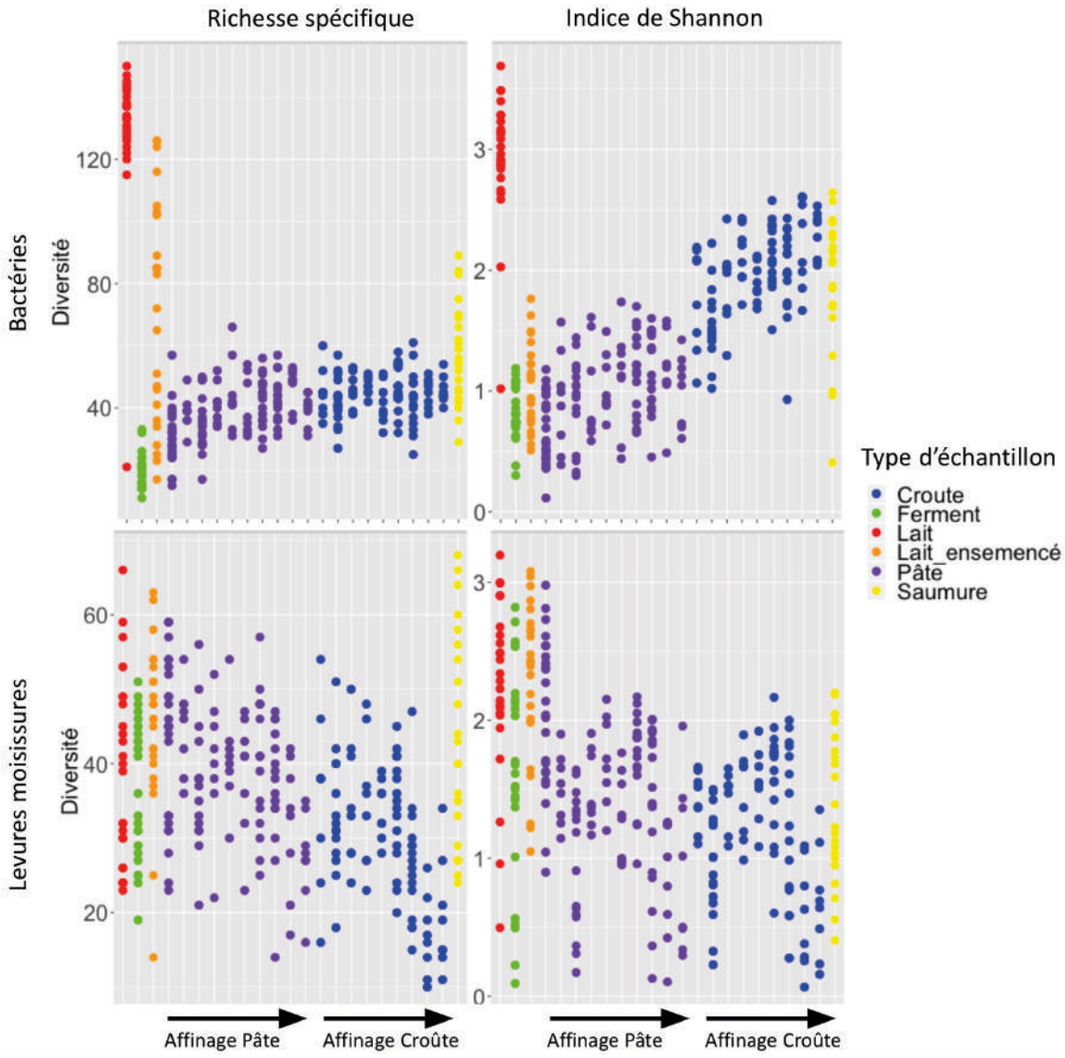


Fig 3 : Biodiversité bactérienne ou fongique de tous les échantillons du projet ERASMO exprimée en nombre de taxon (richesse spécifique) et en indice de Shannon.

Revue des ENIL.indd 11 19/06/2019 16:20

Dynamique des flores majoritaires au cours de procédé de fabrication

Le diagramme d'abondance relative (%) des espèces bactériennes majoritaires dans un atelier et une saison (Fig 4) montre qu'au début de l'affinage, ce sont les flores ensemencées d'acidification comme *Streptococcus* et *Lactobacillus* qui occupent l'essentiel de l'écosystème. Elles restent majoritaires dans la pâte mais elles ne sont probablement plus actives car il n'y a plus de lactose à dégrader. Sont-elles mortes ? Il est impossible de répondre à cette question car le métabarcoding peut détecter les bactéries vivantes et mortes.

Dans la croute, les *Streptococcus* et les *Staphylococcus* sont très majoritaires au début puis s'estompent progressivement pour laisser la place aux flores d'affinage. Les *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Facklamia* et *Sphingobacterium* sont des flores cutanées des mammifères, probablement ensemencées lors de la traite et se développent grâce à la désacidification du milieu et la dégradation des protéines. On notera également la croissance *d'Halomonas*, flore halophile, probablement ensemencée par la saumure. Les seules 10 flores majoritaires illustrent bien la reconquête de la biodiversité dans la croute.

Le même phénomène est observé pour les levures et les moisissures, la levure de désacidification ensemencée *Debaryomyces* est majoritaire au début de l'affinage dans la pâte et la croute puis elle laisse la place à *Fusarium* qui donnera la structure de la croute typique de cette pâte pressée cuite. L'abondance de ces flores dans la pâte montre bien que l'affinage se fait par la croute et que les levures moisissures pénètrent profondément dans la pâte fromagère.

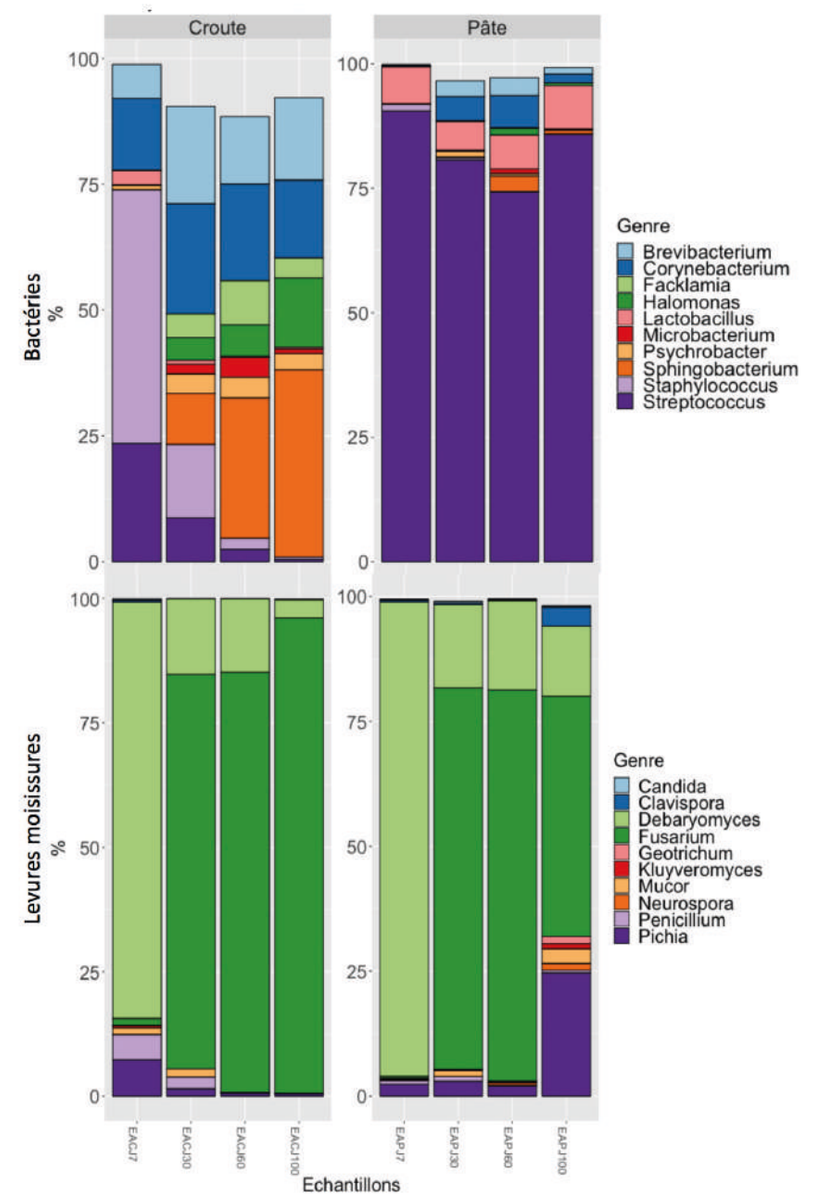


Fig 4 : Evolution des 10 genres majoritaires des écosystèmes bactérien et fongique dans la pâte et la croute des échantillons d'été de l'atelier A (PPC).

Revue des ENIL.indd 12 19/06/2019 16:20

Ce que révèle le « code barre » des 3 technologies

La technique du métabarcoding permet de comparer les écosystèmes complets de différents échantillons, c'est là tout son intérêt. De fait, elle a permis dans le cadre du projet ERASMO d'observer d'abord la biodiversité du lait cru puis d'évaluer si les flores persistent ou non dans l'environnement. Une visualisation en « code barre » de densité microbienne (Fig 5) permet d'identifier la présence de 141 genres bactériens dans le lait cru (74 genres de levures et moisissures, résultat non montré).

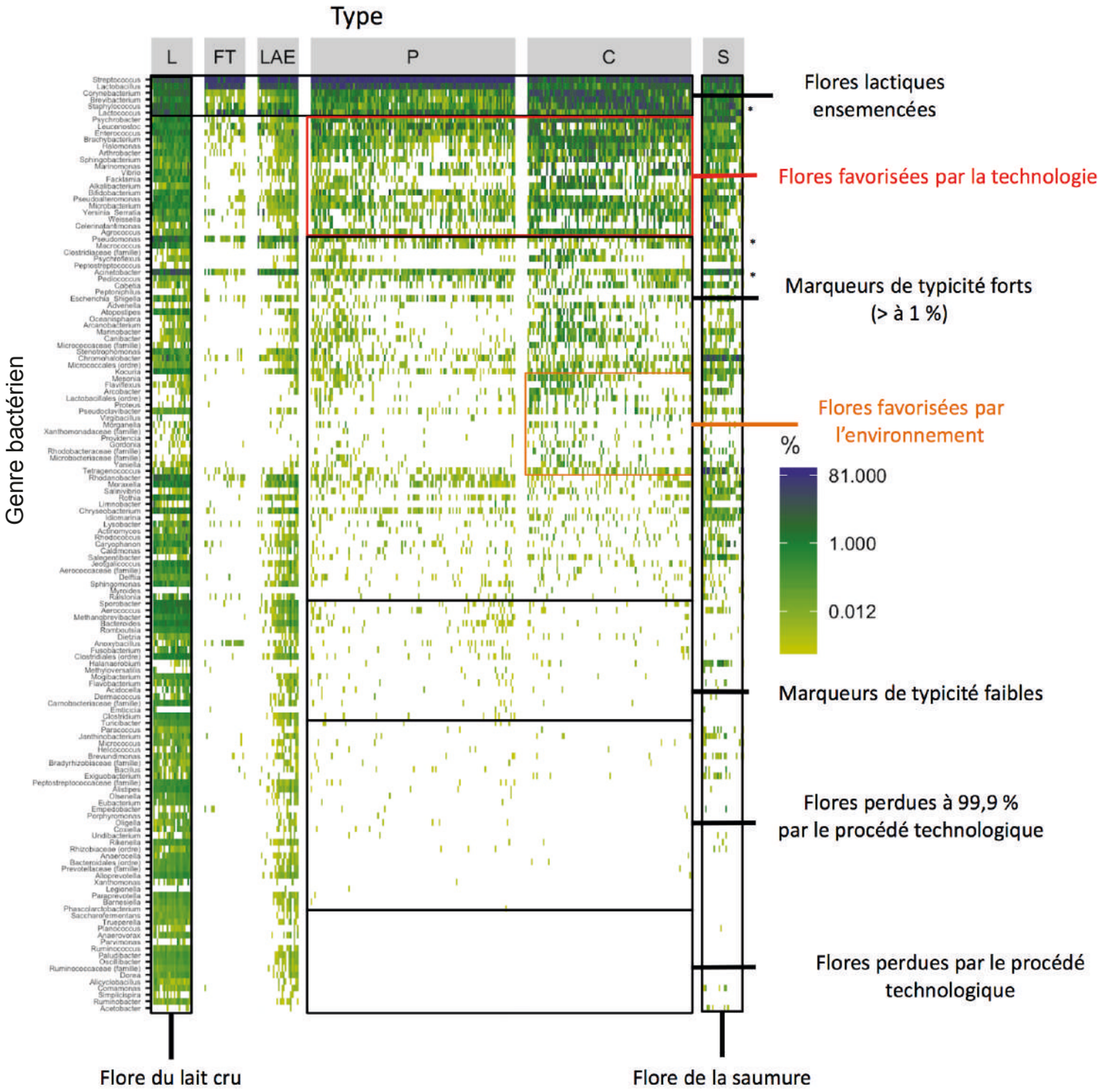


Fig 5 : Carte de densité des genres bactériens dans tous les échantillons. On distingue les flores lactiques ensemencées, les flores du lait cru favorisées ou perdues par la technologie ainsi que les marqueurs de typicité.
Marqueurs de typicité forts : micro-organisme présent dans au moins 3 échantillons à plus de 1 % de l'écosystème
Marqueurs de typicité faibles: micro-organisme présent dans au moins 3 échantillons à plus de 0,01 % et moins de 1 % de l'écosystème
** : genre bactérien ubiquiste (que l'on retrouve partout)*

Revue des ENIL.indd 13 19/06/2019 16:20

Ces souches ont des devenirs très différents au cours du procédé de fabrication, nous les avons alors classés en 6 catégories :

• Probablement perdues par la technologie (15 genres soit 11%) : elles ne sont retrouvées avec cette méthode dans aucune matrice. L'environnement fromager et le procédé technologique n'ont pas permis leur survie.

• Non retrouvées à 99,9 % (29 genres soit 21%) : Elles sont présentes de façon significative dans les laits mais ne sont ensuite détectables que très rarement, voire de façon aléatoire, dans la matrice fromagère.

• Marqueurs de typicité faible (18 genres soit 13%) : Elles sont présentes dans le lait et persistent parfois dans la matrice fromagère. Les tests statistiques réalisés (Permanova, p-value : 0,95) montrent qu'elles ne sont pas présentes de façon aléatoire mais dépendent de facteurs environnementaux ou technologiques que nous n'avons pas encore identifiés. Mais quel défi !

• Marqueurs de typicité forts (55 genres soit 39%) : Elles persistent à des niveaux d'abondance différents dans une grande partie des échantillons, ceci semblant fonction des ateliers considérés. Elles sont donc potentiellement des marqueurs de typicité des fromages. Certaines sont même faiblement présentes dans le lait et se développant bien dans la croute.

• Flores favorisées par la technologie (18 genres soit 13 %) : Elles sont présentes dans la pâte et la croute fromagère à des pourcentages supérieurs à ceux du lait. Elles sont donc favorisées par le procédé de fabrication à des degrés différents et semblent également des marqueurs de typicité potentiels.

• Flores lactiques ensemencées (6 genres soit 4%) : Ce sont des ferments d'acidification ou d'affinage bien connus et classiques. Ils sont pour la plupart ensemencés. Il est à noter que des souches sont également naturellement présentes dans le lait. Il est fortement probable que ce soient des souches différentes. Il semble particulièrement important de noter que le métabarcoding ne permet pas de différencier les souches d'une même espèce entre elles (notamment souches commerciales – souches autochtones).
Il est remarquable que tous les genres bactériens détectés dans le fromage soient présents naturellement dans le lait, y compris les flores ensemencées. Cela révèle que l'ensemencement devrait être renommé « renforcement » car il permet de donner un coup d'accélération à un genre pour s'imposer dans l'écosystème au moment souhaité et d'inoculer une souche sélectionnée pour son aptitude technologique bien-sûr. Peu de taxons du lait cru sont perdus par la technologie démontrant ainsi que le lait cru est bien un pourvoyeur de typicité. Le nombre de flore dont la croissance est favorisée spécifiquement par une technologie donnée est impressionnant et montre bien que la typicité est produite par deux facteurs indissociables : la flore du lait cru d'une part et le savoir-faire fromager d'autre part.

Chaque technologie possède son propre profil d'écosystème, ce qui permet de les différencier. Ce véritable « code barre » est présenté en Fig 6 pour les croutes des 3 technologies. Au total 39 genres bactérien et 26 genres fongiques, soit respectivement 28 et 35 % du total, sont présents de façon différentielle dans au moins 2 technologies. Ils ne semblent pas représenter des marqueurs de typicité mais être dépendant du chemin technologique. Vu que les laits crus de départ son quasiment identiques, ils sont de véritables révélateurs de la « spécificité de chaque atelier de transformation fromagère ».

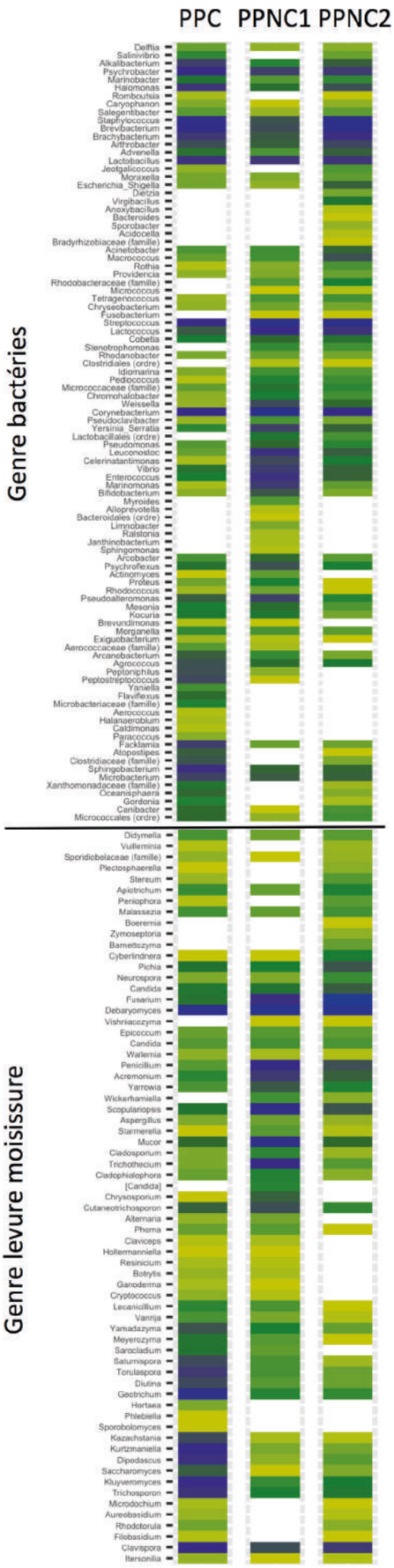


Fig 6 : « Code Barre » des croûtes des 3 technologies obtenu par fusion des échantillons. L'échelle de couleur des pourcentages est identique à celle de la Fig 5.

Revue des ENIL.indd 14 19/06/2019 16:20

Compétition Lait vs Ferments et chemin technologique

L'analyse multifactorielle de type NMDS permet de comparer les écosystèmes des échantillons entre eux. Plus les échantillons sont éloignés sur le graphique, plus ils sont différents, plus ils sont proches sur le graphique, plus ils sont similaires. Comme on peut le voir sur la Fig 7(A), les échantillons de lait cru et de ferments forment des groupes resserrés et éloignés. Le contenu de leur écosystème est donc très différent. Les échantillons de lait ensemencé sont quant à eux la résultante d'une mise en compétition entre les écosystèmes du lait et des ferments. Les échantillons de pâte et de croute prennent ensuite un chemin perpendiculaire sous l'effet de la technologie et de l'environnement de fromagerie. L'écosystème de la pâte est plus proche du ferment et s'en éloigne moins au cours de l'affinage que les croutes. Enfin, la saumure prend elle aussi un chemin perpendiculaire mais son écosystème reste plus proche du lait, restant ainsi un réservoir de biodiversité, façonné par la salinité. La Fig 7(B) résume ce jeu de compétition et d'évolution.

Pour les PPC, l'écosystème du lait cru est plus conservé après l'ensemencement et la croute s'éloigne plus de la diagonale Lait/Ferment, c'est donc la technologie qui semble laisser le mieux exprimer la biodiversité du lait cru et pour laquelle le procédé de fabrication et l'environnement ont le plus d'effet. A l'inverse, le procédé technologique de PPNC1 permet une moindre expression de la biodiversité du lait, et toute proportion relative, a moins d'impact sur l'écosystème au cours de l'affinage. PPNC2 est quant à elle à un niveau intermédiaire de compétition Lait/Ferment et d'impact technologique et environnemental.

Ces résultats démontrent probablement que le traitement thermique du lait cru nécessite un ensemencement plus faible et a un impact plus fort sur le chemin emprunté par l'écosystème au cours de l'affinage.

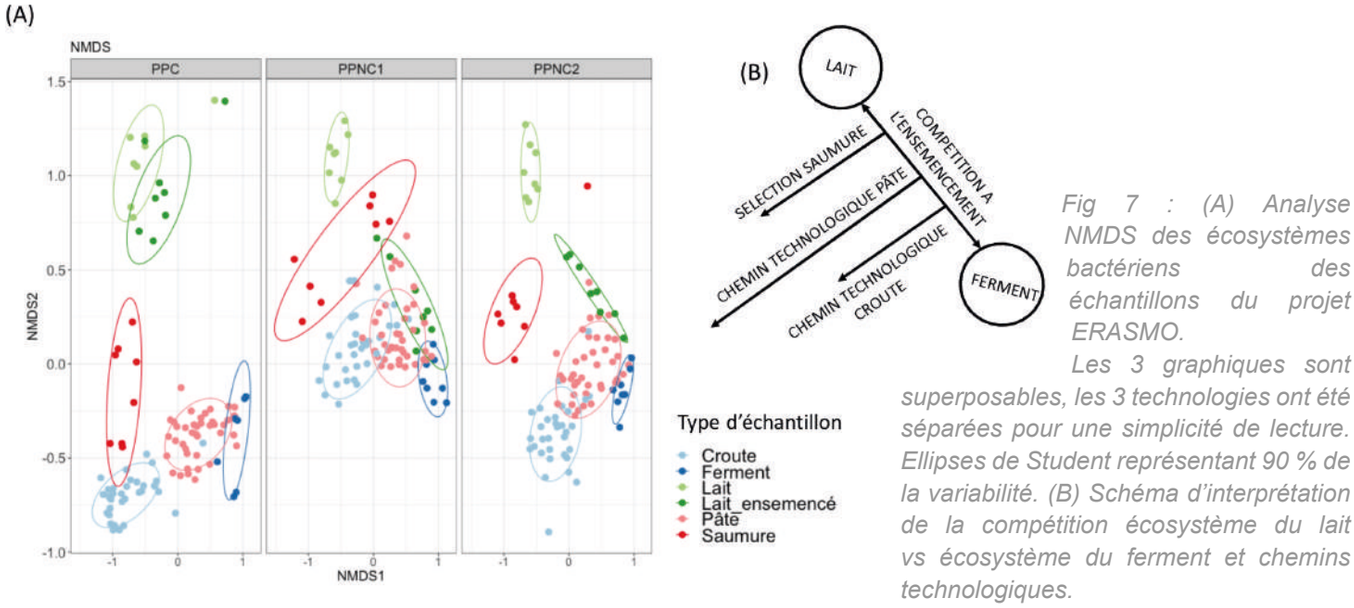


Fig 7 : (A) Analyse NMDS des écosystèmes bactériens des échantillons du projet ERASMO. Les 3 graphiques sont superposables, les 3 technologies ont été séparées pour une simplicité de lecture. Ellipses de Student représentant 90 % de la variabilité. (B) Schéma d'interprétation de la compétition écosystème du lait vs écosystème du ferment et chemins technologiques.

Conclusion

Le projet ERASMO a montré que le métabarcoding était une technique innovante permettant d'accéder à l'ensemble des écosystèmes microbiens d'un nombre conséquent d'échantillons. Cela nous donne une vue différente de nos produits, plus globale, plus comparative, plus humble aussi. Nous avons enfin ouvert la boite noire des flores minoritaires des fromages au lait cru ! Mais, dans la lumière, après nous avoir émerveillé, la complexité fait parfois mal aux yeux. En effet, avec 141 genres bactériens et 74 genres fongiques détectés, dont la plupart persistent du lait cru au fromage, la compréhension de l'évolution de l'écosystème en fonction de la technique semble ardue. La technique de fabrication a pourtant un effet significatif dont nous comprenons les grands principes. Chauffer, saumurer et presser, par exemple, permettent d'orienter l'évolution du développement des microorganismes. Il reste cependant beaucoup de subtilités à découvrir avant de pratiquer l'écologie microbienne dirigée que beaucoup de fromagers souhaitent. Il semble, aux vues de nos résultats, que la typicité soit issue d'une combinaison de facteurs liés au process, à l'environnement et peut-être aussi au hasard. Nous analyserons, en tous cas, ces résultats plus en profondeur dans les mois qui viennent afin de déterminer quels paramètres techniques ont le plus d'effet sur la dynamique de l'écosystème microbien des fromages au lait cru. La suite au prochain épisode…

Revue des ENIL.indd 15 19/06/2019 16:20

Appropriation de ces méthodes par les filières sous signe de qualité

Intérêt du développement de ces méthodes pour les filières fromagères françaises

Delphine JEAN, Enseignante, ENIL Saint-Lô Thère

Présentation Interview

Sébastien BRETON

- Directeur de l'AFTAlp (Association des Fromages Traditionnels des Alpes Savoyardes)
- Administrateur de CERAQ (mise en œuvre des travaux de R&D de l'AFTALp et des Chambres d'Agriculture Savoie-Mont Blanc et Isère) - Travaux principaux autour du lait cru.
- Directeur Général du CNAOL (Conseil National des Appellations d'Origine Laitières)

Le plus important pour le CNAOL est que chaque filière AOP garde ses particularités. Les expériences locales et les travaux menés avec AFTAlp servent d'exemples et assurent la crédibilité des différents outils utilisables. Le CNAOL aide donc chaque filière à s'approprier les outils afin de conduire des stratégies qui leur sont propre, en lien avec les RMT.

Le besoin de caractériser la flore microbienne des fromages semble être une préoccupation depuis plusieurs années, surtout pour les fromages des Alpes ? Est-ce exact ?

Au départ, de façon empirique, l'attachement aux pratiques séculaires codifiait la diversité de la flore. Par exemple : système d'ensemencement traditionnel, repiquage de lactosérum, culture sur recuite… Il y avait déjà un pilotage des flores naturelles et d'ambiance.

En Savoie, en Franche-Comté, en Auvergne et en Normandie, le questionnement autour des communautés microbiennes a toujours animé les filières laitières. Ces questions sur l'écosystème microbien des fromages ont été traitées depuis les années 80 par les méthodes pasteuriennes. Ces méthodes sont plus longues et difficiles à mettre en œuvre que les outils actuels comme la métagénomique, et ne permettaient pas de traiter le sujet de manière globale.

Depuis 10 ans le CNAOL, via le réseau RMT Fromage de terroir (opérationnel depuis le 01/02/2009), avec l'appui du CNIEL, a une réelle volonté d'améliorer et de consolider les connaissances sur la richesse des écosystèmes microbiens des fromages AOP et du lait cru. Et de voir comment cette richesse influe sur la qualité des produits et comment on peut sauvegarder cette richesse.

Aujourd'hui, grâce aux outils métagénomiques, à partir d'un simple échantillon, nous pouvons avoir une idée beaucoup plus précise et rapide de l'écosystème microbien.

Cependant, il ne faut pas que ces méthodes nous donnent seulement une représentation à un instant T de la flore microbienne d'un fromage.
Nous espérons que la métagénomique puisse nous aider à comprendre l'évolution de la flore microbienne dans un fromage au cours du temps.
Grâce à ces outils, les fromagers vont pouvoir poser des hypothèses sur les conséquences de l'évolution de leurs pratiques et les vérifier plus rapidement et facilement.

La métagénomique est un outil utile à la réflexion des fromagers.

Ces méthodes vont nous amener des éclairages mais le côté empirique dans la fabrication des fromages reste essentiel.

réseau Fromages de Terroirs — cnaol CONSEIL NATIONAL DES APPELLATIONS D'ORIGINE LAITIÈRES — A.O.P.

Revue des ENIL.indd 16 19/06/2019 16:20

Depuis la mise en route du projet MetaPDOCheese (2017), y-a-t-il eu des résultats ? et ces résultats sont ils à la hauteur des attendus ?

Le projet MétaPDOCheese concerne les 44 fromages affinés AOP et comptabilise près de 440 laits et 1300 fromages.
Les premiers résultats de l'étude, en mars 2019, portent sur l'ensemble des fromages AOP (les grandes et petites appellations) ce qui est un des atouts du projet (travail dans une sorte d'universalité pour que toutes les filières en soient au même niveau de connaissance).

L'objectif de ce projet est de montrer la diversité microbienne entretenue par la famille des fromages AOP et de comprendre la structuration de ces écosystèmes microbiens.
De plus, ce projet va permettre de communiquer auprès du grand public à propos de la biodiversité présente : « Les fromages sont des produits vivants et l'importance de la biodiversité présente est à conserver ».

Aussi, depuis 5 ans, en Savoie et Auvergne d'autres études comparables au projet MétaPDOCheese ont été menées.

Les résultats ont montré qu'il existe une grande diversité microbienne dans les laits (jusqu'à 120 espèces différentes même pour des laits dont la charge microbienne est faible) et que cette diversité s'exprime tout au long de la vie des fromages. Par exemple, des bactéries en faible proportion dans le lait vont se retrouver en plus grande proportion au cours de l'affinage et intervenir dans les processus de maturation.
Ces études confirment donc ce que chaque fromager – affineur pouvait pressentir par leurs analyses de tous les jours.

Quels sont les partenariats de MetaPDOCheese ?

Les partenariats sont à la fois à l'échelle locale et nationale :
• Localement : échantillonnage (industriel et/ou fermier), acheminement et suivi technique (par appellation et par saison);
• Nationalement :
- INRA : préparation des échantillons, extraction de l'ADN et surtout analyse des données informatiques (cœur du dispositif).
- Génoscope : établissement des profils génétiques (métagénomique) : données brutes.
L'intérêt, au-delà de la description, est de voir la diversité et les évolutions entre produits, et dans un même produit à divers moments (saison, affinage, …) et de connaître l'influence des facteurs technologiques.

On observe déjà des process de transformation qui induisent des évolutions sur la dynamique des fromages.

Quels développements peut-on attendre du projet MetaPDOCheese ?

Il existe un développement de divers projets autours de la question de la biodiversité microbienne des fromages :
• Normandie : caractérisation des prairies et lien avec le lait ;
• Franche-Comté : diversité des sols et lien avec le lait ;
• Travaux sur le Saint Nectaire par rapport à la diversité microbienne de l'ambiance

On pressent que les divers facteurs technologiques, comme le stockage du lait, le refroidissement du lait, la maturation, …, ont une influence sur l'évolution des populations microbiennes que cela soit positivement (flore lactique) ou négativement (flore pathogène) ; mais les méthodes pasteuriennes ne nous permettent pas de les cerner complètement.
On espère que les méthodes métagénomiques vont nous permettre de répondre à ces questions dont l'enjeux est technologique (apport au goût) et aussi et surtout sanitaire.

Un nouveau projet a été mis en place pour valoriser le projet MetaPDOCheese : projet ADAMOS (Casdar) dont l'objectif est d'approfondir et de valoriser les résultats obtenus par MetaPDOCheese. Le travail portera sur :
• Des hypothèses telles que l'influence des températures, la diversité de départ (lait, ferment), les caves d'affinage…
• Différentes échelles (industriel, fermier);
• Différentes régions.

Revue des ENIL.indd 17 19/06/2019 16:20

Au-delà de l'étude des génomes des populations microbiennes, y a-t-il ou y aura-t-il des études qui porteront sur une vision plus métabiologique des fromages et des laits, notamment sur les métabolites résultant de l'activité des micro-organismes ?

En effet, au-delà de savoir quelles sont les bactéries présentes, il est important de savoir à quoi elles servent, comment elles fonctionnent.
C'est un questionnement très important, cependant en termes de méthode tout n'est pas encore stabilisé. Le projet ADAMOS va initier ces questionnements.

Dans le projet MétaPDOCheese, comment s'articulait l'organisation entre les prélèvements en atelier et l'action des partenaires techniques ?

Pour chacune des appellations, c'est plutôt la diversité des fabrications qui a orienté le choix d'échantillonnage (industriel/fermier, saisonnalité…). Les prélèvements ont été assurés par les équipes techniques des filières.
Le coeur du projet est l'analyse statistique des données qui est faite par des équipes de l'INRA. Ces équipes sont à la pointe puisqu'elles travaillent déjà sur la caractérisation du microbiote digestif humain et celui des océans (programme "Tara océan", à lire l'article du journal du CNRS : La révolution métagénomique).

L'utilisation des techniques métagénomiques (extraction ADN, séquençage, …) va devenir de plus en plus facile. Le véritable enjeu pour les filières va être la maîtrise de l'analyse de la bioinformatique.

En effet, la bioinformatique fait appel à de toutes nouvelles compétences. Le projet MetaPDOCheese a donc aussi comme objectif de sensibiliser les filières AOP à ces nouvelles compétences, à leurs utilisations et à leurs exploitations.
Il y a donc une nécessité de faire aussi évoluer les programmes scolaires pour prendre en compte ce nouveau besoin: La bioinformatique. Dans ce cadre, un des rôles du RMT Fromage de terroir est de collaborer avec le Réseau des ENIL pour valoriser les projets de R&D (dont MetaPDOCheese). De plus, il existe des partenariats au niveau local de plus en plus actif entre les écoles et les professionnels pour diffuser les connaissances professionnelles, pour les rendre plus concrètes.

Lexique

ODG : Organismes de Défense et de Gestion
IGP : Indication Géographique Protégée
AOP : Appellation d'Origine Protégée
RMT : Réseau Mixte Technologique
Ceraq : Centre de Ressources pour l'Agriculture de Qualité et de montagne
Casdar : Compte d'Affectation Spécial « Développement Agricole et Rural »
Financement du Ministère de l'Agriculture

Revue des ENIL.indd 18 19/06/2019 16:20

Technologie laitière

Construction des écosystèmes microbiens des fromages de type Cantal : l'influence des systèmes de production du lait au pâturage

Marie FRETIN, Ingénieure de recherche Junior, INRA Centre Auvergne-Rhône-Alpes

De la vache au fromage : diversité et dynamique des communautés bactériennes

En Auvergne, les systèmes d'élevage laitier disposent d'une importante ressource herbagère. L'ingestion de régimes à base d'herbe améliore les qualités sensorielles et nutritionnelles des fromages mais ces effets ne sont que partiellement compris. Ils semblent en partie liés aux microorganismes du lait cru. La peau des trayons est souvent considérée comme un réservoir majeur de la diversité microbienne des laits crus. D'autres sources peuvent être à l'origine de l'ensemencement du lait telles que l'environnement des animaux (eau, air, litière, alimentation) et le matériel de traite (machine à traire, tank à lait). Les microorganismes du lait cru ont un rôle essentiel dans le développement du goût et de l'odeur des fromages au lait cru. Les connaissances sur les microorganismes des produits laitiers ont été acquises par des méthodes d'isolement et de culture. Elles ont été considérablement enrichies grâce aux méthodes moléculaires, plus rapides et plus sensibles. Ces dernières années, il y a eu une évolution spectaculaire dans le domaine de la microbiologie alimentaire grâce aux approches « omiques ». Ces dernières s'appuient sur des technologies de séquençage d'ADN à haut débit (HTS) et permettent de répondre à de nombreuses questions : Qui est présent ? De quoi sont-ils capables ? Que font-ils ?

Une étude a été menée sur des cantals affinés 5 mois avec des animaux nourris au pâturage (Figure 1). Un groupe pâturait sur des prairies naturelles et diversifiées, et un autre sur des prairies permanentes, moins diversifiées et recevait des aliments concentrés (4 kg/jour). Le lait a été transformé dans la même fromagerie et les fromages affinés ensemble. L'ADN des microorganismes présents sur les trayons, dans les laits crus et les fromages au lait cru (pâte et croûte) a été extrait puis séquencé par une approche « *métabarcoding* ». L'identification de ces microorganismes repose sur un fragment d'ADN (ou barcode universel) correspondant au gène de l'ARNr 16S chez les bactéries et à la région ITS chez les champignons (incluant les levures et les moisissures). Dans le cadre de cette étude, les séquences bactériennes issues des quatre habitats ont été comparées et classées en OTU (« *Operationnal Taxonomic Units* ») puis affiliées à des genres bactériens, et parfois des espèces.

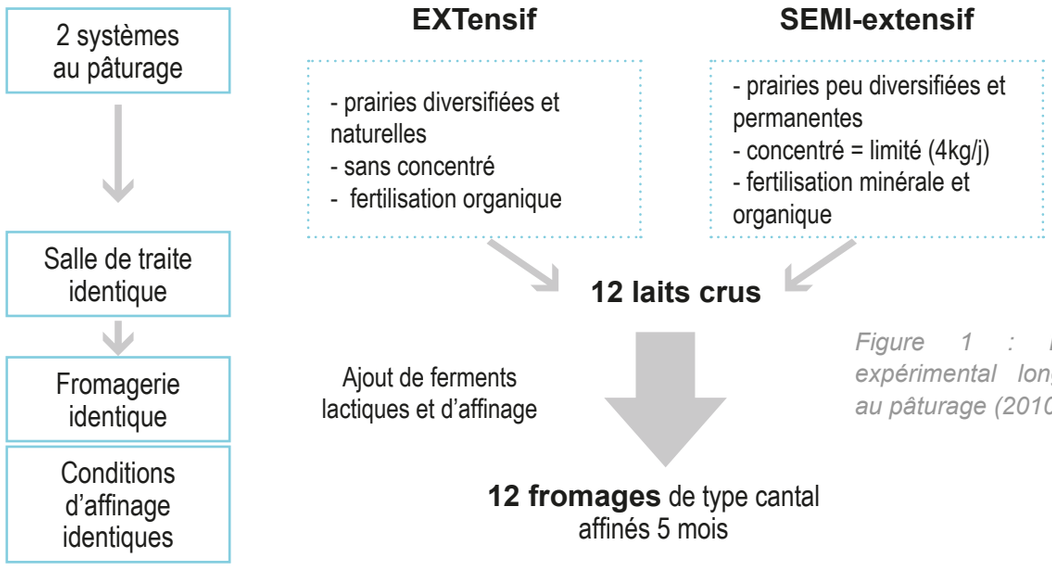


Figure 1 : Dispositif expérimental long terme au pâturage (2010-2013)

Revue des ENIL.indd 19 19/06/2019 16:20

La peau des trayons : réservoir de biodiversité

Dans cette première partie, les deux systèmes (Extensif et Semi-extensif) ont été considérés comme un seul système de production laitier au pâturage afin d'obtenir une vision globale de l'assemblage des communautés bactériennes. L'approche « *metabarcoding* » nous renseigne à la fois sur les bactéries présentes (*Figure 3*) et leur abondance (*Figure 2*).

Si nous considérons les OTUs bactériens les plus abondants, c'est-à-dire ceux dont l'abondance est supérieure à 1% (dans l'échantillon), leur nombre était équivalent entre la peau des trayons et le lait cru (respectivement, 18 et 17 OTUs) (*Figure 2*). Cependant, ces OTUs dominants représentaient presque 90 % de l'abondance totale dans le lait cru, et seulement 65 % pour la peau des trayons ce qui révèle une forte diversité sur la peau des trayons. Le genre *Corynebacterium* était dominant sur la peau des trayons tandis que les bactéries lactiques comme *Lactococcus* et *Lactobacillus* étaient prédominantes à la fois dans le lait cru et le fromage (pâte et croûte). Les OTUs dominants sur la croûte des fromages étaient assignés à des bactéries d'affinage tels que *Brevibacterium linens*, *Nocardiopsis spp*. et *Brachybacterium paraconglomeratum/sacelli* et à *Lactococcus lactis*.

Considérons ensuite les OTUs bactériens présents selon l'habitat considéré (*Figure 3*). La peau des trayons des vaches héberge une grande diversité de bactéries (300 OTUs). Parmi les 112 OTUs présents dans les laits crus, 85 % étaient également présents sur la peau des trayons. Certaines de ces bactéries ont un potentiel d'intérêt technologique concernant la fabrication et l'affinage des fromages. Et dans le produit affiné ? 75 OTUs ont été détectés sur la croûte des fromages et 45 dans la pâte. Au total, 27 % des OTUs bactériens présents dans les fromages au lait cru étaient aussi présents sur la peau des trayons. Certaines de ces bactéries peuvent être impliquées dans le développement du goût et de l'odeur des fromages. Seul 9 OTUs sont présents dans les 4 habitats dont une bactérie lactique bien connue des fromagers, à savoir *Lactococcus lactis*.
Les OTUs retrouvés dans les laits crus mais non détectés sur la peau des trayons pourraient provenir de la machine à traire et/ou des équipements de la fromagerie. Près de la moitié des OTUs présents dans les fromages pourrait être issus de l'environnement de la fromagerie et de la cave d'affinage (matériel, étagères, air, eau, …).

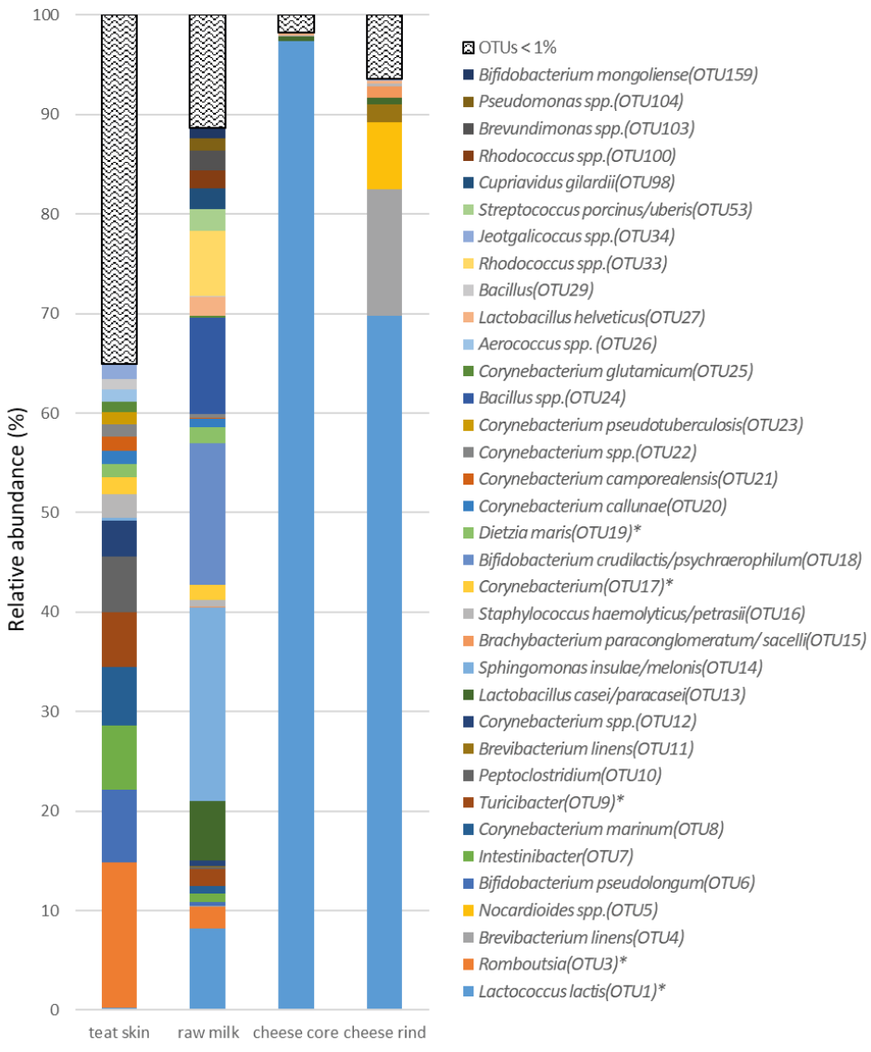


Figure 2 : Histogramme représentant l'abondance relative des 34 OTUs bactériens dominants (abondance > 1 %).

Le symbole * indique que ces OTUs étaient présents dans deux ou plusieurs habitats.

Revue des ENIL.indd 20 19/06/2019 16:20

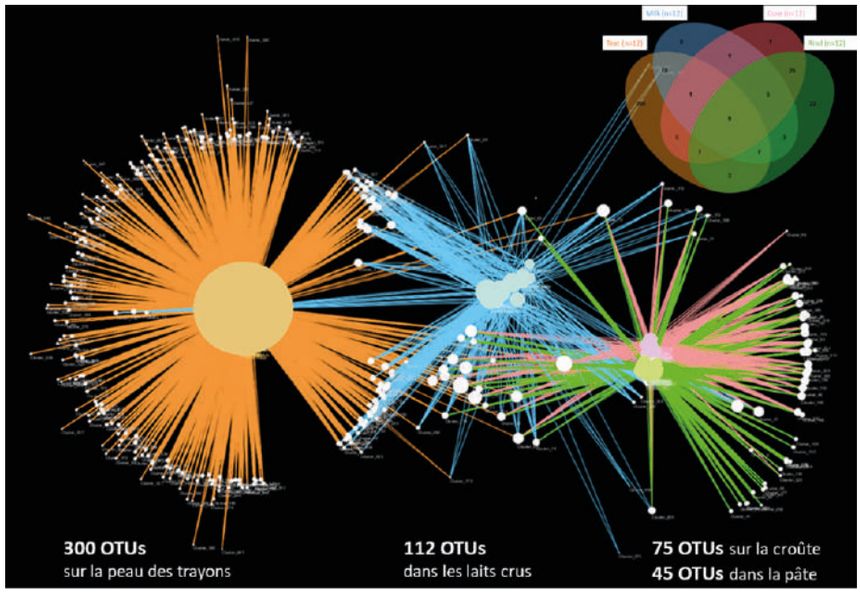


Figure 3 : Représentation visuelle des 365 OTUs bactériens détectés sur la peau des trayons jusqu'au fromage affiné. Les ronds blancs correspondent aux 365 OTUs bactériens détectés dans les quatre habitats (peau des trayons : rond orange ; laits crus : rond bleu ; pâte des fromages : rond rose; croûte des fromages : rond vert). La taille des ronds est proportionnelle au nombre d'OTUs bactériens qui y sont connectés. La présence des OTUs bactériens dans un habitat est indiquée par la couleur des lignes.

Systèmes de pâturage : modification de l'équilibre bactérien

Pour cette seconde partie, notre but était de mettre en évidence les différences au sein des communautés bactériennes entre les deux systèmes extensif et semi-extensif au pâturage *(Figure 4)*. Cette représentation indique une modification de l'équilibre bactérien de la peau des trayons selon le système de pâturage. Ces différences sont probablement liées à la composition botanique des prairies, mais aussi aux aliments concentrés qui pourraient modifier l'équilibre microbien du rumen. L'hypothèse est que le rumen étant modifié, les fèces le sont aussi, les aires de couchage le sont par conséquence, et finalement c'est l'écosystème de la peau des trayons qui est modifié. Les différences sont relativement subtiles dans le microbiote des laits crus et des fromages. L'ajout de ferments lactiques et d'affinage pourraient expliquer la réduction des différences au niveau bactérien entre les fromages des systèmes EXT et SEMI.

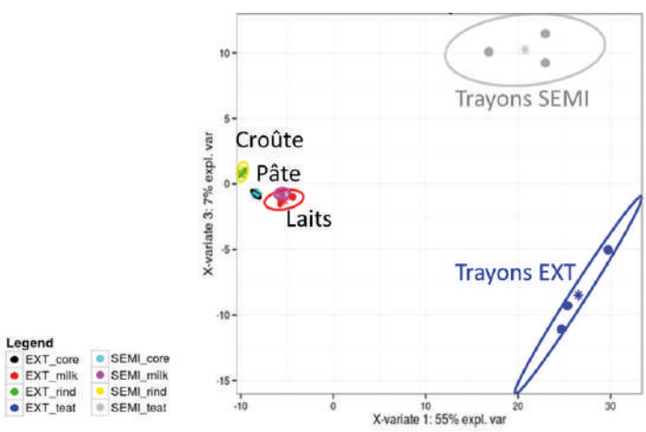


Figure 4 : Distribution des échantillons de la peau des trayons, de lait cru, de pâte et de croûte des fromages en fonction de la composition des communautés bactériennes et selon le système extensif (EXT) ou semi-extensif (SEMI).

Nos résultats soulignent le rôle important des trayons comme réservoir de la diversité bactérienne des laits crus mais aussi, pour la première fois, des fromages au lait cru. D'un point de vue microbiologique, la peau des trayons semble être le reflet du terroir et de la ferme. D'autres recherches sont nécessaires pour caractériser l'ensemble des réservoirs microbiens de la ferme, de l'environnement de la fromagerie et de la cave d'affinage en utilisant les nouvelles techniques de séquençage à haut-débit afin de hiérarchiser l'importance de ces réservoirs et éventuellement d'identifier des pratiques (production et transformation du lait) pour moduler la diversité microbienne des laits et des fromages.

Revue des ENIL.indd 21 19/06/2019 16:20

REVUE DES enil

Conditions de production de lait

Impact de la fertilisation des prairies sur leur biodiversité et sur les transferts de micro-organismes et de contaminants chimiques du sol au lait

Projet IFEP
Durée : 36 mois (2016-2019).

Organisme chef de file : Comité Interprofessionnel de Gestion du Comté (CIGC).

Coordination : Yvette Bouton (CIGC) et Nicolas Chemidlin Prévost-Bouré (UMR 1347 Agroécologie AgroSup Dijon-INRA-Université de Bourgogne).

Autres Partenaires : UMR 6249 Chrono-environnement CNRS-Université de Franche-Comté, Zone Atelier Arc Jurassien https://zaaj.univ-fcomte.fr/spip.php?article101, Institut de l'élevage (IDELE), Conservatoire Botanique National de Franche-Comté-Observatoire des Invertébrés (CBNFC-ORI), Vitagora.

Yvette BOUTON,
Chargée de recherche,
Comité Interprofessionnel
de Gestion du Comté

Contexte : Les prairies occupent une place centrale dans les systèmes de production laitière des Appellations d'Origine Protégées (AOP). Leur importance est à la fois quantitative car les systèmes fourragers des filières fromagères reposent en grande partie sur l'utilisation d'herbe, et qualitative puisque leur diversité est une des composantes clé du « terroir », base de la spécificité des produits AOP. L'enjeu du développement durable de ces filières est d'arriver à gérer les espaces pastoraux en associant la performance du système de production, notamment au travers la fertilisation des prairies et la préservation de leurs équilibres agro-écologiques. Un des principaux enjeux est de bien cerner l'impact des fertilisants (quantité et qualité) sur la biodiversité prairiale et le lien du produit à son terroir. Le projet IFEP vise à évaluer en filière comté, les impacts des pratiques de fertilisation (fumier, lisier) des prairies sur leur biodiversité et les transferts de micro-organismes et de contaminants chimiques du sol au lait. Il permettra de mieux définir les recommandations de fertilisation des prairies afin de préserver l'environnement de production et le lien entre le fromage et son terroir. Il pourra servir d'exemple à d'autres filières fromagères AOP.

Méthodologie : Un groupe de 45 parcelles de prairies pâturées par des vaches laitières issues de 45 fermes réparties sur la zone AOP comté a été constitué. Afin de caractériser le continuum de production, un important travail de terrain a été réalisé pour échantillonner différents compartiments (effluents de ferme, sol, herbe, surface des trayons des vaches laitières, lait de ferme), recenser les espèces de plantes vasculaires des parcelles et enquêter les pratiques de fertilisation et les systèmes d'exploitation. Les échantillons (effluent, sol, herbe, trayon et lait) ont été caractérisés par des analyses physico-chimiques, microbiologiques (quantification des micro-organismes cultivables, inventaire de la diversité des communautés microbiennes) et de contaminants chimiques.

La caractérisation des communautés microbiennes (bactérienne et fongique) des différents compartiments a été réalisée par des approches d'écologie moléculaire. Pour cela, l'ADN de chaque échantillon est extrait et des régions spécifiques de l'ADN des bactéries et des champignons sont amplifiées puis séquencées (ADNr 16S et ADNr 18S, respectivement). L'affiliation de ces séquences permet alors d'identifier les différents groupes (taxons) bactériens et fongiques.

Apport des méthodes « omiques »: Les analyses de métabarcoding (ou « amplicon sequencing ») permettront d'inventorier l'ensemble des genres bactériens et fongiques présents dans les différents compartiments.

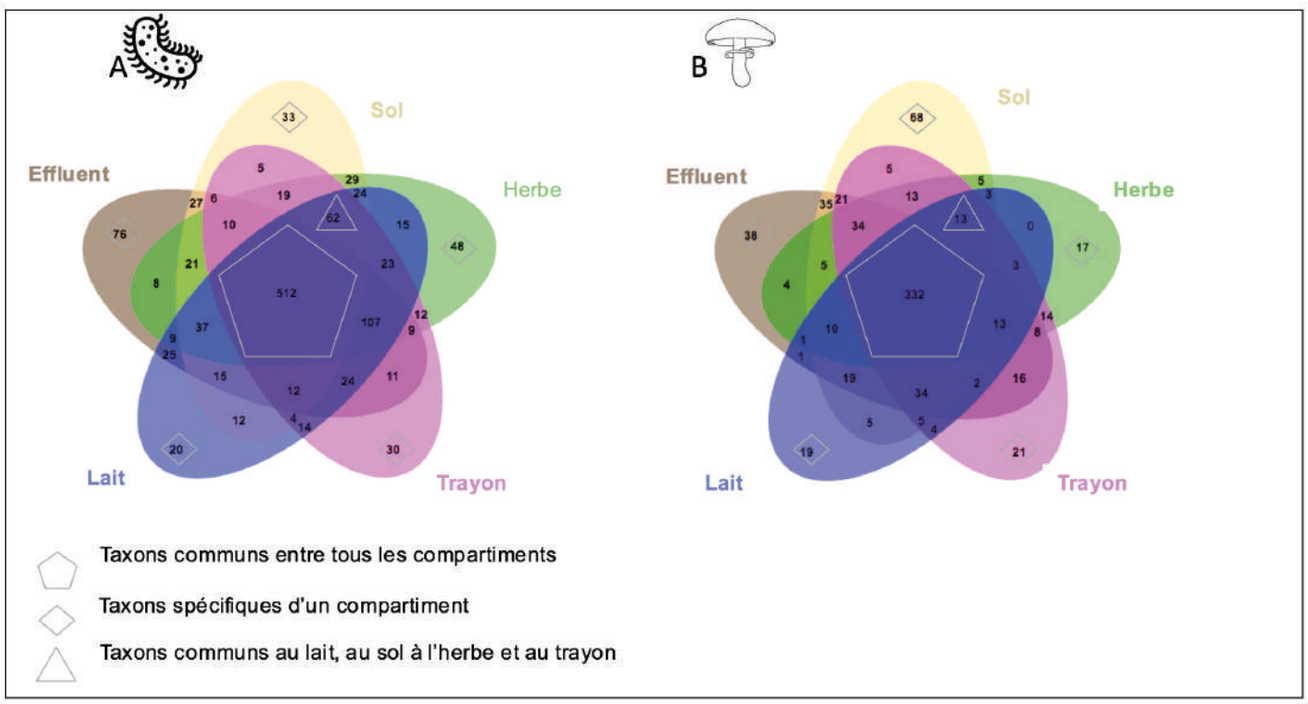
Au niveau du sol, le nombre de taxons dans un sol permet de définir la diversité en termes de richesse taxonomique. Ce paramètre est important car il est directement relié aux fonctions de la communauté microbienne et à son aptitude à résister aux perturbations environnementales. Le nombre d'espèces et leur abondance varient en fonction du milieu : caractéristiques du sol et usage.

Revue des ENIL.indd 22 19/06/2019 16:20

Des travaux antérieurs ont permis de développer différents outils de diagnostic (abondance en micro-organismes, rapport champignons/bactéries, richesse en bactéries et en champignons) pour apprécier la qualité des sols cultivés. Ces outils seront utilisés sur les sols prairiaux pour évaluer l'impact des pratiques de fertilisation.

Les premiers résultats indiquent par exemple que les valeurs moyennes de biomasse moléculaire microbienne (abondance microbienne) varient de 80 à 800 µgADN/g de sol avec une moyenne de 250 µgADN/g de sol.
Ces valeurs sont cohérentes avec les mesures réalisées dans le cadre du Réseau national de Mesure de la Qualité des Sols (RMQS, https://www.gissol.fr/le-gis/programmes/rmqs-34). Ces méthodes permettront aussi d'apporter de nouvelles connaissances sur les communautés microbiennes de la phyllosphère prairiale, réservoir potentiel pour la flore microbienne du lait cru. En effet, les études sur les communautés microbiennes de la phyllosphère sont peu nombreuses et portent davantage sur les espèces maraichères ou de grandes cultures. Les relations entre les taxons microbiens à la fois de la phyllosphère et du sol seront explorées.
Ces méthodes permettront également d'étudier les transferts de microorganismes de l'environnement vers le lait et leur dépendance vis-à-vis des pratiques de fertilisation. Les liens de causalité au niveau du processus de transformation du lait en fromage ont été évalués dans différentes technologies fromagères et ont permis de mettre en évidence que les communautés microbiennes indigènes du lait étaient un acteur clé de la typicité du fromage interagissant avec les microorganismes d'intérêt technologique introduits au début du process de fabrication. Récemment, il a été démontré que le trayon des vaches était une source potentielle des microorganismes présents dans les fromages au lait cru. La forte exposition des trayons aux végétaux pendant la période de pâturage pourrait permettre le transfert de microorganismes depuis la surface des végétaux vers le lait cru via le trayon. Cette étude permettra d'apporter des connaissances en amont de celles déjà acquises au niveau de la chaîne de production en particulier sur la composition microbienne des compartiments herbe et sol et sur les flux de microorganismes entre la prairie (herbe, sol) et le lait. Les premiers résultats montrent que beaucoup de genres bactériens et fongiques sont communs aux différents compartiments impliqués dans le processus de production : effluent, sol, herbe, trayon et lait ; mais aussi qu'il existe des taxons présents dans un nombre restreint de compartiments voir spécifiques de chacun de ces derniers. Parmi ces taxons communs aux différents compartiments, on retrouve des genres d'intérêt technologique en industrie fromagère tels que *lactobacillus sp.* ou *Galactomyces sp.*

Diagrammes de Venn représentant la présence des genres bactériens (A) et fongiques (B) dans les différents compartiments effluent, sol, herbe, trayon et lait.



Revue des ENIL.indd 23 19/06/2019 16:20

Valorisation et exploitation des résultats de ces études dans les formations du Réseau des ENIL : Application «Shiny Pédago »

Interview Clément Carrera Moniteur* sur la ligne pâte pressée et fromager à l'alpage-école au sein des ateliers technologiques de l'ENILV de La Roche-sur-Foron.

*Moniteur : Un moniteur est un salarié des ateliers technologiques. Il est fromager et responsable d'une ligne de fabrication dans sa totalité. Dans le cadre de ses fonctions il est également formateur auprès de l'ensemble des apprenants de l'ENILV et les encadre lors des journées de fabrication sur son atelier. Il encadre également des salariés en chantier d'insertion.

Introduction

Les nouvelles technologies telles que la métagénomique avancent à grand pas dans le secteur de l'agroalimentaire. Il faut maintenant préparer les nouvelles générations de fromagers à s'approprier ces méthodes pour qu'elles en maîtrisent les concepts et puissent interpréter les résultats qu'elles produisent. A cette fin, l'équipe du projet ERASMO a créé une application web accessible en ligne (Fig 1) permettant de consulter la base de données et de créer les graphiques d'abondance relative, de biodiversité, de densité de microorganisme ou encore d'analyse multivariée (NMDS). Ainsi, les formateurs des ENILs peuvent présenter des résultats de métagénomique de façon ludique et pédagogique à leurs apprenants en utilisant, par exemple, une approche « problèmes » (apparition d'un défaut, suivi de la présence des ferments, …).

Ils peuvent également les sensibiliser à la biodiversité des fromages au lait cru qui font leur typicité.

Nicolas ORIEUX

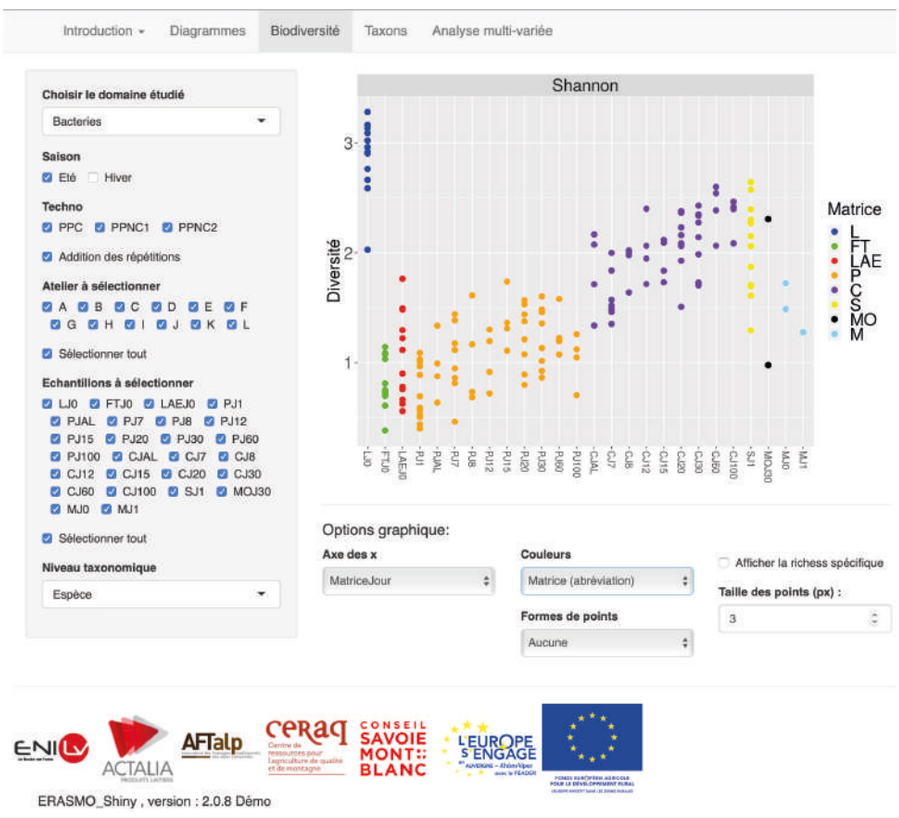


Figure 1 : capture d'écran de l'application SHINY PEDAGO permettant de visualiser les données du projet ERASMO

Revue des ENIL.indd 24 19/06/2019 16:20

Cécile CHARLES, chargée de mission R&D et expérimentation aux ateliers technologiques de l'ENILV de la Roche-sur-Foron.

Le regard d'un formateur sur l'application «SHINY PEDAGO»

L'application Shiny pédago ainsi que les bases de données associées vont être mises à disposition des formateurs en technologie laitière de l'ENILV de la Roche-sur-Foron.

Pensez-vus pouvoir utiliser ce type d'application dans le cadre de votre activité de formateur ?

Oui, complètement. A l'ENILV de La Roche-sur-Foron, nous fabriquons dans nos ateliers technologiques les mêmes fromages que ceux qui ont permis de constituer la base de données de Shiny Pedago. On aurait ainsi à disposition, un outil de simulation interactif pendant nos temps de fabrication avec les élèves. Ce serait un support pédagogique très intéressant. Donc, oui Shiny pédago a sa place dans la formation des futurs fromagers.

Quel est, pour vous, l'intérêt d'une telle application dans un cadre de formation ?

Dans votre approche pédagogique :

En tant que moniteur des ateliers technologiques je forme les élèves autour de la cuve. Ils participent aux fabrications quotidiennement. J'imagine très bien cet outil accessible dans l'atelier pendant la fabrication. Je pourrais ainsi confronter les résultats de la base de données avec ce que l'on vit en direct sur la cuve. On pourrait imaginer une séquence pédagogique où on pose une question aux élèves, on passe sur l'application pour apporter des éléments de réponse et de discussion puis on regarde ce que cela donne en cuve dans notre atelier. On peut faire ainsi des allers-retours entre la cuve et l'application. Pour moi, un tel outil doit permettre d'ouvrir la discussion avec les élèves, de les faire réfléchir.

Elle permet aussi de pouvoir « simuler» l'évolution de l'écosystème dans le fromage et de montrer aux élèves l'impact des pratiques technologiques mais aussi la diversité de celles-ci.

Oui, Shiny pédago a sa place dans la formation des futurs fromagers.

Il y a encore des personnes qui pensent qu'il faut faire d'une certaine manière car « On a toujours fait comme ça ». Cette application pourrait nous aider à les interpeller et à valider ce qui est pertinent, utile de ce qui l'est moins.

Les méthodes omiques permettent aussi d'étudier les écosystèmes microbiens environnementaux en salle de traite et fromagerie. Ce serait très intéressant à aborder avec les élèves de façon concrète. L'application Shiny peut modéliser la répartition des microorganismes dans de tels espaces. C'est très visuel et très pédagogique. On pourrait ainsi aborder plus facilement les questions liées à l'impact des conditions de traite sur le lait et la fabrication fromagère, la conception des bâtiments dans les flux microbiens, etc...

En résumé, Shiny Pedago a un intérêt certain en pédagogie notamment car elle permet de présenter les résultats des études des écosystèmes microbiens de façon très visuelle et très pédagogique. La base de données et les traitements statistiques associés sont très intéressants pour nourrir les réflexions et les discussions techniques que l'on peut avoir avec les élèves sur ces questions-là.

Dans votre approche technologique :

Je l'imagine avant tout comme un outil de ressourcement et d'interrogation sur les pratiques technologiques. La force de cet outil est à la fois la taille et la diversité de la base de données mais aussi l'accessibilité et le traitement de ces données qu'il propose. Je souhaiterais, notamment, étudier plus précisément les pratiques d'ensemencement.

Revue des ENIL.indd 25 19/06/2019 16:20

En effet, par exemple, l'été je fabrique des abondances fermiers sur le site de l'alpage école (Lycée de Contamines / ENILV) et l'hiver des abondances laitiers dans les ateliers technologiques. Dans un atelier laitier comme le nôtre on a les mêmes procédures toute l'année. Un tel outil permettrait d'étudier les variations saisonnières et de mieux piloter l'ensemencement au cours de l'année mais également de mieux comprendre l'impact des différences de pratiques entre les technologies laitières et fermières.

Grâce aux méthodes omiques et à cet outil qui nous donne accès aux résultats on a accès à toutes les flores et on s'aperçoit que les laits sont riches en biodiversité dans nos zones AOP/ IGP. On s'aperçoit que les ferments «écrasent » les pratiques d'élevage et de traite. Or j'ai souvent entendu dire « les laits sont pauvres, on ensemence pour compenser ». On s'aperçoit bien, grâce à Shiny Pedago, de l'impact des ferments exogènes. Avec les niveaux d'ensemencement actuels on écrase tout. Comment et quand les flores endogènes s'expriment ? Quelles pratiques mettre en place pour favoriser cette flore ? Cela m'interroge et un tel outil peut m'aider à approfondir ces questions.

Je souhaiterais ensuite pouvoir transmettre et travailler ces nouvelles connaissances avec les élèves. Cela nous apportera peut-être un nouveau regard sur les écosystèmes microbiens.

La trouvez-vous facilement utilisable ? Identifiez-vous des freins à son utilisation ?

Oui, son utilisation est très intuitive. Par contre cela nécessite d'expliquer, en introduction, le système de codage des échantillons et le principe des résultats en % d'abondance relative. Ce n'est pas évident au premier abord. Concernant les outils statistiques il me semble que des guides d'aide à la lecture des résultats ou un premier accompagnement seraient un plus. En effet, ces types de représentations nécessitent un minimum de pré-requis.

Mais une fois, ces bases acquises on a envie d'aller « jouer avec » et d'aller creuser.
L'autre intérêt majeur de cette application est son accessibilité à partir d'internet. Ainsi on peut s'en servir sur les ateliers comme dans n'importe quelle salle de cours.

A quel public pensez-vous que cela puisse être destiné ?

Cet outil me semble pertinent sur des formations de niveau BTS au minimum. En effet, c'est avant tout un outil pédagogique pour le formateur qui peut ainsi aller plus loin avec ses élèves.
Il me paraît particulièrement intéressant pour les filières en apprentissage qui pourront alors confronter ce qu'ils voient en cours, en entreprise et dans les cuves de l'atelier.
Pour les BTS initiaux il me semble qu'il sera pleinement exploitable sur les 2ème années, une fois le stage fait. En effet, cet outil permet un approfondissement des connaissances initiales. Il faut donc, il me semble, qu'ils aient un minimum de pré-requis techniques.

Pensez-vous à des améliorations possibles ?

Personnellement je trouverais intéressant de creuser sur les différences entre les pratiques « fermiers / laitiers ». Une autre piste serait de renforcer la base de données en diversifiant les technologies. Cela permettrait d'utiliser cet outil comme du ressourcement avec un grand nombre de données terrains et des études statistiques associées.

Personnellement j'ai fait mes études en Franche-Comté puis mon expérience professionnelle est savoyarde. Un tel outil me permettrait d'approfondir mes connaissances sur d'autres technologies. On pourrait imaginer des modèles généraux de différentes technologies pour pouvoir en dégager les grandes lignes pédagogiquement et enrichir les enseignements.

En résumé, dans l'idéal, on aurait une trame avec des infos générales sur l'ensemble des technos et, sur certaines technologies, plus régionales, que l'on utilise sur nos ateliers de transformation des ENILs, pouvoir rentrer dans les détails pour sensibiliser les élèves à la diversité des pratiques pour une même technologie.

INTERVIEW
Clément CARRERA

Revue des ENIL.indd 26 19/06/2019 16:20

REVUE DES enil

Les méthodes omiques pour répondre à des problématiques industrielles

Utilisation des méthodes – omiques dans le cadre de problématiques industrielles spécifiques : exemple du projet REDSEL

Sarah CHUZEVILLE, Chef de projets
Microbiologie d'Interêt Laiter, Pôle expertise Analytique ACTALIA, La Roche sur Foron

Partenaires du projet REDSEL

Le projet REDSEL a regroupé des équipes techniques de l'INRA et d'ACTALIA :
• l'INRA : Pascal Bonnarme, Sandra Helinck et Eric Dugat-Bony (Unité Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires)
• ACTALIA : Sébastien Fraud, Sarah chuzeville, Nadège Bel, Alicia Bertry, Olivier Sgard et Angélique Pulli (Business Unit Produits Laitiers).

Contexte

Le sel, et plus précisément le sodium est nécessaire à l'Homme afin de garantir le maintien essentiel de certaines fonctions cellulaires (pression osmotique, équilibre acido-basique, transmission des influx nerveux et régulation de la pression artérielle). Néanmoins, en grande quantité, il peut se révéler nocif. Ainsi, un apport élevé en sodium semble représenter un risque global pour la santé humaine qui incrimine ce composé dans différents troubles pathologiques (tension artérielle, risques de cancers de l'estomac, ostéoporose) (Caudarella et al., 2009). Par ailleurs, l'assimilation de sodium augmenterait les risques de développer un cancer rénal alors que l'assimilation de potassium n'a aucune influence (Deckers et al., 2014). Même si la réduction du sodium a été identifiée comme l'un des 10 meilleurs moyens pour la prévention des maladies non transmissibles par l'Organisation Mondiale pour la Santé (Barton et al., 2011; WHO, 2003), l'assimilation de sodium par la population de la plupart des pays dépasse largement sa ligne directrice (ANSES, 2012).
Réduire le sel dans le fromage représente un défi pour les industriels des filières agroalimentaires puisque le sel aide au contrôle de divers paramètres importants, comprenant les principaux paramètres physicochimiques, l'activité microbienne, la survie des ferments, la qualité sanitaire et le potentiel organoleptique des fromages.

Objectifs du projet REDSEL

Compte tenu de l'état des connaissances actuelles qui restent éparses, il est apparu nécessaire aux équipes impliquées dans le projet d'initier des travaux visant à étudier l'impact global de la réduction du NaCl et/ou de sa substitution partielle par le KCl, sur la qualité microbiologique et sensorielle des fromages. Les fromages retenus pour l'étude sont les fromages à pâte molle (PM, modèle d'étude de type camembert) et à pâte pressée non cuite (PPNC, modèle d'étude de type reblochon). Les fromages ont été fabriqués avec une flore contrôlée (lait pasteurisé).

Pour chaque technologie, une flore d'altération modèle a été retenue afin d'analyser l'impact de variations de conditions de salage sur le développement de ce type de flores. *Pseudomonas* a été retenu pour les fromages PPNC et *Yarrowia lipolytica* pour les fromages PM.

Une réduction du taux de sel (diminution d'environ 25 % de la teneur en NaCl usuellement utilisée) et une utilisation du KCl, composé alternatif au NaCl (ratio NaCl/KCl 75 %/25 %), ont été analysés par rapport à un contrôle (valeur de NaCl usuelle, 100 %) quant à leur impact sur :

1. la dynamique et le métabolisme de la flore microbienne intervenant dans le processus d'affinage (analyses par microbiologie pasteurienne et approches moléculaires NGS par métagénomique 16S et métatranscriptomique);

2. le potentiel d'implantation de flores d'altérations (analyses par microbiologie pasteurienne et approches moléculaires NGS par métagénomique 16S et métatranscriptomique);

3. la qualité organoleptique (évaluation de la production de composés d'arômes par CPG/MS et analyses sensorielles par un jury entrainé),

4. les principaux paramètres technologiques (évaluation de la lipolyse, protéolyse, activité fermentaire, etc.).

Revue des ENIL.indd 27 19/06/2019 16:20

Impact des conditions de salage sur les fromages et la flore microbienne technologique

En pâtes molles

Une réduction du taux de NaCl d'environ 25 % dans les fromages à PM a une influence moindre sur l'index de lipolyse et sur l'évolution du pH, de l'Aw et de l'humidité des fromages en pâte ou en surface. Par contre, la consommation des sucres (lactose et galactose) est plus importante et la protéolyse est plus fine et plus intense. Les fromages ont alors un goût plus acide, rance et oxydé, une intensité globale de l'odeur et du goût plus importante et une couleur de la croûte plus importante (Tableau 1). L'odeur et l'arôme champignon est moins intense dans les fromages à teneur réduite en NaCl.

Au regard des résultats des dénombrements réalisés par microbiologie Pasteurienne, il a été montré qu'une réduction de NaCl favorisait le développement de *Geotrichum candidum*. De manière concordante, la production d'alcools est accrue à teneur réduite en NaCl. Le sel pourrait avoir une action inhibitrice de la croissance de cette levure. Le sel, perceptible en goût, a également pour impact de limiter la protéolyse qui peut produire des saveurs non désirées, ou à défaut de les masquer (Tableau 1).

L'utilisation du KCl semble compenser, au moins en partie, les effets observés d'une réduction en NaCl (protéolyse, consommation sucres, développement *G. candidum*, qualité organoleptique). Par contre, l'utilisation de KCl diminue la fermeté de la pâte de fromages PM et accentue l'amertume (Tableau 1).

Caractéristiques sensorielles	PM-R	PM-S	PM-C
Couleur de la croûte	4,59 (a)	4,73 (a)	3,72 (b)
Aspect coulant de la zone affinée	6,20 (a)	6,44 (a)	5,10 (b)
Intensité globale de l'odeur	7,25 (a)	6,71 (ab)	6,25 (b)
Odeur de champignon	3,05 (b)	3,63 (b)	4,59 (a)
Odeur d'ammoniaque	3,44 (a)	3,21 (a)	2,30 (b)
Texture ferme de la pâte	2,15 (a)	1,18 (b)	2,59 (a)
Intensité globale du goût	7,44 (a)	7,36 (a)	6,83 (b)
Saveur acide	2,97 (a)	3,07 (a)	2,49 (b)
Arôme de champignon de la croûte	2,76 (b)	3,56 (a)	3,52 (a)
Arôme animal-étable	3,14 (a)	3,12 (a)	2,35 (b)
Saveur amère	3,57 (ab)	3,84 (a)	2,99 (b)
Arôme d'ammoniaque	2,47 (a)	2,41 (a)	1,65 (b)
Goût métallique-oxydé	1,81 (a)	1,67 (ab)	1,27 (b)

Tableau 1. Récapitulatif des différences significatives détectées lors de l'analyse sensorielle des fromages à pâte molle.

Une lettre différente (a,b) signifie une différence statistiquement significative entre 2 groupes. « C » est indiqué pour les fromages témoins, « R » pour les fromages à taux de NaCl réduit et «S» pour les fromages pour lesquels du KCl a été utilisé en substitut.

En pâtes pressées non cuites

Il a été montré qu'une réduction du taux de NaCl a peu d'impact sur les principaux critères physicochimiques des fromages à PPNC (pH, Aw, humidité de la pâte et de la surface des fromages). L'impact des conditions de salage sur la consommation des sucres est également très faible. Aucune modification de la composition microbienne et de la structure microbienne au sein des fromages à PPNC n'intervient quand la teneur en sel est modulée. Seule la population de *Pseudomonas* se développe plus quand la teneur en sel est réduite ou quand du KCl est utilisé en substitution.

Par contre, une réduction du taux de NaCl des fromages à PPNC entraine une augmentation de la protéolyse et de la lipolyse. Quand du KCl est utilisé en substitution, la protéolyse est encore plus intense que les fromages à teneur réduite en NaCl et les fromages présentent plus de tâches sur leur croutage. L'amertume est plus ressentie dans les fromages pour lesquels les conditions de salage ont fait l'objet d'une modification (Tableau 2).

Revue des ENIL.indd 28 19/06/2019 16:20

Caractéristiques sensorielles	PPNC-R	PPNC-S	PPNC-C
Saveur salée	2,56 (a)	2,56 (a)	2,94 (a)
Saveur amère	1,8 (a)	2,03 (a)	1,28 (b)

Tableau 2. Récapitulatif des différences significatives détectées lors de l'analyse sensorielle des fromages à pâte pressée non cuite.

Une lettre différente (a,b) signifie une différence statistiquement significative entre 2 groupes. « C » est indiqué pour les fromages témoins, « R » pour les fromages à taux de NaCl réduit et «S» pour les fromages pour lesquels du KCl a été utilisé en substitut.

Apport des outils de séquençage de nouvelle génération

► Les technologies récentes permettent de séquencer l'ADN et l'ARN beaucoup plus rapidement que les méthodes précédentes, de telle sorte qu'elles ont révolutionné l'étude de la génomique et permettent désormais une analyse plus globale, fine et rapide des écosystèmes microbiens.
La métagénomique est l'outil qui permet de décrire la composition d'un écosystème microbien (bactéries, levures, moisissures). Cette analyse permet en une seule analyse de connaître le pourcentage d'abondance de la plus grande majorité des espèces ou genres microbiens présents au sein d'un écosystème donné (un échantillon de croûte par exemple). La métagénomique 16S s'intéresse plus particulièrement aux écosystèmes bactériens. D'autres méthodes existent pour l'étude des populations de levures et moisissures (non utilisés dans le cadre du projet REDSEL).

La métatranscriptomique est basée sur l'analyse de l'ARN. L'ARN est le produit de gènes qui sont exprimés au sein d'un écosystème donné. La métatranscriptomique est donc une approche permettant l'étude de l'activité métabolique des microorganismes présents au sein d'un écosystème.
La combinaison de ces 2 outils innovants permet d'accéder en simultanée aux informations suivantes :

• Quelle population (genre / espèce) est présente dans mon échantillon et à quel pourcentage ?
• Quelle population est active et, plus particulièrement, quelles voies métaboliques de cette population sont activées (voies métaboliques clés, voies impliqué dans la protéolyse, la production d'arôme…) à un moment donné ?

► Ici, la métagénomique 16S a permis de confirmer que la diversité bactérienne évolue au cours de l'affinage. Notamment, des espèces bactériennes non ensemencées apparaissent au cours du temps dans les deux modèles fromagers du projet REDSEL. Ceci est le cas d'espèces halophiles (Halomonas ou Marinomonas), ou appartenant aux genres Enterobacter, Psychrobacter ou Arthrobacter (Figure 1A et 1B).

► En modèle pâte molle, la métagénomique 16S a permis de confirmer que les conditions de salage n'impactaient pas le développement de la flore technologique (*Streptococcus* et *Lactococcus*) (Figure 1A). L'analyse transcriptomique a également permis de corréler l'augmentation de l'abondance de *G. candidum* à l'augmentation de son activité métabolique (augmentation de la proportion relative des reads de séquençage de *G. candidum* à teneur réduite en NaCl) (Figure 1C). En supplément, l'analyse transcriptomique a permis de constater que le développement de *G. candidum* se fait au détriment de *P. camemberti* (diminution de la proportion relative des reads de séquençage de P. *camemberti* à teneur réduite en NaCl) (Figure 1C). Ceci est en corrélation avec l'analyse sensorielle qui a mis en évidence une diminution de l'intensité de l'odeur et de l'arôme champignon de la croûte pour cette condition de salage (Tableau 1). La substitution par du KCl permet de retrouver un équilibre entre *G. candidum* et *P. camemberti* qui est proche de la condition initiale (fromages témoins à 100% de NaCl). L'utilisation de KCl permet donc de compenser, au moins en partie, les variations sensorielles observées en cas de réduction de NaCl (Tableau 1).

► Les analyses de métagénomique 16S réalisées sur les fromages à PPNC confirment que, globalement, les conditions de salage ont peu d'impact sur l'écosystème microbien des fromages. Néanmoins, il a été mis en évidence que les proportions relatives de *Streptococcus thermophilus* sont légèrement plus basses dans les fromages avec un taux de sel réduit à partir de 14 jours d'affinage (Figure 1B). De manière concordante, l'activité métabolique de *S. thermophilus* à 21 jours d'affinage est légèrement amoindrie à taux de sel réduit (Figure 1D). Deux hypothèses peuvent alors être émises : (i) soit *S. thermophilus* s'est moins bien développé à taux de sel réduit soit (ii) la proportion d'autres espèces bactériennes est plus importante (ex. espèces sensibles au sel).

Revue des ENIL.indd 29 19/06/2019 16:20

Impact des conditions de salage sur le développement des flores d'altération

▶ Le niveau de population de *Yarrowia lipolytica* est similaire en fonction des conditions de salage utilisées en technologie PM. Même si la protéolyse et la lipolyse des fromages sont plus fines et intenses quand *Yarrowia* est utilisé en tant que contaminant dans les fromages, son activité métabolique ne semble pas évoluer en fonction de la teneur en sel (Figure 1C). L'impact de *Yarrowia* pourrait alors être indirect dans le sens où l'équilibre des populations composant la flore technologique (*Streptococcus* et *Lactococcus*) est fortement altéré quand *Yarrowia* est présent, en particulier en début d'affinage (Figure 1A).

▶ Le projet REDSEL a montré que *Pseudomonas* se développe plus quand la teneur en NaCl est réduite ou quand du KCl est utilisé en substitution dans les fromages à PPNC (Figure 1B). Ce phénomène a été observé à la fois par l'utilisation des outils de la microbiologie pasteurienne et par la métagénomique 16S. Les analyses métatranscriptomiques des fromages à PPNC ont également confirmé que l'activité métabolique de *Pseudomonas* est largement amplifiée en condition de variation des conditions de salage par rapport aux fromages témoin (Figure 1D). L'augmentation métabolique de *Pseudomonas* se réalise au détriment de l'activité métabolique de *Debaryomes hansenii* (Figure 1D). En présence de *Pseudomonas*, de nombreux gènes codant pour des protéases sont détectés et leur expression varie en fonction des conditions de salage (augmentation avec un taux de NaCl réduit).

▶ D'autre part, les écosystèmes fromagers PPNC sont plus diversifiés en fin d'affinage lorsque *Pseudomonas* est ajouté en tant que contaminant des produits (Figure 1B). La présence de *Pseudomonas* semble alors impacter l'architecture de la communauté microbienne des fromages à PPNC. Quelles que soient les conditions de salage, la présence de *Pseudomonas* semble défavoriser l'abondance des Lactobacilles et des streptocoques et favoriser la croissance d'autres espèces non ensemencées (ex. *Arthrobacter*) (Figure 1B).

Conclusion

En conclusion, l'impact des conditions de salage est dépendant de la technologie fromagère considérée. Une diminution de la qualité organoleptique des fromages à PM a été notée tandis que l'impact sensoriel semble minime pour les fromages à PPNC. Le NaCl semble représenter une barrière importante contre l'implantation de certaines flores d'altération (ex. *Pseudomonas*) mais pas contre d'autres (ex. *Yarrowia*).
L'utilisation combinée d'analyses classiques (biochimiques, et microbiologie Pasteurienne), d'outils moléculaires puissants (métagénomique et métatranscriptomique) et d'analyses sensorielles ont permis de relier le devenir organoleptique des produits en fonction des conditions de salage à des caractéristiques biochimiques et microbiennes mesurables de manière plus aisée.

Les impacts produits liés aux modalités de salage mises en évidence dans ce rapport devront être prises en compte afin d'adapter les pratiques de productions fromagères aux qualités organoleptiques souhaitées. Par ailleurs, l'élimination, la réduction ou la substitution du sel devraient faire l'objet d'études spécifiques pour chaque type de technologie fromagère en restant vigilant à la stabilité microbiologique des produits et à leur devenir organoleptique.

Remerciements

Le projet redsel n'aurait pas été rendu possible sans son financement par FranceAgrimer et par le Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL).

Références

Barton, P., Andronis, L., Briggs, A., McPherson, K., and Capewell, S. (2011). Effectiveness and cost effectiveness of cardiovascular disease prevention in whole populations: modelling study. BMJ 343, d4044.

Caudarella, R., Vescini, F., Rizzoli, E., and Francucci, C.M. (2009). Salt intake, hypertension, and osteoporosis. J. Endocrinol. Invest. 32, 15–20.

Deckers, I. a. G., van den Brandt, P.A., van Engeland, M., Soetekouw, P.M.M.B., Baldewijns, M.M.L.L., Goldbohm, R.A., and Schouten, L.J. (2014). Long-term dietary sodium, potassium and fluid intake; exploring potential novel risk factors for renal cell cancer in the Netherlands Cohort Study on diet and cancer. Br. J. Cancer 110, 797–801.

WHO (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. - PubMed - NCBI.

ANSES (2012). AVIS de l'Anses relatif au suivi des teneurs en sel des principaux vecteurs entre 2003 et 2011 et simulation des impacts sur les apports en sel de la population française | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

Revue des ENIL.indd 30 19/06/2019 16:20

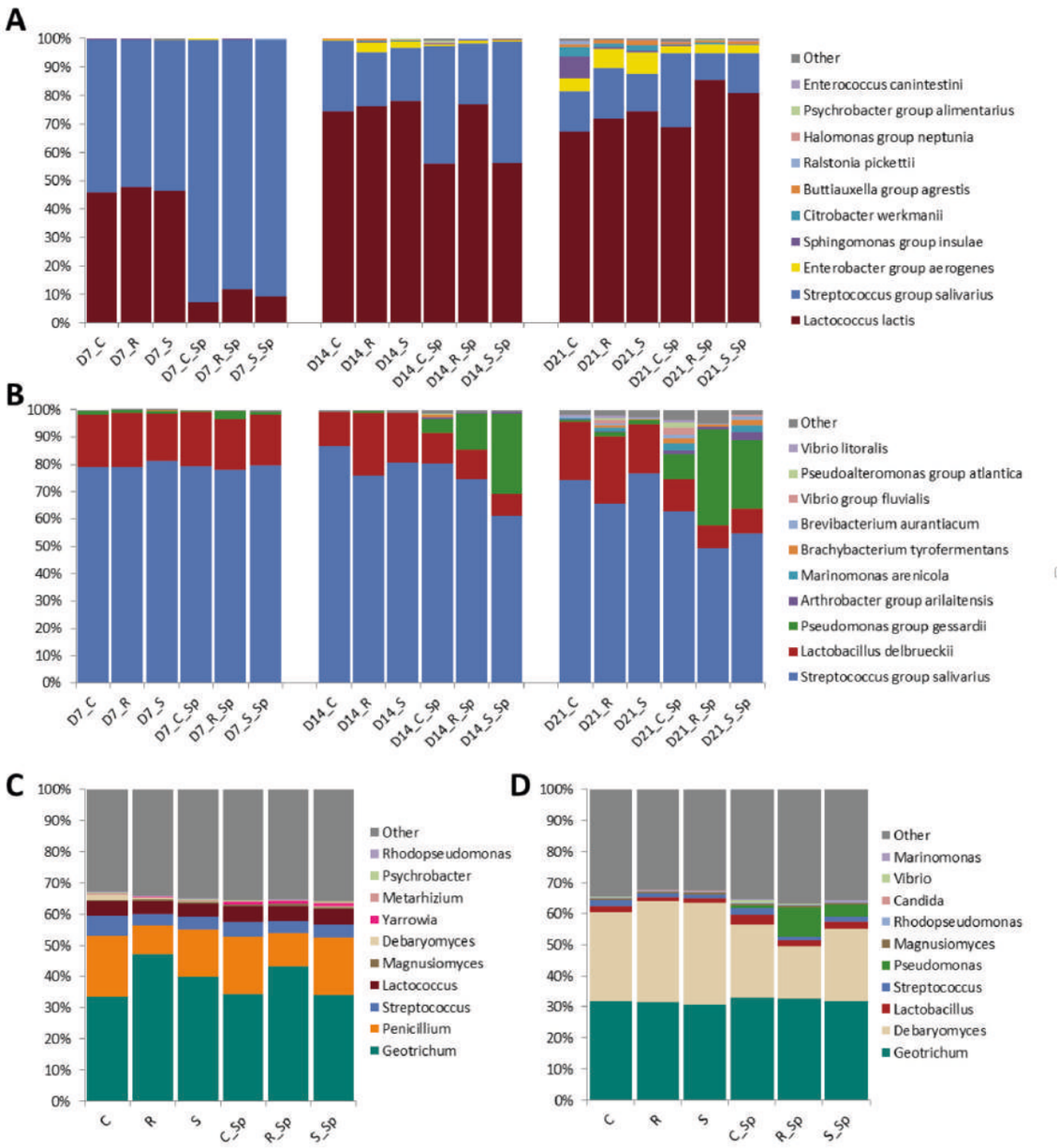


Figure 1. Composition et activité des communautés microbiennes du fromage. « C » est indiqué pour les fromages témoins, « R » pour les fromages à taux de NaCl réduit et S pour les fromages pour lesquels du KCl a été utilisé en substitut. « Sp » est indiqué pour les échantillons contenant une flore d'altération (*Yarrowia* pour PM ou *Pseudomonas* pour PPNC). Les valeurs pour l'ensemble des résultats représentent la moyenne de 3 réplicats. Les 10 espèces les plus abondantes sont montrées.

Graphiques A et B : La dynamique de la composition microbienne a été évaluée par métagénomique 16S pour des fromages PM (A) ou PPNC (B). D7 : 7 jours d'affinage ; D14 : 14 jours d'affinage ; D21 : 21 jours d'affinage.
Les graphiques présentent les pourcentages d'abondances des 10 taxons les plus représentés au sein des échantillons. Par exemple, L'espèce *Lactococcus lactis* représente plus de 45% de l'écosystème microbien de l'échantillon D7_R en PM (fromage à taux de sel réduit à 7 jours d'affinage).

Graphiques C et D : L'activité métabolique des microorganismes a été évaluée par métatranscriptomique à 21 jours d'affinage. L'activité métabolique est en corrélation avec le nombre de reads de séquençage tel que visualisés pour les fromages PM (C) et à PPNC (D). Par exemple, environ 20% des reads de séquençage des fromages témoins (C) de PM correspondent à *Penicillium* (en orange) alors que moins de 10% des reads de séquençage des fromages à teneur réduite en sel correspondent à *Penicillium*. Ceci signifie que l'activité métabolique de *Penicillium* est proportionnellement plus faible dans les fromages à teneur réduite en NaCl comparativement aux fromages témoins.

Revue des ENIL.indd 31 19/06/2019 16:20

Interview de Frédéric Gaucheron, CNIEL, Science et technologie laitières

Sarah CHUZEVILLE, Chef de projets Microbiologie d'Interêt Laiter,
Pôle expertise Analytique ACTALIA, La Roche sur Foron

Quelles sont les questions majeures posées par l'industrie laitière dans le domaine ?

Les micro-organismes (bactéries, levures, moisissures) sont des acteurs majeurs de la fabrication fromagère en participant à leurs caractéristiques organoleptiques. Identifier, comprendre et maîtriser les écosystèmes fromagers sont des défis scientifiques et technologiques. Dans ce contexte, le CNIEL travaille de longue date avec les équipes de recherche françaises pour mieux comprendre ces micro-organismes vivant en symbiose. Qui sont-ils ? Que font-ils ? Comment évolue l'écosystème en fonction de l'affinage du fromage? Pourquoi leur présence est essentielle à la qualité des fromages ? sont les grandes questions posées.

Et le projet REDSEL ?

Le projet Redsel a été une collaboration entre des chercheurs INRA et Actalia. Il y avait un partage de questions communes et complémentarités des compétences pour mener à bien ce projet. Réduire le sel est un challenge technologique plus complexe qu'il n'y parait car cette réduction impacte également la physico-chimie de la matrice laitière. Les conséquences sont de profondes modifications des qualités techno-fonctionnelles et organoleptiques du produit final. Il était donc également important d'apprécier les conséquences de cette réduction saline sur les écosystèmes microbiens présents dans deux types de fromages (pâte molle, pâte pressée non cuite) fabriqués pour ce projet à partir de lait pasteurisé.

Qu'ont apporté les approches «omiques » ?

Il faut voir ces méthodes comme complémentaires de celles existantes et communément utilisées (culture et identification microbienne, analyses biochimiques et physico-chimiques). L'utilisation de ces méthodes «omiques» est un réel progrès dans la connaissance des écosystèmes fromagers. On peut suivre plus précisément la présence des microorganismes et leurs proportions respectives, leurs évolutions mais également leurs activités au fil de la transformation fromagère. Cette connaissance est clé pour maîtriser au mieux la technologie mise en œuvre mais aussi innover et penser à de nouveaux écosystèmes à mettre en place.

Comment sont transférées les connaissances de la recherche vers l'industrie laitière ?

Acquérir des connaissances est une étape et leur transfert est une suite qu'il faut intégrer dans un travail de recherche à caractère appliqué. Ce transfert se fait dès la mise en place du projet par le partage de questions, les hypothèses de recherche et la stratégie pour répondre aux questions initialement posées. Les échanges entre chercheurs de différents instituts (INRA, Actalia,…) et de différentes industries sont donc essentiels. C'est une des missions du CNIEL de valoriser ce travail et de faire du lien. Dans le cadre de projets sur les microorganismes d'intérêt laitier, il a été rapidement compris que ces méthodes «omiques» étaient essentielles à mettre en place. Ainsi en complément du projet REDSEL, d'autres projets comme Food Microbiome Transfert, MétaPDOcheese, Tango et Dynamode sont actuellement en cours avec l'industrie laitière française. Ils ont tous comme objectif majeur de vouloir comprendre au mieux ces écosystèmes fromagers.

Revue des ENIL.indd 32 19/06/2019 16:20

Kit média : Revue des ENIL

Cette revue bi-annuelle est éditée par l'ANFOPEIL.
L'ANFOPEIL est une Association regroupant la Transformation Laitière (FNIL et FNCL), les Écoles Nationales d'Industrie laitière (ENIL), leurs Amicales d'Anciens Élèves et ACTALIA.
Elle a pour finalité première de promouvoir la formation professionnelle des salariés de la Transformation Laitière en diffusant, coordonnant et harmonisant les propositions du réseau des ENIL. Elle a également pour mission de promouvoir les Savoirs Faire des ENIL et ACTALIA ainsi que de favoriser le recrutement et l'accès a l'emploi des Anciens Élèves du réseau.

Prochaines thématiques

- **Décembre 2019 :** Problématiques environnementales dans l'industrie laitière
- **Juin 2020 :** Transmission des savoir-faire

Les destinataires de la revue

- Industries et coopératives laitières et fromagères
- Laiteries - Fromageries
- Écoles - Universités - Centres de recherche

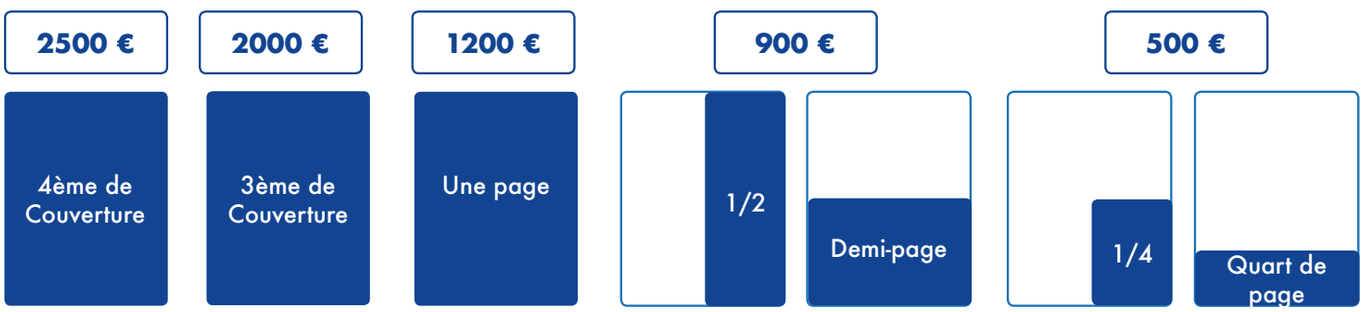
REVUE DES enil

28-36 pages

2000 exemplaires papiers

5000 envois numériques

TARIFS PUBLICITAIRES 2019



accueil@anfopeil-enil.fr

Le réseau des ENIL/ANFOPEIL
BP 10025 • 39801 POLIGNY CEDEX
Tél : 03 84 37 27 24 • Fax : 03 84 37 08 61
accueil@anfopeil-enil.fr

Responsable administrative
Christine GRILLOT
christine.grillot@anfopeil-enil.fr

Coordinateur - Responsable pédagogique :
Thierry MICHELET : thierry.michelet@anfopeil-enil.fr
06 44 71 15 83

ANFOPEIL

Revue des ENIL.indd 33 19/06/2019 16:20

Stages ANFOPEIL

Thierry MICHELET, Coordinateur-Responsable pédagogique, ANFOPEIL

Les micro-organismes sont des alliés indispensables en fromagerie : pas de fromage sans fermentations, pas de fermentations sans micro-organismes. Fabriquer un substrat ad'hoc et proposer des conditions d'environnement précises pour permettre le développement maîtrisé des flores est le challenge du fromager.

Le travail des microbiologistes pour prélever, analyser, identifier … est fondamental afin de comprendre l'origine de la présence puis les phénomènes de croissance ou d'inhibition des micro-organismes tout au long de l'élaboration de nos fromages. Comme nous venons de le voir dans ce numéro, les nouvelles techniques de laboratoire mettant en œuvre la PCR ouvrent de nouvelles possibilités pour aller plus loin et/ou plus vite dans la détection des flores.

Différents stages ANFOPEIL concernent les analyses de laboratoire. Du stage d'initiation, « Bases de microbiologie laitière et laboratoire», en passant par le stage de perfectionnement « Techniques analytiques en microbiologie laitière » ou « Méthodes rapides de détection des flores pathogènes » jusqu'au stage expert « Techniques de biologie moléculaire pour l'industrie laitière », l'offre est réelle pour consolider ses compétences en microbiologie appliquée au secteur laitier.

Ces stages peuvent faire l'objet d'un parcours certifiant pour déboucher sur le Certificat de Qualification Professionnelle « Laborantin dans la Transformation laitière ».
Nous consulter pour toute question sur le sujet.

Stage 40 **Bases de microbiologie laitière et laboratoire -** 4 Jours **Niveau Initiation**	ENIL Mamirolle	Semaine 21 20/05 au 24/05	Bases de microbiologie : cellule, reproduction et facteurs de croissance - Micro-organismes rencontrés et recherchés dans le lait cru - Applications pratiques : bonnes pratiques de laboratoire, prélèvement, dénombrement sur milieux liquides et solides, microscopie, lecture et interprétation résultats
	ENIL Saint-Lô	Semaine 49 02/12 au 06/12	
Stage 42 **Techniques analytiques en microbiologie laitière -** 4 Jours **Niveau Perfectionnement**	ENIL Mamirolle	Semaine 38 16/09 au 20/09	Cadre règlementaire (paquet hygiène, HACCP, PMS, …), étude flores nuisibles et focus produits laitiers, applications pratiques : techniques identification / recherche / dénombrement sur fromage lait cru, comparaison de méthodes référence et alternatives, résultats et interprétation, gestion non-conformités, visite laboratoire accrédité Cofrac
	ENIL Saint-Lô	Semaine 50 09/12 au 13/12	
Stage 44 **Méthodes rapides de détection des flores pathogènes. Utilisation de la PCR -** 2 Jours **Niveau Perfectionnement**	ENIL Mamirolle	Semaine 16 15/04 au 17/04	Environnement PCR. Champs d'application (analyses libératoires, traçabilité, libération), comparaison aux techniques «classiques», normes et techniques biologie moléculaire, applications pratiques : techniques détection de pathogènes – intervention entreprise développement et commercialisation kits de diagnostics
Stage 45 **Techniques de biologie moléculaire pour l'industrie laitière -** 2 Jours **Niveau Expertise**	ENIL La Roche sur Foron	Semaine 46 14/11 au 15/11	Avantages et limites des techniques d'amplification - Développement de solutions alternatives de couplage qPCR-immunoconcentration - Analyses des données et interprétation des résultats - Analyses des séquences pour l'identification de pathogènes - Perspectives offertes par les nouvelles techniques de séquençage

NB : Les descriptifs complets des stages sont disponibles sur notre site : www.anfopeil-enil.fr
N'hésitez pas à contacter le Réseau ANFOPEIL pour toute demande de formation « à la carte » sur ces thématiques ou d'autres.

Revue des ENIL.indd 34 19/06/2019 16:20

Trouvez votre FUTUR EMPLOYÉ
dans le secteur de l'agroalimentaire

@eniljob www.eniljob.fr Ecrivez-nous : service.emploi@anfopeil-enil.fr

Un service qui vous met en **relation** avec des **candidats** motivés, diplômés et compétents dans **les secteurs qui vous intéressent** !

- Diffusion et Consultation d'offres en ligne
- Accès à la CVthèque
- Contact direct avec les candidats
- Affichage des offres dans les ENIL
- Suivi des offres
- Gratuité des offres de stage

TARIFS

Entreprise de -10 salariés
1 offre/ 3 mois **42 €**

Entreprise + 10 salariés
1 offre/ 3 mois **100 €**

PACKS ANNONCES
5 offres/ 1 an **400 €**
10 offres/ 1an **700 €**
50 offres/ 1 an **3000 €**

TARIFS CABINET DE RECRUTEMENT

1 offre / 3 mois **210 €**

PACK ANNONCE
> 5 offres / 1 an **105 € / offre (-50%)**

PROCÉDURE DIFFUSION DES OFFRES

Créez vous un compte recruteur

Cliquez sur **« Je recrute »** puis choisissez une offre d'abonnement -> cliquez ensuite sur **SOUSCRIRE**

Sélectionnez un pack (d'une ou plusieurs offres) puis Saisissez-la et cliquez sur **PRÉVISUALISER**

Modifiez l'offre en cliquant sur **MODIFIER LA LISTE** et Validez-la en cliquant sur **ENVOYER LA LISTE**

Il faut ensuite absolument **passer la Commande pour que l'offre soit validée** !
Pour cela, vous devez remplir vos informations de facturation, choisir votre mode de paiement (virement bancaire / paiement par chèque) et cliquer sur **COMMANDER**

(Votre commande sera ensuite validée, diffusée et vous recevrez la facture dans les plus brefs délais)

Revue des ENIL.indd 35 19/06/2019 16:20

LE RÉSEAU ANFOPEIL

ENIL
25620 MAMIROLLE
Tél. 03 81 55 92 00

Conseiller Formation : A. COINTE
E-mail : adeline.cointe@educagri.fr

ENILBIO
39801 POLIGNY
Tél. 03 84 73 76 76

Conseiller Formation : I. FRIMOUT
E-mail : isabelle.frimout@educagri.fr

A C T A L I A
01000 BOURG-EN-BRESSE
Tél. 04 92 34 71 86

Conseillère Formation : S. FONTAINE
E-mail : s.fontaine@actalia.eu

ENIL
50620 LE HOMMET D'ARTHENAY
Tél. 02 33 77 80 82

Conseillère Formation : A. deschenes
E-mail : agnes.deschenes@educagri.fr

ENILIA
17700 SURGÈRES
Tél. 05 46 27 69 00

Conseiller Formation : E. AUDEBERT
E-mail : emmanuel.audebert@educagri.fr

ENILV
15000 AURILLAC
Tél. 04 71 46 26 60

Conseillère Formation : C. ARSAC
E-mail : celine.arsac@educagri.fr

ENILV
74805 LA ROCHE-SUR-FORON
Tél. 04 50 03 47 13

Conseillère Formation : J. DEBALLON
E-mail : julie.deballon@educagri.fr

Membres du réseau des ENIL

enil
Le Réseau
des Ecoles Nationales
d'Industrie Laitière

Revue des ENIL.indd 36 19/06/2019 16:21