
LES FROMAGES A PATES MOLLES

1.1. Importance du marché des fromages en Europe et en France

Le fromage est l'un des plus anciens moyens de conserver le lait et des preuves de l'existence de sa fabrication ont été attestées depuis le sixième millénaire avant notre ère (Salque *et al*, 2012).

L'Europe produit annuellement 9 millions de tonnes de fromage (50% de la production mondiale) (Eurostat, 2013). La France quant à elle se situe au deuxième rang européen des pays producteurs de fromage – entre respectivement l'Allemagne et l'Italie - avec 1,9 millions de tonnes fabriquées chaque année soit un peu plus de 20 % de la production de l'Union Européenne et 10% de la production mondiale. Le chiffre d'affaires 2011 de l'industrie fromagère (hors fromages frais) s'élève à plus de 6,35 milliards d'euros dont 2,1 milliards concernent les fromages à pâtes molles. La balance commerciale de la France concernant les échanges de fromage est largement bénéficiaire avec un excédent de 1,7 milliard d'euros pour l'année 2012, dont 78 % de l'export et 96 % de l'import s'effectue avec d'autres pays de l'Union Européenne (CNIEL, 2013).

Les français consomment chaque année un peu plus de 26 kg par habitant et par an, ce qui en fait le plus grand consommateur de l'Union. La France est réputée comme étant le "pays du fromage" pour sa consommation certes, mais aussi du fait de la diversité de son offre.

Elle dénombre en effet plus de 1000 sortes de fromages dont 45 bénéficiant d'une « Appellation d'Origine Contrôlée » (AOC) ou d'une « Appellation d'Origine Protégée » (AOP) (CNIEL, 2013). Concernant les fromages à pâte molle en particulier, leur consommation représente 25 % de la consommation totale de fromage, juste après les pâtes pressées cuites.

1.2. Technologie des fromages à pâte molle

Les fromages à pâte molle sont définis dans la norme internationale Codex Alimentarius (CODEX STAN A-6-1973. Adopté en 1973. Révision 1999. Amendé en 2006, 2008, 2013) comme étant tous les fromages dont l'extrait sec dépasse 67 % durant la période de saumurage. En France, cette catégorie renferme aussi bien les produits traditionnels qui bénéficient du label AOC/AOP, souvent produits à partir de lait cru, que des produits industriels plus modernes et plus standardisés (Figure 1).

Selon la conduite de l'affinage, deux types de croûte peuvent se développer sur les fromages à pâte molle permettant de diviser cette famille en deux sous-familles : les pâtes molles à croûte fleurie (ex. Brie, Camembert, Coulommiers) et les pâtes molles à croûte lavée ou croûte morgée (ex. Epoisses, Livarot, Maroilles, Munster). Malgré l'hétérogénéité des fromages à pâte molle, plusieurs points communs caractérisent la fabrication de ces fromages (Figure 2).



Figure 1 : Carte de France des Produits AOP (Source : CNIEL 2013)

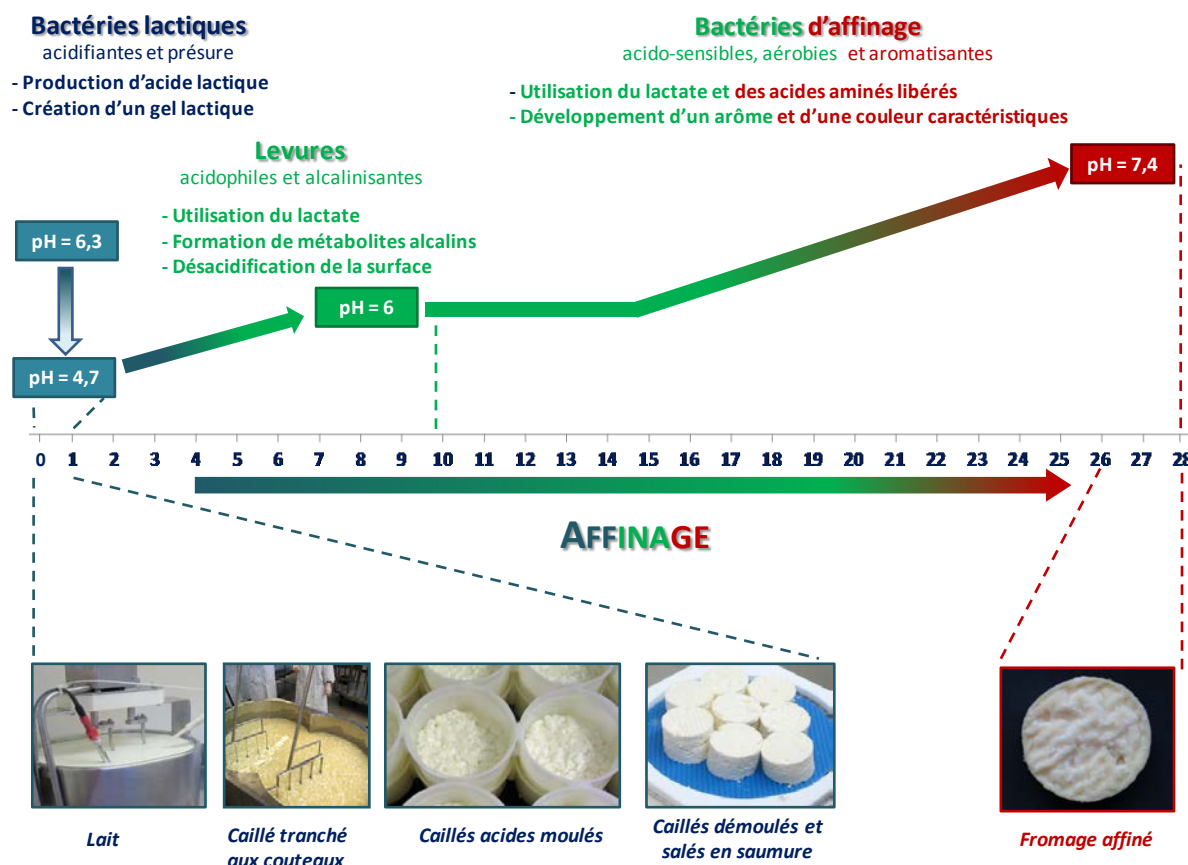


Figure 1 : Schématisation des différentes étapes de fabrication d'un fromage à pâte molle

1.1.1. L'ensemencement et la coagulation

La coagulation est une étape de transformation chimique majeure du lait, conduisant à la séparation des fractions solubles et insolubles du lait. Elle peut être de type enzymatique (présure), lactique ou mixte (bactéries et présure). La coagulation enzymatique fait intervenir la présure, préparation enzymatique issue de la caillette (4ème poche de l'estomac) du veau. La présure se compose essentiellement de chymosine, enzyme protéolytique spécifique des liaisons phénylalanine-méthionine de la caséine. (Alais, chap. 21, 1975). La coagulation lactique implique des bactéries lactiques (Lactic Acid Bacteria, LAB) qui fermentent le lactose – principal glucide du lait - en acide lactique.

Cette flore lactique est naturellement présente dans le lait par contamination au moment de la traite dans la méthode traditionnelle. De manière à mieux maîtriser le développement de cette flore le lait peut aussi être pasteurisé puis ensemencé avec une culture de ferments lactiques préalablement préparée (Alais, chap. 21, 1975). Dans le cas des fromages à pâte molle, cette coagulation est dite « mixte » puisque la température du milieu (28 à 35 °C) et le pH de l'emprésurage (6,3 et 6,4) permettent à la fois l'action des enzymes et le développement des bactéries lactiques. Certaines technologies ajoutent aussi les ferments d'affinage à cette étape de la fabrication (Cogan et al., 2014, chap. 10).

1.2.2. L'égouttage et le tranchage

A la coagulation du lait, s'ensuit un phénomène spontané d'expulsion de l'eau contenue dans le gel laitier appelé synérèse. Cette synérèse consiste en une contraction du réseau de caséines renfermant les globules gras et expulsant le lactosérum. L'égouttage peut se faire spontanément après moulage du caillé dans des moules perforés, mais également par pressage et/ou cuisson. Avant d'être moulé, le caillé est tranché en grains plus ou moins gros, afin d'augmenter la surface d'égouttage. Ce sont ces étapes de tranchage et d'égouttage qui vont conditionner en grande partie l'extrait sec du fromage et donc sa structure finale. Le type de pâte fromagère est très souvent lié à la façon dont a été menée cette étape.

1.2.3. Le salage et l'affinage

L'étape de salage est destinée à protéger le caillé contre l'installation de micro-organismes indésirables ainsi qu'à favoriser l'égouttage par drainage du sérum. Il contribue également à la formation de la croûte. Par la régulation de l'activité de l'eau (a_w), le sel module le développement des micro-organismes et favorise les activités enzymatiques au cours de l'affinage. Le salage peut être effectué par immersion dans une solution de saumure (NaCl) concentrée, à sec par frottement à la surface, ou encore par incorporation du sel dans le caillé broyé.

La plupart des fromages à pâte molle ont une teneur finale en NaCl comprise entre 1,5 et 2,0 %.

L'affinage correspond donc à une succession de transformations biochimiques, réalisées à la fois par des enzymes déjà présentes dans le lait ou le caillé, et par des enzymes synthétisées par le microbiote qui se développe au cours de la maturation (bactéries, levures et/ou moisissures) (Choisy et al, 1997a ; Mahaut et al., 2000). Le temps d'affinage varie en moyenne de 12 à 45 jours suivant les fromages et les qualités organoleptiques désirées. Cette étape est d'autant plus importante concernant les fromages à pâte molle que la grande majorité de la typicité des fromages obtenus dépend du développement de la flore aérobie de surface lors de l'affinage, celle-ci intervenant tardivement (Brennan et al., 2004).

Sur le plan chimique, il s'agit d'une série de transformations que sont : glycolyse des sucres résiduels, protéolyse des caséines, et lipolyse. Ces réactions libèrent respectivement des acides volatiles, des acides aminés, et des acides gras volatiles, responsables de l'arôme du fromage. Les différentes populations de micro-organismes évoluent en étroite interaction au long de l'affinage, de manière concourante ou successive. On distingue donc plusieurs microflore, ayant chacune un rôle spécifique.

1.3. Les fromages à pâte molle : une biodiversité importante et une implantation séquentielle

Comme nous l'avons vu précédemment, les micro-organismes responsables de l'affinage sont d'une grande biodiversité, qu'ils soient encensés ou que leur implantation soit le fait de leur présence dans l'environnement d'affinage. Appartenant à la fois aux Règnes Procaryote qu'Eucaryote, leurs dynamiques d'implantation ainsi que les grands rôles de chaque catégorie majeure du microbiote fromager sont abordés dans les sections suivantes.

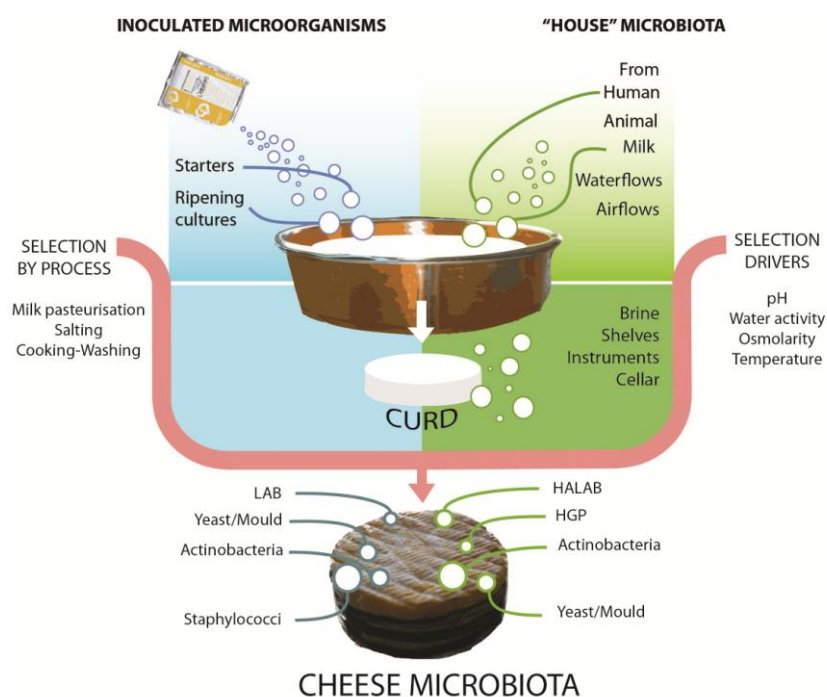


Figure 3 : Microbiote des fromages à pâtes molles : origine et biodiversité (d'après Irlinger et al. 2014)

1.3.1. Les bactéries lactiques (LAB) « starters »

Dans le processus de transformation du lait en fromage à coagulation lactique ou mixte, la microflore lactique est la première flore à intervenir. Les bactéries lactiques sont classées en différents genres, selon la composition de leur paroi cellulaire, leurs caractéristiques biochimiques et génétiques (Stiles & Holzapfel, 1997). Les genres *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* sont majoritairement retrouvés dans les fromages. Les genres *Lactococcus* et *Streptococcus* sont utilisés comme « starters lactiques » et présents dès l'étape de coagulation du lait, provenant soit de la flore naturelle du lait, ou bienensemencés dans le cas de fromages au lait pasteurisé. La fonction principale de ces bactéries est de dégrader le lactose, sucre majoritairement contenu dans le lait, pour produire de l'acide lactique (fermentation lactique) (Beresford et Williams, 2004).

Cette microflore lactique, présente dès la maturation du lait, est dominante durant les premiers jours d'affinage ($\approx 10^9$ UFC.g⁻¹ de caillé). Son développement est essentiel pour préserver le caillé d'une contamination par des germes pathogènes éventuellement présents dans le lait cru ainsi que pour assurer la formation optimale du caillé. Sa concentration et son activité stagnent puis décroissent dans le fromage au fur et à mesure de l'affinage.

Les autres genres de LAB dites Non-starter Lactic Acid Bacteria (NSLAB) peuvent aussi contribuer à l'affinage par leurs activités enzymatiques ; cependant cette thèse ne portant pas sur ces micro-organismes, ils ne seront pas évoqués plus en détails.

1.3.2. Les organismes eucaryotes : levures acido-tolérantes et champignons filamenteux

Les levures hémi-ascomycètes au caractère acido-tolérant font partie de la deuxième vague de flores s'implantant lors de l'affinage d'un fromage à pâte molle et peuvent être présentes soit à la suite d'une contamination par l'environnement d'affinage – saumure, cave, ustensiles - soit ensemencées lors de l'affinage – par exemple pendant le salage (morgeage) de la croûte dans le cas d'une technologie croûte lavée. Les espèces les plus fréquemment isolées et identifiées en fromagerie appartiennent aux genres *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspora* et *Yarrowia* (Chamba et Irlinger, 2004). Ces levures ayant un métabolisme essentiellement - voire strictement – aérobique, on estime que les concentrations en cellules viables sont de 100 à 1000 fois plus importantes sur la croûte qu'au cœur de la pâte atteignant des concentrations de l'ordre de $10^6 - 10^9$ UFC.cm⁻² de croûte de fromage (Chamba et Irlinger, 2004). L'espèce *Debaryomyces hansenii*, très halo-tolérante, est la première à se développer. Son activité désacidifiante consiste en une dégradation de l'acide lactique et en une protéolyse des caséines aboutissant à la libération de molécules alcalinisantes telles que l'ammoniaque. La présence de moisissures superficielles caractérise les fromages à pâtes molles et croûtes fleuries. Sur le plan technologique, les espèces les plus étudiées appartiennent au genre *Penicillium*. Elles contribuent, en métabolisant l'acide lactique, à la neutralisation de la pâte et produisent de nombreuses enzymes qui participent à la maturation du fromage et à l'implantation des bactéries d'affinage acido-sensibles.

L'espèce *Penicillium camembertii* est la plus décrite, puisque se trouvant à la surface de la majorité des fromages à croûtes fleuries tels que le Camembert ou le Brie (Lenoir et al., 1983). Les travaux de cette thèse reposant essentiellement sur des micro-organismes de fromage à pâte molle à croûte lavée, *Penicillium camembertii* ne sera que brièvement évoqué et conservé comme seul champignon filamenteux utilisé lors de certaines expériences.

1.3.3. Les organismes procaryotes : bactéries d'affinage non lactiques

L'utilisation de nouvelles techniques de séquençage culture-indépendantes a permis d'identifier jusqu'à 15 genres dominants concernant la flore bactérienne non-lactique de fromages à pâte molle - abondance moyenne supérieure à 1% du total des genres identifiés, basé sur un séquençage 16S et sur un échantillon de 137 fromages provenant de 10 pays différents (Wolfe et al., 2014) -. Ce chiffre s'élève à près de 60 genres en tenant compte de ceux dont l'abondance est inférieure à 1%.

Ces nouvelles techniques d'identification complètent et confirment des travaux plus anciens comme ceux, entre-autres, de Mounier et al. (2005) qui, par des techniques culture-dépendantes (isolement sur milieu gélosé) portant sur un échantillon de 4 fromages irlandais, ont référencé des espèces dominantes appartenant aux genres décrits dans les travaux de Wolfe et al. (2014). Les travaux de cette thèse se concentrant sur une sélection restreinte de ces micro-organismes, seuls les genres identifiés comme dominants à l'heure actuelle seront abordés. De plus, le choix de l'espèce a aussi pris en compte l'utilisation technologique de certains de ces micro-organismes.

Ainsi, la flore d'affinage non-lactique des fromages à pâte molle est en majorité composée de bactéries à Gram-positif aérobies stricts appartenant aux phyla des Firmicutes et des Actinobactéries (Wolfe et al., 2014). Les bactéries à Gram-négatif sont, quant à elles, surtout représentées par la famille des *Enterobacteriaceae* dont certaines sont aérobies facultatives (Montel et al., 2014). Pour cette raison, la flore d'affinage non-lactique se développe essentiellement en surface des fromages à pâte molle.

Les bactéries corynéformes représentent la part la plus importante de la flore à Gram-positif aérobie stricte, avec des genres tels que *Brevibacterium* et *Corynebacterium*. Un autre genre appartenant aux actinobactéries (*Arthrobacter*) figure parmi les plus représentés ; les Firmicutes sont essentiellement représentés par le genre *Staphylococcus* (Mounier et al., 2005 ; Gori et al., 2013). Le genre *Hafnia* se trouvent parmi les représentants majeurs des *Enterobacteriaceae* (aussi bien sur des fromages au lait cru (Wolfe et al., 2014) que sur des fromages au lait pasteurisé comme en témoigne l'étude de Lay et al. (2004) portant sur des camemberts puisqu'utilisé comme « adjunct culture » par certains fromagers.

1.4. Micro-organismes et écosystème modèle utilisés lors de la thèse

L'expertise du laboratoire concernant les bactéries et levures d'affinage des fromages à pâte molles a permis de constituer un écosystème réduit composé 9 micro-organismes, adapté des travaux de Bonaïti et al. (2005). Cet écosystème modèle comprend les espèces suivantes : *Arthrobacter arilaitensis*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Corynebacterium casei*, *Hafnia alvei*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus equorum*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* et *Geotrichum candidum*.

Une miniaturisation de la fabrication de fromages de type Livarot a été développée (cf. Chapitre 2) Dans le cadre de cette thèse, les étapes de lavage n'ont pas été réalisées et les fromages obtenus possèdent une croûte naturelle dont la flore de surface s'est développée de manière autonome, sans conditionnement par le biais d'un lavage. Nous disposons du génome d'au moins une souche parmi les toutes les espèces précédemment citées ; ceci avait son importance, le quatrième chapitre de cette thèse étant consacrée à l'étude de la réponse aux stress digestifs d'une sélection de ces micro-organismes par des outils moléculaires.