
Stage et Travail de fin d'étude : Développement d'un modèle fromage à pâte molle à croûte lavée en vue de l'isolement d'une espèce non identifiée de *Fusobacterium*, inhibitrice potentielle de *Listeria monocytogenes*

Auteur : Truong, Kim Dinh

Promoteur(s) : Daube, Georges

Faculté : Faculté de Médecine Vétérinaire

Diplôme : Master de spécialisation en management de la sécurité de la chaîne alimentaire

Année académique : 2025-2026

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/27137>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Faculté de Médecine vétérinaire

Département des Sciences des Denrées alimentaires

Secteur de microbiologie des Denrées alimentaires

**DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE FROMAGE À PÂTE MOLLE À
CROÛTE LAVÉE EN VUE DE L'ISOLEMENT D'UNE ESPÈCE NON
IDENTIFIÉE DE *FUSOBACTERIUM*, INHIBITRICE POTENTIELLE
DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*.**

**DEVELOPMENT OF A WASHED-RIND SOFT CHEESE MODEL
FOR THE ISOLATION OF AN UNIDENTIFIED OF
FUSOBACTERIUM AS A POTENTIAL INHIBITOR OF
LISTERIA MONOCYTOGENES.**

Kim Dinh TRUONG

Mémoire présenté en vue de l'obtention
du Diplôme de Master de Spécialisation
en Management de la Sécurité de la Chaîne alimentaire

Année académique 2025 / 2026



Faculté de Médecine vétérinaire

Département des Sciences des Denrées alimentaires

Secteur de microbiologie des Denrées alimentaires

**DÉVELOPPEMENT D'UN FROMAGE MODÈLE À PÂTE MOLLE À
CROÛTE LAVÉE EN VUE DE L'ISOLEMENT D'UNE ESPÈCE NON
IDENTIFIÉE DE FUSOBACTERIUM, INHIBITRICE
POTENTIELLE DE LISTERIA MONOCYTOGENES.**

**DEVELOPMENT OF A WASHED-RIND SOFT CHEESE MODEL
FOR THE ISOLATION OF AN UNIDENTIFIED OF
FUSOBACTERIUM AS A POTENTIAL INHIBITOR OF
LISTERIA MONOCYTOGENES.**

Kim Dinh TRUONG

Mémoire présenté en vue de l'obtention
du Diplôme de Master de Spécialisation
en Management de la Sécurité de la Chaîne alimentaire

Année académique 2025 / 2026

Développement d'un modèle de mini-fromage à pâte molle à croûte lavée en vue de l'isolement d'une espèce non identifiée de *Fusobacterium*, inhibitrice potentielle de *Listeria monocytogenes*.

Mots clés : *Listeria monocytogenes*, *Fusobacterium*, Fromage à pâte molle, croûte lavée, biopréservation

Development of a Miniature Washed-Rind Soft Cheese Model for the Isolation of an unidentified of *Fusobacterium* as a Potential Inhibitor of *Listeria monocytogenes*.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *Fusobacterium*, soft cheese, washed rind, biopreservation.

Monsieur Daube Georges, promoteur de ce mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master de Spécialisation en Management de la Sécurité de la Chaîne alimentaire a accepté la publication de cet ouvrage. L'auteur et le promoteur autorisent sa consultation et sa photocopie pour usage personnel.

Toute utilisation doit se conformer aux dispositions sur les droits d'auteurs, en particulier l'obligation de mentionner la source lors de l'utilisation de résultats de cette étude.

Enfin, je souhaite mentionner que des outils d'intelligence artificielle générative ont été utilisés au cours de la rédaction de ce mémoire, principalement pour la reformulation stylistique, la vérification orthographique et grammaticale. L'ensemble du contenu scientifique, des interprétations et des conclusions reste néanmoins le fruit de mon travail personnel et de l'accompagnement de mes encadrants.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à Madame Jaber, ma maître de stage, pour la qualité de son encadrement, sa disponibilité, ses conseils avisés et l'intérêt qu'elle a porté à ce travail tout au long de sa réalisation. Son humour et sa bonne humeur m'ont permis d'aborder ce projet avec joie et courage.

Je remercie également mon promoteur, Monsieur Daube, pour son accompagnement scientifique, son aide précieuse dans la conception de l'étude et la relecture attentive de ce manuscrit.

Mes remerciements sincères vont également à Monsieur Taminiau, pour le courage qu'il m'a transmis durant ces six mois de stage et pour ses conseils qui m'ont permis de poursuivre mes recherches avec confiance, et pour le traitement bio-informatique des données métagénétiques qui ont enrichi ce travail. Sa présence bienveillante et rassurante a été un véritable réconfort dans les moments plus difficiles.

Je souhaite également adresser mes sincères remerciements à Robin Taminiau pour la conception et la réalisation du modèle 3D du moule ayant permis son impression, ainsi qu'à Simon Daube pour la fabrication du moule à l'aide de son imprimante 3D. Leur contribution a été précieuse pour la réalisation de cette partie du projet.

Je remercie chaleureusement Raphaëlle Minutillo pour son aide technique précieuse et son soutien constant tout au long de ce TFE, tant sur le plan pratique qu'émotionnel. Ses réponses à mes innombrables questions, parfois un peu naïves, et son accompagnement lors de mes premières manipulations m'ont été d'une aide inestimable et m'ont apporté beaucoup de sérénité.

Je souhaite également remercier Tolgahan Babaccan pour son soutien technique et les cafés partagés le matin. Mes remerciements vont aussi aux assistantes du département et à l'ensemble de l'équipe du B42 pour leur accueil, leur disponibilité et leur soutien, ainsi que pour la réalisation des analyses métagénétiques indispensables à cette étude.

Je remercie chaleureusement mes proches, en particulier mon mari et ma famille, pour leur soutien moral, leur patience et leurs encouragements tout au long de ce travail.

Enfin, à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire et qui n'auraient pas été mentionnées ici, j'adresse mes sincères remerciements.

Résumé

Les fromages à pâte molle à croûte lavée constituent un écosystème microbien complexe où *Fusobacterium* sp., une bactérie non caractérisée à ce jour, a été mise en évidence dans des travaux préliminaires. Cette souche pourrait présenter un intérêt en biopréservation vis-à-vis de *Listeria monocytogenes*. Son étude nécessite toutefois un modèle expérimental permettant de multiplier les échantillons tout en limitant les coûts et les volumes de production. L'objectif de ce travail est de développer un fromage modèle d'environ 10 g par unité, à pâte molle et croûte lavée, mimant les caractéristiques du fromage de Herve.

Deux lots ont été produits selon deux modes d'acidification : un lot AL, préacidifié à pH 6,1 par ajout d'acide lactique avant emprésurage, et un lot F, ensemencé par les ferments R-704 et BLO. Chaque lot a été soumis à quatre durées de saumurage (FR4, FR6, FR8 et FR10 minutes) et suivi jusqu'à J42 pour le lot AL et J28 pour le lot F. Les paramètres physico-chimiques (freinte, pH, activité de l'eau, teneur en sel) ont été mesurés à chaque point d'analyse, en parallèle du dénombrement de la flore totale, des bactéries lactiques, des entérobactéries et des levures et moisissures. La composition du microbiote a été caractérisée par métagénomique ciblant la zone V1-V3 de l'ADN ribosomal 16S, et comparée à des données antérieures obtenues sur des fromages de taille standard (Minutillo et Jaber, 2024).

Les deux lots présentent des profils distincts. Le lot AL présente une freinte excessive (42 à 46 %), un pH final de 7,55 et une teneur en sel proche de la cible (2,00 à 2,35 %). Le lot F s'inscrit dans la freinte cible (6 à 14 %) mais dépasse la neutralité à J28 (pH ~8,0) et présente une teneur en sel trop faible (1,15 à 1,45 %). L'activité de l'eau reste conforme aux cibles dans les deux lots. La caractérisation métagénomique révèle une succession écologique typique dans le lot AL et une communauté dominée par *Lactococcus* dans le lot F. *Fusobacterium* sp. atteint des maxima cohérents (21 % et 12 %), suggérant que la dynamique de cette souche est indépendante du format et du mode d'acidification.

Le modèle miniaturisé apparaît adapté à l'étude de *Fusobacterium* sp. Le lot F, plus représentatif du fromage de Herve traditionnel, devra faire l'objet d'ajustements sur la teneur en sel avant sa validation définitive par des productions répétées.

Summary

Washed-rind soft cheeses harbour a complex microbial ecosystem in which *Fusobacterium* sp., a currently uncharacterised bacterium, was previously identified. This strain may be of interest for biopreservation against *Listeria monocytogenes*. Its study, however, requires an experimental model that allows the number of replicates to be increased while limiting production costs and volumes. The aim of this work was to develop a model cheese of approximately 10 g per unit, with a soft body and washed rind, mimicking the characteristics of Herve cheese.

Two batches were produced according to two acidification strategies: batch AL, pre-acidified to pH 6.1 by the addition of lactic acid before rennet addition, and batch F, inoculated with R-704 and BLO starters. Each batch was submitted to four brining durations (FR4, FR6, FR8 and FR10 minutes) and monitored until day 42 for batch AL and day 28 for batch F. Physico-chemical parameters (moisture loss, pH, water activity, salt content) were measured at each analysis point, along with the enumeration of total flora, lactic acid bacteria, enterobacteria, and yeasts and moulds. The microbiota composition was characterised by metagenetics targeting V1-V3 fragment of 16S rDNA and compared with previous data obtained on standard-size cheeses (Minutillo and Jaber, 2024).

Both batches showed distinct profiles. Batch AL presented an excessive moisture loss (42 to 46%), a final pH of 7.55 and a salt content close to the target (2.00 to 2.35%). Batch F remained within the target moisture loss range (6 to 14%) but exceeded neutrality by day 28 (pH ~8.0) and showed a salt content well below the target (1.15 to 1.45%). Water activity remained within the target range in both batches. Metagenetic characterisation revealed a typical ecological succession in batch AL and a *Lactococcus*-dominated community in batch F. *Fusobacterium* sp. reached consistent maximum abundances (21% and 12%), suggesting that the dynamics of this strain are independent of the cheese format and acidification mode.

The miniaturised model appears suitable for the study of *Fusobacterium* sp. Batch F, which is more representative of traditional Herve cheese, will require adjustments to its salt content before its definitive validation through repeated productions.

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
RÉSUMÉ	4
SUMMARY	5
LISTE DES TABLEAUX	8
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES ANNEXES	10
LISTES DES ABRÉVIATIONS	10
INTRODUCTION	11
1. LE FROMAGE : UN PRODUIT DE CONSOMMATION IMPORTANTE	11
2. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> : UN ENJEU DE SANTÉ PUBLIQUE PERSISTANT	12
3. LE MICROBIOTE DU FROMAGE : UN LEVIER DE BIOCONTRÔLE	13
4. <i>FUSOBACTERIUM</i> SP. : UNE PISTE PROMETTEUSE ISSUE DE TRAVAUX ANTÉRIEURS	15
5. DÉVELOPPEMENT D'UN FROMAGE MODÈLE	16
MATÉRIEL ET MÉTHODE	17
1. MATÉRIEL	17
1.1. <i>Matières premières et consommables</i>	17
1.2. <i>Moules de production</i>	17
1.3. <i>Instruments</i>	19
1.4. <i>Milieux de culture et matériel d'analyse microbiologique</i>	19
2. MÉTHODES DE PRODUCTION	19
2.1. <i>Pasteurisation</i>	19
2.2. <i>Acidification</i>	20
2.3. <i>Emprésurage, découpe et délactosage</i>	20
2.4. <i>Mise en moule et démoulage</i>	20
2.5. <i>Saumurage</i>	21
2.6. <i>Lavage de croûte</i>	22
2.7. <i>Conditions d'affinage et de conservation</i>	22
2.8. <i>Plan d'analyse hebdomadaire</i>	23
2.9. <i>Adaptations du protocole en cours d'expérimentation</i>	25
3. MÉTHODES D'ANALYSES	25
3.1. <i>Analyses physico-chimiques</i>	25
3.2. <i>Analyses microbiologiques</i>	26
3.3. <i>Analyses métagénomiques</i>	26
RÉSULTATS	28

1.	MORPHOLOGIE	28
2.	PERTE DE MASSE	30
3.	EVOLUTION PHYSICO-CHIMIQUE ET EFFET DU TEMPS DE SAUMURAGE	31
4.	DYNAMIQUE MICROBIENNE	34
5.	CARACTÉRISATION DU MICROBIOTE PAR MÉTAGÉNÉTIQUE	39
DISCUSSION		45
1.	MORPHOLOGIE	45
2.	PERTE DE MASSE	46
3.	EVOLUTION PHYSICO-CHIMIQUE	47
3.1.	<i>Comparaison des dynamiques d'acidification entre les deux lots</i>	<i>47</i>
3.2.	<i>Effet du temps de saumurage</i>	<i>49</i>
4.	DYNAMIQUE MICROBIENNE	49
4.1.	<i>Lot acide lactique</i>	<i>49</i>
4.2.	<i>Lot ferments</i>	<i>50</i>
5.	CARACTÉRISATION DU MICROBIOTE PAR MÉTAGÉNÉTIQUE	51
5.1.	<i>Lot acide lactique</i>	<i>51</i>
5.2.	<i>Lot ferments</i>	<i>52</i>
5.3.	<i>Evolution de Fusobacterium.....</i>	<i>53</i>
5.4.	<i>Comparaison avec les fromages de taille standard.....</i>	<i>54</i>
CONCLUSIONS		57
BIBLIOGRAPHIE		59
ANNEXES		62
ANNEXE A. TABLEAU D'ENSEMENCEMENT À J1 DU LOT D'ACIDIFICATION CHIMIQUE		62
ANNEXE B. SYNTHÈSE DES DÉNOMBREMENTS MICROBIOLOGIQUES		63
1.	<i>Lot acide lactique</i>	<i>63</i>
2.	<i>Lot ferments</i>	<i>65</i>
ANNEXE C. SYNTHÈSE DES RÉSULTATS MÉTAGÉNÉTIQUES		67

Liste des tableaux

- Tableau I.** Plan d'analyse hebdomadaire selon chaque condition de saumurage (p.23)
- Tableau II.** Évolution des masses moyennes ($g \pm SD$) - Lot acide lactique (p.30)
- Tableau III.** Évolution des masses moyennes ($g \pm SD$) - Lot ferments (p.30)
- Tableau IV.** pH par condition de saumurage - Lot acide lactique (p.31)
- Tableau V.** Activité de l'eau (a_w) par condition de saumurage - Lot acide lactique (p.31)
- Tableau VI.** Teneur en sel (% NaCl) par condition de saumurage - Lot acide lactique (p.32)
- Tableau VII.** pH par condition de saumurage - Lot ferments (p.32)
- Tableau VIII.** Activité de l'eau (a_w) par condition de saumurage - Lot ferments (p.33)
- Tableau IX.** Teneur en sel (% NaCl) par condition de saumurage - Lot ferments (p.33)
- Tableau X.** Comparatif des données métagénomiques tailles standard versus tailles miniaturisé (p.54)
- Tableau XI.** Plan d'ensemencement microbiologique au point initial J1 du lot AL (p.62)
- Tableau XII.** Dénombrements des matières premières à J0 (p.63)
- Tableau XIII.** Dénombrement des solutions de lavages (p.63)
- Tableau XIV.** Dénombrements des mini-fromages à J1 (p.63)
- Tableau XV.** Dénombrements des mini-fromages au cours de l'affinage et de la conservation (p.64)
- Tableau XVI.** Matières premières, solutions de lavages et ferments (p.65)
- Tableau XVII.** Dénombrement des solutions de lavages (p.65)
- Tableau XVIII.** Dénombrements des mini-fromages au cours de l'affinage et de la conservation (p.66)
- Tableau XIX.** Composition du microbiote des solutions de lavages et des fromages modèles de J1 à J14 — Lot acide lactique (p.67)
- Tableau XX.** Composition des fromages modèles de J21 à J42 — Lot acide lactique (p.68)
- Tableau XXI.** Composition des solutions de lavage et des fromages modèles de J1 à J14 — Lot ferments (p.69)
- Tableau XXII.** Composition des fromages modèles de J21 à J42 — Lot ferments (p.70)

Liste des figures

Figure 1. Moules 3D conçus pour la production de fromages miniaturisés (p.18)

Figure 2. Photographie des deux moules fabriqués (p.18)

Figure 3. Chronologie du protocole expérimental (p.24)

Figure 4. Représentation schématique de la découpe d'un FR (± 10 g) pour les analyses physico-chimiques : pH (5 g, bleu), aw (2 g, vert), teneur en sel (2 g, orange) (p.25)

Figure 5. Évolution de la morphologie des fromages modèles au cours du temps – lot acide lactique (p.28)

Figure 6. Évolution de la morphologie des fromages modèles au cours du temps – lot ferments (p.29)

Figure 7. Évolution de la flore totale (PCA) par conditions de saumurages - Lot acide lactique (p.34)

Figure 8. Évolution des bactéries lactiques (MRS) par conditions de saumurages - Lot acide lactique (p.34)

Figure 9. Évolution des entérobactéries (VRBG) par conditions de saumurages - Lot acide lactique (p.35)

Figure 10. Évolution des levures et moisissures (YGC) par conditions de saumurages - Lot acide lactique (p.35)

Figure 11. Évolution de la flore totale (PCA) par conditions de saumurages - Lot ferments (p.36)

Figure 12. Évolution des bactéries lactiques (MRS) par conditions de saumurages - Lot ferments (p.37)

Figure 13. Évolution des entérobactéries (VRBG) par conditions de saumurages - Lot ferments (p.37)

Figure 14. Évolution des levures et moisissures (YGC) par conditions de saumurages - Lot ferments (p.38)

Figure 15. Représentation des genres bactériens majoritaires des solutions de lavage au cours de l'affinage – Lot acide lactique (p.39)

Figure 16. Représentation des genres bactériens majoritaires des fromages modèles au cours de l'affinage et de la conservation – Lot acide lactique (p.40)

Figure 17. Abondance relative du genre *Fusobacterium* par échantillon – Lot acide lactique (p.41)

Figure 18. Représentation des genres bactériens majoritaires des solutions de lavage au cours de l’affinage – Lot ferments (p.42)

Figure 19. Représentation des genres bactériens majoritaires des fromages modèles au cours de l’affinage et de la conservation – Lot ferments (p.43)

Figure 20. Abondance relative du genre *Fusobacterium* par échantillon – Lot ferments (p.44)

Liste des annexes

Annexe A. tableau d'ensemencement à J0 du lot d'acidification chimique (p.62)

Annexe B. synthèse des dénombrements microbiens (p.63 - 66)

Annexe C. Synthèse des résultats métagénétiques (p.67 - 70)

Listes des abréviations

- **A.O.P.** : Appellation d’origine protégée
- **BAL** : bactéries lactiques
- **EFSA** : European Food Safety Authority (Autorité européenne de sécurité des aliments)
- **FP** : *Fusobacterium perfoetens*
- **FR** : fromage modèle
- **Lot AL** : lot acide lactique
- **Lot F** : lot ferment
- ***L. monocytogenes*** : *Listeria monocytogenes*
- **OTU** : Operational Taxonomic Unit (Unité Taxonomique Opérationnelle)
- **SL** : solution de lavage
- **VM** : Vieux Moulin
- **YOPI** : young, old, pregnant and immunocompromised

Introduction

1. Le fromage : un produit de consommation importante

Le fromage constitue un produit de large consommation dans de nombreux pays. Son commerce mondial a connu une croissance de 8 % en 2025, portée notamment par les principaux producteurs européens (Confédération belge de l'industrie laitière, BCZ-CBL, 2025). En 2024, l'Allemagne occupait la première place à l'échelle européenne avec une production de 2,4 millions de tonnes (23 % de la production totale), suivie de la France (18 %) et de l'Italie (13 %) (Eurostat, 2025). En Belgique, la consommation ménagère a atteint 14,44 kg par habitant en 2024, soit une légère hausse de 0,6 % par rapport à 2023 (BCZ-CBL, 2025). Il représente une denrée de haute valeur nutritive, riche en protéines, en acides aminés essentiels, en vitamines (A, B12, riboflavine) et en minéraux essentiels tels que le calcium et le phosphore (O'Brien et O'Connor, 2004). Une portion de 100 g peut, par exemple, apporter jusqu'à 1 mg de riboflavine et 1,1 µg de vitamine B12, soit respectivement près de 77 % et 27,5 % des valeurs nutritionnelles de référence (Gherghina *et al.*, 2021). Dans le monde, plus de mille variétés de fromages sont décrites. On les différencie selon plusieurs critères : leur texture (très dure, dure, semi-dure, semi-molle et molle), la technique de coagulation (acide lactique, présure), le type de lait utilisé (vache, brebis, chèvre), le degré de pasteurisation ou leur degré d'affinage (Ritschard et Schuppler, 2024).

Parmi ces nombreuses variétés existantes, les fromages affinés à pâte molle et croûte lavée occupent une place importante, autant par leur diversité que par leur ancrage régional. En Belgique, le seul fromage possédant une certification A.O.P (Appellation d'Origine Protégée) est le fromage de Herve. Ceux-ci doivent ainsi respecter un cahier des charges strict quant à leur aire géographique et à leur mode de fabrication ce qui contribue à la spécificité de leur microbiote (Parlement européen et Conseil européen, 2024). La fabrication du fromage de Herve suit un protocole précis : emprésurage, caillage, découpe, brassage, moulage cubique traditionnel, puis salage manuel ou par saumurage. Le fromage est ensuite affiné durant 4 à 8 semaines avec des conditions de températures et d'humidité élevée. Chaque semaine, des frottages à l'eau salée permettent l'implantation d'une flore microbienne aérobie spécifique responsable de l'intensité des arômes.

Les fromages à pâtes molles et croûte lavée, obtenus à partir de lait cru ou pasteurisé, sont soumis à un nombre élevé de manipulation post-fabrication et présentent des caractéristiques

physico-chimiques favorables au développement de certains agents pathogènes. Ce type de produit représente donc une matrice sensible du point de vue de la sécurité (Schvartzman *et al.*, 2014).

2. *Listeria monocytogenes* : un enjeu de santé publique persistant

Les aliments peuvent être vecteurs de micro-organismes pathogènes responsables de maladies chez l'homme. Ces toxi-infections alimentaires constituent un problème majeur de santé publique et le nombre de cas déclarés est en augmentation ces dernières années, avec une hausse de 14,5 % en 2024 par rapport à 2023. Parmi les zoonoses les plus signalées en 2024 figurent la campylobactériose, la salmonellose, les infections à *Escherichia coli* productrices de Shiga-toxines (STEC) et la listériose (EFSA, 2025).

Parmi ces agents pathogènes, *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) représente un enjeu de premier plan. Cette bactérie à Gram positif, anaérobie facultative, opportuniste et psychrotrophe, se distingue par sa capacité à se multiplier aux températures de réfrigération, ce qui la rend particulièrement problématique dans la chaîne du froid (Ferreira *et al.*, 2014; Martinez-Rios et Dalgaard, 2018; Gérard *et al.*, 2018; Palacios, 2022). Sa tolérance physiologique est large, elle peut croître sur une gamme de pH allant de 4,6 à 9,5, à une activité de l'eau supérieure à 0,92 et jusqu'à une concentration en sel de 10 % (Gérard *et al.*, 2018). Pour encadrer ce risque, le règlement de la Commission européenne (2005) relatif aux critères microbiologiques prévoit que les aliments présentant un $\text{pH} \leq 4,4$, une $a_w \leq 0,92$, ou la combinaison $\text{pH} \leq 5,0$ et $a_w \leq 0,94$, soit automatiquement considérés comme n'étant pas susceptibles de permettre le développement de *L. monocytogenes*. Ces conditions étant rarement toutes réunies dans les fromages à pâte molle, *L. monocytogenes* y trouve un environnement favorable, ce qui explique sa persistance récurrente dans les ateliers de transformation et sa présence fréquente dans les aliments prêts à consommer.

L. monocytogenes est responsable de la listériose, une infection d'origine alimentaire touchant principalement les populations dites « YOPI » (*Young, Old, Pregnant, Immunocompromised*), pouvant entraîner fausses couches, naissances prématurées et décès. La période d'incubation varie et s'étend généralement de 1 à 4 semaines après l'exposition mais peut aller jusqu'à 70 jours, rendant sa traçabilité compliquée (Palacios, 2022; Gérard *et al.*, 2018). Sa gravité en fait l'une des premières causes de décès d'origine alimentaire dans les pays développés (Falardeau *et al.*, 2023). Au cours des cinq dernières années, cette pathologie montre par ailleurs une tendance à la hausse, probablement liée aux changements démographiques et à l'évolution des

habitudes alimentaires. En 2024, l'EFSA a confirmé un taux d'incidence de 0,69 cas pour 100.000 personnes (Rapport zoonoses EFSA, 2025). En Europe, les personnes âgées de plus de 65 ans sont les plus touchées, en particulier les hommes. On considère que 99 % des cas sont causés par une contamination via l'alimentation (Gérard *et al.*, 2018). Elle figure d'ailleurs, aux côtés de *Salmonella* et des toxines staphylococciques, parmi les principales cibles de la législation alimentaire relative aux produits laitiers (Commission européenne, 2005). En effet, le règlement de la Commission européenne (2005) impose une absence stricte dans 25 grammes d'aliments dans les produits prêts à consommer lorsque sa croissance est possible. Dans le cas contraire, on tolère maximum 100 unité formant colonies par gramme (UFC.g⁻¹) lors de sa conservation sur le marché.

Les fromages frais à pâte molle constituent un vecteur alimentaire bien documenté. Contrairement à une idée reçue, les fromages fabriqués à partir de lait pasteurisé ne sont pas exempts de risque. En effet, une étude menée aux États-Unis entre 1998 et 2014 a même montré qu'ils étaient plus fréquemment impliqués dans les épidémies que ceux au lait cru (Jackson *et al.*, 2018). Cet écart s'explique par une consommation plus élevée, la destruction de la microflore concurrentielle et aussi par un faux sentiment de sécurité qui pousse les populations à risque à privilégier ces produits. Dans ce cas, la contamination ne provient pas du lait lui-même mais survient généralement en cours de production, après la pasteurisation (Schvartzman *et al.*, 2014; Palacios, 2022). Une fois installée dans le fromage, la croissance de *L. monocytogenes* est favorisée par une humidité élevée (teneur en eau > 67 %), une faible teneur en sel et une faible acidité, et se poursuit y compris pendant le stockage (Palacios, 2022; Falardeau *et al.*, 2023). La prévention repose donc essentiellement sur le contrôle strict des mesures d'hygiène et sur la surveillance de l'environnement de production.

3. Le microbiote du fromage : un levier de biocontrôle

Face à ce risque persistant et aux limites du contrôle strictement hygiénique de l'environnement, la recherche de stratégies complémentaires de biocontrôle, préservant les qualités organoleptiques du produit, apparaît essentielle. Le microbiote naturellement présent dans le fromage peut ponctuellement représenter un danger mais également exercer une compétition microbienne susceptible d'inhiber les bactéries pathogènes, notamment *L. monocytogenes* (Falardeau *et al.*, 2023).

Les fromages à pâte molle à croûte lavée constituent des écosystèmes microbiens complexes dans lesquels la flore de surface joue un rôle déterminant dans la maturation, la qualité

sensorielle et la sécurité sanitaire (Camargo *et al.*, 2021). Ce microbiote est dominé par le phylum des Bacillota complété par des protéobactéries et des actinobactéries (Gérard *et al.*, 2018; Falardeau *et al.*, 2023). Non inoculée, cette communauté provient de l'environnement, de la ferme et du matériel d'affinage.

La pâte interne va être riche en bactéries lactiques (BAL) jouant un rôle central dans la fermentation, la coagulation du lait et le développement des arômes. Ces bactéries appartiennent notamment au genres *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus*. Elles consomment le lactose et produisent de l'acide lactique abaissant ainsi le pH et inhibant ainsi la croissance de nombreuses bactéries pathogènes et d'altération. Certaines synthétisent en outre des composés antimicrobiens, dont des bactériocines (Gérard *et al.*, 2018; Camargo *et al.*, 2021; Juan et Trujillo, 2022; Falardeau *et al.*, 2023; Ritschard et Schuppler, 2024). La nisine est la bactériocine la plus documentée et la seule à ce jour autorisée en Europe comme additif alimentaire sous le numéro E234, (EFSA Journal, 2017 ; Parlement européen et Conseil européen, 2008). Produite par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, elle présente une activité inhibitrice puissante contre un large spectre de bactéries à Gram positif notamment *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, les entérocoques, les staphylocoques et les streptocoques (Field *et al.*, 2023)

La croûte est quant à elle colonisée par des levures et des moisissures qui contribuent à la texture, à la couleur et au profil aromatique du fromage (Camargo *et al.*, 2021). Le genre *Debaryomyces*, halotolérant, y domine. Ces levures consomment le lactate produit par les BAL et libèrent des composés alcalins (notamment de l'ammoniac) faisant progressivement remonter le pH de surface (Dalzini *et al.*, 2017; Quijada *et al.*, 2020; Falardeau *et al.*, 2023). Cette désacidification prépare le terrain pour les bactéries moins acido-tolérantes notamment les staphylocoques, *Brevibacterium linens* et diverses espèces du genre *Corynebacterium*, dont l'activité protéolytique et lipolytique dégrade les protéines et les matières grasses du fromage (Dalzini *et al.*, 2017; Falardeau *et al.*, 2023; Ritschard et Schuppler, 2024). À mesure que le pH s'élève et que la surface reste salée et humide, des corynébactéries du genre *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Glutamicibacter* et *Microbacterium*, particulièrement adaptées à ce microenvironnement, deviennent dominantes. L'action combinée de l'ensemble de ces micro-organismes colore progressivement la croûte, assouplit la pâte et confère au fromage à pâte molle et croûte lavée ses caractéristiques organoleptiques recherchées (Gérard *et al.*, 2018; Quijada *et al.*, 2020; Falardeau *et al.*, 2023; Ritschard et Schuppler, 2024). Leur présence

contribue également à empêcher l'installation d'agents pathogènes par compétition pour les nutriments et l'espace (Mayo *et al.*, 2021; Ritschard et Schuppler, 2024).

Cette succession microbienne aboutit à un profil physico-chimique final proche de la neutralité, favorable à l'expression des arômes typiques du fromage mais aussi au développement de *L. monocytogenes* (aw 0,95-0,99 ; pH proche de la neutralité en fin d'affinage) (Falardeau *et al.*, 2023).

Plusieurs de ces populations exercent une action inhibitrice documentée contre *L. monocytogenes*. Des travaux menés au Brésil ont montré, *in vitro*, que les coliformes (principalement *Escherichia coli*) ou les composés qu'ils produisent réduisent significativement la croissance de l'agent pathogène (Martinez-Rios et Dalgaard, 2018). L'acide lactique produit par les BAL a également un effet inhibiteur direct au-delà de 0,3 % de concentration (Martinez-Rios et Dalgaard, 2018). Lors de la production des fromages de Herve, l'utilisation de ferments d'amorçage renforce cet effet en modulant l'activité biologique du microbiote par compétition nutritionnelle et acidification rapide du caillé (Gérard *et al.*, 2018).

4. *Fusobacterium* sp.: une piste prometteuse issue de travaux antérieurs

C'est précisément au sein de cette flore d'affinage qu'une piste originale a émergé. Le Département des Sciences des Denrées alimentaires de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège a mené plusieurs études sur le microbiote indigène des fromages artisanaux belges. Gérard *et al.* (2021) y ont identifié une espèce non décrite de *Fusobacterium* présentant un potentiel bioprotecteur contre la croissance de *L. monocytogenes*. Les analyses métagénomiques réalisées sur trois échantillons de fromage à pâte molle et croûte lavée ont mis en évidence une abondance relative moyenne de $12,2 \pm 3$ % du microbiote bactérien, atteignant jusqu'à environ 15 % dans certains échantillons. Des analyses moléculaires ont montré que cette nouvelle espèce avait *Fusobacterium perfoetens* (FP) comme espèce connue la plus proche. L'alignement du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (rRNA 16S) a révélé une identité de 93,6 %, tandis que la comparaison génomique a montré une identité nucléotidique de 82,89 %. Ces deux valeurs, inférieures respectivement aux seuils de 97 % et 95 %, suggèrent que la souche fromagère est apparentée à FP, tout en indiquant qu'elle pourrait correspondre à une nouvelle espèce du genre *Fusobacterium* (De Witte *et al.*, 2017; Gérard, 2021).

Les travaux ultérieurs de Gallait (2022) a confirmé sa présence dans les fromages affinés de Herve du VM et suggèrent que son réservoir naturel se situerait non pas dans les matières premières mais dans l'environnement de production, plus précisément au niveau des étapes d'affinage et de lavage. Malgré plusieurs milieux de culture et de conditions d'incubations, Gallait C. n'a pas réussi à cultiver ni à isoler ce *Fusobacterium* suggérant ainsi la nécessité d'un composé particulier ou d'une association avec une autre bactérie.

Les bactéries de la famille des *Fusobacteriaceae* sont des bacilles Gram négatif, anaérobies stricts, non mobiles et non sporulés. Elles sont généralement présentes au sein des microbiotes oropharyngé, gastro-intestinal et génital où elles se comportent comme des commensales. Toutefois, certaines espèces peuvent être impliquées dans des infections ou des lésions nécrotiques chez l'Homme et les animaux (Van Assche et Wilssens, 1977; De Witte *et al.*, 2017; Gérard, 2021). Sur le plan de leur isolement, ces bactéries sont catalase négatives et présentent des exigences nutritionnelles élevées nécessitant ainsi l'utilisation de milieux de culture riches (De Witte *et al.*, 2017; Gérard, 2021). La croissance de ce genre bactérien est généralement observée à des températures comprises entre 35 et 37 °C et dans des conditions de pH proches de la neutralité (Gérard, 2021).

5. Développement d'un fromage modèle

Cette difficulté d'isolement en culture pure limite fortement les possibilités d'étude directe de la souche. Or, sa caractérisation, les tests d'antagonisme *in vitro* et les tests de provocation nécessitent au préalable un cadre expérimental reproductible et adapté à l'étude de la microflore de croûte. Dans ce contexte, le présent travail vise à développer un modèle miniaturisé de fromage de Herve, permettant de réduire les coûts de production expérimentale, de cibler l'analyse sur la croûte, (site présumé de prolifération de *Fusobacterium*) et de standardiser les conditions expérimentales. Ce modèle a été développé à partir du protocole établi par Minutillo R. (2024), qui a mis au point un protocole de fabrication pour des fromages de taille standard, et sera adapté à une échelle miniaturisée. Il constituera ainsi le support des futures étapes du projet, notamment pour l'étude des interactions entre *Fusobacterium* sp. et *L. monocytogenes* et l'évaluation de son potentiel antagoniste.

Matériel et méthode

1. Matériel

1.1. Matières premières et consommables

Le lait cru a été collecté à la CARE FEPEX de l'Université de Liège. Il a été conditionné en bouteilles Duran de 2 L conservées à 4-7 °C. Deux modes d'acidification ont été utilisés dans ce travail. D'une part, une solution commerciale d'acide lactique ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$, 85 %, Merck, Allemagne). D'autre part, deux ferments commerciaux employés par les producteurs traditionnels de fromage de Herve : le R-704 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et *L. lactis* subsp. *lactis*, dose 50 U, CHR Hansen, Danemark) et le BLO (*Brevibacterium linens*, dose 10 U, Lallemand, Canada). La coagulation a été assurée par une présure animale (présure Munster, Laboratoire Abia, France). Du chlorure de calcium et du chlorure de sodium (NaCl) ont été utilisés respectivement pour la standardisation du lait et pour la préparation des saumures.

Pour la préparation des solutions de lavage (SL), un fromage commercial au lait cru de chèvre à croûte lavée a été utilisé (« Chèvre du Vieux Moulin », 140 g, 45 % MG). Il a été choisi pour sa richesse en microflore de surface et son hébergement présumé de la souche de *Fusobacterium* d'intérêt. Pour le lot acidifié à l'acide lactique (AL), les fromages ont été achetés dans le commerce « Le Bonheur est dans le Pré » (4000, Liège). En raison d'événements imprévus, les fromages destinés au lot acidifié par ferments (F) ont été achetés directement à la fromagerie « Le Herve du Vieux Moulin » (4651, Herve).

1.2. Moules de production

Deux moules originaux ont été conçus et fabriqués par impression 3D pour ce travail. Le matériau utilisé est le PETG HF (polytéraphthalate d'éthylène glycol modifié haute fluidité), de qualité alimentaire et de couleur noire. Chaque moule est constitué de 25 alvéoles rectangulaires disposées en matrice 5 × 5, aux dimensions internes de 3 × 3 × 4 cm (largeur × profondeur × hauteur), permettant l'obtention de fromages d'environ 10 g. Chaque alvéole est percée sur ses quatre parois latérales de trois trous cylindriques de 5 mm de diamètre destinés à évacuer le lactosérum durant l'égouttage. Les alvéoles sont reliées entre elles par des zones d'attache rectangulaires de 1,5 × 3 cm et de 5 mm d'épaisseur. Le dispositif est complété par deux accessoires. Le premier est une plaque de répartition percée de 25 trous alignés avec les alvéoles

et bordée d'un rebord périphérique de 5 mm ; elle se pose sur le moule ouvert et guide le caillé dans chaque alvéole afin de garantir une répartition homogène de la matière avant l'égouttage. Le second est constitué de deux plaques glissantes équipées de poignées, qui viennent refermer le moule sur ses faces supérieure et inférieure. Chaque plaque comporte un grillage fin situé en regard des alvéoles pour permettre l'évacuation du lactosérum contenu dans les fromages et également des trous plus larges positionnés en regard des zones d'attache entre les alvéoles pour compléter le drainage. Ces plaques permettent de retourner le moule dans son ensemble sans manipulation individuelle des fromages, tout en maintenant une pression uniforme lors de l'égouttage.

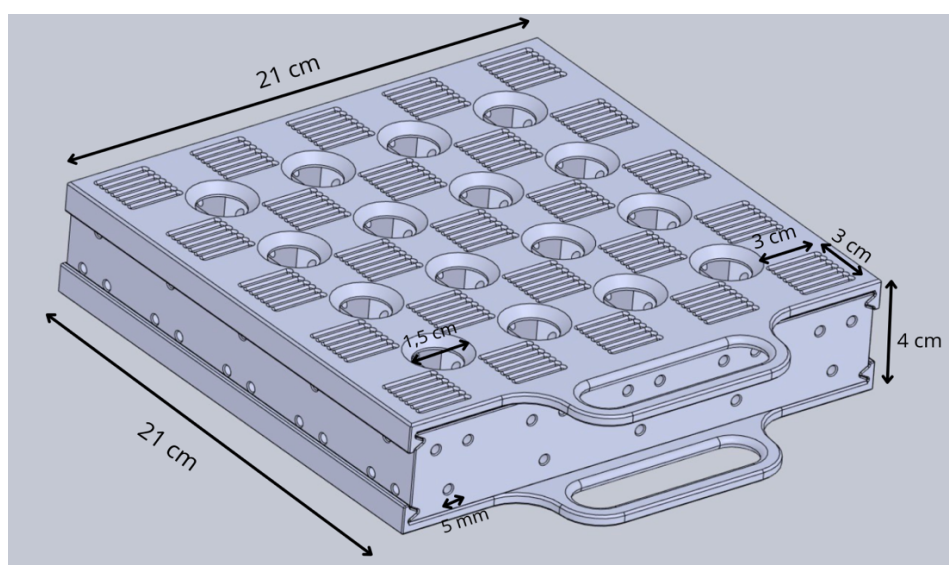


Figure 1. Moules 3D conçus pour la production de fromages miniaturisés.

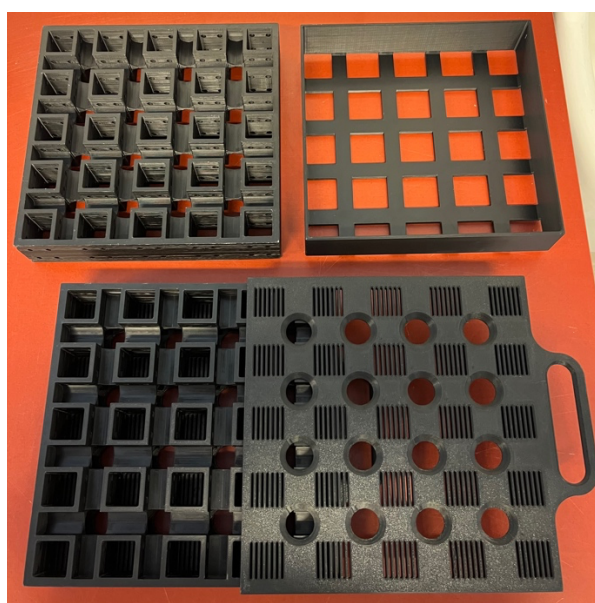


Figure 2. Photographie des deux moules fabriqués

1.3.Instruments

Les mesures physico-chimiques ont été réalisées avec les instruments suivants. Le pH du lait a été mesuré avec un pH-mètre Portamess 912 (Knick, Allemagne) équipé d'une électrode LoT406-M6-DXK-S7/25 (Mettler Toledo). Le pH des fromages a été mesuré avec un pH-mètre 765 (Knick, Allemagne) associé à une sonde de température, après homogénéisation de l'échantillon au Turrax, modèle T18 digital (IKA, Allemagne) dans une solution de chlorure de potassium (KCl) 0,1M. Les deux pH-mètres ont été calibrés à pH 4 et pH 7 avec des solutions Reagecon. Les pesées ont été effectuées sur balance de précision OHAUS Corporation, modèle AX223 (États-Unis). L'activité de l'eau a été mesurée avec un aquamètre Aqualab 4TE (Addium, États-Unis).

L'affinage et la conservation ont été réalisés dans des enceintes climatiques (Liebherr, modèle FRFCvg 5501, Allemagne). La température et l'humidité relative y ont été suivies en continu grâce à une sonde de pénétration IP67 (Testo) couplée à un datalogger 176H1 (Testo) et à une sonde d'ambiance AG408 (Testo).

1.4.Milieux de culture et matériel d'analyse microbiologique

Quatre milieux de culture ont été utilisés. Le PCA (Plate Count Agar) a servi au dénombrement de la flore totale aérobie mésophile. Le MRS (De Man, Rogosa et Sharpe) a été utilisé pour les bactéries lactiques. Le VRBG (Violet Red Bile Glucose Agar) a permis le dénombrement des entérobactéries. Le YGC (Yeast extract Glucose Chloramphenicol Agar) a été utilisé pour les levures et moisissures. Les dilutions ont été réalisées dans de l'eau physiologique stérile délivrée par un Diluflow (Interscience). L'homogénéisation des échantillons a été effectuée au Stomacher (Interscience). Pour la métagénomique 16S, l'extraction d'ADN a été réalisée avec le kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Allemagne). La concentration d'ADN a été mesurée par spectrophotométrie sur NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2. Méthodes de production

2.1.Pasteurisation

Chaque production a nécessité 4 L de lait cru et a permis d'obtenir 50 fromages d'environ 10 g répartis sur les 2 moules. Le pH du lait cru a été mesuré et un prélèvement de 10 mL a été conservé pour analyse microbiologique. La pasteurisation a été réalisée par la méthode basse-température de longue durée : maintien à 63-65 °C pendant 45 min. La température a été

contrôlée au centre d'une bouteille témoin tout au long du traitement. Après pasteurisation, du chlorure de calcium ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$, soit $0,45 \text{ g}$ par bouteille de $1,5 \text{ L}$) a été ajouté. Le lait a ensuite été refroidi à $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$ dans un second bain-marie thermostaté, puis transvasé dans des bacs inox GN 1/3 de 4 L . Un prélèvement de 10 mL de lait pasteurisé a été conservé pour analyse microbiologique.

2.2. Acidification

Deux modes d'acidification ont été comparés.

Acidification chimique (lot AL) : la solution d'acide lactique a été diluée au $1/9$ dans de l'eau distillée. La dilution a été ajoutée au lait par paliers successifs de $0,3 \text{ mL}$ toutes les 2 min , jusqu'à atteindre un pH cible de $6,1$. Le volume final ajouté est d'environ $6,6 \text{ mL}$.

Acidification biologique (lot F) : les ferments R-704 et BLO ont été réhydratés séparément dans 1 L d'eau physiologique à $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant au moins 1 h sous agitation lente. Les concentrations finales attendues sont d'environ $0,05 \text{ U.mL}^{-1}$ pour le R-704 et $0,01 \text{ U.mL}^{-1}$ pour le BLO. Les ferments ont ensuite été ajoutés au lait à des taux de $1 \text{ U}/10 \text{ L}$ (R-704) et $1 \text{ U}/1000 \text{ L}$ (BLO), selon les recommandations des fournisseurs. Pour 4 L de lait, cela correspond à 8 mL de R-704 réhydraté et $0,4 \text{ mL}$ de BLO réhydraté, soit un volume total ajouté d'environ $8,4 \text{ mL}$.

2.3. Emprésurage, découpe et délactosage

La présure animale a été ajoutée à raison de $0,5 \text{ mL.L}^{-1}$ de lait à $34\text{-}35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ après filtration stérile. La coagulation a été conduite pendant 1 h en maintenant le bain-marie à $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Le caillé a ensuite été découpé à l'aide d'un coupe-œuf inox. Le délactosage a été réalisé en évacuant 10% du lactosérum, soit 400 mL par bac. Ce volume a été remplacé par de l'eau physiologique à $44 \text{ }^{\circ}\text{C}$ afin d'enlever le lactose et donc, de freiner l'activité des ferments lactiques. Le caillé a ensuite été brassé activement pendant 2 min . La séquence délactosage-ajout d'eau-brassage a été répétée trois fois au total.

2.4. Mise en moule et démoulage

Le caillé a été réparti équitablement dans les moules à l'aide du répartisseur. L'égalisation a nécessité au moins deux passages. Un premier égouttage de 1 h a été réalisé, suivi du retournement des moules. Un égouttage prolongé d'une nuit (15 h) a ensuite été effectué à $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ et $80\text{-}85 \%$ HR. Le lendemain (J1), Les fromages ont été démoulés et pesés individuellement dans un récipient inox flambé. Les manipulations ont été réalisées avec des gants propres dans des conditions de stérilité industrielle. À l'issue du démoulage, les fromages ont été triés selon

leur qualité morphologique. Les fromages présentant des défauts de forme (trous, irrégularités, instabilité structurelle) ont été attribués aux points d'analyse les plus précoces (J1 et J7), tandis que les fromages les mieux formés ont été conservés pour les points d'analyse les plus tardifs (jusqu'à J42). Cette répartition visait à limiter le biais que pourraient introduire ces défauts morphologiques sur les mesures physico-chimiques et microbiologiques, en particulier sur les mesures de masse et la représentativité de la matrice pour les analyses de surface.

2.5.Saumurage

Sur les 50 fromages produits par lot, 48 ont été salés selon le plan expérimental. Les 2 fromages restants ont été utilisés pour l'analyse « fromage blanc avant salage ». La saumure a été préparée à 20 % de NaCl (80 g dans 400 mL d'eau, 15 °C), additionnée de chlorure de calcium (1,2 g.L⁻¹) et ajustée à pH 5,4 avec du chlorure d'hydrogène. Elle a ensuite été autoclavée et refroidie à 15 °C avant utilisation.

Quatre durées d'immersion ont été comparées : 4, 6, 8 et 10 min. Cette gamme a été choisie sur la base d'un calcul théorique. L'objectif était d'atteindre une teneur finale en sel de 2,5 % (m/m) dans le fromage affiné, valeur caractéristique des fromages de Herve traditionnels. Cette cible finale ne correspond toutefois pas à la teneur en sel à atteindre au moment du saumurage. En effet, la perte d'eau importante au cours de l'affinage concentre mécaniquement le sel initialement absorbé. Pour atteindre 2,5 % après affinage, la teneur en sel visée au moment du saumurage a été estimée à environ 1,78 % (m/m). Cette valeur a servi de cible pour le calcul théorique du temps de saumurage, basé sur la loi de Fick :

$$S = 2 \cdot c \cdot (A/V) \cdot \sqrt{(D \cdot t / \pi)}$$

où « c » est la concentration en sel de la saumure (g/100 g d'eau), « A » la surface du fromage (cm²), « V » le volume du fromage (cm³), « D » le coefficient de pseudo-diffusion du sel (cm².h⁻¹) et « t » le temps de saumurage (h). Les estimations théoriques aboutissent à environ 9 min pour atteindre 1,78 % de sel pour des cubes de 1,5 à 2 cm de côté, et environ 15 min pour 1,72 % pour des cubes de 2 à 3 cm. Cette cible est cohérente avec les valeurs rapportées par Leclercq-Perlat *et al.* (2024) sur un fromage à pâte molle à croûte lavée. Dans cette étude, une teneur de 2,4 % de sel entraînait une perte d'eau excessive durant l'affinage, avec un fromage trop sec et trop dur. L'équilibre technologique et sensoriel était obtenu avec une teneur de 1,7 % de NaCl.

Après saumurage, les fromages modèles (FR) ont été ressuyés 15 min à 20 °C et 80-85 % HR sur une grille inox stérile flambée à l'alcool. Cette étape permet d'éliminer l'excès de saumure superficielle et d'homogénéiser la teneur en sel avant l'ensemencement par lavage. Les 8 premiers fromages (soit 2 fromages par condition de saumurage) ont été analysés directement à J1, sans passer par la phase de lavage. Ces fromages ont fourni le point de référence « post-saumurage » du plan d'analyse. Les 40 fromages restants ont été destinés au suivi d'affinage et de conservation (J7 à J42).

2.6.Lavage de croûte

À chaque point d'analyse, les fromages prélevés le jour même n'étaient pas lavés. L'échantillonnage se faisait directement avant l'étape de lavage, à l'exception de J1 où l'analyse portait justement sur le microbiote fraîchement inoculé. Les fromages restants, destinés aux points d'analyse suivants, étaient lavés à ce moment-là pour poursuivre leur affinage. Cette organisation évitait que le lavage juste avant l'analyse ne modifie la microflore de surface au moment du prélèvement.

Les FR ont été lavés une fois démoulés puis une fois par semaine (J1, J7, J14, J21) pour implanter le microbiote spécifique recherché. La solution de lavage (SL) a été préparée à chaque session à partir d'un fromage commercial. Chaque face du fromage commercial a été frottée manuellement pendant 15 secondes, sous pression modérée et constante, dans 200 mL d'eau physiologique stérile salée à concentration régressives au cours du temps (15 % à J1, 10 % à J7, 5 % à J14, 2,5 % à J21), afin de garantir la constance de la charge microbienne initiale tout en limitant l'apport de sel cumulé. La suspension obtenue a été homogénéisée puis utilisée immédiatement pour l'immersion des FR. Ces derniers ont été délicatement frottés 1 à 2 secondes par face avant d'être égouttés 10 à 15 minutes sur une grille inox stérile.

2.7.Conditions d'affinage et de conservation

L'affinage a été conduit dans une enceinte climatique à 12 °C et 100 % HR pendant 4 semaines (J1 à J28). À J28, les 8 fromages restants ont été conditionnés individuellement dans un papier alimentaire résistant à l'humidité, au sang et aux graisses (Izipro, 25 × 35 cm, 41 g/m², France). Ils ont ensuite été conservés à 8 °C pendant deux semaines supplémentaires (jusqu'à J42), de manière à simuler la phase de commercialisation jusqu'à la fin de la DLC (4 semaines).

2.8. Plan d'analyse hebdomadaire

Le plan d'analyse a été conçu en deux répliques technique pour chaque temps de saumurage, à chaque point d'analyse, selon la grille suivante :

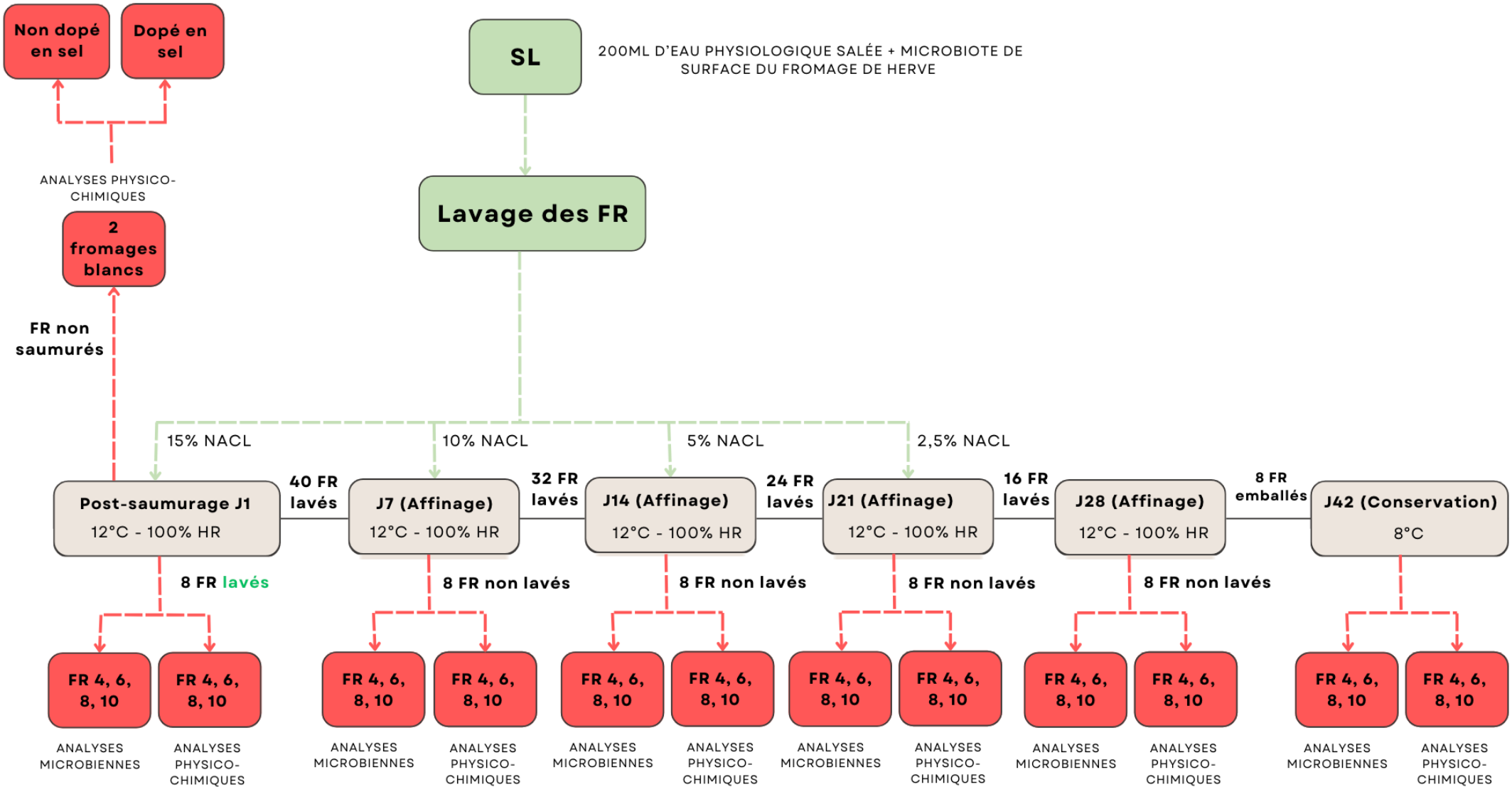
Tableau I. Plan d'analyse hebdomadaire selon chaque condition de saumurage. FR = fromage modèle

Temps d'affinage	4 min	6 min	8 min	10 min
Post-saumurage (J1)	FR4	FR6	FR8	FR10
Affinage J7	FR4	FR6	FR8	FR10
Affinage J14	FR4	FR6	FR8	FR10
Affinage J21	FR4	FR6	FR8	FR10
Affinage J28	FR4	FR6	FR8	FR10
Conservation J42	FR4	FR6	FR8	FR10

FR = fromage modèle

Figure 3. Chronologie du protocole expérimental

TIMELINE DES LAVAGES HEBDOMADAIRES ET DES POINTS D'ANALYSE



2.9. Adaptations du protocole en cours d'expérimentation

Deux adaptations du protocole initial ont été nécessaires au cours de l'expérimentation.

Premièrement, à J1 du lot F, les FR destinés aux analyses microbiologiques ont été perdus. Aucun dénombrement n'a donc pu être réalisé à ce point d'analyse pour ce lot. Seules les analyses physico-chimiques (pH, a_w , teneur en sel) et métagénétiques ont pu être menées à J1. Le suivi microbiologique a été repris normalement à partir de J7.

Deuxièmement, à J14, les fromages du lot F présentaient des signes de fin d'affinage avec une texture nettement plus molle et une croûte prenant une couleur orangée caractéristique. Il a donc été décidé de raccourcir la durée d'affinage initialement prévue et de mettre les fromages restants en conservation selon deux modalités. De J14 à J21, un premier prélèvement a été dédoublé sur deux conditions de température de conservation (8 °C et 12 °C) afin d'évaluer leur effet sur les paramètres suivis. De J21 à J28, correspondant à une semaine de conservation supplémentaire à 12 °C, un dernier prélèvement a été réalisé.

3. Méthodes d'analyses

3.1. Analyses physico-chimiques

Plusieurs paramètres ont été mesurés à chaque point d'analyse à raison d'un FR par condition de saumurage. La masse individuelle a été déterminée sur balance de précision.

Le pH a été mesuré sur une prise d'essai de 5 g (moitié d'un FR) diluée au 1/10 avec du KCl 0,1 M et homogénéisée à l'aide du Turrax. L'activité de l'eau (a_w) a été déterminée sur une prise de 2 g. Enfin, la teneur en sel a été mesurée par la méthode ISO 1841-1 sur une prise de 2 g.

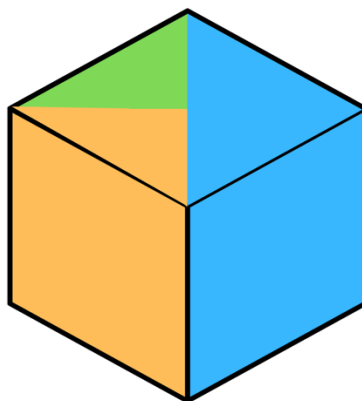


Figure 4. Représentation schématique de la découpe d'un FR (± 10 g) pour les analyses physico-chimiques : pH (5 g, bleu), a_w (2 g, vert), teneur en sel (2 g, orange).

3.2. Analyses microbiologiques

Les analyses microbiologiques ont ciblé quatre groupes microbiens principaux. La flore totale aérobie mésophile a été dénombrée sur milieu PCA après incubation à 30 °C pendant 72 h, avec ensemencement en profondeur. Les bactéries lactiques ont été dénombrées en milieu MRS dans les mêmes conditions (30 °C, 72 h, ensemencement en profondeur). Les entérobactéries ont été dénombrées en milieu VRBG à 30 °C pendant 24 h, également en profondeur. Les levures et moisissures ont été dénombrées sur milieu YGC à 25 °C pendant 72 h, avec ensemencement en surface.

Pour chaque échantillon, une prise d'essai (un fromage par condition de saumurage) a été placée dans un sac Stomacher stérile. L'échantillon a été dilué au dixième avec de l'eau physiologique stérile, puis homogénéisé au Stomacher pendant 2 minutes pour obtenir la suspension mère (SM). En parallèle, chaque SM a été prélevée en 4×1 mL et stockée à -20 °C pour les analyses métagénétiques.

Les dilutions ont été adaptées à la nature et au stade de chaque échantillon (lait cru, lait pasteurisé, fromage blanc, SL, fromages modèles). La gamme de dilutions initialement retenue, appliquée à J1 du lot AL, est détaillée en annexe A. Cette gamme a été révisée à chaque point d'analyse suivant en fonction des résultats obtenus à la semaine précédente. Une montée en dilution a été appliquée lorsque les boîtes du point antérieur présentaient des comptages saturés (> 300 UFC). Inversement, une descente en dilution a été appliquée lorsque les colonies étaient trop peu nombreuses (< 15 UFC). Pour le lot F, les dilutions de départ ont été fixées plus haut dès J1, sur la base des charges observées sur le premier lot et de l'apport direct des ferments commerciaux. Cette approche a permis de maintenir, à chaque temps et pour chaque flore ciblée, au moins une dilution dans la plage de comptage exploitable. Les comptages ont été exprimés en UFC.mL^{-1} pour les échantillons liquides et en UFC.g^{-1} pour les échantillons solides.

3.3. Analyses métagénétiques

L'analyse métagénétique ciblant l'ARNr 16S a été réalisée sur 55 échantillons au total. Le lot AL comprend 28 échantillons (4 solutions de lavage et 24 fromages modèles couvrant les points J1 à J42). Le lot F comprend 27 échantillons (2 solutions de lavage et 25 fromages modèles couvrant les points J1 à J28).

L'ADN génomique bactérien total a été extrait à partir de 1 mL des SM de chaque échantillon, à l'aide du kit DNeasy Blood and Tissue selon les recommandations du fabricant. La

concentration d'ADN total a été mesurée par spectrophotométrie sur NanoDrop ND-1000. Les extraits ont été stockés à -20°C jusqu'à analyse.

La région V1-V3 de l'ADNr 16S a été ciblée par PCR à l'aide d'amorces spécifiques (16SF : 5'-GAGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3' et 16SR : 5'-ACCGCGGCTGCTGGCAC-3'). Les produits de PCR ont été purifiés et dosés avant de servir d'ADN matrice pour une seconde amplification PCR utilisant des adaptateurs Illumina spécifiques. Un mélange équimolaire de chaque produit de PCR a été préparé et séquençé avec le MiSeq Reagent Kit V3 sur une machine MiSeq (Illumina) au centre de séquençage GIGA de l'ULiège.

L'analyse des données de séquençage a été réalisée avec les outils MOTHUR v1.48 et VSEARCH. MOTHUR a été utilisé pour la manipulation et le traitement des séquences. VSEARCH a servi à la recherche de séquences chimériques. La base de données taxonomique utilisée est la version 1.38_2 de ARB-SILVA.

Les séquences ont été nettoyées et filtrées pour ne retenir que celles présentant une taille minimale de 470 nucléotides et au maximum une base dégénérée. Elles ont ensuite été alignées sur l'alignement de référence ARB-SILVA. Les séquences chimériques ont été détectées et éliminées. Une identification taxonomique au genre a été réalisée pour chaque séquence, et les séquences ont été regroupées par unité taxonomique opérationnelle (OTU) avec un filtre de 97 % d'identité. Une identification taxonomique à l'espèce consensus pour chaque OTU a été obtenue avec l'outil BLASTN sur la base ARB-SILVA v1.38_2, avec un seuil d'identification de 99 %. Les données finales ont été utilisées pour obtenir une table de contingence reprenant le profil d'identification microbiologique pour chaque échantillon.

Résultats

1. Morphologie

1.1. Lot acide lactique

Figure 5. Évolution de la morphologie des fromages modèles au cours du temps – lot acide lactique



J1



J7



J14



J21



J42

Absence de photos pour le J28

1.2. Lot ferment

Figure 5. Évolution de la morphologie des fromages modèles au cours du temps – lot ferments



J1



J7



J14



J21



J28

2. Perte de masse

2.1. Lot acide lactique

Tableau II. Évolution des masses moyennes (g ± SD) – Lot acide lactique

Point	FR4	FR6	FR8	FR10
J1 (30/03)	14,4 ± 0,6	14,4 ± 0,6	14,3 ± 0,7	14,3 ± 0,5
J7 (07/04)	12,7 ± 0,5	13,0 ± 0,5	13,0 ± 0,5	12,7 ± 0,5
J14 (14/04)	10,5 ± 0,3	10,7 ± 0,5	10,7 ± 0,6	10,8 ± 0,3
J21 (21/04)	9,7 ± 0,4	9,8 ± 0,7	9,8 ± 0,6	9,8 ± 0,3
J28 (27/04)	8,6 ± 0,3	8,2 ± 0,2	8,4 ± 0,2	8,4 ± 0,3
J42 (11/05)	7,7	8,2	8,2	8,1
Evolution	-46 %	-43 %	-43 %	-43 %

J1 = démoulage ; J7 = 1^{ere} semaine d'affinage ; J14 = 2^e semaine d'affinage ; J21 = 3^e semaine d'affinage ; J28 = 4^e semaine d'affinage ; J42 = 2^e semaine de conservation (une seule mesure disponible pour chaque temps de saumurage). SD = écart-type. n=2 par condition.

2.2. Lot ferments

Tableau III. Évolution des masses moyennes (g ± SD) - Lot ferments

Point	FR4	FR6	FR8	FR10
J1 (09/06)	13,4 ± 0,3	13,5 ± 0,3	13,3 ± 0,4	13,8 ± 0,3
J7 (16/06)	12,1 ± 0,4	12,3 ± 0,3	12,2 ± 0,4	12,7 ± 0,3
J14 (23/06)	11,9 ± 0,5	12,2 ± 0,4	12,4 ± 0,4	12,9 ± 0,5
J21 (30/06)	11,6 ± 0,6	11,6 ± 0,5	11,2 ± 0,6	12,0 ± 0,8
J28 (07/07)	11,9 ± 0,2	11,7 ± 0,4	11,5 ± 0,5	13,0 ± 0,1
Evolution	-11 %	-13 %	-14 %	-6 %

J1 = démoulage ; J7 = 1^{ere} semaine d'affinage ; J14 = 2^e semaine d'affinage ; J21 = 1^{ere} semaine de conservation ; J28 = 2^e semaine de conservation; SD = écart-type. SD = écart-type. n= 2 par condition.

3. Evolution physico-chimique et effet du temps de saumurage

Les paramètres pH, aw et teneur en NaCl ont donc été suivis en détail pour les quatre conditions et à chaque point d'analyse (Tableaux 4.1 à 5.3).

3.1. Lot acide lactique

Tableau IV. pH par condition de saumurage - Lot acide lactique

Point	FR4	FR6	FR8	FR10
J1	6,68	6,65	6,64	6,66
J7	6,66	6,77	6,62	6,66
J14	6,94	6,95	6,89	6,94
J21	7,06	6,99	7,06	7,00
J28	7,22	7,21	7,13	7,17
J42	7,54	7,55	7,49	7,62

Valeurs en moyenne $\pm$ écart-type, $n=1$ par condition.

Tableau V. Activité de l'eau (aw) par condition de saumurage - Lot acide lactique

Point	FR4	FR6	FR8	FR10
J1	0,981	0,972	0,976	0,976
J7	0,970	0,973	0,971	0,976
J14	0,960	0,961	0,961	0,962
J21	0,964	0,967	0,964	0,962
J28	0,958	0,958	0,954	0,957
J42	0,949	0,952	0,954	0,957

$n=1$ par condition.

Tableau VI. Teneur en sel (% NaCl) par condition de saumurage - Lot acide lactique

Point	FR4	FR6	FR8	FR10
J1	1,45 ± 0,41	1,87 ± 0,20	2,19 ± 0,21	2,32 ± 0,00
J7	1,61 ± 0,21	2,10 ± 0,20	2,15 ± 0,20	2,26 ± 0,00
J14	2,16 ± 0,20	2,63 ± 0,00	3,06 ± 0,21	2,99 ± 0,20
J21	2,15 ± 0,20	2,23 ± 0,00	2,79 ± 0,00	2,89 ± 0,00
J28	2,13 ± 0,20	2,04 ± 0,00	2,54 ± 0,00	2,18 ± 0,21
J42	2,26 ± 0,00	2,18 ± 0,21	2,34 ± 0,00	2,00 ± 0,00

Teneur en sel exprimée en % (g/100g). Valeur = moyenne, n=2 par condition. Contrôle positif (FR dopé à 20 % de NaCl, soit 0,4 g de NaCl ajouté) : 18,54 ± 0,00 % ; contrôle négatif (FR non salé) : 0,00 %.

3.2. Lot ferments

Tableau VII. pH par condition de saumurage - Lot ferments

Point	FR4	FR6	FR8	FR10
J1	6,02			
J7	6,05	5,87	6,18	6,12
J14	7,32	7,35	7,38	7,27
J21 – 8 °C	7,93	7,92	7,86	7,91
J21 – 12 °C	7,90	7,92	7,93	7,88
J28	8,14	8,00	8,07	8,16

À J1, moyenne des mesures sur l'ensemble des 8 fromages sans distinction par condition de saumurage. Valeurs en moyenne ± écart-type, n=1 par condition.

Tableau VIII. Activité de l'eau (aw) par condition de saumurage - Lot ferments

Point	FR4	FR6	FR8	FR10
J1	$\pm 0,978$			
J7	0,973	0,977	0,975	0,973
J14	0,977	0,980	0,979	0,978
J21 – 8 °C	0,977	0,976	0,974	0,974
J21 – 12 °C	0,976	0,973	0,972	0,971
J28	0,974	0,968	0,969	0,969

À J1, moyenne des mesures sur l'ensemble des 8 fromages sans distinction par condition de saumurage.
n=1 par condition.

Tableau IX. Teneur en sel (% NaCl) par condition de saumurage - Lot ferments

Point d'analyse	FR4	FR6	FR8	FR10
J1	$1,08 \pm 0,57$			
J7	$0,86 \pm 0,00$	$1,30 \pm 0,20$	$1,26 \pm 0,20$	$1,44 \pm 0,00$
J14	$0,73 \pm 0,21$	$1,02 \pm 0,21$	$1,01 \pm 0,20$	$1,39 \pm 0,00$
J21 (8 °C)	$1,00 \pm 0,20$	$1,70 \pm 0,40$	$1,41 \pm 0,00$	$1,55 \pm 0,20$
J21 (12 °C)	$1,69 \pm 0,40$	$1,87 \pm 0,20$	$1,27 \pm 0,20$	$1,29 \pm 0,20$
J28	$1,40 \pm 0,00$	$1,45 \pm 0,00$	$1,15 \pm 0,00$	$1,13 \pm 0,00$

À J1, moyenne des mesures sur l'ensemble des 8 fromages sans distinction par condition de saumurage.
Teneur en sel exprimée en % ($\text{g}100\text{g}^{-1}$). Valeur = moyenne, *n*=2 par condition. Contrôle positif (FR dopé à 20 % NaCl) : $19,18 \pm 1,21$ % (*n*=2). Contrôle négatif (FR non salé) : $0,43 \pm 0,20$ %.

4. Dynamique microbienne

Les figures 6 à 10 illustrent leur évolution au cours du temps selon les conditions de saumurage. L'ensemble des résultats, exprimés en $\log_{10}$ UFC.g⁻¹, est présenté en annexe B.

4.1. Lot acide lactique

Figure 7. Évolution de la flore totale (PCA) par conditions de saumurages - Lot acide lactique

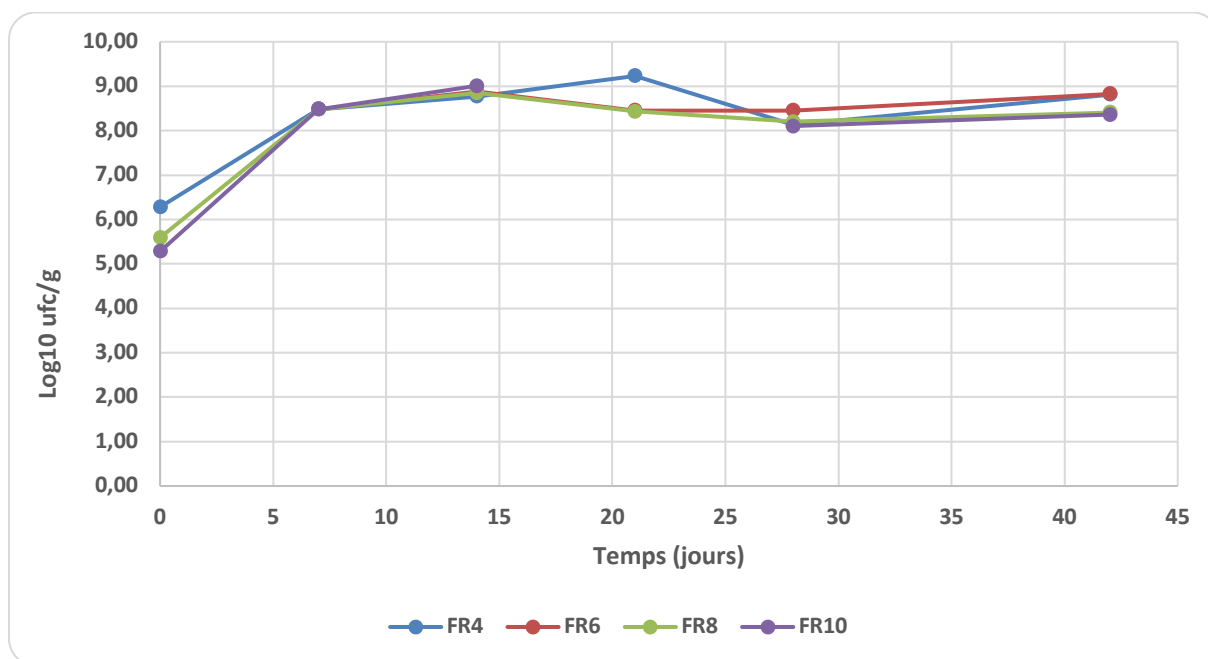


Figure 8. Évolution des bactéries lactiques (MRS) par conditions de saumurages - Lot acide lactique

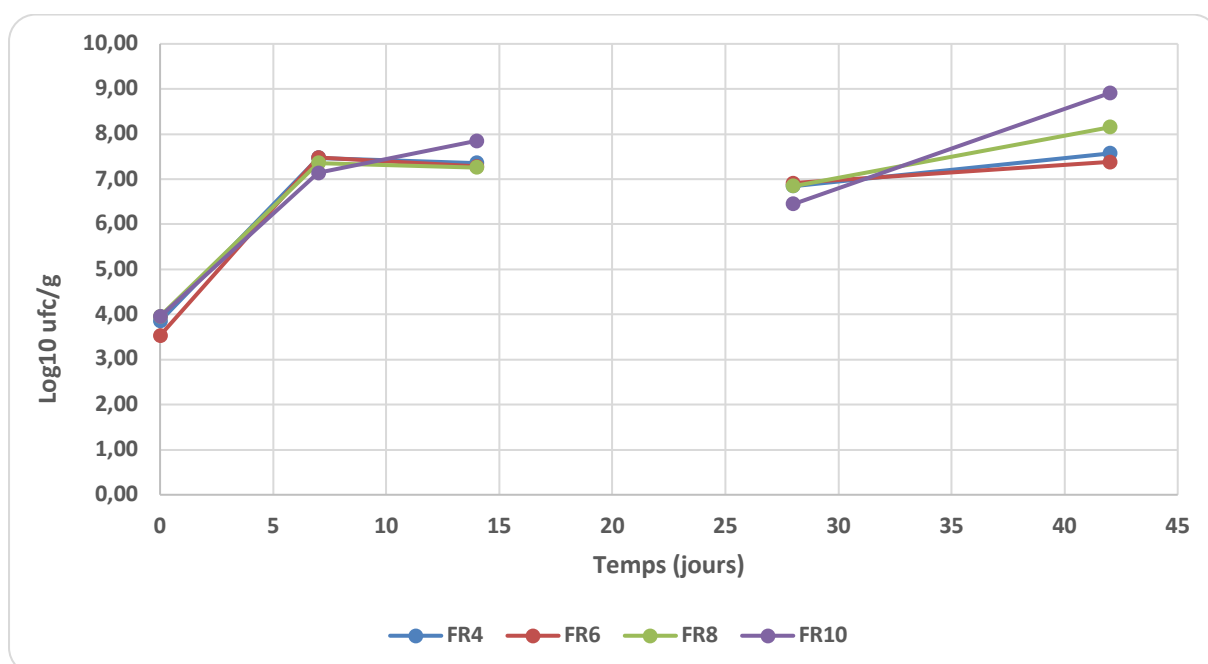


Figure 9. Évolution des entérobactéries (VRBG) par conditions de saumurages - Lot acide lactique

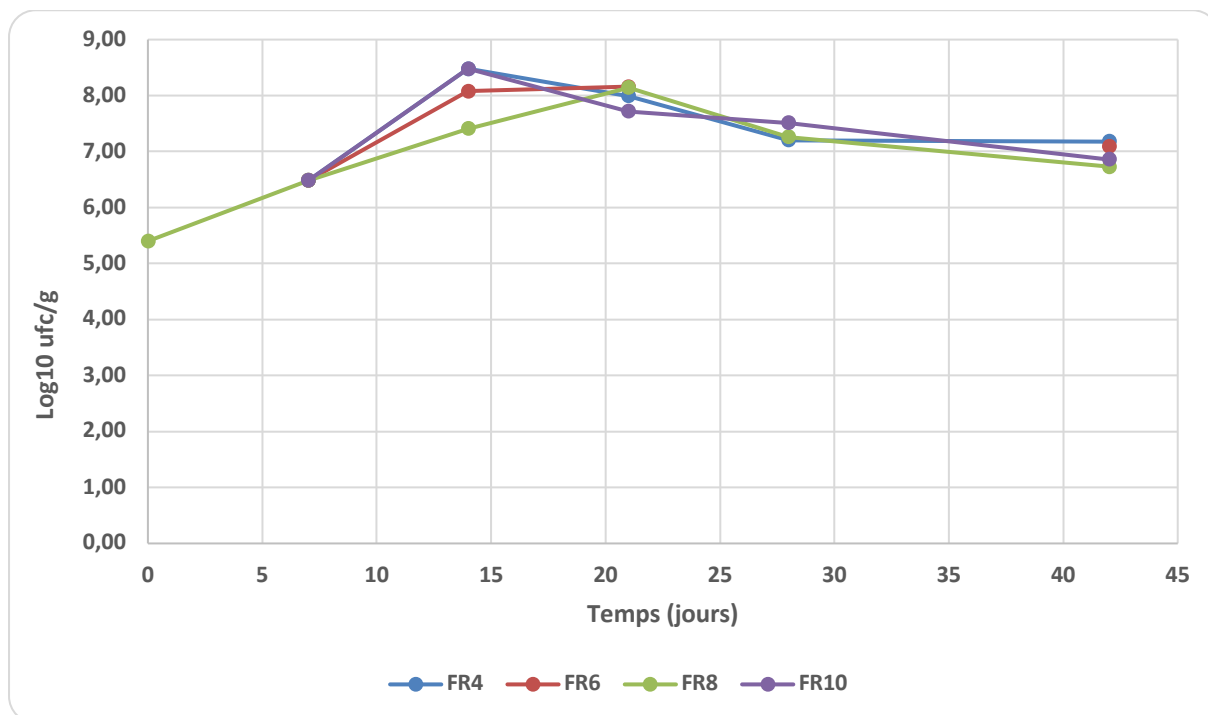
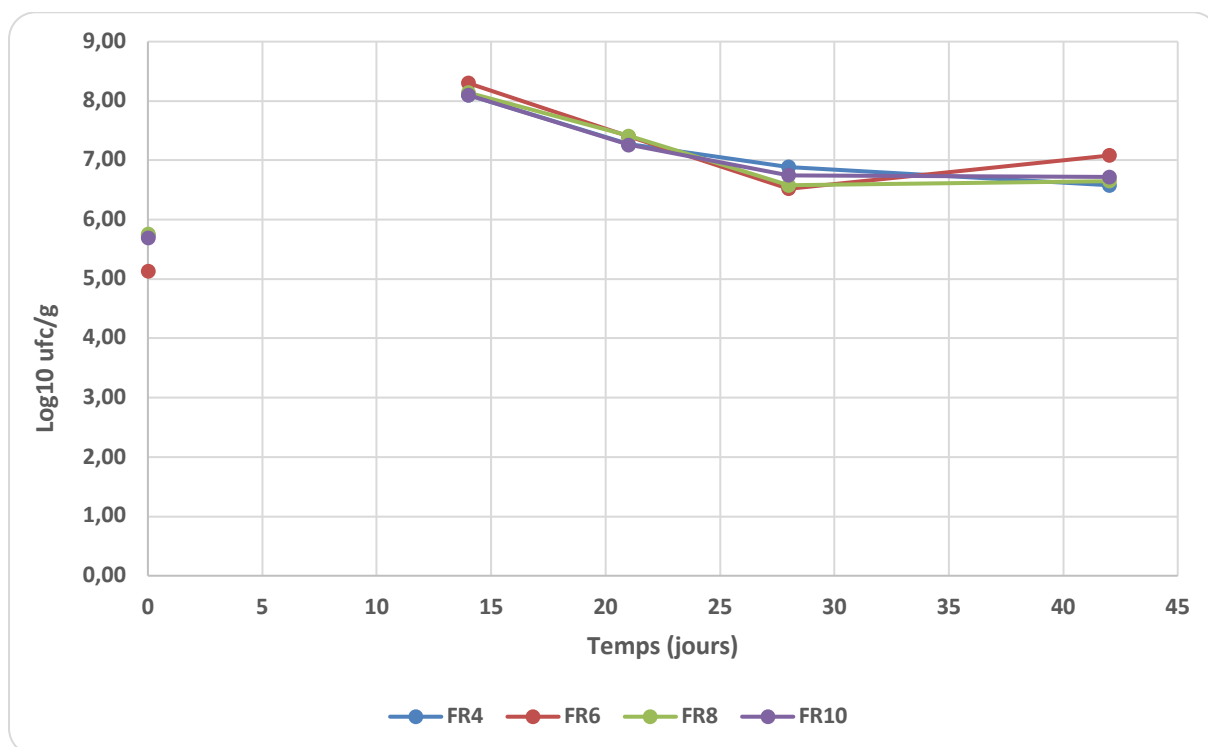


Figure 10. Évolution des levures et moisissures (YGC) par conditions de saumurages - Lot acide lactique



Dans le lot AL, la flore totale atteint $8,5 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ dès J7 et culmine à J14 avec des valeurs de $8,8$ à $9,0 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ selon la condition, puis se maintient autour de $8,2$ à $8,8 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ jusqu'à la fin de l'affinage. Les bactéries lactiques atteignent $7,1$ à $7,5 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ dès J7 et se maintiennent à ce niveau au cours de l'affinage, avec des valeurs finales de $7,4$ à $8,9 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ à J42 selon la condition. Les entérobactéries atteignent $6,5 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ dès J7, montent à $7,4$ - $8,5 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ entre J14 et J21, puis se stabilisent autour de $7,0 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ à J42. Le dénombrement des levures et moisissures n'a pas été réalisé à J7 pour ce lot. Les premières valeurs disponibles à J14 atteignent $8,1$ à $8,3 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$, puis diminuent progressivement à $7,3 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ à J21 avant de se stabiliser autour de $6,7$ à $6,8 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ à J28 et J42.

4.2. Lot ferments

Figure 11. Évolution de la flore totale (PCA) par conditions de saumurages - Lot ferments

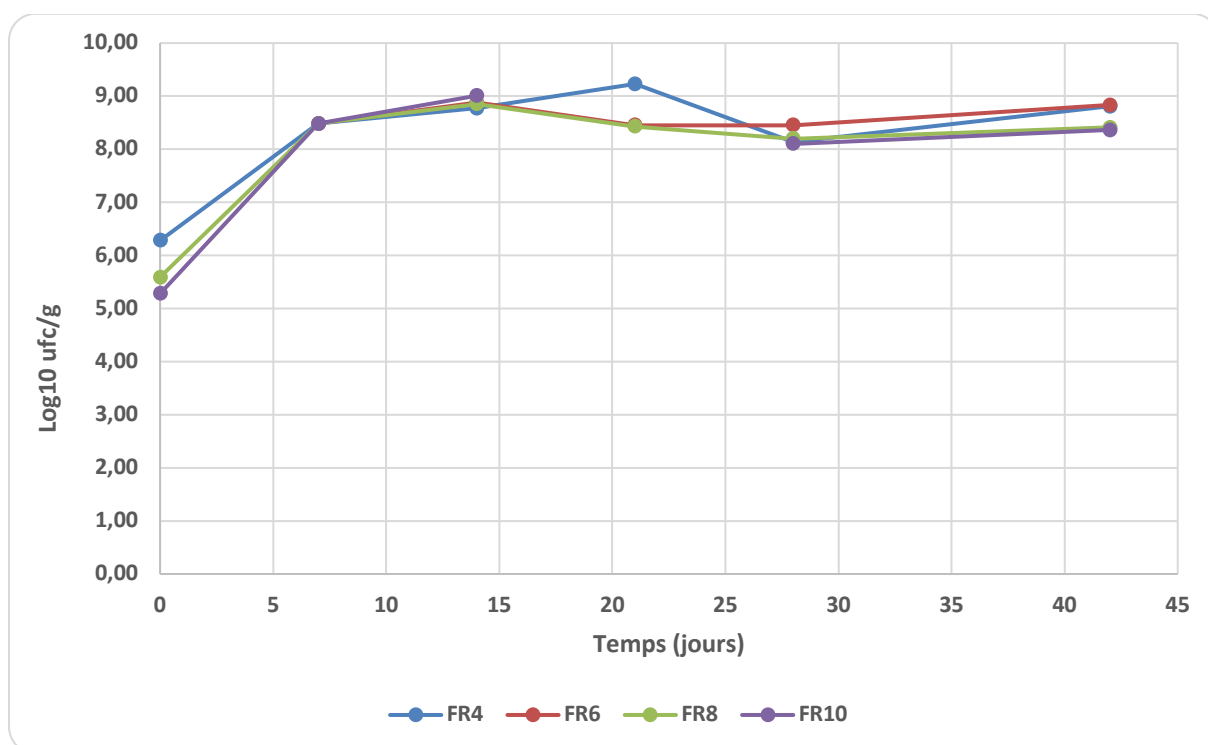


Figure 12. Évolution des bactéries lactiques (MRS) par conditions de saumurages - Lot ferments

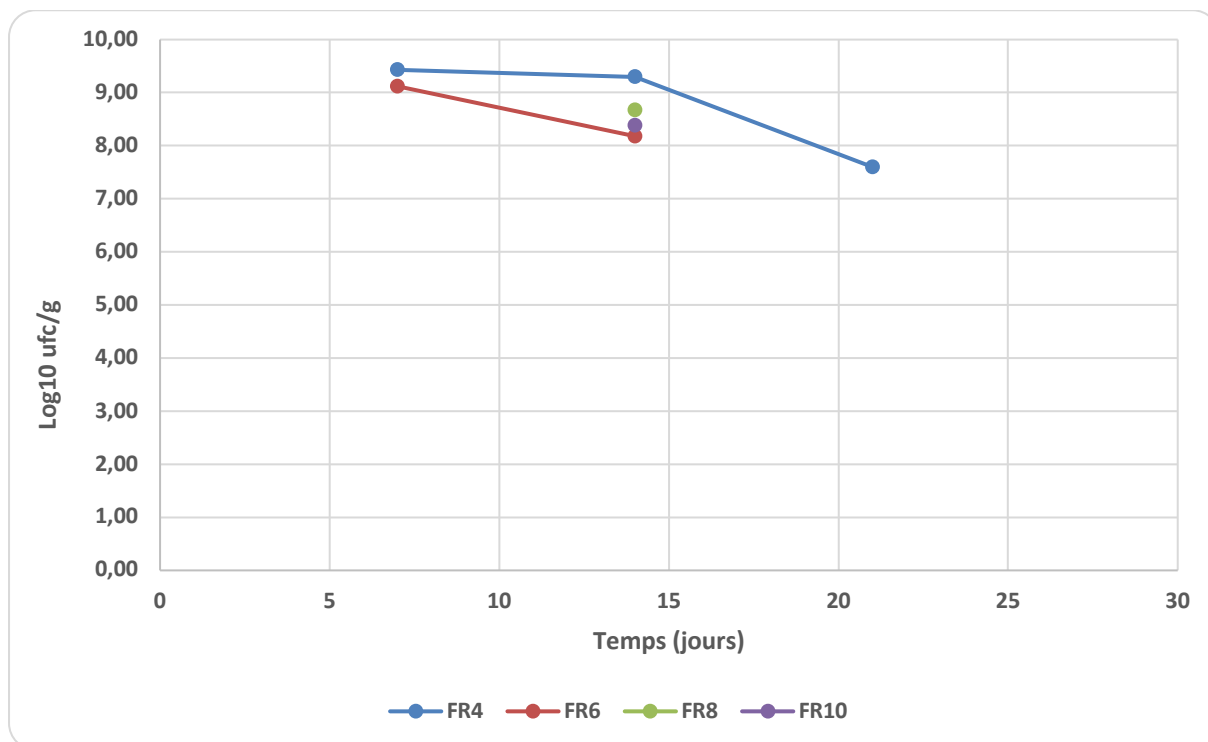


Figure 13. Évolution des entérobactéries (VRBG) par conditions de saumurages - Lot ferments

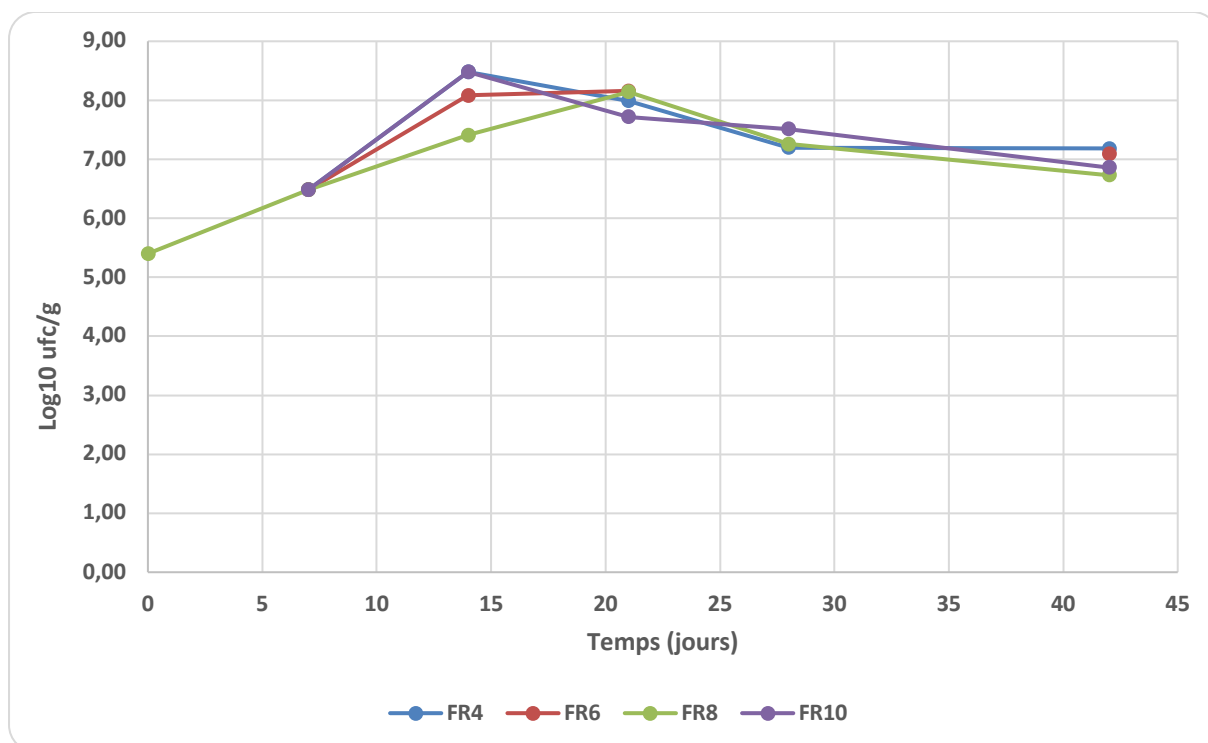
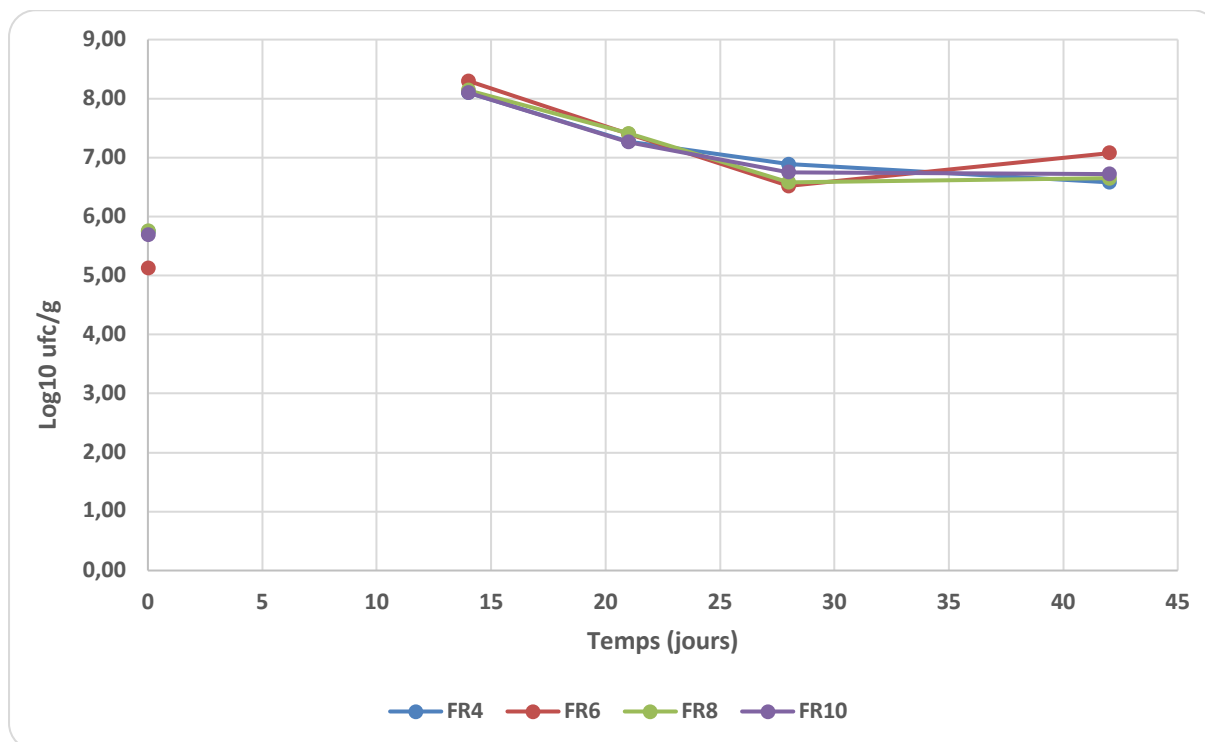


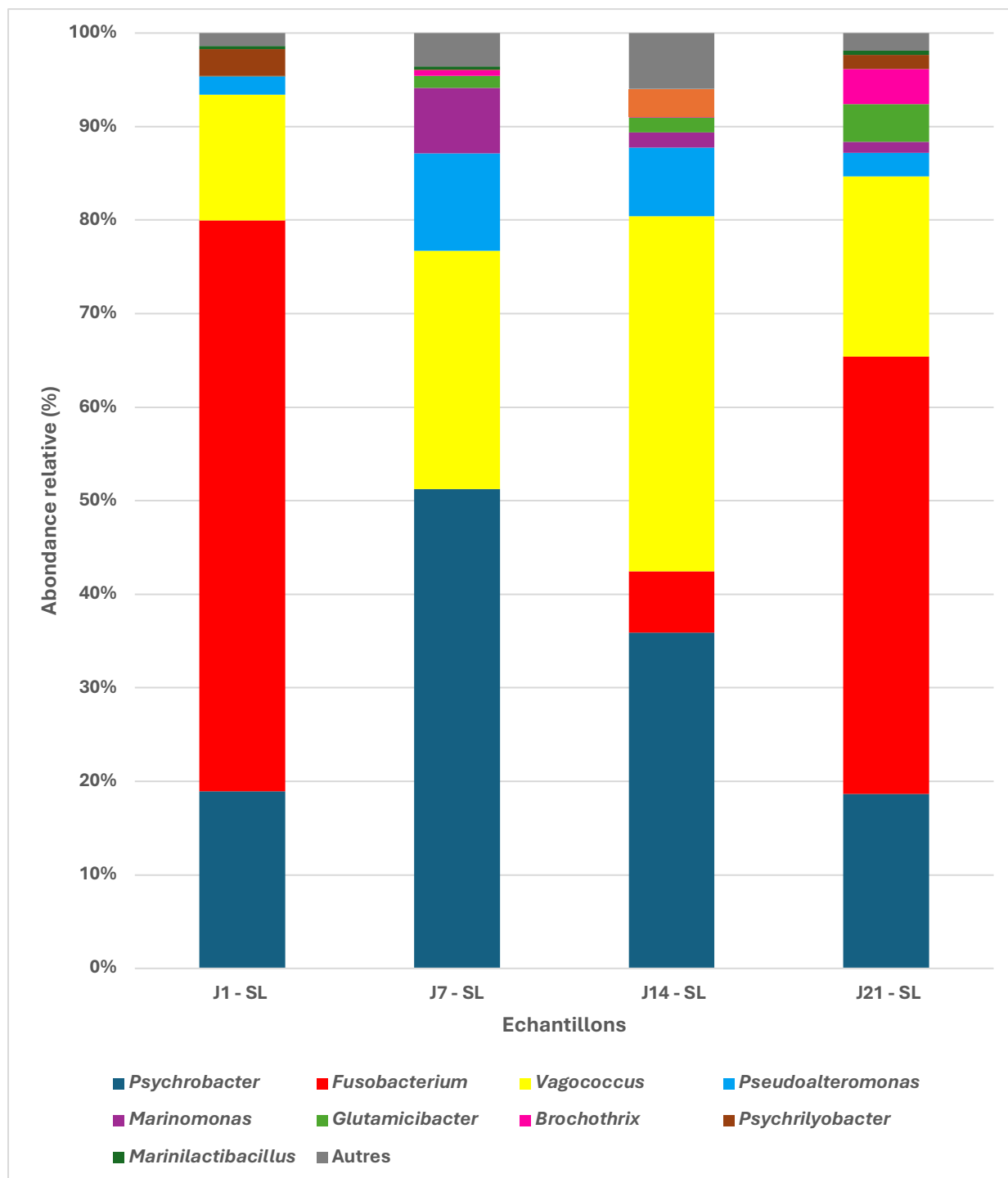
Figure 14. Évolution des levures et moisissures (YGC) par conditions de saumurages - Lot ferments



Le lot F présente des niveaux nettement plus élevés dès J7, avec une flore totale comprise entre 8,0 (FR4) et 9,8 (FR8) $\log_{10}$ UFC.g⁻¹ et des bactéries lactiques proches de 9,3 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹. Cette biomasse initiale se maintient tout au long de l'affinage avec une flore totale stable autour de 9,2 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹ jusqu'à J28, sans distinction marquée entre les deux températures de conservation (8 °C et 12 °C). Les entérobactéries restent sous la limite de détection à J7 (< 1,00 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹), puis atteignent 5,3 à 6,5 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹ à partir de J14. Les levures et moisissures sont absentes à J7, atteignent 8,3 à 8,5 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹ à J14 (à l'exception de FR4 non détecté), puis se stabilisent autour de 7,6 à 7,9 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹ en fin de suivi. Les bactéries lactiques passent sous la limite de détection dès J21 (8 °C) pour trois conditions sur quatre (FR6, FR8, FR10 à < 1,00 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹), tandis que la condition FR4 maintient encore un niveau détectable (7,6 $\log_{10}$ UFC.g⁻¹). À J21 (12 °C) et à J28, l'ensemble des conditions sont sous la limite de détection.

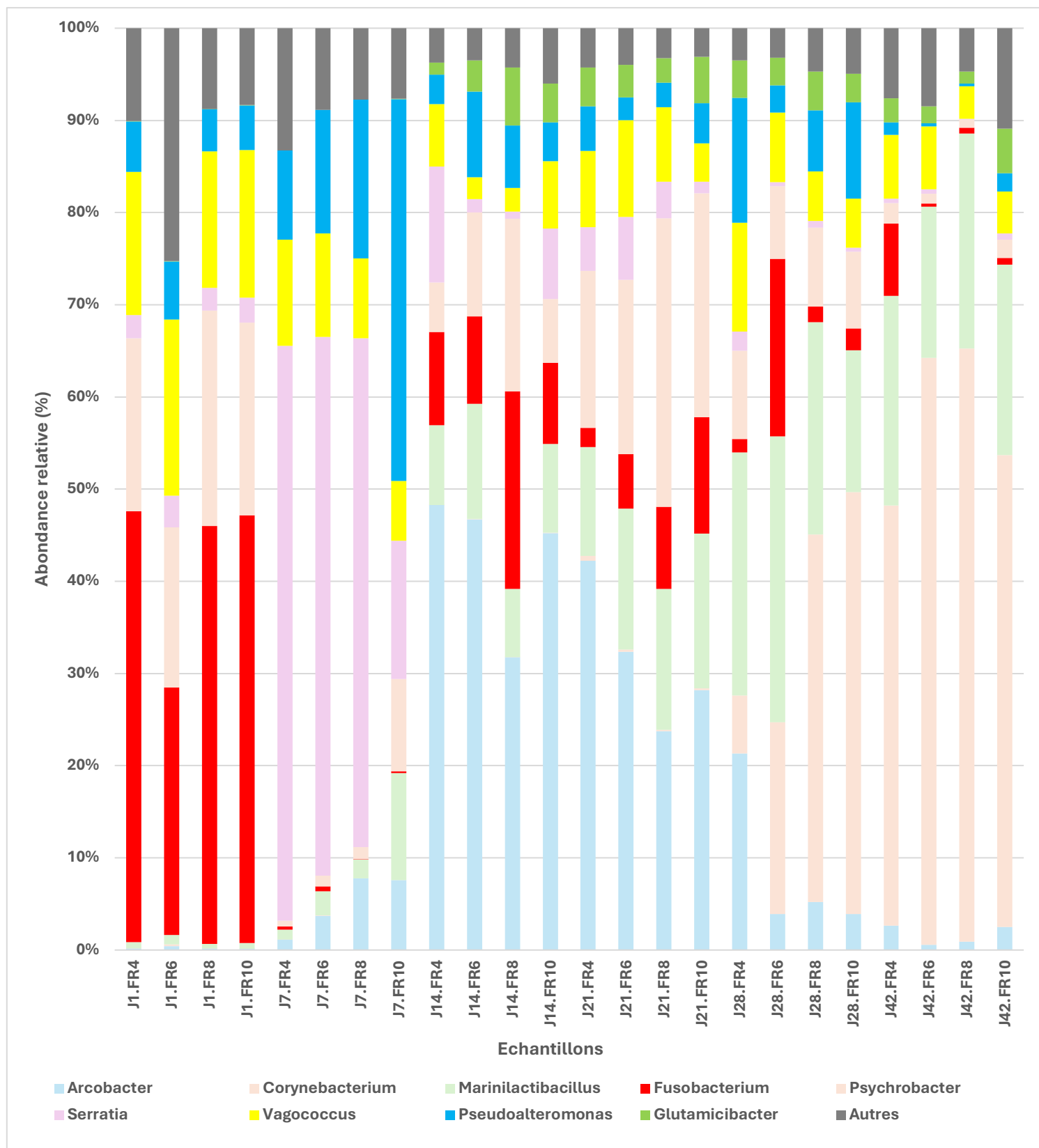
5. Caractérisation du microbiote par métagénomique

Figure 15. Représentation des genres bactériens majoritaires des solutions de lavage au cours de l'affinage – Lot acide lactique



Abondance relative (%) des 10 genres bactériens les plus représentés dans les SL du lot AL, aux quatre points de lavage (J1, J7, J14, J21).

Figure 16. Représentation des genres bactériens majoritaires des fromages modèles au cours de l'affinage et de la conservation – Lot acide lactique

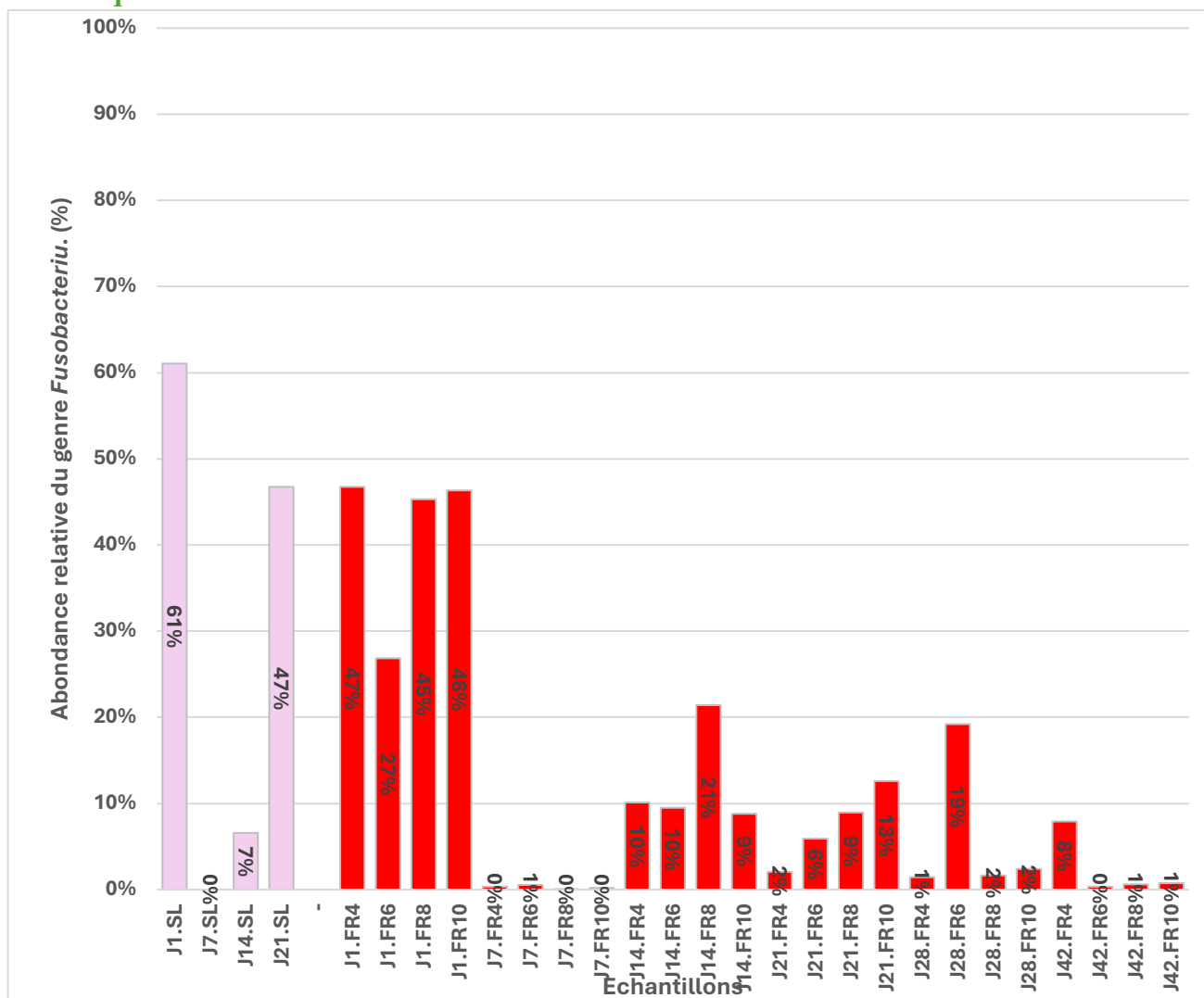


Abondance relative (%) des 10 genres bactériens les plus représentés dans les FR du lot AL, aux cinq points d'analyse (J1, J7, J14, J21 et J42).

À J1, immédiatement après le premier lavage, le microbiote est dominé par *Fusobacterium* (37 % en moyenne des quatre conditions), *Psychrobacter* (18 %) et *Vagococcus* (14 %). La SL correspondante contient 61 % de *Fusobacterium* et 19 % de *Psychrobacter*. À J7, la composition évolue avec une forte diminution de *Fusobacterium* (0,1 à 0,5 % selon les conditions) et une prédominance de *Serratia* (44 %) et *Pseudoalteromonas* (19 %).

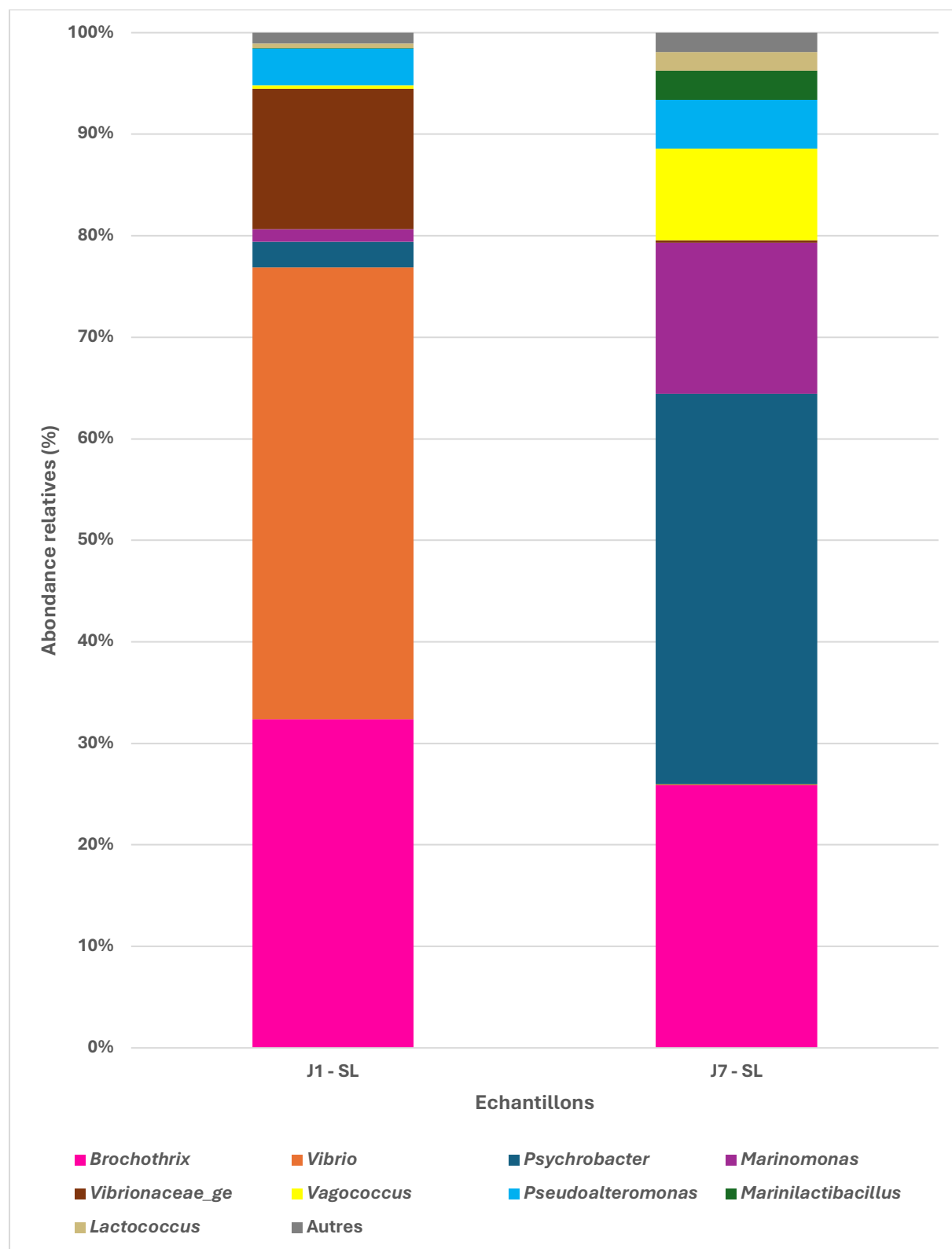
Entre J14 et J21, le microbiote est représenté par *Arcobacter* (30 à 41 %), *Psychrobacter* (10 à 22 %) et *Marinilactibacillus* (9 à 14 %). *Fusobacterium* atteint 8 à 12 %, avec un maximum de 21 % pour la condition FR8 à J14. À J28 et J42, *Corynebacterium* devient dominant, passant de 27 % à J28 à 52 % à J42, accompagné de *Marinilactibacillus* stable autour de 19 à 23 %. Parallèlement, *Arcobacter* chute de 30 % à 1,5 % et *Fusobacterium* diminue à 2 à 6 %.

Figure 17. Abondance relative du genre *Fusobacterium* par échantillon – Lot acide lactique



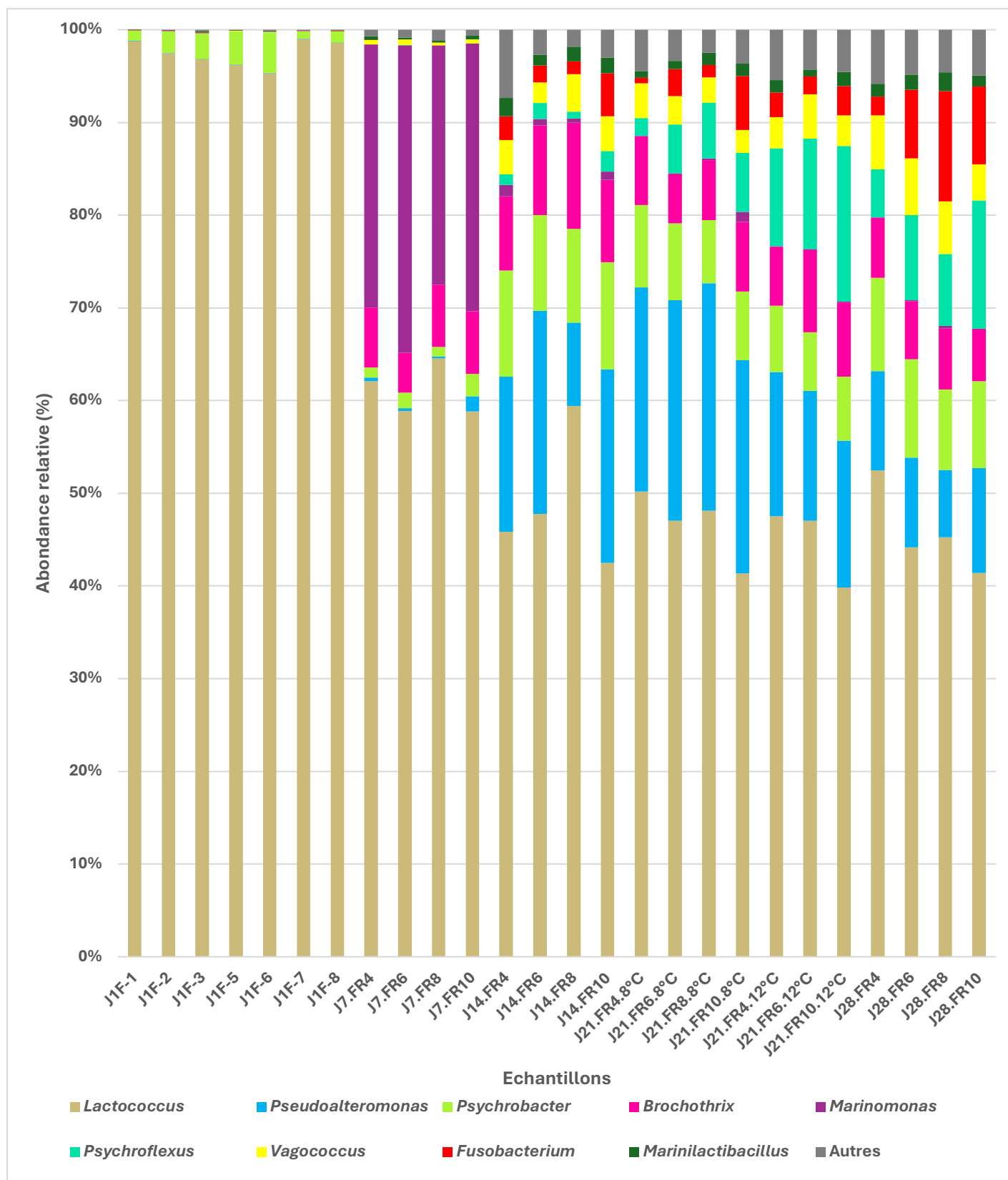
Évolution de l'abondance relative du genre *Fusobacterium* dans les SL et FR du lot AL au cours de l'affinage et de la conservation (10.000 séquences par échantillon).

Figure 18. Représentation des genres bactériens majoritaires des solutions de lavage au cours de l'affinage – Lot ferments



Abondance relative (%) des 10 genres bactériens les plus représentés dans les SL du lot F, aux deux points de lavage (J1 et J7).

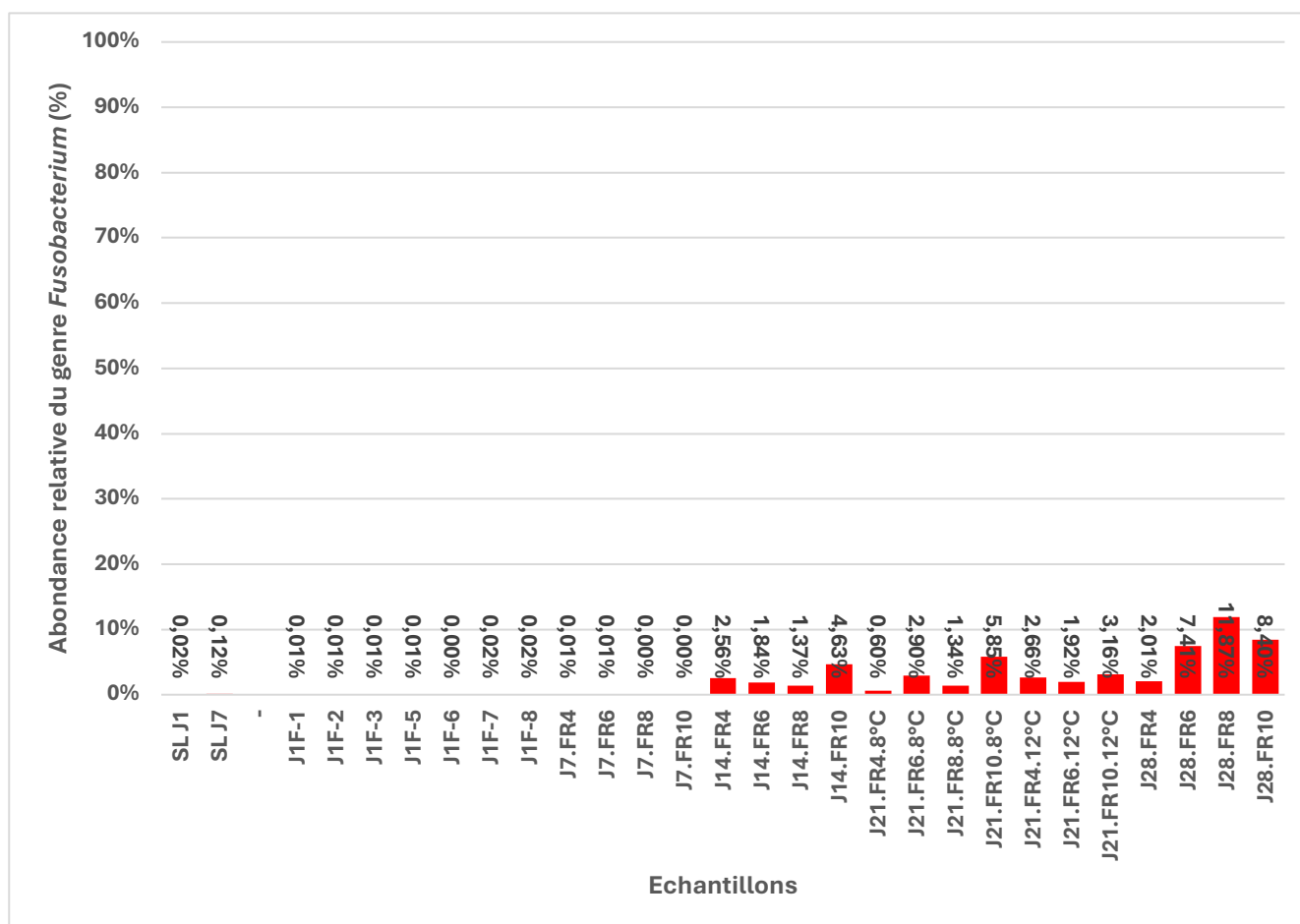
Figure 19. Représentation des genres bactériens majoritaires des fromages modèles au cours de l'affinage et de la conservation – Lot ferments



Abondance relative (%) des 10 genres bactériens les plus représentés dans les FR (SM) du lot F, aux quatre points d'analyse (J1, J7, J14, J21 à 8 et 12 et J28 °C).

À J1, *Lactococcus* représente 95 à 99 % du microbiote des mini-fromages, alors qu'il est quasi absent de la SL correspondante (< 2 %). Sa part diminue ensuite progressivement au cours de l'affinage et de la conservation (61 % à J7, 49 % à J14, 45 à 47 % à J21 et 46 % à J28), au profit de plusieurs genres accompagnateurs : *Marinomonas* atteint un pic transitoire à J7 (29 %) ; *Pseudoalteromonas* monte à 15-23 % entre J14 et J21 ; *Psychrobacter* atteint 7 à 11 % après J14 ; *Brochothrix* reste stable autour de 6 à 10 % tout au long du suivi ; *Psychroflexus* émerge à partir de J14 et progresse jusqu'à 5 à 17 % à J21 et J28. Les corynéformes (*Corynebacterium*, *Brevibacterium*) restent quasi absents tout au long du suivi.

Figure 20. Abondance relative du genre *Fusobacterium* par échantillon – Lot ferments



Évolution de l'abondance relative du genre *Fusobacterium* sp. dans les SL et FR du lot F au cours de l'affinage et de la conservation (10.000 séquences par échantillon).

Fusobacterium est quasi absent dans les SL et à J1 (< 0,02 %) ainsi qu'à J7 (< 0,10 %). Il émerge progressivement à J14 (1,37 à 4,63 % selon la condition) et à J21 (de 0,60 à 5,85 % à 8 °C ; de 1,52 à 3,16 % à 12 °C), pour atteindre 2,01 à 11,87 % à J28.

Discussion

1. Morphologie

Au J1, les fromages du lot AL présentent une forme cubique bien définie, avec des bords nets et une surface blanche mate, cohérente avec une pâte fraîchement démoulée et non colonisée en surface. À J7, une évolution de la couleur est déjà perceptible avec une teinte légèrement jaunâtre en surface, tandis que les côtés commencent à s'arrondir sous l'effet de la perte de masse. À J14, la freinte importante du lot devient visible, les FR ont perdu en volume, présentent des faces légèrement concaves et une texture de surface plus rugueuse. À J21, un changement marqué apparaît avec l'installation d'une croûte orangée caractéristique des fromages à croûte lavée, cohérente avec la colonisation par la flore de surface (*Corynebacterium* et *Arcobacter* détectés par métagénétique). À J42, la croûte est toujours orangée et le FR semble plus affaissé. Cette morphologie finale reste éloignée d'un fromage de Herve commercial, principalement en raison de la freinte excessive du lot (42-46 %) qui a produit des fromages plus petits qu'attendu.

Pour le lot F, les fromages à J1 présentent une forme cubique nette avec une surface lisse et une couleur blanche uniforme. À J7, l'aspect global reste très proche de celui observé à J1, avec une déformation minimale et une couleur légèrement plus crème. Cette stabilité morphologique reflète la freinte plus modérée de ce lot (6-14 %) comparée au lot AL. À J14, la texture devient nettement plus molle, la couleur vire au jaune-orangé et la surface prend l'empreinte de la grille sur laquelle les fromages reposent, signe de leur affaissement sous leur propre poids. Cette évolution rapide a motivé la décision de raccourcir la durée d'affinage prévue initialement et de conditionner les fromages en papier alimentaire dès J14 pour la phase de conservation. À J21, soit après une semaine de conservation, la croûte présente une coloration orangée marquée avec l'apparition de zones noires sur les reliefs, suggérant la colonisation par des levures et moisissures spécifiques développées avant l'emballage. À J28, après deux semaines de conservation, la croûte présente une coloration jaune-orangée uniforme et l'absence de développement fongique supplémentaire, ce qui témoigne de l'efficacité du conditionnement en papier alimentaire pour limiter la prolifération des moisissures aérobies au cours de la conservation.

Les deux lots présentent des évolutions morphologiques nettement différentes. Le lot AL conserve une structure ferme et cubique tout au long du suivi, avec un rétrécissement progressif

et une croûte relativement peu développée. Le lot F, à l'inverse, présente une évolution plus rapide vers un fromage à croûte lavée typique, avec une perte de structure marquée de la pâte dès J14 et un développement plus intense de la croûte orangée.

La perte de structure accélérée observée dans le lot F peut s'expliquer par deux facteurs qui se cumulent. D'une part, la remontée du pH plus marquée dans ce lot ($\sim 8,0$ à J28 contre $\sim 7,5$ à J42 pour le lot AL) favorise l'activité des protéases microbiennes issues de la flore d'affinage et des ferments inoculés, entraînant une dégradation plus rapide de la matrice caséinique. D'autre part, la teneur en sel plus faible du lot F (1,15-1,45 % contre 2,00-2,35 % pour le lot AL) limite l'effet structurant du NaCl sur les caséines et freine moins la prolifération des populations protéolytiques (Leclercq-Perlat *et al.*, 2024). La combinaison de ces deux facteurs pourrait expliquer l'atteinte prématurée d'un stade de maturité avancée observée dès J14 dans ce lot.

2. Perte de masse

Le lot AL présente une perte de masse progressive et continue au cours de l'affinage, comparable entre les quatre conditions de saumurage. Les valeurs finales à J42 se situent entre 42 et 46 %, sans tendance claire liée à la durée de saumurage. Cette observation suggère que dans la gamme testée (4 à 10 min), ce paramètre n'exerce pas d'effet marqué sur la freinte des fromages. Le lot F présente quant à lui une évolution nettement plus modérée au cours de l'affinage. À J14, dernier point commun d'affinage pour les deux lots, les FR ont conservé une masse comprise entre 11,9 et 12,9 g selon la condition, contre 10,5 à 10,8 g pour le lot AL. La perte de masse cumulée à J28, incluant la phase de conservation, reste comprise entre 6 et 14 %, avec une trajectoire homogène entre les quatre conditions de saumurage.

La perte de masse observée s'explique surtout par la déshydratation progressive du fromage au cours de l'affinage. L'eau libre s'évapore au niveau de la croûte, un phénomène favorisé par les conditions d'enceinte (12 °C, 100 % HR) et la ventilation modérée. Le saumurage initial provoque également un effet osmotique où le sel absorbé attire l'eau vers l'extérieur et provoque une exsudation qui se prolonge pendant les premiers jours d'affinage. Cette perte d'eau représente au total 84% de la freinte totale, le reste étant dû au dégagements de CO₂ et aux réactions métaboliques (Riahi *et al.*, 2007; Cipolat-Gotet *et al.*, 2020). Dans le cas de nos fromages, le rapport surface/volume plus élevé qu'un fromage de taille standard amplifie ces phénomènes (Cipolat-Gotet *et al.*, 2020).

Dans un fromage à pâte molle et croûte lavée, la freinte classique se situe entre 5 et 15 %, selon les conditions d'affinage et notamment l'HR de l'enceinte qui joue un rôle plus important que la température (Riahi *et al.*, 2007; Leclercq-Perlat *et al.*, 2024). Ce paramètre est suivi de près par les fromagers car la masse détermine directement le rendement de production. Elle doit donc rester la plus faible possible. Le lot F entre bien dans cette plage cible, avec une perte de masse d'environ 11 % à J28, proche de ce qui est rapporté pour un Munster expérimental affiné dans des conditions similaires (Leclercq-Perlat *et al.*, 2024).

La différence d'évolution entre les deux lots reflètent probablement l'impact de la cinétique d'acidification du lait avant emprésurage sur la structure du caillé formé. Le lot AL, préacidifié chimiquement à pH 6,1 avant l'ajout de la présure, présente une déminéralisation initiale plus importante des caséines. En effet, une partie du phosphate de calcium colloïdal qui stabilise les micelles de caséine se solubilise dans le lactosérum avant la coagulation. Le caillé formé est donc plus fragile et moins cohésif. À l'inverse, dans le lot F, la présure agit sur un lait encore peu acidifié, ce qui préserve la minéralisation des micelles et permet la formation d'un caillé plus riche en calcium colloïdal, plus rigide et à meilleure rétention d'eau (Juan et Trujillo, 2022; Kindstedt, 2013). Ce mécanisme reste néanmoins à confirmer expérimentalement. En effet, une étude a montré, sur un fromage de type Mozzarella, que la préacidification du lait avant emprésurage entraînait une réduction du ratio calcium/caséine (de ~28 à ~21 mg/g) associée à une augmentation de la teneur en eau du fromage (Guinee *et al.*, 2002). Cette observation est opposée à celle réalisée dans notre étude. Plusieurs facteurs pourraient expliquer cette divergence : la matrice fromagère étudiée est différente (pâte filée vs pâte molle à croûte lavée), les protocoles technologiques diffèrent significativement (chauffage/filage vs affinage classique), et les paramètres d'affinage (température, durée, humidité relative) ne sont pas comparables.

3. Evolution physico-chimique

3.1. Comparaison des dynamiques d'acidification entre les deux lots

La comparaison entre les deux modes d'acidification fait apparaître des différences marquées. Le lot AL présente un pH initial modéré (6,65) et une remontée progressive jusqu'à 7,55 à J42. Le lot F présente un pH initial nettement plus bas (6,02) attestant l'acidification biologique effective, puis une remontée plus rapide et plus prononcée jusqu'à 8,09 à J28 soit ~0,5 unité de pH au-dessus de l'AL au même stade. Cette alcalinisation plus forte suggère une activité protéolytique plus intense dans ce lot, cohérente avec la biomasse initiale importante apportée

par les ferments R-704 et BLO. Le dédoublement de la condition d'affinage à J21 (8 °C vs 12 °C) ne fait pas apparaître de différence marquée.

En comparaison au modèle de taille standard produit par Minutillo (2024), où la désacidification débute après 1 à 2 semaines d'affinage pour atteindre un pH de 7,1 à 7,5 à J27, nos FR présentent une dynamique décalée. Cette gamme de pH n'est atteinte qu'à J42 dans le lot AL, tandis que le lot F la dépasse largement dès J28. Cet écart pourrait s'expliquer par le rapport surface/volume plus élevé des FR qui favorise l'implantation et l'activité protéolytique de la flore de surface responsable de la désacidification. De plus, les teneurs en sel plus faibles observées dans nos FR (2,00 à 2,35 % pour le lot AL et 1,15 à 1,45 % pour le lot F) sont inférieures à celles de Minutillo (2024), qui rapporte $1,92 \pm 0,22$ % en croûte pour ses essais 2 et 3, avec une valeur cible d'environ 2,50 %. Une teneur en sel plus faible limite l'inhibition des populations protéolytiques de surface et favorise l'activité des enzymes de désacidification, accélérant ainsi la remontée du pH (Leclercq-Perlat *et al.*, 2024).

Ces différences de teneur en sel peuvent également être mises en regard de notre cible fixée à 2,50 % NaCl (m/m). Pour le lot AL, les teneurs à J42 (2,00 à 2,35 %) restent légèrement en dessous de cette cible. Ce résultat s'explique par la perte de masse importante du lot (42-46 %) qui a concentré mécaniquement le sel initialement absorbé lors du saumurage. On peut néanmoins observer que la concentration attendue par simple concentration mécanique devrait être plus élevée (4,00 %). Cet écart pourrait s'expliquer par la perte de sel via les exsudats en début d'affinage et par un léger effet uniformisant des lavages hebdomadaires, dont la solution saline reste à concentration modérée. Pour le lot F, les teneurs à J28 (1,15 à 1,45 %) sont nettement plus éloignées de la cible. Cet écart est en partie cohérent avec la perte de masse plus modérée de ce lot (6-14 %), qui a limité l'effet de concentration mécanique du sel au cours de l'affinage. Cependant, l'ampleur de l'écart suggère qu'une erreur de manipulation lors du saumurage a pu contribuer à ce résultat. Cette hypothèse est appuyée par la comparaison des teneurs en sel post-saumurage (J1) entre les deux lots. Le lot AL présente déjà un gradient net et croissant selon la durée d'immersion (1,45 à 2,32 %), tandis que le lot F présente une teneur moyenne de $1,08 \pm 0,57$ %. Cet écart de comportement dès J1 suggère un saumurage moins efficace ou moins homogène pour le lot F, indépendamment de la dynamique de freinte ultérieure.

3.2. Effet du temps de saumurage

À J1, un gradient net de teneur en sel est visible entre les quatre conditions pour le lot AL. La durée de saumurage détermine directement la concentration initiale en NaCl, qui passe de 1,45 % (FR4) à 2,30 % (FR10), soit un facteur 1,6 entre les deux extrêmes. Le même gradient est observé dans le lot F, avec des valeurs allant de 0,85 % (FR4) à 1,45 % (FR10). Néanmoins, ce gradient tend à s'estomper au cours de l'affinage et de la conservation. À J42, les teneurs en sel sont presque équivalentes entre les quatre conditions (2,00 à 2,35 %). Le même phénomène est observé sur le lot F où le gradient disparaît totalement à J28 (FR4 = 1,40 % ; FR10 = 1,15 %). Cette homogénéisation est probablement due à la redistribution du sel dans la matrice fromagère par diffusion et à l'effet uniformisant des lavages hebdomadaires avec la solution saline.

Sur les autres paramètres physico-chimiques (pH, aw), aucun effet significatif de la durée de saumurage n'est observable dans les deux lots. Les valeurs finales à J42 pour AL (pH 7,49-7,62 ; aw 0,949-0,957) et à J28 pour F (pH 8,00-8,16 ; aw 0,968-0,974) sont remarquablement homogènes entre les quatre conditions.

Les valeurs obtenues (NaCl 2,0-3,0 %, pH final 7,55 et aw 0,95) restent cohérentes avec l'écosystème naturel de la souche de *Fusobacterium* d'intérêt, isolée de la microflore de surface des fromages de Herve où elle se développe dans des conditions similaires (Gérard, 2021). Ces conditions demeurent également compatibles avec la croissance de *L. monocytogenes* (pH 4,6-9,5 ; aw > 0,92 ; sel jusqu'à 10 %), ce qui permettra ultérieurement l'inoculation contrôlée du pathogène dans le modèle pour les essais de défi visant à démontrer l'activité inhibitrice de la souche (Gérard *et al.*, 2018).

4. Dynamique microbienne

Les niveaux observés sont à interpréter comme des indicateurs de dynamique d'affinage. En effet, aucune norme réglementaire n'encadre la flore totale, les bactéries lactiques, les entérobactéries totales et les levures/moisissures dans les fromages, contrairement aux pathogènes ciblés spécifiquement par le règlement de la Commission européenne (2005)

4.1. Lot acide lactique

L'implantation rapide de la flore totale reflète l'efficacité d'inoculation d'une charge microbienne élevée via les solutions de lavage hebdomadaires. La stabilité des bactéries lactiques à 7,4 - 8,9 log₁₀ UFC.g⁻¹ jusqu'à J42 est à souligner. En effet, les populations lactiques déclinent généralement après épuisement du lactose (Cipolat-Gotet *et al.*, 2020). Dans notre cas, ce

maintien peut s'expliquer d'une part par l'apport régulier de nouvelles bactéries lactiques via les SL, et d'autre part par la présence de bactéries lactiques halotolérantes et adaptées à l'environnement de surface, notamment *Marinilactibacillus* et *Vagococcus* détectés par métagénomique. Ces bactéries, halophiles et alcaliphiles, sont fréquemment décrites dans les croûtes de fromages à pâte molle où elles peuvent atteindre 6 à 10 log₁₀ UFC.g⁻¹ et se développer sur d'autres substrats que le lactose, comme le lactate ou les acides aminés issus de la protéolyse (Suzuki *et al.*, 2021)

La montée des entérobactéries entre J7 et J14 correspond à la fenêtre où le pH commence à remonter (de 6,68 à 6,93) et où la surface est colonisée par la flore d'affinage qui produit des composés azotés simples favorables à ces populations. Les niveaux élevés atteints confirment la nécessité d'un contrôle strict des matières premières et de l'hygiène pour éviter l'introduction de pathogènes de la famille des *Enterobacteriaceae*.

Le suivi des levures et moisissures montre des niveaux élevés dès J14 (8,1 à 8,3 log₁₀ UFC.g⁻¹), traduisant une colonisation rapide de la surface, suivie d'une diminution progressive au cours de l'affinage et de la conservation. L'absence de donnée à J7 ne permet toutefois pas de préciser à partir de quel moment cette population s'est installée.

L'ensemble de ces observations reflète la dynamique classique d'affinage des fromages à croûte lavée, où les bactéries lactiques et corynébactéries s'installent en premier et modifient les conditions du microenvironnement (remontée du pH, dégradation des protéines et des lipides), rendant ensuite la surface propice au développement des populations secondaires (entérobactéries, levures et moisissures).

4.2. Lot ferments

Le décalage marqué des entérobactéries (< 1,00 log₁₀ UFC.g⁻¹ à J7 puis 5,3 à 6,5 log₁₀ UFC.g⁻¹ à J14) suggère que les conditions initiales (pH plus bas, apport de ferments) exercent une pression sélective contre les entérobactéries en début d'affinage. La remontée du pH rendrait ensuite l'environnement plus permissif à leur développement. Les niveaux atteints par les entérobactéries dans ce lot restent inférieurs à ceux du lot AL au même point (5,3 à 6,5 contre 7,4 à 8,5 log₁₀ UFC.g⁻¹ à J14), ce qui suggère que la pression sélective exercée par les ferments maintient un contrôle plus efficace sur ces populations que la simple colonisation de surface.

L'explosion des levures et moisissures à J14 (8,3 à 8,5 log₁₀ UFC.g⁻¹) pourrait s'expliquer par la disponibilité accrue de nutriments issus de la protéolyse et de la lipolyse en cours d'affinage, ainsi que par la remontée du pH qui devient favorable aux genres comme *Debaryomyces*.

On notera enfin la diminution marquée des bactéries lactiques, qui débute dès J21 (8 °C) pour trois conditions sur quatre (FR6, FR8 et FR10 passant sous la limite de détection à < 1,00 log₁₀ UFC.g⁻¹) et se généralise à J21 (12 °C) et J28 pour toutes les conditions. Cette baisse est probablement liée à un stress environnemental (remontée du pH au-delà de 8, déshydratation progressive) plutôt qu'à une réelle disparition. En effet, les bactéries lactiques utilisées comme ferments (*Lactococcus lactis*) subissent une adaptation physiologique importante à pH alcalin, où leur biomasse est réduite d'environ 20 % à pH 8 par rapport à pH 6 (Bendig *et al.*, 2025). La métagénomique confirme cette hypothèse en mettant en évidence une diminution progressive de *Lactococcus* dans notre lot, de 97,5 % du microbiote total à J1 à environ 50 % à partir de J14, sans disparition totale du genre.

5. Caractérisation du microbiote par métagénomique

5.1. Lot acide lactique

La composition initiale à J1 reflète directement celle de la SL utilisée pour l'inoculation, confirmant l'efficacité du transfert de la flore de surface par le lavage. Le basculement observé à J7, avec la quasi-disparition de *Fusobacterium* au profit de *Serratia* et *Pseudoalteromonas*, pourrait correspondre à une prolifération opportuniste de ces genres à Gram négatif à un moment où le pH est encore modéré (~6,7) et où la flore d'affinage n'est pas encore totalement installée.

Entre J28 et J42, la dominance progressive de *Corynebacterium* et la chute simultanée d'*Arcobacter* et de *Fusobacterium*, sont cohérentes avec la remontée du pH observée (7,2 - 7,6), qui favorise les bactéries acido-sensibles comme les corynébactéries. La surface salée et humide favorise les plutôt Firmicutes halotolérants (Kindstedt, 2013; Ritschard et Schuppler, 2024).

Les SL constituent l'inoculum principal de la flore de surface dans notre modèle, et leur composition détermine en grande partie la trajectoire microbienne des fromages. Dans ce lot, elles présentent une composition dominée par *Psychrobacter* (19 à 57 %) et *Vagococcus* (14 à 39 %), accompagnés de *Pseudoalteromonas* (2 à 12 %). Cette composition est cohérente avec le microbiote décrit dans la littérature pour les croûtes de fromages à pâte molle à croûte lavée (Ritschard et Schuppler, 2024) et confirme la pertinence du fromage commercial choisi (Chèvre

du Vieux Moulin) comme source d'inoculum. La présence de *Psychrilyobacter* dans certaines SL du lot AL (2,9 % à J1 et 1,6 % à J21) est à souligner. Ce genre appartient à la famille des Fusobacteriaceae, comme *Fusobacterium*. Cette parenté avait déjà été mise en évidence par Seck A. (2023), qui cherchait initialement à isoler la nouvelle espèce de *Fusobacterium* dans le fromage de Herve mais avait finalement obtenu six isolats correspondant à *Psychrilyobacter atlanticus* (98,78 % d'identité de séquence sur l'ADNr 16S). Malgré cette identification, les isolats étaient positifs aux qPCR ciblant *Fusobacterium*, une observation que l'auteur attribue à la proximité génétique entre les deux genres ou à un possible partage de séquences ciblées par les amorces. Cette observation souligne la nécessité de croiser les données métagénétiques avec des techniques complémentaires (isolement, séquençage Sanger, analyses phylogénétiques) pour confirmer l'identité exacte des populations bactériennes détectées.

On note une variabilité importante entre les quatre SL du lot. Cette variabilité s'explique par le fait que chaque SL est préparée fraîchement à partir d'un nouveau fromage commercial, dont la microflore de surface peut différer selon le lot de production, la date d'achat et les conditions de conservation avant utilisation. Un point important est que certains genres bactériens abondants dans les FR ne sont pas retrouvés dans les SL correspondantes. *Corynebacterium* et *Arcobacter* sont quasi absents des SL (< 0,1 %) mais deviennent dominants au cours de l'affinage (52 % et 41 % respectivement en fin de suivi). Ces observations indiquent que la SL n'est pas l'unique source d'inoculation, le lait cru lui-même, ainsi que l'environnement de l'enceinte climatique, contribuent probablement à la colonisation des fromages.

5.2. Lot ferments

La dominance écrasante de *Lactococcus* à J1 reflète l'apport massif du ferment R-704 ($\log_{10} = 9,6 \text{ UFC.mL}^{-1}$) au moment de la production. La diminution progressive au cours de l'affinage traduit la mise en place d'une communauté plus diversifiée, sous l'influence de la remontée du pH et de la modification progressive du microenvironnement. *Brochothrix*, probablement apporté par le ferment BLO, se maintient de manière stable tout au long de l'affinage. L'absence quasi totale de *Corynebacterium* et *Brevibacterium* dans ce lot pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs. D'abord, la pression compétitive exercée par *Lactococcus*, dominant à toutes les étapes de l'affinage, limite la disponibilité des nutriments et de l'espace pour les corynébactéries. Ensuite, la remontée très marquée du pH au-delà de 8,0 en fin d'affinage dépasse leur optimum de croissance (5,8 à 6,0) (Kindstedt, 2013). Enfin, la teneur en sel plus faible dans ce lot (1,15 à 1,45 %) limite l'avantage sélectif habituel de ces bactéries

halotolérantes vis-à-vis des populations concurrentes, réduisant leur capacité à s'implanter durablement en surface (Ritschard et Schuppler, 2024).

Les SL présentent une composition très différente de celle du lot AL, dominée par *Brochothrix* (26 à 33 %), *Vibrio* (jusqu'à 45 % à J1) et *Psychrobacter* (2 à 39 %). Cette différence pourrait s'expliquer par le changement de fromage source imposé par les circonstances (Le Herve du Vieux Moulin).

De même que pour le lot AL, la dominance écrasante de *Lactococcus* dans les fromages modèles (95 à 99 % à J1) n'est pas retrouvée dans les SL correspondantes (0,5 à 1,9 %). Cette absence confirme que les ferments ajoutés directement dans le lait constituent la principale source de cette population. Ce constat souligne que dans notre protocole, la composition des fromages résulte de plusieurs sources d'inoculation qui se cumulent à savoir, les ferments ajoutés dans le lait, le lait cru lui-même, l'environnement de l'enceinte climatique, et les SL qui n'apportent qu'une partie du microbiote final.

5.3. Evolution de *Fusobacterium*

L'abondance de *Fusobacterium* diffère nettement entre les SL des deux lots. Dans le lot AL, les SL présentent des abondances élevées à certains points de lavage (61 % à J1, 47 % à J21), tandis que dans le lot F, les SL contiennent très peu de *Fusobacterium* à tous les points d'analyse (< 0,15 %). La différence marquée d'abondance de *Fusobacterium* dans les SL entre les deux lots peut être mise en relation avec les fromages commerciaux utilisés pour préparer les SL. Les conditions de conservation avant achat (durée de stockage, température, hygrométrie, manipulations) diffèrent probablement entre les deux enseignes et pourraient influencer la charge en *Fusobacterium*. Cette variable mériterait d'être caractérisée systématiquement lors des productions futures, par exemple en fixant une source d'approvisionnement unique.

Dans le lot F, *Fusobacterium* apparaît progressivement malgré la pression compétitive exercée par *Lactococcus*. Cette implantation tardive suggère que la souche parvient à coloniser la matrice une fois que les conditions physico-chimiques évoluent au cours de l'affinage, notamment avec la remontée du pH au-delà de 7 et la disponibilité en nutriments issus de la protéolyse. La progression continue observée à partir de J14 contraste avec la trajectoire fluctuante du lot AL, où l'abondance de *Fusobacterium* semble davantage dépendre des apports directs via la SL. Cette différence pourrait suggérer que, dans le lot F, la persistance et la croissance de *Fusobacterium* seraient associées à la présence de *Lactococcus*, soit via des

interactions métaboliques (métabolites, cofacteurs), soit via une autre bactérie qui se développerait aux côtés du ferment.

5.4. Comparaison avec les fromages de taille standard

Tableau X. Comparatif des données métagénétiques tailles standard versus tailles miniaturisé

Catégorie	Aspect comparé	Étude 2024 (taille standard)	Notre étude 2026 Lot AL (mini)	Notre étude 2026 Lot F (mini)
SL	Genres dominants	<i>Fusobacterium</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Vagococcus</i> , <i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Fusobacterium</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Vagococcus</i> , <i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Brochothrix</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Psychrobacter</i>
	Abondance de <i>Fusobacterium</i> (%)	37 à 48 (stable)	0 à 61 (variable)	< 0,15 (quasi absent)
J0/J1 (post-saumurage et post-lavage)	Mode d'acidification	Ferments (<i>Streptococcus</i> , <i>Lactococcus</i>)	Acide lactique chimique	Ferments R-704 et BLO
	Genres dominants	<i>Streptococcus</i> (jusqu'à 68 %), <i>Lactococcus</i> (25 %)	<i>Fusobacterium</i> (37 %), <i>Psychrobacter</i> (18 %), <i>Vagococcus</i> (14 %)	<i>Lactococcus</i> (95 à 99 %)
Fin d'affinage	Point d'analyse	J21-J28	J28-J42	J28
	Genre dominant	<i>Glutamicibacter</i> (26 à 32 %)	<i>Corynebacterium</i> (52 % à J42)	<i>Lactococcus</i> (46 %)
	Genres accompagnateurs	<i>Brevibacterium</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Vagococcus</i>	<i>Arcobacter</i> (jusqu'à 41 %), <i>Marinilactibacillus</i> (19-23 %)	<i>Pseudoalteromonas</i> (jusqu'à 23 %), <i>Psychrobacter</i> (7-11 %), <i>Brochothrix</i> (6-10 %)
	Corynéformes	Présents (<i>Glutamicibacter</i> , <i>Brevibacterium</i>)	Présents (<i>Corynebacterium</i> 52 %)	Quasi absents (< 0,1 %)
Fusobacterium	Point du pic	J14	J14 (FR8)	J28 (FR8)
	Abondance maximale (%)	13	21	12
	Dynamique d'implantation	Progressive au cours de l'affinage	Progressive au cours de l'affinage	Progressive au cours de l'affinage

Tableau construit à partir des données métagénétiques 16S obtenues sur fromages de taille standard par Minutillo R. et Jaber H. (2024) et sur les FR dans la présente étude (2026). Les abondances relatives sont exprimées en pourcentage du microbiote total.

Nos résultats peuvent être mis en regard des données métagénétiques obtenues en 2024 par Minutillo R. et Jaber H. sur des fromages de taille standard suivant le même protocole. Cette comparaison permet d'évaluer la représentativité de notre modèle miniaturisé.

La composition des SL est cohérente entre les deux études, avec une dominance de *Fusobacterium* et de *Psychrobacter* accompagnés de *Vagococcus* et *Pseudoalteromonas*. *Fusobacterium* apparaît toutefois plus stable dans les SL de l'étude 2024 (37 à 48 % à tous les points) que dans les nôtres, où sa présence varie fortement (0 à 61 % pour le lot AL et < 0,15 % pour le lot F). Cet écart peut s'expliquer soit par une variabilité intrinsèque des fromages commerciaux utilisés, soit par un incident spécifique à nos lots au moment de la préparation des SL.

Au niveau des FR de notre étude, plusieurs différences apparaissent selon le mode d'acidification employé. Le fromage de taille standard analysé en 2024 est dominé dès J1 par *Streptococcus* (jusqu'à 68 %) et *Lactococcus* (25 %) suggérant l'utilisation de ferments. Notre lot F, égalementensemencé par des ferments (R-704 et BLO), présente une dominance de *Lactococcus* dès J1 (97,5 %), mais sans *Streptococcus*. Cette différence pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité du lait utilisé, notamment selon son origine (lait issu des prairies ou collecté à la ferme) et la saison de collecte. Le lot AL, acidifié par acide lactique seul, ne présente pas cette dominance et laisse place à d'autres genres colonisateurs (*Fusobacterium*, *Serratia*, *Arcobacter*).

En fin d'affinage, l'étude 2024 est marquée par une dominance de *Glutamicibacter* (26 à 32 %). Nos deux lots présentent eux des profils très différents. Le lot AL est dominé par *Corynebacterium* (52 % à J42) et *Arcobacter* (jusqu'à 41 %), deux genres non détectés en 2024. Le lot F conserve lui une part importante de *Lactococcus* (46 % à J28) accompagnée de *Pseudoalteromonas* (jusqu'à 23 %), sans que les Corynébactéries (*Corynebacterium*, *Glutamicibacter*) ne s'installent véritablement. Ces bactéries étant toutes des colonisateurs de croûte, leur abondance relative dans le lot F est probablement modulée par la compétition avec les ferments et par les conditions physico-chimiques induites (pH, sel, aw). L'origine de la coloration orangée reste ainsi à identifier. La contribution de *Psychroflexus* dont les colonies pures sont jaune-orange, peut être envisagée (Seiler *et al.*, 2012). Une caractérisation chimique des pigments de surface (spectrocolorimétrie, HPLC des extraits caroténoïdes) permettrait de mieux comprendre cette coloration.

La dynamique d'implantation de *Fusobacterium* dans les fromages reste en revanche similaire dans les trois cas, avec une abondance qui s'installe progressivement au cours de l'affinage et de la conservation pour atteindre des maxima entre J14 et J28 (13 % dans l'étude 2024, 21 % dans notre échantillon J14.FR8 du lot AL, et 12 % dans notre échantillon J28.FR8 du lot F). Cette similarité est un résultat important pour la validation du FR. Elle indique que malgré les différences de composition globale liées au protocole, l'implantation de *Fusobacterium* suit une trajectoire comparable entre les deux formats et les deux modes d'acidification, ce qui conforte la pertinence du modèle miniaturisé pour l'étude de cette souche.

Conclusions

En conclusion, ce travail montre qu'il est possible de produire un FR à pâte molle et croûte lavée. La comparaison entre les deux lots fait toutefois apparaître des écarts spécifiques. Le lot AL présente une freinte supérieure à la gamme attendue (42-46 % contre 5-15 %) et un pH final légèrement au-dessus de la neutralité (7,5) et une activité de l'eau conforme à la cible technologique (0,95 à 0,96 à J42). Le lot F s'inscrit dans la freinte cible (6-14 %) et présente également une activité de l'eau dans la gamme attendue, mais dépasse la neutralité en fin d'affinage (~8,0) et présente une teneur en sel trop faible par rapport à la cible fixée (1,15-1,45 % contre 2,50 % attendu). C'est ce dernier qui devra être optimiser en priorité puisque les fromages de Herve sont traditionnellement produits par acidification biologique, constituant donc la voie de production la plus représentative du produit visé. Ces résultats obtenus sur une production unique par mode d'acidification devront être confirmés par des productions répétées avant de pouvoir parler d'une validation formelle du modèle. Des ajustements du protocole, notamment sur la teneur en sel visée pour le lot F, permettront par ailleurs de rapprocher le modèle des caractéristiques technologiques attendues.

Les quatre durées de saumurage testées visaient à identifier la condition la plus favorable pour les productions futures. Les résultats montrent que le gradient de teneur en sel initialement observé entre les conditions s'estompe progressivement au cours de l'affinage, jusqu'à devenir non discriminant en fin de suivi pour les deux lots. Cette homogénéisation s'explique par la redistribution du sel par diffusion et à l'effet uniformisant des lavages hebdomadaires à concentration de sel régressive. Sur les autres paramètres (pH, a_w , dénombrements microbiologiques), aucun effet marqué de la durée de saumurage n'est observé, quels que soient le point d'analyse et le lot considéré. La durée de saumurage n'est donc pas un paramètre critique et pourrait donc être fixée arbitrairement dans les prochaines productions.

Enfin, la caractérisation métagénétique confirme la pertinence du FR pour l'étude de *Fusobacterium* sp. Malgré les différences de composition globale observées entre les deux modes d'acidification et par rapport au fromage de taille standard analysé en 2024, la souche parvient à s'implanter dans les deux lots et suit une dynamique d'affinage comparable à celle observée dans le modèle traditionnel. Ces observations, obtenues sur une production unique par mode d'acidification, devront être confirmées par des productions répétées afin de valider formellement le modèle. Cette validation constituera une étape indispensable avant de pouvoir

conduire les essais d'inoculation contrôlée de *L. monocytogenes* visant à démontrer l'activité inhibitrice de la souche.

Plusieurs limites doivent être considérées pour interpréter ces résultats. Chaque mode d'acidification n'a été testé que sur une seule production, sans réplicat biologique, ce qui limite la portée statistique des observations. Les deux lots ayant été produits à des périodes différentes et à partir de fromages commerciaux de sources distinctes, la comparaison directe reste également fragile. Sur le plan physico-chimique, la teneur cible en sel de 2,50 % n'a été atteinte dans aucun des deux lots (2,00-2,35 % pour AL et 1,15-1,45 % pour F), et la freinte du lot AL (42-46 %) dépasse largement la gamme classique attendue (5-15 %).

Ces limites ouvrent plusieurs perspectives pour la suite du projet. La priorité est de répéter les productions afin de valider la reproductibilité du modèle, en standardisant la source des fromages commerciaux utilisés pour préparer les SL et en ajustant la teneur en sel visée pour le lot F. Ce dernier constitue en effet la voie de production la plus représentative du fromage de Herve traditionnel, produit par acidification biologique, et présente en outre une évolution favorable de *Fusobacterium* au cours de l'affinage et de la conservation. L'optimisation du protocole du lot F pourra ensuite être poursuivie plus finement, notamment en testant par des co-cultures *in vitro* l'hypothèse d'une association métabolique entre *Fusobacterium* et *Lactococcus* suggérée par nos données métagénomiques. Enfin, une fois le modèle validé, les essais d'inoculation contrôlée de *L. monocytogenes* permettront d'évaluer l'activité inhibitrice de la souche dans un cadre reproductible et à échelle réduite, offrant l'avantage de multiplier le nombre d'échantillons tout en limitant les coûts expérimentaux liés à la production fromagère.

Bibliographie

- Bendig, T.A.L., Abee, T., Boeren, S., Smid, E.J., van Mastrigt, O., 2025. Alkaline pH-Driven Metabolic Plasticity of *Lactococcus lactis* FM03. *Environmental Microbiology* 27, e70200. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.70200>
- Camargo, A.C., de Araújo, J.P.A., Fusieger, A., de Carvalho, A.F., Nero, L.A., 2021. Microbiological quality and safety of Brazilian artisanal cheeses. *Braz J Microbiol* 52, 393–409. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00416-9>
- Cipolat-Gotet, C., Malacarne, M., Summer, A., Cecchinato, A., Bittante, G., 2020. Modeling weight loss of cheese during ripening and the influence of dairy system, parity, stage of lactation, and composition of processed milk. *Journal of Dairy Science* 103, 6843–6857. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17829>
- Commission européenne, 2024. Règlement (UE) 2024/1143 du Parlement européen et du Conseil du 11 avril 2024 concernant les indications géographiques relatives au vin, aux boissons spiritueuses et aux produits agricoles, ainsi que les spécialités traditionnelles garanties et les mentions de qualité facultatives applicables aux produits agricoles. Texte consolidé du 18 mars 2026. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2024/1143/2026-03-18> Consulté le 27 août 2026.
- Confédération belge de l'industrie laitière (BCZ-CBL), 2025. Rapport annuel 2025. <https://www.bcz-cbl.be/fr/rapport-annuel-2025> Consulté le 27 août 2026.
- Dalzini, E., Cosciani-Cunico, E., Monastero, P., Bernini, V., Neviani, E., Bellio, A., Decastelli, L., Losio, M.-N., Daminelli, P., Varisco, G., 2017. *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheese: Study of the behaviour throughout the process and growth prediction during shelf life. *Int J Food Microbiol* 262, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.018>
- De Witte, C., Flahou, B., Ducatelle, R., Smet, A., De Bruyne, E., Cnockaert, M., Taminiau, B., Daube, G., Vandamme, P., Haesebrouck, F., 2017. Detection, isolation and characterization of *Fusobacterium gastrosuis* sp. nov. colonizing the stomach of pigs. *Syst Appl Microbiol* 40, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.10.001>
- EFSA, 2024. DRV Finder — Dietary Reference Values for nutrients. <https://multimedia.efsa.europa.eu/drvs/index.htm> Consulté le 27 août 2026.
- EFSA, Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC), 2025. The European Union One Health 2024 Zoonoses Report. *EFSA J.* 23 : e9759, doi:10.2903/j.efsa.2025.9759.
- EFSA, Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC), 2025. The European Union One Health 2024 Zoonoses Report. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2025.9759> Consulté le 27 août 2026.
- Eurostat, 2025. Key figures on the European food chain — 2024 edition. Consulté le 27 août 2026.
- Falardeau, J., Yildiz, E., Yan, Y., Castellarin, S.D., Wang, S., 2023. Microbiome and Physicochemical Features Associated with Differential *Listeria monocytogenes* Growth in Soft, Surface-Ripened Cheeses. *Applied and Environmental Microbiology* 89, e02004-22. <https://doi.org/10.1128/aem.02004-22>
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., Stasiewicz, M.J., 2014. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *J Food Prot* 77, 150–170. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>

- Field, D., Fernandez de Ullivarri, M., Ross, R.P., Hill, C., 2023. After a century of nisin research - where are we now? *FEMS Microbiol Rev* 47, fuad023. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad023>
- Gérard, A., 2021. ASSESSMENT OF THE GROWTH OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN BELGIAN ARTISANAL CHEESES AND INVESTIGATIONS ON FACTORS GOVERNING IT.
- Gérard, A., El-Hajjaji, S., Niyonzima, E., Daube, G., Sindic, M., 2018. Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in various types of cheese—A review. *International Journal of Dairy Technology* 71, 825–843. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12552>
- Gherghina, E., Israel-Roming, F., Balan, D., Luta, G., Popa, A., Zachia, M., 2021. Assessment of vitamin content in different types of romanian cheese. *Romanian Biotechnological Letters* 26, 2375–2383. <https://doi.org/10.25083/rbl/26.2/2375.2383>
- Guinee, T.P., Feeney, E.P., Auty, M.A.E., Fox, P.F., 2002. Effect of pH and Calcium Concentration on Some Textural and Functional Properties of Mozzarella Cheese. *Journal of Dairy Science* 85, 1655–1669. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74238-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74238-0)
- Jackson, K.A., Gould, L.H., Hunter, J.C., Kucerova, Z., Jackson, B., 2018. Listeriosis Outbreaks Associated with Soft Cheeses, United States, 1998–20141. *Emerg Infect Dis* 24, 1116–1118. <https://doi.org/10.3201/eid2406.171051>
- Juan, B., Trujillo, A.-J., 2022. Acid and Rennet Coagulation Properties of A2 Milk. *Foods* 11, 3648. <https://doi.org/10.3390/foods11223648>
- Kindstedt, P.S., 2013. The Basics of Cheesemaking. *Microbiology Spectrum* 1, 10.1128/microbiolspec.cm-0002–2012. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.cm-0002-2012>
- Leclercq-Perlat, M.-N., Saint-Eve, A., Picque, D., Trelea, I.-C., 2024. Microbiological, physicochemical, and sensory changes throughout ripening of an experimental soft smear-ripened cheese in relation to salt concentrations. *Journal of Dairy Science* 107, 6393–6411. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-24307>
- Martinez-Rios, V., Dalgaard, P., 2018. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in European cheeses: A systematic review and meta-analysis. *Food Control* 84, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.020>
- Mayo, B., Rodríguez, J., Vázquez, L., Flórez, A.B., 2021. Microbial Interactions within the Cheese Ecosystem and Their Application to Improve Quality and Safety. *Foods* 10, 602. <https://doi.org/10.3390/foods10030602>
- Ministère de l'Économie, des Finances et de la Souveraineté industrielle et numérique (France), 2024. AOP, AOC, IGP, AB : ce qu'il faut savoir sur les labels de qualité. <https://www.economie.gouv.fr/particuliers/mes-droits-conso/alimentation/aop-aoc-igp-ab-ce-quil-faut-savoir-sur-les-labels-de> Consulté le 27 août 2026.
- O'Brien, N.M., O'Connor, T.P., 2004. Nutritional Aspects of Cheese, in: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier, pp. 573–581. [https://doi.org/10.1016/S1874-558X\(04\)80083-6](https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80083-6)
- Palacios, A., 2022. Multistate Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infections Linked to <span style=.
- Quijada, N.M., Schmitz-Esser, S., Zwirzitz, B., Guse, C., Strachan, C.R., Wagner, M., Wetzels, S.U., Selberherr, E., Dzieciol, M., 2020. Austrian Raw-Milk Hard-Cheese Ripening Involves Successional Dynamics of Non-Inoculated Bacteria and Fungi. *Foods* 9, 1851. <https://doi.org/10.3390/foods9121851>
- Riahi, M.H., Trelea, I.C., Leclercq-Perlat, M.-N., Picque, D., Corrieu, G., 2007. Model for changes in weight and dry matter during the ripening of a smear soft cheese under

- controlled temperature and relative humidity. *International Dairy Journal* 17, 946–953. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.11.002>
- Ritschard, J.S., Schuppler, M., 2024. The Microbial Diversity on the Surface of Smear-Ripened Cheeses and Its Impact on Cheese Quality and Safety. *Foods* 13, 214. <https://doi.org/10.3390/foods13020214>
- Sciensano, 2024. Résultats de l'enquête nationale de consommation alimentaire 2022-2023 — Lait, produits laitiers et alternatives végétales. <https://www.sciensano.be/fr/resultats-de-lenquete-nationale-de-consommation-alimentaire-2022-2023/consommation-alimentaire/lait-produits-laitiers-et-alternatives-vegetales> Consulté le 27 août 2026.
- Schvartzman, M.S., Gonzalez-Barron, U., Butler, F., Jordan, K., 2014. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear- or mold-ripened cheese. *Front Cell Infect Microbiol* 4, 90. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00090>
- Seiler, H., Bleicher, A., Busse, H.-J., Hufner, J., Scherer, S., 2012. *Psychroflexus halocasei* sp. nov., isolated from a microbial consortium on a cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 1850–1856. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.034801-0>
- Service public de Wallonie — Agriculture (SPW Agriculture), 2024. AOP, IGP, STG. <https://agriculture.wallonie.be/home/productions-agricoles/qualite/modes-de-productions-specifiques/aop-igp-stg.html> Consulté le 27 août 2026.
- Suzuki, T., Matsutani, M., Matsuyama, M., Unno, R., Matsushita, H., Sugiyama, M., Yamasato, K., Koizumi, Y., Ishikawa, M., 2021. Growth and metabolic properties of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacterial strains of *Marinilactibacillus psychrotolerans* isolated from surface-ripened soft cheese. *International Dairy Journal* 112, 104840. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104840>
- Van Assche, P.F., Wilssens, A.T., 1977. *Fusobacterium perfoetens* (Tissier) Moore and Holdeman 1973: Description and Proposed Neotype Strain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 27, 1–5. <https://doi.org/10.1099/00207713-27-1-1>

Annexes

Annexe A. tableau d'ensemencement à J1 du lot d'acidification chimique

Tableau XI. Plan d'ensemencement microbiologique au point initial J1 du lot AL

Échantillon	Flore	Dilutions / mode	Milieu	Incubation
Lait cru	Flore totale	D2 (P) et D3 (P)	PCA	30 °C / 72 h
	Entérobactéries	SM (P) et D1 (P)	VRBG	30 °C / 24 h
	Levures / moisissures	SM (S) et D1 (S)	YGC	25 °C / 72 h
Lait pasteurisé	Flore totale	SM (P) et D1 (P)	PCA	30 °C / 72 h
	Entérobactéries	SM (P)	VRBG	30 °C / 24 h
	Levures / moisissures	SM (S)	YGC	25 °C / 72 h
Fromage commercial VM	Flore totale	D4 (P) et D5 (P)	PCA	30 °C / 72 h
	Levures / moisissures	D2 (S) et D3 (S)	YGC	25 °C / 72 h
	Bactéries lactiques	D3 (P) et D4 (P)	MRS	30 °C / 72 h
	Entérobactéries	SM (P) et D1 (P)	VRBG	30 °C / 24 h
SL	Flore totale	D2 (P) et D3 (P)	PCA	30 °C / 72 h
	Levures / moisissures	D1 (S) et D2 (S)	YGC	25 °C / 72 h
	Entérobactéries	SM (P) et D1 (P)	VRBG	30 °C / 24 h
	Bactéries lactiques	D1 (P) et D2 (P)	MRS	30 °C / 72 h
Fromage test (après lavage)	Flore totale	SM (P) et D1 (P)	PCA	30 °C / 72 h
	Moisissures	D1 (S) et D2 (S)	YGC	25 °C / 72 h
	Bactéries lactiques	SM (P) et D1 (P)	MRS	30 °C / 72 h
	Entérobactéries	SM (P) et D1 (P)	VRBG	30 °C / 24 h

SM = solution-mère ; D1 à D6 = dilutions décimales ; P = ensemencement en profondeur ; S = ensemencement en surface.

Annexe B. synthèse des dénombrements microbiologiques

Les dénombrements sont exprimés en $\log_{10}$ UFC/g pour les échantillons solides (fromages) et en $\log_{10}$ UFC/mL pour les échantillons liquides (laits, SL, ferments réhydratés). Conventions : *n.d.* = non déterminé ; $\geq X$ = *au minimum* X (toutes dilutions saturées, >300 colonies par boîte) ; $< 1,00$ = sous la limite de détection.

1. Lot acide lactique

Tableau XII. Dénombrements des matières premières à J0

Échantillon	PCA	MRS	VRBG	YGC
Lait cru (J0)	4,89	<i>n.d.</i>	3,00	3,32
Lait pasteurisé (J0)	3,28	<i>n.d.</i>	$< 1,00$	$< 1,00$

Valeurs en $\log_{10}$ UFC/mL⁻¹ (échantillons liquides) ou $\log_{10}$ UFC/g (fromage commercial).

Tableau XIII. Dénombrement des solutions de lavages

Temps	PCA	MRS	VRBG	YGC
J0 (30/03)	6,81	6,13	$\geq 4,48$	$\geq 5,48$
J7 (07/04)	6,48	6,16	6,48	<i>n.d.</i>
J14 (14/04)	8,06	6,56	7,48	7,90
J21 (21/04)	7,18	6,10	$< 1,00$	7,43
J42 (11/05)	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

Valeurs exprimées en $\log_{10}$ UFC/mL

Tableau XIV. Dénombrements des mini-fromages à J1

Condition	PCA	MRS	VRBG	YGC
FR4	6,28	3,85	$\geq 4,48$	5,74
FR6	$\geq 4,48$	3,53	$\geq 4,48$	5,13
FR8	5,59	3,96	5,40	5,76
FR10	5,28	3,95	$\geq 4,48$	5,69

Valeurs en $\log_{10}$ UFC/g. Conditions FR4 à FR10 = durée de saumurage (4, 6, 8 et 10 min).

Tableau XV. Dénombrements des mini-fromages au cours de l'affinage et de la conservation

Temps	Condition	PCA	MRS	VRBG	YGC
J7 (07/04)	FR4	8,48	7,47	6,48	<i>n.d.</i>
	FR6	8,48	7,48	6,48	<i>n.d.</i>
	FR8	8,48	7,36	6,48	<i>n.d.</i>
	FR10	8,48	7,14	6,48	<i>n.d.</i>
J14 (14/04)	FR4	8,77	7,36	8,48	8,10
	FR6	8,88	7,28	8,08	8,30
	FR8	8,85	7,26	7,41	8,14
	FR10	9,01	7,85	8,48	8,10
J21 (21/04)	FR4	9,23	<i>n.d.</i>	7,99	7,27
	FR6	8,45	<i>n.d.</i>	8,16	7,40
	FR8	8,43	<i>n.d.</i>	8,14	7,41
	FR10	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	7,72	7,26
J28 (27/04)	FR4	8,13	6,85	7,20	6,89
	FR6	8,45	6,91	<i>n.d.</i>	6,52
	FR8	8,20	6,85	7,26	6,58
	FR10	8,10	6,45	7,51	6,75
J42 (11/05)	FR4	8,81	7,57	6,18	6,58
	FR6	8,83	7,38	7,09	7,08
	FR8	8,41	8,15	6,73	6,65
	FR10	8,36	8,91	6,86	6,72

Valeurs en $\log_{10}$ UFC/g.

2. Lot ferments

Tableau XVI. Matières premières, solutions de lavages et ferments

Échantillon	PCA	MRS	VRBG	YGC
Lait cru	4,38	2,61	<i>n.d.</i>	3,28
Lait pasteurisé	3,02	< 1,00	< 1,00	< 1,00
SL	6,64	5,48	< 1,00	7,81
Ferment BLO	8,18	< 1,00	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Ferment R-704 (Hansen)	9,63	6,90	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

Valeurs en $\log_{10}$ UFC/mL (tous les échantillons du Tableau B1 sont liquides).

Tableau XVII. Dénombrement des solutions de lavages

Le suivi des SL n'a pas été poursuivi au-delà de J14.

Temps	PCA	MRS	VRBG	YGC
J1 (10/06)	6,64	5,48	< 1,00	7,81
J7 (17/06)	<i>n.d.</i>	7,27	3,00	<i>n.d.</i>

Valeurs en $\log_{10}$ UFC/mL.

Tableau XVIII. Dénombrements des mini-fromages au cours de l'affinage et de la conservation

Temps	Condition	PCA	MRS	VRBG	YGC
J7 (17/06)	FR4	8,00	9,43	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	FR6	9,49	9,12	< 1,00	<i>n.d.</i>
	FR8	9,80	<i>n.d.</i>	< 1,00	<i>n.d.</i>
	FR10	9,71	<i>n.d.</i>	< 1,00	<i>n.d.</i>
J14 (24/06)	FR4	9,18	9,30	5,92	< 1,00
	FR6	9,32	8,18	6,49	8,43
	FR8	9,36	8,67	5,26	8,26
	FR10	8,99	8,38	< 1,00	8,54
J21 – 8 °C (01/07)	FR4	9,23	7,60	<i>n.d.</i>	7,18
	FR6	8,99	< 1,00	6,35	<i>n.d.</i>
	FR8	9,32	< 1,00	5,75	<i>n.d.</i>
	FR10	9,36	<i>n.d.</i>	5,05	<i>n.d.</i>
J21 – 12 °C (01/07)	FR4	9,46	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	< 1,00
	FR6	8,40	< 1,00	6,43	<i>n.d.</i>
	FR8	9,18	< 1,00	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
	FR10	9,30	< 1,00	5,20	< 1,00
J28 (08/07)	FR4	9,53	< 1,00	6,90	7,58
	FR6	8,97	< 1,00	6,33	7,70
	FR8	9,49	< 1,00	6,65	7,87
	FR10	9,04	< 1,00	<i>n.d.</i>	7,59

Valeurs en log₁₀ UFC/g. À J21, le lot a été dédoublé pour tester deux températures de conservation (8 °C vs 12 °C)

Annexe C. Synthèse des résultats métagénétiques

Tableau XIX. Composition du microbiote des solutions de lavages et des fromages modèles de J1 à J14 — Lot acide lactique

Genre	J1.SL	J7SL	J14.SL	J21.SL	J1.FR4	J1.FR6	J1.FR8	J1.FR10	J7.FR4	J7.FR6	J7.FR8	J7.FR10	J14.FR4	J14.FR6	J14.FR8	J14.FR10
<i>Fusobacterium</i>	61,4	-	6,8	49,6	48,6	29,1	47,2	47,7	0,39	0,60	-	0,21	10,3	9,7	21,7	9,2
<i>Psychrobacter</i>	19,0	56,9	37,3	19,8	19,5	18,8	24,4	21,5	0,69	1,2	1,3	10,3	5,5	11,4	19,0	7,2
<i>Arcobacter</i>	-	-	-	-	0,19	0,47	0,18	0,14	1,3	3,9	8,1	7,8	49,3	47,5	32,2	47,3
<i>Corynebacterium</i>	-	-	0,14	-	-	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vagococcus</i>	13,5	28,3	39,4	20,4	16,2	20,8	15,4	16,5	12,7	11,8	9,0	6,6	6,9	2,4	2,6	7,6
<i>Marinilactibacillus</i>	0,35	0,39	3,1	0,47	0,68	1,1	0,50	0,65	1,2	2,8	2,1	11,9	8,8	12,7	7,6	10,1
<i>Serratia</i>	0,58	-	2,3	-	2,6	3,7	2,6	2,8	68,7	61,7	57,6	15,4	12,9	1,5	0,76	8,0
<i>Pseudoalteromonas</i>	2,0	11,6	7,7	2,7	5,7	6,8	4,8	5,0	10,7	14,2	18,0	42,6	3,2	9,4	6,9	4,4
<i>Glutamicibacter</i>	-	1,4	1,6	4,3	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4	3,4	6,4	4,4
<i>Xanthobacteraceae_ge</i>	-	-	-	-	3,4	17,2	2,1	2,6	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrionaceae_ge</i>	-	0,89	1,1	0,86	0,14	0,20	0,13	0,19	0,55	0,60	1,0	4,0	1,0	1,4	1,9	1,2
<i>Enterobacterales_ge</i>	0,13	0,34	0,45	-	-	0,12	-	-	3,9	3,1	2,7	1,1	0,54	0,26	0,25	0,50
<i>Psychrilyobacter</i>	2,9	-	-	1,6	2,9	1,5	2,6	2,7	-	-	-	-	-	0,20	0,69	-
<i>Brevibacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Autres</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abondance relative (%) des 15 genres bactériens les plus représentés dans les SL et les FR du lot AL de J1 à J14, aux différents points d'analyse. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du microbiote total, calculé sur les 10 000 séquences retenues après sous-échantillonnage. Les genres sont classés par abondance décroissante sur l'ensemble du lot. x_ge = espèce non identifié, appartient au genre x ; - = abondance inférieure à 0,1 %

Tableau XX. Composition des fromages modèles de J21 à J42— Lot acide lactique

Genre	J21.FR4	J21.FR6	J21.FR8	J21.FR10	J28.FR4	J28.FR6	J28.FR8	J28.FR10	J42.FR4	J42.FR6	J42.FR8	J42.FR10
<i>Fusobacterium</i>	2,1	6,1	9,1	12,9	1,5	19,7	1,7	2,5	8,4	0,33	0,62	0,76
<i>Psychrobacter</i>	17,6	19,5	32,0	24,9	9,8	8,1	8,8	8,6	2,4	1,1	0,93	2,1
<i>Arcobacter</i>	43,7	33,3	24,3	28,8	21,9	4,0	5,3	4,0	2,8	0,62	0,94	2,6
<i>Corynebacterium</i>	0,57	0,26	0,14	0,19	6,5	21,4	40,9	47,3	48,7	67,1	67,1	54,2
<i>Vagococcus</i>	8,5	10,8	8,3	4,3	12,1	7,7	5,5	5,5	7,4	7,2	3,7	4,8
<i>Marinilactibacillus</i>	12,2	15,8	15,6	17,2	27,1	31,8	23,6	15,9	24,3	17,3	24,4	21,9
<i>Serratia</i>	4,9	7,0	4,0	1,3	2,1	0,47	0,74	0,44	0,51	0,52	-	0,75
<i>Pseudoalteromonas</i>	5,0	2,5	2,7	4,4	13,9	3,0	6,8	10,8	1,4	0,36	0,30	2,1
<i>Glutamicibacter</i>	4,4	3,7	2,7	5,2	4,2	3,0	4,3	3,2	2,8	1,9	1,4	5,1
<i>Xanthobacteraceae_ge</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrionaceae_ge</i>	0,28	0,36	0,25	0,34	0,12	0,12	0,16	0,33	-	-	-	-
<i>Enterobacterales_ge</i>	0,33	0,36	0,84	0,31	0,22	0,24	-	0,10	0,13	0,12	-	-
<i>Psychrilyobacter</i>	-	-	-	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brevibacterium</i>	0,31	0,20	-	0,13	0,61	0,38	2,0	1,4	1,1	3,2	0,48	5,5
<i>Autres</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abondance relative (%) des 15 genres bactériens les plus représentés dans les FR du lot AL de 21 à J42, aux différents points d'analyse. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du microbiote total, calculé sur les 10 000 séquences retenues après sous-échantillonnage. Les genres sont classés par abondance décroissante sur l'ensemble du lot. x_ge = espèce non identifiée, appartient au genre x ; - = abondance inférieure à 0,1 %.

Tableau XXI. Composition des solutions de lavage et des fromages modèles de J1 à J14— Lot ferments

Genre	SL J1	SL J7	J1F-1	J1F-2	J1F-3	J1F-5	J1F-6	J1F-7	J1F-8	J7 FR4	J7 FR6	J7 FR8	J7 FR10	J14 FR4	J14 FR6	J14 FR8	J14 FR10
<i>Lactococcus</i>	0,45	1,9	98,8	97,5	96,9	96,2	95,4	99,0	98,6	62,3	59,2	65,1	58,9	47,9	48,3	60,0	43,1
<i>Pseudoalteromonas</i>	3,6	4,8	-	-	-	-	-	-	-	0,38	0,28	0,20	1,6	17,5	22,2	9,0	21,2
<i>Psychrobacter</i>	2,5	38,9	1,1	2,4	2,8	3,6	4,3	0,83	1,2	1,1	1,7	1,1	2,4	11,9	10,4	10,2	11,7
<i>Brochothrix</i>	32,7	26,2	-	-	-	-	-	-	-	6,5	4,3	6,8	6,8	8,4	9,8	11,6	9,0
<i>Marinomonas</i>	1,3	15,0	-	-	-	-	-	-	-	28,5	33,4	26,0	28,9	1,3	0,69	0,44	0,88
<i>Psychroflexus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	1,8	0,77	2,3
<i>Vagococcus</i>	0,33	9,2	-	-	-	-	-	-	-	0,49	0,59	0,25	0,42	3,9	2,2	4,1	3,8
<i>Fusobacterium</i>	-	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,7	1,9	1,4	4,7
<i>Vibrio</i>	45,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,20	1,3	0,54	0,43	0,48
<i>Marinilactibacillus</i>	-	2,9	-	-	0,15	-	-	-	-	0,39	0,21	0,22	0,40	2,0	1,1	1,6	1,7
<i>Vibrionaceae_ge</i>	14,0	0,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15	0,41	0,20	-	0,17
<i>Halomonas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14	-	-	-
<i>Streptococcaceae_ge</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,23	0,25	0,30	-	0,98	0,22	0,18	-
<i>Glutamicibacter</i>	-	0,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,46	0,52	0,31	0,73
<i>Autres</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abondance relative (%) des 15 genres bactériens les plus représentés dans les SL et les FR du lot F de J1 à J14, aux différents points d'analyse. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du microbiote total, calculé sur les 10 000 séquences retenues après sous-échantillonnage. Les genres sont classés par abondance décroissante sur l'ensemble du lot. x_ge = espèce non identifiée, appartient au genre x ; - = abondance inférieure à 0,1 %.

Tableau XXII. Composition des fromages modèles de J21 à J42— Lot ferments

Genre	J21-8 FR4	J21-8 FR6	J21-8 FR8	J21-8 FR10	J21-12 FR4	J21-12 FR6	J21-12 FR10	J28 FR4	J28 FR6	J28 FR8	J28 FR10
<i>Lactococcus</i>	51,3	47,5	48,7	42,3	48,3	48,0	40,8	53,6	45,1	46,4	42,3
<i>Pseudalteromonas</i>	22,5	24,0	24,8	23,5	15,8	14,3	16,2	10,9	9,9	7,4	11,5
<i>Psychrobacter</i>	9,1	8,4	6,9	7,5	7,3	6,5	7,1	10,3	10,8	8,9	9,6
<i>Brochothrix</i>	7,6	5,3	6,5	7,7	6,5	9,1	8,2	6,6	6,4	6,7	5,7
<i>Marinomonas</i>	-	0,12	0,20	1,1	-	-	0,11	-	0,12	0,29	-
<i>Psychroflexus</i>	2,0	5,3	6,1	6,5	10,7	12,2	17,2	5,3	9,4	8,0	14,1
<i>Vagococcus</i>	3,8	3,1	2,8	2,5	3,4	4,9	3,4	5,9	6,3	5,8	4,0
<i>Fusobacterium</i>	0,61	2,9	1,4	6,0	2,7	2,0	3,2	2,1	7,6	12,2	8,6
<i>Vibrio</i>	0,25	0,84	0,63	0,35	0,59	0,37	0,61	0,30	0,27	0,38	0,14
<i>Marinilactibacillus</i>	0,72	0,93	1,3	1,3	1,4	0,78	1,5	1,4	1,6	2,1	1,2
<i>Vibrionaceae_ge</i>	0,12	0,28	0,25	0,17	0,17	-	0,14	0,21	0,10	-	0,16
<i>Halomonas</i>	0,49	0,72	-	-	1,7	0,48	1,3	1,7	1,6	1,3	1,4
<i>Streptococcaceae_ge</i>	1,0	0,14	0,20	0,88	0,90	1,2	0,11	1,0	0,19	0,12	0,94
<i>Glutamicibacter</i>	0,44	0,36	0,29	0,16	0,54	0,26	0,11	0,72	0,64	0,37	0,26
<i>Autres</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abondance relative (%) des 15 genres bactériens les plus représentés dans les FR du lot F de 21 à J42, aux différents points d'analyse. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du microbiote total, calculé sur les 10 000 séquences retenues après sous-échantillonnage. Les genres sont classés par abondance décroissante sur l'ensemble du lot. *x_ge* = espèce non identifiée, appartient au genre *x* ; - = abondance inférieure à 0,1 %.